



**HAL**  
open science

# Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude de la silanisation de surface

Zahi Hjezi

► **To cite this version:**

Zahi Hjezi. Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées : étude de la silanisation de surface. Matériaux. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0117 . tel-01291875

**HAL Id: tel-01291875**

**<https://theses.hal.science/tel-01291875v1>**

Submitted on 22 Mar 2016

**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.

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences et Ingénierie en Matériaux,  
Mécanique, Energétique et Aéronautique (SI-MMEA)

UNITE DE RECHERCHE Science des Procédés Céramiques et  
Traitements de Surface

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité :

Matériaux Céramiques et Traitements de Surface

Présentée par

Zahi HJEZI

Soutenance prévue le 9 décembre 2015

**Biocéramiques phosphocalciques fonctionnalisées :  
étude de la silanisation de surface**

Thèse dirigée par : Eric CHAMPION et Chantal DAMIA

JURY :

Rapporteurs

M. Eric DEYDIER

Maître de Conférences HDR, Université de Toulouse

M. Jean-Christophe HORNEZ

Maître de Conférences HDR, Université de Valenciennes

Examineurs

M. Jean-Michel BOULER

Professeur – Université de Nantes

M. Vincent CHALEIX

Professeur – Université de Limoges

M. Eric CHAMPION

Professeur – Université de Limoges

Mme Chantal DAMIA

Maître de Conférences – Université de Limoges



## Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de plusieurs années de recherches menées au sein du Laboratoire Science des Procédés Céramiques et Traitements de Surface (SPCTS) au Centre Européen de la Céramique (CEC) de l'Université de Limoges. Je tiens à remercier la Région Limousin pour le financement de ces travaux de thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir lu attentivement ce manuscrit, émis des critiques constructives, écouté ma soutenance et m'avoir décerné le titre de docteur, à savoir les deux rapporteurs M. Eric DEYDIER, Maître de Conférences HDR à l'Université de Toulouse et M. Jean-Christophe HORNEZ, Maître de Conférences HDR à l'Université de Valenciennes ainsi que les deux examinateurs M. Jean-Michel BOULER, Professeur de l'Université de Nantes et M. Vincent CHALEIX, Professeur de l'Université de Limoges.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Monsieur Eric CHAMPION, Professeur de l'Université de Limoges, pour avoir dirigé mes recherches et pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ces années de thèse. Je souhaite remercier également Madame Chantal DAMIA, Maître de Conférences à l'Université de Limoges, pour m'avoir co-encadré et guidé lors de la réalisation de ce travail. Merci pour leur présence, leur soutien, leur rigueur scientifique et leurs qualités humaines.

D'un point de vue technique et scientifique je ne pourrais omettre de remercier grandement Evelyne Poli pour son aide dans les traitements des résultats, Etienne Laborde pour les analyses XPS, Solange Degot pour les analyses TG-SM, Julie Cornette pour les analyses FT-IR, Richard Mayet pour les analyses DRX et Pierre Carles pour les images MEB.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué par leurs discussions ou leur participation à la réalisation de ce travail, et tout particulièrement à Madame Chantal Damia, Marie Lasgorceix, Eddy Nougier et Marie-Michèle Germaini. Je n'oublie pas mes collègues céramistes, les anciens comme les nouveaux. Je n'ai pas assez de place ici pour les remercier pour leur amitié et leurs conseils. Ces années resteront gravées dans ma mémoire.

Mes remerciements les plus vifs vont tout particulièrement à mes parents et mes sœurs (Zeina, Mona, Najwa et Soha) qui ont joué évidemment un très grand rôle dans cette thèse. Leurs

soutiens moraux et matériels m'ont été indispensables tout au long de mes années d'études.  
J'espère que ce travail témoigne toute ma reconnaissance et mon estime à leur égard.

*YA RAB*



# Sommaire

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>7</b>
<b>I.1. Le tissu et les substituts osseux .....</b>	<b>7</b>
I.1.1. Le tissu osseux .....	7
I.1.1.1. La matrice osseuse .....	8
I.1.1.2. Les cellules osseuses.....	9
I.1.2. Les substituts osseux d'origine naturelle .....	11
I.1.3. Les substituts osseux synthétiques .....	12
I.1.3.1. Première génération : les biomatériaux inertes .....	13
I.1.3.2. Deuxième génération .....	14
a. Les biomatériaux bioactifs et biorésorbables .....	14
b. Mécanisme d'intégration d'une céramique bioactive .....	17
c. Les limites de biomatériaux bioactifs et biorésorbables.....	19
I.1.3.3. Troisième génération : les biomatériaux ostéoinducteurs.....	19
<b>I.2. Fonctionnalisation de surface.....</b>	<b>23</b>
I.2.1. Les molécules biologiques d'intérêt .....	23
I.2.1.1. Les séquences peptidiques RGD .....	23
I.2.1.2. Les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire.....	25
I.2.1.3. Les facteurs de croissances.....	25
I.2.2. Les différentes voies de fonctionnalisation.....	28
I.2.2.1. Fonctionnalisation par physisorption .....	28
I.2.2.2. Fonctionnalisation par chimisorption.....	30
I.2.2.3. Fonctionnalisation par greffage covalent .....	32
<b>I.3. Fonctionnalisation de surface par silanisation .....</b>	<b>33</b>
I.3.1. Définition d'un organosilane .....	33
I.3.2. Réactivité chimique d'un organosilane .....	33
I.3.3. Paramètres influençant la silanisation .....	36
I.3.3.1. Effet du pH et de la nature du solvant.....	39

## Sommaire

I.3.3.2. Effet de la température .....	41
I.3.3.3. Concentration de l'organosilane en solution .....	42
I.3.3.4. Effet de la longueur de la chaîne carbonée et du temps de silanisation.....	43
I.3.3.5. Fonctionnalité et nature des substituant organiques .....	45
I.3.3.6. Conclusion .....	46
I.3.4. Silanisation de la surface de phosphates de calcium en vue d'une fonctionnalisation thérapeutique ..	47
<b>I.4. Conclusion.....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE II - ELABORATION ET CARACTERISATION DES SUBSTRATS, CARACTERISATION DES AGENTS DE GREFFAGE.....</b>	<b>59</b>
<b>II.1. Elaboration des substrats phosphocalciques .....</b>	<b>59</b>
II.1.1. L'hydroxyapatite phosphocalcique.....	59
II.1.1.1. Données cristallographiques et substitutions .....	59
II.1.1.2. L'hydroxyapatite silicatée .....	61
II.1.2. Elaboration des substrats .....	62
II.1.2.1. Synthèse des poudres.....	62
II.1.2.2. Mise en forme des substrats .....	65
<b>II.2. Techniques de caractérisation .....</b>	<b>65</b>
II.2.1. Caractérisations physico-chimiques .....	65
II.2.1.1. Analyse par spectroscopie infrarouge .....	65
II.2.1.2. Analyse qualitative par diffraction des rayons X .....	66
II.2.1.3. Affinement des paramètres de maille .....	66
II.2.1.4. Analyse par spectroscopie de photoélectrons X .....	67
II.2.1.5. Analyses élémentaires .....	67
II.2.1.6. Microscopie électronique à balayage.....	68
II.2.1.7. Microscopie à force atomique.....	68
II.2.1.8. Analyse de l'angle de contact .....	69
II.2.2. Analyses thermiques .....	69
II.2.3. Caractérisations physiques.....	70
II.2.3.1. Détermination de la masse volumique des poudres .....	70
II.2.3.2. Mesure de surface spécifique.....	71
II.2.3.3. Analyse granulométrique .....	71
II.2.3.4. Mesure du potentiel zêta par zêtamétrie.....	72
II.2.3.5. Mesure de densité et détermination du taux de densification .....	72
<b>II.3. Caractérisation des substrats .....</b>	<b>72</b>
II.3.1. Pureté des poudres synthétisées .....	72
II.3.1.1. Analyse des phases secondaires.....	73

## Sommaire

II.3.1.2. Evaluation des paramètres de maille par affinement Rietveld .....	74
II.3.1.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge .....	77
II.3.1.4. Analyse chimique.....	78
II.3.2. Caractérisation des substrats pulvérulents .....	79
II.3.2.1. Composition des poudres .....	79
II.3.2.2. Caractérisations physiques des poudres .....	82
II.3.3. Caractérisation des pastilles .....	84
II.3.3.1. Composition des pastilles .....	84
II.3.3.2. Caractérisations physiques des pastilles .....	86
II.3.4. Détermination de la densité de sites X-OH accessibles à la surface des substrats .....	88
<b>II.4. Caractérisation des organosilanes utilisés .....</b>	<b>90</b>
II.4.1. Propriétés biologiques des organosilanes .....	90
II.4.2. Caractérisation des organosilanes.....	92
II.4.2.1. Analyse par spectroscopie infrarouge .....	92
II.4.2.2. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse .....	95
<b>II.5. Conclusion.....</b>	<b>104</b>
<b>CHAPITRE III - ETUDE DU GREFFAGE DES ORGANOSILANES A LA SURFACE DES SUBSTRATS .....</b>	<b>107</b>
<b>III.1. Protocole de greffage .....</b>	<b>107</b>
III.1.1. Mode opératoire .....	108
III.1.2. Evaluation du taux de recouvrement des sites .....	110
<b>III.2. Mode de greffage et quantification .....</b>	<b>111</b>
III.2.1. Morphologie des poudres après greffage .....	112
III.2.2. Mise en évidence de la présence des organosilanes.....	114
III.2.2.1. Analyse par spectroscopie infrarouge .....	114
III.2.2.2. Analyse des poudres par spectroscopie de photoélectrons X.....	116
a. Poudres non greffées .....	116
b. Poudres greffées .....	121
III.2.3. Détermination du mode de greffage des organosilanes .....	131
III.2.3.1. Analyse XPS sur pastilles greffées.....	131
III.2.3.2. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse.....	134
a. Poudres non greffées .....	134
b. Poudres greffées .....	138
III.2.4. Estimation de la quantité d'organosilane greffée .....	153
III.2.4.1. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse .....	153
III.2.4.2. Analyse élémentaire du carbone.....	154

## *Sommaire*

III.2.5. Discussion .....	159
<b>III.3. Caractérisation des substrats greffés : répartition spatiale des organosilanes.....</b>	<b>163</b>
III.3.1. Microscopie à force atomique (AFM).....	163
III.3.2. Etude de l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) par analyse de l'angle de contact.....	170
<b>III.4. Conclusion.....</b>	<b>181</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>185</b>
<b>Annexe 1. Calcium nitrate tetrahydrate .....</b>	<b>203</b>
<b>Annexe 2. di-Ammonium hydrogen orthophosphate .....</b>	<b>204</b>
<b>Annexe 3. Silicon tetraacetate .....</b>	<b>205</b>
<b>Annexe 4. Ammonia solution .....</b>	<b>206</b>
<b>Annexe 5. (3-Aminopropyl)triethoxysilane .....</b>	<b>207</b>
<b>Annexe 6. 3-Ethoxydimethylsilylpropylamine .....</b>	<b>208</b>
<b>Annexe 7. 3-Aminopropyl(diethoxy)methylsilane .....</b>	<b>209</b>
<b>Annexe 8. Liste des abréviations .....</b>	<b>210</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>211</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>215</b>

# Introduction

Le tissu osseux a deux fonctions principales, l'une structurelle (structure corporelle, protection des organes internes, mouvement) et l'autre métabolique (stock de sels minéraux, métabolisme phosphocalcique, formation des cellules sanguines). Il a la capacité à se renouveler par le phénomène du remodelage osseux. Ce processus physiologique assure le renouvellement du tissu osseux par la résorption de l'os ancien et son remplacement par une quantité équivalente de matrice osseuse nouvellement minéralisée. Dans certains cas, le remodelage osseux peut être limité et la quantité régénérée est insuffisante pour combler une zone lésée et réparer les traumatismes, l'apport d'un substitut osseux est donc nécessaire. Les substituts osseux naturels (autogreffe, allogreffe et xéno greffe) présentent différents inconvénients : douleurs résiduelles, transmission des maladies, problèmes éthiques et sociaux. C'est pour ces raisons que les substituts osseux synthétiques se sont largement répandus au cours de ces dernières années.

Parmi les biomatériaux, les céramiques à base de phosphate de calcium comme l'hydroxyapatite (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sont largement employées car elles présentent une composition chimique et une structure proche de la phase minérale osseuse [1]. L'hydroxyapatite partiellement substituée par des groupements silicates (SiHA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ) est actuellement étudiée. Sa bioactivité serait améliorée par l'incorporation de silicium dans sa structure cristalline [2], ce dernier jouant un rôle important dans la solidité, la formation et la calcification des tissus osseux [3, 4]. Ces hydroxyapatites sont parfaitement biocompatibles et permettent de restaurer un capital osseux compromis ou de favoriser la colonisation osseuse dans des situations cliniques très diverses. Les biocéramiques en HA et en SiHA sont ostéoconductrices, c'est-à-dire qu'elles possèdent la capacité de favoriser la croissance osseuse lorsqu'elles sont au contact d'un os [5, 6]. Cependant, ces biocéramiques ne sont pas ostéoinductrices, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables d'initier le phénomène de reconstruction osseuse sans contact direct avec l'os. Leur utilisation dans le cas des larges pertes osseuses, dans lesquelles le contact os-matériau ne se fait qu'aux extrémités de la zone à reconstruire, est de ce fait limitée.

## ***Introduction***

C'est pour cette raison que les recherches actuelles portent sur une nouvelle génération de biomatériaux capables de favoriser la croissance osseuse dans un large volume. On peut distinguer deux grandes approches concernant la recherche et le développement de ces matériaux : d'une part, associer à des matériaux, des cellules progénitrices issues du patient permettant leur différenciation ostéoblastique (*i.e.* matériaux hybrides), et d'autre part fonctionnaliser la surface de biocéramiques par des molécules biologiquement impliquées dans le processus de formation osseuse (peptide, protéine, facteur de croissance, *etc.*).

La présente étude s'inscrit dans ce contexte de développement d'une nouvelle génération de biocéramiques aux performances accrues, ayant la faculté d'induire la formation osseuse sans être en contact avec de l'os existant. Plus spécifiquement, ce mémoire porte sur le greffage covalent de molécules organosilanes à la surface de substrats en HA et SiHA pour une future immobilisation de biomolécules ostéogènes et angiogènes. Le greffage covalent doit permettre de limiter l'encombrement stérique des molécules biologiques et d'en contrôler la densité et le relargage en milieu biologique.

Ce manuscrit se compose de trois chapitres. Dans le premier chapitre, les bases bibliographiques nécessaires à la compréhension de l'étude sont rappelées. Tout d'abord, la composition du tissu osseux ainsi que les différentes générations de substituts osseux sont exposées. Puis, les molécules biologiques d'intérêt pour l'amélioration des propriétés ostéoinductrices ainsi que les différentes voies de fonctionnalisation de la surface d'un substrat sont présentées.

Le deuxième chapitre est consacré aux propriétés de l'hydroxyapatite phosphocalcique ainsi qu'aux différentes substitutions chimiques dont elle peut être le siège. Les techniques de caractérisation mises en œuvre tout au long de ce travail font l'objet de la deuxième partie de ce chapitre. La troisième partie est consacrée à la caractérisation des poudres et des pastilles en HA et SiHA utilisées comme substrats. Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre, les organosilanes utilisés comme agents de greffage sont présentés et caractérisés.

Le troisième et dernier chapitre est dédié à l'étude du greffage, à la surface des substrats en HA et SiHA, de molécules d'organosilanes ayant des fonctionnalités différentes. L'influence de la fonctionnalité des organosilanes et de la présence du silicium dans la structure apatite sur la nature et le mode de greffage est discutée au cours de ce chapitre.

# **Chapitre I - Synthèse bibliographique**

Le chapitre bibliographique est divisé en trois parties. Les constituants du tissu osseux ainsi que les différentes générations de substituts osseux sont exposés dans une première partie. La deuxième partie est consacrée, d'une part, aux molécules biologiques impliquées dans les processus de repousse osseuse et susceptibles de conférer des propriétés ostéoinductives aux biomatériaux, et d'autre part, aux techniques de fonctionnalisation de surface de ces biomatériaux. La dernière partie de cette synthèse bibliographique, se focalise sur la fonctionnalisation covalente de la surface d'un substrat par silanisation.

## **I.1. Le tissu et les substituts osseux**

### **I.1.1. Le tissu osseux**

Le tissu osseux assure plusieurs fonctions. Sa première fonction est mécanique, les os jouant un rôle important dans le soutien du corps et la protection des organes. Sa deuxième fonction est une fonction métabolique. En effet, il permet de stocker les sels minéraux et de contrôler le métabolisme phosphocalcique c'est-à-dire de réguler les concentrations en ions calcium et en ions phosphate dans l'organisme. Enfin, sa dernière fonction est hématopoïétique. Les cellules de la moelle osseuses fournissent un support structural et fonctionnel aux processus de renouvellement des cellules sanguines (hématopoïèse).

Le tissu osseux est un tissu conjonctif constitué d'une matrice extracellulaire organo-minérale et de cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes) (Figure I-1).

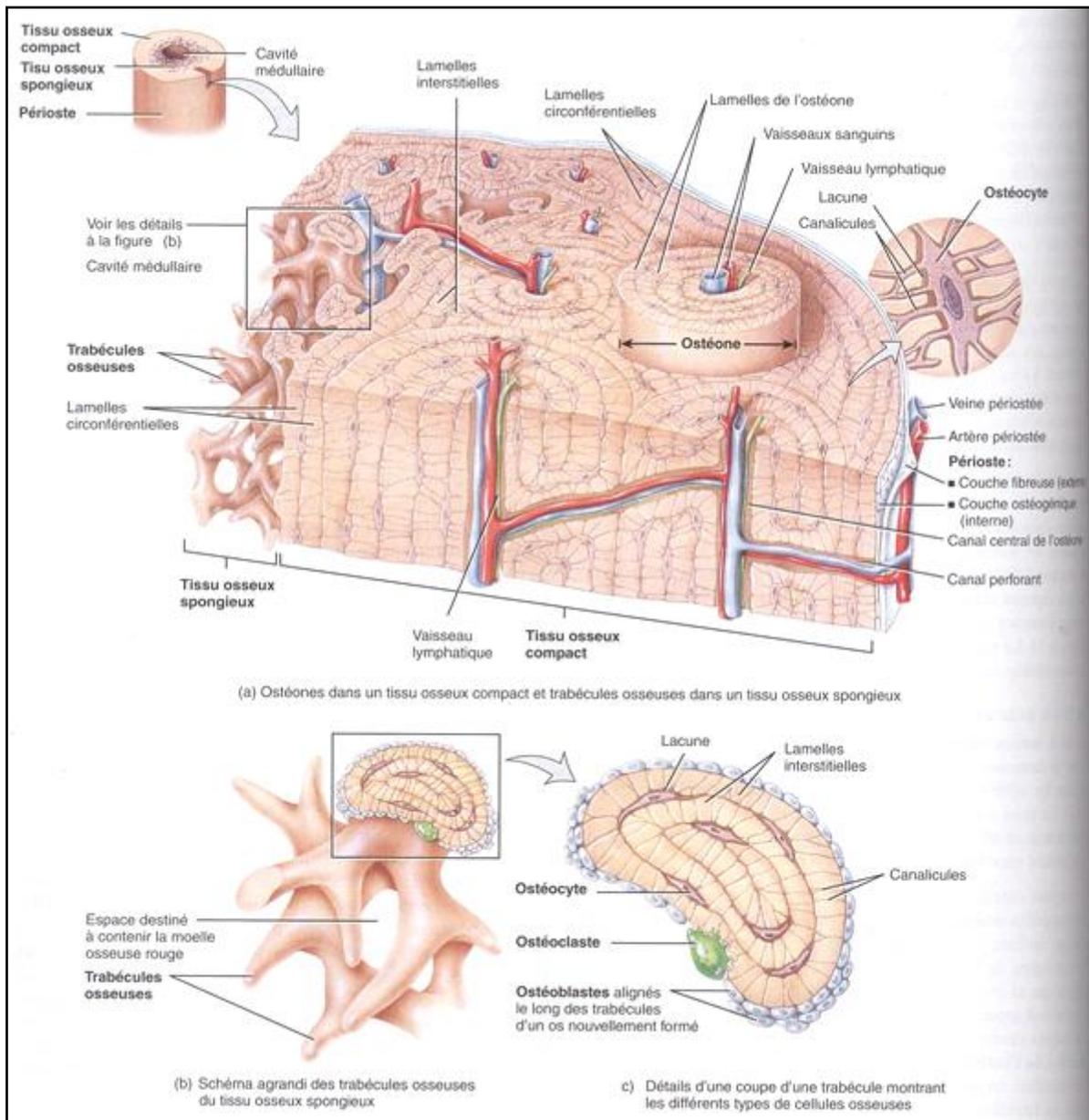
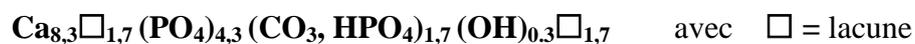


Figure I-1 : Schéma du tissu osseux [7]

### I.1.1.1. La matrice osseuse

La matrice osseuse est formée d'une phase minérale et d'une phase organique. La phase minérale représente 70% du poids de l'os sec, elle est constituée de cristaux d'hydroxyapatite présents sous forme périodique le long des fibres de collagène. Legros [8] a proposé une formule chimique approchée de cette phase minérale :



Cette formule décrit la phase minérale osseuse comme une hydroxyapatite déficiente en calcium, polysubstituée par des groupements hydrogénophosphonates ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) et carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). D'autres éléments minéraux peuvent être présents dans l'os comme les ions chlorure, sodium, silicium et magnésium. La phase organique est formée de 90% de collagène de type I. Ces fibres de collagène assurent la flexibilité de l'os alors que le minéral, qui se dépose à leur surface et entre elles, est responsable de la rigidité de tissu. L'arrangement des fibres dépend de leur emplacement dans l'os. La phase organique comprend également plusieurs protéines non collagéniques comme l'ostéocalcine, l'ostéopontine ou encore l'ostéonectine. Ces protéines ainsi que les facteurs de croissance sécrétés par les cellules ostéoblastiques, jouent un rôle important dans la minéralisation de la matrice osseuse et dans la régulation du remodelage du tissu osseux [9].

### **I.1.1.2. Les cellules osseuses**

On distingue deux types des cellules osseuses : les cellules ostéoblastiques (préostéoblastes, ostéocytes et ostéoblastes matures) qui contribuent à la formation osseuse et les cellules ostéoclastiques responsables de la résorption osseuse (Figure I-2).

Les cellules ostéoblastiques sont des cellules mononuclées de 20 à 50  $\mu\text{m}$  ayant comme origine les cellules progénitrices mésenchymateuses de la moelle osseuse. La fonction principale de ces cellules est de synthétiser et minéraliser la matrice osseuse.

Les ostéoclastes sont de grandes cellules (100  $\mu\text{m}$ ) plurinuclées qui interviennent dans la dégradation de la matrice osseuse. Ces cellules ont pour origine les cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse qui sont capables de se différencier en monocytes et en macrophages [10]. Ces cellules sécrètent des ions  $\text{H}^+$  et des enzymes spécifiques permettant de dissoudre la matière minérale de cette matrice osseuse.

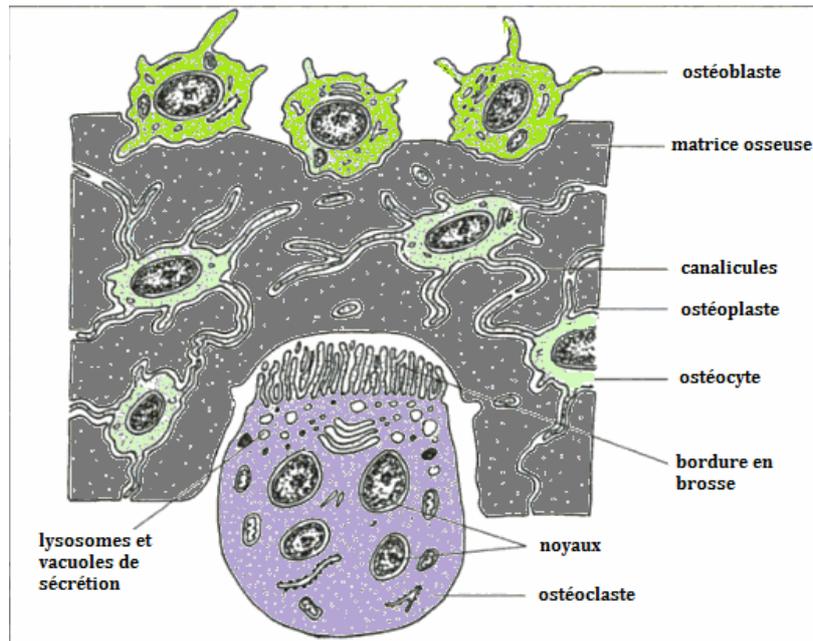


Figure I-2 : La matrice et les cellules osseuses [11]

Les cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques interviennent au cours du phénomène de remodelage osseux. Ce processus permet de substituer l'os ancien aux propriétés mécaniques dégradées par du nouveau tissu osseux et d'assurer la réparation des traumatismes [12]. Ce cycle de remodelage, illustré à la Figure I-3, est divisé en quatre étapes distinctes : la phase d'activation, la phase de résorption, la phase d'inversion et la phase de reconstruction. Pendant la phase d'activation, la surface osseuse est recouverte par des cellules bordantes qui se transforment en précurseurs mononucléés des ostéoclastes. Ensuite, les ostéoclastes activés résorbent l'os ancien durant la phase de résorption. Quand les ostéoclastes ont fini de creuser une lacune, ils meurent par apoptose (mort cellulaire programmée) et sont remplacés par des macrophages qui lissent le fond de la lacune (phase d'inversion). Enfin, lors de la phase de reconstruction, les cellules ostéoblastiques synthétisent la nouvelle trame osseuse.

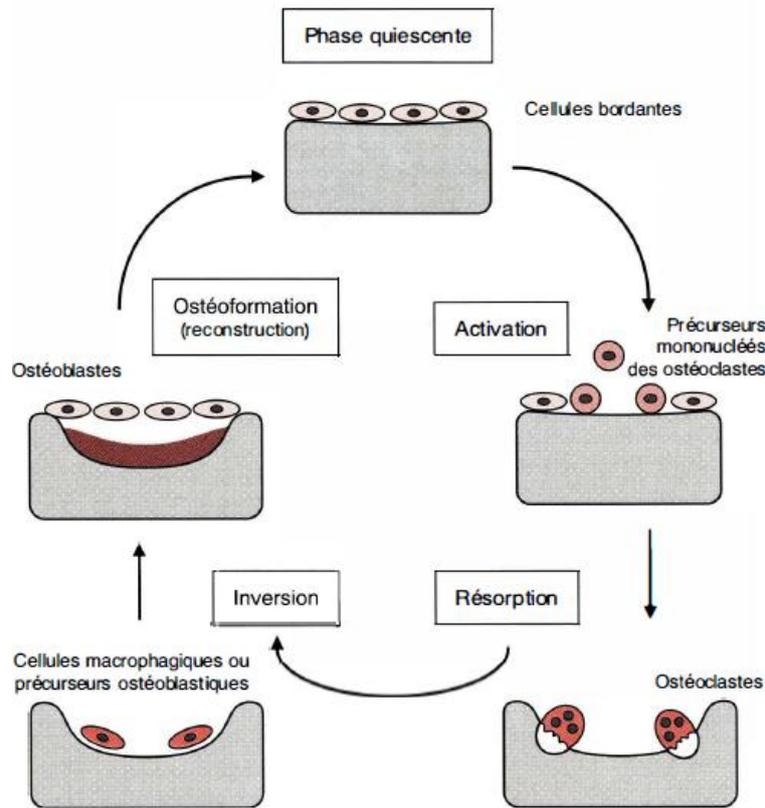


Figure I-3 : Illustration du cycle de remodelage osseux et rôle des ostéoblastes et ostéoclastes durant ce processus [13]

### I.1.2. Les substituts osseux d'origine naturelle

La substitution osseuse la plus évidente consiste à remplacer l'os déficient par un autre. Le substitut osseux peut alors provenir du patient lui-même (autogreffe), d'un autre individu (allogreffe) ou d'animaux (xélogreffe).

L'avantage principal de l'autogreffe, qui reste aujourd'hui le standard en matière de substitution osseuse, est l'absence de risque de rejet. Ce type de greffe est le plus adapté pour la reconstruction des pertes osseuses car l'implant est biocompatible et possède des propriétés d'ostéoconduction et d'ostéoinduction [14] ce qui permet de favoriser l'ostéogénèse, *i.e.* le processus d'élaboration du tissu osseux par les cellules ostéoblastes. Cependant, l'autogreffe nécessite deux interventions chirurgicales, la première pour le prélèvement osseux et la seconde pour la greffe osseuse. Cette contrainte allonge la durée de l'intervention chirurgicale, augmente les pertes sanguines et les risques infectieux. De plus, le prélèvement de greffe peut être accompagné de douleurs résiduelles [15, 16]. Enfin, la réalisation d'une

autogreffe est limitée par la quantité de greffon car seul un petit prélèvement, sur le patient, est toléré.

L'allogreffe présente l'avantage de diminuer la durée de l'intervention chirurgicale car elle ne nécessite qu'un seul site opératoire. Bien que de nombreuses précautions soient prises, les allogreffes posent des problèmes de compatibilité immunitaire et de rejet.

La plupart des xéno-greffes sont réalisées à partir d'os bovin du fait de ses propriétés proches de celles de l'os humain. Le principal avantage est d'accroître la réserve d'organes et de tissus disponibles pour les greffes. L'os spongieux bovin possède la propriété passive de favoriser la reconstruction osseuse (ostéoconduction). Cependant, les risques de transmission de virus et d'agents transmissibles non conventionnels (prion par exemple) ont considérablement diminué leur emploi [17].

Les matériaux synthétiques ne montrent aucun risque immunologique ou de transmission d'agents pathogènes (conventionnels ou non). Ils nécessitent un seul site opératoire, sont disponibles en quantité non limitée et ont un coût contrôlé. C'est pour ces raisons que les recherches se sont concentrées ces 60 dernières années sur l'élaboration de substituts osseux synthétiques performants.

### **I.1.3. Les substituts osseux synthétiques**

L'utilisation de matériaux de substitution osseuse augmente continuellement en chirurgie orthopédique, cranio-maxillofaciale et reconstructrice [18] due à un vieillissement global de la population mondiale [19], de la fréquence des maladies osseuses et des accidents.

La définition d'un biomatériau a été proposée lors du congrès de la société européenne des biomatériaux en 1986 à Chester. Les biomatériaux sont des matériaux non vivants conçus et utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques. Ces matériaux, lorsqu'ils sont appliqués à la substitution osseuse, devront être capables de présenter des liaisons avec l'os environnant et de favoriser sa croissance. Cependant, leur implantation présuppose qu'ils ne soient pas altérés par les fluides corporels ou par les mécanismes de défenses immunitaires de l'organisme. Ils doivent être biocompatibles, *i.e.* ne pas avoir d'effet toxique ou provoquer de réaction inflammatoire après implantation [20].

Les substituts osseux synthétiques ont connu des évolutions au cours du temps en termes de nature et de propriétés (Figure I-4). Entre les années 1960 et 1970, une première génération des biomatériaux inertes (métaux, céramiques et polymères bioinertes) est développée. L'amélioration de la biointégration de l'implant osseux a conduit à partir des années 1980 à une deuxième génération de substituts osseux dits bioactifs et biodégradables. Au cours des dernières années, les recherches portent sur le développement d'une troisième génération de biomatériaux favorisant l'intégration de l'implant et la régénération osseuse. Ce sont les biomatériaux ostéoinducteurs qui sont capables d'induire l'ostéogenèse dans un site extra-osseux [21, 22].

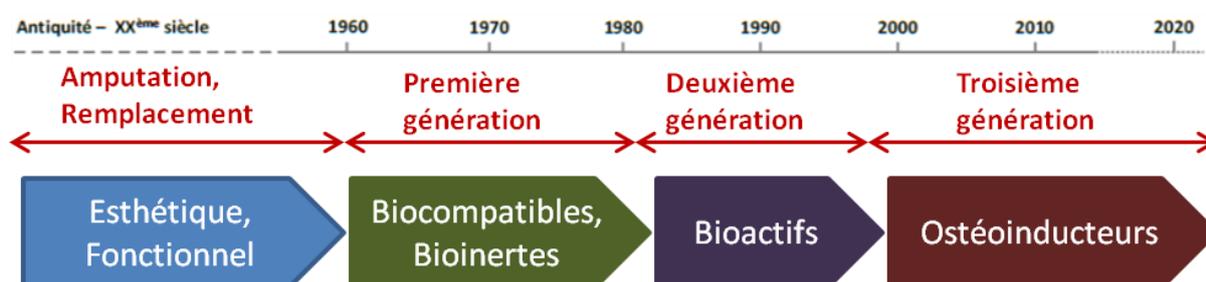


Figure I-4 : Evolution chronologique des générations des substituts osseux synthétiques (D'après Jacquart [23])

### I.1.3.1. Première génération : les biomatériaux inertes

Les biomatériaux inertes sont des matériaux qui induisent une réponse immunitaire minimale lorsqu'ils sont implantés dans un tissu osseux [22]. Ces biomatériaux n'ont aucun effet nocif apparent, ils restent chimiquement stables même après plusieurs années d'implantation. Le choix et l'utilisation de ces biomatériaux inertes dépendent principalement de leurs propriétés mécaniques.

Les premiers biomatériaux inertes utilisés pour des applications orthopédiques au cours du vingtième siècle, sont les aciers inoxydables. Le premier essai réussi de substitution totale d'une prothèse de hanche a été réalisé par Charnley à la fin des années 1950 [24]. Il s'agissait d'une prothèse cimentée avec une tige en acier inoxydable. Aujourd'hui, l'acier inoxydable AISI 316L est utilisé en tant que matériel d'ostéosynthèse. D'autres alliages métalliques sont devenus des matériaux de grand intérêt dans le domaine biomédical en raison de leur résistance à la corrosion supérieure à celle des aciers. Les alliages à base de titane (Ti6Al4V) ainsi que les alliages de Co-Cr-Mo sont largement utilisés comme implants : prothèses de la hanche, de genoux, vis et chevilles pour la fixation de l'os, implants dentaires [25].

Le biomatériau céramique inerte de première génération le plus couramment employé est l'alumine. Elle est utilisée depuis environ 40 ans en orthopédie articulaire en raison de son faible coefficient de frottement. C'est une alternative de choix aux métaux pour l'élaboration de têtes fémorales et de cotyles de prothèses de hanches [26].

Les biomatériaux polymères de première génération sont : le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polyéthylène (PE) et le polyétheréthercétone (PEEK). Le PMMA est utilisé comme ciment de jonction pour la fixation de prothèses. Le PE est employé pour les prothèses articulaires (cupule) et le PEEK en chirurgie vertébrale (cages intervertébrales).

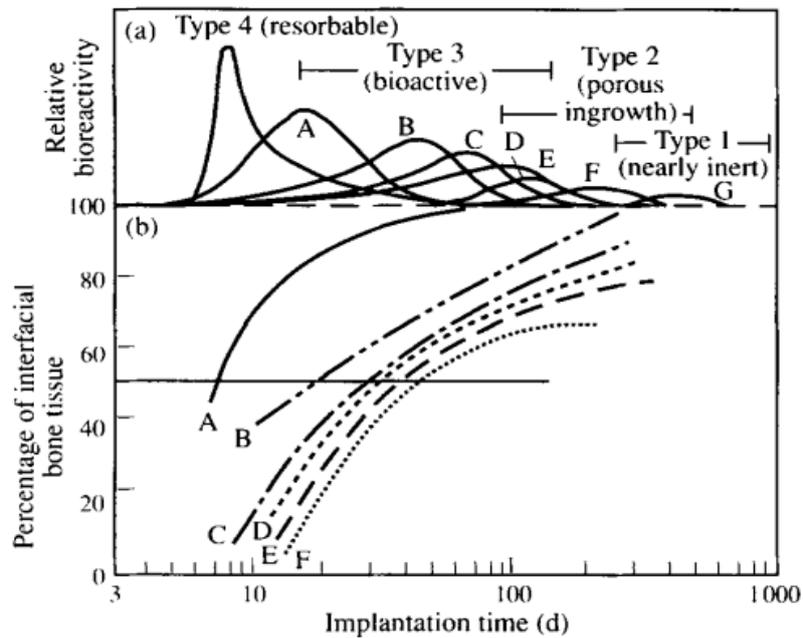
Les fibres de carbone sont utilisées en orthopédie comme renforts des matériaux polymères de première génération (cas du PEEK). Ces matériaux composites ont montré de bons résultats en chirurgie de la colonne vertébrale [27].

### **I.1.3.2. Deuxième génération**

#### **a. Les biomatériaux bioactifs et biorésorbables**

Les matériaux appartenant à la deuxième génération sont caractérisés par leur capacité à provoquer une réponse biologique spécifique conduisant à la formation d'une liaison entre le tissu osseux et le matériau (bioactivité) [28] mais aussi par leur aptitude à subir une dégradation progressive (biorésorbabilité). La bioactivité et la biorésorbabilité dépendent des propriétés chimiques et physico-chimiques du matériau.

Un matériau bioactif crée un environnement compatible avec la croissance osseuse (ostéogenèse). Il a la capacité d'interagir avec l'interface de minéralisation en créant une liaison naturelle entre les matières vivantes et non-vivantes. Le niveau de bioactivité d'un matériau peut être lié au temps nécessaire pour que 50% de l'interface du matériau forme une liaison avec le tissu osseux. La bioactivité relative ainsi que les temps de formation de la liaison os-implant pour différents types de biomatériaux bioactifs (verres, vitrocéramiques et biocéramiques à base de phosphate de calcium) sont présentés sur la Figure I-5. Tous les résultats obtenus lors d'essais *in vitro* et *in vivo* montrent que la caractéristique commune des matériaux bioactifs est la formation d'une couche d'apatite carbonatée biologiquement active à la surface de l'implant.



**Figure I-5 : Spectres de bioactivité des différents implants biocéramiques : (a) Bioactivité relative et (b) Temps de la formation d'une liaison entre l'os et la surface de l'implant [(A) 45S5 Bioglass®, (B) Minal3 Ceravital®, (C) 55S4.3 Bioglass®, (D) A/W glass-ceramic, (E) HA, (F) KGy213 Ceravital®] [29]**

En 1994, une hypothèse a été proposée [30], aboutissant au classement des matériaux bioactifs en deux catégories : les matériaux ostéoproductifs (classe A) et les matériaux ostéoconducteurs (classe B). L'ostéoproduction représente le processus par lequel une surface bioactive est colonisée par des cellules souches ostéogéniques libres dans l'environnement de l'anomalie suite à une intervention chirurgicale [31]. La bioactivité de classe A se produit lorsqu'un matériau provoque à la fois une réponse intracellulaire et extracellulaire à son interface. Les matériaux bioactifs de classe A peuvent se lier à l'os et aux tissus mous. Un matériau ostéoconducteur (classe B) offre simplement une interface biocompatible le long de la partie en contact avec le tissu osseux. La bioactivité ostéoconductrice se produit lorsque le matériau provoque seulement une réponse extracellulaire à son interface [32].

Les verres bioactifs ont été découverts par Larry Hench en 1969 [33]. Ils possèdent des propriétés mécaniques faibles mais leur biocompatibilité les rend adaptés à la réparation de défauts osseux dans les zones du corps non soumises à de fortes contraintes mécaniques. Le Bioglass® 45S5 (45% m SiO<sub>2</sub>, 24,5% m CaO, 24,5% m Na<sub>2</sub>O et 6% m P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a été le premier verre bioactif développé. Par la suite, de nombreux autres verres ou vitrocéramiques ont été développés. Les bioactivités du Bioglass® 55S4.3 (55% m SiO<sub>2</sub>, 6% m P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 19,5% m CaO, 19,5% m Na<sub>2</sub>O, 2,5% m MgO), du KGy213 Ceravital® (38% m SiO<sub>2</sub>, 13,5% m Ca(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 31% m CaO, 4% m Na<sub>2</sub>O, 7% m Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 5,5% m Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 1% m TiO<sub>2</sub>), du cerabone® A/W (34,2% m SiO<sub>2</sub>, 16,3% m P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 44,9% m CaO, 4,6% m MgO), et du Minal3 Ceravital® (46% m

SiO<sub>2</sub>, 16% m Ca(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 33% m CaO, 5% m MgO) sont présentés sur la Figure I-5. Ce sont des biomatériaux de classe A [29].

Les biocéramiques à base de phosphates de calcium (CaP) constituent, à l'heure actuelle, des substituts osseux de choix en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Leur composition chimique est très proche de la phase minérale osseuse [1]. De ce fait, elles n'induisent pas de réactions d'inflammation, ne présentent aucune toxicité biologique [34] et sont biocompatibles. Les biocéramiques phosphocalciques peuvent accueillir à leur surface des précurseurs ostéoblastiques, qui migrent depuis la moelle osseuse, et assurer leur prolifération puis leur différenciation en ostéoblastes. Suivant les compositions chimiques, ces biocéramiques peuvent être biorésorbables, c'est-à-dire que le matériau sera résorbé et remplacé par un tissu vivant après quelques mois d'implantation. La famille des biocéramiques phosphocalciques regroupe de nombreux substituts osseux tels que : l'hydroxyapatite (HA, de formule Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> et de rapport atomique Ca/P = 10/6), le phosphate tricalcique (TCP, de formule Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, sous la forme α ou β et de rapport atomique Ca/P = 3/2) ou les céramiques biphasées (BCP pour *biphasic calcium phosphate*, association de HA et β-TCP) [32, 35]. Ces biocéramiques sont souvent utilisées sous forme d'implants poreux dont la porosité est recolonisée par des tissus osseux néoformés. L'interconnexion entre les pores est un paramètre important car c'est elle qui régit la colonisation des implants [36, 37]. Pour assurer une bonne circulation des fluides biologiques, le diamètre des interconnexions doit être situé entre 20 et 80 μm [38] et la taille des macropores doit être comprise entre 150 et 500 μm [39].

L'hydroxyapatite stœchiométrique (HA) est un matériau non résorbable et bioactif. Elle permet l'obtention d'une interface tissu osseux/implant stable par précipitation, à sa surface et au contact des fluides biologiques, d'une couche d'apatite biologique similaire au minéral osseux [40]. Ces réactions donnent lieu à la formation de liaisons biochimiques fortes entre l'implant et le tissu osseux [29]. Elle est également ostéoconductrice, car elle a la capacité de promouvoir une croissance osseuse lorsqu'elle est au contact d'un os. En ce sens, elle présente une bioactivité de classe B [29].

Les phosphates tricalcique sous la forme α ou β (α-TCP ou β-TCP) sont également bioactifs et ostéoconducteurs. Mais, ils présentent une solubilité beaucoup plus importante que celle de l'HA et sont donc plus résorbables [41]. De manière générale, la solubilité des phosphates de calcium augmente lorsque le rapport atomique Ca/P du composé diminue [42]. Leurs produits

de dégradation (calcium, phosphate) sont complètement assimilables par l'organisme et participent à la reconstruction osseuse. La dégradation interne du matériau après implantation, permet le remplacement de la céramique par de l'os néoformé. Mais, cette résorbabilité doit être contrôlée afin d'éviter la perte de l'intégrité de la structure du matériau céramique laquelle influence la capacité du matériau à supporter la reconstruction osseuse.

La combinaison d'HA et de  $\beta$ -TCP dans des proportions variables pour former les céramiques mixtes de BCP a pour objectif principal de contrôler la vitesse de résorption du matériau et la colonisation osseuse [43]. Ces céramiques mixtes présentent une résorbabilité intermédiaire à celle de l'HA et du  $\beta$ -TCP et sont capables d'être dégradées entièrement pour être remplacées par de la matrice osseuse. Les travaux effectués par Wilson *et al.* [44] ont montré que le potentiel ostéoconducteur d'un implant est déterminé par la bioactivité de la céramique reliée à sa vitesse de dissolution. Ces travaux sont portés sur l'étude de l'influence de la composition et de la microporosité sur le potentiel ostéoconducteur de biocéramiques phosphocalciques. Les auteurs ont étudié la formation de l'os après implantation dans le rachis lombaire de chèvres pour des échantillons d'HA, de  $\beta$ -TCP et de BCP (HA/ $\beta$ -TCP : 80/20) frittés à températures variables et ayant des microporosités différentes. Les résultats ont permis de classer les céramiques suivant leur potentiel ostéoconducteur : BCP frittées à faible (1150°C) et moyenne (1200°C) température =  $\beta$ -TCP > HA frittée à faible température (1150°C) > BCP frittée à haute température (1300°C) > HA frittée à haute température (1250°C).

#### **b. Mécanisme d'intégration d'une céramique bioactive**

Le mécanisme d'intégration d'une céramique bioactive par les fluides biologiques en site osseux (Figure I-6) est similaire au mécanisme de substitution d'un os ancien par du tissu osseux néoformé. Tout comme le remodelage osseux, ce mécanisme fait intervenir les cellules ostéoblastiques ainsi que les cellules ostéoclastiques.

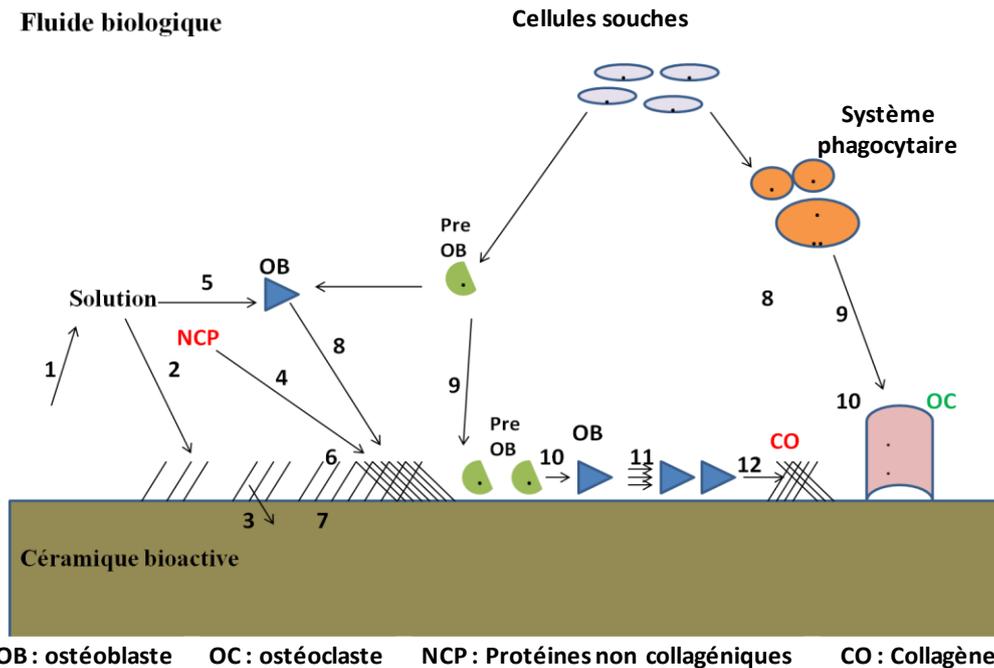


Figure I-6 : Schéma des événements ayant lieu à l'interface entre une céramique bioactive et le fluide biologique entourant [45]

Dans un premier temps, un équilibre chimique s'établit entre la surface de l'implant et les fluides biologiques aboutissant à une dissolution partielle de la surface de l'implant (1). Cet équilibre chimique induit la formation, à la surface de l'implant, d'une couche d'apatite carbonatée de structure chimique similaire à celle de la phase minérale de l'os (2). Des échanges ioniques s'établissent alors à l'interface implant/couche d'apatite carbonatée (3). Puis, les protéines non collagéniques (ostéopontine, sialoprotéine...) de la matrice extracellulaire osseuse s'adsorbent à la surface de la couche d'apatite carbonatée (4) favorisant la fixation des ostéoblastes (8). La présence des ions calcium dans les fluides biologiques provoque une migration des cellules pré-ostéoblastiques et pré-ostéoclastiques (effet chimiotactique) vers la surface de l'implant (5 et 8). Cette étape est analogue à la phase d'activation du remodelage osseux au cours de laquelle les signaux biologiques envoyés par les cellules bordantes induisent une migration des cellules osseuses vers l'os à reconstruire. La fixation des cellules osseuses (9) à la surface de l'implant s'effectue par effet « ventouse » (adhésion cellulaire). Les cellules progénitrices de la moelle osseuse se différencient en ostéoclastes (10) lesquels contribuent à la dissolution de l'implant (*i.e.* phase de résorption du remodelage osseux). Parallèlement, les ostéoblastes prolifèrent (11) et sécrètent la matrice collagénique (12) (*i.e.* phase de formation du remodelage osseux).

### **c. Les limites de biomatériaux bioactifs et biorésorbables**

Malgré leur compatibilité tissulaire et cellulaire souvent excellente, les biomatériaux de seconde génération présentent des propriétés mécaniques nettement inférieures à celle du tissu osseux. Leur mauvaise résistance empêche leur utilisation dans des sites en charge et sous forte sollicitation mécanique.

Les biomatériaux à base de phosphate de calcium sont employés en raison de leur aptitude à favoriser la reconstruction osseuse, les propriétés mécaniques passant au second plan. De ce fait, ces biomatériaux permettent de ne restaurer que les pertes osseuses locales. Dans le cas des substituts osseux à base de  $\beta$ -TCP, une résorption totale et complète du matériau est observée après implantation. Pour les substituts poreux en HA, l'ostéoconduction a lieu en volume mais ce phénomène est limité en termes de dimensions. Cette limitation du phénomène d'ostéoconduction aboutira à des zones centrales fragiles [46]. Bruder *et al.* [47] ont montré que des pertes de substance osseuse de 21 mm (défaut critique) au niveau du fémur, chez le chien, se consolident ni spontanément ni lorsqu'elles sont comblées avec une céramique biphasée à base d'HA (65%*m*) et de  $\beta$ -TCP (35%*m*). Trop fragile, le matériau a tendance à se fracturer. Une apposition d'os au contact d'une céramique est observée plutôt qu'une incorporation du matériau par l'os. Il n'y a pas de véritable régénération du tissu osseux.

#### **I.1.3.3. Troisième génération : les biomatériaux ostéoinducteurs**

Les biomatériaux à base de phosphate de calcium sont peu efficaces pour la reconstruction de segments osseux de grande taille [48]. Dans le cas de larges défauts, l'ostéointégration des greffons ou biomatériaux est incomplète [49]. Toutefois, Brie *et al.* [50] ont décrit un nouveau concept pour la reconstruction des défauts osseux craniofaciaux de grandes dimensions et de formes complexes. Des implants en HA présentant des pores en périphérie sont réalisés par stéréolithographie, leur taille et leur forme étant définies à partir d'un scanner du crâne du patient. Les résultats biologiques montrent qu'il est possible de reconstruire de grands défauts osseux craniofaciaux avec des implants céramiques ayant à la fois des bonnes propriétés mécaniques et ostéoconductrices. Ces nouveaux implants en hydroxyapatite sont bien adaptés pour la reconstruction des zones larges (supérieure à 25 cm<sup>2</sup>) et complexes (zones frontales). Ils possèdent des qualités mécaniques et biologiques que l'on ne retrouve pas actuellement dans les implants disponibles sur le marché.

Il apparaît nécessaire de développer des substituts osseux ostéoinducteurs pour permettre une colonisation cellulaire au cœur de l'implant quel que soit ses dimensions, afin d'avoir formation de tissu osseux et donc des propriétés mécaniques similaires à celles de l'os. Cela permettrait d'accroître le champ d'application potentielle des biomatériaux de seconde génération à de grands implants aux propriétés mécaniques suffisantes. On peut distinguer deux grandes approches concernant la recherche et le développement de matériaux ostéoinducteurs en ingénierie tissulaire osseuse. D'une part, associer des cellules progénitrices issues du patient à des matériaux permettant leur différenciation ostéoblastique (*i.e.* matériaux hybrides), et d'autre part élaborer des matériaux capables d'accueillir les cellules progénitrices de l'hôte et d'induire leur différenciation (*i.e.* matériaux ostéoinducteurs).

Le principe général des matériaux hybrides est d'associer des cellules avec un support naturel ou synthétique afin de construire un tissu vivant tridimensionnel. Dans un premier temps, les cellules sont extraites du patient et sont parfois amplifiées *in vitro*. Puis, elles sont déposées, sur une matrice tridimensionnelle et sont éventuellement cultivées afin de favoriser leur différenciation. L'ensemble du système (matériau + cellules) est ensuite réimplanté chez le patient. Le matériau support doit permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire, reproduire la forme spécifique de l'organe et maintenir cette forme dans le temps. Une structure poreuse permet l'ensemencement cellulaire mais des propriétés mécaniques suffisantes doivent être présentes pour assurer la fonction du tissu [51, 52]. Les cellules utilisées en ingénierie tissulaire osseuse sont les cellules souches mésenchymateuses prélevées sur des patients. Leur phénotype peut être orienté vers différentes lignées cellulaires. Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux peuvent être différenciées en ostéoblastes ou en chondroblastes [53]. Cependant, dans certains cas et en fonction des individus, l'utilisation de cellules souches peut conduire à une hétérogénéité des populations cellulaires ce qui limite leur utilisation. La présence de facteurs de croissance tels que les protéines osseuses morphogéniques (BMP-2 et 7, BMP pour *Bone Morphogenetic Protein*) [54] favorisera le recrutement, la prolifération et la différenciation des cellules souches.

Deux voies de recherche sont actuellement explorées afin de parvenir au développement de matériaux ostéoinducteurs : l'introduction de microporosité au sein des implants et la fonctionnalisation par modification de leur chimie de surface.

Les études publiées dans la littérature qui se basent sur la modification de l'architecture du substrat afin d'avoir des matériaux capables d'assurer un processus d'ostéoinduction sont peu nombreux. Les processus biologiques se déroulant au sein de ces matériaux sont influencés par deux types de porosité, la micro et la macroporosité dont les diamètres de pores sont respectivement inférieurs à 10  $\mu\text{m}$  et de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$  (ou plus) [5, 55].

Les travaux de Habibovic *et al.* [56] ont porté sur l'étude de l'influence de la surface spécifique sur les propriétés ostéoinductrices de deux types de phosphate de calcium (HA et BCP). Ils ont montré qu'une quantité minimale de micropores sur les parois des macropores est nécessaire pour que le matériau soit ostéoinducteur. Ces micropores sont probablement nécessaires pour l'accélération du processus de dissolution-reprécipitation des CaP à l'interface matériau/vivant.

Rouahi *et al.* [57] ont étudié l'influence *in vitro* de la microstructure d'une hydroxyapatite microporeuse (mHA) et non microporeuse (pHA) sur l'adsorption de protéines, l'attachement de cellules osseuses humaines de type SaOs-2 à 30 minutes, 1, 4 et 24 heures et sur la croissance cellulaire à 96 heures. Cette étude montre que la présence de micropores augmentait l'adsorption de protéines ainsi que l'adhérence et la prolifération des cellules osseuses humaines.

Isaac *et al.* [58] ont étudié l'effet de la microporosité de céramique en  $\beta$ -TCP avec 0,25 et 45% de porosité sur le comportement des cellules ostéoprogénitrices pour le développement de matériaux hybrides. Des cellules stromales de la moelle osseuse humaine (BMSCs pour *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) ont étéensemencées puis l'adhésion cellulaire, la viabilité et la différenciation ostéoblastique ont été étudiées durant trois semaines. Les résultats biologiques ont montré que la microporosité de la céramique diminue la viabilité et la différenciation ostéoblastique des cellules BMSCs *in vitro*.

Yuan *et al.* [59] ont comparé les propriétés ostéoinductrices de deux types de céramiques en hydroxyapatite poreuses implantées dans les muscles dorsaux de chiens. Le premier type d'échantillon était un implant macroporeux dont les parois présentaient un fort taux de micropores. Le deuxième type était un implant macroporeux ayant des macropores à paroi dense. Les résultats obtenus ont confirmé que, dans certaines conditions, la céramique pouvait induire la formation d'os dans le tissu mou des chiens, la présence des micropores ayant favorisé l'induction osseuse.

Les travaux de Wei *et al.* [60] ont porté sur l'étude des propriétés biologiques de phosphates de calcium dopés au magnésium. Trois types d'implants ont été étudiés : un implant contenant des micro et des macropores, un implant contenant seulement des macropores et un implant non poreux. Les tests biologiques effectués avec les cellules MG63 ont montré que l'attachement et la prolifération cellulaire étaient nettement supérieurs pour l'implant micro-macro poreux du fait de la présence de la microporosité. Les examens histologiques ont confirmé que ces implants amélioraient la régénération osseuse et présentaient une ostéogénèse *in vivo* plus importante.

Dans leur étude, Cheng *et al.* [61] ont comparé l'ostéoinduction intrinsèque d'un échantillon BCP poreux en hydroxyapatite et en phosphate tricalcique  $\beta$  implanté dans des souris dont le péroné gauche a été fracturé et le péroné droit a été maintenu intact. Les résultats biologiques ont montré que les implants en HA/ $\beta$ -TCP placés dans les muscles des jambes fracturées à proximité du péroné présentaient une induction osseuse significativement plus élevée que ceux implantés dans les muscles des jambes ayant des péronés intacts. Les implantations sous-cutanées n'ont pas montré d'ostéoinduction. Les différences observées ont été reliées à la localisation des implants et à la proximité d'un environnement ostéogénique. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'ostéoinduction par les phosphates de calcium est le résultat de l'adsorption des biomolécules ostéogéniques sur leur surface.

La deuxième voie examinée pour conférer des propriétés ostéoinductives aux biomatériaux consiste à fonctionnaliser leur surface par des biomolécules actives dans le processus de formation osseuse (protéines, peptides, facteurs de croissance,...) et dont le rôle sur l'adhésion et la prolifération cellulaire est connu. Cette stratégie doit permettre de développer un matériau ostéoinducteur capable d'induire le recrutement, l'adhésion et l'attachement cellulaire. Les différentes molécules biologiques d'intérêt susceptibles d'améliorer les propriétés biologiques des implants sont présentées et détaillées dans la deuxième partie de cette bibliographie consacrée à l'étude des biomatériaux fonctionnalisés pour l'ostéoinduction.

## I.2. Fonctionnalisation de surface

Dans cette partie, la séquence peptidique RGD, impliquée dans l'adhésion cellulaire, est définie ainsi que les différentes biomolécules ayant la capacité de favoriser l'ostéogenèse et l'angiogenèse. Puis, les différentes voies de fonctionnalisation de surface sont détaillées.

### I.2.1. Les molécules biologiques d'intérêt

#### I.2.1.1. Les séquences peptidiques RGD

L'utilisation de peptides contenant la séquence d'acides aminés RGD (Arginine – Glycine – Acide Aspartique) s'est largement développée ces 15 dernières années. Cette séquence peptidique (Figure I-7) intervient en tant que médiateur de l'attachement cellulaire [62, 63]. Les récepteurs membranaires appartenant à la famille des intégrines la reconnaissent, favorisant ainsi la fixation biospécifique de cellules [62]. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire responsables des interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire et cellule-agent pathogène [64]. Elles sont impliquées dans le transfert de signaux à travers la membrane plasmique et régulent de nombreuses fonctions dont la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou la cicatrisation. Ces intégrines interviennent dans le processus de rattachement cellulaire au réseau de protéines de la matrice extracellulaire.

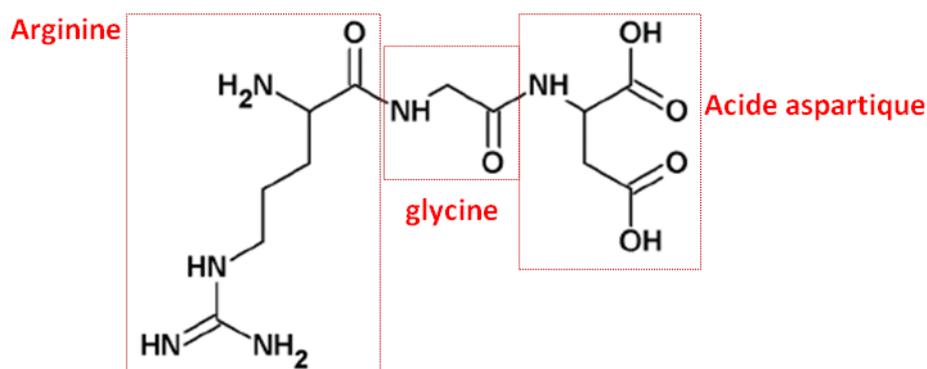


Figure I-7 : Structure chimique du tripeptide RGD

Depuis la découverte du rôle de cette séquence, de nombreux scientifiques ont déposé des peptides contenant cette séquence particulière en surface de biomatériaux pour promouvoir l'attachement cellulaire.

Les premiers travaux publiés en 1999 par Porté-Durrieu *et al.* [65] étudiaient l'influence sur l'adhérence et l'attachement des cellules humaines endothéliales du greffage de la séquence peptidique RGD à la surface de silice. Les expériences d'attachement cellulaire *in vitro* ont montré que les substrats greffés par la séquence RGD amélioraient nettement la fixation des cellules. Ce mécanisme de fixation cellulaire est considéré comme étant dû à un événement spécifique entre la membrane cellulaire et la surface du matériau. D'autres études ont montré que la séquence peptidique RGD améliorait significativement l'attachement cellulaire à la surface de cellulose [66], d'alliages Ti-6Al-4V [67] ou d'hydroxyapatite [68]. Dans cette dernière étude, Durrieu *et al.* [68] ont immobilisé des séquences peptidiques linéaires ou cycliques à la surface d'HA. Les cultures cellulaires ont été effectuées avec de cellules ostéoprogénitrices isolées à partir de cellules de stroma de la moelle osseuse humaine. L'adhésion cellulaire, mesurée entre 1 et 24 heures, a montré que la séquence cyclique de RGD favorisait l'attachement cellulaire pour les temps courts (3 h) et la séquence linéaire pour les temps plus longs (24 h).

Chollet *et al.* [69] ont évalué l'influence de différentes densités de peptides RGD ( $C = 2 \times 10^{-3}$  mol) greffés en surface de polyéthylène téréphtalate (PET) sur l'adhésion de cellules ostéoblastiques MC3T3. Les résultats biologiques *in vitro* ont montré que les jonctions d'ancrage entre des cellules osseuses et la surface de PET greffée se forment après 15 heures, contrairement au PET non greffé. Ils ont signalé une augmentation de l'attachement cellulaire et de la formation de jonctions d'ancrage avec la densité de peptides immobilisée en surface du PET.

Le but de travaux d'Itoh *et al.* [70] était de vérifier si la présence d'une séquence peptidique contenant le motif RGD à la surface d'HA pouvait renforcer l'attachement et la différenciation des ostéoblastes. Des cellules ostéoblastiques murines KUSA/A1 ont été utilisées pour conduire l'étude biologique *in vitro*. Les résultats ont indiqué que l'HA contenant la séquence peptidique RGD améliorait la fixation et la différenciation des ostéoblastes.

Plus récemment, l'étude effectuée par Nguyen *et al.* [71] a porté sur des implants osseux en titane fonctionnalisés avec des nanoparticules contenant une séquence peptidique RGDC (Arginine – Glycine – Acide Aspartique – Cystéine). Les résultats de culture cellulaire (MC3T3-E1) obtenus après 14 heures ont montré que les matériaux fonctionnalisés par le

peptide renforçaient l'adhésion cellulaire spécifique et pouvaient créer de fines extensions cellulaires utilisées à des fins de locomotion (filopodia).

### **I.2.1.2. Les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire**

Plusieurs protéines sont impliquées dans les mécanismes d'adhésion. Parmi elles, la sialoprotéine osseuse (BSP pour *Bone Sialoprotein*) favorise l'adhérence cellulaire grâce à la présence de motifs RGD. Les BSP sont également reconnues par les récepteurs d'adhérence des cellules osseuses [72] ou de fibroblastes [73]. De plus, cette protéine présente une affinité remarquable pour l'hydroxyapatite due à la présence de deux domaines poly-glutamate dans sa structure (fonction acide) [74]. Elle est capable d'induire la formation d'hydroxyapatite *in vitro* [73] et présenterait un rôle dans la nucléation de la minéralisation *in vivo* [75]. Dans le même cadre, l'ostéopontine est une protéine d'adhérence du tissu osseux reliant l'hydroxyapatite aux cellules osseuses. Elle possède un domaine contenant une séquence d'acide aspartique répétée qui lui conférerait son affinité pour l'hydroxyapatite [76].

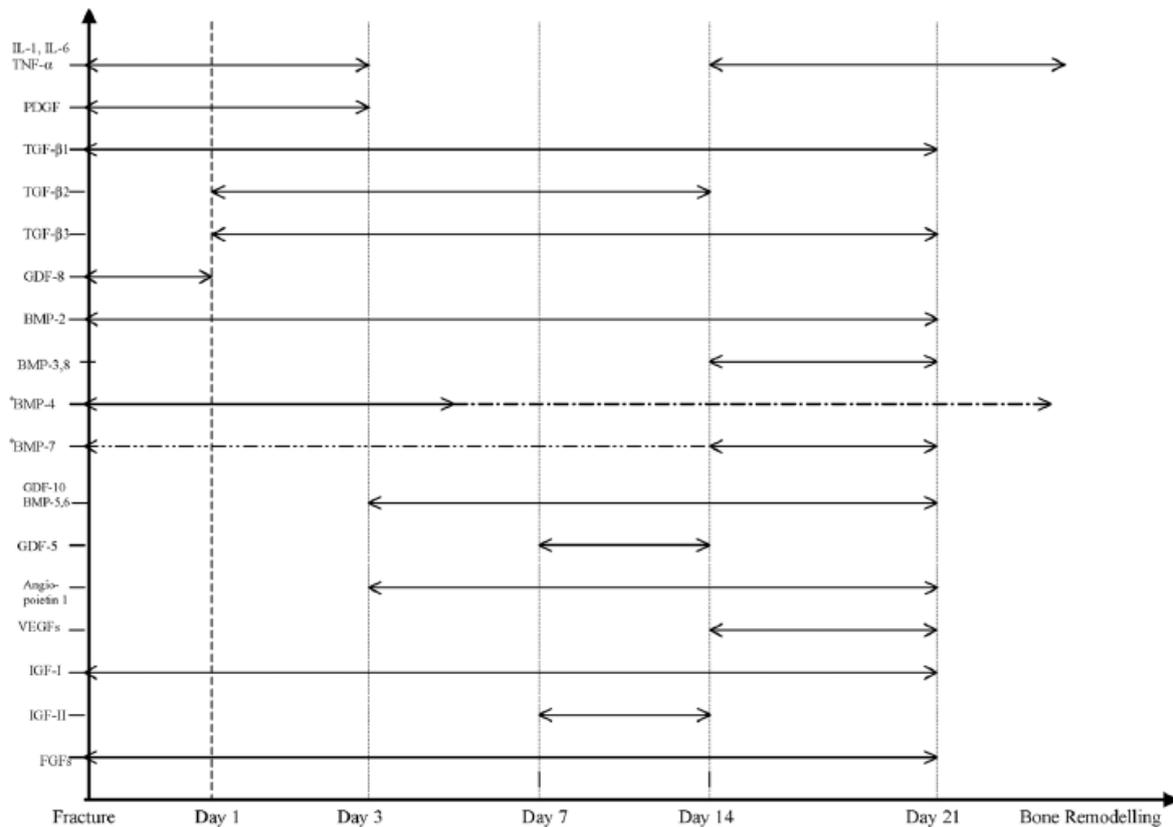
Parmi les protéines capables d'améliorer l'adhérence cellulaire, on peut également citer la vitronectine et les thrombospondines. La vitronectine est une glycoprotéine qui stimule l'adhérence, la migration ou la prolifération des ostéoclastes [77]. Les thrombospondines, présentes dans la plupart des matrices extracellulaires conjonctives, favorisent notamment l'adhérence et la prolifération cellulaire [78]. Dans l'os elles sont fortement exprimées dans la matrice sécrétée par les ostéoblastes lors de la formation osseuse, et sont parfois détectées dans la matrice minéralisée [79].

Une autre protéine active dans les phénomènes d'adhésion cellulaire est la fibronectine. C'est une protéine majeure de la matrice extracellulaire osseuse. Elle joue un rôle dans la régulation de nombreux processus cellulaires et dans l'organisation de la matrice. Cette protéine est exprimée au cours du développement endochondral de l'os [80] et elle est impliquée dans la différenciation et la survie des ostéoblastes.

### **I.2.1.3. Les facteurs de croissances**

Comme il a été présenté précédemment, l'ostéogenèse est le processus par lequel s'élabore le tissu osseux, ce dernier implique de nombreux facteurs de croissance. Les principales molécules de signalisation intervenant durant le processus de remodelage osseux après une

fracture sont représentées en fonction de leur temps d'intervention sur la Figure I-8 [81]. La guérison des fractures et le remodelage osseux sont des processus physiologiques complexes qui impliquent une série bien orchestrée d'événements biologiques et des molécules de signalisation.



**Figure I-8 : Schéma représentatif des profils d'expression des molécules de signalisation au cours de la guérison des fractures [81]. Les traits plein représentent les périodes de forte activité et les traits en pointillés celles de plus faible activité**

Les BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) sont abondantes dans l'os et sont synthétisées par plusieurs cellules dont les cellules ostéoblastiques [82]. Les propriétés ostéoinductives des BMPs ont été largement étudiées dans la littérature. Ces facteurs de croissance, seuls ou associés à des matériaux, sont capables d'initier la formation d'os dans des sites ectopiques, c'est-à-dire après implantation sous-cutanée ou intramusculaire [83-85]. A ce jour, vingt deux protéines différentes de la famille des BMP ont été isolées. Les propriétés des huit premières sont les mieux connues, notamment celles des protéines deux (BMP-2) et sept (BMP-7) qui ont fait l'objet d'études expérimentales et cliniques. Ces deux protéines (BMP-2 et BMP-7) interviennent au cours de la guérison des fractures (Figure I-8). La BMP-2 agit tout au long de la cicatrisation alors que le BMP-7 intervient au stade final.

Les études scientifiques montrent que la BMP-2 induit la migration de monocytes et active l'expression du facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$  pour *Transforming Growth Factor beta*), facteur qui intervient dans la migration de cellules souches mésenchymateuses et des ostéoblastes, et qui participe à leur prolifération [86]. De nombreuses études effectuées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que l'activation des BMP s'accompagnait d'une forte augmentation de l'angiogenèse osseuse. La BMP-7 possède un rôle essentiel dans la transformation du tissu cartilagineux en tissu osseux. Elle agit essentiellement lors de la phase terminale du remodelage osseux en activant directement la différenciation des ostéoblastes [87].

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux (néovascularisation) sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) est considéré aujourd'hui comme le régulateur essentiel des processus angiogéniques [88]. Le VEGF possède de nombreux effets physiologiques sur les cellules endothéliales : stimulation de la prolifération et de la migration cellulaires, augmentation de la perméabilité cellulaire, induction de la formation de pores intracellulaires. Il intervient durant le phénomène de la guérison des fractures entre 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours (Figure I-8).

D'autres molécules biologiques spécifiques du processus angiogénique ont été identifiées. Ces molécules interviennent au début et à la fin de processus de guérison des fractures. On peut citer le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$  pour *Tumor Necrosis Factor alpha*), l'Interleukine 8 (IL8 pour *Interleukin 8*) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF pour *Platelet-Derived Growth Factor*) et les angiopoïétines, famille de molécules dont les plus étudiées sont les angiopoïétines 1 et 2. Ces dernières déstabilisent les interactions entre cellules endothéliales et jouent donc un rôle essentiel dans l'induction de l'angiogenèse en association avec le VEGF. La famille des facteurs de croissance des fibroblastes basiques (FGF pour *Basic Fibroblast Growth Factor*) présentent des effets angiogéniques apparemment proches de ceux de VEGF. *In vivo*, ils peuvent stimuler un processus complet d'angiogenèse alors qu'*in vitro*, ils induisent la prolifération et la migration cellulaire.

La fonctionnalisation de ces biomolécules à la surface d'un substrat peut s'effectuer selon plusieurs voies détaillées dans le paragraphe suivant.

## I.2.2. Les différentes voies de fonctionnalisation

La fonctionnalisation de la surface d'un substrat est une opération qui consiste à modifier la structure et/ou la chimie de sa surface afin de l'adapter à des conditions d'utilisation données. Dans le cadre de la fonctionnalisation de la surface d'implants osseux par des molécules impliquées dans les processus de formation osseuse, trois voies peuvent être envisagées : la physisorption, la chimisorption et le greffage covalent.

### I.2.2.1. Fonctionnalisation par physisorption

L'adsorption physique ou la physisorption est la fixation de molécules d'adsorbat à la surface d'un adsorbant *via* des interactions faibles de nature électrostatique : interactions de Van der Waals (interactions de Debye :  $< 1$  kJ/mol, interactions de Keesom : 0,5 à 3 kJ/mol et interactions de London : 0,5 à 30 kJ/mol) ou des liaisons hydrogène (5 à 30 kJ/mol). Ces interactions peuvent conduire à une adsorption en mono ou en multicouches qui n'engendre pas de modification de la structure moléculaire (*i.e.* modification de la répartition des charges, formation de liaisons irréversibles, modification des fonctions chimiques de la molécule). La physisorption est réversible et s'effectue sans présence d'intermédiaire entre l'adsorbat et l'adsorbant.

L'adsorption de protéines sur des surfaces solides est largement appliquée dans un certain nombre de domaines tels que la biologie, la médecine et la biotechnologie [89]. Différents types des surfaces solides sont utilisées dans ces applications, on peut citer la silice [90], l'or [91], l'acier inoxydable [92] et le polystyrène [93]. La détermination du comportement des protéines en contact avec une surface solide dépend de la structure et de la stabilité de la protéine, de la nature de la solution (pH, force ionique, température, etc.), et des propriétés de la surface [94].

Dans la conception de matériaux biocompatibles pour des implants chirurgicaux, le comportement d'adsorption de protéines sur la surface de matériaux tels que l'hydroxyapatite a été étudié dans la littérature. La Figure I-9 illustre l'architecture générale de l'adsorption physique des molécules biologiques à la surface d'un substrat d'hydroxyapatite.

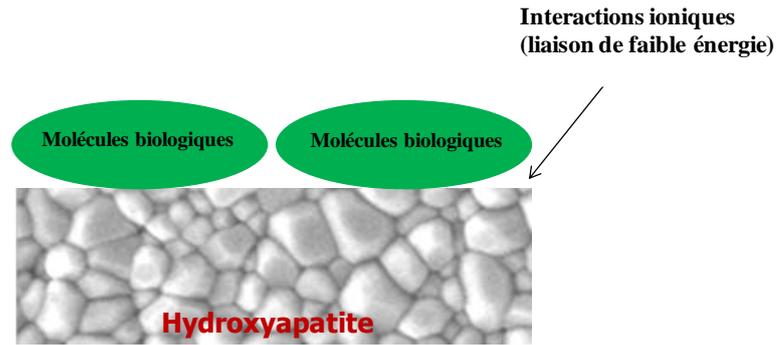


Figure I-9 : Schéma général représentatif de l'adsorption physique de molécules biologiques à la surface d'un substrat en hydroxyapatite

Mafina *et al.* [95] ont étudié l'adsorption de l'albumine de sérum bovin (BSA pour *Bovine Serum Albumin*) sur des disques denses en apatite. Il s'agissait de mesurer l'adsorption/désorption de BSA marquée et non marquée à la surface d'hydroxyapatite (HA) et d'hydroxyapatite silicatée (SiHA). Les résultats obtenus montrent que l'adsorption de la protéine à la surface des substrats en HA et en SiHA est très sensible à la nature du milieu réactionnel PBS (pour *Phosphate Buffered Saline*) ou MEM (pour *Minimum Essential Medium*) et à la température ( $T_{amb}$ , 37°C). De plus, ils ont conclu que la protéine est plus facilement adsorbée à la surface de SiHA, en revanche aucune différence n'est observée au cours du phénomène de désorption.

Les travaux de Delphine Pellenc [96] avaient pour objet l'étude de l'organisation d'une protéine (la fibronectine) à la surface d'une céramique en hydroxyapatite. Les résultats obtenus ont mis en évidence que la simple adsorption de la fibronectine sur l'HA peut induire l'agrégation et/ou la fibrillation de la protéine en fonction des conditions d'adsorption (temps, concentration). Ces observations ont mené à faire l'hypothèse que des changements de conformation de la protéine étaient notamment impliqués dans la formation des différentes structures observées.

L'adsorption des protéines à la surface d'un substrat dépend de conditions expérimentales utilisées (pH, température,...). La conformation des protéines oriente ses sites actifs [89], permettant l'accès aux domaines de reconnaissance des cellules de la matrice osseuse. D'autre part, le phénomène d'adsorption conduit à un relargage rapide et non contrôlé dans le temps à cause des liaisons faibles et réversibles établies entre la molécule biologique et la surface du substrat [97]. La quantité relargée peut être contrôlée en fonction de la quantité adsorbée à la surface du substrat.

### I.2.2.2. Fonctionnalisation par chimisorption

L'adsorption chimique ou la chimisorption met en jeu des liaisons chimiques fortes (liaisons ioniques quelques centaines de kJ/mol) entre les molécules d'un adsorbant et la surface d'un adsorbant. Cette adsorption, parfois irréversible, s'accompagne d'une profonde modification de la répartition des charges électroniques des molécules adsorbées à la surface et ne peut avoir lieu sur plusieurs couches.

Ce type de fonctionnalisation est principalement rencontrée lors de l'adsorption de bisphosphonates (BP) à la surface de phosphates de calcium (CaP) [98, 99]. Dès les années 1980-1990, les bisphosphonates ont connu de nombreuses applications cliniques dans les domaines de la chirurgie orthopédique, du traitement de la maladie osseuse de Paget, de l'ostéogénèse imparfaite et de l'ostéoporose [100]. Les bisphosphonates sont des analogues stables des pyrophosphates (Figure I-10) caractérisés par une liaison de type P-C-P qui les rend résistants à une hydrolyse enzymatique, les chaînes latérales  $R_1$  et  $R_2$  étant respectivement responsables de leur affinité pour les cristaux d'apatite et de leur activité biologique [98, 99, 101].

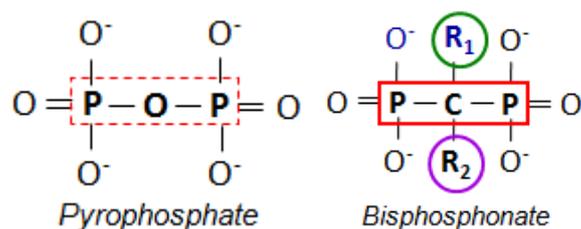


Figure I-10 : Structure chimique générale des pyrophosphates et des bisphosphonates [102]

Cette structure chimique caractéristique leur confère la propriété de se lier au minéral osseux et leur permet d'influencer, par différents mécanismes, l'activité des cellules responsables du remodelage osseux. Ainsi, ils inhibent la formation et ralentissent la dissolution et l'agrégation des cristaux d'apatite. Cette affinité BP-CaP est régie selon la littérature par échange ionique entre les groupements phosphates des cristaux d'hydroxyapatite ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) et les groupements phosphonates des BP (Figure I-11). Dans certains cas, une dissolution de la matrice est observée conduisant à la libération des groupements phosphonates.

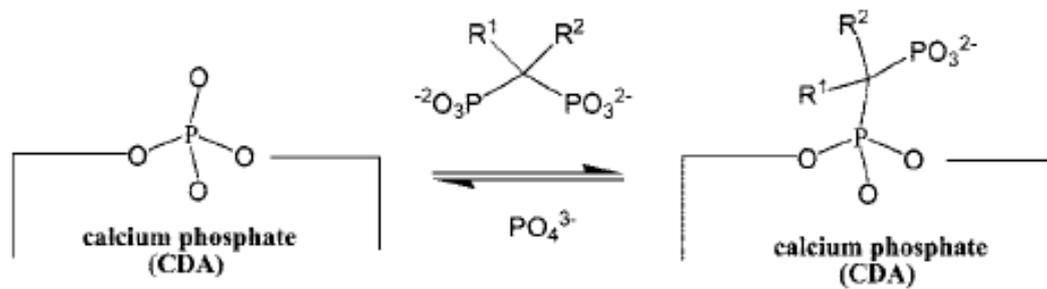


Figure I-11 : Schéma représentatif du mécanisme d'adsorption des bisphosphonates à la surface de CDA (Calcium Deficient Apatite) [103]

Du fait de leur affinité pour les CaP, les bisphosphonates peuvent être utilisés en tant que molécules intermédiaires pour modifier la surface des implants osseux par des molécules biologiquement actives [104-106]. La Figure I-12 illustre l'architecture générale de l'immobilisation de molécules biologiques par l'intermédiaire de bisphosphonates chimiquement adsorbés à la surface d'un implant.

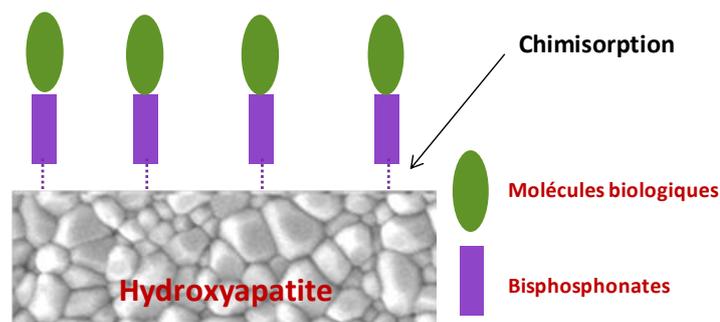


Figure I-12 : Schéma général représentatif de l'adsorption chimique de molécules biologiques à la surface d'un substrat en hydroxyapatite

Iafisco *et al.* [104] ont étudié les mécanismes d'immobilisation de la myoglobine (protéine sanguine apparentée à l'hémoglobine) sur des nanocristaux d'hydroxyapatite et sur de la poudre d'hydroxyapatite modifiée par un BP, l'alendronate ( $R_1 = OH$  et  $R_2 = (CH_2)_3NH_2$ ) dans le but d'utiliser ces matériaux synthétisés en implantation osseuse. Ils ont constaté que l'utilisation du bisphosphonate (alendronate) comme intermédiaire limitait l'adsorption physique et les changements de conformation de la myoglobine.

Sur le même principe, les travaux menés par Schuessle *et al.* [105] sont basés sur l'immobilisation de BMP-2 à la surface de disques d'hydroxyapatite frittés à  $1300^\circ C$  et modifiés par des aminobisphosphonates ( $R_2$  présente un groupement amine terminal). Les résultats de culture cellulaire effectuée sur des cellules myoblastiques ont confirmé

l'amélioration de l'adhésion cellulaire et de la biocompatibilité de l'implant après l'immobilisation de la protéine.

Les bisphosphonates présentent certains avantages en terme de fonctionnalisation de surface : insensibilité à l'hydrolyse et absence d'homocondensation *i.e.* formation de liaisons P-O-P entre deux fonctions P-OH en conditions douces, permettant d'éviter la formation d'amas (multicouches). En revanche, il est difficile de contrôler la densité de molécules chimisorbées à la surface du substrat.

### I.2.2.3. Fonctionnalisation par greffage covalent

Le greffage covalent est basé sur l'établissement de liaisons (iono)-covalentes fortes entre une molécule et la surface d'un substrat. Par définition, la liaison covalente (plusieurs centaines de kJ/mol) est une liaison chimique qui se produit entre deux non-métaux ayant des électronégativités semblables.

L'immobilisation covalente de molécules biologiquement actives à la surface d'un substrat d'hydroxyapatite nécessite l'emploi de molécules intermédiaires (agent de couplage) qui établissent le lien entre le substrat et les biomolécules (Figure I-13). L'utilisation de ces intermédiaires permet de contrôler la densité de greffage à la surface du substrat, de limiter l'encombrement stérique des molécules biologiques et de contrôler le relargage des biomolécules dans le milieu biologique.

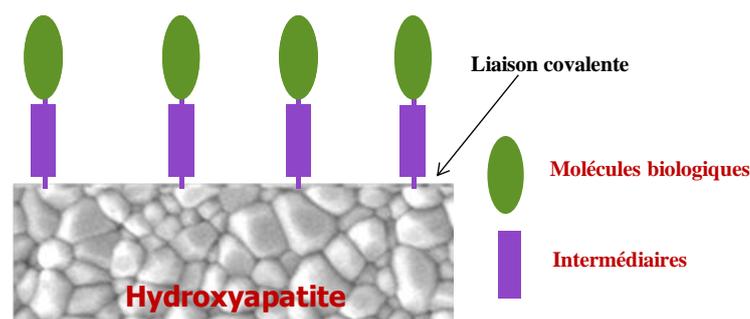


Figure I-13 : Schéma représentatif du greffage covalent de molécules biologiques à la surface d'un substrat en hydroxyapatite

Le procédé le plus couramment employé pour réaliser ce greffage de molécules intermédiaires est la silanisation à l'aide d'organosilanes. Ce procédé est développé dans la troisième partie de ce chapitre bibliographique.

## I.3. Fonctionnalisation de surface par silanisation

La fonctionnalisation d'une surface inorganique par des molécules organiques de type organosilanes, *i.e.* la silanisation de surface, est une méthode fréquemment utilisée pour modifier la surface d'un substrat en assurant une liaison forte substrat/molécule. La silanisation de surface a été mise au point par E.P.Plueddeman *et al.* [107]. D'abord développée pour modifier la surface d'oxydes métalliques et de verres, elle a ensuite été adaptée à d'autres types de substrats. De manière générale, les organosilanes sont immobilisés *via* la formation de liaisons covalentes O-Si-O entre les groupements alcoxyles (OR) du silane et les groupements hydroxyles (OH) présents à la surface du substrat.

Après avoir présenté les organosilanes et leur réactivité, la fonctionnalisation de biomatériaux par silanisation sera illustrée. Puis, les différents travaux qui abordent le greffage d'organosilanes à la surface de phosphates de calcium seront exposés ainsi que l'influence des conditions de greffage sur les dépôts obtenus.

### I.3.1. Définition d'un organosilane

Un organosilane est un composé organique fonctionnel de formule générale  $R_nSiX_{(4-n)}$  ( $n = 0, 1, 2, 3$ ) où X désigne un groupement hydrolysable (alcoyle, halogénure ou carboxylate) et R un groupement organique à courte chaîne non hydrolysable [107]. Le terme « fonctionnalité » désigne le nombre de groupements X hydrolysables auxquels l'atome de silicium est lié (Figure I-14).

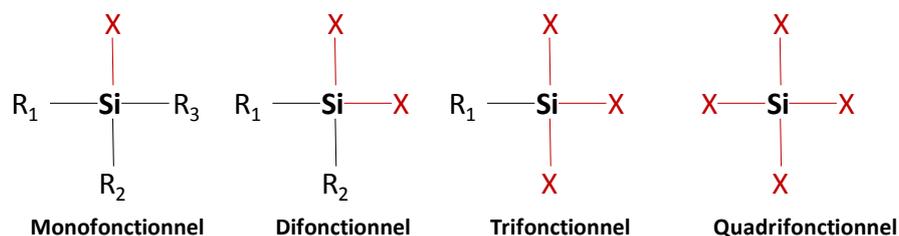


Figure I-14 : Les différentes fonctionnalités des organosilanes

### I.3.2. Réactivité chimique d'un organosilane

Lorsqu'un organosilane se trouve en milieu aqueux, il se produit en premier lieu une réaction d'hydrolyse qui transforme les fonctions alcoxyles portées par l'organosilane en des groupements silanols réactifs et engendre la formation d'alcool ROH (Figure I-15, équation

(a)). Dans un deuxième temps, une réaction d'homocondensation est observée. Elle consiste à la condensation des groupements silanols précédemment formés sur eux-mêmes aboutissant à la formation d'oligomères et conduit à la libération d'eau (Figure I-15, équation (b)). L'homocondensation des organosilanes multifonctionnels donne lieu à la formation de liaisons siloxanes Si-O-Si. Cette liaison se forme soit par réaction entre deux groupements silanols en libérant une molécule d'eau (Figure I-15, équation (c)) soit par réaction entre un groupement silanol et un groupement alcoyle avec la libération d'une fonction alcool comme le montre (Figure I-15, équation (d)).

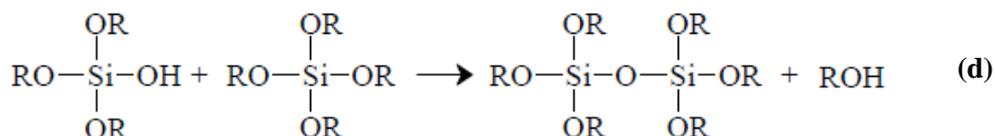
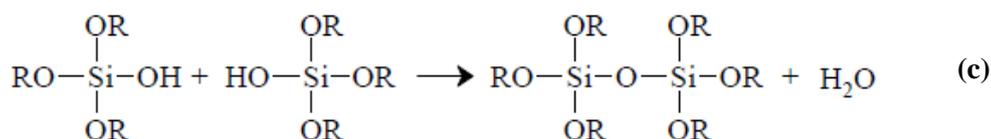
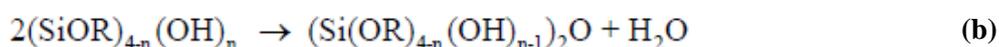
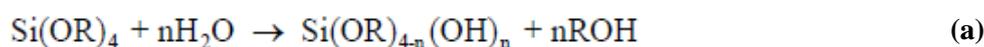


Figure I-15 : Réactions d'hydrolyse et d'homocondensation des organosilanes quadrifonctionnels dans le cas où X = OR [108]

L'homocondensation des silanes peut s'enchaîner jusqu'à la formation d'un réseau tridimensionnel (Figure I-16). Plus l'organosilane portera de groupements hydrolysables, plus il aura tendance à former un réseau 3D. La Figure I-16 montre que les liaisons Si-O-R d'un trialkoxysilane s'hydrolysent facilement en solution aqueuse pour former des silanols  $\text{RSi(OH)}_3$ , composés métastables qui tendent à se condenser par l'intermédiaire de ponts siloxanes Si-O-Si [109]. Cette réaction d'oligomérisation se poursuit pour aboutir à un gel formant un réseau à 3 dimensions.

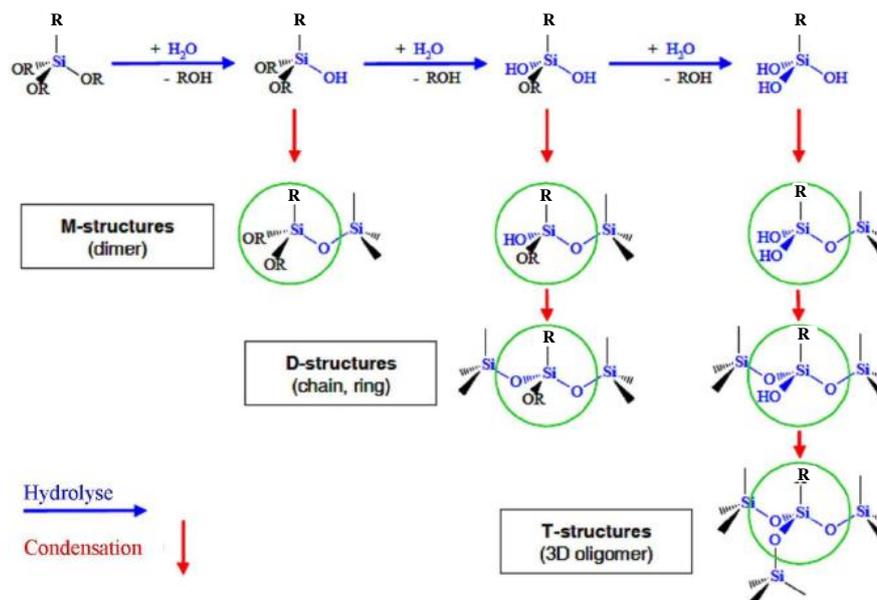


Figure I-16 : Différentes voies d'hydrolyse et d'homocondensation des organosilanes dans le cas où X = OR [110]

Cette réaction de condensation peut avoir lieu à la surface d'un substrat si ce dernier présente des groupements hydroxyles (OH) en surface. Le mécanisme de cette réaction, dite hétérocondensation, est similaire à celui de l'homocondensation. Il aboutira à la formation de liaisons covalentes M-O-Si où M représente un élément chimique existant dans la structure du substrat et portant les sites de surface de type OH. Le substrat peut être soit un matériau organique (*e.g.* un polymère) soit un matériau inorganique (*e.g.* un métal ou une céramique). La Figure I-17 montre un schéma général de la réaction d'hétérocondensation d'un organosilane à la surface d'un substrat.

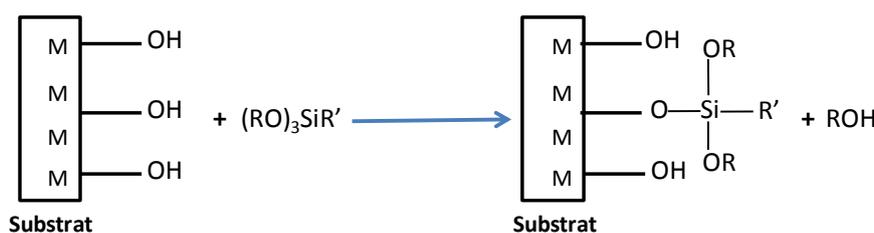


Figure I-17 : Schéma représentatif de la réaction d'hétérocondensation d'un organosilane à la surface d'un substrat dans le cas où X = OR

La réaction de silanisation est influencée par différents paramètres réactionnels représentés sur la Figure I-18 et détaillés dans le paragraphe suivant. Ces paramètres vont jouer sur la densité, l'architecture et la répartition des organosilanes à la surface du substrat.

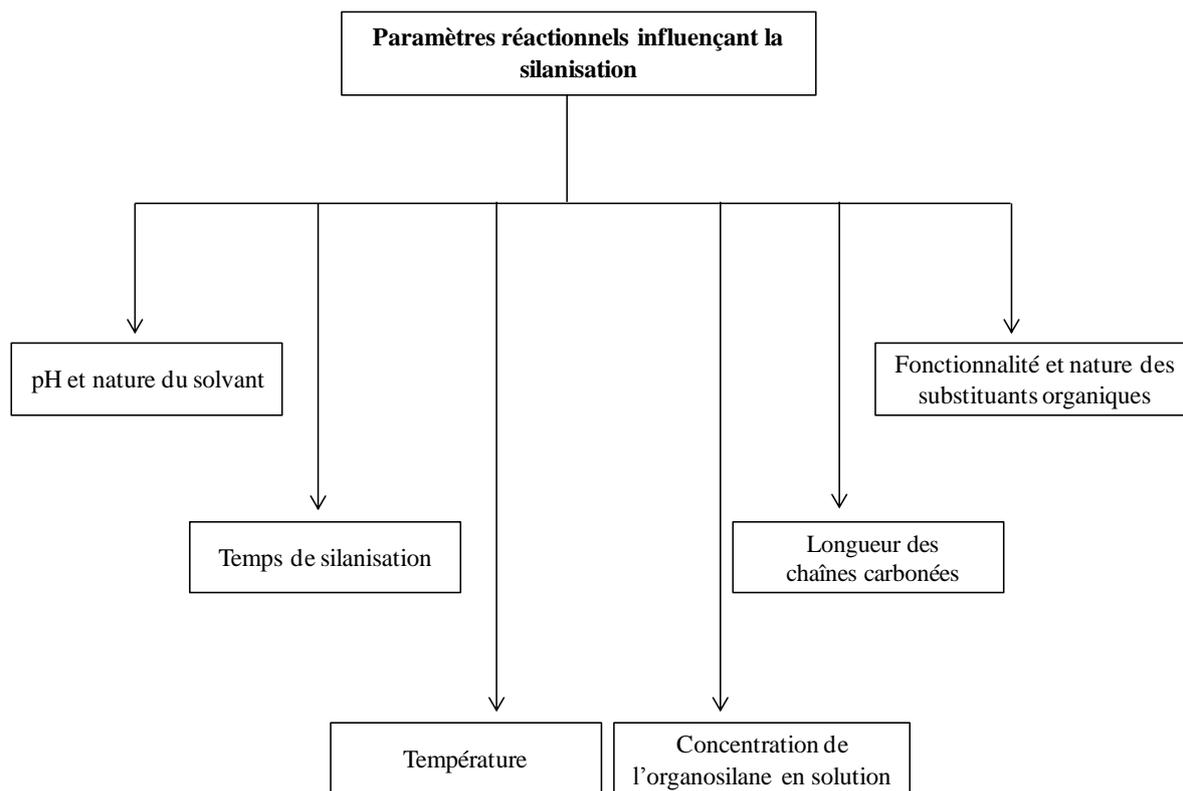


Figure I-18 : Organigramme des paramètres influençant la réaction de silanisation

### I.3.3. Paramètres influençant la silanisation

Les principaux paramètres des protocoles de silanisation utilisés dans les références citées dans ce paragraphe sont résumés au Tableau I-1. Ces paramètres concernent la silanisation de substrats non métalliques.

Tableau I-1 : Paramètres de greffage rencontrés dans la littérature lors de la silanisation des substrats par des organosilanes

Réf.	Substrat	Silane	Concentration en silane	Conditions de réaction	Solvant	Rinçage / Séchage
[105]	Pastille en HA	3-Aminopropyltriéthoxylesilane	1,5% v-v	Agitation 4 h/40°C	Toluène anhydre	Rinçage toluène et chloroforme, séchage sous vide
[111]	Silicium	Octadécyltrichlorosilane	1mM	Immersion à T <sub>amb</sub>	Toluène anhydre	-
[112]	Silicium, silice	Alkyltrichlorosilanes	0,1-0,5% v-v	Immersion de 1 à 48 h à T <sub>amb</sub>	Hexadécane	Rinçage dichlorométhane
[113]	Silice	3-Aminopropyl-1-(méthyl-diéthoxylesilane)	0,1-1% v-v	Immersion : 2 h à T <sub>amb</sub>	Toluène anhydre	Rinçage acétone et éthanol, séchage sous argon
[114]	Silice poreuse	Triméthoxylesilanes, chlorosilanes	-	Agitation sous reflux pendant 14 h	-	Rinçage propan-2-ol
[115]	Oxyde de silicium	n-Alkyltrichlorosilanes	0,001M	Agitation à T <sub>max</sub> = 60°C	n-Alcanes	Rinçage eau (3 fois), séchage à l'étuve
[116]	Hydroxyapatite	γ-Aminopropyltriéthoxylesilane	0,002% v	Agitation sous reflux pendant 24 h/120°C	Toluène anhydre	Rinçage toluène anhydre, séchage à 60°C/24 h
[117]	Silicium	Octadécyltrichlorosilane	-	Immersion : 1 à 90 min	Tétrachlorométhane, hexadécane	Rinçage chloroforme
[118]	Silicium	3-Aminopropyltriéthoxylesilane	2% v-v	Immersion : 15 min à 24 h	Toluène anhydre, tampon phosphate salin	Rinçage (solvant non précisé), séchage sous azote

[119]	Silicium	n-Octadécyltrichlorosilane	-	Immersion de 6 h	Hexane, tétrahydrofurane, dichlorométhane, toluène	Rinçage toluène et éthanol, séchage sous vide à 120°C/1h
[120]	Oxyde de silicium	3-Aminopropyltriéthoxylesilane	0,4% v	Immersion à T <sub>amb</sub>	Toluène, eau	Rinçage éthanol, séchage sous azote
[121]	Oxyde de Fer	γ-Aminopropyltriéthoxylesilane	1% v	Immersion de 5 min	Eau	Rinçage eau, séchage sous azote
[122]	Silice	3-glycidoxypropyltriméthoxylesilane	0,03% v	Immersion de 24 h	Eau, isopropanole	-
[123]	Silice	Ethoxysilane	0,02% v	Immersion de 12 h	Toluène, tétrachlorométhane, iso-octane, triglyme	Rinçage pentane (3 fois), séchage sous vide
[124]	Hydroxyapatite	Octadécyltrichlorosilane	3-5 mmol/l	Immersion : 4 à 36 heures	Toluène	Rinçage toluène, séchage sous vide à 120°C/24 h

### I.3.3.1. Effet du pH et de la nature du solvant

Le pH du milieu réactionnel ainsi que la nature du solvant (aqueux/anhydre) vont influencer les cinétiques des réactions d'hydrolyse et de condensation. Le Tableau I-2 résume l'influence du milieu réactionnel sur les différentes réactions rencontrées au cours de la silanisation d'un substrat.

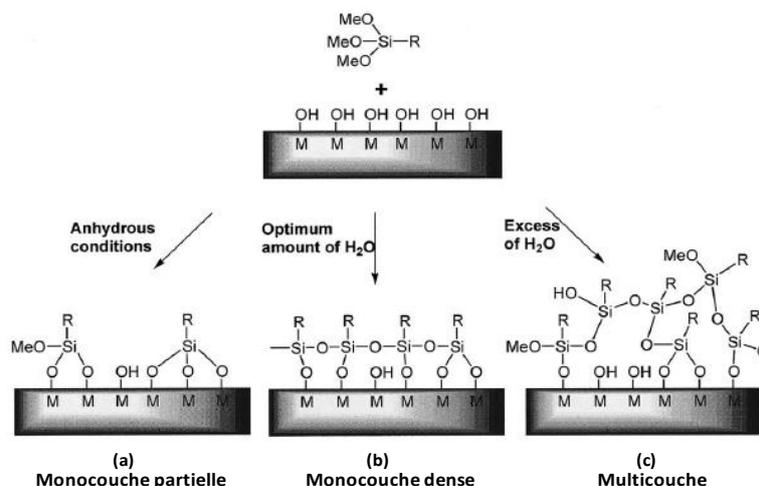
**Tableau I-2 : Influence du milieu réactionnel sur les réactions d'hydrolyse, d'homocondensation et d'hétérocondensation (+ signifie que la réaction est favorisée et – signifie que la réaction est défavorisée)**

Paramètre	pH			Nature du solvant		Quantité d'eau		
	Acide	neutre	basique	anhydre	aqueux	absence	faible quantité	excès
<b>Réactions</b>								
Hydrolyse	+	-	+	-	+	-	-	+
Homocondensation	-	-	+	-	+	-	+	+
Hétérocondensation	+	-	+	+	-	+	+	-

La réaction d'hydrolyse est minimisée autour de pH 7. En effet, cette réaction requière l'emploi d'acides (ex : acide acétique) ou de bases (ex : ammoniacque) [125]. L'homocondensation sera fortement influencée par le pH du milieu réactionnel. Un milieu acide (au minimum autour de pH 2) [125] ralentira l'homocondensation alors qu'elle sera favorisée en milieu basique. La réaction d'hétérocondensation peut, quant à elle, avoir lieu en milieu acide ou basique.

Un des paramètres essentiels à l'obtention de monocouches auto-assemblées de bonne qualité à la surface du substrat est la quantité d'eau présente dans le milieu réactionnel [126]. En effet, celle-ci est fortement impliquée dans les réactions d'homo et hétérocondensation. L'eau provient soit du solvant, soit a été adsorbée à la surface du substrat avant réaction. En milieu aqueux la réaction d'hétérocondensation est minoritaire, la réaction d'homocondensation étant favorisée, alors qu'elle est majoritaire en milieu anhydre. En absence totale d'eau, des monocouches (pas d'homocondensation) partielles et incomplètes sont obtenues, les molécules silanes étant réparties de façon éparse à la surface du substrat [127] (Figure I-19-a). En présence d'un excès d'eau, une polymérisation en solution a lieu (homocondensation). Puis, par hétérocondensation, il se forme des amas ou îlots de polymères à la surface du substrat. Il en résulte un réseau polysiloxane tridimensionnel fixé uniquement par quelques liaisons Si-O-M (Figure I-19-c). Pour obtenir une monocouche auto-assemblée dense, un strict contrôle de la teneur en eau est requis afin de favoriser les réactions avec la surface mais aussi la polymérisation latérale des silanes et ainsi obtenir un réseau polysiloxane

bidimensionnel (Figure I-19-b). Afin de limiter l'homocondensation, de nombreuses réactions de silanisation sont donc réalisées dans des solvants anhydres.



**Figure I-19 : Influence de la quantité d'eau sur le greffage des organosilanes trifonctionnels dans le cas où X = OMe [128]**

L'influence de la nature de solvant (toluène, PBS pour *phosphate buffer solution*) sur l'épaisseur de film formé après silanisation a été étudiée par Kim *et al.* [118] qui ont greffé du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) à la surface de wafer de silicium. Cette étude a montré que la structure et l'épaisseur des films d'APTES formés à la surface du substrat sont influencées par le temps d'immersion et la nature de la solution. Dans une solution de toluène anhydre, l'épaisseur des films d'APTES formés varie entre 10 et 144 Å en fonction du temps de silanisation. En revanche, des films d'APTES ayant une épaisseur variant entre 8 et 13 Å ont été formés lorsque la silanisation est effectuée dans des solutions aqueuses contenant des ions (PBS). Ils ont aussi montré que dans une solution de toluène anhydre, les films croissent à la fois par liaison covalente et adsorption de l'APTES ainsi les groupements amines semblent beaucoup plus disponibles. Mais, les films d'APTES se développent par des interactions électrostatiques/liaisons hydrogène lorsqu'ils sont déposés à partir des solutions aqueuses.

Parallèlement, la polarité du solvant anhydre va influencer la densité de greffage (taux de molécules par unité de surface). Un solvant polaire possède par définition un fort moment dipolaire ce qui provoque des interactions non négligeables avec les molécules de soluté polaires ou polarisables (interactions de Van der Waals) induisant une solvataion des molécules de silane et limitant ainsi leurs interactions avec la surface de substrat. De ce fait, la plupart des réactions de silanisation sont effectuées dans des solvants anhydres apolaires tels

que le toluène ou l'hexane. Les travaux effectués par Manifar *et al.* [119] ont montré l'influence de la nature du solvant sur la morphologie de couches d'octadecyltrichlorosilane (OTS) à la surface de wafer de silicium préalablement nettoyé par une solution de Piranha. La morphologie des couches dépend de la polarité. Les images topographiques en AFM indiquent que pour des solvants polaires tels que le dichlorométhane (DCM) ou le tétrahydrofurane (THF), la nanostructuration finale des couches est homogène avec présence de quelques nodules. Les solvants non ou peu polaires comme l'hexane ou le toluène, conduisent à des surfaces qui présentent de plus gros agrégats.

En milieu anhydre on peut distinguer deux mécanismes différents de greffage des organosilanes. Le premier mécanisme est une réaction d'hétérocondensation entre les groupements hydroxyles existant à la surface du substrat et les groupements hydrolysables des organosilanes. Le deuxième mécanisme est basé sur l'effet catalytique du groupement terminal de l'organosilane. Dans le cas de l'APTES [120] la réaction subit une auto-catalyse due au groupement amine terminal conduisant à une condensation de la molécule à la surface du substrat quelles que soient les conditions réactionnelles et la nature du substrat (Figure I-20).

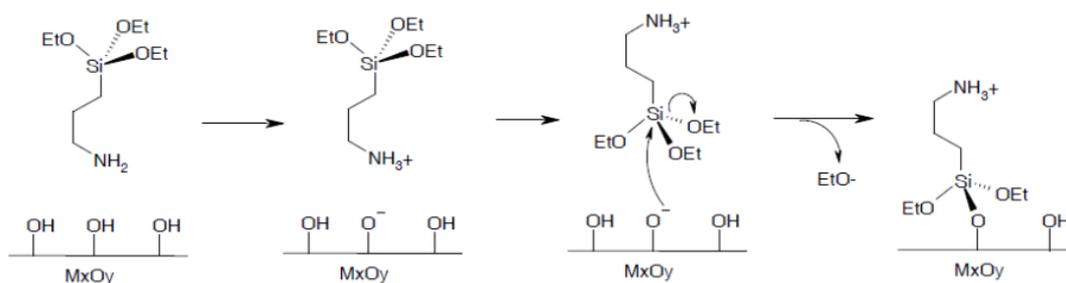


Figure I-20 : Réaction de condensation auto-catalysée entre une molécule d'APTES et la surface d'un oxyde métallique dans un solvant anhydre [129]

Malgré son influence positive sur le greffage, le groupement terminal amine qui est hydrophile, peut réduire la qualité de la monocouche en s'adsorbant à la surface du matériau et en bloquant ainsi les sites fonctionnels [121] *via* l'établissement d'interactions ioniques avec les sites OH libres existant à la surface du substrat [130].

### I.3.3.2. Effet de la température

La température lors de la réaction de greffage est un paramètre important car elle influence la nature des réactions (homocondensation *vs* hétérocondensation) et la structuration des couches d'organosilanes formées à la surface du substrat.

On peut définir deux grandes écoles, concernant l'influence de la température sur la structuration de la couche formée par un organosilane donné à la surface du substrat.

La première suppose que l'augmentation de la température de silanisation aboutit à des couches d'organosilanes non organisées à la surface de substrat. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Brzoska *et al.* [115]. Ils utilisent des molécules de n-alkyltrichlorosilanes immobilisées à la surface d'un substrat d'oxyde de silicium pour définir une température critique ( $T_c = 28^\circ\text{C}$ ) au dessous de laquelle les molécules forment en surface une phase organisée en monocouche. Au dessus de cette température, les molécules s'étalent préférentiellement à la surface et forment une phase désordonnée.

La deuxième école montre le contraire. Elle indique qu'en augmentant la température de silanisation, des monocouches de plus en plus denses et ordonnées sont formées à la surface du substrat. Les principales études confirmant cette hypothèse sont celles de Furuzono *et al.* [116] ainsi que Schuessle *et al.* [105] qui ont utilisé une température de l'ordre de  $120^\circ\text{C}$  lors de la fonctionnalisation de poudres et de pastilles denses en hydroxyapatites (HA) par de l'APTMS (3-aminopropyltriméthoxysilane) et de l'APTES. De même, Davidovits *et al.* [117] ont étudié l'influence de la température de silanisation sur la structuration des couches d'octadécyltrichlorosilane (OTS) à la surface de wafers de silicium. Pour des températures élevées ( $43 \pm 1^\circ\text{C}$ ), la réaction en solution (homocondensation) est favorisée et des couches ordonnées sont observées. Pour des températures basses ( $12 \pm 1^\circ\text{C}$ ), les réactions de surface (hétérocondensation), en compétition avec les réactions de polymérisation en solution (homocondensation) sont quant à elles favorisées conduisant à des couches désordonnées.

### **I.3.3.3. Concentration de l'organosilane en solution**

L'augmentation de la concentration de l'organosilane en solution influence non seulement la densité des molécules à la surface du substrat, mais aussi leur état de condensation et leur répartition. Généralement, l'augmentation de la concentration permet d'augmenter le taux de recouvrement de surface. Il existe une concentration optimale, qui correspond à l'encombrement stérique maximum de la surface par les molécules, au-delà de laquelle le taux de couverture reste stable et ne varie plus [131]. Dans le cas d'organosilanes multifonctionnels, l'augmentation de la concentration en solution favorise l'apparition d'espèces plus condensées en surface de silice [132].

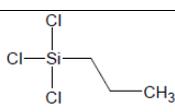
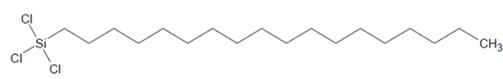
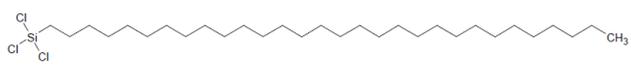
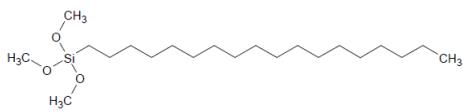
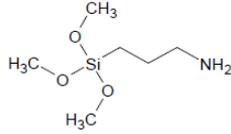
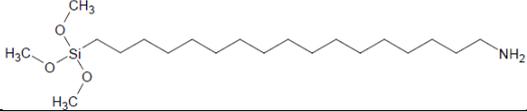
La conformation des molécules à la surface de la silice dépend également de la concentration de l'organosilane dans le milieu. La concentration de la solution influence le taux de recouvrement qui à son tour va influencer la conformation des molécules d'organosilanes. À forte concentration, les molécules se regroupent en paquet ou en îlots (si la concentration de l'organosilane est inférieure à celle de la formation d'une monocouche) avec les chaînes carbonées orientées vers l'extérieur. À faible concentration, les molécules couvrent une large surface et adoptent une conformation repliée [122].

#### **I.3.3.4. Effet de la longueur de la chaîne carbonée et du temps de silanisation**

Des nombreux travaux dans la littérature ont montré qu'un nombre de carbone (au niveau des chaînes non hydrolysables) suffisamment élevé engendre des multicouches auto-assemblées bien ordonnées et orientées perpendiculairement à la surface. Cette organisation est attribuée à des interactions très fortes entre les groupements portés par les chaînes et à l'encombrement stérique engendré par des chaînes carbonées de grande taille [133].

Bierbaum *et al.* [134] ont comparé le greffage, à la surface d'un wafer de silicium oxydé, de différentes molécules d'organosilanes ayant des longueurs de chaînes R, des fonctions terminales et des groupements réactifs variés. Le Tableau I-3 récapitule les différentes molécules d'organosilanes étudiées. Ils ont montré que les organosilanes ayant une fonction méthyle terminale et des longueurs des chaînes carbonées intermédiaires, comme par exemple l'OTS et l'OTMS, ont tendance à former des monocouches auto-assemblées et à s'orienter perpendiculairement à la surface du substrat. Le n-triacontyltrichlorosilane (TCTS) dont la chaîne hydrocarbonée est plus longue conduit lui à la formation d'un film désordonné et moins orienté que le film formé par l'OTS. Les films formés par l'aminosilane (AHTMS) ayant la même longueur de chaîne carbonée que l'OTS et l'OTMS sont complètement désordonnés. Cela est probablement dû à l'interaction du groupement amine avec la surface du substrat. Les organosilanes ayant de courtes chaînes alkyles et des fonctions terminales de type méthyle ou amine (APTMS et PTS) conduisent à des films caractérisés par une orientation aléatoire des molécules.

Tableau I-3 : Noms, acronymes et formules chimiques et semi-développées des organosilanes employés par Bierbaum *et al.* [134]

Nom et acronyme de l'organosilane	Formule chimique	Formule semi-développée
n-Propyltrichlorosilane (PTS)		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{Si}(\text{Cl})_3$
n-Octadécyltrichlorosilane (OTS)		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{Cl})_3$
n-Triacontyltrichlorosilane (TCTS)		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{29}\text{Si}(\text{Cl})_3$
n-Octadécyltriméthoxysilane (OTMS)		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
3-Aminopropyltriméthoxysilane (APTMS)		$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
(17-Aminoheptadécyl)triméthoxysilane (AHTMS)		$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$

Généralement, l'augmentation du temps d'immersion du substrat dans une solution d'organosilane favorise l'épaisseur de la couche formée en améliorant son taux de condensation [123]. Les temps de silanisation rencontrés dans la littérature sont variables de quelques minutes à plusieurs heures et dépendant de l'organosilane employé (Tableau I-1). Le temps de la réaction est ainsi conditionné par la nature de la molécule d'organosilane : nature de ses groupements terminaux, nature et nombres de ses groupements hydrolysables. Mais, l'impact du paramètre « temps », pour un silane donné ne fait pas consensus. Les résultats FTIR-ATR obtenus par Banga *et al.* [111] ont montré qu'un film d'octadécyltrichlorosilane (OTS) se forme à la surface du silicium après 131 minutes de silanisation. Pour le même organosilane et dans des conditions de greffage différentes, Wasserman *et al.* [112] suggèrent 24 heures et Silberzan *et al.* [135] 3 minutes.

Enfin, un temps de silanisation trop important peut avoir un effet contre productif. Les travaux de Lindlar *et al.* [114] sont basés sur l'étude du greffage de triméthoxysilanes et de chlorosilanes à la surface d'un matériau en silice poreuse (M41S). Les résultats montrent qu'un temps de reflux prolongé ( $t = 4$  heures) peut inverser la réaction de polymérisation à la surface du matériau pour les deux types d'organosilanes.

### I.3.3.5. Fonctionnalité et nature des substituant organiques

La densité de greffage est fonction de la réactivité des silanes. La nature et le nombre de groupements R et X des organosilanes  $R_nSiX_{(4-n)}$  (X est le groupement hydrolysable) ont une influence capitale sur les cinétiques d'hydrolyse/condensation.

La fonctionnalité du silane oriente dans un premier temps la morphologie du dépôt par le nombre de points d'ancrage entre la molécule et le substrat. En effet, avec des silanes monofonctionnels ( $R_3SiX$ ), on obtient une couche monomoléculaire sur le solide ; avec des silanes multifonctionnels, la diversité des modes d'ancrage du silane induit une structure finale du recouvrement plus complexe [136]. En augmentant le nombre de groupements hydrolysables dans la structure chimique de l'organosilane, les réactions d'homocondensation et d'hétérocondensation sont favorisées et donc la densité de greffage sera plus importante (paragraphe I.3.2). De plus, la structure électronique du groupement R est un paramètre également important. La présence d'hétéroatomes et de liaisons multiples (fonctions vinyle ou allyle) influe sur la polarité de la chaîne et donc la réactivité [136].

Ces dernières années, l'utilisation de chlorosilanes de formule générale  $R_nSiCl_{4-n}$  ( $n = 0, 1, 2, 3$ ) s'est rependue à cause de leur grande réactivité due à la présence du chlore dans leur structure (la liaison Si-Cl est hydrolysable) [124]. Les chlorosilanes sont corrosifs, inflammables et réagissent avec tous les agents polaires. En milieu aqueux, ils forment des silanols  $R_{n-x}Si(OH)_x$  instable (molécules transitoires) qui se condensent rapidement pour former des organosiloxanes constitués d'enchaînements Si-O-Si [137]. Ces chlorosilanes sont généralement utilisés dans le but d'améliorer et d'optimiser les propriétés de surface des substrats. Ils sont notamment employés dans la fabrication des cellules photovoltaïques, de semi-conducteurs et de fibres optiques. Le chlore est un groupement réactif qui favorise le greffage direct alors que le groupement amine peut conduire à une réaction d'autocatalyse de l'organosilane à la surface du substrat. La nature de groupements terminaux de l'organosilane influence donc sa réactivité et son mode de greffage.

### I.3.3.6. Conclusion

La silanisation est un procédé de modification de surface couramment utilisé et ceux sur de nombreux substrats. Elle est très sensible aux conditions opératoires et plusieurs paramètres (pH, température, pression atmosphérique, nature du solvant, *etc.*) interviennent sur l'efficacité du greffage (Figure I-21 et Tableau I-1).

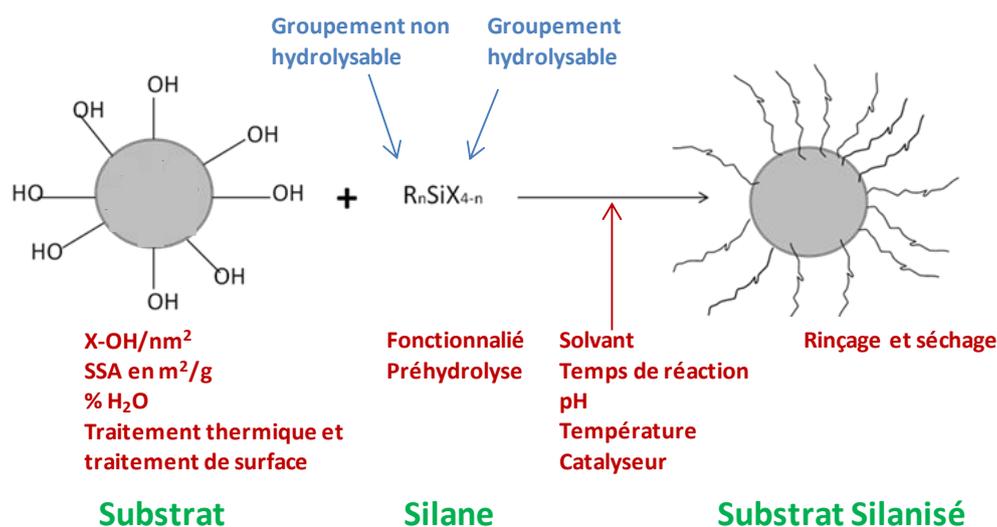


Figure I-21 : Paramètres pertinents lors de la fonctionnalisation de particules d'hydroxyapatite par un organosilane

Pour le substrat, les groupements hydroxyles présents naturellement à sa surface (cas de céramique) ou suite à un traitement spécifique (cas de métaux) sont les sites de liaison principaux entre l'organosilane et le substrat. L'augmentation de la densité de ces groupements (OH) amène à une amélioration de la densité de greffage. De ce fait, la surface spécifique du substrat (SSA en  $m^2/g$ ) sera un élément essentiel dans le contrôle du procédé de silanisation, sa maîtrise permet de moduler la quantité de molécules greffées à masse de substrat égale.

Le pH du milieu influence l'hydrolyse des organosilanes ainsi que leur condensation. C'est pourquoi, afin de contrôler la réaction, les silanisations sont généralement effectuées en milieu anhydre en utilisant un solvant aprotique apolaire et sous un balayage gazeux (argon ou azote). Des monocouches partielles et incomplètes d'organosilanes sont obtenues avec ses solvants complètement anhydres, en revanche en présence d'une quantité maîtrisée d'eau dans le milieu, des monocouches complètes et reproductibles ont été observées.

Le temps de silanisation, varie de 1 h à 24 h et la température de silanisation de l'ambiante jusqu'à 300°C. Ces deux paramètres influence la structuration du film formé. Il semblerait que des réactions de silanisation effectuées sous reflux à hautes températures et avec des temps de réaction longs donnent lieu à de faibles densités d'organosilanes à la surface du substrat.

Une influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'organosilane a été mise en évidence, des multicouches auto-assemblés sont obtenus avec des organosilanes ayant de longues chaînes carbonées ( $C > 18$ ). La nature des groupements organiques et le nombre des groupements hydrolysables portés par l'organosilane sont également à prendre en considération.

En résumé, il est difficile de déduire, à partir des données bibliographiques, un protocole universel de greffage. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte et le choix des organosilanes et des conditions de leur greffage dépend des objectifs visés.

### **I.3.4. Silanisation de la surface de phosphates de calcium en vue d'une fonctionnalisation thérapeutique**

On rencontre dans la littérature de nombreux travaux concernant la fonctionnalisation thérapeutique, *via* le greffage d'organosilanes, de métaux dont la surface a été préalablement oxydée (silicium [138], titane [67, 139, 140]), de céramiques comme les oxydes de métaux (oxyde de zinc (ZnO) [141], oxyde de titane ( $TiO_2$ ) [142]) ou de verres bioactifs [143]. La plupart des réactions de greffage sont effectuées dans des solvants anhydres comme le toluène, l'hexane ou le chloroforme alors que les conditions de réactions de silanisation diffèrent selon les travaux.

La Figure I-22 présente le principe général de la fonctionnalisation de surface par des biomolécules. Le protocole utilisé dans la plupart de ces travaux, consiste à oxyder la surface du substrat afin d'avoir des sites de greffage de type OH lorsque ces derniers ne sont pas naturellement présents. Ensuite, une (ou plusieurs) molécule(s) intermédiaire(s) est (sont) greffée(s) à la surface du matériau. La dernière étape de ce protocole général est consacrée à l'immobilisation covalente de la molécule biologiquement active à la surface.

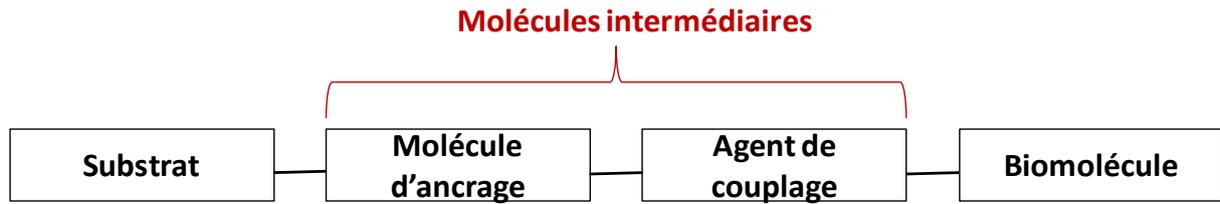


Figure I-22 : Principe de la fonctionnalisation par des biomolécules de la surface des substrats

La stratégie générale de la modification de la surface de matériaux à base de phosphate de calcium est globalement la même que celle employée avec les métaux et les polymères : silanisation de la surface, greffage ou non d'agents de couplage (cross-linker) puis immobilisation des molécules biologiques (peptides, protéines, facteur de croissance, etc.). Cela permet d'avoir en surface les fonctions nécessaires à l'immobilisation de la biomolécule et une distance suffisante substrat/cellules osseuses [144, 145].

Le Tableau I-4 récapitule les principaux paramètres de greffage rencontrés dans la littérature lors de la fonctionnalisation de l'hydroxyapatite par des molécules intermédiaires de type organosilanes. Dans la plupart de ces travaux le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est utilisé comme molécule intermédiaire pour la modification de la surface des substrats. Les concentrations des organosilanes et les conditions de réactions utilisées diffèrent en fonction des travaux. Il est important de noter que la plupart des réactions de silanisation sont effectuées dans des solvants anhydres afin de limiter les réactions d'hydrolyse et d'homocondensation de l'APTES.

Tableau I-4 : Paramètres de greffage rencontrés dans la littérature lors de la fonctionnalisation de l'hydroxyapatite (HA) par des organosilanes

Réf.	Substrat	Silane	Concentration en silane	Conditions de réaction	Solvant	Rinçage / Séchage	Molécules immobilisées
[68]	Poudre en HA	APTES	0,01M	Immersion pendant 2 h avec agitation à T <sub>amb</sub>	Hexane anhydre	Filtration, rinçage sous argon	RGD linéaire et cyclique
[105]	Pastille en HA	APTES	(1.5% v-v)	Agitation pendant 4 h à 40°C	Toluène anhydre	Rinçage par toluène et chloroforme et séchage sous vide	BMP-2
[146]	Poudre en HA	Triméthoxysilanes (R variable)	-	Chauffage à reflux sous azote pendant 48 h	Xylène anhydre	Rinçage avec l'éthanol, séchage sous vide pendant 24 h à 323 K	-
[147]	Granules en HA carbonatée	APTES, TEOS	1 M	Agitation du mélange pendant 3 h	Hexane anhydre	Rinçage avec l'acétate d'éthyle et l'hexane, séchage sous vide pendant 24 h	-
[148, 149]	Poudre en HA	APTES	-	pH fixé entre 9 et 10, T <sub>amb</sub>	Solution aqueuse	Filtration, séchage à T <sub>amb</sub> puis à 130°C (étuve)	PNIPAM, P(BLG-NCA)
[150]	Poudre en HA	GPTMS	-	Sous agitation pendant 48 h/95°C	Diméthyleformamide anhydre	Rinçage au THF, xylène et eau déminéralisée	Cyclodextrine
[151]	HA cristalline, phosphate de calcium amorphe	APTES	0,01M	Immersion pendant 2 h avec agitation à T <sub>amb</sub>	Hexane anhydre	Filtration, rinçage sous argon	Séquences peptidiques KRSR, KSRR
[152]	Skelite™	APTES	0,01M	Immersion pendant 2 h avec agitation à T <sub>amb</sub>	Ethanol anhydre	Rinçage avec éthanol anhydre, séchage sous air	BCSP™-1
[153]	Pastille en HA	APTES	(5% v-v)	Agitation sous reflux pendant 3,5 h	Toluène anhydre	Rinçage 3 fois par trichlorométhane, acétone, éthanol et séchage sous air	BMP-2

Da Silva *et al.* [146] ont effectué une réaction de silanisation à la surface de poudres d'hydroxyapatite stœchiométrique (HA, Ca/P = 10/6) en utilisant trois triméthoxylesilanes de formule générale  $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiR}$  avec  $\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  et  $(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$  (Figure I-23). Les analyses thermogravimétriques et la résonance magnétique nucléaire ( $^{13}\text{C}$ ) ont confirmé que la réaction de silanisation a eu lieu à la surface de l'HA avec les trois organosilanes. Les résultats ont montré qu'une augmentation de la longueur de la chaîne d'organosilane induisait une augmentation de la quantité de molécule en surface (0,75 mmol/g pour HApR1, 4,71 mmol/g pour HApR2 et 7,45 mmol/g pour HApR3).

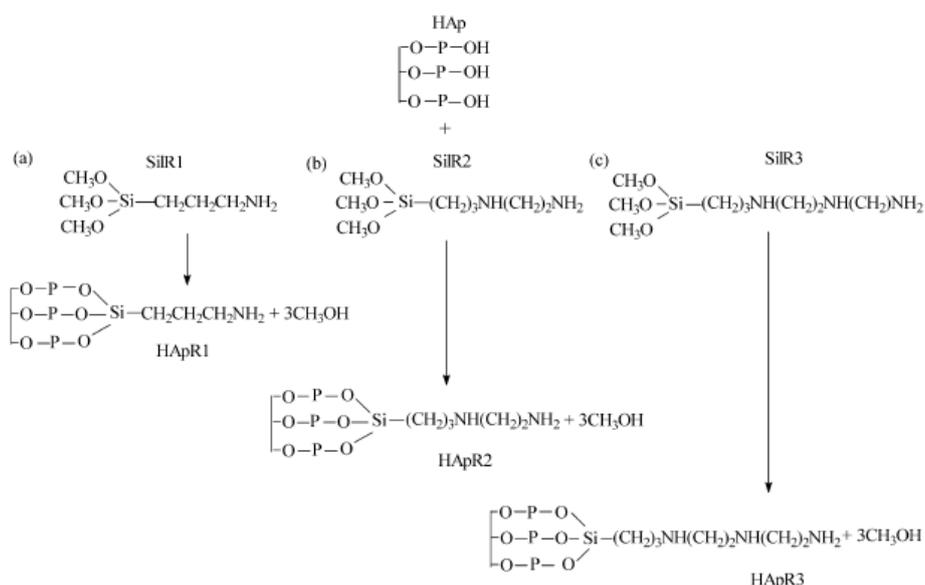


Figure I-23 : Greffage des méthoxylesilanes à la surface d'HA établi par Da Silva *et al.* [146]

Les travaux récents de Russo *et al.* [147] ont porté sur l'étude de la silanisation de la surface d'hydroxyapatite carbonatée par des mélanges d'organosilanes afin d'optimiser le potentiel d'immobilisation de molécules bioactives à la surface de la biocéramique. Les résultats obtenus montrent qu'un mélange d'organosilane entre l'APTES (3-aminopropyltriéthoxylesilane) et le TEOS (orthosilicate de tétraéthyle) est plus efficace que l'APTES seul. Théoriquement, le greffage de l'APTES devrait permettre un couplage homogène entre les groupements OH de la surface du substrat et les groupements silanols de l'APTES (Figure I-24-a). Cependant, les résultats expérimentaux montrent que la formation de liaisons de type Si-O entre les groupements silanols de l'APTES et les groupements OH du substrat est accompagnée par une physisorption (Figure I-24-b) pouvant également impliquer une inversion moléculaire de l'APTES (Figure I-24-c).

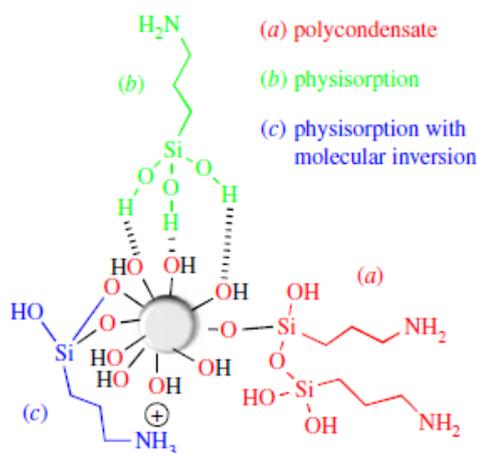


Figure I-24 : Différents modes d'interaction entre les groupements silanols de l'APTES et les groupements OH de la surface [147]

La silanisation de poudres d'HA est également employée en vue de les fonctionnaliser par des polymères biocompatibles. Les travaux de Wei *et al.* [148, 149] portent sur la fonctionnalisation de poudre d'HA par du poly(N-isopropylacrylamide) noté PNIPAM [148] et du (g-benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride) noté P(BLG-NCA) [149]. Dans les deux cas, le greffage du polymère est précédé d'une silanisation par de l'APTES afin de créer des fonctions amines à la surface de l'HA. Puis la polymérisation est initiée soit directement à partir des groupements amines présents à la surface (cas du monomère (BLG-NCA), soit suite à une bromation des molécules d'APTES (cas du monomère PNIPAM), le brome étant plus réactif qu'une amine.

Un autre type d'organoalkoxysilane, le (3-glycidyloxypropyl) triméthoxysilane (GPTMS), a été utilisé par Jacobsen *et al.* [150] pour fonctionnaliser une surface de BCP (70% HA : 30%  $\beta$ -TCP). Cet organosilane est caractérisé par une fonction terminale de type époxy, qui réagit directement sur de la cyclodextrine (molécule cage utilisée pour la libération continue de principe actif) pour former une liaison de type éther avec la molécule biologique (Figure I-25).

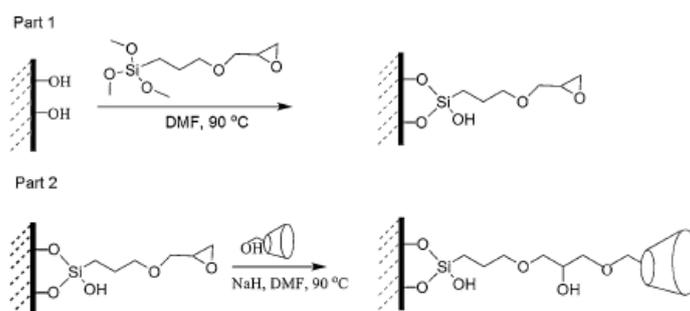


Figure I-25 : Procédé de greffage de la  $\beta$ -cyclodextrine à la surface d'HA [150]

Dans le cadre de l'immobilisation de la séquence peptidique RGD à la surface des substrats à base de phosphate de calcium, Durrieu *et al.* [68] ont transposé le procédé développé pour la fonctionnalisation de la silice [65] aux surfaces d'hydroxyapatite (Figure I-26).

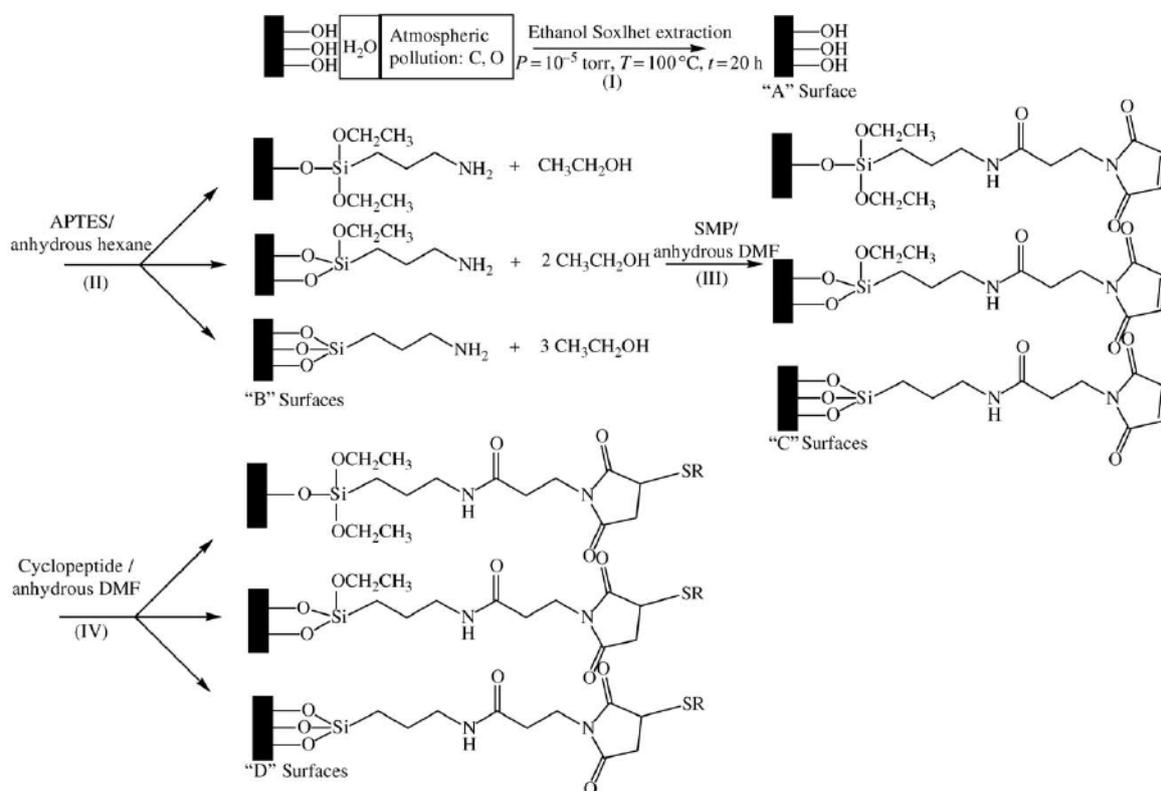


Figure I-26 : Procédé de greffage d'APTES à la surface d'HA établi par Durrieu *et al.* [68]

Dans un premier temps, le substrat d'HA est dégazé sous vide ( $10^{-5}$  torr) à  $100^\circ\text{C}$  pendant 20 h afin d'éliminer l'eau et les impuretés adsorbées à sa surface (Figure I-26-I). Puis une silanisation par de l'APTES dans de l'hexane anhydre est effectuée (Figure I-26-II). Ensuite, la surface est mise en présence d'un agent de couplage SMP (Malimido Propionate) (Figure I-26-III). Cette étape permet d'apporter à la surface du matériau un groupement malimide ( $\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{N}$ ) dont la double liaison  $\text{C}=\text{C}$  réagit facilement avec les fonctions thiols ( $\text{R-SH}$ ) de la cystéine présente dans des peptides RGD cycliques et linéaires (Figure I-26-IV).

Une étude cellulaire *in vitro* menée avec des cellules ostéoprogénitrices utilisées de la moelle osseuse humaine (HBMSC pour *Human Bone Marrow Stromal Cells*), a été effectuée suite à l'immobilisation des séquences RGD linéaire et cyclique. Les résultats quantitatifs ont montré une amélioration de l'adhésion cellulaire dans le deux cas. Plus précisément, la séquence RGD cyclique améliore l'adhésion cellulaire à 3h, alors que la séquence linéaire l'améliore à 24 h.

Nelson *et al.* [151] ont utilisé le même protocole expérimental que celui établi par Durrieu *et al.* [68] afin de fonctionnaliser la surface d'HA cristalline et de phosphate de calcium amorphe par deux autres séquences peptidiques : les séquences Lysine-Arginine-Sérine-Arginine (KRSR) et Lysine-Sérine-Arginine-Arginine (KSRR) (Figure I-27). Dans le cas de la séquence KSRR, les études biologiques *in vitro* ont montré une amélioration de l'adhésion de cellules ostéoblastes d'origine humaine à la surface d'HA cristalline par rapport au phosphate de calcium amorphe. Mais, l'adhérence était similaire pour l'HA cristalline non fonctionnalisée ou fonctionnalisée par la séquence KRSR.

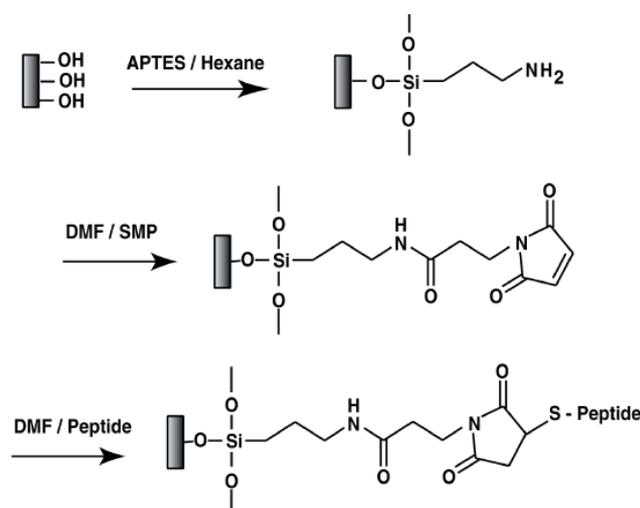


Figure I-27 : Procédé de greffage utilisé par Nelson *et al.* [151]

Sur la base des travaux de Durrieu *et al.* [68], une nouvelle stratégie à plusieurs étapes a été proposée par Wang *et al.* [152]. Elle consiste à fonctionnaliser la surface de pastilles de Skelite™ (une céramique biodégradable composée de 33% d'hydroxyapatite et de 67% de phosphate tricalcique contenant du silicium) par une séquence peptidique synthétique de collagène humain (BCSP™-1) après une réaction de silanisation de la céramique par de l'APTES. Le protocole est détaillé à la Figure I-28.

Une silanisation par de l'APTES dans de l'éthanol anhydre est effectuée (Figure I-28-1), puis la surface est mise en présence d'un agent de couplage l'ester bis-N-hydroxysuccinimide (DSS) (Figure I-28-2) qui se fixe par le biais du groupement terminal amine de l'APTES. Cette étape permet d'apporter à la surface du matériau un groupement malimide (Figure I-28-3) qui va réagir avec la cystéine présente dans les peptides (Figure I-28-4).

Afin d'évaluer l'intégrité biologique de l'implant, une étude *in vitro* a été réalisée en utilisant des cellules ostéoprogénitrices de calvaria de rat. Une amélioration de la prolifération

cellulaire a été mise en évidence en présence de BCSPTM-1. Par ailleurs, l'étude *in vivo* a montrée une augmentation de l'activité de l'alcaline phosphatase (enzyme responsable de la différenciation cellulaire).

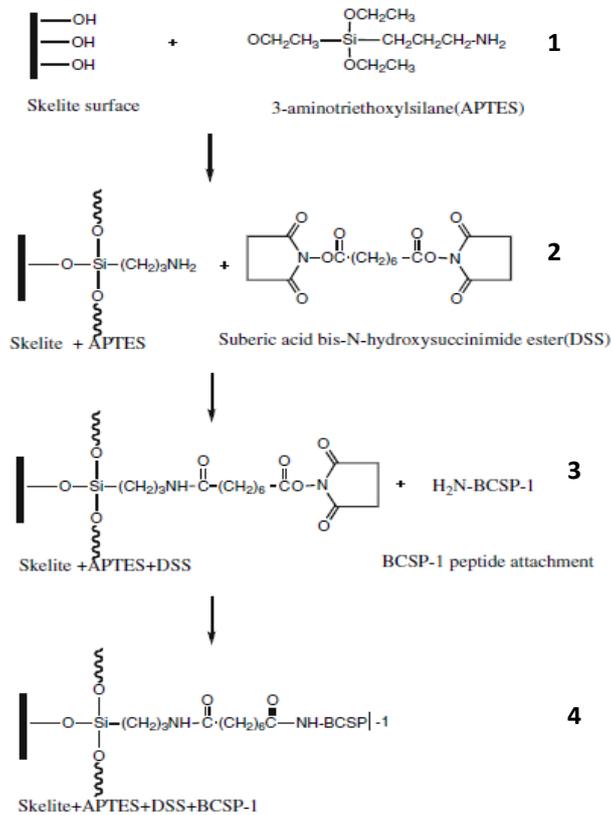


Figure I-28 : Procédé de greffage d'APTES à la surface des pastilles de Skelite<sup>TM</sup> établi par Wang *et al.* [152]

D'autres études de la littérature s'intéressent à la fonctionnalisation de la surface des substrats à base de phosphate de calcium par des protéines. Parmi elles, les études menées par Schuessele *et al.* [105] ainsi que par Zurlinden *et al.* [153] ont utilisé l'APTES pour la silanisation de pastilles d'HA dans l'objectif d'immobiliser de façon covalente la BMP-2 par l'intermédiaire d'un agent de couplage (Figure I-29).

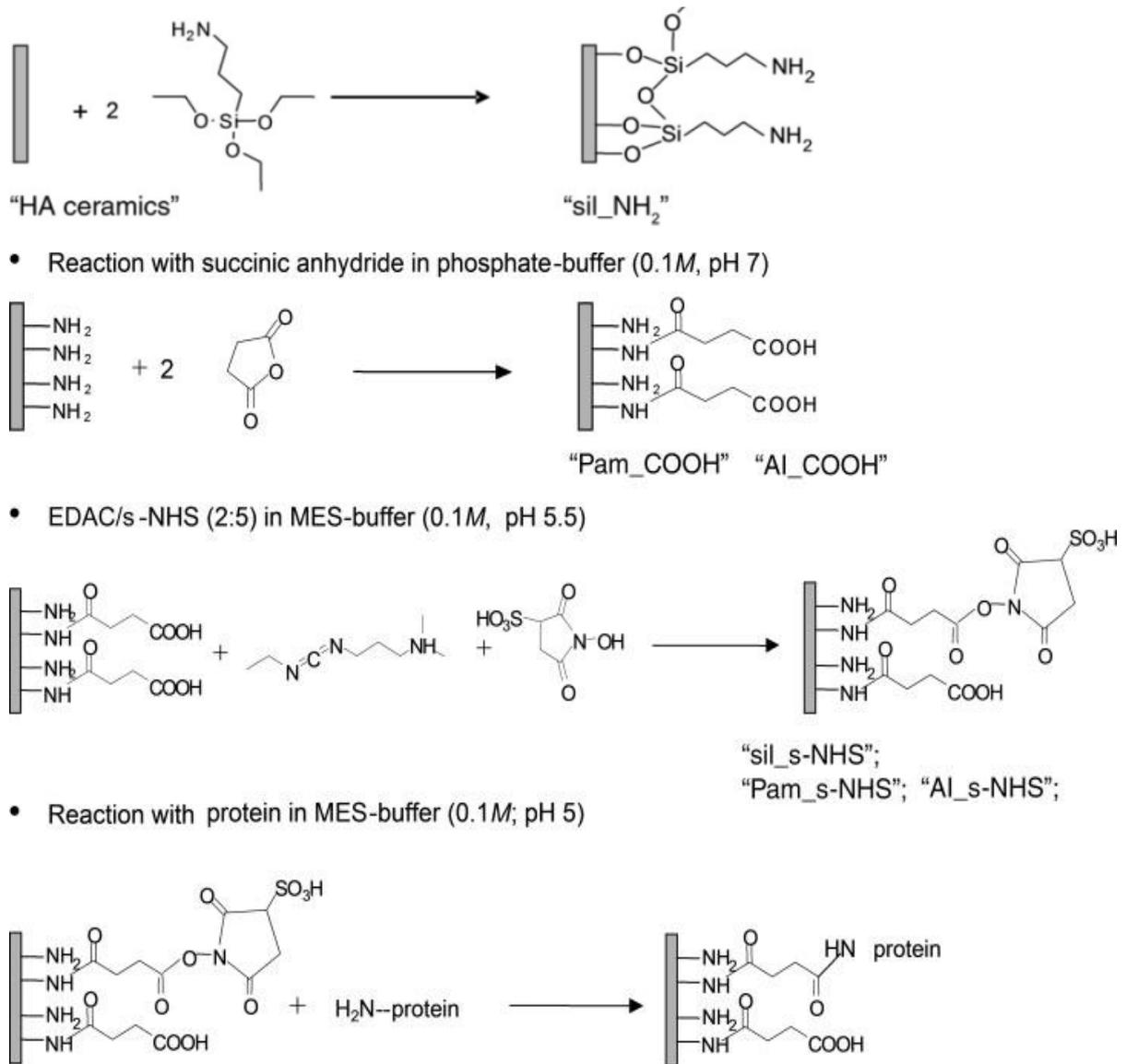


Figure I-29 : Procédé de silanisation d’HA par de l’APTES établi par Schuessele *et al.* [105]

Une étude cellulaire *in vitro* réalisée avec des myoblastes de souris a démontré la biocompatibilité des matériaux fonctionnalisés, ainsi qu’une amélioration de l’adhésion cellulaire après greffage et une augmentation de la prolifération cellulaire ce qui démontre la fixation de protéine à la surface des pastilles d’HA.

## **I.4. Conclusion**

Les différents inconvénients rencontrés avec les substituts osseux naturels ont poussé à l'élaboration de substituts osseux synthétiques ayant des propriétés biologiques améliorées.

Les matériaux à base de phosphates de calcium et principalement ceux en hydroxyapatite sont largement employés comme substitut osseux synthétiques du fait leur composition chimique proche de celle du minéral osseux. Ces biocéramiques sont biocompatibles, bioactives et ostéoconductrices. En revanche, elles ne sont pas ostéoinductrices : elles n'ont pas la capacité de générer une nouvelle matrice osseuse lorsqu'elles sont implantées en site extra osseux. Afin d'améliorer les propriétés biologiques et ostéoinductives de ces biocéramiques, une nouvelle stratégie est actuellement en cours de développement. Elle consiste à fonctionnaliser leur surface par des molécules biologiquement actives.

Cette étude bibliographique a décrit le principe de la fonctionnalisation de la surface de substrats en hydroxyapatite par des biomolécules selon trois méthodes différentes : la physisorption, la chimisorption et le greffage covalent. Le greffage covalent doit permettre de contrôler la densité de greffage à la surface du substrat et le relargage des biomolécules dans le milieu biologique. Il a pu être démontré que la silanisation de surface est une technique envisageable pour le greffage covalent des biomolécules. Plusieurs paramètres réactionnels ont été identifiés. Ils vont influencer la densité et la structuration des organosilanes greffés à la surface du substrat.

Le but général de ce travail est de greffer de façon covalente et contrôlée avec une faible densité de greffage des molécules d'organosilanes ayant des fonctionnalités différentes à la surface de substrat en hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) et en hydroxyapatite silicatée ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ). L'HA et la SiHA ont été choisies comme substrats pour le greffage des molécules d'organosilanes au regard de leurs propriétés biologiques intéressantes. L'incorporation de silicium (Si) dans la structure apatite peut améliorer la bioactivité du matériau [2, 154]. L'HA possède des sites de greffage de type P-OH à sa surface, l'incorporation de silicium dans la structure apatite pourrait permettre d'offrir des sites de greffage privilégiés de type Si-OH à la surface du matériau. En effet, dans la littérature, la plupart des réactions de silanisation de surface sont réalisées sur des substrats à base de silicium présentant des sites Si-OH en surface. Ces sites présentent une bonne aptitude à la silanisation car ils possèdent une affinité importante pour les groupements

## *Chapitre I - Synthèse bibliographique*

hydrolysables des organosilanes. La présence de ces sites dans la structure apatite pourrait donc améliorer les propriétés de surface des biocéramiques phosphocalciques vis-à-vis de la réaction de silanisation.

L'objectif de ce travail, sera d'étudier l'influence de la fonctionnalité d'organosilanes présentant une fonction amine terminale et de l'incorporation du silicium dans la structure apatite sur la nature et le mode de greffage à la surface des substrats céramiques.



# **Chapitre II - Elaboration et caractérisation des substrats, caractérisation des agents de greffage**

Ce chapitre est consacré à l'élaboration et à la caractérisation des substrats en hydroxyapatite et en hydroxyapatite silicatée, ainsi qu'à la caractérisation des agents de greffage, *i.e.* les organosilanes polyfonctionnels, utilisés afin de développer des biocéramiques fonctionnalisées.

La première partie porte sur les phosphates de calcium. Les différentes techniques de caractérisation mises en œuvre tout au long de ce travail sont présentées en deuxième partie. La troisième partie est consacrée à la caractérisation des substrats non greffés. Les organosilanes employés pour la modification de surface des apatites, et leur caractérisation sous forme libre, font l'objet de la dernière partie.

## **II.1. Elaboration des substrats phosphocalciques**

L'hydroxyapatite phosphocalcique est un orthophosphate de calcium, c'est-à-dire un sel de calcium de l'acide orthophosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Sa composition et sa structure cristalline en font un composé très proche du minéral osseux [1]. Après un bref rappel de ses données cristallographiques, les substitutions pouvant avoir lieu au sein de sa structure et sa synthèse par précipitation en milieu aqueux, sont présentées.

### **II.1.1. L'hydroxyapatite phosphocalcique**

#### **II.1.1.1. Données cristallographiques et substitutions**

Les orthophosphates de calcium de structure apatite ont pour formule générale  $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ , dans laquelle Me représente un cation métallique divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ...),  $\text{XO}_4$  un anion

trivalent ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{VO}_4^{3-}$  ...) et Y un anion monovalent ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  ...). L'hydroxyapatite stœchiométrique (HA), de formule générale  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et de rapport atomique Ca/P = 1,667, cristallise dans le groupe d'espace  $\text{P6}_3/\text{m}$  du système hexagonal. Les paramètres de maille de l'HA sont les suivants :

$$a = b = 9,418 \text{ \AA} \quad c = 6,884 \text{ \AA} \quad \alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 120^\circ \text{ [155]}$$

Des substitutions multiples par des ions de même valence ou de valence différente peuvent avoir lieu sur tous les sites ; l'équilibre des charges s'effectuant par la création de lacunes sur les sites calcium (Ca) et/ou hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ). Ces modifications de la composition chimique engendrent une modification des propriétés chimiques des céramiques en HA : solubilité, comportement thermique, comportement en milieu biologique, *etc.*

Le Tableau II-1 résume les principales apatites substituées contenant des éléments présents dans la phase minérale de l'os. L'introduction de tels ions a pour but une modification de la réponse biologique du matériau. Par exemple, le magnésium jouerait un rôle dans les processus de minéralisation des tissus calcifiés [156], la présence de groupements carbonates augmenterait la solubilité et la bioactivité de l'hydroxyapatite [157] alors que la présence de fluor sur les sites hydroxyde augmenterait la stabilité des apatites tendant à les rendre bioinertes.

Tableau II-1: Exemples de substitutions dans les hydroxyapatites phosphocalciques [158]

Substitution	Formule chimique théorique	Notations
<b>Site <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>		
$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Mg-HA
$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Zn}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Zn-HA
$\text{Sr}^{2+}$	$\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Sr-HA
<b>Site <math>\text{PO}_4^{3-}</math></b>		
$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2x}$	C-HA type B
$\text{SiO}_4^{4-}$	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-2x}$	Si-HA
$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-2x}$	
<b>Site <math>\text{OH}^-</math></b>		
$\text{F}^-$	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$	F-HA
$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$	C-HA type A
<b>Mixte</b>	$\text{Ca}_{10-x+u}\square_{x-u}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x+2u-2y}(\text{CO}_3)_y\square_{x-2u+y}$	C-HA type A/B

Parmi les phosphates de calcium actuellement développés, on peut citer l'hydroxyapatite partiellement substituée par des ions silicates ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ). Cette substitution ionique conduit à un déséquilibre de charge dû à la différence de valence entre les groupements phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) et silicate ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ). Ce déséquilibre de charge est compensé par la création de lacunes ( $\square$ ) sur

les sites hydroxyde (OH<sup>-</sup>) afin d'assurer la neutralité de la structure cristalline ce qui conduit à la formule chimique hypothétique formulée par Gibson *et al.* [159] :



Par la suite, cette formulation sera notée SiHA.

### II.1.1.2. L'hydroxyapatite silicatée

Dans la littérature, les travaux qui décrivent la synthèse de l'hydroxyapatite silicatée (SiHA) sont nombreux. En 1999, Gibson *et al.* [159] ont montré la possibilité de synthétiser une hydroxyapatite substituée par des ions silicate (SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>) à partir d'une réaction de neutralisation acido-basique et de tétraacétate de silicium. Dans le même cadre, Palard *et al.* [158, 160] ont étudié la synthèse par précipitation en voie aqueuse pour différents taux de silicium (x = 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 4). Cette méthode ne permet pas la formation directe d'hydroxyapatite silicatée. Les poudres brutes obtenues sont biphasées. Elles sont composées d'un silicate de calcium et d'apatite carbonatée de type B (substitution d'ions phosphate par des ions carbonate) contenant une partie des silicates au sein de sa structure. Pour incorporer le silicium dans la structure apatite, un traitement thermique au-dessus de 700°C est alors nécessaire. Cette méthode de synthèse développée au Laboratoire Science des Procédés Céramiques et de Traitements de Surface (SPCTS) sera utilisée dans le cadre de cette étude.

L'incorporation du silicium dans la structure apatite engendre une variation des paramètres de maille de la structure cristalline apatite. Le paramètre de maille "c" augmente dans la majorité des cas avec le taux de silicium [158, 159], il peut également rester constant alors que le paramètre de maille "a" peut croître [161, 162] ou décroître [163]. Si "a" décroît, le volume de maille ne varie quasiment pas alors que lorsque "a" augmente, la maille se dilate. Padmanabhan *et al.* [164] ont constaté une faible augmentation des paramètres de maille (a et c) après l'incorporation du silicium. Ces variations peuvent être attribuées à une distorsion du réseau cristallin due à l'incorporation de l'ion silicate (SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>) légèrement plus volumineux que l'ion phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). En effet, le rayon ionique de Si<sup>4+</sup> (0,42 Å) est supérieur à celui de P<sup>5+</sup> (0,35 Å) et la longueur de la liaison Si-O (0,161 nm) est plus grande que celle de la liaison P-O (0,155 nm) [165].

Les travaux d'Arcos *et al.* [161, 166] ont montré que le silicium joue un rôle important au niveau de la structure cristalline en induisant une distorsion des tétraèdres. Parallèlement,

l'étude récente effectuée par Padmanabhan *et al.* [164] portant sur la synthèse micro-onde montre que la taille des cristallites et celle des particules diminuent avec l'augmentation de la teneur en silicium. Palard [158] a indiqué pour des pastilles frittées et denses, la taille de grains diminue légèrement avec la quantité du silicium incorporée dans la structure.

De nombreux travaux décrivent l'influence des ions silicate ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ) sur les propriétés biologiques de l'hydroxyapatite. Les études effectuées par Vallet-Regi et Arcos [154] ont montré que la présence de silicium améliorait la bioactivité de l'apatite tout en conservant, une biocompatibilité et des propriétés mécaniques comparables à celles de l'hydroxyapatite. Troubitsin *et al.* [167] ont mis en évidence que l'hydroxyapatite silicatée présentait une résorption plus importante que celle de l'hydroxyapatite sans pour autant engendrer d'effets toxiques sur les tissus environnants. Sutha *et al.* [168] ont étudié les propriétés biologiques de l'hydroxyapatite silicatée contenant différents taux en silicium (0 ; 0,4 ; 0,8 ; 1 et 1,6 % massique). Les implants contenant 1 %m de silicium présentent la meilleure activité biologique. Néanmoins, pour M. Bohner [169] malgré les affirmations faites dans de nombreux articles, le rôle du silicium dans la réponse biologique des substituts n'est pas clair. Plusieurs explications peuvent être avancées : un effet passif impliquant par exemple la libération d'ions calcium, une modification de la chimie ou de la topographie de la surface.

## **II.1.2. Elaboration des substrats**

### **II.1.2.1. Synthèse des poudres**

Les poudres d'hydroxyapatite (HA) et d'hydroxyapatite silicatée (SiHA) sont synthétisées par précipitation en voie aqueuse. La synthèse de ces phosphates de calcium ayant fait l'objet de précédents travaux au sein du Laboratoire SPCTS [42, 158], celle-ci ne sera que brièvement exposée.

Les travaux sur la synthèse de poudre d'hydroxyapatite silicatée de Palard [158] ont démontré que le taux de substitution limite permettant un compromis matériau monophasé/densification maximale était  $x = 0,5$  mol. Afin d'obtenir des matériaux monophasés et d'évaluer l'impact du silicium, le taux de substitution hypothétique est ici fixé à  $x = 0,4$  mol (soit 1,13 %m Si). De ce fait, l'hydroxyapatite silicatée, est synthétisée en se basant sur la formule chimique hypothétique suivante :



De nombreux paramètres sont à contrôler lors d'une précipitation aqueuse car ce sont eux qui vont conditionner la nature et la qualité de la poudre synthétisée [42, 158]. Ces différents paramètres sont récapitulés dans le Tableau II-2. Les quantités de réactifs nécessaires pour synthétiser des poudres d'HA et de SiHA (rapport Ca/P = 1,667 dans le cas d'HA, Ca/(P+Si) = 1,667 dans le cas de SiHA) sont récapitulés dans le Tableau II-3.

**Tableau II-2 : Paramètres de synthèse utilisés lors de la synthèse des poudres d'HA et de SiHA [158]**

Paramètres de synthèse	Valeurs de paramètres
Température de réacteur principal (°C) – solution de calcium	90,0 ± 1,0
Température de réacteur secondaire (°C) – solution de phosphate ou solution de phosphate + silicium	60,0 ± 1,0
pH du milieu réactionnel	9,0 ± 0,1
Temps de maturation (min)	15
Vitesse d'introduction de la solution de phosphate ou de phosphate + silicium (L/h)	2,4
Atmosphère du réacteur	argon
Débit de l'argon (L/h)	0,5

**Tableau II-3 : Quantité de réactifs (n), concentration de réactifs (C), rapports molaires (Ca/P) et (Ca/(P+Si)) de réactifs et teneur hypothétique (x) de silicium**

Notation	n <sub>Ca</sub> (mol)	C <sub>Ca</sub> (mol/L)	n <sub>PO4</sub> (mol)	C <sub>PO4</sub> (mol/L)	n <sub>Si</sub> (mol)	C <sub>Si</sub> (mol/L)	Ca/P réactifs	Ca/(P+Si) réactifs	x <sub>Si</sub> (mol)
HA	1,280	0,64	0,768	0,64	0	0	1,667	1,667	0
SiHA	1,280	0,64	0,717	0,60	0,051	0,04	1,785	1,667	0,4

Les précurseurs utilisés (*voir annexes*) sont le nitrate de calcium tétrahydrate Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, l'hydrogénophosphate de diammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et le tétraacétate de silicium Si(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. La mise en solution, en milieux aqueux, des sels de calcium et de phosphate se fait sans difficulté. En revanche, celle de la poudre de tétraacétate de silicium est plus difficile et nécessite une mise en suspension préalable [158]. Pour ce faire, le mélange "eau + précurseur de silicium" est placé dans une jarre en alumine contenant des billes de broyage également en alumine. Afin de casser les agglomérats, la suspension est homogénéisée (1 min à 150 tr.min<sup>-1</sup>) à l'aide d'un broyeur planétaire. Le dispositif de synthèse des phosphates de calcium est représenté sur la Figure II-1. La capacité du réacteur permet d'obtenir environ 100 g de poudre par synthèse.

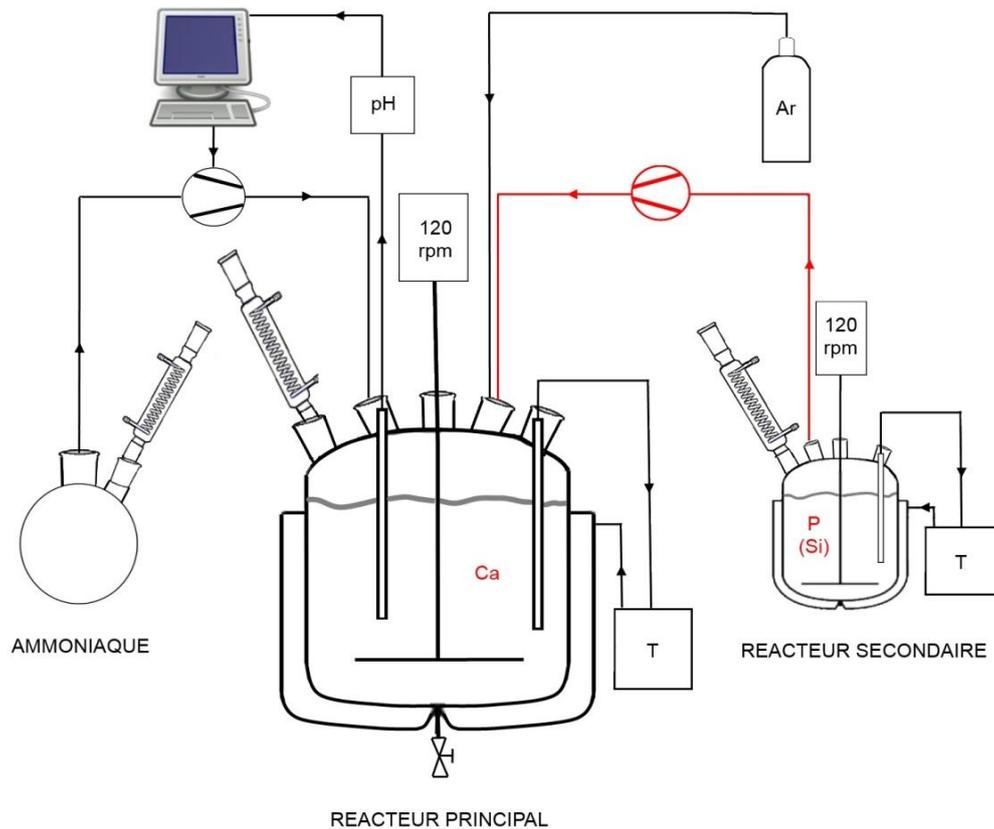


Figure II-1 : Schéma du montage utilisé pour les synthèses par précipitation en voie aqueuse [170]

La solution de nitrate de calcium est introduite dans le réacteur principal, puis chauffée, agitée et portée à la température de consigne (90°C). La solution de phosphate (ou celle de phosphate + précurseur de silicium), placée dans le réacteur secondaire, est également portée à sa température de consigne (60°C). Lorsque les deux solutions ont atteint leurs températures de consigne, la solution de phosphate (ou de phosphate + précurseur de silicium) est ajoutée à débit contrôlé dans le réacteur principal contenant la solution de calcium. Le pH du milieu réactionnel est maintenu à sa valeur de consigne par un régulateur de pH. Celui-ci est relié à une pompe doseuse régulatrice permettant l'ajustement du pH par ajout automatique d'une solution d'ammoniaque  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 35% (Fisher). Les solutions sont maintenues sous agitation mécanique et balayage d'argon durant toute la synthèse et la maturation. Les régulations en pH et en température sont également maintenues durant cette dernière période. À l'issue de la maturation, le précipité est récupéré par centrifugation (500 g pendant 5 min) et lavé deux fois à l'eau distillée. Le "gâteau" récolté est alors séché dans une étuve ventilée (70°C/24 h). Après séchage, les blocs de poudre compacts obtenus sont cassés et broyés dans un mortier en agate.

### II.1.2.2. Mise en forme des substrats

Deux types de substrats sont employés au cours de ces travaux : des poudres calcinées et des pastilles denses.

Les substrats pulvérulents (poudres) d'HA et de SiHA utilisés pour le greffage des organosilanes sont obtenues par calcination des poudres brutes à 1000°C durant 1 h sous air avec des rampes de montée et descente en température de 20°C/min (Four Super Khantal).

Les pastilles denses d'HA et de SiHA sont réalisées à partir des poudres brutes d'HA et de SiHA calcinées respectivement à 650°C/30 min et 700°C/2 h afin d'obtenir une surface spécifique d'environ 30 m<sup>2</sup>/g. Un pressage uniaxial de ces poudres, sous une contrainte de 125 MPa et dans un moule métallique de 10 mm de diamètre, est ensuite réalisé. Les pastilles pressées sont frittées sous air (frittage naturel) à 1200°C durant 30 minutes avec des rampes de montée et descente en température de 20°C/min (Four Super Khantal). Les pastilles denses d'HA et de SiHA sont polies façon miroir à l'aide de papier en carbure de silicium de grade 4000. Elles sont ensuite nettoyées à l'éthanol technique 96% non dénaturé (15 min dans un bain à ultrasons) afin d'éliminer les résidus de polissage et séchées à l'étuve (70°C/24 h). Le polissage permet de rendre la topographie de la surface homogène et reproductible (rugosité constante).

## II.2. Techniques de caractérisation

### II.2.1. Caractérisations physico-chimiques

#### II.2.1.1. Analyse par spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges des échantillons sont réalisés avec un spectromètre à transformée de Fourier (FT-IR pour *Fourier Transform InfraRed*) Perkin Elmer, Spectrum One entre 400 cm<sup>-1</sup> et 4000 cm<sup>-1</sup> avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>. 1 mg ou 5 mg (dans le cas des échantillons concentrés) de poudre et 180 mg de bromure de potassium (KBr) sont mélangés dans un mortier en agate puis pressés dans un moule de 13 mm de diamètre. Le bromure de potassium sert de support à la mesure. Une pastille de KBr pure est réalisée pour chaque série de mesures et son spectre est soustrait de celui des échantillons. Pour comparer les spectres infrarouges des phosphates de calcium, une normalisation est nécessaire. Après une correction

automatique de la ligne de base, chaque spectre est multiplié par un coefficient ramenant l'absorbance de la bande  $\nu_4\text{PO}_4$  située à  $602\text{ cm}^{-1}$ , à 1 [171]. Cette normalisation n'est pas effectuée dans le cas des échantillons concentrés en raison de la saturation du massif  $\nu_4\text{PO}_4$ . Pour les échantillons liquides une goutte de l'échantillon à analyser est déposée, à l'aide d'une pipette Pasteur, entre deux fenêtres de KBr (monocristal).

### II.2.1.2. Analyse qualitative par diffraction des rayons X

L'identification des phases cristallisées présentes dans les poudres et les matériaux denses (pastilles) est réalisée par diffraction des rayons X (DRX). Les diffractogrammes sont acquis avec les radiations  $K_\alpha$  du cuivre ( $\text{CuK}_{\alpha 1} = 1,54056\text{ \AA}$  et  $\text{CuK}_{\alpha 2} = 1,54443\text{ \AA}$ ) sur un diffractomètre  $\theta/2\theta$  Siemens D5000. Les acquisitions sont faites avec un pas de  $0,02^\circ$  en  $2\theta$  et un temps de comptage de 4 secondes sur un intervalle  $[25,40^\circ]$  (en  $2\theta$ ). Les phases sont identifiées par comparaison avec les références du fichier *International Center for Diffraction Data-Powder Diffraction Files* (ICDD-PDF) sur le logiciel EVA (Brüker AXS). Le Tableau II-4 regroupe les numéros des fiches PDF utilisées ainsi que les composés correspondants.

Tableau II-4 : Fiches PDF de référence pour l'indexation des différents composés

Formule chimique	Nom du composé	Abréviation	N° fiche PDF
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite	HA	9 – 432
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate tricalcique $\alpha$	$\alpha$ -TCP	9 – 348
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Phosphate tricalcique $\beta$	$\beta$ -TCP	9 – 169
CaO	Oxyde de calcium	-	37 – 1497
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Dihydroxyde de calcium	-	4 – 733

### II.2.1.3. Affinement des paramètres de maille

L'analyse Rietveld consiste à simuler un diffractogramme à partir d'un modèle cristallographique de l'échantillon, puis à ajuster les paramètres de ce modèle afin que le diffractogramme simulé soit le plus proche possible du diffractogramme mesuré. Pour ce faire, les diffractogrammes sont acquis avec un appareillage Brüker D8 Advance ( $\text{CuK}\alpha$   $1,54056\text{ \AA}$ ), sur l'intervalle  $[20-120^\circ]$ , avec un pas de  $0,012^\circ$  en  $2\theta$  et un temps de comptage de 0,75 s. L'affinement des paramètres de maille est réalisé par la méthode WPF (*Whole Pattern Fitting* ou méthode de Le Bail) à l'aide du logiciel FullProf Suite, version 1.10. Ce traitement permet d'effectuer un ajustement global du diffractogramme avec contrainte de la position des raies mais sans contraindre les intensités. Cela permet de s'affranchir en partie du

problème de superposition des raies de diffraction. L'évaluation de la qualité de l'affinement est effectuée à l'aide des facteurs de confiance suivants :

- $\chi^2$  : facteur représentant la somme des carrés des résidus, permet de juger de l'adéquation du modèle aux mesures expérimentales,
- $R_p$  : résidu du spectre,
- $R_{wp}$  : résidu pondéré du spectre, qui exprime la convergence de l'affinement.

#### **II.2.1.4. Analyse par spectroscopie de photoélectrons X**

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS pour *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) est une méthode physique d'analyse chimique de la surface. Les analyses sont réalisées avec un appareillage Axis Ultra DLD spectrometer (Kratos Analytical Ltd). Les spectres sont acquis à l'aide de la radiation monochromatique  $K_{\alpha}$  de l'aluminium (1486,6 eV) avec une tension d'accélération de 15 kV et une intensité de courant de 12 mA. La zone analysée est de 300  $\mu\text{m}$  par 700  $\mu\text{m}$  et la profondeur d'analyse de l'ordre de 5 nm. L'énergie de passage est de 160 eV pour les spectres larges et 20 eV pour les spectres de haute résolution avec des pas de 0,5 eV et de 0,1 eV respectivement. L'appareillage a une erreur associée sur la position des pics de  $\pm 0,2$  eV. Les spectres sont repositionnés en utilisant le pic de contamination 1s du carbone (C1s) détecté à 285,0 eV. Après correction du bruit de fond par la méthode de Shirley, la décomposition des spectres est réalisée à l'aide du logiciel Vision (Kratos) et la composition atomique des échantillons est calculée à l'aide des coefficients de Scofield [172].

#### **II.2.1.5. Analyses élémentaires**

Le taux de carbone contenu dans les poudres (exprimé en pourcentage massique de carbone, %m C) avant et après greffage des organosilanes est déterminé avec un appareillage EMIA-V 321 V, HORIBA. De 0,5 à 2 g de poudre sont chauffés à haute température ( $T > 2500^{\circ}\text{C}$ ) par induction en présence de fondants (mélange de fer, de cuivre et d'étain) dans des creusets en alumine et sous flux constant d'oxygène. Le carbone contenu dans les échantillons est transformé en dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  et en monoxyde de carbone CO. Ces deux gaz sont ensuite dosés par spectroscopie d'absorption infrarouge. Des analyses sans poudre (blanc) et des mesures avec des étalons contenant respectivement 4,180 ; 2,850 et 0,044 %m C sont réalisées afin d'établir une droite d'étalonnage dans le domaine d'intérêt.

La quantité de silicium dans l'hydroxyapatite silicatée (SiHA) est déterminée par spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma (ICP/AES pour *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*), grâce à un appareillage Thermo-Opteck de modèle Iris. Pour la mise en solution, 100 mg de poudre sont placés dans un réacteur en Téflon<sup>®</sup> en présence de 4 mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) à 15 mol.L<sup>-1</sup>. Après dissolution de la poudre, 10 mL d'acide fluorhydrique (HF) à 3 mol.L<sup>-1</sup> sont ajoutés. Le réacteur est placé dans un dispositif micro-ondes (CEM, MARS 5) afin de favoriser la dissolution de la poudre et homogénéiser la solution. Une fois préparée, la solution à doser est pompée puis nébulisée afin d'obtenir un aérosol et est transportée jusqu'au plasma où elle est ionisée. Des solutions étalons avec une gamme variant de 0 à 40 mg.L<sup>-1</sup> de silicium sont préalablement analysées afin d'établir une droite d'étalonnage.

### **II.2.1.6. Microscopie électronique à balayage**

Les observations par microscopie électronique à balayage (MEB) sont effectuées sur des appareillages Philips XL30 et JEOL JSM-7400 F. Avant observation, les échantillons sont métallisés à l'or ou au palladium (couche d'environ 10 nm d'épaisseur). La microstructure des matériaux denses (pastilles) est observée après un gravage thermique à une température inférieure de 20°C à la température de frittage (1200°C). Les échantillons préalablement polis sont portés durant 6 min à T = 1180°C (rampe de montée et de descente en température : 20°C/min, four Super Khantal).

### **II.2.1.7. Microscopie à force atomique**

Le dispositif utilisé pour étudier la topographie de la surface des pastilles est un microscope à force atomique (AFM pour *Atomic Force Microscopy*) 5500 piloté par Picoview 1.8.2 de la société Agilent Technologies ayant un scanner dont l'étendue maximum est de 9x9 µm<sup>2</sup>. C'est un microscope à "pointe balayée" : l'échantillon est fixe et la pointe balaye la surface. Les topographies sont faites en mode contact avec des pointes en nitrure de silicium (17 kHz, 0.046 N.m<sup>-1</sup>, AppNano, Hydra6V, le rayon de courbure est < 10 nm). La variation de la topographie de la surface est suivie par la détermination de la rugosité surfacique, Sa, calculée sur toute la surface du scan (2x2 µm<sup>2</sup>) et la rugosité linéaire, Ra, mesurée sur une ligne de longueur 2 µm. Sa est la hauteur arithmétique moyenne, elle correspond à la rugosité moyenne de la surface. Ce paramètre est calculé selon l'Équation II-1. Le Ra est la moyenne

arithmétique des écarts à la moyenne, il s'agit d'un paramètre d'amplitude, calculé selon l'Équation II-2, sur un profil linéaire comme le montre la Figure II-2.

$$Sa = \frac{1}{A} \int_A |Z(x,y)| dx dy \text{ (en nm), avec } \begin{cases} A = \text{surface étudiée} \\ Z = \text{écart à la hauteur moyenne} \end{cases}$$

Équation II-1 : Calcul de la rugosité surfacique (Sa)

$$Ra = \frac{1}{lb} \sum_0^{lb} |Z(x)| \text{ (en nm), avec } \begin{cases} lb = \text{longueur de base} \\ Z = \text{écart à la hauteur moyenne} \end{cases}$$

Équation II-2 : Calcul de la rugosité linéaire (Ra)

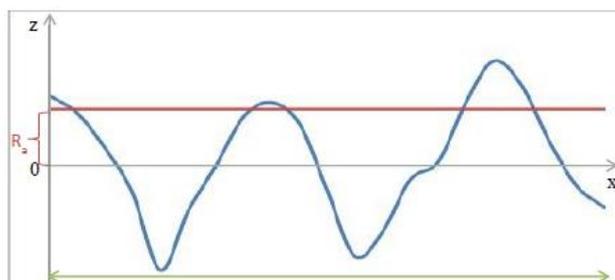


Figure II-2 : Profil linéaire d'une topographie de surface réalisée par AFM permettant le calcul du Ra

### II.2.1.8. Analyse de l'angle de contact

Les analyses de l'angle de contact sont effectuées dans le but de déterminer l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) des pastilles denses en HA et SiHA avant et après greffage des organosilanes. Les analyses sont effectuées avec un appareillage Digidrop Goniometer, GBX relié à une caméra PixeLink. Les populations de gouttes utilisées ont un volume moyen de l'ordre de 4,4  $\mu\text{L}$  et sont déposées automatiquement. Trois solvants ayant des tensions superficielles ( $\gamma$ ) différentes sont utilisés : l'eau distillée ( $\text{H}_2\text{O}$ ), l'éthylène glycol ( $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ ) et le diiodométhane ( $\text{CH}_2\text{I}_2$ ). Le calcul des angles de contact moyens est effectué selon le mode polynomial. Avant l'analyse, la surface des pastilles est nettoyée avec un flux d'argon.

### II.2.2. Analyses thermiques

La thermogravimétrie (TG) couplée à la spectroscopie de la masse (SM) est utilisée pour étudier le comportement thermique des poudres greffées ou non. Les analyses TG permettent de déterminer les pertes de masse et les températures auxquelles elles se produisent, les analyses SM permettent de déterminer la masse des composés mis en jeu. L'appareillage utilisé est un STA 449 F3 (Netzsch) équipé d'un dispositif TG et relié par un tube, calorifugé

à 200°C, à un spectromètre de masse à quadrupôle (Pfeiffer Vacuum Thermostar) permettant d'analyser les gaz émis lors du traitement thermique. Les expériences sont réalisées dans des creusets en platine avec environ 30 mg de poudre. L'argon, en balayage à 20 ml.min<sup>-1</sup>, est utilisé pour l'atmosphère du four et comme gaz vecteur afin d'acheminer les gaz émis vers le spectromètre de masse. La vitesse de chauffe est fixée à 10°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 900°C avant une descente en température à 20°C.min<sup>-1</sup>. Le blanc est effectué avec de creusets vides sous argon.

## **II.2.3. Caractérisations physiques**

### **II.2.3.1. Détermination de la masse volumique des poudres**

La masse volumique réelle des poudres ( $\rho_{réelle}$ , g.cm<sup>-3</sup>) est déterminée par pycnométrie à hélium (Micromeritics AccuPyc II 1340). Le volume de gaz (hélium) déplacé par une masse connue de poudre est mesuré ce qui permet de connaître la masse volumique réelle du matériau. Chaque valeur est déterminée à partir de 10 mesures successives. L'erreur sur la mesure est de 0,05 g.cm<sup>-3</sup>.

Les masses volumiques théoriques ( $\rho_{thé}$ ) des poudres d'HA et de SiHA sont déterminées selon l'Expression II-1, où M représente la masse molaire de l'apatite (elle est de 1004,64 g.mol<sup>-1</sup> pour l'HA et 995,69 g.mol<sup>-1</sup> pour SiHA avec x = 0,45, valeur expérimentale déterminée par ICP/AES, voir paragraphe II.3.1.4), n le nombre de motifs par maille, V le volume de la maille cristalline et N<sub>a</sub> le nombre d'Avogadro. L'apatite cristallisant dans un système hexagonal, le nombre de motifs par maille n vaut 1, et le volume de la maille est donné par l'Expression II-2.

$$\rho_{thé} = \frac{M \times n}{V \times N_a}$$

**Expression II-1 : Loi de détermination de la masse volumique théorique des poudres**

$$V_{maille} = a \times b \times c \times \sin 120^\circ$$

**Expression II-2 : Volume de la maille hexagonale, avec a = b. Les paramètres de maille a, b et c sont déterminés par l'affinement Rietveld**

### II.2.3.2. Mesure de surface spécifique

La surface spécifique (SSA,  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) des poudres est évaluée par la méthode B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller) d'adsorption de diazote ( $\text{N}_2$ ) à huit points (Analyzer Micromeritics ASAP2010). Les mesures sont effectuées après dégazage sous vide de la poudre à  $250^\circ\text{C}$  pendant 12 heures. La surface spécifique des pastilles frittées est très faible. Elle est donc déterminée par adsorption de krypton (Kr).

La taille moyenne des grains ( $\varphi_{\text{moyen}}$ ) peut être estimée à partir de la mesure de la surface spécifique et de la masse volumique réelle de la poudre ( $\rho_{\text{réelle}}$ ) suivant l'Expression II-3 où  $\varphi_{\text{moyen}}$ , SSA et  $\rho_{\text{réelle}}$  sont exprimés respectivement en  $\mu\text{m}$ ,  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  et  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ .

$$\varphi_{\text{moyen}} = \frac{6}{\rho_{\text{réelle}} \times \text{SSA}}$$

Expression II-3 : Détermination de la taille moyenne des grains

### II.2.3.3. Analyse granulométrique

La granulométrie des poudres est déterminée sur un granulomètre laser HORIBA Partica LA-950V2. Les mesures sont effectuées en milieu liquide dans de l'eau distillée sans addition d'un dispersant. Pour chaque analyse, 0,1 g de poudre est dispersé dans 5 mL d'eau distillée. En début d'analyse et afin d'assurer une désagglomération correcte de la poudre, l'ensemble est soumis durant 15 min aux ultrasons. Le principe de mesure repose sur l'analyse du spectre de diffraction émis par les particules en interaction avec un faisceau monochromatique cohérent de longueur d'onde largement inférieure à la taille des particules. L'analyse est basée sur la théorie de Mie en faisant les approximations suivantes :

- les particules sont considérées comme sphériques et homogènes,
- les photons du faisceau incident n'interagissent qu'avec une seule particule (suspension diluée).

#### II.2.3.4. Mesure du potentiel zêta par zétamétrie

Le potentiel zêta ( $p\zeta$ ) des surfaces d'HA et SiHA est déterminé avec d'un Zetasizer nano zs (Mavern Instrument UK) sur des poudres calcinées et mises en suspension dans de l'eau. Les suspensions sont préparées avec 0,1 g de poudre dans 5 mL d'eau distillé. En début d'analyse et afin d'assurer une désagglomération correcte de la poudre, l'ensemble est soumis durant 15 min aux ultrasons. Les analyses sont effectuées avec un faible volume de suspension préparée. Les mesures sont effectuées à 25°C et les valeurs calculées sont obtenues à partir de deux mesures pour chaque composition.

#### II.2.3.5. Mesure de densité et détermination du taux de densification

Pour déterminer le taux de densification ( $\tau$  %) des pastilles frittées, il est nécessaire de calculer la densité des pastilles. Cette densité est déterminée par la méthode d'Archimède qui consiste à réaliser deux pesées de l'échantillon, l'une à l'air ( $m_{\text{sèche}}$ ) et la seconde plongée dans l'eau distillée ( $m_{\text{hydro}}$ ). La densité ( $d_{\text{Archi}}$ ) est alors calculée à partir de l'Expression II-4-a, connaissant la masse volumique de l'eau  $\rho_{\text{eau}} = 1 \text{ g.cm}^{-3}$  à température ambiante. Le taux de densification d'une pastille ( $\tau$  en %) est alors donné par l'Expression II-4-b.

$$(a) \quad d_{\text{Archi}} = \frac{m_{\text{sèche}}}{m_{\text{sèche}} - m_{\text{hydro}}} \times \rho_{\text{eau}}$$

$$(b) \quad \tau (\%) = \frac{d_{\text{Archi}}}{\rho_{\text{réelle}}} \times 100$$

Expression II-4 : Détermination (a) de la densité d'Archimède et (b) du taux de densification des substrats frittés

### II.3. Caractérisation des substrats

#### II.3.1. Pureté des poudres synthétisées

Les résultats présentés dans ce paragraphe (paragraphe II.3.1) sont obtenus sur des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h.

### **II.3.1.1. Analyse des phases secondaires**

Les poudres d'hydroxyapatite (HA) peuvent contenir des phases secondaires. Un rapport molaire Ca/P global supérieur à 10/6, peut être dû à la présence de chaux, et un rapport Ca/P inférieur à 10/6, à la présence de phosphate tricalcique dans la poudre. La calcination des précipités à 1000°C pendant 15 h est le traitement thermique préconisé par la norme internationale ISO 13779-3 [173] afin d'identifier les phases cristallines présentes dans les matériaux dont le rapport molaire Ca/P est compris entre 3/2 et 10/6. Les poudres d'hydroxyapatite silicatée (SiHA) seront traitées de la même façon que celles d'hydroxyapatite, en faisant référence à un rapport Ca/(P+Si) global de 10/6.

La présence de chaux est vérifiée qualitativement sur des échantillons de poudres d'HA et de SiHA calcinées en testant le pH d'une solution aqueuse contenant de la poudre d'apatite par de la phénolphtaléine. L'absence de coloration rose de la solution assure avec une grande sensibilité ( $\text{pH} < 7$ ) l'absence de chaux dans l'échantillon. Ce test est effectué après chaque synthèse sur les poudres chaudes (400°C) en suivant les recommandations de la norme ISO 13779-3 [173]. Les résultats des tests ne montrent aucune coloration, en présence de phénolphtaléine, des solutions aqueuses contenant les poudres d'apatite, traduisant ainsi l'absence de chaux dans toutes les synthèses.

La Figure II-3 présente les diffractogrammes des poudres d'HA (Figure II-3-a) et de SiHA (Figure II-3-b). Les diffractogrammes ne mettent en évidence aucun pic de diffraction pouvant traduire la présence de phosphate tricalcique  $\alpha$  ( $\alpha$ -TCP) ou de phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP). Tous les pics de diffraction peuvent être indexés avec la fiche ICDD-PDF n° 09-0432 de l'hydroxyapatite pure. Cette analyse permet de confirmer l'absence de TCP au sein des poudres. Ce résultat est valable pour toutes les synthèses effectuées.

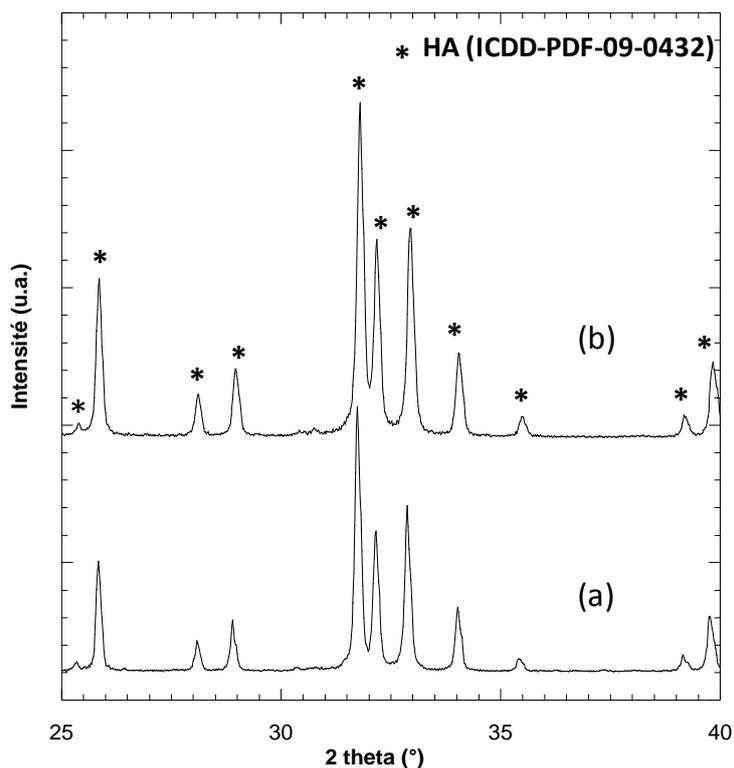


Figure II-3 : Diffractogrammes des poudres (a) d'HA et (b) de SiHA calcinées à 1000°C/15 h

### II.3.1.2. Evaluation des paramètres de maille par affinement Rietveld

La détermination des paramètres de maille est effectuée par analyse Rietveld sur des poudres d'HA et de SiHA calcinées. La Figure II-4 permet de comparer le résultat de l'affinement (Y calculé) au diffractogramme de la poudre (Y observé) ainsi que la différence entre ces deux diagrammes. Cette figure montre la bonne adéquation entre la fonction affinée et les valeurs mesurées expérimentalement pour les poudres d'HA et de SiHA. Le Tableau II-5 récapitule des résultats obtenus pour les deux compositions. Le volume de la maille cristalline  $V$  ( $\text{\AA}^3$ ) est calculé avec l'Expression II-2.

Tableau II-5 : Facteurs de confiance ( $\chi^2$ ,  $R_p$ ,  $R_{wp}$ ), paramètres de maille (a, b, c) et volume de la maille (V) pour les poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h

Composition	$\chi^2$	$R_p$	$R_{wp}$	$R_{wp}/R_p$	a ( $\text{\AA}$ )	b ( $\text{\AA}$ )	c ( $\text{\AA}$ )	Volume de la maille ( $\text{\AA}^3$ )
HA	10,8	47,4	48,8	1,03	9,421(6)	9,421(6)	6,884(5)	529,23(9)
SiHA	10,8	44,9	48,9	1,09	9,425(0)	9,425(0)	6,885(5)	529,69(8)

Les valeurs calculées des paramètres a, b, c et du volume de maille de l'HA sont légèrement supérieures à celles de la fiche PDF 9-432 (a = 9,4180 Å, c = 6,8840 Å et V = 528,80 Å<sup>3</sup>). L'incorporation du silicium dans la structure apatite provoque une légère hausse du paramètre de maille a de 9,421(6) à 9,425(0) Å ainsi qu'une augmentation du volume de la maille de 529,23(9) à 529,69(8) Å<sup>3</sup>. Dans le même temps, le paramètre de maille c reste quasi constant. Ces variations sont en accord avec les résultats obtenus par Palard *et al.* [160] sur l'étude de l'influence de l'incorporation de taux croissants de silicium sur les paramètres de maille de la structure apatite. Ces résultats mettent en évidence que le silicium est incorporé dans la structure apatite [174].

Les facteurs de confiance  $\chi^2$ ,  $R_p$  et  $R_{wp}$  quantifient la validité d'un modèle structural. Si la simulation est parfaite, le rapport  $R_{wp} / R_p$  doit tendre vers 1. Ce rapport est égal à 1,03 pour HA, et 1,09 pour SiHA. Ces valeurs montrent que les simulations effectuées sur les deux poudres sont bonnes.

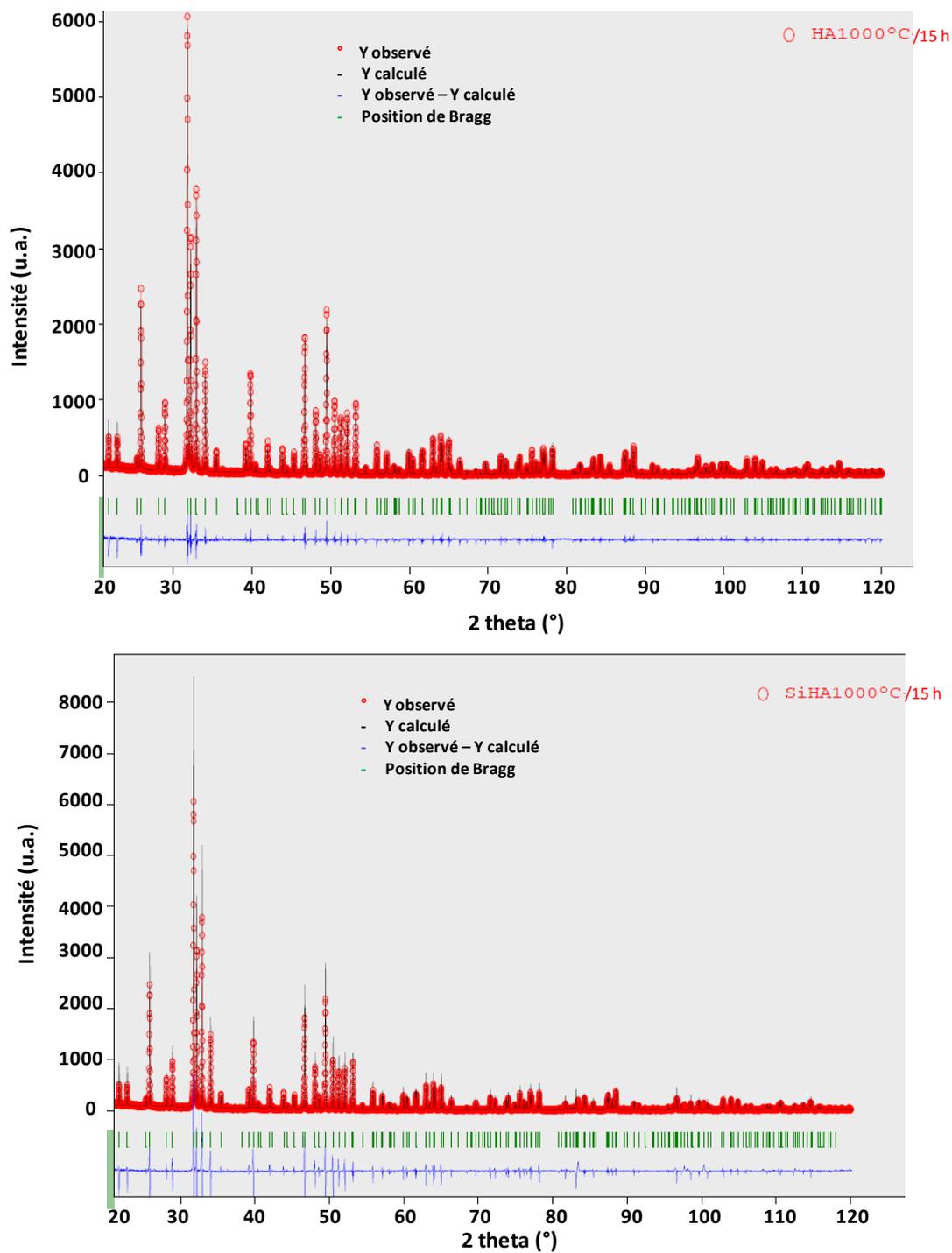


Figure II-4 : Diffractogrammes expérimentaux (Y observé), calculé (Y calculé) et différence mesurée (Y observé – Y calculé) dans le domaine en 2 theta [20-120°] à l'issue de l'affinement des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h

### **II.3.1.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge**

Les spectres FT-IR obtenus pour les poudres d'HA et de SiHA calcinées (1000°C/15 h) sont représentés sur la Figure II-5. Pour faciliter la lecture, les spectres sont étudiés dans trois domaines : 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , 1000 à 400  $\text{cm}^{-1}$  et 1600 à 1350  $\text{cm}^{-1}$ . Le Tableau II-6 récapitule les bandes d'absorption caractéristiques des groupements susceptibles d'être détectés dans les poudres.

Les bandes d'absorption situées à 3400 et 1640  $\text{cm}^{-1}$  sont dues à l'eau adsorbée à la surface des poudres. Quelle que soit la composition des poudres (HA ou SiHA), les bandes d'absorption relatives aux groupements phosphates sont présentes. Les bandes intenses à 1090 et 1030  $\text{cm}^{-1}$  correspondent au mode  $\nu_3\text{PO}_4$  (élongation asymétrique), celle à 961  $\text{cm}^{-1}$  au mode  $\nu_1\text{PO}_4$  (élongation symétrique). Les bandes à 603 et 564  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées au mode  $\nu_4\text{PO}_4$  (déformation angulaire asymétrique) et celle observée à 472  $\text{cm}^{-1}$  au mode  $\nu_2\text{PO}_4$  (déformation angulaire symétrique). Les bandes observées autour de 2000  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées aux harmoniques des groupements phosphates. Les bandes à 3570 et 630  $\text{cm}^{-1}$  correspondent respectivement aux modes d'élongation ( $\nu_S$ ) et de vibration ( $\nu_L$ ) du groupement hydroxyle (OH). Ces dernières sont plus intenses dans le cas d'HA que dans celui de SiHA. En effet, l'incorporation du silicium sous forme des tétraèdres de silicate dans la structure apatite s'accompagne de la création de lacunes sur les sites hydroxydes, ce qui explique la diminution de l'intensité des bandes d'absorption des groupements hydroxyle [160].

Pour les poudres de SiHA, les groupements silicate ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ) sont caractérisés par des bandes de faible intensité à 504, 522, 752 et 890  $\text{cm}^{-1}$  attribuées aux vibrations des liaisons Si-O [158, 175]. Les épaulements détectés à 840, 928, 945 et 984  $\text{cm}^{-1}$  sont attribués soit aux groupements silicates [159, 174], soit aux vibrations des liaisons Si-OH existantes à la surface de SiHA [174].

Les bandes caractéristiques de groupements carbonate  $\text{CO}_3^{2-}$  sites B à 1420 et 1450  $\text{cm}^{-1}$  (Figure II-5-c) sortent avec une faible intensité. Le traitement thermique des poudres à 1000°C ne permet pas d'éliminer totalement le carbonate de la structure apatite.

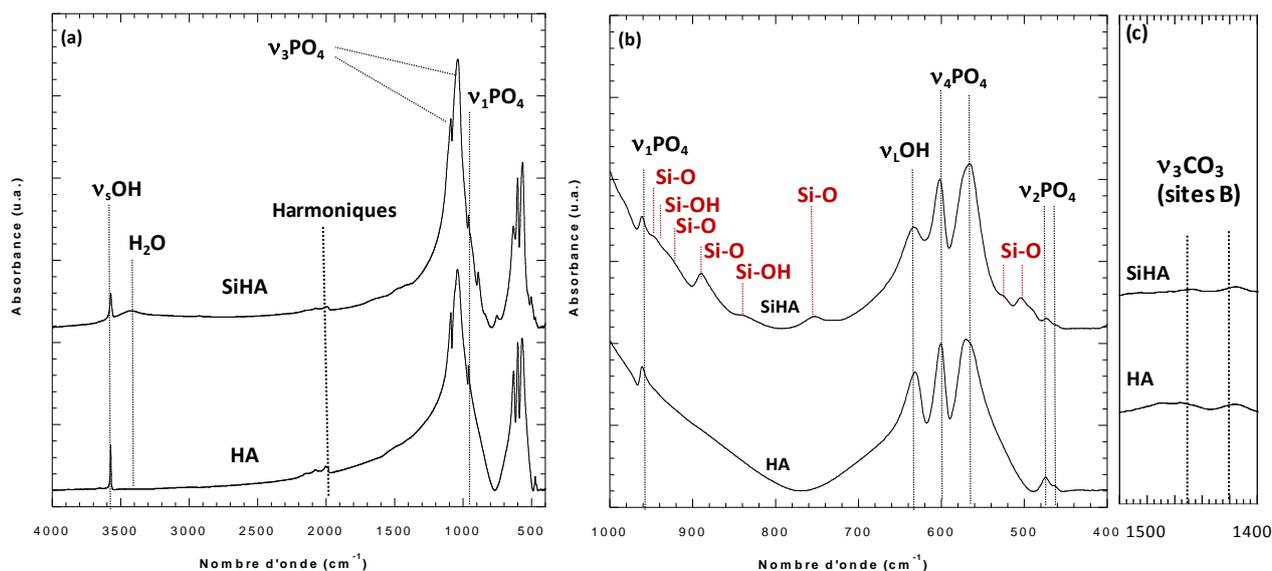


Figure II-5 : Spectres FT-IR dans les intervalles (a) 4000-400 cm<sup>-1</sup>, (b) 1000-400 cm<sup>-1</sup> et (c) 1500-1400 cm<sup>-1</sup> des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h. Les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA

Tableau II-6 : Bandes d'absorption susceptibles d'être détectées dans les poudres d'HA et de SiHA

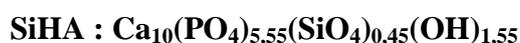
Groupements ioniques	Bandes d'absorption	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )
OH <sup>-</sup>	ν <sub>s</sub>	3570 [1]
	ν <sub>l</sub>	631 [1]
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	ν <sub>1</sub>	961 [1]
	ν <sub>2</sub>	474 [1]
	ν <sub>3</sub>	1030 et 1081 [1]
	ν <sub>4</sub>	560 et 602 [1]
SiO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-	504, 522, 752, 840, 890, 928, 945, 984 [158, 159, 174, 175]
O-H de Ca(OH) <sub>2</sub>	ν	3640-3650 [176]
CO <sub>2</sub> moléculaire (air)	-	2360 [176]
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> sites B	ν <sub>2</sub>	871, 873 [1, 176]
	ν <sub>3</sub>	1412, 1420, 1450, 1460, 1465, 1470 [1, 158, 176]
	ν <sub>4</sub>	692 et 710 [1]
H <sub>2</sub> O adsorbé	ν	3400 [176]
	Δ	1640 [176]

### II.3.1.4. Analyse chimique

Les poudres de SiHA calcinées (1000°C/15 h) ont fait l'objet d'une analyse chimique par ICP/AES afin de déterminer le taux de silicium présent ( $x_{Si}$  mesuré). Les analyses sont menées sur deux synthèses différentes de poudres de SiHA. La valeur moyenne de la teneur

en silicium mesurée est égale à  $0,45 \pm 0,01$  mol. Celle-ci est légèrement plus élevée que celle définie hypothétiquement pour la synthèse des poudres ( $x_{Si}$  hypothétique = 0,40 mol).

En conclusion, les analyses effectuées sur les échantillons de poudre d'HA et de SiHA calcinées à  $1000^{\circ}\text{C}/15$  h ont montré que les poudres synthétisées par la méthode de précipitation en voie aqueuse sont pures et monophasées. Après le traitement thermique, le silicium est totalement incorporé dans la structure apatite avec un taux molaire de 0,45 (1,27 %m). Les formules chimiques des poudres d'HA et de SiHA synthétisées sont :



## **II.3.2. Caractérisation des substrats pulvérulents**

Le greffage des organosilanes est effectué sur des poudres en hydroxyapatite (HA) et en hydroxyapatite silicatée (SiHA) calcinées à  $1000^{\circ}\text{C}$  durant 1 heure. Après calcination, ces poudres sont caractérisées, afin d'évaluer leurs propriétés avant le greffage des organosilanes.

### **II.3.2.1. Composition des poudres**

La Figure II-6 présente les diffractogrammes des poudres d'HA et de SiHA et les résultats des affinements Rietveld sont récapitulés dans le Tableau II-7. Les diffractogrammes ne mettent pas en évidence la présence de phase secondaire au sein des échantillons. Les poudres d'HA et de SiHA sont donc considérées comme monophasées. Elles sont constituées d'une phase apatite pure. Les résultats des affinements montrent que les valeurs des paramètres de maille a, b, c et du volume de maille V sont plus grand pour SiHA que pour l'HA. Ces variations sont en accord avec la substitution des groupements phosphates par des silicates dans la structure apatite (*voir paragraphe II.3.1.2, chapitre II*).

Les spectres FT-IR des poudres calcinées sont présentés sur la Figure II-7. Les bandes de vibration relatives aux groupements phosphate sont présentes pour les deux compositions (*voir paragraphe II.3.1.3, chapitre II*). Il est important de noter qu'après calcination à  $1000^{\circ}\text{C}/1$  h, les groupements silicate sont incorporés dans la structure apatite. En effet les bandes d'absorption correspondant aux groupements silicate sont clairement observées dans

le cas des poudres SiHA (voir paragraphe II.3.1.3, chapitre II). Comme pour les poudres calcinées durant 15 h, des ions carbonate résiduels en site B peuvent être détectés sur le spectre FT-IR.

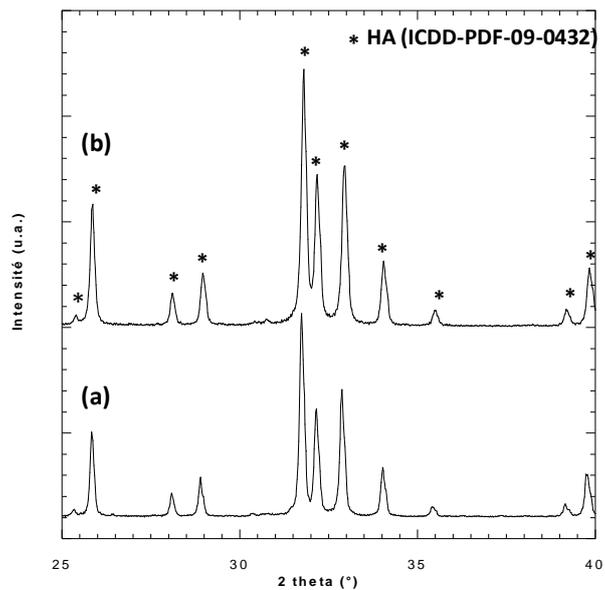


Figure II-6 : Diffractogrammes des poudres (a) d'HA et (b) de SiHA calcinées à 1000°C/1 h

Tableau II-7 : Facteurs de confiance ( $\chi^2$ ,  $R_p$ ,  $R_{wp}$ ), paramètres de maille (a, b, c) et volume de la maille (V) pour les poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1 h

Composition	$\chi^2$	$R_p$	$R_{wp}$	$R_{wp}/R_p$	a (Å)	b (Å)	c (Å)	Volume de maille (Å <sup>3</sup> )
HA	10,7	46,9	47,7	1,02	9,420(1)	9,420(1)	6,881(6)	528,84(5)
SiHA	10,7	45,9	47,4	1,03	9,426(2)	9,426(2)	6,892(6)	530,38(4)

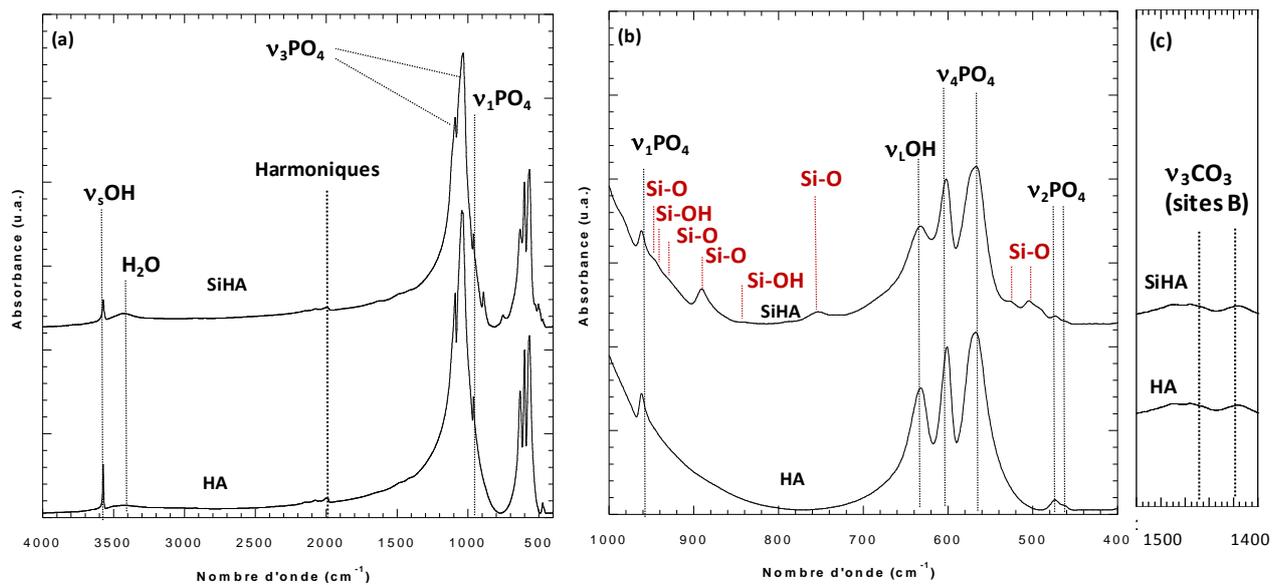


Figure II-7 : Spectres FT-IR dans les intervalles (a) 4000-400 cm<sup>-1</sup>, (b) 1000-400 cm<sup>-1</sup> et (c) 1500-1400 cm<sup>-1</sup> des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1 h. Les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA

### II.3.2.2. Caractérisations physiques des poudres

La Figure II-8 expose les clichés MEB des poudres calcinées. Les poudres sont composées de grains en forme de bâtonnets d'une centaine de nanomètre.

Le Tableau II-8 regroupe les mesures de surface spécifique (SSA), de masse volumique réelle ( $\rho_{réelle}$ ), de masse volumique théorique ( $\rho_{thé}$ ), l'estimation du diamètre moyen des grains ( $\phi_{moyen}$ ) et les valeurs de potentiel zêta ( $p\zeta$ ) des poudres d'HA et de SiHA.

La surface spécifique des poudres d'HA est égale à  $7,0 \pm 0,2 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . Celle des poudres de SiHA est le double soit  $16,1 \pm 0,2 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ .

Les résultats obtenus montrent que les masses volumiques réelles ( $\rho_{réelle}$ ) sont en accord avec les masses volumiques théoriques ( $\rho_{thé}$ ) pour les deux compositions. Le diamètre moyen des grains estimé ( $\phi_{moyen}$ ) est de l'ordre de la centaine de nanomètres pour HA et SiHA ce qui est en accord avec les images obtenues par MEB. La décroissance du diamètre moyen des grains suite à l'incorporation du silicium dans la structure apatite, est attribué à l'influence de l'élément silicium sur la cinétique de croissance granulaire [158].

Les valeurs de potentiel zêta des poudres d'HA et de SiHA à 25°C sont égales à  $-27,2 \pm 1,7 \text{ mV}$  pour HA et à  $-30,0 \pm 1,5 \text{ mV}$  pour SiHA. Les surfaces des deux compositions présentent des charges globales moyennes négatives et similaires. La présence du silicium dans la structure apatite ne modifie pas significativement la charge globale de surface du matériau.

Les répartitions granulométriques des poudres d'HA et de SiHA sont représentées sur la Figure II-9. Les répartitions en volume montrent la présence de deux familles d'agrégats (distribution bimodale) pour les deux compositions. Le diamètre moyen en volume ( $D_{(V,0,5)}$ ) des poudres de HA est de  $2,26 \mu\text{m}$  et celui des poudres de SiHA de  $0,16 \mu\text{m}$ . La présence d'agrégats est donc plus marquée dans le cas de HA que de SiHA. La répartition en nombre met en évidence la présence des petites particules. Elles sont comprises entre  $0,09$  et  $0,50 \mu\text{m}$  pour HA et entre  $0,05$  à  $0,40 \mu\text{m}$  pour SiHA avec un diamètre moyen en nombre ( $D_{(N,0,5)}$ ) égal à  $0,16 \mu\text{m}$  pour HA et à  $0,07 \mu\text{m}$  pour SiHA. Ces résultats sont en accord avec les diamètres moyen estimés ( $\phi_{moy}$ ) par l'Expression II-3 ( $\phi_{moy} \text{ HA} = 0,28 \mu\text{m}$ ,  $\phi_{moy} \text{ SiHA} = 0,12 \mu\text{m}$ ).

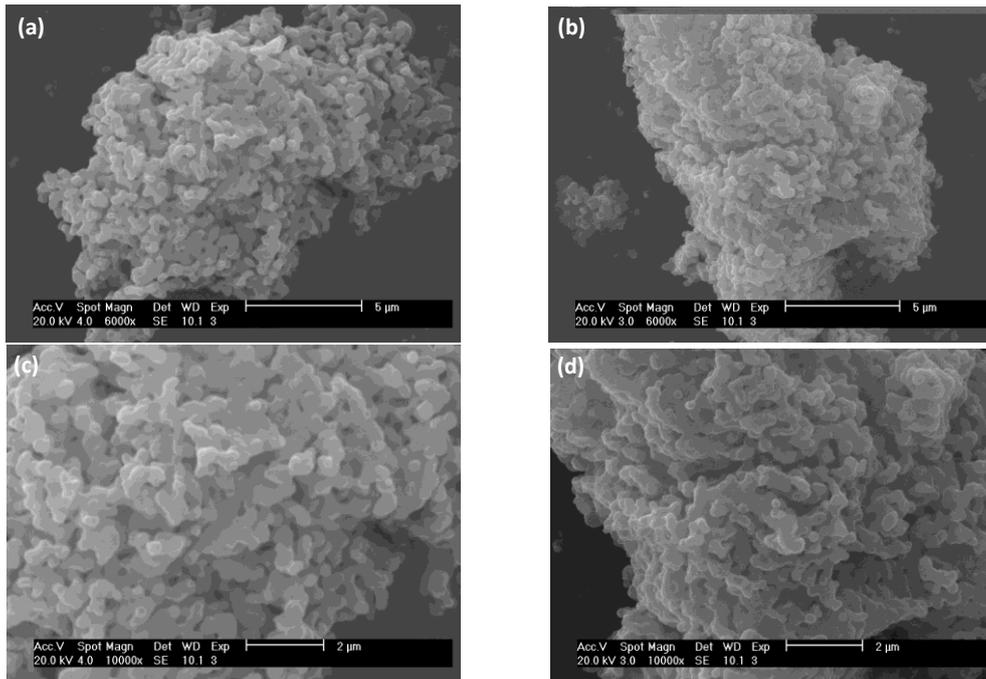


Figure II-8 : Clichés MEB des poudres (a, c) d'HA et (b, d) de SiHA calcinées à 1000°C/1 h

Tableau II-8 : Surfaces spécifiques (SSA), masses volumiques réelles ( $\rho_{réelle}$ ), masses volumiques théoriques ( $\rho_{thé}$ ), estimation du diamètre moyen des grains ( $\phi_{moy}$ ) et potentiel zêta ( $p\zeta$ ) des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1 h

Composition	SSA ( $m^2 \cdot g^{-1}$ )	$\rho_{réelle}$ ( $g \cdot cm^{-3}$ )	$\rho_{thé}$ ( $g \cdot cm^{-3}$ )	$\phi_{moy}$ (nm)	$p\zeta$ (mV)
HA	$7,0 \pm 0,2$	$3,11 \pm 0,05$	3,15	$275 \pm 12$	$-27,2 \pm 1,7$
SiHA	$16,1 \pm 0,2$	$3,07 \pm 0,05$	3,12	$122 \pm 4$	$-30,0 \pm 1,5$

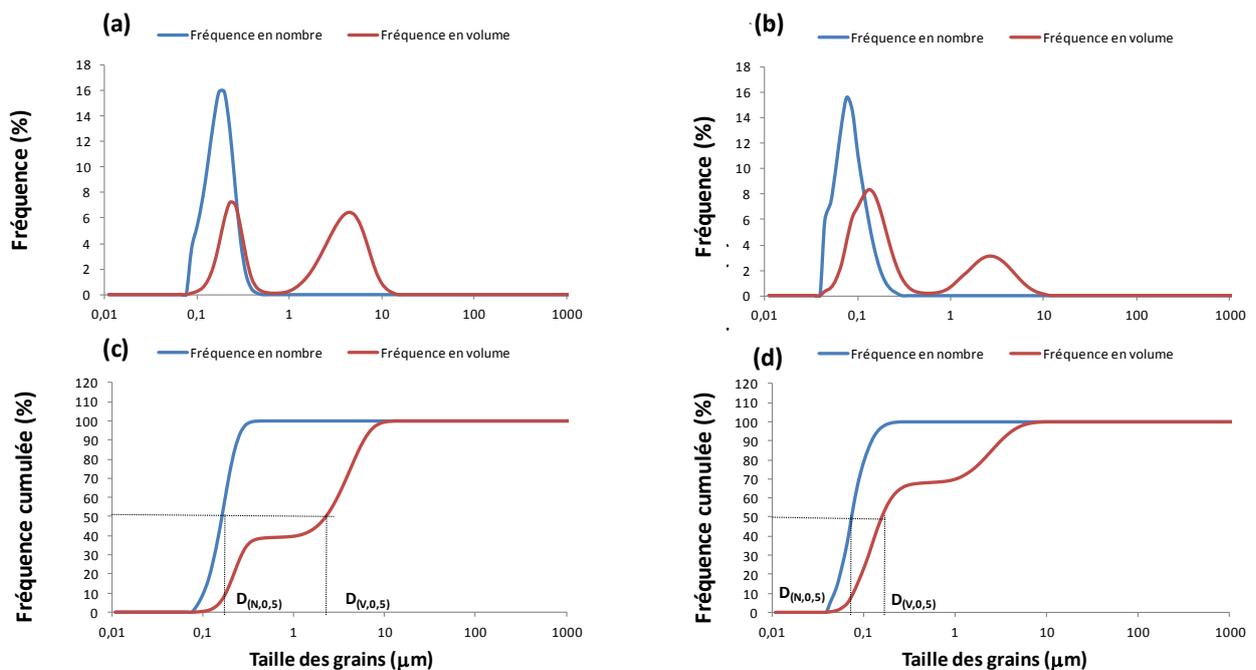


Figure II-9 : Distribution granulométrique en fréquence (%) et en fréquence cumulée (%) des poudres (a, c) d'HA et (b,d) de SiHA calcinées à 1000°C/1 h

En conclusion, les poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C durant 1 heure sont considérées comme monophasées et pures. Concernant l'hydroxyapatite silicatée, le silicium est bien incorporé à la structure apatite. Les deux compositions présentent des valeurs de potentiel zêta comparables. Outre la composition chimique, les seules différences notables entre les deux poudres sont la surface spécifique (celle de la poudre de SiHA est le double de celle de la poudre d'HA) et la répartition granulométrique (la poudre d'HA présente plus d'agrégats que celle de SiHA).

### **II.3.3. Caractérisation des pastilles**

Les pastilles denses d'HA sont élaborées à partir des poudres d'HA calcinées à 650°C/30 min et celles de SiHA à partir des poudres calcinées à 700°C/2 h. Ces pastilles sont frittées à 1200°C/30 min, sous air.

#### **II.3.3.1. Composition des pastilles**

Les diffractogrammes de la surface des pastilles d'HA et de SiHA après polissage sont présentés sur la Figure II-10. Les spectres FT-IR obtenus pour les deux compositions à partir de poudres grattées à la surface des pastilles sont représentés sur la Figure II-11. Sur les diffractogrammes des deux compositions, seules les raies de diffraction relatives à la phase cristalline apatite sont présentes (*voir paragraphe II.3.1.1, chapitre II*). Sur les spectres FT-IR (Figure II-11), seules les bandes d'absorption relatives aux groupements phosphates sont observées (*voir paragraphe II.3.1.3, chapitre II*). Comme pour les poudres calcinées, les bandes caractéristiques des groupements silicates sont observées dans le cas de SiHA, vérifiant l'incorporation des groupements silicates dans la structure apatite, et des carbonates résiduels en site B sont détectées. Les pastilles d'HA et de SiHA sont donc pures et monophasées.

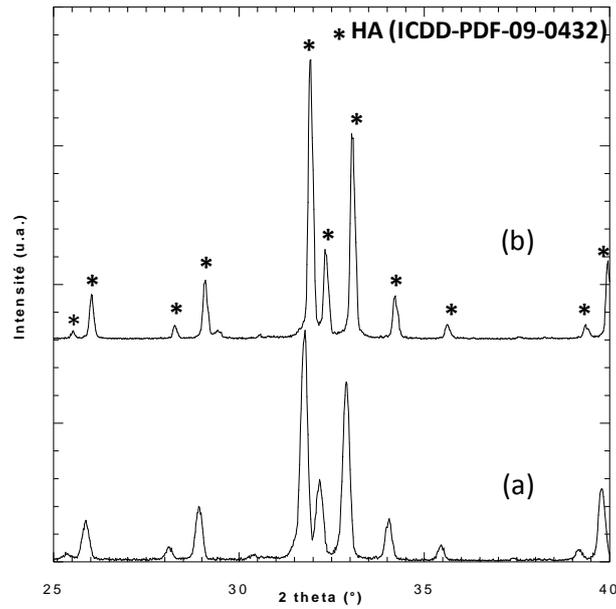


Figure II-10 : Diffractogrammes des pastilles (a) d'HA et (b) de SiHA frittées à 1200°C/30 min et polies

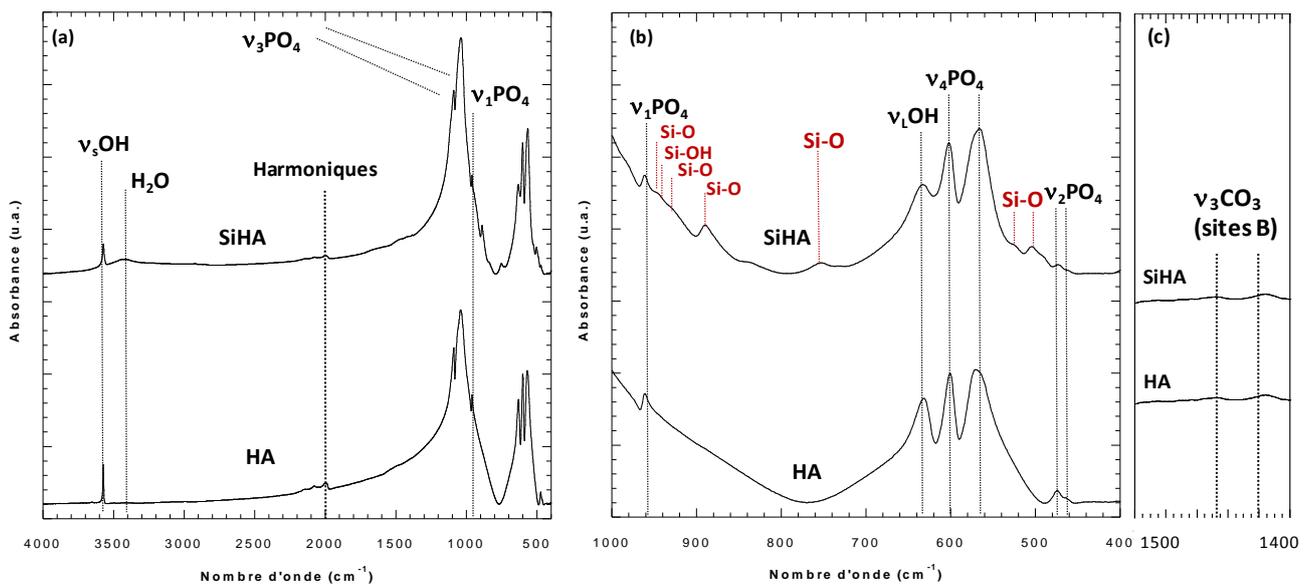


Figure II-11 : Spectres FT-IR dans les intervalles (a) 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , (b) 1000-400  $\text{cm}^{-1}$  et (c) 1500-1400  $\text{cm}^{-1}$  des pastilles d'HA et de SiHA frittées à 1200°C/30 min. Les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA

### II.3.3.2. Caractérisations physiques des pastilles

La Figure II-12 expose les clichés MEB obtenus après gravage thermique. Les matériaux en hydroxyapatite et en hydroxyapatite silicatée présentent une microstructure dense. Les pastilles d'HA sont très peu poreuses. Comparativement aux pastilles d'HA, celles de SiHA présentent une porosité résiduelle légèrement plus importante et une taille de grain légèrement plus faible.

Le Tableau II-9 présente la densité d'Archimède, le taux de densification ( $\tau$  %) et la surface spécifique (SSA) des pastilles d'HA et de SiHA frittées. La détermination de la densité d'Archimède ( $d_{\text{Archi}}$ ) est effectuée sur trois pastilles de chaque composition, la valeur présentée correspond donc à une moyenne de 3 mesures ( $d_{\text{Archi (moy)}}$ ).

Le taux de densification des pastilles ( $\tau$  %) est calculé en utilisant comme valeur pour la masse volumique réelle ( $\rho_{\text{réelle}}$ ), celle de poudres calcinées à 1200°C pendant 30 minutes, soit  $3,08 \pm 0,05 \text{ g.cm}^{-3}$  pour HA et  $3,11 \pm 0,05 \text{ g.cm}^{-3}$  pour SiHA. Une température de frittage de 1200°C permet une densification de 98% pour les pastilles d'HA et de l'ordre de 95% pour les pastilles de SiHA.

Les surfaces spécifiques des pastilles d'HA et de SiHA sont de l'ordre de  $0,50 \pm 0,01 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ . Ces valeurs sont à prendre avec précaution. En effet, leur détermination est difficile et nécessite plusieurs essais avant d'obtenir des résultats concluants. Les pastilles sont denses et de faible surface, ce qui limite l'adsorption du Kr à leur surface et donc la détermination précise de la surface spécifique.

En conclusion, les pastilles d'HA et de SiHA sont pures et monophasées. Cependant, il est à remarquer que les pastilles d'HA sont légèrement plus denses que celles de SiHA et présentent des grains légèrement plus gros conformément aux travaux précédents effectués au laboratoire [158]. La présence de silicium dans l'apatite ralentit légèrement la cinétique de frittage (donc le taux de densification) et la croissance granulaire.

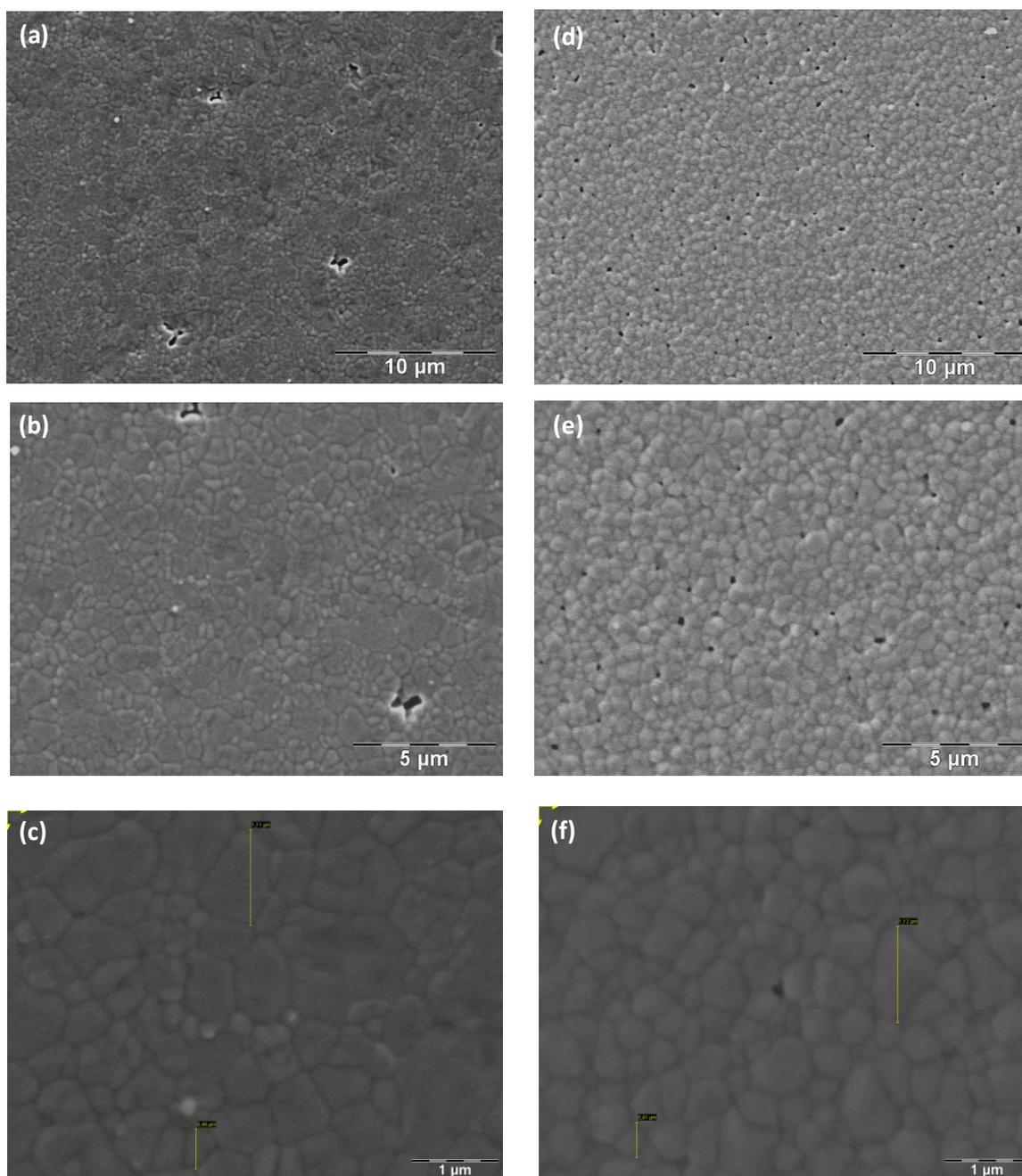


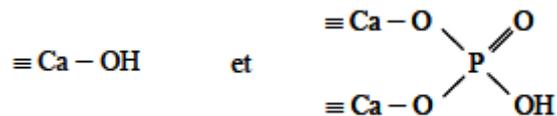
Figure II-12 : Clichés MEB de la surface des pastilles (a, b, c) d'HA et (d, e, f) de SiHA frittées à 1200°C/30 min

Tableau II-9 : Densité d'Archimède moyenne  $d_{\text{Archi (moy)}}$ , taux de densification ( $\tau$  %) et surface spécifique (SSA) des pastilles d'HA et de SiHA frittées à 1200°C/30 min et polies

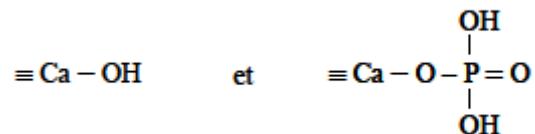
Composition	$d_{\text{Archi (moy)}}$	$\tau$ (%)	SSA ( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )
HA	$3,01 \pm 0,20$	98	$0,50 \pm 0,01$
SiHA	$2,94 \pm 0,20$	95	$0,50 \pm 0,01$

### II.3.4. Détermination de la densité de sites X-OH accessibles à la surface des substrats

D'après la littérature, l'hydroxyapatite présente à sa surface des sites réactionnels de nature différente : des groupements fonctionnels phosphate et des groupements fonctionnels hydroxyle. Wu *et al.* [177] ont montré que chaque groupement phosphate est lié à deux atomes de calcium dans la structure apatite et porte un seul site de greffage de type OH :



A la différence de Wu *et al.* [177], Cases *et al.* [178] estiment que les groupements phosphates sont liés à un seul atome de calcium de surface pour assurer l'électroneutralité de l'interface et portent chacun deux sites de greffage de type OH :



La densité de sites OH présents à la surface de l'apatite diffère d'un travail à un autre dans la littérature. Le calcul appliqué aux substrats utilisés lors des présents travaux de thèse reprend celui utilisé par N. Douard [179] dans des travaux précédents réalisés au laboratoire. Ce calcul, ne tient pas compte de l'existence possible de groupements OH liés aux atomes de calcium et considère un seul groupement OH par atome de phosphore.

Chaque maille d'hydroxyapatite possède huit sites de type P-OH en surface (Figure II-13). Les groupements silicates substituant les groupements phosphates, l'incorporation du silicium dans la structure apatite ne modifie pas le nombre de sites total P+Si de surface. Les substrats en HA et en SiHA présentent donc un même nombre de sites X-OH de surface (X = P ou Si). Le nombre de moles de sites X-OH est déterminé à partir des paramètres cristallographiques de la structure apatite et des aires des plans cristallographiques. L'aire de la maille cristalline ( $A_{\text{maille}}$  en  $\text{m}^2$ ) est obtenue selon l'Expression II-5. La densité de sites X-OH est égale au nombre de sites X-OH de surface (huit) divisé par l'aire de la maille de l'apatite ( $A_{\text{maille}}$ ) en tenant compte du fait que seule une face sur six du motif est accessible (Expression II-6).

Les résultats des affinements de paramètres de maille d'HA et de SiHA permettent de calculer l'aire de la maille ( $A_{\text{maille}}$ ) selon l'Expression II-5 en utilisant les paramètres de maille déterminés au Tableau II-7. La densité de sites de greffage à la surface des substrats ( $d_{\text{X-OH}}$ ) est alors déduite selon l'Expression II-6. L'ensemble des résultats obtenus est répertorié dans le Tableau II-10. L'incorporation du silicium dans la structure apatite ne modifie pas la densité de sites ( $d_{\text{X-OH}}$ ) accessibles au greffage à la surface des poudres et des pastilles en HA et SiHA.

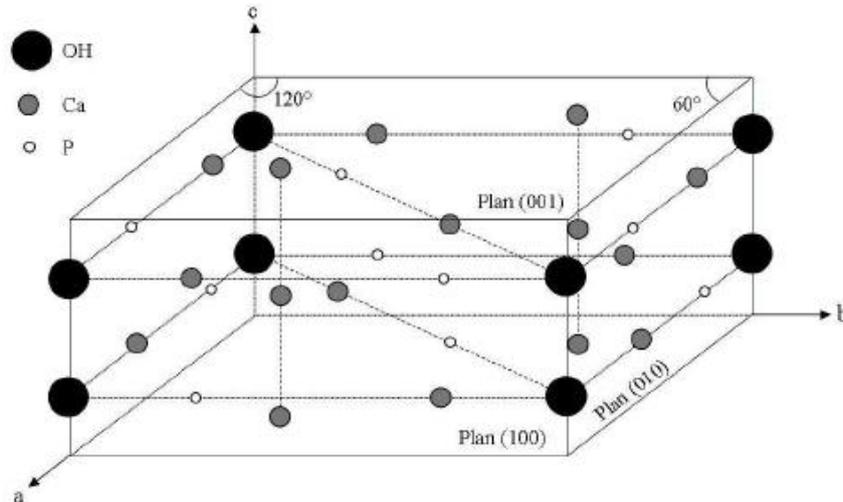


Figure II-13 : Schéma représentant la maille cristalline de l'hydroxyapatite [155]

$$A_{\text{maille}} = 2 \times A(001) + 4 \times A(100)$$

$$\text{avec } A(100) = A(010) = a \times c \quad \text{et} \quad A(001) = a \times b \times \frac{\sqrt{3}}{2}$$

**Expression II-5 :** Calcul de l'aire de la maille cristalline d'une apatite. Les aires  $A(100)$ ,  $A(010)$  et  $A(001)$  correspondent aux aires des plans cristallographiques (100), (010) et (001) de la maille de l'apatite

$$d_{\text{X-OH}} = \frac{1}{6} \times \frac{8}{A_{\text{maille}} \times N_a}$$

**Expression II-6 :** Expression de la densité de sites  $d_{\text{X-OH}}$  existant à la surface d'un solide de structure apatite ( $N_a$  = nombre d'Avogadro)

Tableau II-10 : Différents paramètres calculés pour les substrats d'HA et de SiHA

Composition du substrat	$A(001)$ ( $\text{\AA}^2$ )	$A(100)$ ( $\text{\AA}^2$ )	$A_{\text{maille}}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$d_{\text{X-OH}}$ ( $\text{mol.m}^{-2}$ )
HA	$76,85 \pm 0,01$	$64,81 \pm 0,01$	$412,94 \pm 0,01$	$5,36 \times 10^{-7}$
SiHA	$77,01 \pm 0,01$	$64,97 \pm 0,01$	$413,90 \pm 0,01$	$5,35 \times 10^{-7}$

## II.4. Caractérisation des organosilanes utilisés

Les organosilanes utilisés pour la modification de la surface des substrats sont des aminosilanes. Le groupement amine placé à l'extrémité de leurs chaînes carbonées non hydrolysable, va jouer deux rôles différents durant cette étude. D'une part, il va contribuer à l'autocatalyse de la réaction de silanisation [120] en favorisant la réaction d'hétérocondensation entre les groupements hydrolysables de l'organosilane et les sites OH existant à la surface du substrat. D'autre part, il va constituer un site réactif pour l'immobilisation future de molécules biologiquement actives à la surface du substrat [68].

Les trois organosilanes étudiés sont représentés sur la Figure II-14. La différence entre l'APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane), l'APMDES (3-aminopropyl(diéthoxy)méthylesilane) et l'APDMES (3-(éthoxydiméthylesilyl)propylamine) réside dans leur fonctionnalité, c'est-à-dire le nombre de branches éthoxyle (-O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) hydrolysables et réactives disponibles sur l'atome de silicium. L'APTES comporte trois branches éthoxyle alors qu'il n'y en a que deux dans l'APMDES (l'autre groupement étant une fonction méthyle) et une seule dans l'APDMES (les deux autres groupements étant des fonctions méthyle). Cette différence de fonctionnalité peut impliquer une variation de la réactivité de ces molécules vis-à-vis les sites OH de la surface d'un substrat.

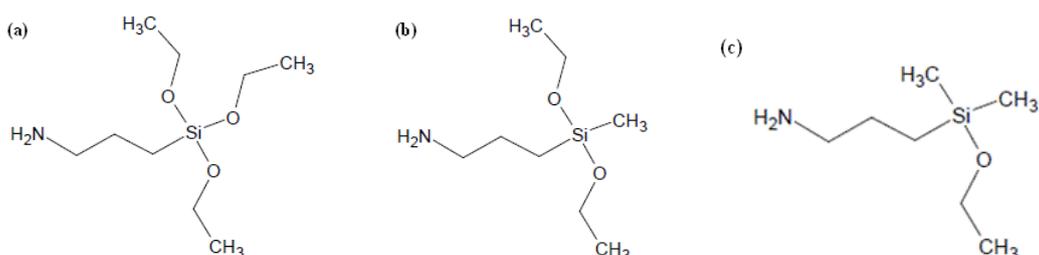


Figure II-14 : Représentation des molécules de (a) 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES), (b) 3-aminopropyl (diéthoxy) méthylesilane (APMDES) et (c) 3-(éthoxydiméthylesilyl)propylamine (APDMES)

### II.4.1. Propriétés biologiques des organosilanes

L'utilisation d'organosilanes comme agents de couplage pour l'immobilisation des molécules biologiquement actives à la surface d'un biomatériau nécessite une connaissance de leurs propriétés biologiques et plus précisément de leur biocompatibilité. En effet, ces molécules si elles ne sont pas couplées à une biomolécule vont être en interaction directe avec le milieu

biologique. Il est important de distinguer l'action d'une molécule "libre" et d'une molécule "liée" soit par hétérocondensation soit par homocondensation.

Dans un rapport scientifique sur la santé publique [180], la toxicité a été évaluée pour l'APTES dans son état libre sur des modèles animaux. Des lapins mâles et femelles ont été traités par voie cutanée avec des solutions d'APTES sur une période de vingt-quatre heures. Les analyses ont montré l'absence d'effets cutanés locaux graves vérifiant la faible toxicité de l'APTES par voie cutanée. Dans le but de vérifier la toxicité biologique de l'APTES, cinq souris ont reçu des doses de 0, 28, 56 et 90 mg/kg d'APTES par injection intrapéritonéale. La dose la plus élevée était équivalente à environ 80% de la dose létale médiane ( $DL_{50}$ ). La  $DL_{50}$  est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance, cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50% d'une population animale donnée dans des conditions d'expérimentation précises. Les résultats obtenus ont montré que l'APTES ne provoquait pas la rupture de l'ADN. L'APTES a également donné une réponse négative dans plusieurs essais de mutagénéicité bactérienne, ainsi que dans des études biologiques effectuées *in vitro* sur la mutation génique de cellules de mammifères. Cet organosilane manque d'activité significative sur l'endommageant de l'ADN, et sa réponse a aussi été négative lors d'un test d'aberration chromosomique sur des fibroblastes de hamsters chinois. Par ailleurs, un essai *in vivo* et plusieurs essais *in vitro* n'ont montré aucun signe de potentiel génotoxique de l'APTES.

Comme il a été exposé dans le chapitre I, l'APTES est couramment utilisé comme agent de greffage. Durrieu *et al.*[68] l'ont utilisé pour immobiliser un peptide RGD à la surface de poudre en hydroxyapatite (HA). La biocompatibilité de l'APTES n'a pas été évaluée directement mais, les tests de culture cellulaire *in vitro* effectués avec des cellules ostéoprogénitrices humaines ont montré une amélioration de l'attachement et de l'adhésion cellulaire à la surface du matériau après l'immobilisation du peptide. Li *et al.* [181] ont étudié la faisabilité de l'utilisation de l'APTES comme agent de greffage pour la modification de supports poreux de chitosane. Les cultures cellulaires *in vitro* effectuées avec des cellules de Schwann (neurolemmocytes) ont montré que la surface de chitosane silanisée avec 8% d'APTES sans addition d'une molécule biologique facilitait la fixation et la prolifération cellulaire à 24 heures. Les tests cellulaires n'ont pas montré d'effets toxiques pour l'APTES. La présence à la surface d'un substrat de molécules d'APTES non greffées par des biomolécules n'a donc pas d'impact toxique sur le milieu biologique.

La toxicité biologique des organosilanes difonctionnel (APMDES) et monofonctionnel (APDMES) n'est pas décrite dans la littérature. Seules, quelques études [182-184] décrivent leur utilisation comme intermédiaires associés à des biomolécules dans des travaux à visée biologique dans des milieux acellulaires.

## **II.4.2. Caractérisation des organosilanes**

Dans la suite de ce travail, la nomenclature suivante sera employée :

- l'APTES sera noté T (pour trifonctionnel),
- l'APMDES sera noté D (pour difonctionnel),
- l'APDMES sera noté M (pour monofonctionnel).

### **II.4.2.1. Analyse par spectroscopie infrarouge**

Les trois organosilanes sont fournis par la société Sigma-Aldrich (*voir annexes*). Les spectres FT-IR caractéristiques des molécules sont représentés à la Figure II-15. Les spectres sont découpés en trois domaines allant de 4000 à 2500  $\text{cm}^{-1}$  (Zone I), de 2500 à 1700  $\text{cm}^{-1}$  (Zone II) et de 1700 à 500  $\text{cm}^{-1}$  (Zone III).

La zone II présente une seule bande de vibration notable située à 1900  $\text{cm}^{-1}$  observée pour l'organosilane T (Figure II-15-c). Dans la littérature, cette bande est référencée comme harmonique des élongations Si-O-Si de la silice ou de réseau de type silice [185-187]. Elle peut être attribuée dans le cas présent à une polymérisation de la molécule T (homocondensation, *voir paragraphe I.3.2*). Cette polymérisation est rendue possible par la sensibilité de la molécule T aux molécules d'eau présentes dans l'air. Cette bande est également présente dans le cas de l'organosilane D mais avec une intensité beaucoup plus faible (Figure II-15-b).

De ce fait, seules les zones I et III seront détaillées (Figure II-16). Les principales bandes de vibrations des organosilanes sont récapitulées dans le Tableau II-11.

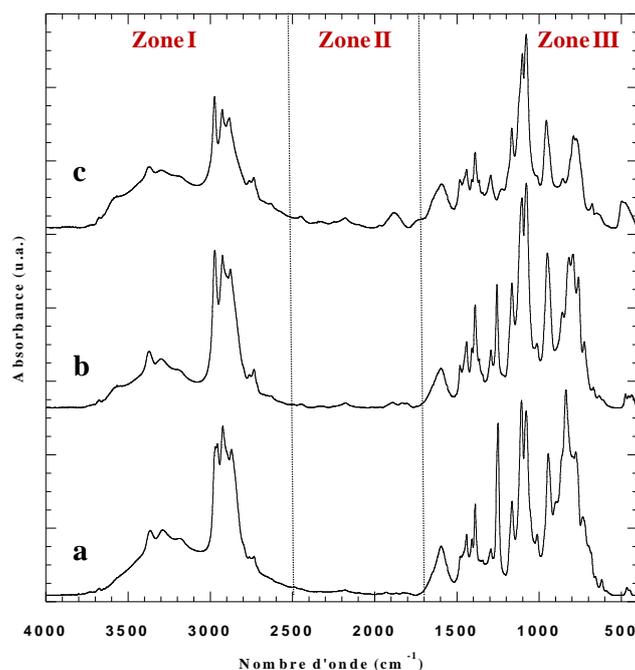


Figure II-15 : Spectres FT-IR des organosilanes utilisés (a) M, (b) D et (c) T

Tableau II-11 : Principales bandes de vibrations des organosilanes

Abréviations :  $\nu_s$ , élancement symétrique ;  $\nu_{as}$ , élancement asymétrique ;  $\delta$ , cisaillement ;  $\omega$ , hochement ;  $\rho$ , balancement

Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Attributions	Intensité de bande	Réf.
3381	$\nu_{as}$ N-H	Faible	[188]
3211	$\nu_s$ N-H	Faible	[188]
2975	$\nu_{as}$ CH <sub>3</sub>	Intense	[189]
2973	$\nu_s$ CH <sub>2</sub> (NH <sub>2</sub> )	Moyenne	[190]
2928	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub>	Intense	[189]
2887	$\nu_s$ CH <sub>3</sub> / $\nu_s$ CH <sub>2</sub>	Intense	[189-194]
2738	$\nu_s$ C-H	Faible	[188]
1640	$\delta_{as}$ NH <sub>2</sub>	Faible	[179]
1600 - 1580	$\delta$ NH <sub>2</sub>	Faible	[188, 189]
1483	$\delta$ CH <sub>2</sub>	Moyenne	[189]
1443	$\delta_{as}$ CH <sub>3</sub>	Moyenne	[189]
1411	$\delta$ Si-CH <sub>2</sub>	Moyenne	[189]
1391	$\delta$ CH <sub>3</sub>	Moyenne	[188]
1297	$\omega$ CH <sub>2</sub>	Moyenne	[188]
1249	$\delta$ Si-CH <sub>3</sub>	Intense	[179]
1168	$\rho$ O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> / $\delta$ NH <sub>2</sub>	Intense	[188, 190-194]
1100	$\nu_s$ C-N	Très intense	[190-194]
1100 et 1080	$\nu_{as}$ Si-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Très intense	[188, 190-194]
958, 792, 777	$\nu_s$ Si-O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Intense	[188, 190-194]

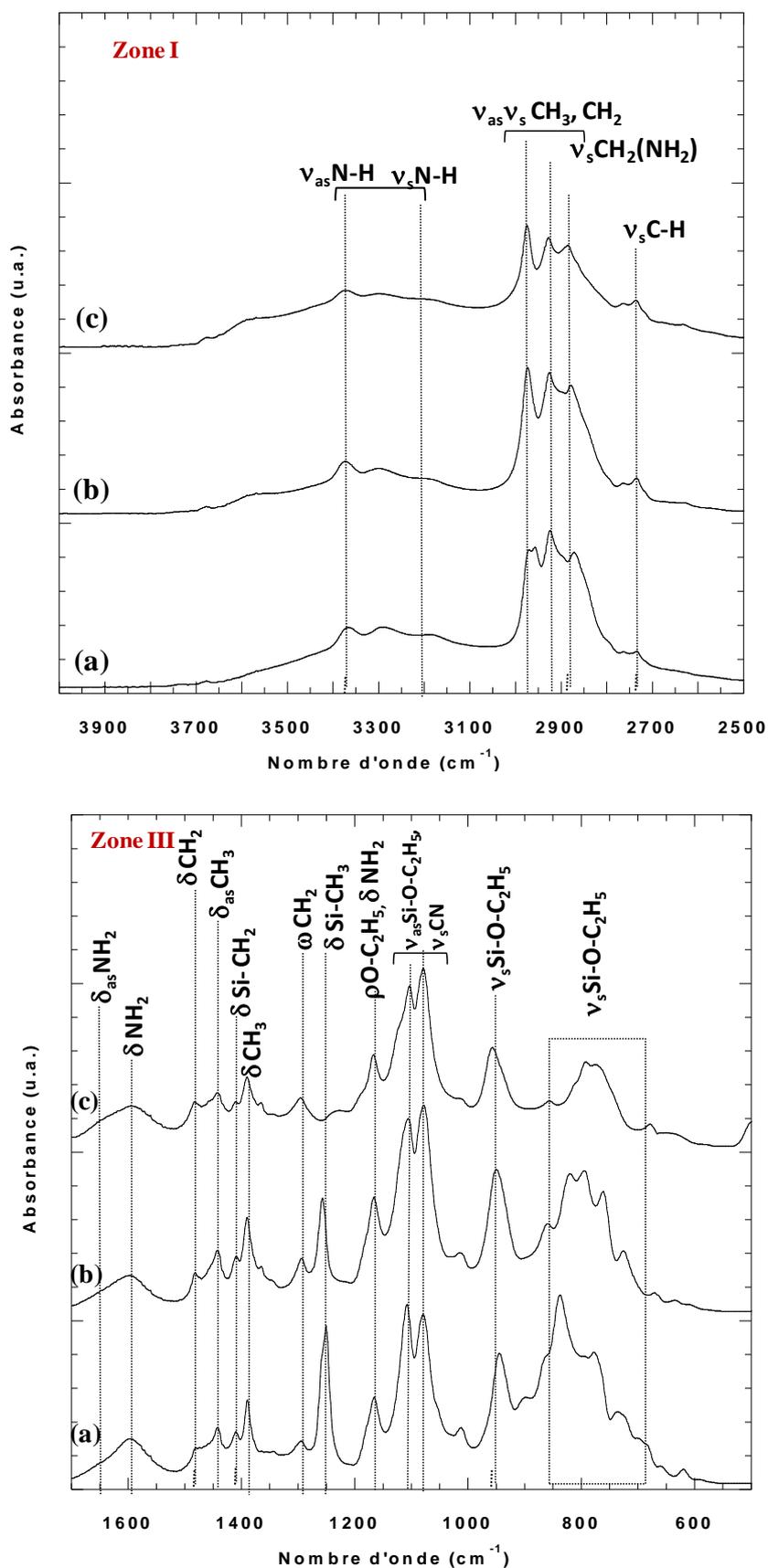


Figure II-16 : Spectres FT-IR des organosilanes utilisés : (a) M, (b) D et (c) T dans les intervalles  $4000\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$  (Zoné I) et  $1700\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$  (Zone III)

Les travaux de nombreux auteurs ont permis d'identifier les différentes bandes d'absorption relevées sur les spectres FT-IR [188-194]. La plupart des bandes d'absorption sont communes aux trois molécules :

- les bandes d'élongation asymétrique et symétrique des groupements  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$  sont observées entre  $2980$  et  $2870 \text{ cm}^{-1}$ . La bande à  $2975 \text{ cm}^{-1}$  peut être attribuée soit à élongation asymétrique  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$  [189] soit à l'élongation  $\nu_s\text{CH}_2(\text{NH}_2)$  [190]. La bande d'absorption à  $2738 \text{ cm}^{-1}$  est caractéristique de l'élongation symétrique de la liaison  $\nu_s\text{CH}$  [188]. Les déformations angulaires de ces groupements sont visibles à  $1442 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$ ),  $1391 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_s \text{CH}_3$ ),  $1483 \text{ cm}^{-1}$  ( $\delta \text{CH}_2$ ) et  $1297 \text{ cm}^{-1}$  ( $\omega \text{CH}_2$ ),
- les bandes caractéristiques de la fonction amine (amine I) sont observées : élongations asymétrique et symétrique de la liaison N-H entre  $3381 \text{ cm}^{-1}$  et  $3211 \text{ cm}^{-1}$ , déformations de cisaillement asymétrique et symétrique du groupement  $\text{NH}_2$  à  $1640 \text{ cm}^{-1}$  (épaulement) et  $1600 \text{ cm}^{-1}$  et élongation de la liaison  $\nu\text{CN}$  à  $1106 \text{ cm}^{-1}$ ,
- les bandes d'absorption situées à  $1168 \text{ cm}^{-1}$  (balancement),  $1104$  et  $1080 \text{ cm}^{-1}$  (élongation asymétrique),  $958$ ,  $792$  et  $777 \text{ cm}^{-1}$  (élongation symétrique) témoignent de la présence des groupements éthoxyle ( $\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$ ),
- la bande d'absorption à  $1411 \text{ cm}^{-1}$  est caractéristique de la déformation de cisaillement des groupements ( $\text{Si}-\text{CH}_2$ ).

A la différence des organosilanes D et M, la molécule T ne présente pas de bande d'absorption à  $1249 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à la déformation de cisaillement des groupements silyles  $\text{Si}-\text{CH}_3$ . L'absence de cette bande dans le cas de la molécule T est due à la présence de trois groupements fonctionnels ( $-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$ ) dans sa structure chimique.

#### **II.4.2.2. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse**

Les analyses thermogravimétriques (TG) des organosilanes trifonctionnel (T), difonctionnel (D) et monofonctionnel (M), effectuées sous atmosphère d'argon, sont représentées sur la Figure II-17. Les thermogrammes mettent en évidence d'importantes pertes de masse (T : 83%, D : 97%, M : 99%) avant  $250^\circ\text{C}$ . Les courbes dérivées des analyses TG montrent que ces pertes de masse sont maximales à  $150^\circ\text{C}$  pour l'organosilane T, à  $130^\circ\text{C}$  pour le D et à  $120^\circ\text{C}$  pour le M. Cette évolution est en accord avec celle des points d'ébullition à pression atmosphérique des organosilanes T, D et M qui sont respectivement  $221,1^\circ\text{C}$ ,  $214^\circ\text{C}$  et  $166,5^\circ\text{C}$  à  $P = 760 \text{ mm Hg}$  (données Sigma Aldrich).

La fonctionnalité de l'organosilane influence sa stabilité thermique : plus la fonctionnalité est importante, plus la température d'ébullition est haute. Quelle que soit leur fonctionnalité, les organosilanes se vaporisent avant 250°C. Pour les organosilanes T et D les pertes de masse à 250°C sont de 83% et 97% respectivement. Les résidus (après 250°C) peuvent être attribués à des polymères issus de réactions de polymérisation (homocondensation) *in situ*, qui se décomposent à plus haute température totalement (organosilane D) ou partiellement (organosilane T) avec formation de solides silicés résiduels.

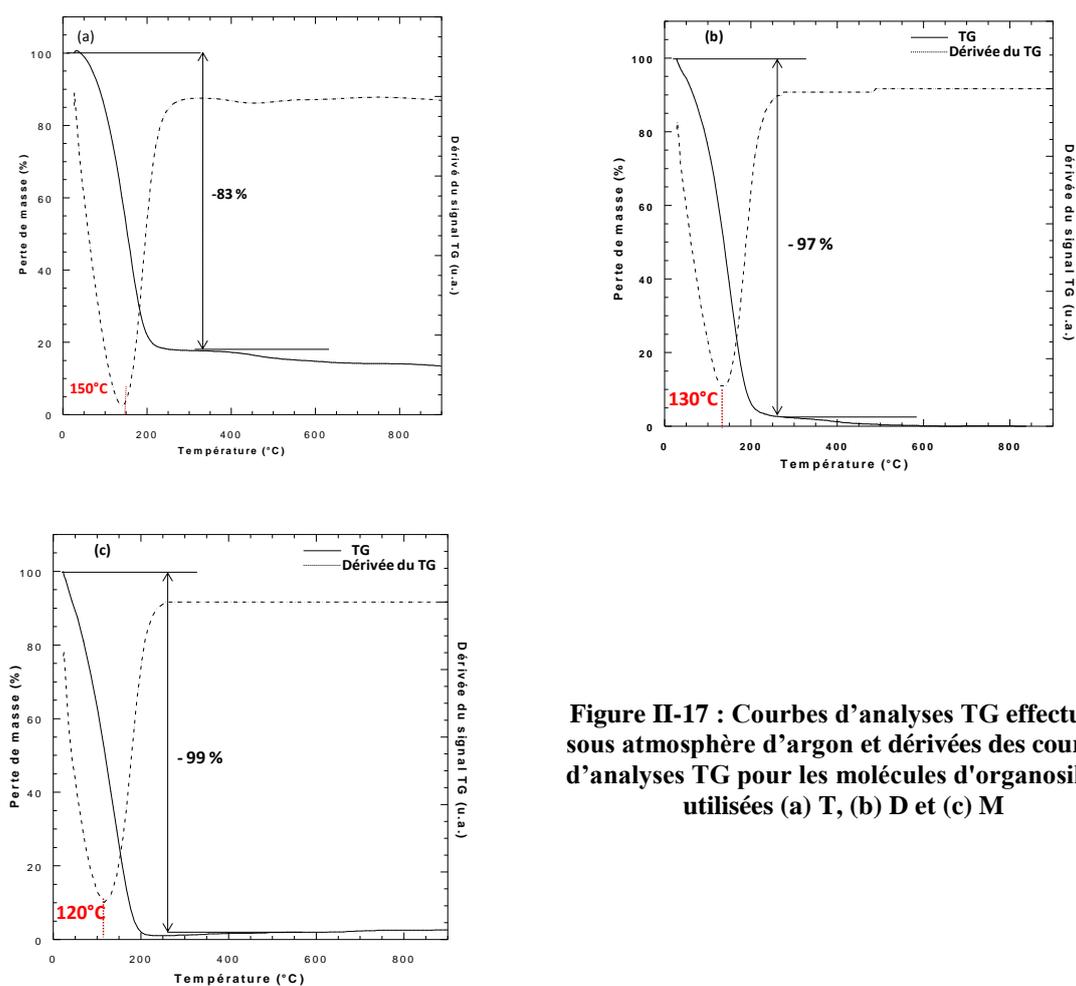


Figure II-17 : Courbes d'analyses TG effectuées sous atmosphère d'argon et dérivées des courbes d'analyses TG pour les molécules d'organosilane utilisées (a) T, (b) D et (c) M

Les Figure II-18, Figure II-19 et Figure II-20 illustrent l'évolution des différentes masses émises au cours du traitement thermique des organosilanes libres. Ces émissions de masses correspondent aux molécules volatilisées ou à la fragmentation, dans le spectromètre de masse de ces molécules. Pour faciliter l'interprétation des émissions de masses obtenues pour chaque organosilane, les courbes sont divisées en trois domaines de température : zone 1 [20-100°C], zone 2 [100-300°C] et zone 3 [300-900°C].

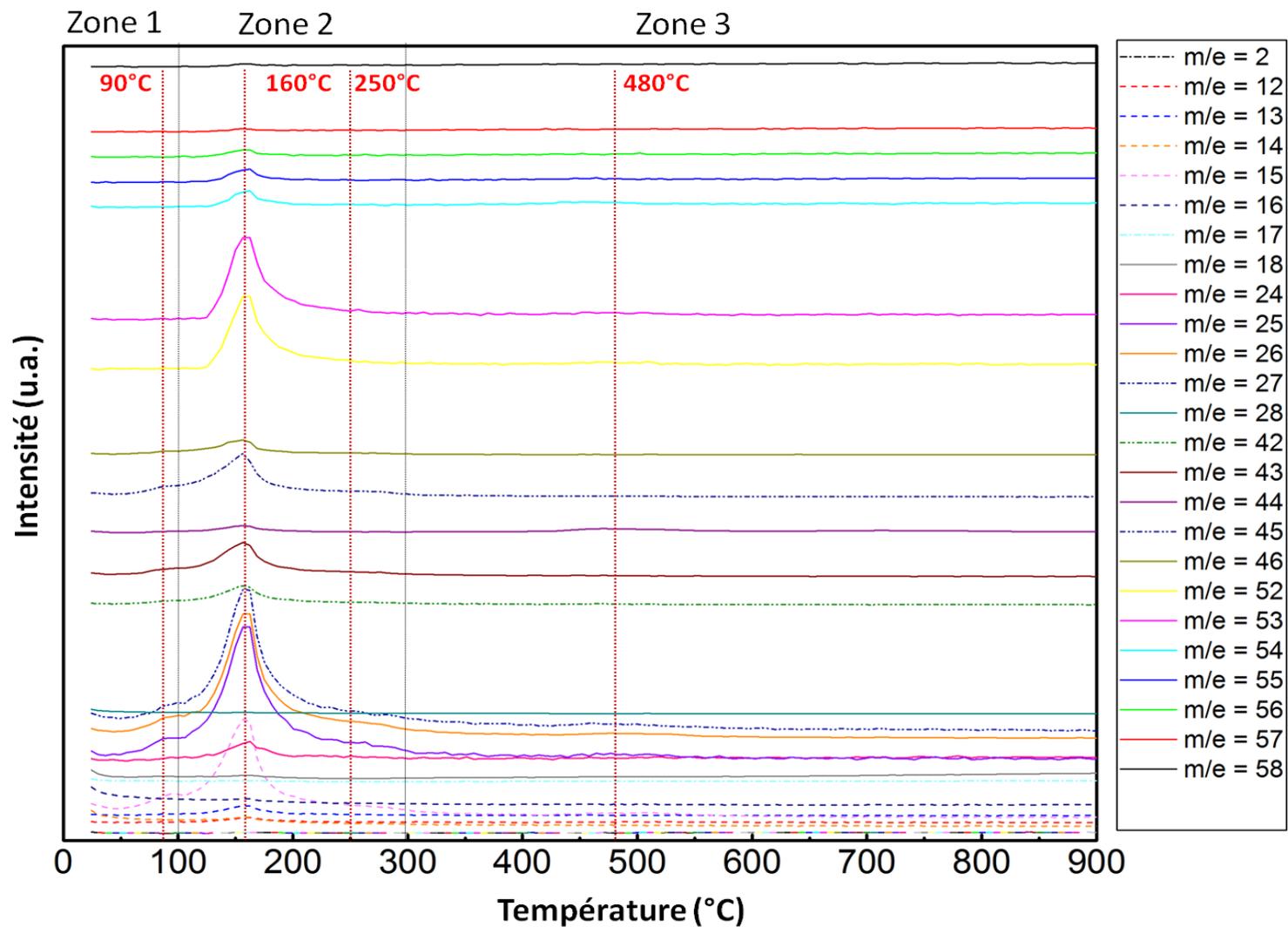


Figure II-18 : Émissions des masses au cours du traitement thermique de l'organosilane T

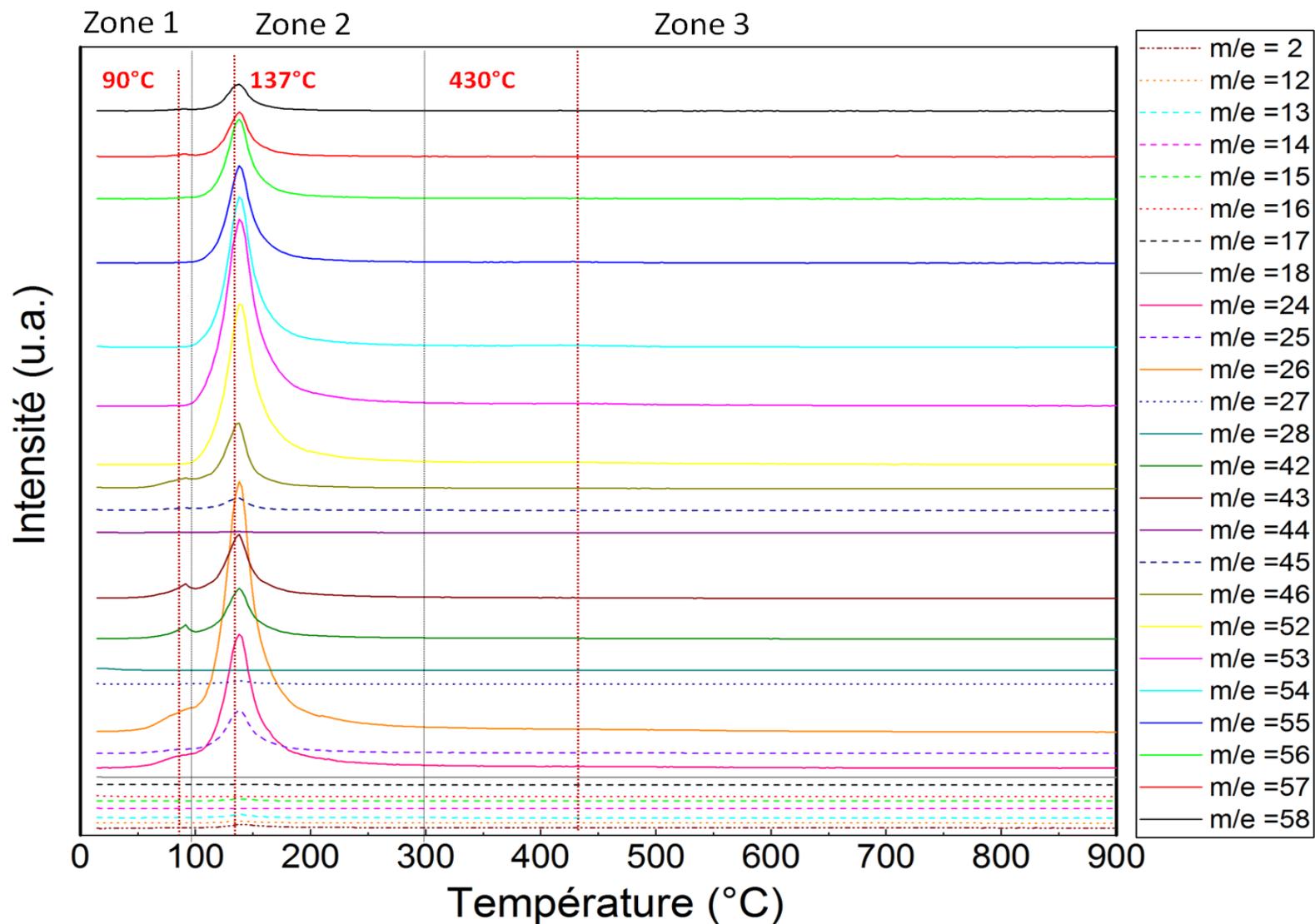


Figure II-19 : Émissions des masses au cours du traitement thermique de l'organosilane D

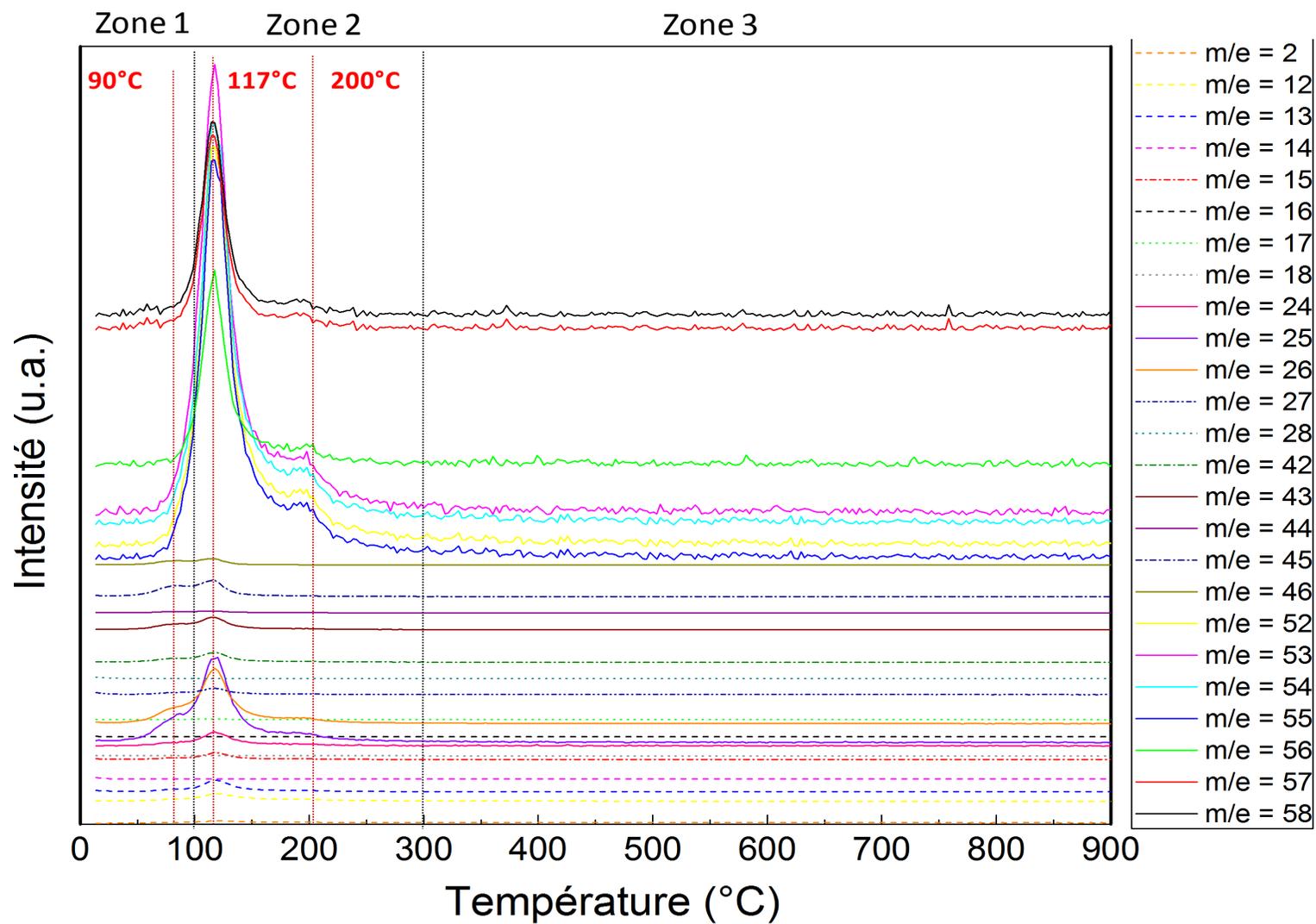


Figure II-20 : Émissions des masses au cours du traitement thermique de l'organosilane M

Le spectre de masse de l'organosilane T (Figure II-18) présente de nombreuses émissions de masses. Les différentes possibilités d'attribution des émissions de masses aux fragments organiques des organosilanes entre  $m/e = 2$  et 58 sont récapitulées dans le Tableau II-12. À partir de  $m/e = 58$ , les émissions de masses ne sont pas observables, elles ne sont donc pas présentées. En se basant sur les profils des courbes et sur la structure de la molécule, les émissions concernant l'organosilane T sont détaillées ci-dessous. L'ensemble de ces interprétations est résumé sur la Figure II-21.

La Zone 2 présente un premier maximum à  $160^{\circ}\text{C}$ . Celui-ci concerne l'ensemble des émissions de masses, certaines pouvant correspondre à plusieurs fragments :

- La chaîne « amine », plus ou moins hydrogénée, est identifiée par les fragments suivants :  $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$  ( $m/e = 58$ ),  $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$  ( $m/e = 57$ ),  $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}$  ( $m/e = 56$ ),  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$  ( $m/e = 55$ ),  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}$  ( $m/e = 54$ ),  $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$  ( $m/e = 53$ ),  $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}$  ( $m/e = 52$ ),  $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$  ( $m/e = 44$ ),  $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$  ( $m/e = 43$ ),  $\text{C}_2\text{H}_4\text{N}$  ( $m/e = 42$ ),  $\text{N}_2$  ou  $\text{CH}_2\text{N}$  ( $m/e = 28$ ), complétés par les petits fragments propres à la fonction amine  $\text{NH}_3$  à  $m/e = 17$ ,  $\text{NH}_2$  à  $m/e = 16$ ,  $\text{NH}$  à  $m/e = 15$  et  $\text{N}$  à  $m/e = 14$ .
- Les chaînes contenant des atomes de silicium (chaînes « siloxanes » et « silanes ») peuvent contribuer aux émissions :  $\text{CH}_2\text{OSi}$  à  $m/e = 58$ ,  $\text{CHOSi}$  à  $m/e = 57$ ,  $\text{COSi}$  ou  $\text{C}_2\text{H}_4\text{Si}$  à  $m/e = 56$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{Si}$  à  $m/e = 55$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2\text{Si}$  à  $m/e = 54$ ,  $\text{C}_2\text{HSi}$  à  $m/e = 53$ ,  $\text{C}_2\text{Si}$  à  $m/e = 52$ ,  $\text{SiO}$  à  $m/e = 44$  et  $\text{CH}_2\text{Si}$  à  $m/e = 42$ .
- Les chaînes « éthoxyle » se retrouvent aux émissions  $m/e = 45$  ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ ),  $m/e = 44$  ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ),  $m/e = 43$  ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ ) et  $m/e = 42$  ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ ). Concernant les petits fragments, les émissions de masses 16, 17 et 18 correspondent à la perte d'un atome d'oxygène libre  $^{16}\text{O}$  ( $m/e = 16$ ), d'un groupement hydroxyde  $^{16}\text{OH}$  ( $m/e = 17$ ) et à de l'eau  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  ( $m/e = 18$ ). L'émission de masse à  $m/e = 46$  est attribuée à la perte d'éthanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ). Cette émission ne correspond pas à aucun fragment des chaînes amine, siloxane ou silane. Elle sera discriminante pour l'identification de la chaîne éthoxyle.
- Les émissions de masses 2, 3, 12 à 15 et 24 à 27 correspondent aux chaînes alkyles quelle que soit leur origine (chaînes amines, silanes, éthoxyles,...). Les émissions de masses  $m/e = 12$  et  $m/e = 13$  sont liées aux carbone libre seul ( $^{12}\text{C}$ ) ou couplé avec un atome d'hydrogène ( $^{12}\text{CH}$ ). Les masses 14, 15, 24, 25, 26 et 27 correspondent respectivement au départ de groupes de type  $\text{CH}_2$  ( $m/e = 14$ ),  $\text{CH}_3$  ( $m/e = 15$ ),  $\text{C}_2$  ( $m/e = 24$ ),  $\text{C}_2\text{H}$  ( $m/e = 25$ ),  $\text{C}_2\text{H}_2$  ( $m/e = 26$ ) et  $\text{C}_2\text{H}_3$  ( $m/e = 27$ ).

Ce pic à 160°C correspond donc à la vaporisation de la molécule. Les zones 2 et 3 montrent également deux faibles bosses enregistrées à environ 250°C et à environ 480°C pour lesquelles les fragments suivants sont présents :  $m/e = 15, 25, 26, 27, 45, 52, 53$  (à 250°C) et  $m/e = 15, 26, 27, 44, 53, 54$  (à 480°C). Ces émissions correspondant à la perte de masse enregistrée en ATG entre 400°C et 500°C (Figure II-17-a) sont certainement dues à la décomposition de polymères formés lors d'une polymérisation partielle, *in situ* et/ou lors du stockage, (voir paragraphe I.3.2) de l'organosilane T. Ce point est appuyé par deux observations : d'une part la présence, sur le spectre FT-IR de la molécule, d'une bande de vibration attribuée à la liaison siloxane Si-O-Si et d'autre part à la présence des émissions de masse 2 à 46 en zone 1. Ces courbes présentent toutes un profil identique avec un maximum à 90°C. Elles peuvent être associées au départ d'éthanol, produit secondaire de la réaction de polymérisation, les émissions de masses 42 à 46 correspondant aux fragments suivants :  $C_2H_5OH$  ( $m/e = 46$ ),  $C_2H_5O$  ( $m/e = 45$ ),  $C_2H_4O$  ( $m/e = 44$ ),  $C_2H_3O$  ( $m/e = 43$ ) et  $C_2H_2O$  ( $m/e = 42$ ).

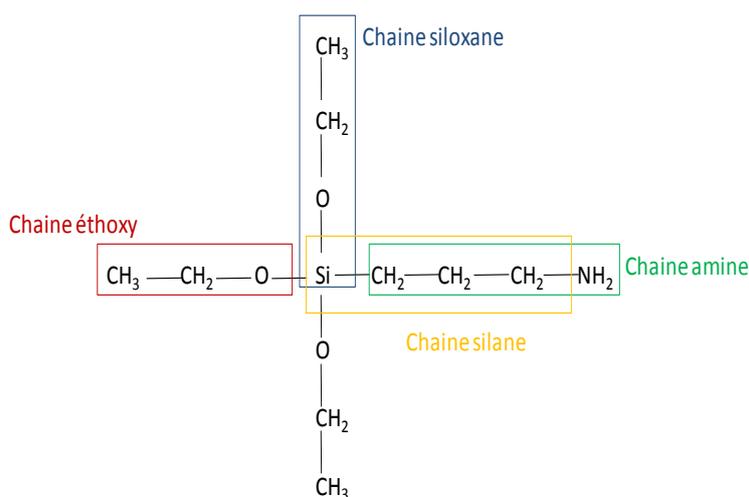


Figure II-21 : Représentation de la décomposition des chaînes organiques de l'organosilane T dans le spectromètre de masse

L'attribution des différentes émissions de masses pour les organosilanes D et M est analogue à celle de l'organosilane T.

L'organosilane D se vaporise à 137°C (zone 2), cette température correspondant à la majorité des pics et aux plus intenses d'entre eux (Figure II-19). Les émissions de masses caractéristiques de la décomposition de polymères issus d'une éventuelle polymérisation résiduelle *in situ* de la molécule semblent plats, néanmoins des pics correspondant aux émissions de masse  $m/e = 26, 53, 54$  et  $55$  sont discernables à 430°C. Ce point est en accord

avec le spectre FTIR (Figure II-16) qui montre une faible bande de vibration Si-O-Si caractéristique de la polymérisation de la molécule D et par la présence dans la zone 1 des émissions de masse correspondant à l'éthanol ( $m/e = 46$  pour l'éthanol et  $m/e = 43, 44$  et  $45$  pour les résidus éthoxyle  $C_2H_3O$ ,  $C_2H_4O$  et  $C_2H_5O$  et sous fragment à  $m/e = 25, 26$  pour les résidus alkyles  $C_2H$  et  $C_2H_2$ ).

L'organosilane M se volatilise à  $117^\circ C$  (zone 2), puis se décompose dans le spectromètre de masse (Figure II-20). La zone 2 présente une faible bosse enregistrée dans la descente à  $200^\circ C$  caractéristique de la volatilisation et de la décomposition de dimères issus de la polymérisation *in situ* de la molécule ( $m/e = 52$  à  $58$  correspondant aux chaînes « amines », « siloxanes » et silanes alors que  $m/e = 25$  et  $26$  correspondant aux chaînes alkyles). Cette polymérisation est confirmée par la présence dans la zone 1 de pics caractéristiques de l'évaporation de l'éthanol ( $m/e = 46$  pour l'éthanol et  $m/e = 43, 44$  et  $45$  pour les résidus éthoxyle  $C_2H_3O$ ,  $C_2H_4O$  et  $C_2H_5O$  et sous fragment à  $m/e = 25, 26$  pour les résidus alkyles  $C_2H$  et  $C_2H_2$ ).

Pour résumer, quelle que soit la fonctionnalité, les trois organosilanes (T, D et M) se volatilisent à des températures inférieures à  $250^\circ C$ . Après la volatilisation, la molécule est conduite vers le spectromètre de masse où elle se décompose en fragments organiques. Des fragments peuvent être détectés au-delà des températures d'évaporation des organosilanes. Ils sont liés à l'évaporation de polymères résultants d'une réaction de polymérisation résiduelle *in situ* de l'organosilane. Cela est confirmé pour tous les organosilanes par la présence dans la zone 1 de pics attribués à l'évaporation d'éthanol ( $m/e = 46$ ) produit secondaire des réactions de polymérisation des organosilanes.

Tableau II-12 : Principaux fragments organiques et émissions des masses correspondantes

Nature des chaînes	Formule des fragments	m/e détectés sur les spectres
<b>Chaînes "amine"</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> N, C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N, C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N, C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N, C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N, C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> N, C <sub>3</sub> HN, C <sub>3</sub> N	58 à 50
	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N, C <sub>2</sub> HN, C <sub>2</sub> N	44 à 38
	CH <sub>4</sub> N, CH <sub>3</sub> N, CH <sub>2</sub> N, CHN, CN	30 à 26
	NH <sub>3</sub> , NH <sub>2</sub> , NH	17, 16, 15
	N <sub>2</sub> , N	28, 14
<b>Chaînes "éthoxy"</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> HO, C <sub>2</sub> O	45 à 40
	CH <sub>4</sub> O, CH <sub>3</sub> O, CH <sub>2</sub> O, CHO	32 à 29
	CO	28
<b>Chaînes "siloxane"</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OSi, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> OSi, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> OSi, C <sub>2</sub> HOSi, C <sub>2</sub> OSi	72 à 68
	CH <sub>2</sub> OSi, CHOSi, COSi	58 à 56
	SiO	44
<b>Chaînes "silane"</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> Si, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> Si, C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Si, C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> Si, C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> Si, C <sub>3</sub> HSi, C <sub>3</sub> Si	70 à 64
	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Si, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Si, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Si, C <sub>2</sub> HSi, C <sub>2</sub> Si	56 à 52
	CH <sub>2</sub> Si, CHSi, CSi	42 à 40
<b>Chaînes "alkyle"</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> , C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> , C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> , C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> , C <sub>3</sub> H, C <sub>3</sub>	42 à 36
	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> H, C <sub>2</sub>	28 à 24
	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH, C	15 à 12
<b>Dioxyde de carbone</b>	<sup>12</sup> CO <sub>2</sub> , <sup>13</sup> CO <sub>2</sub>	44, 45
<b>Eau</b>	H <sub>2</sub> O, HO, O	18, 17, 16
<b>Hydrogène</b>	H	1

## II.5. Conclusion

Des poudres d'hydroxyapatite et d'hydroxyapatite silicatées ont été synthétisées par précipitation en voie aqueuse. Les analyses effectuées ont montré que les poudres synthétisées sont pures et monophasées. Concernant la poudre de SiHA, la présence des groupements silicate a été mise en évidence par spectroscopie FT-IR. Les affinements Rietveld ont montré une augmentation du paramètre de maille  $c$  et du volume de maille  $V$  traduisant l'incorporation de ces groupements dans la structure apatite. Le taux molaire de silicium de la poudre de SiHA est de  $x = 0,45$  (1,27 %m Si). Les formules chimiques des poudres d'HA et de SiHA synthétisées sont donc  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,55}(\text{SiO}_4)_{0,45}(\text{OH})_{1,55}$ .

Deux types de substrats ont été élaborés : des poudres obtenues par calcination à 1000°C durant 1 h des poudres brutes de synthèse et des pastilles denses obtenues par frittage à 1200°C durant 30 min. Les poudres calcinées sont monophasées et pures et présentent des valeurs de potentiel zêta comparables ( $p\zeta_{\text{HA}} = -27,2 \pm 1,7$  mV et  $p\zeta_{\text{SiHA}} = -30,0 \pm 1,5$  mV). Les images MEB ont mis en évidence la structure nano bâtonnet des poudres (diamètre moyen estimé  $\varphi_{\text{moy HA}} = 0,3$   $\mu\text{m}$ ,  $\varphi_{\text{moy SiHA}} = 0,1$   $\mu\text{m}$ ). Les deux compositions présentent des répartitions granulométriques similaires, néanmoins la poudre d'HA présente plus d'agrégats que celle de SiHA. La seule différence réellement notable entre les deux compositions est la surface spécifique :  $\text{SSA}_{\text{HA}} = 7,0 \pm 0,2$   $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  et  $\text{SSA}_{\text{SiHA}} = 16,1 \pm 0,2$   $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Les pastilles frittées sont monophasées, pures et denses ( $\tau_{\text{HA}} = 98\%$  et  $\tau_{\text{SiHA}} = 95\%$ ). Les images MEB montrent que les pastilles de SiHA présentent des grains légèrement plus petits que les pastilles de HA.

Les organosilanes (T, D et M) employés pour le greffage de la surface des substrats sont des molécules organiques ayant des fonctionnalités différentes (*i.e.* nombre de groupements hydrolysables). L'étude bibliographique de leurs propriétés biologiques a montré l'absence d'effet toxique *in vivo* et *in vitro* pour l'organosilane trifonctionnel (T) sous sa forme libre. En revanche, bien qu'ils soient utilisés dans des applications à visées biologiques, la biocompatibilité des organosilanes difonctionnel (D) et monofonctionnel (M) n'est pas vérifiée dans la littérature.

Les trois organosilanes ont été caractérisés par spectroscopie FT-IR et par analyse thermique. Les modes de vibration des différentes fonctions de ces molécules ont été identifiés. L'étude thermique a mis en évidence la faible stabilité thermique des organosilanes libres, les molécules sont volatilisées à 160, 137 et 117°C (maximum des pics) dans les conditions d'analyses employées.



# **Chapitre III - Etude du greffage des organosilanes à la surface des substrats**

Dans ce chapitre, le protocole expérimental mis en place au laboratoire afin de greffer les 3 organosilanes retenus (APTES (T), APMDES (D) et APDMES (M)) à la surface des substrats d'HA et de SiHA est présenté. Les résultats obtenus sur l'étude de la nature et du mode de greffage des organosilanes à la surface des substrats, l'influence de leur fonctionnalité et de l'incorporation du silicium dans la structure apatitique sur la quantité et le mode du greffage sont ensuite discutés.

Certaines techniques de caractérisation nécessitent des échantillons pulvérulents et d'autres des échantillons massifs (pastilles). De ce fait, les organosilanes sont greffés sur ces deux types de substrats afin de pouvoir utiliser des techniques complémentaires. Il a été montré au cours du deuxième chapitre que les poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1h sont pures et monophasées, ces poudres vont donc servir de substrats. Le greffage sera également effectué sur des pastilles denses d'HA et de SiHA frittées à 1200°C/30 min.

## **III.1. Protocole de greffage**

Le protocole expérimental de greffage est établi en tenant compte des études effectuées dans la littérature sur l'influence des différents paramètres réactionnels sur la silanisation de surface. L'emploi de toluène anhydre comme solvant permet de s'affranchir de l'influence du pH et de la présence d'eau dans le milieu réactionnel ce qui permet de limiter les réactions d'homocondensation et ainsi favoriser les réactions d'hétérocondensation à la surface des substrats [126-128]. La réaction de silanisation sera effectuée sous argon et en utilisant la technique de Schlenk qui permet d'avoir un milieu totalement anhydre afin de limiter l'influence de l'humidité sur le greffage.

Comme présenté dans la partie bibliographique, la gamme de température utilisée va de la température ambiante jusqu'à 120°C. Toutefois, il semble qu'à température élevée

( $T > 60^{\circ}\text{C}$ ), la réaction de silanisation entre les sites OH de la surface et les groupements hydrolysables des organosilanes soit favorisée [195]. De même, les temps de silanisation rencontrés dans la littérature sont variables de quelques minutes jusqu'à 48 heures (Tableau I-1 et Tableau I-4). Sur cette base, un chauffage à reflux pendant 3 h à  $90^{\circ}\text{C}$  sera appliqué dans le protocole de silanisation suivi d'une étape de 12 h à  $60^{\circ}\text{C}$  (Figure III-1).

La concentration d'organosilanes dans le milieu réactionnel est fixée à 0,2 mol/L. Cette valeur de concentration correspond à un excès de molécules d'organosilanes par rapport au nombre de moles de sites de greffage disponibles sur les substrats dans les conditions expérimentales choisies (voir paragraphe III.1.2.).

### **III.1.1. Mode opératoire**

Le protocole expérimental mis en place pour greffer la surface des poudres d'HA et de SiHA se découpe en plusieurs étapes qui sont présentées à la Figure III-1-a. Tout d'abord,  $1,00 \pm 0,01$  g de poudre d'HA ou de SiHA est séché à  $110^{\circ}\text{C}$  pendant 3 heures dans une étuve afin d'éliminer les molécules d'eau adsorbées à la surface. La poudre est ensuite introduite dans un ballon de Schlenk de 100 mL, et  $20 \pm 1$  mL de toluène anhydre (Sigma Aldrich, pureté : 99,8%) sont ajoutés au moyen d'une seringue en verre. Le ballon de Schlenk est ensuite relié à une rampe vide-argon afin de travailler dans des conditions anhydres. La rampe est composée de deux entrées et plusieurs ports, la première entrée de la rampe est connectée à une source de gaz d'argon inerte (ALPHAGAZ 1 Argon, pureté globale = 99,999%), tandis que l'autre est reliée à une pompe à vide secondaire (ALCATEL 2004A) permettant de retirer l'air de l'intérieur du ballon. Le ballon contenant la suspension de poudre est passé pendant 15 minutes dans une cuve à ultrasons afin de disperser la poudre dans le solvant. Puis il est porté à  $60^{\circ}\text{C}$  dans un bain d'huile thermostaté, sous agitation magnétique pour préserver une bonne homogénéité du mélange et sous atmosphère inerte (Ar) assurée par la rampe. 0,0042 mol soit un volume de 1 mL d'APTES, 0,9 mL d'APMDES ou 0,8 mL d'APDMES sont ajoutés goutte à goutte au mélange en utilisant une seringue en verre (concentration =  $0,20 \pm 0,06$  mol/L). Le mélange est ensuite chauffé à reflux 3 heures à  $90^{\circ}\text{C}$  puis 12 heures à  $60^{\circ}\text{C}$ . Le mélange est ensuite passé 15 minutes dans une cuve à ultrasons afin d'empêcher la formation d'agglomérats et de finir la réaction de silanisation. Le rinçage des poudres greffées est effectué par centrifugation (HERMLE Z383) à 2500 r.p.m en utilisant le toluène anhydre (deux lavages) puis l'éthanol technique non dénaturé (un lavage). Le dernier rinçage des substrats greffés est effectué avec de l'éthanol technique car ce solvant se volatilise à basse

température ( $T = 70^{\circ}\text{C}$ ) ce qui permet d'éliminer facilement les molécules de solvant adsorbées à la surface des substrats greffés lors du séchage ultérieur. Le séchage des poudres greffées est réalisé dans une étuve à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 12 h puis sous vide durant 3 heures. Les échantillons greffés sont protégés de l'humidité dans un dessiccateur contenant une quantité suffisante de gel de silice.

Le protocole de greffage des pastilles (Figure III-1-b) est similaire à celui des poudres. Les différences entre les deux protocoles sont : l'étape de désagglomération des poudres qui n'est pas nécessaire et le rinçage des pastilles greffées qui est effectué dans une cuve à ultrasons et non par centrifugation.

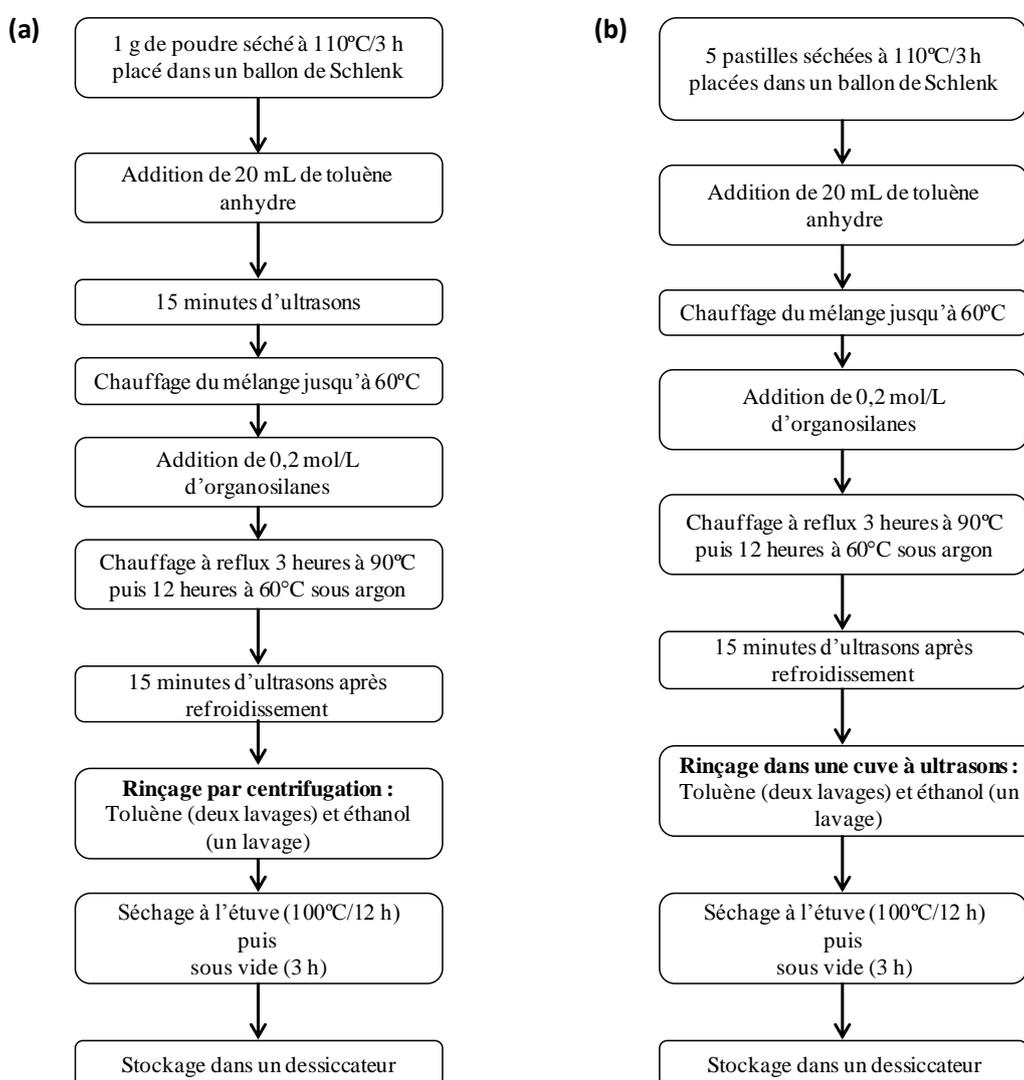


Figure III-1 : Organigrammes des protocoles de greffage (a) des poudres et (b) des pastilles d'HA et de SiHA

### III.1.2. Evaluation du taux de recouvrement des sites

Le taux de recouvrement ( $\tau_R$  en %) est le nombre de molécules d'organosilanes en solution divisé par le nombre de sites de surface du matériau. Le nombre de sites X-OH de surface ( $n_{X-OH}$ ) calculé selon l'Expression III-1, permet de connaître le nombre de sites théoriques accessibles au greffage des organosilanes. La détermination du taux de recouvrement des sites ( $\tau_R$  en %) a été conduite dans l'hypothèse où tous les sites P-OH existants à la surface de l'HA ou les sites P-OH et Si-OH de la SiHA pourraient fixer les organosilanes. Chaque site de greffage a donc la capacité de recevoir au maximum une molécule d'organosilane. L'évaluation du taux de recouvrement des sites ( $\tau_R$  en %) permet de vérifier si les organosilanes sont en excès dans le milieu réactionnel. Ce taux est déterminé selon l'Expression III-2 [179] où  $n_{OAS}$  représente le nombre de moles d'organosilanes en solution, il est de l'ordre de  $4,2 \times 10^{-3}$  mol, et  $n_{X-OH}$  est le nombre de sites X-OH (X = P, Si) accessibles au greffage à la surface des poudres d'HA et de SiHA. La densité de sites de greffage  $d_{X-OH}$  est définie dans le chapitre II par l'Expression II-6. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau III-1.

$$(a) \quad S_p = m_p \times SSA \quad (b) \quad n_{X-OH} = S_p \times d_{X-OH}$$

**Expression III-1 : Détails du calcul du nombre de moles de sites X-OH. (a) Calcul de la surface développée par les substrats ( $S_p$  en  $m^2$ ) à partir de la masse du substrat ( $m_p$  en g) et sa surface spécifique (SSA en  $m^2 \cdot g^{-1}$ ). (b) Calcul du nombre de moles de sites de surface  $n_{X-OH}$  accessibles à partir de la surface développée par les poudres ( $S_p$  en  $m^2$ ) et la densité de sites X-OH ( $d_{X-OH}$  en  $mol \cdot m^{-2}$ )**

$$\tau_R = \frac{n_{OAS}}{n_{X-OH}}$$

**Expression III-2 : Calcul du taux de recouvrement des sites de surface par les organosilanes**

**Tableau III-1 : Différents paramètres calculés pour les substrats d'HA et de SiHA**

Echantillon	$m_p$ (g)	SSA ( $m^2 \cdot g^{-1}$ )	$S_p$ ( $m^2$ )	$n_{OAS}$	$n_{X-OH}$ (mol)	$\tau_R$ (%)
HA poudre	$1,00 \pm 0,01$	$7,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,3$	$4,20 \times 10^{-3}$	$3,80 \times 10^{-6}$	1105
SiHA poudre	$1,00 \pm 0,01$	$16,1 \pm 0,2$	$16,1 \pm 0,4$	$4,20 \times 10^{-3}$	$8,60 \times 10^{-6}$	488
HA pastille	$0,30 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	$4,20 \times 10^{-3}$	$8,04 \times 10^{-8}$	52239
SiHA pastille	$0,30 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$	$4,20 \times 10^{-3}$	$8,04 \times 10^{-8}$	52239

La surface développée par la poudre de SiHA est environ le double de celle de HA. La présence du silicium dans la structure apatite permet d'augmenter le nombre de mole des sites accessibles au greffage de  $3,80 \times 10^{-6}$  mol pour HA à  $8,60 \times 10^{-6}$  mol pour SiHA. A masse égale,

une poudre en SiHA présentera donc environ deux fois plus de sites greffables qu'une poudre en HA. De ce fait, le taux de recouvrement de sites ( $\tau_R$  en %) de la surface des poudres d'HA est quasiment le double de celui de SiHA. Les pastilles d'HA et de SiHA possèdent quant à elles des surfaces spécifiques similaires. Donc, le nombre de mole de sites accessibles au greffage ne varie pas d'une composition à l'autre de l'ordre de  $8,04 \times 10^{-8}$  mol.

Les valeurs relativement importantes obtenues pour le  $\tau_R$  pour HA (1105%) et SiHA (488%) montrent que les organosilanes sont en large excès dans la solution par rapport au nombre de sites de greffage ( $n_{X-OH}$ ). Le taux de recouvrement des pastilles d'HA et de SiHA (52239%) est plus important que celui des poudres et les organosilanes sont en très large excès par rapport au nombre de sites de greffage ( $n_{X-OH}$ ).

## **III.2. Mode de greffage et quantification**

La mise en évidence de la présence des organosilanes à la surface des substrats en HA et en SiHA, ainsi que l'étude de leur mode de greffage et l'estimation de leurs quantités greffées par différentes techniques expérimentales sont présentées ci-dessous.

Dans la suite de ce travail, la nomenclature suivante sera employée :

- HA : les poudres d'HA calcinées à 1000°C/1 h,
- HA-Réf : les poudres d'HA de référence qui sont traitées avec le protocole de greffage mais sans addition de l'organosilane,
- HA-T : HA greffée avec l'organosilane trifonctionnel (APTES),
- HA-D : HA greffée avec l'organosilane difonctionnel (APMDES),
- HA-M : HA greffée avec l'organosilane monofonctionnel (APDMES),
  
- SiHA : les poudres de SiHA calcinées à 1000°C/1 h,
- SiHA-Réf : les poudres de SiHA de référence qui sont traitées avec le protocole de greffage mais sans addition de l'organosilane,
- SiHA-T : SiHA greffée avec l'organosilane trifonctionnel (APTES),
- SiHA-D : SiHA greffée avec l'organosilane difonctionnel (APMDES),
- SiHA-M : SiHA greffée avec l'organosilane monofonctionnel (APDMES).

### III.2.1. Morphologie des poudres après greffage

La morphologie des poudres d'HA et de SiHA (*i.e.* calcinées à 1000°C durant 1 h), de référence (HA-Réf, SiHA-Réf) et de celles greffées avec l'organosilane trifonctionnel (HA-T, SiHA-T) sont observées par MEB. Les clichés obtenus sont présentés sur la Figure III-2. Le Tableau III-2 regroupe les mesures de surface spécifique des poudres non greffées et greffées avec l'organosilane trifonctionnel.

Les images MEB montrent que les poudres restent inertes vis-à-vis du solvant organique (toluène) utilisé pour le greffage. Par rapport aux poudres avant greffage (Figure III-2-a et b), aucune différence significative de morphologie n'est à noter pour les poudres de référence (Figure III-2-c et d) et greffées (Figure III-2-e et f). Elles présentent des agglomérats dont la taille se situe autour de quelques micromètres, ces derniers étant constitués de grains nanométriques. Pour les poudres HA-T et SiHA-T, aucune évolution de la surface spécifique est notée (Tableau III-2). Les surfaces spécifiques sont identiques à celles des poudres non greffées. Le greffage ne modifie pas la morphologie des poudres ni leur surface spécifique.

**Tableau III-2 : Surfaces spécifiques (SSA) des poudres non greffées (HA, SiHA) et des poudres greffées avec l'organosilane trifonctionnel (HA-T, SiHA-T)**

Echantillons	HA	HA-T	SiHA	SiHA-T
SSA (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	7,1 ± 0,2	7,2 ± 0,2	16,1 ± 0,2	16,1 ± 0,2

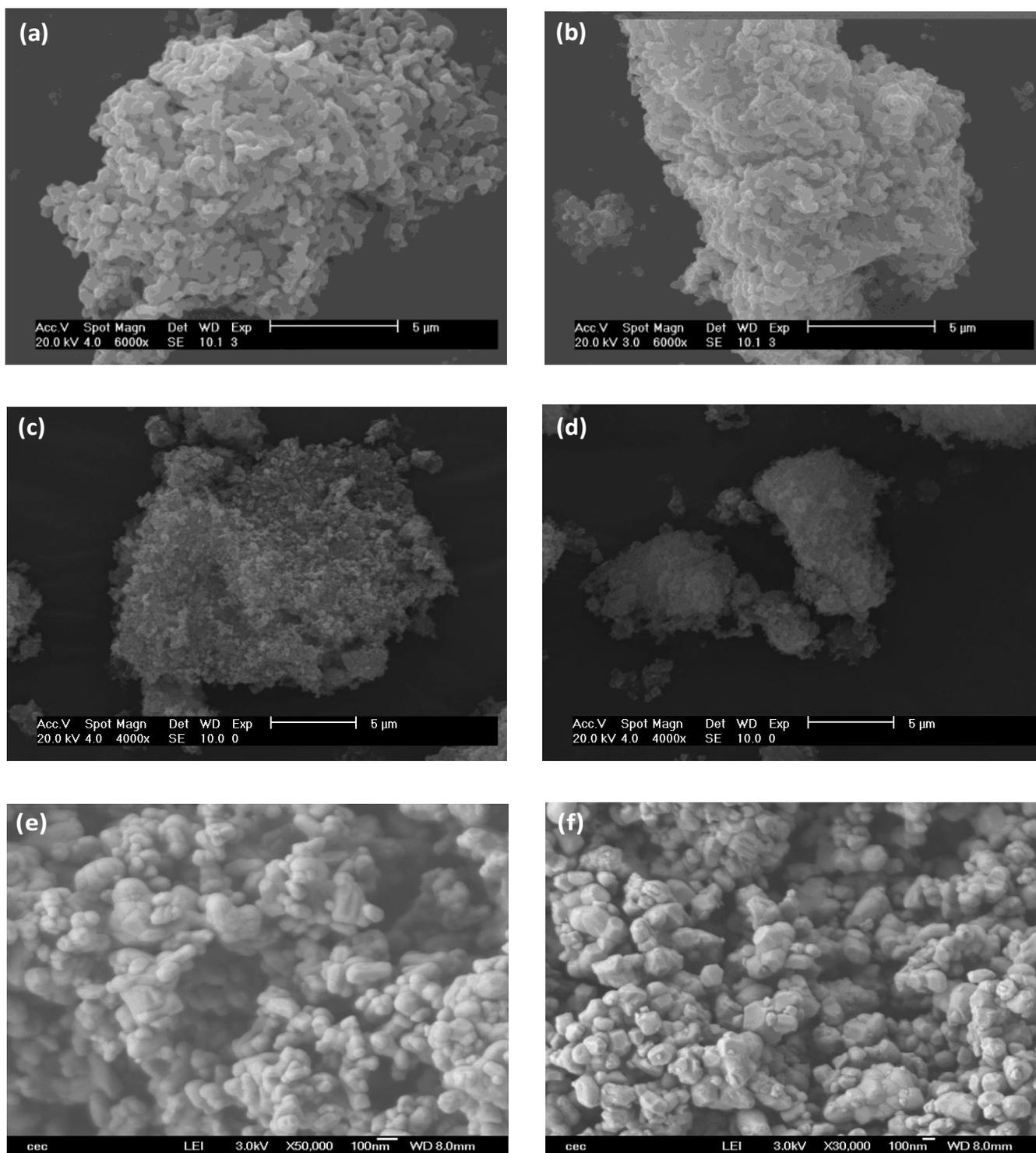


Figure III-2 : Clichés MEB des poudres (a) HA, (b) SiHA, (c) HA-Réf, (d) SiHA-Réf, (e) HA-T et (f) SiHA-T

## III.2.2. Mise en évidence de la présence des organosilanes

### III.2.2.1. Analyse par spectroscopie infrarouge

Les spectres FT-IR des poudres d'HA et de SiHA greffées avec les organosilanes sont représentés Figure III-3 et Figure III-4. Afin de détecter les bandes caractéristiques des organosilanes et compte tenu de la faible sensibilité de la technique, les pastilles de KBr ont été concentrées (*voir paragraphe II.2.1.1*).

Les spectres FT-IR d'HA-M, HA-D et HA-T (Figure III-3) présentent les modes de vibration typiques des groupements phosphates ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  et  $\nu_4$ ) ainsi que deux bandes caractéristiques du mode vibrationnel de la liaison O-H ( $\nu_s$  et  $\nu_L$ ) [1] (*voir paragraphe II.3.1.3*). La seule différence remarquée entre ces spectres et celui de la poudre d'HA est la présence de trois bandes d'absorption de faibles intensités à 2973, 2928 et 2887  $\text{cm}^{-1}$  qui correspondent respectivement aux bandes de vibrations  $\nu_s\text{CH}_2(\text{NH}_2)$  [190],  $\nu_{as}\text{CH}_2$  [189] et  $\nu_s\text{CH}_3 / \nu_s\text{CH}_2$  [189-194] (élongations de CH aliphatiques) des molécules T, D et M (*voir paragraphe II.4.2.1*). Les organosilanes T, D et M sont donc présents à la surface des poudres d'HA. Les autres bandes caractéristiques des organosilanes (T, D et M) ne peuvent pas être observées car elles sont masquées par les bandes phosphates de la structure apatite qui sont très intenses.

De la même façon, les poudres de SiHA greffées avec les organosilanes T, D et M présentent les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate de l'hydroxyapatite silicatée (Figure III-4). Les groupements silicates ( $\text{SiO}_4^{4-}$ ), très peu visibles, ne sont caractérisés que par une bande de faible intensité à 890  $\text{cm}^{-1}$  attribuée à la liaison Si-O dans la structure tétraédrique  $\text{SiO}_4$ . Les trois bandes d'absorption de faibles intensités à 2973, 2928 et 2887  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques de bandes de vibrations  $\nu_s\text{CH}_2(\text{NH}_2)$  [190],  $\nu_{as}\text{CH}_2$  [189] et  $\nu_s\text{CH}_3 / \nu_s\text{CH}_2$  [189-194] sont détectées sur les spectres mettant également en évidence la présence des organosilanes T, D et M à la surface des poudres de SiHA.

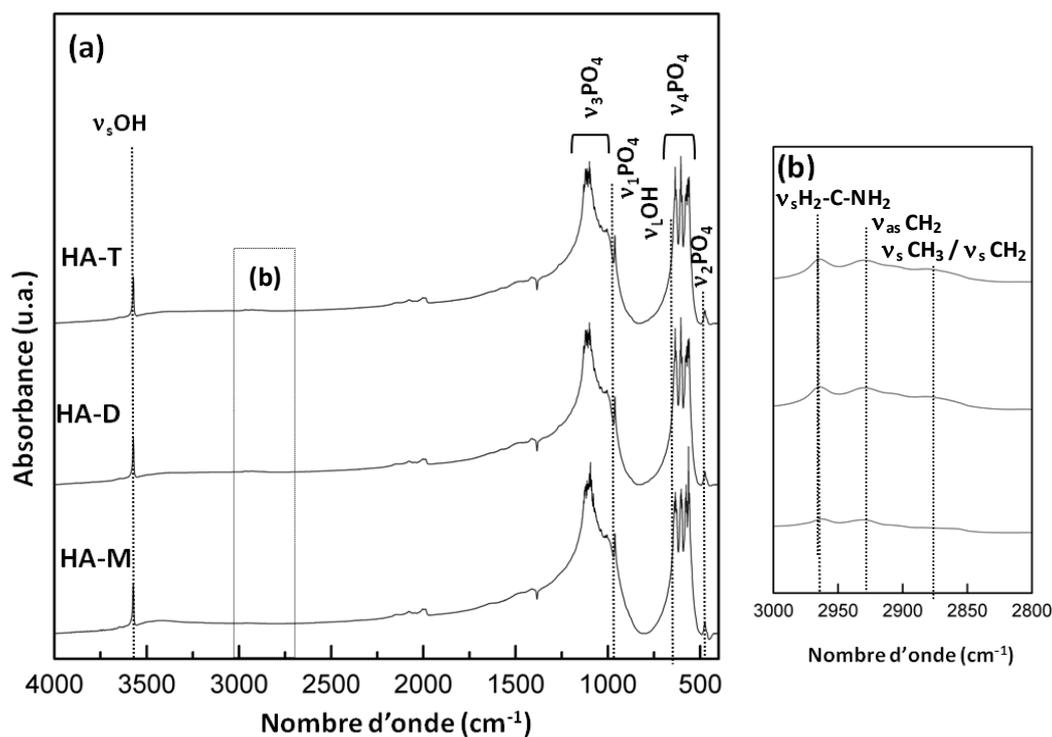


Figure III-3 : Spectres FT-IR des poudres HA-M, HA-D et HA-T dans les intervalles (a) 4000-400 cm<sup>-1</sup> et (b) 3000-2800 cm<sup>-1</sup>

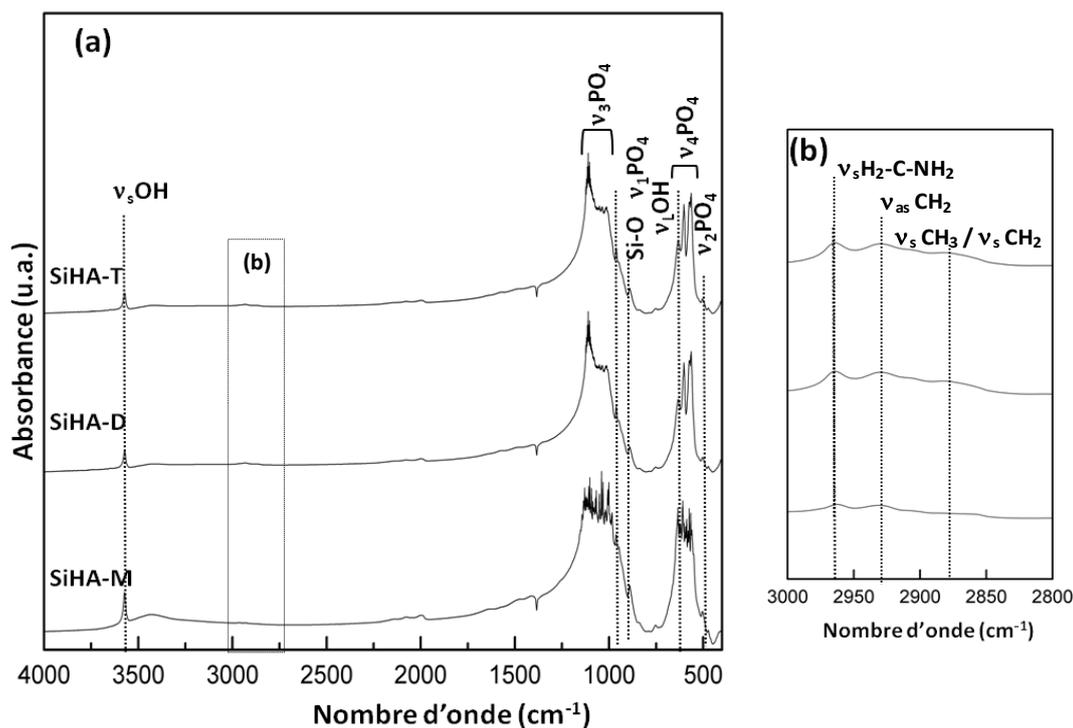


Figure III-4 : Spectres FT-IR des poudres SiHA-M, SiHA-D et SiHA-T dans les intervalles (a) 4000-400 cm<sup>-1</sup> et (b) 3000-2800 cm<sup>-1</sup>

Tableau III-3 : Rapports d'aire vsCH<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)/vsOH pour les poudres d'HA et de SiHA greffées

Echantillon	HA-M	HA-D	HA-T	SiHA-M	SiHA-D	SiHA-T
ν <sub>s</sub> CH <sub>2</sub> (NH <sub>2</sub> )/ν <sub>s</sub> OH	0,005	0,01	0,01	0,01	0,14	0,14

Pour un même substrat, l'intensité de la bande d'absorption à  $2973\text{ cm}^{-1}$  semble augmenter avec la fonctionnalité de l'organosilane (Figure III-3-b, Figure III-4-b). Afin de valider cette hypothèse, le rapport d'aire  $\nu_s\text{CH}_2(\text{NH}_2)/\nu_s\text{OH}$  a été calculé à l'aide du logiciel Origin 8<sup>®</sup>. Les valeurs obtenues sont récapitulées dans le Tableau III-3. Pour les deux compositions, le rapport  $\nu_s\text{CH}_2(\text{NH}_2)/\nu_s\text{OH}$  augmente en passant de l'organosilane M à l'organosilane D puis reste constant avec l'organosilane T. L'APDMES monofonctionnel semble conduire à un greffage beaucoup plus faible que les deux autres organosilanes.

### **III.2.2.2. Analyse des poudres par spectroscopie de photoélectrons X**

#### **a. Poudres non greffées**

La Figure III-5 présente les spectres larges acquis par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) à la surface des poudres d'HA et de SiHA calcinées. Quelle que soit la composition, les pics caractéristiques des éléments oxygène (O 1s), phosphore (P 2s et P 2p), calcium (Ca 2s, Ca 2p, Ca 3s et Ca 3p), et silicium (Si 2s et Si 2p) pour SiHA, apparaissent. Les deux pics observés autour de 555 eV sont assignés aux plasmons de l'atome d'oxygène. Les pics caractéristiques des éléments Ca, P, O, C et Si ont fait l'objet d'une étude de décomposition (acquisition haute résolution). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III-6.

Les énergies de liaisons (eV) sont récapitulées dans le Tableau III-4. Afin de vérifier la reproductibilité des analyses, chaque échantillon est caractérisé trois fois. Ce tableau résume l'ensemble des résultats obtenus sur poudres calcinées et calcinées puis greffées, des éléments chimiques détectés à la surface des échantillons et énergies de liaisons correspondantes.

Pour chaque liaison d'un atome donné (Ca, P, O...), tous échantillons confondus, la moyenne de l'énergie de liaison a été calculée. Les faibles valeurs des écarts types (0,1 à 0,2 eV) montrent que les énergies de liaisons sont identiques d'un échantillon à l'autre.

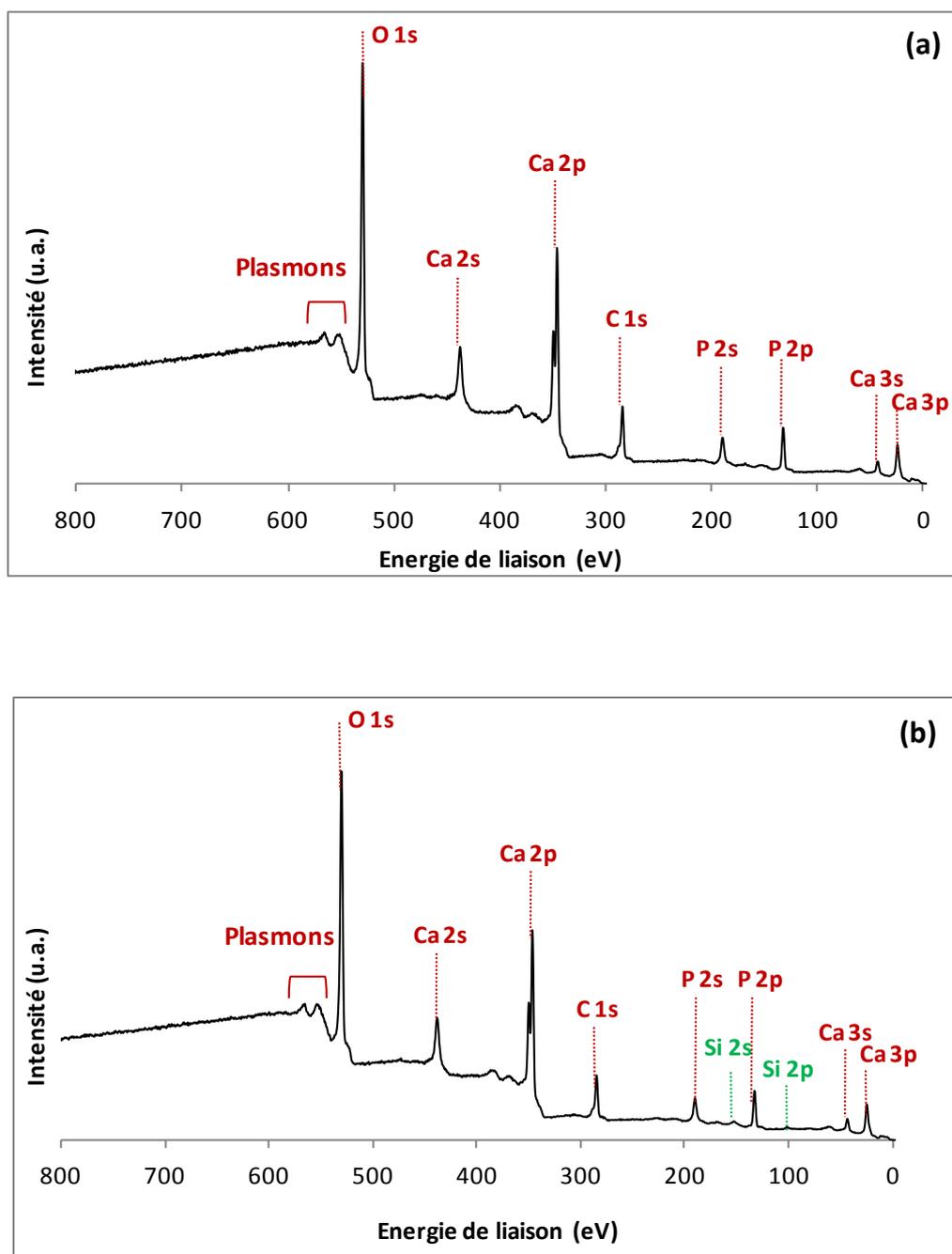


Figure III-5 : Spectres XPS larges des poudres (a) d'HA et (b) de SiHA non greffées

Pour les poudres calcinées, les différentes contributions caractéristiques des éléments chimiques sont :

- Le pic C 1s qui présente trois contributions observées à des énergies de liaisons différentes. La première à 285,0 eV est la référence, elle est due à des liaisons de type C-C et C-H [196, 197]. La deuxième contribution à  $286,5 \pm 0,1$  eV est associée aux liaisons de type C-O ou C-N [197]. La dernière contribution de C 1s à  $288,9 \pm 0,1$  eV est attribuée aux liaisons de type C(=O)O [196, 198]. La présence de carbone est due à des impuretés présentes à la surface des échantillons.
- Le pic Ca 2p qui présente deux contributions. La première, centrée autour de  $347,0 \pm 0,1$  eV est due aux photoélectrons Ca 2p<sub>3/2</sub> et la seconde, positionnée autour de  $350,5 \pm 0,1$  eV aux photoélectrons Ca 2p<sub>1/2</sub> [199].
- Le pic P 2p qui est également formé de deux contributions. La contribution à  $132,8 \pm 0,2$  eV correspond aux photoélectrons P 2p<sub>3/2</sub> [200]. L'autre contribution centrée à  $133,8 \pm 0,1$  eV est attribuée aux photoélectrons P 2p<sub>1/2</sub> [124].
- Le pic Si 2p qui est présent uniquement dans le cas de SiHA est formé à partir d'une seule contribution à  $102,2 \pm 0,2$  eV. Dans la littérature, ce pic est associé aux liaisons O-Si-O dans la silice [162, 197, 200-203]. Par analogie, il peut être attribué aux liaisons O-Si-O des tétraèdres SiO<sub>4</sub> de l'apatite.
- Le pic O 1s qui possède trois contributions. Le pic à  $530,8 \pm 0,2$  eV, correspond sans ambiguïté aux liaisons P-O [162, 204]. La contribution à  $532,2 \pm 0,1$  eV est associée aux liaisons de type O-H (HA et SiHA) et O-Si (SiHA) [162]. Dans le cas de l'HA, il n'y a pas de liaisons O-Si, le silicium n'étant pas dans sa structure chimique, donc la contribution vient uniquement des fonctions O-H présentes en surface. La dernière contribution à  $533,4 \pm 0,1$  eV est attribuée aux molécules d'eau adsorbées à la surface des échantillons [205, 206].

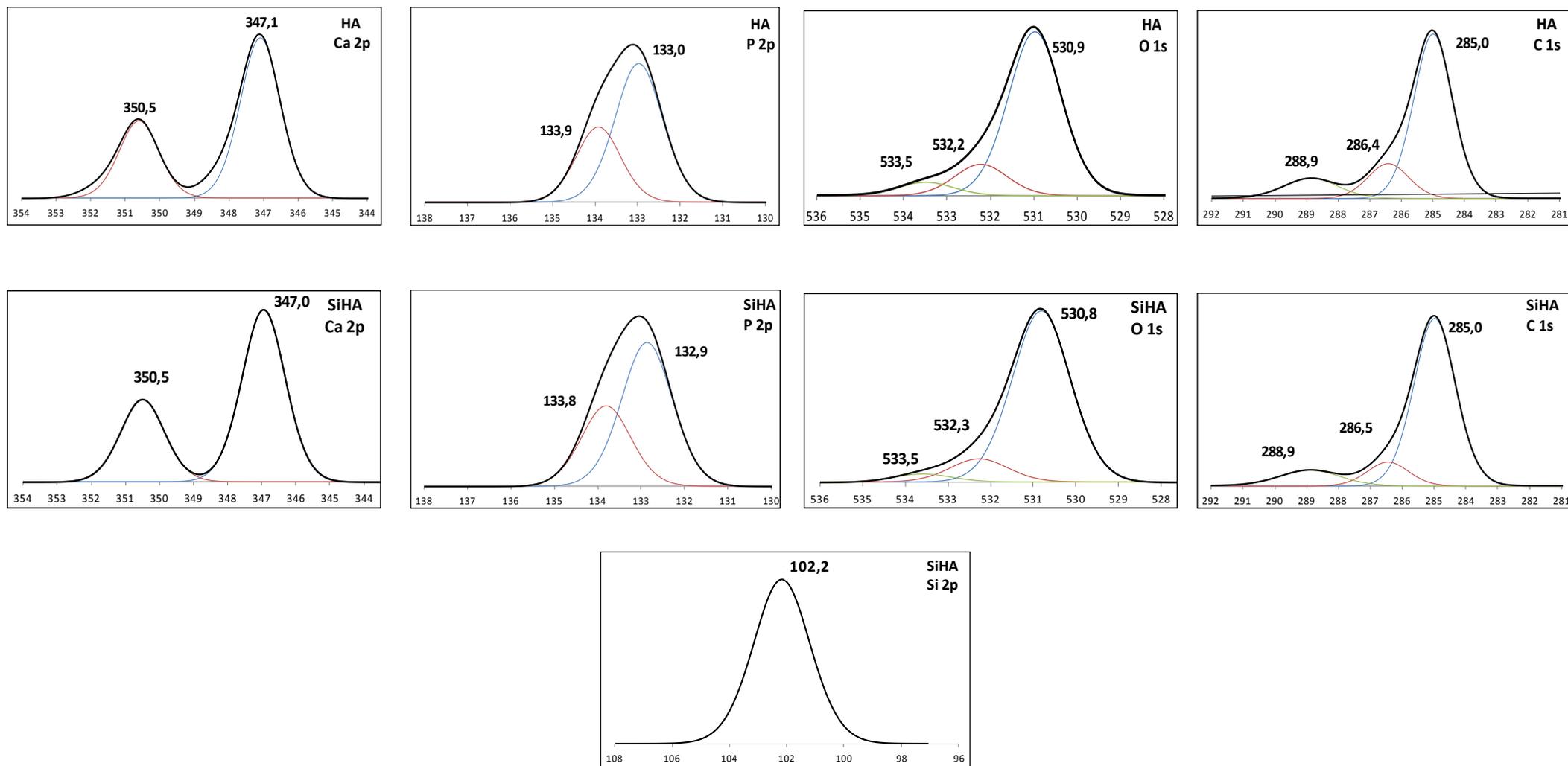


Figure III-6 : Décomposition des pics XPS Ca 2p, P 2p, O 1s, C 1s et Si 2p des poudres d'HA et de SiHA non greffées

Echelle : abscisse = énergie de liaison en eV, ordonnée = intensité en (u.a.)

Tableau III-4 : Energies des liaisons (eV) des éléments chimiques (Ca, P, O, C, Si, N) détectés à la surface des poudres d'HA et de SiHA avant et après greffage

Echantillon	Ca 2p		P 2p		O 1s			C 1s			Si 2p	N 1s	
	2p <sub>3/2</sub> [199]	2p <sub>1/2</sub> [199]	2p <sub>3/2</sub> [200]	2p <sub>1/2</sub> [124]	O-P [162, 204]	O-H/O-Si [162]	H <sub>2</sub> O [205, 206]	C-C/C-H [196, 197]	C-O/C-N [197]	COO [196, 198]	C-Si-O/ O-Si-O [197, 201]	NH <sub>2</sub> [194, 197]	N <sup>+</sup> [194, 197, 205]
<b>HA</b>	347,1	350,5	133,0	133,9	530,9	532,2	533,5	285,0	286,4	288,9	-	-	-
<b>SiHA</b>	347,0	350,5	132,9	133,8	530,8	532,3	533,5	285,0	286,5	288,9	102,2	-	-
<b>HA-T</b>	346,8	350,3	132,6	133,7	530,7	532,1	533,3	285,0	286,5	288,8	102,6	399,5	401,5
<b>HA-D</b>	346,9	350,5	132,6	133,6	530,9	532,1	533,5	285,0	286,2	289,3	102,2	399,6	401,5
<b>HA-M</b>	347,2	350,7	133,0	133,9	531,0	532,4	533,6	285,0	286,7	289,1	101,8	Trace	Trace
<b>SiHA-T</b>	346,8	350,4	132,7	133,8	530,5	531,9	533,2	285,0	286,5	288,9	102,6*	399,2	401,1
<b>SiHA-D</b>	346,8	350,3	132,6	133,5	530,7	532,0	533,6	285,0	286,4	288,8	102,6*	399,6	401,6
<b>SiHA-M</b>	347,0	350,6	132,9	133,8	531,0	532,4	533,6	285,0	286,3	289,1	101,8*	Trace	Trace
<b>Moyenne</b>	347,0	350,5	132,8	133,8	530,8	532,2	533,4	285,0	286,5	288,9	102,2	399,5	401,4
<b>Ecart type</b>	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2

\* Contribution principale

## b. Poudres greffées

La Figure III-7 montre le spectre XPS large d'une poudre d'HA greffée avec l'organosilane trifonctionnel (HA-T). Ce spectre est représentatif de tous les spectres larges obtenus avec des poudres greffées. Il indique la présence de tous les pics caractéristiques des phosphates de calcium (Ca, P et O). Pour tous les échantillons (HA-T, HA-D et HA-M) des pics additionnels attribués aux éléments azote (N 1s) et silicium (Si 2s et Si 2p) sont détectés. Ces pics témoignent de la présence des organosilanes à la surface des poudres d'HA.

Pour la composition SiHA, le silicium est déjà présent dans la structure. De ce fait, il ne permet pas de confirmer la présence des organosilanes à la surface des poudres, mais la détection de l'azote (N 1s) confirme leur présence.

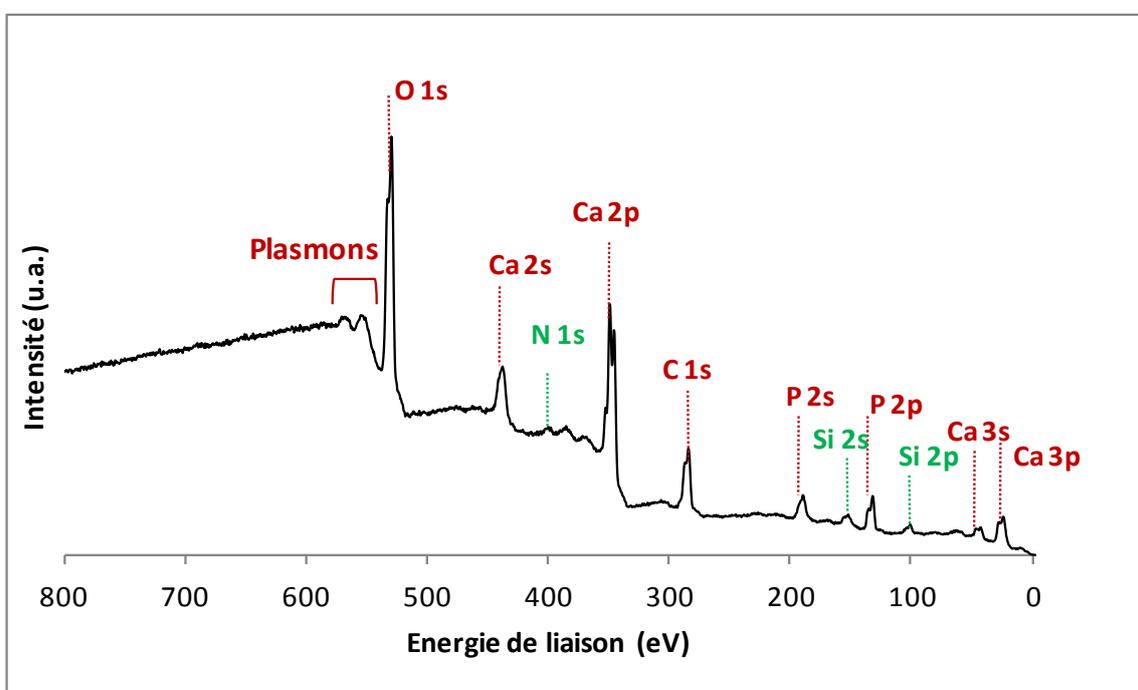


Figure III-7 : Spectre XPS large d'une poudre HA-T

Les spectres haute résolution des poudres greffées sont présentés sur la Figure III-8 (décomposition des pics C 1s et O 1s) et Figure III-9 (décomposition des pics Si 2p et N 1s).

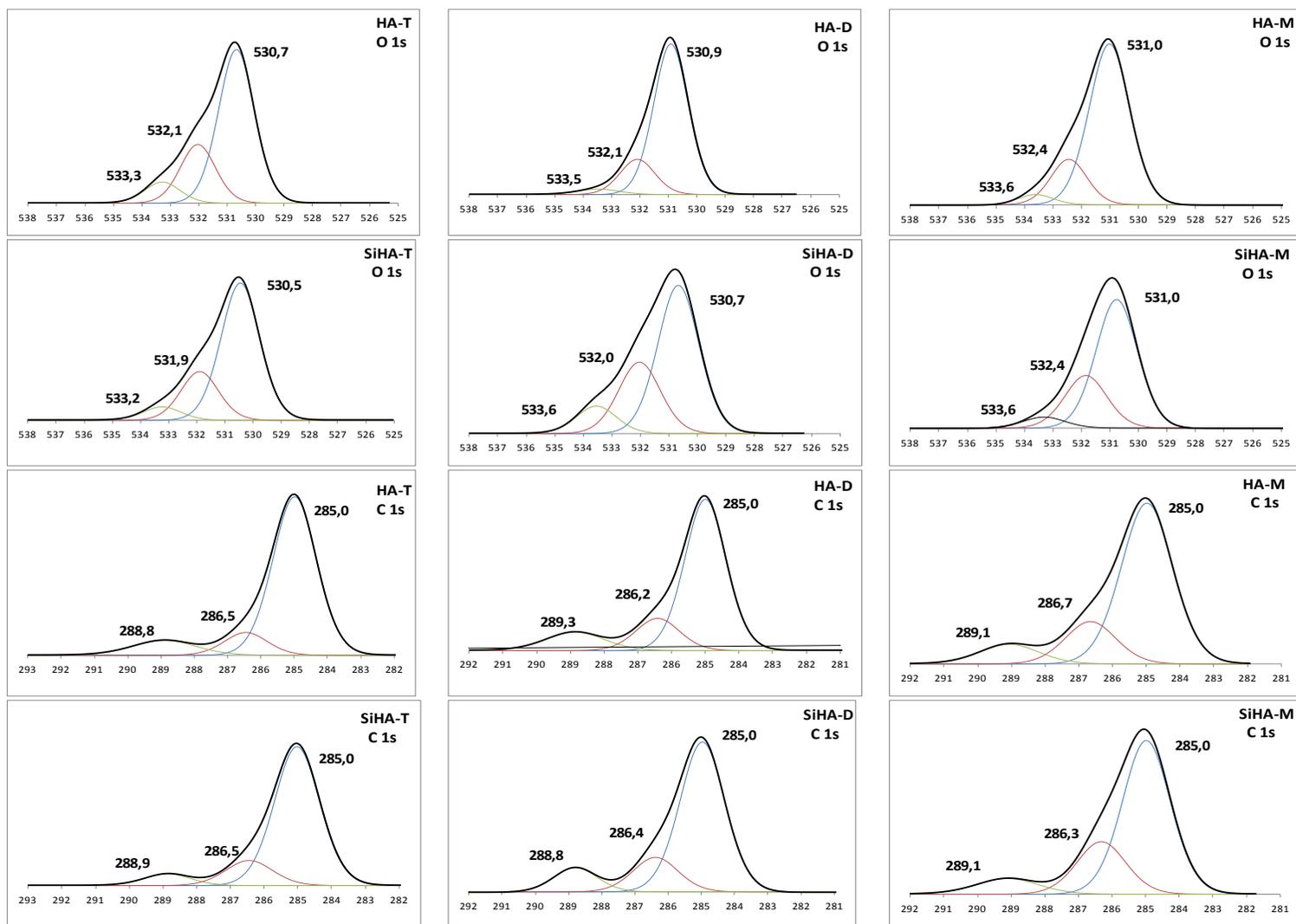


Figure III-8 : Décomposition des pics XPS O 1s et C 1s obtenus à la surface des poudres d'HA et de SiHA greffées

Echelle : abscisse = énergie de liaison en eV, ordonnée = intensité en (u.a.)

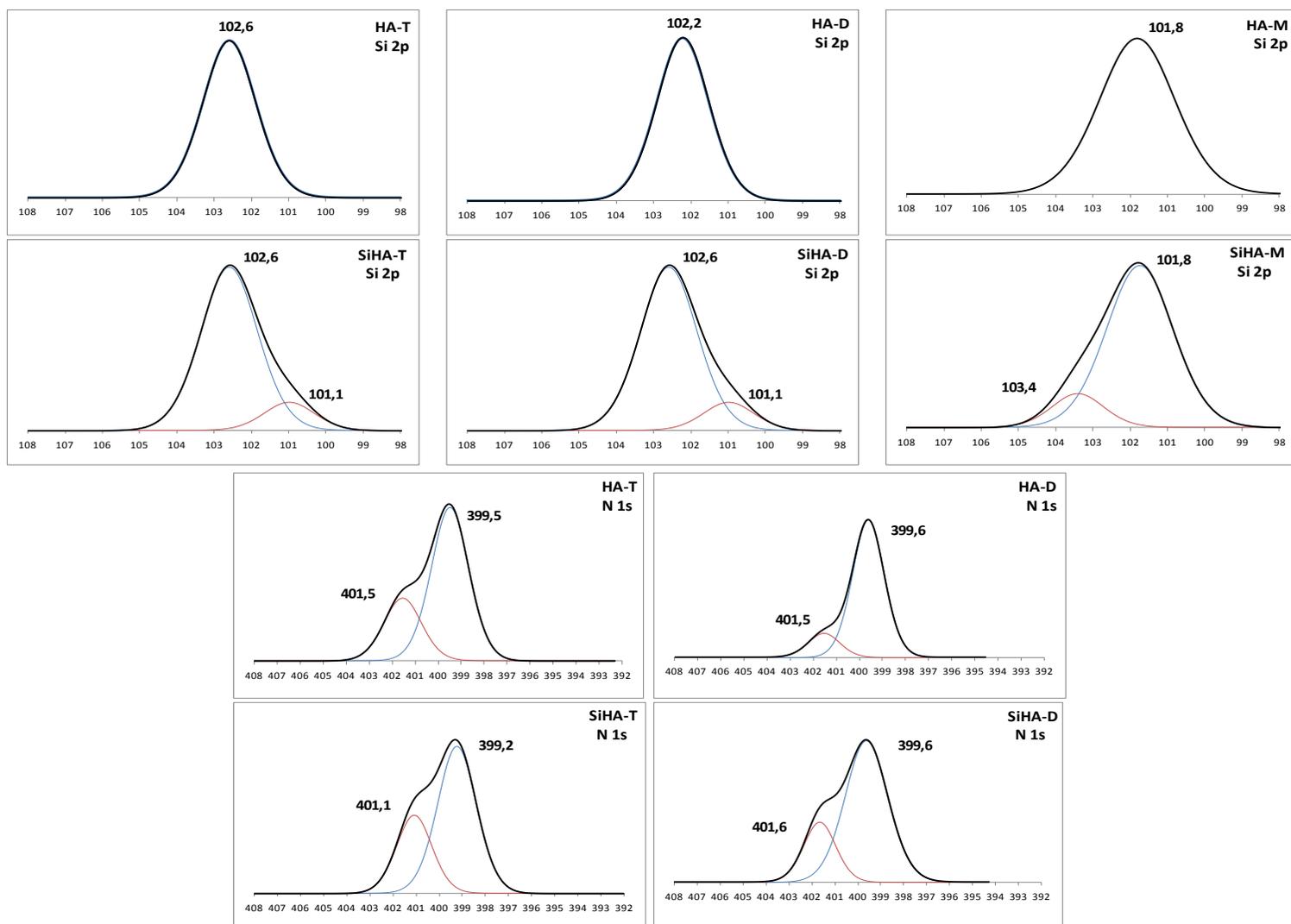


Figure III-9 : Décomposition des pics XPS Si 2p et N 1s obtenus à la surface des poudres d'HA et de SiHA greffées

Echelle : abscisse = énergie de liaison en eV, ordonnée = intensité en (u.a.)

La décomposition des pics C 1s et O 1s montre les mêmes contributions que celles des poudres non greffées. Cependant, certaines contributions semblent plus importantes ce qui est normal en présence des molécules d'organosilane et des impuretés à la surface des poudres. Pour vérifier cette hypothèse, les rapports d'aires d'intensité des pics  $A_{(C-O/C-N)}/A_{(C-C/C-H)}$ ,  $A_{(COO)}/A_{(C-C/C-H)}$  et  $A_{(O-H/O-Si)}/A_{(O-P)}$  sont calculés et sont récapitulés dans le Tableau III-5. La variation de ces trois rapports est à mettre en relation avec la présence des organosilanes à la surface des poudres. Quel que soit la nature de l'échantillon (HA ou SiHA), les rapports  $A_{(C-O/C-N)}/A_{(C-C/C-H)}$  et  $A_{(COO)}/A_{(C-C/C-H)}$  doivent diminuer après le greffage des organosilanes. L'aire du pic  $A_{(C-C/C-H)}$  doit augmenter plus vite que celle du pics  $A_{(C-O/C-N)}$  et celle du pic  $A_{(COO)}$  rester constante. Cette évolution hypothétique n'est vérifiée expérimentalement que dans le cas du rapport  $A_{(COO)}/A_{(C-C/C-H)}$  comme le montre le Tableau III-5, l'aire  $A_{(COO)}$  étant uniquement due aux impuretés présentes à la surface. L'étude du rapport  $A_{(O-H/O-Si)}/A_{(O-P)}$  qui n'inclut pas l'élément carbone, est plus fiable. Ce rapport est également en relation avec la présence de l'organosilane et doit augmenter après greffage, dû à la diminution de l'intensité du pic de la liaison O-P et à l'augmentation de la contribution de la liaison Si-O. Cela est le cas pour les deux substrats greffés.

**Tableau III-5 : Rapports des aires des pics caractéristiques des poudres d'HA et de SiHA avant et après greffage**

Rapports d'aires	$A_{(C-O/C-N)}/A_{(C-C/C-H)}$	$A_{(COO)}/A_{(C-C/C-H)}$	$A_{(O-H/O-Si)}/A_{(O-P)}$
HA	0,22	0,17	0,19
SiHA	0,14	0,14	0,14
HA-M	0,26	0,14	0,25
HA-D	0,20	0,13	0,24
HA-T	0,20	0,13	0,38
SiHA-M	0,35	0,13	0,42
SiHA-D	0,23	0,16	0,49
SiHA-T	0,19	0,09	0,34

Pour les poudres HA-T, HA-D et HA-M, le pic Si 2p est formé à partir d'une seule contribution à (101,8-102,6 eV) attribuée aux liaisons C-Si-O des organosilanes [197, 201], puisque l'HA ne contient pas de silicium dans sa structure chimique. Pour les poudres SiHA-T, SiHA-D et SiHA-M, les largeurs à mi-hauteur (FWHM) des pics Si 2p sont relativement plus importantes que celles de l'HA greffée. Ces valeurs sont de l'ordre de 1,6 eV pour HA alors qu'elles sont augmentées à 1,8 eV pour SiHA. Cette évolution des valeurs des largeurs à mi-hauteur permet de considérer que les pics Si 2p des SiHA greffées sont composés de deux contributions. L'une est caractéristique des liaisons O-Si-O des

tétraèdres SiO<sub>4</sub> dans l'apatite [197, 200], l'autre est associée aux liaisons C-Si-O des organosilanes [201]. Dans ce cas, il faut noter que l'attribution exacte de ces pics est délicate.

Concernant le pic N 1s, dans le cas des poudres greffées par l'organosilane M, ce pic est détecté mais non quantifiable probablement à cause de la faible quantité de molécule M présente à la surface. Il est donc très difficile d'effectuer sa décomposition. Pour les poudres HA-T, HA-D, SiHA-T et SiHA-D, les spectres de décomposition des pics N 1s montrent la présence de deux contributions (Figure III-9). La première contribution à  $399,5 \pm 0,1$  eV est associée selon la littérature à un environnement chimique de type NH<sub>2</sub> de molécules d'organosilanes greffées d'une façon covalente (Figure III-10-a) [194, 197] ou adsorbées (Figure III-10-d) [147] à la surface du substrat. Dans ce cas, la fonction amine non protonée est libre pour une réaction ultérieure.

La deuxième contribution à  $401,4 \pm 0,2$  eV est attribuée à un environnement chimique de type NH<sub>3</sub><sup>+</sup> [194, 197, 205]. Dans ce cas, la protonation de l'atome d'azote terminal (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) peut être expliquée par la littérature selon plusieurs possibilités mettant en évidence un greffage covalent (Figure III-10-b et Figure III-10-c) ou une adsorption (Figure III-10-e) des organosilanes à la surface des substrats. La première possibilité illustrée par les Figure III-10-b et Figure III-10-e met en jeu la différence d'électronégativité entre l'atome d'azote du groupe amine et l'hydrogène des fonctions hydroxyles présentes à la surface des substrats [129, 147]. Cette différence induit la formation de liaisons hydrogènes qui modifient l'orientation de l'organosilane qui se replie à la surface du substrat [206]. Cette hypothèse nécessite des sites OH libres à la surface des substrats en HA et en SiHA qui sont identifiés par la contribution à 532,2 eV caractéristique de la liaison O-H. Une autre indication de la présence des sites OH libres à la surface des poudres est la détection du phosphore (P 2p) portant ces sites après le greffage des organosilanes (Tableau III-4). Ces groupements OH peuvent également provenir de la présence d'eau résiduelle (contribution de l'oxygène à 533,4 eV) adsorbée à la surface des poudres greffées, ce qui permettrait de favoriser la protonation des groupements NH<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub><sup>+</sup> [197, 205].

La deuxième possibilité (Figure III-10-c) est basée sur l'effet catalytique du groupement amine terminal de l'organosilane. Ce dernier se protone en arrachant l'hydrogène porté par un groupement OH de surface. Le site négatif (O<sup>-</sup>) créé à la surface du substrat permet l'hétérocondensation de la molécule d'organosilane [129] quelles que soient les conditions réactionnelles et la nature du substrat.

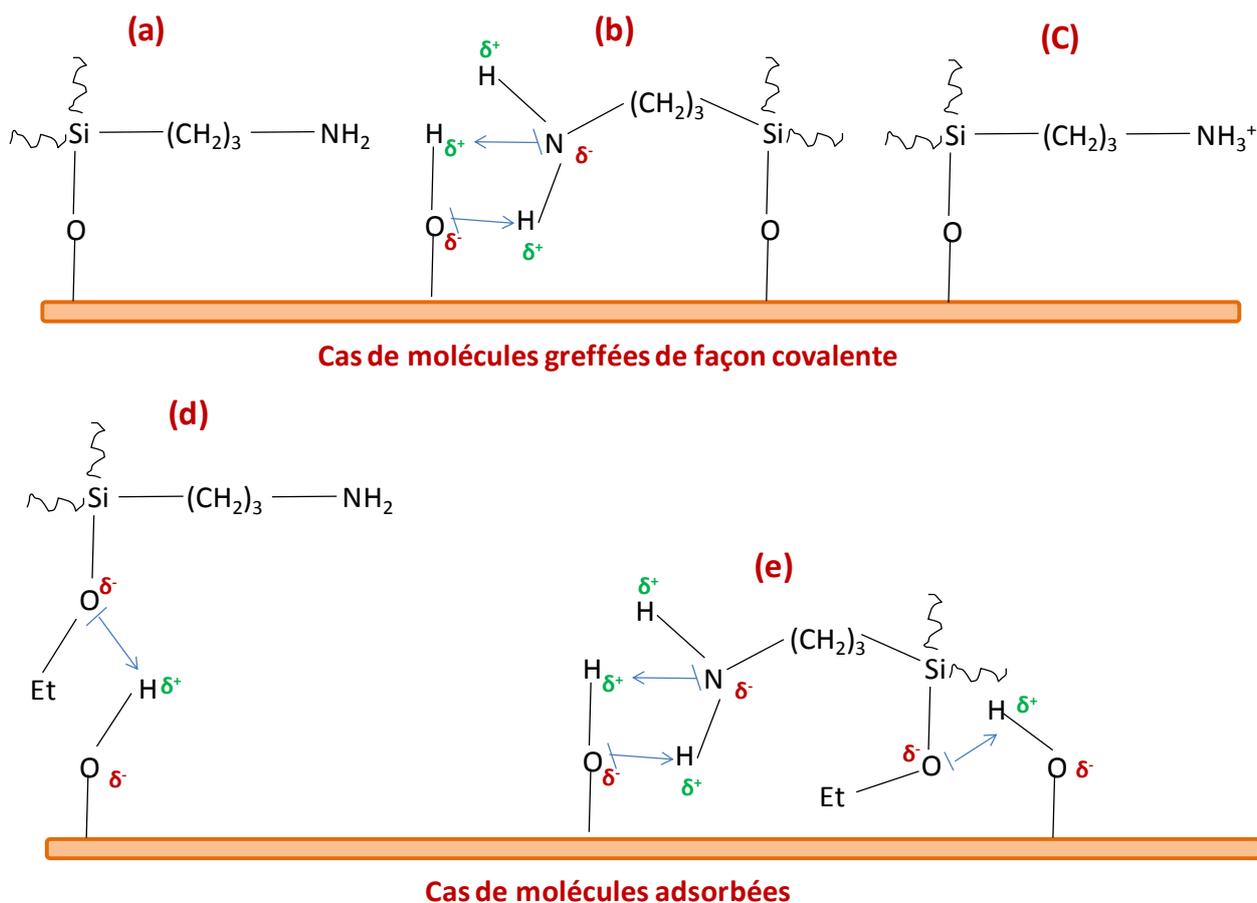


Figure III-10 : Schéma représentatif des différentes contributions de l'azote à la surface du substrat

Le Tableau III-6 récapitule les valeurs des rapports des pics  $A(\text{NH}_3^+)/A(\text{NH}_2)$  caractéristiques des poudres d'HA et de SiHA greffées par l'organosilane T (HA-T = 0,41, SiHA-T = 0,48) et D (HA-D = 0,17, SiHA-D = 0,32). La protonation du groupement amine semble augmentée avec la présence du silicium et la fonctionnalité des organosilanes.

Tableau III-6 : Rapports des aires  $A(\text{NH}_3^+)/A(\text{NH}_2)$  pour HA-D, HA-T, SiHA-D et SiHA-T

Echantillons	$A(\text{NH}_3^+)/A(\text{NH}_2)$
HA-D	0,17
HA-T	0,41
SiHA-D	0,32
SiHA-T	0,48

Le Tableau III-7 et la Figure III-11 présentent l'évolution des pourcentages atomiques des différents éléments chimiques présents à la surface des échantillons.

Le Tableau III-7 montre que quel que soit le substrat (HA ou SiHA), les pourcentages atomiques en calcium (Ca), en phosphore (P) et en oxygène (O) diminuent après le greffage des organosilanes. Les pourcentages atomiques en carbone (C), en silicium (Si) et en azote (N) dus à la présence des organosilanes augmentent lorsqu'ils sont quantifiables. Après le greffage des organosilanes, et bien que leur contribution soit divisée par deux, on arrive toujours à quantifier le phosphore (P) et le calcium (Ca) à la surface des échantillons. Selon la littérature [151], ceci confirme l'absence de la formation de couches épaisses d'organosilanes couvrant totalement la surface des substrats. En effet, la profondeur d'analyse de l'XPS est d'environ 10 nm. Le pourcentage atomique d'oxygène (O) doit soit augmenter après le greffage des organosilanes (si l'organosilane est greffé par 1 ou 2 bras), soit rester constant (si l'organosilane est greffé par 3 bras). La diminution du pourcentage atomique d'oxygène (O) après le greffage des organosilanes peut être expliquée par un effet d'écran des molécules d'organosilanes sur les sites OH libres présents à la surface des substrats. Plus la fonctionnalité de l'organosilane augmente, plus le nombre de sites OH écrantés serait important. Ce point est confirmé par l'augmentation du pourcentage atomique du carbone (C) après greffage, la structure chimique des organosilanes englobant un nombre important d'atomes de carbone. La diminution du pourcentage atomique d'oxygène (O) et l'augmentation de celui du carbone (C) sont en accord avec les résultats XPS obtenus dans la littérature [66, 207]. Les travaux de thèse de Simon [207] ont montré que le greffage de l'organosilane T (APTÉS) à la surface de la silice provoque une augmentation du pourcentage atomique de carbone de 18,7 à 25,2% et une diminution du pourcentage atomique d'oxygène de 29,1 à 28,6%. Dans le même cadre, De Taillac *et al.* [66] ont montré une augmentation du pourcentage atomique de carbone de 53,5 à 63,3% et une diminution du pourcentage atomique d'oxygène de 46,5 à 32,8% après greffage d'APTÉS à la surface de la cellulose.

Les poudres d'HA et de SiHA non greffées présentent des rapports atomiques expérimentaux Ca/P de l'ordre de 1,50 et 1,60 respectivement (Tableau III-7), alors que les rapports atomiques théoriques sont de 1,67 pour HA et 1,78 pour SiHA. Les rapports Ca/P des poudres greffées sont : HA-T (1,50), HA-D (1,50) et HA-M (1,57) pour l'hydroxyapatite et SiHA-T (1,40), SiHA-D (1,50) et SiHA-M (1,33) pour l'hydroxyapatite silicatée. La composition de la surface même si la profondeur d'analyse est encore élevée en XPS (10 nm) peut être différente de la composition du cœur des apatites. Toutefois, pour tous les échantillons, le

rapport Ca/P est quasiment constant compte tenu des incertitudes de mesure élevées (Tableau III-7). Cette incertitude ne permet pas de conclure sur une influence de l'organosilane en surface des substrats sur les rapports Ca/P.

Le rapport N/P n'est pas calculé pour les poudres greffées par l'organosilane monofonctionnel (M) car le pourcentage atomique d'azote n'est pas quantifiable. Lorsque ce rapport est mesurable, il augmente quand la fonctionnalité de l'organosilane augmente et ce pour les deux types de substrats. Il est égal à 0,25 pour HA-D, 0,50 pour HA-T, 0,17 pour SiHA-D et 0,20 pour SiHA-T. Cela montre que la quantité d'organosilanes présente à la surface augmente avec la fonctionnalité de la molécule. De plus, les rapports N/P sont légèrement inférieurs dans le cas de l'hydroxyapatite silicatée par rapport à ceux de l'HA. Cela peut traduire soit une quantité d'azote moins importante en surface des substrats en SiHA, soit une répartition moins homogène des molécules, masquant ainsi moins de site phosphore.

La structure chimique des organosilanes greffés à la surface des poudres d'HA et de SiHA est évaluée par l'intermédiaire du rapport expérimental N/Si. Le rapport théorique N/Si est égal à 1, puisque chaque organosilane utilisé contient 1 atome d'azote pour 1 atome de silicium. Dans le cas des échantillons HA-D et HA-T, le rapport N/Si expérimental (1,00) est égal à la valeur théorique. Pour les échantillons SiHA-D et SiHA-T, les valeurs sont de 0,50 et 0,33 respectivement. Ces dernières valeurs sont « sous-évaluées » car le substrat SiHA contient déjà du silicium dans sa structure. Ces valeurs sont proches de celles obtenues dans la littérature (N/Si = 0,54) [207] pour l'organosilane T greffé à la surface de silice et qui sont considérées proches de la valeur théorique de 1. Après greffage, les organosilanes (T, D) conservent donc les fonctions amines et siloxane.

Les valeurs des rapports N/P et N/Si doivent être interprétés avec précautions compte tenu des incertitudes de mesure élevées (Tableau III-7).

En fin, l'étude de l'évolution des pourcentages atomiques et des rapports atomiques des éléments chimiques présents à la surface des poudres d'HA et de SiHA permet de vérifier la présence des organosilanes (M, D et T). Le recouvrement de la surface par les organosilanes est partiel (absence de couche recouvrant le substrat) sachant que la surface analysée est de  $300 \times 700 \mu\text{m}^2$  sur une profondeur de 10 nm et que les éléments Ca et P sont visibles après greffage. En se basant sur l'évolution du rapport N/P, il semblerait que la quantité

d'organosilanes greffée augmente avec la fonctionnalité pour les deux types des substrats. La quantité de silane semble plus importante sur HA.

L'étude précédente a montré la présence des organosilanes à la surface des substrats mais ne permet pas de confirmer s'ils sont adsorbés ou greffés de façon covalente. Dans ce qui suit, le but sera donc de vérifier la présence d'un lien chimique fort entre les organosilanes et la surface des substrats.

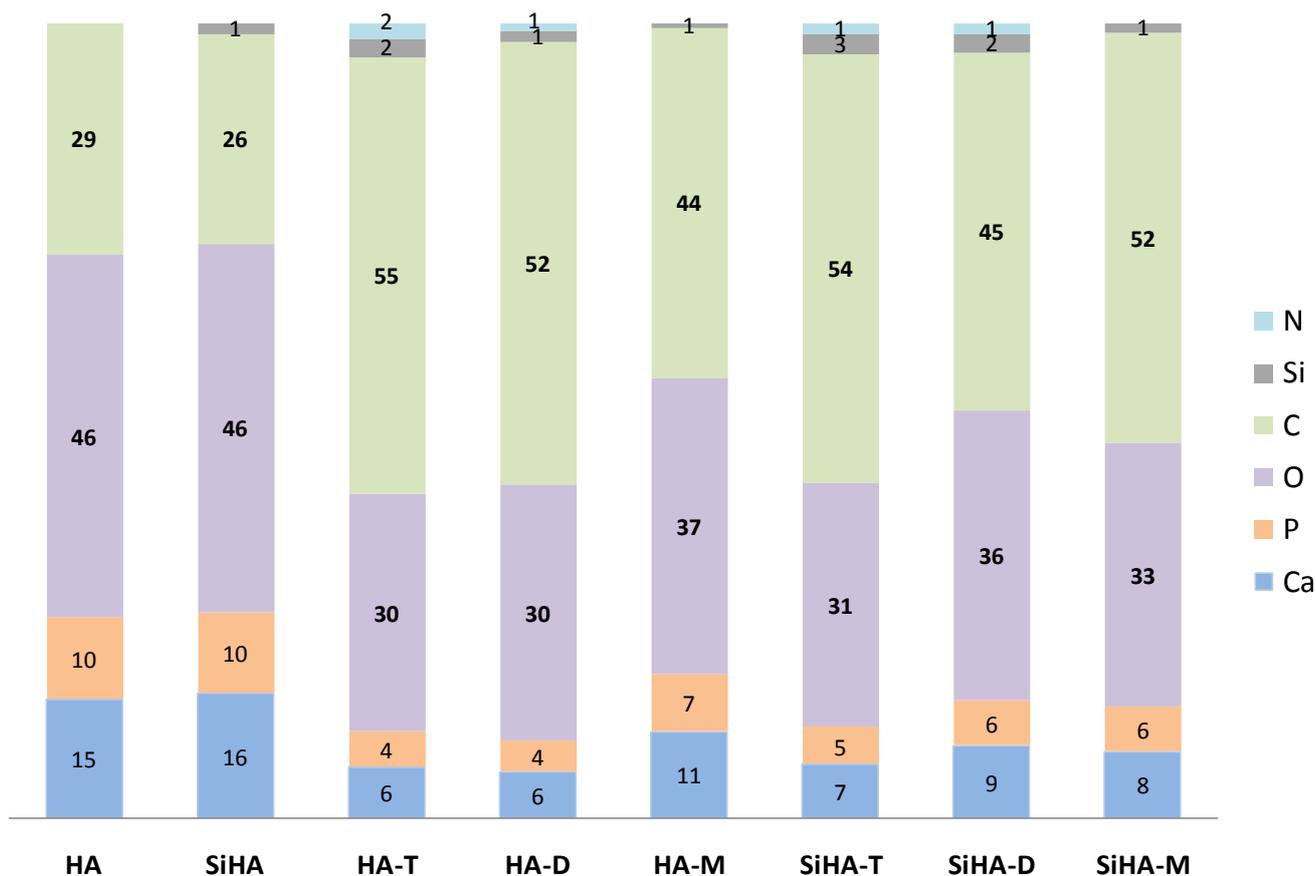


Figure III-11 : Evolution des pourcentages atomiques des différents éléments chimiques présents à la surface des poudres avant et après greffage (les pourcentages atomiques sont indiqués sur le graphique)

**Tableau III-7 : Pourcentages atomiques des différents éléments chimiques présents à la surface des poudres avant et après greffage. L'incertitude absolue sur les pourcentages atomiques est de 2 %, l'incertitude sur les rapports molaires est calculée à partir de celles des pourcentages atomiques**

Echantillon	Ca	P	O	C	Si	N	Ca/P	N/P	N/Si
HA	15	10	46	29	/	/	1,50 ± 0,33	/	/
SiHA	16	10	46	26	1	/	1,60 ± 0,33	/	/
HA-T	6	4	30	55	2	2	1,50 ± 0,83	0,50 ± 1,50	1,00 ± 2,00
HA-D	6	4	30	52	1	1	1,50 ± 0,83	0,25 ± 2,50	1,00 ± 4,00
HA-M	11	7	37	44	1	Trace	1,57 ± 0,46	/	/
SiHA-T	7	5	31	54	3	1	1,40 ± 0,68	0,20 ± 2,40	0,33 ± 2,66
SiHA-D	9	6	36	45	2	1	1,50 ± 0,55	0,17 ± 2,33	0,50 ± 3,00
SiHA-M	8	6	33	52	1	Trace	1,33 ± 0,58	/	/

### III.2.3. Détermination du mode de greffage des organosilanes

Le but de cette partie est d'étudier le mode de greffage des organosilanes (T, D et M) et donc de vérifier la nature de la liaison chimique entre la surface des substrats en HA et SiHA et les organosilanes. Pour cela, deux démarches sont utilisées. La première est une analyse par XPS après décapage ionique de la surface d'une pastille d'HA greffée par l'organosilane T. La deuxième est un suivi de la dégradation thermique des échantillons greffés par thermogravimétrie (TG) couplée à de la spectrométrie de masse (SM). Cette technique permet d'étudier les températures de dégradation de différentes chaînes organiques des organosilanes immobilisés à la surface des biocéramiques et ainsi estimer leur mode de liaison au substrat.

#### III.2.3.1. Analyse XPS sur pastilles greffées

Le protocole de greffage des pastilles est similaire à celui des poudres ce qui rend les résultats comparables entre les deux types des substrats (*voir paragraphe III.1*). Le décapage ionique est effectué par des ions d'argon  $Ar^+$  qui sont accélérés afin de leur conférer une énergie de 190 kJ/mol (décapage léger, 2 KeV) ou de 385 kJ/mol (décapage intense, 4 KeV). Un décapage léger et six décapages intenses sont effectués sur la surface d'une pastille HA-T. Après chaque décapage les pourcentages atomiques des éléments chimiques présents à la surface de l'échantillon sont enregistrés. Le décapage léger est effectué pendant 1 minute, alors que les décapages intenses sont réalisés pendant 3, 5, 7, 9, 12 et 15 minutes (temps cumulés). Un décapage intense (4 keV) appliqué sur un matériau de référence en oxyde de tantale ( $Ta_2O_5$ ) durant 25 minutes permet de creuser la surface de 60 nm. Bien que l'HA diffère de cette référence, on peut estimer qu'après 15 minutes de décapage intense, la surface décapée est de l'ordre de quelques dizaines de nm.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure III-12. Seule une pastille d'HA greffée par l'organosilane trifonctionnel (APTES) est analysée. Ce choix repose sur deux raisons principales. La première est l'absence de silicium dans le substrat ce qui permet de suivre l'évolution du pourcentage atomique de cet élément en lien avec l'organosilane. La deuxième est liée à la fonctionnalité de l'organosilane. La quantité d'APTES greffée semble plus importante que dans le cas des organosilanes di et monofonctionnel, la détection de l'azote en est donc améliorée

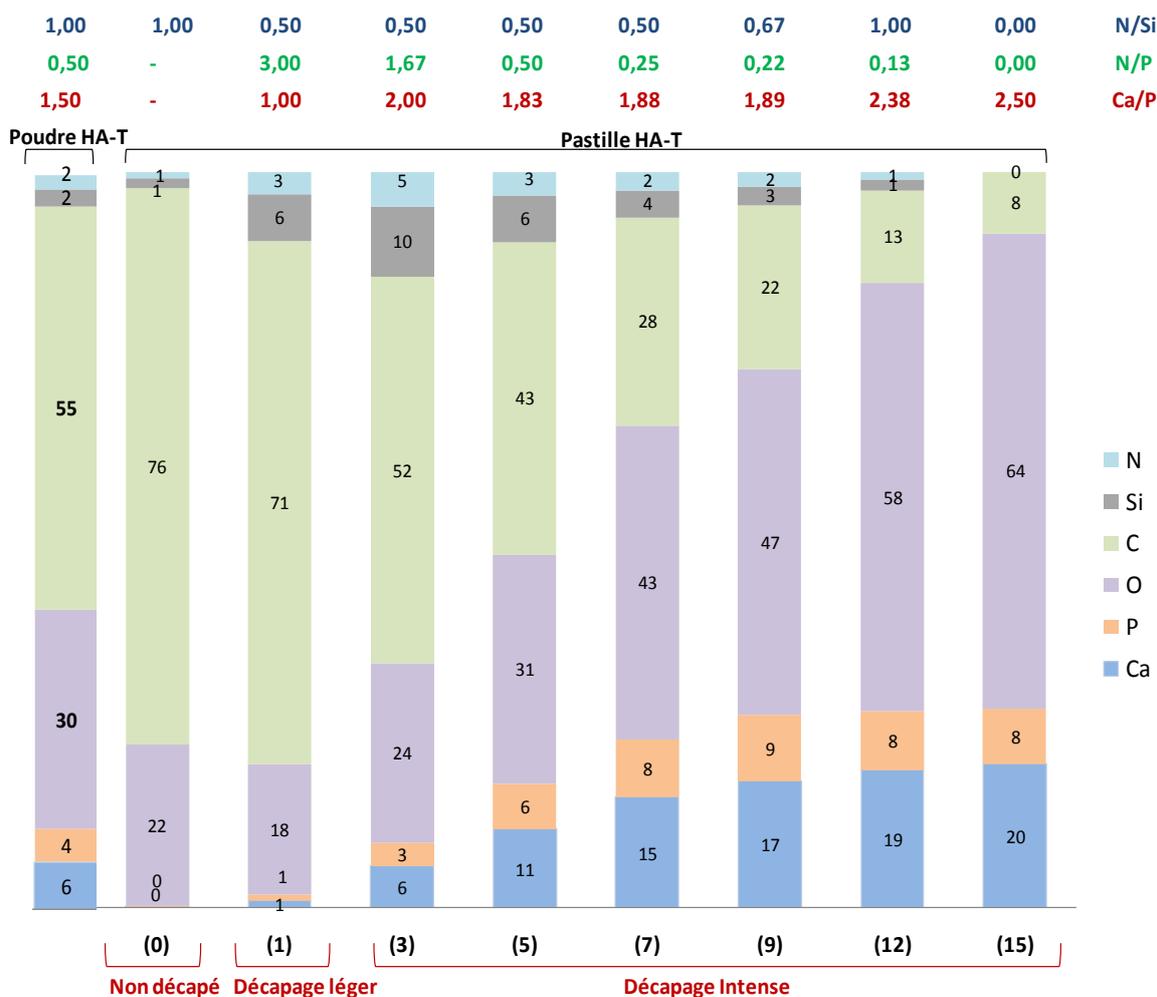


Figure III-12 : Evolution des pourcentages atomiques des éléments chimiques présents à la surface de la poudre d'HA-T et de la pastille d'HA-T après des décapages ioniques successifs. Les temps cumulés (min) de décapage sont indiqués entre parenthèses

La Figure III-12 montre qu'avant le décapage de la surface, les éléments calcium (Ca) et phosphore (P) ne sont pas détectés à la surface de la pastille greffée par l'organosilane T. Cela est attribué à la présence des impuretés essentiellement carbonées recouvrant la surface de la pastille. Le décapage léger (190 kJ/mol pendant 1 minute) permet de retirer les polluants ségrégués (le carbone essentiellement). Cela se traduit par une diminution des pourcentages atomiques en C et O. Le rapport Ca/P de la pastille est égal à 1, cette valeur est peu significative car les pourcentages atomiques de Ca et P mesurés sont très faibles (1% at.). La détection de l'azote (3%at.) et du silicium (6%at.) après le décapage léger atteste la présence de l'organosilane à la surface.

Les énergies des liaisons covalentes sont de l'ordre de 200 à 700 kJ/mol. On peut donc conclure qu'une énergie de 190 kJ/mol pour le décapage léger ne permet pas de rompre les liaisons covalentes entre l'organosilane et le substrat et donc ne détruit pas les molécules

d'organosilanes présentes à la surface de la pastille. Ce résultat permet de penser qu'il existe un lien chimique fort entre la molécule d'organosilane et la surface du substrat d'HA. Si les organosilanes étaient seulement adsorbés ils devraient être éliminés après le décapage léger (190 kJ/mol).

Après 3 minutes de décapage intense (385 kJ/mol), les pourcentages atomiques des éléments calcium (Ca), phosphore (P), oxygène (O), silicium (Si) et azote (N) augmentent au détriment du carbone. Les éléments Si et N caractéristiques de l'organosilane sont toujours visibles près 12 minutes de décapage à 385 kJ/mol mais disparaissent après 15 minutes de décapage intense. L'énergie de décapage de 385 kJ/mol a donc permis de casser les liaisons covalentes de l'organosilane qui est totalement éliminé. Parallèlement, le rapport Ca/P augmente de 2 à 2,50 avec la durée de décapage intense. Ceci peut être expliqué par un fort décapage qui induit une ségrégation des oxydes, les groupements phosphates vont être préférentiellement attaqués [197].

Le rapport N/Si est égal à 1 pour la poudre et la pastille greffée et non décapée. Après le décapage léger, le rapport N/Si diminue à 0,50 et reste presque constant entre 3 et 9 minutes de décapage intense. Le rapport N/P pour la pastille d'HA-T après 1 minute de décapage léger est égal à 3,00. Pendant le décapage intense, ce rapport diminue progressivement pour atteindre 0,00 après 15 minutes. La quantité de l'azote éliminée augmente progressivement avec le temps de décapage. Ces variations de N/Si et N/P pourraient être attribuées à un changement de composition chimique de la surface de substrats au cours du décapage en tenant compte de la possibilité de la perte du groupement amine de l'APTES comme proposé par Nanci *et al.* [139]. Le décapage intense (385 kJ/mol) permettrait de rompre la liaison C-N ayant une énergie de liaison de l'ordre de 300 kJ/mol plus faible que celle de Si-O d'environ 500 kJ/mol [208-210]. Mais, la diminution progressive de N/P peut être expliquée également par le pourcentage atomique de phosphore qui augmente avec les décapages intenses. Comme pour le cas des poudres, les rapports Ca/P, N/P et N/Si doivent être traités avec précautions compte tenu des incertitudes élevées sur les mesures.

### III.2.3.2. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse

#### a. Poudres non greffées

Les analyses thermogravimétriques (TG) ainsi que les graphiques d'émission de masses (SM) des poudres HA, SiHA, HA-Réf et SiHA-Réf sont représentés sur les Figure III-13 et Figure III-14. Seules les émissions de masses, correspondant à l'eau et celles ayant donné un signal représentatif sont mentionnées sur les graphiques. Les graphiques sont découpés en trois domaines de températures notés respectivement zone 1 ( $T_{amb}$  - 200°C), zone 2 (200°C - 700°C) et zone 3 (> 700°C). Le Tableau III-8 récapitule les pertes des masses associées aux différentes zones de température. Le Tableau II-12 récapitule les différentes possibilités d'attribution des émissions de masses aux fragments organiques des organosilanes.

Les poudres d'HA et d'HA-Réf montrent de faibles pertes des masses dans la zone de température comprise entre 30 et 900°C (Figure III-13-a et c). Les pertes de masses totales ( $\Delta m_t$ ) enregistrées sont respectivement de l'ordre de 0,4 et 0,5% (Tableau III-8).

Dans la zone 1 à basse température (Figure III-13), les pertes de masses ( $\Delta m_1 = 0,1\%$  pour HA et 0,2% pour HA-Réf) enregistrées pour les deux échantillons sont attribuées à l'humidité résiduelle (vers 80°C) et à des résidus carbonés adsorbés à la surface des poudres (vers 120°C). L'attribution à ces espèces chimiques est déduite de la spectrométrie de masse (Figure III-13-b et d) par la présence de très faibles émissions (épaulements) à  $m/e = 17$  (OH) et 18 ( $H_2O$ ) et  $m/e = 44$  ( $CO_2$ ) et 45 ( $^{13}CO_2$ ) à la limite des seuils de détection. Ces deux émissions sont détectées avec un maximum à environ 80°C pour  $H_2O$  et 120°C pour  $CO_2$ .

La zone 2 comprend deux pertes de masses représentées respectivement par  $\Delta m_2'$  (vers 350°C) et  $\Delta m_2$  (vers 580°C). Dans le cas d'HA, ces deux pertes de masses ne sont pas dissociables quantitativement. De ce fait, une seule perte de masse globale  $\Delta m_2 = 0,1\%$  est considérée. Pour HA-Réf, les deux pertes de masses  $\Delta m_2' = 0,05$  et  $\Delta m_2 = 0,1\%$  sont détectées respectivement à 340 et 560°C. Ces pertes de masses correspondent aux émissions de masses  $m/e = 44$  et 45 caractéristiques de la perte de  $CO_2$ . Les émissions à 560°C sont dues à la décarbonatation des sites B de la structure apatite lors du chauffage de la poudre sous atmosphère neutre [211]. En effet, la présence de carbonates résiduels en site B est mise en évidence par les analyses FT-IR (Figure II-7, paragraphe II.3.2.1) sur les substrats en HA et SiHA. Les faibles émissions de masses enregistrées vers 340°C ne sont pas clairement

identifiées. Elles pourraient être attribuées à une décarbonatation résiduelle des sites A de l'apatite [211].

Les pertes de masses enregistrées dans la zone 3 ( $\Delta m_3 = 0,2\%$  pour HA et  $0,15\%$  pour HA-Réf) peuvent être associées au début de la réaction de déshydroxylation de l'apatite [212] selon l'équation chimique suivante :



Les poudres de SiHA et de SiHA-Réf (Figure III-14) montrent des pertes de masses totales ( $\Delta m_t$ ) de  $0,6$  et  $1,05\%$  respectivement (Tableau III-8). De la même façon que pour les poudres d'HA, les pertes de masses enregistrées dans la zone 1 à  $80$  et  $140^\circ\text{C}$  pour SiHA ( $\Delta m_1 = 0,15\%$ ) et à  $40$  et  $140^\circ\text{C}$  pour SiHA-Réf ( $\Delta m_1 = 0,1\%$ ) sont associées aux départs d'humidité et de résidus carbonés adsorbés ( $m/e = 17, 18, 44$  et  $45$ ). Les pertes de masses dans la zone 2 à  $360^\circ\text{C}$  pour SiHA ( $\Delta m_2' = 0,1\%$ ) et  $350^\circ\text{C}$  pour SiHA-Réf ( $\Delta m_2' = 0,5\%$ ) correspondant à la décarbonatation des sites A de la structure apatite. Celles à  $580^\circ\text{C}$  pour SiHA ( $\Delta m_2 = 0,1\%$ ) et SiHA-Réf ( $\Delta m_2 = 0,15\%$ ) sont dues à la décarbonatation des sites B de la structure apatite lors du chauffage de la poudre sous atmosphère neutre. Enfin, dans la zone 3 ( $\Delta m_3 = 0,25\%$  pour SiHA et  $0,3\%$  pour SiHA-Réf) les pertes de masses sont dues à la réaction de déshydroxylation de l'apatite (Figure III-14-b et d).

**Tableau III-8 : Pertes des masses (%) observées par thermogravimétrie pour les poudres calcinées et de référence**

Echantillon	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Perte de masse totale
	[30 - 200°C]	[200 - 700°C]	[700 - 900°C]	[30 - 900°C]
HA	$\Delta m_1 = 0,1$	$\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,2$	$\Delta m_t = 0,4$
HA-Réf	$\Delta m_1 = 0,2$	$\Delta m_2' = 0,05$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,15$	$\Delta m_t = 0,5$
SiHA	$\Delta m_1 = 0,15$	$\Delta m_2' = 0,1$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,25$	$\Delta m_t = 0,6$
SiHA-Réf	$\Delta m_1 = 0,1$	$\Delta m_2' = 0,5$ $\Delta m_2 = 0,15$	$\Delta m_3 = 0,3$	$\Delta m_t = 1,05$

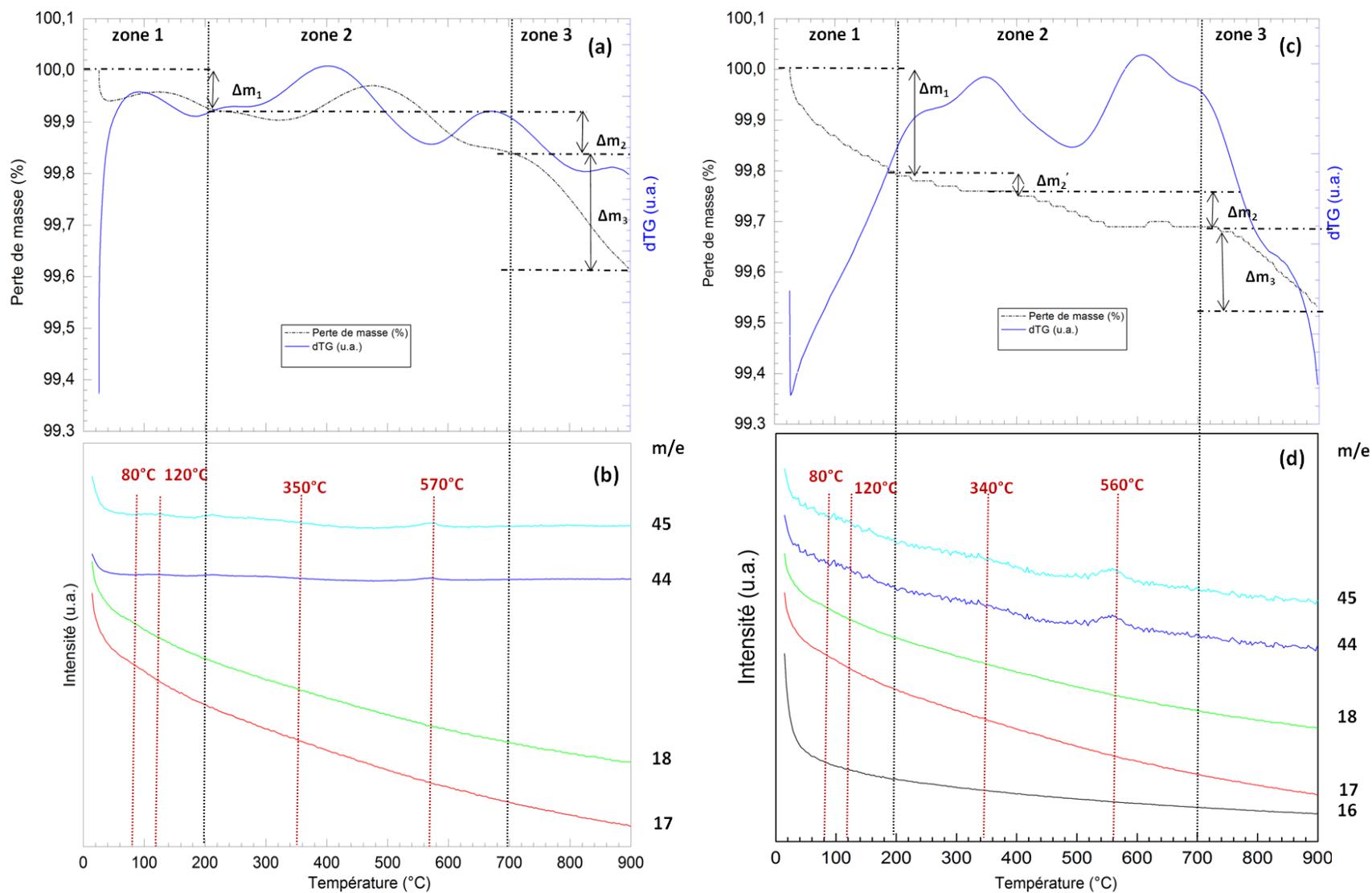


Figure III-13 : Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et émissions de masses (SM) des poudres (a, b) d'HA et (c, d) d'HA-Réf

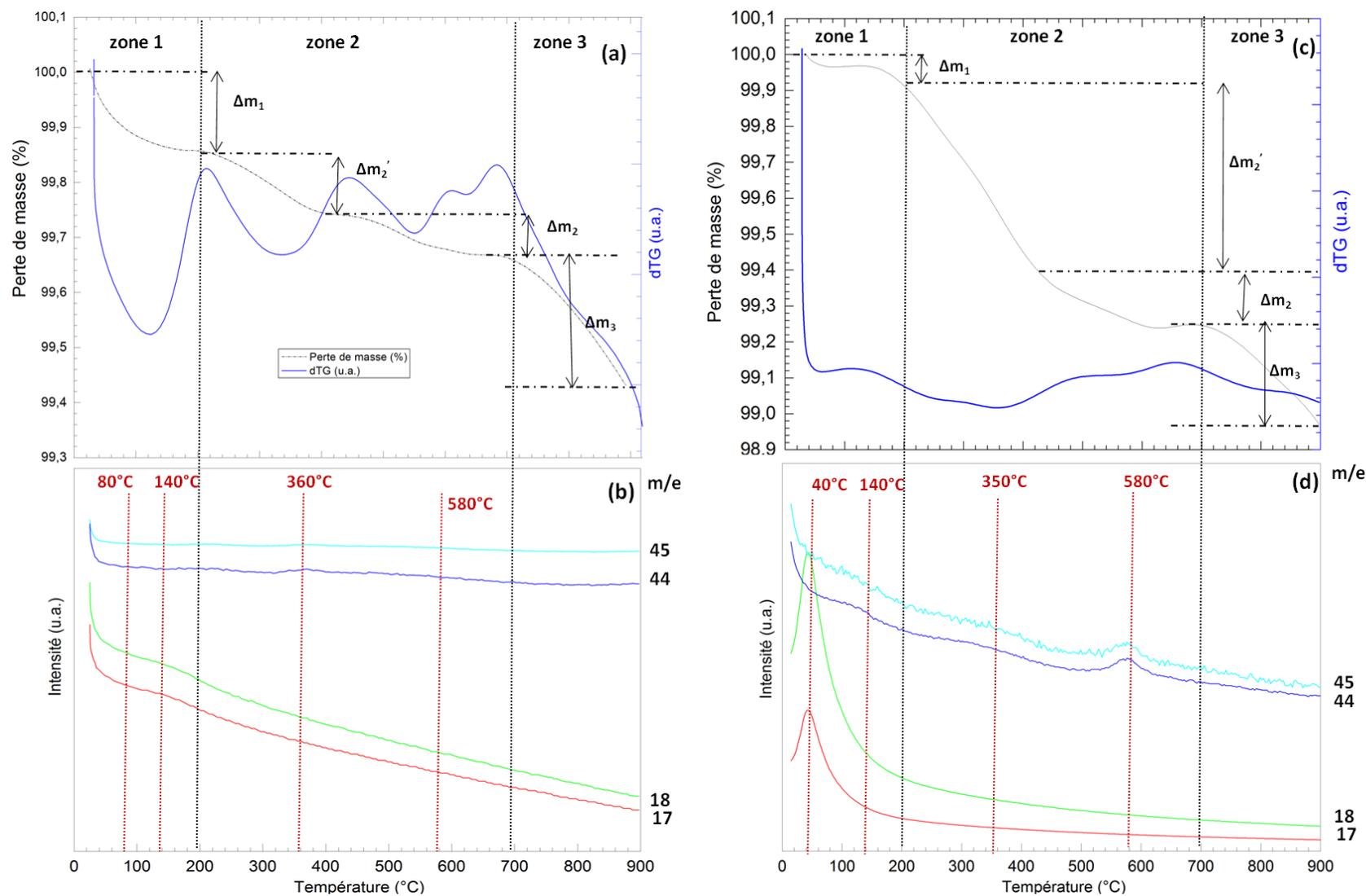


Figure III-14 : Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et émissions de masses (SM) des poudres (a, b) de SiHA et (c, d) de SiHA-Réf

### b. Poudres greffées

Les analyses thermogravimétriques (TG) et les spectres d'émission de masses (SM) obtenus sur les poudres d'HA et de SiHA greffées par les organosilanes ont été enregistrés entre 30 et 900°C afin d'identifier le mode de greffage des organosilanes à la surface des substrats céramiques. Les thermogrammes et les graphiques des émissions de masses des substrats en hydroxyapatite sont présentés sur les Figure III-15, III-17 et III-19, et ceux des substrats en hydroxyapatite silicatée sur les Figure III-16, III-18 et III-20. L'ensemble de ces analyses thermogravimétriques met en évidence trois domaines de température, caractérisés par des cinétiques de perte de masse et des émissions des masses distinctes. Pour tous les échantillons greffés comme pour les poudres non greffées, la zone 1 s'étale de 30 à 200°C, la zone 2 de 200 à 700°C et la zone 3 est comprise entre 700 et 900°C. Les pertes des masses associées à ces domaines sont répertoriées dans le Tableau III-9.

**Tableau III-9 : Pertes des masses (%) observées par thermogravimétrie pour les poudres greffées**

Echantillon	Zone 1 [30 - 200°C]	Zone 2 [200 - 700°C]	Zone 3 [700 - 900°C]	Perte de masse totale [30 - 900°C]
HA-M	$\Delta m_1 = 0,3$	$\Delta m_2' = 0,1$ $\Delta m_2'' = 0,2$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,2$	$\Delta m_t = 0,9$
SiHA-M	$\Delta m_1 = 0,3$	$\Delta m_2' = 0,7$ $\Delta m_2'' = 0,05$ $\Delta m_2 = 0,05$	$\Delta m_3 = 0,2$	$\Delta m_t = 1,3$
HA-D	$\Delta m_1 = 0,5$	$\Delta m_2' = 0,6$ $\Delta m_2'' = 0,5$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,2$	$\Delta m_t = 1,9$
SiHA-D	$\Delta m_1 = 0,2$	$\Delta m_2' = 1,2$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,1$	$\Delta m_t = 1,6$
HA-T	$\Delta m_1 = 0,2$	$\Delta m_2' = 0,3$ $\Delta m_2'' = 0,6$ $\Delta m_2''' = 0,8$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,2$	$\Delta m_t = 2,2$
SiHA-T	$\Delta m_1 = 0,3$	$\Delta m_2' = 0,6$ $\Delta m_2'' = 0,6$ $\Delta m_2 = 0,1$	$\Delta m_3 = 0,1$	$\Delta m_t = 1,7$

Afin de faciliter la lecture des résultats obtenus, les zones 1 et 3 qui présentent de très faibles pertes de masses (Tableau III-9) sont traitées en premier. Puis, l'étude de la zone 2 caractérisée par les pertes des masses les plus importantes (Tableau III-9) est développée car elle présente les émissions de masses caractéristiques de la dégradation thermique des chaînes organiques des organosilanes. L'attribution des émissions de masse est présentée dans le Tableau II-12.

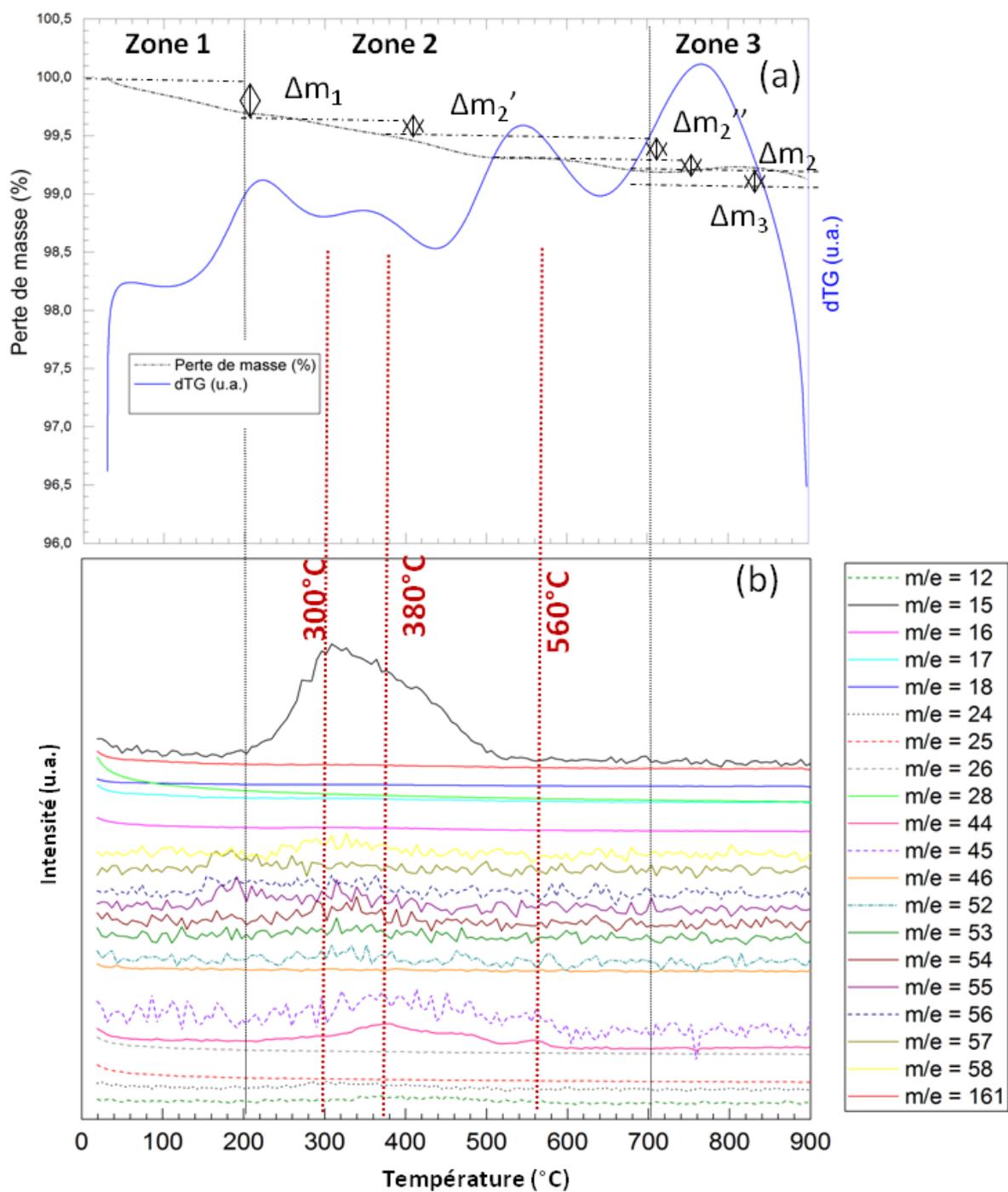


Figure III-15 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres HA-M

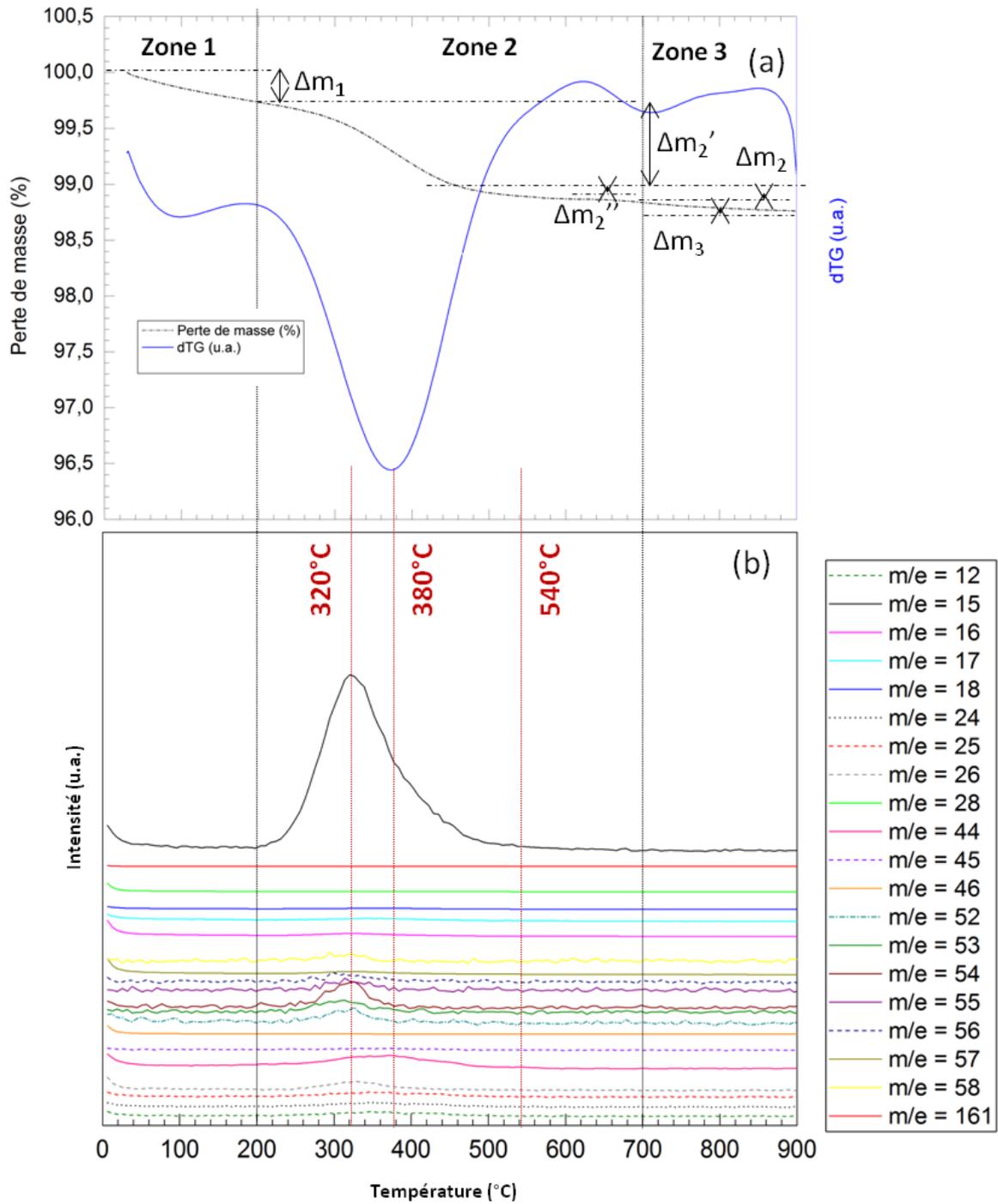


Figure III-16 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres SiHA-M

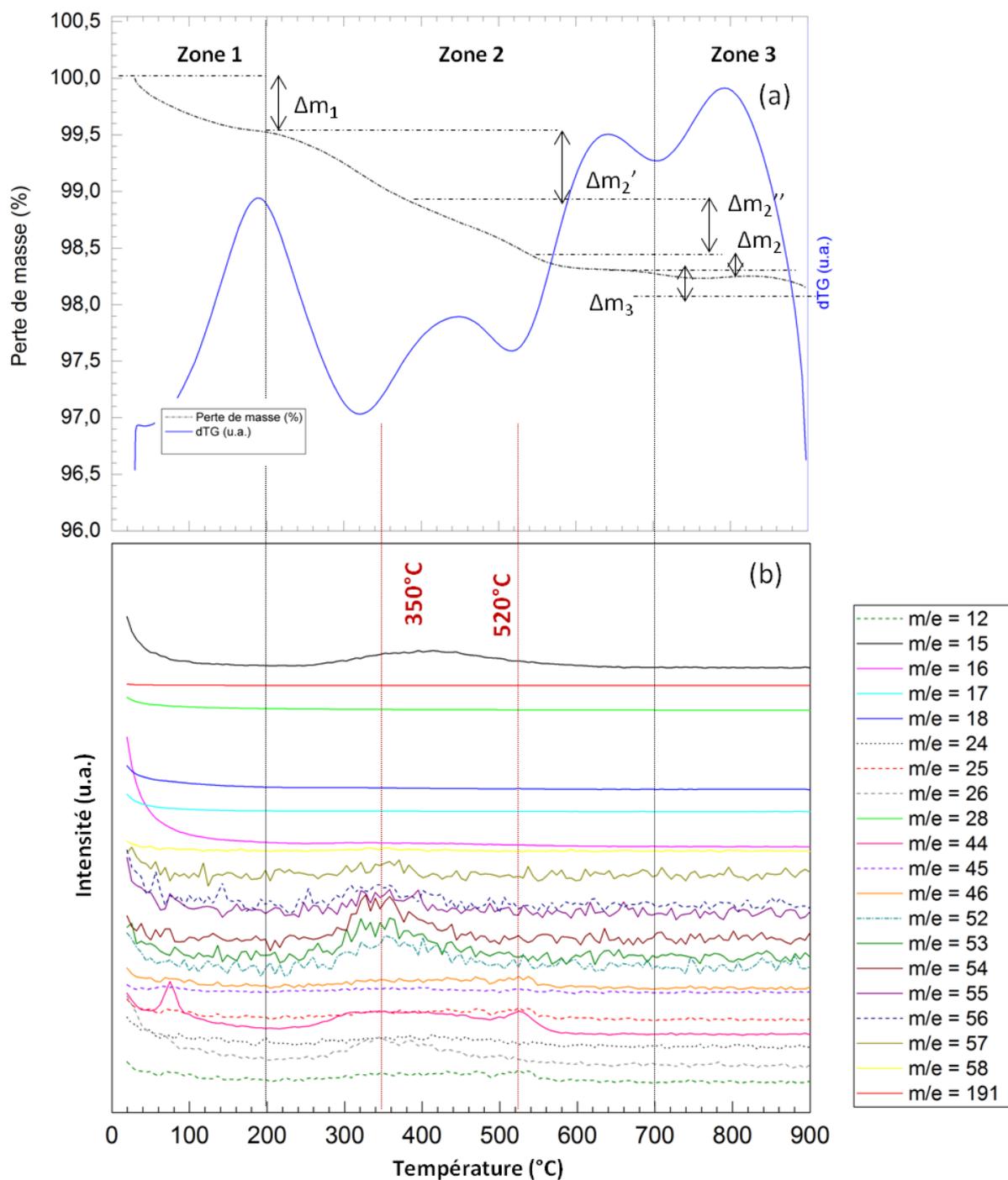


Figure III-17 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres HA-D

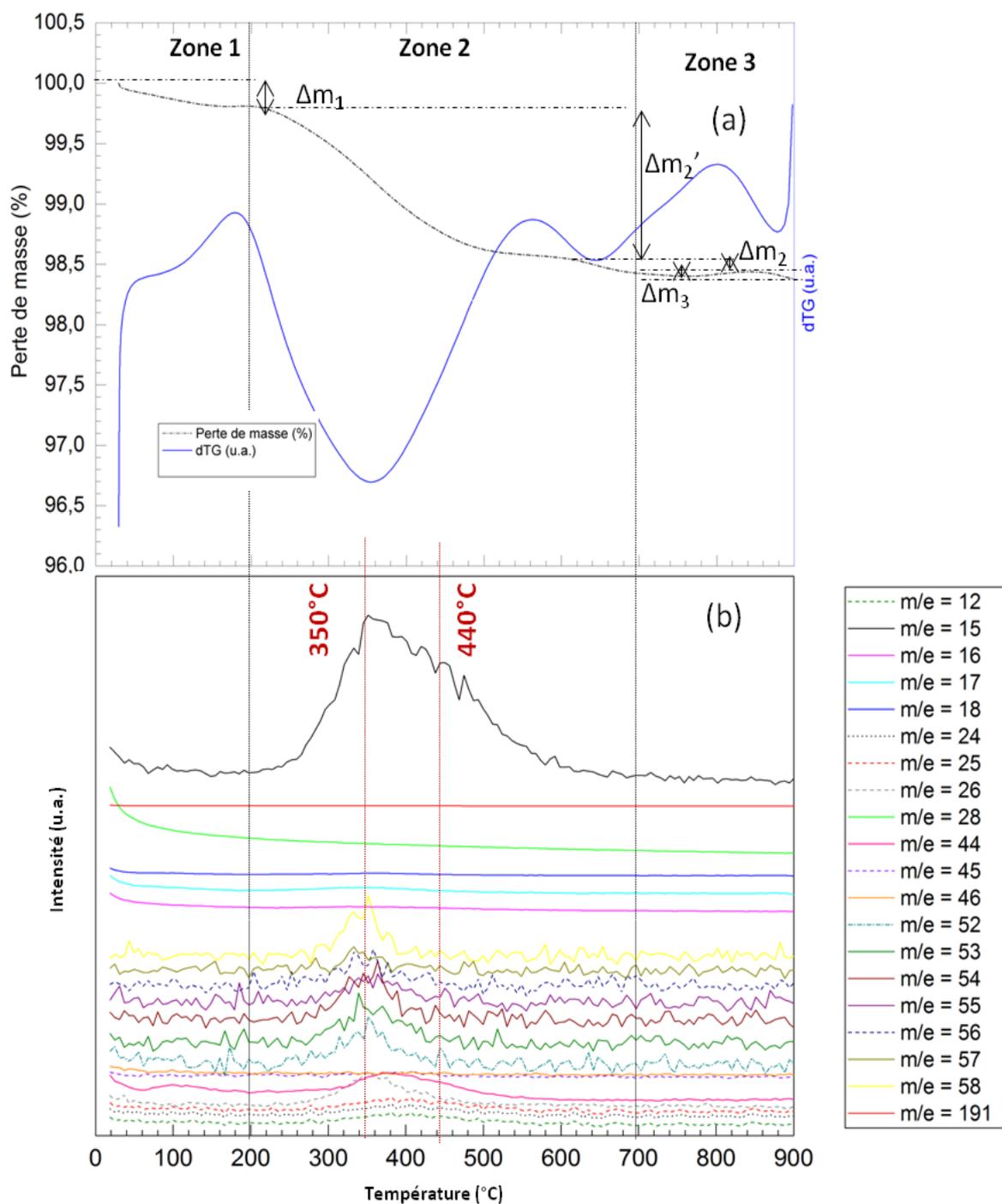


Figure III-18 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres SiHA-D

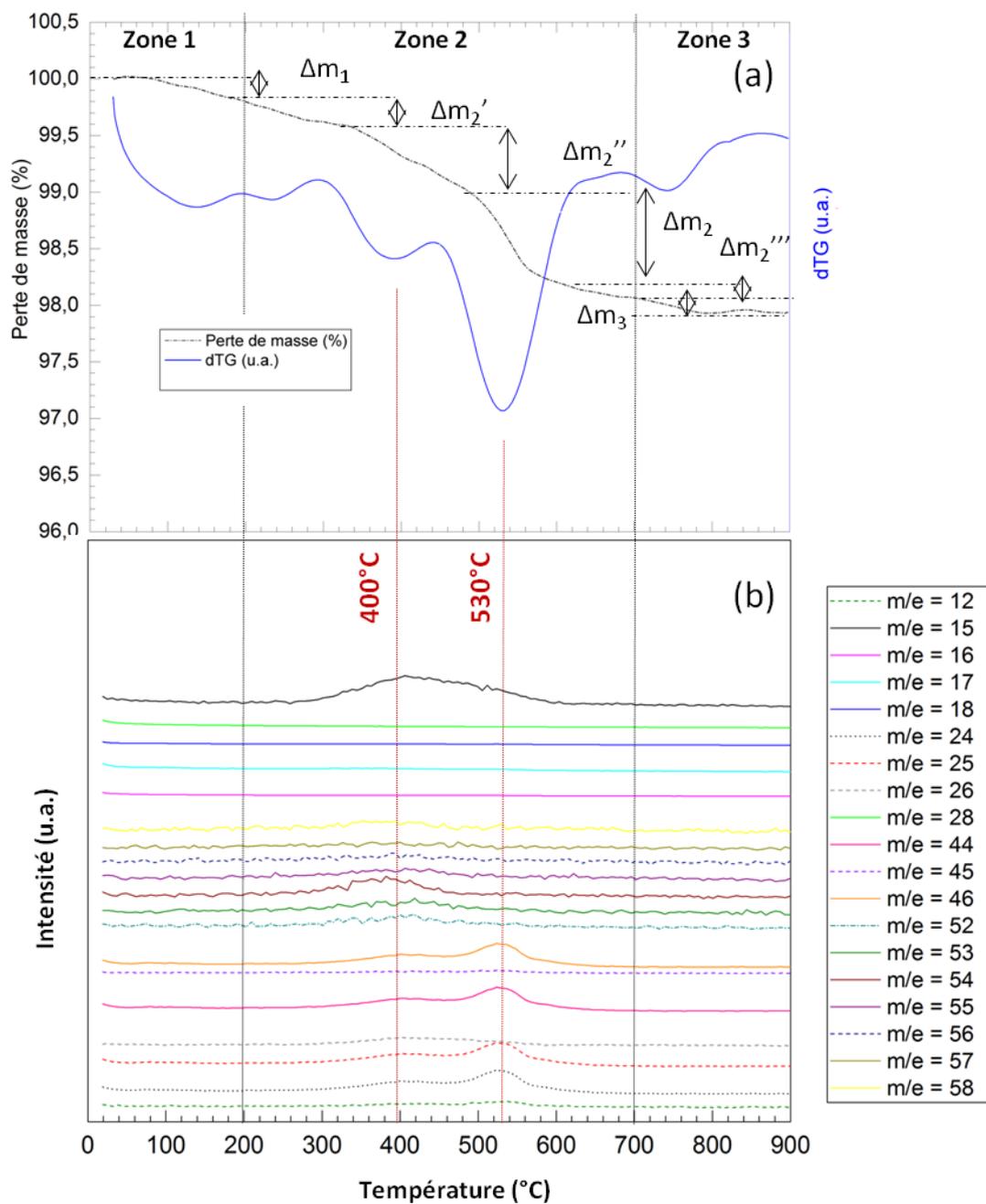


Figure III-19 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres HA-T

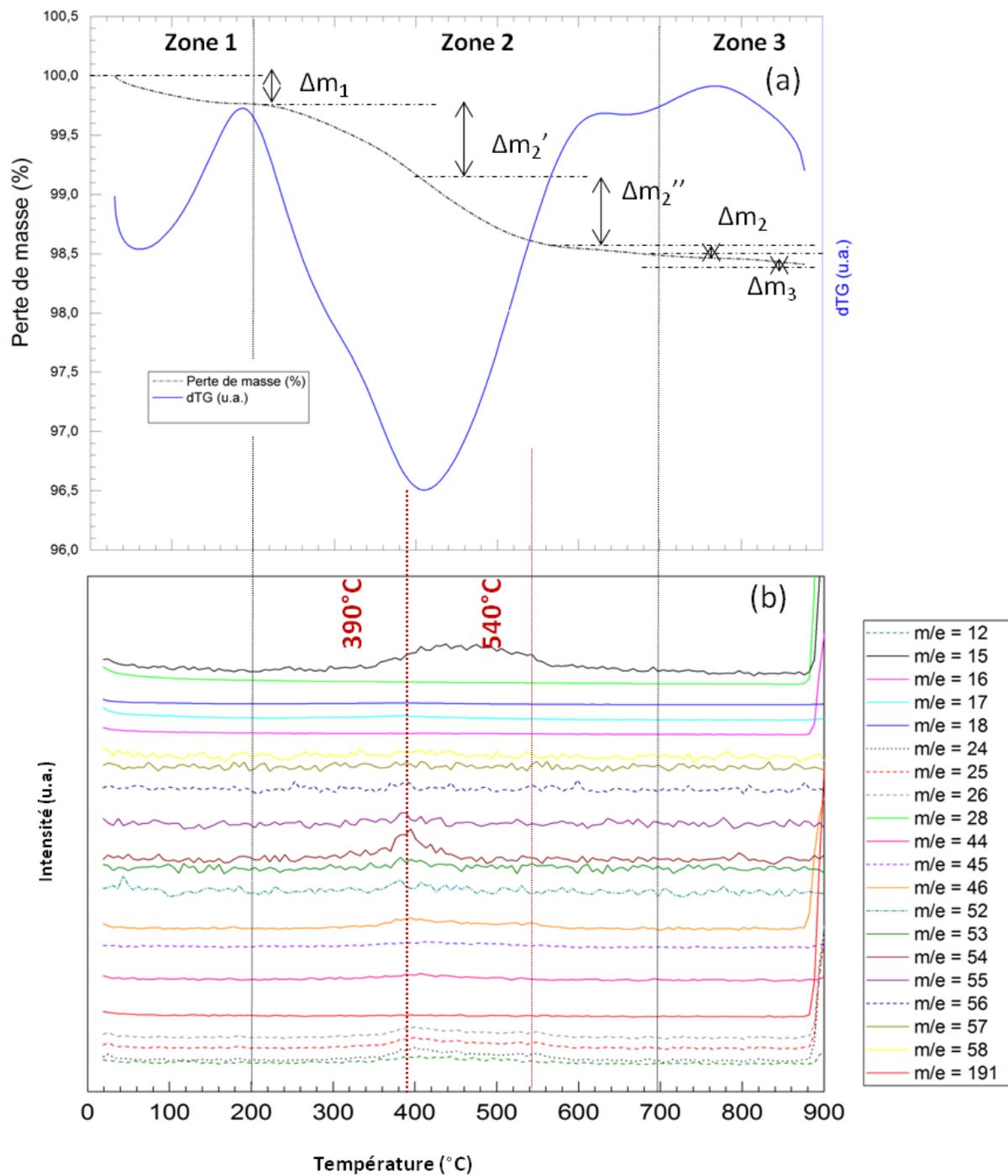


Figure III-20 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG), et (b) émissions de masses (SM) des poudres SiHA-T

Dans la zone 1, qui s'étend de 30 à 200°C, les pertes de masse varient entre 0,2% et 0,5% (Tableau III-9). Ces faibles pertes de masses légèrement supérieures à celles mesurées sur les poudres non greffées (Tableau III-8) correspondent vraisemblablement à des résidus carbonés adsorbés à la surface des poudres et au dernier solvant de rinçage (éthanol). Pour tous les échantillons, le signal de l'émission de masse caractéristique de l'eau ( $m/e = 18$ ) est plat. Les émissions de masse  $m/e = 44$  et  $46$  ne sont pas plates pour HA-D et SiHA-D, contrairement aux autres échantillons. Cela peut s'expliquer par la présence de résidus carbonés ( $m/e = 44$ ) et d'éthanol adsorbés ( $m/e = 46$ ) à la surface des échantillons.

Les pertes des masses observées dans la zone 3 (700 - 900°C) sont faibles et oscillent entre 0,1 et 0,2% (Tableau III-9). Comme dans le cas des poudres non greffées (Tableau III-8), la déshydroxylation des apatites peut expliquer ces pertes de masses.

La zone 2 (200-700°C) présente des émissions de masses caractéristiques de la dégradation des chaînes organiques des organosilanes. Cette zone est caractérisée par des pertes de masses relativement importantes par rapport aux zones 1 et 3, oscillant entre 0,4 et 1,8% (Tableau III-9). Ces valeurs sont supérieures à celles enregistrées sur les poudres non greffées (Tableau III-8). Au cours du chapitre 2, il a été montré que les organosilanes libres et non greffés se volatilisent à des températures inférieures à 250°C. Aucune émission de masse provenant des organosilanes n'est observée dans la zone 1 (30 - 200°C). Les départs relatifs aux organosilanes à plus haute température ( $T > 250^\circ\text{C}$ ) permettent donc de penser à la présence d'une liaison forte avec les surfaces des substrats sans exclure la possibilité de la présence de polymères résultants de l'homocondensation *in situ* des organosilanes. Dans ce cas ils se dégradent également à haute température notamment pour le trifonctionnel comme décrit au chapitre II (voir paragraphe II.4.2.2).

Pour toutes les poudres greffées, le signal à  $m/e = 28$  attribué au silicium ainsi que les fragments lourds ( $m/e = 72$  à  $68$ ) contenant le silicium sont plats en spectrométrie de masse, ce qui permet de conclure que l'élément silicium n'est contenu dans aucun fragment présent dans le spectromètre de masse lors de la chauffe de l'échantillon. Afin de vérifier cette hypothèse, la poudre d'HA-T a été analysée par XPS suite à une analyse thermogravimétrique jusqu'à 900°C. Le Tableau III-10 résume les pourcentages atomiques des différents éléments détectés à sa surface.

**Tableau III-10 : Pourcentages atomiques des différents éléments chimiques détectés à la surface de la poudre d'HA-T après chauffage à 900°C et analysée par XPS**

	Ca	P	O	C	Si	N
HA-T	14,4	8,1	56,2	18,6	2,8	-

La présence du carbone à la surface de l'échantillon est due à une pollution résiduelle. Cette analyse montre, d'une part, l'absence d'azote (N) mettant en évidence la dégradation thermique de la chaîne amine de l'organosilane T et, d'autre part, la présence du silicium à la surface. La présence des différents éléments confirme que les organosilanes greffés à la surface des substrats se dégradent lors du traitement thermique mais que le silicium reste toujours à la surface du substrat.

Afin d'attribuer les différentes émissions de masses détectées à des fragments issus de la dégradation des organosilanes et comprendre leur mode de greffage, l'émission de masse à  $m/e = 46$  caractéristique de l'éthanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) sera discriminante car aucun fragment de la chaîne amine ne correspond à cette masse (Tableau II-12). Lorsque l'organosilane greffé garde un groupement éthoxyle non impliqué dans le greffage, ce groupement sera observé en spectrométrie de masse à  $m/e = 45$ , couplé à un hydrogène libre ( $m/e = 1$ ) il formera de l'éthanol observé à  $m/e = 46$ . L'émission de masse à  $m/e = 46$  permet donc de voir si l'organosilane garde des chaînes éthoxyle libres à la surface du substrat et donc d'étudier son mode de liaison avec ce dernier.

### **Analyse des poudres HA-M et SiHA-M entre 200 et 700°C (zone 2)**

- Les poudres HA-M (Figure III-15) montrent que le signal de l'émission de masse à  $m/e = 46$  est plat. La possibilité de la présence de molécules d'organosilanes M adsorbées ne peut pas être exclue mais ce phénomène doit être très minoritaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la présence de l'émission de masse à  $m/e = 161$  caractéristique de la masse molaire de la molécule M. Cette émission n'est pas observable sur la Figure III-15-b. De plus, la perte de masse  $\Delta m_2'$  qui pourrait également être associée à la volatilisation de la molécule adsorbée est faible (0,1%) et en partie due à la poudre HA elle-même (HA-Réf,  $\Delta m_2' = 0,05\%$ , Tableau III-8). Ces résultats indiquent que le seul groupement éthoxyle porté par l'organosilane M est impliqué dans la réaction de greffage. Les molécules d'organosilanes présentes à la surface de l'HA sont donc greffées de façon covalente.

L'émission de masse à  $m/e = 15$  (Figure III-15) est attribuée à la perte de la fonction amine  $\text{NH}_2$  sous forme  $\text{NH}$  et du méthyle  $\text{CH}_3$  (Tableau II-12). Le signal caractéristique de cette émission de masse s'étale entre  $200^\circ\text{C}$  et  $500^\circ\text{C}$  (Figure III-15) et présente deux maximums à  $300^\circ\text{C}$  et à  $380^\circ\text{C}$ . Les émissions de masses de 58 à 52 ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}$ ), 45 ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ ), 44 ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$ ), 26 ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ), 25 ( $\text{C}_2\text{H}$ ), 24 ( $\text{C}_2$ ) et 12 ( $\text{C}$ ) sont également enregistrées dans cet intervalle de température, avec un maximum semblant se situer à  $300^\circ\text{C}$ , témoignant d'une dégradation continue des chaînes amines dans cet intervalle. Le maximum observé à  $380^\circ\text{C}$  doit correspondre à la dégradation thermique des groupements méthyles libres de l'organosilane M. Les signaux des émissions de masses  $m/e = 44$  et  $45$  présentent également un maximum à  $560^\circ\text{C}$ . Dans ce cas, ils correspondent à la décarbonatation des poudres comme montré dans le paragraphe III.2.3.2.a.

- L'organosilane M présent à la surface de SiHA, se dégrade de façon analogue au cas précédent (HA-M). La Figure III-16 montre l'absence des émissions de masses  $m/e = 46$  ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) et 161 (masse totale de M). Les molécules d'organosilanes M sont donc greffées de façon covalente à la surface de SiHA et le phénomène d'adsorption est minoritaire.

L'allure générale de l'émission de masse  $m/e = 15$  ( $\text{NH}$  ou  $\text{CH}_3$ ) montre un signal continu allant de  $200^\circ\text{C}$  à  $550^\circ\text{C}$ . Ce signal regroupe un maximum à  $320^\circ\text{C}$  et un épaulement dont le sommet se situe à  $380^\circ\text{C}$ . Les émissions de masses 12, 15, 24, 25, 26, 44, 45, 52 à 58 dues à la dégradation des chaînes amines de l'organosilane M sont enregistrées dans cette zone de température avec un maximum vers  $320^\circ\text{C}$ . Le maximum observé à  $380^\circ\text{C}$  doit correspondre à la dégradation thermique des groupements méthyles libres de l'organosilane M.

Contrairement aux poudres HA-M, les émissions  $m/e = 44$  et  $45$  ne présentent pas de maximum net à  $540^\circ\text{C}$  pouvant être attribué à la décarbonatation des poudres. La Figure III-21 résume le mode de greffage de l'organosilane M à la surface d'HA et de SiHA. L'organosilane M peut se greffer à la surface des substrats en gardant un groupement amine ( $\text{NH}_2$ ) libre (Figure III-21-a). D'autre part, les analyses XPS (voir paragraphe III.2.2.2.b) ont montré la possibilité du repliement de l'organosilane à la surface aboutissant à des interactions ioniques entre les groupements amines avec les sites OH de surface (Figure III-21-b) ou d'une réaction d'autocatalyse induit par ce

groupement (Figure III-21-c). Dans ces deux derniers cas, le groupement amine greffé à la surface sera protoné ( $\text{NH}_3^+$ ).

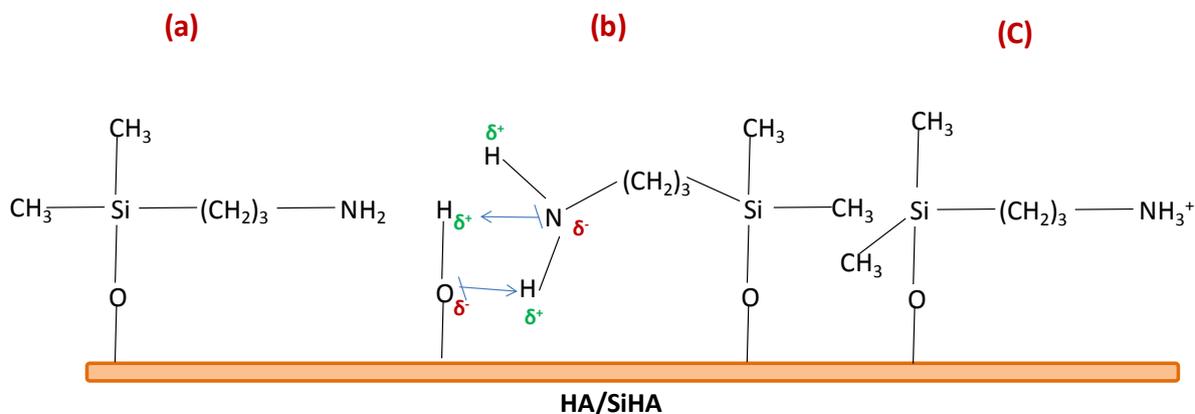


Figure III-21 : Schéma représentatif du mode de greffage covalent supposé de l'organosilane M à la surface des poudres d'HA et de SiHA

### Analyse des poudres HA-D et SiHA-D entre 200 et 700°C (zone 2)

- Pour HA-D, le signal de l'émission de masse  $m/e = 191$  correspondant à la masse de la molécule D est plat (Figure III-17). La quantité de molécules adsorbées est donc inférieure à la limite des seuils de détection.

L'allure générale de l'émission de masse  $m/e = 15$  (NH ou  $\text{CH}_3$ ) montre un signal continu allant de 250°C à 550°C. Ce signal est corrélé à un premier phénomène présentant un maximum à 350°C et correspondant aux émissions de masses de 58 à 52 ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}$ ), 45 ( $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ ), 44 ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$ ), 26 ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ), 25 ( $\text{C}_2\text{H}$ ), 24 ( $\text{C}_2$ ) et 12 (C). Ce phénomène correspond à la dégradation des chaînes amines.

L'émission de masse  $m/e = 15$  est corrélée à un deuxième phénomène dont le maximum se situe à 520°C. À cette température, les poudres HA-D montrent la présence de l'émission de masse à  $m/e = 46$  caractéristique de la perte des chaînes éthoxyles non impliquées dans la réaction de greffage. De même, les émissions de masses  $m/e = 44$  et 45 présentent un maximum à 520°C. De ce fait, ce maximum doit correspondre à la dégradation thermique des groupements éthoxyles non impliqués dans le greffage de l'organosilane D.

La perte des groupements méthyles de l'organosilane D doit se situer entre 350°C et 520°C mais ne peut pas être clairement identifiée compte tenu de la continuité des signaux.

- Tout comme pour les poudres HA-D, le phénomène d'adsorption pour les poudres SiHA-D est minoritaire (absence de l'émission de masse  $m/e = 191$ ).  
 Contrairement à HA-D, le signal de l'émission de masse  $m/e = 46$  est plat (Figure III-18), l'organosilane D ne présente donc pas de groupement éthoxyle libre.  
 Le signal de l'émission de masse  $m/e = 15$  s'étale de 250°C à 600°C et comprend un maximum à 350°C et un épaulement à 440°C. Tout comme pour la poudre HA-D, le premier est attribué à la dégradation des chaînes amines. En revanche, les poudres SiHA-D ne présentant pas d'éthoxyle libre, l'épaulement à 440°C est attribué à la perte des groupements  $\text{CH}_3$  des organosilanes D.

La Figure III-22 représente le mode de greffage de l'organosilane D à la surface des substrats en HA et SiHA. Comme pour l'organosilane M, l'organosilane D greffé à la surface des substrats (HA ou SiHA) peut avoir des fonctions amines ( $\text{NH}_2$ ) libres ou protonées ( $\text{NH}_3^+$ ).

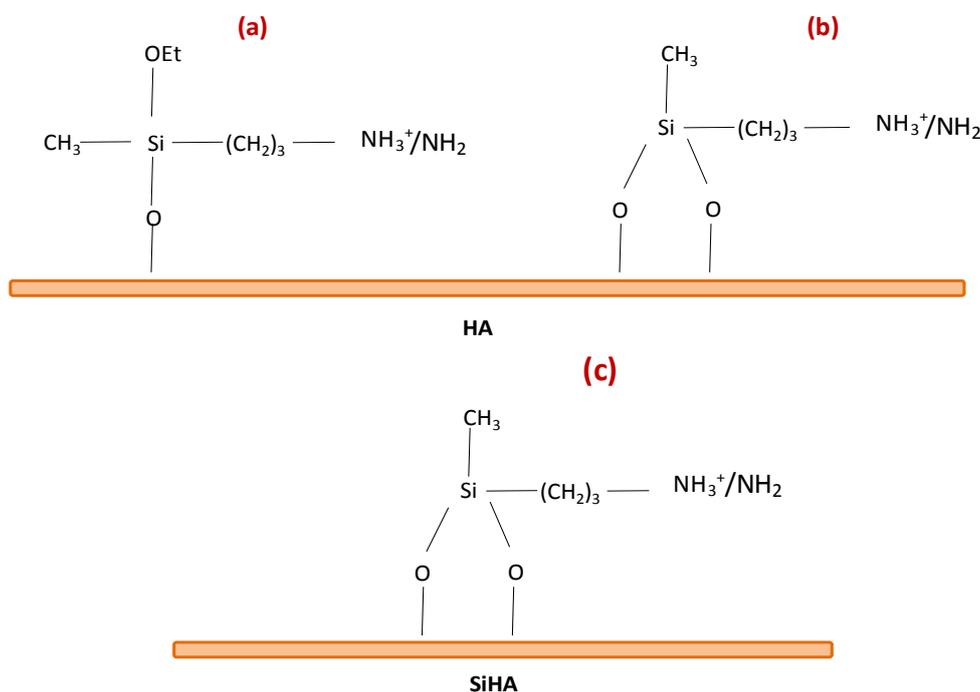


Figure III-22 : Schéma représentatif des modes de greffage supposés de l'organosilane D à la surface des poudres : cas des poudres d'HA où le greffage a eu lieu par (a) 1 ou (b) 2 chaînes éthoxyles ; cas des poudres de SiHA où le greffage a eu lieu par (c) 2 chaînes éthoxyles

**Analyse des poudres HA-T et SiHA-T entre 200 et 700°C (zone 2)**

- Le phénomène de dégradation thermique des poudres HA-T (Figure III-19) est très similaire à celui des poudres HA-D. Le signal de l'émission de masse  $m/e = 15$  est compris entre 260°C et 600°C. La molécule T ne contenant pas de groupement méthyle, ce dernier ne contribue pas au signal ( $m/e = 15$ ). Les maximums des émissions de masses associées à la masse  $m/e = 15$  sont légèrement décalés : les chaînes amines se dégradent avec un maximum de 400°C et les chaînes éthoxyles ( $m/e = 46, 45$  et  $44$ ) à 530°C.
- Le spectre de masse de SiHA-T (Figure III-20) montre un phénomène de dégradation thermique très similaire à celui des poudres HA-T (Figure III-19). Le signal de l'émission de masse  $m/e = 15$  est compris entre 330°C et 600°C. Les maximums des émissions de masses associées à la masse  $m/e = 15$  sont à nouveau légèrement décalés : les chaînes amines se dégradent avec un maximum de 390°C et les chaînes éthoxyle à 540°C. Le signal de l'émission de masse  $m/e = 46$  (EtOH) est faible, une faible quantité des groupements éthoxyles est donc non impliqués dans le greffage dans le cas de SiHA-T. Cela laisse penser que sur les substrats SiHA, le greffage de l'organosilane T est majoritaire par 3 chaînes éthoxyles alors qu'il s'effectue par une ou deux chaînes éthoxyles à la surface d'HA (Figure III-23).

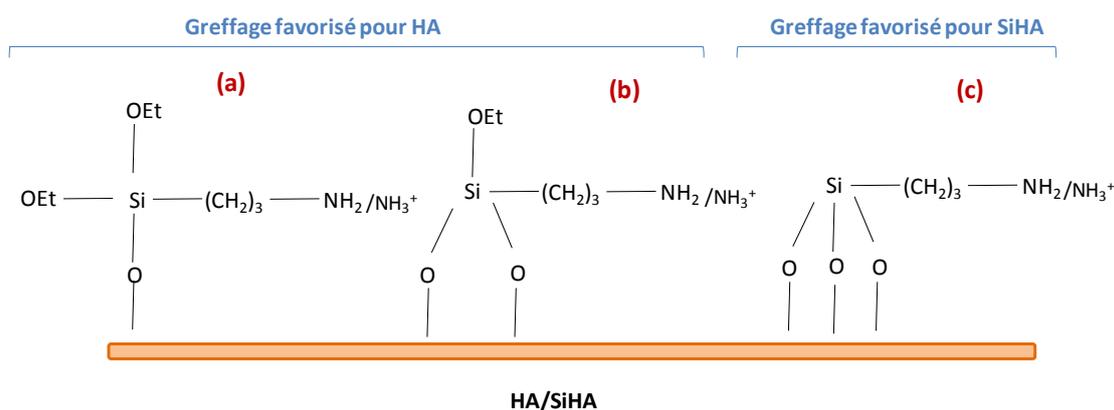


Figure III-23 : Schéma représentatif du mode de greffage de l'organosilane T à la surface d'HA et de SiHA

La Figure III-24 regroupe les différentes allures des émissions de masses  $m/e = 15$  des poudres d'HA et de SiHA greffées. Les températures de dégradations des différentes chaînes organiques des organosilanes greffés sont récapitulées dans le Tableau III-11.

On remarque que plus la fonctionnalité de l'organosilane augmente, plus le signal de l'émission de masse  $m/e = 15$  se décale vers les hautes températures (Figure III-24). Parallèlement, le Tableau III-11 montre que quel que soit l'échantillon, les chaînes amines se dégradent en premier (entre 300 et 400°C) puis viennent les chaînes éthoxyles (entre 520 et 540°C). L'augmentation de la fonctionnalité de l'organosilane et donc la présence des groupements éthoxyles influence la structure électronique de la molécule greffée et induit des liaisons chimiques plus stables qui se dégradent à plus haute température. Les températures de dégradation des chaînes organiques vont dans le même sens que les énergies de liaisons Si-C et Si-O. Dans la littérature, les énergies de liaisons varient de 300 à 356 kJ/mol pour Si-C [208, 213] et de 369 à 536 kJ/mol pour Si-O [208-210, 214, 215]. Les liaisons Si-O sont donc thermiquement plus stables que les liaisons Si-C car elles possèdent les énergies de liaisons les plus importantes. C'est pour cette raison que les chaînes amines se dégradent à des températures plus faibles.

La nature du substrat (HA ou SiHA) influe le mode de liaison de l'organosilane à la surface. Au contraire de l'HA, le substrat de SiHA favorise le greffage des organosilanes par plusieurs chaînes éthoxyles (2 chaînes pour D et 3 chaînes pour T). Cette différence du nombre de chaînes éthoxyles impliquées dans le greffage entre les deux substrats permet de modifier l'architecture des organosilanes à la surface des substrats en apatite.

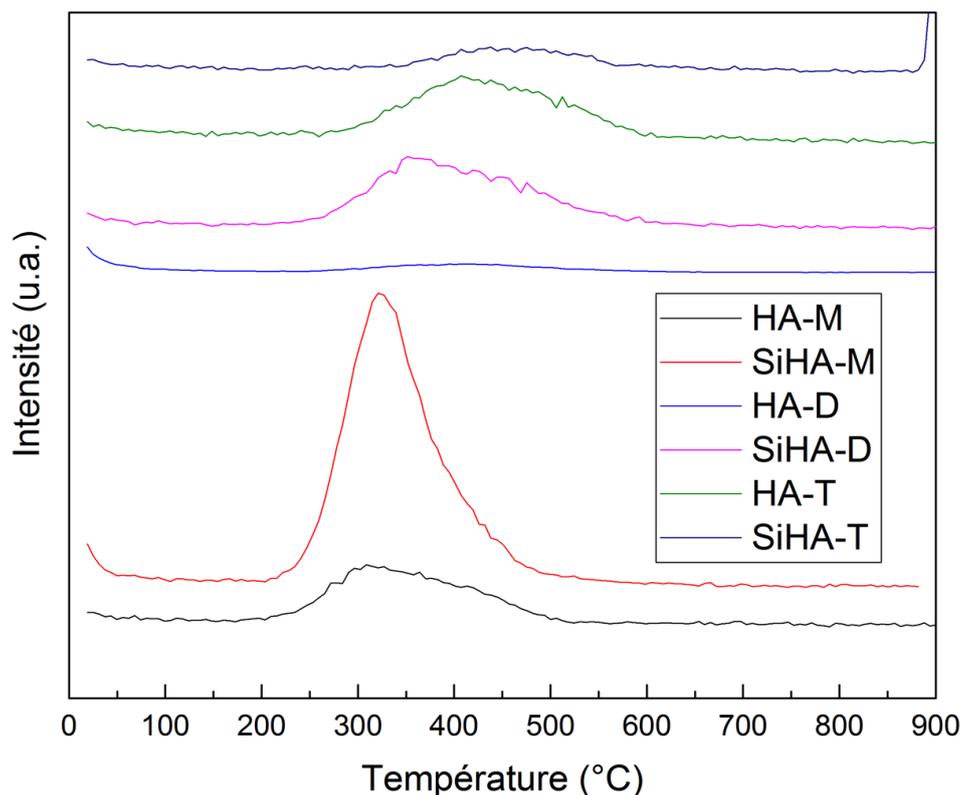


Figure III-24 : Allures générales des émissions de masses  $m/e = 15$  des poudres d'HA et de SiHA greffées

Tableau III-11 : Températures de dégradations des fragments organiques et nombre de groupements éthoxyles impliqués dans le greffage pour les poudres d'HA et de SiHA greffées

Echantillon	Températures de dégradations des fragments organiques (°C)			Nombre de groupements éthoxyles impliqués dans le greffage
	Amine	Méthyle	Ethoxyle	
HA-M	300	380	-	1
SiHA-M	320	380	-	1
HA-D	350	-	520	1, 2
SiHA-D	350	440	-	2
HA-T	400	-	530	1, 2, 3
SiHA-T	390	-	540	1, 2, 3

### III.2.4. Estimation de la quantité d'organosilane greffée

L'estimation de la quantité d'organosilane greffée à la surface des substrats en HA et SiHA est effectuée à partir de l'analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse (TG/SM) et par analyse élémentaire de carbone. Les résultats obtenus seront présentés ci-dessous.

#### III.2.4.1. Analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse

La quantité d'organosilane greffée à la surface des poudres d'HA et de SiHA, est estimée en déterminant la densité surfacique des molécules d'organosilanes ( $d_s^{ATG}_{(exp)}$ ) en  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ . Pour chaque échantillon, on considère la perte de masse totale dans la zone 2 ( $\Delta m_{2total}$ ), c'est-à-dire la perte de masse entre 200 et 700°C. La perte de masse liée à l'organosilane ( $\Delta m_{org}$ ) est obtenue en ôtant à  $\Delta m_{2total}$  les pertes de masses de la zone 2 des poudres de référence soit  $\Delta m_{2HA-Réf} = 0,15\%$  et  $\Delta m_{2SiHA-Réf} = 0,2\%$ . La densité surfacique en organosilanes est obtenue en divisant  $\Delta m_{org}$  par la surface spécifique des poudres (SSA) puis par la masse molaire de la partie organique greffée. Celle-ci est estimée en tenant compte du nombre de bras éthoxyles engagés dans le greffage et en supposant que tous les atomes de silicium sont restés à la surface des substrats. Les valeurs calculées sont récapitulées dans le Tableau III-12.

**Tableau III-12 : Masse molaire de l'organosilane (g/mol),  $\Delta m_{2total}$  (%),  $\Delta m_{org}$  (%), densité surfacique en  $\text{g}/\text{m}^2$  et en  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  des poudres d'HA et de SiHA greffées ( $SSA_{HA} = 7,0 \text{ m}^2/\text{g}$  et  $SSA_{SiHA} = 16,1 \text{ m}^2/\text{g}$ )**

Echantillons	Type de greffage	Masse molaire de l'organosilane (g/mol)	$\Delta m_{2total}$ (%)	$\Delta m_{org} = \Delta m_{2total} - \Delta m_{2Réf}$	Densité surfacique en $\text{g}/\text{m}^2$	Densité surfacique ( $d_s^{ATG}_{(exp)}$ ) en $\mu\text{mol}/\text{m}^2$
HA-M	1 bras	88	0,4	0,25	$4 \times 10^{-4}$	5
HA-D	1 bras	118	1,2	1,05	$15 \times 10^{-4}$	13
	2 bras	73				21
HA-T	1 bras	148	1,8	1,65	$24 \times 10^{-4}$	16
	2 bras	103				23
	3 bras	58				41
SiHA-M	1 bras	88	0,8	0,6	$4 \times 10^{-4}$	5
SiHA-D	1 bras	118	1,3	1,1	$7 \times 10^{-4}$	6
	2 bras	73				10
SiHA-T	1 bras	148	1,3	1,1	$7 \times 10^{-4}$	5
	2 bras	103				7
	3 bras	58				12

Avec les organosilanes D et T, la densité surfacique est plus importante pour l'HA que pour la SiHA. Bien que les évolutions des densités surfaciques soient à prendre au conditionnel compte tenu de l'imprécision sur la détermination de  $\Delta m_{org}$ , on peut noter la tendance suivante : la quantité greffée sur HA est environ le double de celle sur SiHA. Dans le cas de l'organosilane monofonctionnel, la densité surfacique est égale à  $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  dans les deux cas. Ce résultat est cohérent avec le fait que l'organosilane M contient un seul groupement éthoxyle dans sa structure chimique qui va se condenser de la même façon à la surface d'HA et de SiHA puisque la présence du silicium dans la structure apatite ne modifie pas les nombres de sites accessibles au greffage. La densité surfacique ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) des molécules d'organosilanes dépend de la fonctionnalité des organosilanes et de la nature du substrat. Pour les poudres d'HA et de SiHA, la densité surfacique augmente avec la fonctionnalité de l'organosilane comme le montre le Tableau III-12. Plus le nombre de groupements hydrolysables dans la structure de l'organosilane est important, la quantité greffée à la surface sera plus grande.

#### **III.2.4.2. Analyse élémentaire du carbone**

Les résultats des analyses élémentaires de carbone sur les différentes poudres, avant et après greffage, sont présentés à la Figure III-25. Afin de remonter à la quantité de carbone réelle due aux organosilanes, les taux de carbone des échantillons références ( $0,09 \text{ mg}/\text{m}^2$  pour HA-Réf et  $0,05 \text{ mg}/\text{m}^2$  pour SiHA-Réf) sont soustraits aux pourcentages massiques des poudres greffées qui sont présentés sur la Figure III-25. Les organosilanes possèdent des atomes de carbone dans leur structure moléculaire, l'évaluation des pourcentages massiques de carbone permet de remonter à la densité de molécules d'organosilanes à la surface ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ). La quantité de carbone (en  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) de poudre est calculée pour chaque échantillon à partir des pourcentages massiques obtenus (Figure III-25). Ce calcul est effectué en divisant les pourcentages massiques de carbone obtenus par les surfaces spécifiques SSA des poudres ( $SSA_{HA} = 7,0 \text{ m}^2/\text{g}$  et  $SSA_{SiHA} = 16,1 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

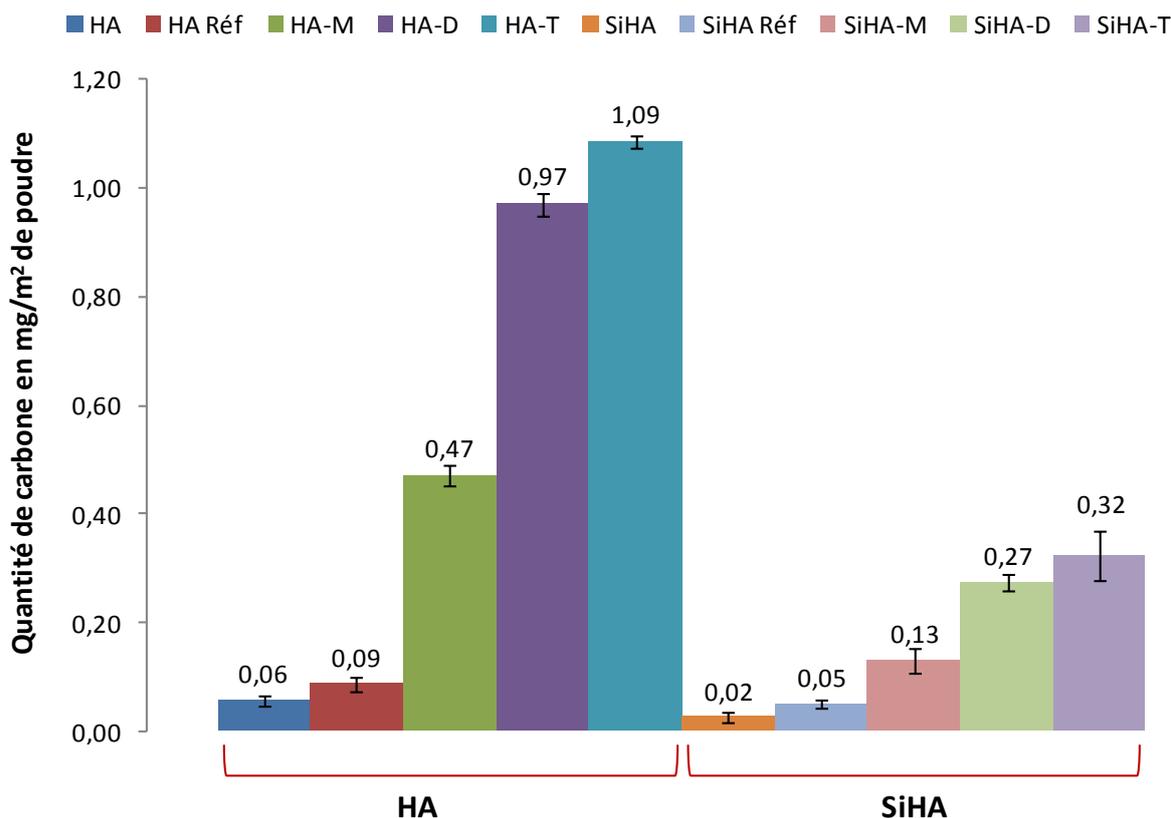


Figure III-25 : Quantités de carbone en mg/m<sup>2</sup> obtenues pour les poudres d'HA et de SiHA avant et après greffage des organosilanes

Pour les poudres d'HA et de SiHA qui ont subi les mêmes traitements expérimentaux que les poudres greffées mais sans addition des organosilanes (HA-Réf et SiHA-Réf), les quantités de carbone en mg/m<sup>2</sup> sont plus importantes que celles des poudres de départ. En passant de l'HA à l'HA-Réf, la quantité de carbone augmente de 0,06 mg/m<sup>2</sup> à 0,09 mg/m<sup>2</sup> et de 0,02 mg/m<sup>2</sup> à 0,05 mg/m<sup>2</sup> pour SiHA-Réf. Ces variations peuvent être attribuées à la présence des résidus de carbone à la surface des poudres due au traitement des poudres avec les solvants organiques (toluène, éthanol). En effet, les analyses TG/SM des poudres de référence (Figure III-13 et Figure III-14) ont montré la présence des pertes de masses (m/e = 44, 45) dues à la carbonatation des poudres et à des résidus carbonés des solvants dans la zone 1. C'est pourquoi ces pourcentages massiques en carbone ont été soustraits à ceux des poudres greffées.

Dans le cas des poudres d'HA greffées, les quantités de carbone mesurées pour HA-M, HA-D et HA-T sont respectivement 0,47, 0,97 et 1,09 mg/m<sup>2</sup>. La teneur en carbone augmente avec la fonctionnalité des organosilanes. Ces mêmes évolutions sont observées dans le cas des poudres SiHA. En passant de SiHA-M à SiHA-D et SiHA-T, les quantités de carbone mesurées sont respectivement 0,13, 0,27 et 0,32 mg/m<sup>2</sup>.

Quel que soit l'organosilane, les substrats en HA présentent des quantités de carbone plus importantes que les substrats en SiHA. Pour HA-M, la quantité de carbone est de  $0,47 \text{ mg/m}^2$  alors qu'elle est de  $0,13 \text{ mg/m}^2$  pour SiHA-M. Les poudres HA-D ont une quantité de carbone égale à  $0,97 \text{ mg/m}^2$  et celle de SiHA-D de  $0,27 \text{ mg/m}^2$ . Les poudres greffées par l'organosilane T montrent une quantité de carbone de l'ordre de  $1,09 \text{ mg/m}^2$  pour HA-T et  $0,32 \text{ mg/m}^2$  pour SiHA-T. Pour tous les échantillons greffés, le rapport quantité de carbone (HA)/quantité de carbone (SiHA) est de l'ordre de 3,6. La quantité du carbone liée aux organosilanes est nettement plus importante à la surface des poudres d'HA que de SiHA.

Le Tableau III-13 récapitule les valeurs des densités massiques ( $\mu\text{mol/g}$ ) et surfaciques ( $\mu\text{mol/m}^2$ ) des molécules d'organosilanes présentes à la surface des substrats. Ces densités sont calculées de façon théorique et expérimentale, les détails des calculs sont expliqués ci-dessous.

#### ➤ Calculs théoriques

Les valeurs calculées théoriquement sont basées sur le nombre de moles de sites de greffage pour 1g de poudre ( $n_{\text{X-OH}} = 3,8 \times 10^{-6} \text{ mol}$  pour HA et  $8,6 \times 10^{-6} \text{ mol}$  pour SiHA ; voir *paragraphe III.1.2*) en supposant que tous les sites puissent recevoir des molécules d'organosilanes. Le calcul est effectué en tenant compte de toutes les possibilités, du nombre maximum et minimum de bras impliqués dans le greffage de l'organosilane. Pour HA-M et SiHA-M, la densité massique en  $\mu\text{mol/g}$  maximum pour une monocouche est égale à  $n_{\text{X-OH}}$  car cet organosilane ne peut se greffer que par une seule liaison suite à l'hydrolyse de sa fonction éthoxyle. Pour les organosilanes D et T, la densité massique ( $d_{\text{m(théo)}}$ ) en  $\mu\text{mol/g}$  est calculée en divisant  $n_{\text{X-OH}}$  par un, deux ou trois suivant que l'organosilane se greffe par une, deux (cas de T et D) ou trois chaînes éthoxyles (cas de T uniquement). Enfin, la densité surfacique ( $d_{\text{s(théo)}}$ ) en  $\mu\text{mol/m}^2$  est calculée en divisant la densité massique en  $\mu\text{mol/g}$  par la surface spécifique de la poudre ( $SSA_{\text{HA}} = 7,0 \text{ m}^2/\text{g}$  et  $SSA_{\text{SiHA}} = 16,1 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

#### ➤ Calculs expérimentaux

Les calculs expérimentaux de la densité surfacique ( $\mu\text{mol/m}^2$ ) se basent sur les résultats des analyses élémentaires de carbone et sont présentés dans le Tableau III-13. Dans un premier temps, la masse molaire de la partie organique greffée de l'organosilane est calculée selon les nombres de chaînes éthoxyles impliquées dans le greffage, c'est-à-dire les nombres des fonctions éthoxyles perdues. Afin de s'affranchir de la carbonatation initiale des poudres et

des traces de solvant, les pourcentages massiques en carbone des échantillons de référence ( $\%mC_{\text{Réf}}$ ) sont soustraits (0,05% pour HA-Réf et 0,08% pour SiHA-Réf). Les pourcentages obtenus ( $\%mC_{\text{corr}}$ ) sont divisés par 100 afin d'obtenir les fractions massiques correspondantes.

La densité massique ( $d_{m(\text{exp})}$ ) en  $\mu\text{mol/g}$  est calculée selon l'Expression III-3 tel que  $M_C$  représente la masse molaire de carbone (12 g/mol) et  $n_C$  est le nombre des atomes de carbone dans la partie organique greffée de l'organosilane. La densité surfacique ( $d_{s(\text{exp})}$ ) en  $\mu\text{mol/m}^2$  est ensuite déterminée en divisant la densité massique en  $\mu\text{mol/g}$  par la surface spécifique des poudres.

$$\text{Densité massique} = \frac{\text{fraction de masse de carbone}}{M_C \times n_C} \times \frac{1}{10^{-6}}$$

**Expression III-3 : Calcul de la densité massique en  $\mu\text{mol/g}$**

Quel que soit les cas, les densités surfaciques ( $d_{s(\text{exp})}$ ) déterminées expérimentalement sont plus grandes que celles calculées théoriquement ( $d_{s(\text{théo})} = 0,2$  à  $0,5 \mu\text{mol/m}^2$ ). Les valeurs expérimentales obtenues ( $d_{s(\text{exp})}$ ) varient de 2 à  $30 \mu\text{mol/m}^2$ . Ces résultats montrent qu'il y a beaucoup plus de molécules à la surface que prévu par le calcul théorique pour un greffage covalent à partir des sites X-OH. Par rapport aux calculs théoriques, les densités surfaciques expérimentales pour HA sont plus importantes (facteur  $\sim 20/30$ ) que pour SiHA (facteur  $\sim 10/20$ ). Cet excès d'organosilanes peut être attribué à des réactions de polymérisation en surface des organosilanes (homocondensation) aboutissant à la formation d'un réseau en 3D. Comme c'est déjà présenté par la technique TG, la densité surfacique augmente avec la fonctionnalité de l'organosilane sur les deux substrats (HA et SiHA) et elle est plus importante à la surface d'HA que pour SiHA.

Au-delà des tendances entre les résultats par analyse carbone et par ATG qui sont similaires, le Tableau III-13 montre que les densités surfaciques expérimentales sont proches. Par exemple, pour HA-M la densité surfacique déterminée par analyse de carbone est égale à  $8 \mu\text{mol/m}^2$  et celle déterminée par l'analyse TG est de  $5 \mu\text{mol/m}^2$ . Ces similitudes sont observées pour tous les échantillons montrant la fiabilité des résultats obtenus.

Tableau III-13 : Calcul théorique et expérimental de la densité massique ( $\mu\text{mol/g}$ ) et surfacique ( $\mu\text{mol/m}^2$ ) des molécules d'organosilanes à la surface des poudres greffées. Le calcul est effectué à partir des résultats des pourcentages de carbone

Echantillons	Type de greffage	n(c) dans l'organosilane	Masse molaire de l'organosilane greffé (g/mol)	Calcul théorique		Calcul expérimental					Densité surfacique ( $\mu\text{mol/m}^2$ ) $d_s^{\text{ATG}}(\text{exp})$ par calcul TG
				Densité massique $d_m(\text{théo})$ ( $\mu\text{mol/g}$ )	Densité surfacique $d_s(\text{théo})$ ( $\mu\text{mol/m}^2$ )	% mC	% mC <sub>corr</sub> = % mC - % mC <sub>Réf</sub>	fraction de masse de carbone	Densité massique $d_m(\text{exp})$ ( $\mu\text{mol/g}$ )	Densité surfacique $d_s(\text{exp})$ ( $\mu\text{mol/m}^2$ )	
HA-M	1 bras	5	116	3,8	<b>0,5</b>	0,39%	0,34%	0,0034	57	<b>8</b>	<b>5</b>
HA-D	1 bras	6	146	3,8	<b>0,5</b>	0,74%	0,69%	0,0069	96	<b>14</b>	<b>13</b>
	2 bras	4	101	1,9	<b>0,3</b>				144	<b>21</b>	<b>21</b>
HA-T	1 bras	7	176	3,8	<b>0,5</b>	0,82%	0,76%	0,0076	90	<b>13</b>	<b>16</b>
	2 bras	5	131	1,9	<b>0,3</b>				126	<b>18</b>	<b>23</b>
	3 bras	3	86	1,3	<b>0,2</b>				211	<b>30</b>	<b>41</b>
SiHA-M	1 bras	5	116	8,6	<b>0,5</b>	0,30%	0,22%	0,0022	37	<b>2</b>	<b>5</b>
SiHA-D	1 bras	6	146	8,6	<b>0,5</b>	0,52%	0,44%	0,0044	61	<b>4</b>	<b>6</b>
	2 bras	4	101	4,3	<b>0,3</b>				92	<b>6</b>	<b>10</b>
SiHA-T	1 bras	7	176	8,6	<b>0,5</b>	0,60%	0,52%	0,0052	62	<b>4</b>	<b>5</b>
	2 bras	5	131	4,3	<b>0,3</b>				87	<b>5</b>	<b>7</b>
	3 bras	3	86	2,9	<b>0,2</b>				144	<b>9</b>	<b>12</b>

### **III.2.5. Discussion**

Le greffage des organosilanes (T, D, M) à la surface des substrats en HA et SiHA a été étudié par différentes techniques de caractérisation. Le but était de mettre en évidence le mode de greffage des organosilanes et d'estimer leur quantité à la surface des substrats.

Aucune différence notable de taille ou de forme de grains n'est observée entre les poudres d'HA et de SiHA non greffées, celles de référence et celles greffées avec l'organosilane. Les surfaces spécifiques (SSA) restent également inchangées. La présence d'organosilane à la surface des poudres n'a aucun impact sur les aspects morphologiques de celles-ci.

Les analyses par spectroscopie infrarouge (FTIR) effectuées sur les poudres d'HA et de SiHA greffées avec les organosilanes T, D, M ont montré la présence de ces derniers à leur surface. Qualitativement l'augmentation de la fonctionnalité de l'organosilane favorise la quantité greffée à la surface ce qui se traduit par une augmentation du rapport des bandes de vibration  $\nu_s\text{CH}_2(\text{NH}_2)/\nu_s\text{OH}$ . Ce rapport est également plus important à la surface des poudres de SiHA greffées que sur l'HA.

Les éléments caractéristiques des organosilanes (N et Si) sont détectés en XPS pour tous les échantillons greffés même si l'azote (N) n'est pas quantifiable dans les cas de HA-M et SiHA-M en raison de la faible quantité de l'organosilane M présente à la surface. Le calcium et le phosphore sont toujours quantifiables après greffage. Il est donc possible de conclure que le greffage des organosilanes ne recouvre pas tous les sites de greffage disponibles à la surface de deux substrats (HA, SiHA). Cela signifie, l'absence de formation d'une couche d'organosilane recouvrant totalement la surface des substrats. L'existence des liaisons covalentes P-O-Si n'est pas prouvée puisque aucune forte variation dans les énergies de liaison de P ou de Si n'est observée. Cela est attribué à la faible incidence de l'atome de silicium sur la position de l'énergie de la liaison P-O au niveau des pics P 2p<sub>3/2</sub> et P 2p<sub>1/2</sub> et réciproquement à la faible incidence de l'atome de phosphore sur la position de l'énergie de la liaison Si-O au niveau du pic Si 2p. Bien que l'analyse XPS des poudres n'ait pas montré la présence d'une liaison covalente P-O-Si entre les substrats et les organosilanes, le décapage ionique de la surface d'une pastille d'HA-T a permis de vérifier la présence des liaisons fortes entre les organosilanes et les substrats.

L'étude de l'azote (N) a montré la présence d'une contribution à  $399,5 \pm 0,1$  eV correspondant à une fonction  $\text{NH}_2$  et une contribution à  $401,4 \pm 0,2$  eV attribuée à un environnement chimique de type  $\text{NH}_3^+$  [194, 197, 205]. La présence de la contribution  $\text{NH}_3^+$  nécessite la présence de sites OH libres à la surface d'HA et de SiHA qui sont identifiés par XPS à 532,2 eV (en particulier dans le cas des substrats en HA). Dans les deux cas ( $\text{NH}_2$  ou  $\text{NH}_3^+$ ), les organosilanes peuvent être greffés d'une façon covalente ou adsorbés à la surface des substrats (voir paragraphe III.2.2.2.b).

L'étude de l'évolution des pourcentages atomiques des éléments chimiques à la surface des poudres a indiqué une diminution des pourcentages atomiques de l'atome d'oxygène (O 1s) après greffage, cela peut être expliqué par l'occupation des sites OH de la surface des substrats par des molécules d'organosilanes. L'augmentation des pourcentages atomiques de carbone (C 1s) après greffage est due à la structure chimique des organosilanes qui comporte des atomes de carbone.

Les analyses thermogravimétriques couplées à la spectrométrie d'émission de masse (TG/SM) ont montré que la dégradation thermique des chaînes organiques des organosilanes greffés s'effectue à des températures beaucoup plus importantes (300 à 540°C) que celles des organosilanes libres (avant 250°C). Cette technique montre que le phénomène d'adsorption des organosilanes à la surface des substrats est minoritaire (absence du signal caractéristique de la masse molaire totale des organosilanes). Ces observations confirment la présence d'une liaison forte entre les organosilanes et les substrats en HA et SiHA. Après greffage, les chaînes éthoxyles sont thermiquement plus stables que les chaînes amines. Cela est attribué à l'énergie de liaison Si-O (369 à 536 kJ/mol) [208-210, 214, 215] relativement plus importante que celle de Si-C (300 à 356 kJ/mol) [208, 213].

Les densités surfaciques ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) en organosilanes déterminées expérimentalement en se basant sur les analyses de carbone montrent des valeurs proches de celles calculées à partir des analyses thermogravimétriques. Les différences observées dans les valeurs ne sont pas significatives compte tenu de l'incertitude de deux mesures. Pour les deux approches, la densité surfacique augmente avec la fonctionnalité de l'organosilane sur les deux substrats (HA et SiHA) et est plus importante à la surface d'HA que pour SiHA. Par ailleurs, la quantification de la concentration des groupements amine supportés par l'organosilane T à la surface des substrats [216] a été effectuée par deux méthodes photométriques UV-Vis (méthode de Kaiser et méthode de l'induit). Les concentrations en groupements amines

mesurées pour les poudres SiHA-T ( $n_{\text{amine}} = 5,9 \times 10^{-6} \pm 7,5 \times 10^{-7}$  mol/g (méthode de l'induit) et  $6,3 \times 10^{-6} \pm 8,0 \times 10^{-7}$  mol/g (méthode de Kaiser)) et HA-T ( $n_{\text{amine}} = 1,9 \times 10^{-6} \pm 3,3 \times 10^{-7}$  mol/g (méthode de l'induit) et  $6,9 \times 10^{-6} \pm 2,4 \times 10^{-7}$  mol/g (méthode de Kaiser)) sont proches des concentrations théoriques ( $n_{\text{amine}} = 8,6 \times 10^{-6}$  mol/g (SiHA-T) et  $3,7 \times 10^{-6}$  mol/g (HA-T), voir paragraphe III.1.2). Les densités surfaciques ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) des organosilanes à la surface des poudres (HA-T et SiHA-T) déterminées par les méthodes de Kaiser et de l'induit sont récapitulées dans le Tableau III-14.

**Tableau III-14 : Densités surfaciques ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) d'organosilanes déterminées par les méthodes de Kaiser et de l'induit en divisant  $n_{\text{amine}}$  par les surfaces spécifiques des poudres ( $\text{SSA}_{\text{HA}} = 7,0 \text{ m}^2/\text{g}$  et  $\text{SSA}_{\text{SiHA}} = 16,1 \text{ m}^2/\text{g}$ )**

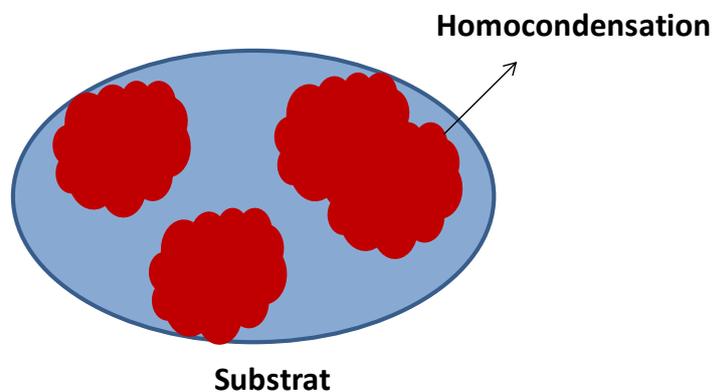
	Méthode de Kaiser	Méthode de l'induit
Poudre HA-T	0,9	0,3
Poudre SiHA-T	0,4	0,4

La méthode de Kaiser montre que la densité surfacique à la surface d'HA-T est deux fois plus grande que celle de SiHA-T. La méthode de l'induit présente des densités similaires dans les deux cas. Les valeurs des densités obtenues par ces deux méthodes de quantification sont plus faibles que celles déterminées par les analyses de carbone et thermogravimétrie (Tableau III-13). Les valeurs des densités déterminées par les méthodes de Kaiser et de l'induit sont respectivement : 0,9 (HA-T) / 0,4 (SiHA-T) et 0,3 (HA-T) / 0,4 (SiHA/T)  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  alors qu'elles varient entre 13 et 30 (HA-T) / 4 et 9 (SiHA-T)  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  pour les analyses de carbone et 16 à 41 (HA-T) / 5 et 12 (SiHA-T)  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  pour les analyses thermogravimétriques. Les faibles valeurs des densités surfaciques obtenues par les méthodes de Kaiser et de l'induit [216] sont dues au fait que ces deux techniques quantifient seulement les groupements amines libres ( $\text{NH}_2$ ) alors que les analyses élémentaire de carbone et thermogravimétrie quantifient les molécules d'organosilanes quelle que soit la forme de la fonction amine ( $\text{NH}_2$  et  $\text{NH}_3^+$ ). La présence des groupements amine ( $\text{NH}_2$ ) libres est importante dans notre cas afin de les utiliser comme site d'ancrage pour les molécules biologiques.

La densité surfacique d'organosilanes ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) dépend de la fonctionnalité de l'organosilane et de la nature du substrat. L'évolution de cette densité peut être reliée au nombre de groupements éthoxyyles impliqués dans la réaction de greffage. Dans le cas des organosilanes difonctionnel et trifonctionnel, le nombre des groupements éthoxyyles impliqués dans la réaction de greffage dépend de la nature du substrat. La présence du silicium dans la structure du substrat augmente le nombre des groupements éthoxyyles impliqués dans la

réaction de greffage ce qui limite la quantité greffée. On peut expliquer la différence dans le mode de greffage de l'organosilane difonctionnel et trifonctionnel à la surface d'HA et de SiHA par les propriétés des sites de greffage existant à la surface. Les sites de greffage Si-OH à la surface de SiHA seraient plus réactifs que les sites P-OH. Ils auraient plus d'affinité pour les groupements éthoxyles hydrolysables des organosilanes difonctionnel et trifonctionnel ce qui aboutit à cette différence dans le mode de greffage et par conséquent de la densité surfacique. De même, elle est plus importante à la surface d'HA comparée à celle de SiHA.

L'architecture générale des organosilanes (Figure III-26) à la surface des substrats semble être une couche non homogène qui recouvre partiellement la surface sur laquelle d'autres couches peuvent se former grâce à une réaction d'homocondensation (polymérisation).



**Figure III-26 : Architecture générale des organosilanes à la surface des substrats**

### III.3. Caractérisation des substrats greffés : répartition spatiale des organosilanes

La répartition spatiale des molécules d'organosilanes est étudiée sur des pastilles en HA et SiHA. Les techniques de caractérisation permettant d'évaluer la répartition spatiale de molécules organiques à la surface d'un substrat ne sont pas applicables sur des poudres. Cette étude est donc réalisée sur des pastilles denses à l'aide de deux techniques complémentaires :

- La microscopie à force atomique pour déterminer la topographie de la surface
- Les essais de mouillabilité pour déterminer l'énergie de surface.

#### III.3.1. Microscopie à force atomique (AFM)

Afin d'étudier l'impact sur la topographie des traitements expérimentaux (polissage, passage dans le solvant et greffage des organosilanes), les valeurs de la rugosité de surface ( $S_a$ ) sont représentées sur la Figure III-27. Elles sont calculées à partir des images AFM ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ) effectuées sur des pastilles non polies (Figures III-28 et III-29) et polies (Figures III-30 et III-31).

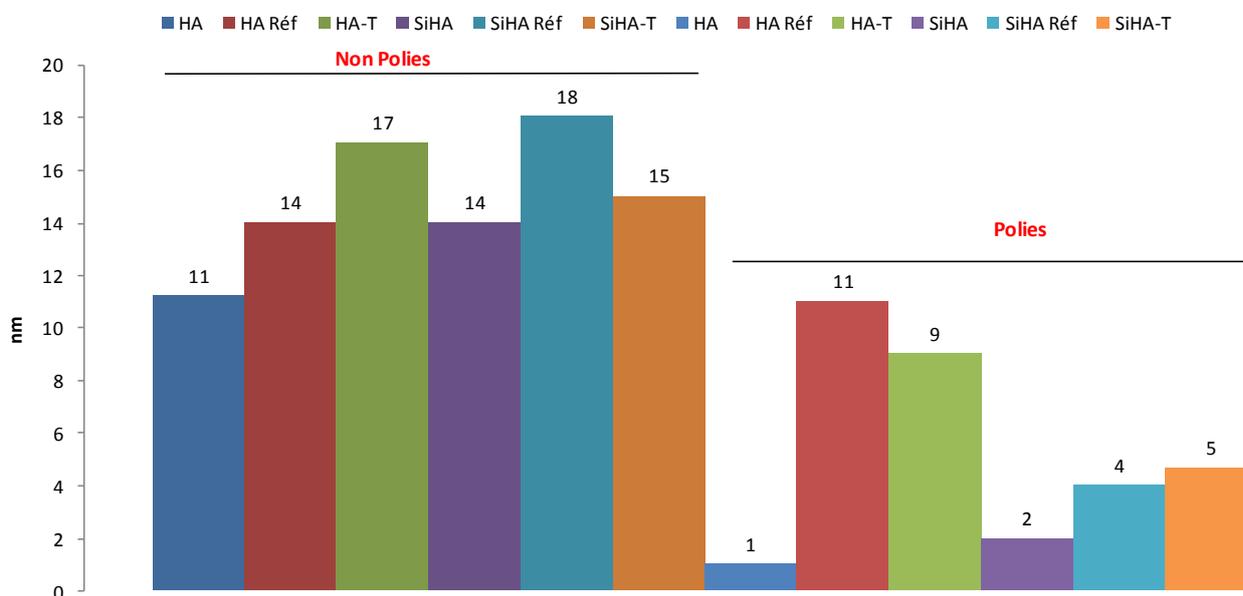


Figure III-27 : Variations de la rugosité de surface  $S_a$  à la surface des pastilles non polies et polies en HA et SiHA avant et après greffage avec l'organosilane T (les valeurs indiquées sur la figure correspondent à  $S_a$ )

La rugosité surfacique ( $S_a$ ) des pastilles non polies en HA et SiHA est respectivement de 11 et 14 nm. Les images AFM (Figure III-28-a et b) et les profils de rugosité (Figure III-29-a et b) montrent clairement les joints de grains existant à la surface des pastilles. L'échelle de hauteur montre une amplitude totale de surface maximale de 130 nm pour HA et de 110 nm pour SiHA, les deux matériaux présentent donc des topographies de surface similaires.

Les pastilles de référence (HA-Réf et SiHA-Réf) sont traitées avec le protocole de greffage mais sans addition de l'organosilane T (solvant : toluène anhydre, immersion = 3 h à 90°C puis 12 h à 60°C, lavage = éthanol technique non dénaturé). Les rugosités surfaciques ( $S_a$ ) des pastilles non polies d'HA-Réf et de SiHA-Réf sont respectivement 14 et 18 nm (Figure III-27). La rugosité des échantillons de référence (HA-Réf et SiHA-Réf) est très légèrement supérieure à celle des pastilles brutes de frittage. Les images AFM des pastilles de référence (voir flèches sur Figure III-28-c et d) et les profils de rugosité (Figure III-29-c et d) montrent la présence des grains de faible taille sur la surface. Ces zones claires sont dues à la présence des sommets (Figure III-29-c et d). L'échelle des hauteurs qui accompagne les images montre une variation de l'amplitude totale de surface jusqu'à 130 nm pour la pastille HA-Réf (Figure III-28-c) et 220 nm pour la pastille SiHA-Réf (Figure III-28-d). Le traitement des pastilles dans les solvants modifie donc faiblement la topographie de surface.

Après le greffage de l'organosilane T, la rugosité surfacique ( $S_a$ ) pour les pastilles non polies est de 17 nm pour HA-T, et de 15 nm pour SiHA-T. Les images AFM de la pastille non polie et greffée HA-T et SiHA-T (Figure III-28-e et f) présentent également des zones claires correspondant à des protubérances présentes à la surface des pastilles. Les profils de rugosité (Figure III-29-e et f) ne sont toutefois pas clairement différents de ceux enregistrés pour les pastilles brutes ou non greffées. Toutes, les pastilles montrent des surfaces ayant des topographies accidentées qui se traduisent sur les profils par la présence de plusieurs sommets avec de fortes variations d'amplitude totale. Ces variations de rugosité ne permettent pas de localiser les organosilanes à la surface des pastilles en HA et SiHA non polies.

Pour les pastilles polies en HA et SiHA (Figure III-27), les rugosités surfaciques sont de l'ordre de 1 et 2 nm. La topographie de surface (Figure III-30-a et b) et les profils de rugosité (Figure III-31-a et b) montrent que les joints de grains ne sont plus visibles à la surface. Cela est attribué au polissage, l'échelle de hauteur montre une amplitude totale de surface maximale de 18 nm et de 16 nm respectivement pour HA et SiHA. Les topographies de surface sont similaires pour les deux matériaux.

Les pastilles polies d'HA-Réf et SiHA-Réf présentent des rugosités surfaciques ( $S_a$ ) de 11 et 4 nm (Figure III-27). La rugosité des échantillons (HA-Réf et SiHA-Réf) est très légèrement plus importante que celle des substrats polis. L'amplitude totale maximale de surface est de 130 nm pour HA-Réf (Figure III-30-c) et 80 nm pour SiHA-Réf (Figure III-30-d). Après le greffage de l'organosilane T, la rugosité surfacique est de 9 nm pour HA-T, et de 5 nm pour SiHA-T (Figure III-27). La Figure III-31 montre les profils de rugosité des échantillons polis. En présence d'organosilane, les profils deviennent plus lisses avec une modification de rugosité et de la topographie de surface. Pour les pastilles greffées polies, on remarque la présence des grains (protubérances) à leur surface et une amplitude maximale de 110 nm pour HA-T et 55 nm pour SiHA-T inférieure à celle des échantillons HA-Réf et SiHA-Réf. Ces grains visibles sur les images AFM (Figure III-30-e et f) sont de taille et de morphologies différentes de ceux observés sur HA-Réf et SiHA-Réf. Ils pourraient être représentatifs de petits amas d'organosilane. De plus, la distribution non cohérente de ces amas permettrait de supposer que l'organosilane T est réparti d'une façon non homogène à la surface des pastilles.

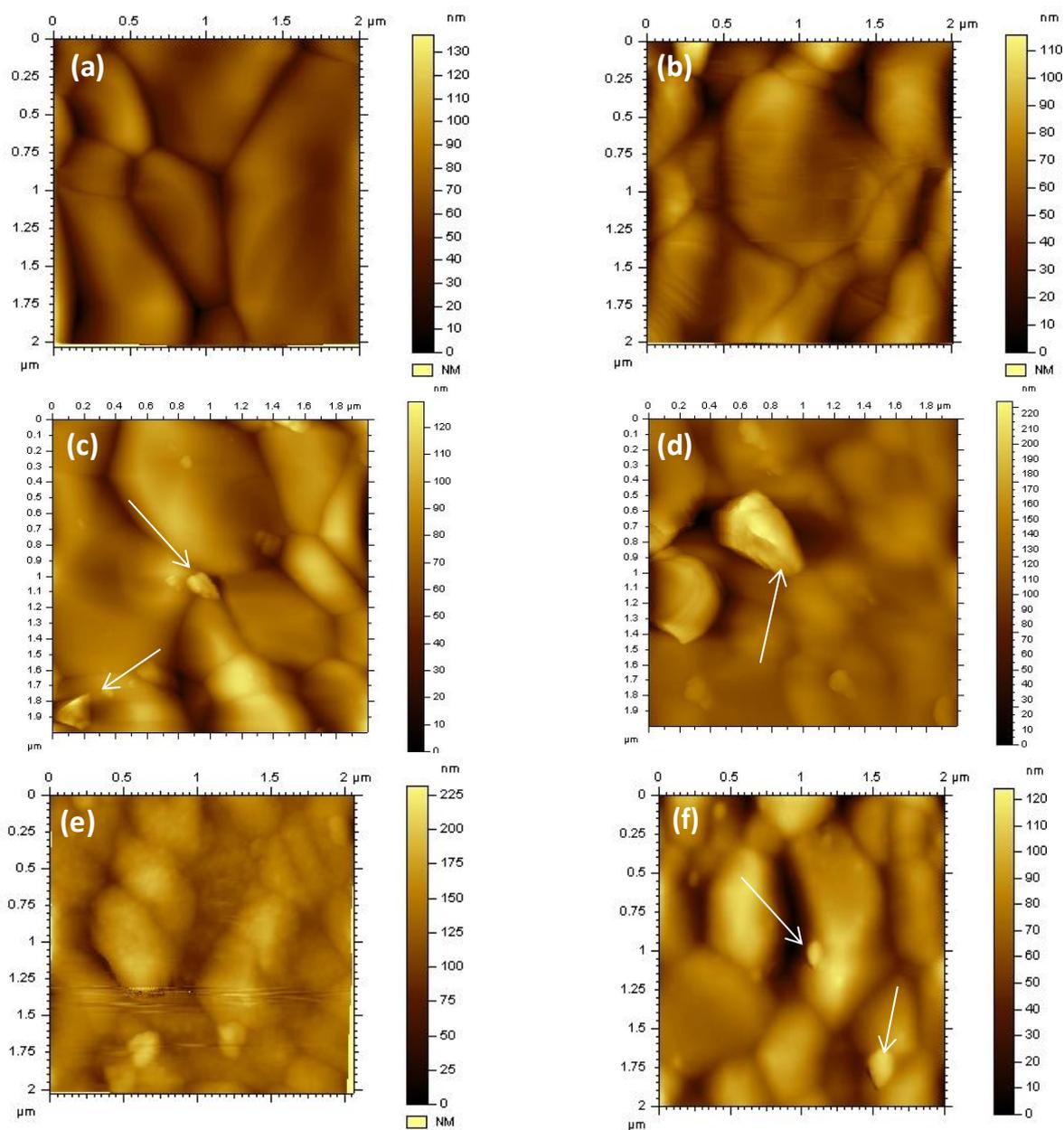


Figure III-28 : Images topographiques en AFM de la surface des pastilles non polies : (a) HA non greffée, (b) SiHA non greffée, (c) HA-Réf, (d) SiHA-Réf, (e) HA-T, (f) SiHA-T

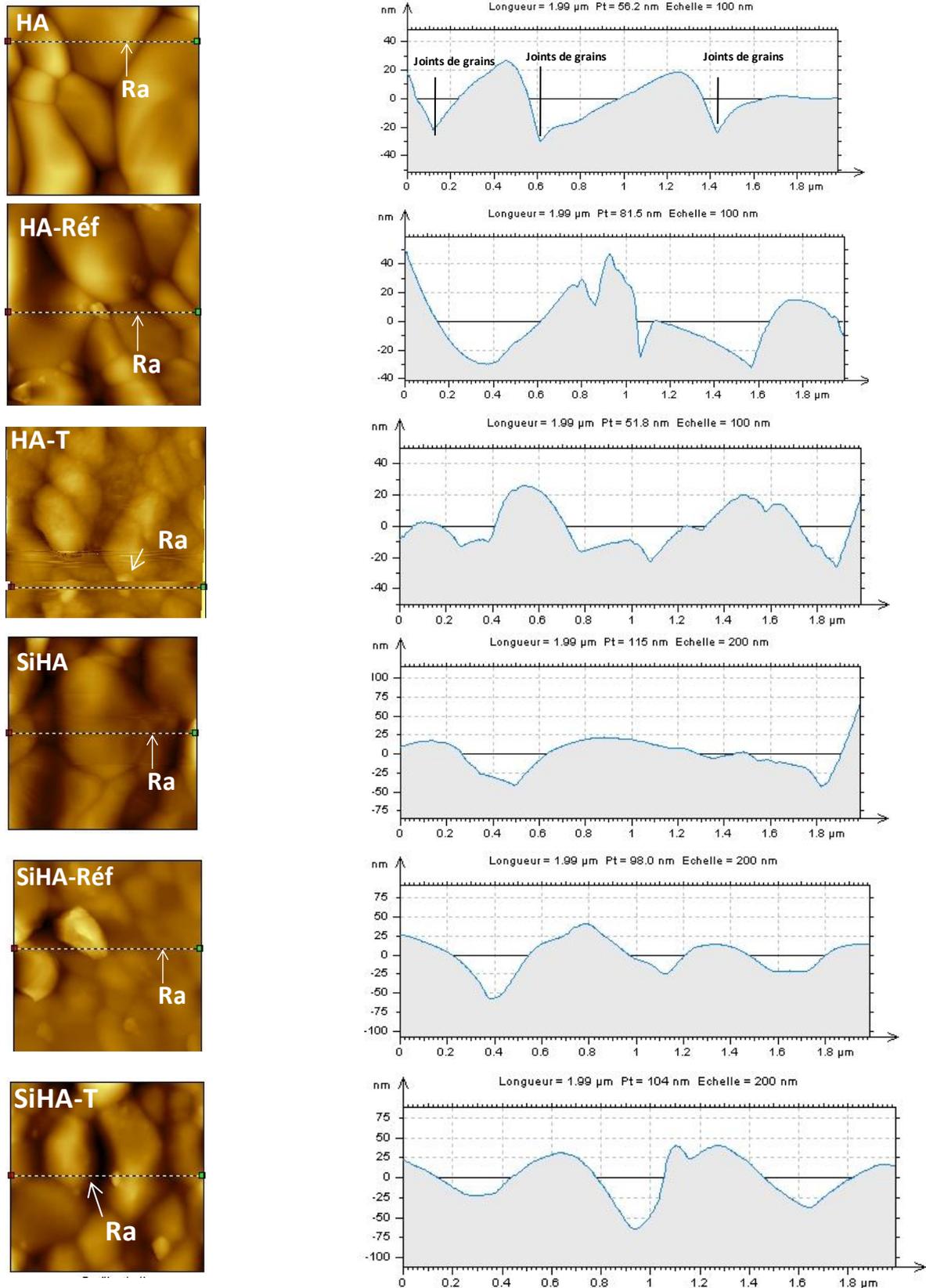


Figure III-29 : Exemples de profils de rugosité pour les pastilles non polies

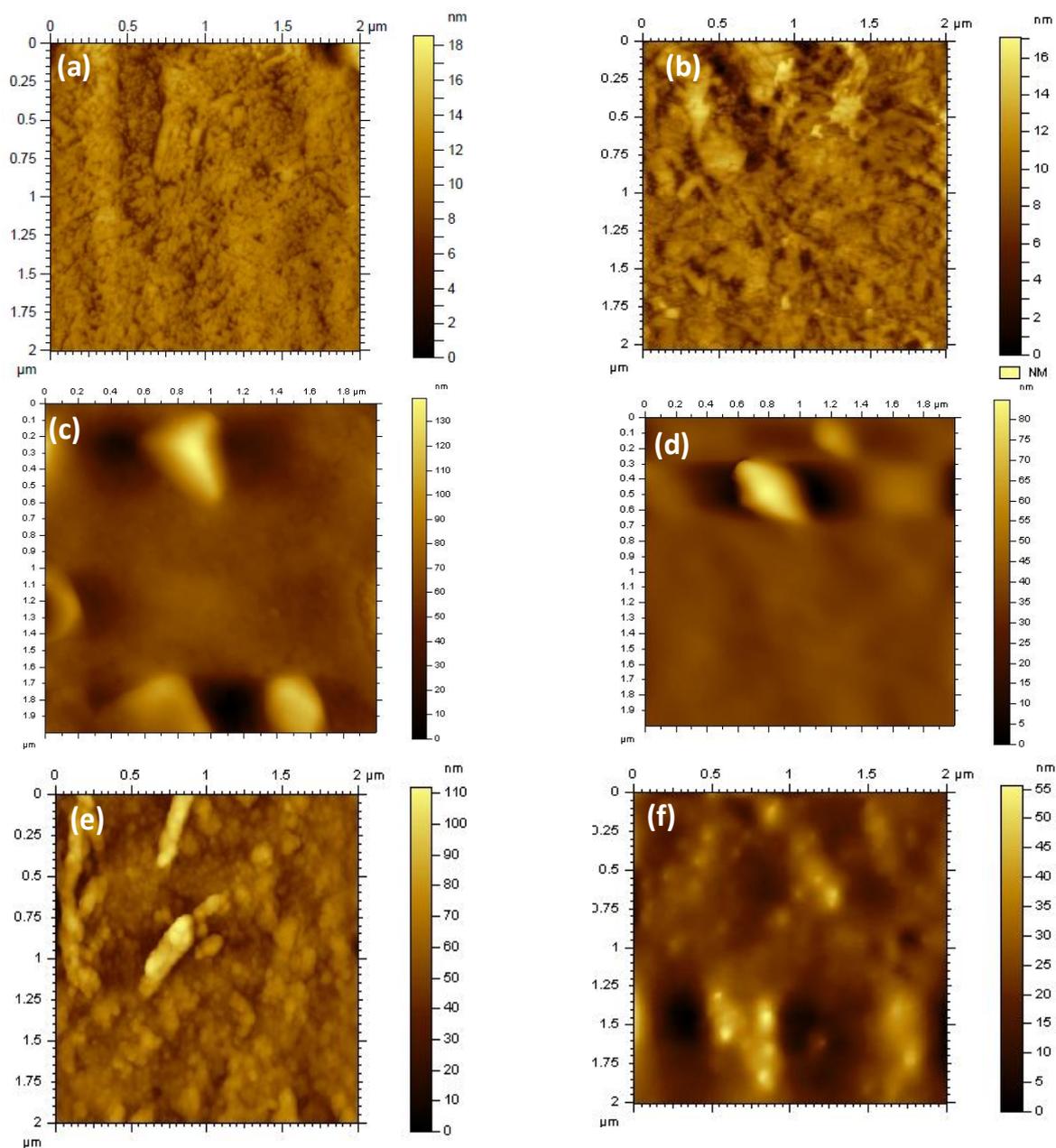


Figure III-30 : Images topographiques en AFM de la surface des pastilles polies : (a) HA non greffée, (b) SiHA non greffée, (c) HA-Réf, (d) SiHA-Réf, (e) HA-T, (f) SiHA-T

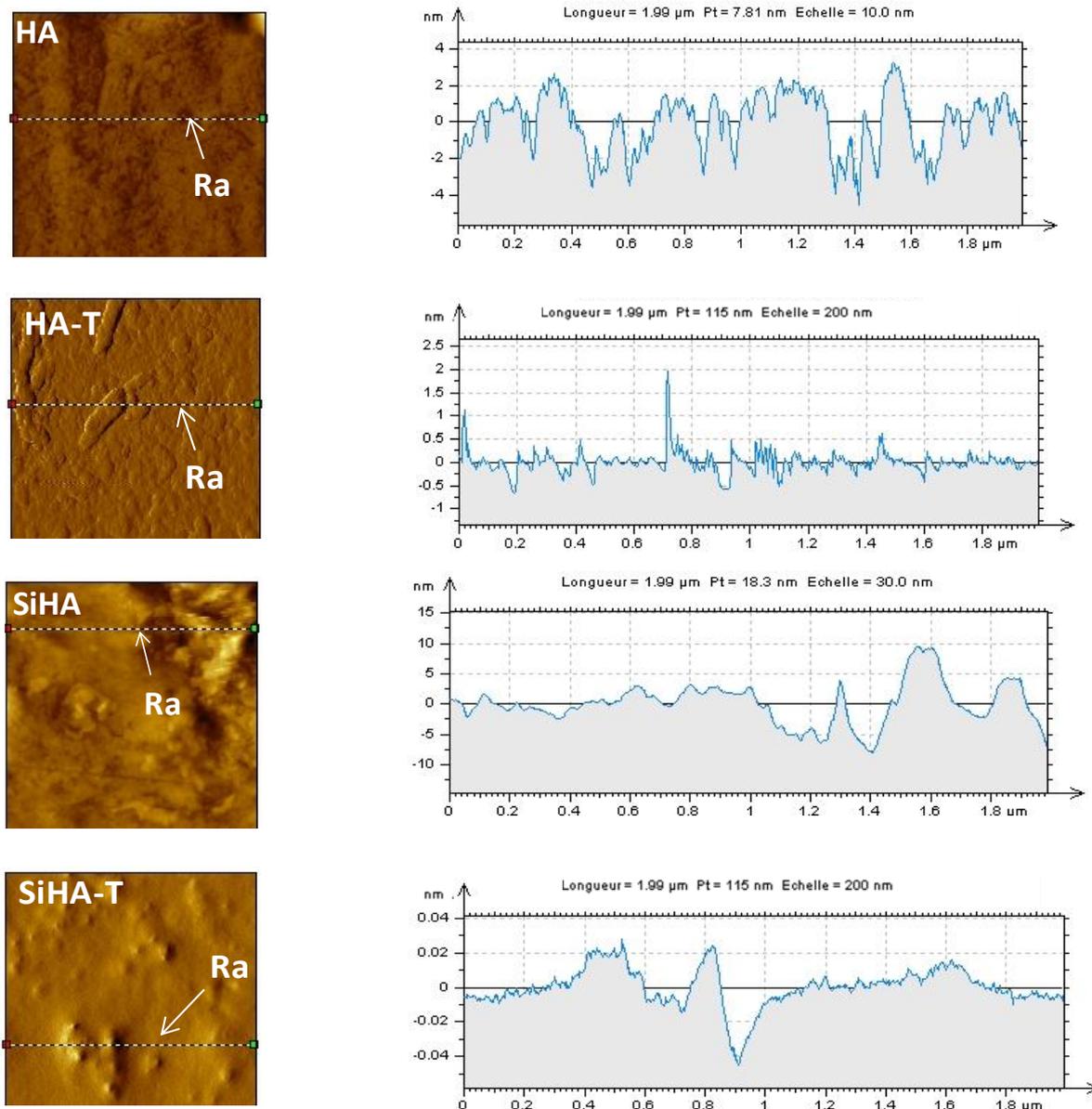


Figure III-31 : Exemples de profils de rugosité pour les pastilles polies

### III.3.2. Etude de l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) par analyse de l'angle de contact

L'adhérence de bactéries ou de macromolécules biologiques telles que les protéines à la surface d'un biomatériau est principalement attribuée aux propriétés hydrophobes/hydrophiles du substrat. De plus, la mouillabilité est un facteur critique dans l'immobilisation des cellules biologiques [217, 218]. L'adhésion des protéines et des bactéries diffère en fonction de la mouillabilité de la surface. Des études *in vitro* ont montré une réponse cellulaire favorable avec les surfaces hydrophiles due à une meilleure adsorption des protéines [218].

Les paramètres de surface (chimie, texturation, rugosité) jouent un rôle essentiel dans les propriétés de mouillabilité. Rosenman *et al.* [219] ont développé une nouvelle méthode de modification de la mouillabilité de l'hydroxyapatite (HA) dans une large gamme d'angles de contact ( $\theta = 10$  à  $100^\circ$ ) par la modulation de la texturation de la surface. Les mesures d'angle de contact obtenues ont montré que l'irradiation de la surface d'HA par un faisceau d'électrons conduit à une variation du potentiel de surface entraînant une modification de la mouillabilité de ce matériau avec l'eau. La mouillabilité d'un support solide peut également être modifiée par traitement chimique de sa surface, par exemple en le fonctionnalisant par des molécules ayant des propriétés chimiques différentes.

Les études de l'influence d'un groupement fonctionnel terminal d'une monocouche auto-assemblée d'organosilanes sur la mouillabilité de surface montrent que le caractère hydrophobe de la surface peut être contrôlé avec précision. Les monocouches auto-assemblées ayant des groupements fonctionnels terminaux polaires (acide carboxylique, amine, hydroxyle,...) sont mouillées par l'eau (hydrophile). Celles qui présentent des groupements terminaux non polaires (méthyle) ne sont pas mouillées par l'eau (hydrophobe) [217]. Les organosilanes utilisés dans ce travail (T, D et M) présentent des groupements terminaux polaires de type amine. La variation de la mouillabilité de surface après greffage, permet de confirmer la présence et l'architecture (couche mince, orientation des fonctions amines) des organosilanes à la surface du substrat. Dans cette optique, la détermination de l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) pour un substrat silanisé permet de vérifier la présence des organosilanes à la surface du substrat.

D'un point de vue fondamental, la description du phénomène de mouillabilité repose essentiellement sur la nature des interactions qui s'établissent entre un liquide et une surface solide. Les phénomènes de surfaces trouvent leur origine dans les interactions moléculaires prenant place aux interfaces. Les forces interfaciales proviennent des forces de Van der Waals d'origine dispersive (Interactions de London : champ induit) ou polaire (Interactions de Debye : effet inducteur, interactions de Keesom : dipôle-dipôle) et dans les liaisons hydrogène. De ce fait, l'énergie de surface peut exprimer comme la somme de deux termes, l'un représentatif des contributions dispersives ( $\gamma^d$ ) et l'autre des contributions polaires ( $\gamma^p$ ) :

$$\gamma_s = \gamma^d + \gamma^p$$

**Expression III-4 : Calcul de l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) à partir de la contribution dispersive ( $\gamma^d$ ) et de la contribution polaire ( $\gamma^p$ )**

La Figure III-32 montre une goutte de liquide posée sur une surface solide. L'équilibre des forces au point A est donné par l'équation simplifiée de Young (Expression III-5) où  $\gamma_s$ ,  $\gamma_{sl}$ ,  $\gamma_l$  représentent respectivement l'énergie de surface du solide, l'énergie interfaciale solide-liquide et l'énergie de surface du liquide.

$$\gamma_s - \gamma_{sl} = \gamma_l \cdot \cos \theta$$

**Expression III-5 : Equation simplifiée de Young**

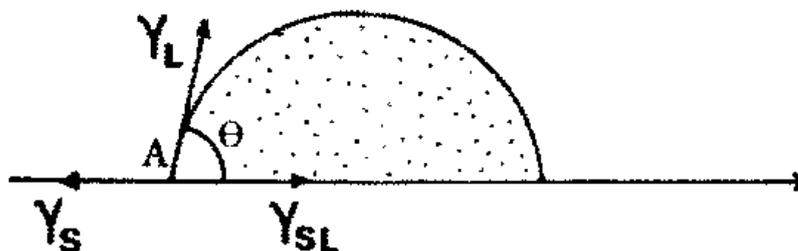


Figure III-32 : Forces appliquées sur une goutte de liquide posée sur un support solide

Lorsque  $\gamma_s > \gamma_{sl}$ , l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) est plus grande que celle de l'interface ( $\gamma_{sl}$ ) et donc la goutte va s'étaler à la surface. Si on reprend la formule de Young avec  $\gamma_l > 0$ , lorsque  $\gamma_s > \gamma_{sl}$  cela implique que  $\cos \theta > 0$  et l'angle  $\theta$  est comprise entre 0 et 90°. Dans le cas où l'angle de contact moyen d'un solvant à la surface d'un substrat est inférieur à 10°, la surface est désignée très mouillante. Si cet angle est inférieur à 90°, la surface est considérée comme mouillante. Dans le cas où  $\gamma_s < \gamma_{sl}$ , l'énergie de surface ( $\gamma_s$ ) est plus faible que celle de l'interface ( $\gamma_{sl}$ ) et donc la goutte se contracte à la surface. L'angle  $\theta$  est compris entre 90 et 180° ( $\cos \theta < 0$ ) et la surface est dite non mouillante. Plusieurs modèles sont rencontrés dans la littérature pour déterminer l'énergie de surface d'un solide. La relation d'Owens-Wendt (Expression III-6) [220, 221] permet de déterminer l'énergie de surface du solide  $\gamma_s$  à partir de mesure d'angle de contact effectuée avec des liquides connus de nature différente. Elle est utilisée dans le cas de surface polaire présentant des énergies de surfaces élevées (quelques dizaines de mN/m) [222].

$$\frac{(1 + \cos \theta) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}} = \sqrt{\gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_s^p} \times \frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$$

$$\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d \text{ et } \gamma_l = \gamma_l^p + \gamma_l^d$$

**Expression III-6: Relation générale d'Owens-Wendt.  $\gamma_s^p$ ,  $\gamma_s^d$ ,  $\gamma_l^p$  et  $\gamma_l^d$  sont les termes représentatifs des contributions des interactions dispersives et polaires et  $\theta$  représente l'angle de contact moyen entre un liquide (l) et une surface solide (s)**

Les analyses d'angle de contact sont effectuées à l'aide de trois solvants dont les composantes polaires et dispersives sont connues (Tableau III-15). On procède par régression linéaire à partir des données expérimentales afin de déterminer les composantes polaire ( $\gamma_s^p$ ) et dispersive ( $\gamma_s^d$ ) de la phase solide, en traçant la variation de l'expression  $\frac{(1+\cos \theta) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$  en

fonction de  $\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$ .

Cette équation peut s'écrire de la forme  $y = ax + b$  avec :

$$\bullet \quad y = \frac{(1 + \cos \theta) \times \gamma_l}{2 \sqrt{\gamma_l^d}} \qquad \bullet \quad a = \sqrt{\gamma_s^p}$$

$$\bullet \quad x = \frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}} \qquad \bullet \quad b = \sqrt{\gamma_s^d}$$

Les solvants utilisés dans ces travaux (eau, diiodométhane et éthylène glycol) ont des énergies de surface et des polarités différentes, ils se comportent donc différemment à la surface d'un substrat donné. Le Tableau III-15 regroupe leurs énergies de surface trouvées dans la littérature [223] ainsi que leur polarité, masse molaire (g/mol) et densité (g/cm<sup>3</sup>).

**Tableau III-15 : Caractéristiques des solvants utilisés pour la détermination de l'énergie de surface**

Solvants	Masse molaire (g/mol)	Densité (g/cm <sup>3</sup> )	Énergie de surface $\gamma_l$ (mN/m)	Terme dispersif $\gamma_l^d$ (mN/m)	Terme polaire $\gamma_l^p$ (mN/m)	Polarité
Eau (H <sub>2</sub> O)	18	1,0	72,0	21,3	50,7	polaire
Diiodométhane (CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub> )	268	3,3	50,3	49,9	0,4	apolaire
Éthylène glycol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )	62	1,1	48,4	29,3	19,1	polarité moyenne

Les valeurs des angles de contact enregistrés pour les pastilles polies en HA et SiHA avec les trois solvants sont récapitulées dans le Tableau III-16. Chaque valeur d'angle de contact représente la moyenne calculée sur 20 mesures effectuées à température ambiante et avec un temps de stabilisation de la goutte de l'ordre de 20 secondes. L'angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) est obtenu selon la relation suivante :

$$\theta_m = \frac{\theta_g + \theta_d}{2}$$

**Expression III-7 : Calcul de l'angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) à partir de l'angle de contact gauche ( $\theta_g$ ) et droit ( $\theta_d$ )**

Le Tableau III-17 regroupe les valeurs calculées pour chaque échantillon et chaque solvant afin de tracer la relation d'Owens-Wendt. Les graphiques résultants sont présentés sur la Figure III-33. Les termes représentatifs des contributions des interactions dispersives et polaires ( $\gamma_s^d$  et  $\gamma_s^p$ ) et l'énergie de surface des échantillons ( $\gamma_s$ ) calculée à partir des régressions linéaires sont récapitulés dans le Tableau III-18.

Tableau III-16 : Angles de contact moyens ( $\theta_m$  en  $^\circ$ ) obtenus à la surface des pastilles

Echantillons	Eau distillée	Diiodométhane	Ethylène glycol
	$\theta_m$	$\theta_m$	$\theta_m$
HA	62 ± 2	45 ± 1	51 ± 2
SiHA	52 ± 2	40 ± 1	43 ± 2
HA-M	80 ± 2	46 ± 1	54 ± 1
HA-D	86 ± 1	41 ± 1	55 ± 1
HA-T	88 ± 2	36 ± 1	54 ± 2
SiHA-M	64 ± 2	58 ± 1	51 ± 2
SiHA-D	76 ± 1	44 ± 1	47 ± 2
SiHA-T	69 ± 1	38 ± 1	50 ± 2

Tableau III-17 : Récapitulatif des valeurs de l'équation d'Owens-Wendt calculées pour les substrats en HA et en SiHA avant et après greffage

Solvants	Diiodométhane		Éthylène glycol		Eau	
Echantillons	$\frac{(1 + \cos \theta_m) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{(1 + \cos \theta_m) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{(1 + \cos \theta_m) \times \gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$	$\frac{\sqrt{\gamma_l^p}}{\sqrt{\gamma_l^d}}$
HA	0,19	0,2	0,23	0,8	0,36	1,5
SiHA	0,20		0,24			
HA-M	0,19		0,22			
HA-D	0,20		0,22			
HA-T	0,21		0,22			
SiHA-M	0,17		0,23			
SiHA-D	0,20		0,24			
SiHA-T	0,20		0,23			

Tableau III-18 : Terme des interactions polaires ( $\gamma_s^p$ ), terme des interactions dispersives ( $\gamma_s^d$ ) et énergie de surface ( $\gamma_s$ ) en mN/m des substrats en HA et en SiHA avant et après greffage

Echantillons	$a = \sqrt{\gamma_s^p}$	$\gamma_s^p$	$b = \sqrt{\gamma_s^d}$	$\gamma_s^d$	$\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$
HA	0,12	14	0,16	26	40
SiHA	0,15	23	0,16	26	48
HA-M	0,07	5	0,18	32	37
HA-D	0,05	3	0,19	36	39
HA-T	0,04	2	0,20	40	42
SiHA-M	0,13	17	0,14	20	37
SiHA-D	0,08	6	0,18	32	39
SiHA-T	0,09	8	0,18	32	41

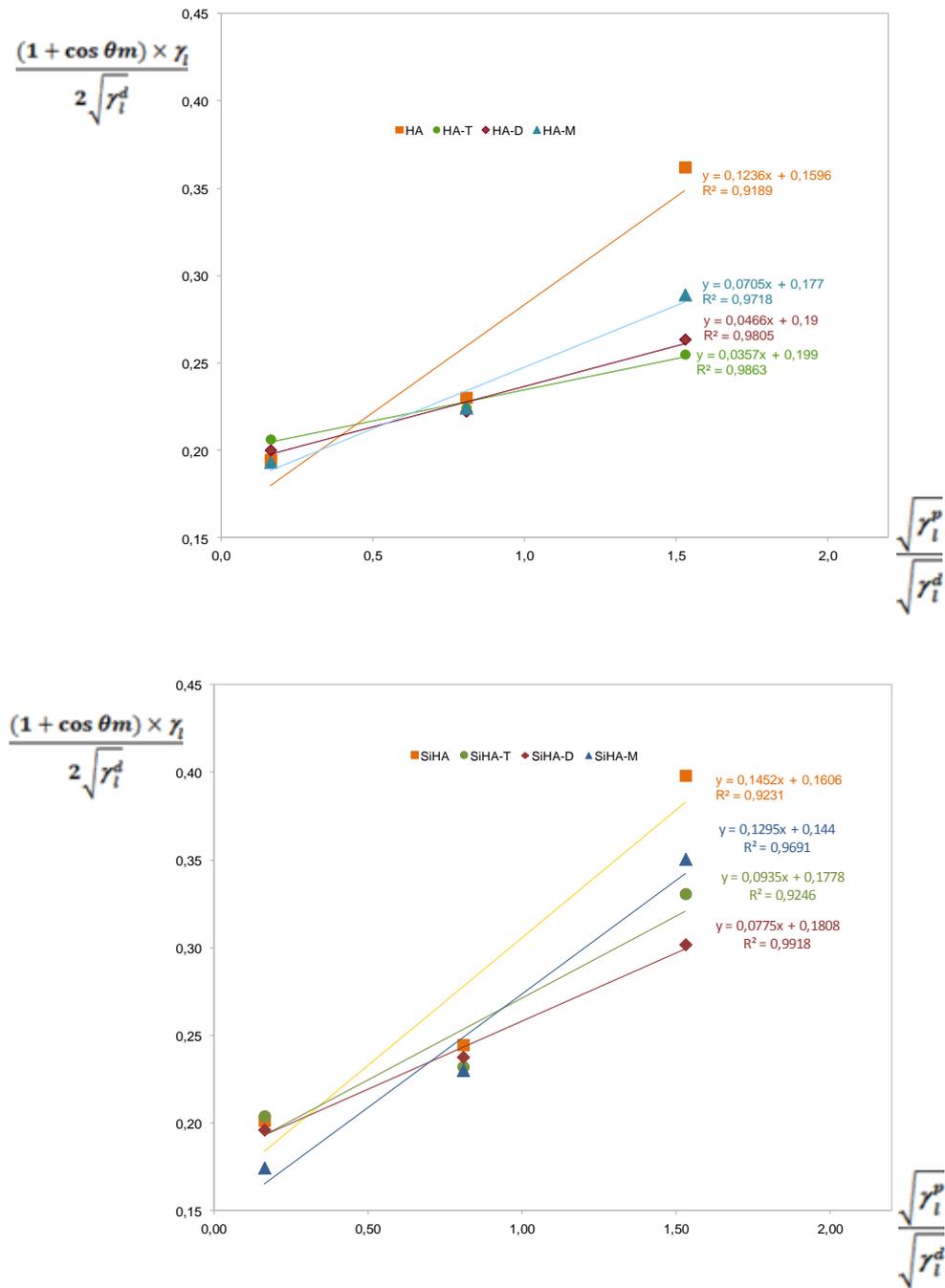


Figure III-33 : Représentations graphiques de la relation d'Owens-Wendt pour les substrats en HA et en SiHA avant et après greffage et équations de régression linéaire associées

Le Tableau III-16 montre que l'angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) obtenu à la surface des pastilles d'HA avec l'eau distillée est de l'ordre de  $62 \pm 2^\circ$ , indiquant que la surface des pastilles d'HA non greffées est hydrophile. Ce comportement est attribué aux liaisons hydrogène établies entre l'eau et les groupements hydroxyle (OH) existants à la surface des pastilles. Les forces associées à l'interaction de l'eau avec la surface sont alors plus grandes que les forces de cohésion de la goutte d'eau. Un angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) plus faible est obtenu dans le cas des pastilles en SiHA non greffées ( $\theta_m = 52 \pm 2^\circ$ ). Une étude effectuée par Vandiver *et al.* [224] sur des pastilles en SiHA et HA frittées à  $1200^\circ\text{C}/2$  h montre que les valeurs de l'angle de contact moyen obtenues avec l'eau distillé sont respectivement  $65 \pm 2^\circ$  ( $52 \pm 2^\circ$  dans notre cas) et  $75 \pm 2^\circ$  ( $62 \pm 2^\circ$  dans notre cas). Botelho *et al.* [220] ont étudié l'évolution de l'angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) des pastilles monophasées en HA et SiHA frittées à  $1300^\circ\text{C}/2$  heures. Les résultats obtenus avec l'eau distillée ont montré que l'angle de contact moyen des pastilles d'HA est de l'ordre de  $71,8 \pm 4,1^\circ$  ( $62 \pm 2^\circ$  dans notre cas). Pour SiHA, l'angle de contact moyen est diminué à  $64,9 \pm 6,1^\circ$  ( $52 \pm 2^\circ$  dans notre cas). Généralement, une différence de l'ordre de  $10^\circ$  est notée entre les valeurs obtenues dans la littérature [220, 224] et notre étude. Cela peut être attribué au traitement thermique des substrats qui diffèrent entre les études ainsi qu'au taux du silicium incorporé dans la structure apatite ( $x_{\text{Si}} = 0,28$  et  $0,53$  mol [220],  $x_{\text{Si}} = 0,18$  mol [224]). Quoiqu'il en soit, il est important de noter que la diminution de l'angle de contact moyen à la surface des pastilles de SiHA est remarquée dans tous les cas. La présence du silicium dans la structure apatite permet d'en augmenter l'hydrophilie. La diminution de l'angle de contact moyen en passant de l'HA au SiHA est due au fait que l'atome de silicium est plus facilement polarisable que l'atome de phosphore en raison d'un numéro atomique plus petit pour un même nombre des couches électroniques. Les poudres de SiHA possèdent un potentiel zêta ( $p\zeta = -30 \text{ mV} \pm 1,5$ ) légèrement inférieur à celui de l'HA ( $p\zeta = -27 \text{ mV} \pm 1,7$ ). Cette différence de potentiel zêta entre les deux substrats conduit à une surface de SiHA plus chargée présentant une affinité pour l'eau plus grande que celle de l'HA et donc plus hydrophile.

Les angles de contact obtenus avec l'éthylène glycol sont :  $\theta_{m\text{HA}} = 51 \pm 2^\circ$  et  $\theta_{m\text{SiHA}} = 43 \pm 2^\circ$  (Tableau III-16). La surface de SiHA garde toujours une mouillabilité plus importante que celle de l'HA.

Les angles de contact trouvés par Botelho *et al.* [220] en utilisant le diiodométhane (solvant apolaire) sont respectivement  $42,8 \pm 5,8^\circ$  ( $45 \pm 1^\circ$  dans notre cas) et  $44,1 \pm 3,3^\circ$  ( $40 \pm 1^\circ$  dans notre cas) pour HA et SiHA. Les valeurs de l'angle de contact moyen obtenues avec le

diiodométhane sont proches à celles trouvées par Botelho *et al.* [220]. Les variations de  $\theta_m$  pour les pastilles d'HA et de SiHA remarquées dans le cas des analyses effectuées avec de l'eau distillé sont moins nettes dans le cas du diiodométhane et de l'éthylène glycol. Cela peut être attribué à la nature du solvant et plus précisément à son énergie de surface. Généralement, les liquides ayant une énergie de surface ( $\gamma_l = 50,3$  mN/m pour diiodométhane et 48,4 mN/m pour éthylène glycol) proches de l'énergie de surface d'un substrat ( $\gamma_s = 40$  mN/m pour HA et 48 mN/m pour SiHA) se mouillent à la surface [225]. Dans la littérature, le calcul des énergies de surface par la relation d'Owens-Wendt effectué par Botelho *et al.* [220] a conduit à des valeurs ( $\gamma_s = 42,9$  mN/m pour HA et 45,5 mN/m pour SiHA) qui sont très proches de celles trouvées dans notre étude (Tableau III-18 : 40 mN/m (HA) et 48 mN/m (SiHA)). Cette augmentation de la tension de surface est expliquée par la présence des liaisons Si-O insaturées conduisant à la formation de liaisons Si-OH en présence d'un milieu aqueux [220]. Pour les pastilles de SiHA, les interactions polaires ( $\gamma_s^p = 23$  mN/m) sont plus importantes que celles en HA ( $\gamma_s^p = 14$  mN/m) et les interactions dispersives sont identiques ( $\gamma_s^d = 26$  mN/m). La présence du silicium dans la structure apatite améliore uniquement le caractère polaire du substrat. De ce fait, les angles de contact déterminés avec un solvant apolaire (diiodométhane) présentent un écart de  $5^\circ$  ( $\theta_m = 45 \pm 1^\circ$  pour HA et  $40 \pm 1^\circ$  pour SiHA). Avec des solvants relativement polaires (eau et éthylène glycol), ces écarts sont de  $10^\circ$  (Tableau III-16).

Après greffage et dans le cas de l'eau,  $\theta_m$  augmente et est égale à  $88 \pm 2^\circ$  pour HA-T,  $86 \pm 1^\circ$  pour HA-D et  $80 \pm 2^\circ$  pour HA-M. Il en est de même pour les pastilles en SiHA greffées, pour lesquelles l'angle de contact moyen ( $\theta_m$ ) vaut  $69 \pm 1^\circ$  pour SiHA-T,  $76 \pm 1^\circ$  pour SiHA-D et  $64 \pm 2^\circ$  pour SiHA-M (Tableau III-16). Cette évolution après le greffage des organosilanes témoigne d'une augmentation de l'hydrophobicité de la surface. Elle est due aux chaînes carbonées des organosilanes présentes à la surface des substrats [217, 226, 227]. D'après la littérature [228], les facteurs qui contribuent à générer une surface hydrophobe sont : la nature des chaînes non impliquées dans le greffage, la polymérisation du dépôt d'organosilane, le degré de couverture de la surface et la distribution et l'orientation de l'organosilane à la surface. Les chaînes hydrocarbonées aliphatiques non polaires sont des entités qui permettent à l'organosilane d'induire une surface hydrophobe [228]. De même, lorsque l'organosilane forme une monocouche à la surface, il favorise l'hydrophobicité de la surface plus que des molécules d'organosilanes linéaires et perpendiculaires à la surface.

Fadeev et McCarthy [229] ont étudié les variations de l'angle de contact à la surface de la silice. Ils ont conclu que l'angle de contact de l'eau est indépendant de la longueur de la chaîne carbonée de l'organosilane. L'hydrophobicité dépend principalement de la population des groupements hydroxyl (caractère hydrophile) à la surface. Si tous les groupements hydroxyl sont recouverts par les organosilanes (monocouche), une surface hydrophobe est obtenue. Les mesures sur la surface modifiée par les organosilanes montrent une vraie modification des propriétés intrinsèques de surface de substrat. De plus la polarité des groupements peut intervenir dans la détermination de l'hydrophobicité de la surface. Une équipe en Australie menée par Watts [230, 231] a étudié l'orientation et l'adsorption de la molécule d'APTES à la surface de ZnO. Ils ont montré que l'orientation et l'adsorption de la molécule d'APTES dépendent du point isoélectrique du substrat et du pH du milieu réactionnel. Dans toute la gamme de pH, la molécule de silane s'oriente suivant toutes les configurations possibles. La formation des multicouches autoassemblées à la surface des substrats engendre des surfaces superhydrophobes avec des angles de contact supérieures à 160°. Mais ce n'est pas le cas dans notre étude, les angles de contact obtenues sont inférieures à 160° montrant l'absence de la formation des multicouches à la surface des substrats en HA et en SiHA.

Après greffage des organosilanes T, D et M, les angles de contact obtenus avec le diiodométhane (Tableau III-16) sont presque du même ordre pour HA-D et HA-M ( $\theta_m = 41 \pm 1^\circ$  et  $46 \pm 1^\circ$ ) que celui de l'HA ( $\theta_m = 45 \pm 1^\circ$ ). Pour HA-T, la diminution de l'angle de contact est à noter ( $\theta_m = 36 \pm 1^\circ$ ). Pour les pastilles de SiHA, les angles de contact pour SiHA-T et SiHA-D ( $\theta_m = 38 \pm 1^\circ$  et  $44 \pm 1^\circ$ ) sont de même ordre que celui de SiHA ( $\theta_m = 40 \pm 1^\circ$ ). Pour SiHA-M, l'angle de contact enregistré est plus important ( $\theta_m = 58 \pm 1^\circ$ ). Avec l'éthylène glycol (Tableau III-16), les angles de contact pour les pastilles de HA greffées sont du même ordre que celui de l'HA. Pour les pastilles de SiHA, les angles de contact sont plus importants pour SiHA-T ( $\theta_m = 50 \pm 2^\circ$ ) et SiHA-M ( $\theta_m = 51 \pm 2^\circ$ ) par rapport à SiHA ( $\theta_m = 43 \pm 2^\circ$ ). Pour SiHA-D, l'angle de contact obtenu ( $\theta_m = 47 \pm 2^\circ$ ) est proche de celui de SiHA. Pour les pastilles d'HA greffées, les angles de contact, en prenant comme référence la pastille non greffée, diminuent de 5 à 10° avec le diiodométhane et restent stables avec l'éthylène glycol. En présence de silicium, l'angle augmente de 18° pour SiHA-M avec le diiodométhane alors que pour SiHA-D et SiHA-T les angles sont presque constants. Avec l'éthylène glycol, les variations de l'ordre de 5 à 10° sont enregistrées pour les pastilles de SiHA. Ces variations des angles de contact peuvent être attribuées à la présence de silicium dans la structure apatite

(variation de l'hydrophilie de surface), à la tension superficielle du solvant de greffage vers le substrat et ainsi que à l'architecture des organosilanes à la surface des pastilles.

Après greffage, les pastilles d'HA-T, HA-D et HA-M possèdent des énergies de surface égales à 42 ; 39 et 37 mN/m respectivement (Tableau III-18). Ces valeurs sont proches de la pastille d'HA non greffée (40 mN/m). Il semble que la présence des organosilanes à la surface des pastilles d'HA influe faiblement sur l'énergie de surface. Les énergies de surface diminuent avec la fonctionnalité des organosilanes et donc avec la quantité greffée. D'autre part, la contribution polaire ( $\gamma_s^p$ ) diminue après le greffage des organosilanes. Elle est de 14 mN/m pour HA à 2, 3 et 5 mN/m pour HA-T, HA-D et HA-M respectivement. Parallèlement, la contribution dispersive ( $\gamma_s^d$ ) augmente après le greffage de 26 mN/m (HA) à 40, 36 et 32 mN/m pour HA-T, HA-D et HA-M respectivement (Tableau III-18). Pour les pastilles de SiHA greffées, les variations sont plus remarquables que celles des pastilles d'HA greffées. Ces énergies sont de l'ordre de 41 ; 39 et 37 mN/m respectivement pour SiHA-T, SiHA-D et SiHA-M. La présence des molécules d'organosilanes à la surface de SiHA diminue les énergies de surface par rapport au substrat seul (48 mN/m). De même que pour HA, les énergies de surface diminuent avec la fonctionnalité des organosilanes (Tableau III-18). La contribution polaire ( $\gamma_s^p$ ) diminue après le greffage des organosilanes passant de 23 mN/m pour SiHA à 8, 6 et 17 mN/m pour SiHA-T, SiHA-D et SiHA-M et la contribution dispersive ( $\gamma_s^d$ ) augmente après le greffage de 26 mN/m pour SiHA à 32 mN/m pour SiHA-T et SiHA-D, mais diminue pour SiHA-M (20 mN/m). La présence des organosilanes à la surface des pastilles d'HA et de SiHA conduit à des surfaces moins polaires, présentant des contributions dispersives plus importantes et donc plus hydrophobes.

La différence des énergies de surface entre les deux substrats pourrait être attribuée au comportement des molécules d'organosilanes à la surface des substrats, leur mode de liaison avec la surface et à la présence du silicium dans la structure. De plus, il est possible que les deux substrats HA et SiHA se comportent différemment dans le solvant utilisé pour la réaction de greffage (Toluène). Le toluène présente une énergie de surface ( $\gamma = 28,5$  mN/m à 20°C) inférieure à l'énergie de surface des substrats. La surface de SiHA est plus chargée que celle de HA et donc elle est plus mouillante. Cela permet d'améliorer l'affinité de SiHA pour le toluène et influencer sur la quantité des organosilanes greffés à la surface par rapport à HA en modifiant l'énergie de surface.

En conclusion, les angles de contact obtenus après le greffage des organosilanes à la surface des substrats ne sont pas superhydrophobes ( $\theta_m = 160^\circ$ ). À partir de ces résultats, il est possible de supposer l'absence d'un film mince d'organosilane recouvrant toute la surface de la pastille. Les organosilanes peuvent être répartis d'une façon non homogène à la surface.

### III.4. Conclusion

Le protocole expérimental de greffage mis en place dans le laboratoire est basé sur une réaction de silanisation en milieu complètement anhydre. Ce protocole permet, d'une part, de favoriser les réactions d'hétérocondensation entre les groupements hydrolysables de l'organosilane et les sites OH de greffage et, d'autre part, de minimiser les réactions d'homocondensation afin de limiter la probabilité de formation d'une couche. Le calcul du taux de recouvrement ( $\tau_R$  en %) a montré que les organosilanes sont en large excès en solution. Cela permet d'améliorer la probabilité de greffage des sites de surface.

Le greffage des organosilanes à la surface des poudres en HA et SiHA n'influe pas sur la morphologie de celles-ci. La surface spécifique (SSA) reste quasiment constante après le greffage des organosilanes. Cela peut être attribué à une faible quantité d'organosilanes greffée à la surface. Les poudres greffées présentent des agglomérats dont la taille se situe autour de quelques micromètres, ces derniers étant constitués de grains nanométriques.

Les analyses FTIR effectuées sur les poudres d'HA et de SiHA greffées confirment la présence des organosilanes, les molécules T, D et M sont détectées sur les deux substrats. Le greffage covalent est confirmé par la présence des éléments chimiques caractéristiques des organosilanes en spectroscopie de photoélectrons X (XPS) après 12 minutes de décapage ionique intense à la surface d'une pastille HA-T. La détection de l'atome de phosphore après greffage, ainsi que les sites OH libres à la surface d'HA et de SiHA montre que les organosilanes ne recouvrent pas tous les sites de greffage disponibles à la surface de deux substrats. L'élément azote possède deux contributions, la première à  $399,5 \pm 0,1$  eV correspondant à une fonction  $\text{NH}_2$  et la deuxième à  $401,4 \pm 0,2$  eV attribuée à un environnement chimique de type  $\text{NH}_3^+$ . La deuxième contribution peut être due à la présence d'organosilanes adsorbés à la surface des échantillons greffés ou au repliement de la molécule d'organosilanes après greffage. Cette analyse a montré que l'organosilane greffé garde toujours de groupements amines libres ( $\text{NH}_2$ ) qui vont servir pour des réactions de greffage ultérieures.

Les analyses TG/SM ont montré que les températures de dégradation des chaînes organiques des organosilanes sont augmentées après greffage vérifiant le greffage covalent de ces molécules organiques à la surface des substrats. La densité surfacique des organosilanes à la surface des substrats (HA ou SiHA) dépend fortement de la fonctionnalité de l'organosilane.

L'incorporation du silicium dans la structure apatitique et donc la création des sites de greffage de type Si-OH influe sur la densité surfacique et le mode de greffage des organosilanes. Les sites Si-OH présentent plus d'affinité que les sites P-OH vers les groupements hydrolysables des organosilanes ce qui permet de favoriser les nombres de groupements hydrolysables impliqués dans la réaction de greffage. Il en résulte une diminution de la quantité de greffage à la surface. Quelle que soit la fonctionnalité de l'organosilane, la densité surfacique est toujours plus importante à la surface d'HA que celle de SiHA.

Les analyses AFM ont montré une variation de la rugosité surfacique ( $S_a$ ) après greffage pour les pastilles non polies et polies. Les images AFM des pastilles greffées montrent la présence des zones claires (amplitude totale) correspondent à des protubérances présentes à la surface de la pastille. La topographie de surface montre des variations remarquables dans l'échelle de hauteur. L'analyse de l'angle de contact a bien confirmé la présence des organosilanes à la surface des substrats. Après greffage, l'hydrophilie de la surface diminue en raison de la présence des chaînes carbonées des organosilanes. Les contributions polaires sont diminuées après greffage alors que les dispersives sont augmentées vérifiant une hydrophobicité plus importante. La présence du silicium dans la structure apatite ainsi que le greffage des organosilanes influe faiblement l'énergie de surface. L'augmentation de l'hydrophobicité après le greffage des organosilanes peut être attribuée à la présence des zones non homogène d'organosilanes à la surface des substrats où les pluparts de sites hydrophiles OH de la surface sont masqués par les organosilanes.

# Conclusion générale

Le but général de ce projet était d'étudier l'influence de la fonctionnalité des organosilanes ainsi que l'incorporation du silicium dans la structure apatite sur la nature, la quantité et le mode de greffage des organosilanes à la surface des substrats en hydroxyapatite. Trois aminosilanes (T, D et M) ayant des fonctionnalités différentes ont été greffés à la surface de substrats en HA et en SiHA dans des conditions anhydres. Ceci dans le but d'immobiliser des molécules biologiquement actifs (protéines, peptides, facteurs de croissance,...) afin d'accéder à une nouvelle génération des biocéramiques dites ostéoinductrices ayant la capacité d'initier le phénomène de reconstruction osseuse sans contact direct avec l'os.

Dans ce cadre des poudres d'hydroxyapatite de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et d'hydroxyapatite silicatées de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,55}(\text{SiO}_4)_{0,45}(\text{OH})_{1,55}$  ont été synthétisées par la méthode de précipitation en voie aqueuse. Des céramiques denses ont ensuite été élaborées par frittage. Les techniques de caractérisation utilisées (DRX, FT-IR, analyse BET, MEB, pycnométrie à Helium) ont montré que les substrats sont purs et monophasés et présentent des propriétés de surface similaires (potentiel zêta, topographie).

Dans un deuxième temps, des organosilanes (T, D et M) ayant respectivement 3, 2 et 1 groupements hydrolysables ont été caractérisés. L'étude thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de masse a mis en évidence la faible stabilité thermique des organosilanes libres, les molécules sont volatilisées à 150°C (T), 130°C (D) et 120°C (M) dans les conditions d'analyses employées. Le greffage des organosilanes à la surface des substrats a été réalisé selon un protocole expérimental basé sur une réaction de silanisation en milieu complètement anhydre.

La présence des organosilanes à la surface ainsi que l'absence de la formation d'une couche quelle que soit la fonctionnalité de l'organosilane a pu être montré. Les analyses par XPS et TG/SM ont permis de conclure qu'une liaison covalente forte existe entre les organosilanes et les substrats. L'architecture générale des organosilanes à la surface est fonction de la nature du substrat et de la fonctionnalité de l'organosilane. L'incorporation du silicium dans la

## *Conclusion générale*

structure apatitique, et donc l'existence de sites de greffage de type Si-OH, influe sur la densité surfacique et le mode de greffage des organosilanes. La présence du silicium favorise le nombre de chaînes éthoxyles impliquées dans le greffage. L'organosilane M se greffe par une chaîne éthoxyle sur les deux substrats. À la surface de SiHA, le greffage est favorisé par deux chaînes éthoxyles pour l'organosilane D et deux ou trois chaînes éthoxyles pour l'organosilane T.

La densité surfacique en organosilanes à la surface des substrats (HA ou SiHA) dépend fortement de la fonctionnalité de celui-ci. Les sites Si-OH présentent plus d'affinité que les sites P-OH pour les groupements hydrolysables des organosilanes ce qui permet de favoriser le nombre de groupements hydrolysables impliqués dans la réaction de greffage. Il en résulte une diminution de la quantité de molécules greffées. Les analyses XPS ainsi que la quantification par spectrophotométrie UV ont montré la présence des groupements amines non protonés capables d'être utilisés pour des réactions de greffage ultérieures.

Enfin, les analyses AFM et angle de contact ont montré une répartition non homogène des organosilanes à la surface des substrats. En présence d'organosilane, les profils deviennent plus lisses avec une modification de la rugosité et de la topographie de surface. La distribution non cohérente des amas à la surface des pastilles greffées permettrait de supposer que l'organosilane T est réparti d'une façon non homogène. Le greffage des organosilanes ne modifie pas notablement l'énergie de surface de l'apatite. L'hydroxyapatite silicatée présente une surface plus hydrophile que celle de l'HA caractérisée par un angle de contact moyen plus faible. Après greffage, les angles de contact sont augmentés montrant des surfaces plus hydrophobes. Les angles de contacts obtenus ne montrent pas des surfaces superhydrophobes vérifiant donc l'absence d'une couche mince à la surface des substrats.

En termes de perspectives, durant ce projet on a réussi à greffer des organosilanes multifonctionnels d'une façon covalente et avec une faible densité de greffage à la surface de substrats en HA et en SiHA. Les substrats silanisés par les organosilanes seront fonctionnalisés par des molécules biologiques (protéines, peptides, facteurs de croissance,...) immobilisées sur les organosilanes par l'intermédiaire de leur terminaison amine afin d'étudier leur effet ostéoinducteur par des essais *in vivo* et *in vitro*.

# Bibliographie

- [1] J.C. Elliott, Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Amsterdam: Elsevier Science, (1994).
- [2] H.M.d. Silva, M. Mateescu, A. Ponche, C. Damia, E. Champion, G. Soares, K. Anselme, Surface transformation of silicon-doped hydroxyapatite immersed in culture medium under dynamic and static conditions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (2010) 349-355.
- [3] E.M. Carlisle, Silicon: A possible factor in bone calcification, *Science*, 167 (1970) 279-280.
- [4] E.M. Carlisle, Silicon: An essential element for the chick, *Science*, 178 (1972) 619-621.
- [5] M. Jarcho, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 157 (1981) 259-278.
- [6] J.F. Osborn, H. Newesely, Bonding osteogenesis induced by calcium phosphate implants, *Journal of Dental Research*, ISSUE B (1980) 405.
- [7] G.J. Tortora, B. Derrickson, Principes d'anatomie et de physiologie, Ed. De Boeck, 4e édition, Bruxelles (2007).
- [8] R. Legros, Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés, Thèse I.N.P, (1984) Université de Toulouse.
- [9] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaïd, A. Meunier, C. De Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, G. Guillemin, Tissue-engineered bone regeneration, *Nature America Inc.*, 18 (2000) 4.
- [10] N. Udagawa, N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T.J. Martin, T. Suda, Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (1990) 7260-7264.
- [11] L. Vidal, L'apport de l'ingénierie tissulaire en régénération osseuse préimplantaire, Thèse de Doctorat, (2012) Université Toulouse III - Paul Sabatier Faculté De Chirurgie Dentaire.
- [12] I. Couret, Biology of bone remodeling, *Medecine Nucleaire* 28 (2004) 57-65
- [13] M.C. De Vernejoul, Cellules osseuses et remodelage osseux, *médecine/sciences*, 9 (1993) 1192-1203.

## *Bibliographie*

- [14] C.R. Perry, Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (1999) 71-86.
- [15] N. Ross, L. Tacconi, J.B. Miles, Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting, *British journal of neurosurgery*, 14 (2000) 476-479.
- [16] J.G. Seiler 3rd., J. Johnson, Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications, *Journal of the Southern Orthopaedic Association*, 9 (2000) 91-97.
- [17] H. Melo, C. Brandão, G. Rego, R. Nunes, Ethical and legal issues in xenotransplantation, *Bioethics*, 15 (2001) 427-442.
- [18] F. Barrère, T.A. Mahmood, K. de Groot, C.A. van Blitterswijk, Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions, *Materials Science and Engineering R: Reports*, 59 (2008) 38-71.
- [19] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castanao, J.A. Planell, Biomaterials in orthopaedics, *Journal of the Royal Society Interface*, 5 (2008) 1137-1158
- [20] D.F. Williams, Tissue-biomaterial interactions, *Journal of Materials Science*, 22 (1987) 3421-3445.
- [21] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials *Science*, 295 (2002) 1014-1017.
- [22] S.M. Best, A.E. Porter, E.S. Thian, J. Huang, Bioceramics: Past, present and for the future, *Journal of the European Ceramic Society*, 28 (2008) 1319-1327.
- [23] S. Jacquart, Substitut osseux injectable, antibactérien et résorbable : études physico-chimiques et biologiques d'un ciment composite à base d'apatite, thèse de Doctorat, (2013) Université de toulouse.
- [24] J. Charnley, Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur, *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 42 (1960) 28-30.
- [25] M. Long, H.J. Rack, Titanium alloys in total joint replacement - A materials science perspective *Biomaterials*, 19 (1998) 1621-1639.
- [26] P. Boutin, Total arthroplasty of the hip by fritted aluminum prosthesis. Experimental study and 1st clinical applications, *Revue de Chirurgie Orthopedique et Reparatrice de l'Appareil Moteur*, 58 (1972) 229-246.
- [27] T. Tullberg, Failure of a carbon fiber implant: A case report, *Spine*, 23 (1998) 1804-1806.
- [28] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Grenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 5 (1971) 117-141.
- [29] W. Cao, L.L. Hench, Bioactive materials, *Ceramics International*, 22 (1996) 493-507.

## *Bibliographie*

- [30] L.L. Hench, Bioactive ceramics: Theory and clinical applications, In: O. H. Andersson, editor. Bioceramics. Oxford: Butterworth-Heinemann (1994) 3-14.
- [31] J. Wilson, A.E. Clark, E. Douek, J. Kriegger, W.K. Smith, J.S. Zomet, Clinical applications of bioglass implants. In Bioceramics, Vol. 7, ed. 6. H. Andersson & A. Yli-Urpo. Butterworth-Heinemann, Oxford,, (1994) 415-422.
- [32] K. De Groot, Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties, In: K. De Groot, editor. Bioceramics of calcium phosphate. Boca Raton: CRC press,, (1983) 100-114.
- [33] L.L. Hench, The story of Bioglass®, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 17 (2006) 967-978.
- [34] G. Daculsi, O. Malard, E. Goyenvalle, Efficacité et performance des substituts osseux pour remplacer les allogreffes et autogreffes Revue Européenne de Technologie Biomédicale, 26 (2005) 218-222.
- [35] K. De Groot, Bioceramics consisting of calcium phosphate salts, Biomaterials, 1 (1980) 47-50.
- [36] B.S. Chang, K.K. Lee, K.S. Hong, H.J. Youn, H.S. Ryu, S.S. Chung, K.W. Park, Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations, Biomaterials, 21 (2000) 1291-1298.
- [37] A. Bignon, J. Chouteau, J. Chevalier, G. Fantozzi, J.P. Carret, P. Chavassieux, G. Boivin, M. Melin, D. Hartmann, Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 14 (2003) 1089-1097.
- [38] P. Hardouin, K. Anselme, B. Flautre, F. Bianchi, G. Bascoulergue, B. Bouxin, Tissue engineering and skeletal diseases, Revue du Rhumatisme, 67 (2000) 498-504.
- [39] S.M. Warren, K.D. Fong, R.P. Nacamuli, H.M. Song, T.D. Fang, M.T. Longaker, Biomaterials for skin and bone replacement and repair in plastic surgery, Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery, 9 (2003) 10-15.
- [40] H. Takadama, T. Kokubo, in vitro evaluation of bone bioactivity, Bioceramics and their clinical applications, Woodhead publishing in materials, (2008) 165-182.
- [41] F.C.M. Driessens, R.M.H. Verbeek, Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates, In : de Putter C., de Lange G.L., de Groot K., et al. Eds, Implant materials in biofunction, Advances in biomaterials, Amsterdam : Elsevier, (1988) 105-111.
- [42] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders, Biomaterials, 23 (2002) 1065-1072.
- [43] G. Daculsi, Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute Biomaterials, 19 (1998) 1473-1478.

## *Bibliographie*

- [44] C.E. Wilson, M.C. Kruyt, J.D. De Bruijn, C.A. Van Blitterswijk, F.C. Oner, A.J. Verbout, W.J.A. Dhert, A new in vivo screening model for posterior spinal bone formation: Comparison of ten calcium phosphate ceramic material treatments, *Biomaterials*, 27 (2006) 302-314.
- [45] P. Ducheyne, T. Kokubo, C.A. van Blitterswijk, Bone bonding biomaterials, Eds P. Ducheyne. Leiderdorp, Reed Healthcare communications, (1992) 57-72.
- [46] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. De Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, G. Guillemin, Tissue-engineered bone regeneration, *Nature Amrica Inc*, 18 (2000) 959-963.
- [47] S.P. Bruder, K.H. Kraus, V.M. Goldberg, S. Kadiyala, The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 80 (1998) 985-996.
- [48] K.D. Johnson, K.E. Frierson, T.S. Keller, C. Cook, R. Scheinberg, J. Zerwekh, L. Meyers, M.F. Sciadini, Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: A biomechanical, histological, and radiographic analysis, *Journal of Orthopaedic Research*, 14 (1996) 351-369.
- [49] C. Delloye, How to improve the incorporation of massive allografts, *La Chirurgia degli organi di movimento*, 88 (2003) 335-343.
- [50] J. Brie, T. Chartier, C. Chaput, C. Delage, B. Pradeau, F. Caire, M.-P. Boncoeur, J.-J. Moreau, A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 41 (2013) 403-407.
- [51] R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, *Science*, 260 (1993) 920-926.
- [52] D.W. Hutmacher, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12 (2001) 107-124.
- [53] J.M. Seong, B.-C. Kim, J.-H. Park, I.K. Kwon, A. Mantalaris, Y.-S. Hwang, Stem cells in bone tissue engineering, *Biomedical Materials*, 5 (2010) Article number 062001.
- [54] S. Catros, F. Guillemot, J. Amédée, J.C. Fricain, Ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie buccale et maxillo-faciale : applications cliniques, *Med Buccale Chir Buccale*, 16 (2010) 227-237.
- [55] N. Passuti, G. Daculsi, Céramiques en phosphate de calcium en chirurgie orthopédique, *La presse médicale*, 18 (1989) 28-31.
- [56] P. Habibovic, H. Yuan, C.M. Van Der Valk, G. Meijer, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot, 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials, *Biomaterials*, 26 (2005) 3565-3575.
- [57] M. Rouahi, O. Gallet, E. Champion, J. Dentzer, P. Hardouin, K. Anselme, Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 78 (2006) 222-235.

## *Bibliographie*

- [58] J. Isaac, J.C. Hornez, D. Jian, M. Descamps, P. Hardouin, D. Magne, beta-TCP microporosity decreases the viability and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 86 (2008) 286-393.
- [59] H. Yuan, K. Kurashina, J.D. De Bruijn, Y. Li, K. De Groot, X. Zhang, A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics, *Biomaterials*, 20 (1999) 1799-1806.
- [60] J. Wei, J. Jia, F. Wu, S. Wei, H. Zhou, H. Zhang, J.W. Shin, C. Liu, Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calcium phosphate for bone tissue regeneration, *Biomaterials*, 31 (2010) 1260-1269.
- [61] L. Cheng, F. Ye, R. Yang, X. Lu, Y. Shi, L. Li, H. Fan, H. Bu, Osteoinduction of hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula, *Acta Biomaterialia*, 6 (2010) 1569-1574.
- [62] P. Schaffner, M.M. Dard, Structure and function of RGD peptides involved in bone biology *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (2003) 119-132.
- [63] K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials*, 21 (2000) 667-681.
- [64] B.H. Luo, T.A. Springer, Integrin structures and conformational signaling, *Current Opinion in Cell Biology*, 18 (2006) 579-586.
- [65] M.C. Porté-Durrieu, C. Labrugère, F. Villars, F. Lefebvre, S. Dutoya, A. Guette, L. Bordenave, C. Baquey, Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46 (1999) 368-375.
- [66] L.B. De Taillac, M.C. Porté-Durrieu, C. Labrugère, R. Bareille, J. Amédée, C. Baquey, Grafting of RGD peptides to cellulose to enhance human osteoprogenitor cells adhesion and proliferation, *Composites Science and Technology*, 64 (2004) 827-837.
- [67] M.C. Porté-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugère, B. Brouillaud, R. Bareille, J. Amédée, N. Barthe, M. Dard, C. Baquey, Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: Physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion, *Biomaterials*, 25 (2004) 4837-4846.
- [68] M.C. Durrieu, S. Pallu, F. Guillemot, R. Bareille, J. Amédée, C. Baquey, C. Labrugère, M. Dard, Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15 (2004) 779 -786.
- [69] C. Chollet, C. Labrugère, M.C. Durrieu, Influence de la densité de peptides RGD greffés en surface de polyéthylène téréphtalate sur l'attachement des MC3T3, *Alliance for Engineering in Biology and Medicine*, 29 (2008) 7-12.
- [70] D. Itoh, S. Yoneda, S. Kuroda, H. Kondo, A. Umezawa, K. Ohya, T. Ohyama, S. Kasugai, Enhancement of osteogenesis on hydroxyapatite surface coated with synthetic peptide (EEEEEEPRGDT) in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research*, 62 (2002) 292-298.

## *Bibliographie*

- [71] M.N. Nguyen, T. Lebarbe, O.F. Zouani, L. Pichavant, M.C. Durrieu, V. Héroguez, Impact of RGD nanopatterns grafted onto titanium on osteoblastic cell adhesion, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 896-904.
- [72] M.E. Flores, D. Heinegard, F.P. Reinholt, G. Andersson, Bone Sialoprotein Coated on Glass and Plastic Surfaces Is Recognized by Different  $\alpha_3$  Integrins, *Experimental Cell Research*, 227 (1996) 40-46.
- [73] N.L. Harris, K.R. Rattray, C.E. Tye, T.M. Underhill, M.J. Somerman, J.A. D'errico, A.F. Chambers, G.K. Hunter, H.A. Goldberg, Functional Analysis of Bone Sialoprotein: Identification of the Hydroxyapatite-nucleating and Cell-binding Domains by Recombinant Peptide Expression and Site-directed Mutagenesis, *Bone*, 27 (2000) 795-802.
- [74] R. Fujisawa, M. Mizuno, Y. Nodasaka, Y. Kuboki, Attachment of Osteoblastic Cells to Hydroxyapatite Crystals by a Synthetic Peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) Containing Two Functional Sequences of Bone Sialoprotein, *Matrix Biology*, 16 (1997) 21-28.
- [75] K.L. Yao, R. Todescan, Jr., J. Sodek, Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture, *Journal of Bone and Mineral Research*, 9 (1994) 231-240.
- [76] H.A. Goldberg, K.J. Warner, M.C. Li, G.K. Hunter, Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite, *Connective Tissue Research*, 42 (2001) 25-37.
- [77] R.M. Salaszyk, W.A. Williams, A.L. Boskey, A. Batorsky, G.E. Plopper, Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004 (2004) 24-34.
- [78] J.C. Adams, J. Lawler, The thrombospondins, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36 (2004) 961-968.
- [79] P. Gehron Robey, M.F. Young, L.W. Fisher, T.D. McClain, Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix, *Journal of Cell Biology*, 108 (1989) 719-727.
- [80] R.E. Weiss, A.H. Reddi, Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow., *Journal of Cell Biology*, 88 (1981) 630-636.
- [81] R. Dimitriou, E. Tsiridis, P.V. Giannoudis, Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury. International Journal of the Care of the Injured.*, 36 (2005) 1392-1404.
- [82] E. Rosenberg, Utilisation des facteurs de croissance pour la régénération osseuse, *Journal de Parodontologie et d'Implantologie Orale*, 18 (1999) 301-311.
- [83] B.D. Boyan, C.H. Lohmann, A. Somers, G.G. Niederauer, J.M. Wozney, D.D. Dean, D.L. Carnes Jr., Z. Schwartz, Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46 (1999) 51-59.

## *Bibliographie*

- [84] U. Ripamonti, J. Crooks, D.C. Rueger, Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 107 (2001) 977-988.
- [85] D.H.R. Kempen, M.C. Kruyt, L. Lu, C.E. Wilson, A.V. Florschütz, L.B. Creemers, M.J. Yaszemski, W.J.A. Dhert, Effect of autologous bone marrow stromal cell seeding and bone morphogenetic protein-2 delivery on ectopic bone formation in a microsphere/poly(propylene fumarate) composite, *Tissue Engineering - Part A*, 15 (2009) 587-594.
- [86] N.S. Cunningham, V. Paralkar, A.H. Reddi, Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor  $\beta$ 1 mRNA expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (1992) 11740-11744.
- [87] M.M.L. Deckers, R.L. Van Bezooijen, D.E.R. Van Geertje Horst, J. Hoogendam, D.E.R. Van Chris Bent, S.E. Papapoulos, C.W.G.M. Löwik, Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A, *Endocrinology*, 143 (2002) 1545-1553.
- [88] W. Risau, I. Flamme, Vasculogenesis, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11 (1995) 73-91.
- [89] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91 (2001) 233-244.
- [90] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, Surface tailoring for controlled protein adsorption: Effect of topography at the nanometer scale and chemistry *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 3939-3945.
- [91] F. Caruso, D.N. Furlong, P. Kingshott, Characterization of ferritin adsorption onto gold, *Journal of Colloid and Interface Science*, 186 (1997) 129-140.
- [92] H. Itoh, A. Nagata, T. Toyomasu, Adsorption of  $\beta$ -Lactoglobulin onto the Surface of Stainless Steel Particles, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59 (1995).
- [93] J. Revilla, A. Elaïssari, P. Carriere, C. Pichot, Adsorption of bovine serum albumin onto polystyrene latex particles bearing saccharidic moieties *Journal of Colloid and Interface Science*, 180 (1996) 405-412.
- [94] C.A. Haynes, W. Norde, Structures and Stabilities of Adsorbed Proteins, *Journal of Colloid and Interface Science*, 169 (1995) 313-328.
- [95] M.K. Mafina, K.A. Hing, A.C. Sullivan, Development of novel fluorescent probes for the analysis of protein interactions under physiological conditions with medical devices, *Langmuir*, 29 (2013) 1420-1426.
- [96] D. Pellenc, Autoassemblage de la fibronectine induit par l'adsorption caractérisation expérimentale sur l'hydroxyapatite et étude par simulation numérique, Thèse de Doctorat, (2005) Université de Cergy-Pontoise.

## *Bibliographie*

- [97] J. Ramier, Structures fibreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire, Thèse de Doctorat, Université Paris-Est, (2012).
- [98] S. Josse, C. Fauchoux, A. Soueidan, G. Grimandi, D. Massiot, B. Alonso, P. Janvier, S. Laïb, P. Pilet, O. Gauthier, G. Daculsi, J. Guicheux, B. Bujoli, J.-M. Bouler, Novel biomaterials for bisphosphonate delivery, *Biomaterials*, 26 (2005) 2073-2080.
- [99] H. Seshima, M. Yoshinari, S. Takemoto, M. Hattori, E. Kawada, T. Inoue, Y. Oda, Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 78 (2006) 215-221.
- [100] H. Fleisch, Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient, Academic Press, (2000).
- [101] R.G.G. Russell, Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology, *pediatrics*, 119 (2007) 150-162.
- [102] P. Pascaud, Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse :Etude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate, Thèse de Doctorat, (2012) Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- [103] H. Roussière, F. Fayon, B. Alonso, T. Rouillon, V. Schnitzler, E. Verron, J. Guicheux, M. Petit, D. Massiot, P. Janvier, J.M. Bouler, B. Bujoli, Reaction of Zoledronate with - Tricalcium Phosphate for the Design of Potential Drug Device Combined Systems, *Chemistry of Materials*, 20 (2008) 182-191.
- [104] M. Iafisco, B. Palazzo, G. Falini, M. Di Foggia, S. Bonora, S. Nicolis, L. Casella, N. Roveri, Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate, *Langmuir*, 24 (2008) 4924-4930.
- [105] A. Schuessle, H. May, J. Tessmar, A. Goepferich, Enhanced bone morphogenetic protein-2 performance on hydroxyapatite ceramic surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90 (2007) 959-971.
- [106] B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C.L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties, *Advanced Functional Materials*, 17 (2007) 2180-2188.
- [107] E.P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, book Plenum, New York, (1982).
- [108] E. Sibbotier, Génération électro-assistée de films à base de silice : "fonctionnalisation, mésostructuration et applications analytiques", Thèse de Doctorat Université Henri Poincaré, Nancy, (2007).
- [109] F. Beari, M. Brand, P. Jenkner, R. Lehnert, H.J. Metternich, J. Monkiewicz, H.W. Siesler, Organofunctional alkoxy-silanes in dilute aqueous solution: New accounts on the dynamic structural mutability *Journal of Organometallic Chemistry*, 625 (2001) 208-216.
- [110] C. Damia, S. Sarda, E. Deydier, P. Sharrock, Study of two hydroxyapatite/poly(alkoxy-silane) implant coatings, *Surface & Coatings Technology*, 201 (2006) 3008-3015.

## *Bibliographie*

- [111] R. Banga, J. Yarwood, A.M. Morgan, B. Evans, J. Kells, In-situ FTIR studies of the kinetics and self assembly of alkyl and perfluoroalkyl trichlorosilanes on silicon, *Thin Solid Films*, 284-285 (1996) 261-266.
- [112] S.R. Wasserman, Y.-T. Tao, G.M. Whitesides, Structure and reactivity of alkylsiloxane monolayers formed by reaction of alkyltrichlorosilanes on silicon substrates, *Langmuir* 5 (1989) 1074-1087
- [113] A.S. Anderson, A.M. Dattelbaum, G.A. Montano, D.N. Price, J.G. Schmidt, J.S. Martinez, W.K. Grace, k.M. Grace, B.I. Swanson, Functional PEG-Modified Thin Films for Biological Detection, *Langmuir*, 24 (2008) 2240-2247.
- [114] B. Lindlar, M. Luchinger, A. Rothlisberger, M. Haouas, G. Pirngruber, A. Kogelbauer, R. Prins, Chemical modification of high-quality large-pore M41S materials, *Journal of materials Chemistry*, 12 (2002) 528-533.
- [115] J.B. Brzoska, I. Ben Azouz, F. Rondelez, Silanization of solid substrates: A step toward reproducibility, *Langmuir*, 10 (1994) 4367-4373.
- [116] T. Furuzono, K. Sonoda, J. Tanaka, A hydroxyapatite coating covalently linked onto a silicone implant material, *Journal of Biomedical Materials Research*, 56 (2001) 9-16.
- [117] J.V. Davidovits, V. Pho, P. Silberzan, M. Goldmann, Temperature influence on the formation of silanized monolayers on silica: an atomic force microscopy study, *Surface Science*, 352-354 (1996) 369-373.
- [118] J. Kim, P. Seidler, L.S. Wan, C. Fill, Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates, *Journal of Colloid and Interface Science*, 329 (2009) 114-119.
- [119] T. Manifar, A. Rezaee, M. Sheikhzadeh, S. Mittler, Formation of uniform self-assembly monolayers by choosing the right solvent: OTS on silicon wafer, a case study, *Applied Surface Science*, 254 (2008) 4611-4619.
- [120] E.T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Leidberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström, Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxyde, *Journal of Colloid and Interface Science*, 147 (1991) 103-118.
- [121] J.S. Quinton, P.C. Dastoor, Conformational dynamics of  $\gamma$ -APS on the iron oxidesurface: an adsorption kinetic study using XPS and ToF-SIMS, *Surface and Interface Analysis*, 30 (2000) 21-24.
- [122] M.W. Daniels, L.F. Francis, Silane adsorption behavior, microstructure, and properties of glycidoxypropyltrimethoxysilane-modified colloidal silica coatings, *Journal of Colloid and Interface Science*, 205 (1998) 191-200.
- [123] K.D. Behringer, J. BLUMEL, Reactions of ethoxysilanes with Silica : A solid-state NMR Study, *Journal of liquid Chromatography and related technologies*, 19 (1996) 2753-2765.
- [124] C. Yang, W. Weng, P. Du, G. Shen, G. Han, XPS studies of Hydroxyapatite Powders by Grafting Octadecyltrichlorosilane, *Key Engineering materials*, 330-332 (2007) 765-768.

## *Bibliographie*

- [125] C.J. Brinker, Hydrolysis and condensation of silicates : effects on structure, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 100 (1988) 31-50.
- [126] D.L. Angst, G.W. Simmons, Moisture absorption characteristics of organosiloxane self-assembled monolayers, *Langmuir*, 7 (1991) 2236-2242.
- [127] P.H. Mutin, G. Guerrero, A. Vioux, Hybrid materials from organophosphorus coupling molecules, *Journal of Materials Chemistry* 15 (2005) 3761-3768.
- [128] P.H. Mutin, G. Guerrero, A. Vioux, Organic–inorganic hybrid materials based on organophosphorus coupling molecules: from metal phosphonates to surface modification of oxides, *Comptes Rendus Chimie* 6(2003) 1153-1164.
- [129] G. Forget, Conception et synthèse des surfaces nanostructurées et/ou fonctionnalisées par des nanoparticules comme système de ciblage cellulaire, Thèse de Doctorat, (2009) Université Bordeaux 1.
- [130] B.A. McCool, W.J. DeSisto, Amino-functionalized silica membranes for enhanced carbon dioxide permeation, *Advanced Functional Materials*, 15 (2005) 1635-1640.
- [131] M. Etienne, A. Walcarius, Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium, *Talanta*, 59 (2003) 1173-1188.
- [132] D. Derouet, S. Forgeard, J.-C. Brosse, J. Emery, J.-Y. Buzare, Application of solid-state NMR (  $^{13}\text{C}$  and  $^{29}\text{Si}$  CP/MAS NMR) spectroscopy to the characterization of alkenyltrialkoxysilane and trialkoxysilyl-terminated polyisoprene grafting onto silica microparticles, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 36 (1998) 437-453.
- [133] J. Duchet, B. Chabert, J.P. Chapel, J.F. Gérard, J.M. Chovelon, N.J. Renault, Influence of the Deposition Process on the Structure of Grafted Alkylsilane Layers, *Langmuir*, 13 (1997) 2271-2278.
- [134] K. Bierbaum, M. Kinzler, C. Wöll, M. Grunze, G. Hähner, S. Heid, F. Effenberger, A near edge X-ray absorption fine structure spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy study of the film properties of self-assembled monolayers of organosilanes on oxidized Si(100), *Langmuir* 11 (1995) 512-518
- [135] P. Silberzan, L. Leger, D. Ausserre, J.J. Benattar, Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers, *Langmuir*, 7 (1991) 1647–1651.
- [136] C.P. Tripp, M.L. Hair, Reaction of Methylsilanols with Hydrated Silica Surfaces: The Hydrolysis of Trichloro-, Dichloro-, and Monochloromethylsilanes and the Effects of Curing, *Langmuir*, 11 (1995) 149-155.
- [137] E. Rochow, Introduction à la chimie des silicones, Paris: Dunod, (1957) 181p.
- [138] N. Rathor, S. Panda, Aminosilane densities on nanotextured silicon, *Materials Science and Engineering C*, 29 (2009) 2340-2345.
- [139] A. Nanci, J.D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal, M.D. McKee, Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules, *Journal of Biomedical Materials Research*, 40 (1998) 324-335.

## *Bibliographie*

- [140] M. Dettin, T. Herath, R. Gambaretto, G. Iucci, C. Battocchio, A. Bagno, F. Ghezzi, C. Di Bello, G. Polzonetti, L. Di Silvio, Assessment of novel chemical strategies for covalent attachment of adhesive peptides to rough titanium surfaces: XPS analysis and biological evaluation, *Inter Science*, 91 (2008) 463 - 479.
- [141] P. Liu, T. Wang, Poly(hydroethyl acrylate) grafted from ZnO nanoparticles via surface-initiated atom transfer radical polymerization, *Current Applied Physics*, 8 (2008) 66-70.
- [142] S.H. Pazokifard, S.M. Mirabedini, M. Esfandeh, M. Mohseni, Z. Ranjbar, Silane grafting of TiO<sub>2</sub> nanoparticles: dispersibility and photoactivity in aqueous solutions, *Surface Interface Analysis*, 44 (2012) 41-47.
- [143] E. Verné, C. Vitale-Brovarone, E. Bui, C.L. Bianchi, A.R. Boccaccini, Surface functionalization of bioactive glasses, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 90 (2009) 981-992.
- [144] P. Schaffner, J. Meyer, M. Dard, B. Nies, S. Verrier, H. Kessler, M. Kantlehner, Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10 (1999) 837-839.
- [145] M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S.L. Goodman, H. Kessler, Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation, *Chembiochem*, 1 (2000) 107-114.
- [146] O.G. Da Silva, E.C.D.S. Filho, M.G.D. Fonseca, L.N.H. Arakaki, C. Airoidi, Hydroxyapatite organofunctionalized with silylating agents to heavy cation removal, *Journal of Colloid and Interface Science* 302 (2006) 485-491.
- [147] L. Russo, F. Taraballi, C. Lupo, A. Poveda, J. Jiménez-Barbero, M. Sandri, A. Tampieri, F. Nicotra, L. Cipolla, Carbonate hydroxyapatite functionalization: a comparative study towards (bio)molecules fixation, *Interface Focus*, 4 (2014).
- [148] J. Wei, P. He, A. Liu, X. Chen, X. Wang, X. Jing, Surface Modification of Hydroxyapatite Nanoparticles with Thermal-Responsive PNIPAM by ATRP, *Macromolecular Bioscience*, 9 (2009) 1237-1246.
- [149] J. Wei, A. Liu, L. Chen, P. Zhang, X. Chen, X. Jing, The Surface Modification of Hydroxyapatite Nanoparticles by the Ring Opening Polymerization of g-Benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride, *Macromolecular Bioscience*, 9 (2009) 631-638.
- [150] P.A.L. Jacobsen, J.L. Nielsen, M.V. Juhl, N. Theilgaard, K.L. Larsen, Grafting cyclodextrins to calcium phosphate ceramics for biomedical applications, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, (2011) 1-9.
- [151] M. Nelson, G. Balasundaram, T.J. Webster, Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate crystalline hydroxyapatite functionalized with KRSR, *International Journal of Nanomedicine*, 1 (2006) 339-349.

## ***Bibliographie***

- [152] V. Wang, G. Misra, B. Amsden, Immobilization of a bone and cartilage stimulating peptide to a synthetic bone graft, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (2008) 2145-2155.
- [153] K. Zurlinden, M. Laub, H.P. Jennissen, Chemical Functionalization of a Hydroxyapatite Based Bone Replacement Material for the Immobilization of Proteins, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 36 (2005) 820-827.
- [154] M. Vallet-Regi, D. Arcos, Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants, *Journal of Materials Chemistry*, 15 (2005) 1509-1516.
- [155] M.I. Kay, R.A. Young, A.S. Posner, Crystal Structure of Hydroxyapatite, *Nature*, 204 (1964) 1050-1052.
- [156] C.C. Liu, J.K. Yeh, J.F. Aloia, Magnesium directly stimulates osteoblast cell proliferation, *Journal of Bone and Mineral Research*, 3 (1988) S104.
- [157] C.R. Hankermeyer, K.L. Ohashi, D.C. Delaney, J. Ross, B.R. Constantz, Dissolution rates of carbonated hydroxyapatite in hydrochloric acid, *Biomaterials*, 23 (2002) 743-750.
- [158] M. Palard, Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées, Thèse de Doctorat, (2007) Université de Limoges.
- [159] I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield, Chemical characterisation of silicon- substituted hydroxyapatite, *Journal of Biomed. Mat. Res*, 44 (1999) 422-428.
- [160] M. Palard, E. Champion, S. Foucaud, Synthesis of silicated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ , *Journal of Solid State Chemistry*, 181 (2008) 1950–1960.
- [161] D. Arcos, J. Rodríguez-Carvajal, M. Vallet-Regi, Silicon incorporation in hydroxylapatite obtained by controlled crystallization, *Chemistry of Materials*, 16 (2004) 2300-2308.
- [162] F. Balas, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regi, *In vitro* bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 66A (2003) 364-375.
- [163] X.L. Tang, X.F. Xiao, R.F. Liu, Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method, *Materials Letters*, 59 (2005) 3841-3846.
- [164] S.K. Padmanabhan, E. Ul Haq, A. Licciulli, Rapid synthesis and characterization of silicon substituted nano hydroxyapatite using microwave irradiation, *Current Applied Physics*, 14 (2014) 87-92.
- [165] S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J. Lee, S.C. Chung, Y.H. Kim, Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors,, *Biomaterials*, 24 (2003) 1389-1398.
- [166] D. Arcos, J. Rodríguez-Carvajal, M. Vallet-Regí, The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure. A neutron diffraction study, *Solid State Sciences*, 6 (2004) 987-994.

## *Bibliographie*

- [167] M.A. Troubitsin, N.G. Gabruk, L. Van Thuan, D. Van Dat, I.I. Oleynikova, S.V. Nadezhdin, The comparative characteristic of physical, chemical and bioactive properties of the synthesized hydroxyapatites, *Global Journal of Pharmacology*, 7 (2013) 342-347.
- [168] S. Sutha, K. Kavitha, G. Karunakaran, V. Rajendran, In-vitro bioactivity, biocorrosion and antibacterial activity of silicon integrated hydroxyapatite/chitosan composite coating on 316 L stainless steel implants, *Materials Science and Engineering C*, 33 (2013) 4046-4054.
- [169] M. Bohner, Silicon-substituted calcium phosphates - A critical view *Biomaterials*, 30 (2009) 6403-6406.
- [170] M. Lasgorceix, Mise en forme par microstéréolithographie et frittage de céramiques macro-micro-poreuses en hydroxyapatite silicatée et évaluation biologique, Thèse de Doctorat, (2014) Université de Limoges.
- [171] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I.R. Dickson, M.J. Glimcher, The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy study, *Calcified Tissue International*, 45 (1989) 157-164.
- [172] J.H. Scofield, Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 8 (1976) 129-137.
- [173] ISO13779-3, Analyse chimique et caractérisation de la cristallinité et de la pureté de phase, (2008).
- [174] D. Marchat, M. Zymelka, C. Coelho, L. Gremillard, L. Joly-pottuz, F. Babonneau, C. Esnouf, J. Chevalier, D. Bernache-Assollant, Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 6992-7004.
- [175] B. Desport, J. Carpena, J.L. Lacout, D. Borschneck, J. Gattacceca, Characterization of a calcium phospho-silicated apatite with iron oxide inclusions, *Journal of Crystal Growth*, 316 (2011) 164-171.
- [176] M. Vignoles, Contribution à l'étude de l'influence des ions alcalins sur la carbonatation dans les sites de type B, Thèse de Doctorat, (1984) Instituts National Polytechnique de Toulouse.
- [177] L. Wu, W. Forsling, P.W. Schindler, Surface Complexation of Calcium Minerals in Aqueous Solution, *Journal of Colloid and Interface Science*, 147 (1991) 178-185.
- [178] J.M. Cases, P. Jacquier, S.M. Smani, J.E. Poirier, J.Y. Bottero, Propriétés électrochimiques superficielles des apatites sédimentaires et flottabilité, *Revue de l'Industrie Minérale*, Janvier-Février (1989) 122-133.
- [179] N. Douard, Elaboration et Fonctionnalisation de Biocéramiques Phosphocalciques, Thèse de Doctorat, (2010) Université de Limoges.
- [180] SIDS Initial Assessment Report, 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES), UNEP PUBLICATIONS, Arona, Italy, 11-14 November 2003 (2003).

## *Bibliographie*

- [181] G. Li, L. Zhang, C. Wang, X. Zhao, C. Zhu, Y. Zheng, Y. Wang, Y. Zhao, Y. Yang, Effect of silanization on chitosan porous scaffolds for peripheral nerve regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 101 (2014) 718-726.
- [182] K.S. Deshpande, S. Kuddannaya, J. Stagnus, P.C. Thune, C.P.M. De smet Louis, H. Ter horst Joop, A.M.V. Der Wielen Luuk, M. Ottens, Biofunctionalization and self-interaction chromatography in PDMS microchannels, *Biochemical engineering journal* 67 (2012) 111-119.
- [183] T. Wazawa, Y. Ishizuka-Katsura, S. Nishikawa, A.H. Iwane, S. Aoyama, Grafting of poly(ethylene glycol) onto poly(acrylic acid)-coated glass for a protein-resistant surface, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 2549-2556.
- [184] K. Miyaki, H.-L. Zeng, T. Nakagama, K. Uchiyama, Steady surface modification of polydimethylsiloxane microchannel and its application in simultaneous analysis of homocysteine and glutathione in human serum, *Journal of Chromatography A*, 1166 (2007) 201-206.
- [185] G. Sartori, F. Bigi, R. Maggi, R. Sartorio, D.J. Macquarrie, M. Lenarda, L. Storaro, S. Coluccia, G. Martra, Catalytic activity of aminopropyl xerogels in the selective synthesis of (E)-nitrostyrenes from nitroalkanes and aromatic aldehydes, *Journal of Catalysis*, 222 (2004) 410-418.
- [186] V.M. Gun'ko, E.F. Voronin, E.M. Pakhlov, V.I. Zarko, V.V. Turov, N.V. Guzenko, R. Lebeda, E. Chibowski, Features of fumed silica coverage with silanes having three or two groups reacting with the surface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 166 (2000) 187-201.
- [187] G. Shen, A. Horgan, R. Levicky, Reaction of N-phenyl maleimide with aminosilane monolayers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35 (2004) 59-65.
- [188] W. Yuan, W.J. Van Ooij, Characterization of Organofunctional Silane Films on Zinc Substrates, *Journal of Colloid and Interface Science*, 185 (1997) 197-209.
- [189] C.H. Chiang, H. Ishida, J.L. Koenig, The Structure of  $\gamma$ -Aminopropyltriethoxysilane on Glass Surfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 74 (1980) 396-404.
- [190] V.K.S. Hsiao, J.R. Waldeisen, Y. Zheng, P.F. Lloyd, T.J. Bunning, T.J. Huang, Aminopropyltriethoxysilane (APTES)-functionalized nanoporous polymeric gratings: Fabrication and application in biosensing, *Journal of Materials Chemistry*, 17 (2007) 4896-4901.
- [191] X. Wang, P. Wang, Z. Dong, Z. Dong, Z. Ma, J. Jiang, R. Li, J. Ma, Highly sensitive fluorescence probe based on functional SBA-15 for selective detection of Hg<sup>2+</sup>, *Nanoscale Research Letters*, 5 (2010) 1468-1473.
- [192] S. Mingwu, C. Hongdong, W. Xifu, C. Xueyan, L. Kangan, H.W. Su, G. Rui, Z. Linfeng, Z. Guixiang, S. Xiangyang, Facile one-pot preparation, surface functionalization, and toxicity assay of APTS-coated iron oxide nanoparticles, *Nanotechnology*, 23 (2012) 105601.

## *Bibliographie*

- [193] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D. Kiemle, Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & Sons., (2005).
- [194] M.P. Seach, D. Briggs, Practical surface analysis, (1990).
- [195] W. Dierkes, J.W.M. Noordermeer, Increasing the Silanisation Efficiency of Silica Compounds:Upscaling, *KGK Kautschuk und Gummi Kunststoffe*, 56 (2003) 338-344.
- [196] J.L. Xu, K.A. Khor, Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101 (2007) 187-195.
- [197] D. Briggs, J.T. Grant, Surface analysis by Auger and X-ray photoelectron spectroscopy, IM Publications, (2003).
- [198] M.C. Chang, J. Tanaka, XPS study for the microstructure development of hydroxyapatite/collagen nanocomposites cross-linked using glutaraldehyde, *Biomaterials*, 23 (2002) 3879-3885.
- [199] A. Lebugle, B. Sallek, A. Tai Tai, Surface modification of monetite in water at 37 °C: Characterisation by XPS, *Journal of Materials Chemistry*, 9 (1999) 2511-2515.
- [200] J. Perez-Pariente, F. Balas, M. Vallet-Regi, Surface and chemical study of SiO<sub>2</sub>·P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·CaO·(MgO) bioactive glasses, *Chemistry of Materials*, 12 (2000) 750-755.
- [201] Y. Hijikata, H. Yaguchi, M. Yoshikawa, S. Yoshida, Composition analysis of SiO<sub>2</sub>/SiC interfaces by electron spectroscopic measurements using slope-shaped oxide films, *Applied Surface Science*, 184 (2001) 161-166.
- [202] G. Beshkov, V. Krastev, K. Grigorov, H. Maciel, T.-A. Tang, V. Huang, X-ray photoelectron spectroscopy study of phosphorus silicate glasses, *Surface and Coatings Technology*, 161 (2002) 11-19.
- [203] V. Ääritalo, S. Areva, M. Jokinen, M. Lindén, T. Peltola, Sol-gel-derived TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> implant coatings for direct tissue attachment. Part I: Design, preparation and characterization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1863-1873.
- [204] C.-W. Yang, T.-S. Lui, Kinetics of hydrothermal crystallization under saturated steam pressure and the self-healing effect by nanocrystallite for hydroxyapatite coatings, *Acta Biomaterialia*, 5 (2009) 2728-2737.
- [205] G. Iucci, M. Dettin, C. Battocchio, R. Gambaretto, C. Di Bello, G. Polzonetti, Novel immobilizations of an adhesion peptide on the TiO<sub>2</sub> surface: An XPS investigation, *Materials Science and Engineering C*, 27 (2007) 1201-1206.
- [206] Y. Song, H. Hildebrand, P. Schmuki, Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile TiO<sub>2</sub>, *Surface Science*, 604 (2010) 346-353.
- [207] A. Simon, Intérêt de la microscopie de force atomique sur la biofonctionnalisation de matériaux : caractérisation du greffage et de l'adhésion cellulaire, Thèse de Doctorat Université Bordeaux 1, (2002).

## *Bibliographie*

- [208] Y. El Kortobi, J.B. D'espinoze de la Caillerie, A.P. Legrand, Local Composition of Silicon Oxycarbides Obtained by Laser Spray Pyrolysis, *Chemistry of Materials*, 9 (1997) 632-639.
- [209] M. Biron, Silicones ou siloxanes - structure et propriétés Techniques de l'ingénieur, n2880 (2007).
- [210] P. Cancouet, Synthèse et caractérisation de nouveaux polysiloxanes fonctionnalisées et propriétés biospécifiques, Thèse de Doctorat université Paris 13, (1994).
- [211] J.P. Lafon, Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées, Thèse de Doctorat (2004) Université de Limoges.
- [212] S. Raynaud, Synthèse, frittage et propriétés mécaniques de phosphates de calcium dans le système hydroxyapatite-phosphate tricalcique, Thèse de Doctorat, Université de Limoges, (1999).
- [213] M.T. Kim, J. Lee, Characterization of amorphous SiC:H films deposited from hexamethyldisilazane, *Thin Solid Films*, 303 (1997) 173-179.
- [214] L. Byczynski, M. Dutkiewicz, H. Maciejewski, Thermal degradation studies of poly(urethane-siloxane) thermosets based on co-poly(dimethyl)(methyl, hydroxypolyoxyethylenepropyl) siloxane, *Thermochimica Acta*, 589 (2014) 252-261.
- [215] M. Andriot, S.H. Chao, A. Colas, S. Cray, F. de Buyl, J.V.J. DeGroot, A. Dupont, T. Easton, J.L. Garaud, G. E., F. Gubbels, M. Jungk, S. Leadley, J.P. Lecomte, B. Lenoble, R. Meeks, A. Mountney, G. Shearer, S. Stassen, C. Stevens, X. Thomas, A.T. Wolf, Silicones in Industrial Applications, A. Colas, Dow Corning Europe SA, Seneffe (Belgium).
- [216] E. Poli, V. Chaleix, C. Damia, Z. Hjezi, E. Champion, V. Sol, Efficient quantification of primary amine functions grafted onto apatite ceramics by using two UV-Vis spectrophotometric methods, *Analytical Methods*, 6 (2014) 9622-9627.
- [217] M. Mrksich, G.M. Whitesides, Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 25 (1996) 55-78.
- [218] C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley, M.J. Percy, Mediation of biomaterialcell interactions by adsorbed proteins. A review, *Tissue Engineering* 11 (2005) 1-18.
- [219] G. Rosenman, D. Aronov, Wettability engineering and bioactivation of hydroxyapatite nanoceramics, *NSTI-Nanotech*, 2 (2006) 91-94.
- [220] C.M. Botelho, R. Brooks, M. Kanitakahara, C. Ohtsuki, S. Best, M.A. Lopes, N. Rushton, W. Bonfield, J.D. Santos, Effect of Protein Adsorption onto the Dissolution of Silicon-Substituted Hydroxyapatite *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1 (2011) 72-79.
- [221] F. Hejda, P. Solar, J. Kousal, Surface free energy determination by contact angle measurements – A comparison of various approaches, *WDS'10 Proceedings of Contributed Papers, Part III*, (2010) 25-30.

## *Bibliographie*

- [222] C. Jouany, C. Chenu, P. Chassin, Détermination de la mouillabilité des constituants du sol à partir de mesures d'angles de contact: revue bibliographique, *Science du Sol*, 30 (1992) 33-47.
- [223] A. Serro, A. Fernandes, B. Saramago, Dynamic interfacial behaviour of bovine serum albumin solutions on titanium surfaces, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 125 (1997) 209-219.
- [224] J. Vandiver, D. Dean, N. Patel, C. Botelho, S. Best, J.D. Santos, M.A. Lopes, W. Bonfield, C. Ortiz, Silicon addition to hydroxyapatite increases nanoscale electrostatic, van der Waals, and adhesive interactions, *Journal of Biomedical Materials Research*, 78 (2006) 352-363.
- [225] B. Arkles, Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silanes, Gelest Inc., Morrisville, PA, (2006).
- [226] P. Dubruel, E. Vanderleyden, M. Bergada, I. De Paepe, H. Chen, S. Kuypers, J. Luyten, J. Schrooten, L. Van Hoorebeke, E. Schacht, Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces, *Surface Science*, 600 (2006) 2562–2571.
- [227] K. Jradi, C. Daneault, B. Chabot, Chemical surface modification of glass beads for the treatment of paper machine process waters, *Thin Solid Films*, 519 (2011) 4239–4245.
- [228] B. Arkles, Y. Pan, Y.M. Kim, The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification, “Silanes and Other Coupling Agents Vol 5, K. Mittal Ed. p.51 VSP (Brill), 5 (2009).
- [229] A.Y. Fadeev, T.J. McCarthy, Self-Assembly Is Not the Only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces: Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon, *Langmuir*, 16 (2000) 7268–7274.
- [230] B. Watts, L. Thomsen, P.C. Dastoor, Proceedings of the International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals Part III, *Synthetic Metals*, 154 (2005) 1-342
- [231] L. Thomsen, B. Watts, P.C. Dastoor, A NEXAFS orientation study of  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane on zinc oxide surfaces, *Surface and Interface Analysis*, 38 (2006) 1139–1145.

## *Bibliographie*

# Annexe 1. Calcium nitrate tetrahydrate

**SIGMA-ALDRICH**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sigmaaldrich.com](mailto:techserv@sigmaaldrich.com)

Outside USA: [eurtechserv@sigmaaldrich.com](mailto:eurtechserv@sigmaaldrich.com)

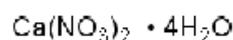
## Product Specification

**Product Name:**

Calcium nitrate tetrahydrate –  $\geq 99.0\%$

**Product Number:**

C1396



**CAS Number:**

13477-34-4

**MDL:**

MFC00149604

**Formula:**

CaN2O8 · 4H2O

**Formula Weight:**

236.15 g/mol

TEST	Specification
Appearance (Color)	White
Appearance (Form)	Powder or Crystals
Solubility (Turbidity)	Clear
At 20g plus 100ml of Water	
Solubility (Color)	Colorless
Complexometric EDTA	$\geq 99.0\%$
Recommended Retest Period	
3 Years	

Specification: PRD.0.ZQ5.10000028031

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Annexe 2. di-Ammonium hydrogen orthophosphate



### Specification Sheet

Product: di-Ammonium hydrogen  
orthophosphate

Code: A/5360/60

Grade: AR

Application:

Expiry Phrase:

Test	Guaranteed	Units
Assay	≥ 98	%
Calcium (Ca)	≤ 5	ppm
Copper (Cu)	≤ 5	ppm
Iron (Fe)	≤ 5	ppm
Lead (Pb)	≤ 5	ppm
Magnesium (Mg)	≤ 5	ppm
Nitrate (NO <sub>3</sub> ) (%)	≤ 0.001	%
Potassium (K)	≤ 10	ppm
Sodium (Na)	≤ 10	ppm
Total chloride (Cl)	≤ 0.0005	%
Total silicon (Si)	≤ 50	ppm
Total sulfur (S)	≤ 50	ppm
Zinc (Zn)	≤ 5	ppm
pH (5% aq. solution)	≥ 7.8 and ≤ 8.2	

Additional Information:

Mrs K S Cluskey BSc  
Quality & Compliance Manager

Wednesday 30th of April 2014 01:44:54 PM  
Any queries please phone: +44(0)1509 555158.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC  
*The world leader in serving science*

## Annexe 3. Silicon tetraacetate

# Specification Sheet

SIGMA-ALDRICH

<b>Product Name</b>	Silicon tetraacetate, 98%
<b>Product Number</b>	345156
<b>Product Brand</b>	ALDRICH
<b>CAS Number</b>	<a href="#">562-90-3</a>
<b>Molecular Weight</b>	264.26
<b>Storage Temp</b>	-20°C

<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>
<b>Appearance (Color)</b>	Conforms to Requirements White to Beige
<b>Appearance (Form)</b>	Conforms to Requirements Crystals or Crystalline Powder
<b>Infrared spectrum</b>	Conforms to Structure
<b>Purity (GC)</b>	≥97.5 %

## Annexe 4. Ammonia solution



### Specification Sheet

Product: Ammonia solution 0.88 SG

Code: A/3280/21

Grade: AR

Application: For analysis

Expiry Phrase: Use within 5yrs of opening

Test	Guaranteed	Units
Assay	$\geq 32$ and $\leq 36$	%
Calcium (Ca)	$\leq 1$	ppm
Carbonate (CO <sub>3</sub> )	$\leq 0.002$	%
Colour	$\leq 10$	APHA
Copper (Cu)	$\leq 0.05$	ppm
Iron (Fe)	$\leq 0.2$	ppm
Lead (Pb)	$\leq 0.05$	ppm
Magnesium (Mg)	$\leq 0.1$	ppm
Potassium (K)	$\leq 1$	ppm
Pyridine & homologues (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N)	$\leq 2$	ppm
SG at 20C	$\geq 0.88$ and $\leq 0.89$	
Sodium (Na)	$\leq 5$	ppm
Substances reducing KMnO <sub>4</sub>	$\leq 0.001$	%
Total chloride (Cl)	$\leq 0.00005$	%
Total phosphorus (P)	$\leq 0.5$	ppm
Total silicon (Si)	$\leq 1$	ppm
Total sulfur (S)	$\leq 1$	ppm
Zinc (Zn)	$\leq 0.2$	ppm

Additional Information:

Mrs K S Cluskey BSc  
Quality & Compliance Manager.

Sunday 25th of May 2014 10:36:09 AM  
Any queries please phone: +44(0)1509 555158.

**ThermoFisher**  
**SCIENTIFIC**  
*The world leader in serving science*

## Annexe 5. (3-Aminopropyl)triethoxysilane

**SIGMA-ALDRICH**<sup>®</sup>

[sigmaaldrich.com](http://sigmaaldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@al.com](mailto:techserv@al.com)

Outside USA: [eurtechserv@al.com](mailto:eurtechserv@al.com)

### Product Specification

**Product Name:**

(3-Aminopropyl)triethoxysilane – 99%

**Product Number:**

440140

**CAS Number:**

919-30-2

**MDL:**

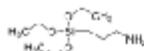
MFC000008207

**Formula:**

C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>Si

**Formula Weight:**

221.37 g/mol



**TEST**

**Specification**

Appearance (Color)

Colorless

Appearance (Form)

Liquid

Infrared Spectrum

Conforms to Structure

Color Test

≤ 25 APHA

Purity (GC)

≥ 98.5 %

Expiration Date Period

2 Years

Specification: PRD.1.ZQ5.10000027944

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of Invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Annexe 6. 3-Ethoxydimethylsilylpropylamine

**SIGMA-ALDRICH®**
[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

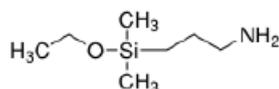
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

### Product Specification

Product Name:  
3-(Ethoxydimethylsilyl)propylamine - 97%

Product Number: 588857  
 CAS Number: 18306-79-1  
 MDL: MFCD00053947  
 Formula: C<sub>7</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>Si</sub>  
 Formula Weight: 161.32 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Proton NMR spectrum	Conforms to Structure
Purity (GC)	≥ 96.5 %

Specification: PRD.0.ZQ5.10000014681

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## Annexe 7. 3-Aminopropyl(diethoxy)methylsilane

Pas de fiche de spécification : les données sont disponibles sur le site

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/371890?lang=fr&region=FR>

### Informations Sécurité

Symbol	 GHS05
Signal word	<b>Danger</b>
Hazard statements	H314
Precautionary statements	P280-P305 + P351 + P338-P310
Personal Protective Equipment	Faceshields, full-face respirator (US), Gloves, Goggles, multi-purpose combination respirator cartridge (US), type ABEK (EN14387) respirator filter
Hazard Codes (Europe)	C
Risk Statements (Europe)	34
Safety Statements (Europe)	26-36/37/39-45
RIDADR	UN 3267 8 / PGII
WGK Germany	3
RTECS	UI0700000
Flash Point(F)	185 °F
Flash Point(C)	85 °C

### Propriétés

Related Categories	Materials Science, Micro/NanoElectronics, Self Assembly & Contact Printing, Self-Assembly Materials, Silanes Plus...
assay	97%
form	liquid
refractive index	n <sub>20/D</sub> 1.426(lit.)
bp	85-88 °C/8 mmHg(lit.)
density	0.916 g/mL at 25 °C(lit.)

## Annexe 8. Liste des abréviations

AFM : Microscope à force atomique	OB : Ostéoblaste
AHTMS : (17-Aminoheptadecyl)triméthoxylesilane	OC : Ostéoclaste
AISI 316 : Acier inoxydable au chrome-nickel-molybdène	OTMS : n-Octadecyltriméthoxylesilane
APDMES : 3-(éthoxydiméthylesilyl)propylamine	OTS : Octadecyltrichlorosilane
APMDES : 3-aminopropyl(diéthoxyle)méthylesilane	P(BLG-NCA) : (g-benzyl-L-glutamate-N-carboxyanhydride)
APTES : 3-Aminopropyltriéthoxylesilane	PBS : Phosphate buffered saline
APTMS : 3-aminopropyltriméthoxylesilane	PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
BCP : Phosphate de calcium biphasé	PDMS : polydiméthysiloxane
BMP : Protéine morphogénétique osseuse	PE : Polyéthylène
BMSCs : cellules stromales de la moelle osseuse humaine	PEEK : Polyétheréthercétone
BP : Bisphosphonates	PET : Polyéthylène glycol
BSA : Albumine de sérum bovin	PGA : Acide polyglycolique
BSP : Sialoprotéine osseuse	pHA : Hydroxyapatite non microporeuse
CaP : Phosphate de calcium	PMMA : Polyméthacrylate de méthyle
CO : Collagène	PNIPAM : poly(N-isopropylacrylamide)
Co-Cr-Mo : Alliages à base de cobalt-chrome-molybdène	PTS : n-Propyltrichlorosilane
DCM : Dichlorométhane	RGD : Arginine – Glycine – Acide Aspartique
DRX : Diffraction des rayons X	SaOs-2 : Sarcoma osteogenic
DSS : Ester bis-N-hydroxysuccinimide	SiHA : Hydroxyapatite silicatée
FGF : facteurs de croissance des fibroblastes basique	SM : Spectrométrie de masse
FN : Fibronectine	SSA : Surface spécifique
FTCA : Fluorescein thioureidoamino caproic acid	TCP : Phosphate tri-calcique
FT-IR : Spectrométrie infrarouge	TCTS : n-Triacontyltrichlorosilane
HA : Hydroxyapatite	TEOS : orthosilicate de tétraéthyle
HBMSC : Cellules ostéoprogénitrices humaine	TG : Thermogravimétrie
IL8 : Interleukin 8	TGF- $\beta$ : Facteur de croissance transformant bêta
KRSR : Lysine-Arginine-Sérine-Arginine	THF : Tétrahydrofurane
KSRR : Lysine-Sérine-Arginine-Arginine	Ti6Al4V : Alliages à base de titane
KUSA/A1 : Cellules ostéoblastiques murines	TNF- $\alpha$ : Facteur de nécrose tumorale alpha
MC3T3 : Cellules ostéoblastiques de souris	VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
MEB : Microscope électronique à balayage	XPS : Spectroscopie de photoélectrons X
MEM : Minimum Essential Medium	
mHA : Hydroxyapatite microporeuse	
mPEG : poly(éthylèneglycol) monométhyleéther	
NCP : Protéines non collagéniques	

## Table des illustrations

Figure I-1 : Schéma du tissu osseux [7] .....	8
Figure I-2 : La matrice et les cellules osseuses [11].....	10
Figure I-3 : Illustration du cycle de remodelage osseux et rôle des ostéoblastes et ostéoclastes durant ce processus [13] .....	11
Figure I-4 : Evolution chronologique des générations des substituts osseux synthétiques (D'après Jacquart [23]).....	13
Figure I-5 : Spectres de bioactivité des différents implants biocéramiques : (a) Bioactivité relative et (b) Temps de la formation d'une liaison entre l'os et la surface de l'implant [(A) 45S5 Bioglass®, (B) Minal3 Ceravital®, (C) 55S4.3 Bioglass®, (D) A/W glass-ceramic, (E) HA, (F) KGy213 Ceravital®] [29] .....	15
Figure I-6 : Schéma des événements ayant lieu à l'interface entre une céramique bioactive et le fluide biologique entourant [45] .....	18
Figure I-7 : Structure chimique du tripeptide RGD.....	23
Figure I-8 : Schéma représentatif des profils d'expression des molécules de signalisation au cours de la guérison des fractures [81]. Les traits plein représentent les périodes de forte activité et les traits en pointillés celles de plus faible activité.....	26
Figure I-9 : Schéma général représentatif de l'adsorption physique de molécules biologiques à la surface d'un substrat en hydroxyapatite .....	29
Figure I-10 : Structure chimique générale des pyrophosphates et des bisphosphonates [102] .....	30
Figure I-11 : Schéma représentatif du mécanisme d'adsorption des bisphosphonates à la surface de CDA (Calcium Deficient Apatite) [103] .....	31
Figure I-12 : Schéma général représentatif de l'adsorption chimique de molécules biologiques à la surface d'un substrat en hydroxyapatite .....	31
Figure I-13 : Schéma représentatif du greffage covalent de molécules biologiques à la surface d'un substrat en hydroxyapatite.....	32
Figure I-14 : Les différentes fonctionnalités des organosilanes .....	33
Figure I-15 : Réactions d'hydrolyse et d'homocondensation des organosilanes quadrifonctionnels dans le cas où X = OR [108].....	34
Figure I-16 : Différentes voies d'hydrolyse et d'homocondensation des organosilanes dans le cas où X = OR [110].....	35
Figure I-17 : Schéma représentatif de la réaction d'hétérocondensation d'un organosilane à la surface d'un substrat dans le cas où X = OR .....	35
Figure I-18 : Organigramme des paramètres influençant la réaction de silanisation .....	36
Figure I-19 : Influence de la quantité d'eau sur le greffage des organosilanes trifonctionnels dans le cas où X = OMe [128].....	40
Figure I-20 : Réaction de condensation auto-catalysée entre une molécule d'APTÉS et la surface d'un oxyde métallique dans un solvant anhydre [129] .....	41
Figure I-21 : Paramètres pertinents lors de la fonctionnalisation de particules d'hydroxyapatite par un organosilane.....	46
Figure I-22 : Principe de la fonctionnalisation par des biomolécules de la surface des substrats .....	48
Figure I-23 : Greffage des méthoxylesilanes à la surface d'HA établi par Da Silva <i>et al.</i> [146].....	50
Figure I-24 : Différents modes d'interaction entre les groupements silanols de l'APTÉS et les groupements OH de la surface [147].....	51
Figure I-25 : Procédé de greffage de la $\beta$ -cyclodextrine à la surface d'HA [150] .....	51
Figure I-26 : Procédé de greffage d'APTÉS à la surface d'HA établi par Durrieu <i>et al.</i> [68] .....	52

## Table des illustrations

Figure I-27 : Procédé de greffage utilisé par Nelson <i>et al.</i> [151] .....	53
Figure I-28 : Procédé de greffage d'APTES à la surface des pastilles de Skelite™ établi par Wang <i>et al.</i> [152] .....	54
Figure I-29 : Procédé de silanisation d'HA par de l'APTES établi par Schuessele <i>et al.</i> [105] .....	55
Figure II-1 : Schéma du montage utilisé pour les synthèses par précipitation en voie aqueuse [170] ..	64
Figure II-2 : Profil linéaire d'une topographie de surface réalisée par AFM permettant le calcul du Ra .....	69
Figure II-3 : Diffractogrammes des poudres (a) d'HA et (b) de SiHA calcinées à 1000°C/15 h.....	74
Figure II-4 : Diffractogrammes expérimentaux (Y observé), calculé (Y calculé) et différence mesurée (Y observé – Y calculé) dans le domaine en 2 theta [20-120°] à l'issue de l'affinement des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h .....	76
Figure II-5 : Spectres FT-IR dans les intervalles (a) 4000-400 cm <sup>-1</sup> , (b) 1000-400 cm <sup>-1</sup> et (c) 1500-1400 cm <sup>-1</sup> des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h. Les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA.....	78
Figure II-6 : Diffractogrammes des poudres (a) d'HA et (b) de SiHA calcinées à 1000°C/1 h.....	81
Figure II-7 : Spectres FT-IR dans les intervalles (a) 4000-400 cm <sup>-1</sup> , (b) 1000-400 cm <sup>-1</sup> et (c) 1500-1400 cm <sup>-1</sup> des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1 h. Les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA.....	81
Figure II-8 : Clichés MEB des poudres (a, c) d'HA et (b, d) de SiHA calcinées à 1000°C/1 h.....	83
Figure II-9 : Distribution granulométrique en fréquence (%) et en fréquence cumulée (%) des poudres (a, c) d'HA et (b,d) de SiHA calcinées à 1000°C/1 h.....	83
Figure II-10 : Diffractogrammes des pastilles (a) d'HA et (b) de SiHA frittées à 1200°C/30 min et polies .....	85
Figure II-11 : Spectres FT-IR dans les intervalles (a) 4000-400 cm <sup>-1</sup> , (b) 1000-400 cm <sup>-1</sup> et (c) 1500-1400 cm <sup>-1</sup> des pastilles d'HA et de SiHA frittées à 1200°C/30 min. Les indexations représentées en noir sont communes aux spectres d'HA et SiHA, les indexations en rouge sont spécifiques aux spectres de SiHA .....	85
Figure II-12 : Clichés MEB de la surface des pastilles (a, b, c) d'HA et (d, e, f) de SiHA frittées à 1200°C/30 min .....	87
Figure II-13 : Schéma représentant la maille cristalline de l'hydroxyapatite [155] .....	89
Figure II-14 : Représentation des molécules de (a) 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES), (b) 3-aminopropyl (diéthoxyle) méthylesilane (APMDES) et (c) 3-(éthoxydiméthylesilyl)propylamine (APDMES) .....	90
Figure II-15 : Spectres FT-IR des organosilanes utilisés (a) M, (b) D et (c) T .....	93
Figure II-16 : Spectres FT-IR des organosilanes utilisés : (a) M, (b) D et (c) T dans les intervalles 4000-2500 cm <sup>-1</sup> (Zoné I) et 1700-500 cm <sup>-1</sup> (Zone III) .....	94
Figure II-17 : Courbes d'analyses TG effectuées sous atmosphère d'argon et dérivées des courbes d'analyses TG pour les molécules d'organosilane utilisées (a) T, (b) D et (c) M.....	96
Figure II-18 : Émissions des masses au cours du traitement thermique de l'organosilane T .....	97
Figure II-19 : Émissions des masses au cours du traitement thermique de l'organosilane D .....	98
Figure II-20 : Émissions des masses au cours du traitement thermique de l'organosilane M.....	99
Figure II-21 : Représentation de la décomposition des chaînes organiques de l'organosilane T dans le spectromètre de masse.....	101
Figure III-1 : Organigrammes des protocoles de greffage (a) des poudres et (b) des pastilles d'HA et de SiHA.....	109
Figure III-2 : Clichés MEB des poudres (a) HA, (b) SiHA, (c) HA-Réf, (d) SiHA-Réf, (e) HA-T et (f) SiHA-T .....	113

*Table des illustrations*

Figure III-3 : Spectres FT-IR des poudres HA-M, HA-D et HA-T dans les intervalles (a) 4000-400 cm <sup>-1</sup> et (b) 3000-2800 cm <sup>-1</sup> .....	115
Figure III-4 : Spectres FT-IR des poudres SiHA-M, SiHA-D et SiHA-T dans les intervalles (a) 4000-400 cm <sup>-1</sup> et (b) 3000-2800 cm <sup>-1</sup> .....	115
Figure III-5 : Spectres XPS larges des poudres (a) d'HA et (b) de SiHA non greffées .....	117
Figure III-6 : Décomposition des pics XPS Ca 2p, P 2p, O 1s, C 1s et Si 2p des poudres d'HA et de SiHA non greffées .....	119
Figure III-7 : Spectre XPS large d'une poudre HA-T .....	121
Figure III-8 : Décomposition des pics XPS O 1s et C 1s obtenus à la surface des poudres d'HA et de SiHA greffées .....	122
Figure III-9 : Décomposition des pics XPS Si 2p et N 1s obtenus à la surface des poudres d'HA et de SiHA greffées .....	123
Figure III-10 : Schéma représentatif des différentes contributions de l'azote à la surface du substrat	126
Figure III-11 : Evolution des pourcentages atomiques des différents éléments chimiques présents à la surface des poudres avant et après greffage (les pourcentages atomiques sont indiqués sur le graphique).....	129
Figure III-12 : Evolution des pourcentages atomiques des éléments chimiques présents à la surface de la poudre d'HA-T et de la pastille d'HA-T après des décapages ioniques successifs. Les temps cumulés (min) de décapage sont indiqués entre parenthèses .....	132
Figure III-13 : Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et émissions de masses (SM) des poudres (a, b) d'HA et (c, d) d'HA-Réf.....	136
Figure III-14 : Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et émissions de masses (SM) des poudres (a, b) de SiHA et (c, d) de SiHA-Réf .....	137
Figure III-15 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres HA-M.....	139
Figure III-16 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres SiHA-M .....	140
Figure III-17 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres HA-D .....	141
Figure III-18 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres SiHA-D.....	142
Figure III-19 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG) et (b) émissions de masses (SM) des poudres HA-T.....	143
Figure III-20 : (a) Perte de masse (TG), dérivée du signal (dTG), et (b) émissions de masses (SM) des poudres SiHA-T .....	144
Figure III-21 : Schéma représentatif du mode de greffage covalent supposé de l'organosilane M à la surface des poudres d'HA et de SiHA.....	148
Figure III-22 : Schéma représentatif des modes de greffage supposés de l'organosilane D à la surface des poudres : cas des poudres d'HA où le greffage a eu lieu par (a) 1 ou (b) 2 chaînes éthoxyle ; cas des poudres de SiHA où le greffage a eu lieu par (c) 2 chaînes éthoxyle .....	149
Figure III-23 : Schéma représentatif du mode de greffage de l'organosilane T à la surface d'HA et de SiHA.....	150
Figure III-24 : Allures générales des émissions de masses m/e =15 des poudres d'HA et de SiHA greffées .....	152
Figure III-25 : Quantités de carbone en mg/m <sup>2</sup> obtenues pour les poudres d'HA et de SiHA avant et après greffage des organosilanes .....	155
Figure III-26 : Architecture générale des organosilanes à la surface des substrats .....	162

## *Table des illustrations*

Figure III-27 : Variations de la rugosité de surface Sa à la surface des pastilles non polies et polies en HA et SiHA avant et après greffage avec l'organosilane T (les valeurs indiquées sur la figure correspondent à Sa) .....	163
Figure III-28 : Images topographiques en AFM de la surface des pastilles non polies : (a) HA non greffée, (b) SiHA non greffée, (c) HA-Réf, (d) SiHA-Réf, (e) HA-T, (f) SiHA-T .....	166
Figure III-29 : Exemples de profils de rugosité pour les pastilles non polies .....	167
Figure III-30 : Images topographiques en AFM de la surface des pastilles polies : (a) HA non greffée, (b) SiHA non greffée, (c) HA-Réf, (d) SiHA-Réf, (e) HA-T, (f) SiHA-T .....	168
Figure III-31 : Exemples de profils de rugosité pour les pastilles polies .....	169
Figure III-32 : Forces appliquées sur une goutte de liquide posée sur un support solide.....	171
Figure III-33 : Représentations graphiques de la relation d'Owens-Wendt pour les substrats en HA et en SiHA avant et après greffage et équations de régression linéaire associées.....	175

## Table des tableaux

Tableau I-1 : Paramètres de greffage rencontrés dans la littérature lors de la silanisation des substrats par des organosilanes.....	37
Tableau I-2 : Influence du milieu réactionnel sur les réactions d'hydrolyse, d'homocondensation et d'hétérocondensation (+ signifie que la réaction est favorisée et – signifie que la réaction est défavorisée) .....	39
Tableau I-3 : Noms, acronymes et formules chimiques et semi-développées des organosilanes employés par Bierbaum <i>et al.</i> [134] .....	44
Tableau I-4 : Paramètres de greffage rencontrés dans la littérature lors de la fonctionnalisation de l'hydroxyapatite (HA) par des organosilanes.....	49
Tableau II-1: Exemples de substitutions dans les hydroxyapatites phosphocalciques [158] .....	60
Tableau II-2 : Paramètres de synthèse utilisés lors de la synthèse des poudres d'HA et de SiHA [158] .....	63
Tableau II-3 : Quantité de réactifs (n), concentration de réactifs (C), rapports molaires (Ca/P) et (Ca/(P+Si)) de réactifs et teneur hypothétique (x) de silicium.....	63
Tableau II-4 : Fiches PDF de référence pour l'indexation des différents composés.....	66
Tableau II-5 : Facteurs de confiance ( $\chi^2$ , $R_p$ , $R_{wp}$ ), paramètres de maille (a, b, c) et volume de la maille (V) pour les poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/15 h.....	74
Tableau II-6 : Bandes d'absorption susceptibles d'être détectées dans les poudres d'HA et de SiHA. 78	
Tableau II-7 : Facteurs de confiance ( $\chi^2$ , $R_p$ , $R_{wp}$ ), paramètres de maille (a, b, c) et volume de la maille (V) pour les poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1 h.....	81
Tableau II-8 : Surfaces spécifiques (SSA), masses volumiques réelles ( $\rho_{réelle}$ ), masses volumiques théoriques ( $\rho_{thé}$ ), estimation du diamètre moyen des grains ( $\phi_{moy}$ ) et potentiel zêta ( $p\zeta$ ) des poudres d'HA et de SiHA calcinées à 1000°C/1 h .....	83
Tableau II-9 : Densité d'Archimède moyenne $d_{Arch}(moy)$ , taux de densification ( $\tau$ %) et surface spécifique (SSA) des pastilles d'HA et de SiHA frittées à 1200°C/30 min et polies.....	87
Tableau II-10 : Différents paramètres calculés pour les substrats d'HA et de SiHA .....	89
Tableau II-11 : Principales bandes de vibrations des organosilanes .....	93
Tableau II-12 : Principaux fragments organiques et émissions des masses correspondantes .....	103
Tableau III-1 : Différents paramètres calculés pour les substrats d'HA et de SiHA.....	110
Tableau III-2 : Surfaces spécifiques (SSA) des poudres non greffées (HA, SiHA) et des poudres greffées avec l'organosilane trifonctionnel (HA-T, SiHA-T) .....	112
Tableau III-3 : Rapports d'aire vsCH <sub>2</sub> (NH <sub>2</sub> )/vsOH pour les poudres d'HA et de SiHA greffées .....	115
Tableau III-4 : Energies des liaisons (eV) des éléments chimiques (Ca, P, O, C, Si, N) détectés à la surface des poudres d'HA et de SiHA avant et après greffage .....	120
Tableau III-5 : Rapports des aires des pics caractéristiques des poudres d'HA et de SiHA avant et après greffage .....	124
Tableau III-6 : Rapports des aires A(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )/A(NH <sub>2</sub> ) pour HA-D, HA-T, SiHA-D et SiHA-T .....	126
Tableau III-7 : Pourcentages atomiques des différents éléments chimiques présents à la surface des poudres avant et après greffage. L'incertitude absolue sur les pourcentages atomiques est de 2 %, l'incertitude sur les rapports molaires est calculée à partir de celles des pourcentages atomiques .....	130
Tableau III-8 : Pertes des masses (%) observées par thermogravimétrie pour les poudres calcinées et de référence .....	135
Tableau III-9 : Pertes des masses (%) observées par thermogravimétrie pour les poudres greffées... 138	
Tableau III-10 : Pourcentages atomiques des différents éléments chimiques détectés à la surface de la poudre d'HA-T après chauffage à 900°C et analysée par XPS.....	146

## Table des tableaux

Tableau III-11 : Températures de dégradations des fragments organiques et nombre de groupements éthoxyle impliqués dans le greffage pour les poudres d'HA et de SiHA greffées .....	152
Tableau III-12 : Masse molaire de l'organosilane (g/mol), $\Delta m_{2total}$ (%), $\Delta m_{org}$ (%), densité surfacique en g/m <sup>2</sup> et en $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ des poudres d'HA et de SiHA greffées ( $SSA_{HA} = 7,0 \text{ m}^2/\text{g}$ et $SSA_{SiHA} = 16,1 \text{ m}^2/\text{g}$ ) .....	153
Tableau III-13 : Calcul théorique et expérimental de la densité massique ( $\mu\text{mol}/\text{g}$ ) et surfacique ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) des molécules d'organosilanes.....	158
Tableau III-14 : Densités surfaciques ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) d'organosilanes déterminées par les méthodes de Kaiser et d'addition en divisant $n_{amine}$ par les surfaces spécifiques des poudres ( $SSA_{HA} = 7,0 \text{ m}^2/\text{g}$ et $SSA_{SiHA} = 16,1 \text{ m}^2/\text{g}$ ).....	161
Tableau III-15 : Caractéristiques des solvants utilisés pour la détermination de l'énergie de surface	173
Tableau III-16 : Angles de contact moyens ( $\theta_m$ en °) obtenus à la surface des pastilles.....	174
Tableau III-17 : Récapitulatif des valeurs de l'équation d'Owens-Wendt calculées pour les substrats en HA et en SiHA avant et après greffage .....	174
Tableau III-18 : Terme des interactions polaires ( $\gamma_s^p$ ), terme des interactions dispersives ( $\gamma_s^d$ ) et énergie de surface ( $\gamma_s$ ) en mN/m des substrats en HA et en SiHA avant et après greffage .....	174



## Résumé

L'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) est largement utilisée en tant que substitut osseux. Sa composition chimique est proche de celle du minéral osseux ce qui en fait une céramique ostéoconductrice. Les hydroxyapatites silicatées (SiHA) sont actuellement étudiées. La présence de silicium au sein de la structure apatite pourrait accroître la bioactivité des implants. Cependant, ces substituts ne sont pas ostéoinducteurs. Ils n'ont pas la capacité d'induire la formation de tissus osseux, ce qui limite leur utilisation en chirurgie réparatrice. L'une des stratégies envisagées afin de les rendre ostéoinducteurs est de fonctionnaliser leur surface par des molécules biologiquement actives *via* des organosilanes. L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de l'incorporation du silicium dans l'hydroxyapatite et de la fonctionnalité des amino-éthoxy-silanes (1, 2 ou 3 groupements hydrolysables) sur le mode de greffage et la quantité de molécules à la surface des substrats. Les céramiques HA et SiHA silanisées ont été élaborées et caractérisées par spectroscopie de photoélectrons X et par analyse thermogravimétrique couplée à la spectrométrie de la masse. Les résultats ont confirmé un greffage covalent quelles que soient la nature du substrat et la fonctionnalité de l'organosilane. La quantité greffée augmente avec la fonctionnalité de l'organosilane. La présence de silicium au sein du substrat favorise le nombre de chaînes éthoxyles impliquées dans la réaction d'hétérocondensation et diminue la quantité d'organosilanes greffée. Les organosilanes sont répartis d'une façon non homogène sur la surface mais sans formation d'une couche recouvrant celle-ci en totalité.

**Mots clés :** Hydroxyapatite silicatée, greffage covalent, silanisation, fonctionnalité

## Abstract

Calcium phosphate hydroxyapatite (HA) is widely used as bone substitute. Its chemical composition is close to the mineral part of bone which induces osteoconductive properties. Silicated hydroxyapatites (SiHA) are being studied. The incorporation of silicon in the hydroxyapatite structure would increase the bioactivity of the implant. However, these substitutes are not osteoinductive. They do not have the ability to induce bone formation which limits their use in reconstructive surgery. In order to obtain osteoinductive ceramics, it is possible to functionalize their surface by biologically active molecules *via* organosilanes. The present work studies the influence of silicon incorporation in the hydroxyapatite structure and the functionality of amino-ethoxy-silanes (1, 2 or 3 hydrolysable groups) on the grafting mode and on the quantity of molecules at the substrates surface. HA and SiHASilanised ceramics have been produced and characterized by means of X-ray photoelectron spectroscopy and thermogravimetric analysis coupled with mass spectrometry. The results confirmed the covalent grafting whatever the nature of the substrate and the functionality of the organosilane might be. The grafted amount increases with the functionality of organosilane. The presence of silicon within the substrate promotes the number of ethoxyl chains involved in the heterocondensation reaction and decreases the grafted amount of organosilanes. The organosilanes are not homogeneously distributed on the surface but without formation of a layer covering the entire surface.

**Keywords:** Silicated hydroxyapatite, covalent grafting, silanisation, functionality