



HAL
open science

Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l'élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées.

Baptiste Charbonnier

► **To cite this version:**

Baptiste Charbonnier. Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l'élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées.. Autre. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSEM031 . tel-01665170

HAL Id: tel-01665170

<https://theses.hal.science/tel-01665170>

Submitted on 15 Dec 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSEM031

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Ecole des Mines de Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Génie des Procédés
Discipline : Science des Matériaux

Soutenue publiquement le 09/12/2016, par :
Baptiste CHARBONNIER

**Développement de procédés de mise en
forme et de caractérisation pour
l'élaboration de biocéramiques en
apatites phosphocalciques carbonatées**

Devant le jury composé de :

Christian REY, Pr., CIRIMAT UMR CNRS 5085

Président

Marc BOHNER, Pr., RMS Foundation
Éric CHAMPION, Pr., SPCTS UMR CNRS 7315
Helen REVERON, CR, MATEIS UMR CNRS 5510
Esther POTIER, CR, B2OA UMR CNRS 7052
Luc MALAVAL, CR, SAINBIOSE UMR INSERM 1059

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examineur

Didier BERNACHE-ASSOLLANT, Pr., SAINBIOSE UMR INSERM 1059
David MARCHAT, MCU, SAINBIOSE UMR INSERM 1059

Directeur de thèse
Encadrant de thèse

Spécialités doctorales	Responsables :	Spécialités doctorales	Responsables
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	K. Wolski Directeur de recherche	MATHEMATIQUES APPLIQUEES	O. Roustant, Maître-assistant
MECANIQUE ET INGENIERIE	S. Drapier, professeur	INFORMATIQUE	O. Boissier, Professeur
GENIE DES PROCEDES	F. Gruy, Maître de recherche	IMAGE, VISION, SIGNAL	JC. Pinoli, Professeur
SCIENCES DE LA TERRE	B. Guy, Directeur de recherche	GENIE INDUSTRIEL	X. Delorme, Maître assistant
SCIENCES ET GENIE DE L' ENVIRONNEMENT	D. Graillot, Directeur de recherche	MICROELECTRONIQUE	Ph. Lalevée, Professeur

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

ABSI	Nabil	CR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
BURLAT	Patrick	PR1	Génie Industriel	FAYOL
CHRISTIEN	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSE	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
DOUCE	Sandrine	PR2	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FOURNIER	Jacques	Ingénieur chercheur CEA	Microélectronique	CMP
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Image Vision Signal	CIS
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDRAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1		SPIN
OWENS	Rosin	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PERES	Véronique	MR	Génie des Procédés	SPIN
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PIJLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROBISSON	Bruno	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Génie industriel	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

« Der wahre Wert eines Menschen ist in erster Linie dadurch bestimmt, in welchem Grad und in welchem Sinn er zur Befreiung vom Ich gelangt ist »

Albert Einstein

« Sache que ta meilleure amie, Proletaire, c'est la Chimie »

Guy Debord

A ma Famille

A mes Amis

A Vous

Remerciements

*“Ciel, mais que vois-je? Oui, Vous, qui dévisagez dubitativement la première page de ma timide préface! Timide du fait de la **maladresse assurée** de mon auteur en sa plume. Timide, mais témoin de la **reconnaissance** qu’adresse ce dernier **aux personnes** ayant fait de moi ce que je suis aujourd’hui : un bedonnant mais robuste manuscrit de thèse. Je vous en prie, prenez vos aises, installez-vous confortablement, et avant d’attaquer une **lecture scientifique éprouvante**, prenez le temps de lire les légers petits mots dédiés à toutes celles et ceux qui ont œuvré de quelque façon que ce soit à ma **confection.**”*

Famille

Une fois n’est pas coutume, soyons impolis et égoïstes! Mes premières pensées vont vers mes grands-parents et parents, qui par leur éducation et leur confiance, m’ont assuré un avenir libre ; liberté inestimable à mes yeux. “Big up” aux frangins, aka “le Nain” et “Junior”, qui sont toujours présents en cas de coup dur et réciproquement.

Outre le cocon familial, j’ai eu la chance immense d’avoir été entouré de personnes aussi compétentes que passionnées tout au long de mon cursus :

Jury de thèse

Un grand merci à Monsieur Christian REY (président du jury) pour m’avoir transmis malgré lui le virus de la recherche lors de ses cours captivants à l’ENSIACET quelques années auparavant. J’espère pouvoir profiter encore longtemps de votre expérience et de vos conseils avisés.

Je tiens tout particulièrement à remercier Messieurs Éric CHAMPION et Marc BOHNER (rapporteurs) non seulement pour l’intérêt qu’ils ont porté à ces travaux de thèse, mais surtout pour leurs qualités humaines et leur rigueur scientifique. C’est toujours un plaisir d’échanger avec vous, merci une fois de plus pour votre disponibilité.

Je suis très reconnaissant à Madame Helen REVERON (examinatrice) pour sa lecture approfondie de ce manuscrit, accompagnée de nombreuses questions et commentaires constructifs.

Enfin, un n^{ième} merci à Madame Ester POTHIER et Monsieur Luc MALAVAL (examineurs) pour leur grande ouverture d’esprit et leur pédagogie. Travailler en votre compagnie fut fort agréable, expérience que je n’hésiterai pas à renouveler.

Équipe “Biocéramique”

Faisant fi de toute convention, mes premiers mots s’adressent aux petits nouveaux de l’équipe, Mikhaël (aka Pioupiou) et Sophie, à qui je lègue fort lâchement la lourde charge de poursuivre ces travaux.

Merci beaucoup à vous deux pour votre gentillesse et tout ce que je n'arriverai pas à exprimer sur papier! Bon courage et plein de bonnes choses (je réveille le *bisounours*[®] qui est en moi).

Afin de perpétuer la tradition, un grand merci à Coralie LAURENT, merveilleuse ~~assistante~~ collègue, dont les petites mains qui travaillent dans l'ombre ont apporté une plus-value indubitable à cette thèse (mais pas seulement!). Merci pour tout, ta bonne mauvaise humeur, tes petits pas nerveux qui cadencent nos journées, ton cœur à l'ouvrage... J'en oublie tellement!

Merci également à Nathalie DOUARD pour son aide tout au long de mon séjour au CIS. Ce fut un réel plaisir!

Tout mon respect et ma reconnaissance envers Monsieur Didier BERNACHE-ASSOLLANT, qui a été un directeur de thèse présent lorsqu'il le fallait. Merci tout spécialement pour votre expérience et vos conseils.

Last but not least, mes remerciements plus que chaleureux à David MARCHAT, qui a été bien plus qu'un encadrant au cours de cette thèse. Ici encore, difficile pour moi, homme de peu de mots, de trouver les termes justes... Pour te citer, « on ne dit jamais assez souvent à nos proches combien ils comptent pour nous », et j'aime à croire que tu en fais partie. Adieu!

Collègues

Veillez par avance m'excuser pour les classements effectués, qui vont néanmoins limiter les probabilités d'omission (ou du moins je l'espère)...

Tout d'abord, merci à tous les membres du laboratoire de Bioingénierie et de Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) que j'ai eu la chance de côtoyer et qui font un travail de fourmi dans le cadre de nombreux projets collaboratifs. Merci beaucoup à Monsieur Hervé PETITE, directeur du B2OA pour ses grandes qualités. Sans oublier Esther POTHIER, Mickaël DESCHEPPER, Morad BENSIDHOUM, Amaury GRANDJEAN. Merci aussi aux chirurgiens impliqués dans de tels projets, qui fournissent un travail important mais que je n'ai malheureusement pas rencontré à l'heure actuelle.

Restons coté « biologie » pour remercier nos collègues du Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux (LBTO). Merci à Luc, Laura, Guénaëlle, Virginie et Alain pour les discussions fortes instructives. Merci également à tous les doctorants ou anciens doctorants du LBTO que j'ai eu grand plaisir à connaître.

Enfin tous les collègues permanents comme doctorants de l'École des Mines de Saint-Étienne. Merci beaucoup à Marie-Claude, Gwendoline, Nicolas, Olivier V., Jean-Pierre, Alex, Gilles, Marc, Sergio, Marylin, Delphine, Fred et Yamina pour leurs aides diverses et variées lors de manips. Et que dire de Françoise, Carole et Amélie, véritables mamans qui nous chouchoutent quotidiennement en s'occupant de toutes les petites tracasseries administratives! Merci énormément! N'oublions pas Jérôme M. et Olivier B., qui étonnés par ma poisse légendaire, ont toujours réussi à réparer les PC tombés en panne dans mes mains. Enfin, comme il est plus agréable de travailler dans une bonne ambiance, merci à tout le monde au CIS comme à SPIN pour leur bonne humeur animant nos (nombreuses?) pauses café!

A présent, si vous n'avez toujours pas vu une petite phrase pour vous, c'est soit **(i)** que je suis **un grossier personnage** et que je vous ai totalement **oubliés, (ii)** que vous faites partie de la catégorie ci-dessous!

Amis : ma 2^e famille

J'appelle à la barre tous les anciens qui m'ont suivi de tout petit jusqu'à aujourd'hui : amis d'enfance (Benjamin, Nathan, Coline, Juliette, David), de ma période ado (Momo Le Pingouin, Dada, Jérem, Charlotte, Talo, Léa, Jo, Will, Yo, Navia, Hary, Ma blonde, Poupou, Adeline) ou encore de l'ENSIACET (AJet'7, Perrine, Guigui, Kuzo, Céline) et **tous ceux que j'oublie de mentionner ici!** J'ai délaissé certain(e)s trop longtemps, promis je vais prendre le temps de passer vous voir maintenant que tout est fini!

N'étant pas un fervent amoureux de la ville de Saint-Étienne, j'ai eu l'agréable surprise de rencontrer ici des **personnes adorables** qui m'ont rendu la vie tellement plus belle et m'ont supportés lorsque la déprime guettait! Un gros bisou à toute la meute des anciens de l'école des Mines et de l'UJM : Antoine, Fiona, Thomas, Jules, Frank, Pierre-Yves, Jo', Aaron, Estelle, Chagatte, Andréa, Aurélien, Benjamin, Sylvia, Pauline, Lara, Miru... et à tous ceux qui sont encore sur place : Fluti-Fanette, Klervi, Damien, Armelle, Clothilde, Olivier, Maxou, Mathilde, Xavier, Dimitrios, mon Pierrot, Shima, Thierry, Sabri, Baptiste, Laura, Sareh, Cristina, Sophie, Amélie, Brice...

Je rends finalement grâce à tous les membres de « 3 ou 4 ans plus tard » (nouvellement renommé « aBillig ») pour avoir accompagné la boîte à rythme humaine que je suis lors de concerts endiablés dans les pubs de Sainté : des chanteurs de talent (Omar et Sylvain), des guitaristes d'exception (Fanny et Boris - mon Ours des Carpates), un pianiste de charme (Pioupiou, on t'aime!), et un bassiste prodigieux (David, mâle alpha du groupe).

Enfin un dernier clin d'œil à toutes celles avec qui ont partagé un bout de chemin avec moi ces dernières années!

Papa Charbo'

Sommaire

Remerciements.....	iii
Sommaire	vii
Table des illustrations.....	xi
Glossaire	xxi
Nomenclature des phases	xxiii
Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	3
I.1. Du remodelage à la régénération osseuse	5
I.1.1. Le tissu osseux	5
I.1.1.1. Les fonctions du tissu osseux	5
I.1.1.2. Composition du tissu osseux	5
I.1.2. Le remodelage osseux	6
I.1.3. La régénération osseuse.....	8
I.2. La biologie de l'os : vers de nouvelles méthodes d'accès aux connaissances	9
I.2.1. Approches expérimentales actuelles	9
I.2.1.1. Le modèle animal	10
I.2.1.2. Le modèle in vitro 2D	11
I.2.2. Transition vers des modèles de tissu osseux 3D <i>in vitro</i>	11
I.2.3. Les supports de culture	14
I.2.3.1. Le rôle clef de l'architecture.....	15
I.2.3.2. Influence de la composition	15
I.2.4. Perspectives pour le développement de modèles de tissu osseux 3D <i>in vitro</i>	17
I.3. Du comblement des petits défauts osseux aux problématiques des grands défauts osseux.....	18
I.3.1. Défauts osseux : limites de la régénération osseuse.....	18
I.3.2. Comblement des petits défauts osseux	19
I.3.3. Perspectives pour le soin des grands défauts osseux	23
I.4. Stratégie de l'étude	25

Chapitre II. Développement de biocéramiques poreuses d'architecture contrôlée : optimisation, limites et validation du procédé.....	29
II-1. Article 1 : Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations	37
II-2. Article 2 : Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization	47
Chapitre III. Vers une caractérisation plus précise des hydroxyapatites carbonatées	61
III.1. L'hydroxyapatite et ses substitutions.....	63
III.1.1. L'hydroxyapatite phosphocalcique : généralités.....	63
III.1.1.1. Structure de l'hydroxyapatite	63
III.1.1.2. Groupements ioniques caractéristiques	65
III.1.2. Les substitutions d'intérêt biologique dans l'hydroxyapatite.....	66
III.2. Les hydroxyapatites phosphocalciques carbonatées.....	67
III.2.1. Structure des hydroxyapatites carbonatées	68
III.2.2. Stabilité thermique des hydroxyapatites carbonatées	70
III.2.2.1. Échanges ioniques sur les sites A	70
III.2.2.2. Décarbonatation des sites B : stabilité thermique des C _B HA	71
III.2.3. Les hydroxyapatites carbonatées : maîtrise et quantification de la carbonatation.....	72
III.2.3.1. Problématiques liées à la préparation et à la quantification des taux de carbonate	72
III.2.3.2. Détection des ions carbonate par spectrométrie IR	73
III.2.3.3. Quantification des ions carbonate dans la maille apatitique par spectrométrie IR	74
III.3. Matériels et méthodes	78
III.3.1. Préambule	78
III.3.2. Préparation des poudres	79
III.3.2.1. Poudres synthétisées	79
III.3.2.2. Caractérisation des poudres synthétisées	80
III.3.2.3. Préparation des poudres d'HA et de CHA pour les études qualitative d'indexation des bandes et de réalisation des courbes d'étalonnage.....	80
III.3.2.3.1. Préparation des poudres pour l'étude qualitative d'indexation des bandes IR.....	80
III.3.2.3.2. Préparation des poudres de C _A HA pour la réalisation des courbes d'étalonnage...	81
III.3.3. Choix d'une référence interne et protocole de mélange hydroxyapatite/référence	82
III.3.3.1. Choix et préparation du composé de référence interne.....	82
III.3.3.2. Protocole de mélange des poudres.....	83
III.3.3.3. Influence de la quantité de référence interne sur le spectre IR des hydroxyapatites	83

III.3.4. Analyse spectrale.....	83
III.3.4.1.Spectroscopie IR : instrumentation.....	83
III.3.4.2. Analyse spectrale : le « curve fitting », une aide à l'interprétation	84
III.4. Pureté des poudres d'hydroxyapatites préparées et validation du protocole de mélange	88
III.4.1. Analyses des poudres d'HA et de C_B HA synthétisées par voie humide.....	88
III.4.2. Influence du broyage des poudres sur leur spectre IR.....	90
III.4.3. Validation de la méthode d'ajout	92
III.4.3.1. Reproductibilité des analyses.....	92
III.4.3.2. Influence de la quantité de référence interne sur les spectres IR	93
III.4.4. Méthode d'ajout en spectrométrie IR : problèmes et améliorations possibles	96
III.4.5. Conclusions.....	105
III.5. Vers une caractérisation plus précise des ions carbonate dans la maille apatitique	105
III.5.1. Indexation des bandes relatives aux ions carbonate substitués dans la maille apatitique .	105
III.5.1.1. Indexation visuelle.....	106
III.5.1.2. Analyse spectrale à l'aide d'outils informatiques.....	111
III.5.2. Quantification sélective des carbonates par spectroscopie IR.....	120
III.5.2.1. Construction des courbes de calibration pour les $CO_3 A$	120
III.5.2.2. Utilisation des courbes de calibration pour évaluer les quantités d'ions carbonate en sites A et B dans des C_{AB} HA	125
III.6. Conclusion.....	129
Chapitre IV. Mise en application des outils développés	131
IV.1. Aide au développement d'un modèle <i>in vitro</i> de tissu osseux mature	134
IV.1.1. Préambule	134
IV.1.2. Matériels et méthodes.....	136
IV.1.2.1. Conception et fabrication des substrats de culture	136
IV.1.2.1.1. Substrats de culture 3D.....	136
IV.1.2.1.2. Substrats de culture 2D½	139
IV.1.2.2. Essais biologiques.....	140
IV.1.2.2.1. Types cellulaires et milieux de culture	140
IV.1.2.2.2. Culture cellulaire et analyses	141
IV.1.3. Résultats et discussion	142
IV.1.3.1. Conception et fabrication des substrats de culture	142
IV.1.3.1.1. Substrats de culture 3D.....	142

IV.1.3.1.2. Substrats de culture 2D½	144
IV.1.3.2. Essais biologiques.....	146
IV.1.4. Conclusion	150
IV.2. Évaluation <i>in vivo</i> de l'influence de l'architecture du matériau sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse	151
IV.2.1. Préambule	151
IV.2.2. Matériel et Méthodes	152
IV.2.2.1. Conception et production des implants.....	152
IV.2.2.2. Protocoles des évaluations biologiques <i>in vivo</i>	154
IV.2.3. Résultats et discussion	156
IV.2.3.1. Fabrication des implants	156
IV.2.3.2 Essais biologiques <i>in vivo</i>	157
IV.2.4. Études en cours et perspectives	162
IV.2.4.1. Modification de l'architecture des implants pour les études en site ectopique	162
IV.2.4.2. Influence de l'architecture et de la composition de l'implant sur un modèle animal en site orthotopique.....	163
IV.3. Conclusion.....	166
Conclusion générale	167
Références	169
Annexes.....	185
Annexe 1 : Synthèse des poudres	185
Annexe 2 : Caractérisation des poudres préparées	189
Annexe 3 : Résolution du système de deux équations à deux inconnues pour la détermination des coefficients stœchiométriques des CO_{3A} et CO_{3B} d'une C_{AB}HA de formule théorique Eq. III-26 ...	191

Table des illustrations

Figure I-1. Schéma des différentes composantes de l'os naturel à différentes échelles (courtoisie banque d'images Servier®).....	6
Figure I-2. Représentation schématique d'u cycle de remodelage osseux (courtoisie banque d'images Servier®).....	8
Figure I-3. Représentation schématique du processus de régénération osseuse spontanée (adapté de Cruess et Dumont [22], courtoisie banque d'images Servier®)	9
Figure I-4. Impact de l'extinction de la sialoprotéine osseuse (BSP) sur le développement et la minéralisation du squelette de souris. BSP+/+ : souris sauvage non modifiée génétiquement, BSP-/- : souris modifiée génétiquement avec extinction du gène codant pour la BSP (d'après Bouleftour et al. [33]). A titre informatif, la BSP jouerait entre autre un rôle fondamental dans les mécanismes de formation et de remodelage osseux [34].	10
Figure I-5. Représentation schématique d'un système de culture 3D composé d'une chambre de culture dans laquelle est insérée un support de culture macroporeux préalablement ensemencé, et d'un système de perfusion composé principalement d'une pompe, de tuyaux, et de réservoirs contenant le milieu de culture à perfuser et si nécessaire les effluents.....	12
Figure I-6. Schéma précisant les interactions possibles entre l'os et certains organes ("bone as a signalling centre " [59])	13
Figure I-7. Représentation schématique du concept "organs-on-chip" (courtoisie Geraldine Hamilton, Wyss Institute [61]).....	14
Figure I-8. Représentation schématique des éléments fondamentaux pour le développement de modèle de tissu osseux 3D in vitro, incluant le type cellulaire, les caractéristiques principales du bioréacteur et du support de culture, et les outils d'analyse et de caractérisation (Schéma issu de la revue de Bouet et al. [36]). AA : acide ascorbique; β GP : β -glycérophosphate; ALP : phosphatase alcaline; CTX : Télopeptide C-terminale réticulée; PINP : propéptide amino-terminale du collagène de type I; OCT : tomographie à cohérence optique; micro-CT : microtomographie.....	18
Figure I-9. Détermination de la taille de défaut osseux fémoral critique chez le rat. La taille de la résection fémorale initiale, ainsi que le temps écoulé (en semaine) après la dite résection sont précisés sur les images. Aucun comblement n'a été réalisé après résection et le fémur a été stabilisé à l'aide d'une plaque d'ostéosynthèse en polyétheréthercétone (PEEK) fixée en partie proximale et distale à l'aide de 3 vis en TAN (Ti-6% _(w/w) Al-7% _(w/w) Nb) de 0.7 mm de diamètre. Ces images ont été obtenues sur rats vivants à l'aide d'un scanner. Elles ont été fournies par le laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires (B2OA CNRS UMR 7052) dans le cadre du projet ANR OrthoFlase. Après 20 semaines il apparaît que le défaut de 2mm est quasiment comblé par un nouvel os, le défaut de 3mm tend progressivement à être comblé mais très lentement, en revanche aucune formation osseuse n'est observée pour le défaut de 5mm qui est clairement un grand défaut de taille critique.	19
Figure I-10. Schéma de la société Medtronic présentant la corrélation virtuelle entre le pourcentage d'os nouveau formé au sein d'un défaut pour 2 patients A et B et le pourcentage de matériaux de type CaP (HA, β -TCP, et 2 mélanges) restant au sein du défaut en fonction du temps d'implantation (courtoisie Medtronic ®).....	21
Figure I-11. Exemple d'effet indésirable (excroissance osseuse) provoqué par une libération non maîtrisée de facteur de croissance (rhBMP2) faisant suite à l'implantation d'un dispositif de fusion vertébrale Infuse Bone Graft® (Medtronic)	24
Figure I-12. Principe de l'ingénierie tissulaire osseuse	25
Figure I-13. Illustration du potentiel des techniques de fabrication additive pour la production de biocéramiques d'architectures complexes et contrôlées, avec A. une biocéramique industrielle produite par un procédé céramique traditionnel de bullage ("foaming" en anglais) et B. une biocéramique issue du procédé développé au cours de ces	

travaux de thèse ($\emptyset = (7,93 \pm 0,04)$ mm ; $N > 20$). Plusieurs exemples d'applications rendues possibles grâce au procédé développé sont détaillés dans le chapitre IV.	26
Figure I-14. Développement de céramiques phosphocalciques en réponse à une problématique osseuse donnée. L'établissement d'un cahier des charges fonctionnel de la céramique à obtenir, en fonction de la question scientifique, constitue la première étape du procédé de fabrication. Il en découle le choix de la composition (e.g., phase, chimie de surface) et de l'architecture de la biocéramique. Notons que ce choix peut être encore actuellement très approximatif et empirique du fait de manque de connaissances. Par la suite, un modèle virtuel de la céramique est conçu à l'aide d'outils informatiques (CAO) puis sa réplique physique est produite à l'aide de procédés de fabrication dit additifs. L'étape de conception influe sur la géométrie de la céramique obtenue à l'échelle macroscopique, le procédé de fabrication additif sur ses caractéristiques macro- et microscopiques et le(s) post-traitement(s) (e.g., frittage) sur sa microstructure.	27
Figure II-1. Exemple de développement d'un implant maxillaire sur mesure, détaillant les étapes de conception assistée par ordinateur (CAO) de son modèle numérique géométrique et de production de sa réplique physique via une technologie de fabrication additive (i.e., fabrication en couche par couche).	31
Figure II-2. Capabilité d'un procédé de fabrication additive [154]. La capabilité d'un procédé de fabrication additive représente sa capacité à produire un objet dont la géométrie est en adéquation avec celle décrite initialement dans le cahier des charges fonctionnel. En autres termes, la capabilité quantifie les écarts géométriques entre le modèle numérique théorique respectant exactement le cahier des charges fonctionnel et sa réplique physique après production par fabrication additive : les différences géométriques proviennent du traitement des données numériques précédant la fabrication additive (e.g., tessellation et découpe du modèle numérique), des limites technologiques de la machine de fabrication additive (e.g., taille du spot laser) ainsi que des phénomènes physiques (e.g., retrait) mis en jeu lors de la production de la pièce.	32
Figure II-3. Problématiques associées à la production de biocéramiques personnalisées en CaP via une méthode de fabrication additive. La première étape consiste à définir un modèle numérique ② via des outils CAO pour répondre à une problématique donnée ①. La capacité des outils CAO à générer les structures désirées est actuellement le facteur limitant, la qualité des éventuelles données source utilisée (e.g., imagerie médicale) pouvant également complexifier la tâche. Le modèle numérique défini peut également servir de support à des modèles de simulation numérique (ici sciemment mis à l'écart). La production de la réplique physique du modèle numérique conçu met en jeu une technologie de fabrication additive ③ suivie d'étapes de post-traitement (e.g., nettoyage, frittage) ④ respectivement limitées par la capabilité de la machine de fabrication additive et la maîtrise des phénomènes physico-chimiques (e.g., dégradation de la phase). Enfin la caractérisation du matériau obtenu (physique, chimique, biologique) ⑤ et l'interprétation des résultats ⑥ sont vouées à générer de nouvelles connaissances, même en cas d'échec du fait, par exemple, de techniques de caractérisation inadaptées (e.g., marquage cellulaire non sélectif à postériori).	33
Figure II-4. Exemple de biocéramique en CaP obtenue par SLM (Projet ANR OrthoFlase), avec sur l'image de gauche un cordon de matière après passage du laser et sur l'image de droite une forme 3D après fusion laser.	35
Figure II-5. Exemple de biocéramique en CaP obtenue par SLA.	35
Figure III-1. Projection de la structure cristalline de l'hydroxyapatite selon les plans (001) et (010) (courtoisie Antoine Boyer [174])	64
Figure III-2. Spectre IR caractéristique d'une hydroxyapatite stœchiométrique. Les modes de vibration ν sont décrits dans le Tableau III-1.	65
Figure III-3. Projection de la structure d'une C_{AB} -HA selon les plans (001) et (010) (courtoisie Antoine Boyer [174])	69
Figure III-4. Évolution des paramètres de maille de l'hydroxyapatite en fonction du site et du taux de substitution en ions carbonate. Seules les évolutions sont comparables, les traitements thermiques (e.g., temps, température) subis par les poudres analysées n'étant pas forcément similaires. Graphiques élaborés selon les données de Legeros et al. [181], Bonel et al. [196] et Lafon et al. [200].	70
Figure III-5. Modes normaux de vibration de l'ion carbonate à l'état libre [208-211] (courtoisie M.E. Fleet [193]) avec ν_1 et ν_3 une élongation respectivement symétrique et asymétrique des liaisons de la molécule, ν_2 et ν_4 un	

mouvement de bascule respectivement hors et dans le plan. Le tableau récapitule également les modes de vibrations détectables en spectroscopie infrarouge et Raman.	73
Figure III-6. Comparaison des spectres IR de différentes hydroxyapatites avec a. une hydroxyapatite stœchiométrique (HA, 1000°C-15h-air), b. une hydroxyapatite carbonatée de type A (HA, 1000°C-1h-CO ₂), et c. une hydroxyapatite carbonatée mixte de type A/B (C _{0,8} HA, 1000°C-1h-CO ₂). Aucune normalisation des spectres n'a été effectuée dans le cas présent.	74
Figure III-7. Spectres IR de l'HA calcinée à 1000°C pendant 15h sous air ou sous CO ₂ A. sans normalisation (i.e., brut d'acquisition) et B. normalisés par rapport à la bande relative au mode de vibration ν_4 PO ₄ à 600 cm ⁻¹ . Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un module de réflexion totale atténuée (ATR, Golden Gate TM).	76
Figure III-8. Spectres IR de l'HA, de la C _{0,4} -HA et de la C _{0,8} -HA calcinées à 900°C pendant 5h sous CO ₂ A. sans normalisation (i.e., brut d'acquisition) et B. normalisés par rapport à la bande relative au mode de vibration ν_4 PO ₄ à 600 cm ⁻¹ . Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un module de réflexion totale atténuée (ATR, Golden Gate TM).	77
Figure III-9. Pourquoi utiliser les méthodes d'analyse spectrale pour déterminer l'intensité d'une bande IR au sein d'un chevauchement (massif) de bandes ?.....	78
Figure III-10. Spectre IR caractéristique du ferricyanure de potassium (noir) superposé à celui d'une C _{0,8} HA calcinée à 1000°C pendant 1h sous CO ₂ . L'unique et étroite bande IR observée à 2115 cm ⁻¹ sur le spectre IR du K ₃ Fe(CN) ₆ est relative au mode de vibration ν_s des groupements C≡N.	82
Figure III-11. Représentation schématique des systèmes d'analyse par A. réflexion totale atténuée (ATR) et B. réflexion diffuse (DRIFT) du spectromètre infrarouge.	84
Figure III-12. Découpage en trois zones d'intérêt du spectre IR d'une C _{0,8} HA calcinée à 900 °C pendant 5 h sous pression partielle de CO ₂ mélangée à 7,5 % en masse de K ₃ Fe(CN) ₆ , à savoir le domaine relatif au mode de vibration ① ν_s C≡N du composé de référence (2200-2020 cm ⁻¹), ② ν_3 CO ₃ (1650-1340 cm ⁻¹) et ③ ν_2 CO ₃ (900-800 cm ⁻¹).	85
Figure III-13. Détection des bandes IR grâce aux dérivées première et seconde. Exemple proposé au niveau du domaine ν_3 CO ₃ du spectre IR d'une poudre C _{0,8} HA calcinée à 900 °C pendant 5 h sous CO ₂ mélangée à 7,5 % en masse de référence.	86
Figure III-14. Définition de la ligne de base dans les différentes zones d'étude du spectre IR. Exemple réalisé sur un spectre de C _{0,8} HA calcinée à 900 °C pendant 5 h sous CO ₂ mélangée à 7,5 % en masse de référence.	86
Figure III-15. Exemple du résultat d'une procédure de « curve fitting » appliquée au massif ν_3 CO ₃ du spectre IR d'une C _{0,8} HA calcinée à 900 °C pendant 5 h sous CO ₂ mélangée à 7,5% en masse de référence.	87
Figure III-16. Diffractogrammes des poudres d'HA et de C _B HA synthétisées par voie humide puis calcinées respectivement à 1000 °C pendant 15 h sous air et 1000 °C pendant 2 h sous CO ₂	88
Figure III-17. Spectres IR des poudres d'HA et de C _B HA synthétisées par voie humide puis calcinées respectivement à 1000 °C pendant 15 h sous air et 1000 °C pendant 2 h sous CO ₂	89
Figure III-18. Évolution des paramètres de maille a (en rouge) et c (en bleu) pour les poudres de CHA (traitées à 1000 °C pendant 15 h sous CO ₂) en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique des poudres, selon la formule générale des C _B HA (Eq. III-2). A titre de référence, les paramètres de maille a (orange) et c (cyan) déterminés pour une HA calcinée à 1000 °C pendant 15 h sous air ont été représentés. Les lignes pointillées représentent les valeurs théoriques des paramètres de maille de l'HA (ICDD-PDF 9-432).	90
Figure III-19. Évolution de l'intensité des spectres IR d'une C _{0,8} HA calcinée à 1000 °C pendant 1 h sous CO ₂ en fonction du temps de broyage à 150 rpm.	91
Figure III-20. Spectre IR du a. ferricyanure de potassium après broyage manuel des cristaux au mortier et pilon puis tamisage à 10 µm (noir), et b. du même lot de ferricyanure de potassium après broyage mécanique pendant 5 min à l'aide d'un vibro-broyeur MM2 (réglage en puissance : 60%, Retsch, Allemagne) puis tamisage à 10 µm (rouge).	91

- Figure III-21.** Évolution de la couleur du composé de référence avec le temps de broyage manuel réalisé à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate : avec A. les cristaux de $K_3Fe(CN)_6$ tels que fournis par Sigma-Aldrich, et B. la poudre utilisée après tamisage en dessous de $10\ \mu m$ 92
- Figure III-22.** Évaluation de la reproductibilité du protocole de mélange et de la répétabilité de l'analyse IR sur un mélange de C_AHA ($\varnothing < 25\ \mu m$) et de référence (7,5 % en masse, $\varnothing < 10\ \mu m$). Les notations Axx et Bxx représentent 2 préparations différentes du mélange analysées 2 fois chacune (-01 et -02). Les C_AHA analysées ont été obtenues à partir de poudres d'HA précalciniées à $400\ ^\circ C/2\ h/air$ puis calciniées à $1000\ ^\circ C/1\ h/CO_2$ 92
- Figure III-23.** Évaluation de la reproductibilité du protocole de mélange et de la répétabilité de l'analyse IR sur un mélange de $C_{AB}HA$ ($\varnothing < 25\ \mu m$) et de référence (50% en masse, $\varnothing < 10\ \mu m$). Les notations A01, B01 et C01 représentent la première analyse IR de chacune des 3 préparations différentes du mélange. Les $C_{AB}HA$ analysées ont été obtenues à partir de poudres de $C_{0,8}HA$ précalciniées à $400\ ^\circ C/2\ h/air$ puis calciniées à $1000\ ^\circ C/1\ h/CO_2$ 93
- Figure III-24.** Évolution des spectres IR des mélanges C_AHA -référence et $C_{0,8}HA$ -référence en fonction de la quantité de référence. Les poudres d'hydroxyapatites ont été obtenues en traitant thermiquement une HA et une $C_{0,8}HA$ à $900\ ^\circ C$ pendant 5 h sous CO_2 94
- Figure III-25.** Exemple de spectres IR obtenus pour des mélanges C_AHA -référence et $C_{AB}HA$ -référence pour deux quantités de référence A. 7,5 % et B. 50 % en masse de référence. 95
- Figure III-26.** Différences d'intensité de la bande de référence à $2115\ cm^{-1}$ en fonction de la composition des poudres et du % massique de référence. Spectres obtenus pour des mélanges C_AHA -référence et $C_{AB}HA$ -référence pour deux quantités de référence A. 7,5 %, et B. 50 % en masse. Les poudres C_AHA et $C_{AB}HA$ ont été respectivement obtenues en calcinant une HA et des C_BHA à $900\ ^\circ C$ pendant 5 h sous CO_2 97
- Figure III-27.** Évolution de l'intensité de la bande IR de référence en fonction de la nature de l'hydroxyapatite analysée avec un système de mesure du type A. réflexion totale atténuée (ATR pour « Attenuated Total Reflection »), et B. réflexion diffuse (DRIFT pour « Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform »). 98
- Figure III-28.** Évolution de l'intensité de la bande de référence en fonction de la température et du temps de calcination sous CO_2 d'une HA préalablement calcinée à $400\ ^\circ C$ pendant 2 h sous air. 99
- Figure III-29.** Évolution de l'intensité de la bande IR de référence à $2120\ cm^{-1}$ pour des mélanges à 7,5 % en masse de référence avec des poudres d'HA, C_AHA et $C_{AB}HA$ de composition différente mais d'ordre local « équivalent » (calcination à $1000\ ^\circ C$ pendant 15 h sous CO_2 ou sous air). 100
- Figure III-30.** Évolution de l'intensité de la bande IR de référence à $2115\ cm^{-1}$ pour des mélanges à 7,5 % en masse de référence avec des poudres de C_AHA d'ordre local équivalent. 100
- Figure III-31.** Évolution de l'intensité de la bande de référence en fonction du % massique en référence dans les mélanges analysés via spectroscopie IR (ATR). Les courbes bleues et rouges ont été respectivement obtenues avec l'analyse de mélange HA $900\ ^\circ C$ -5 h- CO_2 /référence et $C_{0,8}HA$ - $900\ ^\circ C$ - CO_2 /référence. 102
- Figure III-32.** Représentation schématique des interactions entre photons et matériau 103
- Figure III-33.** Évolution de la couleur du mélange CHA/composé de référence, à 7,5% en masse, en fonction de la composition de la CHA. 103
- Figure III-34.** Évolution A. de l'indice de réfraction et B. du coefficient d'absorption des poudres de C_AHA et $C_{AB}HA$ en fonction du nombre d'onde. Les poudres C_AHA et $C_{AB}HA$ ont respectivement été obtenues en calcinant une HA et des C_BHA à $900\ ^\circ C$ pendant 5 h sous CO_2 104
- Figure III-35.** Spectres IR de mélanges C_AHA -Référence (7,5% en masse) avec 4 zones centrées sur A. la bande $\nu_5\ C\equiv N$ du composé de référence, B. le domaine $\nu_3\ CO_3$, C. le domaine $\nu_2\ CO_3$ et D. le domaine $\nu_4\ CO_3$. Les poudres de C_AHA ont été obtenues en calcinant une HA à $1000\ ^\circ C$ sous air pendant 15 h, puis sous CO_2 avec différents couples température/temps de palier. Les % massique en CO_{3A} pour chaque C_AHA sont indiqués à titre informatif. 107
- Figure III-36.** Spectres IR de C_AHA et de $C_{AB}HA$ mélangées avec 7,5% en masse de référence ; avec les domaines relatifs aux modes de vibration A. $\nu_5\ C\equiv N$ du composé de référence, et B. $\nu_3\ CO_3$, C. $\nu_2\ CO_3$ et D. $\nu_4\ CO_3$ des CHA. La C_AHA et les $C_{AB}HA$ ont été respectivement obtenues par calcination d'une HA et de C_BHA à $900\ ^\circ C/5\ h/CO_2$ 109

Figure III-37. Spectres IR d'HA et de C_BHA mélangées avec 7,5% en masse de référence ; avec les domaines relatifs aux modes de vibration A. ν_5 C≡N du composé de référence, et B. ν_3 CO₃, C. ν_2 CO₃ et D. ν_4 CO₃ des CHA. Tous les spectres ont été normalisés par rapport à l'intensité (aire intégrée) de la bande de référence ramenée à 1. La C_AHA et les C_{AB}HA ont été respectivement obtenues par calcination d'une HA et de C_BHA à 900 °C/5 h/CO₂..... 109

Figure III-38. Méthodes de détection des bandes IR dans les domaines ν_2 CO₃ et ν_3 CO₃ à l'aide des dérivées première et seconde des spectres (explications section III.3.4.2.) pour des mélanges A. HA-Référence, B. C_{0,4}HA-Référence et C. C_{0,8}HA-référence. Les mélanges ont été réalisés avec 7,5 % en masse de référence et des poudres traitées à 900 °C pendant 5 h sous CO₂. 112

Figure III-39. Résultat de la procédure de « curve fitting » dans les domaines relatifs aux modes de vibration ν_2 CO₃ et ν_3 CO₃. Les spectres IR ont été réalisés sur des mélanges de poudre contenant 7,5 % en masse de référence et A. une C_AHA, B. une C_{0,2}HA, C. une C_{0,4}HA, D. une C_{0,6}HA, et E. une C_{0,8}HA. Les courbes noires et vertes représentent respectivement le spectre IR normalisé et le résultat du « curve fitting ». Les bandes en gris, bleu, et rouge sont respectivement non assignées, assignées au CO_{3B} et assignées aux CO_{3A}..... 114

Figure III-40. Évolution du rapport d'intensité **I bande CO3 / I bande de référence** en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique des poudres, selon la formule générale des C_BHA (Eq. III-2), pour les 11 bandes du domaine ν_3 CO₃. Les données sont séparées en deux pour plus de lisibilité avec en A. les rapports présentant les plus fortes variations ($\Delta > 1,5$) et en (B) les plus faibles ($\Delta < 1,5$). Les données d'intensité sont issues des spectres présentés Figure III-39 (A1, B1, C1, D1 et E1). 115

Figure III-41. Évolution du rapport d'intensité **I bande CO3 / I bande de référence** en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique des poudres, selon la formule générale des C_BHA (Eq. III-2), pour les 5 bandes du domaine ν_2 CO₃. Les données d'intensité sont issues des spectres présentés Figure III-39 (A2, B2, C2, D2 et E2). . 115

Figure III-42. Évolution du ratio d'intensité **I bande CO3 / I bande de référence** en fonction du taux de CO_{3A} pour les bandes relatives aux modes de vibration ν_3 des CO₃. Évolutions déterminées sur des poudres d'HA calcinées à 1000 °C pendant 15 h sous air puis traitées sous CO₂ mélangées à 7,5% en masse de référence. Les flèches \uparrow , \nearrow et \rightarrow représentent respectivement une augmentation forte, moyenne et une faible à nulle du ratio d'intensité avec l'augmentation du taux de CO_{3A}. Le Δ et le R² représentent respectivement l'écart entre la valeur supérieure et la valeur inférieure et le coefficient de régression linéaire des droites..... 116

Figure III-43. Évolution du ratio d'intensité **I bande CO3 / I bande de référence** en fonction du taux de CO_{3A} pour les bandes relatives aux modes de vibration ν_2 des CO₃. Évolutions déterminées sur des poudres d'HA calcinées à 1000 °C pendant 15 h sous air puis traitées sous CO₂ mélangées à 7,5% en masse de référence. Les flèches \uparrow , \nearrow et \rightarrow représentent respectivement une augmentation forte, moyenne et faible à nulle du ratio d'intensité avec l'augmentation du taux de CO_{3A}. Le Δ et le R² représentent respectivement l'écart entre la valeur supérieure et la valeur inférieure et le coefficient de régression linéaire des droites..... 116

Figure III-44. Spectre IR d'une HA et de C_AHA avec en rouge, bleu et gris (marquées d'une *) les bandes IR respectivement relatives aux CO_{3A}, CO_{3B} de structure et CO_{3B} de surface. L'HA et les C_AHA ont été obtenues respectivement par calcination d'une HA à 1000°C/15 h/air et à 650 °C-850 °C-1000 °C/1 h/CO₂..... 119

Figure III-45. Exemple de la procédure de « curve fitting » réalisée sur le spectre IR d'un mélange à 50/50 de la poudre d'HA calcinée à 1000 °C pendant 15 h sous air puis recuite à 800 °C pendant 10 h sous CO₂ et de la poudre de référence. Les spectres sont centrés sur les domaines ν_5 C≡N, ν_3 CO₃ et ν_2 CO₃. 122

Figure III-46. Droites de régression linéaire des rapports d'intensité **R = Aire bande considérée / Aire bande référence** en fonction de la quantité de carbonate mesurée dans la poudre. Les bandes considérées sont celles du domaine ν_2 CO₃ compris entre 900 et 840 cm⁻¹ Les flèches \uparrow , \nearrow et \rightarrow représentent respectivement une augmentation forte, moyenne et faible à très faible du rapport d'intensité avec l'augmentation du taux de CO_{3A}. Le Δ représente l'écart entre la valeur supérieure et la valeur inférieure.. 123

Figure III-47. Courbe d'étalonnage reliant le rapport d'intensité de la bande à 879 cm⁻¹ (ν_2 CO_{3A}) et de la bande à 2115 cm⁻¹ (référence) à la quantité d'ions carbonate en site A. 124

Figure III-48. Courbe d'étalonnage reliant le rapport d'intensité de la bande à 1455 cm⁻¹ (ν_3 CO_{3A}) et de la bande à 2115 cm⁻¹ (référence) à la quantité d'ions carbonate en site A. 124

Figure III-49. Courbe d'étalonnage reliant le rapport d'intensité de la bande à 1548 cm^{-1} ($\nu_3\text{ CO}_3\text{ A}$) et de la bande à 2115 cm^{-1} (référence) à la quantité d'ions carbonate en site A.	125
Figure III-50. Exemple de la procédure de « curve fitting » réalisée sur le spectre IR d'un mélange à 50/50 de la poudre de $\text{C}_{0,8}\text{HA}$ calcinée à $900\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 5 h sous CO_2 , et de la poudre de référence. Les spectres sont centrés sur les domaines $\nu_5\text{ C}\equiv\text{N}$, $\nu_3\text{ CO}_3$ et $\nu_2\text{ CO}_3$	126
Figure IV-1. Influence de l'architecture du substrat de culture sur la formation in vitro d'un nouveau tissu (d'après Rumpler et al. [242])	135
Figure IV-2. Nomenclature utilisée pour qualifier l'architecture du support de culture aux différentes échelles de taille.	135
Figure IV-3. Schéma du procédé de blocage du matériau à l'aide de deux pistons du système BOSE Electroforce 5270.	137
Figure IV-4. Représentation CAO des biocéramiques comportant chacune 50 canaux unidirectionnels de section circulaire (A1) ou triangulaire (B1) en vue isométrique et en vue de dessus et les moules respectivement utilisés pour leur production (B1 et B2). Le système d'armature soutenant les colonnes des moules (qui deviendront pour rappel les canaux des biocéramiques) est précautionneusement éliminé au cours du procédé de fabrication.	138
Figure IV-5. A. Représentation schématique de l'imprimante 3D utilisée pour la production des moules en cire utilisés dans le procédé de fabrication des biocéramiques. B. Orientation des moules sur la plaque d'impression, l'axe indiqué représentant celui du plateau d'impression.....	139
Figure IV-6. Images CAO (conception assistée par ordinateur) des céramiques $2\text{D}\frac{1}{2}$ (-1) et des moules (-2) pour les géométries de surface A. en vague, B. en triangle dont l'angle exposé est de 90° et C. en triangle dont l'angle exposé est de 45°	139
Figure IV-7. Stratégie d'impression des moules pour la fabrication des biocéramiques en HA $2\text{D}\frac{1}{2}$. Les axes rouges correspondent aux axes de l'imprimante (Figure IV-5 A).....	140
Figure IV-8. Bioréacteur de perfusion Bose ElectroForce 5270 BioDynamic mis à disposition par la plateforme ivtv.	142
Figure IV-9. Biocéramiques en HA produites spécifiquement pour la chambre de culture du réacteur Bose ElectroForce 5270 BioDynamic.....	143
Figure IV-10. Images par microscopie électronique à balayage de la surface des biocéramiques 3D avec en A. une vue de dessus et en B une vue de côté. Les flèches en surbrillance rouge indiquent le sens du flux de perfusion des biocéramiques.	144
Figure IV-11. Photographie de A la face supérieure et B. la face inférieure d'une pastille $2\text{D}\frac{1}{2}$ issue de l'imprégnation d'un moule par une barbotine peu concentrée en matière sèche (71 % en masse). Les zones dépourvues de matière (cavités), cerclées de bleu ou de rouge sur les photographies, peuvent rester en surface (bleu) ou traverser toute l'épaisseur de la pastille (rouge). En C. est présenté un schéma explicatif de la formation de telles cavités liée au départ inhomogène de l'eau contenue dans la barbotine.....	145
Figure IV-12. Image 3D (Micro-Tomographie X) et géométrie de surface (microscopie) des pastilles en HA avec le motif A. en vague, B. en triangle dont l'angle exposé est de 90° et C. en triangle dont l'angle exposé est de 45° ..	146
Figure IV-13. Influence du débit de perfusion sur la formation de matrice extracellulaire dans les biocéramiques 3D (7 jours de culture). Les noyaux des cellules, marqués au DAPI, apparaissent en surbrillance sur ces images effectuées en microscopie à fluorescence.	147
Figure IV-14. Formation et maturation du tissu osseux dans les canaux unidirectionnels de section circulaire et triangulaire des biocéramiques 3D perfusées à $300\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ après 15 jours de culture avec A. le dépôt de matrice extracellulaire et B. les marquages de la fibronectine (FN, en vert) et de l'ostéopontine (OPN, en bleu) et C. une coloration au Rouge d'Alizarine	148
Figure IV-15. Formation et maturation du tissu osseux après 15 jours de culture statique sur les biocéramiques en HA planes et $2\text{D}\frac{1}{2}$ avec A. une vue en coupe de l'intérieur des sillons, et B. les résultats des dosages qRT-PCR de la protéine ostéocalcine et sclérosine (qui est une protéine dont le gène est le SOST). Les flèches jaunes présentes sur	

les images montrent d'éventuelles colonies ostéoblastiques minéralisées. La céramique est indiquée par une étoile.	149
Figure IV-16. Fibre d'actine de stress (phalloïdine , en vert) et noyau des cellules (DAPI, en bleu) après 15 jours de culture sur les biocéramiques en HA planes et 2D½. Les images ont été acquises en microscopie à fluorescence à la surface de la matrice (« Top Cell Layer »), et à l'intérieur de la matrice à une profondeur z = 20 % (0 % correspondant au fond du sillon et 100 % à son extrémité supérieure). Une profondeur de 20 µm par rapport à la surface de la pastille a été choisie pour les échantillons plans témoins. La présence de céramique sur les images est indiquée par une étoile.	150
Figure IV-17. Représentation CAO A. des biocéramiques et B. des moules ayant servi à leur fabrication en vue isométrique et en coupe. Les armatures circulaires, qui servent à soutenir les colonnes des moules (futurs canaux des biocéramiques), sont éliminées au cours du procédé de fabrication.	153
Figure IV-18. Récapitulatif des essais biologiques réalisés au B2OA au cours de cette étude préliminaire. La frise chronologique indique la durée d'implantation des biocéramiques en sous-cutané dorsal avant sacrifice des souris nude. Les méthodes utilisées pour l'observation de l'ostéogenèse et/ou de la pénétration cellulaire et vasculaire sont indiquées à gauche de ce schéma. A noter que l'étude par histologie a été menée dans les locaux du B2OA et l'analyse par tomographie X à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility). Les biocéramiques implantées sont symbolisées par des cercles violets, rouges et verts codant pour leur longueur (respectivement 2, 4 et 8 mm). Les auras bleues et rouges correspondent respectivement à un dépôt de facteur de croissance (rh-BMP2, recombinant human Bone Morphogenic Protein 2) sur les biocéramiques ou à leur ensemencement avec des cellules mésenchymateuses humaines (hMSC) avant implantation.	155
Figure IV-19. Photographie des trois types de biocéramiques fabriquées. Les cotes des biocéramiques ont été déterminées au pied à coulisse (N = 5). Le diamètre des canaux a été mesuré sur des images des céramiques acquises à la binoculaire (N = 6 céramiques) ; aucune différence significative n'a été observée entre les différentes céramiques.	156
Figure IV-20. Topographie observée sur la surface extérieure des biocéramiques fabriquées. Cette dernière est représentative de l'état de surface à l'intérieur des canaux de la biocéramique. Pour information, les « marches » sont orientées perpendiculairement à la direction des canaux.	157
Figure IV-21. Imprégnation d'un implant de 4 mm par une solution contenant une molécule modèle (picrofuchisine, couleur rouge) de masse molaire comparable à celle de la rh-BMP2.	158
Figure IV-22. Ensemencement d'un implant de 4 mm par une suspension d'hMSC selon le protocole décrit section IV.2.2.2. Les points noirs représentent des hMSC vivantes marquées par un sel de tetrazolium MMT.	158
Figure IV-23. Photographie de biocéramiques après implantation en sous-cutanée (souris nude) pendant A. 30 jours et B. 60 jours. Une injection d'un mélange gélatine/encre de chine dans le système vasculaire de la souris après sacrifice permet une meilleure visualisation des vaisseaux sanguins (image A.)	159
Figure IV-24. Images 3D (tomographie X, ESRF) de la vascularisation (en rouge) et minéralisation (en jaune) à l'intérieur des biocéramiques après 30 jours d'implantation sous-cutanée chez la souris Nude. Travail en cours (un grand merci à Mikhaël Hadida, doctorant au CIS, pour son aide précieuse).	160
Figure IV-25. Évaluation par histologie de l'angiogenèse en fonction du diamètre des canaux (implant « brut » de 4 mm, J30) avec en A. le nombre cumulé de vaisseaux présents dans les canaux de différents diamètres et en B. le pourcentage d'occupation moyen des vaisseaux par canal.	161
Figure IV-26. Évaluation par histologie de l'ostéogenèse en fonction du diamètre des canaux (implants de 2 mm avec rh-BMP2, J30), avec en A. la surface de matrice minéralisée moyenne présente chaque canal et en B. cette même valeur normalisée par rapport à la section du canal considéré.	161
Figure IV-27. Stratégie pour promouvoir l'angiogenèse et l'ostéogenèse via l'association de deux porosités de type gyroïde.	162
Figure IV-28. Nouvelle génération d'implants ectopiques : modification de l'architecture des anciennes céramiques (Figure IV-19) afin d'éviter les éventuels artefacts expérimentaux. A. représentation CAO et cotes des implants menant à la conception des moules. Les colonnes des moules sont supportées par un système d'armature éliminé	

lors de la fabrication des céramiques. B. images des trois types d'implants effectuées à la binoculaire. Les spécifications de ces derniers sont détaillées (N=6 céramiques x 3 architectures). 163

Figure IV-29. Détermination de la taille de défaut osseux fémoral critique chez le rat. La taille de la résection fémorale initiale, ainsi que le temps écoulé (en semaine) après la dite résection sont précisés sur les images. Aucun comblement n'a été réalisé après résection et le fémur a été stabilisé à l'aide d'une plaque d'ostéosynthèse en polyéthéréthercétone (PEEK) fixée en partie proximale et distale à l'aide de 3 vis en TAN (Ti-6%_(w/w)Al-7%_(w/w)Nb) de 0,7 mm de diamètre. 164

Figure IV-30. Représentation CAO A des biocéramiques conçues pour les essais biologiques en site osseux de taille critique (5 mm) et de leur moule respectif (vue en coupe) et B. Une photographie des biocéramiques après fabrication avec (de gauche à droite) une architecture gyroïde laissant passer une sphère de 300 µm de diamètre en son sein, une architecture gyroïde laissant passer une sphère de 800 µm de diamètre et enfin l'architecture acropora témoin..... 165

Figure IV-31. Évaluation de l'influence de l'architecture et de la composition d'implants personnalisés en CaP sur la régénération osseuse d'un défaut fémoral de taille critique chez le rat Lewis 166

Tableau I-1. Exemple de matériaux commercialisés pour le comblement de petits défauts osseux dans le domaine dentaire (courtoisie Nathalie Douard CIS-EMSE).....	22
Tableau I-2. Liste non exhaustive de biocéramiques en BCP actuellement disponibles sur le marché.	23
Tableau III-1. Bandes IR caractéristiques des hydroxyapatites synthétisées par voie aqueuse [175].....	66
Tableau III-2. Exemples de substitution dans la structure de l'HA [7, 97, 98, 176]	67
Tableau III-3. Bandes IR attribuées aux modes vibrationnels ν_2 et ν_3 des ions carbonate dans la structure apatitique par Elliot et Legeros [181, 212]. Les bandes relatives au mode vibrationnel ν_4 des CO_3 de faible intensité ont sciemment été omises de cette liste	74
Tableau III-4. Illustration de l'identification floue des bandes IR relatives aux modes de vibration ν_2 , ν_3 et ν_4 des ions carbonate en site A et B dans le réseau apatitique [180, 188, 193, 214, 224-227]. A titre d'exemple, l'encadré rouge sur le tableau met en évidence les divergences à propos du nombre de bandes, de leur position et de leur assignation entre 1510 et 1430 cm^{-1}	75
Tableau III-5. Échantillons de C_AHA obtenus par traitements thermiques sous atmosphère de CO_2 ($p\text{CO}_2 \approx 1 \text{ bar}$) d'une poudre d'HA, préalablement traitée à 1000°C pendant 15 h sous air ; échantillons préparés pour la construction de courbes d'étalonnage relatives aux ions carbonate placés dans les sites A de la maille apatitique 81	
Tableau III-6. Évolution de l'intensité de la bande IR de référence en fonction de sa concentration dans le mélange hydroxyapatite/référence, de la composition de l'hydroxyapatite, et des traitements thermiques qu'elle a subis. Les dénominations 1x et 2x représentent respectivement les hydroxyapatites des groupes 1 et 2. Les indices -a et -b désignent des mélanges hydroxyapatite/référence à 7,5% en masse, dont les hydroxyapatites ont respectivement subi une calcination à $900^\circ\text{C}/5 \text{ h}/\text{CO}_2$ et $1000^\circ\text{C}/15 \text{ h}/\text{CO}_2$. L'indice -c désigne un mélange hydroxyapatite/référence à 50% en masse, dont les hydroxyapatites ont subi un traitement thermique à $900^\circ\text{C}/5 \text{ h}/\text{CO}_2$	101
Tableau III-7. Identification des bandes IR relatives aux ions carbonate situés en site A et B dans la maille apatitique. Comparaison de nos assignations avec celles de la littérature, les nombres d'ondes indiquées en violet, en orangé et en vert indiquent des bandes respectivement non décrites, en désaccord et en accord avec les données de la littérature. Les * et † représentent les doutes concernant l'assignation des bandes IR respectivement au sein de la littérature et suite à ces premières observations expérimentales.	110
Tableau III-8. Récapitulatif des bandes IR relatives aux ions carbonate situés en site A et B dans la maille apatitique. Ce tableau propose également une comparaison de nos assignations avec celles de la littérature, les nombres d'ondes indiquées en violet, en orange et en vert indiquent des bandes respectivement non décrites, en désaccord et en accord avec les données de la littérature. Les * représentent les doutes sur l'identification des bandes IR au sein de la littérature	120
Tableau III-9. Quantité totale de carbone, et par déduction mathématique de CO_3 (cf. Eq. III-21, page 80), contenue dans les échantillons d'HA précalcinées à $1000^\circ\text{C}/15 \text{ h}/\text{air}$ puis traités sous CO_2 . Les valeurs sont données après dégazage sous vide primaire (10^{-2} mbar) réalisé à 100°C pendant 12 h à l'aide d'un appareil Micromeritics ASAP 2020.....	121
Tableau III-10. Récapitulatif des caractéristiques de la bande de référence et des bandes principales relatives aux ions carbonate de type A et B des hydroxyapatites obtenues après « curve fitting ». Le numéro assigné aux bandes IR fait référence à leur dénomination lors de la procédure de « curve fitting » (Figure III-37, page 107).....	126
Tableau III-11. Pourcentages massiques en CO_{3A} déterminées via les courbes d'étalonnage établies à l'aide des bandes à 879 et 1548 cm^{-1}	126
Tableau III-12. Pourcentages massiques de CO_{3A} et CO_{3B} contenus dans chacun des échantillons de C_{AB}HA analysés. Le pourcentage massique total en C a été mesuré expérimentalement après dégazage des poudres (section	

III.3.2.3., p78). La concentration massique en CO_{3A} est issue du Tableau III-12. La concentration massique en CO_{3B} est la différence de la quantité de CO_3 totale et de CO_{3A} 127

Tableau III-13. Coefficients stœchiométriques et incertitudes associées des formules chimiques des échantillons d'HA et de C_B HA calcinées à 900 °C pendant 5h sous CO_2 . Coefficients évalués expérimentalement à l'aide des courbes d'étalonnage des Figures III-47 et III-49. 128

Tableau III-14. Bandes IR relatives aux modes de vibration ν_2 et ν_3 des ions CO_{3A} , CO_{3B} de volume (i.e. structure) et CO_{3B} de surface détectables dans les hydroxyapatites carbonatées 129

Glossaire

Allogreffe : greffon où le donneur et le receveur sont de la même espèce biologique.

Analyse spectrale : terme générique regroupant les techniques d'analyses d'un signal (e.g., spectre infrarouge) pour en obtenir les caractéristiques.

Angiogenèse : processus de formation et croissance de vaisseaux sanguins.

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

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

Biodégradation : capacité du matériau à se dégrader sous l'effet du milieu biologique et de l'activité cellulaire. La biodégradation comprend la solubilité et la biorésorption du matériau.

Biorésorption : capacité d'un matériau à être dégradé en milieu biologique sous l'action des cellules.

Bioréactivité : ensemble des interactions chimiques, physiques, mécaniques et biologiques entre le substrat de culture et les cellules cultivées (in vitro) ou l'implant et les tissus receveurs (in vivo).

Cellules souches mésenchymateuses : cellules multipotentes présentes en nombre très réduit dans l'organisme adulte. Elles ont la capacité de se différencier en différentes lignées cellulaires incluant les cellules du tissu osseux, du cartilage ou encore des tissus adipeux.

Conception assistée par ordinateur : ensemble des logiciels et des techniques de modélisation géométrique permettant de concevoir un modèle numérique afin de le fabriquer ou encore d'effectuer des simulations numériques.

Cytotoxicité : propriété d'un agent ou matériau à être toxique pour les cellules.

Frittage : Processus de consolidation thermique (sans fusion) de matériaux pulvérulents par création de pontages entre les grains de matière.

Fabrication additive : terme générique regroupant l'ensemble des procédés de mise en forme d'une pièce par ajout de matière, par empilement de couches successives, par opposition aux procédés par retrait de matière (e.g., usinage).

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

Matrice extracellulaire : Ensemble de macromolécules (e.g., protéines, glycoprotéines, glucides) organisées en réseau autour des cellules.

Nécrose : mort cellulaire non programmée et prématurée (par opposition à l'apoptose).

Ostéoblaste : cellule qui synthétise la partie non-minérale de l'os et participe par la suite à sa minéralisation.

Ostéoclaste : cellule responsable de la résorption du tissu osseux.

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

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

Ostéoinduction : capacité d'induire la formation de la matière osseuse.

Solubilité : capacité d'un matériau à se dégrader dans un milieu en l'absence d'activité cellulaire

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

Trypsination cellulaire : séparation des cellules adhérentes à leur substrat via une enzyme digestive, la trypsine.

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

Nomenclature des phases

BCP	Mélange de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite phosphocalcique
CaP	Phosphates de calcium (nom générique)
TCP	Phosphate tricalcique
HA	Hydroxyapatite phosphocalcique
CHA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée
C _A HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée en site A (i.e., site hydroxyde)
C _B HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée en site B (i.e., site phosphate)
C _{AB} HA	Hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée en site A et B

Introduction

Les planaires, vers plats aquatiques de quelques centimètres tout au plus, bénéficient de capacités de régénération phénoménales : l'intégralité de leur organisme peut se reconstituer à partir d'un fragment de leur corps, même de taille ridicule (limite à 3,6 ‰ massique pour la *Planaria Maculata* d'après T.H. Morgan). Chez les vertébrés, cette faculté d'autoréparation est également présente (e.g. salamandre, poisson zèbre, lézard) mais la plupart du temps sur des zones très localisées (e.g., membre, œil, queue) et parfois accompagnée d'une perte de fonctions plus ou moins étendue. Les mammifères possèdent également des capacités de régénération, mais elles se limitent seulement à des fractions d'organes ou de tissus, l'os en est le parfait exemple.

L'os est un tissu complexe en constante évolution sous la tutelle des BMU (Bone Modeling Units), unités fonctionnelles du remodelage osseux. D'un point de vue général, nous connaissons relativement bien le fonctionnement du remodelage osseux, ce qui est loin d'être le cas au niveau cellulaire et moléculaire. Or le remodelage osseux joue un rôle essentiel dans la régénération de l'os qui intervient lorsque son intégrité est menacée. L'amélioration des connaissances concernant les mécanismes biologiques du remodelage et de la régénération osseuse apparaît donc comme fondamentale pour le développement de nouveaux dispositifs médicaux.

Qu'ils soient implants ou substrats de culture, les phosphates de calcium (CaP), comme l'hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), sont des matériaux très largement employés pour les problématiques osseuses du fait de leur parfaite biocompatibilité. Malgré leurs atouts incontestables pour ce domaine, ces matériaux synthétiques restent cantonnés à des usages modestes (e.g., comblement de petits défauts) du fait d'une bioactivité limitée.

Pour pallier ces limitations, nous avons entrepris deux voies de modulation des propriétés biologiques de l'HA ; une voie « chimique », basée sur l'incorporation d'ions carbonate dans sa structure, et une voie « procédé », reposant sur le potentiel des technologies de fabrication additive. L'objectif de ces travaux a ainsi été de développer un procédé d'élaboration et un procédé de caractérisation de biocéramiques en hydroxyapatites carbonatées.

La synthèse bibliographique, qui constitue le premier chapitre de cette thèse, vise à introduire les notions et problématiques essentielles à la bonne compréhension des choix et démarches mises en place au cours de ces travaux.

Le deuxième chapitre traite du développement et de l'optimisation d'un procédé d'élaboration de biocéramiques d'architecture personnalisée, basé sur une technologie de fabrication additive.

Le troisième chapitre aborde la préparation d'hydroxyapatites carbonatées et les étapes de développement et de validation d'un procédé de quantification sélective des carbonates par spectroscopie infrarouge.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre de cette thèse détaille les démarches scientifiques adoptées pour répondre à deux problématiques biologiques, une *in vitro* et une *in vivo*, dans le cadre de collaborations scientifiques.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I.1. Du remodelage à la régénération osseuse

I.1.1. Le tissu osseux

I.1.1.1. Les fonctions du tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif complexe hautement spécialisé en perpétuelle évolution composé de nombreux éléments cellulaires associés à une matrice extracellulaire (MEC) abondante et « minéralisée » (i.e. matrice organique sur laquelle repose une matrice inorganique). De prime abord, les os assurent un rôle biomécanique, i.e. soutien et déplacement du corps (e.g., points d'ancrage des ligaments et tendons) et de protection des organes. Outre ses fonctions purement mécaniques, l'os possède une fonction métabolique et homéostatique. Par exemple, il régule le stockage et la libération dans l'organisme de minéraux tels que le calcium, le phosphore, le sodium ou le magnésium dont il est le principal réservoir (respectivement 99, 75, 90 et 50 %) [1]. Il serait aussi potentiellement impliqué dans l'homéostasie énergétique, plus particulièrement dans la régulation de la sécrétion d'insuline pancréatique [2, 3]. Le tissu osseux est également le lieu de production des lignées cellulaires érythrocytaires (globules rouges), thrombocytaires (plaquettes sanguines) et leucocytaires (globules blancs) assurée par la moelle osseuse. Ce processus physiologique est appelé l'hématopoïèse.

La diversité des rôles assurés par l'os s'explique en partie par la diversité des tissus qui le composent.

I.1.1.2. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est un matériau composite : la MEC, qui abrite une grande variété de types cellulaires, comporte une composante organique qui sert de support à une composante inorganique.

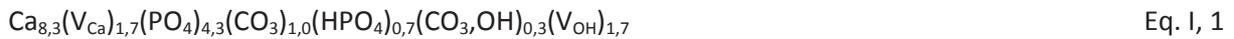
La matrice organique de la MEC représente environ 30 % de la masse totale du tissu osseux sec. Elle est composée principalement de collagène de type I (90 %), de collagène de type III, de type V et X à l'état de traces et de protéines dites non collagéniques [4]. Les molécules de collagène s'associent en fibrilles qui s'organisent en un support architecturé propice au dépôt de cristaux de phosphates de calcium (Figure I-1) [5]. L'association structurelle de ces fibres organiques et de cette matrice inorganique confère à l'os ses propriétés d'élasticité et de résistance à la traction.

La matrice inorganique de la MEC représente environ 70 % du poids total de l'os sec. Elle s'apparente à une phase apatitique* dont le composé le plus emblématique, l'hydroxyapatite phosphocalcique ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), se trouve sous la forme de fines aiguilles hexagonales qui s'entremêlent aux fibres de collagène de la matrice organique (Figure I-1 page 6). La matrice inorganique confère à l'os ses propriétés mécaniques de rigidité, de dureté et de résistance à la compression, mais aussi son rôle dans ses fonctions métaboliques et homéostatiques.

La composition chimique exacte de l'apatite osseuse est difficile à exprimer du fait qu'elle dépend de nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, la localisation de l'os. De nombreuses substitutions dans le réseau apatitique ont été observées avec, par exemple, la présence d'ions magnésium, sodium,

* de formule générale $Me_{10}(XO_4)_6(Y)_2$ avec Me un cation bivalent, XO_4 un groupement anionique trivalent et Y un anion monovalent (plus de détail au chapitre III de cette thèse)

strontium en site calcium, d'ions chlore et fluor en site hydroxyde et d'ions carbonate en site hydroxyde et phosphate [6, 7]. La substitution des carbonates est la plus récurrente (3-9 % en masse) et a été prise en compte par Legros et al. en 1986 dans la formule théorique de l'apatite osseuse suivante [8] :



avec V_x une lacune en élément x permettant ainsi la conservation de l'électroneutralité de la structure

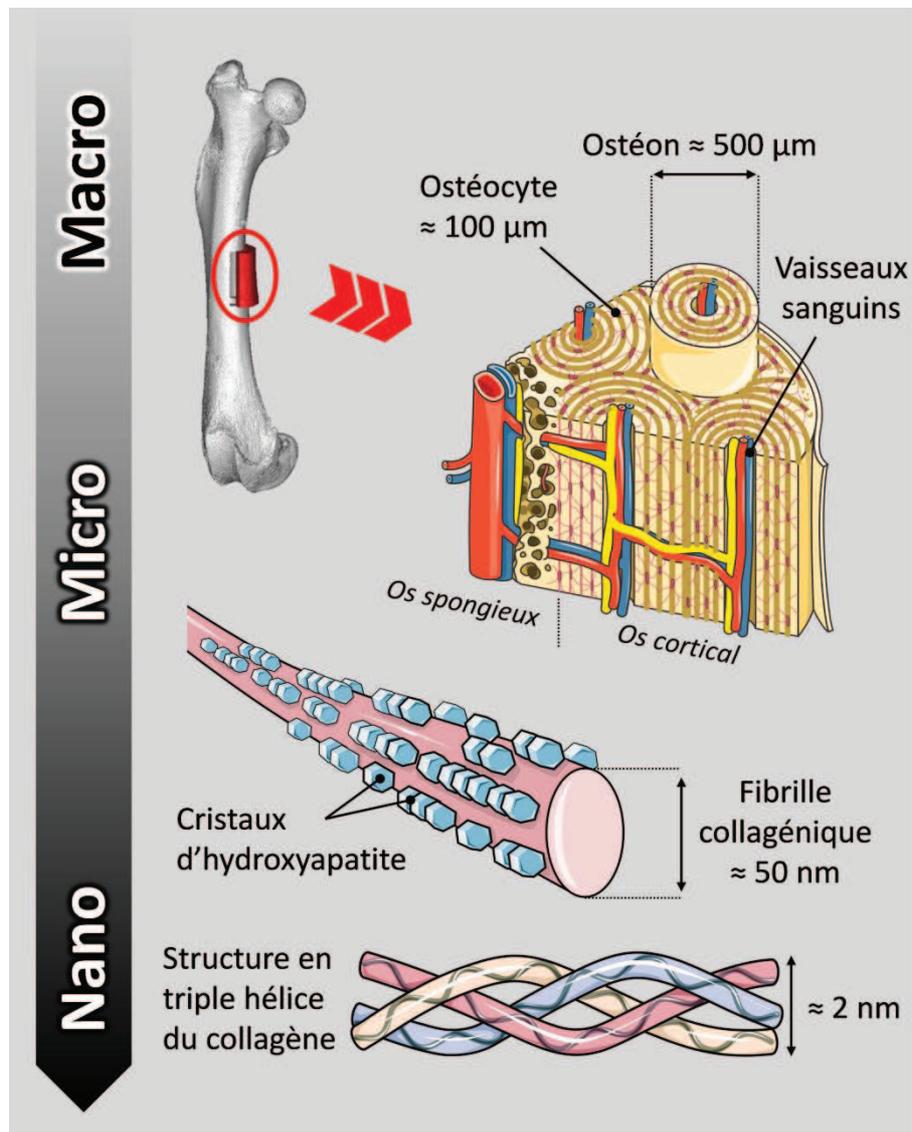


Figure I-1. Schéma des différentes composantes de l'os naturel à différentes échelles (courtoisie banque d'images Servier®)

I.1.2. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est en constant renouvellement (5-10 % par an chez l'adulte [4]) du fait d'un équilibre subtil entre la résorption osseuse assurée par les ostéoclastes et la formation osseuse assurée par les ostéoblastes (Figure I-2 page 8). Un cycle de remodelage osseux dure environ 4 mois chez l'adulte avec une phase de formation osseuse plus longue que celle de résorption. Le remodelage osseux est un phénomène nécessaire à la conservation et l'adaptation des propriétés mécaniques des os et permet aussi la réparation d'éventuels défauts structurels [9]. En outre, il constitue un levier essentiel du métabolisme phosphocalcique.

Les ostéoclastes dérivent de monocytes issus de cellules souches hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse. Leur différenciation en cellules pré-ostéoclastiques (mononuclées) s'initie au contact des cellules stromales pré-ostéoblastiques. Les cellules pré-ostéoclastiques finalisent leur différenciation en ostéoclastes matures, cellules géantes multi-nucléées (70-100 μm), en fusionnant entre elles. Les ostéoclastes matures adhèrent à la MEC et dissolvent la phase minérale par attaque acide puis la matrice organique par action enzymatique [10]. Une fois la lacune de résorption formée, les ostéoclastes matures meurent par apoptose*, libérant des facteurs de croissance et des signaux endocriniens. Ces signaux biochimiques déclenchent l'arrivée de cellules pré-ostéoblastiques (issues de cellules stromales mésenchymateuses) et de macrophages au sein de la lacune de résorption. Les cellules pré-ostéoblastiques, suite à leur différenciation en ostéoblastes matures, sont responsables du dépôt d'une nouvelle matrice collagénique. Cette matrice non minéralisée ou ostéoïde est ensuite « minéralisée » par les ostéoblastes via la sécrétion de diverses protéines dont la phosphatase alcaline osseuse qui joue un rôle prépondérant dans l'initialisation de cette « minéralisation ». Une fois le dépôt de matrice réalisé, les ostéoblastes peuvent suivre 4 voies différentes [11, 12] : (i) la plupart d'entre eux meurent par apoptose, (ii) certains diminuent leur activité métabolique (quiescence) et forment ainsi des cellules bordantes, (iii) d'autres se différencient en chondrocytes, cellules responsables de la formation du cartilage, et (iv) enfin, quelques-uns se laissent emmurés dans la matrice osseuse et se différencient en ostéocytes.

Les cellules bordantes sont des cellules aplaties qui recouvrent l'interface osseuse inactive (zones n'étant pas en remodelage osseux). Malgré une activité métabolique diminuée, les cellules bordantes jouent un rôle dans la régulation du métabolisme osseux en communiquant avec les ostéocytes et en libérant des substances chimiques [4, 13]. Sous l'influence de certains stimuli, elles peuvent aussi sortir de leur état de quiescence pour devenir à nouveau des ostéoblastes actifs [13].

Emmurés dans de petites lacunes de la matrice osseuse, les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os (>90%) [14, 15]. Leurs prolongements cytoplasmiques, cheminant dans des canalicules de la matrice osseuse permettent des communications inter-ostéocytaires ainsi que d'autres avec les cellules de surface (ostéoclastes, ostéoblastes et cellules bordantes). Incapables de proliférer, ils sont néanmoins au cœur d'un réseau fonctionnel doté d'une intense activité métabolique et impliqué dans la réponse aux contraintes mécaniques et dans le contrôle du remodelage osseux [15, 16]. En particulier, le réseau ostéocytaire émettrait en continu des informations depuis la profondeur des os jusqu'à la surface en fonction des contraintes mécaniques subies et coordonnerait l'activité ostéoblastique/ostéoclastique. Ainsi, les ostéocytes joueraient un rôle de "chef d'orchestre" des fonctions biomécaniques, métaboliques et homéostatiques de l'os [15, 17].

* Apoptose ou mort cellulaire programmée : processus physiologique par lequel les cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal

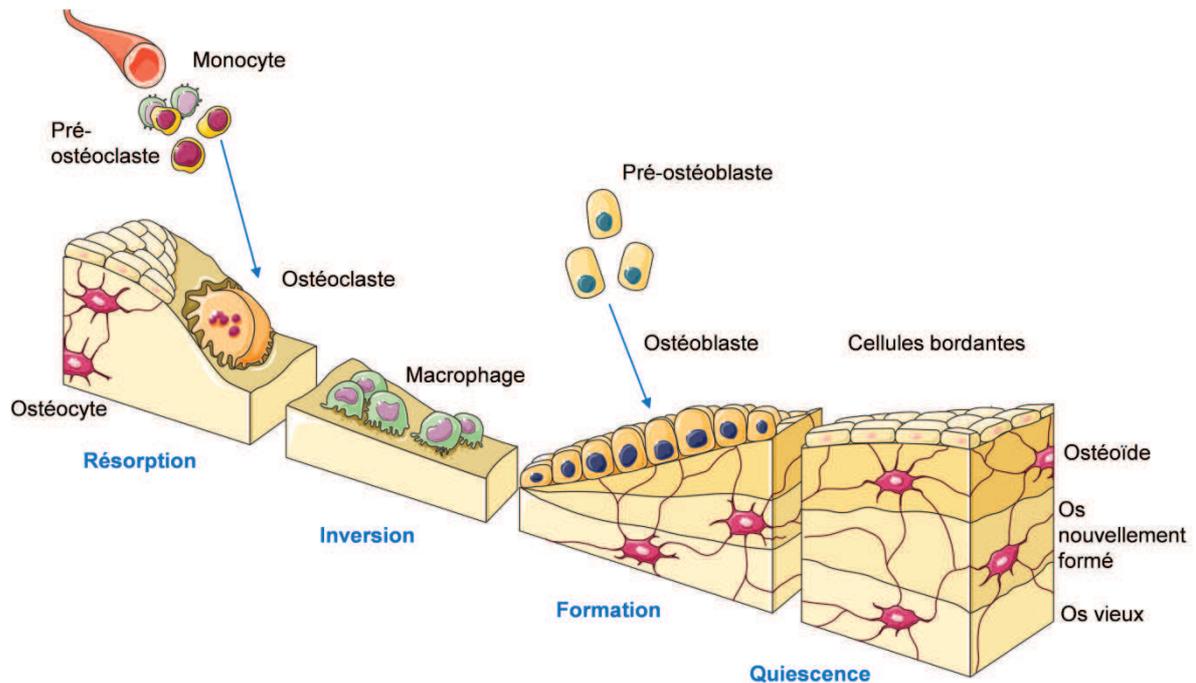


Figure I-2. Représentation schématique d'u cycle de remodelage osseux (courtoisie banque d'images Servier®)

L'étude et la compréhension des mécanismes impliqués dans le remodelage osseux ont été et sont encore actuellement au centre de nombreuses recherches scientifiques [18-20]. En effet, même si les mécanismes généraux du remodelage osseux sont relativement bien connus, ceux au niveau cellulaire et moléculaire sont encore très mal identifiés.

I.1.3. La régénération osseuse

Lorsque l'intégrité du tissu osseux est endommagée à la suite d'un traumatisme, qu'il soit chirurgical (e.g., métastase osseuse) ou accidentel (fracture), un phénomène spontané et naturel de régénération s'amorce. Il est constitué de trois phases indépendantes se superposant dans le temps, à savoir les phases : inflammatoire, de réparation et de remodelage osseux (Figure I-3 page 9) [21].

La régénération osseuse est initialisée par une phase inflammatoire qui fait suite à la rupture dans la continuité du tissu osseux. Cette phase inflammatoire, accompagnée de la formation d'un hématome, est due à la présence de cellules du système immunitaire qui dégradent tout tissu dévitalisé ou lésé. Ces dernières préparent une zone favorable à la formation de nouveaux tissus. Des messages biochimiques (cytokines) pro-inflammatoires, présents dans l'hématome, vont activer la néo-angiogenèse et promouvoir le recrutement de cellules pré-ostéoclastiques. Le début de la phase de réparation est caractérisé par la migration et la multiplication des cellules pré-ostéoblastiques qui initient la formation d'un tissu de granulation remplaçant progressivement l'hématome. Sous l'effet de nombreux stimuli (e.g., messages chimiques, contraintes mécaniques, nutriments) elles se différencient par la suite en chondroblastes. Cette différenciation est à l'origine de la formation d'un cal fibrocartilagineux qui stabilise le foyer de la fracture et fait, entre autre, office de matrice pour sa revascularisation. Le nouveau réseau vasculaire formé apporte les conditions nécessaires à la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques et pré-ostéoclastiques présentes dans le milieu. Ces dernières remplacent, à terme, la matrice fibrocartilagineuse par un tissu minéralisé. La régénération osseuse est finalisée par une

phase de remodelage osseux (section I.1.2. page 6) qui restaure progressivement la structure initiale de l'os (remodelage du cal minéralisé).

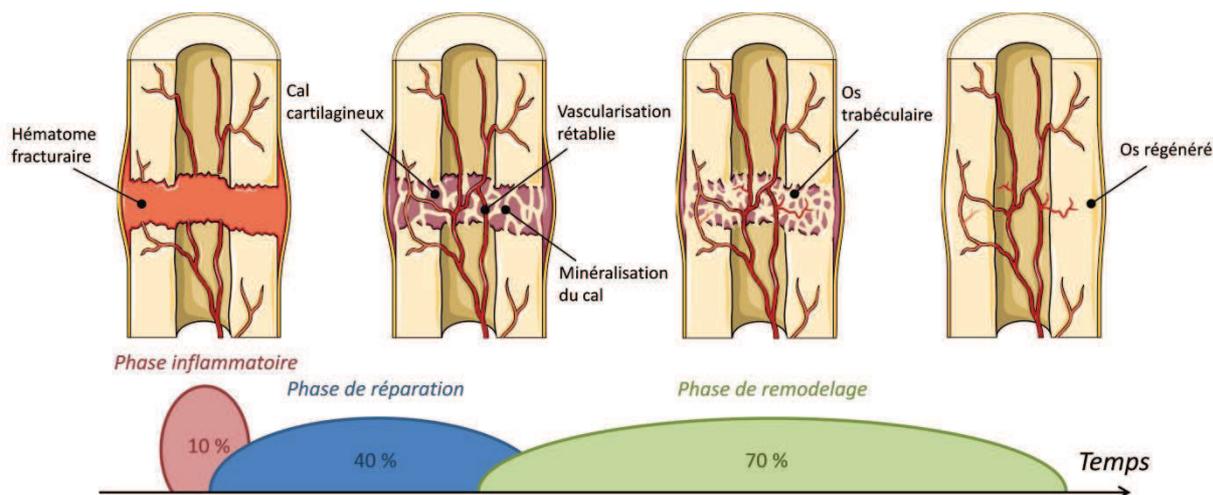


Figure I-3. Représentation schématique du processus de régénération osseuse spontanée (adapté de Cruess et Dumont [22], courtoisie banque d'images Servier®)

De nombreuses inconnues quant aux mécanismes de régénération osseuse persistent encore de nos jours telles que les voies de migration des cellules souches squelettiques sur le site endommagé ou encore le rôle de ces dernières dans la régénération osseuse [23]. Ces zones d'ombres limitent considérablement l'avancée des solutions thérapeutiques actuelles et plus particulièrement dans le cas critique des grands défauts osseux (cf. section I.3. page 18). Comprendre les mécanismes et les acteurs de la cascade biologique régissant la formation et le remodelage osseux apparaît donc comme fondamental pour le développement de dispositifs médicaux et de procédures médicales adaptés.

I.2. La biologie de l'os : vers de nouvelles méthodes d'accès aux connaissances

L'approfondissement des connaissances de la biologie de l'os, et plus particulièrement de la cascade biologique impliquée dans le remodelage osseux, fait appel à deux approches complémentaires, *in vivo* d'une part et *in vitro* d'autre part. Le choix d'une méthode expérimentale plutôt qu'une autre dépend de la problématique scientifique envisagée ainsi que des facteurs éthiques et financiers. Ainsi, le modèle animal, physiologique, est encore nécessaire mais tend à être remplacé s'il n'est pas indispensable (règle des 3R : remplacer, réduire, raffiner [24]). Une des voies de substitution des modèles animaux les plus prometteuses est basée sur le développement de tissus modèles *in vitro* [25].

I.2.1. Approches expérimentales actuelles

Historiquement, les modèles animaux (*in vivo*) et la culture cellulaire sur substrat plan (2D, *in vitro*) sont les méthodes d'accès à la connaissance les plus utilisées. Les modèles animaux fournissent un système biologique complet (fonction toutefois du modèle animal choisi) mais offrent un contrôle limité de l'environnement local et peu d'accès à l'information en temps réel. Au contraire, le modèle de culture 2D traditionnel *in vitro* permet un contrôle fin de l'environnement des cellules et un accès direct aux processus cellulaires. Toutefois, ces conditions de culture sont très largement simplifiées et

reproduisent peu l'environnement réel de l'os, i.e., une structure tridimensionnelle (3D) soumise à différents types de stimuli (e.g., mécaniques).

I.2.1.1. Le modèle animal

La majorité du savoir et des connaissances actuelles en biologie, physiologie, biochimie ou encore immunologie est issue directement ou indirectement de l'expérimentation animale [26]. Elle constitue encore de nos jours une étape nécessaire à la validation de toute problématique biologique du fait du manque de réalisme biologique des systèmes *in vitro*. En effet, l'avantage du modèle animal repose sur l'environnement complexe qu'offre tout organisme vivant.

Initialement utilisé pour acquérir des connaissances basiques, le modèle animal offre, grâce aux progrès de l'ingénierie génétique (e.g., recombinaison homologue de l'ADN [27], TALE-nucléases [28], caspases [29]), d'importantes opportunités pour la compréhension de phénomènes biologiques complexes. Par exemple, l'impact de l'inhibition ou de la surexpression de facteurs de transcription (régulateurs) ou de protéines impliquées dans la cascade biologique osseuse fait l'objet de nombreuses recherches [30-32] ; un exemple d'étude est donné Figure I-4.

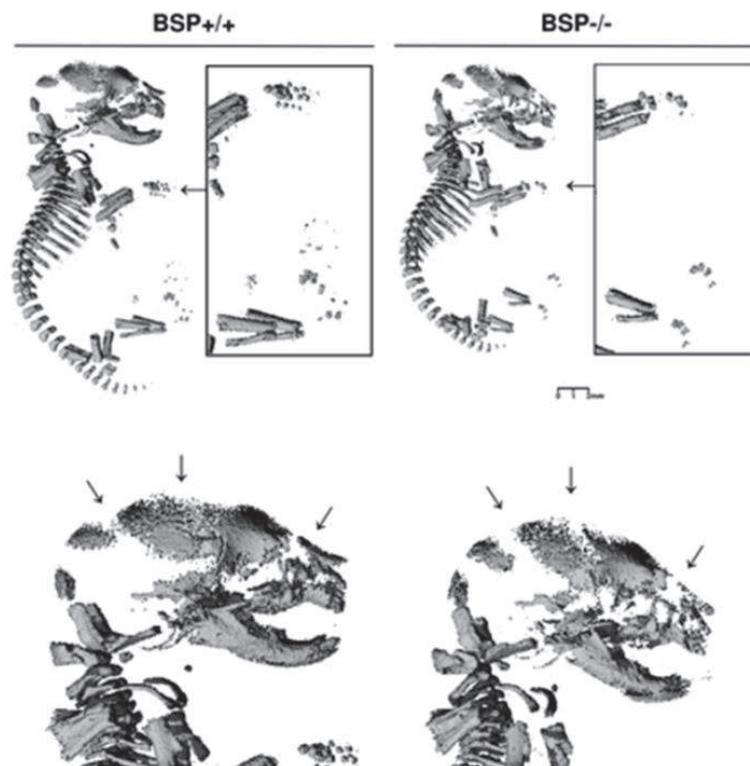


Figure I-4. Impact de l'extinction de la sialoprotéine osseuse (BSP) sur le développement et la minéralisation du squelette de souris. **BSP+/+** : souris sauvage non modifiée génétiquement, **BSP-/-** : souris modifiée génétiquement avec extinction du gène codant pour la BSP (d'après Bouleftour et al. [33]). A titre informatif, la BSP jouerait entre autre un rôle fondamental dans les mécanismes de formation et de remodelage osseux [34].

Cependant, le modèle animal connaît d'importantes limites, comme (i) sa transposition à l'humain [35], (ii) la variabilité inhérente à tout système vivant, (iii) le manque de contrôle de l'environnement local et de suivi des processus cellulaires en temps réel, et (iv) les problématiques d'éthique et de coût de telles expérimentations.

I.2.1.2. Le modèle *in vitro* 2D

Par opposition au modèle animal, la culture cellulaire en milieu statique sur substrat plan (2D) est simple, peu onéreuse et permet le contrôle du microenvironnement (e.g., milieu de culture, stimuli) ainsi que le suivi en temps réel des processus cellulaires.

Bien que ces méthodes de culture traditionnelles statiques sur substrats 2D constituent une première approche idéale pour initier une réflexion scientifique, elles ne sont que peu représentatives du microenvironnement d'un tissu ou d'un organe. En particulier, les cellules osseuses, qui se développent normalement dans un environnement 3D soumis à des stimulations mécaniques, sont ici forcées de s'adapter à une surface plane et rigide. Elles modifient alors leur comportement et leurs fonctions cellulaires, et par conséquent, les signaux biochimiques sécrétés [36-39]. De plus, les temps de culture sur support 2D sont relativement courts par rapport aux processus cellulaires de base (e.g., dépôt et minéralisation de la MEC, différenciation ostéocytaire) limitant un peu plus leurs applications expérimentales.

Le potentiel des systèmes de culture 3D réside dans leur capacité à fournir un environnement plus physiologique que les systèmes 2D [36, 38, 39], d'où leur développement rapide depuis une dizaine d'années.

I.2.2. Transition vers des modèles de tissu osseux 3D *in vitro*

Le développement de modèles de tissus 3D *in vitro* semble constituer une étape fondamentale pour l'accroissement des connaissances en biologie au vue des limites des modèles animaux et de la culture cellulaire traditionnelle 2D. Cette transition nécessite l'évolution des méthodes et des systèmes de culture, ainsi que des techniques d'observation et d'analyse. De nombreux modèles de culture 3D *in vitro* sont étudiés sur la base de l'agrégation de cellules en sphéroïdes [38-40], de leur encapsulation dans un gel [41, 42], ou encore de leur ensemencement sur des matrices 3D [37, 43]. Le choix d'un modèle de culture et de ses spécifications est fonction du modèle de tissu 3D à développer et de la question scientifique posée.

Le développement d'un modèle de tissu osseux 3D *in vitro* requiert en premier lieu un substrat doté d'une architecture 3D permettant la colonisation, la prolifération et la différenciation cellulaire. Des exemples de culture de cellules osseuses dans des matrices d'architecture 3D contrôlées en milieu statiques ont démontré leur intérêt scientifique [44, 45]. Cependant, l'activité des cellules situées en périphérie du support de culture et en contact privilégié avec les nutriments tend à obstruer la porosité externe du support et très vite à limiter la diffusion des nutriments jusqu'au cœur du support, entraînant inévitablement la mort des cellules situées au-delà d'une centaine de micromètre de la surface [36, 46-50].

Pour pallier cette problématique, des bioréacteurs perfusés ont été conçus. Il est de nos jours bien établi que les bioréacteurs perfusés sont les systèmes de culture 3D les plus adaptés au transport de charge (e.g., nutriments, déchets), ainsi qu'à la répartition, prolifération et différenciation des cellules osseuses à l'intérieur de la matrice support [51-53]. Ces systèmes visent à faire traverser la matrice support, préalablementensemencée, par le milieu de culture (Figure I-5). Bien que la conception et la

complexité de tels systèmes dépendent de l'application visée, ces derniers comportent au minimum une chambre de perfusion contenant la matrice support, une pompe et un réservoir de milieu de culture, le tout connecté par des tuyaux (Figure I-5). Ils permettent d'associer une meilleure maîtrise du microenvironnement cellulaire (e.g., apport de nutriment, évacuation des déchets, injection de substances chimiques), le suivi de nombreux paramètres (e.g., pH, température, pression partielle d'oxygène, concentration glucose) ainsi qu'une possible stimulation mécanique via le flux de perfusion [54] et/ou la compression du support de culture [37].

Bien qu'encore limitée par manque d'expérience, pour des raisons technologiques ou encore de coût, le développement de bioréacteurs, conçus pour répondre à une question scientifique précise, tend à se développer. Dans ce cadre, les matrices supports, indispensables à la culture des cellules osseuses sont également amenées à évoluer selon la nature de l'étude (voir section I.2.3. page 14)

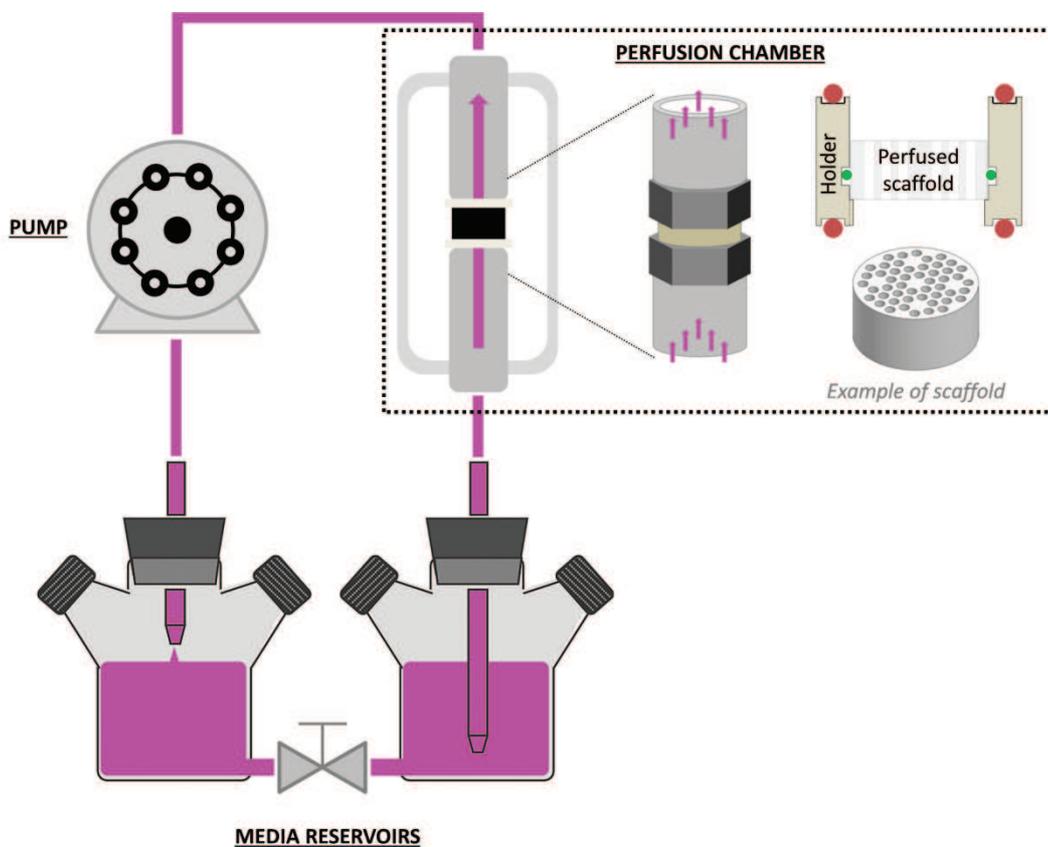


Figure I-5. Représentation schématique d'un système de culture 3D composé d'une chambre de culture dans laquelle est insérée un support de culture macroporeux préalablement ensemencé, et d'un système de perfusion composé principalement d'une pompe, de tuyaux, et de réservoirs contenant le milieu de culture à perfuser et si nécessaire les effluents.

Malgré d'importantes évolutions, les modèles de tissu osseux 3D dynamiques sont encore très minimalistes comparés au modèle *in vivo* : ils ne comportent très souvent qu'un seul type cellulaire et n'incluent pas de contrôle des signaux micro-environnementaux biochimiques, biophysiques et mécaniques. Or, les mécanismes régissant la dynamique osseuse sont basés sur les interactions entre de nombreux types cellulaires (e.g., ostéocytes, cellules endothéliales, cellules bordantes, ostéoblastes, ostéoclastes). Certaines études couplant un bioréacteur perfusé et la co-culture de plusieurs types cellulaires ont toutefois été réalisées (e.g., ostéoblastes & ostéoclastes [55], ostéoprogéniteurs & cellules endothéliales [56], ostéoblastes & ostéoclastes & cellules endothéliales [57]).

Malheureusement, ces systèmes de co-culture sont complexes, difficilement maîtrisables et n'ont, à notre connaissance, jamais été couplés avec des dispositifs de stimulation mécanique fiables. La volonté de mieux comprendre les interactions cellulaires régulant la biologie de l'os à l'aide de ces systèmes *in vitro* perfusés se heurte toutefois à des contraintes techniques, telles que la fabrication de supports de culture contrôlés [36], limitant leur développement.

Une approche *in vitro* complémentaire a fait son apparition très récemment, se focalisant principalement sur les interactions systémiques inter-organes via la mise en série de systèmes micro-perfusés appelés "organs-on-chips". Cette démarche fait suite au constat que l'os communique avec les tissus musculaires environnants, mais aussi avec le foie, le pancréas, les reins, les intestins, la thyroïde, etc. (Figure I-6). Par exemple, la sécrétion excessive d'hormones thyroïdiennes (i.e. hyperthyroïdie) peut provoquer une diminution significative de la masse minérale osseuse [58].

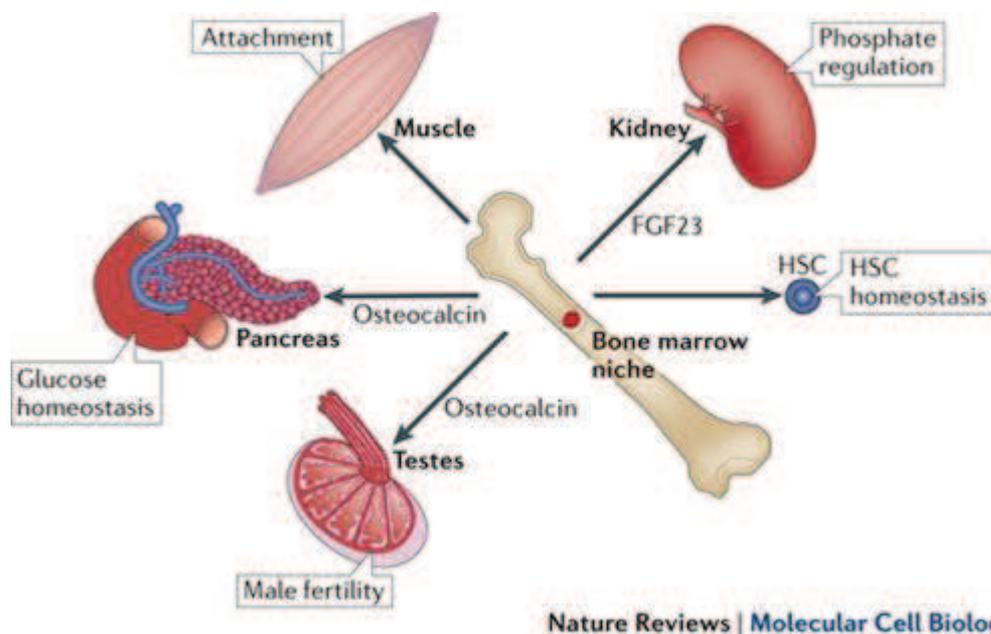


Figure I-6. Schéma précisant les interactions possibles entre l'os et certains organes ("bone as a signalling centre " [59])

Dans un premier temps, les systèmes organs-on-chip ne visent pas au développement de modèles de tissus complets, mais plutôt à la combinaison d'unités fondamentales fonctionnelles de différents tissus pour mieux les étudier [60] (Figure I-7 page 14). Ces systèmes s'intéressent bien entendu aux unités fondamentales saines, mais aussi à l'influence que la défaillance d'une unité systémique ou encore l'action qu'un produit actif pourrait avoir sur les autres unités fondamentales.

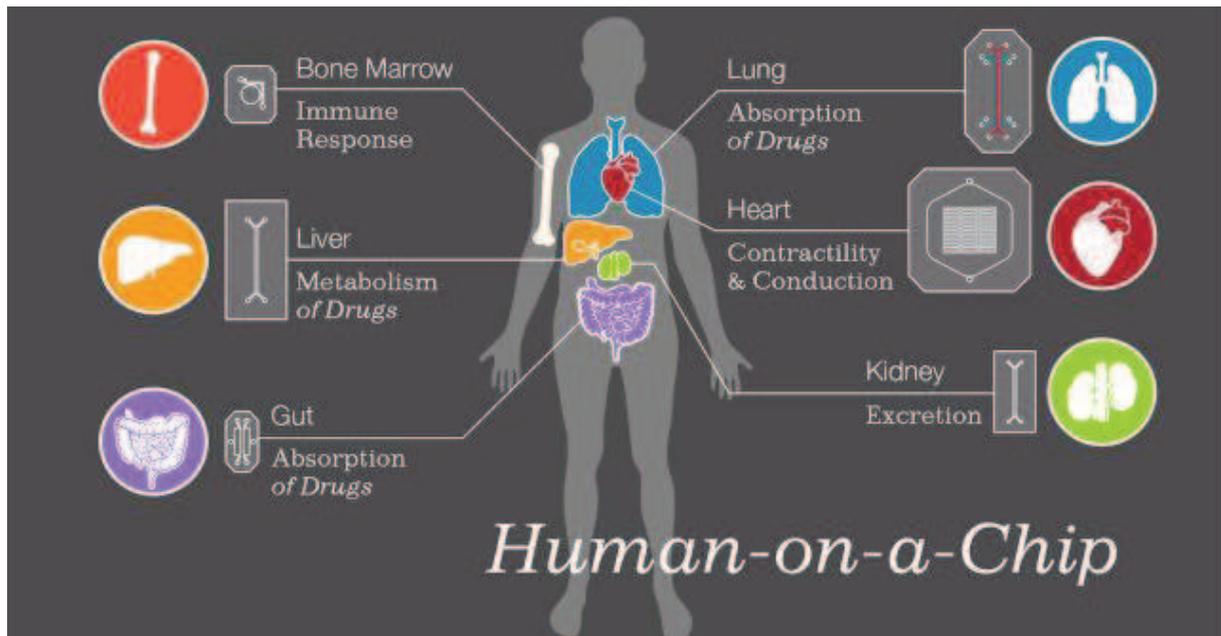


Figure I-7. Représentation schématique du concept "organs-on-chip" (courtoisie Geraldine Hamilton, Wyss Institute [61])

Un avantage majeur de ces systèmes réside dans les opportunités d'observation (e.g, imagerie haute résolution) et d'analyse (e.g., signaux biochimiques) en temps réel qu'ils offrent. Ainsi, le suivi des activités métaboliques et génétiques de cellules vivantes fonctionnelles dans un microenvironnement proche du physiologique peut être étudié [62]. De plus, ces systèmes micro-perfusés ont également l'avantage d'être d'une grande flexibilité et dotés d'un important panel de paramètres contrôlables à un niveau jusqu'à présent inégalé (e.g., types et position des cellules, stimuli chimiques et mécaniques, gradients de nutriments et d'oxygène) [62]. Cependant, outre les challenges technologiques inhérents à la conception, la production et la mise en place de tels systèmes, ils souffrent avant tout de leur miniaturisation et par voie de conséquence de leur minimalisme. A titre d'exemple, les systèmes micro-perfusés conçus par Zhang et al. [63] et Park [64] et al. possèdent des chambres de culture de respectivement 10 et 17 μL pour un volume total de milieu de culture de 150 μL . Or, comme indiqué précédemment, certains organes comme l'os requièrent de nombreux types cellulaires et une organisation macroscopique pour exprimer pleinement leurs fonctions.

Le couplage de ces deux approches *in vitro* (i.e., culture en bioréacteur perfusé et organ-on-chip) représente sans aucun doute le modèle de tissu osseux *in vitro* le plus abouti et permettrait de combiner les interactions intercellulaires et inter-organes ainsi que le contrôle et le suivi en temps réel d'un grand nombre de signaux. Une première étape vers ces systèmes combinés passe par l'amélioration des couples bioréacteur (perfusé) - matrice support, et plus précisément dans le contrôle et l'homogénéité des paramètres de culture au sein du support 3D (e.g., force de cisaillement, taux d' O_2). Ceci implique forcément un contrôle précis du flux de perfusion au cours du temps mais également un ajustement précis des propriétés du support de culture par rapport à l'étude envisagée.

I.2.3. Les supports de culture

Comme évoqué précédemment, le développement de tissus modèles osseux *in vitro* nécessite un environnement 3D qui simule au moins partiellement la structure, les propriétés mécaniques (e.g., rigidité), la composition ou encore les signaux de la matrice extracellulaire naturelle. Les matrices

supports 3D constituent alors des outils cruciaux pour l'identification des mécanismes cellulaires régissant le devenir des cellules osseuses.

Si le succès des implants osseux *in vivo* est conditionné par leur capacité à être colonisés, dégradés et remplacés par des tissus néoformés, les substrats adaptés aux expérimentations *in vitro* en bioréacteur doivent avant tout fournir un support 3D adapté à la culture des cellules. Or, la composition aussi bien que l'architecture des matrices support influencent grandement la réponse cellulaire et doivent ainsi être spécifiques d'une application visée.

1.2.3.1. Le rôle clef de l'architecture

L'architecture de la matrice support joue un rôle prépondérant dans les stratégies de culture 3D en bioréacteur [36]. La microarchitecture (<20 μm) du substrat, comprenant la topologie de surface ainsi que la taille, la forme et la distribution des micropores, module ses propriétés ostéoconductive [65, 66] et ostéoinductive [67, 68]. Les raisons de cette modulation proviendraient (i) de l'adsorption sélective de protéines contenues dans le milieu de culture ou les fluides biologiques [69, 70], (ii) d'une augmentation de la surface qui pourrait promouvoir les échanges dynamiques aux interfaces biomatériau-MEC-cellule [71], ou encore (iii) de la sensibilité des cellules aux discontinuités du substrat [72, 73]. La macroarchitecture ($\geq 100 \mu\text{m}$) du substrat, comprenant sa géométrie globale et sa structure interne (e.g., taille, forme, répartition des pores), est tout aussi fondamentale. La géométrie globale se doit de correspondre parfaitement à la chambre de culture pour éviter tout biais expérimental, tel que des fuites. La structure interne de la matrice influe sur ses propriétés mécaniques [74], sa vitesse de dégradation [75, 76], sa capacité à être perfusée (e.g., perméabilité, tortuosité), les champs de vitesse d'écoulement [77, 78] ou encore les transports de masse [79]. La macroarchitecture impacte par conséquent la colonisation, la prolifération et la différenciation cellulaire au cours de la culture [80, 81].

1.2.3.2. Influence de la composition

La composition d'un matériau comprend sa composition chimique (e.g., atomes composant le matériau) et sa structure cristallographique (e.g., ordre local). Associées aux traitements chimiques, mécaniques ou encore thermiques que peuvent subir les matériaux, ces deux grandeurs gouvernent les propriétés chimiques (e.g., solubilité, hydrolyse, acidité, capacité d'adsorption), physiques (e.g., mouillabilité, charge de surface, degré de cristallinité), mécaniques (e.g., rigidité) et biologiques (e.g., toxicité, adhésion cellulaire) intrinsèques du substrat de culture. En retour, ces propriétés intrinsèques affectent le devenir cellulaire, des étapes les plus précoces, telles que l'adsorption des protéines, jusqu'aux étapes de différenciation cellulaire [36]. En effet, outre les caractéristiques microarchitecturales, telles que la rugosité (voir section précédente 1.2.3.1), le type, la conformation et la densité des protéines adsorbées sont fonctions (i) des groupements ioniques présents à la surface du matériau, (ii) de l'environnement ionique et de la valeur du pH du milieu de culture [82, 83]. Or, ces paramètres chimiques (i et ii) peuvent être significativement modifiés lors des étapes de dégradation du matériau. *In vitro*, le substrat peut se dégrader via des réactions chimiques (e.g., dissolution, hydrolyse), via l'activité de certaines cellules (e.g., résorption, endocytose) ou encore via la perte d'intégrité mécanique (e.g., fissuration). Comme les produits de cette dégradation peuvent affecter le devenir cellulaire, ils doivent également être biocompatibles (i.e., non toxiques).

En fonction des applications visées, de nombreux matériaux ont montré d'intéressantes potentialités pour la culture 3D de cellules osseuses [51] :

- Certains métaux et alliages non dégradables (e.g., TA6V, Ti-Nb), considérés comme bioinertes et biocompatibles, sont d'intérêt du fait de leur grande modulabilité tant au niveau architectural que de leur composition, permettant ainsi la modification des propriétés mécaniques des structures générées [84]. Leur principal défaut réside cependant dans le possible relargage d'ions métalliques (e.g., oxydation) pouvant être néfastes pour les cellules osseuses ou leur métabolisme [85].
- Les céramiques bioinertes (e.g., alumine, zircone), bien que plus limitées que les alliages métalliques en terme de modulabilité et plus fragiles mécaniquement, ont l'avantage de proposer une structure thermodynamiquement donc chimiquement très stable, n'évoluant que très peu en milieu biologique.
- Outre la faculté de pouvoir les mettre en forme relativement facilement, notamment via des méthodes additives [86], un grand nombre de polymères biocompatibles plus ou moins biodégradables existent (e.g., pour des applications osseuses [87] : poly(méthyl-méthacrylate) [PMMA], polyéthylène [PE], acide polylactique [PLA], acide polyglycolique [PGA]). Ce potentiel de dégradation peut être théoriquement ajusté par le biais de leur chimie (e.g., composition des unités fondamentales), leur degré de polymérisation, leurs masses molaires moyennes, leur structure et conformation (e.g., homopolymère, copolymère, polymère linéaire versus réticulé), et leur cristallinité [88]. Cependant, la dégradation des polymères synthétiques provoque une libération de produits de faible masse molaire moyenne (e.g., oligomères ou monomères comme le méthyl-méthacrylate pour le PMMA [89, 90]) ou des dérivés acides (e.g., acide lactique pour le PLA, acide glycolique pour le PGA [88]) qui peuvent s'avérer nocifs pour les cellules osseuses et leur métabolisme [87, 88, 91]. En outre, les propriétés de surface de certains polymères biodégradables (e.g., hydrophobicité [92]) ne favorisent pas l'adhésion cellulaire ou la formation d'un nouveau tissu osseux [93]. Enfin, leurs faibles propriétés mécaniques ne sont que peu adaptées aux stimuli mécaniques (e.g., cisaillement, compression) éventuellement exercés lors de la culture [94].
- Les biocéramiques en phosphates de calcium (CaP), fortes de leurs similitudes avec la partie minérale de l'os (e.g., rigidité, composition), sont utilisées depuis les années 1950 comme substituts de l'os [95] et fin des années 1970 comme support de culture *in vitro* [96]. Leur biocompatibilité, leur bioactivité (souvent supérieure aux polymères synthétiques) [7, 97] et leur biodégradabilité [7, 97, 98] en font des supports de culture de choix. L'obtention de matrices 3D d'architecture contrôlée est néanmoins complexe et la fragilité relative de ces céramiques constitue une problématique majeure limitant leur sollicitation mécanique au cours de la culture cellulaire. Ces faiblesses mécaniques peuvent être toutefois compensées en ajustant l'architecture et/ou leur composition.
- D'autres matériaux massifs (e.g., bioverres) ou encore nanostructurés (e.g., nanotubes de carbone [99]) peuvent être utilisés pour la culture 3D de cellules osseuses, sous réserve de contrôler leurs interactions avec le milieu environnant et de maîtriser leur toxicité.

Notons qu'il est bien sûr possible de combiner différents matériaux (i.e. composite) pour pallier à leurs limites respectives. En revanche, il sera alors très complexe de relier un comportement biologique aux propriétés physico-chimiques du support de culture.

Le développement de modèles de tissus osseux 3D *in vitro* requiert de connaître l'influence de la composition et de l'architecture du substrat de culture sur la réponse cellulaire et réciproquement de pouvoir évaluer l'influence du milieu de culture et de l'activité cellulaire sur ce substrat. En conséquence, il est impossible d'établir rigoureusement les liens entre réponse biologique et caractéristiques de la matrice support (i.e. composition, architecture) si ces dernières ne sont pas précisément connues [36]. Par exemple, la taille des macropores du substrat est connue pour impacter de façon significative le développement du tissu osseux (*in vivo* et *in vitro*) [100, 101] mais les résultats obtenus sont étrangement comparables pour des pores compris entre 100 et 1200 μm [102, 103]. La raison de ce manque de cohérence scientifique est à associer à la nature aléatoire des architectures poreuses utilisées pour ces évaluations biologiques et donc aux limites des procédés de fabrication mis en œuvre pour les obtenir. Ceci indique également que pour l'heure, la grande majorité des études en ingénierie tissulaire osseuse ne se préoccupe pas assez de la maîtrise et de la standardisation de la chimie et de l'architecture des supports de culture [36].

I.2.4. Perspectives pour le développement de modèles de tissu osseux 3D *in vitro*

Développer un bioréacteur de perfusion, définir la composition et l'architecture appropriées de la matrice support, mettre en place un protocole de culture standardisé et concevoir des outils d'observation et d'analyse pour répondre à une problématique spécifique représentent un véritable challenge (Figure I-8 page 18) mais sont nécessaires à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires régissant la biologie de l'os.

Dans cette optique, une démarche multidisciplinaire intégrant les principes des sciences expérimentales (e.g., biologie, science des matériaux, physique, chimie) et des sciences numériques (e.g., simulation mathématique) [104] pourrait s'avérer pertinente.

En effet, les stratégies de fabrication couplant la conception par ordinateur (CAO) et les technologies de fabrication additives offrent des opportunités importantes pour la production de supports de culture macroporeux d'architecture et de composition parfaitement maîtrisées. Ces matériaux standardisés devraient permettre l'obtention de données expérimentales fiables et facilement implémentables dans des modèles de simulation numérique prédictifs (e.g., différenciation cellulaire en fonction du cisaillement).

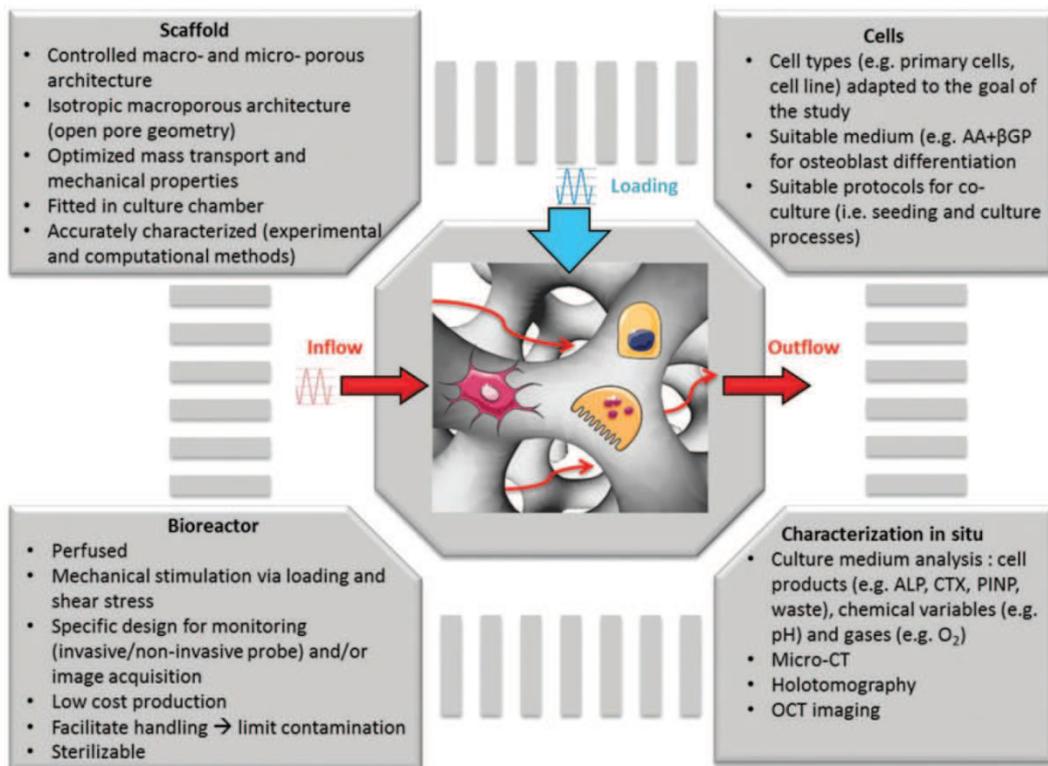


Figure I-8. Représentation schématique des éléments fondamentaux pour le développement de modèle de tissu osseux 3D *in vitro*, incluant le type cellulaire, les caractéristiques principales du bioréacteur et du support de culture, et les outils d'analyse et de caractérisation (Schéma issu de la revue de Bouet et al. [36]). AA : acide ascorbique; βGP : β-glycérophosphate; ALP : phosphatase alcaline; CTX : Téloptéptide C-terminale réticulée; PINP : propéptide amino-terminale du collagène de type I; OCT : tomographie à cohérence optique; micro-CT : microtomographie.

I.3. Du comblement des petits défauts osseux aux problématiques des grands défauts osseux

Comme expliqué précédemment, les mécanismes spontanés de régénération osseuse s'enclenchent lorsque l'intégrité du tissu osseux est menacée (section I.1.3. page 8). Néanmoins, dans certains cas, notamment s'il y a une perte de substance osseuse, le processus de régénération naturelle (voir Figure I-3 page 9) ne peut se mettre en place correctement. Ainsi, certains auteurs établissent qu'un défaut de taille supérieure à 10 mm chez l'humain n'est pas propice à la régénération osseuse physiologique [105], bien qu'aucune généralité ne puisse être faite.

I.3.1. Défauts osseux : limites de la régénération osseuse

Le tissu osseux peine à se régénérer naturellement lorsque la taille du défaut augmente, jusqu'à être impossible : c'est le passage du défaut de petite taille au grand défaut de taille critique. Ce phénomène, bien qu'étudié (Figure I-9), n'est toujours pas clairement expliqué de nos jours. Le manque de "signaux osseux et vasculaires" et de cellules ostéoprogénitrices et endothéliales au sein du défaut pourrait en être la cause [106]; cellules ostéocompétentes et signaux biochimiques restant « cantonnés » à proximité des berges osseuses, en particulier près du périoste [106, 107]. En conséquence, une compétition naturelle entre le phénomène lent de régénération osseuse et la nécessité d'une restauration rapide de la fonction mécanique (même partielle) pourrait avoir lieu. Cette compétition

mènerait à terme au remplacement du tissu cicatriciel intermédiaire (voir Figure I-3 page 9) par un tissu fibreux empêchant la formation osseuse ultérieure [108-110].

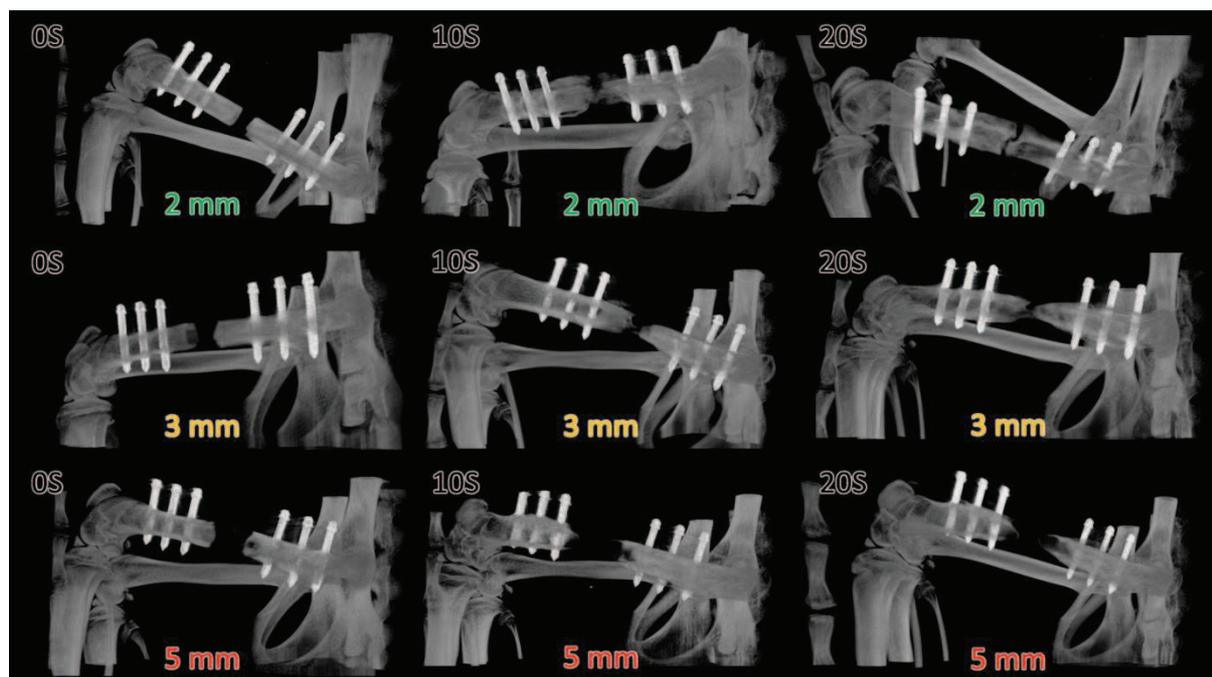


Figure I-9. Détermination de la taille de défaut osseux fémoral critique chez le rat. La taille de la résection fémorale initiale, ainsi que le temps écoulé (en semaine) après la dite résection sont précisés sur les images. Aucun comblement n'a été réalisé après résection et le fémur a été stabilisé à l'aide d'une plaque d'ostéosynthèse en polyéthylène téréphtalate (PEEK) fixée en partie proximale et distale à l'aide de 3 vis en TAN (Ti-6%_(w/w)Al-7%_(w/w)Nb) de 0.7 mm de diamètre. Ces images ont été obtenues sur rats vivants à l'aide d'un scanner. Elles ont été fournies par le laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires (B2OA CNRS UMR 7052) dans le cadre du projet ANR OrthoFlase. Après 20 semaines il apparaît que le défaut de 2mm est quasiment comblé par un nouvel os, le défaut de 3mm tend progressivement à être comblé mais très lentement, en revanche aucune formation osseuse n'est observée pour le défaut de 5mm qui est clairement un grand défaut de taille critique.

La régénération de défauts osseux de petite taille est actuellement relativement aisée. Elle peut être guidée et accélérée via l'utilisation d'un matériau de comblement osseux d'origine humaine, animale, naturelle ou encore synthétique. Au contraire, peu de solutions viables sont de nos jours disponibles pour le soin des grands défauts osseux et plus encore lorsqu'ils sont de taille critique [111]. Des procédures chirurgicales (e.g., dispositif d'Ilizarov [112]) très pénibles, douloureuses et aux conséquences lourdes sont envisageables, mais le comblement du défaut par un substitut de l'os est préférable, bien que souvent insuffisant.

I.3.2. Comblement des petits défauts osseux

De nombreux types de substituts de l'os sont utilisés pour la régénération osseuse dans le cadre des petites pertes osseuses : des greffes humaines autologues aux implants synthétiques en passant par les greffons de banque (Tableau I-1 page 22).

L'autogreffe osseuse est toujours considérée comme le matériau idéal (« *gold standard* ») en chirurgie réparatrice osseuse et convient très bien au comblement des petits défauts osseux. Cependant, ces greffons ne sont disponibles qu'en quantité très limitée et impliquent des procédures lourdes, facteurs de complications post-opératoires. De plus, pour une taille de défaut osseux supérieur à 6 cm chez l'être humain, l'autogreffe n'est plus suffisante pour aider convenablement la régénération de l'os [113,

114]. L'allogreffe (os de banque) présente une meilleure disponibilité que l'autogreffe, mais ne possède en revanche aucune propriété ostéogénique ou angiogénique. Les complications post-opératoires et les infections sont aussi plus nombreuses que dans le cas d'une autogreffe [115, 116]. De plus, une ostéointégration incomplète de l'allogreffe, accompagnée d'une dégradation des propriétés mécaniques du site comblé dans près de 60% des cas, ont été observées après 10 ans [117]. Les xéngreffes sont quant à elles beaucoup moins utilisées depuis les années 2000 du fait des risques de transmission de maladies telle que l'encéphalopathie spongiforme bovine.

D'autres matériaux de comblement comme les métaux [118] et polymères [119] biorésorbables, les bioverres [115], les carbonates de calcium naturels (e.g., corail) [120] ou encore les phosphates de calcium synthétiques [121] sont aussi utilisés avec succès pour le soin des défauts osseux de petite taille (Tableau 1); chaque matériau ayant ses propres avantages et limites. Par exemple, l'hydroxyapatite (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) et le phosphate tricalcique bêta (β -TCP, $Ca_3(PO_4)_2$) sont les deux biocéramiques phosphocalciques les plus communément utilisées cliniquement comme matériau de comblement. Malgré une efficacité incontestable pour les défauts de petite taille, l'HA et le β -TCP ne possèdent pas, entre autres, une vitesse de biodégradation adaptée à la vitesse de formation d'un nouveau tissu osseux. En effet, *in vivo*, l'HA est une céramique relativement stable du fait de sa faible solubilité (*in vivo* $60 \text{ mg m}^{-2} \text{ jour}^{-1}$ [122], $K_s = 10^{-116,8}$ [123]) et très faible résorbabilité [124]. A l'inverse, les céramiques en β -TCP se dégradent trop rapidement du fait d'une solubilité environ 10 fois plus élevée que celle de l'HA (*in vivo* $520 \text{ mg m}^{-2} \text{ jour}^{-1}$ [122], $K_s = 10^{-28,9}$ [123]). En réponse à ces vitesses de biodégradation inadaptées, des céramiques biphasées, mélangeant des phases d'HA et de β -TCP (BCP pour biphasic calcium phosphate en anglais), ont fait leur apparition ; la solubilité du mélange biphasé étant alors considérée comme une solubilité « moyenne » entre la solubilité de l'HA et celle du β -TCP au facteur de masse près. La Figure I-10 présente par exemple un document marketing de la société Medtronic expliquant l'intérêt des biocéramiques BCP dans des applications de comblement osseux via la confrontation de la vitesse de formation osseuse et de la vitesse supposée de dégradation de la biocéramique en fonction de sa composition. De nombreux industriels commercialisent ces biocéramiques en BCP pour le comblement de défauts osseux (Tableau I-2 page 23).

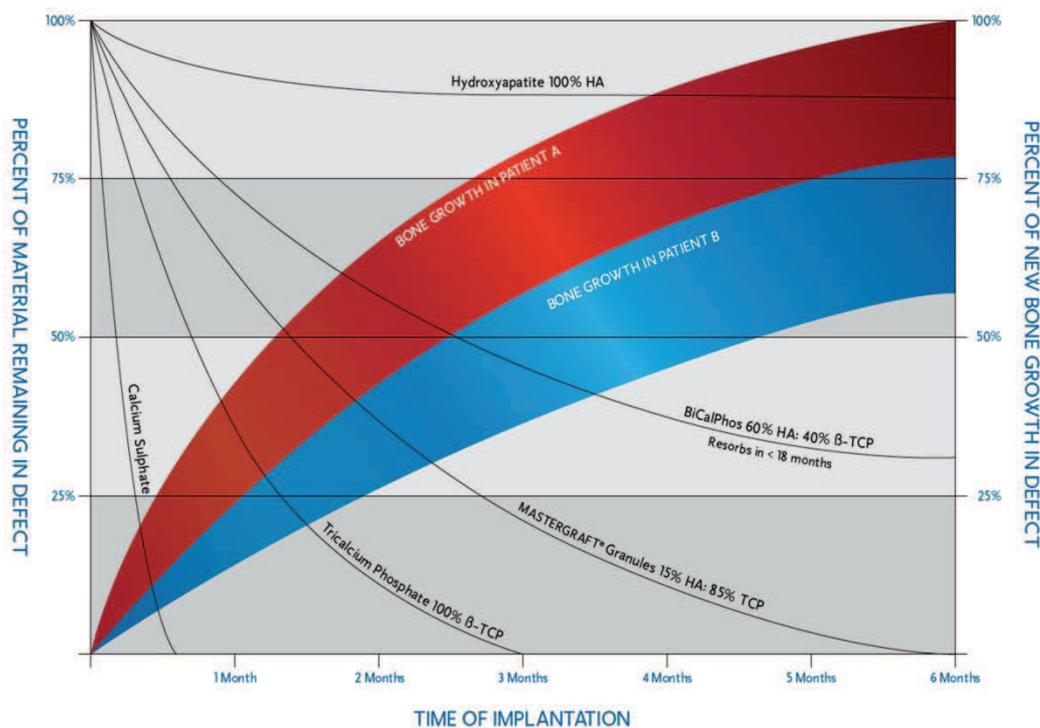


Figure I-10. Schéma de la société Medtronic présentant la corrélation virtuelle entre le pourcentage d'os nouveau formé au sein d'un défaut pour 2 patients A et B et le pourcentage de matériaux de type CaP (HA, β -TCP, et 2 mélanges) restant au sein du défaut en fonction du temps d'implantation (courtoisie Medtronic[®]).

Or, en réalité, les mélanges biphasés d'HA et de β -TCP ne peuvent pas être caractérisés par une « solubilité moyenne » puisque le produit de solubilité d'une phase est constant et propre à celle-ci. Ainsi, dans ces mélanges BCP, la phase β -TCP, qui disparaît plus rapidement que la phase HA, va laisser place à une matrice plus ou moins poreuse d'HA pure relativement stable dans le temps [125, 126], voire entraîner la libération de particules d'HA au niveau du site d'implantation [126] pouvant engendrer l'apparition d'une réaction inflammatoire [127, 128]. Cette modulation purement virtuelle de la vitesse de dégradation est donc scientifiquement inexacte et thérapeutiquement loin d'être idéale.

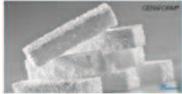
Les limitations inhérentes aux procédés traditionnels de mise en forme des biocéramiques limitent également leur architecture à des blocs ou des granules dotés d'une macro- et micro-porosités aléatoires en termes de densité, taille et distribution (voir Tableau I-2 page 23).

Par conséquent, les biocéramiques en CaP cliniquement utilisées actuellement se limitent généralement à des défauts de moins de 3 cm, taille au-delà de laquelle les propriétés de ces substituts ne sont pas suffisantes pour permettre, sans facteur bioactif additionnel, une restauration de l'intégrité de l'os [129].

Tableau I-1. Exemple de matériaux commercialisés pour le comblement de petits défauts osseux dans le domaine dentaire (courtoisie Nathalie Douard CIS-EMSE)

Company	Type	Product Name	Component	Shape
BIOBANK	Allograft		Cryopreserved human bone	granules 0,5 mm / 1 mm
BOTISS / STRAUMANN	Allograft	Maxgraft cancellous or cortico-cancellous	Deproteinized freeze-dried human bone	granules 0,5-2 mm
	Xenograft	Cerabone	Deproteinized bovine bone	granules 0,5-1 / 1-2 mm
STRAUMANN	Synthetic	Maxresorb	60% HA / 40% b-TCP	granules 0,5-1 / 0,8-1,5 mm
	Synthetic	BoneCeramic	60% HA / 40% b-TCP	granules 0,4-0,7 / 0,5-1 mm
GEISTLICH	Xenograft	Bio-Oss et Bio-Oss Pen	Deproteinized bovine bone	granules 0,25-1 / 1-2 mm
	Xenograft	Bio-Oss Collagen	90% Bio-Oss® + 10% porcine collagen	Moldable block
ZIMMER DENTAL	Allograft	Puros Cancellous and/or Cortical Particles	Deproteinized human bone	granules 0,25-1 / 1-2 mm
	Allograft	RegenaVate	Deproteinized human bone	Formable after rehydration
	Synthetic	IngenioS HA	HA	granules 0,25-1 / 1-2 mm
	Synthetic	IngenioS β -TCP	"100% silicated β -TCP"	granules 0,25-1 / 1-2 mm
KASIOS	Synthetic	Kasios TCP Dental et Kasios TCP Dental HP b-TCP	Calcium carbonate skeleton extracted from marine corallina algae	granules 0,15-0,5 / 0,5-1 / 1-2 mm
DENTSPLY Implant / OTA Natural		Algisorb / Algipore	Calcium carbonate skeleton extracted from marine corallina algae	granules 0,3-0,5 / 0,5-1 / 1-2 mm
BIOM'UP	Synthetic	MATRI BONE MAX	60% HA / 40% b-TCP dispersed in a collagenic matrix	granules 0,08-0,2 / 0,5-1 mm
TBF	Allograft	Phoenix	Cryopreserved human bone	granules 0,2-1,6 / 0,5-2 mm
BIOMATLANTE	Synthetic	MBCP+™ Granules	20 % HA / 80 % b-TCP	granules 0,5-1 / 1-2 mm
	Synthetic	In'Oss Putty	MBCP+ granules in an hydrogel matrix	Moldable putty
FABHER Medical	Synthetic	Ceros TCP	b-TCP	granules 0,5-0,7 mm
CURASAN	Synthetic	Cerasorb Classic	b-TCP	granules 0,5-1 / 1-2 mm
	Synthetic	Cerasorb M	b-TCP	granules 0,15-0,5 / 0,5-1 / 1-2 mm
	Synthetic	Cerasorb Perio	b-TCP	polygonally shaped granules 0,25-0,5 mm
SEPTODONT	Synthetic	RTR	b-TCP	granules 0,5-1 mm
TEKNIMED	Synthetic	Odoncer	b-TCP	granules 0,1-1 / 1-2 mm
	Synthetic	Ceraform Dental	65% HA / 35% b-TCP	granules 0,1-1 / 1-2 mm
BIOMET 3i	Synthetic	Biogran	Bioglass	granules 0,3-0,35 mm
	Xenograft	Endobon	Deproteinized bovine bone	granules 0,5-1 / 1-2 mm
BIOCORAL	Allograft	RegenerOss	Freeze-dried human bone mineralized or partially demineralized	granules 0,2-0,3 / 0,3-0,5 / 0,5-0,8 mm
	Natural	Biocoral	Mineral part (i.e. calcium carbonate) extract from natural coral	granules 0,3-0,45 mm

Tableau I-2. Liste non exhaustive de biocéramiques actuellement disponibles sur le marché.

Company	Product Name	Component	Shape examples
Stryker	BoneSave	20% HA - 80% β -TCP (50% porosity)	
	Vitoss	20% HA - 80% β -TCP (90% porosity)	
Synthes	ChronOs	β -TCP (60-70% porosity)	
Teknimed	Ceraform	65% HA - 35% β -TCP	
FH Orthopedics	EuroCer 200+	65% HA - 35% β -TCP (60% porosity)	
	EuroCer 400	55% HA - 45% β -TCP	
Medtronic	Mastergraft	85% HA - 15% β -TCP (80% porosity)	
	BiCalPhos	60% HA - 40% β -TCP (80% porosity)	
Biomatlante	MBCP	60% HA - 40% β -TCP (70% porosity)	
Alphatec Spine	Bone'X	60% HA - 40% β -TCP	

I.3.3. Perspectives pour le soin des grands défauts osseux

Les propriétés des substituts de l'os actuellement disponibles ne sont pas adéquates pour permettre à elles seules la réparation du défaut osseux lorsque sa taille dépasse quelques centimètres. Certaines études ont avancé que l'échec des procédures de comblement de ces défauts osseux de taille critique pouvait être dû en premier lieu à un manque de revascularisation au niveau de l'implant [130, 131]. En effet, si les cellules situées en périphérie du matériau de comblement peuvent profiter d'oxygène et de nutriments par des phénomènes de diffusion ou d'une revascularisation locale de l'implant (i.e., de surface), celles situées à plus de 100 à 400 μ m de ces vaisseaux ou de l'interface implant/tissu hôte meurent inexorablement du fait d'une ischémie locale (hypoxie mais surtout déplétion en nutriments) [46-50].

Pour stimuler la vascularisation de l'implant et la formation d'un nouveau tissu osseux, l'utilisation de facteurs de croissance, tels que les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) ou encore de dérivés plaquettaires, est légalement autorisée (e.g., rhBMP2 commercialisée depuis 2002) [47, 132-134]. Malheureusement, malgré des résultats cliniques intéressants, leurs applications restent limitées et

tendent même à être de plus en plus restreintes par les autorités de santé publique [135]. En effet, la méconnaissance actuelle des doses optimales de facteurs de croissance à libérer au sein du défaut osseux au cours de la phase de réparation (i.e., en fonction du temps), combinée à un relargage peu maîtrisé, du fait que le facteur actif est le plus souvent adsorbé à la surface du biomatériau, peut induire de graves effets indésirables post-opération [136], tels que celui présenté Figure I-11.



Figure I-11. Exemple d'effet indésirable (excroissance osseuse) provoqué par une libération non maîtrisée de facteur de croissance (rhBMP2) faisant suite à l'implantation d'un dispositif de fusion vertébrale Infuse Bone Graft® (Medtronic)

La thérapie cellulaire, approche basée sur l'introduction de cellules souches au sein d'un organe lésé pour remplacer ou suppléer des cellules défaillantes, a vu le jour au début des années 2000 [137, 138]. Appliquées à la régénération de défauts osseux, ces procédures thérapeutiques, très onéreuses et difficiles à mettre en œuvre, ont montré des résultats intéressants mais encore peu reproductibles [139, 140]. Une alternative à plus bas coût, et actuellement utilisée cliniquement [141, 142], repose sur l'injection de moelle osseuse totale qui contient naturellement des cellules souches et des facteurs de croissance. Malgré des résultats prometteurs, ils sont souvent trop dépendants de l'âge et de l'état de santé du patient [141]. Le succès de ces deux types de procédures thérapeutiques repose grandement sur la nature, le nombre et la qualité des cellules souches injectées [139, 143]. Il est actuellement admis que des étapes de purification (préalable à l'injection), de culture de ces cellules en bioréacteur (i.e., d'expansion cellulaire) [139, 141, 142], ou encore l'association de ces cellules à un matériau de complément (i.e., matrice support), améliorent la régénération osseuse au sein du défaut osseux [139, 143].

L'utilisation d'un matériau support, de cellules souches et si nécessaire de substances actives marque la transition entre la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire (Figure I-12 page 25). Encore à l'état de preuve de concept [116], cette approche thérapeutique, tend à se développer pour répondre notamment à la problématique des défauts osseux de taille critique. Cette stratégie vise selon J.P. Vacanti à recréer un tissu osseux vivant tridimensionnel présentant des fonctionnalités structurelles et mécaniques au moins équivalentes au tissu à remplacer ou à combler [144]. Cette définition assez restrictive peut toutefois être « assouplie » en insistant surtout sur le fait que le but est d'élaborer des tissus vivants artificiels (produits manufacturés) permettant à terme de rétablir, maintenir ou améliorer

la fonction de tissus humains endommagés. Simple sur le papier cette stratégie se heurte tout d'abord à une problématique réglementaire liée au passage d'un dispositif médical simple (i.e., simple substrat de comblement de classe III) à un médicament [145]. Enfin, de façon opérationnelle aucun consensus n'existe actuellement quant au type d'implant (e.g., matériau, composition), de facteurs de croissance ou de type(s) cellulaire(s) à utiliser [146]. L'ingénierie tissulaire osseuse doit alors faire face à trois grands chantiers qui sont (i) le développement d'implants ayant une architecture et une composition spécifique à l'application visée, (ii) la compréhension et la maîtrise de l'influence des facteurs bioactifs sur le comportement cellulaire (e.g., nature, dose, vitesse de libération) et (iii) le développement de méthodes et de protocoles de culture cellulaire (cellules autologues ou allo- géniques) sur implants personnalisés en bioréacteur (e.g., survie, croissance, différenciation, stimulation via le flux).

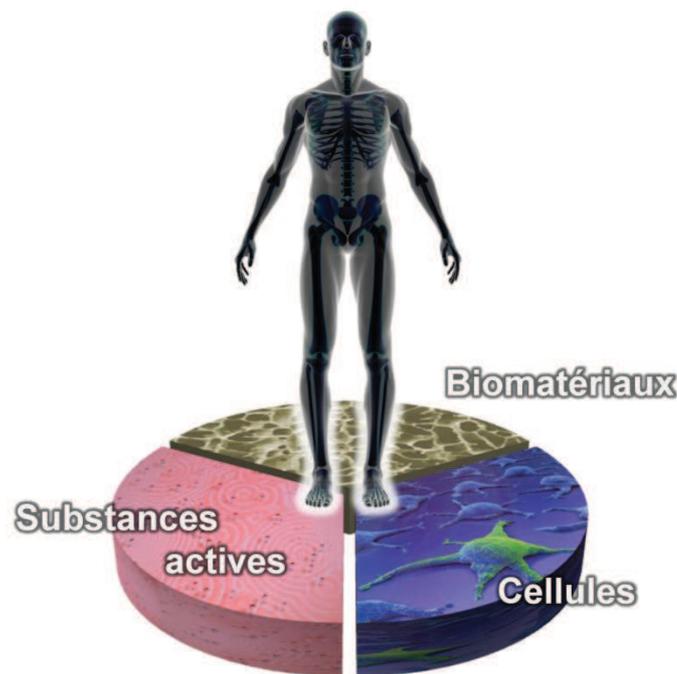


Figure I-12. Principe de l'ingénierie tissulaire osseuse

Bien que leurs finalités diffèrent, des problématiques communes existent entre le développement d'outils pour l'acquisition de nouvelles connaissances fondamentales sur l'os et l'amélioration des implants pour la régénération des grands défauts osseux. En effet, il apparaît évident que dans un cas comme dans l'autre les substrats macroporeux 3D ne sont plus adaptés actuellement aux questions scientifiques ou aux applications thérapeutiques visées [36, 147].

I.4. Stratégie de l'étude

Malgré une évolution significative des matériaux et des méthodes mis au service de la biologie de l'os, la communauté scientifique s'accorde qu'après plus de 40 années d'efforts, d'importants progrès restent encore à faire quant au développement de matrices adaptées aux problématiques osseuses [36, 147]. Le manque de connaissances fondamentales sur les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant le métabolisme osseux et le manque d'interaction entre les différentes disciplines scientifiques (e.g., biologiste, physico-chimiste, mécaniciens) et avec les praticiens, ne facilitent pas la mise en place d'une stratégie d'élaboration des matériaux à utiliser pour une application visée.

De nombreux matériaux sous de multiples formes sont employés de nos jours, chacun(e) ayant montré(e) d'intéressantes potentialités ainsi que leurs limites (cf. sections I.2.3.2 page 15 et I.3.2. page 19). Nous pensons toutefois comme certains auteurs [97, 147, 148], que les biocéramiques en CaP ont d'excellentes prédispositions pour ces applications osseuses. Tout particulièrement, l'hydroxyapatite jouit d'une importante modulabilité de ses propriétés biologiques via l'insertion d'ions d'intérêt biologique dans son réseau cristallin (e.g., Sr^{2+} , CO_3^{2-}) [6, 7, 98]. Certaines de ces substitutions (e.g., SiO_4^{4-}) permettent également la fonctionnalisation de sa surface (e.g., greffage) [149, 150]. Néanmoins, la synthèse d'hydroxyapatites (poly)-substituées pures et monophasiques, ainsi que leur caractérisation précise constituent un véritable challenge (e.g., HA silicatées [151-153]). De plus, les contraintes de fabrication qu'impliquent les méthodes traditionnelles d'élaboration des biocéramiques (e.g., géométries, standardisation, homogénéité architecturale) limitent leurs champs d'applications. L'avènement récent de méthodes couplant conception assistée par ordinateur (CAO) et techniques de fabrication additive (e.g., impression 3D) sont à même de remédier aux limites actuelles de mise en forme des biocéramiques et notamment celles en CaP comme présenté Figure I-13.

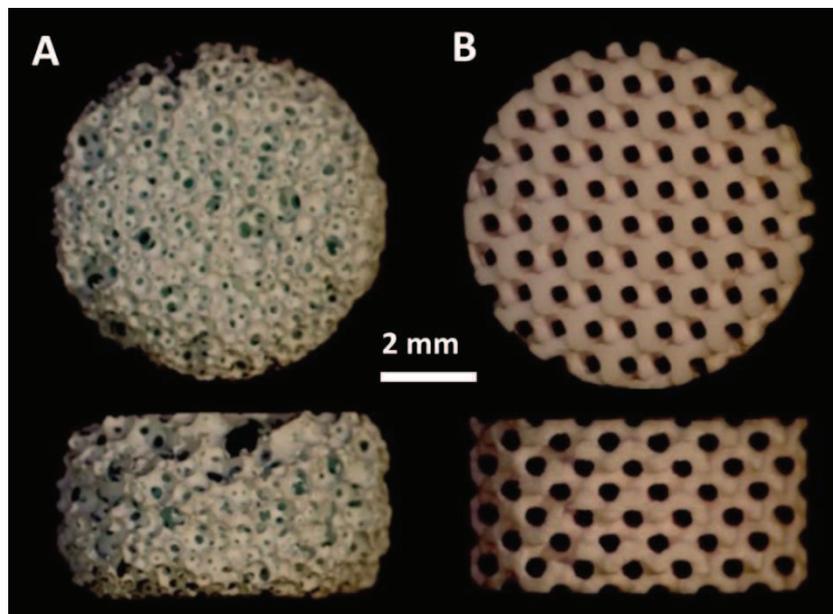


Figure I-13. Illustration du potentiel des techniques de fabrication additive pour la production de biocéramiques d'architectures complexes et contrôlées, avec A. une biocéramique industrielle produite par un procédé céramique traditionnel de bullage ("foaming" en anglais) et B. une biocéramique issue du procédé développé au cours de ces travaux de thèse ($\varnothing = (7,93 \pm 0,04)$ mm ; $N = 20$). Plusieurs exemples d'applications rendus possibles grâce au procédé développé sont détaillés dans le chapitre IV.

Ainsi, la démarche de ces travaux de thèse vise à la production de biocéramiques personnalisées en HA substituée dont l'architecture et la composition doivent pouvoir être adaptées à leur finalité. Autrement dit, tel que représenté Figure I-14 (page 27), nous souhaitons moduler la bioréactivité³ de la céramique via son architecture et sa chimie en fonction de la question scientifique ou application thérapeutique considérée. Dans cette optique une méthode versatile, fiable et reproductible de fabrication de biocéramique en HA d'architecture personnalisée est présentée au cours du chapitre II de cette thèse. Cette méthode comprend (i) la conception par ordinateur d'un modèle numérique de la céramique et de son négatif, qui constituera son moule après ajustement (ii) la production de ce moule

³ le terme « bioréactivité » comprend les diverses interactions chimiques, physiques, mécaniques et biologiques entre le substrat de culture et les cellules cultivées (*in vitro*) ou l'implant et les tissus receveurs (*in vivo*). De ce fait, il englobe les notions de biocompatibilité, bioconductivité, biorésorbabilité, et bioinductivité.

couche par couche via un procédé de fabrication additive suivie de (iii) son imprégnation par une suspension de poudre céramique (iv) pour finalement obtenir après une série de post-traitements (e.g., déliantage et frittage) la céramique considérée. Le chapitre III, quant à lui, traite d'un exemple de modulation de la bioréactivité des céramiques en HA via la substitution de carbonates au sein de son réseau cristallin. Le développement d'un outil d'analyse qualitative et quantitative du taux de carbonates substitués dans l'HA y sera également abordé. Finalement, le chapitre IV fait état d'une partie des projets collaboratifs rendus possible grâce aux outils développés, à savoir le développement de céramiques d'architecture et de composition contrôlées pour répondre à une problématique donnée.

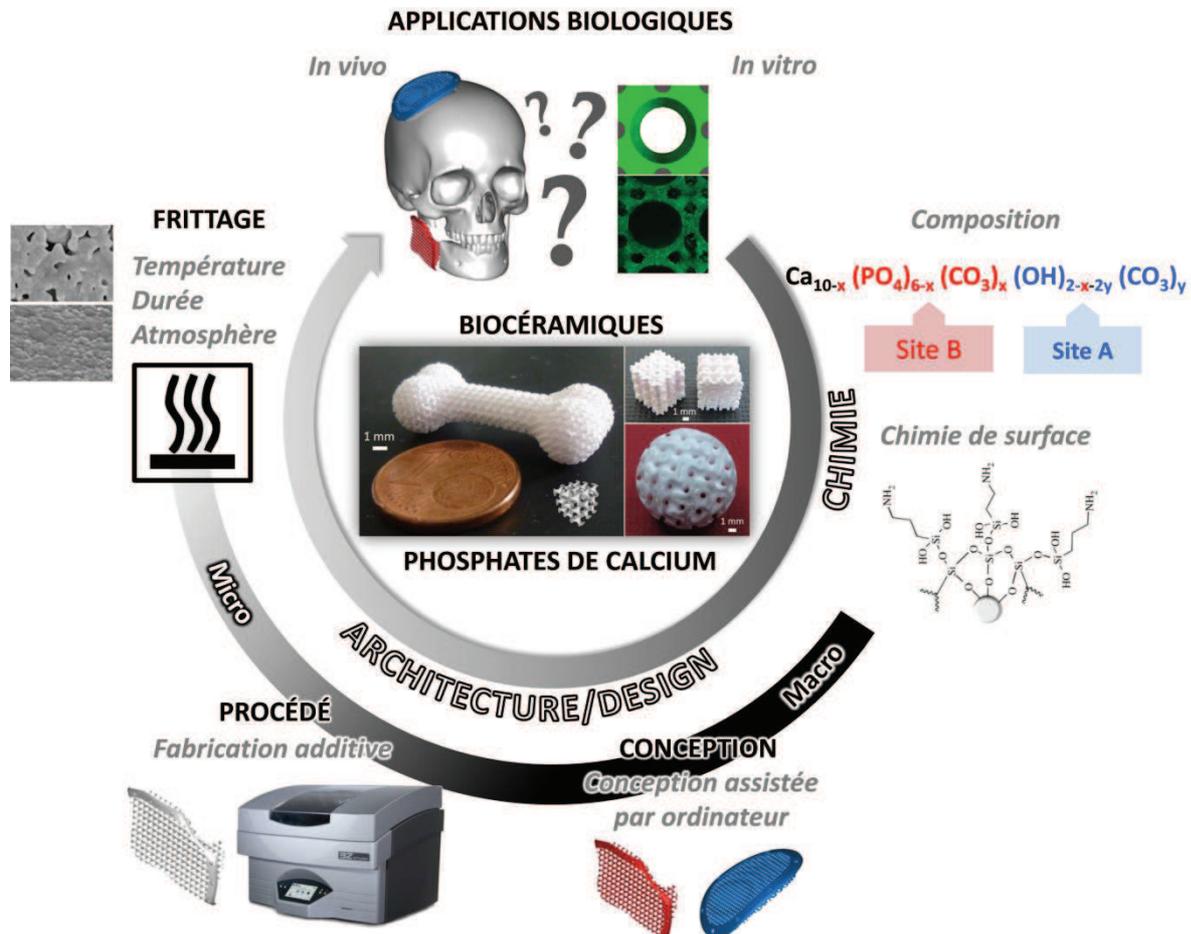


Figure I-14. Développement de céramiques phosphocalciques en réponse à une problématique osseuse donnée. L'établissement d'un cahier des charges fonctionnel de la céramique à obtenir, en fonction de la question scientifique, constitue la première étape du procédé de fabrication. Il en découle le choix de la composition (e.g., phase, chimie de surface) et de l'architecture de la biocéramique. Notons que ce choix peut être encore actuellement très approximatif et empirique du fait de manque de connaissances. Par la suite, un modèle virtuel de la céramique est conçu à l'aide d'outils informatiques (CAO) puis sa réplique physique est produite à l'aide de procédés de fabrication dit additifs. L'étape de conception influence sur la géométrie de la céramique obtenue à l'échelle macroscopique, le procédé de fabrication additif sur ses caractéristiques macro- et microscopiques et le(s) post-traitement(s) (e.g., frittage) sur sa microstructure.

Chapitre II. Développement de
biocéramiques poreuses
d'architecture contrôlée :
optimisation, limites et validation du
procédé

Les phosphates de calcium (CaP), tels que l'hydroxyapatite (HA), sont employés depuis de nombreuses années comme implants ou supports de culture. Malgré l'efficacité incontestable de ces biocéramiques synthétiques en CaP pour le comblement de défauts osseux, leurs usages restent limités à des pertes volumiques peu étendues du fait (i) d'une biodégradation non adaptée, (ii) de capacités limitées à induire la formation de nouveaux tissus osseux et vasculaire et (iii) d'une conception architecturale inadéquate aux problématiques des défauts osseux de taille critique. De même, le développement de systèmes de culture cellulaire osseuse *in vitro* 3D (e.g., modèles de tissus osseux) reste limité par les contraintes de fabrication qu'impliquent les méthodes traditionnelles d'obtention des céramiques : contraintes géométriques ou encore de standardisation et d'homogénéité architecturale. Dans ce cadre, l'avènement récent de méthodes combinant conception assistée par ordinateur (CAO) et technologies de fabrication additive ouvre de nouvelles perspectives. La Figure II-1 présente un exemple d'association de ces deux technologies, numériques et de fabrication couche par couche, dans le but de réaliser un implant personnalisé.

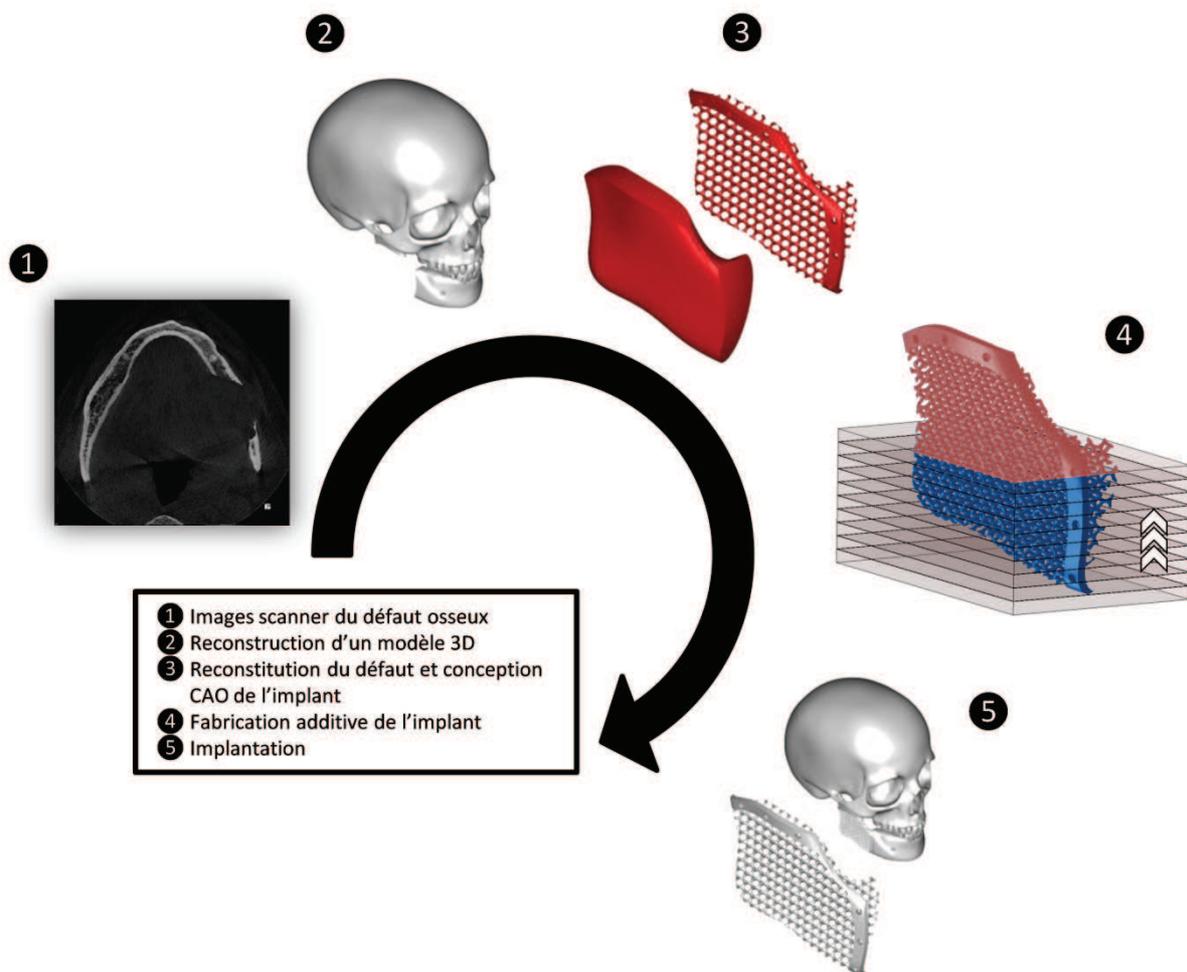


Figure II-1. Exemple de développement d'un implant maxillaire sur mesure, détaillant les étapes de conception assistée par ordinateur (CAO) de son modèle numérique géométrique et de production de sa réplique physique via une technologie de fabrication additive (i.e., fabrication en couche par couche).

La CAO consiste à définir un modèle numérique géométrique de la pièce considérée (e.g., implant, matrice poreuse). Ce modèle, encore appelé maquette numérique, peut (i) servir de support à la modélisation mathématique de phénomènes à l'aide d'outils de simulation numérique (e.g., contraintes mécaniques), ou (ii) être transféré vers une machine de fabrication additive qui va produire couche par couche sa réplique physique (Figure II-1 page 31).

La fabrication d'objets dotés d'une architecture personnalisée ne serait donc, en théorie, que limitée par la capacité du procédé de fabrication, i.e. les écarts entre le modèle numérique (vérifiant précisément le cahier des charges) et la géométrie de l'objet obtenu (Figure II-2)

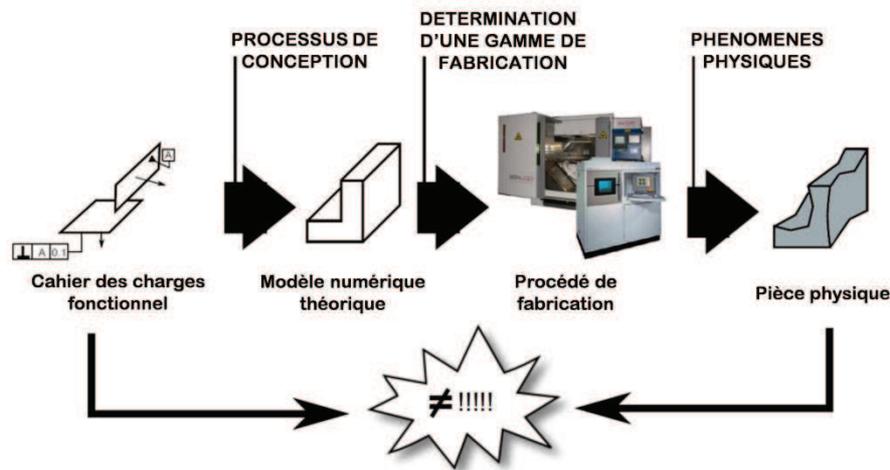


Figure II-2. Capacité d'un procédé de fabrication additive [154]. La capacité d'un procédé de fabrication additive représente sa capacité à produire un objet dont la géométrie est en adéquation avec celle décrite initialement dans le cahier des charges fonctionnel. En autres termes, la capacité quantifie les écarts géométriques entre le modèle numérique théorique respectant exactement le cahier des charges fonctionnel et sa réplique physique après production par fabrication additive : les différences géométriques proviennent du traitement des données numériques précédant la fabrication additive (e.g., tessellation et découpe du modèle numérique), des limites technologiques de la machine de fabrication additive (e.g., taille du spot laser) ainsi que des phénomènes physiques (e.g., retrait) mis en jeu lors de la production de la pièce.

En réalité, de multiples problématiques, abordées Figure II-3 (page 33) et développées dans les paragraphes suivants, freinent l'élaboration d'objets de géométrie personnalisée via fabrication additive, que ce soit au niveau du modèle numérique (e.g., capacité des logiciels CAO) ou des étapes du procédé de fabrication (e.g., capacité du procédé).

La conception de modèles numériques pour des applications médicales et plus particulièrement osseuses souffre d'un manque évident d'outils ; les principaux logiciels de CAO provenant à l'origine de l'industrie des transports (e.g., Dassault Systèmes, Autodesk). Ces derniers, relativement peu onéreux (e.g., Inventor et Solidworks respectivement gratuit et 150 € TTC pour les étudiants), n'autorisent que la conception de modèles simples basée sur des opérations booléennes ne permettant pas de répondre aux spécifications du domaine médical (e.g., utilisation d'images médicales). Cependant ces dernières années, le développement de logiciels de conception et de simulation numérique dédiés à des applications médicales a été amorcé ; citons par exemple les logiciels Mimics Innovation, Netfabb, Simpleware, ou encore Within Medical. En plus des fonctionnalités basiques de CAO, ces logiciels permettent la génération de structures poreuses aléatoires ou organisées (i.e., répétition d'une géométrie de base) appelées « structures lattices », dont certaines, telles que les surfaces minimales triplement périodiques (TPMS), pourraient se révéler d'intérêt pour les problématiques osseuses [155-161]. En outre, ce type de logiciel intègre souvent un module de traitement d'images, permettant la conception de structures sur mesure à partir de données issues de techniques d'imagerie (e.g., tomographie à rayons X, imagerie par résonance magnétique). Néanmoins, ces logiciels spécialisés sont tout d'abord très onéreux (e.g., respectivement 30.000 € ou 45.000 € HT pour une licence académique ou entreprise de Netfabb comprenant le module Selective Space Structures), très gourmands en ressources informatiques, mais également non-optimisés pour la conception de

structures poreuses complexes (e.g., alternance de parties denses-poreuses, gradient de porosité, transition entre deux "structures lattices" différentes). Ce domaine connaît cependant une évolution très rapide et une concurrence importante, ce qui laisse présager une amélioration prochaine des fonctionnalités et des possibilités proposées par ces logiciels, ainsi qu'une baisse substantielle de leur coût.

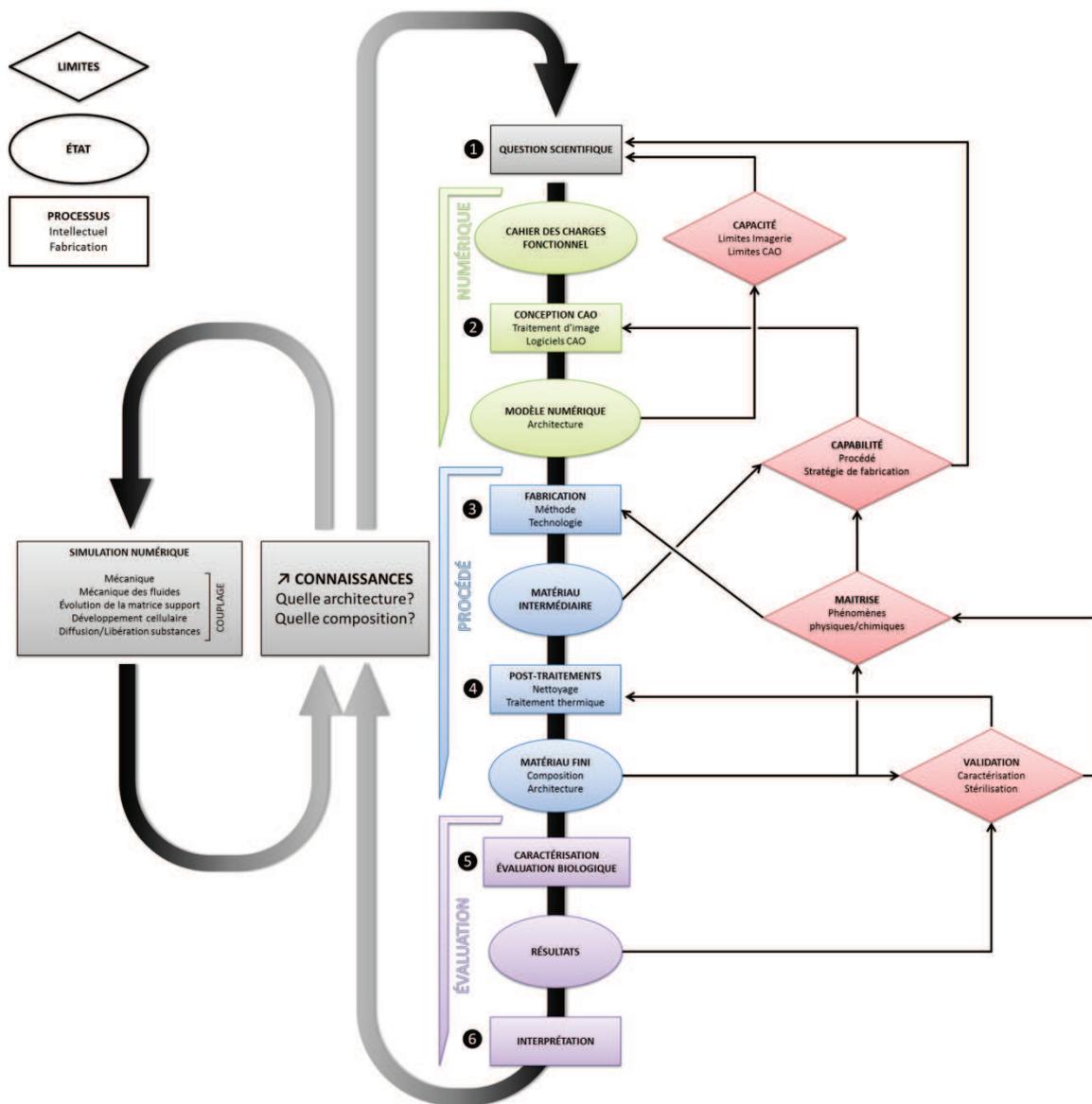


Figure II-3. Problématiques associées à la production de biocéramiques personnalisées en CaP via une méthode de fabrication additive. La première étape consiste à définir un modèle numérique **2** via des outils CAO pour répondre à une problématique donnée **1**. La capacité des outils CAO à générer les structures désirées est actuellement le facteur limitant, la qualité des éventuelles données source utilisée (e.g., imagerie médicale) pouvant également complexifier la tâche. Le modèle numérique défini peut également servir de support à des modèles de simulation numérique (ici sciemment mis à l'écart). La production de la réplique physique du modèle numérique conçu met en jeu une technologie de fabrication additive **3** suivie d'étapes de post-traitement (e.g., nettoyage, frittage) **4** respectivement limitées par la capacité de la machine de fabrication additive et la maîtrise des phénomènes physico-chimiques (e.g., dégradation de la phase). Enfin la caractérisation du matériau obtenu (physique, chimique, biologique) **5** et l'interprétation des résultats **6** sont vouées à générer de nouvelles connaissances, même en cas d'échec du fait, par exemple, de techniques de caractérisation inadaptées (e.g., marquage cellulaire non sélectif a posteriori).

D'autre part, la production par fabrication additive de céramiques est encore de nos jours difficile ; les procédés disponibles actuellement étant beaucoup plus fiables et avancés pour les polymères et les

métaux. Ce constat est lié avant tout au fait que les céramiques sont les matériaux les plus réfractaires qui existent; c'est-à-dire qu'ils restent solides jusqu'à des températures bien supérieures à 1400°C. De plus, leur fusion entraîne généralement leur décomposition, point excessivement critique pour des applications médicales. De ce fait, les technologies de fabrication additive basées sur la fusion laser (« SLM » : Selective Laser Melting) des grains de poudre, couramment utilisées pour les polymères ou métaux, sont difficilement adaptables aux composés céramiques. Toutefois, des pièces en alumine et en zircon ont pu être obtenues par SLM sans décomposition (e.g., Phenix System, France). D'autres procédés, tels que la stéréolithographie (SLA), permettent de s'affranchir de cette fusion de la poudre céramique en l'associant à une résine photosensible qui est polymérisée à l'aide d'un laser (généralement UV). Les sociétés Lithoz (Autriche) et 3D Ceram (France) mettent en œuvre ce principe pour élaborer des pièces céramiques en alumine, zircon, hydroxyapatite (HA) ou phosphate tricalcique β (β -TCP). Dans le cas de la SLA, la cohésion de la pièce est obtenue par un procédé traditionnel de frittage (i.e., soudage des grains sans fusion complète du matériau), précédé du déliantage des composés organiques. Une alternative supplémentaire consiste au frittage sélectif par laser (« SLS » : Selective Laser Sintering) de particules sphériques composées d'un mélange CaP/polymère [162]. Cependant, comme exposé au cours du chapitre I, les polymères ne sont pas des matériaux idéaux pour les applications osseuses considérées, et l'éventuelle dégradation de la phase polymérique du composite peut entraîner le relargage des particules de CaP dans l'organisme ; ces dernières n'étant pas cohésives/frittées entre elles.

Outre les difficultés liées aux problématiques thermiques de ces procédés, les machines de SLA et SLM adaptées aux matériaux céramiques sont excessivement onéreuses en terme d'équipement (e.g., \approx 500.000€ pour un appareil PM250 de chez Phenix Systems) mais aussi de matières premières (e.g., granulats, suspensions, pâtes) [163]. Elles sont également peu flexibles (i.e., transposition d'une phase céramique à une autre) du fait de la complexité de mise au point des pâtes pour la SLA ou de contrôle de l'interaction laser-matière pour la SLM. Des difficultés supplémentaires sont rencontrées dans le cas du procédé SLA du fait :

- de l'utilisation de composés organiques toxiques pouvant également interagir chimiquement avec la phase céramique
- de la très forte viscosité des pâtes céramiques qui limite l'architecture des pièces élaborées du fait de la nécessité d'éliminer la pâte non polymérisée
- ou encore du recyclage complexe, voire impossible, de la pâte non polymérisée.

Au final, malgré les restrictions listées ci-dessus, les technologies de fabrication SLM (e.g., Osseomatrix) et SLA (e.g., 3D Ceram) sont de nos jours utilisées pour l'élaboration de biocéramiques en CaP (voir exemples Figures II-4 et II-5). Elles présentent actuellement les meilleures performances en termes de design et de contrôle de l'architecture. La résolution reste toutefois perfectible pour la plupart des techniques SLM ou SLA puisque la résolution finale est toujours bien supérieure à $\pm 50 \mu\text{m}$ (Figures II-4 et II-5), exception faite du procédé développé par Lithoz bien qu'aucune donnée chiffrée ne soit à notre connaissance disponible. D'autres techniques, comme l'impression 3D ou le robocasting ont permis la production directe de biocéramiques en HA et β -TCP, mais la résolution des pièces obtenues est relativement mauvaise et les architectures concevables sont bien plus limitées que pour la SLM ou SLA

(voir section suivante « Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations »).

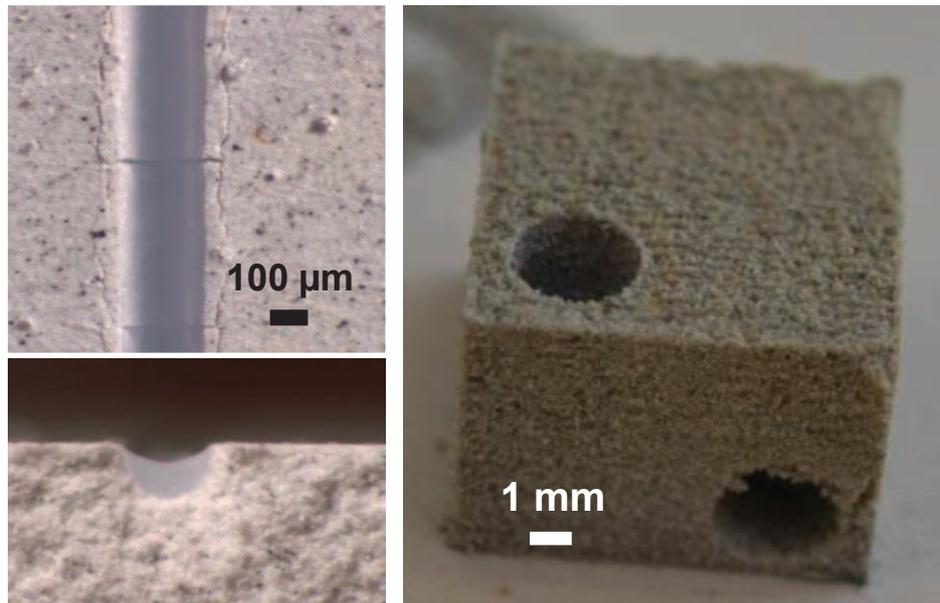


Figure II-4. Exemple de biocéramique en CaP obtenue par SLM (Projet ANR OrthoFlase), avec sur l'image de gauche un cordon de matière après passage du laser et sur l'image de droite une forme 3D après fusion laser.

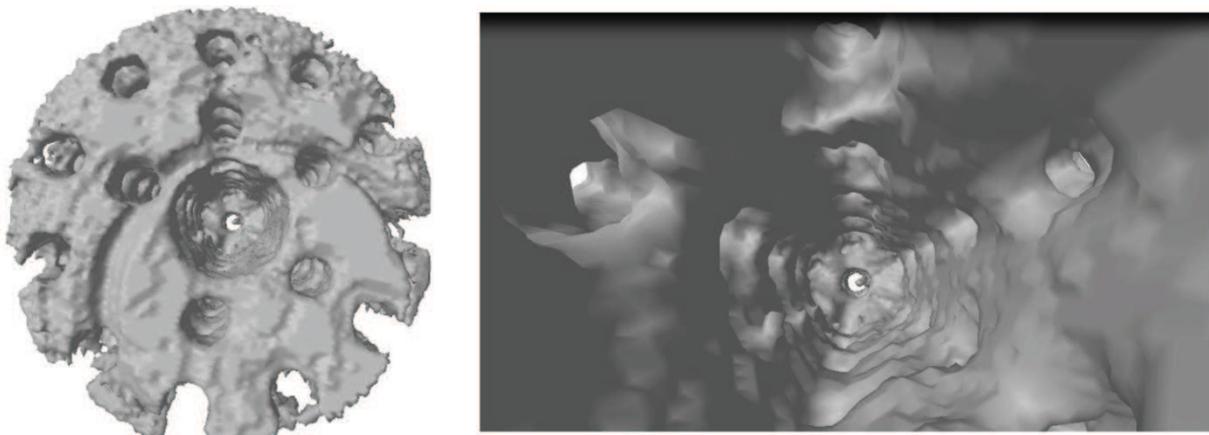


Figure II-5. Exemple de biocéramique en CaP obtenue par SLA

Ainsi, nous avons voulu développer un procédé d'élaboration de céramiques basé sur l'imprégnation d'un moule polymérique produit par fabrication additive. Cette stratégie résulte des constats suivants : les technologies SLM, SLS et SLA appliquées aux céramiques sont peu flexibles et hors de prix pour un laboratoire académique, à l'inverse les technologies de fabrication additive pour les matériaux plastiques sont aujourd'hui fiables, d'une haute résolution et relativement bon marché.

Le procédé développé, basé sur des étapes traditionnellement utilisées pour la fabrication des céramiques (imprégnation / séchage / déliantage / frittage), a nécessité (i) de choisir la technologie de fabrication du moule, (ii) de trouver une composition de moule adaptée aux étapes de traitements thermiques (e.g., déliantage) et aux applications biologiques envisagées (e.g., absence de résidus toxiques), (iii) de s'approprier les méthodes numériques nécessaires à la fabrication des moules

(négatifs des structures finales) et (iv) d'optimiser les suspensions afin d'imprégner convenablement ces derniers.

La capabilité globale du procédé développé ainsi que ses limites ont été évaluées (section « Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations»). De manière concomitante, l'optimisation des propriétés et de la formulation de suspensions d'HA a été réalisée (section « Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization »).

Au cours de ces deux études, des céramiques en HA d'architecture complexe ont été fabriquées avec succès, sans déformation anisotrope des structures (retraits uniformes) ni modification de phase ou résidu toxique. Les suspensions préparées, malgré des taux élevés de matière sèche pour un procédé d'imprégnation (jusqu'à 80 % en masse), sont restées fluides ($< 80 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ à 200 s^{-1}) et ont permis une excellente imprégnation des moules. La maîtrise de leur vitesse de séchage a été identifiée comme un paramètre déterminant de la qualité des biocéramiques obtenues (e.g., absence de défauts, tenue mécanique). De légères déviations entre le modèle CAO et la géométrie des biocéramiques produites ont été observées. Ces différences résultent des limitations technologiques de l'imprimante 3D ainsi que de la stratégie d'impression des moules (résolution, orientation). Leur nature dépend également fortement de la géométrie de la pièce à imprimer (e.g., forme angulaire ou non, taille).

Bien qu'à prendre en considération, les limites du procédé développé sont cependant minimes face aux perspectives et opportunités qu'il offre : production maîtrisée et reproductible de biocéramiques en CaP d'architecture standardisée (e.g., définition finale de $40 \mu\text{m}$, topographie de surface de 5 à $20 \mu\text{m}$), architecture conçue spécifiquement pour une application visée, préservation des phases et de la biocompatibilité, adaptation aisée à de nouvelles phases céramiques et enfin un coût machine/entretien/production peu élevé. A titre d'illustration, des exemples d'applications en biologie de l'os, rendues possibles grâce à ce procédé, sont détaillés dans le chapitre IV de cette thèse.

II-1. Article 1 : Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold: Ceramic Architectural Control and Process Limitations

By Baptiste Charbonnier, Coralie Laurent, Gilles Blanc, Olivier Valfort and David Marchat*

Current architectural and production limitations prevent the manufacturing standardization and design of bioceramics. Such limitations have hindered advances in bone tissue engineering and regeneration. In this context, we propose a bioceramic manufacturing process based on the impregnation of wax molds produced by additive manufacturing. Hydroxyapatite bioceramics with custom architectures were fabricated to evaluate the reliability, robustness, and limitations of this process. Results indicate that this process preserves phase biocompatibility, permits homogeneous shrinkage of the biomaterial during heat treatment, and allows reproducible and precise manufacturing of custom architectures.

1. Introduction

Calcium phosphate (CaP) bioceramics have been used for years for therapeutic purposes^[1] and for fundamental research.^[2] The first type of applications is the development of bone substitutes for regenerative medicine (e.g., repair of small bone defects). The success of such a therapy is determined by the implant's ability to interact positively with the host tissue (e.g., cell invasion, degradation, and replacement). The second type of applications, i.e., fundamental research, focuses on understanding the fundamental aspects of bone biology and the assessment of drugs by developing in vitro models. This involves the development of scaffolds for the in vitro culture of cells in controlled three-dimensional (3D) environments.^[3]

For both therapeutic and 3D-scaffold-based culture strategies, the scaffold architecture may directly (e.g., nutrient transport, cell colonization) or indirectly (e.g., shear stress, local stimuli) influence the cell fate through its macroscopic

(>100 μm) and microscopic (<20 μm) features. Numerous studies have investigated the influence of micro- and macro-architecture, both of which are of great importance (see for review).^[3] However, an important disparity regarding the influence of the architecture on cell response and fate is present in the current literature as summarized in Bouet et al.^[3] Such discrepancies are most likely due to the random internal pore architecture of the scaffolds, which is related to the limitations of current scaffold production methods.

Until recently, CaP bioceramics have been primarily produced using traditional ceramic processing techniques. Depending on the intended applications, several approaches may be considered, including the use of CaP dry powders (e.g., pressing),^[4] bulk materials (e.g., hydrothermal exchange, machining),^[5] or suspensions. Suspension-based methods, such as porogen or salt leaching,^[6] mold impregnation,^[7] foaming,^[8] or freeze drying,^[9] are traditional and versatile processes for manufacturing of macroporous CaP scaffolds.^[10] These conventional methods are relevant and allow the production of tuned scaffolds; however, they still suffer from architectural limitations (e.g., global/local shape), internal inhomogeneity (e.g., pore and interconnection size), and sample-to-sample variations (e.g., random pore distribution). This lack of architectural standardization prevents the rigorous design of biological experiments and limits their reproducibility.^[3]

New engineering developments that combine computational methods and additive manufacturing (AM) technologies are able to overcome such limitations by providing both a higher level of control over the design of the manufactured scaffolds and the opportunity to create reproducible, optimized custom

[*] Dr. D. Marchat, B. Charbonnier, C. Laurent, G. Blanc, O. Valfort

Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, CIS-EMSE, INSERM U1059, SAINBIOSE, F-42023 Saint-Etienne, France
E-mail: marchat@emse.fr

[**] We thank Mr Georges Taillandier for his advices about the additive manufacturing machines and the "Region Rhône-Alpes" for the financial support provided for this work. (Supporting Information is available online from Wiley Online Library or from the author).

architectures. AM technologies for bioceramics are far less advanced than for polymers and metals,^[11] but prototypes or small batches of Al_2O_3/ZrO_2 have been produced using stereolithography (SLA, e.g., Lithoz, Austria; Prodways, France), selective laser melting (SLM, e.g., Phenix systems, France) or 3D-printing (3DP, e.g., Center for Fine Print Research, UK) technologies. Technological development of AM methods for the production of CaP scaffolds is still in its early stages because of the challenging specifications of biological applications associated with the specific physicochemical^[12] and thermal properties^[13] of CaP. Thus, the AM process for the production of such CaP scaffolds should preserve CaP biocompatibility (no toxic residue), should not induce phase modifications, and should allow reproducible and precise manufacturing of a wide array of custom architectures (e.g., pore sizes from approximately 150 μm to 1 mm). Additional criteria, such as the AM machine costs and the flexibility and ease of implementation of the process must also be considered.

CaP scaffolds produced via "direct-write assembly,"^[14] including robocasting^[15] or 3DP,^[16] have been recently reported in the comprehensive reviews of Kumar et al.^[17] The conclusion is that their applications are restricted due to the lack of architectural control at both the global and the local scales and the architectural limitations inherent in these processes (e.g., arrangement of tubes more or less well-defined for "3D plotting,"^[17b] accuracy of deposition and post-printing cleaning of the structures for 3DP). Craniofacial bone substitutes were successfully produced by SLA (3DCeram, France).^[18] Nonetheless, apart from the high costs of such a technology, the SLA process involves the use of toxic monomers,^[19] which may affect sensitive CaP phases, and lacks flexibility; especially because of the difficulty in adapting the compositions of the highly concentrated ceramic suspensions^[20] to various CaP phases. Finally, post-processing or post-fabrication issues, such as the removal of non-polymerized slurry or, in some case, support structures, restrict the ceramic design possibilities.^[17b,21]^[22] Selective laser sintering (SLS)^[22] and SLM^[23] methods require further developments for the production of CaP scaffolds, primarily due to the low macro- and micro-architectural control and to phase degradation during the shaping process that is not compatible with the intended biological applications. Moreover, because these technologies use a laser beam or electron beam as the power source, they are expensive, and their use in research laboratories is limited.

Considering the specifications and current limitations (listed above) for the production of CaP bioceramics, we utilize an "indirect 3D printing" as defined in Do et al.,^[24] and more precisely a manufacturing process based on the impregnation of wax molds produced via an AM technology. This process already described in recent studies,^[25] was optimized here in order to fabricate pure CaP porous bioceramics with a high level of control over the architecture. More precisely, in this paper, we focus on the determination of the robustness, architectural capabilities, and limitations of such a process to produce HA bioceramic. Wax molds were

produced using a 3D Drop on Demand (DoD)-based 3D printer, followed by a traditional ceramic process of replication. The optimization of the ceramic processing is described elsewhere.^[26] The influence of the wax mold printing strategy (e.g., orientation, resolution) on the micro- and macro-architectural features of the bioceramics was studied. Finally, the architectural reproducibility (e.g., shape conservation, sample-to-sample homogeneity) was assessed at the scaffold scale using triply periodic spherical structures with 8 mm diameters.

2. Materials and Methods

2.1. Ceramic Manufacturing Process – Overview

The manufacturing process consists of three main stages. The first stage is the computer-aided design (CAD) conception of the intended ceramic and its respective wax mold (Figure 1A–C). The latter is designed as the negative of the bioceramic (i.e., the structure and internal voids of the scaffold, respectively). For compatibility purposes with the AM machine, CAD files are exported in the stereolithography file format (.stl), which is an approximation of the original model using planar triangles via tessellation. The material deposition (print head path) is determined using a virtual orientation of the mold .stl file that is sliced into a stack of two-dimensional (2D) layers based on a given layer thickness. Finally, the sliced file is sent to the AM machine for the production stage.

The second stage is the production of the mold via additive manufacturing. A 3ZStudio 3D printer (SolidScape, Multistation, Paris) was selected because of its relatively low cost, high and adjustable resolution (from 6 to 25 μm) and

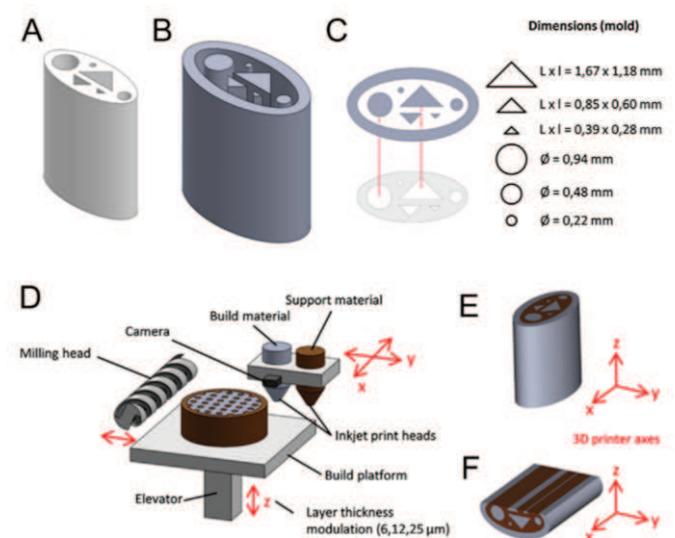


Fig. 1. (A) Ceramic and (B) mold 3D images derived from CAD software, and (C) their respective cross-sections (Bioceramic channels are the negative of the mold columns, and triangles were designed with angles $\theta_1 = 45^\circ$ and $\theta_2 = 90^\circ$). Schematic representation of (D) the 3D printing technology with an adjustable layer thickness along the z-axis of the printer (6, 12, 19, 25 μm), and the printing orientation of molds with round and triangular columns (E) along the z-axis and (F) perpendicular to the z-axis.

compatibility of wax molds with the ceramic processing (i.e., low shrinkage, adapted thermal properties, and no residue after debinding).^[26] Molds were built layer by layer by depositing “build” and “support” molten wax droplets through outlet nozzles that harden immediately onto the piece under construction. The layer thickness is corrected using a milling head (Figure 1D). After the printing is completed, the part is placed in a 52 °C bath of petroleum distillate (Onyx Ardéa, France) until the part is clean and all support material has been removed. Both the layer thickness and the mold printing orientation, shown in Figure 1D–F, affect the mold features and, consequently, the resulting bioceramic. The effect of these parameters will be studied hereafter.

The ceramic processing, presented in Section 2.2 and described in detail in Charbonnier et al.,^[26] represents the final stage of the bioceramic production. Molds are impregnated with an aqueous suspension of CaP powder. After drying, the organic substances (e.g., wax mold, dispersing agent) are removed from the green material (debinding), which is then sintered to obtain the bioceramic.

The bioceramic manufacturing process, from mold manufacturing to ceramic sintering, induces large (i.e., at the scaffold scale) or localized morphological deformations, which may be detrimental to the bioceramic in terms of mechanical handling and/or compliance with specifications. Therefore, the estimation of the morphological deviations of the produced bioceramics from their respective CAD models is required to validate this manufacturing process (see Sections 2.3 and 2.4).

2.2. Ceramic Processing

2.2.1. Powder Synthesis

HA powder was prepared via an aqueous precipitation method using a fully automated apparatus. A diammonium hydrogen phosphate ((NH₄)₂HPO₄, 99%, Merck, Germany) solution was added drop-wise to a calcium nitrate solution (Ca(NO₃)₂·4H₂O, 99%, Merck, Germany) using peristaltic pumps. The reaction was performed under continuous stirring under reflux at a regulated temperature of 45 °C (external T-probe). An argon flow (Air Products, 0.1 L min⁻¹) in the reactor prevented any uncontrolled carbonation of precipitates. The pH of the suspension was automatically adjusted and maintained at 9.0 with a 28% ammonia solution (Merck, Germany) by mean of a pH stat (GALa 0420 TTT, Prominent, Strasbourg, France). After the introduction of all of the reagents, the suspension was aged for 17 h and then filtered. The precipitate was pre-calcined at 400 °C for 2 h (Carbolite, UK) before it was crushed to a size of 1–10 μm (Hosokawa Alpine, AFG100, Germany). The HA powder was then heat-treated at 1 020 °C for 2 h (LH40/13, Nabertherm, Germany) to obtain a surface area of 4.0 ± 0.1 m² g⁻¹ (N = 3). This value was determined on powders outgassed at 150 °C for 8 h by means of the Brunauer–Emmett–Teller (BET) 5 points method using the N₂ adsorption isotherm (Micromeritics ASAP 2010, Germany).

2.2.2. Bioceramic Scaffold Preparation

Templates were impregnated with a HA slurry prepared by blending 73.6% (w/w) powder, 26.2% (w/w) pure water, and 0.2% (w/w) dispersing agent (Darvan C-N,R. T. Vanderbilt Company Inc., USA) for 15 min at 200 rpm in a zirconia jar with 10 and 5 mm diameter zirconia balls (PM400, Retsch, Germany). An organic binder (Duramax B-1000, Rohmand Haas, France) was then added at a concentration of 3.7% (w/w of slurry). The slurry was then mixed for 15 min using a propeller stirrer. After drying overnight at room temperature, the green bodies were cleaned of all excess dried slurry using a surgical blade (Swann-Morton, UK). The green bodies were then heat-treated in a debinding furnace (Carbolite, UK) at a temperature of 500 °C to eliminate the polymer mold and the organic adjuvants. The consolidation of the ceramic was achieved by sintering at 1 200 °C for 2 h in air with a heating rate of 4 °C min⁻¹ (LH40/13, Nabertherm, Germany).

2.3. Influence of Mold Printing Parameters on Ceramic Architectural Features

A bioceramic CAD model with channels oriented along a single direction (Figure 1A) was designed to assess the influence of the mold printing parameters on the architectural features of the bioceramic. Circular and right-angled triangular ($\theta_1 = 90^\circ$, $\theta_2 = 45^\circ$) channels were defined with three different sizes according to macropore sizes reported in the literature^[3]: small ($\approx 200 \mu\text{m}$), medium ($\approx 400 \mu\text{m}$), and large ($\approx 800 \mu\text{m}$). The dimensions of the round and triangular columns of the molds printed with resolutions of 6, 12, and 25 μm along the z-axis (Figure 1E) or perpendicular to the printer x-axis (Figure 1F) are presented in Figure 1. Bioceramics were obtained according to the process described in Section 2.2.

Morphometric analyzes of the produced bioceramics were carried out at various scales. Each bioceramic was first imaged using a Nanotom S X-ray computed tomography system (Phoenix, USA) with a voltage of 80 kV (tungsten target), an integration time of 750 ms and a 3.5 μm voxel resolution. For reconstruction of the volume data, a proprietary implementation based on the Feldkamps cone beam-reconstruction algorithm was used. VG Studio software (Volume Graphics, Heidelberg, Germany) was used for the 3D visualization of the volume data and the dataset export in .DICOM format for image analysis. The geometrical features of the bioceramic pores were analyzed in 2D on three cross-sections perpendicular to the channels at the inlet, middle and outlet of the bioceramic using ImageJ freeware (National Institutes of Health, USA). A schematic representation for right-angled triangular channel is given in Figure 2. From these results, three morphological factors, aspect ratio (A.R.), form factor (F.F.), and roundness (R.) were calculated from the following Equations and in accordance with ISO norm 9276–6:

$$\text{A.R.} = \frac{B}{L} \quad (1)$$

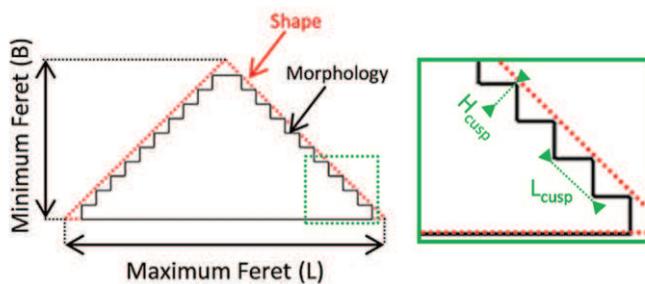


Fig. 2. Schematic representation of the "shape" and "morphology" of an object, and the main dimensional variables considered for the geometric analysis at the pore scale.

$$F.F. = \sqrt{\frac{4 \times \pi \times A}{P^2}} \quad (2)$$

$$R. = \sqrt{\frac{4 \times A}{\pi \times L^2}} \quad (3)$$

with L and B the maximum and minimum Feret diameters (see Figure 2), respectively, and A and P the area and the perimeter of the channel, respectively.

The theoretical values of the morphological factors A.R., F.F., and $R.$ are equal to 1 for a circle, and 0.50, 0.73, and 0.56 for isosceles right triangle, respectively.

Scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-6500F, USA) was used to image the internal geometry, micro-architecture, and microstructure of the channels. Particular attention was given to the determination of the cusp depth (H_{cusp}) and spacing (L_{cusp}) inherent to the AM process (Figure 2). Prior to observation, the bioceramics were mounted in a thermoset epoxy resin (EpoThin, Buehler, USA), with both of their faces covered to prevent the resin from entering the channels. After mounting, samples were polished either parallel or perpendicular to the channels, using an automated polishing system (Prepamatic, Struers, Denmark). Polished samples were coated with approximately 20 nm of gold (Q150 R ES, Quorum Technologies) prior to imaging.

2.4. Architectural Control and Reliability at the Scaffold Scale – Process Validation

The targeted applications for the bioceramic scaffolds require reproducible production of complex 3D CaP scaffolds with a custom, controlled architecture. Consequently, the validation of our process requires an analysis of the architectural reliability at the scaffold scale. Spherical ceramics (8 mm diameter) with a triply periodic internal architecture (gyroid), were designed using the ScanIP software suite (Simpleware, UK) and then manufactured to evaluate i) the reproducibility of the process; ii) the conservation of the shapes at both the global and local scales; and iii) the homogeneity of the internal architecture and microstructure (Images of the CAD model are provided in supplementary Figure S1). This triply periodic porous network is comprised of 540 μm diameter cavities with 330 μm diameter interconnections and 310 μm thick ceramic

walls. An 850 μm gyroid unit cell was repeated over the entire sphere volume, resulting in a total porosity of 70%. A cylinder ($\phi = 850 \mu\text{m}$, $h = 850 \mu\text{m}$) and a cube ($L = 850 \mu\text{m}$) were inserted into the structure as visual markers for further geometric data analysis (see supplementary Figure S1). Molds were printed at a resolution of 6 μm and the HA bioceramics were produced in triplicate according to the process described in Section 2.2.

Morphometric analysis was performed using X-ray tomography (see Section 2.3). ScanIP suite was used for image data processing. The conservation of the spherical shape of the bioceramics was first analyzed. To assess the shape conservation of the internal architecture over the entire sphere volume, cross-sections of the xy -, xz -, and yz -planes were compared to the CAD file to evaluate any deviations. The CAD model and the bioceramic 3D images were superimposed using the square and cylindrical markers and a uniform global shrinkage of 14%.

3. Results

3.1. Influence of the Mold Printing Parameters on the Scaffold Architectural Features

Figure 3 shows X-ray micro-tomography 3D images of the bioceramics and their respective cross-sections obtained from molds printed with columns along (Figure 3A) or perpendicular (Figure 3B) to the z -axis of the printer (Figure 1). The printing orientation of the mold is visible on the ceramics printed at resolutions of 25 μm (images not included) and 12 μm (Figure 3), but is much less apparent for a printing resolution of 6 μm (images not included). A more detailed examination of these observations is presented in Section 3.1.

At the macroscale, the bioceramics exhibit all six channels regardless of the manufacturing parameters. Despite cropping of the 90° angles, triangular shaped channels are sharper

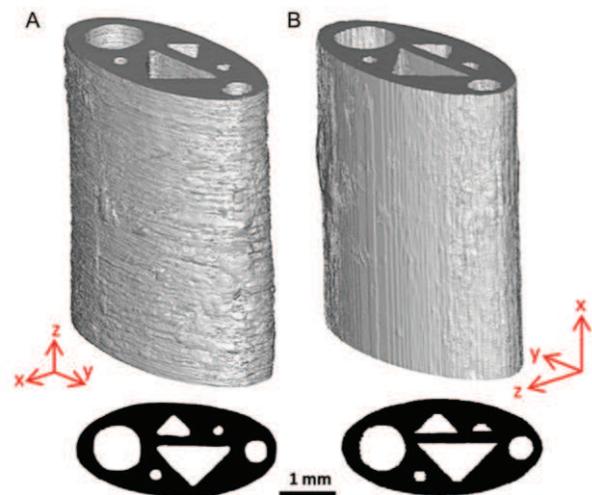


Fig. 3. 3D X-ray micro-tomography images of bioceramics manufactured from molds printed with a 12 μm resolution; the x -, y -, z -axes represent the 3D printer axis. Bioceramic from mold printed with columns (A) along the z -axis and (B) perpendicular to the z -axis of the printer.

and better-defined in bioceramics with channels perpendicular to the z-axis of the printer (Figure 3B), than in bioceramics with channels parallel to the z-axis of the printer (Figure 3A). In the latter, the vertices of the triangular shapes are rounded, so much so that the smallest triangle appears circular, regardless of the mold printing resolution. Circular shapes are generally well defined; however, a clear deformation is observed on the smallest circle in Figure 3B which appears as a square.

These general observations are complemented by the analysis of the geometric characteristics and morphological factors displayed in Figure 4 and 5, respectively.

In bioceramics produced from molds with columns aligned along the z-axis of the printer (Figure 3A and 4A), the diameter of the circular channels (Figure 4A1) changes slightly from sample to sample, with a maximum deviation of $15\ \mu\text{m}$, but evolves with the resolution. For instance, the diameter of the smallest channel decreases from 232 to $192\ \mu\text{m}$

as the resolution increases from 25 to $6\ \mu\text{m}$. In contrast, when the mold is printed with columns perpendicular to the z-axis of the printer (Figure 3B and 4B), there is no significant variation in the bioceramics channel diameter regardless of the resolution. Thus, the diameters of small, medium, and large circular channels are centered at 195, 425, and $820\ \mu\text{m}$ with a maximum standard deviation of $10\ \mu\text{m}$. Conservation of angles in the triangular channels compared to the CAD model is highly dependent on the triangle size as well as the printing orientation of the molds. For bioceramics produced from molds with columns along the z-axis of the printer (Figure 4A2–A3), no angle was measured on the smallest triangle due to its circular shape, but the medium and large triangles exhibit relatively good angular conservation (e.g., 43.6° , 45.0° , and 45.0° for large triangles with a 25, 12, and $6\ \mu\text{m}$ resolution). The standard deviation decreases with increased triangle size: non-measurable, ± 1.1 , $\pm 0.5^\circ$ for 45° angles of small, medium, and large triangles, respectively. Moreover, the angle variation, with regard to the theoretical values (45° or 90°), narrows slightly with an increase in the printing resolution (e.g., $\pm 1.15^\circ > \pm 1.1^\circ > \pm 1.05^\circ$ for 25, 12 and $6\ \mu\text{m}$ resolution, respectively, for medium triangle 45° angles). These observations remain mostly valid for the bioceramics produced from molds with columns perpendicular to the z-axis of the printer, with two differences (Figure 4B2–B3). First, there is better conservation of the angles in the smallest triangle. Although the angles are $82 \pm 1.3^\circ$ and $48.5 \pm 0.9^\circ$ instead of 90° and 45° angles, respectively, we were able to measure these angles unlike in the bioceramics produced from molds with columns along the z-axis of the printer. Second, there is better angular control because the standard deviation and angular variation are lower for both the medium and the large triangles (i.e., $47.3 \pm 0.6^\circ$, $45.4 \pm 0.6^\circ$ and $45.5 \pm 0.5^\circ$ for resolutions of 25, 12, and $6\ \mu\text{m}$, respectively, for the 45° angles in the medium triangle).

Aspect ratios, roundness, and form factors for the triangular and circular channels are displayed in Figure 5 for each set of manufacturing parameters.

For bioceramics manufactured from molds with columns both along and perpendicular to the z-axis of the printer, the aspect ratio is close to its theoretical value for the medium and large channels regardless of the shape (triangular or circular). A deviation from the theoretical value is observed for the small circular and triangular channels. This deviation slightly decreases with increased printing resolution. Channel roundness follows a similar trend with the exception of the triangular channels of the bioceramics produced from molds printed with columns perpendicular to the z-axis of the printer, which have roundness values that match the theoretical values regardless of channel size. Finally, the form factor matches or is close to its theoretical value regardless of the shape of the channels and the printing orientation of the mold. An exception to this trend can be observed for the circular channels of the bioceramics produced from molds with columns perpendicular to the z-axis of the printer.

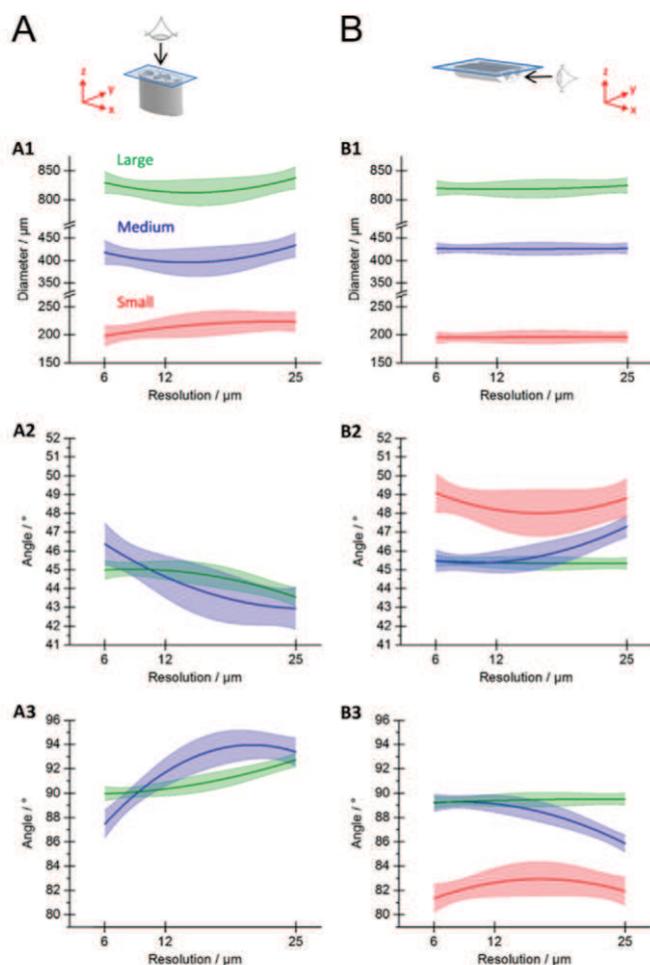


Fig. 4. Influence of the mold printing strategy on the architectural features of the bioceramic manufactured from molds printed with columns (A) along and (B) perpendicular to the z-axis. The x-, y-, and z-axes represent the 3D printer axes. A1–A3 and B1–B3 show the measured circles diameters and triangles 45° and 90° angles, respectively. Small, medium, and large channels are displayed in red, blue, and green, respectively. Colored bands outline the 99% confidence interval calculated from measurements ($N=9$) with 2nd degree polynomial fitted curves (OriginPro, OriginLab, USA).

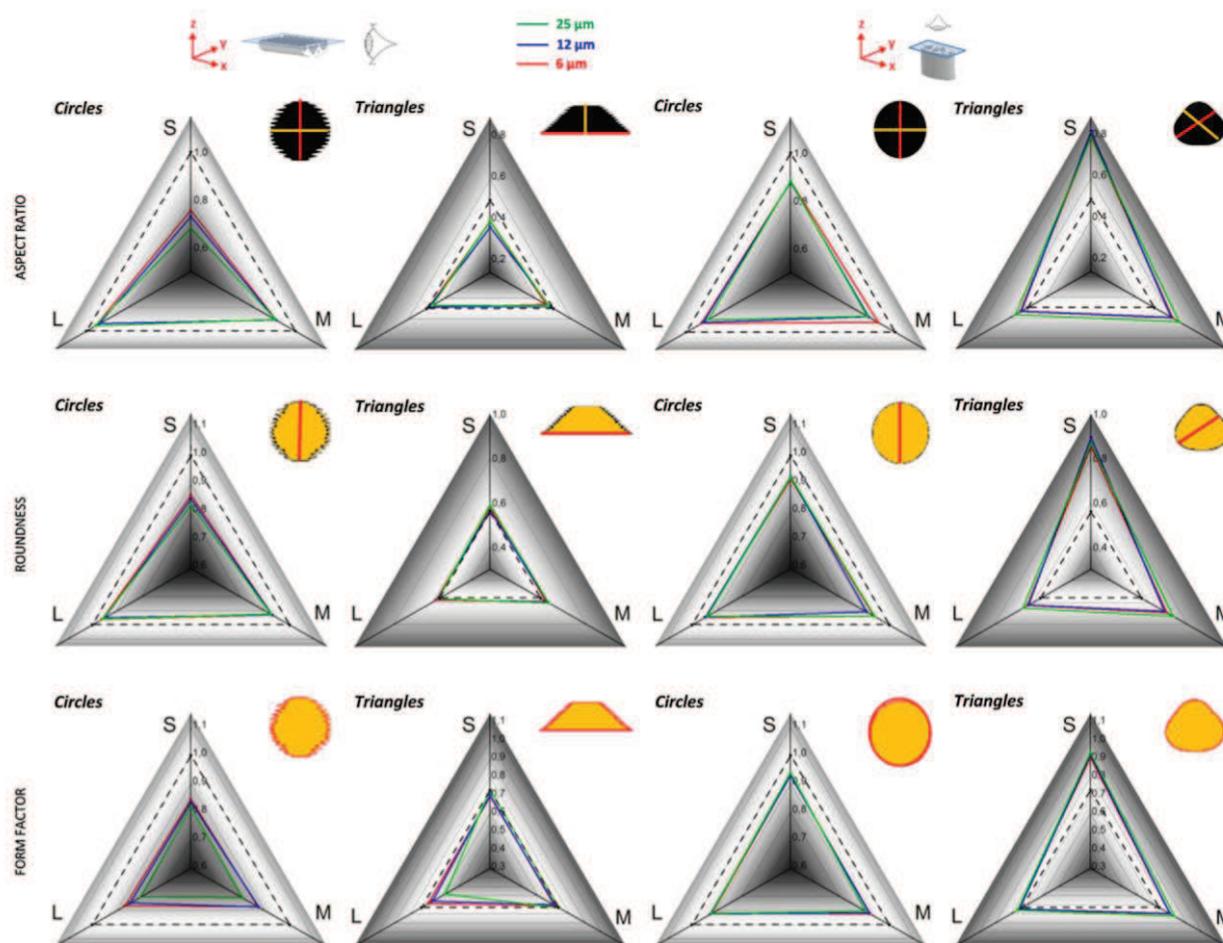


Fig. 5. Influence of mold printing parameters on shape factors. The S, M, and L symbols refer to the small, medium, and large channels, respectively. Green, red, and blue curves refer to the 25, 12, and 6 μm resolution used to produce the molds, respectively. The x-, y-, and z-axes represent the printer axes. An overview of the general channel shape and parameters considered for the shape factor calculation (in orange and red) is displayed in the top, right corner of each cell.

Finally, when molds are printed with columns perpendicular to the z-axis, the form factors of the bioceramics channels approach the theoretical values as the resolution increases.

Figure 6 shows SEM images of cross-sections of the circular channels for both mold printing directions. The images show the layer-by-layer structure of the bioceramic induced by the mold topology.

The 25 μm layer resolution resulted in a surface topology on the produced bioceramic with $H_{\text{cusp}} = 19.8 \pm 3.0 \mu\text{m}$ and $L_{\text{cusp}} = 20.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$. Likewise, using a 12 μm 3D printer resolution, the bioceramics exhibit a surface topology with $H_{\text{cusp}} = 9.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$ and $L_{\text{cusp}} = 9.2 \pm 1.9 \mu\text{m}$. For a 6 μm resolution, the layer-by-layer and well-defined micro-architecture tend to blur, with cusps approximately 5 μm wide and high, which sometimes merge to form broader grooves (Figure 6C). Furthermore, as the resolution increases, the channel surfaces become less jagged-looking and are more linear (images not included). Similar conclusions can be drawn for the bioceramics with channels perpendicular to the z-axis of the printer (Figure 6D–F). The staircase morphology, observed for a 25 μm resolution, becomes smoother as the resolution increases.

3.2. Process Robustness at the Scaffold Scale

Figure 7A displays an X-ray micro-tomography 3D image of the triply periodic bioceramic. The spherical shape is preserved, with an apparent shrinkage of $14.5 \pm 0.8\%$. At a local scale, the internal architecture is also maintained and does not undergo any inhomogeneous deformation with a wall shrinkage of $14.1 \pm 2.7\%$ (Figure 7B).

The similarities between the bioceramic CAD model and the produced bioceramic are assessed (Figure 7C). Despite a lack of overlapping areas, especially at the edge of the ceramic, the gyroid shape is maintained over the entire sphere volume. The lack of overlapping areas may be explained by i) the removal of excess material during the cleaning step of greens (see Section 2.2.2); and ii) software limitations for 3D image fitting (e.g., maximal angular accuracy of 1°).

4. Discussion

In this work, we validated the manufacturing of CaP bioceramics with complex and controlled architectures via the impregnation of 3D-printed wax molds. The macroporous 3D networks are reproducible with a large amount of control at

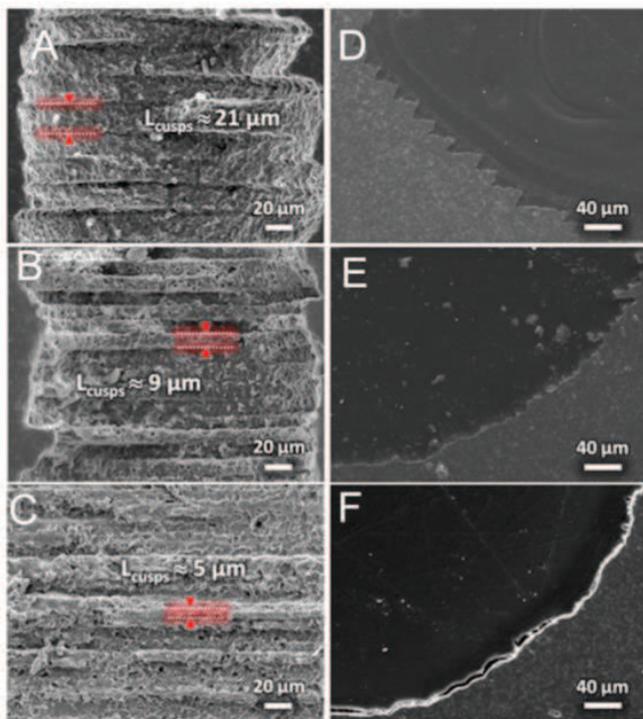


Fig. 6. SEM images of the cross-sections of the channels in the bioceramics produced from molds printed with columns (A, B, and C) along and (D, E, and F) perpendicular to the z-axis of the printer with a 3D printer resolution of 25 μm (A and D), 12 μm (B and E), and 6 μm (C and F).

both the global and local scales (Section 3.2). Despite a high consistency between the produced 3D bioceramics and their respective CAD models, deviations in the construct surface may be observed. This was confirmed by the geometrical analysis performed at the pore scale (Section 3.1). The shapes of the unidirectional channels were generally well-defined and the highest geometrical accuracy (with respect to angle) and dimensional reliability were achieved in bioceramics produced using molds with columns perpendicular to the z-axis of the printer. An increase in the layer resolution from 25 to 6 μm significantly reduced the channel roughness (Figure 6). Nonetheless, shape deformations were not completely avoided (e.g., rounded edges or cropping of the 90° angle of the triangles, see Section 3.1).

Some possible causes were identified to explain bioceramics architectural deviations from the CAD model: i) issues during ceramic processing; ii) inappropriate mold printing strategy; iii) approximations in the .stl export of the mold CAD model or inaccuracy in the .stl file slicing; and iv) technological limitations of the 3D printer.

Ceramic processing (i.e., mold cleaning, impregnation, and heat treatments) is not responsible for the differences between the bioceramic and its CAD model because the slurry formulation used herein was proved to be suitable for the developed process without generating post-sintering defects (i.e., homogeneous and isotropic shrinkage).^[26] Furthermore, complementary X-ray micro-tomography scans of the molds revealed similar deformation at both the mold and bioceramic

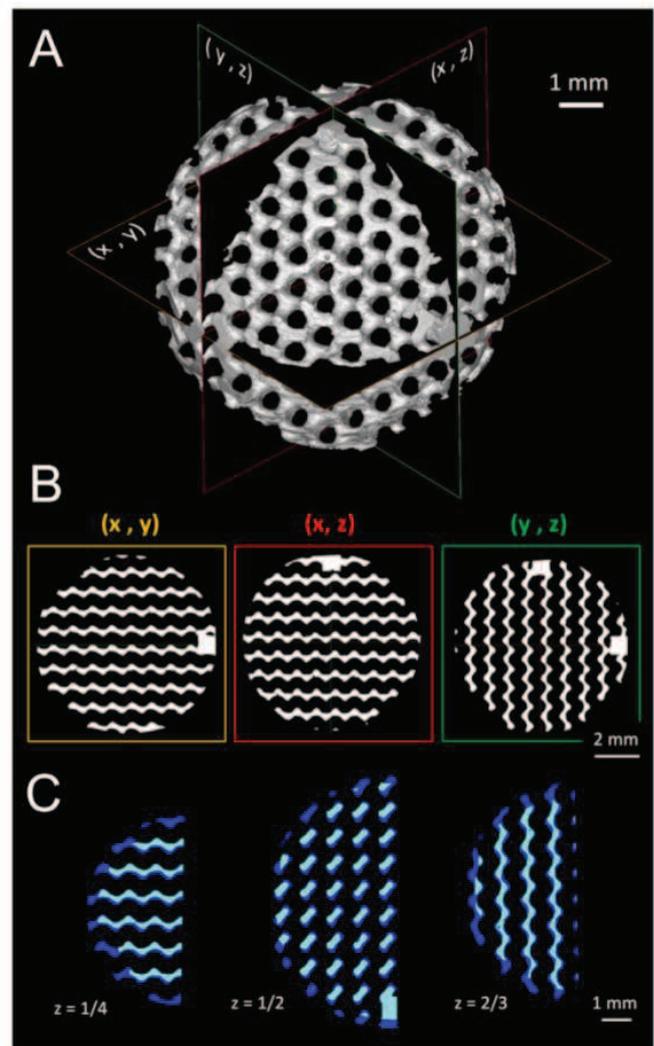


Fig. 7. (A) 3D image obtained from X-ray micro-tomography of the spherical macroporous bioceramics (gyroid internal architecture), (B) cross-sections relative to the xy -, xz - and yz -planes displayed on the 3D view, and (C) comparison of cross-sections of the CAD model (blue) and the resulting bioceramic (cyan) at different heights (1/4, 1/2, 2/3) in the sample using Simpleware software (the shrinkage of the bioceramic structure was simulated on the CAD file using a homogeneous size reduction of 14%).

surfaces. Finally, no wax residue or dust was observed in the mold, suggesting that the defects observed on the bioceramic surface are related to mold topology. This is supported by the fact that the shape deformations are specific to the mold printing parameters, and primarily a function of the mold printing orientation. In fact, the mold printing resolution affects the surface morphology more than the geometrical features (i.e., shapes, see Figure 2). In addition, for a given printing orientation, the architectural features are affected to different extents depending on their geometry (e.g., angles vs. curves) and dimensions (e.g., small vs. large channels). These trends are consistent with the technological challenges of 3D-printing-based technologies as stated by Orpallo et al.^[19b] The choice of a printing orientation appears to be a compromise between part design and one or more manufacturing considerations such as printing time, cost or geometrical accuracy.^[27] Thus, the more specifications

required for a part, the more compromises required. It is also crucial to note that depending on the part design, "there may not be an optimal orientation that meets the needs of the design."^[19b] This need for a printing strategy emphasizes the current limitations of AM processes, including computational methods (e.g., CAD file, tessellation).

It is generally accepted that the tessellation algorithms used for the export of the CAD model in .stl file can generate geometric errors, especially if the model contains curved surfaces.^[28] In our case, this has a minor impact as no facet or chordal error was observed on either the ceramics or the molds. Additionally, the .stl file slicing can lead to architectural deviations between the bioceramic and its CAD model. For columns printed along the z-axis of the printer, the CAD model is maintained after slicing (i.e., triangles keep sharp angles without deformation regardless of their size and circles undergo minor polygonal approximations). In the worst-case scenario, that of the smallest circle, this approximation produces an 18-sided polygon (side length of approximately 36.8 μm) with a mean diameter of $209.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ rather than 220 μm (theoretical value). Conversely, for an orientation of columns perpendicular to the z-axis of the printer, the .stl file slicing results in cropping of the 90° angles, lightly flattened surfaces at the circle extremities (top and bottom) and staircase morphologies at the construct surfaces. Similar deformations are observed on the molds and the bioceramics. An example of the imperfections is illustrated in Table 1 with a comparison, at different production stages, of the flattened surfaces on the flat-topped triangles. For more precision, please refer to the supplementary Figure S2.

This cross-analysis (Table 1) clearly indicates that the slicing procedure is not the most significant cause of geometrical deviation from the CAD models. Even though the flattened surfaces measured on sliced and microtomography images are of the same order of magnitude (100 μm), the flattened surfaces of the molds are, on average, $39.4 \pm 11.9\%$ wider than in the sliced .stl files. This suggests that the DoD technology is the predominant limiting factor.

Table 1. Lengths of the flattened surfaces derived from the cropping of the 90° angle in the triangles. Measurements (N = 9) were carried out on the sliced .stl files and on X-ray micro-tomography images of the molds and bioceramics (orientation of the columns/channels perpendicular to the z-axis of the 3D-printer). Supplementary Figure S2 in the supplementary data complements this table.

Resolution/ μm	Shapes	Flattened surface/ μm		
		Sliced .stl file	Mold	Bioceramic
25	S Triangle	109.9	155.0 ± 4.0	136.0 ± 21.6
	M Triangle	104.0	159.0 ± 13.1	146.7 ± 13.6
	L Triangle	116.2	180.3 ± 3.1	153.7 ± 9.3
12	S Triangle	110.4	139.0 ± 9.6	133.7 ± 10.6
	M Triangle	103.0	134.0 ± 11.5	121.3 ± 14.5
	L Triangle	116.8	170.3 ± 1.5	147.3 ± 12.6
6	S Triangle	109.7	129.0 ± 5.3	116.3 ± 5.7
	M Triangle	91.8	135.0 ± 2.0	128.3 ± 2.3
	L Triangle	116.7	162.3 ± 3.5	156.3 ± 8.1

As presented briefly in Section 2.1, the mold is fabricated layer by layer, alternating between waxes deposition through outlet nozzles and correction of the layer thickness with a milling head. No significant shape deformation based on the milling direction was detected on the molds or the bioceramics. Thus, the technological limitations of the 3D printer are due to the wax deposition, more specifically to the variation of droplet size (Δd), droplet position (Δp), and droplet spreading on the material (Δs average diameter of the splashed droplet after deposition) as presented in Figure 8. These variations are a function of the frequency of the piezo-electric component (Δf) inside the print-head, the print-head and operating temperatures (ΔT), and the print head position and momentum.^[29] All these technical wax deposition issues result in variations of $\pm 17.1\%$ in the deposit width (see Figure 8) for a single straight line monolayer (2.5 mm length, $N = 30$). This is consistent with the inaccuracies observed in the molds with unidirectional columns and their resulting bioceramics, independent of the printing parameters.

Overcoming the current technological limits of the 3D printer through better control of the droplet size and deposition would improve this ceramic manufacturing method. Optimization of the proprietary slicing and print

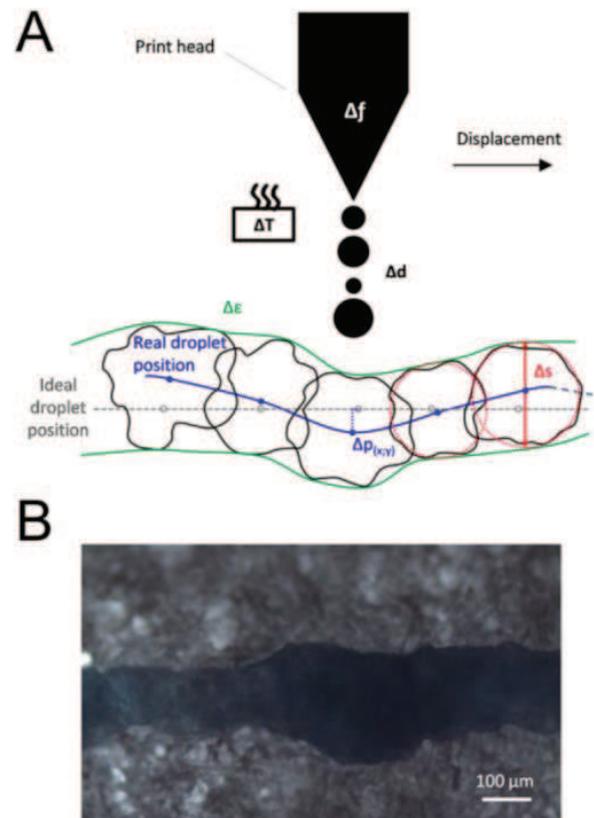


Fig. 8. (A) Schematic representation of the technological limitations of the DoD process, where Δd is the size variation of the droplet size at the print head outlet, Δp is the deviation of the wax droplet from its theoretical position, and Δs is the average diameter of the splashed wax droplet after deposition. These wax deposition issues are greatly influenced by the frequency of the piezo-electric component Δf inside the print-head, the print head and operating temperatures, ΔT , as well as the print head position and momentum. (B) Optical microscopy image of the resulting inaccuracy, $\Delta \epsilon = 17.1\%$, in the deposited material for a single straight-line monolayer.

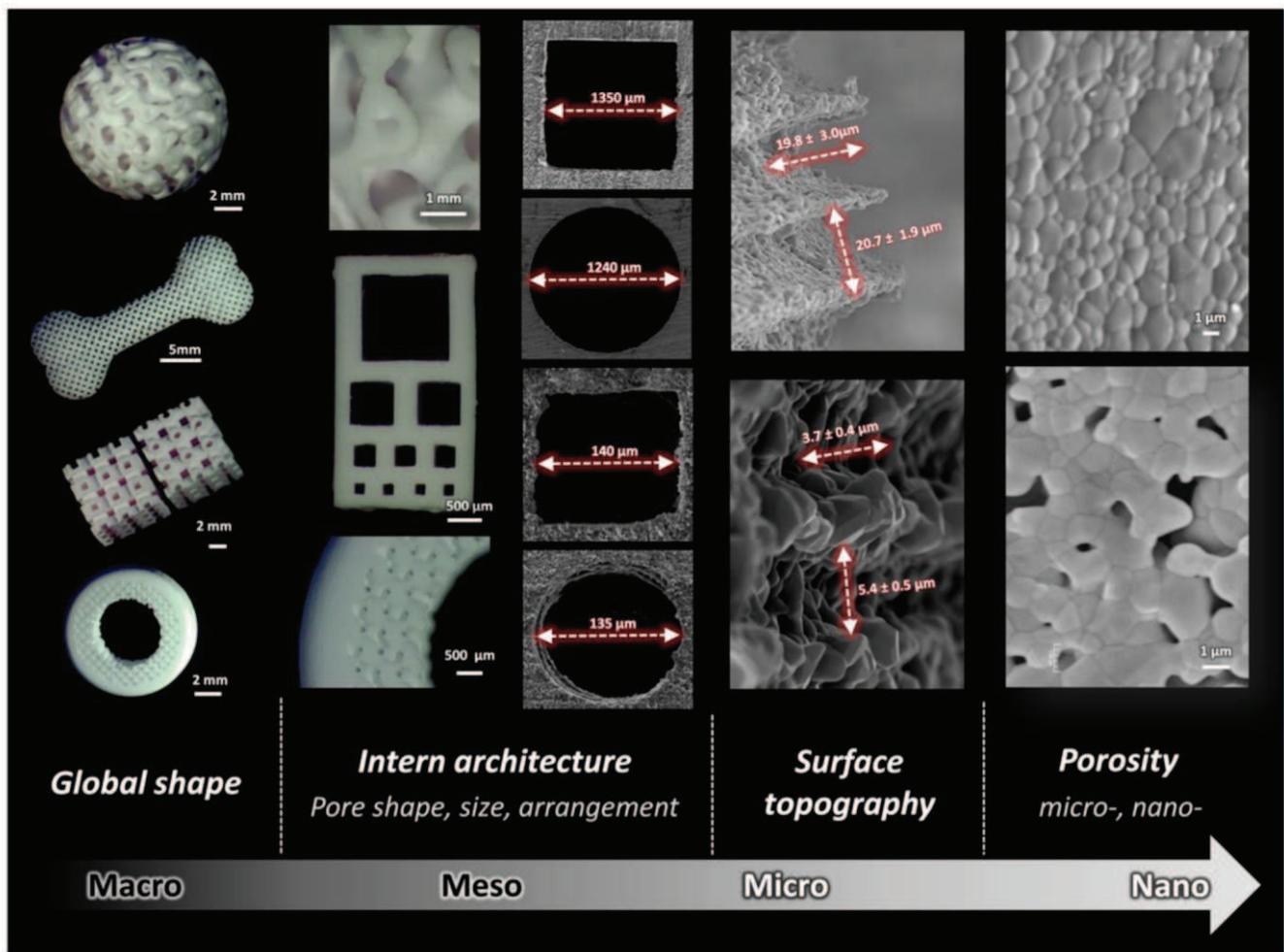


Fig. 9. Examples of porous HA bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax molds. This process allows adjusting the shape, the intern architecture (smallest achievable frame/shape (i.e., circle or square) is 120 μm), the surface microtopography (cusp depth and width of 20–5 μm) and the micro- nano-pores density of the pure bioceramics.

head path planning algorithms may also be required. Finally, the process limitations and possible printing strategies must be integrated into the ceramic design to allow compromises that are compatible with the intended applications. Currently, part design options are constrained by technological limitations but in the future, AM technologies may support better part design and lead to new scientific insight. However, for the current applications, the developed manufacturing process is far more accurate than conventional or current AM (e.g., direct-write assembly, SLS) ceramic processing methods and convenient enough for the production of custom bioceramics adapted to fundamental and therapeutic applications. Figure 9 illustrates the potential of our process from the control of the bioceramic design/shape up to the adjustment of the micro- and nano-features.

5. Conclusions

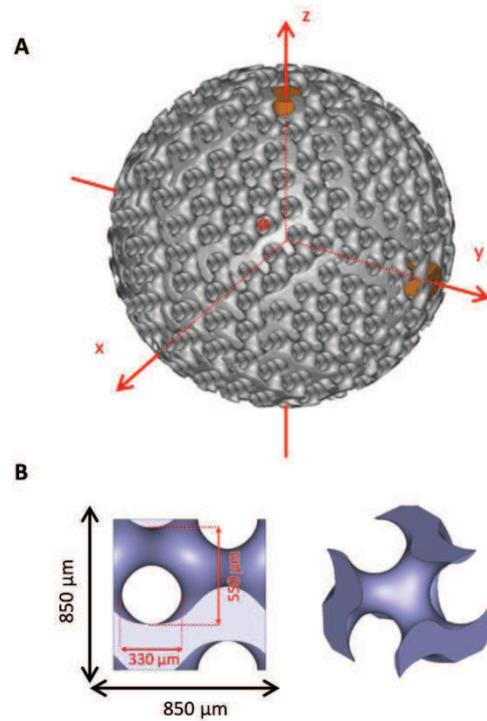
The goal of this study was to evaluate the reliability, robustness, and limitations of a bioceramic manufacturing process based on the impregnation of additively manufactured molds. The results suggest that the architectural deviations observed

between the CAD model and the bioceramic are primarily due to the technical limitations of the 3D printer, more specifically to the variability of the wax droplet deposition. However, the limits of this AM process are minor compared to the architectural opportunities it offers, including standardization of bioceramics manufacturing, high and reproducible architectural control for a wide range of designs, phase biocompatibility preservation, and ease of implementation for various phase compositions. All of these advantages will allow the development of new tools for experimental/fundamental research that will help to better understand the influence of macro- and micro-architecture on cell response and fate.

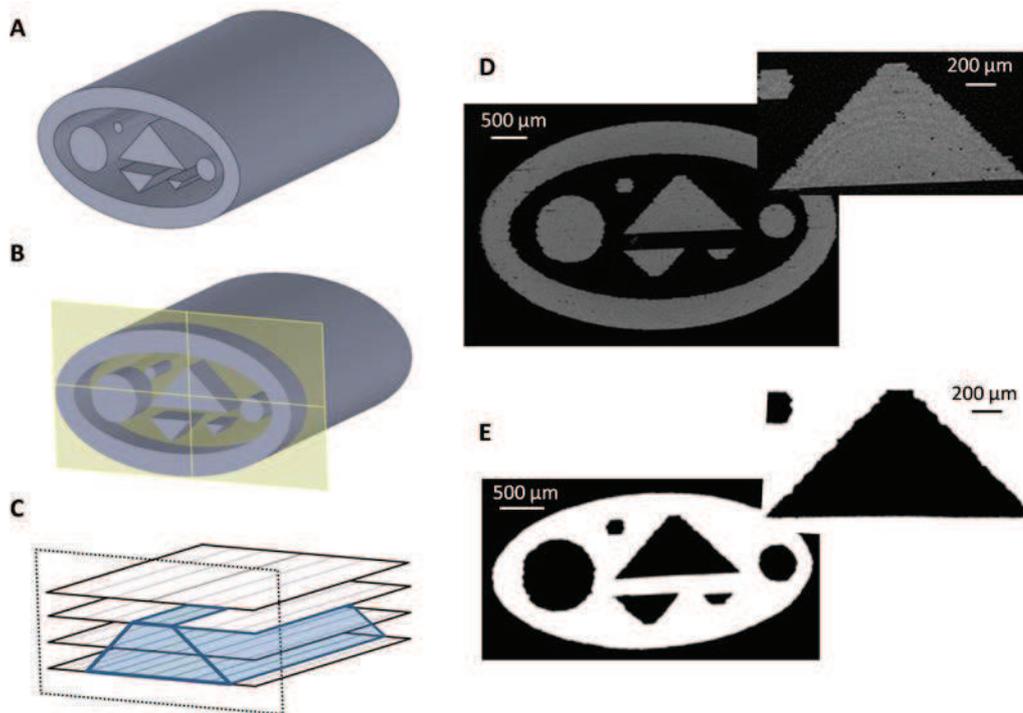
Article first published online: xxxx
Manuscript Revised: June 22, 2016
Manuscript Received: May 30, 2016

- [1] J. Lowry, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **2006**, *88*, 334.
- [2] H. M. da Silva, M. Mateescu, C. Damia, E. Champion, G. Soares, K. Anselme, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *80*, 138.

- [3] G. Bouet, D. Marchat, M. Cruel, L. Malaval, L. Vico, *Tissue Eng. Part B Rev.* **2014**, *21*, 133.
- [4] R. Halouani, D. Bernache-Assolant, E. Champion, A. Ababou, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1994**, *5*, 563.
- [5] J. Rocha, A. Lemos, S. Agathopoulos, P. Valério, S. Kannan, F. Oktar, J. Ferreira, *Bone* **2005**, *37*, 850.
- [6] a) S.-S. Kim, M. Sun Park, O. Jeon, C. Yong Choi, B.-S. Kim, *Biomaterials* **2006**, *27*, 1399; b) X. Liu, L. A. Smith, J. Hu, P. X. Ma, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2252.
- [7] a) M. Descamps, T. Duhoo, F. Monchau, J. Lu, P. Hardouin, Hornez, A. Leriche, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2008**, *28*, 149; b) M. Descamps, O. Richart, P. Hardouin, J. C. Hornez, A. Leriche, *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 1131.
- [8] A. Salerno, D. Guarnieri, M. Iannone, S. Zeppetelli, P. A. Netti, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 2661.
- [9] S. Farhangdoust, A. Zamanian, M. Yasaei, M. Khorami, *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 453.
- [10] J. H. Shepherd, S. M. Best, *JOM* **2011**, *63*, 83.
- [11] a) F. P. W. Melchels, *Preparation of Advanced Porous Structures by Stereolithography for Application in Tissue Engineering*, University of Twente, Enschede, Netherlands **2010**; b) J. P. Kruth, G. Levy, F. Klocke, T. H. C. Childs, *CIRP Ann. Manuf. Technol.* **2007**, *56*, 730.
- [12] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1882.
- [13] E. Champion, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5855.
- [14] J. A. Lewis, J. E. Smay, J. Stuecker, J. Cesarano, *J. Am. Ceram. Soc.* **2006**, *89*, 3599.
- [15] a) P. Miranda, A. Pajares, E. Saiz, A. P. Tomsia, F. Guiberteau, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *85*, 218; b) J. G. Dellinger, J. Cesarano, R. D. Jamison, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, *82*, 383.
- [16] a) A. Butscher, M. Bohner, S. Hofmann, L. Gauckler, R. Müller, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 907; b) M. Castilho, C. Moseke, A. Ewald, U. Gbureck, J. Groll, I. Pires, J. Teßmar, E. Vorndran, *Biofabrication* **2014**, *6*, 015006.
- [17] a) A. Kumar, A. R. Akkineni, B. Basu, M. Gelinsky, *J. Biomater. Appl.* **2015**, *8*, 1168; b) A. Kumar, S. Mandal, S. Barui, R. Vasireddi, U. Gbureck, M. Gelinsky, B. Basu, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2016**, *103*, 1.
- [18] a) C. Chaput, T. Chartier, J. Brie, J. Lafon, *Proceedings of the 4th International Congress on Ceramics*, The American Ceramic Society, Hilton North Raleigh-Midtown, NC, USA **2012**; b) J. Brie, T. Chartier, C. Chaput, C. Delage, B. Pradeau, F. Caire, M.-P. Boncoeur, J.-J. Moreau, *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2013**, *41*, 403.
- [19] a) V. K. Popov, A. V. Evseev, A. L. Ivanov, V. V. Roginski, A. I. Volozhin, S. M. Howdle, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15*, 123; b) W. Oropallo, L. A. Pieggl, *Eng. Comput.* **2015**, *32*, 135.
- [20] T. Chartier, C. Chaput, Y. Aboullatim, C. Delage, *Ceram. Forum Int.* **2006**, *83*, 102.
- [21] G. Brunello, S. Sivoletta, R. Meneghello, L. Ferroni, C. Gardin, A. Piattelli, B. Zavan, E. Bressan, *Biotechnol. Adv.* **2016**, in press.
- [22] a) B. Ma, L. Lin, X. Huang, Q. Hu, M. Fang, in *Knowledge Enterprise: Intelligent Strategies in Product Design, Manufacturing, and Management*, Springer, USA **2006**, 207, 710; b) C. Shuai, C. Gao, Y. Nie, H. Hu, Y. Zhou, S. Peng, *Nanotechnology* **2011**, *22*, 285703; c) C. Shuai, J. Zhuang, H. Hu, S. Peng, D. Liu, J. Liu, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2013**, *60*, 266; d) C. Shuai, P. Li, J. Liu, S. Peng, *Mater. Charact.* **2013**, *77*, 23.
- [23] C. Colin, J.-D. Bartout, E. Shaker, D. Marchat, D. Nimal, *US Patent 20,160,052,162*, **2016**.
- [24] A. V. Do, B. Khorsand, S. M. Geary, A. K. Salem, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1742.
- [25] a) C. M. Bidan, K. P. Kommareddy, M. Rumpler, P. Kollmannsberger, Y. J. M. Bréchet, P. Fratzl, J. W. C. Dunlop, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36336; b) M. Rumpler, A. Woesz, J. W. C. Dunlop, J. T. van Dongen, P. Fratzl, *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5*, 1173; c) C. E. Wilson, J. D. de Bruijn, C. A. van Blitterswijk, A. J. Verbout, W. J. A. Dhert, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2004**, *68*, 123; d) M. Schumacher, F. Uhl, R. Detsch, U. Deisinger, G. Ziegler, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 3039; e) J. Malmström, E. Adolfsson, L. Emanuelsson, P. Thomsen, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 2983.
- [26] B. Charbonnier, C. Laurent, D. Marchat, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2016**, in press.
- [27] P. Pandey, N. V. Reddy, S. Dhande, *J. Mater. Process. Technol.* **2007**, *185*, 125.
- [28] G. Navangul, R. Paul, S. Anand, *J. Manuf. Sci. Eng.* **2013**, *135*, 031006.
- [29] I. Gibson, D. Rosen, B. Stucker, *Additive Manufacturing Technologies: Rapid Prototyping to Direct Digital Manufacturing*, Springer, New York, Heidelberg, Dordrecht, London **2010**.



Supplementary Figure 1. Images produced from CAD software of A. The designed bioceramic with the x-, y-, and z-axes representing the 3D printer axes and specific visual markers (in orange) serving as orientation references for the geometric data analysis, and B. the gyroid unit cell.



Supplementary Figure 2. Example of the evolution of shape deformation throughout each stage of the bioceramic production process with A. the CAD conception of the mold, B. the tessellation of the CAD file (.stl export), C. the slicing of the .stl file with respect to a specific orientation of the part (in the current example, mold columns are perpendicular to the z-axis of the printer), D. a cross-section of the produced mold imaged with X-ray tomography and E. a cross section of the resulting bioceramic imaged with X-ray tomography.

II-2. Article 2 : Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization

Baptiste Charbonnier, Coralie Laurent, David Marchat*

Ecole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, INSERM U1059, F-42023, 158 cours Fauriel, Saint-Etienne Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2016

Received in revised form 1 June 2016

Accepted 2 June 2016

Available online 16 June 2016

Keywords:

Calcium phosphates

Bioceramic

Slurry

Additive manufacturing

ABSTRACT

Nowadays, new engineering developments that combine computational methods and additive manufacturing are able to overcome the current limitations of conventional ceramic manufacturing methods. In this context, a robust bioceramic manufacturing process based on the impregnation of three-dimensional (3D) printed wax molds was developed. The innovative and creative potential of this process is based on the ability to impregnate homogeneously a complex structural design in a reproducible way. We investigated on the optimization of hydroxyapatite slurry based on its preparation parameters. Scaffolds were successfully produced with a wide range of slurry formulations. The results indicate that the bioceramics quality is primarily determined by the slurry drying rate in contact with the mold for a suspension viscosity less than or equal to 80 mPa s. In addition, this process, which allows for phase preservation, can be easily adapted to a large variety of ceramic phases and a wide range of biological applications.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A transitional change in manufacturing paradigm from mass customization to personalized production has occurred since the 2000s. In the former paradigm, manufacturers designed and proposed a basic product that was supplemented by a full set of options they would offer, and customers select the package that globally matched their needs and expectations [1]. In contrast, in personalized production, customers are actively involved in the design of the product they want to purchase, which ensures exact matching of the product to their needs with greater cost-effectiveness [1]. Therefore, personalized production appears to be the next logical step in developing consumer products. "We are moving to a world in which value is determined by one consumer-created experience at a time; $N=1$ " [2]. This is particularly true in the biomedical field due to a growing demand for personalized products and bioceramics for both therapeutic and research purposes [3–6]. The development of application-specific bioceramics creates detailed specifications in terms of composition, architecture, and/or mechanical properties, which necessitates reliable, robust, flexible, and cost-effective manufacturing processes.

The traditional impregnation-based manufacturing process coupled with the production of polymeric templates using additive

manufacturing technologies, such as 3-dimensional printing (3DP), represents a cost-effective and flexible solution for the production of ceramics [7–10] compared to light-based AM technologies (e.g., stereolithography, selective laser sintering/melting) [6]. Therefore, we presented a complete manufacturing method to produce personalized bioceramic scaffolds via the impregnation of a wax mold manufactured by a Drop on Demand (DoD) based 3D printer. Special attention was focused on the influence of mold manufacturing strategy on the final bioceramic architectural features [11].

Although the transformation mechanisms from suspensions to green bodies [12] and then ceramics [13] are well referred, they are process- and phase-dependent [6,14–16]. Thus, the current study focuses on the adaptation and optimization of the traditional impregnation process to wax templates generated using a 3D printer. The evolution of the rheological behavior of hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) slurries, as well as the quality of the produced HA bioceramics, were studied as function of the slurry formulation (e.g., dry matter content, dispersant concentration) and the preparation process (i.e., mixing/grinding time and rate).

2. Materials and methods

2.1. Ceramic manufacturing process

As detailed in Charbonnier et al. [11] and shown in Fig. 1, the first step in the manufacturing process consists of computer-aided design (CAD) and production of the impregnation molds. The molds

* Corresponding author.

E-mail address: marchat@emse.fr (D. Marchat).

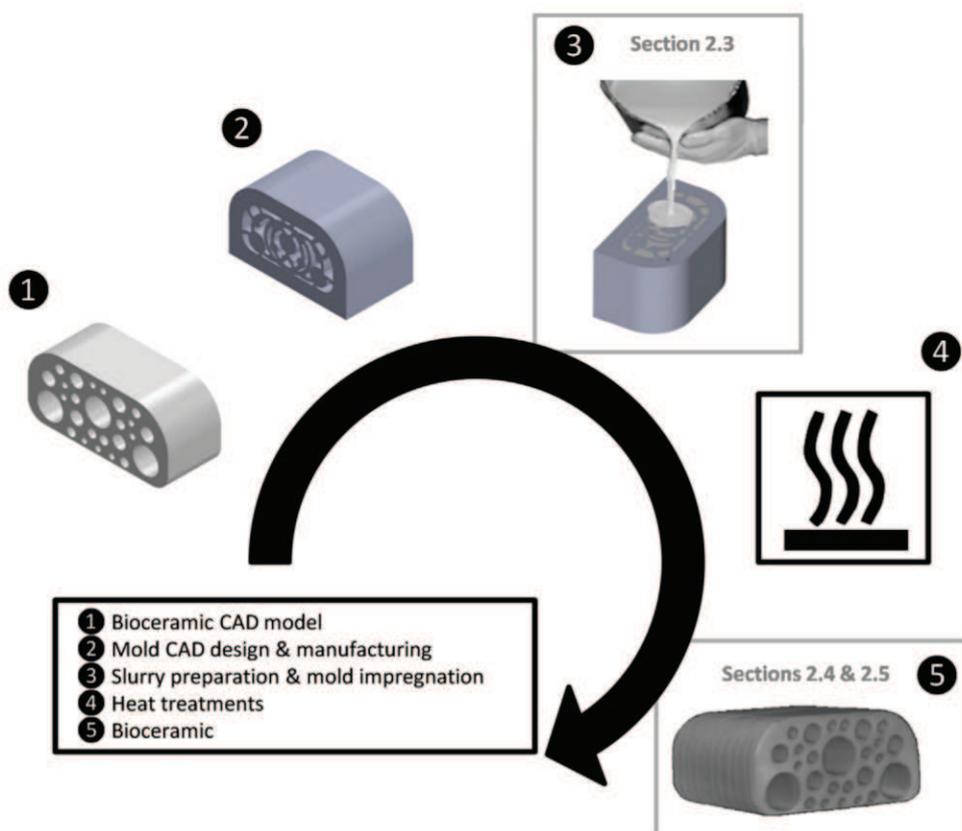


Fig. 1. Representation of the developed manufacturing process including **1** the bioceramic computer-aided design (CAD) model, **2** the mold CAD model, which is a negative of the bioceramic structure, and its production using a 3D printer, **3** mold impregnation by a ceramic suspension, **4** heat-treatments of debinding and sintering to obtain **5** the bioceramic.

are designed as the negative structure of the intended bioceramic and built layer by layer via a DoD based 3D printer (3Z Studio, Solid-scape, Multistation, Dinard). Prior to printing, the layer thickness (from 6 to 25 μm) and mold printing orientation must be defined based on the expected final bioceramic specifications [11]. Once printed and cleaned, the molds are impregnated with a HA suspension (see Fig. 1, stage 3). After drying, the greens are debinded for 2 h at 500 $^{\circ}\text{C}$ followed by sintering at 1200 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h under air (see Fig. 1, stage 4).

Slurry characteristics, such as the dry matter content or rheological properties, are crucial parameters for manufacturing bioceramics via mold impregnation [17]. The good impregnation of the mold is particularly important here because the robust control of architectural features or even mechanical properties of the bioceramics constitute the added value of this process. Therefore (Fig. 1, stage 3), we studied the influence of the mixing/grinding parameters, powder specific surface area and slurry formulation on the slurry viscosity as well as the final quality of the produced bioceramics. Finally, chemical and physico-chemical analyses were performed on the manufactured HA bioceramics to confirm compliance of their properties with international standards for biological applications.

2.2. Powder synthesis

The HA powder was prepared via an aqueous precipitation method using a fully automated apparatus. A diammonium hydrogen phosphate ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 99%, Merck, Germany) solution was added dropwise to a calcium nitrate solution ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%, Merck, Germany) using peristaltic pumps. The reaction was

performed under continuous stirring and refluxed at a regulated temperature of 45 $^{\circ}\text{C}$ (external T-probe). The argon flow (Air Products, 0.1 L/min) in the reactor prevented uncontrolled carbonation of the precipitates. The pH of the suspension was automatically adjusted and maintained at 9.0 with the addition of a 28% ammonia solution (Merck, Germany) using a pH stat (GALA 0420 TTT, Prominent, Strasbourg, France). After the introduction of all of the reagents, the suspension was aged for 17 h and then filtered. The precipitate was pre-calcined at 400 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h (Carbolite, UK) before it was crushed to a size of 1–10 μm (Hosokawa Alpine, AFG100, Germany). Finally, the HA powder was calcined at 795 $^{\circ}\text{C}$, 915 $^{\circ}\text{C}$ and 1020 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h (LH40/13, Nabertherm, Germany) to obtain a specific surface area (shorten hereafter S_{BET}) of 17.6 ± 0.4 , 8.1 ± 0.2 , and 4.0 ± 0.1 m^2/g ($N \geq 3$), respectively. These values were determined on powders that were outgassed at 150 $^{\circ}\text{C}$ for 8 h using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) 5-points method using N_2 adsorption isotherm (Micromeritics ASAP 2010, Germany). HA particles are usually in a spherical (ball) shape, just a few are shaped like a rice grain (see Supplementary Fig. S1).

2.3. Influence of slurry formulation and preparation on rheological behavior

2.3.1. Slurry preparation and viscosity measurements

The HA slurries were prepared in a planetary ball mill (PM400, Retsch, Germany) by blending HA powder, pure water and dispersing agent (Darvan C-N, R. T. Vanderbilt Company Inc., USA) in zirconium oxide jars with 5 and 10 mm diameter balls.

The rheological investigations were performed at 25 $^{\circ}\text{C}$ using a rotating automatic viscometer (Haake RotoVisco 1, Thermo Sci-

Table 1
Composition of 60% (w/w) dry matter content slurries prepared with 4.0, 8.1 and 17.6 m²/g HA powders. The initial specific surface area is shorten S_{BETini} in this table.

S_{BETini} /g m ⁻²	HA powder % (w/w)	Pure water % (w/w)	Dispersant % (w/w)
4.0 ± 0.1	59.91	39.73	0.36
8.1 ± 0.2	59.82	39.46	0.72
17.6 ± 0.4	59.61	38.83	1.56

entific, USA) equipped with a couple cup-coaxial cylinder (Haake VT550 MV1, Thermo Scientific, USA). The viscosity was measured at a constant shear rate of 200 s⁻¹ (break of 200 s) after an initialization phase that consisted of two consecutive shear rate cycles (100 s⁻¹ for 20 s and 200 s⁻¹ for 200 s). The reported viscosity value is an average of 100 values recorded from the 50–150 s. The ramps up and down were fixed at 1.66 s⁻¹/s and 3.33 s⁻¹/s, respectively.

2.3.2. Influence of the mixing/grinding rate

The HA slurries for the viscosity measurements were prepared by blending 59.61% (w/w) HA powder, 38.83% (w/w) pure water and 1.56% (w/w) dispersant for 1 h at 100, 115, 150, 200, 205 or 220 rpm. The dispersant quantity was calculated based on a dispersant concentration of 1.5 mg/m² of powder and HA powder with an initial S_{BET} of 17.6 m²/g (Table 1). The slurries were prepared in triplicate.

2.3.3. Influence of the mixing/grinding time

HA slurries with a dry matter concentration of 60% (w/w) were prepared with 4.0, 8.1 and 17.6 m²/g powders. The quantity of dispersing agent remained constant with respect to the powder S_{BET} (1.5 mg/m²). Table 1 provides the composition of the slurries.

The mixing/grinding time was fixed between 5 and 75 min at a mixing rate of 200 rpm. After the viscosity measurement (see Section 2.3.1), the evolution of the S_{BET} induced by the mixing/grinding process was investigated. The slurry was dried at ambient temperature and then crushed using an agate mortar and pestle. After a debinding step at 400 °C for 3 h to remove organic additives without changing the S_{BET} of the powder [18], each powder sample was ground again and then analyzed using the BET method (c.f. 2.1.). The slurries were prepared and analyzed in triplicate for the turning points (i.e., modification of viscosity behavior), and the S_{BET} measurements were repeated 3 times for each sample.

2.3.4. Influence of the dispersant concentration

60% (w/w) dry matter slurries were prepared with 4.0 and 17.6 m²/g HA powders. The mixing/grinding rate and time were fixed based on the results from the studies described in Sections 2.3.2 and 2.3.3. The dispersant screening was performed using a suspension containing 0.5–5 mg of dispersant per m² of HA and considering the final powder S_{BET} (i.e., after the mixing/grinding step).

2.3.5. Influence of the dry matter concentration

The variation in the suspension viscosity as a function of the dry matter concentration was investigated using the slurries prepared with 4.0, 8.1 and 17.6 m²/g HA powders and mixing at 200 rpm for 15, 30 and 60 min, respectively. The mixing/grinding rate and time as well as the dispersant concentration were fixed based on the results from the studies described in Sections 2.3.2, 2.3.3 and 2.3.4, respectively.

2.4. Influence of slurry formulation on the produced bioceramics

2.4.1. Design and production of molds

A bioceramic CAD model was designed using the ScanIP suite from Simpleware (UK). This model consists of 70% gyroid archi-

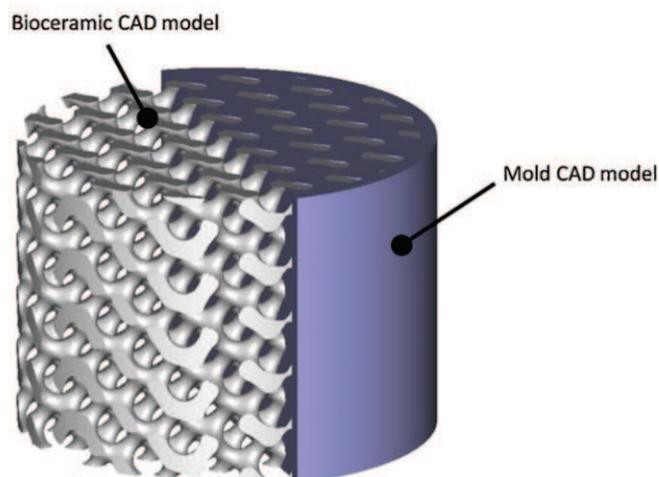


Fig. 2. CAD model of the mold and the intended bioceramic.

ture with wall thickness varying from 250 to 400 μm (Fig. 2). The CAD mold model ($\varnothing = 8.6$ mm, $h = 5.95$ mm) was patterned from the bioceramic CAD model. This triply periodic and narrow porous mold was specifically designed for challenging the process, especially the impregnation step.

2.4.2. Bioceramic manufacturing – protocol

The quality of the bioceramics was studied as a function of the slurry formulations. The ceramics were produced from 8 different slurry formulations based on the viscosity as a function of dry matter content curves (see Section 2.3.5).

Prior to impregnation of the wax molds, the slurries were mixed with a binder (Duramax B-1000, Rohmand Haas, France) at 3.7% (w/w of slurry) for 15 min at 150 rpm using a propeller stirrer (Bohlander, Germany). Three molds were impregnated for each slurry composition. After drying at room temperature overnight, all of the dried slurry surplus was removed from the obtained green bodies using a surgical blade (Swann-Morton, UK). Then, the green bodies were debinded to eliminate the polymeric mold as well as the organic adjuvants by slowly increasing the temperature to 500 °C in a debinding furnace (Carbolite, UK). The consolidation of the ceramic was guaranteed by employing a sintering step at 1200 °C for 2 h under air with ramps of 4 °C/min (LH40/13, Nabertherm, Germany).

2.5. Validation of the manufacturing process for biological applications

Robust control of the architectural properties as well as the chemical and phase compositions of the ceramics is required for their intended biological applications. Therefore, after sintering, the bioceramics were imaged three-dimensionally using an X-ray computed tomography (CT) system (Phoenix, USA) to identify possible (volume) defects (80 kV, tungsten target, 0.75 s of integration time and 3.5 μm voxel resolution). To reconstruct the volume data, a proprietary program based on Feldkamps cone beam-reconstruction algorithm was employed. After reconstruction, the bioceramic 3D image was analyzed with VG Studio software (Volume Graphics, Heidelberg, Germany). Scaffold microstructure was characterized using a Scanning Electron Microscopy (SEM-FEG, JEOL JSM-6500F, USA). Qualitative images were obtained after gold sputtering (20 mA, 50 s) of the samples for electrical conductance (Quorum Q150R ES, England).

Phase identification was performed using X-ray diffraction spectroscopy of the crushed ceramics. The patterns were recorded with

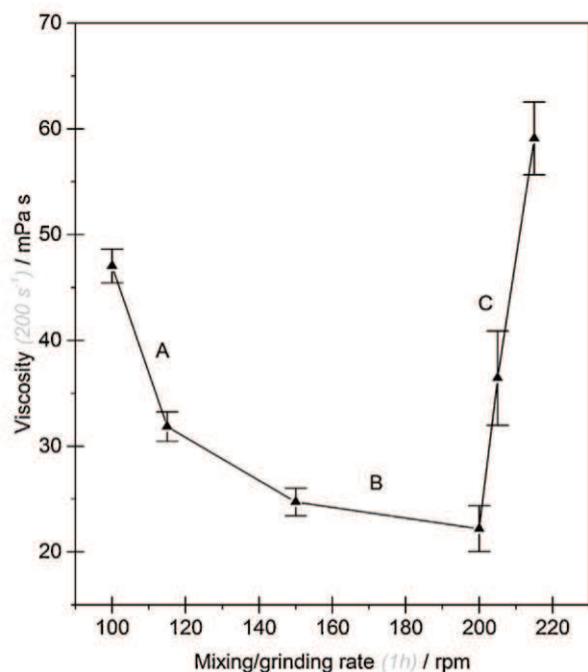


Fig. 3. Evolution of the viscosity of the HA slurry as a function of the mixing/grinding rate. The slurries were prepared by blending for 1 h with a dry matter content of 60% (w/w) and a dispersant concentration of 1.5 mg/m² of HA powder calculated for an initial HA powder S_{BET} of 17.6 m²/g. For each mixing/grinding rate, the slurries were prepared and analyzed in triplicate.

CuK α radiation using a $\theta/2\theta$ diffractometer Siemens D5000 over a range of 10–60°. All of the crystalline phases were identified by comparison with reference patterns in ICDD-PDF (International Centre for Diffraction Data – Powder Diffraction Files). To complement these crystallographic data, the powder samples were analyzed by infrared spectroscopy using a MIR TF VERTEX 70 spec-

trometer equipped of an ATR system. The spectra were recorded from 4000 to 400 cm⁻¹ at a resolution of 2 cm⁻¹ and obtained by signal averaging of 64 successive scans.

Using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Horiba Activa Spectrometer, Jobin-Yvon), the trace elements in the produced bioceramics were quantified after dissolution in a nitric acid solution (0.5 M). Finally, the carbon residue content was determined with a Leco CS 444 carbon sulfur analyzer.

3. Results

3.1. Influence of the mixing/grinding rate

Fig. 3 shows the variation in the slurry viscosity as a function of the operating speed of the planetary ball mill. The viscosity decreased slowly as the speed ratio increased from 100 to 150 rpm (A in Fig. 3) to reach a viscosity threshold at 25 mPa s from 150 to 200 rpm (B in Fig. 3). A sudden increase in the viscosity occurred after 200 rpm, and the viscosity reached 60 mPa s at 215 rpm (C in Fig. 3). For subsequent studies, a mixing/grinding rate of 190 rpm was chosen.

3.2. Influence of the mixing/grinding time

A similar evolution of the slurry viscosity throughout the mixing/grinding time was observed regardless of the initial S_{BET} of the HA powder (Fig. 4). The viscosity decreased with the mixing/grinding time up to a minimum value. This value as well as the mixing/grinding time that was necessary to reach it, are a function of the initial S_{BET} of the powders (i.e., 10.6 mPa s after 17.5 min, 11.4 mPa s after 35 min and 20.2 mPa s after 65 min for the 4.0, 8.1 and 17.6 m²/g powders, respectively). Beyond these mixing/grinding times corresponding to the lowest viscosity values, the suspension viscosity increased quickly. In addition, as the ini-

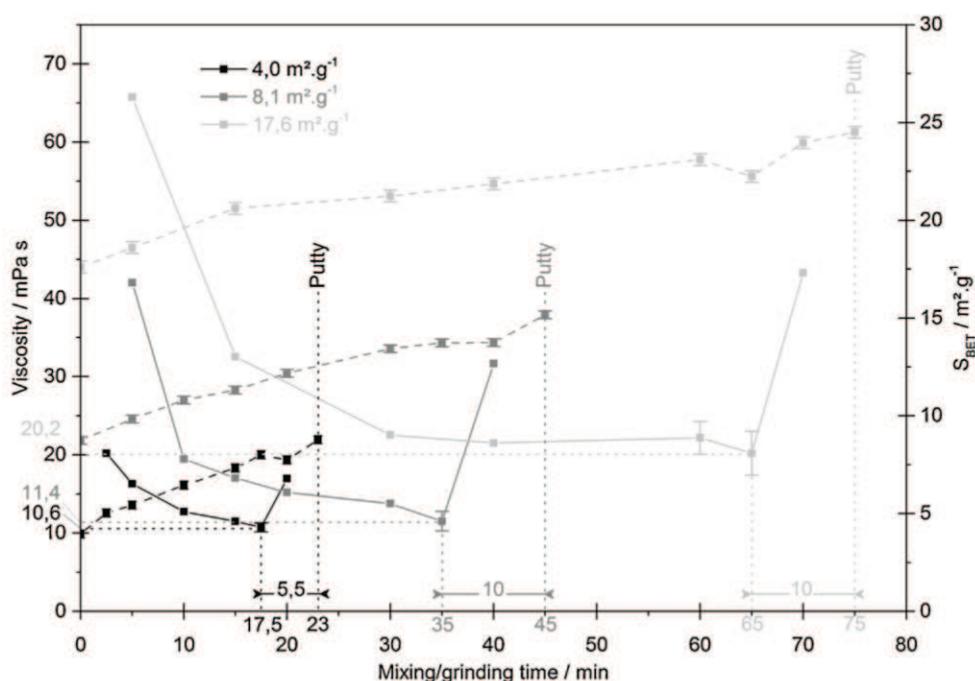


Fig. 4. Evolution during the mixing/grinding time: viscosity of HA slurries prepared with 4.0, 8.1 and 17.6 m²/g powders are shown in black, dark grey and light grey, respectively (solid line). S_{BET} of powders after slurry processing (dash line). The slurries were prepared at a mixing/grinding rate of 190 rpm with a dry matter content of 60% (w/w) and a dispersant concentration of 1.5 mg/m² of HA powder calculated for the initial S_{BET} of the HA powder. Slurries that have the lowest viscosity were prepared in triplicate then analyzed three times.

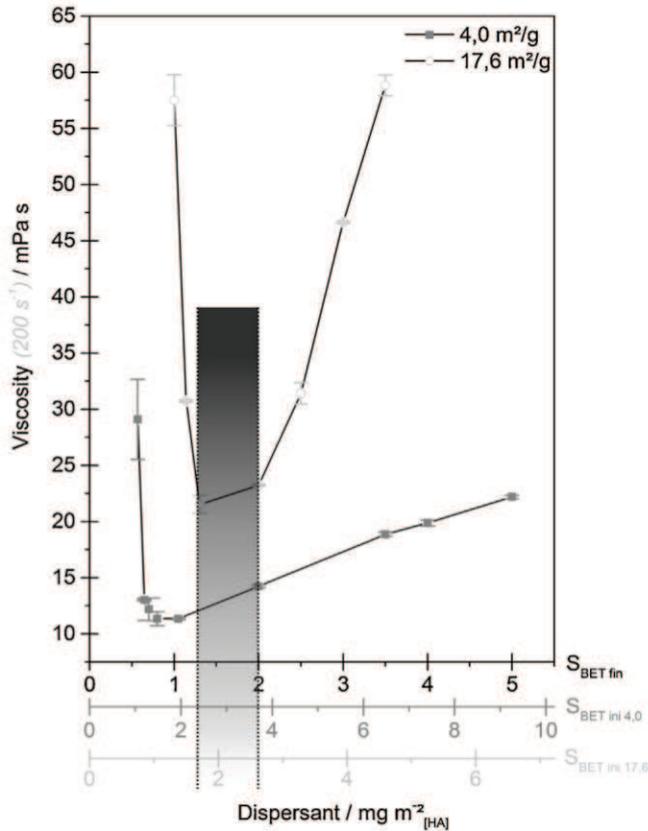


Fig. 5. Evolution of the viscosity as a function of the dispersant concentration relative to the final powder S_{BET} ($S_{\text{BETfin}} = 7.3$ and $23.1 \text{ m}^2/\text{g}$ for $S_{\text{BETini}} = 4.0$ and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$, respectively). The secondary abscises (in grey) shows the dispersant concentration relative to the initial surface area of the powders (S_{BETini}). The slurries were prepared at a mixing/grinding rate of 190 rpm with a dry matter content of 60% (w/w) for 15 and 60 min with the 4.0 and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ powders (S_{BETini}), respectively. The grey area shows the minimum viscosity range (as a function of the dispersing agent concentration) shared by the 4.0 and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ powders.

tial S_{BET} decreased, the suspension becomes a putty faster (5.5, 10 and 10 min for the powders of 4.0, 8.1 and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$, respectively).

Concurrently with this viscosity change, the S_{BET} of the HA powders increased with the mixing grinding time (Fig. 4). Therefore, between the beginning of the mixing/grinding step ($t=0$) and the putty formation, the S_{BET} of the powders increased from 4.0 to $8.8 \text{ m}^2/\text{g}$, 8.1 to $15.2 \text{ m}^2/\text{g}$ or 17.6 to $24.5 \text{ m}^2/\text{g}$.

Mixing/grinding times of 15, 20 and 60 min were employed in subsequent studies to prepare HA suspensions with the 4.0, 8.1 and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ powders, respectively. At these mixing/grinding time-points, the S_{BET} values of the powders were equal to 7.3 ± 0.2 , 13.4 ± 0.2 and $21.3 \pm 0.3 \text{ m}^2/\text{g}$, respectively ($N=3 \times 3$).

3.3. Influence of the dispersant concentration

The evolution of the slurry viscosity for 4.0 and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ HA powders as function of the amount of dispersing agent is shown in Fig. 5. This amount of dispersant (displayed in abscissa) is expressed according to the S_{BET} of the powders measured before (S_{BETini}) or after (S_{BETfin}) the mixing/grinding step.

The evolution of the slurry viscosity with the dispersant concentration is quite similar and followed a U-shaped pattern regardless of the initial powder S_{BET} . However, the range of the dispersant concentration where the viscosity is at a minimum depends on the powder S_{BET} . Finally, and most importantly, there is a common range of dispersing agent concentration ($1.3\text{--}2.0 \text{ mg}/\text{m}^2$), which is expressed as function of the final S_{BET} of the powders (S_{BETfin}),

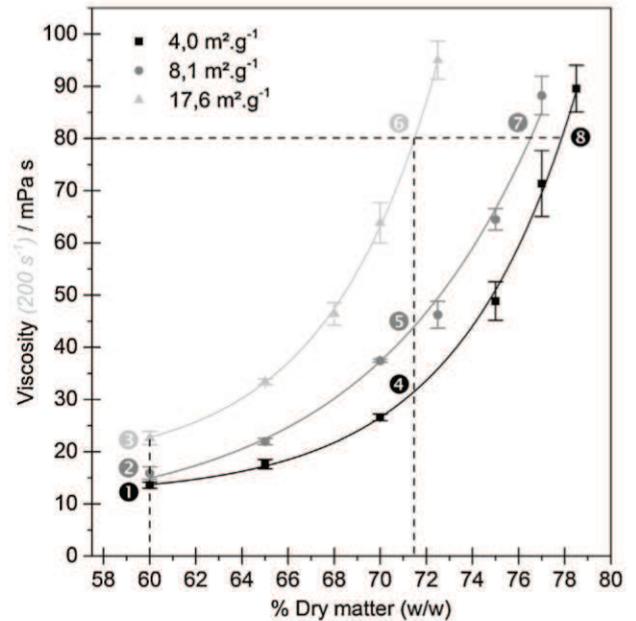


Fig. 6. Evolution of the slurry viscosity as a function of the dry matter content of HA. The slurries were prepared with the 4.0 (black line), 8.1 (dark grey line) and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ (light grey line) HA powders. The numbers 1 to 8 refer to the composition of the slurries used to produce the bioceramics that were analyzed in Section 2.4.

where the viscosity is low regardless of the initial powder S_{BET} (see grey area in Fig. 5).

A dispersant content of $1.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ of HA powder, which was calculated from S_{BETfin} , was used in subsequent studies for the preparation of slurries.

3.4. Influence of the dry matter concentration

The slurry viscosity increased exponentially with the dry matter concentration (Fig. 6) following the relationship $y = A_0 + A_1 \times e^{x/A_2}$ regardless of the initial S_{BET} . However, as the S_{BETini} increased, the slurry viscosity increased faster with the dry matter content. Therefore, for the 4.0, 8.1 and $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ powders, the same viscosity (i.e., 80 mPa s) was reached for an dry matter content of 77.8, 76.5 and 71.4% (w/w), respectively.

3.5. Bioceramic architectural features as a function of the slurry formulation

Three-dimensional CT and cross-sectional images of the cylindrical HA ceramics are shown in Fig. 7. No large non-impregnated zones were observed even for slurries with a highest viscosity of 80 mPa s. Nonetheless, the bioceramics were significantly affected by the rheological properties and formulation of the slurries. The number and size of bubbles trapped inside the walls of the bioceramics tend to increase significantly with an increase in the dry matter content regardless of the powder S_{BET} . For a viscosity of less than 50 mPa s (samples 1–5), bubbles are rare or absent except for the bioceramics manufactured with the slurry using the $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ HA powder (sample 3). In addition, no significant cracks were observed in these bubble-free samples (samples 1, 2 and 4, 5). In contrast, in the bioceramics manufactured with dry matter contents of 76.5 and 77.8% (w/w) from the 8.1 and $4.0 \text{ m}^2/\text{g}$ HA powders (samples 7 and 8), respectively, small cracks ($\approx 10 \mu\text{m}$ wide) were visible. Likewise, in all of the bioceramics produced with the $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ HA powders (samples 3 and 6), large cracks

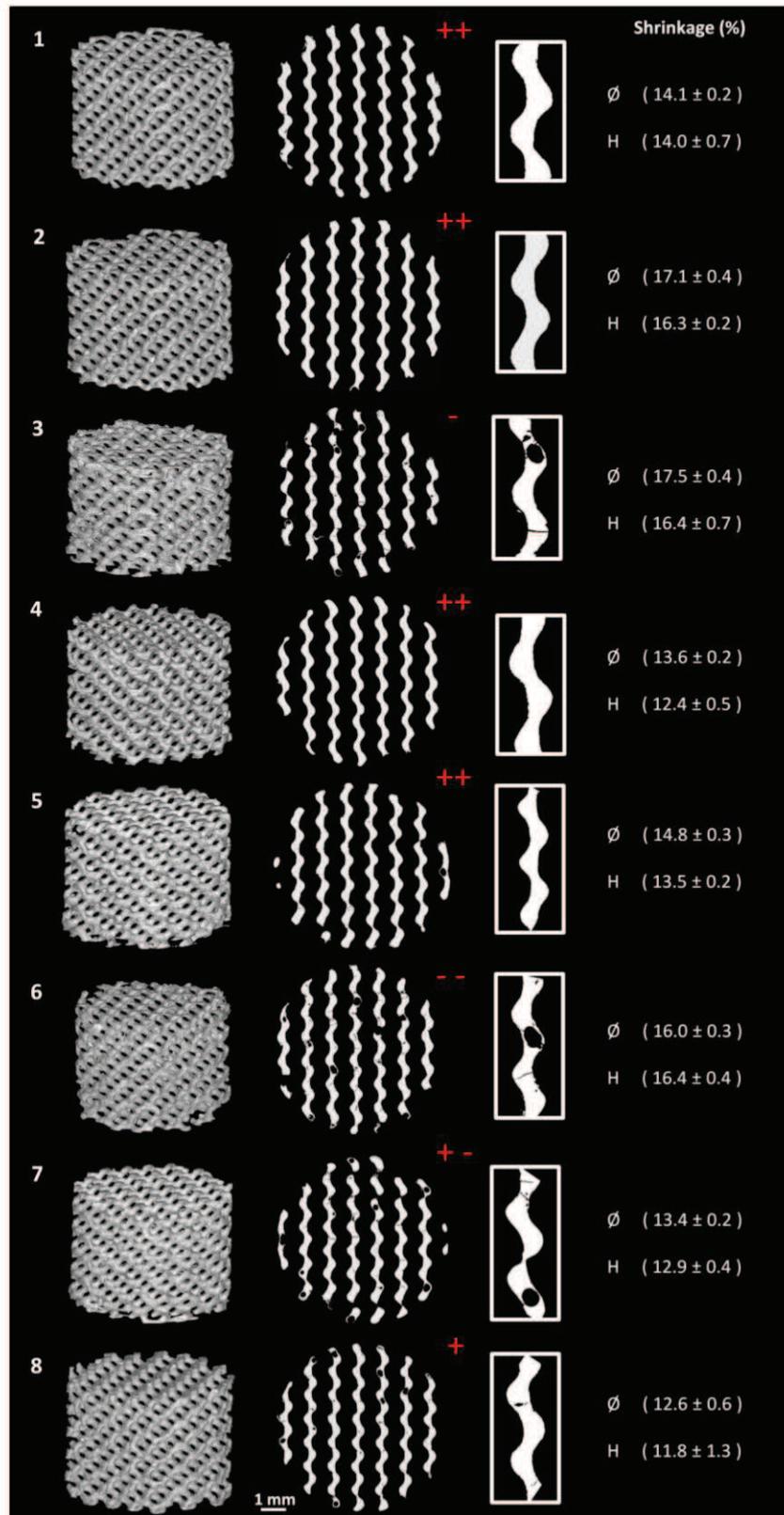


Fig. 7. 3D images and cross-section obtained by μ -tomography X of bioceramics n° 1–8. The qualitative mechanical handling was evaluated from none (–) to very good (++). The +– symbol represents a bioceramic that can be manipulated by hand without specific precaution. The shrinkage values in% of the diameter and height of each bioceramic are specified in white.

($\approx 20 \mu\text{m}$ wide) that propagated through the bioceramic walls were observed. Interestingly the cracks and bubbles are concomitant.

Isotropic shrinkage of the bioceramics was also observed regardless of the slurry formulation (see Fig. 7). The shrinkage tends to increase with an increase of the powder S_{BET} (e.g., samples 1, 2,

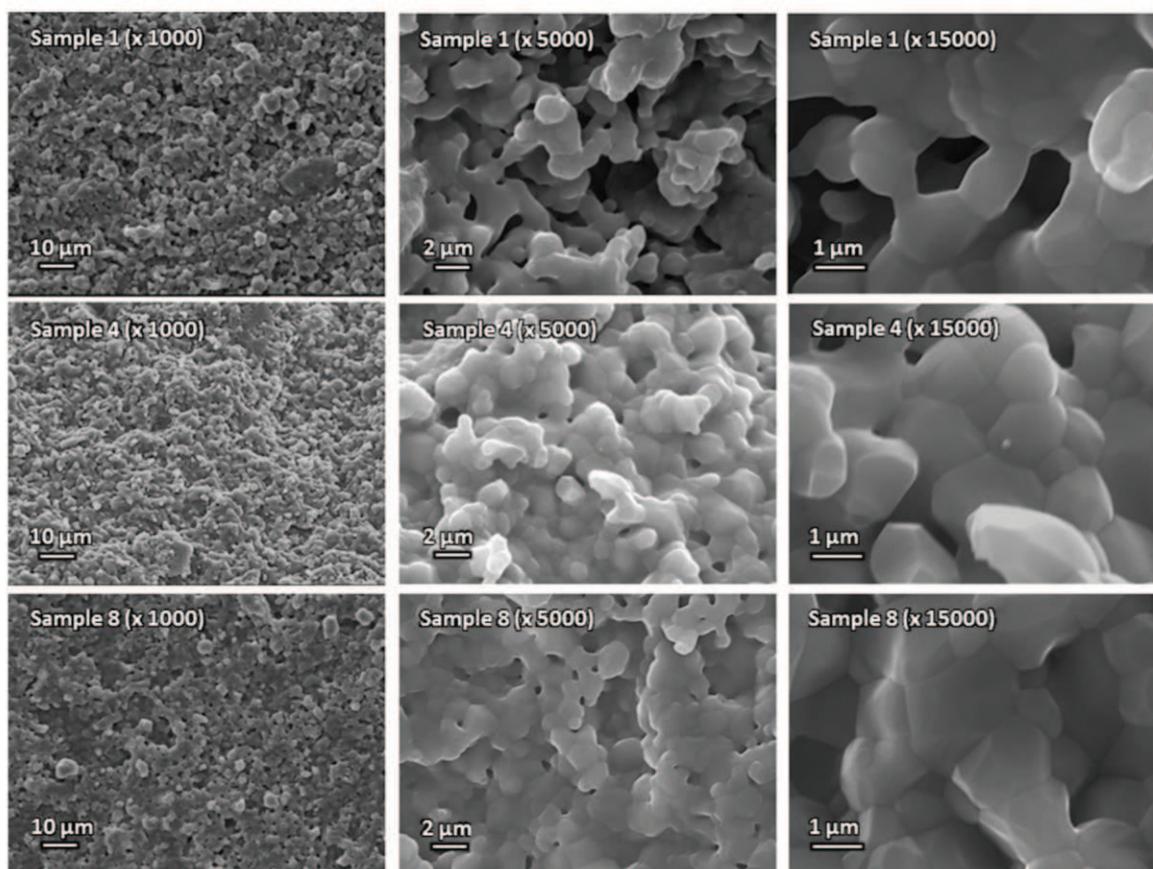


Fig. 8. SEM images of fractured surface of bioceramics 1, 4 and 8 (see Fig. 6) at equivalent magnifications. As a reminder, bioceramic 1, 4 and 8 resulted from slurries prepared with $4.0 \text{ m}^2/\text{g}$ HA powder, with a dry matter content of 60, 71.4 and 77.8% (w/w), respectively, and a same dispersant concentration (regarding SBET fin). Once dried, slurries underwent the same heat treatments (i.e. debinding, sintering).

3 or 4, 5, 6) or a decrease in the slurry dry matter content (e.g., samples 1, 4, 8 or 2, 5, 7), except for samples 3 and 6, which were prepared with the $17.6 \text{ m}^2/\text{g}$ powder.

The SEM images of bioceramics microstructures (Fig. 8) reveal that low dry matter content slurries (e.g. 60% w/w, sample 1) lead to bioceramics with a high amount of microporosities and a low grain coordination. An increase of slurry dry matter content reduces significantly the number of micropores; no significant difference was observed between sample 4 (71.4% (w/w)) and sample 8 (77.8% (w/w)).

3.6. Chemical and phase composition

Fig. 9 shows the X-ray diffraction patterns and the infrared spectra of the ground bioceramic (sample 4 in Figs. 6 and 7). The diffractogram and infrared patterns of the HA bioceramic only exhibit the characteristic lines and bands of HA. No secondary phase, organic residue or crystallographic substitution was detected.

The ICP-AES elemental analysis revealed a very low amount of iron and trace elements (Table 2), which were below the limit values recommended in ISO-norm 13779-1 and 13779-3.

Finally, the very low amount of carbon that was detected in the bioceramic powders ($0.006\% \pm 0.001 \text{ w/w}$) and reference HA ($0.014\% \pm 0.004 \text{ w/w}$) were of the same order of magnitude, which indicates the absence of possible carbon residues induced by the developed manufacturing process.

Table 2

ICP-AES elemental analysis of HA composition after the manufacturing process.

Element	Content (ppm)
Arsenic (As)	<1
Antimony (Sb)	<1
Bismuth (Bi)	<0.1
Cadmium (Cd)	<0.1
Copper (Cu)	<1
Iron (Fe)	<1
Molybdenum (Mo)	<1
Lead (Pb)	<0.1
Mercury (Hg)	<0.1
Silver (Ag)	<1
Tin (Sn)	<1

4. Discussion

In this study, bioceramics with a controlled architecture were produced in a reproducible way with phase and chemical compositions that were in compliance with the international standards for biological applications, as demonstrated in Section 3.6. To achieve this outcome, an iterative experimental procedure was developed. The effects of the mixing/grinding rate, mixing/grinding time, dispersing agent concentration and dry matter content on slurry rheological properties and the quality of the manufactured bioceramics were investigated.

The optimal planetary ball mill parameters were determined (mixing/grinding rate and time). As shown in Fig. 3, the evolution of the slurry viscosity as a function of the mixing/grinding rate followed a U-shaped pattern. For low mixing/grinding rates (left side of the U), the energy provided by the planetary ball mill is

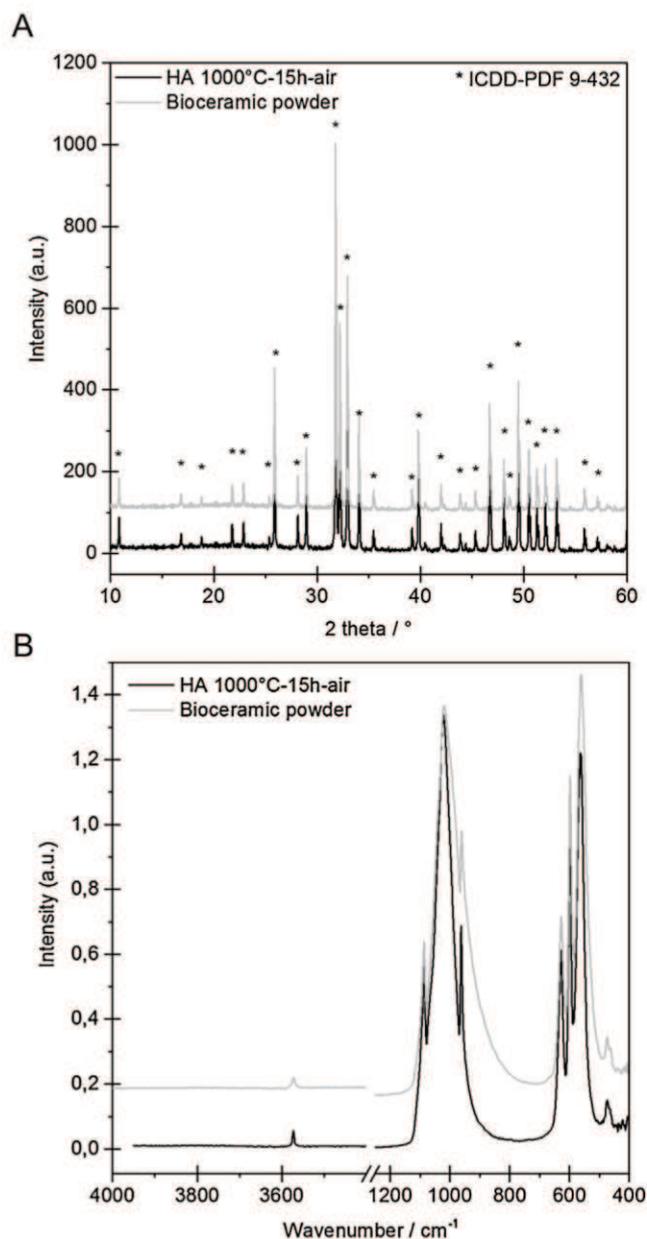


Fig. 9. A. XRD pattern and B. IR spectra of the HA powder calcined at 1000 °C for 15 h under air and the crushed bioceramic. ICDD-PDF 9-432 was used for phase identification in XRD.

too low to break particle agglomerates and homogenize the dispersant molecule at the particle surfaces. Therefore, a portion of these molecules remained in solution (Fig. 10A). As a consequence, slurry viscosity is higher compare to that of a fully deflocculated slurry (Fig. 10B).

In contrast, when the supplied energy is too high (right side of the U), the increase in the slurry viscosity may be due to (i) dispersing agent degradation caused by overheating or stresses (compression, shear) and/or (ii) the evolution of the powder S_{BET} resulting from attrition (Fig. 10C). In both cases, the dispersant concentration with respect to the powder S_{BET} becomes too low to ensure good slurry deflocculation, which explains the sudden increase in viscosity.

U-shaped evolutions of the slurry viscosity were also observed throughout the mixing/grinding time (Fig. 4). As a first approximation, the faster deflocculation of the slurries (left side of the U) prepared with low S_{BET} powders may be due to easier and faster

interactions between the dispersant molecules and the HA particles. For a similar mixing energy, a longer mixing time is required to cover a greater surface area. In addition, powder attrition during mixing/grinding is much more severe for low S_{BET} powders (e.g., 2.5 times faster for 4.0 m²/g powder than for 17.6 m²/g one), which induces the formation of new surfaces that may be very favorable for the adsorption of dispersant molecules [19]. Nonetheless, this faster increase in S_{BET} destabilizes faster suspension due to a lack of dispersant molecules in relationship to the powder surface, as shown in Fig. 10C (right side). This behavior is shown in Fig. 5 and explains the earliest increase in the slurry viscosity shown in Fig. 4 (right side of the U) when the initial S_{BET} decreased.

In general, slurry deflocculation is sensitive to a lack or excess of the dispersing agent [20–22], as confirmed by the results shown in Fig. 5. Additionally, the slurry deflocculation state is a function of the powder S_{BET} . As the powder S_{BETini} increased, the dispersant concentration range of stability decreased (e.g., at least 4 units of stability for the powder at 4.0 m²/g and only 0.7 units for $S_{BET} = 17.6$ m²/g, Fig. 5). All of these observations are shown in Fig. 11.

Three main factors could explain the stability difference observed between the suspensions prepared with the 4.0 m²/g and 17.6 m²/g HA powders. These factors include the short range interactions between the particles, the particle concentration in the suspension and the dispersing agent concentration in the aqueous phase. All of these factors are related to the particle size. Indeed, assuming that the HA particles are spherical, and by means of Eq. 1 [23,24], the equivalent diameter (\varnothing_{eq}) of the elementary particles is equal to approximately 260 nm and 80 nm after mixing/grinding for the lowest (4.0 m²/g) and highest (17.6 m²/g) S_{BETini} , respectively.

$$\varnothing_{eq} = \frac{6}{\rho \times S_{BET}} \quad (1)$$

with \varnothing_{eq} the equivalent diameter of the powder elementary particles, ρ the material bulk density and S_{BET} the powder specific surface area.

However, below 1 μ m, the interactions between the particles are dominated by short-range forces (e.g., van der Waals, electrostatic, steric, electrosteric and depletion forces) that tend to increase in importance as the particle diameter decreases. Therefore, more short-range interactions occur between 80 nm particles than 260 nm particles. Moreover, for the same dry matter content, approximately 30 times more 80 nm particles than 260 nm particles must be dispersed. This result is consistent with a higher dispersant concentration being required for deflocculation of the suspensions containing 80 nm particles compared to those containing 260 nm particles (Fig. 5). For example, a concentration of 3 mg/m² (considering powders S_{BETfin}) is equivalent to a concentration of 8.2 and 25.5 mg of dispersant per mL of water for slurries prepared with the 4.0 and 17.6 m²/g powders, respectively. Based on the relatively high molar weight (10000–16000 g/mol) and chain length (approx. 50–80 nm) of the dispersant molecules, these high dispersant concentrations in the aqueous phase most likely contribute to slurry destabilization.

The developed mixing/grinding method and proposed slurry formulation in this study may constitute an improvement in current slurry preparation. For example, Sadeghian et al. observed that a slurry prepared with a 4.6 m²/g HA powder and a dry matter content of 75% (w/w) had a viscosity of approximately 360 mPa s at 200 s⁻¹ [22], which is 7 times higher than the optimal value reported herein for an equivalent slurry composition (i.e., powder S_{BET} , dry matter content) and process measurement.

After the slurry preparation process was optimized, the evaluation of their formulation on the resulting bioceramics was carried out via impregnation of complex-shaped molds. The micro-CT observations of the bioceramics reveal that (i) mold impregnation

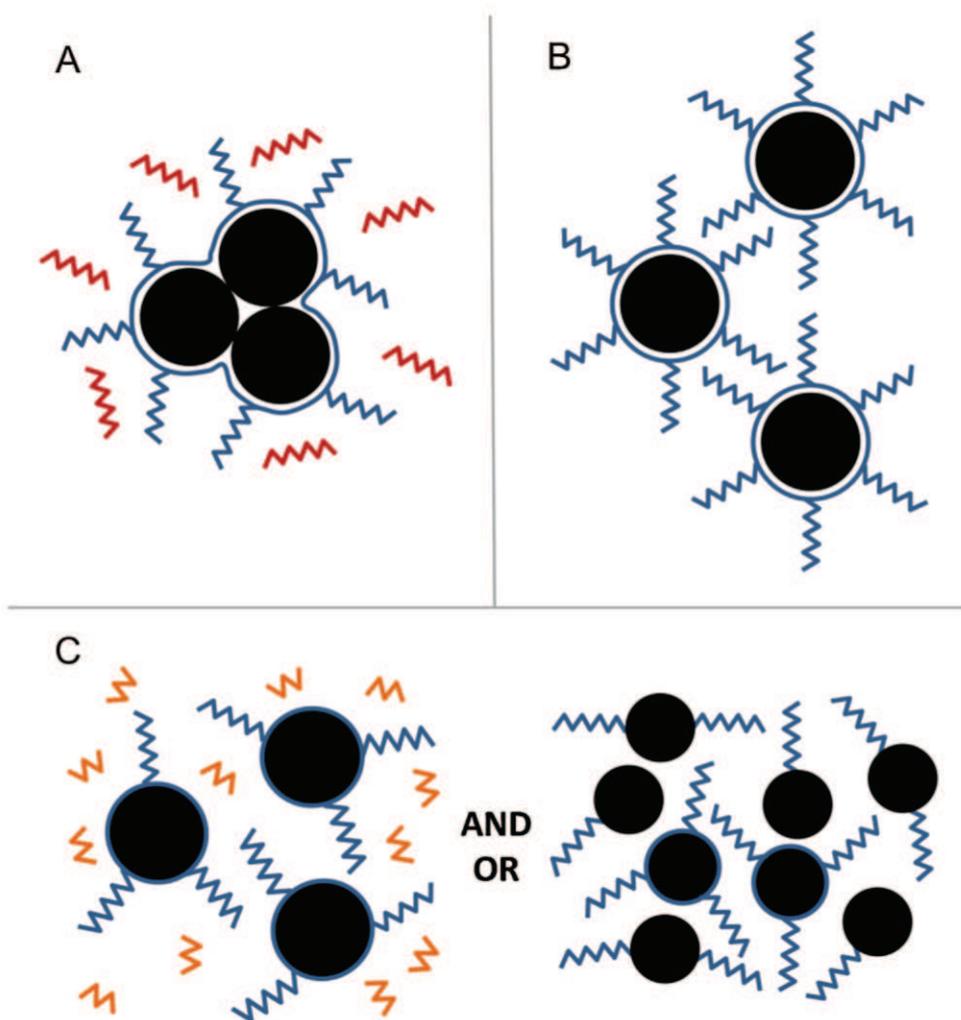


Fig. 10. Schematic representation of the slurry dispersion state depending on the slurry mixing/grinding energy provided with (A.) a low mixing/grinding energy that does not allow for efficient particles dispersion, (B.) a suitable mixing/grinding energy leading to optimal deflocculation and (C.) the results from a high mixing/grinding energy that was too high (i.e., degradation of the dispersant molecules (heat, mechanical stress) and/or an increase of the powder S_{BET} (attrition)). The blue polymeric chains, which are bound to the particles, represent the active dispersant molecules, the red ones represent the unbound dispersant molecules, and the orange ones represent the degraded dispersant molecules. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

was successful regardless of the slurry formulation, (ii) bioceramic shrinkage (drying, sintering) was isotropic, which allows for a good correspondence between the produced bioceramics and their CAD model (for more information, please refer to Charbonnier et al. [11]) and (iii) bubbles, regardless of their origin, lead to cracks in the bioceramic structure due to differential sintering induced stress. Focusing on bubble formation, as observed macroscopically in bioceramics 3, 6, 7, and 8 (Fig. 7), the low viscosity of the slurries (≤ 80 mPa s) cannot explain their trapping in the bioceramic structure. Indeed, whether slurry preparation or impregnation was the cause of bubbles, the latter would have been observed in all samples, which is not the case. For instance, for an equivalent low viscosity (around 20 mPa s), samples 1 and 2 are bubbles-free whereas some are present in sample 3. Moreover, no bubbles were observed in slurries before impregnation, and inside the dried slurry out of the mold (see Supplementary Fig. S2). Finally, the sintering step cannot lead to such large and round pores (Fig. 8). Thereby, a possible explanation of the bubbles formation may be found in the phenomena involved in slurry drying. Slurry drying corresponds to a loss of water from evaporation or absorption by the molds or the impregnation support. This water loss must be

concomitant with an inflow of the surrounding suspension (see Supplementary Fig. S2) to obtain the highest possible density of the green. Whether this drain phenomenon is limited, local and premature slurry drying will occur, leading to the formation of voids. The limitations of slurry draining inside the mold are related to the previous explanations regarding slurry destabilization/flocculation and especially to a critical increase of the dispersant concentration in the aqueous phase when water is drained from the slurry.

In the current case, the bioceramics produced from slurries that were prepared with 4.0 and 8.1 m²/g powders and a moderate dry matter content (60–72% (w/w)) exhibited excellent quality (e.g., no defect, no deformation) and a wide range of possible microstructures, from high to low amount of micropores (Fig. 8). Thus, this ceramic process enables the control of the macroporous design and the micropores density.

5. Conclusions

Bioceramic scaffolds with complex architectures were successfully produced via impregnation of 3D-printed wax molds with a wide range of HA suspension formulations. More important than

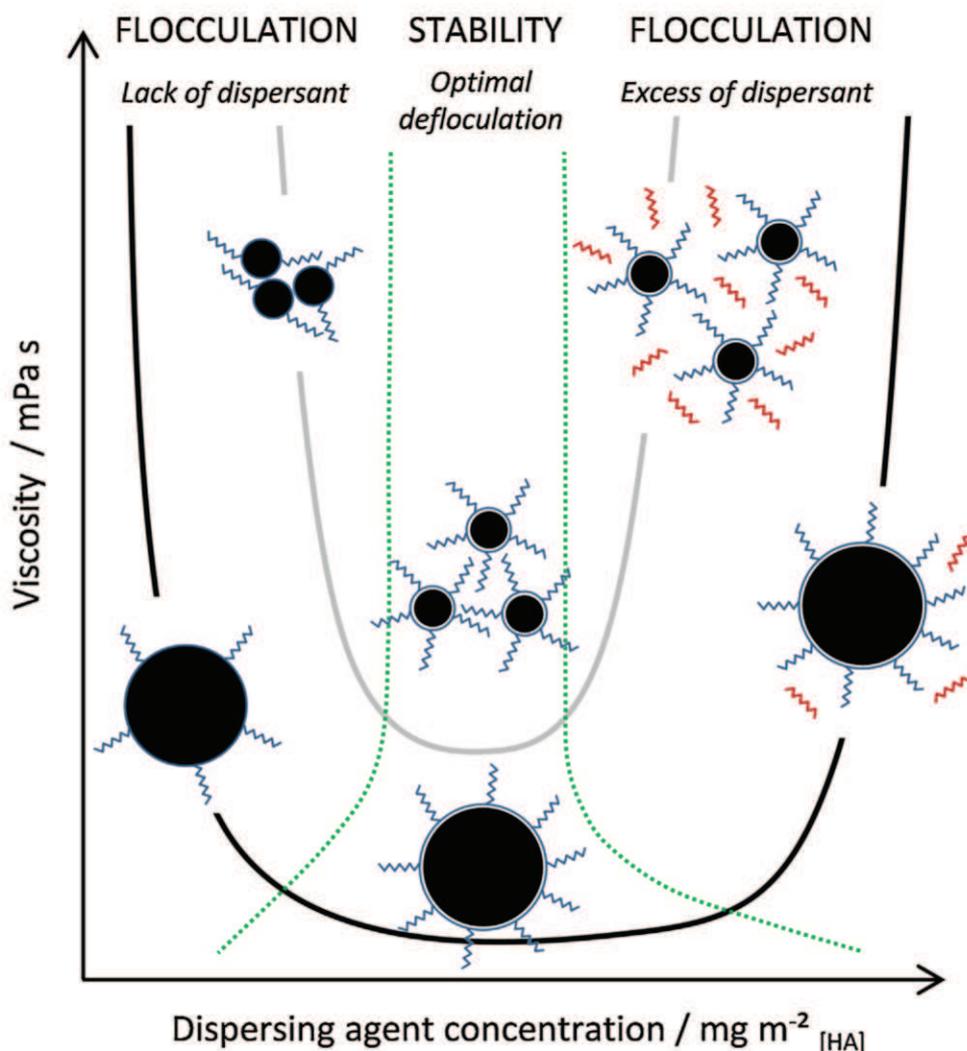


Fig. 11. Illustration of HA slurry deflocculation states and causes as a function of the Darvan C-N dispersing agent content for powders with a high ($17.6 \text{ m}^2/\text{g}$, grey curve) and low ($4.0 \text{ m}^2/\text{g}$, black curve) initial specific surface area. The blue polymeric chains, which are bound to the particles, represent the active dispersant molecules, and the red ones are unbound dispersant molecules that can destabilize the suspension. The area between the curves in green dots is considered the zone of optimal deflocculation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the suspension viscosity, the suspension-drying rate in the wax mold is the main parameter that controls the final quality of the bioceramic. Indeed, all of our results suggest that water loss from the slurry in contact with the mold walls that is too quick induces local flocculation then setting, resulting in the formation of bubbles. The latter lead to the development of cracks during bioceramic sintering due to differential phenomena.

Even if this study was carried out with HA, this low cost mold manufacturing process that is associated with the versatility of the impregnation process will lead to the development of bioceramics with a wide range of phases (e.g., aluminum or zirconium oxides, tricalcium phosphate, and substituted HA) for an even larger application scope. Finally, the development of porous application-specific bioceramics with controlled and standardized architectures using this process will enable biological assessments in a reproducible way to advance bone tissue regeneration.

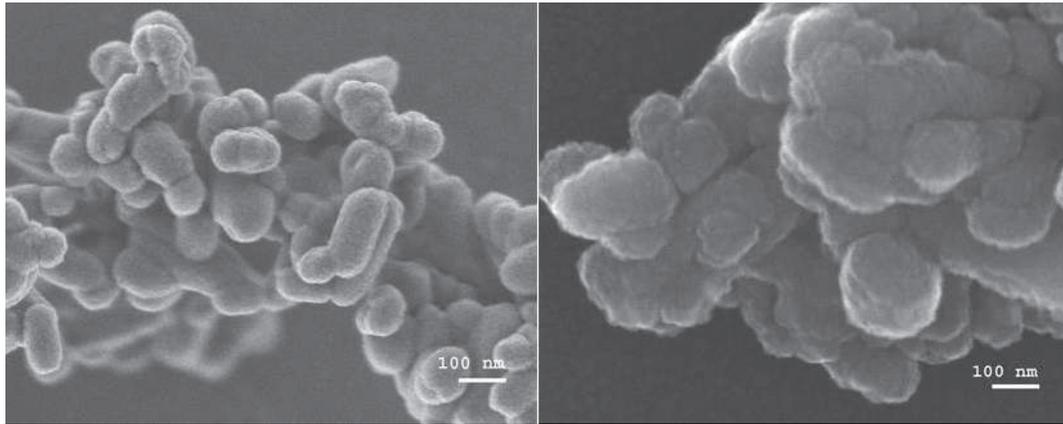
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2016.06.005>.

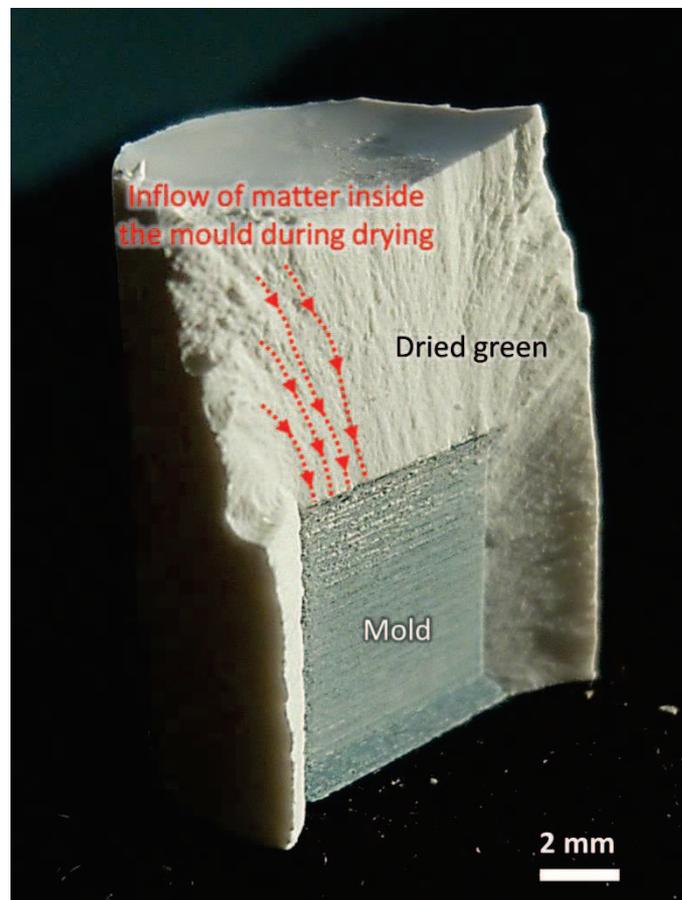
References

- [1] Y. Koren, *The Global Manufacturing Revolution: Product-Process-Business Integration and Reconfigurable Systems*, vol. 80, John Wiley & Sons, 2010.
- [2] C.K. Prahalad, M. Krishnan, *The new age of innovation*, New York, (2008).
- [3] D. Logeart-Avramoglou, et al., Engineering bone: challenges and obstacles, *J. Cell. Mol. Med.* 9 (1) (2005) 72–84.
- [4] U. Kneser, et al., Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view, *J. Cell. Mol. Med.* 10 (1) (2006) 7.
- [5] L. Podshivalov, A. Fischer, P.Z. Bar-Yoseph, On the road to personalized medicine: multiscale computational modeling of bone tissue, *Arch. Comput. Methods Eng.* 21 (4) (2014) 399–479.
- [6] M. Lasgorceix, E. Champion, T. Chartier, Shaping by microstereolithography and sintering of macro-micro-porous silicon substituted hydroxyapatite, *J. Eur. Ceram. Soc.* 36 (4) (2016) 1091–1101.
- [7] C.M. Bidan, et al., How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth, *PLoS One* 7 (5) (2012) e36336.
- [8] M. Rumpfer, et al., The effect of geometry on three-dimensional tissue growth, *J. R. Soc. Interface* 5 (27) (2008) 1173–1180.
- [9] M. Schumacher, et al., Static and dynamic cultivation of bone marrow stromal cells on biphasic calcium phosphate scaffolds derived from an indirect rapid prototyping technique, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (11) (2010) 3039–3048.
- [10] J. Malmström, et al., Bone ingrowth in zirconia and hydroxyapatite scaffolds with identical macroporosity, *J. Mater. Sci.* 19 (9) (2008) 2983–2992.
- [11] B. Charbonnier, et al., Porous bioceramics produced using an additive manufacturing machine: ceramic architectural control and process limitations, *Adv. Eng. Mater.* (2016) (Submitted in May).
- [12] J. Yu, J. Yang, Y. Huang, The transformation mechanism from suspension to green body and the development of colloidal forming, *Ceram. Int.* 37 (5) (2011) 1435–1451.

- [13] E. Champion, Sintering of calcium phosphate bioceramics, *Acta Biomater.* 9 (4) (2013) 5855–5875.
- [14] M. Descamps, et al., Manufacture of macroporous [beta]-tricalcium phosphate bioceramics, *J. Eur. Ceram. Soc.* 28 (1) (2008) 149–157.
- [15] S. Padilla, et al., Processing and mechanical properties of hydroxyapatite pieces obtained by the gelcasting method, *J. Eur. Ceram. Soc.* 25 (4) (2005) 375–383.
- [16] J. Locs, et al., Ammonium hydrogen carbonate provided viscous slurry foaming—a novel technology for the preparation of porous ceramics, *J. Eur. Ceram. Soc.* 33 (15) (2013) 3437–3443.
- [17] A. Tsetsekou, C. Agrafiotis, A. Milias, Optimization of the rheological properties of alumina slurries for ceramic processing applications Part I: slip-casting, *J. Eur. Ceram. Soc.* 21 (3) (2001) 363–373.
- [18] D. Bernache-Assollant, et al., Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ I: calcination and particle growth, *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2) (2003) 229–241.
- [19] K.S. Hong, Synthesis of particle dispersion, *Encycl. Surf. Colloid Sci.* 8 (2006) 6208–6220.
- [20] F. Lelièvre, D. Bernache-Assollant, T. Chartier, Influence of powder characteristics on the rheological behaviour of hydroxyapatite slurries, *J. Mater. Sci.* 7 (8) (1996) 489–494.
- [21] S.-M. Seo, et al., Effect of milling time on the viscosity of hydroxyapatite suspension, *Curr. Appl. Phys.* 12 (Suppl. 2) (2012) S71–S75.
- [22] Z. Sadeghian, J.G. Heinrich, F. Moztarzadeh, Preparation of highly concentrated aqueous hydroxyapatite suspensions for slip casting, *J. Mater. Sci.* 40 (17) (2005) 4619–4623.
- [23] S. Lowell, J.E. Shields, *Powder Surface Area and Porosity*, vol. 2, Springer Science & Business Media, 2013.
- [24] D. Houivet, et al., Ultrafine grinding of oxide powders with a controlled viscosity of slurries, *Adv. Eng. Mater.* 13 (7) (2011) 609–615.



Supplementary Fig. S1. Scanning electron micrographs of HA particles calcined at 795°C for 2 hours under air (SBET=17.6 ± 0.4 m²/g); images obtained using a Scanning Electron Microscopy (SEM-FEG, JEOL JSM-6500F, USA)



Supplementary Fig. S2. Illustration of the drainage phenomena observed during slurry drying.

Chapitre III. Vers une caractérisation plus précise des hydroxyapatites carbonatées

Dans l'optique de produire des biocéramiques adaptées à une application visée, l'ajustement de la bio-réactivité peut être réalisé via la modulation de leur chimie et/ou de leur architecture ; ce dernier point a fait l'objet du chapitre II précédent. Le chapitre III traite quant à lui des substitutions d'intérêts biologiques dans la maille apatitique, et plus particulièrement des modifications chimiques par des ions carbonate (CO_3^{2-}).

Il a été montré que l'introduction d'ions carbonate dans la structure de l'HA améliore sa bioréactivité, telles que ses propriétés de biodégradation ou encore d'ostéoconduction [124, 164-166]. Un point intéressant est que ces modifications de propriétés des hydroxyapatites carbonatées (CHA) sont fonction du taux d'ions carbonate présents dans la maille de l'HA [122, 167]. Cependant la maîtrise de ce taux n'est pas chose aisée, les ions carbonate pouvant occuper deux sites cristallographiques de l'HA : les sites hydroxyde (OH, dit sites A) et phosphate (PO_4 , dit sites B). En outre, les méthodes de caractérisation actuellement disponibles ne permettent pas une quantification fiable du taux de substitution sur chacun de ces sites. Par conséquent, il est pour l'instant impossible de déterminer l'influence respective des ions carbonate de type A et de type B sur les propriétés des CHA en milieu biologique et sur la réponse biologique induite.

Dans ce contexte, nous avons voulu savoir s'il était possible de développer une méthode de quantification fiable des ions carbonate en substitution des ions hydroxyde et phosphate. Pour cela nous nous sommes appuyés sur la spectroscopie par infrarouge (IR), technique de caractérisation très largement utilisée pour ce type de composés et disponible dans de très nombreux laboratoires de recherche. Plus spécifiquement, nous nous sommes intéressés à l'amélioration et à la standardisation de méthodes existantes. Notre stratégie a été basée sur (i) l'ajout au sein de la poudre à analyser d'un composé de référence, et (ii) la mise en place de protocoles d'analyse spectrale des données IR après acquisition (e.g., « curve fitting »).

III.1. L'hydroxyapatite et ses substitutions

Les apatites constituent une famille de minéraux définie par la formule chimique générale $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$ dans laquelle Me représente généralement un cation bivalent, XO_4 un groupement anionique trivalent et Y un anion monovalent. L'hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, communément appelée hydroxyapatite (HA), en est le membre le plus emblématique. La structure apatitique accepte un grand nombre de substitutions [168-171], qui, en conséquence, modifient ses propriétés intrinsèques d'où une utilisation des apatites dans des domaines aussi variés que le stockage, l'énergie, la dépollution ou encore le biomédical.

III.1.1. L'hydroxyapatite phosphocalcique : généralités

III.1.1.1. Structure de l'hydroxyapatite

L'HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) a une composition théorique massique de 39,68 % de calcium, 18,45 % de phosphore et un ratio molaire Ca/P égal à 1,667. Elle cristallise dans le système hexagonal et plus précisément sous le groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$; ses paramètres de maille a , c et γ étant respectivement égaux à 9,418 Å, 6,884 Å et 120°, d'où un volume de maille égal à 528,80 Å³ (International Center for Diffraction Data-Powder Diffraction Files, ICDD-PDF 09-432).

Dans le cas concret de l'HA, les tétraèdres PO_4 définissent le squelette de la structure cristallographique. En effet, à l'inverse des sites Ca et OH, aucune lacune n'a jamais été mise en évidence sur ces sites [172, 173]. Ce squelette définit au sein de la structure deux types de tunnel notés I et II, comme représentés sur la Figure III-1 (page 64).

Le tunnel de type I, de diamètre égal à environ $2,5 \text{ \AA}$, est occupé par des cations Ca_I . Les sites de ces cations Ca_I , au nombre de 4 par maille, présentent une symétrie C_h (i.e. axe de rotation combiné à un plan de réflexion qui lui est perpendiculaire). Ils sont placés sur les axes ternaires et sont entourés de neuf atomes d'oxygène provenant des groupements XO_4 (PO_4 , trois O(1), trois O(2) et trois O(3)).

Le tunnel de type II, de diamètre compris entre 3 et $4,5 \text{ \AA}$, contient le reste des cations Ca, soit 6 cations Ca_{II} par maille. Les sites de ces derniers sont localisés à la périphérie du tunnel et présentent une symétrie C_s . Groupés trois par trois au niveau $z = \frac{1}{4}$ et $z = \frac{3}{4}$ de la maille, ils forment des triangles équilatéraux décalés de 60° autour de l'axe sénaire hélicoïdal (axe c de la maille hexagonale). Avec une coordinance égale à 7, ils sont entourés de six atomes d'oxygène des groupements PO_4 , un O(1), un O(2), quatre O(3)) et d'un atome d'oxygène issu d'un groupement OH.

Finalement, les sites anioniques OH sont localisés le long de l'axe sénaire du réseau et occupent les niveaux $z = \frac{1}{4}$ et $z = \frac{3}{4}$. Ils possèdent une grande mobilité du fait de leur localisation dans le grand tunnel de type II.

Une telle structure cristalline permet de nombreuses substitutions au sein de son réseau.

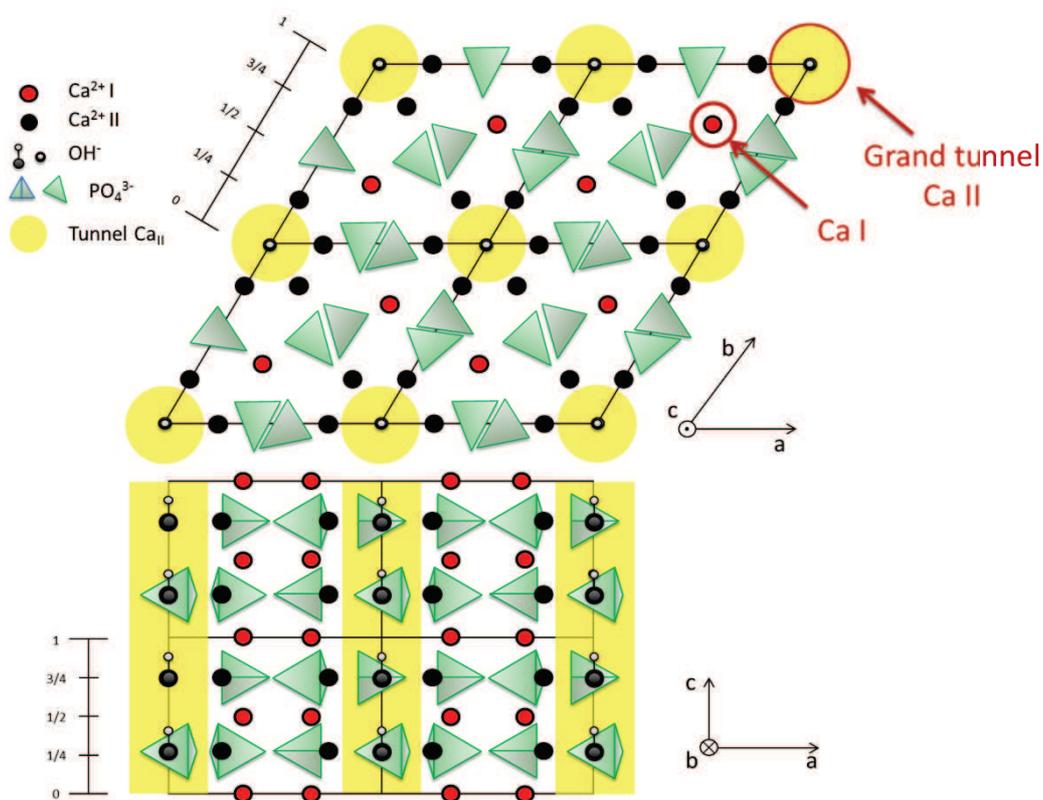


Figure III-1. Projection de la structure cristalline de l'hydroxyapatite selon les plans (001) et (010) (courtoisie Antoine Boyer [174])

Par la suite, nous emploierons les termes d'ions « hydroxyde » et de sites « hydroxyde » pour décrire la structure des hydroxyapatites. En revanche, nous parlerons de vibration des groupements « hydroxyle » lors des caractérisations par spectroscopie infrarouge.

III.1.1.2. Groupements ioniques caractéristiques

La spectroscopie infrarouge (IR) est couramment utilisée pour obtenir des informations sur les molécules ou groupements moléculaires présents au sein d'un échantillon mais aussi sur leur environnement chimique : elle fournit des informations sur l'organisation structurale de composés gazeux, liquides ou solides, organiques ou inorganiques, amorphes ou encore cristallins.

Cette technique d'analyse est basée sur la réponse des molécules lorsqu'elles sont soumises à une excitation énergétique : les liaisons interatomiques des molécules, initialement sous leur état fondamental au niveau d'énergie vibrationnelle v_0 , sont susceptibles de changer de mode normal vibratoire sous l'effet d'une irradiation, i.e., d'atteindre un niveau d'énergie vibrationnelle supérieur. Physiquement, le passage à un niveau d'énergie vibrationnelle supérieur se traduit par une « vibration interne » des molécules dans le plan (e.g., étirement/ "stretching", cisaillement/ "scissoring", bascule/ "rocking") ou hors du plan (e.g., torsion/ "twisting", agitation/ "wagging"). Ces niveaux d'énergie sont fixés intrinsèquement par la nature de la molécule (i.e., masses des atomes, nature des liaisons, forces interatomiques) et par les contraintes imposées par les atomes voisins (i.e., environnement ionique). Ainsi, l'énergie (ou la fréquence) absorbée par une molécule lorsqu'elle change de mode normal vibratoire est caractéristique de sa nature chimique et de son environnement.

Les bandes caractéristiques des modes de vibration des groupements ioniques de l'HA et leur attribution sont présentées sur la Figure III-2 et dans le Tableau III-1. Ce dernier fait aussi état des bandes caractéristiques d'éventuels résidus de synthèse ou d'impuretés pouvant accompagner l'HA lors de sa synthèse par précipitation en voie humide.

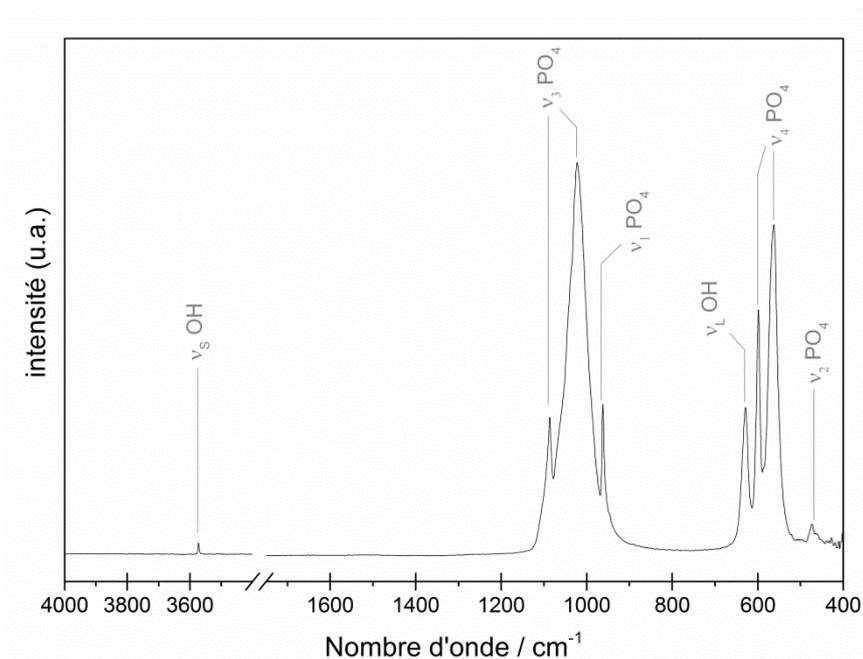


Figure III-2. Spectre IR caractéristique d'une hydroxyapatite stœchiométrique. Les modes de vibration v sont décrits dans le Tableau III-1.

Tableau III-1. Bandes IR caractéristiques des hydroxyapatites synthétisées par voie aqueuse [175]

Bandes IR (cm ⁻¹)	Intensité	Attribution		
3700 - 3000	moyenne	H-O-H, H ₂ O adsorbée		
3640 et 3540	faible	O-H, des groupes Ca(OH) ₂		
3580	épaulement	O-H, vibration de valence symétrique des groupes OH	v ₅	
1630	moyenne	H ₂ O et CO ₂ adsorbés		
1400 – 1380 *	forte	N-O des groupes NO ₃		
1500 - 1350	faible	C-O des groupes CO ₃		v ₃
1200 - 1180	épaulement	P-OH, groupes HPO ₄		
1120 - 1020	forte	P-O, élongation antisymétrique des groupes PO ₄	v ₃	
965 - 960	moyenne	P-O, élongation symétrique des groupes PO ₄		v ₁
900 - 850	faible	C-O des groupes CO ₃		v ₂
880 - 865	faible	Elongation P-OH des groupes HPO ₄		
820 *	faible	N-O des groupes NO ₃		
630	épaulement	O-H mouvement de libration des groupes OH		v _L
600 - 550	forte	P-O, déformation antisymétrique des groupes PO ₄		v ₄
460	faible	P-O, déformation symétrique des groupes PO ₄		v ₂

*Résidus nitrés de synthèse présents dans une poudre immédiatement après synthèse ; la majorité des nitrates étant éliminés par traitement thermique de la poudre à faible température (T ≈ 400 °C).

III.1.2. Les substitutions d'intérêt biologique dans l'hydroxyapatite

Comme introduit précédemment, la structure cristallographique de l'HA peut accueillir de nombreuses substitutions ioniques, et ce, sur l'ensemble des sites définis à la section III.1.1.1 (page 63). Ainsi, les cations bivalents Ca²⁺ peuvent non seulement être remplacés par des cations bivalents (e.g., Sr²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺), mais également par des cations monovalents (e.g., Na⁺, K⁺) ou trivalents (e.g., La³⁺, Ga³⁺, Eu³⁺). De même, les anions PO₄³⁻ trivalents peuvent être remplacés par des groupements bivalents (e.g., CO₃²⁻, SO₄²⁻, HPO₄²⁻), trivalents (e.g., AsO₄³⁻, VO₄³⁻), ou tétravalents (e.g., SiO₄⁴⁻). Enfin, les groupements OH⁻ peuvent également être substitués par des ions monovalents (e.g., F⁻, Cl⁻) ou bivalents (e.g., CO₃²⁻, O²⁻, S²⁻). Néanmoins, la substitution des ions Ca²⁺, PO₄³⁻ et OH⁻ par des ions de valence différente est limitée par (i) la taille de ces derniers, et (ii) la nécessité d'une compensation de charge qui en découle (i.e., électroneutralité de la structure) [176]. Celle-ci est obtenue par des substitutions couplées (e.g., CO₃²⁻ et SiO₄⁴⁻ comme supposé par M. Palard [177]) ou par la création de lacunes cationiques (sites Ca²⁺) et/ou anioniques (sites OH⁻). Rappelons que les sites PO₄³⁻ (sites B) sont toujours saturés à 6 ions par maille quels que soient les écarts à la stœchiométrie engendrés par les multiples substitutions [172, 173].

L'incorporation d'espèces ioniques dans le réseau de l'HA affecte les propriétés physico-chimiques intrinsèques de l'HA et par voie de conséquence ses « performances » en milieu biologique [7, 97, 98, 176]. Par exemple le magnésium, présent naturellement dans la phase inorganique de l'os (≈ 0,7 % en masse), est connu pour jouer un rôle fondamental dans le métabolisme osseux. Outre l'effet biologique positif de la libération de magnésium au sein d'un défaut osseux [7, 176], les hydroxyapatites « magnésiées » (Mg-HA) ont démontré une ostéointégration améliorée par rapport à l'HA du fait notamment d'une biodégradation supérieure [176]. D'autres exemples de substitutions d'intérêt biologique sont présentés dans le Tableau III-2.

Pour plus d'informations, les revues de Shepherd et al. [98, 178], Boanini et al. [7], Šupová [97] et Cacciotti [176] traitent en détail de l'influence de nombreuses substitutions ioniques d'intérêt biologique dans l'HA.

Tableau III-2. Exemples de substitution dans la structure de l'HA [7, 97, 98, 176]

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Substitutions	Formules chimiques théoriques
Site Ca^{2+}	Ag^+	$\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}$
	Mg^{2+}	$\text{Ca}_{10-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
	Sr^{2+}	$\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
	Zn^{2+}	$\text{Ca}_{10-x}\text{Zn}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Site B (phosphate)	CO_3^{2-}	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$
	HPO_4^{2-}	$\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$
	SiO_4^{4-}	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$
Site A (hydroxyde)	Cl^-	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{Cl}_{2x}$
	F^-	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$
	CO_3^{2-}	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}(\text{CO}_3)_x$
Mixte Site A/B	CO_3^{2-}	$\text{Ca}_{10-x+u}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x+2u-2y}(\text{CO}_3)_y$

Également présents dans la phase inorganique de l'os (entre 3 et 8 % en masse), préférentiellement en site B [179-183], les ions carbonate peuvent aussi se substituer aux ions hydroxyde (site A) de cette apatite biologique. L'introduction d'ions carbonate dans la maille augmente la solubilité de l'HA comme confirmé par les expériences *in vitro* et *in vivo* menées par Barralet et al. [122] et Nelson et al. [165]. Une biorésorption plus importante de céramiques en CHA par rapport à des céramiques en HA a également été observée *in vitro* et *in vivo* [124, 167, 184]. Au final, la biodégradation (i.e., solubilité et résorption ostéoclastique) des CHA est d'autant plus importante (thermodynamiquement) que le taux d'ions carbonate est élevé. Ainsi, G. Spence propose de contrôler la vitesse de résorption des céramiques synthétiques en CHA en maîtrisant leur teneur en carbonate [124]. Par déduction, il serait ainsi possible d'adapter la dégradation de ces biocéramiques à l'application biologique considérée. De plus, les ions carbonate incorporés dans l'HA amélioreraient l'ostéointégration, l'ostéoconduction et la bioactivité du matériau [164, 166, 184-187]. Pour ces raisons, les sections suivantes de ce chapitre vont traiter de ces CHA, de leur synthèse au développement de méthodes de caractérisation précises de leur teneur en ions carbonate.

III.2. Les hydroxyapatites phosphocalciques carbonatées

Comme précédemment évoqué, l'incorporation d'ions carbonate dans la maille apatitique peut s'effectuer en site hydroxyde (site A : C_AHA) ou phosphate (site B : C_BHA). Lorsque les ions carbonate occupent simultanément les deux sites, on parle alors d'hydroxyapatite carbonatée mixte de type A/B, notée C_{AB}HA .

De nombreuses méthodes de synthèse des CHA existent et font intervenir des mécanismes réactionnels différents ; les deux principales méthodes étant la synthèse en voie humide [173, 188-190] et les réactions « solide-solide » [191, 192]. Les modèles théoriques de structures cristallines et de compensation de charge proposés s'en trouvent par conséquent différents, tels que ceux proposés par Fleet et Liu pour des CHA obtenues par voie « solide-solide » [191-194] ou ceux proposés par Elliott pour des réactions en voie aqueuse [173]. Nous nous focaliserons dans le cadre de ce travail, et plus particulièrement de ce rappel bibliographique, sur les CHA issues de précipitation en milieu aqueux. Lors de la synthèse de CHA par voie humide, il est communément accepté que les ions carbonate sont majoritairement inclus en site B, i.e., en substitution des ions phosphate plutôt qu'hydroxyde (par Z. Legeros dans sa thèse en 1967 [195]). A l'inverse, la carbonatation en site A s'effectue lors des traitements thermiques de ces hydroxyapatites sous CO_2 (R. Wallaey dans les années 1950, se référer à [173, 196]).

III.2.1. Structure des hydroxyapatites carbonatées

Les hydroxyapatites carbonatées de type A (C_AHA) peuvent être décrites par la formule suivante [197] :



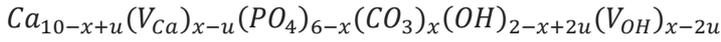
dans laquelle z ($0 \leq z \leq 1$) représente le coefficient stœchiométrique d'ions carbonate en substitution des ions hydroxyde ($\text{CO}_3^-_{\text{OH}}$). Cette substitution induit la formation de lacunes en site hydroxyde V_{OH}^+ pour conserver l'électroneutralité de la structure. Du fait du remplacement des ions hydroxyde ($r = 0,97 \text{ \AA}$ [198]) par des ions carbonate de rayon ionique plus important ($r = 1,31 \text{ \AA}$ [198]), la maille de l'hydroxyapatite stœchiométrique conserve son groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$ mais subit une contraction de son axe c et une élongation importante de son axe a [181, 182, 199]. Cette distorsion de la maille est d'autant plus importante que le taux d'ions carbonate en site A (notés par la suite $\text{CO}_{3\text{A}}$) augmente. Notons également une transition de la structure cristalline de la C_AHA d'une symétrie hexagonale $\text{P6}_3/\text{m}$ à une symétrie pseudo hexagonale avec un groupe d'espace monoclinique lorsque z dépasse les 0,9 [196].

Les hydroxyapatites carbonatées de type B (C_BHA) peuvent, quant à elles, être décrites par la formule suivante [200] :



dans laquelle x ($0 \leq x \leq 2$) représente la quantité d'ions carbonate en site phosphate ($\text{CO}_3^+_{\text{PO}_4}$). Dans ce cas, l'électroneutralité est conservée par la création de lacunes en site hydroxyde V_{OH}^+ et calcium $\text{V}_{\text{Ca}}^{2-}$. Le rayon ionique du groupement carbonate ($r = 1,31 \text{ \AA}$ [198], plan) étant plus petit que celui du groupement phosphate ($r = 1,54 \text{ \AA}$ [198], tétragonal), la maille de l'hydroxyapatite stœchiométrique conserve son groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$, mais subit une contraction de son axe a et une élongation de son axe c lors de l'introduction d'ions carbonate en site B (noté par la suite $\text{CO}_{3\text{B}}$) [181, 182, 201, 202].

Une autre formule de la C_BHA , plus complexe, fut également proposée par Labarthe et al. [201] sur la base d'observations expérimentales indiquant que les quantités d'ions Ca^{2+} et OH^- dosées dans les C_BHA étaient toujours supérieures aux quantités théoriques prévues par l'équation précédente (Eq. III-2). Un facteur correctif « u » ($0 \leq 2u \leq x$) fut ainsi introduit dans la formule suivante Eq. III-3 :



Eq. III-3

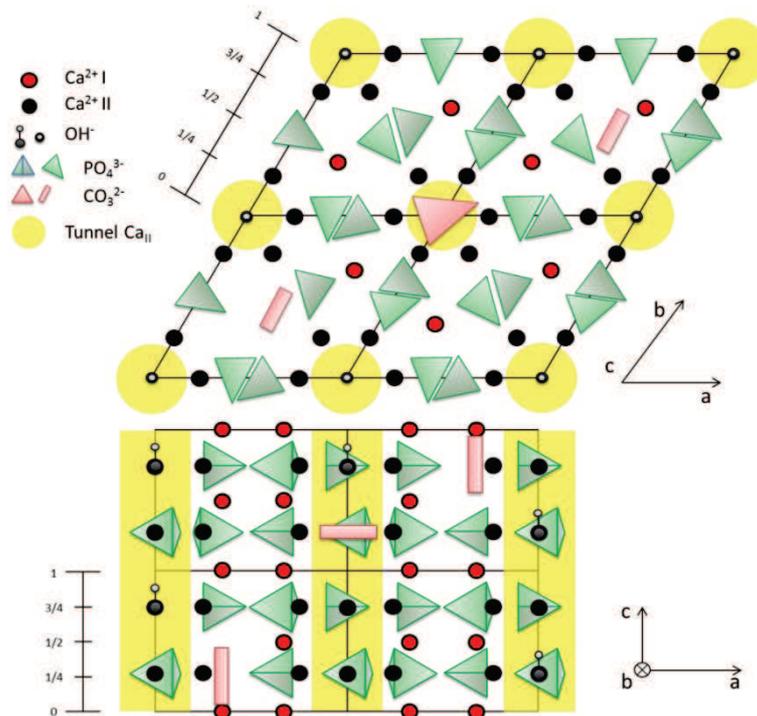
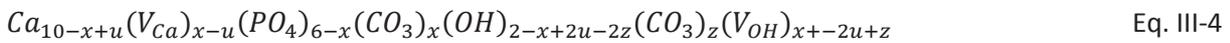


Figure III-3. Projection de la structure d'une CAB-HA selon les plans (001) et (010) (courtoisie Antoine Boyer [174])

Les CHA de type A/B (C_{AB}HA, Figure III-3) pourraient être décrites comme une combinaison des modèles précédents (Eq. III-1 et Eq. III-3) et formalisées par la formule générale Eq. III-4 suivante [200] :



Eq. III-4

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

Ces valeurs de coefficient traduisent l'hypothèse que le nombre maximum de sites A pouvant être occupés par des ions carbonate dépend du nombre de groupements OH_{OH} disponibles, et donc du nombre d'ions carbonate présents en site B. Ici encore, l'électroneutralité est assurée par la création de lacunes en site hydroxyde V_{OH}⁺ et calcium V_{Ca}²⁻. L'évolution des paramètres de maille des C_{AB}HA par rapport à ceux de l'HA stœchiométrique est une fonction du ratio des ions carbonate présents en site A et B. En effet, comme décrit précédemment dans cette section et présenté dans la Figure III-4 l'évolution des paramètres *a* et *c* est opposée selon que le taux de carbonate augmente au niveau des sites A ou B :

- ↗ taux CO₃ A ⇒ ↗ paramètre *a* et ↘ paramètre *c*
- ↗ taux CO₃ B ⇒ ↘ paramètre *a* et ↗ paramètre *c*

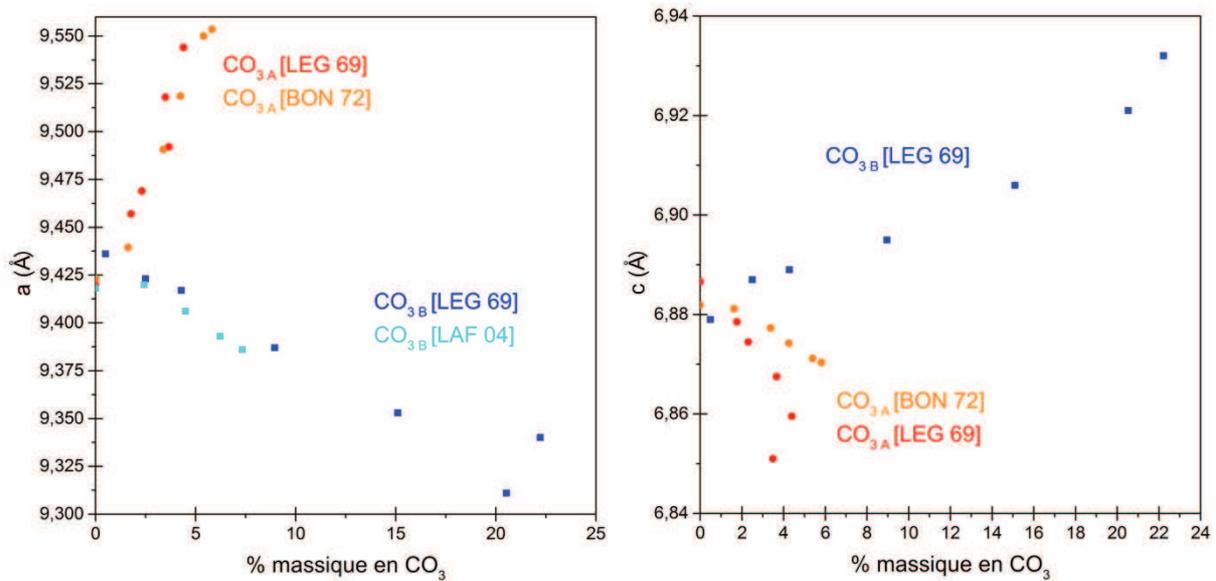


Figure III-4. Évolution des paramètres de maille de l'hydroxyapatite en fonction du site et du taux de substitution en ions carbonate. Seules les évolutions sont comparables, les traitements thermiques (e.g., temps, température) subis par les poudres analysées n'étant pas forcément similaires. Graphiques élaborés selon les données de Legeros et al. [181], Bonel et al. [196] et Lafon et al. [200]

D'un point de vue général, la limite d'incorporation théorique des ions carbonate (i.e., basée sur les Eq. III-1 et III-3 pages 66-67) dans les C_AHA et C_BHA sont respectivement de 5,7 % en masse (soit $z = 1$) et 14,6 % en masse (soit $x = 2$).

III.2.2. Stabilité thermique des hydroxyapatites carbonatées

L'incorporation d'ions carbonate dans la maille de l'HA diminue significativement sa stabilité thermique : sous air ou atmosphère inerte les CHA se décomposent entre 550 et 750 °C suivant le taux de carbonatation [200, 201, 203-205]. Il est néanmoins possible de repousser la température de décomposition des CHA vers des températures plus élevées en effectuant les traitements thermiques sous CO_2 . En revanche, de tels traitements thermiques entraînent inévitablement, comme vu précédemment, une carbonatation des sites A. Notons qu'une description plus complète des phénomènes mis en jeu lors du traitement thermique des CHA est disponible dans la thèse de J.-P. Lafon [200].

III.2.2.1. Échanges ioniques sur les sites A

En fonction de la pression partielle en CO_2 et de la composition initiale de l'hydroxyapatite, les échanges ioniques en site A s'initient à partir de 550-600°C selon l'équation suivante :



L'hydroxyapatite est alors convertie en une C_AHA (Eq. III-6)

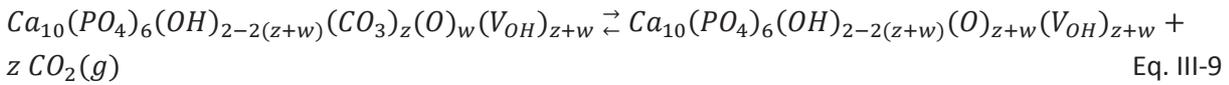


Notons que la température optimale pour la carbonatation des sites A sous CO_2 (P_{CO_2} = pression atmosphérique assimilée à 1 bar) semble proche de 900°C d'après les études de G. Bonel [189, 196].

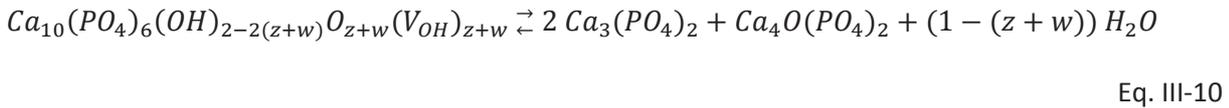
Au-delà de cette température, une compétition a lieu entre les différentes réactions d'échange pouvant s'opérer au niveau des sites A (Eq. III-7 et III-8) :



Bien que ces équilibres Eq. III-7 et Eq. III-8 dépendent de la pression partielle de CO_2 ($p_{CO_2} = \frac{P_{CO_2}}{P^\circ}$) et de vapeur d'eau ($p_{H_2O} = \frac{P_{H_2O}}{P^\circ}$) dans le milieu réactionnel, l'équilibre thermodynamique tend vers la formation d'une oxyhydroxyapatite (lorsque la température dépasse les 950°C) si l'on considère que $p_{CO_2} \approx 1$ bar (=100 KPa) et $p_{H_2O} \leq 3.5$ KPa selon l'équation suivante :



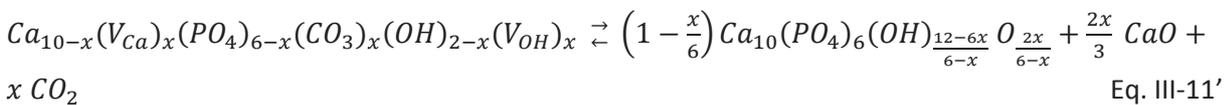
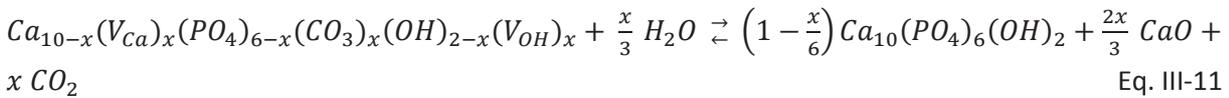
L'oxyhydroxyapatite formée se décompose alors si la température continue d'augmenter comme suit (Eq. III-10) :



N.B : dans le cas d'une C_AHA traitée sous atmosphère inerte, la décarbonatation des sites A s'initie à partir de 650°C [174, 200].

III.2.2.2. Décarbonatation des sites B : stabilité thermique des C_BHA

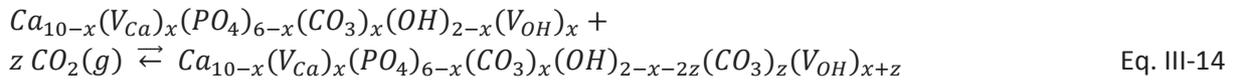
Sous atmosphère inerte ou sous air, les C_BHA commencent à se décomposer à basse température, i.e., vers 650 °C, en fonction de leur taux de carbonatation mais également des pressions partielles de gaz [174, 200]. Plus particulièrement, les réactions de décomposition constituent un équilibre hétérogène solide / gaz entre une (oxy)hydroxyapatite, de la chaux, du dioxyde de carbone et le cas échéant de la vapeur d'eau comme décrit par les réactions générales suivantes (Eq. III-11 et 11') :



Notons que la chaux peut être difficile à détecter via les techniques de caractérisation usuelles (e.g., diffraction des rayons X, spectroscopie IR) du fait (i) d'une limite quantitative (la quantité de chaux pouvant être en dessous des limites de détection des appareils), (ii) de la superposition de pics de diffraction ou bandes IR de la chaux avec celles de l'HA, et (iii) de la possible hydratation (Eq. III-12) ou carbonatation (Eq. III-13) de la chaux :



La pression partielle de CO₂, variable intensive, influence l'équilibre thermodynamique et ainsi la température de décarbonatation des sites B. L'utilisation d'une atmosphère riche en CO₂ au cours du traitement thermique a pour conséquence de décaler la température de décomposition des C_BHA vers des températures plus élevées (jusqu'aux alentours de 1100-1150°C pour $p_{CO_2} = 1$). En contrepartie, le traitement thermique sous CO₂ des C_BHA induit la carbonatation de leurs sites A (comme expliqué section III.2.3.1., Eq. III-5 page 68) et ainsi la formation de C_{AB}HA (Eq. III-14):



III.2.3. Les hydroxyapatites carbonatées : maîtrise et quantification de la carbonatation

En dépit d'importants travaux sur les « performances » biologiques des biomatériaux en hydroxyapatites carbonatées [124, 164, 167, 184, 187, 206, 207], il n'a encore jamais été pris en considération (ou « évalué ») l'influence de chacun des types de carbonate (de site A et de site B) sur celles-ci. Ceci est au moins en partie lié à la complexité de préparation des CHA mais également au fait que les méthodes de quantification des ions carbonate dans la structure apatitique demeurent imprécises.

III.2.3.1. Problématiques liées à la préparation et à la quantification des taux de carbonate

La préparation de céramiques en CHA de composition maîtrisée et précisément caractérisée demeure encore de nos jours délicate du fait des points suivants :

- 1- bien qu'il soit actuellement admis que le site de substitution préférentiel des ions carbonate lors de la synthèse soit le site B, il est à notre connaissance impossible d'obtenir une poudre cristalline ou une céramique en C_BHA sans un traitement thermique sous CO₂, sous peine de décomposition des C_BHA (section III.2.2. page 70). Ce traitement thermique entraîne irrémédiablement une incorporation d'ions carbonate en site A.
- 2- bien qu'inévitable pour l'obtention de céramiques, la carbonatation en site A (cinétique et taux) dépend de la composition initiale des C_BHA, (i.e. du nombre de sites hydroxyde initialement disponibles avant traitement thermique) et des paramètres de traitements thermiques (e.g., température, temps, pression partielle de CO₂ ou de vapeur d'eau). Il n'existe malheureusement pas à notre connaissance d'études traitant de cette problématique.
- 3- les approches classiques de quantification des carbonates utilisant généralement des méthodes destructives (e.g., décomposition, dissolution), ne permettent pas la différenciation des CO_{3A} et CO_{3B}. Pour pallier ce problème, des méthodes de quantification sélective des ions carbonate par spectroscopie vibrationnelle (e.g., IR, Raman) ont été développées. Toutefois, ces méthodes sont encore relativement imprécises ou soumises à d'importants biais, comme détaillé dans la section III.2.3.3 (page 74).

III.2.3.2. Détection des ions carbonate par spectrométrie IR

La Figure III-5 présente les modes normaux de vibration de l'ion carbonate à l'état libre. La plupart de ces modes sont visibles en spectroscopie IR sauf le mode ν_1 . Il y a ainsi trois grands domaines de vibration du groupement carbonate détectables en IR vers 1415 cm^{-1} (ν_3), 879 cm^{-1} (ν_2), et 680 cm^{-1} (ν_4).

Mode	Description	Symmetry	Selection rules	Frequency (cm^{-1})
ν_1	Symmetric stretch	A_1'	Raman	1063
ν_2	Out-of-plane bend	A_2''	Infrared	879
ν_3	Asymmetric stretch	E'	Infrared+Raman	1415
ν_4	In-plane bend	E'	Infrared+Raman	680

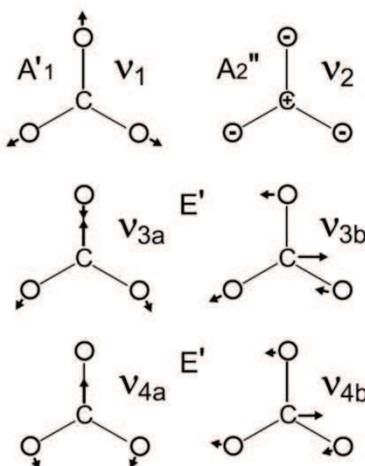


Figure III-5. Modes normaux de vibration de l'ion carbonate à l'état libre [208-211] (courtoisie M.E. Fleet [193]) avec ν_1 et ν_3 une élongation respectivement symétrique et asymétrique des liaisons de la molécule, ν_2 et ν_4 un mouvement de bascule respectivement hors et dans le plan. Le tableau récapitule également les modes de vibrations détectables en spectroscopie infrarouge et Raman.

La Figure III-6 compare les spectres IR d'une HA, d'une C_A HA et d'une C_{AB} HA.

Outre la diminution des bandes caractéristiques des ions hydroxyde (ν_L et ν_S respectivement à 630 et 3580 cm^{-1}), un élargissement du massif caractéristique des modes de vibration ν_1 et ν_3 des groupements PO_4 ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ dans l'HA stœchiométrique, cf. tableau III-1 et Figure III-2 pages 65 et 66) est associé à la présence d'ions carbonate dans la maille apatitique. Cet élargissement témoigne d'une perte d'ordre local.

Nous retrouvons sur les spectres IR des hydroxyapatites carbonatées les bandes relatives aux modes de vibration de l'ion carbonate dit libre, présentées Figure III-6. A noter que les bandes des domaines ν_3 ($\approx 1415\text{ cm}^{-1}$) et ν_2 ($\approx 879\text{ cm}^{-1}$) des CO_3 sont nettement plus intenses que celles du domaine ν_4 ($\approx 680\text{ cm}^{-1}$). De plus, et comme attendu, la position et le nombre de ces bandes sont sensiblement modifiés par rapport à l'ion libre en fonction de leur environnement chimique (site A ou B). Les premières études réalisées à la fin des années 1960 ont permis d'identifier, respectivement, 2 et 4 bandes de vibrations pour les domaines ν_2 et ν_3 [181, 212]. La moitié de ces bandes fut assignée aux CO_{3A} et l'autre moitié aux CO_{3B} (voir Tableau III-3).

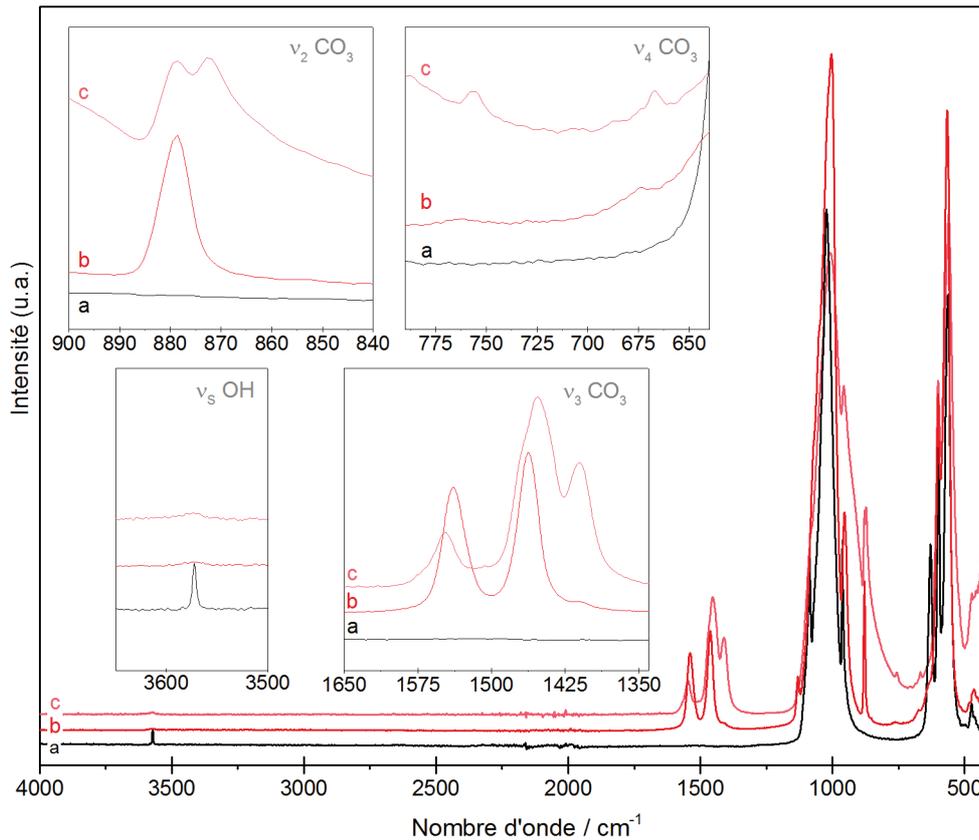


Figure III-6. Comparaison des spectres IR de différentes hydroxyapatites avec a. une hydroxyapatite stœchiométrique (HA, 1000°C-15h-air), b. une hydroxyapatite carbonatée de type A (HA, 1000°C-1h-CO₂), et c. une hydroxyapatite carbonatée mixte de type A/B (C_{0,8}HA, 1000°C-1h-CO₂). Aucune normalisation des spectres n'a été effectuée dans le cas présent.

Tableau III-3. Bandes IR attribuées aux modes vibrationnels ν_2 et ν_3 des ions carbonate dans la structure apatitique par Elliot et Legeros [181, 212]. Les bandes relatives au mode vibrationnel ν_4 des CO₃ de faible intensité ont sciemment été omises de cette liste

Mode de vibration	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
ν_2 CO ₃	870 (B)
	878 (A)
ν_3 CO ₃	1410 (B)
	1455 (A)
	1465 (B)
	1545 (A)

III.2.3.3. Quantification des ions carbonate dans la maille apatitique par spectrométrie IR

L'identification des bandes IR relatives aux CO_{3 A} ou CO_{3 B}, décrite au cours de la section III.2.3.2. précédente, est à l'origine des travaux précurseurs d'Arends et al. qui, entre autre, fait usage de la spectroscopie IR pour déterminer le taux d'ions carbonate présents dans des échantillons d'émail [213]. Dès lors, la quantification sélective des ions carbonate a fait l'objet de nombreuses études, sur des hydroxyapatites naturelles [214-220] ou synthétiques [221-224] en couplant spectroscopie IR et dosages élémentaires (e.g., dosage du taux de carbone total, spectrométrie plasma à couplage inductif ICP-AES). L'amélioration des appareils de mesure et des outils d'analyse spectrale a mené à une meilleure différenciation des composantes vibrationnelles des spectres IR grâce à une simplification des

analyses, à une meilleure qualité des spectres (e.g., bruit, résolution) et à la mise en œuvre de procédures informatiques de traitement des données (e.g., détection de bandes, « curve fitting »⁴).

Malgré ces améliorations, les méthodes de quantification sélectives des ions carbonate par spectroscopie IR sont encore sujettes de nos jours à de nombreuses problématiques, qui limitent leur fiabilité:

a) Identification des bandes

L'identification des bandes IR relatives aux CO_3A et CO_3B , bien que significativement améliorée depuis les années 1960, reste encore controversée comme le montre le Tableau III-4 ci-dessous.

Tableau III-4. Illustration de l'identification floue des bandes IR relatives aux modes de vibration ν_2 , ν_3 et ν_4 des ions carbonate en site A et B dans le réseau apatitique [180, 188, 193, 214, 224-227]. A titre d'exemple, l'encadré rouge sur le tableau met en évidence les divergences à propos du nombre de bandes, de leur position et de leur assignation entre 1510 et 1430 cm^{-1} .

Mode de vibration	Antonakos	Rey	Lafon	Gibson	Fleet
$\nu_4 \text{CO}_3^{2-}$	668 (A)		670 (A)		
	674 (B)	675 (A)			
		692 (B)	692 (B)		
	713 (B)	718 (B)	710 (B)		
		740 (?)			
	760(A)	757 (A)	757 (A)	755 (A)	
	813 (B)				non détaillé
847					
$\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$		866 (lab)	866 (lab)		862 (A2/lab)
	873 (B)	871 (B)	871 (B)	873 (B)	872 (B)
			873 (B)		
	880(A)	878 (A)	880 (A)	880 (A)	878 (A1)
	1409 (B)	1416*	1412 (B)	1410*	1409 (B)
	1427 (B)	1422 (B)	1420 (B)		
$\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$	1444 (A)	1445*			1441 (A1)
		1452*	1450 (A)*		1450 (A1)
	1450 (B)	1456 (B)		1455*	1455 (B)
			1460 (B)		1459 (A1)
	1468 (vac)	1463 (A)	1465 (A)	1466*	
		1470*	1470 (B)*		1474 (B)
	1498 (A)	1500*	1500 (A)*	1498*	
				1504*	1507 (A2)
	1528 (A)				
	1535 (A)	1540 (A)			
	1545*	1545 (A)*	1545*	1544 (A1)	
	1568*	1568 *	1570*	1569 (A2)	

* Assignation controversée A, B ou encore A/B

b) Normalisation

L'usage veut que les spectres IR soient normalisés (i.e. intensité rapportée à une même valeur) par rapport à une bande relative au mode de vibration $\nu_4 \text{PO}_4$: « après correction de la ligne de base, chaque spectre est multiplié par un coefficient ramenant l'absorbance de la bande à 601 cm^{-1} à 1 » [200, 218]. Un travail identique est réalisé avec les bandes à 575 cm^{-1} [213, 217, 228], 560 cm^{-1} [222, 225], ou encore 960 cm^{-1} ($\nu_1 \text{PO}_4$) [216]. Or l'intensité de ces bandes prise comme « référence » dépend

⁴ L'anglicisme "curve fitting" n'a malheureusement pas d'équivalent usuel en français (certains parlent d'ajustement de courbe). En spectrométrie IR, le "curve fitting" est une procédure mathématique qui vise à faire correspondre un profil d'intensité IR théorique à un profil d'intensité expérimental mesuré. Le « curve fitting » ne modifie en aucun cas le spectre IR expérimental d'où une différence essentielle avec la déconvolution spectrale. Pour plus de précision, veuillez-vous référer à la section III.3.4.2. page 85 de ce chapitre.

de différents facteurs physico-chimiques tels que la taille et l'ordre local des cristallites, mais également du taux de PO_4 présent dans la maille.

Les Figures III-7 et III-8 comparent respectivement les spectres IR d'HA et C_AHA , et de C_AHA et C_{AB}HA avant et après normalisation par rapport à la bande $\nu_4 \text{PO}_4$ ($\approx 600 \text{ cm}^{-1}$). Il est intéressant de constater que cette normalisation modifie très nettement l'intensité des bandes par rapport aux spectres bruts d'acquisition et ce sans que nous soyons sûrs que cette modification soit légitime, i.e., cohérente scientifiquement. Par exemple, la variation de l'intensité des bandes $\nu_3 \text{CO}_3$ entre 1600 et 1350 cm^{-1} en fonction du taux de carbonatation en site B (Fig. III-8) est sensiblement différente entre des spectres bruts d'acquisition (Fig. III-8 A) et des spectres normalisés (Fig. III-8 B). Cette normalisation n'induirait-elle pas des biais, préjudiciables aussi bien pour l'indexation des bandes que pour les procédures de quantification ?

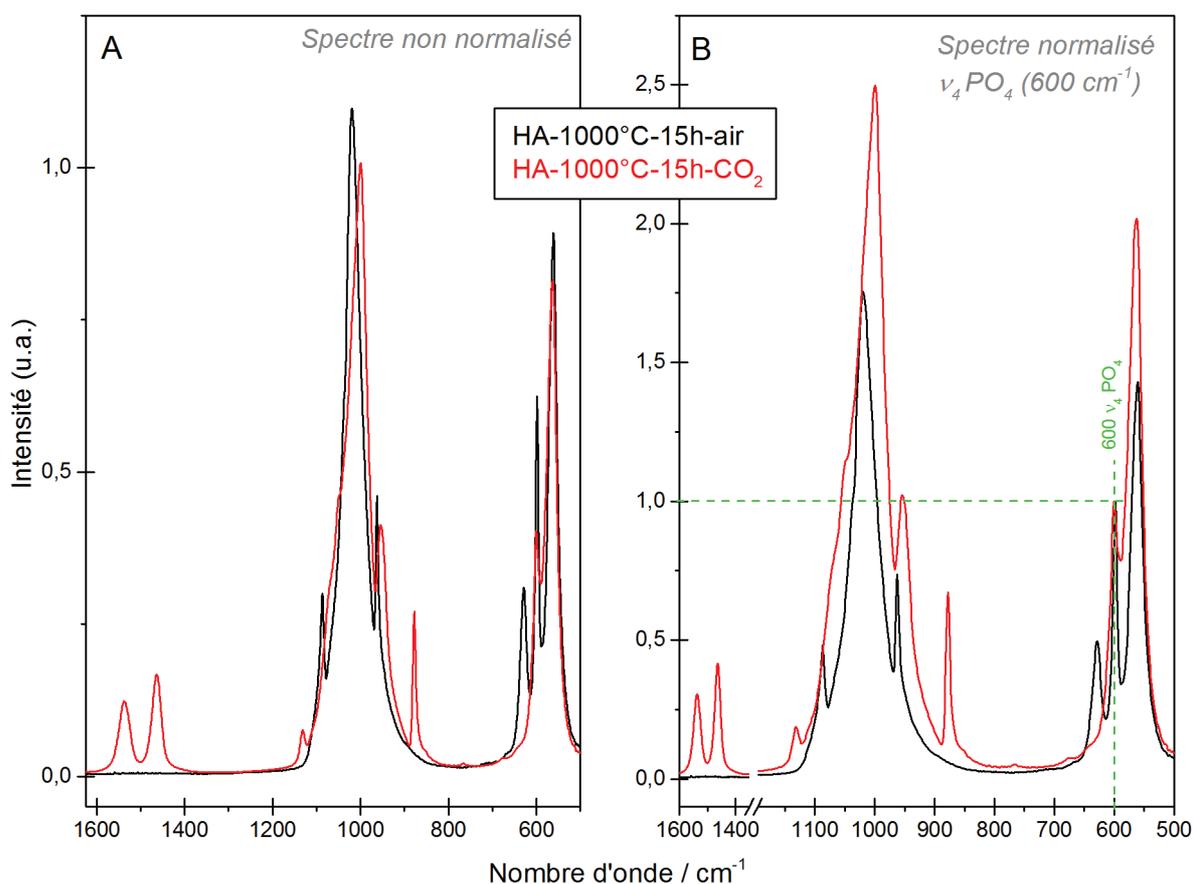


Figure III-7. Spectres IR de l'HA calcinée à 1000°C pendant 15h sous air ou sous CO_2 A. sans normalisation (i.e., brut d'acquisition) et B. normalisés par rapport à la bande relative au mode de vibration $\nu_4 \text{PO}_4$ à 600 cm^{-1} . Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un module de réflexion totale atténuée (ATR, Golden GateTM).

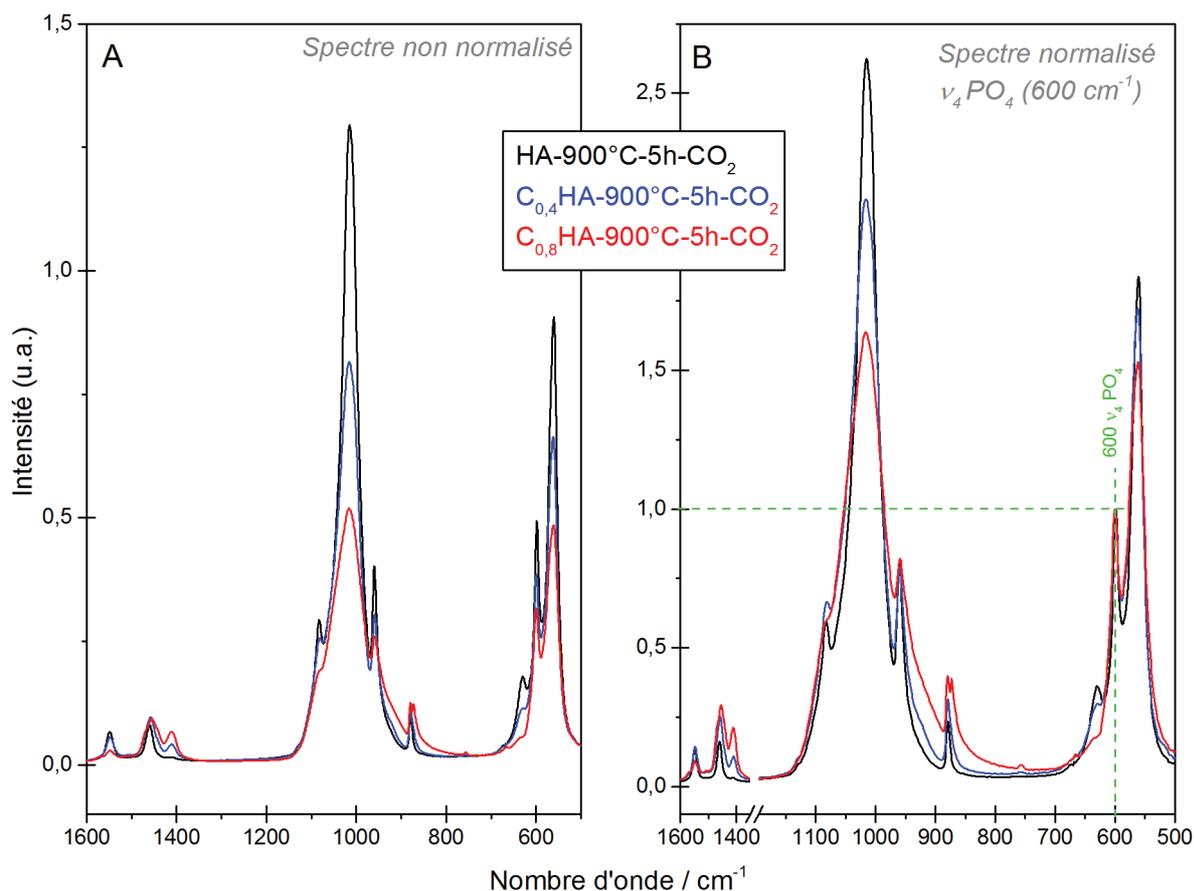


Figure III-8. Spectres IR de l'HA, de la $C_{0,4}$ -HA et de la $C_{0,8}$ -HA calcinées à 900°C pendant 5h sous CO_2 A. sans normalisation (i.e., brut d'acquisition) et B. normalisés par rapport à la bande relative au mode de vibration $\nu_4 \text{PO}_4$ à 600 cm^{-1} . Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un module de réflexion totale atténuée (ATR, Golden GateTM).

c) Hauteur ou intensité d'une bande IR

Une approximation fréquente consiste à considérer que la hauteur d'une bande correspond à son intensité (voir citation de la procédure de J.P. LAFON [200] dans le point « b » ci-dessus) ; approximation justifiable dans le cas de bandes très fines et totalement dissociées. Malheureusement, les bandes IR relatives aux modes de vibration des ions carbonate introduits dans le réseau apatitique se chevauchent dans les domaines ν_2 et ν_3 . Par conséquent, la « notion » d'intensité des bandes ne correspond plus à leur hauteur apparente (Figure III-9). Il est de fait nécessaire de mettre en place un protocole de « curve fitting » pour déterminer la hauteur réelle des bandes IR ou mieux encore, leur aire intégrée, afin de minimiser les biais expérimentaux.

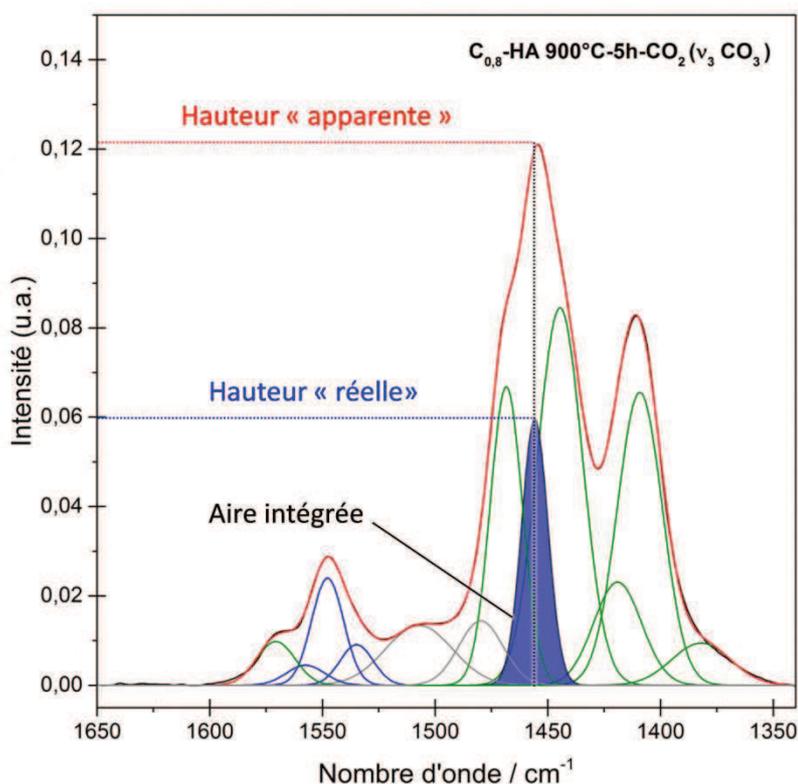


Figure III-9. Pourquoi utiliser les méthodes d'analyse spectrale pour déterminer l'intensité d'une bande IR au sein d'un chevauchement (massif) de bandes ?

d) Curve-fitting

Les procédures mathématiques de « curve fitting » sont des outils puissants qui visent à faire correspondre un profil d'intensité IR théorique à un profil d'intensité expérimental mesuré. Malheureusement, ces procédures sont peu utilisées et surtout ne sont pas standardisées i.e., qu'elles ne suivent pas une procédure bien définie et employée par tous. En cause, une démarche complexe qui nécessite à la fois une rigueur scientifique propre au domaine étudié (IR et HA), mais également une bonne connaissance du fonctionnement des outils d'analyse spectrale (e.g., ligne de base, algorithmes mathématiques, voir section III.3.4.2., page 84) [229-232].

L'étude présentée au cours des paragraphes suivants vise à apporter un début de réponse aux problématiques associées à la quantification sélective par spectrométrie IR des ions carbonate substitués aux ions phosphate (CO_3B) et hydroxyde (CO_3A) dans la structure apatitique. Pour ce faire, nous avons associé l'utilisation d'un composé de référence interne et la mise en place de procédures standardisées de « curve fitting ».

III.3. Matériels et méthodes

III.3.1. Préambule

Comme abordé en introduction, la finalité des travaux présentés dans ce chapitre III est d'améliorer la méthode de quantification sélective des ions carbonate insérés dans la structure apatitique par le biais

de l'établissement de courbes d'étalonnage reliant l'intensité intégrée (I) de bandes IR spécifiques (CO_{3A} et CO_{3B}) à une quantité d'ions carbonate. Notre démarche expérimentale est basée sur l'ajout en quantité connue d'une référence interne dans la poudre de CHA afin de relier un rapport d'intensité de bandes à une quantité d'ions carbonate comme suit :

$$\frac{I_{\text{bande carbonate}}}{I_{\text{bande référence}}} = f(\%_{\text{massique}} CO_3) \quad \text{Eq. III-15}$$

Notre méthodologie s'articule autour de 3 grands axes :

1. un axe « chimique » avec la préparation d'échantillons de CHA purs et monophasiques,
2. un axe « procédé » avec le développement d'une méthode d'ajout d'une référence « neutre » vis-à-vis des groupements ioniques considérés pour l'établissement de courbes d'étalonnage IR,
3. et un axe « d'analyse spectrale » avec la mise en place de procédures de « curve fitting » valides scientifiquement et standardisées.

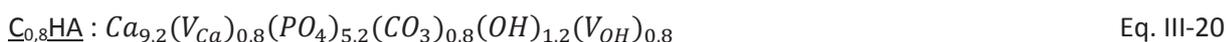
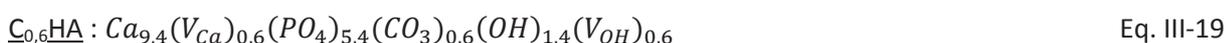
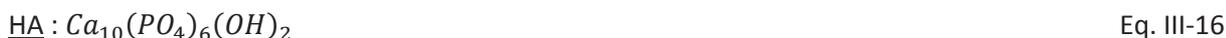
Plus spécifiquement, elle a été mise en place afin dans un premier temps d'affiner l'indexation des bandes relatives aux CO_{3A} et CO_{3B} , puis d'établir des courbes d'étalonnage reliant l'intensité intégrée de bandes clairement indexées à une quantité d'ions carbonate présent sur un site spécifique.

III.3.2. Préparation des poudres

La préparation des échantillons de CHA a débuté par la synthèse chimique en voie humide des poudres d'HA et de C_B HA. Une fois s'être assuré de leur pureté, divers traitements thermiques sous CO_2 ont été réalisés ($p_{CO_2} = P_{\text{atmosphérique}} \approx 1 \text{ bar}$).

III.3.2.1. Poudres synthétisées

Dans le cadre de cette étude, cinq poudres de compositions différentes ont été synthétisées: une hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique (HA), et quatre hydroxyapatites carbonatées de type B (C_x HA, avec x le coefficient stœchiométrique théorique d'ions carbonate introduits en site B). Les formules chimiques théoriques de ces poudres sont les suivantes :



Les formules théoriques des C_B HA présentées ci-dessus proviennent du modèle théorique proposé dans la section III.2.1. (Eq. III-2, page 66).

Le mode opératoire et les paramètres de synthèse des poudres sont détaillés en Annexe 1.

III.3.2.2. Caractérisation des poudres synthétisées

Afin de détecter la présence éventuelle de phase secondaire dans les poudres après synthèse, ces dernières ont été calcinées à haute température afin d'améliorer leur ordre local et ainsi affiner leur analyse par diffraction des rayons X (DRX) et spectroscopie infrarouge (IR). Deux traitements thermiques ont ainsi été utilisés selon la composition de la poudre :

- une calcination à 1000°C pendant 15 h sous air pour l'HA (selon la norme ISO 13779-3 : 2008),
- ou une calcination à 1000°C pendant 2 h sous CO₂ pour les C_BHA (protocole établi par Antoine Boyer au cours de sa thèse [174]).

L'analyse qualitative des phases cristallines présentes au sein des échantillons, ainsi que la détermination de leurs paramètres de maille, ont été réalisées par DRX, suivant les protocoles décrits en Annexe 2. Plus spécifiquement, la détermination des paramètres de maille des poudres d'HA et de CHA a été effectuée après un traitement thermique à 1000°C pendant 15 h respectivement sous air ou sous CO₂.

Le seuil de détection de la chaux par DRX étant aux alentours de 1 % en masse, l'absence de chaux a été vérifiée à l'aide de l'indicateur coloré phénolphtaléine tel que décrit en Annexe 2. En complément, une analyse qualitative par spectroscopie IR a été réalisée sur chaque échantillon pour détecter d'éventuelles phases secondaires cristallines ou amorphes.

Enfin, une analyse chimique quantitative du carbone a été systématiquement réalisée. Les détails de cette analyse sont également présentés en Annexe 2.

III.3.2.3. Préparation des poudres d'HA et de CHA pour les études qualitative d'indexation des bandes et de réalisation des courbes d'étalonnage

Il est évident et maintes fois prouvé que le succès des méthodes d'analyse qualitative et surtout quantitative nécessite une préparation méticuleuse des échantillons (e.g., James R Connolly-DRX [233]). Nous sommes partis de ce principe simple pour formaliser l'ensemble des étapes d'élaboration des échantillons nécessaires aux études par spectroscopie IR.

III.3.2.3.1. Préparation des poudres pour l'étude qualitative d'indexation des bandes IR

Dans le but d'identifier le plus précisément possible les bandes IR relatives aux modes de vibration des ions carbonate substitués en site A et B dans la maille apatitique, les poudres d'HA et de C_BHA préalablement synthétisées, et certifiées pures et monophasiques (voir section résultats III.4.1.), ont été calcinées à 900°C pendant 5 h sous CO₂ (sauf cas particulier précisé dans les légendes) afin d'obtenir des poudres avec un ordre local et un taux de carbonatation des sites A élevé (voir section III.2.2.1., page 70).

Pour des raisons de standardisation des essais, une fois calcinées les poudres ont été broyées mécaniquement à l'aide d'un broyeur planétaire et de bols et de billes en zircone (PM400, Retsch, Allemagne), puis tamisées (tamis nylon, Fisher Scientific) afin de ne conserver que les agrégats

inférieurs à 25 μm . A ce titre, les paramètres de broyage ont été choisis afin d'obtenir une intensité maximale des spectres IR (voir l'étude chapitre III.4.2., page 90). Les échantillons tamisés ont été ensuite placés à l'étuve à 100 °C pendant plusieurs heures, séchés dans un dessiccateur puis conditionnés dans des flacons en polystyrène cristal. Finalement, ces derniers sont conservés en dessiccateur à température ambiante.

III.3.2.3.2. Préparation des poudres de C_AHA pour la réalisation des courbes d'étalonnage

Des courbes d'étalonnage reliant l'intensité intégrée de bandes IR spécifiques des CO_3 présents dans les sites A à une quantité d'ions carbonate ont été réalisées. Les bandes IR choisies pour réaliser ces courbes sont issues des résultats de l'étude qualitative d'indexation des bandes précédemment décrite (section III.3.2.3.1 précédente).

Les échantillons ont été préparés à partir d'une poudre d'HA préalablement calcinée à 1000 °C pendant 15 h sous air, c'est-à-dire présentant un ordre local important et homogène d'un échantillon à l'autre. Cette poudre a ensuite été traitée thermiquement sous CO_2 à pression ambiante (p_{CO_2} assimilé à 1 bar soit 10^5 Pa ; CO_2 , 99,9995% Air Liquide, France) afin d'obtenir des taux de carbonatation en site A différents. Le tableau III-5 ci-dessous détaille les différents traitements thermiques effectués.

Tableau III-5. Échantillons de C_AHA obtenus par traitements thermiques sous atmosphère de CO_2 ($p_{\text{CO}_2} \approx 1$ bar) d'une poudre d'HA, préalablement traitée à 1000°C pendant 15 h sous air ; échantillons préparés pour la construction de courbes d'étalonnage relatives aux ions carbonate placés dans les sites A de la maille apatitique

Échantillon	Poudre	Traitement thermique sous CO_2		
		Montée	Palier	Descente
1	HA 1000 °C-15 h-air	5 °C / min	650 °C - 30 min	- 5 °C / min
2	-	-	680 °C - 30 min	-
3	-	-	700 °C - 0 min	-
4	-	-	700 °C - 30 min	-
5	-	-	800 °C - 0 min	-
6	-	-	800 °C - 30 min	-
7	-	-	800 °C - 60 min	-
8	-	-	800 °C - 90 min	-
9	-	-	800 °C - 120 min	-
10	-	-	800 °C - 300 min	-
11	-	-	800 °C - 600 min	-
12	-	-	820 °C - 0 min	-
13	-	-	850 °C - 0 min	-
14	-	-	950 °C - 60 min	-
15	-	-	1000 °C - 30 min	-

Les poudres une fois calcinées ont subi le même protocole de broyage et de tamisage que celui détaillé dans la section précédente (III.3.2.3.1.).

Enfin, la quantité totale de carbone contenue dans chaque échantillon a été déterminée à l'aide d'un analyseur carbone-soufre (CS-444 Leco) tel que décrit en Annexe 2. Pour évaluer l'influence d'éventuels « polluants carbonés » (e.g., CO_2 adsorbé), le dosage C a été réalisé avant et après une étape de dégazage des poudres à 100 °C pendant 12 h sous vide primaire à 10^{-2} mbar (≈ 2 Pa) à l'aide d'un appareil Micrometrics ASAP 2020 (N = 3). Les poudres ont ensuite été conditionnées sous azote dans un

dessiccateur. La concentration totale en carbonate dans l'échantillon est déduite du dosage C via la formule suivante :

$$\%_{\text{massique}} CO_3 = \%_{\text{massique}} C \times \frac{M(CO_3)}{M(C)} \quad \text{Eq. III-21}$$

avec M la masse molaire des éléments considérés.

III.3.3. Choix d'une référence interne et protocole de mélange hydroxyapatite/référence

L'ajout en quantité connue d'une référence interne dans la poudre de CHA a pour but de normaliser de façon cohérente et systématique les spectres IR et ainsi d'éviter les biais liés à la normalisation par rapport aux bandes relatives aux groupements phosphate, telle que la bande $\nu_4 PO_4$ à 600 cm^{-1} (voir section III.2.3.3., page 74)

III.3.3.1. Choix et préparation du composé de référence interne

Le composé de référence doit être (i) peu cher, (ii) facilement manipulable (e.g., non toxique), (iii) inerte vis-à-vis des phases étudiées, et (iv) avoir un spectre IR compatible avec les phases et les groupements ioniques étudiés. Idéalement, il ne doit comporter qu'une bande de faible largeur à mi-hauteur et une ligne de base constante dans les zones d'intérêt du spectre IR des hydroxyapatites. Répondant à priori à tous les critères définis ci-dessus, le ferricyanure de potassium, de formule $K_3Fe(CN)_6$ (99,99%, Sigma-Aldrich, USA) a été sélectionné. La Figure III-10 présente le spectre IR du ferricyanure de potassium superposé à celui d'une $C_{0,8}HA$ calcinée à $1000^\circ C$ pendant 1 h sous CO_2 .

Notons que le ferricyanure de potassium est disponible sous forme de cristaux de quelques millimètres, de couleur rouge rubis. Afin d'obtenir une poudre de $K_3Fe(CN)_6$ homogène, un broyage suivi d'un tamisage est nécessaire. De façon équivalente aux travaux réalisés sur les poudres d'hydroxyapatites et afin de standardiser la préparation des échantillons nécessaires aux études de spectroscopie IR, nous avons étudié l'influence du broyage sur ce composé. Les résultats sont présentés dans la section III.4.2, page 90.

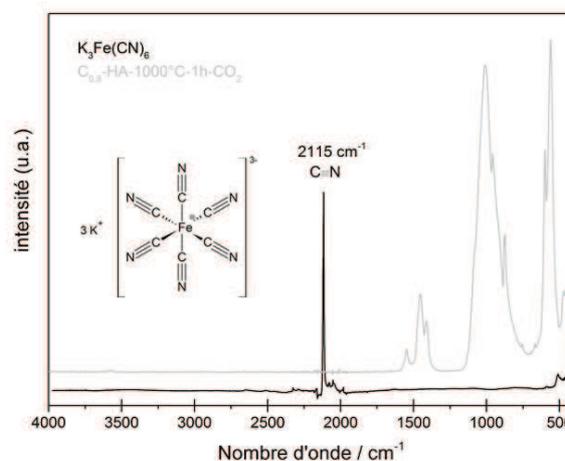


Figure III-10. Spectre IR caractéristique du ferricyanure de potassium (noir) superposé à celui d'une $C_{0,8}HA$ calcinée à $1000^\circ C$ pendant 1h sous CO_2 . L'unique et étroite bande IR observée à 2115 cm^{-1} sur le spectre IR du $K_3Fe(CN)_6$ est relative au mode de vibration ν_s des groupements $C \equiv N$.

III.3.3.2. Protocole de mélange des poudres

L'obtention d'un mélange homogène de composés pulvérulents est complexe, tout spécifiquement dans notre cas où la masse totale de l'échantillon (hydroxyapatite et $K_3Fe(CN)_6$) a été fixée à 100 mg. Les masses respectives d'HA ou CHA et de ferricyanure de potassium ont été pesées sur une balance de précision (Adventurer Pro $\pm 0,1$ mg, Ohaus) puis mélangées au mortier et pilon en agate jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune homogène ($t_{\text{mélange}} \approx 5$ min).

Pour évaluer la reproductibilité du protocole et l'homogénéité du mélange, plusieurs échantillons ont été préparés en trois exemplaires (notés Axx, Bxx et Cxx), chacun fractionné en trois nouveaux échantillons avant analyse par spectroscopie IR (notées -01, -02 et -03).

III.3.3.3. Influence de la quantité de référence interne sur le spectre IR des hydroxyapatites

Le ferricyanure de potassium n'est théoriquement pas susceptible de réagir ou d'interagir avec les poudres des hydroxyapatites étudiées. Afin d'évaluer la potentielle influence de cet ajout sur les spectres IR des poudres de CHA les spectres IR des mélanges CHA/Référence contenant 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 33,0, 50,0 et 75,0% en masse de ferricyanure de potassium ont été comparés. Cette étude nous a également permis de définir la quantité de référence idéale à incorporer aux échantillons d'hydroxyapatites dans le cas des analyses qualitatives et quantitatives. Pour cela les critères suivants ont été pris en compte :

- Pour les études qualitatives par spectroscopie IR, il est essentiel (i) que la référence interne perturbe le moins possible les spectres des hydroxyapatites et notamment la position du maximum des bandes, et (ii) que le rapport $R = \frac{\text{Intensité de la bande de référence}}{\text{Intensité du b}}$ soit supérieur à 2.
- Pour la quantification des carbonates substitués dans le réseau apatitique, la quantité de $K_3Fe(CN)_6$ (i) ne doit pas perturber le spectre original des hydroxyapatites dans les zones ν_2 et ν_3 des carbonates (i.e. respectivement 850-900 et 1350-1600 cm^{-1}), et (ii) aboutir à un rapport $R = \frac{\text{Intensité de la bande de référence}}{\text{Intensité du bruit}}$ supérieur à 10 pour minimiser les erreurs lors du traitement de données. Idéalement, l'intensité de la bande de référence doit également être du même ordre de grandeur que les bandes considérées pour l'analyse afin de minimiser les erreurs expérimentales.

III.3.4. Analyse spectrale

III.3.4.1. Spectroscopie IR : instrumentation

L'acquisition des spectres IR a été réalisée via un spectromètre MIR TF VERTEX 70 (Bruker Optics) équipé d'un module de réflexion totale atténuée (ATR, Golden GateTM) sur des échantillons pulvérulents ; nous parlerons de FTIR-ATR. Toutefois, pour confirmer certains résultats obtenus en FTIR-ATR, un module d'analyse par réflexion diffuse (DRIFT, Praying MantisTM, Harrick) a été également employé. La Figure III-11 ci-dessous schématise les grandes différences entre ces deux méthodes.

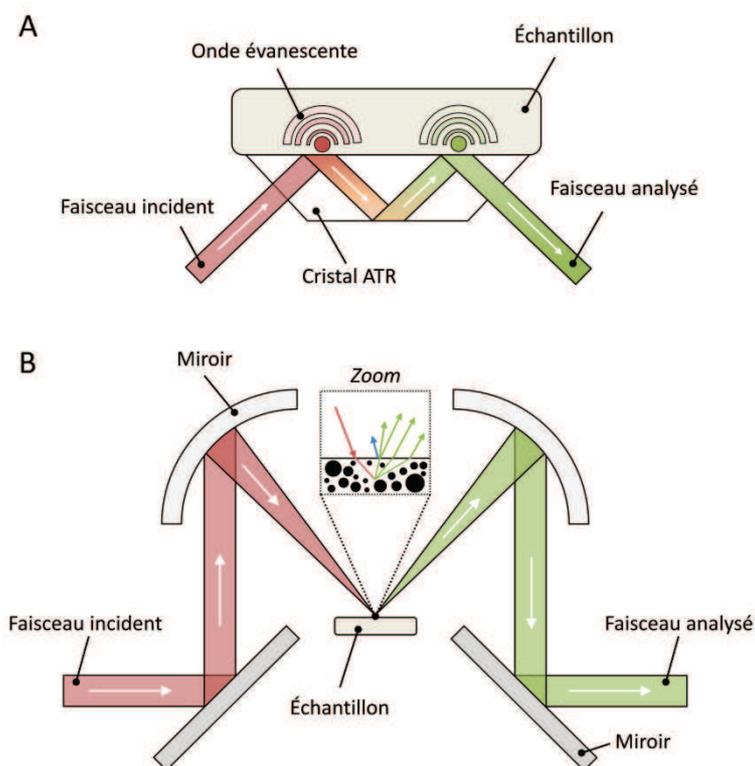


Figure III-11. Représentation schématique des systèmes d'analyse par A. réflexion totale atténuée (ATR) et B. réflexion diffuse (DRIFT) du spectromètre infrarouge.

Contrairement à l'ATR, les analyses par DRIFT ont nécessité une étape supplémentaire de préparation des échantillons. Cette dernière a fait l'objet d'une étude d'optimisation non détaillée dans ce manuscrit. Au final, le mélange « poudre à analyser/référence » doit être dilué à hauteur de 1 % en masse dans du bromure de potassium (KBr 99,99 %, Sigma-Aldrich, USA) avant analyse.

Pour ces deux types d'analyses IR, les paramètres d'acquisition restent en revanche similaires : le domaine spectral étudié s'étend de 4000 cm^{-1} à 450 cm^{-1} et chaque spectre est issu d'une moyenne de 64 scans enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} .

III.3.4.2. Analyse spectrale : le « curve fitting », une aide à l'interprétation

Le « curve fitting » (ou « ajustement de courbe », terme très peu utilisé en français) est une procédure visant à ajuster une ou plusieurs fonctions mathématiques à un profil de courbe expérimentale par l'intermédiaire d'algorithmes de régression. Comme toute modélisation mathématique, le résultat obtenu à la suite d'une procédure de « curve fitting » n'est pas unique et dépend fondamentalement des paramètres choisis par l'opérateur (e.g., initialisation, fonctions mathématiques). Par conséquent, il est relativement aisé pour un utilisateur non-averti de faire correspondre le résultat du « curve fitting » à ses attentes et donc d'induire un biais important dans l'étude qu'il mène.

En spectroscopie vibrationnelle (e.g., Infrarouge, Raman), où les spectres complexes comportent souvent des bandes se chevauchant, les procédures de « curve fitting » constituent un moyen de répondre aux « besoins fondamentaux » de l'opérateur : (i) combien de bandes se trouvent dans le massif considéré et à quel nombre d'onde, (ii) quelle est leur intensité respective (i.e., leur aire respective et non pas leur hauteur), et (iii) quelle est leur forme. Le « curve fitting » représente alors un

outil très puissant basé cependant sur le bon sens et les connaissances scientifiques de l'utilisateur [229, 231, 232]. L'analyse d'un spectre IR se décompose en deux grandes étapes, la définition du nombre de bandes IR et leur positionnement (visuellement puis affinage via outils mathématiques), et le « fitting » en lui-même. Les paragraphes suivants visent à détailler la procédure de « curve fitting » mise en place dans le cadre de ce travail. Elle est inspirée des recommandations adressées dans les ouvrages de Dodd et al. [231], Smith et al. [232] et Meier [229].

Le logiciel OriginPro 9.1 (2015 OriginLab, USA) a été utilisé pour le traitement des spectres IR, qui ne doivent subir aucune modification (e.g., smoothing, déconvolution) avant le « curve fitting ». Chaque spectre IR a été segmenté en zones d'intérêt, qui ont été traitées séparément afin d'éviter d'éventuels artefacts lors du « fitting » (e.g., ligne de base imprécise, déplacement de bande d'un massif à un autre). Dans le cadre de nos études, trois zones ont été définies :

1. la zone entre 2200 et 2020 cm^{-1} comprenant la bande à 2115 cm^{-1} du composé de référence, relative au mode de vibration $\nu_s \text{C}\equiv\text{N}$
2. le domaine relatif au mode de vibration $\nu_3 \text{CO}_3$ compris entre 1650 et 1340 cm^{-1} ,
3. le domaine relatif aux $\nu_3 \text{PO}_4$, $\nu_1 \text{PO}_4$, et $\nu_2 \text{CO}_3$ des hydroxyapatites situé entre 900 et 800 cm^{-1} .

Un exemple de ce découpage en zones est présenté Figure III-12.

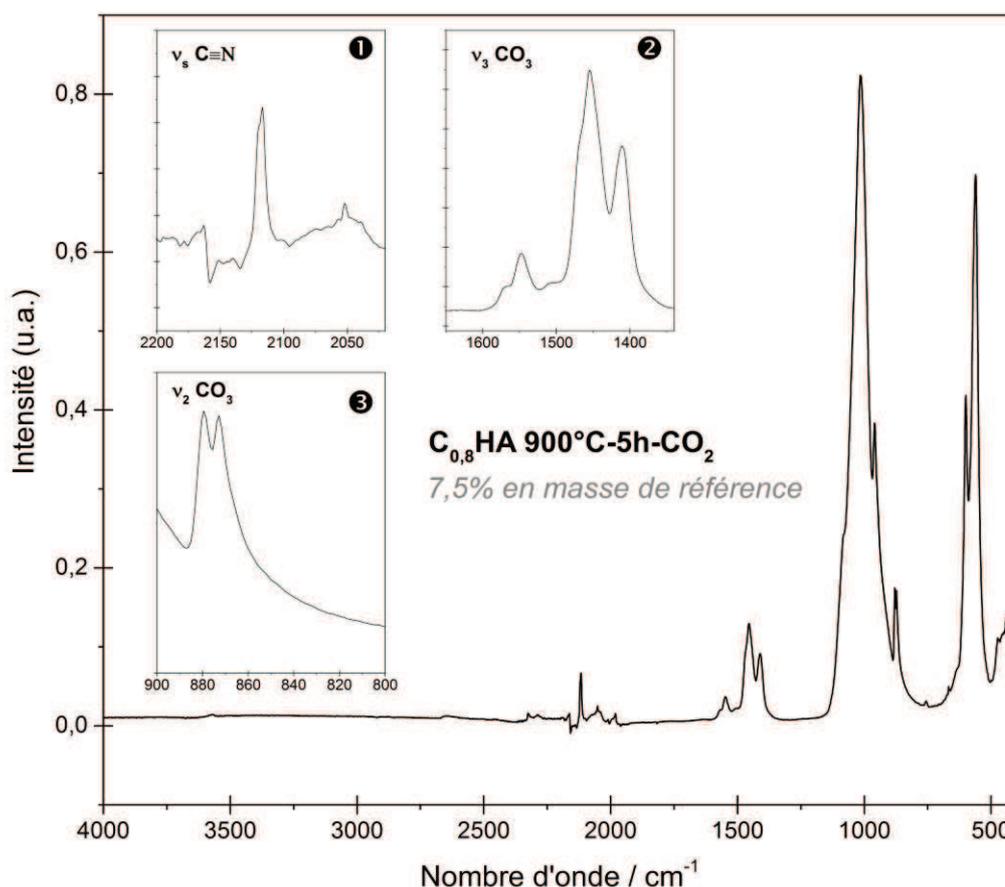


Figure III-12. Découpage en trois zones d'intérêt du spectre IR d'une $\text{C}_{0,8}\text{HA}$ calcinée à 900 °C pendant 5 h sous pression partielle de CO_2 mélangée à 7,5 % en masse de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, à savoir le domaine relatif au mode de vibration ① $\nu_s \text{C}\equiv\text{N}$ du composé de référence (2200-2020 cm^{-1}), ② $\nu_3 \text{CO}_3$ (1650-1340 cm^{-1}) et ③ $\nu_2 \text{CO}_3$ (900-800 cm^{-1}).

Pour détecter les bandes présentes dans chaque massif, une méthode basée sur les dérivées première et seconde du spectre à analyser a été utilisée (Figure III-13) : chaque « creux » de la dérivée seconde peut indiquer la présence d'une bande IR. Notons que du fait de la résolution spectrale de 2 cm^{-1} , des bandes séparées de moins de 4 cm^{-1} ne peuvent pas être différenciées. Afin d'éviter la sur ou sous-détection de bandes, une analyse croisée des spectres bruts d'acquisition, des données de la littérature et des résultats mathématiques obtenus après dérivation a été préférée à l'utilisation de filtres (e.g., filtre à transformée de Fourier) dont l'influence est peu maîtrisable.

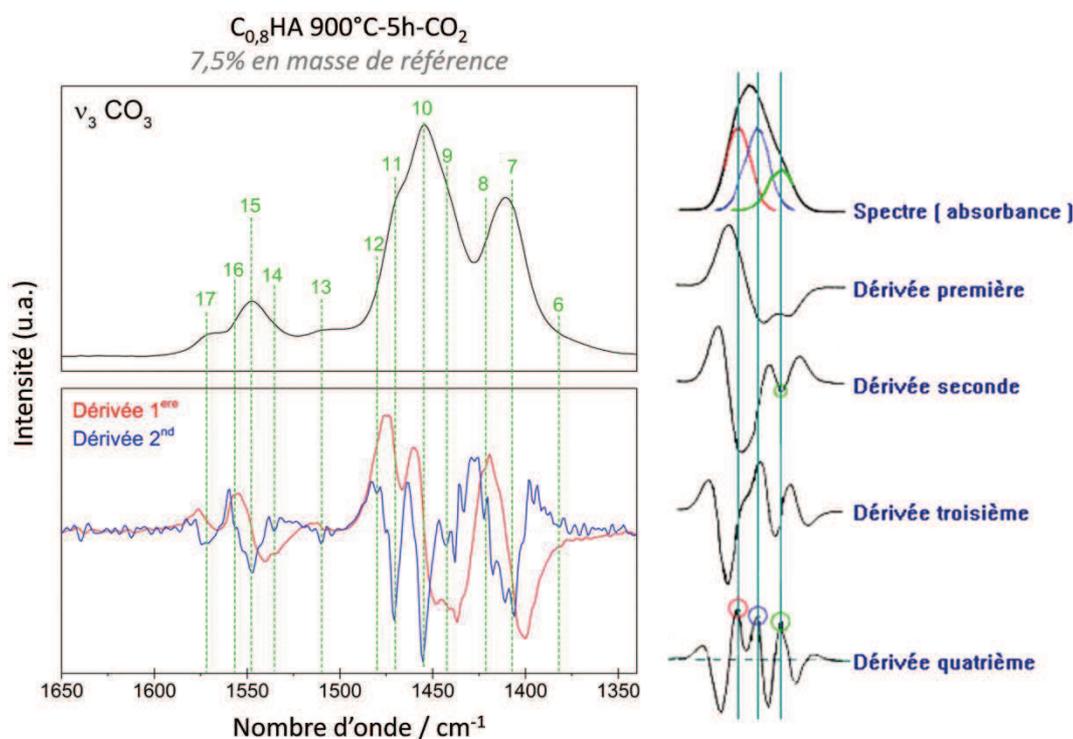


Figure III-13. Détection des bandes IR grâce aux dérivées première et seconde. Exemple proposé au niveau du domaine $\nu_3 \text{CO}_3$ du spectre IR d'une poudre $\text{C}_{0,8}\text{HA}$ calcinée à 900°C pendant 5 h sous CO_2 mélangée à 7,5 % en masse de référence.

Une fois le nombre de bandes et leur position relative définis (Figure III-13) l'étape de « fitting » peut être abordée. Au préalable, la ligne de base pour chaque zone est définie manuellement et de façon identique pour chaque spectre IR selon le modèle détaillé ci-dessous (Figure III-14) puis soustraite.

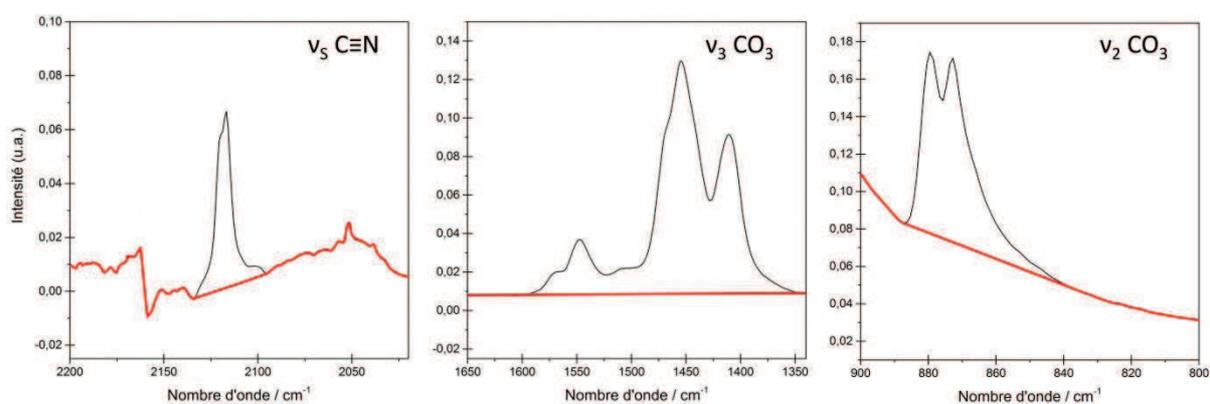


Figure III-14. Définition de la ligne de base dans les différentes zones d'étude du spectre IR. Exemple réalisé sur un spectre de $\text{C}_{0,8}\text{HA}$ calcinée à 900°C pendant 5 h sous CO_2 mélangée à 7,5 % en masse de référence.

Le choix d'un profil mathématique pour chaque bande est alors effectué, les modèles Lorentzien et Gaussien étant privilégiés du fait de leur réalité physique. En effet, intrinsèquement, une vibration IR tend à suivre un modèle Lorentzien, mais la nature de l'échantillon (e.g., poudre) ou encore les équipements constituant l'appareil de mesure (e.g., monochromateur) tendent à induire un élargissement gaussien des bandes [229]. Il est également possible d'utiliser d'autres modèles, tel que le modèle Voigt, mais leur réalité physique peut être remise en question [229]. Dans notre cas, un modèle Gaussien de bandes a été choisi pour toutes les analyses spectrométriques. La Figure III-15 illustre un exemple de « curve fitting » selon le modèle de bande choisi.

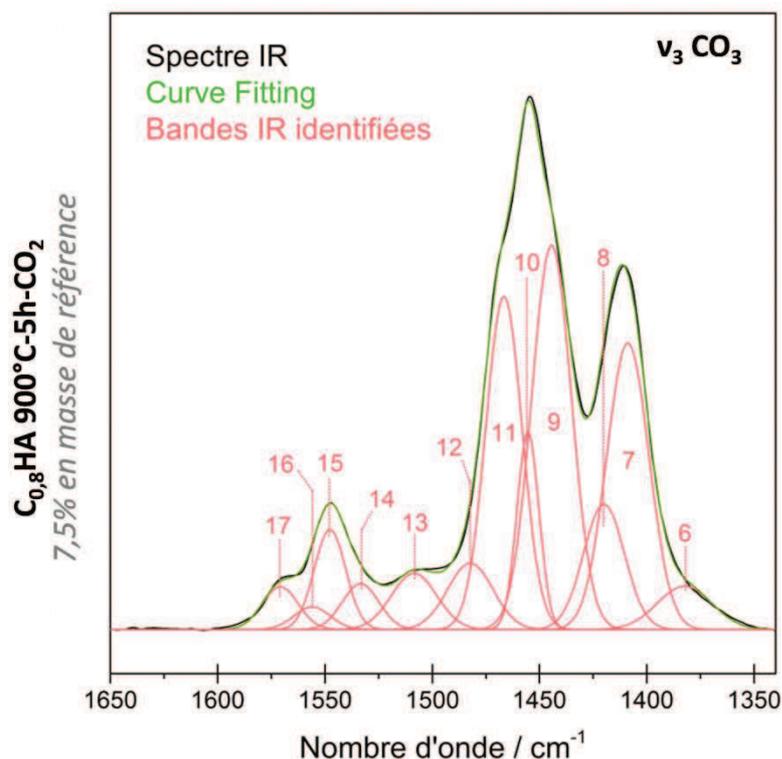


Figure III-15. Exemple du résultat d'une procédure de « curve fitting » appliquée au massif $\nu_3 CO_3$ du spectre IR d'une $C_{0,8}HA$ calcinée à 900 °C pendant 5 h sous CO_2 mélangé à 7,5% en masse de référence.

Un contrôle du « fitting » est également possible en contraignant les paramètres d'une ou plusieurs bandes, à savoir leur position, leur largeur à mi-hauteur et leur intensité. Dans le cadre de nos études, un maximum de paramètres a été laissé libre lors du « fitting » et le système ne fut contraint qu'en cas d'incohérence importante (e.g., bande d'intensité négative, largeur à mi-hauteur disproportionnée). Dans ce dernier cas, le paramètre déficient a été borné selon des valeurs empiriques déterminées lors de précédentes procédures de « fitting », puis relâché. La même routine de « fitting » a été effectuée, autant que possible, sur tous les spectres dans l'optique de standardiser la procédure et d'obtenir des résultats comparables. L'obtention de résultats proches de la réalité physique fait appel une fois de plus au bon sens de l'opérateur ; des paramètres sur-contraints lors du « fitting » mèneront à des conclusions erronées.

III.4. Pureté des poudres d'hydroxyapatites préparées et validation du protocole de mélange

Comme présenté dans les sections précédentes de ce chapitre III, une des problématiques principales des analyses qualitatives ou quantitatives réalisées par spectrométrie des hydroxyapatites carbonatées reste l'absence d'une référence stable d'un échantillon à l'autre au sein des spectres (e.g., une bande, un domaine). Une solution réside dans l'ajout de façon standardisée d'une référence interne de composition stable aux poudres d'hydroxyapatites. Cette section présente les résultats d'optimisation de ce procédé d'ajout.

III.4.1. Analyses des poudres d'HA et de C_B HA synthétisées par voie humide

Les diagrammes de DRX de l'HA et des C_B HA calcinées respectivement à 1000 °C-15 h sous air et 1000 °C-2 h sous CO_2 sont présentés Figure III-16. Leur profil est similaire et caractéristique d'une phase apatitique (HA, ICDD-PDF 09-432). Les pics de diffraction sont étroits et intenses reflétant un ordre local élevé des cristallites. Aucune phase secondaire cristalline n'est détectée. En outre les tests chimiques négatifs réalisés avec la solution de phénolphtaléine confirment l'absence de chaux ou de carbonate de calcium dans les poudres après synthèse.

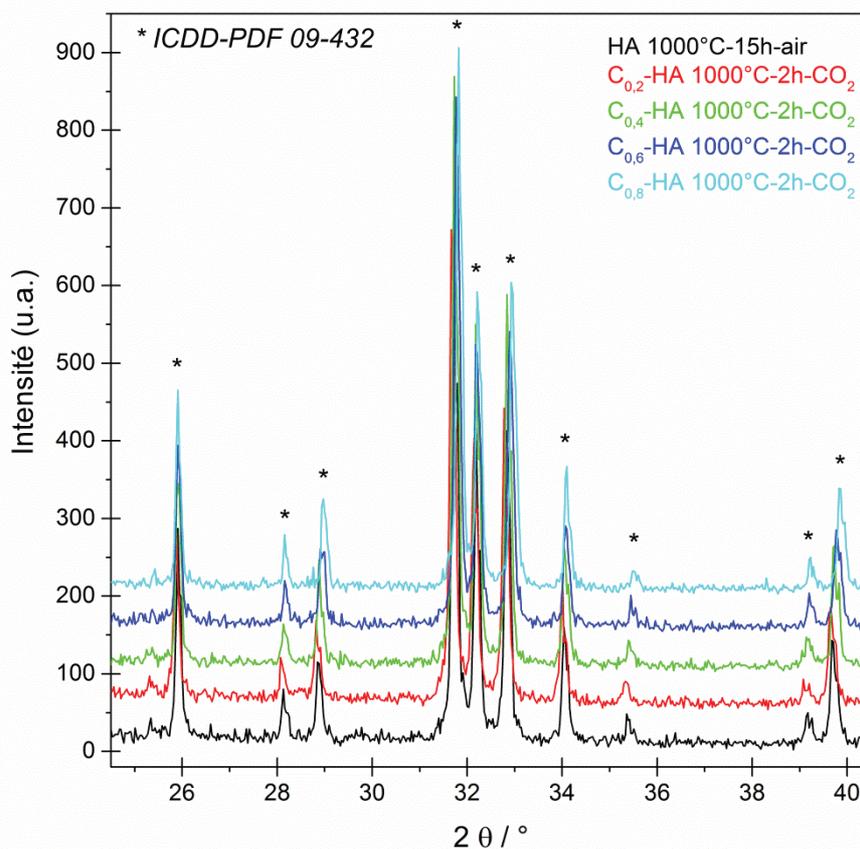


Figure III-16. Diffractogrammes des poudres d'HA et de C_B HA synthétisées par voie humide puis calcinées respectivement à 1000 °C pendant 15 h sous air et 1000 °C pendant 2 h sous CO_2 .

La Figure III-17 présente les spectres d'absorption IR des poudres d'HA et de CHA après calcination (respectivement 1000°C-15h-air et 1000°C-2h-CO₂). L'ensemble des spectres IR des poudres calcinées présente les bandes d'absorption caractéristiques des groupements phosphate (472, 560, 600, ≈ 960, ≈ 1015 et ≈ 1090 cm⁻¹) et hydroxyle (630 et 3572 cm⁻¹) d'une hydroxyapatite phosphocalcique. Comme attendu les vibrations associées aux groupements CO₃ en substitution dans la maille apatitique sont également détectées sur les spectres des poudres CHA. En revanche, aucune bande liée à une autre espèce n'est détectée.

Ces résultats confirment que les poudres synthétisées sont pures et monophasiques.

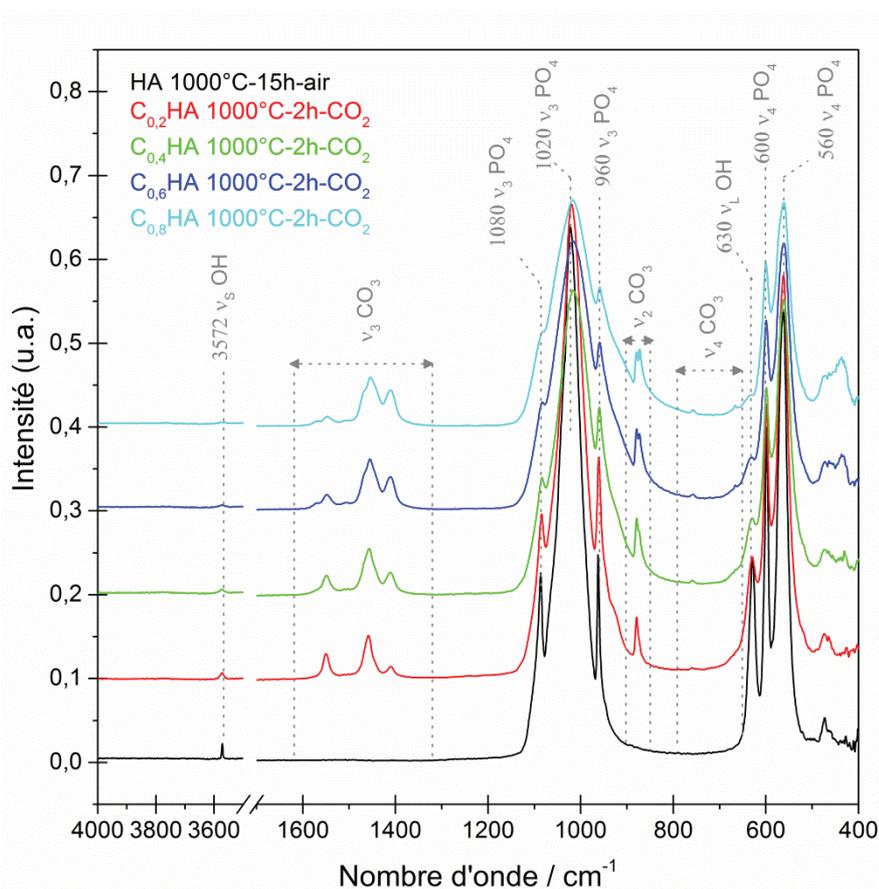


Figure III-17. Spectres IR des poudres d'HA et de C_BHA synthétisées par voie humide puis calcinées respectivement à 1000 °C pendant 15 h sous air et 1000 °C pendant 2 h sous CO₂.

Pour compléter ces analyses, les paramètres de maille des poudres calcinées à 1000 °C pendant 15 h sous CO₂ ont été évalués et sont présentés Figure III-18.

Notons tout d'abord que les paramètres de maille de l'HA synthétisée puis calcinée pendant 15 h sous air sont semblables aux données de la littérature (ICDD-PDF 9-432). L'évolution des paramètres de maille observée est également cohérente avec celle décrite dans la littérature (voir section III.2.1.), à savoir qu'une carbonatation des sites A seule entraîne une augmentation du paramètre *a* et une légère diminution du paramètre *c* (Figure III-18, *x* = 0). De façon équivalente, une carbonatation des sites A et B simultanée entraîne une évolution opposée des paramètres *a* et *c* en fonction du taux de CO_{3B}. En

revanche, les évolutions du paramètre a ($\Delta = 0,111 \text{ \AA}$) sont beaucoup plus marquées que pour le paramètre c ($\Delta = 0,019 \text{ \AA}$).

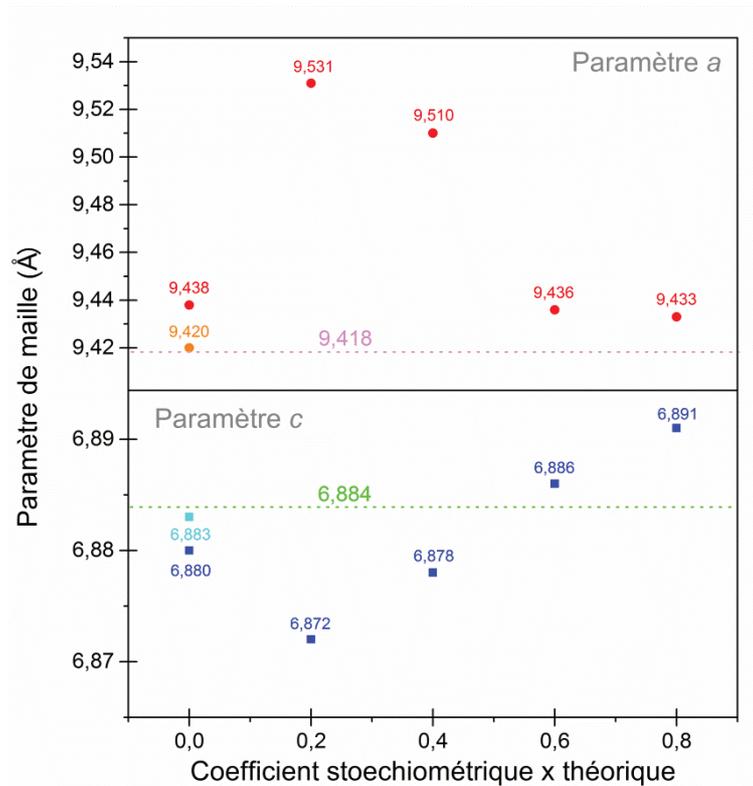


Figure III-18. Évolution des paramètres de maille a (en rouge) et c (en bleu) pour les poudres de CHA (traitées à 1000 °C pendant 15 h sous CO_2) en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique des poudres, selon la formule générale des C_xHA (Eq. III-2). A titre de référence, les paramètres de maille a (orange) et c (cyan) déterminés pour une HA calcinée à 1000 °C pendant 15 h sous air ont été représentés. Les lignes pointillées représentent les valeurs théoriques des paramètres de maille de l'HA (ICDD-PDF 9-432).

III.4.2. Influence du broyage des poudres sur leur spectre

IR

Afin de standardiser le protocole de préparation des poudres utilisées pour fabriquer les échantillons analysés par spectrométrie IR, ces dernières ont été broyées puis tamisées tel que décrit dans les sections III.3.2.3. (page 80) et III.3.3.2. (page 83).

La Figure III-19 présente l'évolution des spectres IR d'une $\text{C}_{0,8}\text{HA}$ en fonction du temps de broyage à 150 rpm. Notez que l'évolution des spectres décrite pour cette poudre est similaire pour toutes les poudres d'hydroxyapatites préparées (i.e., HA, C_AHA , $\text{C}_{0,2}\text{HA}$, $\text{C}_{0,4}\text{HA}$, $\text{C}_{0,6}\text{HA}$, $\text{C}_{0,8}\text{HA}$). Les résultats indiquent que l'intensité des bandes de vibrations, quelles qu'elles soient, augmente avec le temps de broyage pour devenir constante à partir d'1 h. Cette valeur d'1 h à 150 rpm sera utilisée par la suite pour la préparation de toutes les poudres d'hydroxyapatites.

L'influence du broyage sur le composé de référence interne (ferricyanure de potassium) est présentée Figures III-20 et III-21 (pages 91 et 92). Il apparaît clairement qu'un broyage mécanique des cristaux (initialement rouges) à l'aide d'un vibro-broyeur (Retsch MM2), même à faible énergie, est délétère

pour les fonctions chimiques du $K_3Fe(CN)_6$. En effet, outre le changement de couleur de la poudre, qui devient verte, de nouvelles bandes d'absorption apparaissent et notamment à proximité de la vibration ν_s des groupements $C\equiv N$ (voir Figure III-20). En revanche, un broyage manuel dans un mortier en agate permet de conserver les fonctions chimiques du $K_3Fe(CN)_6$ tout en obtenant des particules inférieures à $10\ \mu m$ (la poudre est alors jaune, Figure III-21). La poudre de référence interne a ainsi été broyée manuellement au mortier en agate puis tamisée en dessous $10\ \mu m$ avant son utilisation dans les étapes de mélange décrites en section III.3.3.

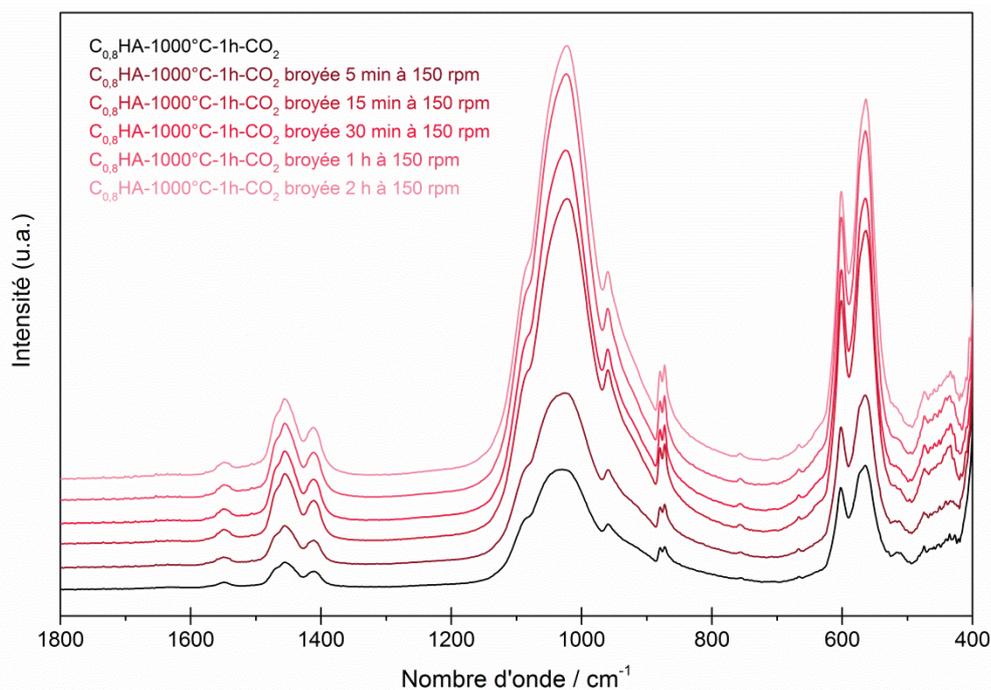


Figure III-19. Évolution de l'intensité des spectres IR d'une $C_{0,8}HA$ calcinée à $1000\ ^\circ C$ pendant 1 h sous CO_2 en fonction du temps de broyage à 150 rpm

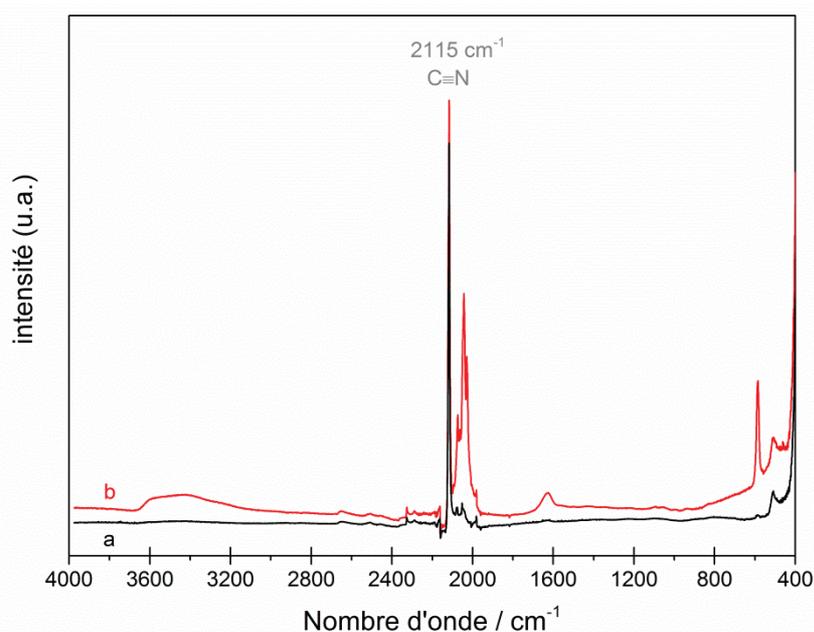


Figure III-20. Spectre IR du a. ferricyanure de potassium après broyage manuel des cristaux au mortier et pilon puis tamisage à $10\ \mu m$ (noir), et b. du même lot de ferricyanure de potassium après broyage mécanique pendant 5 min à l'aide d'un vibro-broyeur MM2 (réglage en puissance : 60%, Retsch, Allemagne) puis tamisage à $10\ \mu m$ (rouge).

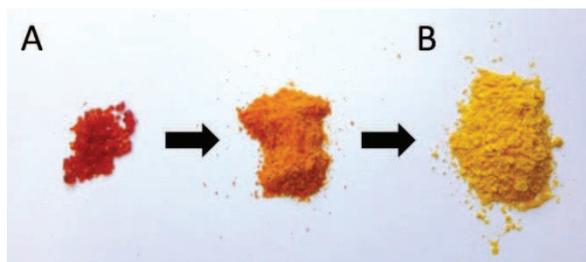


Figure III-21. Évolution de la couleur du composé de référence avec le temps de broyage manuel réalisé à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate : avec A. les cristaux de $K_3Fe(CN)_6$ tels que fournis par Sigma-Aldrich, et B. la poudre utilisée après tamisage en dessous de $10\ \mu m$.

III.4.3. Validation de la méthode d'ajout

La validation du procédé d'ajout d'une référence interne nécessite de s'assurer de la reproductibilité des analyses, d'évaluer les possibles interactions spectrales en fonction de la quantité de référence, et enfin d'optimiser cette quantité en fonction des études envisagées.

III.4.3.1. Reproductibilité des analyses

Les Figures III-22 et III-23 présentent des exemples de spectres IR obtenus dans le cadre des essais de répétabilité du procédé de mélange échantillon-référence, et d'acquisition des spectres. Ces exemples sont représentatifs des résultats obtenus à savoir qu'aucune différence significative n'a pu être observée entre les spectres pour une poudre d'hydroxyapatite et un pourcentage de référence donnés, et ce quel que soit l'opérateur. La méthode de préparation des mélanges est reproductible.

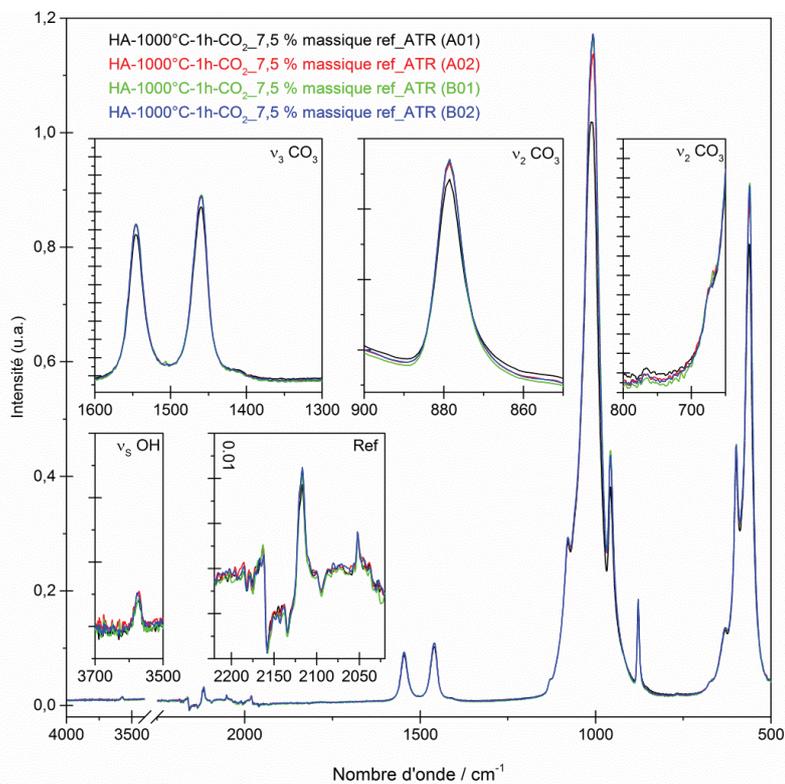


Figure III-22. Évaluation de la reproductibilité du protocole de mélange et de la répétabilité de l'analyse IR sur un mélange de C_AHA ($\varnothing < 25\ \mu m$) et de référence (7,5 % en masse, $\varnothing < 10\ \mu m$). Les notations Axx et Bxx représentent 2 préparations différentes du mélange analysées 2 fois chacune (-01 et -02). Les C_AHA analysées ont été obtenues à partir de poudres d'HA précalciniées à $400\ ^\circ C/2\ h/air$ puis calciniées à $1000\ ^\circ C/1\ h/CO_2$.

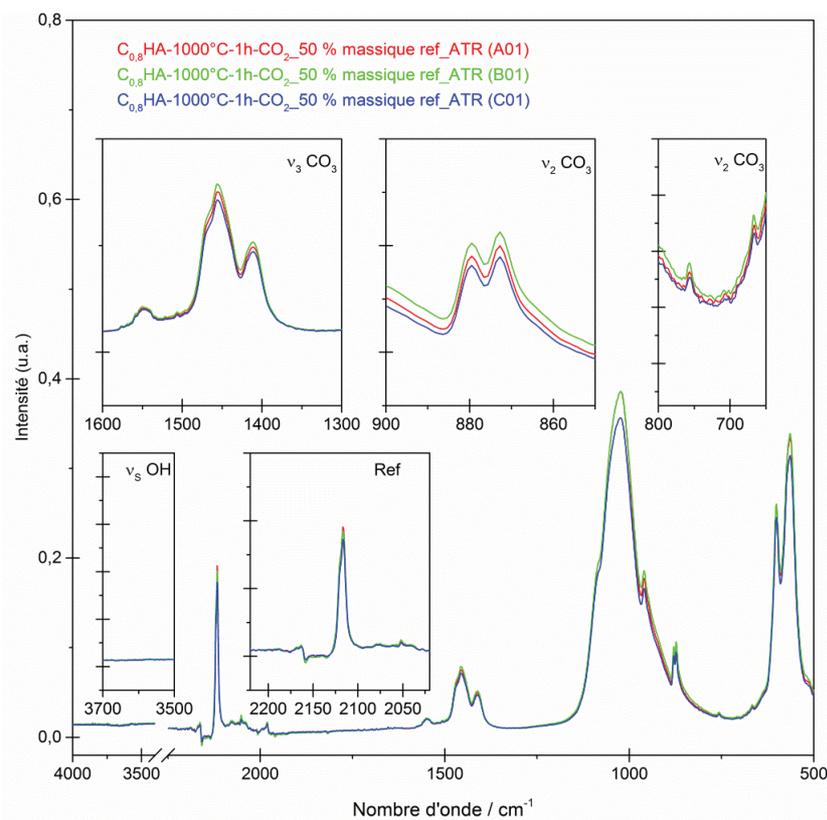


Figure III-23. Évaluation de la reproductibilité du protocole de mélange et de la répétabilité de l'analyse IR sur un mélange de $C_{AB}HA$ ($\phi < 25\mu\text{m}$) et de référence (50% en masse, $\phi < 10\mu\text{m}$). Les notations A01, B01 et C01 représentent la première analyse IR de chacune des 3 préparations différentes du mélange. Les $C_{AB}HA$ analysées ont été obtenues à partir de poudres de $C_{0,8}HA$ précalciniées à 400 °C/2 h/air puis calciniées à 1000 °C/1 h/ CO_2 .

III.4.3.2. Influence de la quantité de référence interne sur les spectres IR

La Figure III-24 illustre l'évolution des spectres IR des mélanges poudre-référence, en fonction de la quantité de référence ajoutée. Les poudres d'hydroxyapatites utilisées pour cette étude sont une HA et une $C_{0,8}HA$ calcinées à 900 °C pendant 5 h sous CO_2 .

La bande IR de référence (2115 cm^{-1}) est détectable à partir d'une quantité de 2,5 % en masse de référence. Pour des quantités plus faibles, elle est masquée par le bruit induit par le cristal en diamant du système ATR (Golden Gate™ Single Reflection ATR system). Les spectres IR ne connaissent aucune modification significative jusqu'à une concentration de 10 % massique de référence dans le mélange. La baisse d'intensité des bandes IR et leur faible élargissement lors d'une augmentation de la concentration en référence sont normaux, du fait d'une quantité plus faible de phase apatitique présente dans le mélange. Pour des concentrations de référence supérieures à 10 % en masse un déplacement des maxima des bandes relatives aux groupements PO_4 vers les grands nombres d'onde est observé mais les zones relatives aux vibrations des carbonates restent intactes (cf. Figure III-24 page 94).

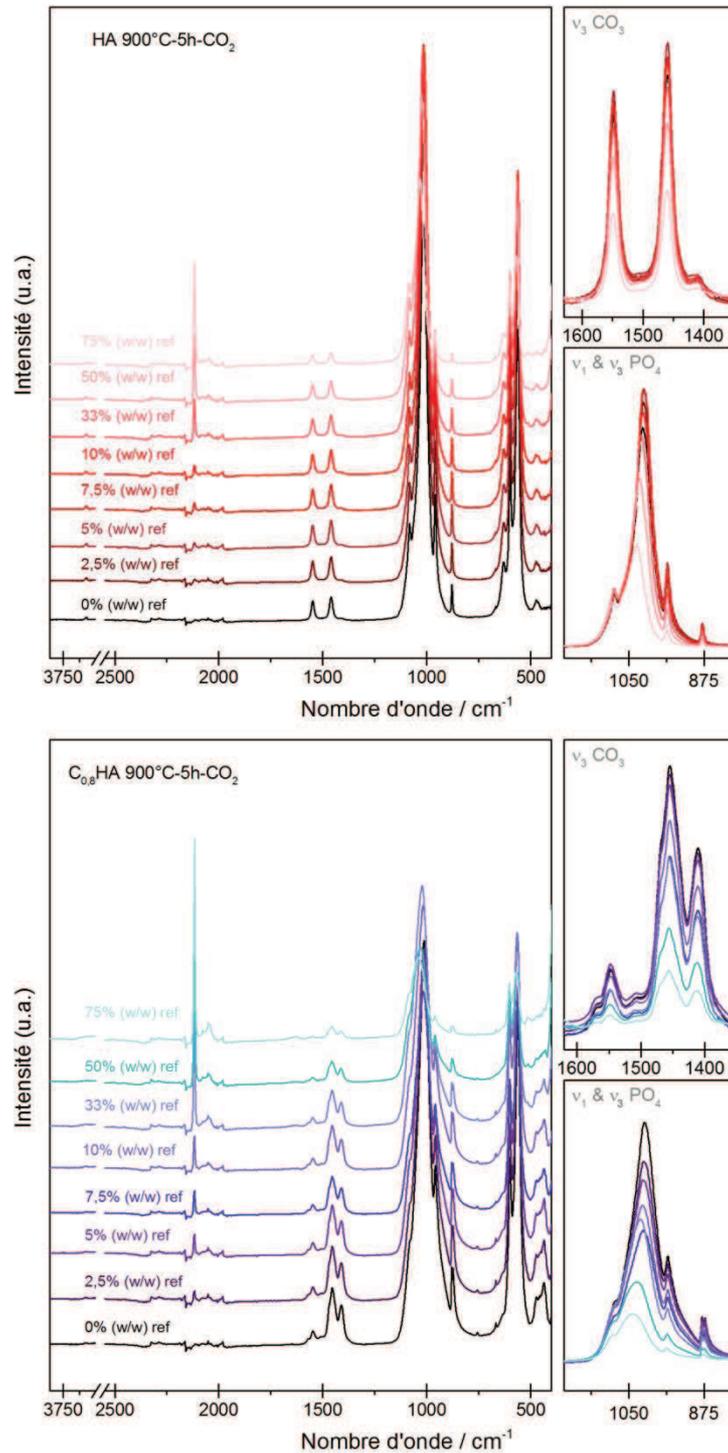


Figure III-24. Évolution des spectres IR des mélanges C_A HA-référence et $C_{0,8}$ HA-référence en fonction de la quantité de référence. Les poudres d'hydroxyapatites ont été obtenues en traitant thermiquement une HA et une $C_{0,8}$ HA à 900 °C pendant 5 h sous CO_2 .

Sur la base de ces résultats et des critères de choix exposés dans la section III.3.3.3. (page 83), deux types de mélange poudre-référence ont par la suite été utilisés :

1. un mélange contenant 7,5 % en masse de référence pour les analyses IR qualitatives afin de préserver le spectre IR des hydroxyapatites de toute « déformation » et d'obtenir une bande de référence dont l'intensité est plus de deux fois supérieure au bruit,

2. et un mélange contenant 50 % en masse de référence pour les analyses IR quantitatives, permettant de ne pas perturber le spectre originel des hydroxyapatites dans les zones ν_2 et ν_3 des carbonates et tout en obtenant un rapport signal sur bruit supérieur à 10. A noter qu'une quantité de 33% à 50% en masse de référence dans les mélanges serait tout à fait acceptable.

Les spectres IR obtenus avec ces deux types de mélange sont illustrés Figure III-25.

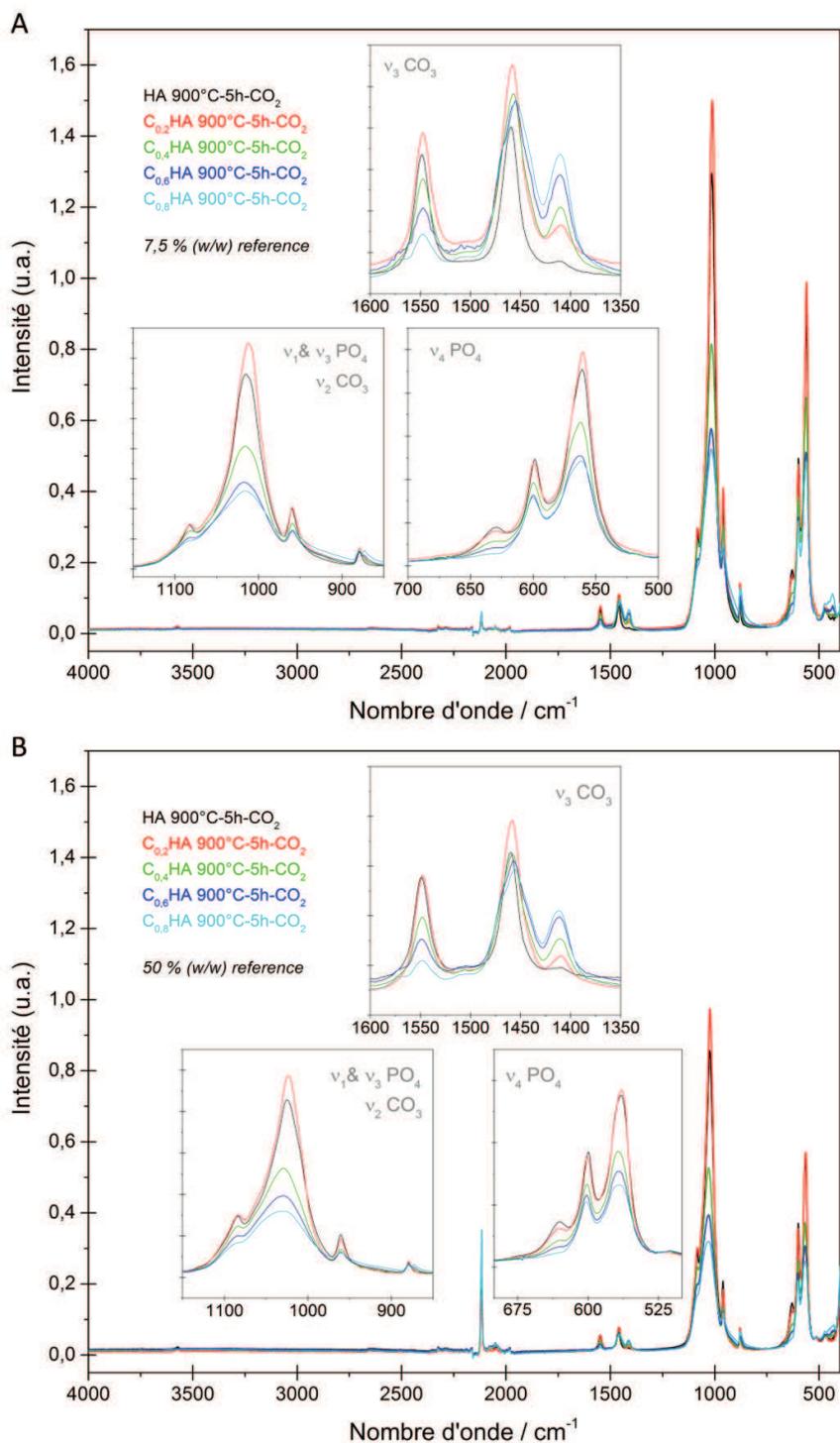


Figure III-25. Exemple de spectres IR obtenus pour des mélanges C_A HA-référence et C_{AB} HA-référence pour deux quantités de référence A. 7,5 % et B. 50 % en masse de référence.

III.4.4. Méthode d'ajout en spectrométrie IR : problèmes et améliorations possibles

Au cours des analyses comparant les spectres des mélanges C_A HA-référence et C_{AB} HA-référence, un phénomène étonnant est apparu. En effet, la bande du composé de référence, bien qu'ajouté en quantité connue et constante, a une intensité variable en fonction de la poudre d'hydroxyapatite à laquelle il est mélangé. Ce phénomène est mis en évidence sur la Figure III-26 pour des mélanges à 7,5 % et 50 % en masse de référence. Deux « groupes » semblent se distinguer : le groupe que nous appellerons #1 composé des poudres de C_A HA et $C_{0,2}$ HA, et le groupe #2 constitué des poudres $C_{0,4}$ HA, $C_{0,6}$ HA et $C_{0,8}$ HA. L'intensité de la bande de référence à 2115 cm^{-1} est égale dans chacun des groupes mais présente toujours une intensité plus faible pour les mélanges réalisés avec les poudres du groupe #1 par rapport à ceux réalisés avec les poudres du groupe #2.

La raison d'une telle variation d'intensité s'est alors posée.

Les protocoles de mélange des poudres et d'analyse ont été démontrés reproductibles et répétables pour un mélange bien défini (cf. III.4.3.1., page 83). La variation observée ne semble donc pas liée à ces protocoles.

Le cristal en diamant du système ATR Golden Gate™ utilisé générant du bruit entre 2400 cm^{-1} et 1900 cm^{-1} , nous avons voulu évaluer sa potentielle implication dans les différences d'intensité observées. La Figure III-27 présente les spectres IR obtenus sur des mélanges C_A HA-référence et C_{AB} HA-référence (7,5 % en masse) avec soit un module ATR, soit un module DRIFT qui n'utilise pas de cristal (cf. Figure III-11., page 84). Les résultats qualitatifs obtenus par analyse spectrale confirment très clairement l'existence des 2 groupes sus-cités (C_A HA/ $C_{0,2}$ HA et $C_{0,4}$ HA/ $C_{0,6}$ HA/ $C_{0,8}$ HA) et ce quel que soit le module d'analyse utilisé. Notons également que la différence d'intensité observée entre ces deux groupes est relativement constante d'un module d'analyse à l'autre et égale à $0,29 \pm 0,04$. La technique d'analyse ne semble donc pas à incriminer.

Une autre analyse de la Figure III-27A semble indiquer que cette différence d'intensité de la bande de référence n'est pas directement liée à l'ordre local au sein des cristallites d'apatite. En effet, il est connu que les substitutions ioniques dans l'apatite au niveau des sites phosphate augmentent le désordre local [234]. De plus, comme le montre la Figure III-28 une augmentation de l'ordre local au sein des cristallites de C_A HA, par le biais d'une augmentation de la température de calcination dans ce cas, entraîne une augmentation sensible de l'intensité de la bande de référence jusqu'à une valeur stable (ici 0,37 pour une C_A HA, 7,5 % en masse de référence). Ces deux comportements sont diamétralement opposés au phénomène de groupes précédemment décrits puisque nous observons que la bande de référence à 2115 cm^{-1} est toujours plus intense pour le « groupe » comportant le plus d'ions carbonate en site B ($C_{0,4}$ HA, $C_{0,6}$ HA et $C_{0,8}$ HA).

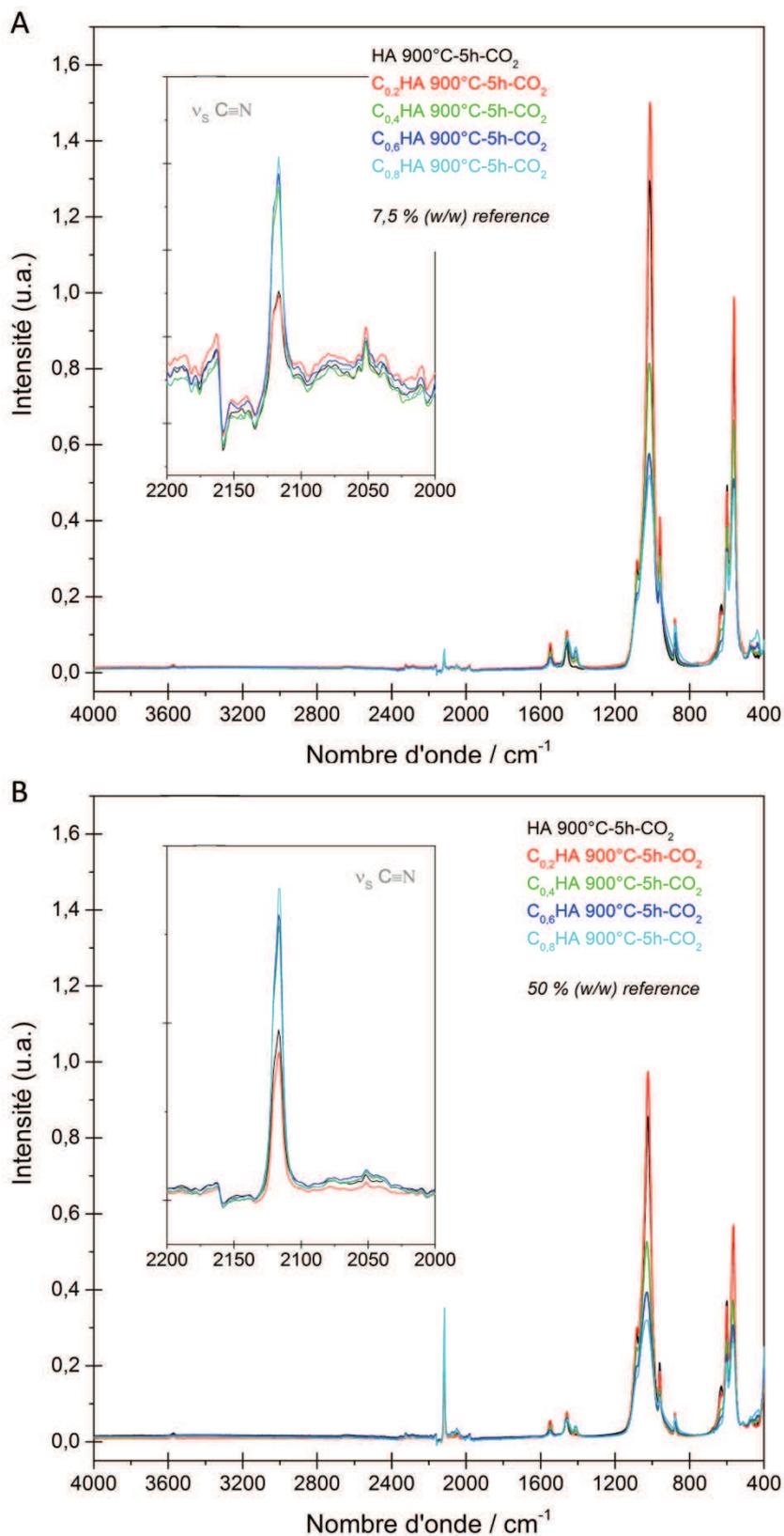


Figure III-26. Différences d'intensité de la bande de référence à 2115 cm⁻¹ en fonction de la composition des poudres et du % massique de référence. Spectres obtenus pour des mélanges C_AHA-référence et C_{AB}HA-référence pour deux quantités de référence A. 7,5 %, et B. 50 % en masse. Les poudres C_AHA et C_{AB}HA ont été respectivement obtenues en calcinant une HA et des C_BHA à 900 °C pendant 5 h sous CO₂.

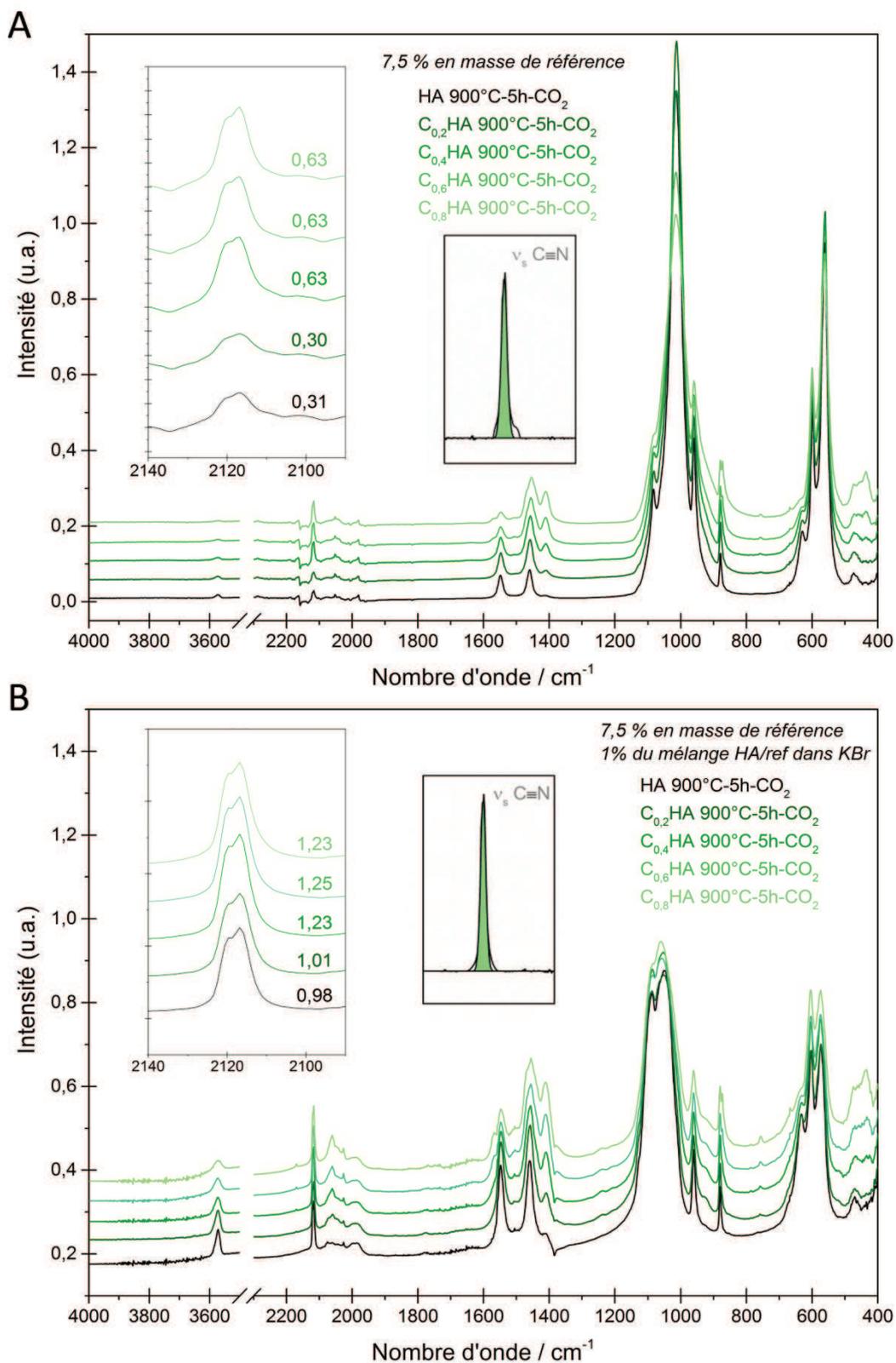


Figure III-27. Évolution de l'intensité de la bande IR de référence en fonction de la nature de l'hydroxyapatite analysée avec un système de mesure du type A. réflexion totale atténuée (ATR pour « Attenuated Total Reflection »), et B. réflexion diffuse (DRIFT pour « Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform »).

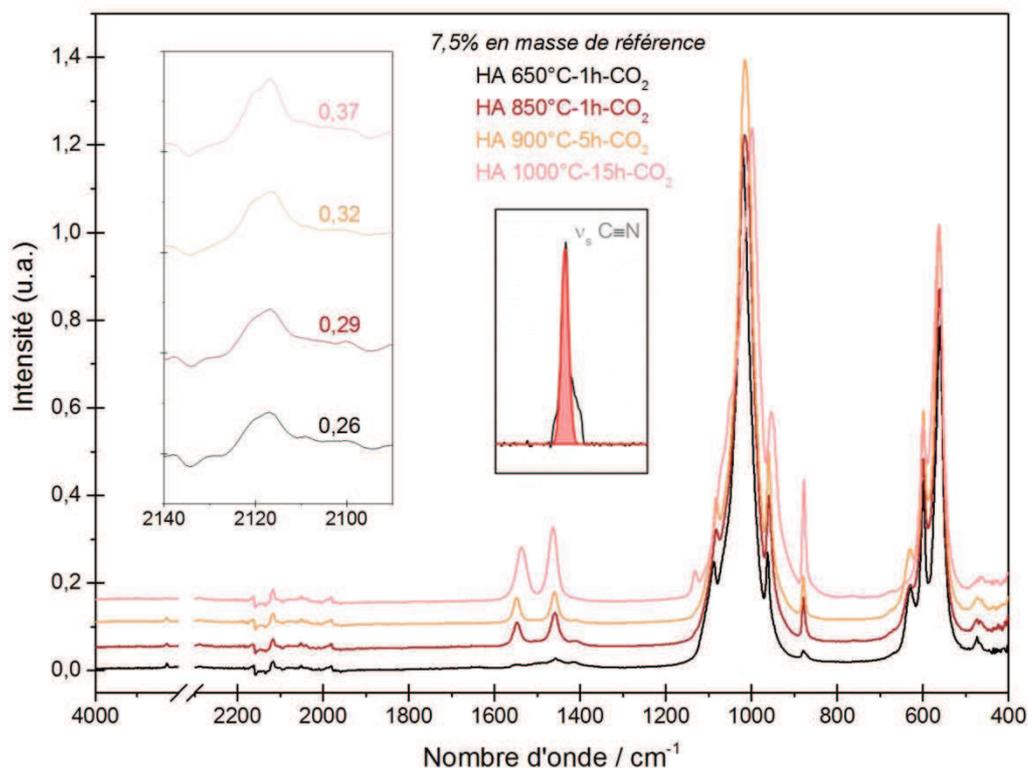


Figure III-28. Évolution de l'intensité de la bande de référence en fonction de la température et du temps de calcination sous CO_2 d'une HA préalablement calcinée à 400 °C pendant 2 h sous air.

Nous avons essayé de quantifier cette variation d'intensité pour des poudres d'HA, C_AHA et C_{AB}HA d'ordre local équivalent (calcination à 1000 °C pendant 15 h sous CO_2 ou sous air). Les spectres sont présentés Figure III-29. L'intensité de la bande de référence, bien qu'évoluant faiblement, est du même ordre de grandeur pour les poudres HA, C_AHA et $\text{C}_{0,2}\text{HA}$ calcinées à 1000 °C pendant 15 h. En revanche une différence importante entre les deux groupes $\text{C}_A\text{HA}/\text{C}_{0,2}\text{HA}$ ($0,33 \pm 0,04$) et $\text{C}_{0,4}\text{HA}/\text{C}_{0,6}\text{HA}/\text{C}_{0,8}\text{HA}$ ($0,68 \pm 0,04$) est une nouvelle fois observée. L'intensité de cette bande de référence semble être fonction du taux de substitution en site B plutôt que de celui en site A. En effet, les spectres IR des mélanges de poudre de C_AHA , contenant des quantités variables d'ions carbonate en site A, et de poudre de référence à 7,5 % en masse, présentés Figure III-30, ne révèlent aucune évolution de l'intensité de la bande de référence : $0,28 \pm 0,02$.

Le tableau III-6 synthétise les valeurs d'intensité de la bande de référence pour divers mélanges CHA/référence analysés en FTIR-ATR.

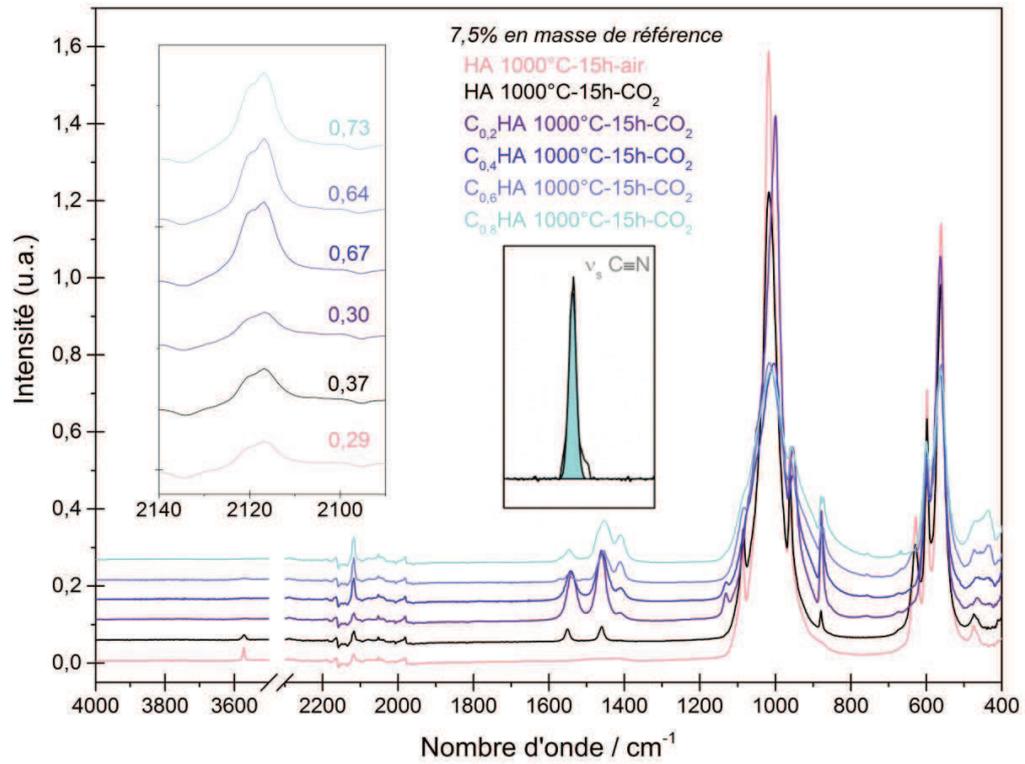


Figure III-29. Évolution de l'intensité de la bande IR de référence à 2120 cm^{-1} pour des mélanges à 7,5 % en masse de référence avec des poudres d'HA, C_A HA et C_{AB} HA de composition différente mais d'ordre local « équivalent » (calcination à 1000°C pendant 15 h sous CO_2 ou sous air)

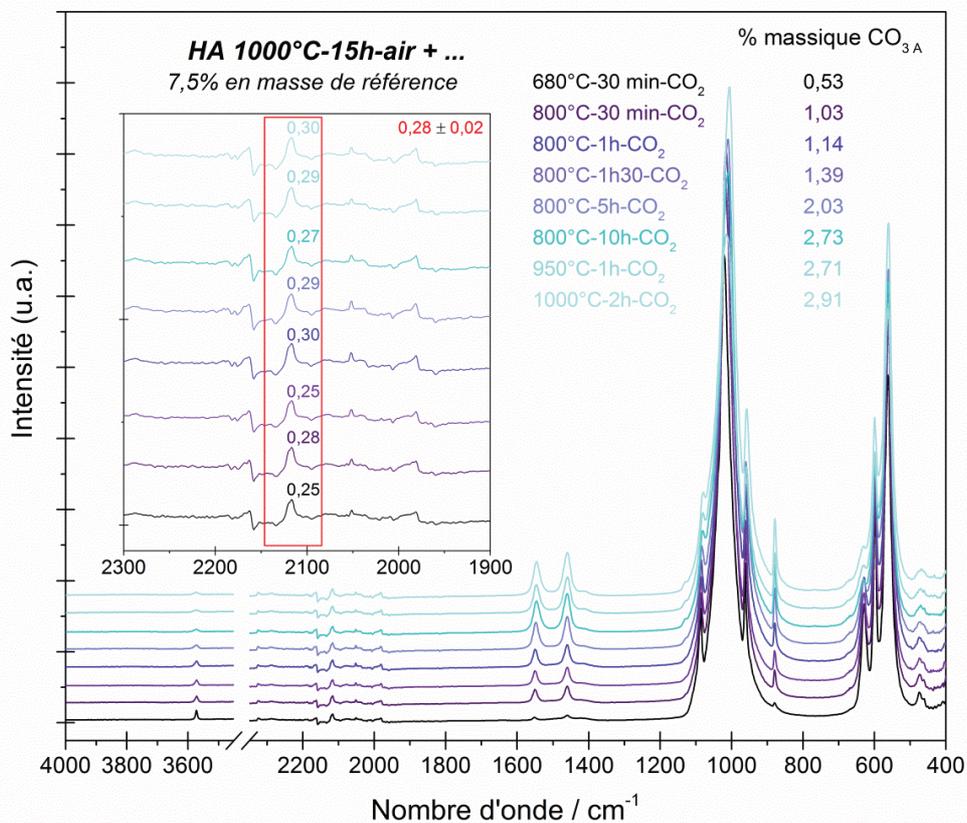


Figure III-30. Évolution de l'intensité de la bande IR de référence à 2115 cm^{-1} pour des mélanges à 7,5 % en masse de référence avec des poudres de C_A HA d'ordre local équivalent.

Tableau III-6. Évolution de l'intensité de la bande IR de référence en fonction de sa concentration dans le mélange hydroxyapatite/référence, de la composition de l'hydroxyapatite, et des traitements thermiques qu'elle a subis. Les dénominations 1x et 2x représentent respectivement les hydroxyapatites des groupes 1 et 2. Les indices -a et -b désignent des mélanges hydroxyapatite/référence à 7,5% en masse, dont les hydroxyapatites ont respectivement subi une calcination à 900 °C/5 h/CO₂ et 1000 °C/15 h/CO₂. L'indice -c désigne un mélange hydroxyapatite/référence à 50% en masse, dont les hydroxyapatites ont subi un traitement thermique à 900 °C/5 h/CO₂.

FTIR ATR	7,5% en masse de référence						50% en masse de référence		
	1000	650	850	900	1000	1000	900		
	15	1	1	5	1	15	5		
Température (°C)									
Temps (h)									
Atmosphère	air	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂		
HA	0,29	0,26	0,29	0,31	0,32	0,37	1,06	0,07	1,95
C _{0,2} HA			1a	0,30	1b	0,30	0,94	0,06	1,82
C _{0,4} HA			Légère augmentation →	0,63		0,67	0,99	0,05	2,92
C _{0,6} HA				0,63		0,64	0,94	0,05	2,96
C _{0,8} HA			2a	0,63	2b	0,73	1,07	0,06	3,22
Ratio 2x/1x				2,06	2,02		Peu d'évolution		1,61
Écart type 2x/1x				0,07	0,32				0,12

L'analyse du Tableau III-6 indique que l'intensité de la bande de référence n'évolue pas, ou faiblement, pour un taux de substitution en site B fixe (rapport Xb/Xa, tableau III-6), alors qu'elle varie significativement entre les groupes 1 et 2 (rapport 2x/1x, tableau III-6). Il est également intéressant de noter que le rapport entre l'intensité de la bande de référence pour les mélanges « groupe 2/K₃Fe(CN)₆ » et celle des mélanges « groupe 1/K₃Fe(CN)₆ » est constant pour les 2 traitements thermiques des CHA réalisés (≈2,0). En outre, ce rapport varie peu lorsque la quantité en composé de référence dans le mélange passe de 7,5 % à 50 % en masse (respectivement ≈ 2 et ≈1,6). La Figure III-31 montre également que la variation de l'intensité de la bande de référence pour des mélanges « C_AHA/K₃Fe(CN)₆ » et « C_{0,8}HA/K₃Fe(CN)₆ » évolue linéairement en fonction de la quantité de référence.

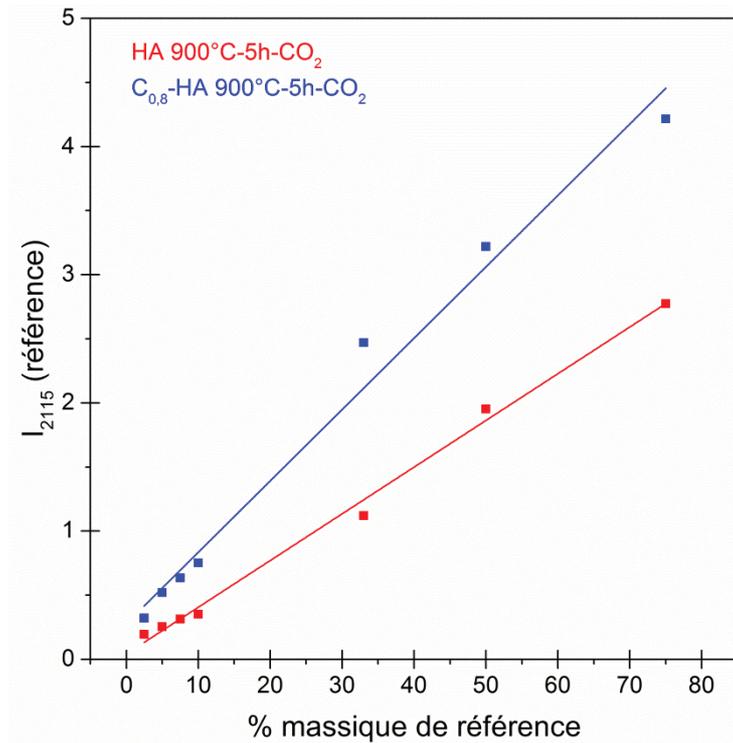


Figure III-31. Évolution de l'intensité de la bande de référence en fonction du % massique en référence dans les mélanges analysés via spectroscopie IR (ATR). Les courbes bleues et rouges ont été respectivement obtenues avec l'analyse de mélange HA 900 °C-5 h-CO₂/référence et C_{0,8}HA-900°C-CO₂/référence.

Ces résultats laissent ainsi à penser que la cause principale du changement d'intensité de la bande de référence entre les groupes 1 et 2 n'est pas : (i) le fait d'une différence d'ordre local des CHA, (ii) liée au taux d'ions carbonate en site A, (iii) corrélée à une éventuelle interaction chimique ou physico-chimique entre le composé de référence et les CHA, (iv) proportionnelle à la quantité de CO_{3B} (du fait de l'existence de 2 groupes). En revanche, ce changement pourrait être expliqué par une modification des propriétés optiques des poudres d'hydroxyapatites en fonction du taux de CO_{3B}. En effet, il n'est pas aberrant de penser qu'un changement au sein de la structure apatitique (e.g., paramètres de maille, répartition des charges) pourrait modifier sensiblement une voire plusieurs des propriétés optiques du matériau (e.g., indice de réfraction, réflectivité, coefficient d'absorption). Par conséquent, les spectres IR obtenus pour des matériaux chimiquement proches mais de propriétés optiques différentes pourraient comporter des intensités variables puisque les techniques d'analyses IR sont basées sur les interactions onde-matière comme schématisé Figure III-32.

En première approche, cette hypothèse semble plausible si l'on se cantonne au domaine spectral du visible. En effet, la Figure III-33 montre que le mélange « Groupe 1/Référence » est toujours plus pâle que le mélange « Groupe 2/Référence » pour la même quantité de référence ajoutée, ici 7,5 % en masse. Cette observation, bien que simpliste, témoigne des écarts dans le domaine du visible des propriétés optiques des deux groupes de CHA définis.

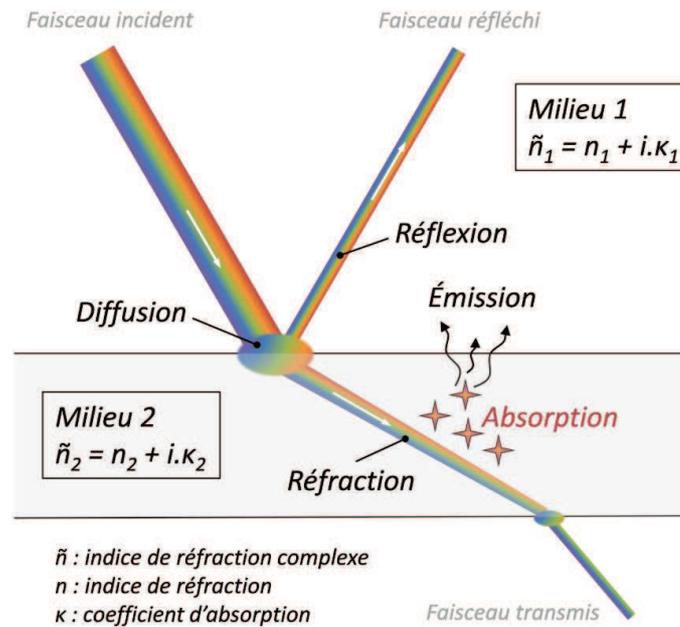


Figure III-32. Représentation schématique des interactions entre photons et matériau

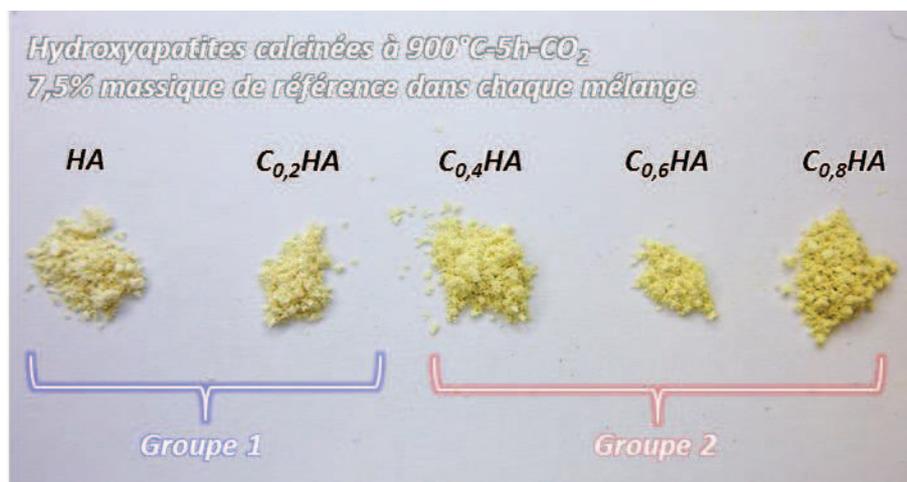
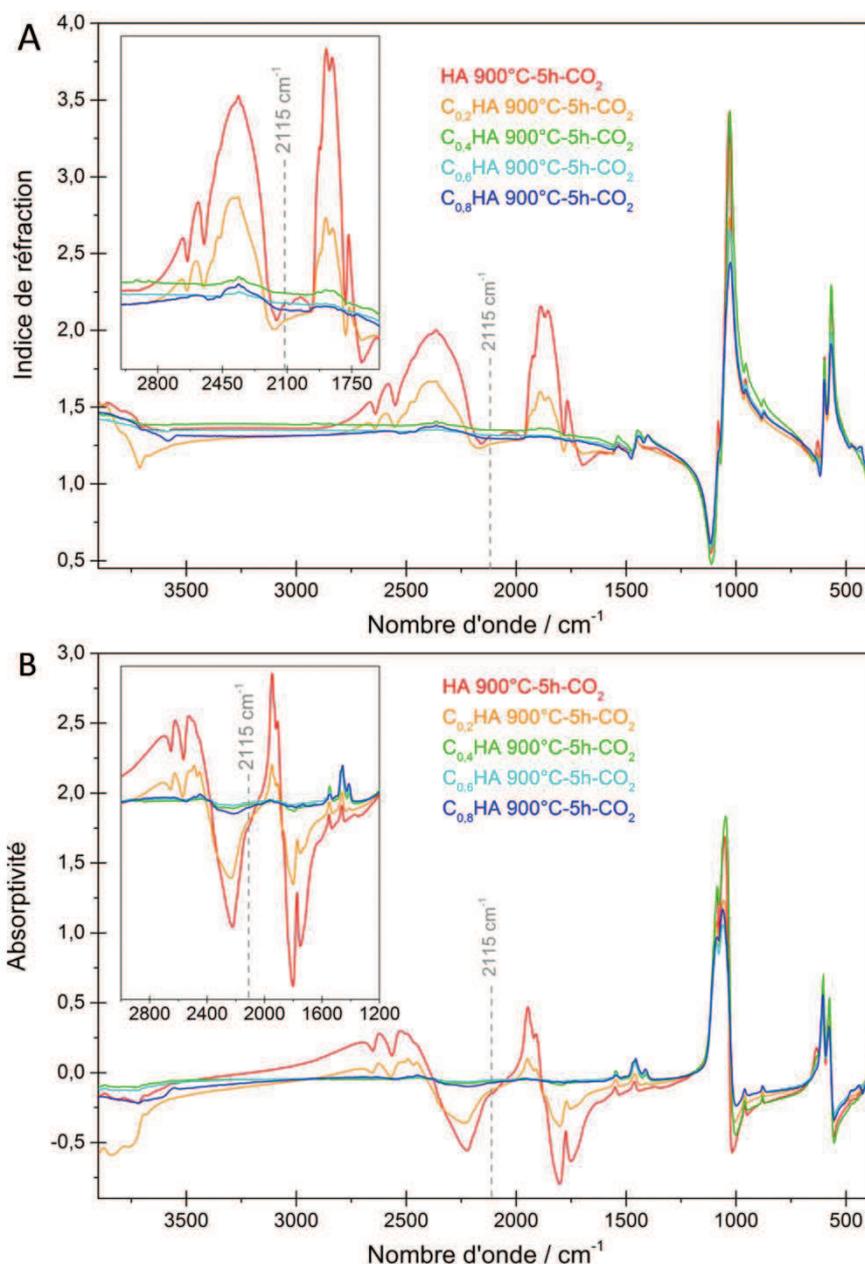


Figure III-33. Évolution de la couleur du mélange CHA/composé de référence, à 7,5% en masse, en fonction de la composition de la CHA.

Pour aller plus loin, l'évolution des propriétés optiques entre les différentes CHA préparées a été évaluée, comme illustré Figure III-34 page 104. Ces mesures ont été effectuées par spectroscopie IR en réflexion spéculaire (angle de 11° par rapport à la normale) sur des comprimés d'un mélange échantillon d'hydroxyapatite-poudre de KBr. Un algorithme de Kramers-Kronig a par la suite permis d'évaluer l'évolution de l'indice de réfraction et du coefficient d'absorption en fonction du nombre d'onde comme illustré Figure III-34. A titre informatif, plus de détails sur la transformée de Kramers-Kronig sont disponibles dans l'ouvrage de J.C. Canit et al. [235]. Il est important de souligner que la méthode utilisée dans notre cas n'est que qualitative, i.e., seules les différences d'évolution du nombre d'ondes sont à prendre en considération pas leur valeur⁵.

⁵ Ces mesures d'indice de réfraction par spectrométrie IR n'ont été effectuées que qualitativement en fin de thèse avec l'aimable aide de la société BRUKER. Les mesures quantitatives, demandant la mise en place de protocoles expérimentaux et de techniques d'analyses adaptées, n'ont pas pu être réalisées par manque de temps et de moyens.

Les résultats confirment que les poudres du groupe 1 (C_A HA et $C_{0,2}$ HA) et du groupe 2 (C_A HA et $C_{0,2}$ HA) présentent des propriétés optiques équivalentes au sein d'un même groupe mais significativement différentes entre les groupes. Ils permettent ainsi d'expliquer la différence d'intensité enregistrée au niveau de la bande de référence selon que le mélange ait été fait avec une poudre du groupe 1 ou du groupe 2. **Mais plus important ils nous indiquent que cette différence n'est pas un phénomène extrinsèque aux poudres de CHA, c'est-à-dire lié seulement à la modulation de l'amplitude de vibration du groupement $C\equiv N$ (par exemple du fait d'interaction avec des groupements de surface des CHA), mais à un phénomène intrinsèque aux poudres de CHA et donc généralisable à tout le spectre IR.** En somme, l'utilisation du rapport $R = \frac{I_{\text{bande } CO_3}}{I_{\text{bande référence}}}$ est valide quel que soit le taux de CO_{3B} .



Une validation rigoureuse des différences de propriétés optiques des céramiques en CHA en fonction de leur composition est à réaliser. Pour cela, il sera nécessaire de préparer des pastilles frittées denses et polies (« poli miroir » : grade 1 μm) de $C_A\text{HA}$ et $C_{AB}\text{HA}$ de composition différente et (ii) d'évaluer leurs propriétés optiques en réflexion spéculaire pure grâce au système Hyperion 3000 (Bruker) couplé à notre spectromètre IR. Une perspective d'étude intéressante sera de comprendre les raisons d'un tel changement de propriétés optiques en fonction du taux de CO_{3B} : par exemple, relier les variations de propriétés optiques aux possibles modifications du réseau cristallin (e.g., formation locale de clusters P_3 dans la maille apatitique $P_{63/m}$, suggestion de Fleet à propos de $C_{AB}\text{HA}$ sodées à partir d'un certain taux de CO_{3B} [193]).

III.4.5. Conclusions

Notre but final étant de produire des implants personnalisés en CHA il apparaît important de prévoir des méthodes normalisables d'analyse de ces biomatériaux et pourquoi pas une méthode de quantification des CO_{3A} et CO_{3B} .

Certes, cette méthode d'ajout connaît des limites telles que (i) le temps de préparation des échantillons, (ii) la « pollution » irréversible des échantillons de poudre par le composé de référence, (iii) une modification du spectre IR en fonction de la quantité de référence introduite dans le mélange, et (iv) les raisons encore floues de la fluctuation de l'intensité de l'ensemble du spectre IR en fonction du taux de CO_{3B} des hydroxyapatites analysées. Toutefois, le potentiel de cette méthode nous semble supérieur à ses inconvénients et réside dans la possibilité (i) de valider la qualité du spectre (e.g. détection des fluctuations de l'appareillage de mesure), (ii) de normaliser les spectres IR par rapport à une bande de référence connue et stable, et (iii) de mettre en place une méthode fiable et standardisable de quantification sélective des carbonates dans la maille apatitique.

Enfin, ce travail a permis de mettre en évidence que les propriétés optiques des CaP, en général considérées comme équivalentes (e.g., coefficient d'absorption $\approx 1,6$ [236-238]) ne le sont en fait pas du tout. Ces propriétés devront notamment être évaluées plus précisément pour les CHA.

III.5. Vers une caractérisation plus précise des ions carbonate dans la maille apatitique

III.5.1. Indexation des bandes relatives aux ions carbonate substitués dans la maille apatitique

Comme indiqué dans la section III.3.4.2. (page 84), l'identification des bandes relatives aux ions carbonate substitués en site A ou B du réseau de l'hydroxyapatite a suivi deux grandes étapes : une première étape conventionnelle d'assignation des bandes sur la base de comparaison visuelle des spectres obtenus sur différents échantillons et une deuxième étape d'affinement de ces indexations à l'aide d'outils informatiques.

III.5.1.1. Indexation visuelle

L'observation et la comparaison des spectres IR de C_A HA et C_{AB} HA a permis une détermination approximative du nombre de bandes et de leur position dans les massifs ν_2 et ν_3 des ions carbonate, ainsi qu'une première indexation. Cette première étape est fondamentale pour la procédure de « curve fitting » [229].

La Figure III-35 présente les spectres IR de mélanges C_A HA-Référence (7,5 % en masse), dissociés en zones d'intérêt centrées autour de la bande de référence, et des domaines ν_3 CO_3 , ν_2 CO_3 et ν_4 CO_3 . Les spectres présentés ne sont pas normalisés (i.e., bruts d'acquisition).

Les poudres d'HA traitées thermiquement sous CO_2 présentent trois bandes à 1548 cm^{-1} (ν_3 CO_3), 1455 cm^{-1} (ν_3 CO_3) et 879 cm^{-1} (ν_2 CO_3) qui évoluent significativement avec le taux de CO_{3A} . Ces trois bandes semblent, à ce stade de l'analyse des spectres, assez clairement assignables à des CO_{3A} . Cette assignation n'est communément admise dans la littérature que pour la bande à 879 cm^{-1} (tableau III-4, page 75).

La forme asymétrique de la bande à 879 cm^{-1} suggère la présence de bandes supplémentaires vers les plus bas nombres d'onde. Quatre bandes ont ainsi été positionnées arbitrairement à 873 , 866 , 860 et 853 cm^{-1} . A première vue, l'intensité de ces bandes n'évolue pas significativement avec l'augmentation du taux de CO_{3A} , toutefois elles n'ont été affectées à aucun type de CO_3 à ce stade de l'étude.

De façon équivalente, la forme des bandes à 1548 et 1455 cm^{-1} suggère la présence d'au minimum deux bandes supplémentaires encadrant chacune de ces bandes principales, que nous avons positionnées respectivement à 1557 et 1535 cm^{-1} , et 1467 et 1444 cm^{-1} . Une différence apparaît toutefois : le maximum de la bande à 1548 cm^{-1} est décalé vers les bas nombres d'onde avec l'augmentation de la carbonatation en site A, alors que celui de la bande à 1455 cm^{-1} reste constant. Sur ces observations, nous avons arbitrairement attribué les bandes à 1557 et 1535 cm^{-1} à CO_{3A} , et celles à 1467 et 1444 cm^{-1} à CO_{3B} . Nous reviendrons sur ces choix plus tard. Enfin, les bandes situées à 1409 , 1419 , 1482 , 1507 et 1572 cm^{-1} , qui évoluent peu avec l'accroissement du taux de CO_{3A} , n'ont pas été affectées pour l'heure.

Au niveau du domaine ν_4 CO_3 aucune bande n'est clairement identifiable.

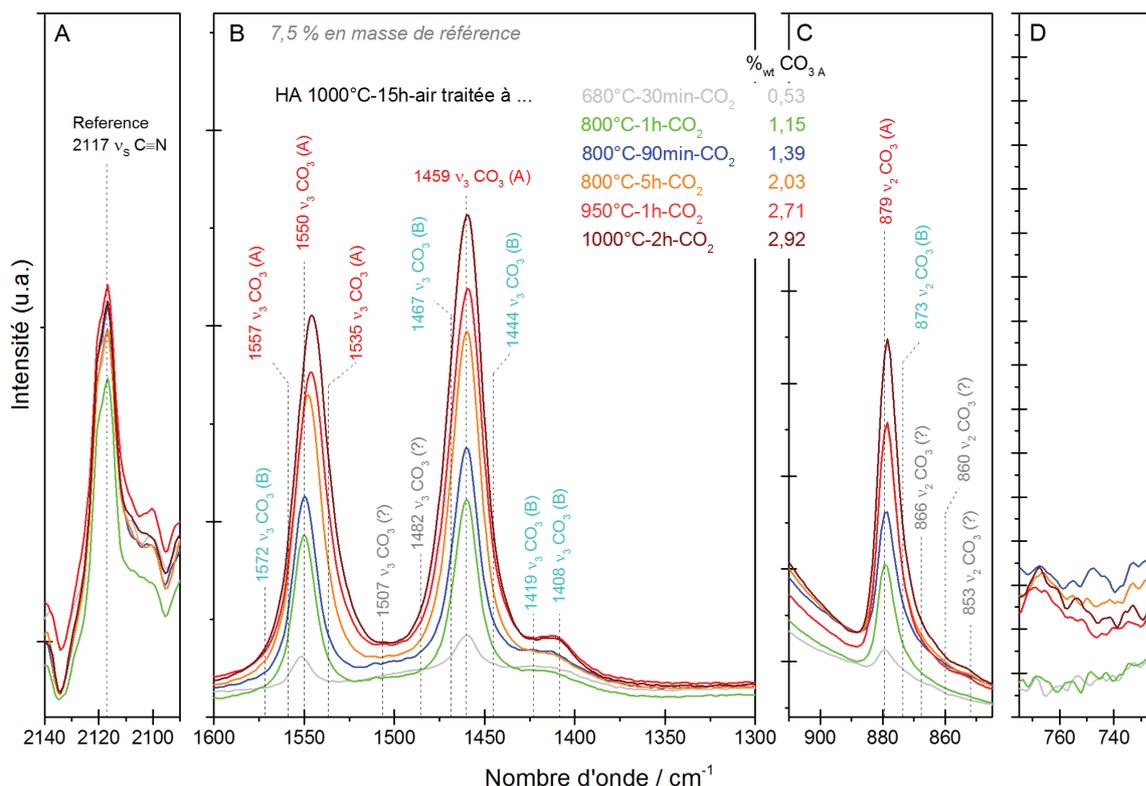


Figure III-35. Spectres IR de mélanges C_A HA-Référence (7,5% en masse) avec 4 zones centrées sur A, la bande ν_5 C≡N du composé de référence, B, le domaine ν_3 CO₃, C, le domaine ν_2 CO₃ et D, le domaine ν_4 CO₃. Les poudres de C_A HA ont été obtenues en calcinant une HA à 1000 °C sous air pendant 15 h, puis sous CO₂ avec différents couples température/temps de palier. Les % massique en CO_{3A} pour chaque C_A HA sont indiqués à titre informatif.

La Figure III-36 présente les spectres IR bruts d'acquisition de mélanges C_{AB} HA-Référence (7,5 % en masse) dissociés selon les mêmes zones que pour la Figure III-35. Les spectres normalisés de la Figure III-36 sont présentés Figure III-37.

Avant tout nous pouvons constater que l'évolution de l'intensité des bandes avec le taux de CO_{3B} est très différente selon que l'on considère les spectres bruts d'acquisition ou normalisés par rapport à la bande de référence. Ce constat n'est pas anecdotique car il peut expliquer, en tout cas en partie, les contradictions d'indexation observées dans la littérature. Les analyses faites par la suite seront réalisées sur les spectres normalisés (Figure III-37).

L'introduction d'ions carbonate en site B induit une modification significative des domaines ν_2 CO₃ et ν_3 CO₃ comparativement au spectre IR d'une C_A HA (comparaison faite à l'aide de la Figure III-35 ou de l'échantillon « HA 900°C-5 h-CO₂ » Figures III-36 et III-37).

Le domaine ν_2 CO_3 voit apparaître une seconde bande principale (i.e. d'intensité significative) à 873 cm^{-1} d'intensité croissante avec le taux de $\text{CO}_{3\text{B}}$. Ce domaine s'élargit également vers les bas nombres d'onde avec l'augmentation du taux de $\text{CO}_{3\text{B}}$. Nous avons attribué cet épaulement, comme lors de l'analyse des spectres de C_AHA (Figure III-35), à trois bandes placées à 866 , 860 et 853 cm^{-1} . Cette analyse rudimentaire indiquerait donc que le domaine ν_2 CO_3 serait constitué d'une bande associée aux $\text{CO}_{3\text{A}}$ à 879 cm^{-1} et d'au moins trois bandes à 873 , 866 et 860 cm^{-1} attribuables à des $\text{CO}_{3\text{B}}$. L'évolution de la bande observée vers 853 cm^{-1} est tellement faible que nous ne l'avons pas assignée à un site en particulier dans l'immédiat.

Le domaine ν_3 CO_3 des $\text{C}_{\text{AB}}\text{HA}$ connaît quant à lui plusieurs modifications majeures par rapport à celui d'une C_AHA .

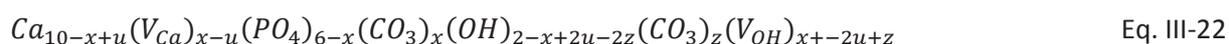
Le domaine centré sur la bande à 1548 cm^{-1} voit son intensité diminuer avec le taux de $\text{CO}_{3\text{B}}$ et ce, sans déplacement de la position de son maximum. Seule la bande qui jouxte ce domaine à 1572 cm^{-1} s'intensifie avec le taux de carbonatation en site B. L'évolution de ces bandes en fonction de la quantité de $\text{CO}_{3\text{B}}$ permet ainsi de confirmer, voire d'affiner, l'assignation des bandes précédemment proposée Figure III-35 à savoir : trois bandes associées aux $\text{CO}_{3\text{A}}$ à 1557 , 1548 et 1535 cm^{-1} et une bande liée au $\text{CO}_{3\text{B}}$ à 1572 cm^{-1} .

Le domaine centré autour de la bande à 1455 cm^{-1} voit son profil se déformer avec l'augmentation du taux de $\text{CO}_{3\text{B}}$. Le maximum de ce domaine se décale de 5 cm^{-1} vers les petits nombres d'onde entre l'échantillon C_AHA ($\text{HA } 900^\circ\text{C-5h-CO}_2$) et l'échantillon contenant le plus de $\text{CO}_{3\text{B}}$ ($\text{C}_{0,8}\text{HA } 900^\circ\text{C-5h-CO}_2$). De plus, deux nets épaulements à 1467 cm^{-1} et 1444 cm^{-1} s'intensifient avec le taux de $\text{CO}_{3\text{B}}$, au détriment vraisemblablement de la bande à 1455 cm^{-1} . En résumé, les assignations établies sur la base des spectres obtenus pour les C_AHA semblent se confirmer, la bande à 1455 cm^{-1} pouvant être attribuée aux $\text{CO}_{3\text{A}}$ et les bandes à 1467 et 1444 cm^{-1} aux $\text{CO}_{3\text{B}}$.

Les bandes précédemment positionnées à 1409 et 1419 cm^{-1} pour les C_AHA (Figure III-35), voient leur intensité augmenter significativement avec le taux de $\text{CO}_{3\text{B}}$, nous les avons attribuées à des $\text{CO}_{3\text{B}}$. Notons, qu'un élargissement du pied de cette bande, vers les bas nombres d'onde, est également observée. Cet épaulement a été assigné à des $\text{CO}_{3\text{B}}$ à 1382 cm^{-1} .

Enfin une nouvelle bande est détectée à 757 cm^{-1} au niveau du domaine ν_4 CO_3 par rapport aux spectres des poudres C_AHA (Figure III-35 versus Figure III-37). Son évolution avec la composition des $\text{C}_{\text{AB}}\text{HA}$ indique qu'elle est à corrélérer aux $\text{CO}_{3\text{B}}$.

Une analyse sommaire de l'intensité des bandes assignées, dans le cadre de ce travail, aux ions carbonate de type A et B confirmerait la formule générale des CHA de type A/B suivante (identique à l'Eq. III-6, page 68) :



En effet les bandes assignées aux $\text{CO}_{3\text{A}}$ sont de moins en moins intenses avec l'augmentation du taux de carbonatation en B, i.e., une augmentation du coefficient stœchiométrique x. Une exception toutefois, la CHA de type A/B $\text{C}_{0,2}\text{HA}$ présente toujours des bandes assignées aux $\text{CO}_{3\text{A}}$ (e.g., 1548 , 1455 , 879 cm^{-1}) sensiblement plus intenses que celles de la C_AHA ($\text{HA } 900^\circ\text{C-5h-CO}_2$).

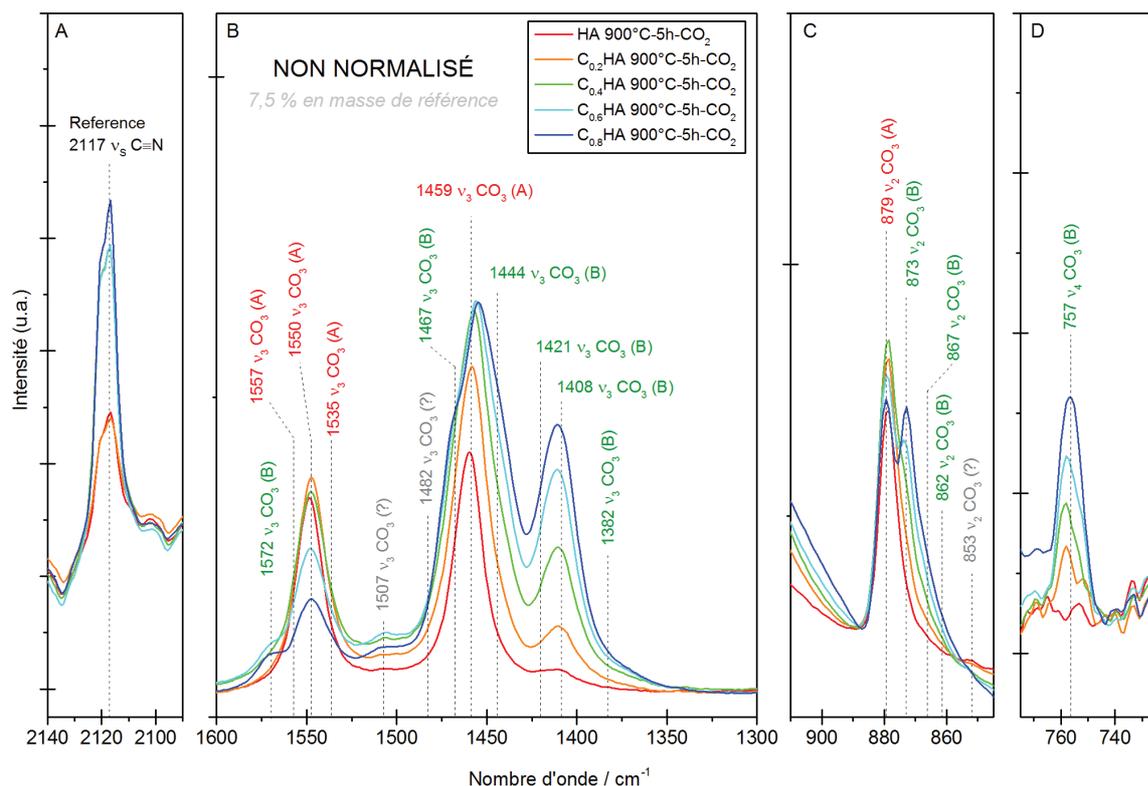


Figure III-36. Spectres IR de C_AHA et de C_{AB}HA mélangées avec 7,5% en masse de référence ; avec les domaines relatifs aux modes de vibration A. ν₃ C≡N du composé de référence, et B. ν₃ CO₃, C. ν₂ CO₃ et D. ν₄ CO₃ des CHA. La C_AHA et les C_{AB}HA ont été respectivement obtenues par calcination d'une HA et de C_BHA à 900 °C/5 h/CO₂.

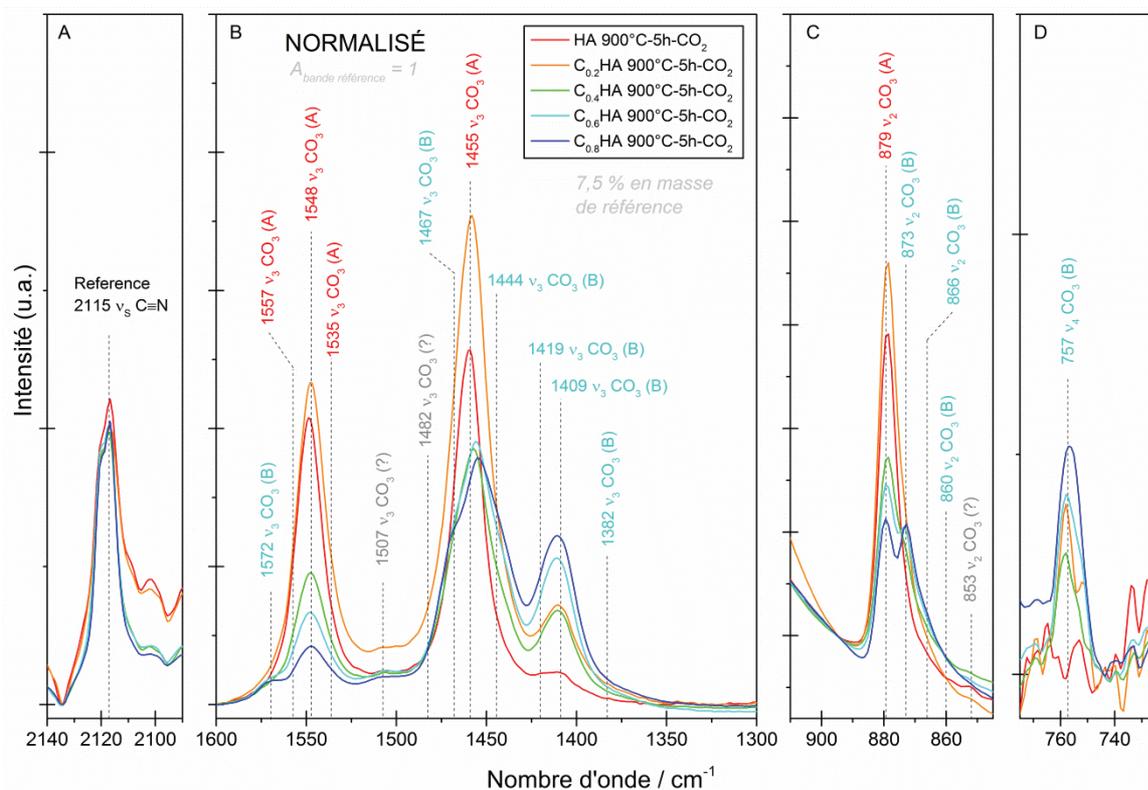


Figure III-37. Spectres IR d'HA et de C_BHA mélangées avec 7,5% en masse de référence ; avec les domaines relatifs aux modes de vibration A. ν₃ C≡N du composé de référence, et B. ν₃ CO₃, C. ν₂ CO₃ et D. ν₄ CO₃ des CHA. Tous les spectres ont été normalisés par rapport à l'intensité (aire intégrée) de la bande de référence ramenée à 1. La C_AHA et les C_{AB}HA ont été respectivement obtenues par calcination d'une HA et de C_BHA à 900 °C/5 h/CO₂.

Le tableau III-7 ci-dessous résume les conclusions de la première étape de cette étude. L'identification des bandes IR principales du massif $\nu_2\text{CO}_3$ (879 et 873 cm^{-1}) est en accord avec les données de la littérature. L'attribution des bandes de faible intensité, positionnées à 867, 860 et 853 cm^{-1} , aux CO_3B est en soit un élément nouveau mais qui trouve très certainement un écho dans le terme « labile » employé par le Pr. REY (cf. section III.5.1.2. page 111).

En revanche, notre indexation des bandes dans le domaine relatif au mode $\nu_3\text{CO}_3$ connaît des différences majeures avec celles proposées dans la littérature : seules les bandes à 1409, 1419, 1535 et 1548 cm^{-1} sont conformes à la littérature.

Tableau III-7. Identification des bandes IR relatives aux ions carbonate situés en site A et B dans la maille apatitique. Comparaison de nos assignations avec celles de la littérature, les nombres d'ondes indiqués en violet, en orangé et en vert indiquent des bandes respectivement non décrites, en désaccord et en accord avec les données de la littérature. Les * et † représentent les doutes concernant l'assignation des bandes IR respectivement au sein de la littérature et suite à ces premières observations expérimentales.

Mode de vibration	Antonakos	Rey	Lafon	Gibson	Fleet	Présent Travail
$\nu_4\text{CO}_3$	668 (A)		670 (A)			
	674 (B)	675 (A)				
		692 (B)	692 (B)			
	713 (B)	718 (B)	710 (B)			
		740 (?)				
	760(A)	757 (A)	757 (A)	755 (A)		757 (B)
	813 (B)					
847						
$\nu_2\text{CO}_3$						853 †
					862 (A2/lab)	860 (B) †
		866 (lab)	866 (lab)			866 (B) †
	873 (B)	871 (B)	871 (B)	873 (B)	872 (B)	873 (B)
			873 (B)			
	880(A)	878 (A)	880 (A)	880 (A)	878 (A1)	879 (A)
$\nu_3\text{CO}_3$						1382 (B) †
	1409 (B)	1416*	1412 (B)	1410*	1409 (B)	1409 (B)
	1427 (B)	1422 (B)	1420 (B)			1419 (B)
	1444 (A)	1445*			1441 (A1)	1444 (B)
		1452*	1450 (A)*		1450 (A1)	
	1450 (B)	1456 (B)		1455*	1455 (B)	
			1460 (B)		1459 (A1)	1455 (A)
	1468 (vac)	1463 (A)	1465 (A)	1466*		1467 (B)
		1470*	1470 (B)*		1474 (B)	1467 (B)
						1482 †
	1498 (A)	1500*	1500 (A)*	1498*	1504*	1507 †
	1528 (A)				1507 (A2)	
	1535 (A)	1540 (A)			1535 (A)	
	1545*	1545 (A)*	1545*	1544 (A1)	1548 (A)	
					1557 (A)	
	1568*	1568 *	1570*	1569 (A2)	1572 (B)	

* Assignation controversée dans la littérature

† Bande non-assignable/doutes aux vie des ces expérimentations

Accord/Désaccord/bande non décrite versus littérature

Les divergences entre les résultats obtenus et la littérature peuvent trouver une explication dans les points suivants :

1. l'éventuelle différence de composition entre les CHA étudiées, qui sont dans notre cas des CHA monophasiques de synthèse sans aucune autre substitution (e.g., Na, Cl), contrairement à beaucoup d'études [180, 193, 239].

2. un manque de connaissances fondamentales des CHA ; des réactions de synthèse aux échanges/migrations ioniques pouvant s'opérer aux cours des traitements thermiques en passant par la distribution des ions carbonate dans la maille apatitique. En effet, les spectres IR des poudres d'HA calcinées à 1000°C pendant 15 h sous air (afin d'éliminer la présence possible de traces de $\text{CO}_{3\text{B}}$) puis traitées sous CO_2 , pour former des $\text{C}_\text{A}\text{HA}$ escomptées « pures », possèdent des bandes attribuables à des $\text{CO}_{3\text{B}}$ (e.g., 1409, 1419, 1572 cm^{-1} , Figure III-35). Serait-il donc impossible d'obtenir des CHA uniquement carbonatées en site A ? Existe-t-il plusieurs types de sites B et/ou A ?

3. d'éventuels problèmes d'acquisition et/ou de normalisation (e.g., par rapport à une bande de référence variable $\nu_4 \text{PO}_4$ à 600 cm^{-1}) des spectres IR qui peuvent fausser certaines interprétations. Pour plus de précision, veuillez, s'il vous plait, vous référer aux sections III.2.3.1. (page 72) et III.5.1. (page 106).

III.5.1.2. Analyse spectrale à l'aide d'outils informatiques

Dans l'optique d'affiner les résultats obtenus au sous-chapitre précédent III.5.1.1., une analyse plus poussée des spectres IR a été menée via une procédure de « curve fitting » détaillée section III.3.4.2. (page 84). Après définition et soustraction de la ligne de base, l'estimation mathématique du nombre et de la position des bandes IR dans les domaines ν_2 et ν_3 des ions carbonate a été réalisée en utilisant la dérivée première et seconde de chaque spectre, comme illustré sur les exemples de la Figure III-38. Au final, 5 positions de bande ont été définies au niveau du domaine $\nu_2 \text{CO}_3$ (n° 1 à 5) et 11 pour le domaine $\nu_2 \text{CO}_3$ (n°6 à 17).

La Figure III-39 présente la décomposition spectrale obtenue après « curve fitting » des spectres IR des mélanges $\text{C}_\text{A}\text{HA}$ -Référence et $\text{C}_\text{AB}\text{HA}$ -Référence contenant 7,5 % en masse de référence.

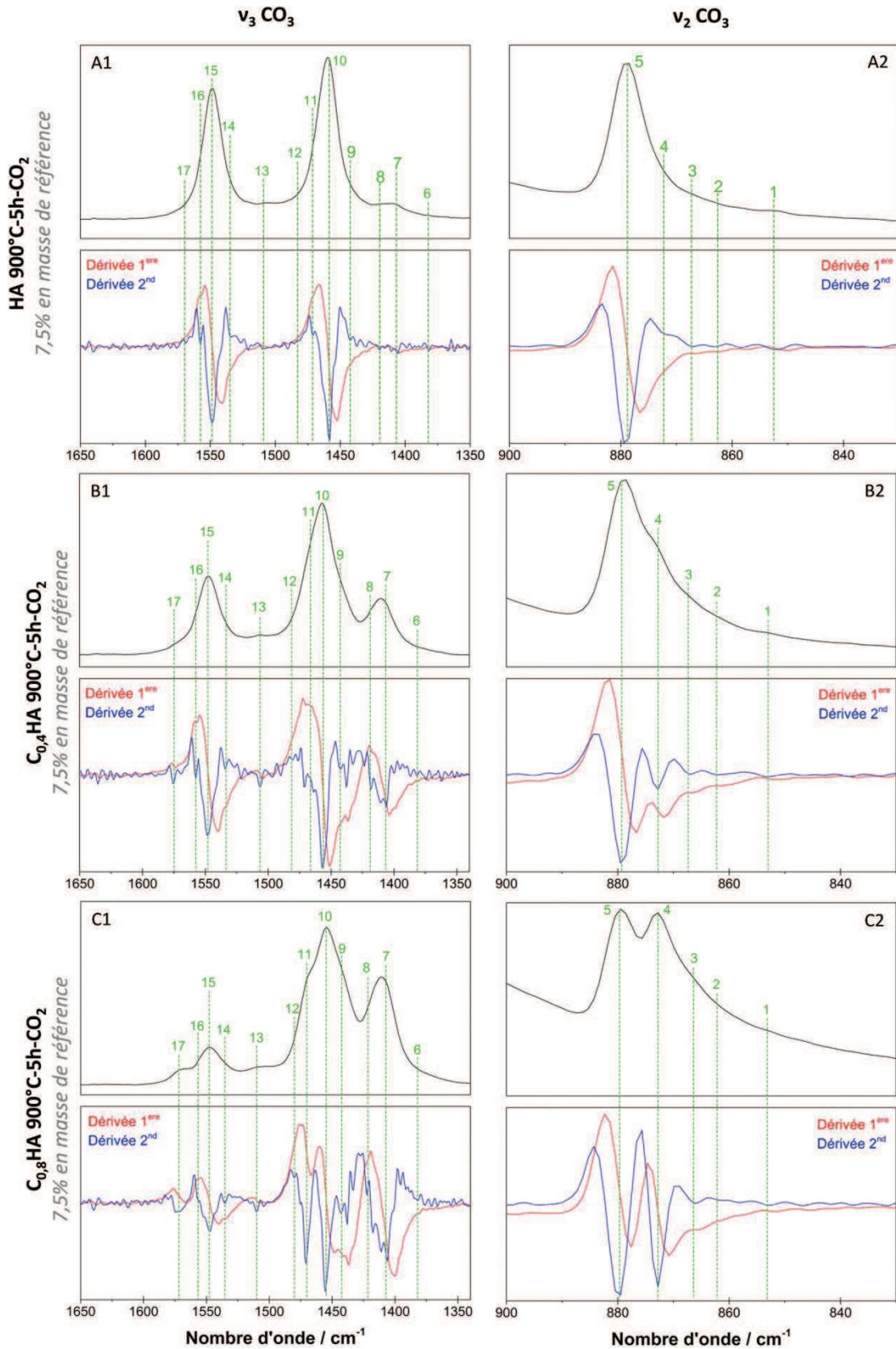
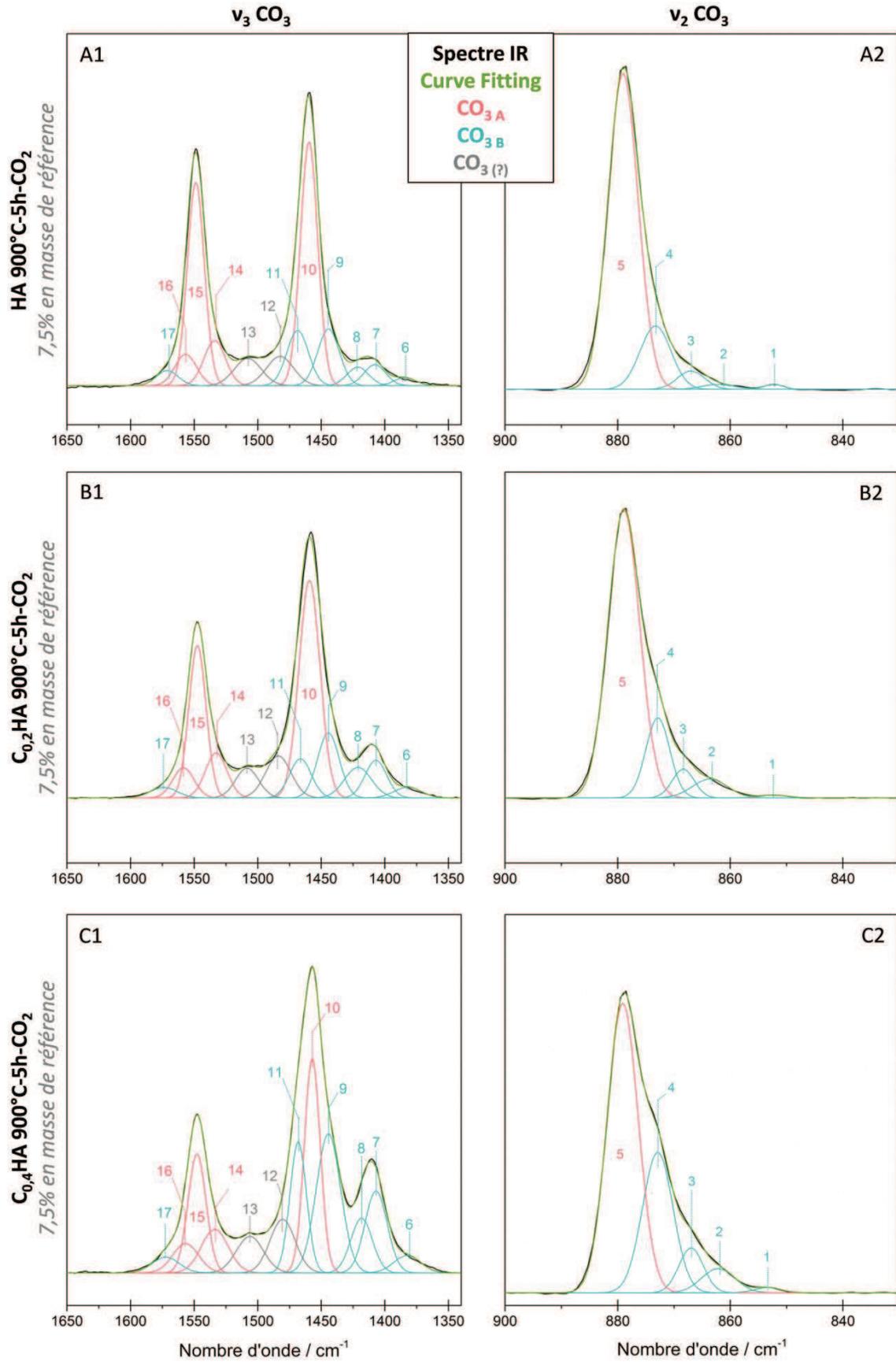


Figure III-38. Méthodes de détection des bandes IR dans les domaines $\nu_2 \text{CO}_3$ et $\nu_3 \text{CO}_3$ à l'aide des dérivées première et seconde des spectres (explications section III.3.4.2.) pour des mélanges A. HA-Référence, B. C_{0,4}HA-Référence et C. C_{0,8}HA-référence. Les mélanges ont été réalisés avec 7,5% en masse de référence et des poudres traitées à 900 °C pendant 5 h sous CO₂.



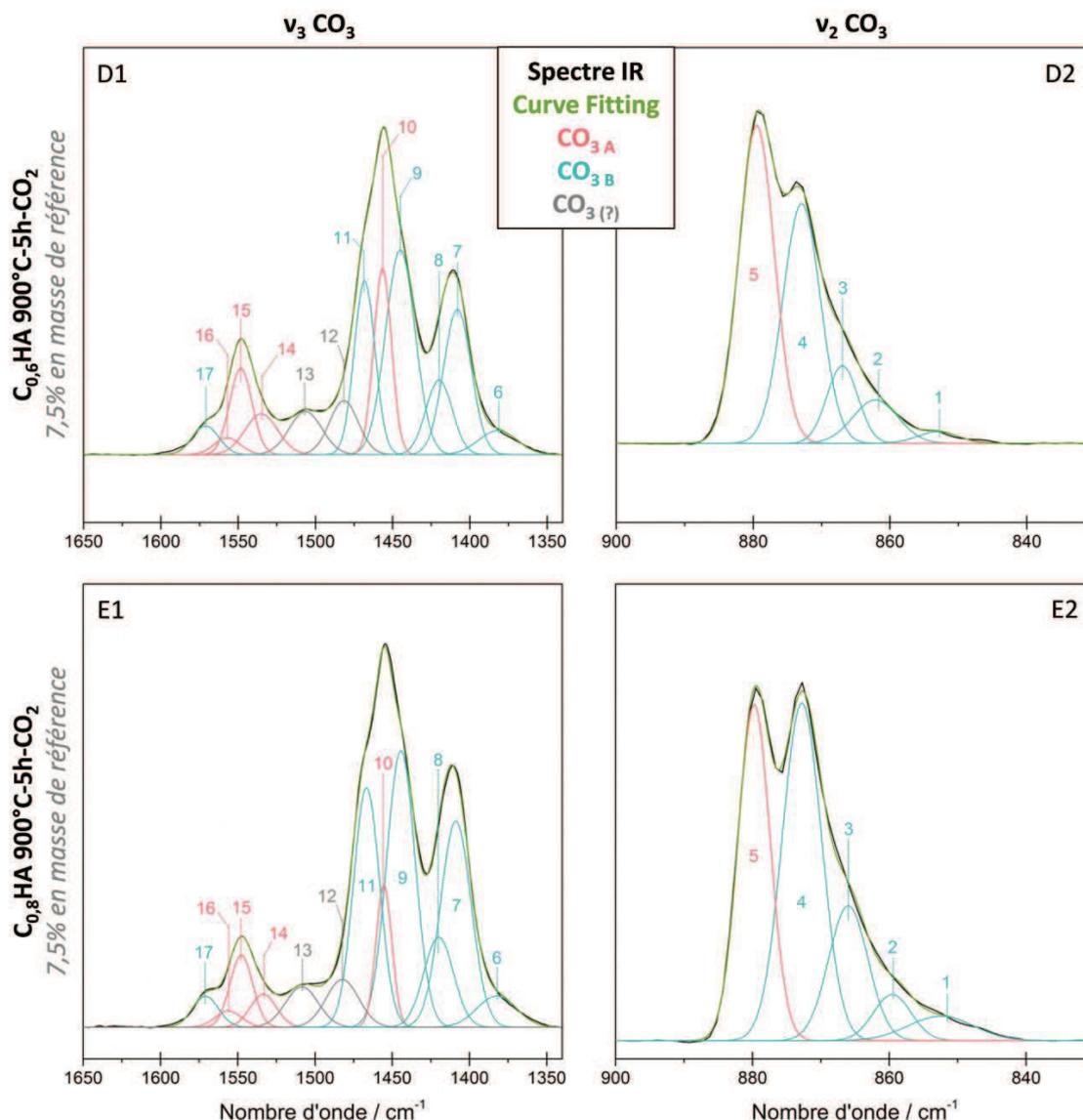


Figure III-39. Résultat de la procédure de « curve fitting » dans les domaines relatifs aux modes de vibration $v_2 \text{ CO}_3$ et $v_3 \text{ CO}_3$. Les spectres IR ont été réalisés sur des mélanges de poudre contenant 7,5 % en masse de référence et A. une C_AHA , B. une $\text{C}_{0,2}\text{HA}$, C. une $\text{C}_{0,4}\text{HA}$, D. une $\text{C}_{0,6}\text{HA}$, et E. une $\text{C}_{0,8}\text{HA}$. Les courbes noires et vertes représentent respectivement le spectre IR normalisé et le résultat du « curve fitting ». Les bandes en gris, bleu, et rouge sont respectivement non assignées, assignées au $\text{CO}_{3\text{B}}$ et assignées aux $\text{CO}_{3\text{A}}$.

La procédure de « curve fitting » mise en place a permis de déterminer avec précision la position et l'intensité de chaque bande. Elle s'est avérée être un formidable outil d'aide à l'analyse des spectres.

Les Figures III-40 et III-41 présentent l'évolution du ratio $\frac{I_{\text{bande CO}_3}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique (selon la formule générale des C_BHA Eq. III-2, page 66), et ce pour toutes les bandes des domaines $v_3 \text{ CO}_3$ (n° 6 à 17) et $v_2 \text{ CO}_3$ (n° 1 à 5) détaillées sur les spectres de la Figure III-39.

De façon équivalente, les Figures III-42 et III-43 présentent l'évolution du ratio $\frac{I_{\text{bande CO}_3}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du taux de $\text{CO}_{3\text{A}}$. Les données d'intensité sont issues de la procédure de « curve fitting » réalisée sur les spectres IR des mélanges C_AHA -Référence à 7,5% en masse. La préparation des poudres C_AHA est décrite au chapitre III.3.2.3.2. Tableau III-5 page 81.

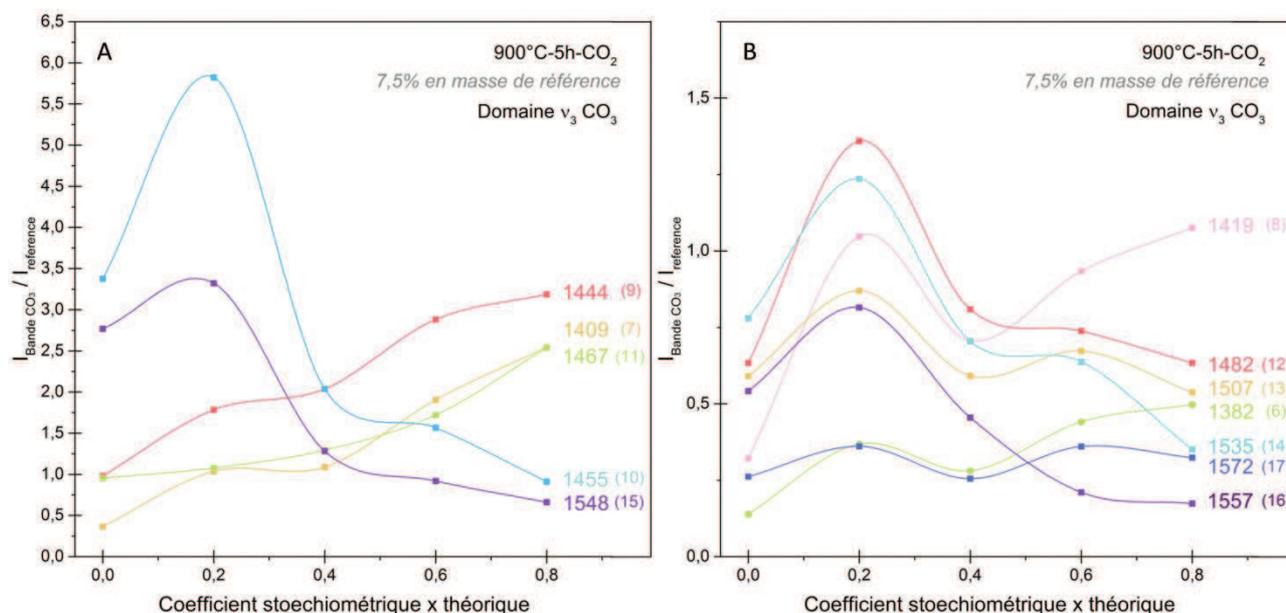


Figure III-40. Évolution du rapport d'intensité $\frac{I_{\text{bande CO}_3}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique des poudres, selon la formule générale des C₈HA (Eq. III-2), pour les 11 bandes du domaine v₃ CO₃. Les données sont séparées en deux pour plus de lisibilité avec en A. les rapports présentant les plus fortes variations ($\Delta \geq 1,5$) et en (B) les plus faibles ($\Delta < 1,5$). Les données d'intensité sont issues des spectres présentés Figure III-39 (A1, B1, C1, D1 et E1).

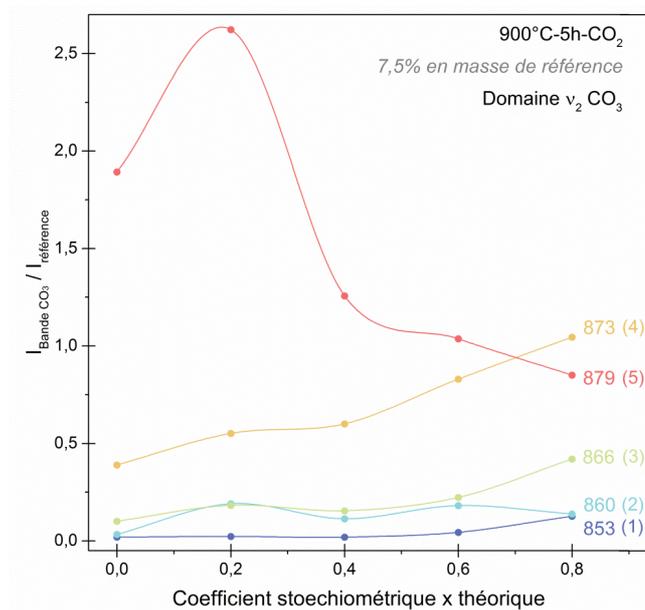


Figure III-41. Évolution du rapport d'intensité $\frac{I_{\text{bande CO}_3}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique des poudres, selon la formule générale des C₈HA (Eq. III-2), pour les 5 bandes du domaine v₂ CO₃. Les données d'intensité sont issues des spectres présentés Figure III-39 (A2, B2, C2, D2 et E2).

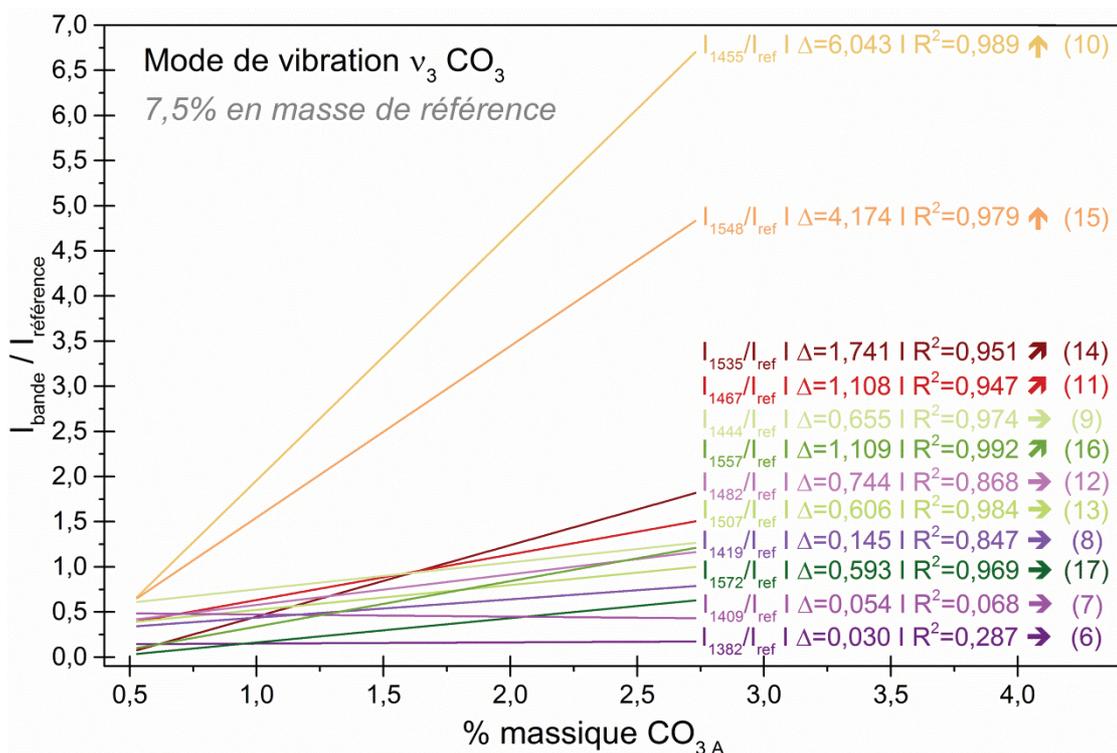


Figure III-42. Évolution du ratio d'intensité $\frac{I_{\text{bande CO}_3}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du taux de CO_{3A} pour les bandes relatives aux modes de vibration ν_3 des CO_3 . Évolutions déterminées sur des poudres d'HA calcinées à 1000 °C pendant 15 h sous air puis traitées sous CO_2 mélangées à 7,5% en masse de référence. Les flèches ↑, ↗ et → représentent respectivement une augmentation forte, moyenne et une faible à nulle du ratio d'intensité avec l'augmentation du taux de CO_{3A} . Le Δ et le R^2 représentent respectivement l'écart entre la valeur supérieure et la valeur inférieure et le coefficient de régression linéaire des droites

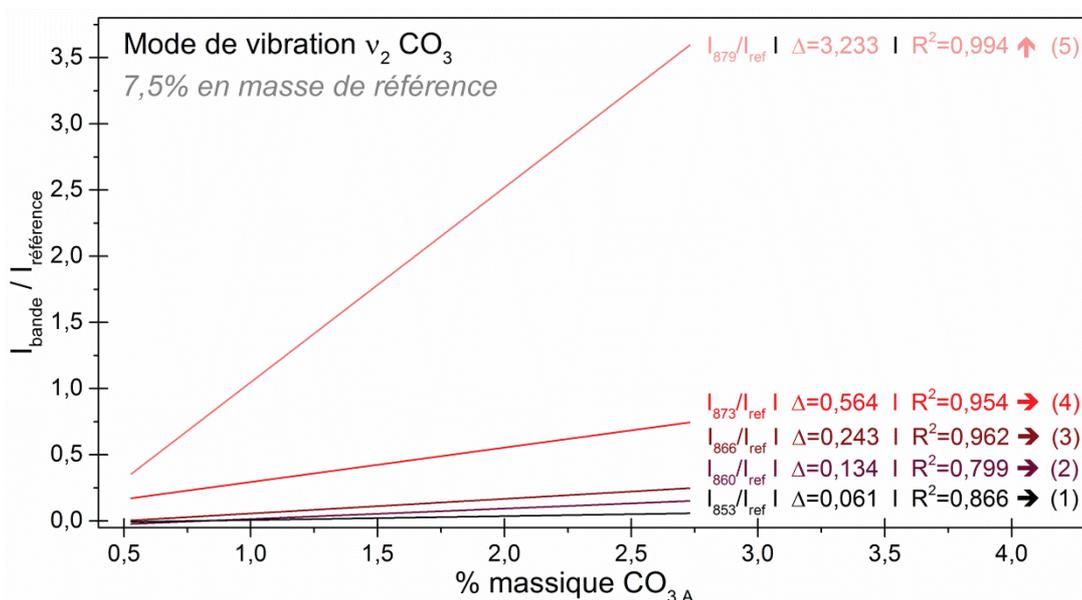


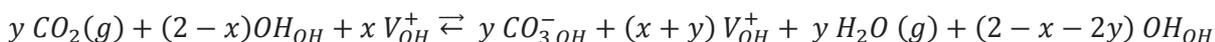
Figure III-43. Évolution du ratio d'intensité $\frac{I_{\text{bande CO}_3}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du taux de CO_{3A} pour les bandes relatives aux modes de vibration ν_2 des CO_3 . Évolutions déterminées sur des poudres d'HA calcinées à 1000 °C pendant 15 h sous air puis traitées sous CO_2 mélangées à 7,5% en masse de référence. Les flèches ↑, ↗ et → représentent respectivement une augmentation forte, moyenne et faible à nulle du ratio d'intensité avec l'augmentation du taux de CO_{3A} . Le Δ et le R^2 représentent respectivement l'écart entre la valeur supérieure et la valeur inférieure et le coefficient de régression linéaire des droites

La confrontation des informations des Figures III-40 et III-42 prouve assez clairement que les bandes à 1557 (16), 1548 (15), 1535 (14), et 1455 (10) cm^{-1} sont liées aux CO_{3A} : leur intensité respective augmente significativement avec le taux de CO_{3A} (Figure III-40). La bande à 1482 (12) cm^{-1} souffre de sa proximité avec les bandes intenses à 1455 (10) et 1467 (11) cm^{-1} . Néanmoins l'évolution du rapport $\frac{I_{1482(12)}}{I_{\text{bande de référence}}}$ en fonction du coefficient stœchiométrique x théorique (Figure III-40) est caractéristique des bandes attribuables aux CO_{3A} (voir explication ci-dessous).

Plus intéressant, les Figures III-40 et III-41 révèlent que la carbonatation en site A est favorisée par de faibles quantités de CO_{3B} . En effet, la poudre $\text{C}_{0,2}\text{HA}$ calcinée à 900°C pendant 5 h sous CO_2 présente toujours un rapport $\frac{I_{\text{bande } \text{CO}_3 A}}{I_{\text{bande de référence}}}$ supérieur à ceux obtenus avec les poudres C_AHA et $\text{C}_{0,4}\text{HA}$ traitées thermiquement dans les mêmes conditions, d'où la forme en dôme caractéristique des courbes $\frac{I_{\text{bande } \text{CO}_3 A}}{I_{\text{bande de référence}}} = f(x)$. La présence d'un faible taux de lacunes en site OH, induite par l'introduction de CO_{3B} (Eq. III-23 similaire à Eq. III-2 page 66), pourrait expliquer cette singularité.



En revanche, si le taux de CO_{3B} continue d'augmenter ($x \geq 0,4$), la carbonatation en site A est alors défavorisée. Il semble donc que la carbonatation en site A ne soit pas simplement corrélée à un maximum du taux de OH_{OH} ou à la présence de V_{OH} mais à un optimum du couple $\text{V}_{\text{OH}}-\text{OH}_{\text{OH}}$ selon l'équilibre quasi-chimique ci-dessous (complexification de l'Eq. III-5) :



Eq. III-24

Ces mêmes Figures III-40 et III-42 permettent de confirmer que les bandes à 1467 (11), 1444 (9), 1419 (8) et 1409 (7) cm^{-1} sont uniquement liées aux CO_{3B} : leur intensité respective augmentant significativement avec l'augmentation du taux de CO_{3B} (Figure III-40) et restant relativement constante avec l'augmentation du taux de CO_{3A} (Figure III-42). L'augmentation légère de l'intensité des bandes à 1467 (11) et 1444 (9) cm^{-1} avec l'accroissement du taux de CO_{3A} est due à leur proximité avec la/les bande(s) des CO_{3A} à 1455 (10) cm^{-1} et 1482 (12) cm^{-1} (uniquement pour la bande à 1467 (11) cm^{-1}).

Les Figures III-41 et III-43 confirment quant à elles que les bandes à 879 (5) et 873 (4) cm^{-1} sont respectivement relatives aux CO_{3A} et CO_{3B} . En effet, l'intensité de la bande à 879 (5) cm^{-1} augmente significativement lorsque le taux de CO_{3A} croît (Figure III-43) et présente la forme en dôme caractéristique des courbes $\frac{I_{\text{bande } \text{CO}_3 A}}{I_{\text{bande de référence}}} = f(x)$. La bande à 873 (4) cm^{-1} , quant à elle, voit son intensité croître intensément avec le taux de CO_{3B} (Figure III-41) et stagner avec l'introduction d'ions carbonate en site A (Figure III-43).

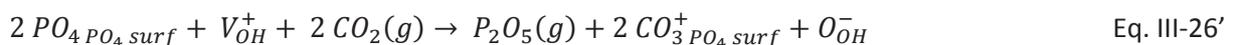
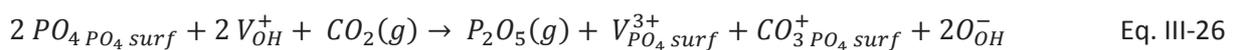
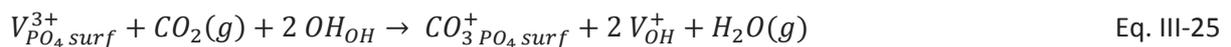
Au milieu de cette affluence de nombres d'onde et d'informations plus ou moins digestes il est un point sur lequel nous ne sommes au final pas revenu : pourquoi les spectres IR des C_AHA , montrés Figure III-35 (page 107), présentent-ils la totalité des bandes attribuées aux ions carbonate de sites B (860, 866, 873, 1382, 1409, 1419, 1444, 1467, 1572 cm^{-1}) ? Nos assignations seraient-elles erronées ? Nos C_AHA seraient-elles en fait des C_{AB}HA qui s'ignorent ?

Le premier des constats est que certes les spectres des C_AHA présentent bien des bandes que nous avons attribuées à des CO_{3B} mais qu'elles sont d'intensité faible ($1409, 1419 \text{ cm}^{-1}$), voire très faible ($860, 866, 873, 1382, 1444, 1572 \text{ cm}^{-1}$) et constante avec le taux de CO_{3A} (cf. Figures III-42 et III-43). Le deuxième constat est que certaines de ces bandes CO_3 de « type B » ($860, 866, 1382, 1572 \text{ cm}^{-1}$) ou d'autres encore non- assignées ($853, 1482, 1507 \text{ cm}^{-1}$) restent d'intensité faible (i.e., non nulle) et constante non seulement avec le taux de CO_{3A} (Figures III-42 et III-43) mais également avec le taux de CO_{3B} (Figures III-40 et III-41).

La Figure III-44 présente 5 spectres IR de mélanges HA- ou CHA-Référence à 7,5 % en masse. Elle a pour but de comparer les spectres obtenus pour une HA calcinée sous différentes atmosphères (air ou CO_2) et différentes températures, et au final permettre de mieux comprendre la présence de ces ions carbonate en site B dans des C_AHA supposées dépourvues d'ions carbonate de type B.

L'HA traitée à 1000°C pendant 15 h sous air ne présente aucune des bandes caractéristiques des CO_3 (type A ou B). Ceci exclut la présence de CO_3 en site A ou B dans la poudre d'HA utilisée pour élaborer les C_AHA (voir protocole section III.3.2.3.2., page 81) et par la même occasion la possible existence d'une solution solide d'hydroxyapatite carbonatée stable à haute température sous air. Les spectres indiquent en revanche qu'un simple traitement thermique, même à basse température (650°C), fait apparaître les bandes IR attribuées aux CO_3 de type A mais également de type B. Les spectres étant normalisés par rapport à la bande de référence, il est intéressant de constater que les bandes à 1419 et 1409 cm^{-1} attribuées à des CO_{3B} sont sensiblement plus intenses plus la température de calcination est basse ($I_{650} \propto I_{850} \propto I_{1000}$).

Concrètement, nous expliquons la présence des bandes attribuées aux CO_{3B} ($860, 866, 873, 1382, 1409, 1419, 1444, 1467, 1572 \text{ cm}^{-1}$) sur les spectres des poudres de C_AHA par l'interaction des molécules de CO_2 avec les sites PO_4 (libres ou occupés) présents à la surface des particules d'HA, au cours du traitement thermique sous CO_2 . Les réactions d'échange suivantes non-exhaustives sont proposées :



Cette distinction entre « site de surface » et « site de volume » (i.e., dans la maille) nous permet également d'expliquer la présence de bandes d'absorption relatives aux groupements CO_3 ($860, 866, 1382, 1572 \text{ cm}^{-1}$ | $853, 1507 \text{ cm}^{-1}$) d'intensité faible et constante quel que soit le taux de CO_3 de type A ou B. Les bandes $\nu_2 CO_3$ et $\nu_3 CO_3$ sus-citées seraient ainsi attribuables à des groupements CO_3 fixés exclusivement à la surface des particules. Compte tenu de la taille nanométrique des poudres étudiées (de l'ordre de 100 à 500 nm) ces « effets de surface » peuvent effectivement ne plus être considérés comme négligeables par rapport aux « effets de volume ». Une étude visant à relier l'intensité de ces bandes d'absorption à la surface développée par les particules pourrait confirmer cette hypothèse. Enfin, les groupements CO_3 substitués dans les sites PO_4 de surface **présentent également les bandes d'absorption infrarouge à $1467, 1444, 1419, 1409$ et 873 cm^{-1} propres aux groupements CO_3 substitués en site B au sein de la maille.**

Pour conclure ce travail le Tableau III-8 propose les nouvelles assignations des bandes IR relatives aux ions carbonate introduits dans les différents sites de l'hydroxyapatite.

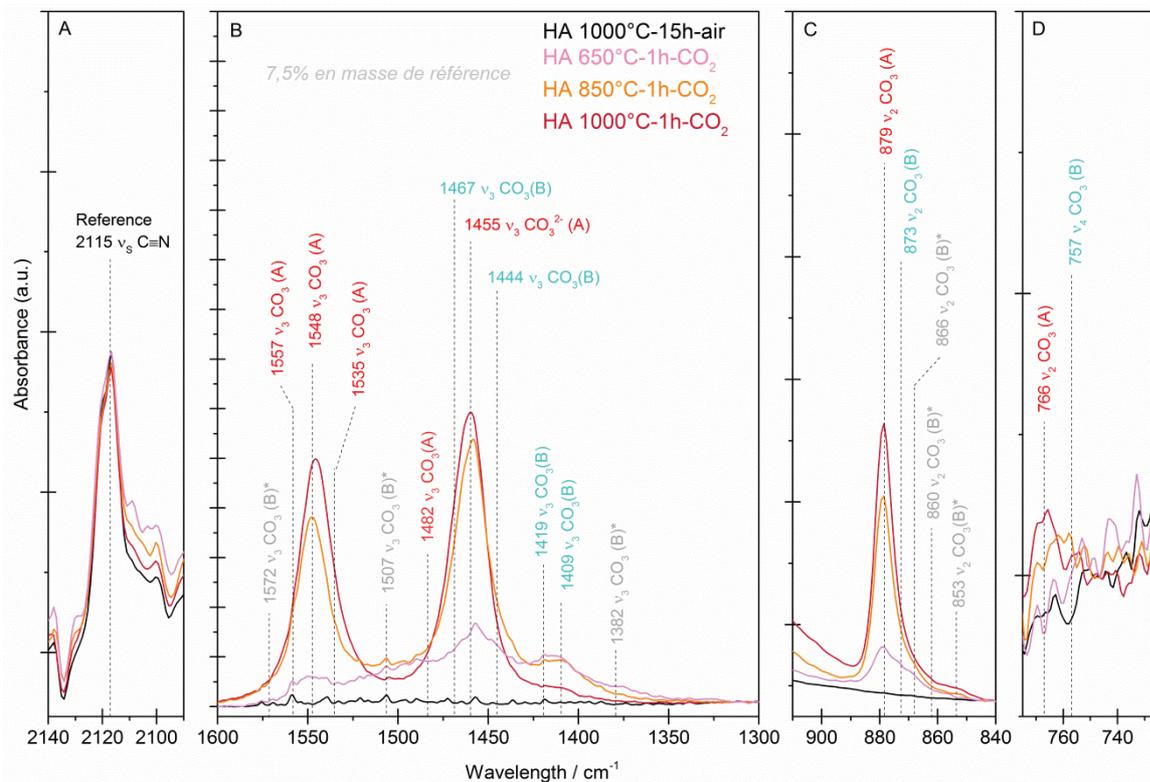


Figure III-44. Spectre IR d'une HA et de CAHA avec en rouge, bleu et gris (marquées d'une *) les bandes IR respectivement relatives aux CO_{3A}, CO_{3B} de structure et CO_{3B} de surface. L'HA et les CAHA ont été obtenues respectivement par calcination d'une HA à 1000°C/15 h/air et à 650 °C-850 °C-1000 °C/1 h/CO₂.

Tableau III-8. Récapitulatif des bandes IR relatives aux ions carbonate situés en site A et B dans la maille apatitique. Ce tableau propose également une comparaison de nos assignations avec celles de la littérature, les nombres d'ondes indiqués en violet, en orange et en vert indiquent des bandes respectivement non décrites, en désaccord et en accord avec les données de la littérature. Les * représentent les doutes sur l'identification des bandes IR au sein de la littérature

Mode de vibration	Antonakos	Rey	Lafon	Gibson	Fleet	Présent Travail
$\nu_4 \text{CO}_3$	668 (A)		670 (A)			
	674 (B)	675 (A)				
		692 (B)	692 (B)			
	713 (B)	718 (B)	710 (B)			
		740 (?)				
	760(A)	757 (A)	757 (A)	755 (A)	non détaillé	757 (B) 766 (A)
	813 (B)					
	847					
$\nu_2 \text{CO}_3$						853 (B surf)
					862 (A2/lab)	860 (B surf) 866 (B surf)
		866 (lab)	866 (lab)			
	873 (B)	871 (B)	871 (B)	873 (B)	872 (B)	873 (B)
			873 (B)			
	880(A)	878 (A)	880 (A)	880 (A)	878 (A1)	879 (A)
$\nu_3 \text{CO}_3$						1382 (B surf)
	1409 (B)	1416*	1412 (B)	1410*	1409 (B)	1409 (B)
	1427 (B)	1422 (B)	1420 (B)			1419 (B)
	1444 (A)	1445*			1441 (A1)	1444 (B)
		1452*	1450 (A)*		1450 (A1)	
	1450 (B)	1456 (B)		1455*	1455 (B)	
			1460 (B)		1459 (A1)	1455 (A)
	1468 (vac)	1463 (A)	1465 (A)	1466*		
		1470*	1470 (B)*		1474 (B)	1467 (B)
						1482 (A)
	1498 (A)	1500*	1500 (A)*	1498*		
				1504*	1507 (A2)	1507 (B surf)
	1528 (A)					
	1535 (A)	1540 (A)			1535 (A)	
	1545*	1545 (A)*	1545*	1544 (A1)	1548 (A)	
					1557 (A)	
	1568*	1568 *	1570*	1569 (A2)	1572 (B surf)	

* Assignation controversée dans la littérature

Accord/Désaccord/bande non décrite versus littérature

III.5.2. Quantification sélective des carbonates par spectroscopie IR

Les travaux présentés au cours des sections précédentes III.4 et III.5.1 ont été utilisés pour la quantification sélective des ions carbonate présents en sites A et B de la maille apatitique.

III.5.2.1. Construction des courbes de calibration pour les $\text{CO}_3 \text{ A}$

La construction des courbes d'étalonnage, relatives aux ions carbonate présents en site A, nécessite trois étapes :

1. le dosage du carbone total contenu dans les poudres de C_AHA selon la méthode présentée à la section III.3.2.3., page 80.
2. le choix de la ou des bandes d'intérêt,
3. et enfin la mesure des rapports d'aires intégrées (i.e., intensités) des bandes d'absorption IR

$R = \frac{\text{Intensité de la bande considérée}}{\text{Intensité de la bande de référence}}$ obtenues avec des mélanges de poudre C_AHA -Référence de

rapport massique 50/50. Pour ce faire, un protocole d'analyse spectrale par « curve fitting » (section III.3.4.2., page 84) a été utilisé selon les paramètres définis dans la section III.5.1.2. (page 111).

Le Tableau III-9 présente les quantités totales de carbone, et par déduction mathématique d'ions carbonate (cf. Eq. III-21, page 80), dosées dans les échantillons d'HA recuit sous CO₂ après dégazage sous vide primaire (10⁻² mbar) à 100 °C pendant au minimum 12 h. Notez, qu'aucune différence significative entre les valeurs avant et après dégazage n'a été observée.

Tableau III-9. Quantité totale de carbone, et par déduction mathématique de CO₃ (cf. Eq. III-21, page 80), contenue dans les échantillons d'HA précalcinés à 1000 °C/15 h/air puis traités sous CO₂. Les valeurs sont données après dégazage sous vide primaire (10⁻² mbar) réalisé à 100 °C pendant 12 h à l'aide d'un appareil Micromeritics ASAP 2020.

Échantillon	Poudre	Traitement thermique sous CO ₂			Concentration totale en carbone		Concentration totale en carbonate	
		Montée	Palier	Descente	% massique	Incertitude	% massique	Incertitude
1	HA 1000 °C-15 h-air	5 °C / min	650 °C - 30 min	- 5 °C / min	0,081	0,001	0,406	0,002
2	-	-	680 °C - 30 min	-	0,106	0,004	0,529	0,019
3	-	-	700 °C - 0 min	-	0,069	0,001	0,346	0,005
4	-	-	700 °C - 30 min	-	0,149	0,002	0,743	0,011
5	-	-	800 °C - 0 min	-	0,130	0,002	0,651	0,010
6	-	-	800 °C - 30 min	-	0,206	0,004	1,027	0,018
7	-	-	800 °C - 60 min	-	0,230	0,001	1,149	0,007
8	-	-	800 °C - 90 min	-	0,278	0,004	1,387	0,018
9	-	-	800 °C - 120 min	-	0,415	0,005	2,074	0,024
10	-	-	800 °C - 300 min	-	0,407	0,004	2,033	0,020
11	-	-	800 °C - 600 min	-	0,547	0,002	2,731	0,009
12	-	-	820 °C - 0 min	-	0,123	0,005	0,615	0,027
13	-	-	850 °C - 0 min	-	0,199	0,001	0,992	0,002
14	-	-	950 °C - 60 min	-	0,543	0,006	2,710	0,032
15	-	-	1000 °C - 30 min	-	0,187	0,007	0,935	0,034

L'analyse de la composition de ces poudres de C_AHA (section III.4.1., page 88) ayant confirmé l'absence de phase secondaire, nous considérerons pour la suite de ce travail que les poudres sont des hydroxyapatites carbonatées de type A pures. Ainsi, le pourcentage massique de carbonate déterminé dans les poudres sera considéré comme un pourcentage massique d'ions carbonate en site A. Cette hypothèse est d'autant plus justifiable que l'analyse qualitative de ces échantillons (C_AHA) au chapitre III.5.1. n'a révélé aucune carbonatation de type B dans le volume des cristallites.

Le choix de la ou des bandes d'intérêt repose sur des principes simples : (i) la bande est parfaitement et uniquement assignable aux ions carbonate de type A, et (ii) son amplitude de variation avec la carbonatation de type A est suffisante pour minimiser les erreurs de mesure des aires intégrées.

Basé sur les résultats précédents d'indexation des bandes (Section III.5.1.) et sur la méthode de « curve fitting » décrite au chapitre III.3.4.2. (page 84), les spectres IR des mélanges ont été analysés. Un exemple de cette opération de « curve fitting » centré sur les modes ν_2 CO₃ et ν_3 CO₃ est proposé Figure III-45. Comme présenté au chapitre précédent (III.5.1.2., page 111), la procédure a permis de déterminer les intensités de la bande de référence ainsi que celles des autres bandes contenues dans les domaines ν_2 et ν_3 des ions carbonate. Ce travail a été effectué pour chaque mélange (cf. la liste des poudres de C_AHA Tableau III-9, N = 2 minimum pour chaque échantillon).

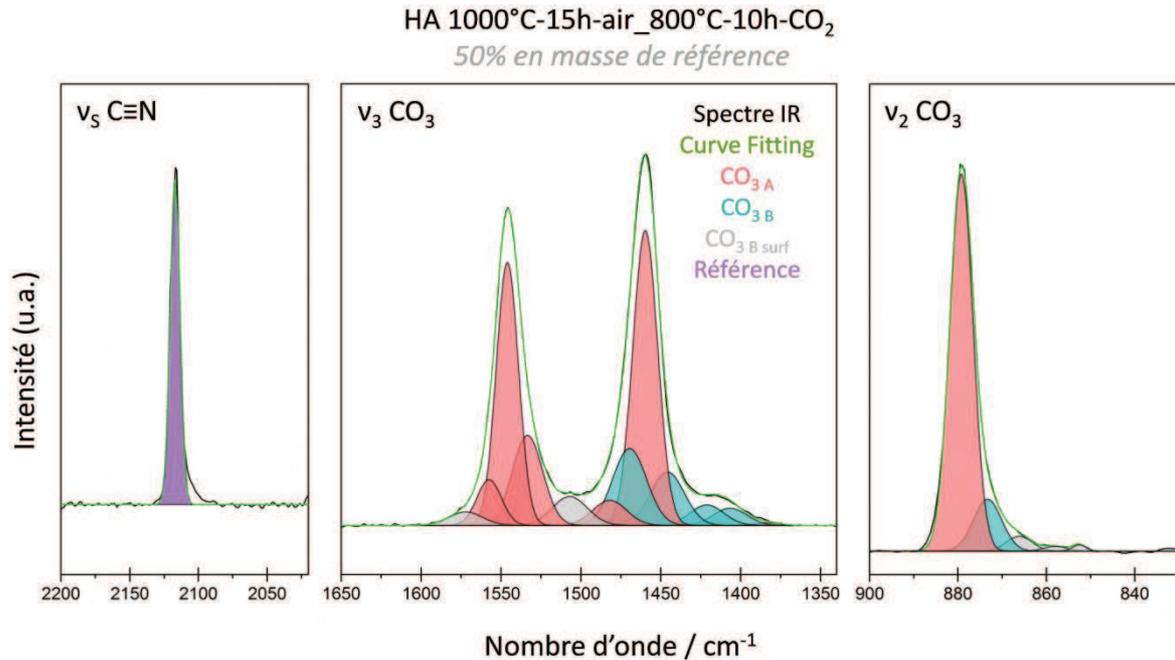


Figure III-45. Exemple de la procédure de « curve fitting » réalisée sur le spectre IR d'un mélange à 50/50 de la poudre d'HA calcinée à 1000 °C pendant 15 h sous air puis recuite à 800 °C pendant 10 h sous CO₂ et de la poudre de référence. Les spectres sont centrés sur les domaines v₅ C≡N, v₃ CO₃ et v₂ CO₃.

Afin de définir les bandes d'intérêt pour la réalisation des courbes de calibration, le rapport d'intensité $R = \frac{\text{Intensité de la bande considérée}}{\text{Intensité de la bande de référence}}$ a été tracé pour l'ensemble des bandes détectées dans les domaines v₃ CO₃ et v₂ CO₃. Même si nous savions avec les résultats précédents (section III.5.1., page 105) qu'une partie de ces bandes n'était pas assignable aux ions carbonate de site A, il nous est apparu important de vérifier la transposition des résultats d'un pourcentage de référence à un autre.

Les résultats (Figure III-46) confirment tout d'abord que les bandes à 1382 (6), 1409 (7), 1419 (8) et 1572 (17) cm⁻¹ du domaine v₃ CO₃ ainsi que les bandes à 853 (1), 860 (2), 866 (3) et 873 (4) cm⁻¹ du domaine v₂ CO₃ sont indépendantes du taux de carbonatation en site A et ne peuvent donc pas être assignées à des ions carbonate dans ces sites. La quantification des variations des bandes indexées à 1507 (13), 1482 (12), 1467 (11) et 1444 (9) cm⁻¹ se révèle une nouvelle fois problématique du fait de la présence de la bande très intense à 1455 (10) cm⁻¹ assignée à des CO₃ A, mais également ici de la légère déformation des bandes liée à l'ajout à 50 % en masse de la référence (voir figure III-24, page 94).

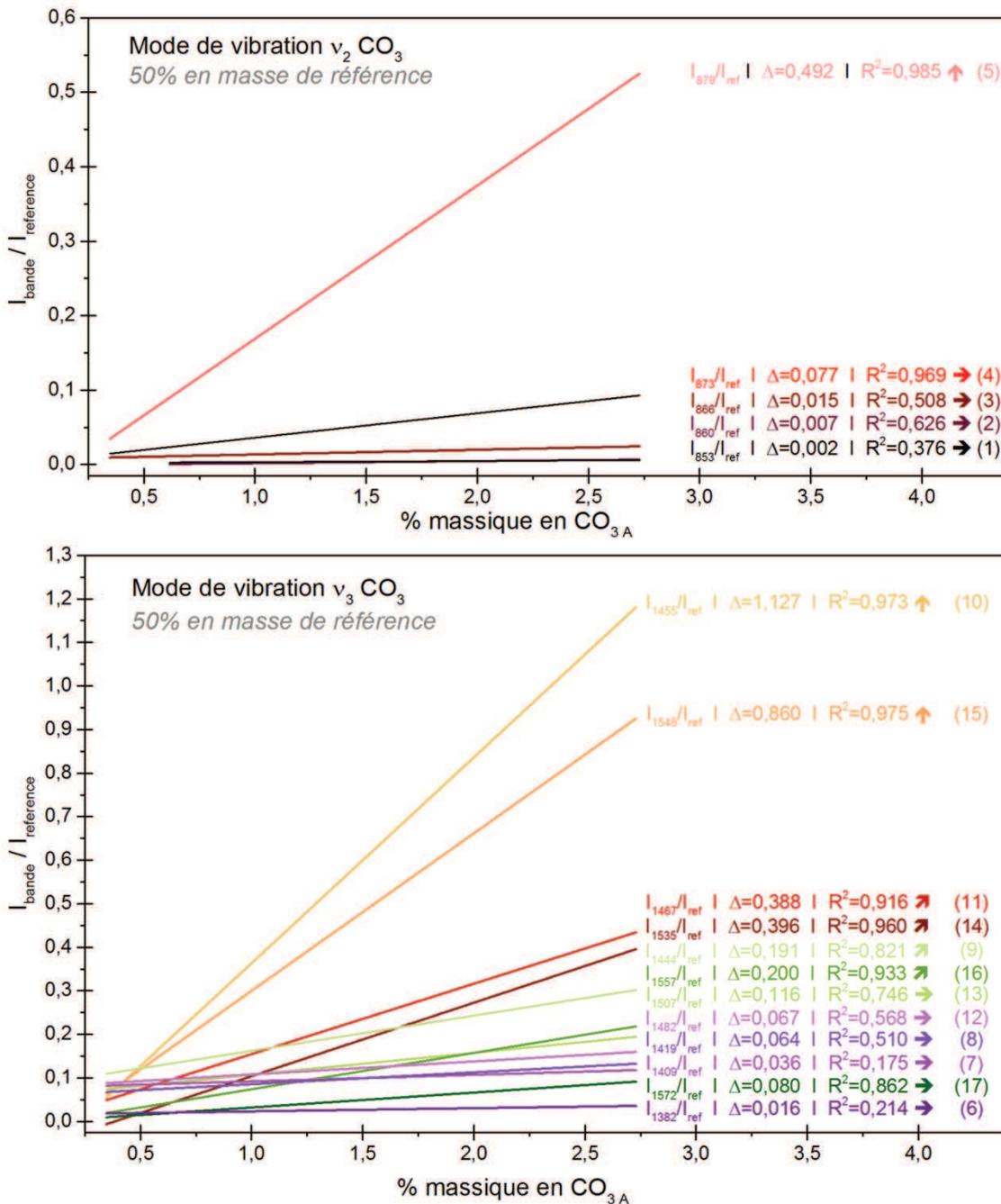


Figure III-46. Droites de régression linéaire des rapports d'intensité $R = \frac{\text{Aire bande considérée}}{\text{Aire bande référence}}$ en fonction de la quantité de carbonate mesurée dans la poudre. Les bandes considérées sont celles du domaine ν_2 CO_3 compris entre 900 et 840 cm^{-1} . Les flèches \uparrow , \nearrow et \rightarrow représentent respectivement une augmentation forte, moyenne et faible à très faible du rapport d'intensité avec l'augmentation du taux de $\text{CO}_3 \text{A}$. Le Δ représente l'écart entre la valeur supérieure et la valeur inférieure.

Parmi les bandes attribuables aux $\text{CO}_3 \text{A}$, trois remplissent les critères énoncés précédemment, à savoir l'assurance de leur assignation et leur forte amplitude de variation avec la quantité de $\text{CO}_3 \text{A}$: 879 (5) cm^{-1} (mode ν_2), 1455 (10) cm^{-1} (mode ν_3), et 1548 (15) cm^{-1} (mode ν_3). Les courbes de calibration complètes établies à l'aide de ces bandes sont présentées respectivement Figures III-47, III-48 et III-49.

Remarque : compte tenu du commentaire précédent concernant la proximité de la bande à 1455 (10) cm^{-1} (mode ν_3 $\text{CO}_3 \text{A}$) avec les bandes à 1467 (11) et 1445 (9) cm^{-1} (ν_3 $\text{CO}_3 \text{B}$), il nous apparaît raisonnable de ne pas certifier la fiabilité de la courbe d'étalonnage relative à cette bande.

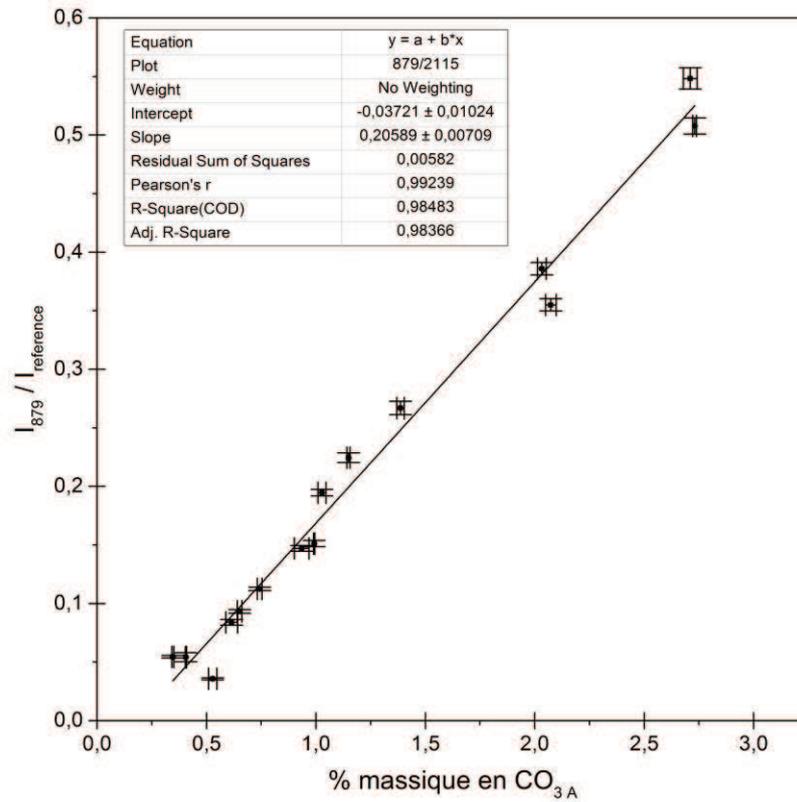


Figure III-47. Courbe d'étalonnage reliant le rapport d'intensité de la bande à 879 cm^{-1} ($\nu_2 \text{ CO}_3 \text{ A}$) et de la bande à 2115 cm^{-1} (référence) à la quantité d'ions carbonate en site A.

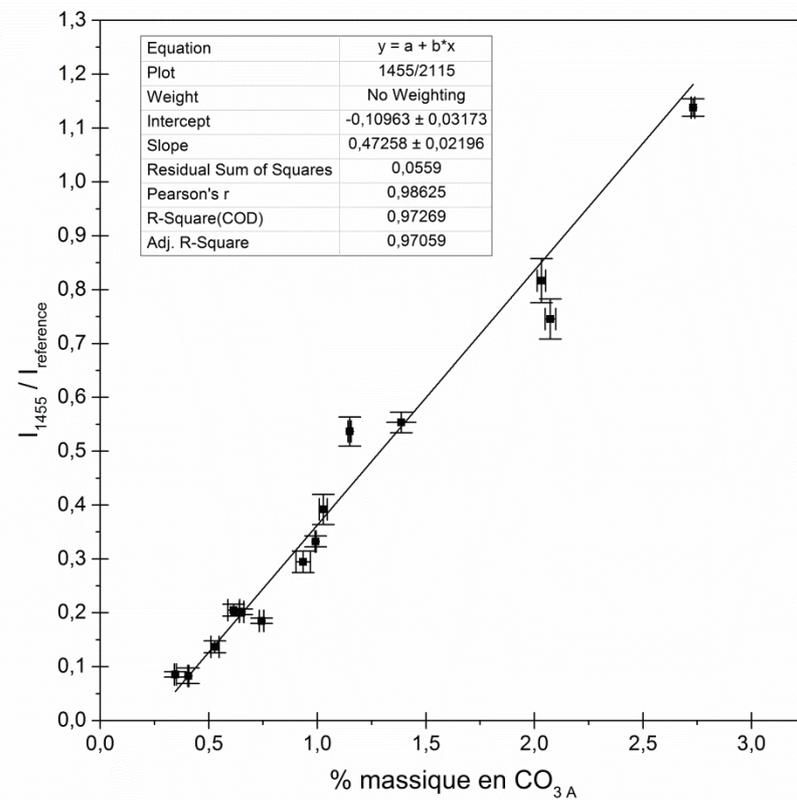


Figure III-48. Courbe d'étalonnage reliant le rapport d'intensité de la bande à 1455 cm^{-1} ($\nu_3 \text{ CO}_3 \text{ A}$) et de la bande à 2115 cm^{-1} (référence) à la quantité d'ions carbonate en site A.

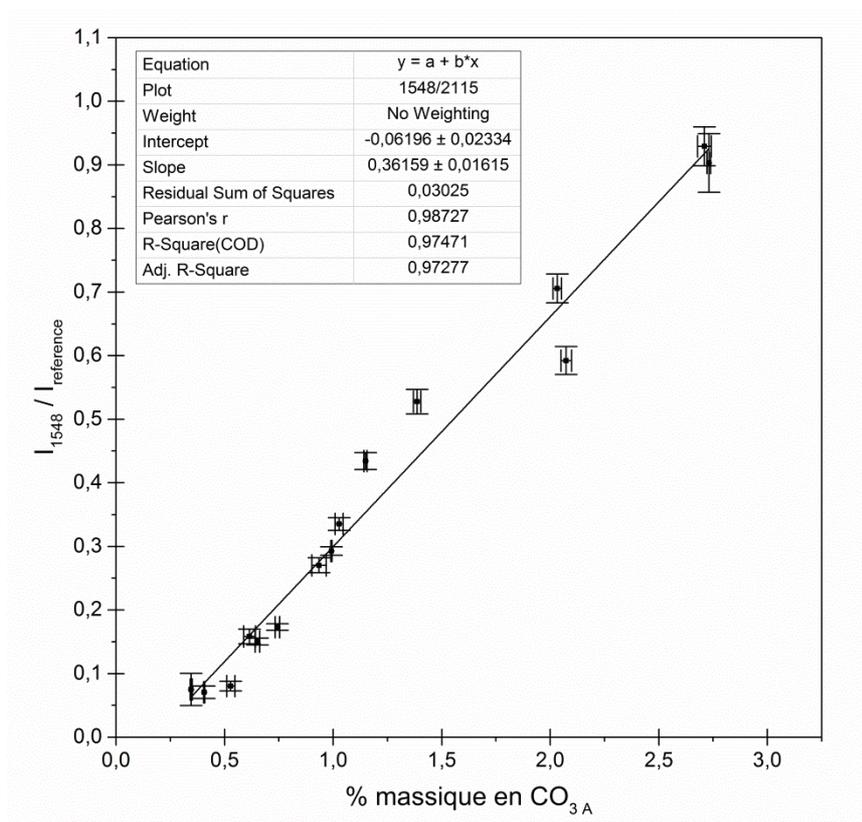


Figure III-49. Courbe d'étalonnage reliant le rapport d'intensité de la bande à 1548 cm^{-1} ($\nu_3 \text{ CO}_3 \text{ A}$) et de la bande à 2115 cm^{-1} (référence) à la quantité d'ions carbonate en site A.

III.5.2.2. Utilisation des courbes de calibration pour évaluer les quantités d'ions carbonate en sites A et B dans des $\text{C}_{\text{AB}}\text{HA}$

La pertinence des courbes étalonnage a été éprouvée via l'évaluation de la composition des poudres de $\text{C}_{0,2}\text{HA}$, $\text{C}_{0,4}\text{HA}$, $\text{C}_{0,6}\text{HA}$ et $\text{C}_{0,8}\text{HA}$ calcinées à $900 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 5 h sous CO_2 . La quantité de carbonate en site A de chaque $\text{C}_{\text{AB}}\text{HA}$ a tout d'abord été évaluée à l'aide des courbes de calibration et des aires des bandes relatives aux $\text{CO}_3 \text{ A}$ déterminées par « curve fitting ». La Figure III-50 présente un exemple de cette opération de « curve fitting ». Pour information, la largeur à mi-hauteur et l'intensité des bandes principales relatives aux $\text{CO}_3 \text{ A}$ et $\text{CO}_3 \text{ B}$ obtenues après « curve fitting » sont fournies dans le tableau III-10.

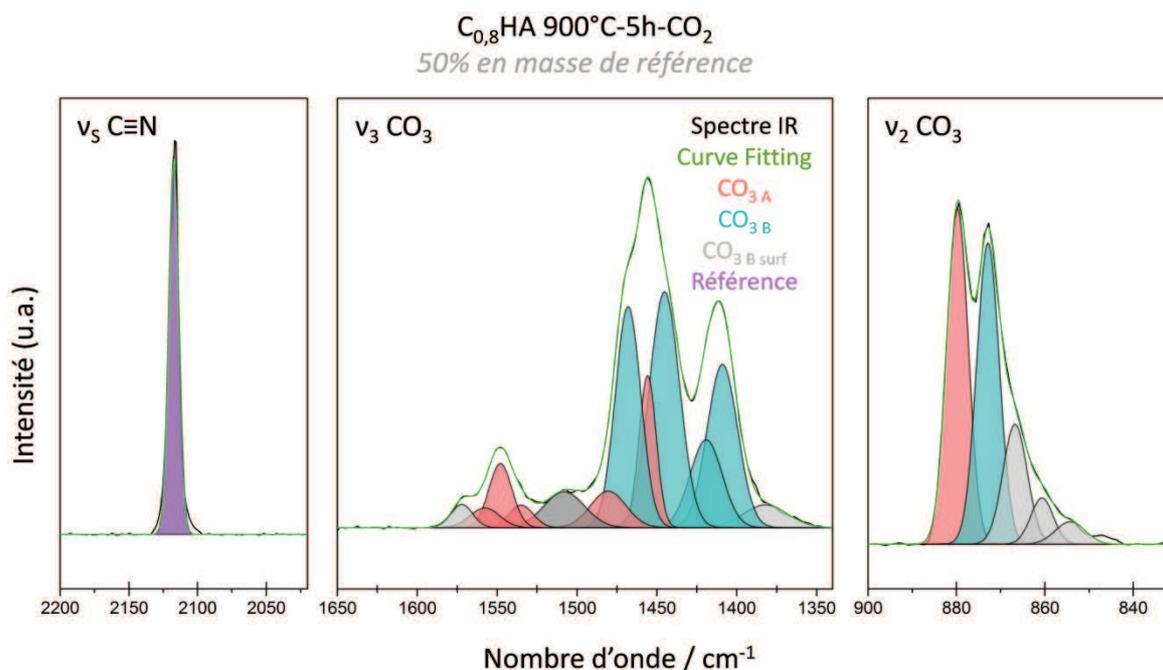


Figure III-50. Exemple de la procédure de « curve fitting » réalisée sur le spectre IR d'un mélange à 50/50 de la poudre de C_{0,8}HA calcinée à 900 °C pendant 5 h sous CO₂, et de la poudre de référence. Les spectres sont centrés sur les domaines ν_s C≡N, ν₃ CO₃ et ν₂ CO₃.

Tableau III-10. Récapitulatif des caractéristiques de la bande de référence et des bandes principales relatives aux ions carbonate de type A et B des hydroxyapatites obtenues après « curve fitting ». Le numéro assigné aux bandes IR fait référence à leur dénomination lors de la procédure de « curve fitting » (Figure III-37, page 109)

Bande IR n°	Position (cm ⁻¹)	HA 900°C-5h CO ₂		C _{0,2} HA 900°C-5h CO ₂		C _{0,4} HA 900°C-5h CO ₂		C _{0,6} HA 900°C-5h CO ₂		C _{0,8} HA 900°C-5h CO ₂	
		Intensité	Largeur à mi-hauteur	Intensité	Largeur à mi-hauteur	Intensité	Largeur à mi-hauteur	Intensité	Largeur à mi-hauteur	Intensité	Largeur à mi-hauteur
4	873 (B)	0,055	6,6	0,093	6,3	0,118	5,7	0,180	5,8	0,217	6,1
5	879 (A)	0,349	6,3	0,420	6,5	0,334	6,3	0,311	6,2	0,228	5,7
7	1409 (B)	0,081	20,0	0,271	23,1	0,298	20,6	0,560	20,0	0,640	22,6
10	1455 (A)	0,585	14,2	0,702	14,3	0,653	15,1	0,385	12,1	0,332	12,6
15	1548 (A)	0,525	14,2	0,674	15,7	0,451	15,4	0,315	15,9	0,189	17,0
référence	2115	1,951	9,2	1,823	9,1	2,921	8,6	2,964	8,5	3,219	8,7

Le tableau III-11 présente les concentrations massiques de CO_{3A} déterminées à partir des courbes d'étalonnage pour chaque échantillon. Le dosage de la concentration massique totale en carbone pour chaque échantillon a permis d'en déduire la concentration massique en CO_{3B} par différence, comme présenté Tableau III-12.

Tableau III-11. Pourcentages massiques en CO_{3A} déterminées via les courbes d'étalonnage établies à l'aide des bandes à 879 et 1548 cm⁻¹.

	HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,2} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,4} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,6} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,8} HA 900°C-5h-CO ₂
$I_{879}/I_{référence}$	0,179	0,23	0,114	0,105	0,0709
% massique CO _{3A} (879)	1,05	1,298	0,734	0,691	0,525
$I_{1548}/I_{référence}$	0,269	0,37	0,154	0,106	0,0588
% massique CO _{3A} (1548)	0,918	1,194	0,604	0,473	0,344
% massique moyen CO _{3A}	0,98	1,25	0,67	0,58	0,43
Écart type	0,07	0,05	0,07	0,11	0,09

Tableau III-12. Pourcentages massiques de CO_{3A} et CO_{3B} contenus dans chacun des échantillons de $C_{AB}HA$ analysés. Le pourcentage massique total en C a été mesuré expérimentalement après dégazage des poudres (section III.3.2.3., p80). La concentration massique en CO_{3A} est issue du Tableau III-12. La concentration massique en CO_{3B} est la différence de la quantité de CO_3 totale et de CO_{3A} .

	HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,2} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,4} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,6} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,8} HA 900°C-5h-CO ₂
% massique C total	0,265	0,389	0,579	0,793	1,000
Incertitude	0,004	0,002	0,007	0,007	0,009
% massique CO ₃ total	1,32	1,94	2,89	3,96	5,00
Incertitude	0,02	0,01	0,03	0,03	0,04
% massique CO _{3A}	0,98	1,25	0,67	0,58	0,43
Incertitude	0,07	0,05	0,07	0,11	0,07
% massique CO _{3B} déduit	0,34	0,69	2,22	3,38	4,57
Incertitude	0,09	0,06	0,10	0,14	0,11

L'interprétation des résultats en termes de concentration massique étant peu explicite, la formule chimique de chaque hydroxyapatite analysée a été déterminée.

Nous avons pour cela utilisé la formule théorique simplifiée des hydroxyapatites carbonatées suivante (Eq. III-27, formule similaire à Eq. III-4 (page 67) en prenant u=0) :



avec x et y les coefficients stœchiométriques des ions carbonates en site B et en site A,

Cette formule nous a permis de résoudre le système suivant de deux équations à deux inconnues (Eq. III-28) :

$$\begin{aligned} \%_{massique} (CO_{3B}) &= \frac{m(CO_{3B})}{m(C_{AB}HA)} = \frac{n(CO_{3B}) \times M(CO_3)}{n(C_{AB}HA) \times M(C_{AB}HA)} & \text{Eq. III-28 (A)} \\ \%_{massique} (CO_{3A}) &= \frac{m(CO_{3A})}{m(C_{AB}HA)} = \frac{n(CO_{3A}) \times M(CO_3)}{n(C_{AB}HA) \times M(C_{AB}HA)} & \text{Eq. III-28 (B)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \%_{massique} (CO_{3B}) \\ \%_{massique} (CO_{3A}) \end{aligned}} \right\} \text{Système III-1}$$

Autrement dit, pour une mole de $C_{AB}HA$, le système d'équations III-27 peut s'écrire de la façon suivante (Eq. III-29) :

$$\begin{aligned} \%_{massique} (CO_{3B}) &= \frac{x \times M(CO_3)}{(10-x)M(Ca) + (6-x)M(PO_4) + (x+y)M(CO_3) + (2-x-2y)M(OH)} & \text{Eq. III-29 (A)} \\ \%_{massique} (CO_{3A}) &= \frac{y \times M(CO_3)}{(10-x)M(Ca) + (6-x)M(PO_4) + (x+y)M(CO_3) + (2-x-2y)M(OH)} & \text{Eq. III-29 (B)} \end{aligned} \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} \%_{massique} (CO_{3B}) \\ \%_{massique} (CO_{3A}) \end{aligned}} \right\} \text{Système III-2}$$

Pour chaque échantillon, la résolution de ce système d'équations donne lieu à un couple unique [x,y] ; pour plus de précision, se référer à l'Annexe 3 de ce chapitre. Les coefficients stœchiométriques des ions calcium, phosphate et hydroxyde ont par la suite été déduits d'après la formule théorique d'une $C_{AB}HA$ (Eq III-27).

Les formules chimiques calculées des échantillons d'HA et de C_BHA calcinées à 900 °C pendant 5 h sous CO₂ sont les suivantes :

$$\underline{C_A}HA : Ca_{9,94}(V_{Ca})_{0,06}(PO_4)_{5,94}(CO_3)_{0,06}(OH)_{1,62}(CO_3)_{0,16}(V_{OH})_{0,38} \quad \text{Eq. III-30}$$

$$\underline{C_{AB}}HA-C_{0,2}HA : Ca_{9,88}(V_{Ca})_{0,12}(PO_4)_{5,88}(CO_3)_{0,12}(OH)_{1,47}(CO_3)_{0,21}(V_{OH})_{0,53} \quad \text{Eq. III-31}$$

$$\underline{C_{AB}}HA-C_{0,4}HA : Ca_{9,64}(V_{Ca})_{0,36}(PO_4)_{5,64}(CO_3)_{0,36}(OH)_{1,42}(CO_3)_{0,11}(V_{OH})_{0,58} \quad \text{Eq. III-32}$$

$$\underline{C_{AB}}HA-C_{0,6}HA : Ca_{9,46}(V_{Ca})_{0,54}(PO_4)_{5,46}(CO_3)_{0,54}(OH)_{1,28}(CO_3)_{0,09}(V_{OH})_{0,72} \quad \text{Eq. III-33}$$

$$\underline{C_{AB}}HA-C_{0,8}HA : Ca_{9,28}(V_{Ca})_{0,72}(PO_4)_{5,28}(CO_3)_{0,72}(OH)_{1,15}(CO_3)_{0,07}(V_{OH})_{0,85} \quad \text{Eq. III-34}$$

Les résultats complets avec les incertitudes de calcul sont donnés dans le tableau III-13.

Tableau III-13. Coefficients stœchiométriques et incertitudes associées des formules chimiques des échantillons d'HA et de C_BHA calcinées à 900 °C pendant 5h sous CO₂. Coefficients évalués expérimentalement à l'aide des courbes d'étalonnage des Figures III-47 et III-49.

Coefficient stœchiométrique	HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,2} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,4} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,6} HA 900°C-5h-CO ₂	C _{0,8} HA 900°C-5h-CO ₂
x (CO_{3B})	0,058	0,116	0,361	0,540	0,716
<i>Incertitude</i>	0,015	0,010	0,016	0,023	0,021
y (CO_{3A})	0,164	0,208	0,109	0,093	0,067
<i>Incertitude</i>	0,012	0,008	0,011	0,018	0,014
PO₄	5,942	5,884	5,639	5,460	5,284
<i>Incertitude</i>	0,015	0,010	0,016	0,023	0,021
Ca	9,942	9,884	9,639	9,460	9,284
<i>Incertitude</i>	0,015	0,010	0,016	0,023	0,021
OH	1,615	1,468	1,421	1,275	1,149
<i>Incertitude</i>	0,015	0,010	0,016	0,023	0,021

Comme observé lors des analyses IR qualitatives (section III.5.1.), un faible taux de CO_{3B} est présent dans la poudre de C_AHA dont l'origine est la substitution d'ions carbonate sur les sites phosphate présent à la surface des particules. Les C_BHA connaissent également une légère sous-stœchiométrie en CO_{3B} par rapport à leur composition théorique, qui peut être expliquée par le protocole et les paramètres de synthèse utilisés (e.g., réaction avec ions calcium en large excès, température plutôt faible, pH plutôt neutre, cf. annexe 1). Les formules chimiques expérimentales obtenues sont toutefois cohérentes avec les formules théoriques (voir section III.3.1.1.), ce qui semblerait valider (i) la formule théorique des C_{AB}HA utilisée pour les calculs (Eq. III-27, page 125), et (ii) les courbes de calibration élaborées dans le cadre de ce travail.

Enfin, l'hypothèse que la carbonatation en site A (coefficient stœchiométrique y) est favorisée par la présence d'une faible quantité de CO_{3B} dans la maille apatitique ($0,116 \leq x \leq 0,361$) est également vérifiée.

III.6. Conclusion

Les travaux présentés au cours du chapitre III ont abouti à la quantification sélective par spectroscopie IR des ions carbonate présents dans les sites A et B de la maille apatitique. Cette quantification sélective a été rendue possible grâce à une amélioration de l'identification et de l'assignation des bandes IR relatives aux CO_3A et CO_3B , prérequis nécessaire avant toute quantification. A ce titre, le tableau III-14 récapitule la position et l'assignation des bandes IR relatives aux modes de vibration ν_2 et ν_3 des ions carbonate dans le réseau apatitique.

Tableau III-14. Bandes IR relatives aux modes de vibration ν_2 et ν_3 des ions CO_3A , CO_3B de volume (i.e. structure) et CO_3B de surface détectables dans les hydroxyapatites carbonatées

Mode de vibration	N°	Nombre d'onde (cm^{-1})
$\nu_2 \text{CO}_3$	1	853 (B surf)
	2	860 (B surf)
	3	867 (B surf)
	4	873 (B)
	5	879 (A) *
$\nu_3 \text{CO}_3$	6	1382 (B surf)
	7	1409 (B)
	8	1419 (B)
	9	1444 (B)
	10	1455 (A)
	11	1467 (B)
	12	1482 (A)
	13	1507 (B surf)
	14	1535 (A)
	15	1548 (A) *
	16	1557 (A)
	17	1572 (B surf)

* Bandes utilisées pour la quantification IR des CO_3A , i.e. peu influencées par les bandes avoisinantes

Enfin cette étude a permis de montrer que :

1. il est possible de quantifier rigoureusement par spectroscopie IR le taux de CO_3A et CO_3B contenus dans une hydroxyapatite carbonatée.
2. les propriétés optiques des hydroxyapatites sont fonction du taux de CO_3B qu'elles contiennent, i.e. une transition semble s'opérer entre les compositions $\text{C}_{0,2}\text{HA}$ et $\text{C}_{0,4}\text{HA}$. En termes de valeur expérimentale, cette transition s'opère pour $0,12 \leq x \leq 0,36$. Cette modification de propriétés optiques pourrait être liée à une modification de la structure cristallographique des hydroxyapatites.
3. la carbonatation en site A est favorisée par la présence d'un faible taux de CO_3B ($0,12 \leq x \leq 0,36$).
4. la calcination sous CO_2 des poudres d'hydroxyapatites étudiées semble entraîner une substitution des groupements PO_4 présent à la surface des cristallites par des groupements CO_3 . Les bandes IR caractéristiques de ces groupements de surface ont été assignées à 1572, 1507, 1382, 866, 860 et 853 cm^{-1} .

Ces premières conclusions ouvrent de nombreuses perspectives d'études fondamentales (e.g., modification locale du réseau cristallin des HA avec la carbonatation en site B), comme appliquées (e.g. influence du taux et du site de carbonatation sur les « performances biologiques » des CHA) que nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'aborder au cours de cette thèse.

Du fait des nombreuses questions encore en suspens, le travail présenté dans ce chapitre constitue plutôt une preuve de concept et vise à amorcer une dynamique d'études. Il a toutefois l'avantage de proposer (i) un protocole de synthèse de CHA pures et monophasiques, (ii) une méthode de préparation des échantillons et d'analyse par spectroscopie IR standardisée ainsi (iii) qu'un protocole d'analyse spectrale par « curve fitting » discutable mais intégralement détaillé.

Chapitre IV. Mise en application des outils développés

L'os, tissu complexe s'il en est, connaît ces dernières années une évolution, au moins intellectuelle, dans la manière que nous avons de vouloir l'étudier ou le remplacer ; nous pourrions presque parler de changement de paradigme tellement la rupture amorcée est importante. Ainsi, dans le domaine de la régénération osseuse les implants tendent de plus en plus à être personnalisés, c'est-à-dire à s'adapter aux besoins du patient mais également aux procédures chirurgicales, afin d'améliorer les soins, la vitesse de guérison et plus globalement le bien-être du patient. La compréhension du mécanisme du remodelage osseux n'est pas en reste et s'ouvre vers le développement de modèles *in vitro* de tissus vivants voire de micro-organes mis en relation, plus connus sous l'anglicisme d'organ-on-chip. Ces modèles de cultures pluricellulaires et perfusés en trois-dimensions (3D) ont pour vocation de s'approcher le plus possible de l'environnement physiologique des cellules tout en permettant un contrôle et un enregistrement en temps réel des paramètres de culture.

Ce changement de paradigme se traduit concrètement par le passage de domaines scientifiques ou techniques s'autosuffisants (e.g. biologie, sciences des matériaux, chirurgie, ingénierie) à la mise en place de collaborations interdisciplinaires étroites^{††}. Cette transition s'accompagne d'une modification significative de l'organisation du travail et surtout de l'approche scientifique des sujets. Les principaux obstacles à surmonter sont avant tout la compréhension entre spécialistes de domaines différents, et la formalisation de questions scientifiques pertinentes et profitables aux différentes parties.

Ce chapitre IV présente deux des six développements de biocéramiques mis en place dans le cadre de cette thèse. Le premier concerne la fabrication de biocéramiques en HA pour des applications *in vitro* en collaboration avec les biologistes du Laboratoire de Biologie Intégrative du Tissu Osseux (LBTO, INSERM U 1059, Saint-Étienne), et le deuxième celle d'implants céramiques en HA et CHA pour des problématiques de grands défauts osseux en collaboration avec le laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA, CNRS UMR 7052, Paris).

Il en résulte que la démarche adoptée pour le développement de ces biocéramiques est plutôt singulière au regard des céramiques traditionnellement utilisées pour ce type d'études biologiques, puisqu'elle considère l'application biologique comme le point central des spécifications du matériau et en conséquence du procédé de fabrication à mettre en place.

^{††} A ce titre, le regroupement de l'Institut Régional de Médecine et d'Ingénierie du Sport (IRMIS), la faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet (UJM, dont le LBTO fait partie) et le Centre Ingénierie et Santé (CIS) de l'École des Mines de Saint-Étienne sur le nouveau Campus Santé Innovation (CSI) en Juin 2015 illustre parfaitement cette évolution de mentalité. La création de l'unité commune SAINBIOSE (INSERM U1059) entre l'UJM et le CIS en est une seconde preuve.

IV.1. Aide au développement d'un modèle *in vitro* de tissu osseux mature

IV.1.1. Préambule

Encore de nos jours, la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans les processus de remodelage et de régénération osseuse au niveau cellulaire et moléculaire demeure partielle. Le développement d'un modèle *in vitro* de tissu osseux dans un environnement maîtrisé le plus proche possible des conditions physiologiques pourrait constituer un outil puissant pour l'étude fondamentale de ces mécanismes biologiques (cf. Chapitre I).

Dans le cadre d'un projet collaboratif amorcé en 2009 entre le CIS et le LBTO, un travail centré sur le développement d'un modèle *in vitro* 3D de tissu osseux mature (i.e. comportant des ostéocytes) a été entrepris. Ce travail a été matérialisé par l'association de deux thèses, la thèse de doctorat ici discutée sur l'élaboration de biocéramiques macroporeuses d'architecture contrôlée (Baptiste CHARBONNIER) et une thèse de doctorat en biologie de l'os (Laura JUIGNET). La finalité de cette étude pluridisciplinaire était de développer un système de culture en 3D *in vitro*, qui permettrait d'évaluer d'une part l'influence des stimuli mécaniques (e.g., compression du substrat de culture, contrainte de cisaillement) sur le remodelage osseux, et d'autre part le rôle que jouent les ostéocytes dans la dynamique du remodelage.

La différenciation de cellules primaires squelettiques en ostéocytes est un processus lent (temps culture \approx 2 semaines). Par conséquent, un bioréacteur perfusé dans lequel se trouve un substrat de culture 3D biocompatible et ostéoconducteur est un prérequis au développement d'un tel modèle de tissu [36, 37]. Outre l'apport de nutriments et d'oxygène nécessaire à la survie des cellules osseuses, le flux de perfusion induit une stimulation (positive ou négative) de ces dernières. Afin de mieux comprendre et d'isoler ce phénomène il est impératif dans un premier temps de limiter au maximum les possibles interférences chimiques et de changement d'architecture liées à la dégradation du substrat de culture 3D. Pour ce faire, il faut utiliser un matériau peu dégradable. L'hydroxyapatite (HA) de composition $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ est un matériau biocompatible, ostéoconducteur et possédant l'un des plus bas produits de solubilité de la famille des phosphates de calcium.

L'architecture de ces supports est également primordiale, et sa maîtrise a une triple fonction : (i) assurer la bonne perfusion du support sans perte de flux (i.e., absence de fuites), (ii) assurer l'homogénéité du flux au sein de la porosité du support (assurant ainsi l'homogénéité de distribution des nutriments et de la stimulation mécanique liée au flux), et (iii) favoriser la formation et la maturation du tissu osseux. En effet, concernant ce dernier point, des études récentes de l'équipe du Pr. Fratzl (Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Allemagne) ont montré que la courbure des pores et la présence de zones confinées (e.g. angles aigus) influencent significativement le développement tissulaire [44, 45, 242, 243] comme illustré Figure IV-1.

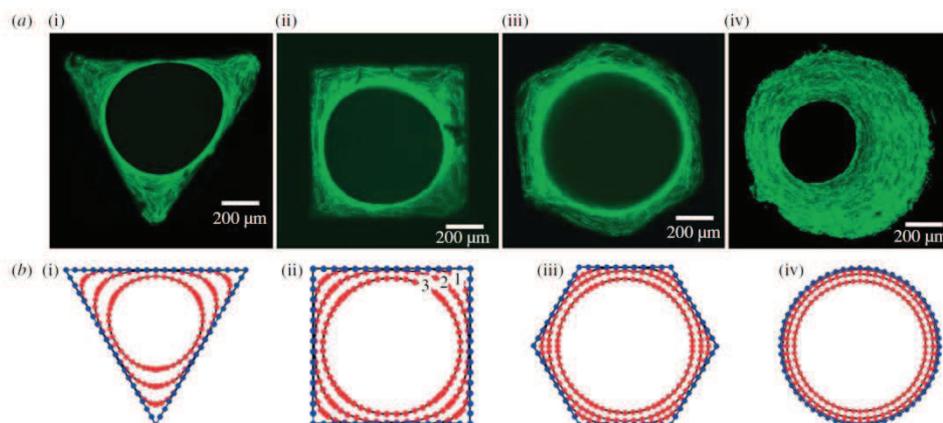


Figure 1. (a) New tissue formed in three-dimensional matrix channels. Actin stress fibres are stained with phalloidin-FITC and visualized under a confocal laser scanning microscope. Here, the tissue formation is shown (i-iii) after 21 days and (iv) after 30 days of cell culture in the channels of a (i) triangular, (ii) square, (iii) hexagonal and (iv) round shape introduced into a HA plate *in vitro*. (b) Numerical simulation of tissue formation within channels of various shapes: (i) triangular, (ii) square, (iii) hexagonal and (iv) round. The lines (early time point 1, ongoing times 2 and 3) mark the simulated development of tissue formation due to ongoing culture time, which corresponds closely to the observed development of new tissue formation *in vitro*.

Figure IV-1. Influence de l'architecture du substrat de culture sur la formation *in vitro* d'un nouveau tissu (d'après Rumpler et al. [242])

Toutefois, l'état actuel des connaissances ne nous permet pas d'établir l' « architecture idéale » [244] (cf. Chapitre I), c'est-à-dire, plus concrètement dans le cas de cette étude, celle qui permettrait la différenciation de cellules primaires squelettiques en ostéocytes le plus efficacement possible. Le terme « architecture » est également imparfait puisqu'il n'existe pas qu'un paramètre architectural pouvant moduler le comportement des cellules osseuses mais plusieurs [36, 245]. La Figure IV-2 détaille la nomenclature que nous utilisons pour qualifier l'architecture aux différentes échelles de taille.

En conséquence, l'étude préliminaire présentée ci-dessous vise à évaluer l'influence de l'architecture interne du substrat de culture 3D et du flux de perfusion sur le devenir de cellules ostéoprogénitrices. L'analyse et l'observation des phénomènes biologiques dans de telles structures 3D « fermées » sont loin d'être simples et demandent l'adaptation des protocoles expérimentaux classiques. De fait, l'influence de l'architecture sur le comportement cellulaire a aussi été étudiée en milieu statique sur des substrats « ouverts » présentant la même macroarchitecture que les substrats 3D étudiés. Ces biocéramiques planes macroarchitecturées seront désignées comme des matériaux 2D½.

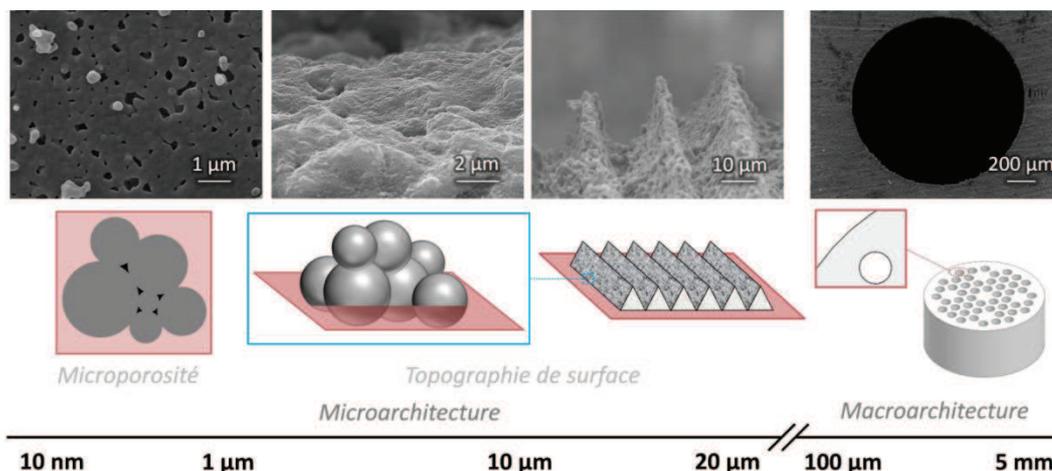


Figure IV-2. Nomenclature utilisée pour qualifier l'architecture du support de culture aux différentes échelles de taille.

IV.1.2. Matériels et méthodes

IV.1.2.1. Conception et fabrication des substrats de culture

Les substrats de culture, qu'ils soient en 2D½ ou 3D, ont été fabriqués en HA à l'aide du procédé de fabrication par imprégnation d'un moule en cire développé dans le cadre de cette thèse et détaillé au chapitre II. Toutefois, comme indiqué en introduction de ce dernier chapitre, la fonction et les propriétés des céramiques que l'on souhaite obtenir vont nécessiter d'ajuster les protocoles de fabrication.

IV.1.2.1.1. Substrats de culture 3D

Le cahier des charges des biocéramiques macroporeuses est à première vue assez simple. En résumé le matériau doit être biocompatible, ostéoconducteur, facilement stérilisable, faiblement dégradable dans le milieu de culture et d'architecture contrôlée. A ce titre, des architectures complexes telles les structures minimales triplement périodiques (e.g., gyroides), pressenties pour favoriser le développement tissulaire [155-161] auraient pu être étudiées. Toutefois, le contrôle des flux de perfusion à l'intérieur de telles structures et la modélisation des phénomènes physiques, chimiques et biologiques en leur sein peuvent s'avérer problématiques. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés au cours de cette étude préliminaire sur des céramiques d'architectures simples afin de développer des modèles prédictifs. Autrement dit, l'idée est de pouvoir relier simplement l'architecture du substrat, induisant des contraintes fluidiques (e.g., flux de cisaillement) lors de sa perfusion, à un comportement cellulaire ; la complexification des structures et modèle prédictifs sera envisagée à postériori.

Par conséquent, et sur la base des travaux de l'équipe du Pr. Fratzl, l'architecture interne des biocéramiques a été conçue avec des géométries élémentaires en forme de canaux unidirectionnels de section circulaire ou triangulaire. Afin de conserver un débit de perfusion équivalent entre chaque biocéramique mais également chaque canal, qu'il soit de section triangulaire ou circulaire, le nombre de canaux unidirectionnels ainsi que l'aire de leur section se devaient d'être similaires.

La dimension et la forme générales des biocéramiques ont été contraintes par le système de fixation du biomatériau proposé de série sur le bioréacteur de perfusion Bose ElectroForce 5270 BioDynamic utilisé dans le cadre de ces essais. La fixation de la céramique est réalisée à l'aide de pistons cylindriques en acier inoxydable 316L de 10,4 mm de diamètre extérieur, et l'étanchéité à l'aide d'une jupe en silicone, telles que schématisées Figure IV-3. Ces spécifications nous ont ainsi conduits à fixer le diamètre des céramiques à 10,0 mm.

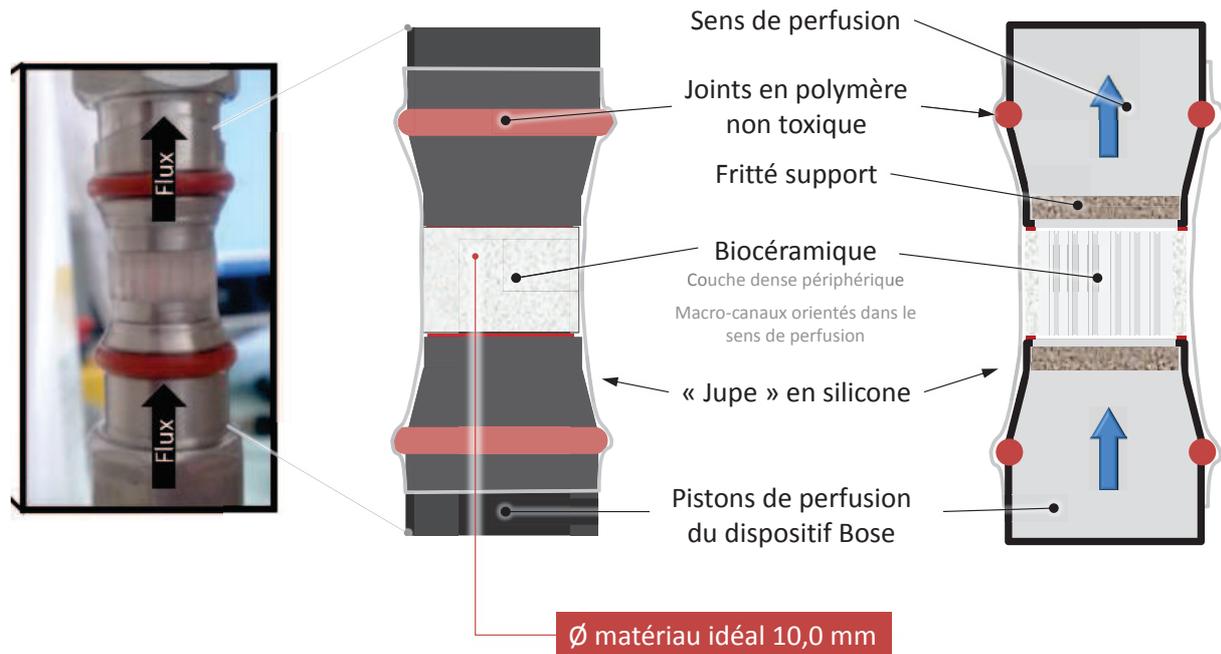


Figure IV-3. Schéma du procédé de blocage du matériau à l'aide de deux pistons du système BOSE Electroforce 5270.

La hauteur des biocéramiques cylindriques, choisie à 5 mm, a fait l'objet de compromis entre (i) leur temps et leur coût de production, et (ii) les contraintes des protocoles biologiques. Parmi ces dernières nous pouvons citer la nécessité d'offrir une surface (et donc une hauteur) d'adhésion suffisante aux cellules pour l'étape d'ensemencement et leur développement ; une quantité de cellules minimum est nécessaire pour pouvoir réaliser les analyses quantitatives (e.g., qRT-PCR). La hauteur ne doit toutefois pas être trop importante compte tenu des limites de la microscopie confocale utilisée pour imager le dépôt de matrice dans les canaux. Ces deux dernières contraintes sont également à l'origine des spécifications du diamètre et du nombre de canaux. Le but étant de cultiver et de contrôler les cellules jusqu'à 3 semaines, des diamètres de canaux relativement larges devaient être choisis pour éviter leur obstruction trop rapide. Associés aux contraintes de diamètre de la biocéramique, d'équivalence des sections des canaux, 50 canaux de section circulaire ($\varnothing \approx 740 \mu\text{m}$) ou triangulaire (angles 90° , 45° , 45° , hypoténuse $L = 1100 \mu\text{m}$ et petit côté $l = 780 \mu\text{m}$) ont été finalement insérés dans le volume de la céramique. La figure IV-4 présente les dessins CAO des moules et des biocéramiques conçues pour cette étude.

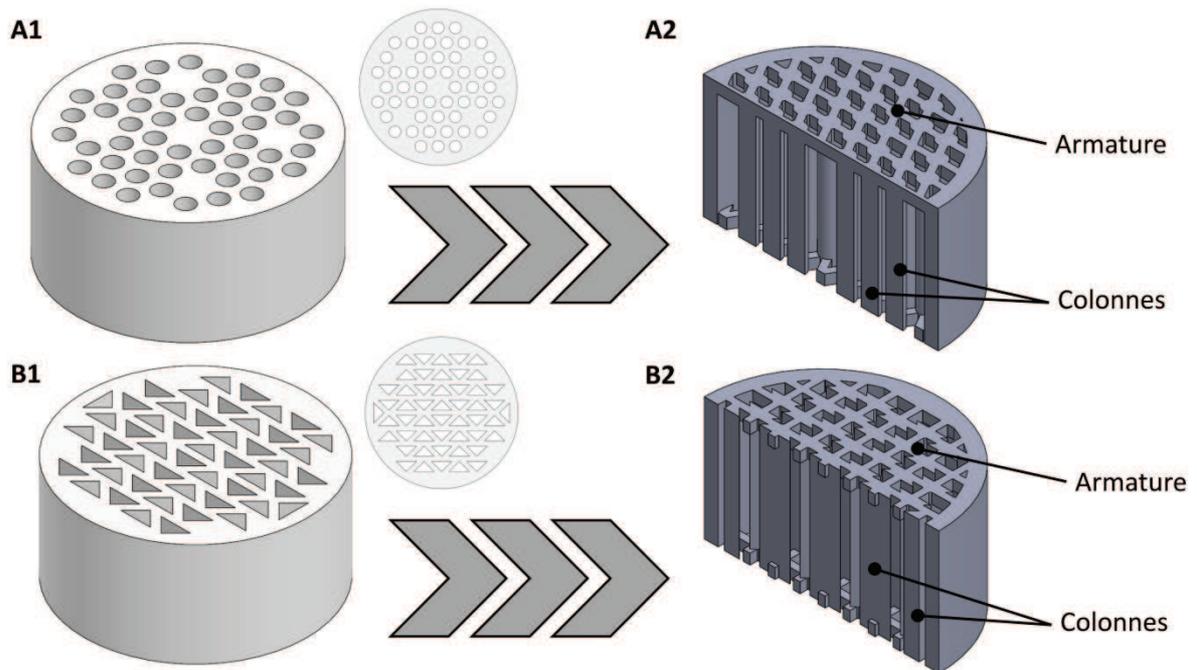


Figure IV-4. Représentation CAO des biocéramiques comportant chacune 50 canaux unidirectionnels de section circulaire (A1) ou triangulaire (B1) en vue isométrique et en vue de dessus et les moules respectivement utilisés pour leur production (B1 et B2). Le système d'armature soutenant les colonnes des moules (qui deviendront pour rappel les canaux des biocéramiques) est précautionneusement éliminé au cours du procédé de fabrication.

L'élaboration des biocéramiques en HA a suivi la procédure de fabrication détaillée dans le chapitre II à savoir la fabrication du moule (voir Figure IV-5, page 139), suivie des étapes d'imprégnation, de séchage, de déliantage puis de frittage.

Les paramètres de fabrication des moules ont été fixés par les contraintes liées à l'ensemencement des biocéramiques. En effet, l'adhésion cellulaire sur des surfaces en HA et l'ensemencement homogène de ces substrats de culture 3D sont loin d'être aisés. En réponse, les céramiques doivent présenter au sein des canaux une microtopographie (voir Figure IV-2) qui doit permettre en théorie de « piéger » les cellules ($5 < \varnothing_{\text{cellules}} < 10 \mu\text{m}$). La présence de cette microtopographie peut être obtenue en jouant sur deux paramètres : la résolution de fabrication du moule et la viscosité de la barbotine.

Les moules ont été produits par impression 3D (3Z studio, Multistation), les colonnes orientées selon l'axe z de l'imprimante (Figure IV-5), avec une résolution faible de $25 \mu\text{m}$ afin d'obtenir des « marches » d'une vingtaine de micromètres de profondeur et de largeur, positionnées perpendiculairement au sens du flux (voir Article 1, Chapitre II, page 37). L'obtention de ces marches est toutefois soumise à la préparation d'une suspension fluide capable de napper parfaitement les surfaces du moule. Cette dernière a ainsi été préparée, sur la base des résultats présentés au Chapitre II (Article 2, Chapitre II, page 47), avec une poudre d'HA de $4,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, et un pourcentage en matière sèche de 73,6 % en masse. Ce pourcentage de matière sèche élevé pour notre procédé est également important pour limiter la quantité de micropores : en simplifiant, plus il y a d'eau dans une suspension et plus la céramique risque de comporter des micro- nano-pores (voir Figure IV-2). Nous avons effectivement souhaité éviter autant que possible la présence de micropores dans ces céramiques pour limiter leur dégradation prématurée et la perturbation du flux de perfusion. En complément de ce pourcentage de matière sèche nous avons donc choisi une température de frittage des céramiques en HA optimale favorisant l'élimination de ces micro- nano-pores : $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 2 h sous air.

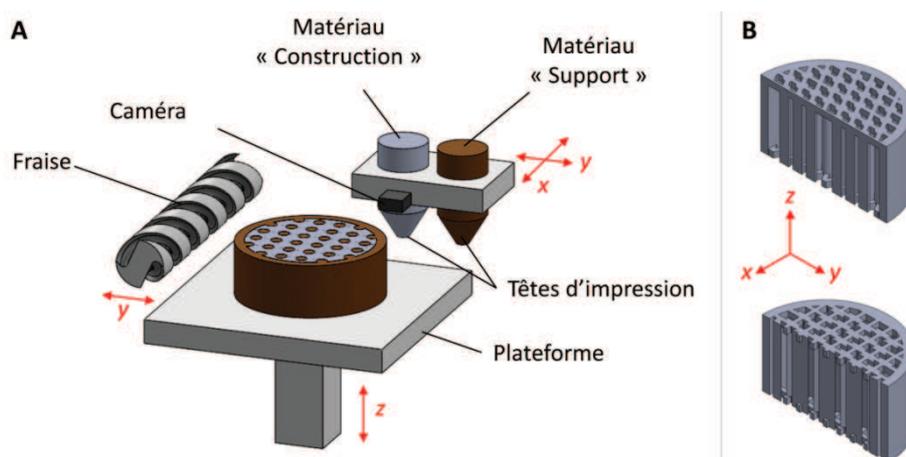


Figure IV-5. A. Représentation schématique de l'imprimante 3D utilisée pour la production des moules en cire utilisés dans le procédé de fabrication des biocéramiques. B. Orientation des moules sur la plaque d'impression, l'axe indiqué représentant celui du plateau d'impression.

IV.1.2.1.2. Substrats de culture 2D½

Les biocéramiques 2D½ ont été pensées dans l'optique de faciliter l'accès aux informations biologiques tout en faisant écho à la géométrie des pores unidirectionnels des céramiques 3D. Des images CAO de ces céramiques et des moules qui leur sont associés sont présentées Figure IV-6. Ainsi, la surface de ces pastilles comporte des sillons en vague ou en triangle (angle exposé 45° ou 90°). La profondeur des sillons a été fixée entre 400 et 600 µm pour (i) se rapprocher des dimensions des canaux dans les matériaux 3D et (ii) permettre l'observation des cellules à l'aide des équipements d'analyse microscopique à notre disposition (e.g., microscope confocal de l'Equipex IVTV, vidéomicroscope). Le diamètre des pastilles a été fixé par les dimensions des puits de culture (plaque 24 puits, $\varnothing_{\text{puits}} = 15 \text{ mm}$), soit à 10,6 mm, de façon à ce que les pastilles occupent un maximum d'espace dans le puits tout en restant facilement manipulables. Enfin, dans le but de minimiser les possibles interférences entre l'HA et la plupart des réactifs utilisés (e.g., agents de coloration [246, 247]) ou des protéines dosées [248-250] (l'ADN s'adsorbe particulièrement bien sur l'HA), la quantité d'HA a été minimisée en fixant leur épaisseur à 1,55 mm.

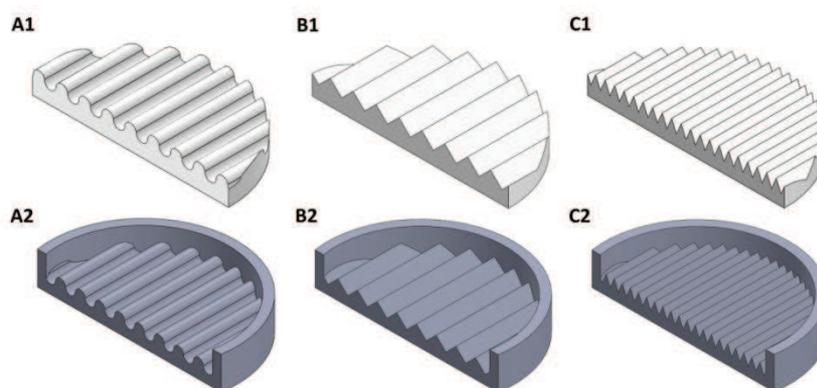


Figure IV-6. Images CAO (conception assistée par ordinateur) des céramiques 2D½ (-1) et des moules (-2) pour les géométries de surface A. en vague, B. en triangle dont l'angle exposé est de 90° et C. en triangle dont l'angle exposé est de 45°.

La fabrication des pastilles 2D½ en HA a été réalisée selon les protocoles décrits dans le Chapitre II. Les moules ont été fabriqués par impression 3D (3Z Studio, Multistation), horizontalement, c'est à dire

leurs sillons perpendiculaires à l'axe z de l'imprimante (Figure IV-7), avec une épaisseur de couche de 25 μm .

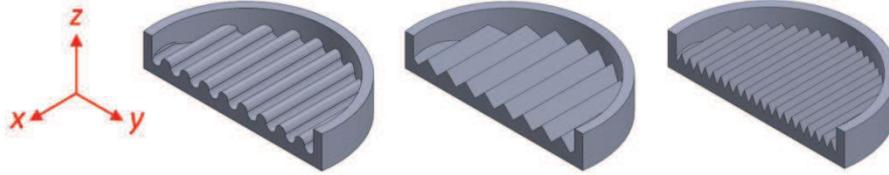


Figure IV-7. Stratégie d'impression des moules pour la fabrication des biocéramiques en HA 2D%. Les axes rouges correspondent aux axes de l'imprimante (Figure IV-5 A)

Afin d'obtenir les céramiques les plus denses et homogènes possibles, les caractéristiques des barbotines ont dû être ajustées du fait des problématiques de séchage de la suspension dans ces conditions particulières : grande surface de contact entre le moule en cire et la suspension, et structure très ouverte des moules. Pour cette phase d'optimisation, des suspensions préparées avec une poudre d'HA de $4,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ contenant de 71 % à 83 % en masse de matière sèche ont été testées. Après séchage et déliantage, les crus ont été frittés à $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 5h sous air afin de limiter la présence de microporosités.

Parallèlement, des pastilles planes d'HA de 10 mm de diamètre ont été fabriquées par compression uniaxiale (35 MPa, matrice de $\varnothing = 12,7 \text{ mm}$) puis isostatique (200 MPa / 1 min) d'une poudre de $4,0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Ces comprimés ont finalement été frittés à $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 2 h sous air. Ils serviront de témoins négatifs lors des essais biologiques (avec et sans macroarchitecture).

IV.1.2.2. Essais biologiques

La mise au point des protocoles et les évaluations biologiques ont été intégralement réalisés par Laura JUIGNET dans le cadre de sa thèse doctorat. Les données présentées ci-dessous n'ont pas pour vocation d'être exhaustives mais de donner des informations quant aux étapes. L'intégralité des protocoles est détaillée dans la thèse de Laura Juignet, veuillez, s'il vous plaît, vous y référer pour plus de précisions.

IV.1.2.2.1. Types cellulaires et milieux de culture

Deux types cellulaires ont été utilisés au cours de ces études *in vitro*, à savoir des cellules C3H10T1/2 (clone 8) et des cellules murines ostéoblastiques primaires (calvaria).

Les cellules de la lignée cellulaire C3H10T1/2 (clone 8), peu coûteuses, immortalisées mais non cancéreuses, peuvent s'engager dans la voie ostéoblastique ou adipocitaire en présence de facteurs spécifiques. Elles sont cultivées dans du DMEM complet [i.e., milieu Eagle modifié de Dulbecco, 10 % en volume de sérum fœtal de veau, 1 % de pénicilline et de streptomycine, 1 % de Glutamax®]. Cette lignée cellulaire a été utilisée pour la mise au point des protocoles biologiques (e.g., ensemencement, débit de perfusion).

Les cellules murines ostéoblastiques primaires (calvaria), beaucoup plus coûteuses, complexes à obtenir, et sensibles que les C3H10T1/2 (clone 8), sont capables de former des colonies ostéoblastiques minéralisées en présence de facteurs spécifiques. Elles sont contenues dans du α -MEM complet [i.e., Milieu Minimum Essentiel de Eagle (Sigma) supplémenté de 2 mM L-glutamine (Sigma), de 50 U.mL^{-1} de pénicilline (Sigma), de $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de streptomycine (Sigma) et de 10 % en volume de sérum fœtal de

veau (FCS, Biowest, Nuaille, France)]. Afin d'induire l'ostéogenèse, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'acide ascorbique (Sigma) et 10 mM de β -glycérophosphate (Sigma) ont été ajoutés au milieu lors de la culture. Ces cellules n'ont été utilisées qu'une fois les protocoles d'ensemencement et de culture validés.

IV.1.2.2.2. Culture cellulaire et analyses

Préalablement à toute culture cellulaire, les biocéramiques ont été stérilisées par traitement thermique sous air sec à 180 °C pendant 30 min (Poupinel, Binder, Allemagne).

2D½. Les pastilles 2D½ ont chacune étéensemencées avec 40000 cellules murines ostéoblastiques primaires (calvaria) contenues dans leur milieu de culture. Du fait de la structure « ouverte » de ces céramiques, leur ensemencement n'a pas nécessité de mise au point particulière. L'attachement des cellules sur les pastilles a été évalué 15 min après l'ensemencement. La culture cellulaire, statique dans ce cas, a été menée à 37 °C sous 5 % de CO₂ pendant 3 à 15 jours, le milieu de culture étant changé tous les un ou deux jours. La viabilité cellulaire, les processus cellulaires et l'activité métabolique des cellules ont été suivis tout au long de la culture. L'organisation du tissu, à savoir l'orientation des cellules, leur géométrie, ainsi que la forme et position de leur noyau a également été quantifiée.

3D. L'ensemencement cellulaire des matériaux 3D est une étape clé de la réussite et de la standardisation des essais biologiques. La quantité et l'homogénéité des cellulesensemencées ainsi que la répétabilité du procédé doivent être assurées avant tout autre chose. Les essais d'ensemencement ont été effectués avec la lignée cellulaire C3H10T1/2 (clone 8). Trois procédés d'ensemencement ont été étudiés :

1. un procédé par rotation du matériau

Les matériaux ont été placés dans des tubes stériles d'un diamètre légèrement supérieur au matériau ($\varnothing = 11$ mm) puis recouverts d'une suspension cellulaire (3×10^6 cellules dans 10 mL), l'ensemble étant ensuite complété avec du milieu de culture, puis le tube fermé hermétiquement. Le tube d'ensemencement était placé sur un agitateur rotatif (20 rpm soit $0,21 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) à 37 °C dans un incubateur à 5 % CO₂. Le matériau en rotation se déplaçait au sein de la suspension cellulaire qui le traversait de part en part.

2. un procédé avec mise sous vide

Les tubes contenant les matériaux et la suspension cellulaire ont été placés dans une fiole à vide stérile. Un vide (-100 mmHg) a été appliqué 3 x 1 min afin d'aspirer les bulles d'air hors des pores du matériau. Les tubes ont ensuite été fermés hermétiquement puis placés à 37 °C pendant 2 h dans un incubateur à 5 % CO₂. Après 1 h, ils ont été remués délicatement de façon à ce que le matériau se retourne à l'intérieur du tube.

3. un procédé associant la mise sous vide suivi d'une mise en rotation du matériau.

Les tubes d'ensemencement sont préparés comme décrit en (a), soumis à 3 x 1 min de vide (voir 2.), puis immédiatement mis en rotation (voir 1.).

Une fois le protocole d'ensemencement validé la culture des cellules murines ostéoblastiques primaires (calvaria) a été effectuée dans un bioréacteur Bose ElectroForce 5270 BioDynamic, présenté Figure IV-8. Ce bioréacteur perfusé a été mis à notre disposition par la plateforme Ingénierie et Vieillesse des Tissus Vivants (IVTV) avec l'appui de la responsable Dr. Virginie Dumas (École Nationale d'Ingénieurs de

Saint-Étienne, ENISE). L'intérêt de ce bioréacteur réside dans sa capacité à stimuler mécaniquement les cellules au moyen du flux traversant la biocéramique (flux pulsatile ou non) ou encore par sollicitation de cette dernière en compression. Il permet également le prélèvement de milieu et/ou l'ajout de substances en temps réel au cours d'une expérimentation. Ce bioréacteur possède 4 chambres de culture comme montré sur la Figure IV-8. Une biocéramique ensemencée est positionnée dans chacune des chambres de perfusion entre deux écrous tel qu'illustré Figure IV-3 (page 137), puis le tout est placé dans un incubateur à 37 °C sous 5 % de CO₂ jusqu'à 30 jours.



Figure IV-8. Bioréacteur de perfusion Bose ElectroForce 5270 BioDynamic mis à disposition par la plateforme ivtv.

Afin d'évaluer l'influence du débit de perfusion sur la formation tissulaire et la différenciation cellulaire, les cellules ont été cultivées pendant 7 jours dans les biocéramiques avec des débits de perfusion de 50, 300 ou 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, correspondant respectivement à des vitesses de 38,8, 232,5 et 387,5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ au niveau des canaux.

L'influence de l'architecture du substrat de culture sur le développement tissulaire a été quantifiée via la culture de cellules murines ostéoblastiques primaires dans les biocéramiques 3D pendant 30 jours avec un débit de perfusion de 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

IV.1.3. Résultats et discussion

IV.1.3.1. Conception et fabrication des substrats de culture

IV.1.3.1.1. Substrats de culture 3D

La figure IV-9 présente une image en coupe des biocéramiques produites ainsi que leurs principales caractéristiques géométriques. Quelle que soit leur architecture interne (section circulaire ou triangulaire), les biocéramiques possèdent des dimensions similaires, à savoir un diamètre de $10,02 \pm$

0,03 mm et une hauteur de $5,09 \pm 0,06$ mm. La géométrie des canaux circulaires et triangulaires est très bien définie, malgré une très légère déformation des cercles et un faible arrondissement des angles des triangles^{††}. Les canaux circulaires des biocéramiques ont un diamètre $\varnothing_{\text{pore}}$ égal à 740 ± 15 μm ; les canaux triangulaires ont une hypoténuse (L) et un petit côté (l) respectivement égaux à $1,097 \pm 0,014$ mm et $0,776 \pm 0,010$ μm .

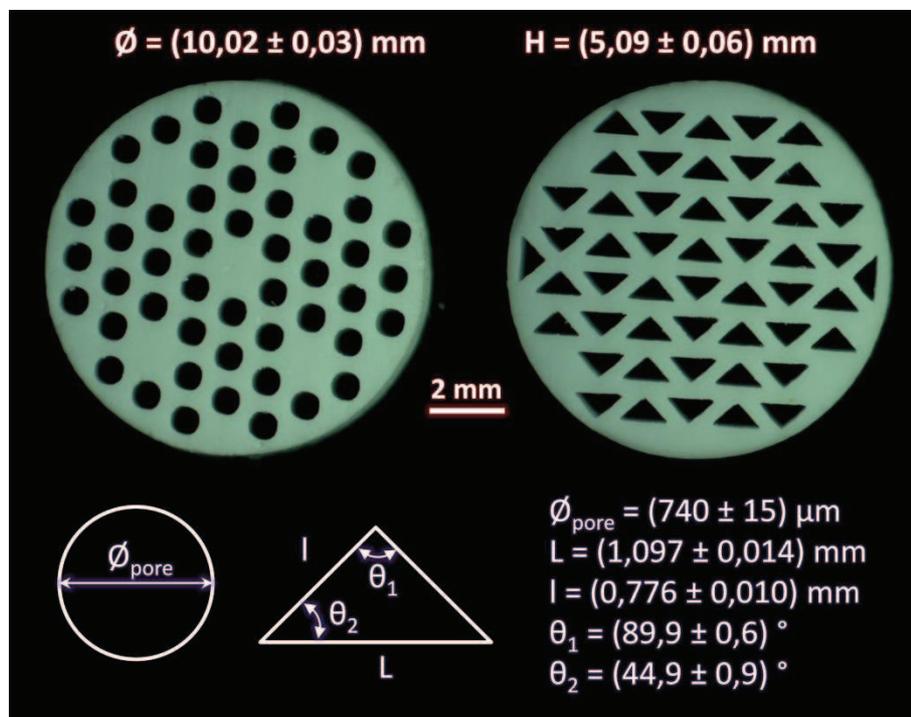


Figure IV-9. Biocéramiques en HA produites spécifiquement pour la chambre de culture du réacteur Bose ElectroForce 5270 BioDynamic

Les biocéramiques produites correspondent très fidèlement au cahier des charges défini section IV.1.2.2.1. tant au niveau de leurs dimensions globales ($\varnothing = 10$ mm, $H = 5$ mm) que locales ($\varnothing_{\text{pore}} = 740$ μm , $L = 1100$ μm et $l = 780$ μm). Une bonne reproductibilité de la perfusion dans les différentes biocéramiques est alors assurée. De même, les aires des sections circulaires et triangulaires des canaux sont comparables (respectivement $0,43 \pm 0,01$ mm^2 et $0,43 \pm 0,02$ mm^2), ce qui induit un débit global (au niveau de la céramique) et local (au niveau d'un pore) de perfusion similaire quelle que soit la géométrie interne de la biocéramique.

La figure IV-10 illustre la macro- et micro- topographie présente à la surface des biocéramiques 3D, induite par la stratégie d'impression du moule et l'emploi d'une barbotine fluide mais concentrée en matière sèche (73,6 % en masse).

Des « marches » d'environ 20 μm de haut et de large, orientées perpendiculairement aux sens des canaux, rythment la surface des céramiques (« microtopographie périodique »). A l'échelle plus petite, la surface de ces dernières se compose également d'une microtopographie aléatoire de 1 à 2 μm d'amplitude induite par les grains de poudre. Enfin, la nano- / micro- porosité est peu discernable, comme souhaité.

^{††} Ceci confirme les résultats présentés dans l'article « Porous Bioceramics Produced by Impregnation of 3D-Printed Wax Mold Ceramic : Architectural Control and Process Limitations », Chapitre II

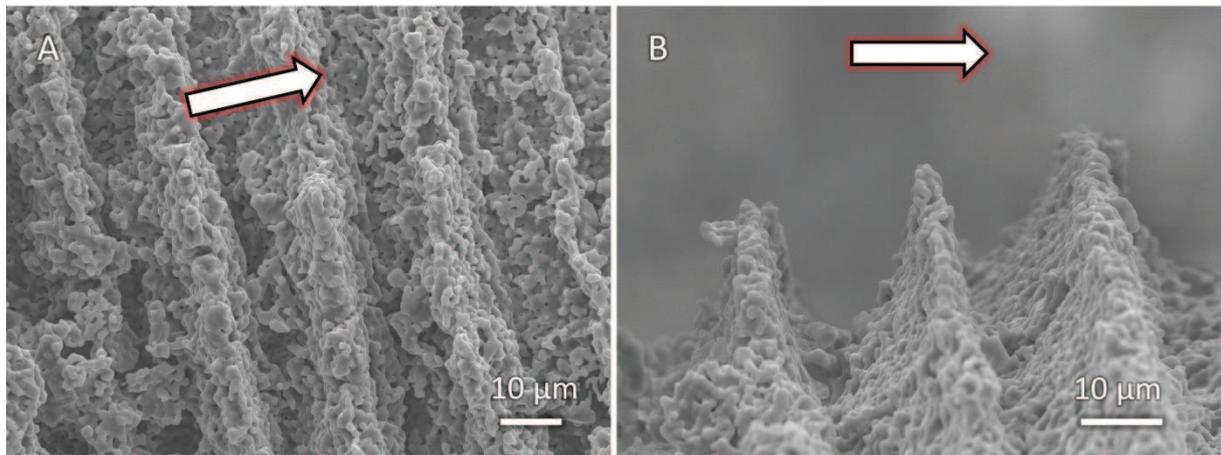


Figure IV-10. Images par microscopie électronique à balayage de la surface des biocéramiques 3D avec en A. une vue de dessus et en B une vue de côté. Les flèches en surbrillance rouge indiquent le sens du flux de perfusion des biocéramiques.

IV.1.3.1.2. Substrats de culture 2D½

La Figure IV-11 A et B montre un exemple représentatif des biocéramiques obtenues avec une barbotine chargée à 71 % en matière sèche. Dans ces conditions les céramiques présentent des zones dépourvues de matière (cavités) qui peuvent aller jusqu'à traverser l'intégralité de la pièce. La formation de ces cavités a été observée après l'imprégnation du moule lors du séchage de la suspension. Ce phénomène n'est pas sans rappeler la formation de bulles dans les structures 3D lorsque les propriétés de la barbotine ne sont pas adéquates ou lorsque le séchage de la barbotine est inadapté (cf. Article 2, Chapitre II, page 47). Nous expliquons ce phénomène de cavitation par un départ inhomogène de l'eau de la barbotine lors du séchage, comme illustré Figure IV-11. La grande quantité de cire (hydrophile) en contact avec la barbotine absorbe rapidement une partie de son eau de constitution, entraînant un séchage local préférentiel de la barbotine. Un phénomène équivalent est observé sur les bords du moule où l'action simultanée de l'absorption et de l'évaporation^{§§} de l'eau provoque la solidification rapide de la suspension. La barbotine sèche (i.e., le vert) formée agit alors comme un drain qui amplifie le phénomène de séchage et l'apparition de transfert de matière des zones les plus humides vers les parties sèches. Ce phénomène provoque la formation de cavité d'autant plus importante que la suspension est riche en eau.

Pour limiter voire éviter ce phénomène, il est ainsi indispensable dans le cas de ces moules ouverts de travailler avec des suspensions riches en matière sèche, ou autrement dit constituées d'une faible quantité d'eau. Ainsi, les moules ont été imprégnés par une barbotine concentrée en matière sèche à hauteur de 82,1 % en masse puis recouverts d'un film plastique afin de limiter la perte brutale d'eau par évaporation, et par voie de conséquence un séchage inhomogène de la suspension. Le film plastique est finalement retiré après quelques heures pour finaliser le séchage des pièces.

^{§§} L'évaporation préférentielle sur les bords du moule par rapport au centre du moule est une question de différence de pression de vapeur saturante

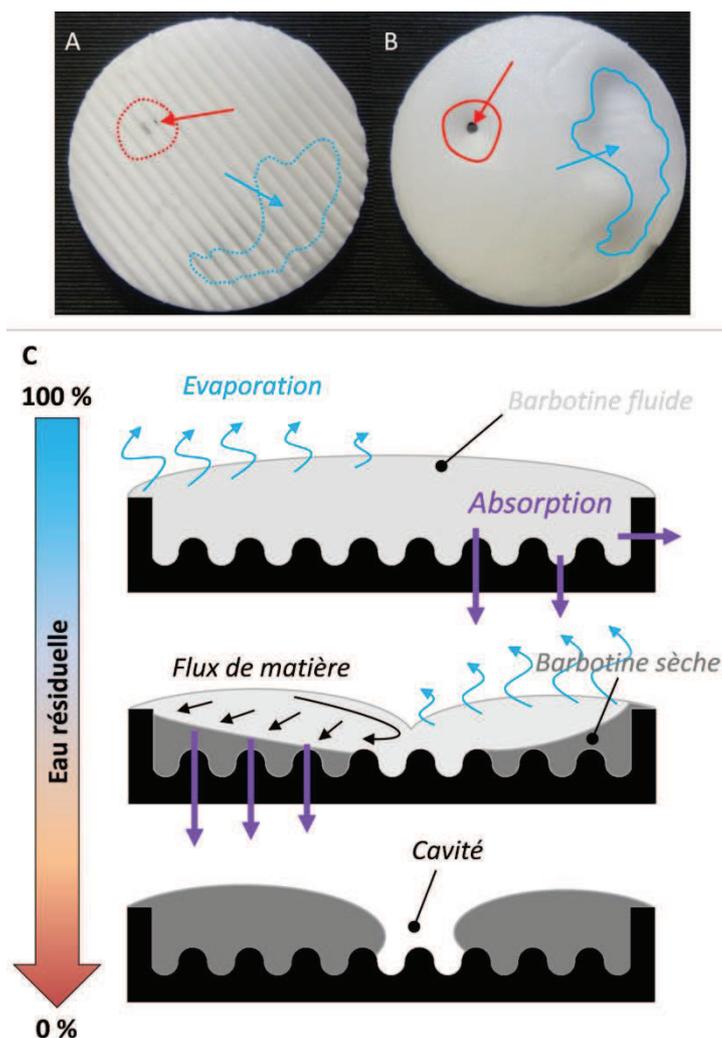


Figure IV-11. Photographie de A la face supérieure et B. la face inférieure d'une pastille 2D½ issue de l'imprégnation d'un moule par une barbotine peu concentrée en matière sèche (71 % en masse). Les zones dépourvues de matière (cavités), cerclées de bleu ou de rouge sur les photographies, peuvent rester en surface (bleu) ou traverser toute l'épaisseur de la pastille (rouge). En C. est présenté un schéma explicatif de la formation de telles cavités liée au départ inhomogène de l'eau contenue dans la barbotine.

La Figure IV-12 présente les biocéramiques en HA obtenues après optimisation du procédé d'imprégnation, déliantage puis frittage des pièces à 1200 °C pendant 2 h sous air.

Les dimensions globales des céramiques rentrent dans le cahier des charges défini section IV.1.2.1.2, à savoir un diamètre et une épaisseur proches de 10,6 mm et 1,50 mm (N=9). Les géométries de surface sont très bien définies pour les vagues et les triangles à 90°. Elles sont en revanche légèrement crénelées pour les triangles à 45° (N=9). Ceci aurait pu être corrigé à l'aide d'un ajustement des paramètres de fabrication des moules ; en augmentant par exemple la résolution de fabrication (12 µm au lieu de 25 µm). Un autre problème lié à la stratégie de montage des moules est la présence de méplats de 120 à 140 µm de largeur au fond des sillons (cf. Figure IV-12). Ce méplat diminue significativement la profondeur des sillons, et ce d'autant plus que l'angle est aigu. Ce phénomène expliqué dans l'article 1 (Chapitre II, page 37), lié à l'épaisseur minimale de cire que peuvent déposer les buses d'impression lors de la construction des moules, aurait pu être limité en modifiant par exemple l'angle de montage de ces derniers ; en inclinant leur sens de fabrication de 90° par exemple. Toutefois dans ce cas les temps de production deviendraient trop contraignants avec la machine de

laboratoire dont nous disposons, et la tenue des moules sur la tranche lors du montage aurait nécessité un ajustement des fichiers CAO.

Notons enfin que la microtopographie des céramiques 3D et 2D½ est nettement différente puisque ces dernières possèdent des « marches » mais d'amplitude beaucoup plus faible que dans les échantillons 3D ($< 10 \mu\text{m}$ versus $20 \mu\text{m}$) et disposées dans le sens des sillons. Ces différences sont liées à l'utilisation d'une suspension plus chargée en matière sèche dans le cas des 2D½ (82,1 % en masse) par rapport au 3D (73,6% en masse), et d'une stratégie de montage différente. Cette variation de topographie entre 3D et 2D½ est une erreur qu'il faudra savoir éviter lors des prochains essais si nous voulons pouvoir comparer les résultats des cultures entre eux.

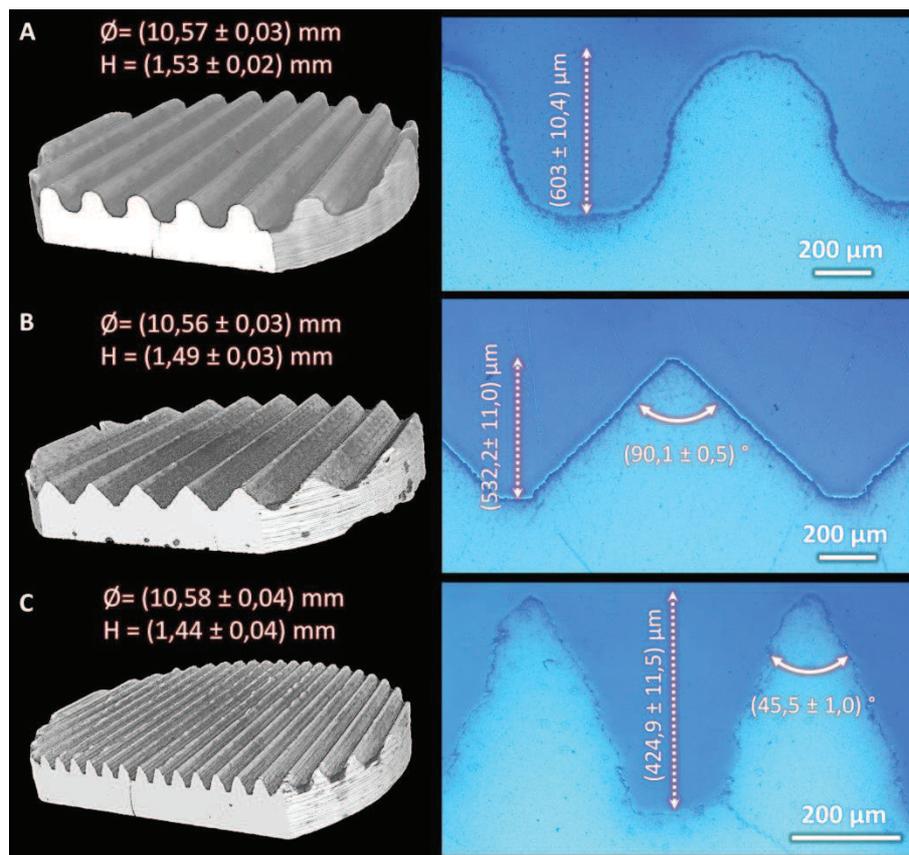


Figure IV-12. Image 3D (Micro-Tomographie X) et géométrie de surface (microscopie) des pastilles en HA avec le motif A. en vague, B. en triangle dont l'angle exposé est de 90° et C. en triangle dont l'angle exposé est de 45°

IV.1.3.2. Essais biologiques

Les résultats des études biologiques faisant partie intégrante de la thèse de Laura Juignet, et l'objet de deux articles bientôt soumis^{***}, nous n'en ferons ci-dessous qu'un bref résumé.

3D. L'ensemencement des biocéramiques 3D par rotation seule a permis d'obtenir un nombre très important de cellules dans les biocéramiques mais de façon inhomogène et non reproductible (respectivement 201200, 18000 et 329000 cellules, valeurs médiane, minimale et maximale). A l'inverse, l'ensemencement sous vide, relativement homogène et très reproductible, ne permet pas

^{***} Article 1 : « Macrotopographic closure promotes tissue growth and osteogenesis in vitro »

Article 2 : « Impact of macroarchitecture on osteoblast cell orientation and extracellular matrix deposition »

d'obtenir un grand nombre de cellules dans le matériau (respectivement 24100, 17800 et 27500 cellules, valeurs médiane, minimale et maximale). La combinaison de ces deux techniques d'ensemencement a montré des résultats encourageants, malgré une densité cellulaire à l'intérieur des canaux encore un peu faible (respectivement 58400, 40000 et 66500 cellules, valeurs médiane, minimale et maximale).

Le débit de perfusion au cœur des céramiques 3D joue, comme attendu, un rôle déterminant dans le développement et la maturation des cellules osseuses comme démontré Figure IV-13.

Un débit de perfusion de $50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ entraîne une forte croissance du tissu à l'entrée de la biocéramique, les pores étant très rapidement obstrués. Il en résulte une mort des cellules à l'intérieur et en sortie de la biocéramique. Ce débit de perfusion n'est donc pas assez fort pour le développement homogène d'un tissu dans les canaux. En revanche, une formation tissulaire homogène est observée pour les débits de perfusion de 300 et $500 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, avec toutefois une quantité de tissu formé significativement plus faible pour ce dernier. Un débit de perfusion de $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (équivalent à une vitesse de $234 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans les canaux) semble favoriser le développement d'un nouveau tissu et a été choisi pour le reste de l'étude.

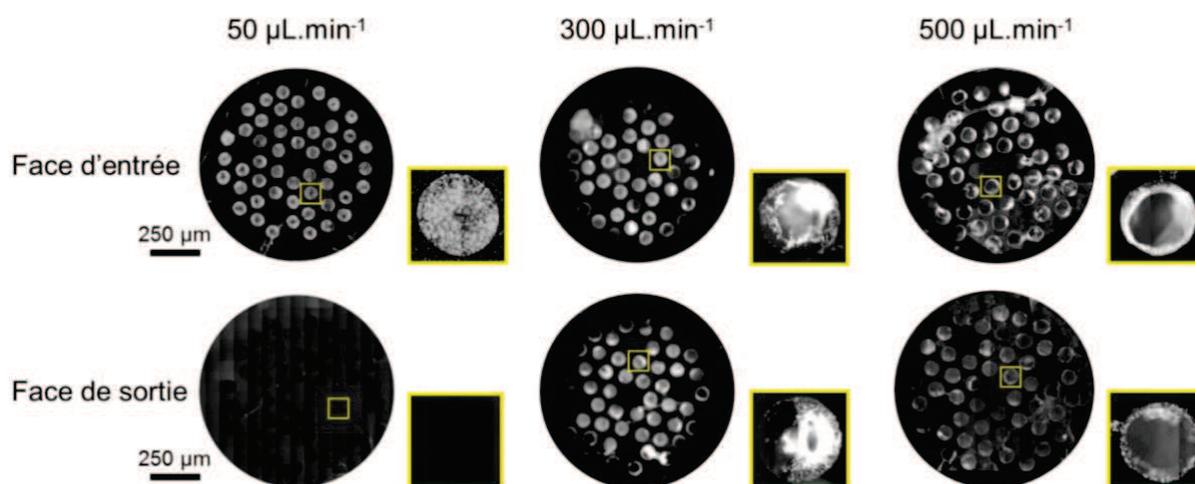


Figure IV-13. Influence du débit de perfusion sur la formation de matrice extracellulaire dans les biocéramiques 3D (7 jours de culture). Les noyaux des cellules, marqués au DAPI, apparaissent en surbrillance sur ces images effectuées en microscopie à fluorescence.

Par ailleurs, comme illustré Figure IV-14, la géométrie des pores unidirectionnels influe sur la formation du tissu. En effet, la matrice extracellulaire apparaît uniformément déposée à la surface des canaux circulaires (épaisseur $\approx 21 \mu\text{m}$), alors qu'elle semble préférentiellement concentrée dans les angles des canaux de section triangulaire et plus particulièrement dans les angles les plus aigus/fermés (Figure IV-14 A). De façon équivalente nous pouvons observer une accumulation de Fibronectine (FN) et Ostéopontine (OPN) dans ces derniers laissant à penser que des angles de 45° favoriseraient au moins la prolifération voire la différenciation cellulaire⁺⁺⁺ (Figure IV-14 B).

⁺⁺⁺ L'OPN se lie d'une manière covalente à la fibronectine, via une transglutamination qui augmente sa liaison au collagène de type I. L'OPN sert à l'attachement des cellules à l'HA. Elle est fortement exprimée au pic de prolifération des progéniteurs/préostéoblastes (stade précoce), va ensuite diminuer puis de nouveau augmenter au début de la minéralisation (exprimée par les ostéoblastes différenciés).

La maturation du tissu formé dans ces deux types de structure est difficile à évaluer, les messages biochimiques relargués par les cellules dans le milieu étant très fortement dilués. De même, les dosages ADN et ARNm, qui nécessitent une grande quantité de cellules, n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Il est à noter toutefois qu'une coloration au Rouge Alizarine a mis en évidence la minéralisation de la matrice après 15 jours de culture de cellules de calvaria. Malheureusement ces évaluations n'ont été pour l'heure réalisées que dans les pores circulaires d'un matériau-modèle en PMMA. Toutefois, elles confirment qu'une ostéogénèse prend place au sein des biomatériaux dans le système développé (Figure IV-14 C).

Pour résumer, la culture de cellules murines ostéoblastiques primaires dans un environnement 3D perfusé a mené au développement d'un modèle de tissu osseux minéralisé. Ces systèmes *in vitro* en 3D complexe nécessitent toutefois une adaptation des techniques classiques d'observation et d'analyse en temps réel des phénomènes biologiques, prérequis nécessaire pour aller plus loin dans la maîtrise de la culture et la compréhension des phénomènes qui s'y produisent. Les études sur les pastilles 2D½ prennent alors tout leur sens.

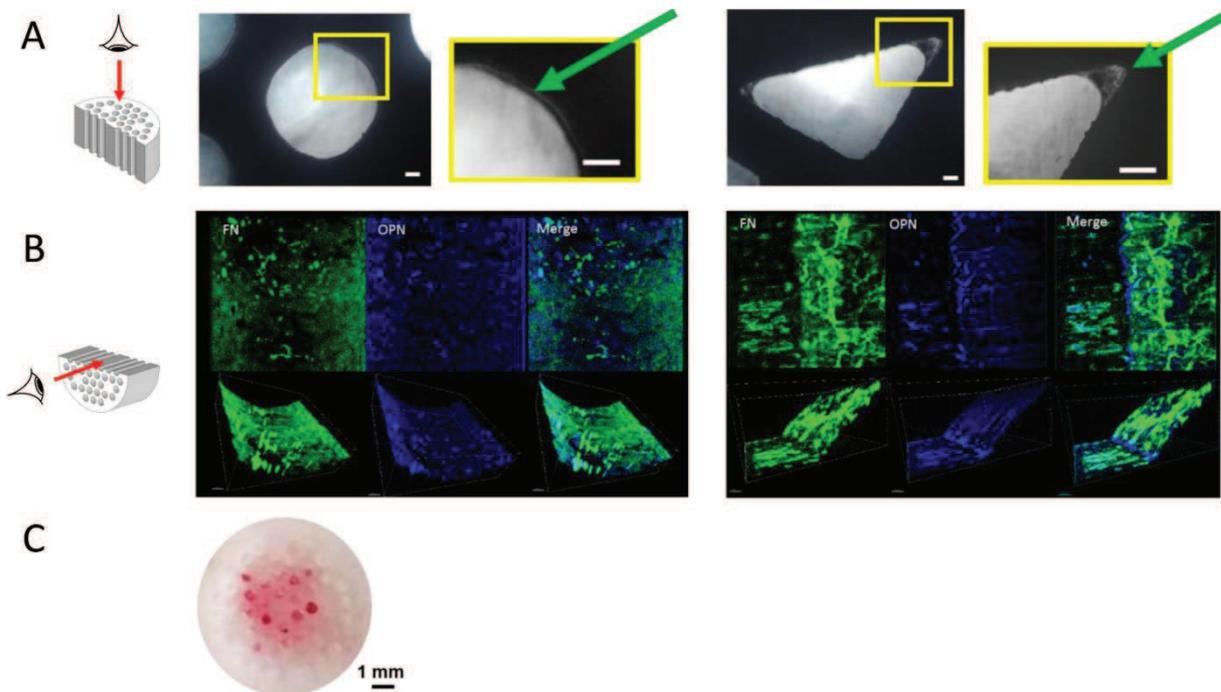


Figure IV-14. Formation et maturation du tissu osseux dans les canaux unidirectionnels de section circulaire et triangulaire des biocéramiques 3D perfusées à $300 \mu\text{L min}^{-1}$ après 15 jours de culture avec A. le dépôt de matrice extracellulaire et B. les marquages de la fibronectine (FN, en vert) et de l'ostéopontine (OPN, en bleu) et C. une coloration au Rouge d'Alizarine

2D½. L'ensemencement des pastilles planes et 2D½ avec des cellules ostéoblastiques primaires murines a montré des résultats satisfaisants, confirmés par les mesures d'attachement cellulaires (résultats non présentés dans ce manuscrit). Les cellules murines ostéoblastiques primaires déposent significativement plus de matrice extracellulaire (jusqu'à 4 fois plus) sur les pastilles 2D½ que sur les pastilles planes, mais aucune différence significative n'a été observée entre les différentes géométries (Figure IV-15 A). Des colonies ostéoblastiques minéralisées sont présentes sur les pastilles planes et 2D½ après 15 jours de culture (Figure IV-15 A, flèches jaunes). Cependant la cinétique de différenciation ostéoblastique semble être accélérée sur les pastilles 2D½ comme le suggère les dosages qRT-PCR de la protéine ostéocalcine (Figure IV-15 B), qui est un marqueur de l'activité métabolique des ostéoblastes. En outre l'état de différenciation ostéoblastique semble d'autant plus avancé que la courbure des

sillons et/ou la présence de zones confinées est importante (i.e. triangles 45° z triangles 90° z vagues z plan), comme le suggère les dosages qRT-PCR de la protéine sclérostine (Figure IV-15 B), qui est un marqueur ostéoblastique mature, et qui est exprimée par les ostéocytes.

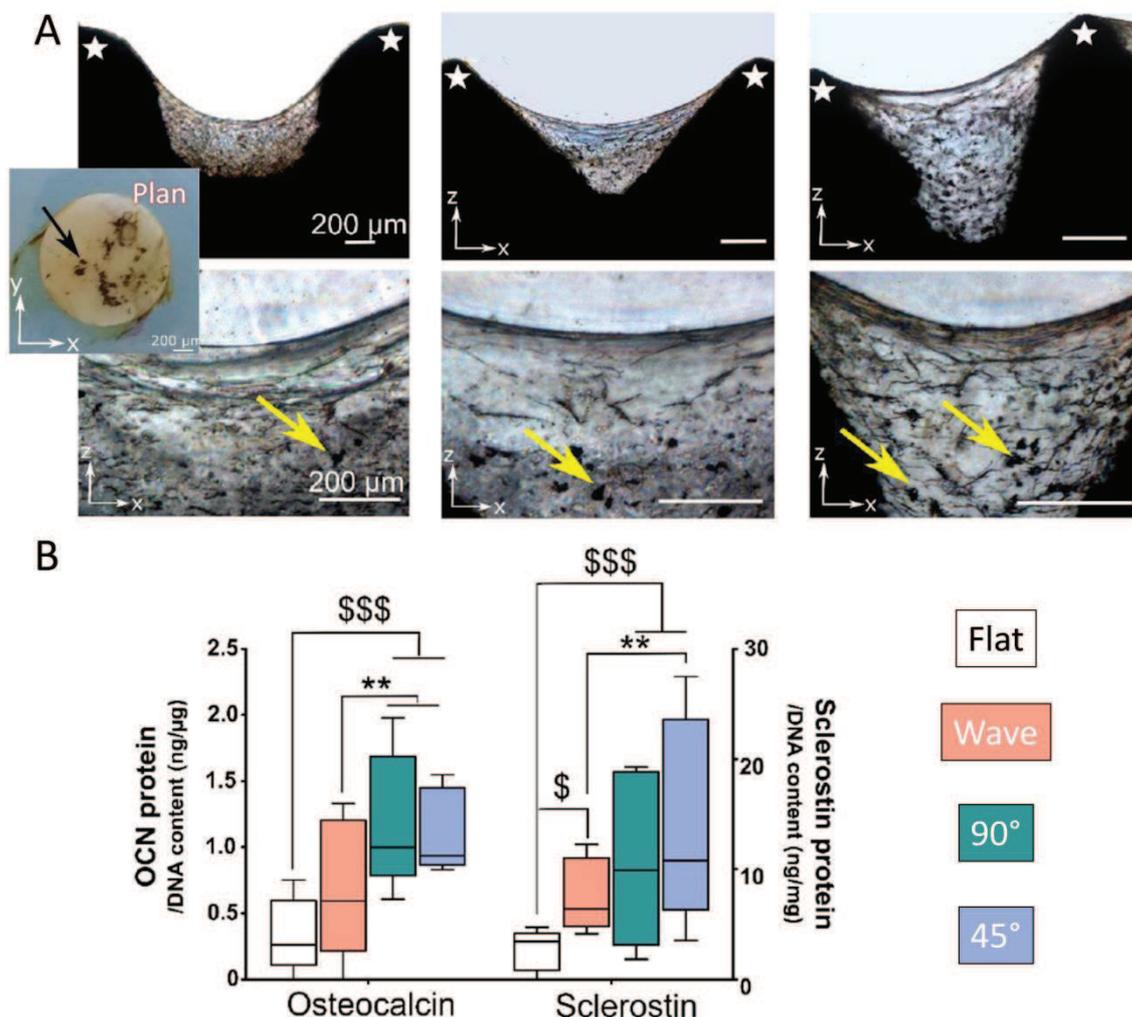


Figure IV-15. Formation et maturation du tissu osseux après 15 jours de culture statique sur les biocéramiques en HA planes et 2D½ avec A. une vue en coupe de l'intérieur des sillons, et B. les résultats des dosages qRT-PCR de la protéine ostéocalcine et sclérostine (qui est une protéine dont le gène est le SOST). Les flèches jaunes présentes sur les images montrent d'éventuelles colonies ostéoblastiques minéralisées. La céramique est indiquée par une étoile.

Enfin, l'organisation du tissu connaît des différences notables entre substrat plan et substrat 2D½ (Figure IV-16). Pour les pastilles planes, les cellules génèrent une grande quantité de fibres de stress que ce soit à la surface de la matrice ou à 20 μ m de profondeur. Elles sont orientées aléatoirement et possèdent une morphologie très étalée à la surface du matériau. Dans les substrats 2D½, les couches cellulaires supérieures (« Top cell layer ») présentent une densité de fibres de stress comparable à celle observée sur les pastilles planes. Ces fibres semblent même orientées préférentiellement, perpendiculairement à l'axe des sillons, pour la géométrie la plus fermée, i.e., triangles à 45° (ce résultat a été effectivement confirmé mais n'est pas présenté dans ce document). En revanche, à l'intérieur de la matrice (z=20%) leur densité est considérablement réduite quelle que soit la géométrie du support 2D½. De même, les cellules sont beaucoup moins étalées que sur les couches supérieures de la matrice (ou sur la pastille plane).

Ces observations prouvent bien que les cellules ostéoblastiques cultivées sur un substrat plan sont forcées de s'adapter à un environnement qui ne leur est pas naturel. En revanche, les cellules ostéoblastiques cultivées sur les substrats 2D½, à l'exception de celles en surface, semblent se trouver dans un environnement tridimensionnel proche de leur microenvironnement physiologique, du fait de la quasi-absence de fibres de stress et de leur morphologie « naturelle » ; i.e., non étalée. Les résultats obtenus sur ces substrats 2D½ donnent des pistes de réflexion pour les études à venir sur nos systèmes *in vitro*, mais également quant à la conception des implants.

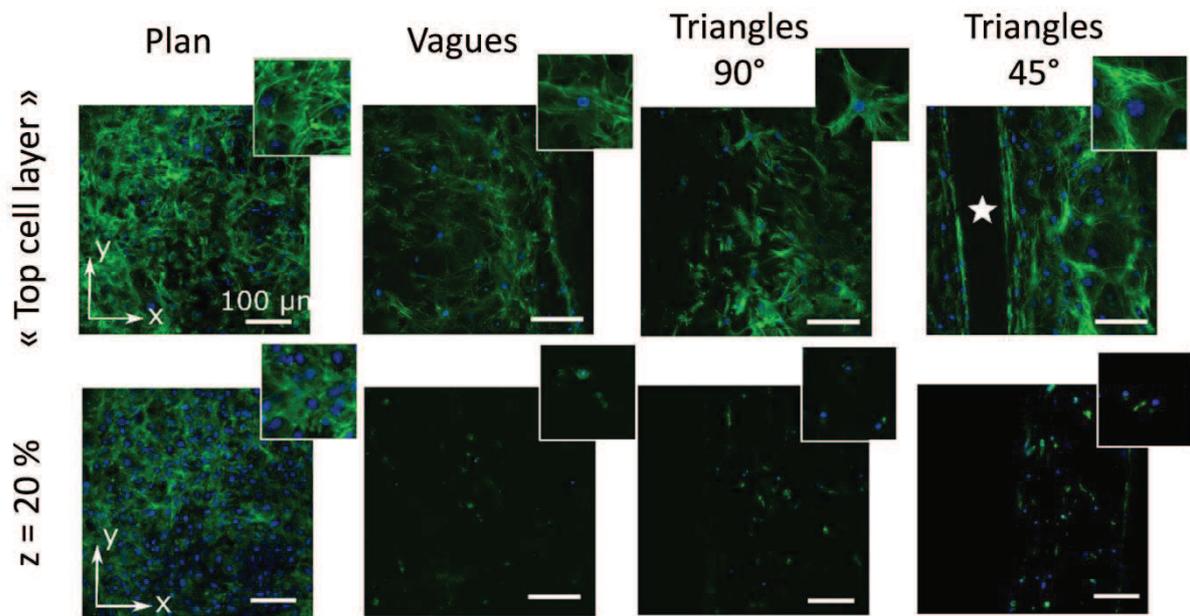


Figure IV-16. Fibre d'actine de stress (phalloïdine, en vert) et noyau des cellules (DAPI, en bleu) après 15 jours de culture sur les biocéramiques en HA planes et 2D½. Les images ont été acquises en microscopie à fluorescence à la surface de la matrice (« Top Cell Layer »), et à l'intérieur de la matrice à une profondeur $z = 20\%$ (0 % correspondant au fond du sillon et 100 % à son extrémité supérieure). Une profondeur de 20 µm par rapport à la surface de la pastille a été choisie pour les échantillons plans témoins. La présence de céramique sur les images est indiquée par une étoile.

IV.1.4. Conclusion

Les études en milieu statique (biocéramiques 2D½) et en milieu perfusé (biocéramiques 3D) ont permis l'obtention d'informations complémentaires. L'influence de l'architecture du substrat et du débit de perfusion sur le développement d'un nouveau tissu osseux a pu être approchée. Cependant, les nombreuses contraintes de mise au point inhérentes aux systèmes 3D, telles que le contrôle absolu et homogène des paramètres de culture (e.g., débit de perfusion) ou encore d'analyse des phénomènes biologiques en temps réels, limitent encore leur utilisation/potentiel. A ce titre, la thèse de Mikhael HADIDA débutée en octobre 2015 au sein du CIS vise au développement d'un bioréacteur perfusé spécifique au développement d'un modèle de tissu osseux. L'adaptation des protocoles d'observation et d'analyse pour des structures 3D sont également en cours. Un gros travail de modélisation est aussi intégré dans la thèse de Mikhael qui devrait à terme permettre la mise en place de modèles mathématiques prédictifs du développement tissulaire.

Outre des résultats forts intéressants bien qu'encore incomplets, ces travaux amorcent surtout une nouvelle dynamique de recherche et de plus large collaboration aussi enthousiasmante intellectuellement et humainement, que complexe à mettre en place et à pérenniser.

IV.2. Évaluation *in vivo* de l'influence de l'architecture du matériau sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse

IV.2.1. Préambule

A la suite d'un trauma ou d'un acte chirurgical, si le défaut osseux mesure plus de quelques millimètres l'os ne peut pas se réparer seul. Dans ce cas la restauration de la continuité osseuse est aidée par l'implantation d'un « substitut osseux ». Ces matériaux de comblement peuvent être d'origine humaine (autogreffe, allogreffe), animale (e.g., xéno greffe, corail) ou synthétique (e.g., biocéramique). Ces solutions chirurgicales trouvent toutefois leurs limites dans le cas des défauts de grande taille ($V > 1 \text{ cm}^3$). Quelle que soit la solution envisagée pour aider à la régénération de ces grandes pertes de substance, telle que l'utilisation de facteurs ostéoinducteurs (e.g., rhBMP2) ou de produits d'ingénierie tissulaire, un besoin est clairement identifié celui d'implants personnalisés répondant parfaitement aux exigences de biodégradation et architecturales du site opératoire. Concernant ce dernier point, un contact optimal entre les berges osseuses et l'implant est ainsi essentiel pour assurer une parfaite conduction et apposition osseuse. La propagation des vaisseaux sanguins au cœur du défaut, éléments clés de l'ostéogénèse et plus globalement de la régénération osseuse, est également tributaire de l'architecture de l'implant. Il est admis qu'une des causes d'échec des procédures standards de comblement est à créditer à une carence de vascularisation du défaut [46-50, 130, 131], qui limiterait l'apport essentiel en nutriments au sein de l'implant. L'architecture externe et interne inadaptée de ces défauts n'y est pas étrangère. Une meilleure compréhension de l'influence de l'architecture des implants sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse pourrait permettre de proposer à terme une amélioration des dispositifs médicaux existants.

Bien qu'une multitude d'études traite de l'effet de l'architecture de l'implant sur le développement des tissus osseux [103, 251, 252] et vasculaires [251, 253-255], peu de différences significatives ont été montrées entre des porosités de $100 \mu\text{m}$ à $1200 \mu\text{m}$ [36, 244]. Outre les protocoles d'évaluation biologique variant d'une étude à une autre (e.g. modèle animal), ce flou scientifique résulte de la non standardisation des implants utilisés (i.e. composition et architecture) [36, 244, 245]. Notons que cette volonté de maîtriser les caractéristiques des biocéramiques pour des évaluations biologiques plus rigoureuses tend à se développer au sein de la communauté scientifique grâce à la démocratisation des procédés de fabrication additive, tel que le robocasting [256, 257]. Cependant très peu d'études présentent réellement des implants en CaP d'architecture précise et contrôlée ; les récents travaux des équipes des P^{fs} Champion (Science des Procédés Céramiques et Traitements de Surface, France) [258, 259] et Fratzl (Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Allemagne) [44, 45, 242, 243] sont à ce titre remarquables.

Dans ce contexte, une collaboration étroite avec le B2OA s'est mise en place, en septembre 2013 dans le cadre du projet ANR TecSan OrthoFlase, afin d'évaluer rigoureusement *in vivo* l'influence de l'architecture interne d'implants en CaP sur l'angiogenèse et l'ostéogenèse. Ce projet n'a eu de cesse d'évoluer et de se complexifier depuis les premiers essais biologiques, mobilisant de nombreuses personnes et ressources différentes. Les sections suivantes ne détailleront que l'étude préliminaire de

ce projet ; les procédures chirurgicales et les évaluations biologiques en cours devant rester confidentielles pour l'heure. Ainsi, les suites données à cette première étude seront abordées uniquement sous forme de perspectives même si elles sont déjà mises en œuvre.

L'étude préliminaire a eu pour but d'évaluer l'influence de la porosité d'implants céramiques sur la pénétration cellulaire et vasculaire, ainsi que sur l'ostéogenèse, à l'aide d'un modèle *in vivo* plutôt bon marché et surtout pertinent pour la problématique des grands défauts osseux, à savoir une greffe en site ectopique (sous-cutané) chez le petit animal (souris nude) [110]. En effet, tout comme un défaut osseux de taille critique, ce site ectopique ne comporte ni facteurs ostéogéniques, ni cellules de lignée osseuse. La conception et la production des biocéramiques a été effectuée au CIS, et les essais biologiques *in vivo* ont été réalisés au B2OA dans le cadre du Master 2 de sciences chirurgicales d'Amaury Grandjean (9^e année de médecine en 2013, aujourd'hui chef de clinique à l'hôpital Lariboisière).

IV.2.2. Matériel et Méthodes

IV.2.2.1. Conception et production des implants

La conception des biocéramiques est le fruit de nombreux échanges et discussions avec l'équipe du B2OA, et répond aux problématiques et contraintes biologiques suivantes :

1. l'architecture interne des biocéramiques doit être pensée de telle sorte à minimiser le nombre d'animaux sacrifiés (règle de 3 R : réduire, raffiner, remplacer)
2. les implants placés sous la peau du dos (site ectopique) des souris ne doivent en aucun cas blesser ou endommager les tissus de l'animal, afin d'éviter toute réaction biologique parasite (e.g. inflammation anormale).
3. du fait du modèle animal (petit animal, souris Nude) et du site d'implantation (sous cutané) choisi, l'épaisseur de l'implant ne doit pas dépasser les 3 mm
4. les propriétés mécaniques des biocéramiques doivent être suffisantes pour assurer leur intégrité lors des essais *in vivo* (i.e. manipulation, implantation et explantation)
5. l'architecture des implants ne doit pas ou peu évoluer sur toute la durée de l'implantation afin de borner un comportement cellulaire à une taille de pore et une seule.
6. de façon équivalente au point précédent l'architecture des implants doit permettre de comparer/évaluer/discriminer des paramètres simples tels que l'influence du diamètre d'un pore sur la profondeur de pénétration d'un vaisseau sanguin ou sur la quantité de matrice minéralisée. L'architecture poreuse doit donc être simple et assimilable à une seule grandeur géométrique.
7. les diamètres des pores étudiés doivent être pertinents vis-à-vis de la question scientifique.

Sur la base de ce cahier des charges, la Figure IV-17 présente les modèles des céramiques conçus par ordinateur ainsi que les différentes vues du design des moules qui en découlent. L'architecture globale des biocéramiques est très peu angulaire afin de ne pas blesser l'animal. Elle est également peu épaisse et avec deux surfaces plates pour éviter aux implants de rouler sous la peau de l'animal. La porosité des céramiques se limite à des canaux cylindriques rectilignes (tortuosité = 1) de diamètre égale à 150, 220, 380 ou 840 μm les traversant sur toute leur longueur. Cette architecture interne simple, voire simpliste, a été imaginée pour faciliter la corrélation entre observations biologiques et paramètres géométriques de l'implant. Il apparaît évident que la relation entre les données géométriques de la porosité (e.g.,

tortuosité, perméabilité, diamètre des ouvertures) et les grandeurs caractérisant la vascularisation (e.g., densité, longueur, diamètre) est bien plus simple à évaluer pour un canal unidirectionnel que pour une structure constituée de pores interconnectés.

Les canaux d'un même diamètre ont été répartis sur différentes zones de la biocéramique afin de limiter, autant que faire se peut, d'éventuelles erreurs expérimentales. Enfin, trois longueurs ($L = 2, 4$ ou 8 mm) de céramiques ont été envisagées d'après l'expérience et le savoir de l'équipe du B2OA.

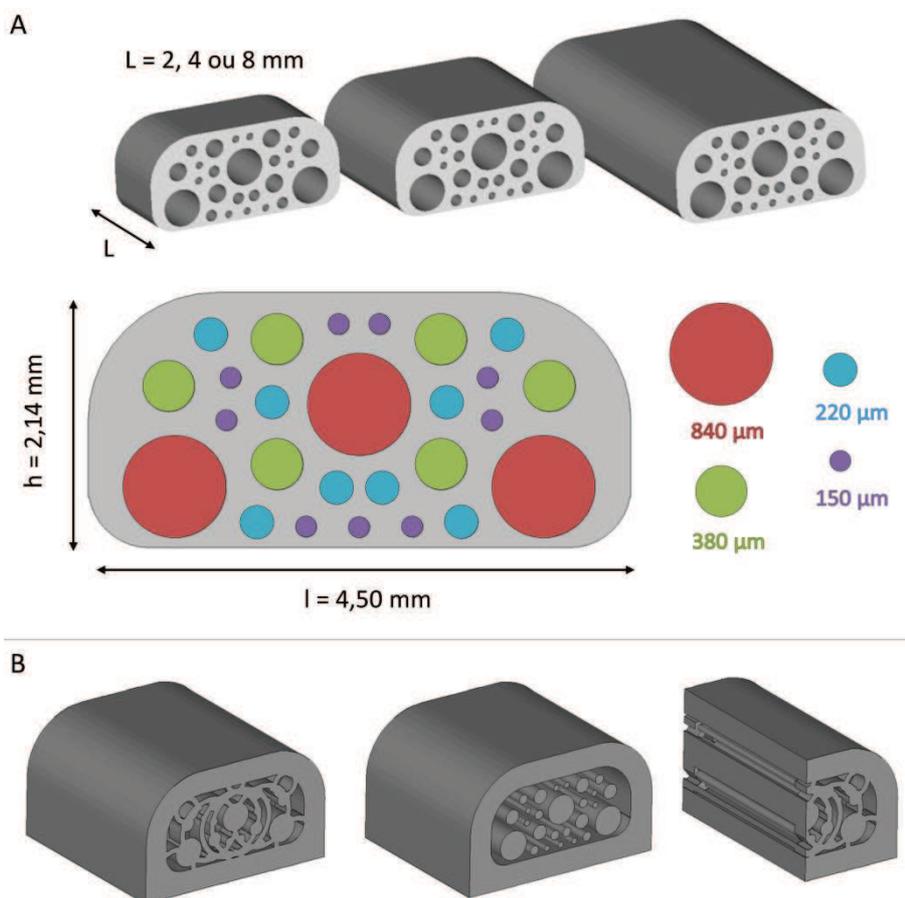


Figure IV-17. Représentation CAO A. des biocéramiques et B. des moules ayant servi à leur fabrication en vue isométrique et en coupe. Les armatures circulaires, qui servent à soutenir les colonnes des moules (futurs canaux des biocéramiques), sont éliminées au cours du procédé de fabrication.

Les biocéramiques ont été produites en HA (peu biodégradable) selon les protocoles décrits Chapitre II. Succinctement, les moules ont été fabriqués par impression 3D avec une épaisseur de couche de $25 \mu\text{m}$, leurs colonnes (i.e., les futurs canaux de la céramique) orientées selon l'axe z de la machine (Figure IV-3A, page 137). De façon équivalente à ce qui a été présenté au chapitre IV.1.2.1.1. (page 136), ces paramètres de fabrication des moules ont été fixés par les contraintes liées à l'ensemencement des biocéramiques. En effet, une partie des évaluations a été réalisée avec des matériaux ensemencés avec des cellules souches mésenchymateuse humaine (hMSC) comme décrit dans le chapitre suivant IV.2.2.2. Une barbotine, préparée avec une poudre d'HA à $8,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ et 65 % en masse de matière sèche (cf. Figure 6 de l'article 2, Chapitre II), a servi à l'imprégnation des moules. Après séchage et déliantage, les crus ont été frittés à $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 2 h sous air.

IV.2.2.2. Protocoles des évaluations biologiques in vivo

L'étude menée et les expérimentations effectuées ont été approuvées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale Lariboisière-Villemin.

Le modèle murin choisi est une souche Nude (RMRInu, fournisseur CER Janvier, France). Il s'agit de souris athymiques, dépourvues de lymphocytes T, ce qui en fait des hôtes sans immunité à médiation cellulaire. Au total, 18 souris Nude âgées de 6 semaines (poids moyen 25g) ont été opérées. Au préalable, les implants ont été stérilisés par traitement thermique sous air sec à 180 °C pendant 30 min (Poupinel, Binder, Allemagne).

Trois types d'expérimentation ont été réalisés avec des biocéramiques implantées (1) sans aucun ajout (implants « bruts »), (2) préalablementensemencées avec des hMSC, ou (3) préalablement imprégnées d'une solution de protéines ostéo-inductrices (rh BMP2 pour « Recombinant human bone morphogenetic protein-2 »). Ces deux dernières expérimentations ont eu plusieurs buts et principalement de « contrôles positifs », i.e., de conditions ostéogénique et angiogénique.

Les hMSC sont originaires d'un pool de cellules d'adultes différents (volontaires sains). Elles ont été prélevées par récupération du produit d'alésage du fût diaphysaire fémoral, lors de la mise en place d'une prothèse totale de hanche dans le service de Chirurgie Orthopédique de l'Hôpital Lariboisière à Paris. Leur culture a été effectuée dans un incubateur à 37 °C en présence d' α MEM (Minimum Essential Media alpha, Sigmaaldrich) supplémenté de 10 % de sérum de veau foetal SVF (PAA, Pasching, Austria) et dans des conditions stériles (Steri-Cult CO2 Incubator, Thermo scientific) à 21 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 74 % de N₂. Une fois à confluence, les hMSC ont été trypsinées, comptées sur une lame de Malassez puis centrifugées 5 min à 1200 tr.min⁻¹ afin d'être suspendues dans du milieu α -MEM avec 10 % SVF à une concentration de 10⁶ cellules.mL⁻¹. Finalement, les implants ont étéensemencés par mise en contact avec de telles suspensions dans un tube Eppendorf placés pendant 14 h dans une étuve à 37 °C sous 5 % de CO₂.

L'imprégnation des implants par la solution de rh-BMP2 à 100 ngml⁻¹ a également été réalisée pendant 14 h dans une étuve à 37 °C sous 5 % de CO₂. Les implants « bruts » ont quant à eux été maintenus dans les mêmes conditions dans du PBS (Phosphate Buffer Saline).

Les implantations ont été réalisées après anesthésie par injection de Kétamine (80 mg.kg⁻¹ ; Ketalar®, Panpharma, Virbach, France) et Xylazine (7 mg.kg⁻¹ ; Rompun® 2 %, Bayer, France) par voie intra péritonéale.

La Figure IV-18 récapitule les différentes implantations réalisées et les durées d'implantation.

Une fois la durée d'implantation atteinte, les souris ont été euthanasiées et les implants explantés, fixés puis analysés par histologie ou tomographie X. La mise en évidence de la néovascularisation des implants a été réalisée après anesthésie, à 37°C, par l'injection intracardiaque d'une solution à 50/50 en volume de gélatine et d'encre de chine (protocole B2OA), d'une solution à 50/50 en volume d'une solution de sulfate de baryum et de PBS. Ce dernier protocole a été réalisé selon les préconisations de Mme Marie-Hélène LAFAGE (LBTO, Saint-Etienne) [261].

Le sulfate de baryum a servi d'agent de contraste pour des analyses en tomographie X sur la ligne de faisceau ID19 de l'Installation Européenne de Rayonnement Synchrotron (ESRF, Grenoble) dans le cadre du projet ERISTO. Un des avantages majeurs des faisceaux de rayons X générés à l'ESRF réside dans leur

très haute cohérence, qui rend possible les acquisitions microtomographiques en contraste de phase^{†††} [260]. La combinaison d'enregistrements microtomographiques en contraste de phase pour différentes distances échantillon/détecteur mène à l'obtention très précise et quantitative du matériau analysé à l'échelle du micron. Cette technique appelée holotomographie, qui couple cartographies quantitatives des phases et image géométrique de l'échantillon [262], a servi à analyser les biocéramiques après explantation et fixation. Après reconstruction des volumes, le traitement des données (e.g. segmentation) a été effectué via le logiciel VGStudio Max (Volume Graphics, États-Unis) afin de pouvoir observer la vascularisation et la minéralisation à l'intérieur des biocéramiques.

Comme dans le cas des études *in vitro*, la présentation de ces protocoles est très largement simplifiée et nous nous en excusons. Les protocoles complets (e.g., fixation, inclusion, marquage) sont détaillés dans le rapport de Master d'Amaury Grandjean [263].

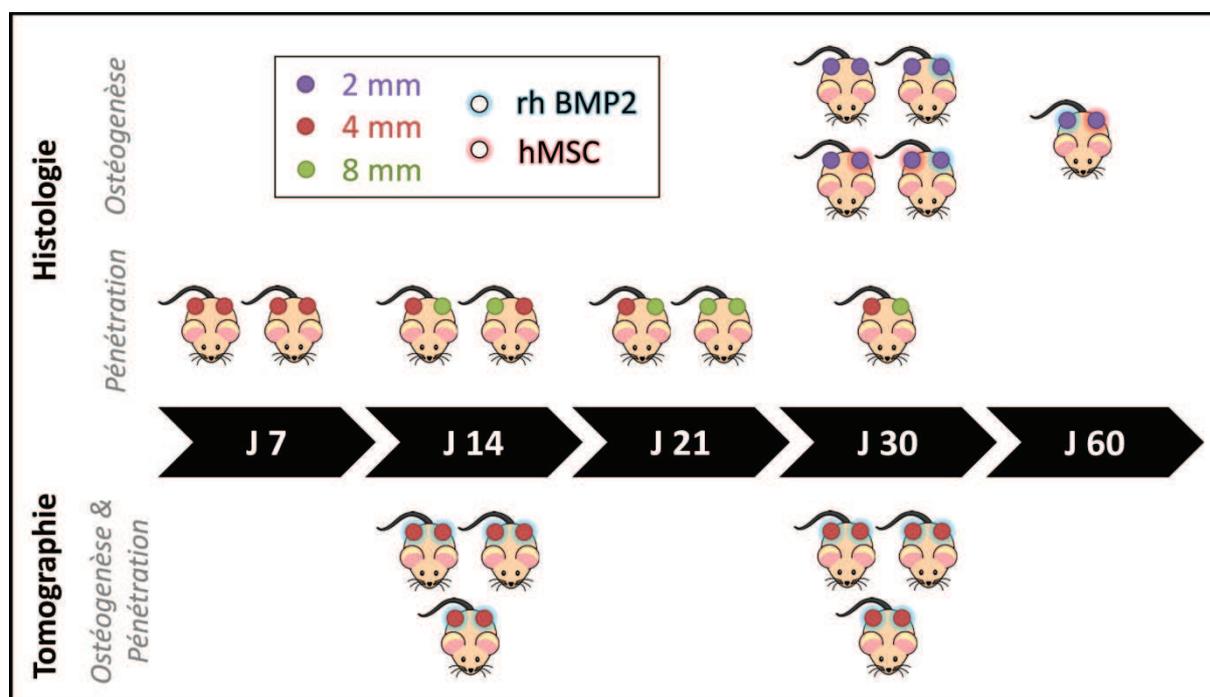


Figure IV-18. Récapitulatif des essais biologiques réalisés au B2OA au cours de cette étude préliminaire. La frise chronologique indique la durée d'implantation des biocéramiques en sous-cutané dorsal avant sacrifice des souris nude. Les méthodes utilisées pour l'observation de l'ostéogénèse et/ou de la pénétration cellulaire et vasculaire sont indiquées à gauche de ce schéma. A noter que l'étude par histologie a été menée dans les locaux du B2OA et l'analyse par tomographie X à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility). Les biocéramiques implantées sont symbolisées par des cercles violets, rouges et verts codant pour leur longueur (respectivement 2, 4 et 8 mm). Les auras bleues et rouges correspondent respectivement à un dépôt de facteur de croissance (rh-BMP2, recombinaut human Bone Morphogenic Protein 2) sur les biocéramiques ou à leur ensemencement avec des cellules mésenchymateuses humaines (hMSC) avant implantation.

^{†††} L'imagerie en contraste de phase est basée sur la légère déviation des faisceaux de rayon X cohérents lorsqu'ils traversent des matières de densité différentes, d'où la nécessité d'un faisceau le plus cohérent possible. C'est une technique très sensible et idéale pour l'analyse des matériaux composites.

IV.2.3. Résultats et discussion

IV.2.3.1. Fabrication des implants

Les biocéramiques fabriquées sont présentées Figure IV-19. Leur longueur (L), épaisseur (H) et largeur (l) ont été déterminées sur N=5 échantillons. Les résultats sont présentés sur la Figure IV-19, les dimensions sont conformes aux attentes et relativement constantes ($\leq 1\%$ de variation).

Le diamètre des pores a été évalué sur 6 échantillons (N = 2 pour chaque longueur). Ces diamètres sont parfaitement équivalents quelle que soit la longueur de la céramique. Les écarts-types donnés sur la Figure IV-19 intègrent l'ensemble des mesures et prouvent une nouvelle fois la robustesse de notre procédé, même avec un moule de faible résolution (25 μm). Nous avons noté toutefois, comme discuté dans l'article 2 du chapitre II (Figure 4, A1 et Figure 5 « Circles »), une légère déformation des pores de plus petit diamètre.

La topographie de surface des implants, présentée Figure IV-20, est composée de « marches triangulaires » d'environ 20 μm de haut et de large (similaires à celles illustrées Figure IV-10) orientées perpendiculairement au sens des canaux. Comme décrit précédemment cette microtopographie maîtrisée nous semble essentielle dans cette étude *in vivo* pour optimiser l'ensemencement des biocéramiques, et faciliter la conduction et l'apposition osseuse.

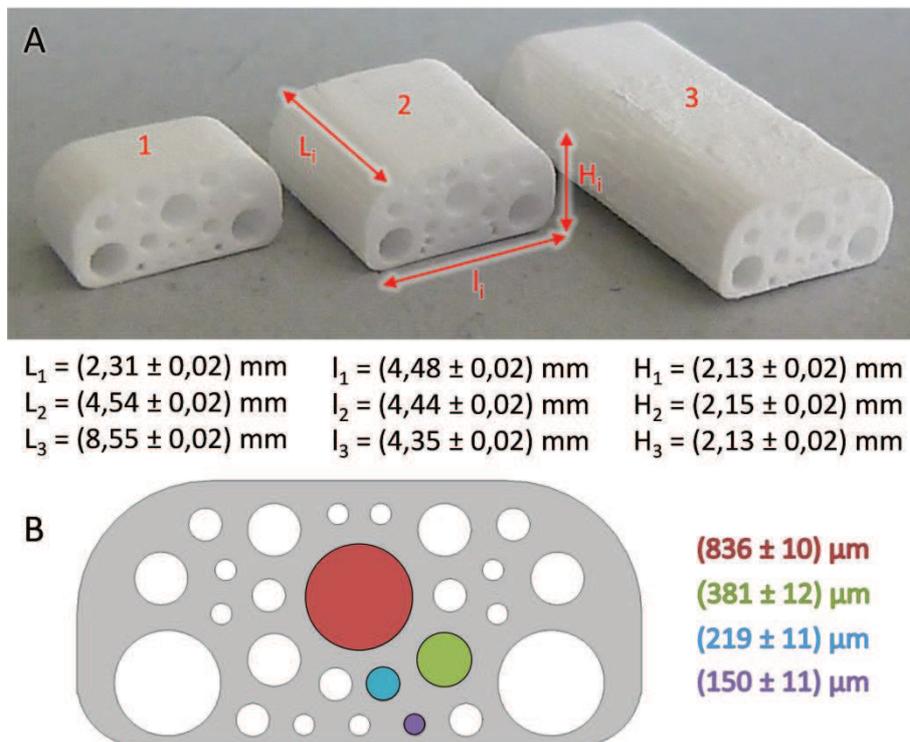


Figure IV-19. Photographie des trois types de biocéramiques fabriquées. Les cotes des biocéramiques ont été déterminées au pied à coulisse (N = 5). Le diamètre des canaux a été mesuré sur des images des céramiques acquises à la binoculaire (N = 6 céramiques) ; aucune différence significative n'a été observée entre les différentes céramiques.

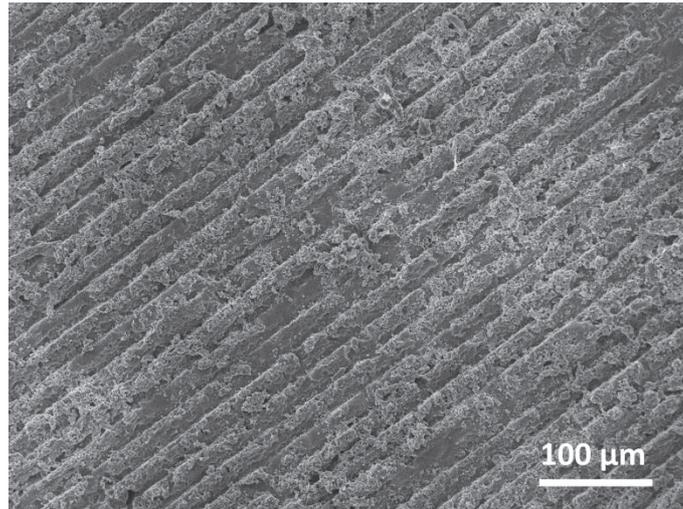


Figure IV-20. Topographie observée sur la surface extérieure des biocéramiques fabriquées. Cette dernière est représentative de l'état de surface à l'intérieur des canaux de la biocéramique. Pour information, les « marches » sont orientées perpendiculairement à la direction des canaux.

IV.2.3.2 Essais biologiques in vivo

Des études préliminaires de vérification de l'homogénéité de l'ensemencement et d'adsorption de la suspension de rh-BMP2 dans les implants ont été réalisées.

La rh-BMP2 étant coûteuse, une molécule modèle de masse molaire équivalente, la picrofuchsine, a été utilisée pour évaluer l'imprégnation des implants (Figure IV-21). La couleur homogène rouge observée sur tout l'implant confirme que le protocole mis en place permet l'adsorption de la solution de picrofuchsine de façon uniforme sur toutes les surfaces (interne et externe) de l'implant. Par analogie, nous pouvons penser que les molécules de rh-BMP2 s'adsorbent de façon homogène à la surface de l'implant.

Les tests d'ensemencement des hMSC dans les canaux, dont un exemple est présenté Figure IV-22, montrent également que le protocole mis en place et l'architecture des implants permettent une répartition homogène des cellules le long des canaux qu'ils soient de 8 mm ou 2 mm de longueur. De plus, le fait que la totalité des hMSC restent vivantes après ensemencement indique la parfaite cytocompatibilité des implants vis-à-vis des hMSC.



Figure IV-21. Imprégnation d'un implant de 4 mm par une solution contenant une molécule modèle (picrofuchsine, couleur rouge) de masse molaire comparable à celle de la rh-BMP2.



Figure IV-22. Ensemencement d'un implant de 4 mm par une suspension d'hMSC selon le protocole décrit section IV.2.2.2. Les points noirs représentent des hMSC vivantes marquées par un sel de tetrazolium MMT.

Après 7 jours d'implantation, les cellules de l'hôte ont déjà envahi la totalité des implants de 4 mm de long, et donc a fortiori ceux de 2 mm de long, quel que soit le diamètre des canaux circulaires. En revanche, même après 30 jours de culture, la zone centrale des implants de 8 mm de long n'est pas colonisée. Ceci ne va pas sans rappeler les phénomènes observés pour les grands défauts osseux où les zones trop éloignées de la surface de l'implant sont dépourvues de cellules. Ce résultat montre/confirme qu'au-delà de ≈ 3 mm de profondeur la migration cellulaire et tissulaire est très limitée voire impossible, et ce, quel que soit le diamètre des ouvertures compris entre 150 et 840 μm .

Après 30 jours d'implantation, de nombreux vaisseaux sanguins pénètrent les implants de 2 et 4 mm de long, ceci quelle que soit la taille de pores (Figure IV-23 A). A noter que l'envahissement des pores par les vaisseaux sanguins se fait tout d'abord sur les pores à proximité de la peau de l'animal^{§§§}. Après 60

^{§§§} Nous reviendrons par la suite sur cette vascularisation « préférentielle » en fonction de la proximité entre pore et peau de l'animal. Pour éviter ce biais, l'architecture de ces céramiques a été modifiée lors d'une étude suivante (section IV.2.4.1)

jours d'implantation (Figure IV-23 B), tous les pores sans exception semblent colonisés par le réseau vasculaire.

Ces observations sont confirmées et précisées par les analyses en tomographie X réalisées à l'ESRF. La Figure IV-24 présente un exemple d'images 3D de biocéramiques après 30 jours d'implantation sous-cutanée. Ces résultats nous confirment tout d'abord que les vaisseaux sanguins pénètrent bien dans les canaux et que certains de ces vaisseaux de diamètre supérieur à 50 μm traversent l'intégralité des biocéramiques de 2 mm pour s'enfoncer de plus de 3 mm dans celles de 4 mm. D'autre part, ces vaisseaux pénètrent et s'enfoncent dans l'implant généralement par le centre des canaux (comme illustré sur la Figure IV-24 A). Au cours de leur progression dans les canaux, ils se ramifient en vaisseaux de plus petite taille (capillaires) qui semblent se diriger vers/chercher les parois des canaux. La formation de matrice minéralisée (visible en jaune sur les images Figure IV-24) est observable en entrée et sortie des canaux (sur environ 400 μm , voir Figure IV-24 B) mais également à l'intérieur de ces derniers dans des zones où de petits vaisseaux sanguins (capillaires) sont présents (Figure IV-24 C). Ce travail long et fastidieux de reconstruction, segmentation, etc. des images n'est à ce jour pas finalisé, nous ne pouvons malheureusement pas présenter d'image complète de bonne qualité et encore moins de données quantitatives.

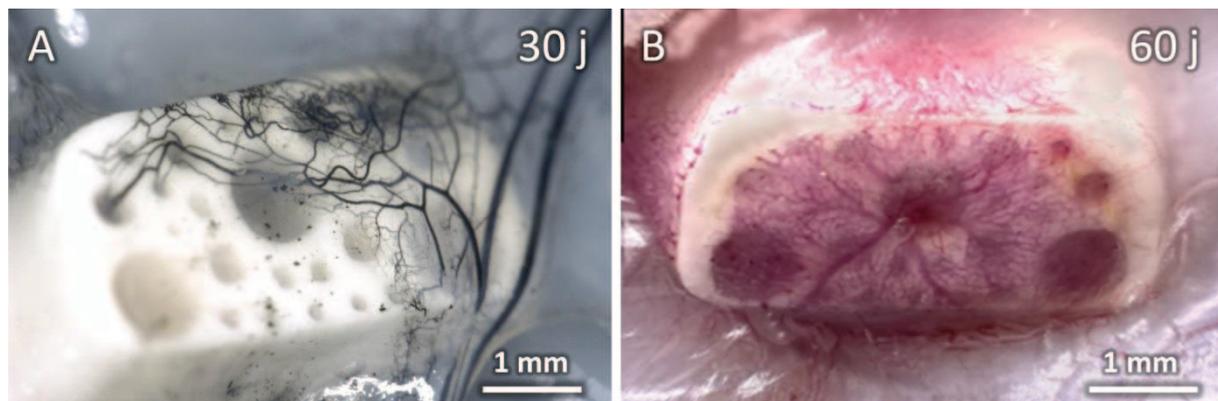


Figure IV-23. Photographie de biocéramiques après implantation en sous-cutanée (souris nude) pendant A. 30 jours et B. 60 jours. Une injection d'un mélange gélatine/encres de chine dans le système vasculaire de la souris après sacrifice permet une meilleure visualisation des vaisseaux sanguins (image A.)

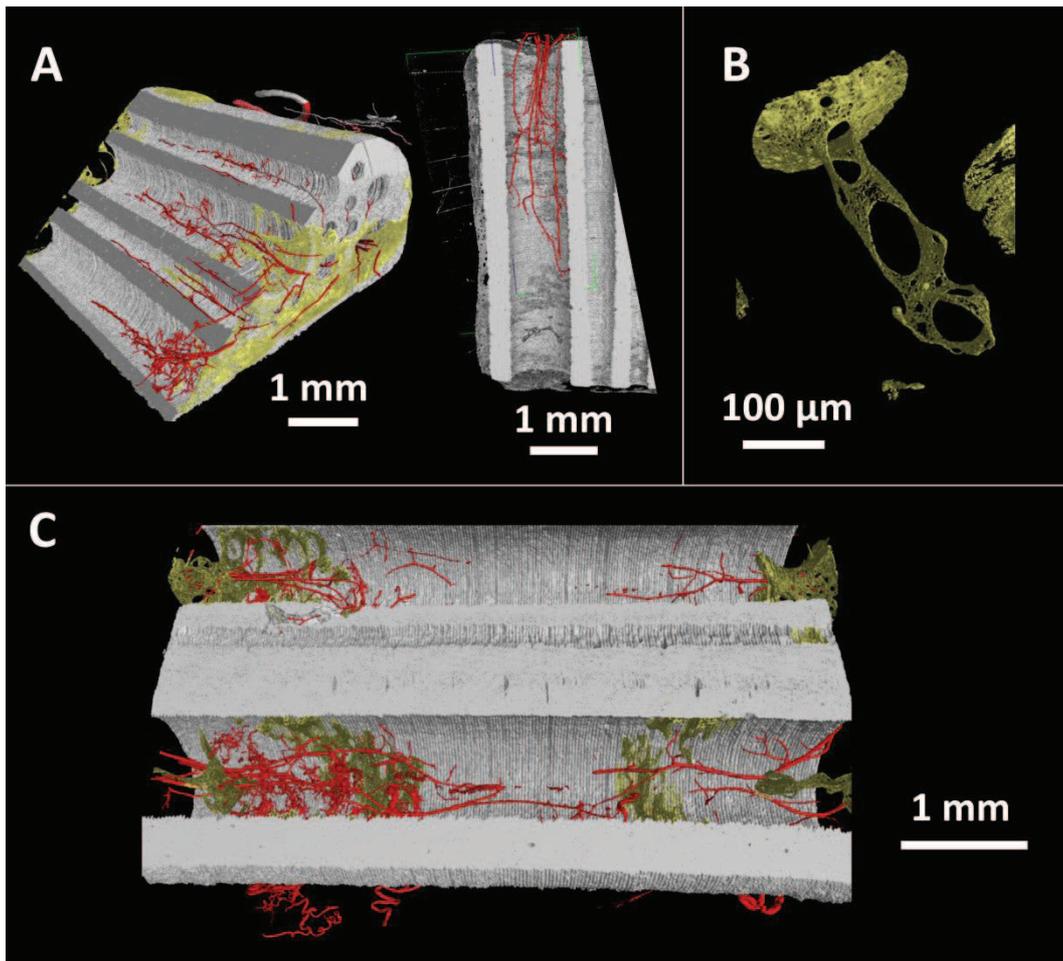


Figure IV-24. Images 3D (tomographie X, ESRF) de la vascularisation (en rouge) et minéralisation (en jaune) à l'intérieur des biocéramiques après 30 jours d'implantation sous-cutanée chez la souris Nude. Travail en cours (un grand merci à Mikhaël Hadida, doctorant au CIS, pour son aide précieuse).

En parallèle de ces données tomographiques un certain nombre de données histologiques ont été analysées et sont présentées Figures IV-25 (angiogenèse) et IV-26 (ostéogenèse). Ces données ont permis une amorce de quantification des phénomènes.

Pour faciliter l'analyse, les vaisseaux ont été distingués par leur diamètre. Trois tailles ont été arbitrairement choisies : $\varnothing < 25 \mu\text{m}$, $25 \leq \varnothing \leq 50 \mu\text{m}$ et $\varnothing > 50 \mu\text{m}$.

Comme l'indique la Figure IV-25, le nombre de vaisseaux sanguins augmente avec la taille des canaux/pores. Soulignons également que les vaisseaux de diamètre important ($\varnothing > 50 \mu\text{m}$) sont presque exclusivement présents dans les pores de $840 \mu\text{m}$ de diamètre, ceux de diamètre inférieur comportant en majorité des capillaires ($\varnothing < 25 \mu\text{m}$). A l'inverse, le rapport $\frac{\text{Aire occupée par les vaisseaux}}{\text{Aire de la section du canal}}$ tend à croître lorsque la section des canaux décroît. Par extrapolation, nous pouvons en déduire que les capillaires sanguins occupent un volume supérieur dans les canaux de petit diamètre par rapport à ceux de gros diamètre.

La formation de matrice minéralisée est également fonction du diamètre des canaux. La Figure IV-26 A indique que plus le diamètre du canal est large, plus la quantité de matrice minéralisée est grande. Toutefois, rapporté à la section du canal, la quantité de matrice minéralisée est plus importante dans les canaux de petit diamètre. Cette observation fait écho aux constatations précédentes (Figure IV-24),

à savoir que la présence de matrice minéralisée au sein des canaux est assujettie à la présence de capillaires. Ces résultats confirment donc le rôle essentiel des capillaires sanguins dans l'ostéogénèse [264, 265].

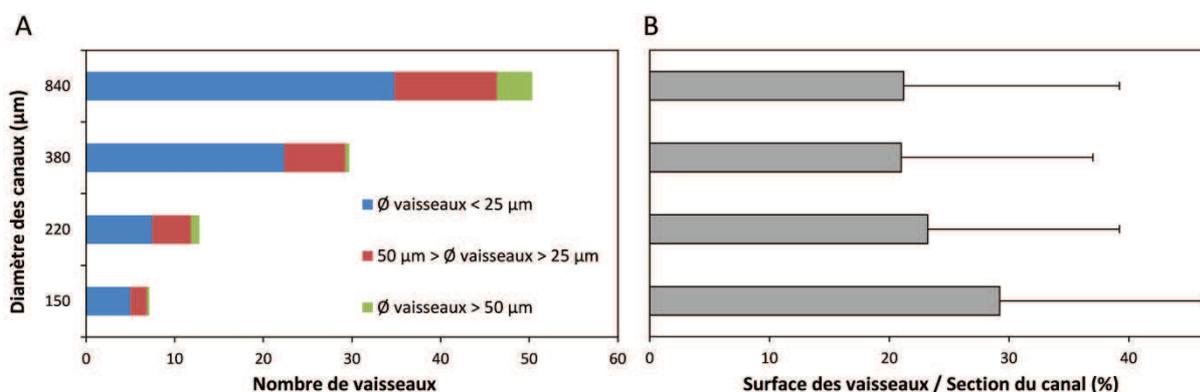


Figure IV-25. Évaluation par histologie de l'angiogénèse en fonction du diamètre des canaux (implant « brut » de 4 mm, J30) avec en A. le nombre cumulé de vaisseaux présents dans les canaux de différents diamètres et en B. le pourcentage d'occupation moyen des vaisseaux par canal.

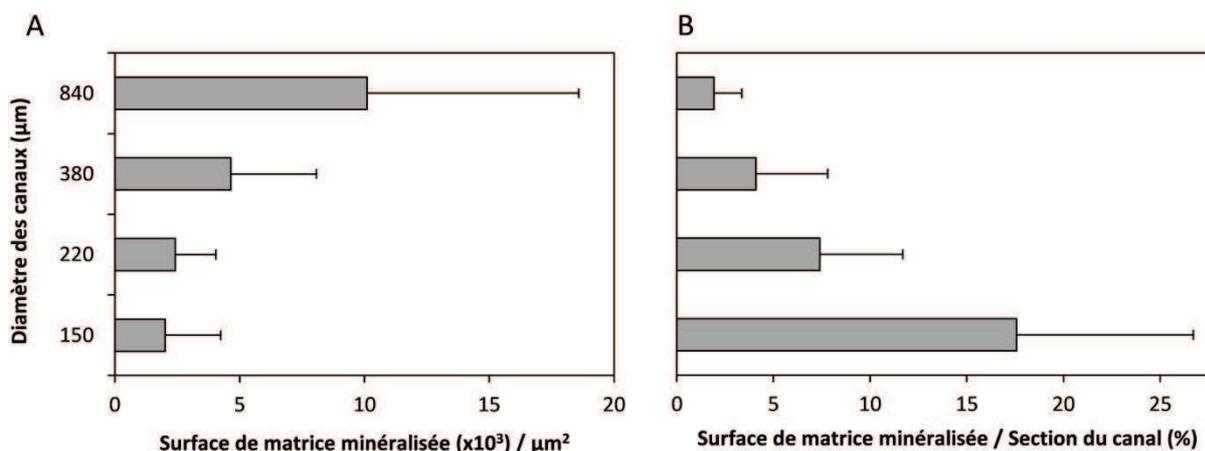


Figure IV-26. Évaluation par histologie de l'ostéogénèse en fonction du diamètre des canaux (implants de 2 mm avec rh-BMP2, J30), avec en A. la surface de matrice minéralisée moyenne présente chaque canal et en B. cette même valeur normalisée par rapport à la section du canal considéré.

Bien que d'architecture simple, les implants conçus ont permis d'établir des liens entre taille des porosités, angiogénèse et ostéogénèse. Il serait tentant d'extrapoler ces résultats à des structures plus complexes tridimensionnelles afin d'encourager via cette architecture le développement d'un réseau vasculaire menant à la formation d'un nouveau tissu osseux. Une image virtuelle d'une telle structure est proposée Figure IV-27. Elle se compose de l'association de deux porosités tri-périodiques de type gyroïde : une porosité primaire de taille relativement importante (e.g., 800 µm), qui aurait pour but de faciliter la pénétration des gros vaisseaux sanguins jusqu'au cœur de l'implant, et une porosité secondaire de petite taille (e.g., 120 µm) qui encouragerait la formation de capillaires et le dépôt d'une matrice minéralisée. Cette stratégie va être mise en œuvre dans un projet financé par l'ANR.

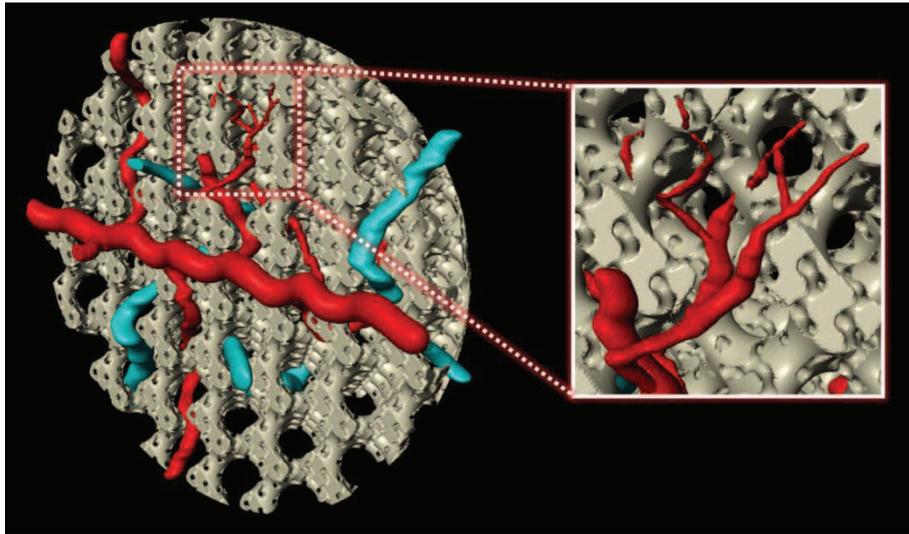


Figure IV-27. Stratégie pour promouvoir l'angiogenèse et l'ostéogenèse via l'association de deux porosités de type gyroïde.

IV.2.4. Études en cours et perspectives

Sur la base des résultats précédents, deux types d'études ont été envisagées : (i) une étude en site ectopique murin (sous cutané dorsal) dans la continuité de l'étude précédemment présentée, et (ii) une étude en site orthotopique (i.e., osseux) dans laquelle est évaluée l'influence de l'architecture et de la composition d'implants sur la réparation d'un défaut osseux de taille critique.

IV.2.4.1. Modification de l'architecture des implants pour les études en site ectopique

Bien qu'aucun biais expérimental ne soit avéré dans l'étude précédente, deux points fondamentaux ont attiré notre attention :

- l'épaisseur des implants ($\approx 2,1$ mm) induit une proximité préférentielle des pores situés sur la partie supérieure des implants avec la peau de la souris, qui semble être l'origine de la migration vasculaire. Une vascularisation préférentielle des pores en fonction de leur localisation sur l'implant pourrait alors avoir lieu.
- la concentration de rh-BMP2 est fonction de la surface d'adsorption disponible dans les canaux ; elle diffère donc dans nos précédentes céramiques d'un type de canal à un autre.

Afin de s'affranchir de ses éventuels artefacts, l'architecture des précédents implants a été repensée (Figure IV-28). Chaque implant ne comporte plus alors qu'un seul type de canal de 160, 340 ou 810 μm de diamètre. Leur nombre dans chaque implant a été déterminé de façon à avoir une surface interne de pores équivalente (surface ≈ 33 mm^2), soit respectivement 14, 7 et 3 canaux par implant. La longueur des implants a été fixée à 4,5 mm d'après l'étude précédente et leur hauteur réduite à 1,0 mm.

Comme illustré Figure IV-28, les dimensions globales et locales des implants sont conformes aux spécifications du cahier des charges. Les implants ont été imprégnés par une solution de rh-BMP2 avant implantation selon le protocole défini section IV.2.2.2. L'implantation de ces nouveaux modèles (6 céramiques/architecture) en site sous-cutané dorsal chez des souris Nude a été effectuée au B2OA

début 2015. Après explantation et fixation, les implants ont été stockés et vont être analysés dans les mois à venir.

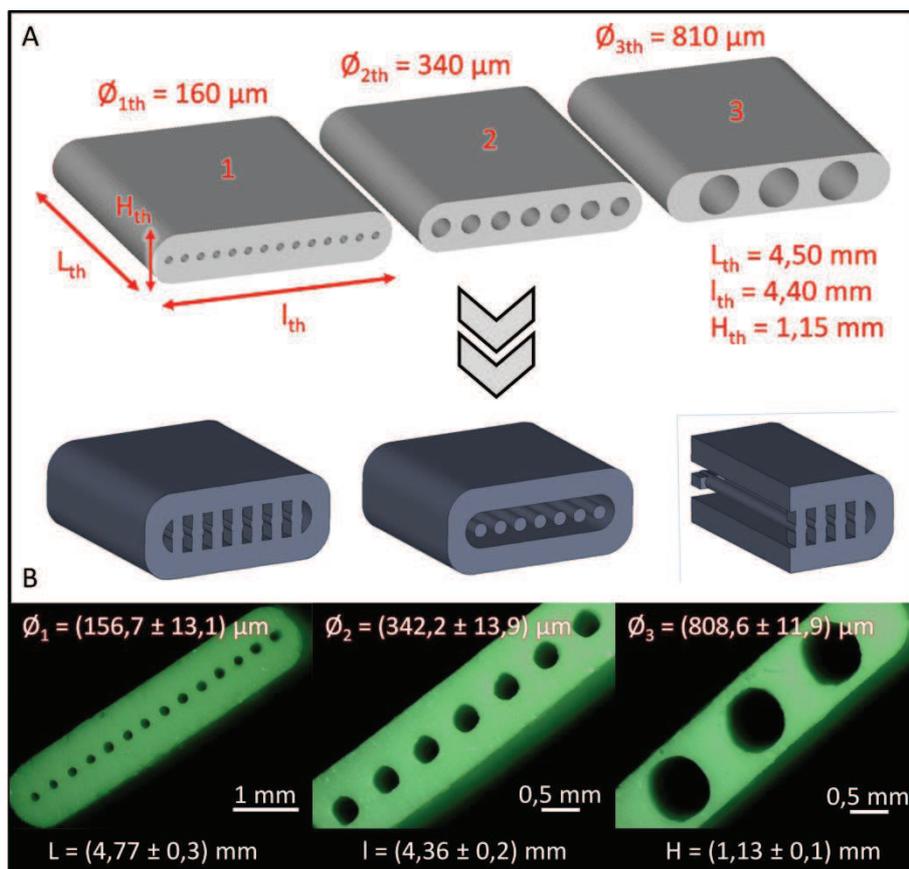


Figure IV-28. Nouvelle génération d'implants ectopiques : modification de l'architecture des anciennes céramiques (Figure IV-19) afin d'éviter les éventuels artefacts expérimentaux. A. représentation CAO et cotes des implants menant à la conception des moules. Les colonnes des moules sont supportées par un système d'armature éliminé lors de la fabrication des céramiques. B. images des trois types d'implants effectués à la binoculaire. Les spécifications de ces derniers sont détaillées (N=6 céramiques x 3 architectures).

IV.2.4.2. Influence de l'architecture et de la composition de l'implant sur un modèle animal en site orthotopique

Cette étude constitue un « scale-up » des études précédentes avec le passage d'un site ectopique (sous cutané) à un site orthotopique et d'un implant d'architecture « simple » à « complexe ». Elle vise à évaluer simultanément l'influence de l'architecture et de la composition d'un implant sur la régénération d'un défaut osseux fémoral de **grande taille critique** (i.e., qui ne se régénère pas spontanément).

Pour ce faire, un suivi hebdomadaire de la formation osseuse *in vivo* (i.e., sur animal vivant) à l'aide d'un microscanner haute résolution (SkyScan 1172, Bruker) a été prévu. Ce type d'étude impose alors le choix d'un modèle animal adapté, à savoir un modèle petit animal, pour pouvoir rentrer dans la chambre du scanner, mais dont la taille du fémur est suffisante pour pouvoir observer avec précision la régénération osseuse. Le rat Lewis représente un compromis adapté à ces contraintes.

L'équipe du B2OA a tout d'abord mis en place une étude ayant pour but de déterminer la taille critique d'un défaut de grande taille au niveau du fémur de ratte Lewis (Figure IV-29, identique à la Figure I-9

page 19). Ainsi, une résection fémorale de 2, 3, 4 ou 5 mm a été effectuée et stabilisée via une plaque d'ostéosynthèse. La régénération osseuse a par la suite été suivie par scanner jusqu'à 20 semaines.

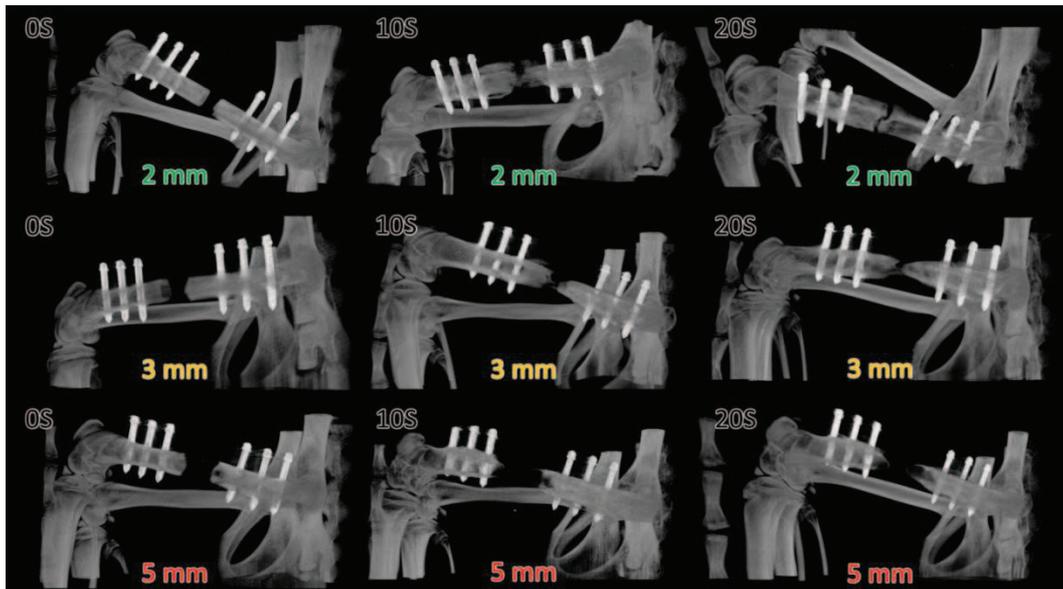


Figure IV-29. Détermination de la taille de défaut osseux fémoral critique chez le rat. La taille de la résection fémorale initiale, ainsi que le temps écoulé (en semaine) après la dite résection sont précisés sur les images. Aucun comblement n'a été réalisé après résection et le fémur a été stabilisé à l'aide d'une plaque d'ostéosynthèse en polyéthéréthercétone (PEEK) fixée en partie proximale et distale à l'aide de 3 vis en TAN (Ti-6%_(w/w)Al-7%_(w/w)Nb) de 0,7 mm de diamètre.

Le défaut osseux de 2 mm est presque régénéré après 20 semaines et la diminution de la taille des défauts de 4 mm (non représenté ici) est visible avec le temps, bien que plus lente à mesure que la taille du défaut croît. En revanche, aucune régénération osseuse n'est observable pour le défaut de 5 mm, ce qui en fait un défaut de taille critique pour le fémur du rat Lewis. Cette taille de défaut osseux a été choisie pour la suite de l'étude.

Une fois le modèle animal et la taille de défaut fémoral critique définis, la conception des implants a pu être amorcée avec comme point de départ les images scanner d'un fémur de rat Lewis. Ce dernier a tout d'abord été segmenté grâce au logiciel Simpleware (Synopsys, États-Unis) afin de reconstruire une image 3D du fémur. La cavité médullaire de l'os a ensuite été comblée et la zone de résection a été sélectionnée puis exportée en fichier .stl. Finalement, trois architectures internes différentes ont été appliquées à cette résection de 5 mm (Figure IV-30), à savoir une architecture composée de gyroides de petite taille (laissant passer une sphère de 300 µm de diamètre), une autre composée de gyroides de grande taille (laissant passer une sphère de 800 µm de diamètre) et enfin une architecture témoin de type corail (acropora, dérivée d'un scanner de matériau commercial). Les tailles de ces porosités ont été choisies selon les résultats de l'étude préliminaire. La conception assistée par ordinateur des moules a été menée en conséquence (Figure IV-30).

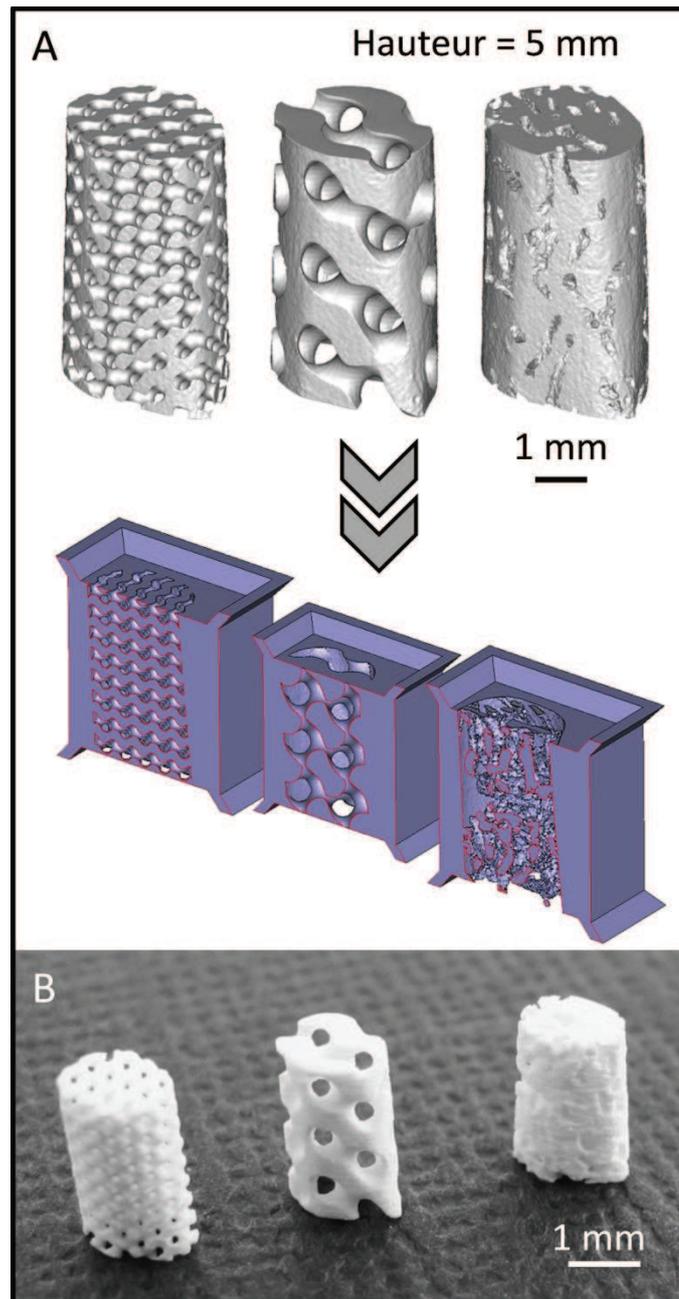


Figure IV-30. Représentation CAO A des biocéramiques conçues pour les essais biologiques en site osseux de taille critique (5 mm) et de leur moule respectif (vue en coupe) et B. Une photographie des biocéramiques après fabrication avec (de gauche à droite) une architecture « gyroïde » laissant passer une sphère de 300 μm de diamètre en son sein, une architecture « gyroïde » laissant passer une sphère de 800 μm de diamètre et enfin l'architecture « acropora » témoin.

Les biocéramiques ont été produites en hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et en hydroxyapatite carbonatée de type AB ($\text{Ca}_{9,27}(\text{V}_{\text{Ca}})_{0,73}(\text{PO}_4)_{5,27}(\text{CO}_3)_{0,73}(\text{OH})_{1,17}(\text{CO}_3)_{0,05}(\text{V}_{\text{OH}})_{0,83}$) via les protocoles décrits au Chapitre II afin de déterminer l'influence de l'insertion de carbonates dans la maille apatitique sur la régénération osseuse. Les protocoles pour les essais biologiques (e.g., ensemencement, résection) ont été mis en place au B2OA en fin d'année 2015 et début d'année 2016. Les premières implantations en site osseux sont attendues dans les prochaines semaines. La Figure IV-31 résume la philosophie de cette étude.

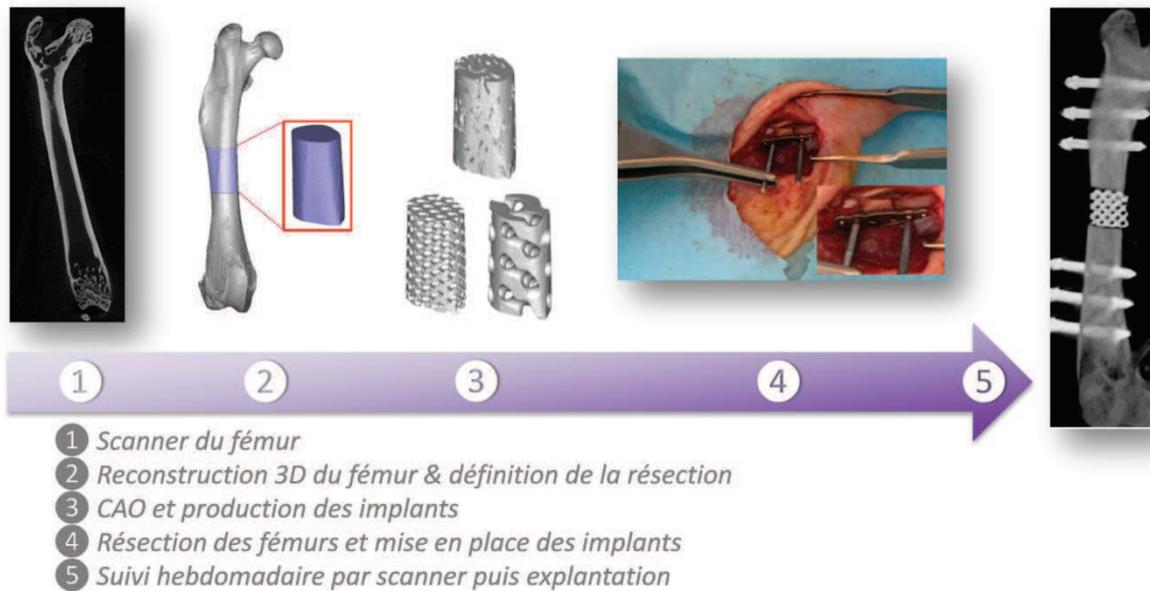


Figure IV-31. Évaluation de l'influence de l'architecture et de la composition d'implants personnalisés en CaP sur la régénération osseuse d'un défaut fémoral de taille critique chez le rat Lewis

IV.3. Conclusion

Au cours de ce chapitre, deux des six projets collaboratifs amorcés au cours de cette thèse ont été succinctement abordés. L'essence de ce travail repose sur la démarche scientifique mise en œuvre pour comprendre, formaliser et apporter des réponses à des problématiques en biologie de l'os. La réussite de tels projets, très coûteux (temps, moyens humains et matériels), est conditionnée par une bonne compréhension et coordination entre spécialistes de domaines différents.

Notre philosophie est que le spécialiste « matériau » doit placer l'application biologique au cœur des spécifications du matériau et par conséquent des procédés de fabrication (Chapitre II) ou de caractérisation (Chapitre III) à mettre en place. Il est également essentiel que chaque spécialiste développe ses compétences dans les spécialités des autres. Ce retour d'expérience est fondamental et permet une évolution concomitante des connaissances du groupe et ainsi des questions scientifiques.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse se sont intéressés à la modulation des propriétés biologiques de l'hydroxyapatite (HA) par le biais d'une voie « chimique », basée sur l'incorporation d'ions carbonate dans la structure apatitique, et d'une voie « procédé », reposant sur le potentiel de la fabrication additive.

Le procédé de fabrication repose sur l'association d'un procédé céramique traditionnel d'imprégnation d'un moule et d'impression en trois-dimensions de ce dernier. Le succès de la fabrication d'implants ou de substrats de culture est fonction (i) de la technologie de fabrication additive, qui doit permettre de parfaitement maîtriser l'architecture du moule, (ii) de la composition de ce dernier, qui doit être adaptée au procédé céramique (e.g., déliantage) et ne doit pas laisser de résidus toxiques après élimination, (iii) des méthodes numériques nécessaires à l'élaboration des moules et de leur stratégie de conception, et (iv) des propriétés des suspensions, rhéologiques notamment. Des biocéramiques d'architectures sur-mesure et standardisées en HA mais également en hydroxyapatites carbonatées (CHA) ont ainsi pu être produites avec une maîtrise et une précision encore peu égalée dans le domaine ($\approx 5 \mu\text{m}$). Le potentiel du procédé développé a pu être éprouvé pour de nombreuses problématiques (e.g., implants osseux, implants cardiaques, supports de culture pour bioréacteurs) à l'échelle du prototype mais également pour des productions plus importantes notamment dans le cadre de projet collaboratifs nationaux (ANR Orthoflase,) et européens (Projet ESA ERISTO). Ce procédé va être mis en œuvre dans le cadre de 2 nouveaux projets ANR (Céram-Os et Vitabone). Des évolutions quant à ses capacités de production sont à prévoir (e.g., vitesse, intuitivité, grandes pièces), pour le développements d'implants adaptés aux grands animaux (e.g., brebis) et, pourquoi pas, pour une transposition future à l'être Humain.

La synthèse de CHA pures et monophasique a été réalisée. La méthode de caractérisation par spectroscopie IR développée nous a permis de déterminer avec précision le taux d'ions carbonate en site A et B de ces CHA. Du fait de sa standardisation, cette méthode va constituer un outil (i) formidable d'étude de l'influence respective des carbonates sur la bioréactivité des CHA, et (ii) indispensable dans l'optique de mise sur le marché de dispositifs médicaux en CHA (e.g., norme ISO). En outre, cette étude a permis de prouver que les propriétés optiques (ou même physiques en extrapolant) des CHA dépendent du taux d'ions carbonates introduits en site B. Ceci ouvre d'importants champs d'exploration en recherche fondamentale sur le matériau en lui-même : structure cristallographique, mécanismes de substitution, frittage, etc. Une thèse en collaboration avec le laboratoire MATEIS (Lyon) a par ailleurs débuté sur cette thématique (Sophie Guillou).

Enfin la philosophie de recherche au sein du laboratoire est de placer la question biologique au cœur des spécifications du matériau et par conséquent des procédés de fabrication et de caractérisation de celui-ci. Notre vision de l'ingénierie tissulaire ne se résume pas à un cahier des charges Matériau/Cellules/Substances mais plus à une stratégie de travail et d'échange entre des équipes de spécialités différentes. Enfin, l'expérience accumulée pendant ces quelques années de thèse a montré, parfois à nos dépens, qu'il est essentiel de maîtriser l'intégralité des étapes, de la synthèse de la matière première à l'évaluation biologique, pour pouvoir espérer faire progresser les connaissances spécifiques et communes aux différents acteurs de tels projets collaboratifs.

Références

- [1] M.J. Glimcher. Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 64 (2006) 223-282.
- [2] N.K. Lee, H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J.D. Ahn, C. Confavreux, R. Dacquin, P.J. Mee, M.D. McKee, D.Y. Jung. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton, *Cell* 130 (2007) 456-469.
- [3] K. Fulzele, R.C. Riddle, D.J. DiGirolamo, X. Cao, C. Wan, D. Chen, M.-C. Faugere, S. Aja, M.A. Hussain, J.C. Brüning. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition, *Cell* 142 (2010) 309-319.
- [4] M.-C. de Vernejoul, P. Marie. *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, Flammarion médecine-sciences (2008).
- [5] G.H. Bourne. *The biochemistry and physiology of bone*, Elsevier (2014).
- [6] S. Bose, G. Fielding, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics, *Trends in Biotechnology* 31 (2013) 594-605.
- [7] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1882-1894.
- [8] R. Legros, N. Balmain, G. Bonel. Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone, *Journal of chemical research Synopses* 8-9.
- [9] B. Clarke. Normal bone anatomy and physiology, *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 3 (2008) S131-S139.
- [10] S.L. Teitelbaum. Bone resorption by osteoclasts, *Science* 289 (2000) 1504-1508.
- [11] J. Kular, J. Tickner, S.M. Chim, J. Xu. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level, *Clinical biochemistry* 45 (2012) 863-873.
- [12] J. Aubin, F. Liu, L. Malaval, A. Gupta. Osteoblast and chondroblast differentiation, *Bone* 17 (1995) S77-S83.
- [13] T. Thomas, A. Martin, M. Lafage-Proust. *Physiologie du tissu osseux*. EMC, (2008).
- [14] T.A. Franz - Odendaal, B.K. Hall, P.E. Witten. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes, *Developmental Dynamics* 235 (2006) 176-190.
- [15] L.F. Bonewald. The amazing osteocyte, *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (2011) 229-238.
- [16] R. Huiskes, R. Ruimerman, G.H. Van Lenthe, J.D. Janssen. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone, *Nature* 405 (2000) 704-706.
- [17] T. Bellido. Osteocyte-driven bone remodeling, *Calcified tissue international* 94 (2014) 25-34.
- [18] T.L. Andersen, M.E. Abdelgawad, H.B. Kristensen, E.M. Hauge, L. Rolighed, J. Bollerslev, P. Kjærsgaard-Andersen, J.-M. Delaisse. Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link?, *The American journal of pathology* 183 (2013) 235-246.
- [19] D.W. Dempster, L.G. Raisz. *Bone physiology: bone cells, modeling, and remodeling*. Nutrition and Bone Health Springer (2015). p. 37-56.

- [20] P. Christen, K. Ito, R. Ellouz, S. Boutroy, E. Sornay-Rendu, R.D. Chapurlat, B. van Rietbergen. Bone remodelling in humans is load-driven but not lazy, *Nature communications* 5 (2014).
- [21] J.J. Sela, I.A. Bab. *Principles of Bone Regeneration*, Springer Science & Business Media (2012).
- [22] R.L. Cruess, J. Dumont. *Healing of Bone, Tendon and Ligament*. In: *Fractures*, (1975).
- [23] X. Wang, Y. Wang, W. Gou, Q. Lu, J. Peng, S. Lu. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review, *International orthopaedics* 37 (2013) 2491-2498.
- [24] D.J. Wells. Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1245 (2011) 14-16.
- [25] R. Vries, M. Leenaars, J. Tra, R. Huijbregtse, E. Bongers, J.A. Jansen, B. Gordijn, M. Ritskes - Hoitinga. The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (2013).
- [26] T.R. Society. Statement of the Royal Society's position on the use of animals in research 2015 (2015).
- [27] A.L. Kurtzman, S. Govindarajan, K. Vahle, J.T. Jones, V. Heinrichs, P.A. Patten. Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins, *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2001) 361-370.
- [28] L. Li, M.J. Piatek, A. Atef, A. Piatek, A. Wibowo, X. Fang, J.S.M. Sabir, J.-K. Zhu, M.M. Mahfouz. Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification, *Plant molecular biology* 78 (2012) 407-416.
- [29] S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar, S. Kumar. Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death & Differentiation* 22 (2015) 526-539.
- [30] W. Bouleftour, L. Juignet, G. Bouet, R.N. Granito, A. Vanden-Bossche, N. Laroche, J.E. Aubin, M.-H. Lafage-Proust, L. Vico, L. Malaval. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology—Contribution of mouse experimental genetics, *Matrix Biology* (2016).
- [31] D. Chen, M. Zhao, G.R. Mundy. Bone morphogenetic proteins, *Growth factors* 22 (2004) 233-241.
- [32] D.G. Monroe, M.E. McGee-Lawrence, M.J. Oursler, J.J. Westendorf. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease, *Gene* 492 (2012) 1-18.
- [33] W. Bouleftour, M. Boudiffa, N.M. Wade-Gueye, G. Bouët, M. Cardelli, N. Laroche, A. Vanden-Bossche, M. Thomas, E. Bonnelye, J.E. Aubin. Skeletal Development of Mice Lacking Bone Sialoprotein (BSP)-Impairment of Long Bone Growth and Progressive Establishment of High Trabecular Bone Mass, (2014).
- [34] L. Malaval, J.E. Aubin, L. Vico. Role of the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING), bone sialoprotein (BSP) in bone development and remodeling, *Osteoporosis international* 20 (2009) 1077-1080.
- [35] N. Shanks, R. Greek, J. Greek. Are animal models predictive for humans?, *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine* 4 (2009) 1.
- [36] G. Bouet, D. Marchat, M. Cruel, L. Malaval, L. Vico. In Vitro Three-Dimensional Bone Tissue Models: From Cells to Controlled and Dynamic Environment, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 21 (2014) 133-156.
- [37] G. Bouet, M. Cruel, C. Laurent, L. Vico, L. Malaval, D. Marchat. Validation of an in vitro 3D bone culture model with perfused and mechanically stressed ceramic scaffold, *Eur Cell Mater* 29 (2015) 250.

- [38] H. Page, P. Flood, E.G. Reynaud. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond, *Cell and tissue research* 352 (2013) 123-131.
- [39] S. Breslin, L. O'Driscoll. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery, *Drug discovery today* 18 (2013) 240-249.
- [40] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, J. de Boer. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends in Biotechnology* 31 (2013) 108-115.
- [41] J. Barralet, L. Wang, M. Lawson, J. Triffitt, P. Cooper, R. Shelton. Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels, *Journal of materials science: materials in medicine* 16 (2005) 515-519.
- [42] M.W. Tibbitt, K.S. Anseth. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, *Biotechnology and bioengineering* 103 (2009) 655-663.
- [43] M. Rumpler, A. Woesz, F. Varga, I. Manjubala, K. Klaushofer, P. Fratzl. Three - dimensional growth behavior of osteoblasts on biomimetic hydroxylapatite scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 81 (2007) 40-50.
- [44] C.M. Bidan, K.P. Kommareddy, M. Rumpler, P. Kollmannsberger, Y.J.M. Bréchet, P. Fratzl, J.W.C. Dunlop. How Linear Tension Converts to Curvature: Geometric Control of Bone Tissue Growth, *PLoS ONE* 7 (2012) e36336.
- [45] C.M. Bidan, K.P. Kommareddy, M. Rumpler, P. Kollmannsberger, P. Fratzl, J.W.C. Dunlop. Geometry as a Factor for Tissue Growth: Towards Shape Optimization of Tissue Engineering Scaffolds, *Advanced Healthcare Materials* 2 (2013) 186-194.
- [46] A. Das, E. Botchwey. Evaluation of angiogenesis and osteogenesis, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 17 (2011) 403-414.
- [47] S.G. Pneumaticos, G.K. Triantafyllopoulos, E.K. Basdra, A.G. Papavassiliou. Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments, *Journal of cellular and molecular medicine* 14 (2010) 2561-2569.
- [48] A. Schmitt, M. van Griensven, A.B. Imhoff, S. Buchmann. Application of stem cells in orthopedics, *Stem cells international* 2012 (2012).
- [49] M. Deschepper, K. Oudina, B. David, V. Myrtil, C. Collet, M. Bensidhoum, D. Logeart - Avramoglou, H. Petite. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long - term, severe and continuous hypoxia, *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (2011) 1505-1514.
- [50] H. Petite, K. Vandamme, L. Monfoulet, D. Logeart-Avramoglou. Strategies for improving the efficacy of bioengineered bone constructs: a perspective, *Osteoporosis International* 22 (2011) 2017-2021.
- [51] A.B. Yeatts, J.P. Fisher. Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress, *Bone* 48 (2011) 171-181.
- [52] L.S. Gardel, L.A. Serra, R.L. Reis, M.E. Gomes. Use of perfusion bioreactors and large animal models for long bone tissue engineering, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20 (2013) 126-146.
- [53] C. Szpalski, F. Sagebin, M. Barbaro, S.M. Warren. The influence of environmental factors on bone tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 101 (2013) 663-675.

- [54] R.J. McCoy, F.J. O'Brien. Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: a review, *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16 (2010) 587-601.
- [55] K. Nakagawa, H. Abukawa, M.Y. Shin, H. Terai, M.J. Troulis, J.P. Vacanti. Osteoclastogenesis on tissue-engineered bone, *Tissue engineering* 10 (2004) 93-100.
- [56] M. Grellier, N. Ferreira - Tojais, C. Bourget, R. Bareille, F. Guillemot, J. Amédée. Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells, *Journal of cellular biochemistry* 106 (2009) 390-398.
- [57] A. Papadimitropoulos, A. Scherberich, S. Guven, N. Theilgaard, H. Crooijmans, F. Santini, K. Scheffler, A. Zallone, I. Martin. A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells, *Eur Cell Mater* 21 (2011) 445-458.
- [58] E. Tsourdi, E. Rijntjes, J. Köhrle, L.C. Hofbauer, M. Rauner. Hyperthyroidism and hypothyroidism in male mice and their effects on bone mass, bone turnover, and the Wnt inhibitors sclerostin and dickkopf-1, *Endocrinology* 156 (2015) 3517-3527.
- [59] F. Long. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage, *Nature reviews Molecular cell biology* 13 (2012) 27-38.
- [60] C. Luni, E. Serena, N. Elvassore. Human-on-chip for therapy development and fundamental science, *Current opinion in biotechnology* 25 (2014) 45-50.
- [61] G. Hamilton. Organs on Chips, <https://www.youtube.com/watch?v=CpkXmtJOH84> (June 2013, TED^x Boston).
- [62] S.N. Bhatia, D.E. Ingber. Microfluidic organs-on-chips, *Nature biotechnology* (2014).
- [63] W. Zhang, W.Y. Lee, D.S. Siegel, P. Toliás, J. Zilberberg. Patient-specific 3D microfluidic tissue model for multiple myeloma, *Tissue Engineering Part C: Methods* 20 (2014) 663-670.
- [64] S.-H. Park, W.Y. Sim, B.-H. Min, S.S. Yang, A. Khademhosseini, D.L. Kaplan. Chip-based comparison of the osteogenesis of human bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells under mechanical stimulation, *PLoS ONE* 7 (2012) e46689.
- [65] H.V. Unadkat, M. Hulsman, K. Cornelissen, B.J. Papenburg, R.K. Truckenmüller, A.E. Carpenter, M. Wessling, G.F. Post, M. Uetz, M.J. Reinders. An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate, *PNAS* 108 (2011) 16565-16570.
- [66] J.R. Woodard, A.J. Hilldore, S.K. Lan, C.J. Park, A.W. Morgan, J.A.C. Eurell, S.G. Clark, M.B. Wheeler, R.D. Jamison, A.J. Wagoner Johnson. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity, *Biomaterials* 28 (2007) 45-54.
- [67] O. Chan, M.J. Coathup, A. Nesbitt, C.Y. Ho, K.A. Hing, T. Buckland, C. Campion, G.W. Blunn. The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials, *Acta biomaterialia* 8 (2012) 2788-2794.
- [68] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D. Wilkinson, R.O. Oreffo. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder, *Nat Mater* 6 (2007) 997-1003.
- [69] D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y. Missirlis. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22 (2001) 1241-1251.
- [70] B. Li, X. Liao, L. Zheng, X. Zhu, Z. Wang, H. Fan, X. Zhang. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3794-3804.

- [71] 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.
- [72] B.D. Boyan, C.H. Lohmann, D.D. Dean, V.L. Sylvia, D.L. Cochran, Z. Schwartz. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology, *Annual Review of Materials Research* 31 (2001) 357-371.
- [73] A. Curtis, C. Wilkinson. Topographical control of cells, *Biomaterials* 18 (1997) 1573-1583.
- [74] F. Pecqueux, F. Tancret, N. Payraudeau, J.M. Bouler. Influence of microporosity and macroporosity on the mechanical properties of biphasic calcium phosphate bioceramics: Modelling and experiment, *Journal of the European Ceramic Society* 30 (2010) 819-829.
- [75] C.X. Lam, M.M. Savalani, S.-H. Teoh, D.W. Hutmacher. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions, *Biomedical materials* 3 (2008) 034108.
- [76] C. Wilson, C. van Blitterswijk, A. Verbout, W. Dhert, J. de Bruijn. Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22 (2011) 97-105.
- [77] F.P. Melchels, B. Tonnarelli, A.L. Olivares, I. Martin, D. Lacroix, J. Feijen, D.J. Wendt, D.W. Grijpma. The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding, *Biomaterials* 32 (2011) 2878-2884.
- [78] X. Yan, X. Chen, D. Bergstrom. Modeling of the flow within scaffolds in perfusion bioreactors, *American Journal of Biomedical Engineering* 1 (2011) 72-77.
- [79] W.L. Grayson, G. Vunjak-Novakovic, B. Obradovic. *Bioreactors in tissue engineering*. Cell and Tissue Engineering Springer (2012). p. 217-227.
- [80] A. Salerno, D. Guarnieri, M. Iannone, S. Zeppetelli, P.A. Netti. Effect of Micro- and Macroporosity of Bone Tissue Three-Dimensional-Poly(ϵ -Caprolactone) Scaffold on Human Mesenchymal Stem Cells Invasion, Proliferation, and Differentiation *In Vitro*, *Tissue Engineering Part A* 16 (2010) 2661-2673.
- [81] I. Marcos-Campos, D. Marolt, P. Petridis, S. Bhumiratana, D. Schmidt, G. Vunjak-Novakovic. Bone scaffold architecture modulates the development of mineralized bone matrix by human embryonic stem cells, *Biomaterials* 33 (2012) 8329-8342.
- [82] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 8037-8045.
- [83] A.C. Allori, E.H. Davidson, D.D. Reformat, A.M. Saylor, J. Freeman, A. Vaughan, D. Wootton, E. Clark, J.L. Ricci, S.M. Warren. Design and validation of a dynamic cell - culture system for bone biology research and exogenous tissue - engineering applications, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (2013).
- [84] M. Friák, W.A. Counts, D. Ma, B. Sander, D. Holec, D. Raabe, J. Neugebauer. Theory-guided materials design of multi-phase Ti-Nb alloys with bone-matching elastic properties, *Materials* 5 (2012) 1853-1872.
- [85] Z.L. Sun, J.C. Wataha, C.T. Hanks. Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation, (1997).
- [86] F.P.W. Melchels. Preparation of advanced porous structures by stereolithography for application in tissue engineering, University of Twente (2010).

- [87] A.R. Shrivats, M.C. McDermott, J.O. Hollinger. Bone tissue engineering: state of the union, *Drug discovery today* 19 (2014) 781-786.
- [88] J.M. Anderson, M.S. Shive. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012) 72-82.
- [89] A. Boger, M. Bohner, P. Heini, S. Verrier, E. Schneider. Properties of an injectable low modulus PMMA bone cement for osteoporotic bone, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 86 (2008) 474-482.
- [90] B. Magnan, M. Bondi, T. Maluta, E. Samaila, L. Schirru, C. Dall'Oca. Acrylic bone cement: current concept review, *Musculoskeletal surgery* 97 (2013) 93-100.
- [91] N. Zhang, D.H. Kohn. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration, *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 96 (2012) 63-81.
- [92] S. Oh, N. Oh, M. Appleford, J.L. Ong. Bioceramics for tissue engineering applications—a review, *Am J Biochem Biotechnol* 2 (2006) 49-56.
- [93] S.C. Owen, M.S. Shoichet. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94A (2010) 1321-1331.
- [94] S. Wu, X. Liu, K.W. Yeung, C. Liu, X. Yang. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 80 (2014) 1-36.
- [95] R. Ray, A. Ward Jr. A preliminary report on studies of basic calcium phosphate in bone replacement, *Surgical forum* (1951) 429.
- [96] A. Kallenberger. [The effect of bioceramics (calcium phosphate ceramics) on cultured rabbit fibroblasts], *Schweizerische Monatsschrift fur Zahnheilkunde= Revue mensuelle suisse d'odontostomatologie/SSO* 88 (1978) 90-99.
- [97] M. Šupová. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: a review, *Ceramics International* 41 (2015) 9203-9231.
- [98] J.H. Shepherd, D.V. Shepherd, S.M. Best. Substituted hydroxyapatites for bone repair, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 23 (2012) 2335-2347.
- [99] P. Newman, A. Minett, R. Ellis-Behnke, H. Zreiqat. Carbon nanotubes: their potential and pitfalls for bone tissue regeneration and engineering, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9 (2013) 1139-1158.
- [100] M. Mastrogiacomo, S. Scaglione, R. Martinetti, L. Dolcini, F. Beltrame, R. Cancedda, R. Quarto. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics, *Biomaterials* 27 (2006) 3230-3237.
- [101] M.M.C.G. Silva, L.A. Cyster, J.J.A. Barry, X.B. Yang, R.O.C. Oreffo, D.M. Grant, C.A. Scotchford, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, F.R.A.J. Rose. The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 27 (2006) 5909-5917.
- [102] S.M.M. Roosa, J.M. Kemppainen, E.N. Moffitt, P.H. Krebsbach, S.J. Hollister. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 92 (2010) 359-368.
- [103] M.-C. von Doernberg, B. von Rechenberg, M. Bohner, S. Grünenfelder, G.H. van Lenthe, R. Müller, B. Gasser, R. Mathys, G. Baroud, J. Auer. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes, *Biomaterials* 27 (2006) 5186-5198.

- [104] E. Saiz, E.A. Zimmermann, J.S. Lee, U.G. Wegst, A.P. Tomsia. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering, *Dental Materials* 29 (2013) 103-115.
- [105] J.C. Reichert, A. Cipitria, D.R. Epari, S. Saifzadeh, P. Krishnakanth, A. Berner, M.A. Woodruff, H. Schell, M. Mehta, M.A. Schuetz. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones, *Science Translational Medicine* 4 (2012) 141ra193-141ra193.
- [106] S. Stegen, N. van Gestel, G. Carmeliet. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration, *Bone* 70 (2015) 19-27.
- [107] X. Zhang, C. Xie, A.S. Lin, H. Ito, H. Awad, J.R. Lieberman, P.T. Rubery, E.M. Schwarz, R.J. O'Keefe, R.E. Guldberg. Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering, *Journal of Bone and Mineral Research* 20 (2005) 2124-2137.
- [108] V. VIATEAU, G. GUILLEMIN, Y. CALANDO, D. LOGEART, K. OUDINA, L. SEDEL, D. HANNOUCHE, V. BOUSSON, H. PETITE. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model, *Veterinary Surgery* 35 (2006) 445-452.
- [109] P. Pelissier, A. Masquelet, R. Bareille, S.M. Pelissier, J. Amedee. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration, *Journal of orthopaedic research* 22 (2004) 73-79.
- [110] H. Petite. La bio-ingénierie de la régénération osseuse, *M/S Revues: Dossier Technique* (2002).
- [111] A. Wiese, H.C. Pape. Bone defects caused by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions, *Orthopedic Clinics of North America* 41 (2010) 1-4.
- [112] B. Demiralp, T. Ege, O. Kose, Y. Yurttas, M. Basbozkurt. Reconstruction of intercalary bone defects following bone tumor resection with segmental bone transport using an Ilizarov circular external fixator, *Journal of Orthopaedic Science* 19 (2014) 1004-1011.
- [113] J.T. Marino, B.H. Ziran. Use of solid and cancellous autologous bone graft for fractures and nonunions, *Orthopedic Clinics of North America* 41 (2010) 15-26.
- [114] A.C. Masquelet, T. Begue. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects, *Orthopedic Clinics of North America* 41 (2010) 27-37.
- [115] L. Cato, J. Tao. *Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering: 2nd Edition*,(2014).
- [116] M. Manassero. MODELISATION ANIMALE APPLIQUEE A L'EVALUATION DE PRODUITS D'INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE -Etude de la contribution de modèles animaux ectopiques et orthotopiques-: UNIVERSITE PARIS DIDEROT (Paris 7); 2013.
- [117] D.L. Wheeler, W.F. Enneking. Allograft bone decreases in strength in vivo over time, *Clin Orthop Relat Res* 435 (2005) 36-42.
- [118] K. Alvarez, H. Nakajima. Metallic scaffolds for bone regeneration, *Materials* 2 (2009) 790-832.
- [119] D. Puppi, F. Chiellini, A. Piras, E. Chiellini. Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 403-440.
- [120] G. Guillemin, J.L. Patat, J. Fournie, M. Chetail. The use of coral as a bone graft substitute, *Journal of biomedical materials research* 21 (1987) 557-567.
- [121] M. Böhner. Resorbable biomaterials as bone graft substitutes, *Materials Today* 13 (2010) 24-30.
- [122] J. Barralet, M. Akao, H. Aoki, H. Aoki. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats, *Journal of biomedical materials research* 49 (2000) 176-182.

- [123] C. Christèle, R.E.Y. Christian. Biomatériaux à base de phosphates de calcium, Techniques de l'ingénieur Biomatériaux et biomécanique base documentaire : TIB606DUO (2013).
- [124] G. Spence, N. Patel, R. Brooks, N. Rushton. Carbonate substituted hydroxyapatite: resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 90 (2009) 217-224.
- [125] P. Weiss, P. Layrolle, L.P. Clergeau, B. Enckel, P. Pilet, Y. Amouriq, G. Daculsi, B. Giumelli. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial, *Biomaterials* 28 (2007) 3295-3305.
- [126] K. Kurashina, H. Kurita, Q. Wu, A. Ohtsuka, H. Kobayashi. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits, *Biomaterials* 23 (2002) 407-412.
- [127] F. Velard, D. Laurent-Maquin, C. Guillaume, S. Bouthors, E. Jallot, J.-M. Nedelec, A. Belaouaj, P. Laquerriere. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction, *Acta biomaterialia* 5 (2009) 1708-1715.
- [128] A. Grandjean-Laquerriere, O. Tabary, J. Jacquot, D. Richard, P. Frayssinet, M. Guenounou, D. Laurent-Maquin, P. Laquerriere, S. Gangloff. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles, *Biomaterials* 28 (2007) 400-404.
- [129] C.A. Garrido, S.E. Lobo, F.M. Turibio, R.Z. LeGeros. Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: clinical outcomes, *International journal of biomaterials* 2011 (2011).
- [130] J. Zhou, H. Lin, T. Fang, X. Li, W. Dai, T. Uemura, J. Dong. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone, *Biomaterials* 31 (2010) 1171-1179.
- [131] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaid, A. Meunier, C. de Pollak, M. Bourguignon, K. Oudina, L. Sedel, G. Guillemain. Tissue-engineered bone regeneration, *Nature biotechnology* 18 (2000) 959-963.
- [132] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, P.V. Giannoudis. Bone regeneration: current concepts and future directions, *BMC medicine* 9 (2011) 66.
- [133] R. Dimitriou, E. Tsiridis, P.V. Giannoudis. Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury* 36 (2005) 1392-1404.
- [134] H. Schliephake. Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: a systematic review, *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 17 (2015) 247-273.
- [135] R. Hashimoto, A. Raich, E. Yoder, K. McMullen, J. Dettori. On-and off-label uses of rhBMP-2 or rhBMP-7 for spinal fusion, *Olympia, WA: Washington State Health Care Authority* (2012).
- [136] E.J. Carragee, E.L. Hurwitz, B.K. Weiner. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned, *The Spine Journal* 11 (2011) 471-491.
- [137] D. Cyranoski. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells, *Nature* 10 (2014).
- [138] R.R. Makkar, R.R. Smith, K. Cheng, K. Malliaras, L.E. Thomson, D. Berman, L.S. Czer, L. Marbán, A. Mendizabal, P.V. Johnston. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial, *The Lancet* 379 (2012) 895-904.
- [139] J.I. Dawson, J. Kanczler, R. Tare, M. Kassem, R.O. Oreffo. Concise Review: Bridging the Gap: Bone Regeneration Using Skeletal Stem Cell - Based Strategies—Where Are We Now?, *Stem Cells* 32 (2014) 35-44.

- [140] D. Kaigler, G. Pagni, C.H. Park, T.M. Braun, L.A. Holman, E. Yi, S.A. Tarle, R.L. Bartel, W.V. Giannobile. Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial, *Cell Transplant* 22 (2013) 767.
- [141] P. Hernigou, A. Poignard, F. Beaujean, H. Rouard. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions, *The Journal of Bone & Joint Surgery* 87 (2005) 1430-1437.
- [142] J.-B. Gross, J. Diligent, D. Bensoussan, L. Galois, J.-F. Stoltz, D. Mainard. Percutaneous autologous bone marrow injection for treatment of delayed and non-union of long bone: a retrospective study of 45 cases, *Bio-medical materials and engineering* 25 (2015) 187-197.
- [143] M.N. Knight, K.D. Hankenson. Mesenchymal stem cells in bone regeneration, *Advances in wound care* 2 (2013) 306-316.
- [144] U.A. Stock, J.P. Vacanti. Tissue engineering: current state and prospects, *Annual review of medicine* 52 (2001) 443-451.
- [145] ansm. <http://ansm.sante.fr/>, (2016).
- [146] L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, J.E. Ramirez-Vick. Scaffold design for bone regeneration, *Journal of nanoscience and nanotechnology* 14 (2014) 15.
- [147] M. Bohner, L. Galea, N. Doebelin. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes, *Journal of the European Ceramic Society* 32 (2012) 2663-2671.
- [148] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology* 30 (2012) 546-554.
- [149] N. Douard. *Élaboration et fonctionnalisation de biocéramiques phosphocalciques: Limoges; 2010.*
- [150] S. Bose, S. Tarafder. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review, *Acta biomaterialia* 8 (2012) 1401-1421.
- [151] M. Bohner. Silicon-substituted calcium phosphates – A critical view, *Biomaterials* 30 (2009) 6403-6406.
- [152] 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.
- [153] D. Marchat, G. Bouët, A. Lueckgen, M. Zymelka, L. Malaval, S. Szenknect, N. Dacheux, D. Bernache-Assollant, J. Chevalier. Physico-chemical characterization and in vitro biological evaluation of pure SiHA for bone tissue engineering application, *Key Engineering Materials* 529-530 (2013) 351-356.
- [154] R. Ponche. *Méthodologie de conception pour la fabrication additive, application à la projection de poudres: Ecole Centrale de Nantes (ECN); 2013.*
- [155] S. Rajagopalan, R.A. Robb. Schwarz meets Schwann: Design and fabrication of biomorphic and durataxic tissue engineering scaffolds, *Medical Image Analysis* 10 (2006) 693-712.
- [156] S.C. Kapfer, S.T. Hyde, K. Mecke, C.H. Arns, G.E. Schröder-Turk. Minimal surface scaffold designs for tissue engineering, *Biomaterials* 32 (2011) 6875-6882.
- [157] S.J. Hollister, C.Y. Lin. Computational design of tissue engineering scaffolds, *Computer Methods in Applied Mechanics and Engineering* 196 (2007) 2991-2998.
- [158] F.P.W. Melchels, K. Bertoldi, R. Gabbriellini, A.H. Velders, J. Feijen, D.W. Grijpma. Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography, *Biomaterials* 31 (2010) 6909-6916.

- [159] D.J. Yoo. Porous scaffold design using the distance field and triply periodic minimal surface models, *Biomaterials* 32 (2011) 7741-7754.
- [160] S.J. Hollister. Porous scaffold design for tissue engineering, *Nat Mater* 4 (2005) 518-524.
- [161] D. Yoo. New paradigms in hierarchical porous scaffold design for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* 33 (2013) 1759-1772.
- [162] A. Mazzoli. Selective laser sintering in biomedical engineering, *Medical & biological engineering & computing* 51 (2013) 245-256.
- [163] A. Zocca, P. Colombo, C.M. Gomes, J. Günster. Additive Manufacturing of Ceramics: Issues, Potentialities, and Opportunities, *Journal of the American Ceramic Society* 98 (2015) 1983-2001.
- [164] E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute, *Journal of the European Ceramic Society* 23 (2003) 2931-2937.
- [165] D.G. Nelson. The influence of carbonate on the atomic structure and reactivity of hydroxyapatite, *Journal of dental research* 60 Spec No C (1981) 1621-1629.
- [166] A.J. Melville, J. Harrison, K.A. Gross, J.S. Forsythe, A.O. Trounson, R. Mollard. Mouse embryonic stem cell colonisation of carbonated apatite surfaces, *Biomaterials* 27 (2006) 615-622.
- [167] G. Spence, N. Patel, R. Brooks, W. Bonfield, N. Rushton. Osteoclastogenesis on hydroxyapatite ceramics: the effect of carbonate substitution, *J Biomed Mater Res A* 92 (2010) 1292-1300.
- [168] M. BERTOLUS, M. DEFRANCESCHI. Les apatites: des phosphates naturels, *Techniques de l'ingénieur Sciences fondamentales* (2004) AF6610. 6611-AF6610. 6618.
- [169] P.-J. Panteix. Synthèse et caractérisation de conducteurs ioniques à structure apatitique: Limoges; 2005.
- [170] V. LOUIS-ACHILLE. DE L'INCORPORATION DE LANTHANIDES DANS LE RESEAU CRISTALLIN D'UNE APATITE PHOSPHOCALCIQUE.
- [171] J.M. Hughes, J. Rakovan. The crystal structure of apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})$, *Reviews in mineralogy and geochemistry* 48 (2002) 1-12.
- [172] J.-L. Lacout. Contribution à l'étude de l'extraction par vapoméallurgie du manganèse et du vanadium des apatites 1983.
- [173] J.C. Elliott. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Elsevier (2013).
- [174] A. Boyer. Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo silicatées: Saint-Etienne, EMSE; 2014.
- [175] D. Marchat. Fixation du cadmium par une hydroxyapatite phosphocalcique: étude cinétique et thermodynamique: Université de Limoges. Faculté des sciences et techniques; 2005.
- [176] I. Cacciotti. Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite, (2015).
- [177] M. Palard. Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées: Université de Limoges; 2007.
- [178] J.H. Shepherd, S.M. Best. Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair, *JOM* 63 (2011) 83-92.
- [179] G. Montel, G. Bonel, J.C. Heughebaert, J.C. Trombe, C. Rey. New concepts in the composition, crystallization and growth of the mineral component of calcified tissues, *Journal of Crystal Growth* 53 (1981) 74-99.

- [180] 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.
- [181] R.Z. LeGeros, O.R. Trautz, E. Klein, J.P. LeGeros. Two types of carbonate substitution in the apatite structure, *Experientia* 25 (1969) 5-7.
- [182] R. Zapanta-Legeros. Effect of Carbonate on the Lattice Parameters of Apatite, , Published online: 24 April 1965; | doi:10.1038/206403a0 206 (1965) 403-404.
- [183] F.C.M. Driessens, H.G. Schaeken, R.M.H. Verbeeck. On the mechanism of substitution in carbonated apatites, *Journal of Dental Research* 62 (1983).
- [184] A. Porter, N. Patel, R. Brooks, S. Best, N. Rushton, W. Bonfield. Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants, *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005) 899-907.
- [185] Y. Doi, T. Koda, N. Wakamatsu, T. Goto, H. Kamemizu, Y. Moriwaki, M. Adachi, Y. Suwa. Influence of carbonate on sintering of apatites, *Journal of Dental Research* 72 (1993) 1279-1284.
- [186] R. Detsch, D. Hagmeyer, M. Neumann, S. Schaefer, A. Vortkamp, M. Wuelling, G. Ziegler, M. Epple. The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3223-3233.
- [187] N. Patel, I.R. Gibson, K.A. Hing, S.M. Best, E. Damien, P.A. Revell, W. Bonfield. The In Vivo Response of Phase Pure Hydroxyapatite and Carbonate Substituted Hydroxyapatite Granules of Varying Size Ranges, *Key Engineering Materials* 218-220 (2002) 383-386.
- [188] J.P. Lafon, E. Champion, D. Bernache-Assollant. Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-x(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition, *Journal of the European Ceramic Society* 28 (2008) 139-147.
- [189] G. Bonel. Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites - 2 - Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées de type B, *Annales de Chimie* 7 (1972) 127-139.
- [190] M. Vignoles, G. Bonel, D. Holcomb, R. Young. Influence of Preparation Conditions on the Composition of Type-B Carbonated Hydroxyapatite and on the Localization of the Carbonate Ions, *Calcified Tissue International* 43 (1988) 33-40.
- [191] M.E. Fleet, X. Liu. Carbonate apatite type A synthesized at high pressure: new space group (P3) and orientation of channel carbonate ion, *Journal of Solid State Chemistry* 174 (2003) 412-417.
- [192] M.E. Fleet, X. Liu. Location of type B carbonate ion in type A-B carbonate apatite synthesized at high pressure, *Journal of Solid State Chemistry* 177 (2004) 3174-3182.
- [193] M.E. Fleet. Carbonated hydroxyapatite: materials, synthesis, and applications, CRC Press (2014).
- [194] M.E. Fleet. Infrared spectra of carbonate apatites: ν_2 -Region bands, *Biomaterials* 30 (2009) 1473-1481.
- [195] R.Z. LeGeros. Crystallographic Studies of the Carbonate Substitution in the Apatite Structure: New York University; 1967.
- [196] G. Bonel. Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites - 1 - Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques des apatites carbonatées du type A, *Annales de Chimie* 7 (1972) 65-88.
- [197] J.C. Elliott. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, *Studies in organic chemistry* (1994).

- [198] A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam. Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences, Academic Press (2014).
- [199] G. Bonel. Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites 1970.
- [200] J.-P. Lafon. Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées [Thèse]: Université de Limoges; 2004.
- [201] J.C. Labarthe, G. Bonel, G. Montel. Sur la structure et les propriétés des apatites carbonatées de type B phospho-calciques, *Ann Chim* 8 (1973) 289-301.
- [202] M. Vignoles, G. Bonel, R.A. Young. Occurrence of nitrogenous species in precipitated B-type carbonated hydroxyapatites, *Calcified Tissue International* 40 (1987) 64-70.
- [203] M. Vignoles. Contribution à l'étude des apatites carbonatées de type B, These de Doctorat d'état, INP Toulouse (1984).
- [204] I. Khattech, M. Jemal. Décomposition thermique de fluorapatites carbonatées de type b "inverses", *Thermochimica acta* 118 (1987) 267-275.
- [205] J. Barralet, J.C. Knowles, S. Best, W. Bonfield. Thermal decomposition of synthesised carbonate hydroxyapatite, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 13 (2002) 529-533.
- [206] G. Spence, S. Phillips, C. Champion, R. Brooks, N. Rushton. Bone formation in a carbonate-substituted hydroxyapatite implant is inhibited by zoledronate: the importance of bioresorption to osteoconduction, *J Bone Joint Surg Br* 90 (2008) 1635-1640.
- [207] I.Y. Pieters, N.M. Van den Vreken, H.A. Declercq, M.J. Cornelissen, R.M. Verbeeck. Carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite: Influence of carbonate content on adhesion and proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells, *Acta biomaterialia* 6 (2010) 1561-1568.
- [208] W. White. The carbonate minerals, *The infrared spectra of minerals* 4 (1974) 227-284.
- [209] T.G. Kujumzelis. über die Schwingungen und die Struktur der XO₃-Ionen, *Zeitschrift für Physik* 109 (1938) 586-597.
- [210] G. Herzberg. *Molecular Spectra and Molecular Structure. II. Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*, (1945).
- [211] R. Madix, J. Solomon, J. Stöhr. The orientation of the carbonate anion on Ag (110), *Surface Science* 197 (1988) L253-L259.
- [212] J. Elliot. Synthetic and biological carbonate-containing apatites, *International Symposium on Structural Properties of Hydroxyapatite* New York: Gordon-Breach (1969).
- [213] C.L.D. J. Arends. HPO₄²⁻ Content in enamel and artificial carious lesions, *Journal of Dental Research* 54 (1975) 65-79.
- [214] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, B. Collins, M.J. Glimcher. Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging, *Calcified Tissue International* 49 (1991) 251-258.
- [215] H. Ou - Yang, E. Paschalis, W. Mayo, A. Boskey, R. Mendelsohn. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO₃²⁻, *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (2001) 893-900.
- [216] T. Leventouri, A. Antonakos, A. Kyriacou, R. Venturelli, E. Liarokapis, V. Perdikatsis. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age, *International Journal of Biomaterials* 2009 (2009) 1-6.
- [217] J.D.B. Featherstone, S. Pearson, R.Z. LeGeros. An Infrared Method for Quantification of Carbonate in Carbonated Apatites, *Caries Research* 18 (1984) 63-66.

- [218] A.B. Sønju Clasen, I.E. Ruyter. Quantitative Determination of Type A and Type B Carbonate in Human Deciduous and Permanent Enamel by Means of Fourier Transform Infrared Spectrometry, *Advances in Dental Research* 11 (1997) 523-527.
- [219] J.C. Elliott, D.W. Holcomb, D.R.A. Young. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel, *Calcified Tissue International* 37 (1985) 372-375.
- [220] K. Verdelis, L. Lukashova, J.T. Wright, R. Mendelsohn, M.G.E. Peterson, S. Doty, A.L. Boskey. Maturation changes in dentin mineral properties, *Bone* 40 (2007) 1399-1407.
- [221] Y. Lee, Y.M. Hahm, D.H. Lee, S. Matsuya, M. Nakagawa, K. Ishikawa. Preparation and characterization of macroporous carbonate-substituted hydroxyapatite scaffold, *INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH* 47 (2008) 2618-2622.
- [222] A. Krajewski, M. Mazzocchi, P.L. Buldini, A. Ravaglioli, A. Tinti, P. Taddei, C. Fagnano. Synthesis of carbonated hydroxyapatites: efficiency of the substitution and critical evaluation of analytical methods, *Journal of Molecular Structure* 744–747 (2005) 221-228.
- [223] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, L. Vichi, M. Sandri. Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite, *Biomaterials* 25 (2004) 1763-1770.
- [224] A. Antonakos, E. Liarokapis, T. Leventouri. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites, *Biomaterials* 28 (2007) 3043-3054.
- [225] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, M. Shimizu, B. Collins, M.J. Glimcher. A resolution-enhanced Fourier Transform Infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation, *Calcified Tissue International* 49 (1991) 259-268.
- [226] H. El Feki, C. Rey, M. Vignoles. Carbonate ions in apatites: Infrared investigations in the 4 CO₃ domain, *Calcified tissue international* 49 (1991) 269-274.
- [227] I.R. Gibson, W. Bonfield. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite, *Journal of biomedical materials research* 59 (2002) 697-708.
- [228] R. LeGeros, J. LeGeros. Carbonate analyses of synthetic, mineral and biological apatites, *Journal of Dental Research* 62 (1983) 259-259.
- [229] R.J. Meier. On art and science in curve-fitting vibrational spectra, *Vibrational Spectroscopy* 39 (2005) 266-269.
- [230] M. Bradley. Curve Fitting in Raman and IR Spectroscopy : Basic Theory of Line Shapes and Applications, *Application Note 50733* (2007) 4.
- [231] J.G. Dodd, L. DeNoyer. Curve - Fitting: Modeling Spectra, *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (2002).
- [232] B.C. Smith. *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*, CRC press (2011).
- [233] J.R. Connolly. Introduction quantitative X-ray diffraction methods, *Fundamentals of X-Ray Powder Diffraction*, Nuevo Mexico University, <http://epswww.unm.edu/xrd/xrdclass/09-quant-intro.pdf> (2012).
- [234] Y. Wang, S. Von Euw, G. Laurent, C. Crevant, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azaïs. Impact of collagen confinement vs. ionic substitutions on the local disorder in bone and biomimetic apatites, *Materials Horizons* 1 (2014) 224-231.
- [235] J. Canit, M. Billardon, J. Badoz. Vérification expérimentale des relations de Kramers-Kronig entre indices de réfraction et d'extinction, *Journal de Physique* 32 (1971) 691-697.
- [236] A. Ascenzi, C. Fabry. Technique for dissection and measurement of refractive index of osteones, *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 6 (1959) 139-142.

- [237] D. Spitzer, J. Ten Bosch. The absorption and scattering of light in bovine and human dental enamel, *Calcified tissue research* 17 (1975) 129-137.
- [238] E. Moreno, T. Gregory, W. Brown. Preparation and solubility of hydroxyapatite, *J Res Natl Bur Stand A* 72 (1968) 773-782.
- [239] J.C. Merry, I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield. Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 9 (1998) 779-783.
- [240] R.J. Kaandorp, F.P. Wesselingh, H.B. Vonhof. Ecological implications from geochemical records of Miocene Western Amazonian bivalves, *Journal of South American Earth Sciences* 21 (2006) 54-74.
- [241] X. Guan, H. Dong, J. Ma, L. Jiang. Removal of arsenic from water: effects of competing anions on As (III) removal in KMnO₄-Fe (II) process, *Water research* 43 (2009) 3891-3899.
- [242] M. Rumpler, A. Woesz, J.W.C. Dunlop, J.T. van Dongen, P. Fratzl. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth, *J R Soc Interface* 5 (2008) 1173-1180.
- [243] C.M. Bidan, P. Kollmannsberger, V. Gering, S. Ehrig, P. Joly, A. Petersen, V. Vogel, P. Fratzl, J.W. Dunlop. Gradual conversion of cellular stress patterns into pre-stressed matrix architecture during in vitro tissue growth, *J R Soc Interface* 13 (2016) 20160136.
- [244] M. Bohner, Y. Loosli, G. Baroud, D. Lacroix. Commentary: deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute, *Acta biomaterialia* 7 (2011) 478-484.
- [245] M.I. Gariboldi, S.M. Best. effect of ceramic scaffold architectural parameters on biological response, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3 (2015).
- [246] R. Speirs. The reaction between some dyes and synthetic hydroxyapatite I. The uptake of dyes in relation to their structures, *The Histochemical Journal* 2 (1970) 45-66.
- [247] R. Speirs. The reaction between some dyes and synthetic hydroxyapatite 2. Nature of the binding reaction, *The Histochemical Journal* 2 (1970) 67-86.
- [248] C. Andrews-Pfannkoch, D.W. Fadrosch, J. Thorpe, S.J. Williamson. Hydroxyapatite-mediated separation of double-stranded DNA, single-stranded DNA, and RNA genomes from natural viral assemblages, *Applied and environmental microbiology* 76 (2010) 5039-5045.
- [249] M.J. Gorbunoff. The interaction of proteins with hydroxyapatite: I. Role of protein charge and structure, *Analytical biochemistry* 136 (1984) 425-432.
- [250] M.J. Gorbunoff, S.N. Timasheff. The interaction of proteins with hydroxyapatite: III. Mechanism, *Analytical biochemistry* 136 (1984) 440-445.
- [251] M.R. Appleford, S. Oh, N. Oh, J.L. Ong. In vivo study on hydroxyapatite scaffolds with trabecular architecture for bone repair, *Journal of biomedical materials research Part A* 89 (2009) 1019-1027.
- [252] V. Karageorgiou, D. Kaplan. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.
- [253] J. Will, R. Melcher, C. Treul, N. Travitzky, U. Kneser, E. Polykandriotis, R. Horch, P. Greil. Porous ceramic bone scaffolds for vascularized bone tissue regeneration, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 2781-2790.
- [254] F. Bai, Z. Wang, J. Lu, J. Liu, G. Chen, R. Lv, J. Wang, K. Lin, J. Zhang, X. Huang. The correlation between the internal structure and vascularization of controllable porous bioceramic materials in vivo: a quantitative study, *Tissue engineering Part A* 16 (2010) 3791-3803.
- [255] A. Malhotra, P. Habibovic. Calcium Phosphates and Angiogenesis: Implications and Advances for Bone Regeneration, *Trends in Biotechnology* (2016).

- [256] Y.-F. Feng, L. Wang, X. Li, Z.-S. Ma, Y. Zhang, Z.-Y. Zhang, W. Lei. Influence of architecture of β -tricalcium phosphate scaffolds on biological performance in repairing segmental bone defects, PLoS ONE 7 (2012) e49955.
- [257] B. Ostrowska, A. Di Luca, L. Moroni, W. Swieszkowski. Influence of internal pore architecture on biological and mechanical properties of three - dimensional fiber deposited scaffolds for bone regeneration, Journal of Biomedical Materials Research Part A (2016).
- [258] A. Magnaudeix, J. Usseglio, M. Lasgorceix, F. Lalloue, C. Damia, J. Brie, P. Pascaud-Mathieu, E. Champion. Quantitative analysis of vascular colonisation and angio-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model, Acta biomaterialia 38 (2016) 179-189.
- [259] M. Lasgorceix, E. Champion, T. Chartier. Shaping by microstereolithography and sintering of macro-micro-porous silicon substituted hydroxyapatite, Journal of the European Ceramic Society 36 (2016) 1091-1101.
- [260] P. Cloetens, W. Ludwig, J. Baruchel, J.-P. Guigay, P. Pernot-Rejmánková, M. Salomé-Pateyron, M. Schlenker, J.-Y. Buffière, E. Maire, G. Peix. Hard x-ray phase imaging using simple propagation of a coherent synchrotron radiation beam, Journal of Physics D: Applied Physics 32 (1999) A145.
- [261] J. Fei, F. Peyrin, L. Malaval, L. Vico, M.H. Lafage-Proust, Imaging and quantitative assessment of long bone vascularization in the adult rat using microcomputed tomography, The Anatomic Record 293 (2010) 215-224
- [262] P. Cloetens, W. Ludwig, J. Baruchel, D. Van Dyck, J. Van Landuyt, J. Guigay, M. Schlenker. Holotomography: Quantitative phase tomography with micrometer resolution using hard synchrotron radiation x rays, Applied physics letters 75 (1999) 2912-2914.
- [263] A. Grandjean, M. Deschepper, Étude de la porosité d'un implant en hydroxyapatite fabriqué par prototypage rapide en site ectopique murin, Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (2014).
- [264] H.B. Kristensen, T.L. Andersen, N. Marcussen, L. Rolighed, J.M. Delaisse. Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone, Journal of Bone and Mineral Research 28 (2013) 574-585.
- [265] S.K. Ramasamy, A.P. Kusumbe, T. Itkin, S. Gur-Cohen, T. Lapidot, R.H. Adams. Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals, Annual Review of Cell and Developmental Biology 32 (2016).

Annexes

Annexe 1 : Synthèse des poudres

La synthèse d'hydroxyapatite carbonatée par précipitation est basée sur la réaction entre une solution aqueuse de calcium et une solution aqueuse de phosphate et de carbonate ; la vitesse d'introduction des réactifs, la valeur du pH et de la température étant contrôlées et régulées pendant la précipitation (Figure Annexe 1-1). Ces solutions sont obtenues par dissolution totale en milieu aqueux de nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pureté 99%, Merck 1.02121, Allemagne), d'hydrogénophosphate de diammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pureté 99%, Merck 1.01207, Allemagne), et d'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3 , pureté 99%, Merck 1.01131, Allemagne). Etant parfaitement miscibles et ne réagissant pas entre eux, les sels de phosphate et de carbonate sont dissous dans la même solution. Cela permet de conserver le rapport stœchiométrique au cours de la précipitation tout en facilitant leur introduction dans le réacteur de synthèse.

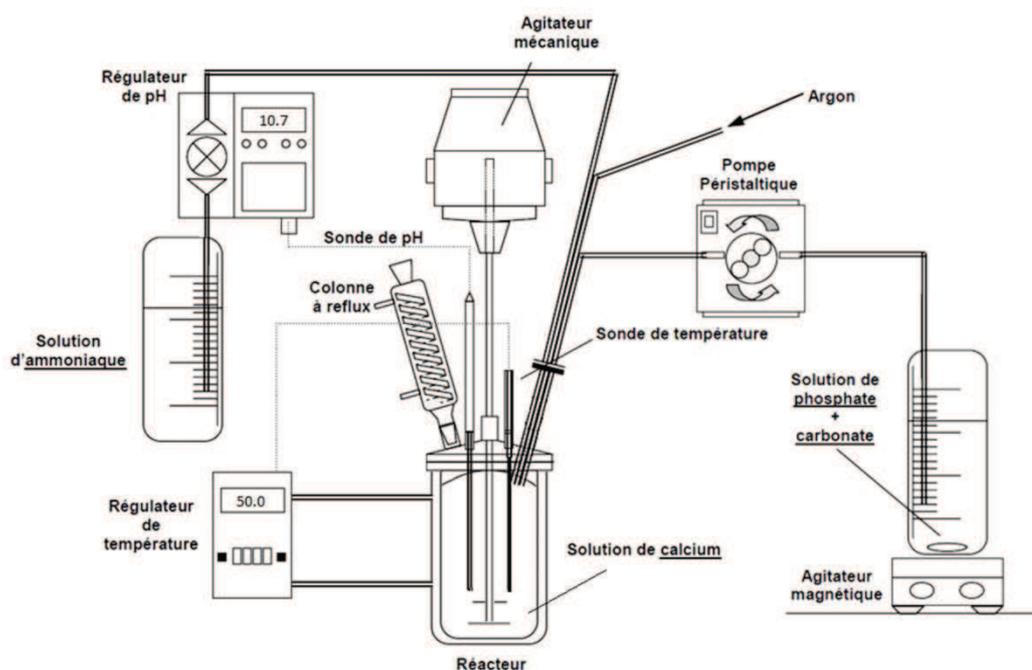
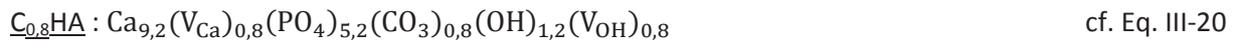
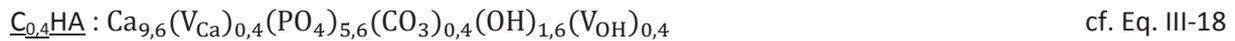
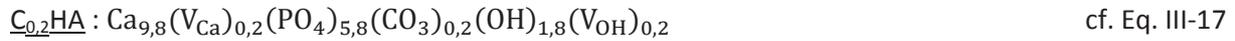


Figure Annexe 1-1 : Schéma du montage de synthèse par précipitation en voie aqueuse

La solution de nitrate de calcium est introduite dans un réacteur à double paroi de 5 L. Une sonde de température Pt 100 placée au cœur du réacteur est reliée à un cryothermostat (Huber K6, Allemagne) qui permet une régulation dynamique de la température de réaction par la circulation d'une huile siliconée dans la double paroi. Une agitation mécanique (Eurostar IKA Werke) à 480 rpm via une pale en PTFE pendant l'intégralité de la synthèse permet l'homogénéisation du milieu réactionnel. Afin d'éviter la carbonatation du précipité par le CO_2 atmosphérique, le réacteur est balayé par un flux d'argon (20 mL/min, pureté 99.999 %, Air Liquide). Le pH est ajusté et maintenu à une valeur consigne de 7,95 par l'ajout d'une solution concentrée d'ammoniaque ($(\text{NH}_3, \text{H}_2\text{O})$, 28%, Merck 1.05423, Allemagne) au moyen d'une pompe (ProMinent) reliée à un couple régulateur de pH/électrode (M400/InPro4800, Metler Toledo). Une colonne à reflux surplombe la tête du réacteur afin de condenser les vapeurs d'ammoniaque.

Cinq poudres de compositions différentes ont été synthétisées: une hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique (HA) et quatre hydroxyapatites carbonatées de type B (C_xHA , avec x le coefficient stœchiométrique théorique d'ions carbonate introduits en site B). Les formules chimiques théoriques de ces poudres sont les suivantes :



où V_{Ca} et V_{OH} représentent respectivement les lacunes en site calcium et en site hydroxyde. Ces formules chimiques théoriques des C_BHA proviennent des formules générales présentes dans la littérature (section III.2.1., Eq. III-2 page 66)

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

1. Le pH de la réaction : dans le cas de la synthèse de l'HA et des C_BHA , le pH est maintenu à 7.95 pour que les espèces $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} et HCO_3^- soient majoritaires dans le milieu réactionnel comme illustré par les courbes de spéciation ci-dessous.

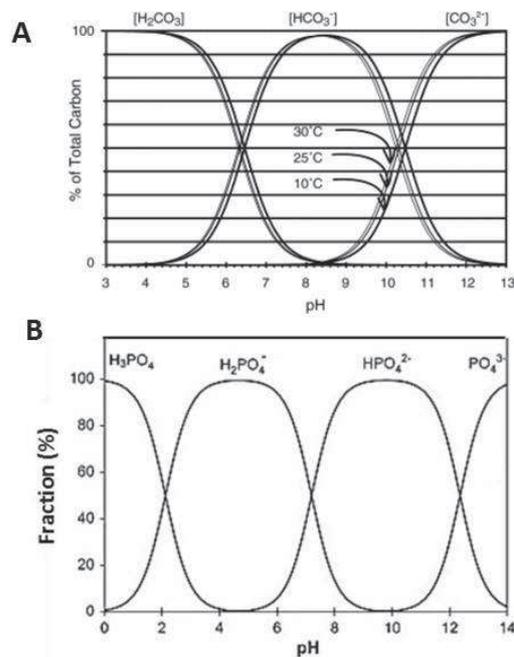


Figure Annexe 1-2 : Diagramme de spéciation A. de l'espèce carbonate [240], et B. de l'espèce phosphate [241]. A noter toutefois que ces diagrammes évoluent en fonction de la température et des espèces chimiques présentes dans le milieu réactionnel.

2. Le rapport molaire en réactifs $\frac{Ca}{P+C}$: les quantités initiales de nitrate de calcium tétrahydraté, d'hydrogénophosphate de diammonium et d'hydrogénocarbonate d'ammonium sont fixées en fonction de la formule de l'hydroxyapatite à synthétiser

- La concentration en réactifs : pour chaque synthèse, les quantités de réactifs introduites sont calculées afin d'obtenir une masse théorique de 120 g de poudre précipitée. Le volume d'eau déionisée pour dissoudre le nitrate de calcium est fixé à 1500 mL. De même l'hydrogénophosphate de diammonium et l'hydrogencarbonate d'ammonium sont dissous simultanément dans 500 mL d'eau déionisée.
- Mode de précipitation : la solution de phosphate et carbonate est ajoutée goutte à goutte à la solution de calcium. [190] à un débit de 25 mL/min. La précipitation est effectuée à une température de 65 °C et le temps de maturation est fixé à 24 h.

Après maturation, le milieu de synthèse est centrifugé à 400 rpm pendant 5 minutes (Sorvall Legend XF, Thermo Scientific) pour séparer la phase aqueuse du précipité formé. Le précipité est séché à 80 °C pendant 12 à 24 h en étuve puis broyée manuellement. Enfin, la poudre est traitée à 400 °C pendant 2 h sous air (Carbolite, Royaume Uni), afin de stopper toute réaction chimique et d'éliminer la majorité des résidus de synthèse (e.g., résidus nitrés), puis stockée.

Les paramètres de synthèse sont récapitulés dans le Tableau annexe 1-1 ci-dessous :

Tableau annexe 1-1 : Récapitulatif des paramètres de synthèse utilisés

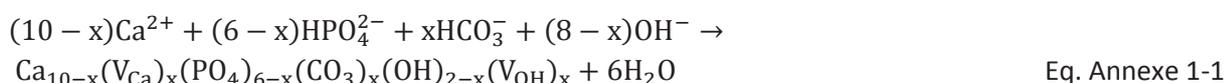
Échantillon	Paramètres de synthèse						
	$n(\text{Ca})/\text{mol}$	$n(\text{P})/\text{mol}$	$n(\text{C})/\text{mol}$	$\frac{\text{Ca}}{\text{P} + \text{C}}$	pH	T/°C	temps maturation/h
HA	1,195	0,717	0,000	10/6	7,95	65	24
C _{0,2} -HA	1,192	0,706	0,024	9,8/6	-	-	-
C _{0,4} -HA	1,190	0,694	0,050	9,6/6	-	-	-
C _{0,6} -HA	1,188	0,683	0,076	9,4/6	-	-	-
C _{0,8} -HA	1,186	0,670	0,103	9,2/6	-	-	-

A titre informatif, le Tableau annexe 1-2 indique pour chaque poudre synthétisée la correspondance entre coefficient stœchiométrique théorique et pourcentage massique théorique pour les éléments calcium, phosphore et carbone.

Tableau Annexe 1-2 : Correspondance entre coefficients stœchiométriques et pourcentages massiques théoriques des éléments Ca, P et C pour chaque poudre synthétisée.

Échantillon	Masse molaire théorique /g.mol ⁻¹	Coefficients stœchiométriques théoriques			% massiques théoriques		
		Ca	P	C	Ca	P	C
HA	1004,61	10	6	0	39,89	18,50	0,00
C _{0,2} -HA	986,20	9,8	5,8	0,2	39,83	18,22	0,24
C _{0,4} -HA	967,80	9,6	5,6	0,4	39,76	17,92	0,50
C _{0,6} -HA	949,39	9,4	5,4	0,6	39,68	17,62	0,76
C _{0,8} -HA	930,98	9,2	5,2	0,8	39,61	17,30	1,03

Finalement, dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, la réaction de précipitation peut s'écrire en première approximation selon l'équation générale suivante :



avec x le taux de carbonate introduit en site B et V_{Ca} et V_{OH} respectivement les lacunes en site calcium et en site hydroxyde.

Annexe 2 : Caractérisation des poudres préparées

Analyses structurales

L'analyse qualitative des phases cristallines présentes au sein des échantillons est réalisée par diffraction des rayons X (DRX). Les diffractogrammes sont enregistrés avec la radiation $\text{CuK}\alpha$ (40 kV, 30 mA) sur un diffractomètre $\theta/2\theta$ Siemens D5000 à température ambiante. Les acquisitions sont réalisées sur un domaine angulaire de 27° à 38° (en 2θ) selon un pas de $0,02^\circ$ et un temps de comptage égal à 9 s. Le pic est considéré comme détectable si le rapport d'intensité signal/bruit est supérieur ou égal à 2. Les phases sont identifiées par comparaison avec les références ICDD-PDF (International Center for Diffraction Data - Powder Diffraction Files) listées dans le tableau Annexe 2-1.

Tableau Annexe 2-1 : Référence des fiches ICDD-PDF de l'hydroxyapatite et de possibles phases secondaires présentes après synthèse ou traitement thermique.

Nature du composé	N° de fiche ICDD-PDF	Nature du composé	N° de fiche ICDD-PDF
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9-432	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	9-345
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \alpha$ TCP	9-348	CaO	37-1497
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \beta$ TCP	9-169	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	4-733
$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9 - \text{TTCP}$	25-1137	CaCO_3 - calcite	5-0586

Les paramètres de maille des poudres monophasiques sont déterminés par une méthode d'affinement Rietveld (méthode de Le Bail) via le logiciel Topas 4.2 (2013, Bruker). Pour cela, l'acquisition d'un diffractogramme haute résolution (domaine angulaire : 10° à 120° , pas : $0,02^\circ$, temps de comptage : 10,5 s) est effectuée sur des poudres calcinées à 1000°C pendant 15 h sous air ou sous CO_2 .

Analyses spectroscopiques

L'acquisition des spectres IR est réalisée sur un spectromètre MIR TF VERTEX 70 (Bruker Optics) équipé d'un module de réflexion totale atténuée (ATR) sur des échantillons pulvérulents. Le domaine spectral étudié s'étend de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} . Chaque spectre est issu d'une moyenne de 64 scans.

Analyses chimiques

L'analyse quantitative du carbone total contenu dans les échantillons (N=3 à 9) est réalisée à l'aide d'un analyseur carbone-souffre (CS-444 Leco). L'échantillon est vaporisé sous flux de dioxygène, et le carbone contenu dans l'échantillon ainsi libéré sous forme de dioxyde de carbone. Un système infrarouge, étalonné au préalable, permet de doser la quantité de carbone initialement présent. A noter toutefois qu'il est impossible via ce système de différencier la provenance du carbone : carbonates substitués dans la maille (site A ou B), dioxyde de carbone adsorbé.

Test phénolphtaléine

Les poudres synthétisées sont susceptibles de contenir de la chaux sous sa forme hydratée $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Or, en raison de la superposition de la raie principale de diffraction de l'hydroxyde de calcium (plan (200) à $2\theta = 34,08^\circ$) avec une raie de l'HA (plan (202) à $2\theta = 34,05^\circ$), un test qualitatif supplémentaire doit être réalisé pour s'assurer de l'absence de chaux dans le composé. Ce test est effectué après calcination des poudres d'hydroxyapatite non carbonatée à 1000°C pendant 15 h sous air en accord avec la norme ISO

13779-3 : 2008, ou à 1000 °C pendant 2 sous CO₂ pour les hydroxyapatites carbonatées (Thèse A. BOYER).

Dans le cas de l'HA, l'absence de chaux est alors vérifiée en projetant de la poudre encore chaude (T > 400 °C) dans de l'eau déionisée. Quelques gouttes de l'indicateur colorée phénolphtaléine sont ensuite ajoutées. La solution devient instantanément rose en présence de chaux, qui alcalinise la solution.

Pour les CHA, les échantillons étudiés sont également susceptibles de contenir une phase de carbonate de calcium CaCO₃, obtenue par précipitation au cours de la synthèse ou par carbonatation de la chaux. En effet, au-delà de 900°C et sous atmosphère CO₂, le composé CaO, s'il est présent, devient CaCO₃ selon l'équilibre suivant (similaire à Eq. III-13 page 69) :



La présence de CaCO₃ à l'état de traces dans une poudre d'HA ou de CHA est difficile à déceler par DRX en raison des seuils de détection trop élevés et de la faible intensité de ses pics principaux de diffraction. Le protocole de détection établi consiste alors à calciner l'échantillon sous air à 550 °C pendant 10 h. Ce traitement thermique préalable permet de retransformer au moins partiellement (transformation totale à 890 °C) la phase CaCO₃ en CaO (Eq. III-13, page 69) sans décarbonater la phase CHA. Ces paramètres de calcination ont été déterminés via l'étude de la stabilité thermique des composés CHA et CSiHA dans le cadre de la thèse d'A. BOYER (cf. III.2.2, page 96). Le test de détection de la chaux à la phénolphtaléine peut alors être réalisé sur ces poudres chaudes selon le protocole précédemment décrit.

Annexe 3 : Résolution du système de deux équations à deux inconnues pour la détermination des coefficients stœchiométriques des $CO_3 A$ et $CO_3 B$ d'une $C_{AB}HA$ de formule théorique Eq. III-26

Formule théorique simplifiée d'une $C_{AB}HA$ (similaire à Eq. III-4 page 67 et Eq. III-27 page 125 avec $u=0$)



avec x et y les coefficients stœchiométriques des ions carbonates en site B et en site A.

L'expression des pourcentages massiques en $CO_3 A$ et $CO_3 B$ présents dans une $C_{AB}HA$ peuvent alors s'écrire comme suit :

$$\left. \begin{aligned} \%_{massique}(CO_3 B) &= \frac{m(CO_3 B)}{m(C_{AB}HA)} = \frac{n(CO_3 B) \times M(CO_3)}{n(C_{AB}HA) \times M(C_{AB}HA)} \\ \%_{massique}(CO_3 A) &= \frac{m(CO_3 A)}{m(C_{AB}HA)} = \frac{n(CO_3 A) \times M(CO_3)}{n(C_{AB}HA) \times M(C_{AB}HA)} \end{aligned} \right\} \text{Système III-1}$$

Autrement dit, pour une mole de $C_{AB}HA$, le système d'équations III-1 peut se réécrire

$$\left. \begin{aligned} \%_{massique}(CO_3 B) &= \frac{x \times M(CO_3)}{(10-x)M(Ca) + (6-x)M(PO_4) + (x+y)M(CO_3) + (2-x-2y)M(OH)} \\ \%_{massique}(CO_3 A) &= \frac{y \times M(CO_3)}{(10-x)M(Ca) + (6-x)M(PO_4) + (x+y)M(CO_3) + (2-x-2y)M(OH)} \end{aligned} \right\} \text{Système III-2}$$

avec x et y nos inconnues.

Exprimons l'inconnue y en fonction comme fonction de x et des données connues en utilisant la seconde équation du système III-2 :

$$y \times M(CO_3) = \%_{massique}(CO_3 A) \times [(10-x)M(Ca) + (6-x)M(PO_4) + (x+y)M(CO_3) + (2-x-2y)M(OH)]$$

$$y \times M(CO_3) - \%_{massique}(CO_3 A) \times [-xM(Ca) - xM(PO_4) + (x+y)M(CO_3) + (-x-2y)M(OH)] = \%_{massique}(CO_3 A) \times [10M(Ca) + 6M(PO_4) + 2M(OH)]$$

$$y = \%_{\text{massique}}(CO_{3A}) \times \frac{M(HA) - x [M(Ca) + M(PO_4) - M(CO_3) + M(OH)]}{M(CO_3) + [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3A})}$$

De même, l'équation 1 du système III-2 peut se réécrire

$$\begin{aligned} & \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \times M(HA) \\ &= x \times [M(CO_3) + [M(Ca) + M(PO_4) - M(CO_3) + M(OH)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3B})] \\ &+ y \times [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \end{aligned}$$

Remplaçons y par son expression dans l'équation précédente

$$\begin{aligned} & \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \times M(HA) \\ &= x \times [M(CO_3) + [M(Ca) + M(PO_4) - M(CO_3) + M(OH)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3B})] \\ &+ \%_{\text{massique}}(CO_{3A}) \times \frac{M(HA) - x [M(Ca) + M(PO_4) - M(CO_3) + M(OH)]}{M(CO_3) + [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3A})} \\ &\quad \times [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \end{aligned}$$

Exprimons l'inconnue x en fonction comme fonction des données connues

$$\begin{aligned} & \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \times M(HA) \\ &= x \\ &\times \left[M(CO_3) + [M(Ca) + M(PO_4) - M(CO_3) + M(OH)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \right] \\ &\times \left[1 - \frac{\%_{\text{massique}}(CO_{3A}) \times [2M(OH) - M(CO_3)]}{M(CO_3) + [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3A})} \right] \\ &+ \frac{\%_{\text{massique}}(CO_{3A}) \times \%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \times M(HA) \times [2M(OH) - M(CO_3)]}{M(CO_3) + [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3A})} \end{aligned} \quad \left. \begin{array}{l} \alpha \\ \beta \end{array} \right\}$$

$$x = \frac{\%_{\text{massique}}(CO_{3B}) \times M(HA) - \beta}{\alpha}$$

Pour chaque poudre d'hydroxyapatite carbonatée, la valeur de x est alors calculée grâce aux pourcentages massiques en CO_{3A} et CO_{3B} déterminés expérimentalement. La valeur de y est déduite grâce à l'expression suivante

$$y = \%_{\text{massique}}(CO_{3A}) \times \frac{M(HA) - x [M(Ca) + M(PO_4) - M(CO_3) + M(OH)]}{M(CO_3) + [2M(OH) - M(CO_3)] \times \%_{\text{massique}}(CO_{3A})}$$

NNT : 2016LYSEM031

Baptiste CHARBONNIER

ELABORATION OF CARBONATED PHOSPHOCALCIC APATITES: DEVELOPMENT OF A CHARACTERIZATION METHOD AND A MANUFACTURING PROCESS.

Specialty: Process Engineering

Keywords: Bone, Bioceramics, Calcium phosphates, Carbonated hydroxyapatites, Infrared spectroscopy, Additive manufacturing

Summary:

The current approach to produce biomaterials tends to evolve due to societal change such as the development of personalized medicine or the eagerness to better understand bone biology. Hence, biomaterials, which specifications depends of their intended applications, have to be custom made. For bone tissue engineering, this implies to control the scaffold architecture and behaviour in a biological environment (e.g. biodegradability).

Despite their indisputable qualities, the use of hydroxyapatite (HA) bioceramics tend to be limited to basic applications (e.g. filling small defects) because of biodegradation, osteoconduction, or osteoinduction properties that do not match the actual needs. To exceed these limitations, we explored two modifications paths to tune HA biologic properties: a “chemical” approach based on incorporation of carbonate ions into apatitic structure, and a “process” approach, built around additive manufacturing singular potential.

Carbonated phosphocalcic hydroxyapatites (CHA) powders were prepared. As carbonate ions may occupy HA hydroxyl and phosphate sites, a selective method to quantify their ratio in each site by IR spectroscopy has been developed. This innovative spectroscopic method opens numerous opportunities for applied and fundamental studies of CHA, but could also be considered as a precious standard for a future release of CHA medical devices (e.g. ISO norm).

A cheap, flexible, robust and reliable manufacturing process based on an additive manufacturing technology has been developed and optimized, leading to the production of bioceramics with complex architectural features (accuracy $\approx 5 \mu\text{m}$).

This manufacturing process has been implemented in biological studies with fundamental and therapeutic purposes.

NNT : 2016LYSEM031

Baptiste CHARBONNIER

DÉVELOPPEMENT DE PROCÉDÉS DE MISE EN FORME ET DE CARACTÉRISATION POUR L'ÉLABORATION DE BIOCÉRAMIQUES EN APATITES PHOSPHOCALCIQUES CARBONATÉES

Spécialité : Génie des Procédés

Mots clés : Os, Biocéramiques, Phosphates de calcium, Hydroxyapatites carbonatées, Spectroscopie infrarouge, Fabrication additive

Résumé :

Les changements sociétaux tels que la personnalisation de la médecine, ainsi que la volonté de mieux comprendre la biologie de l'os modifie notre approche de fabrication des biomatériaux. Ces derniers se doivent ainsi d'être sur-mesure, c'est-à-dire capables de répondre à une problématique particulière. Ceci implique plus précisément dans le cas qui nous intéresse, à savoir l'os, la maîtrise de leur architecture et de leur comportement en milieu biologique (e.g., biodégradabilité).

Malgré leurs atouts incontestables pour ce domaine, les biocéramiques en hydroxyapatite (HA) restent cantonnées à des usages modestes (e.g., comblement de petits défauts) ; en cause, des propriétés de biodégradation, d'ostéoconduction ou encore d'ostéoinduction souvent inadaptées aux problématiques contemporaines. Pour pallier ces limitations, nous avons entrepris deux voies de modulation des propriétés biologiques de l'HA, une voie « chimique », basée sur l'incorporation d'ions carbonate dans la structure apatitique, et une voie « procédé », reposant sur le potentiel de la fabrication additive.

Des poudres d'hydroxyapatites phosphocalciques carbonatées (CHA) ont été préparées. Les ions carbonate pouvant occuper les sites hydroxyle et phosphate de l'HA, une méthode de quantification sélective du taux de substitution sur chacun de ces sites a été mise au point. Cette méthode spectroscopique novatrice ouvre de nombreuses opportunités d'études appliquées et fondamentales des CHA, abordées dans ce manuscrit, et constitue également un outil qui pourrait se révéler précieux dans l'optique de mise sur le marché de dispositifs médicaux en CHA (e.g., norme ISO).

Basé sur une technologie de fabrication additive, un procédé de fabrication de biocéramiques d'architecture complexe, reproductible, flexible, fiable, de haute précision ($\approx 5 \mu\text{m}$) et peu coûteux, a été développé et optimisé. Cet outil de fabrication a été mis en œuvre pour répondre à des questions biologiques à finalité fondamentale et thérapeutique.