



HAL
open science

Élaboration de bioverres et de nano-bioverres ostéoinducteurs associés à des molécules à usage thérapeutique

Nicolas Rocton

► **To cite this version:**

Nicolas Rocton. Élaboration de bioverres et de nano-bioverres ostéoinducteurs associés à des molécules à usage thérapeutique. Matériaux. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1S086 . tel-02873917

HAL Id: tel-02873917

<https://theses.hal.science/tel-02873917>

Submitted on 18 Jun 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Sciences des Matériaux

Par

Nicolas ROCTON

Élaboration de bioverres et de nanobioverres ostéoinducteurs associés à des molécules à usage thérapeutique

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 04 Décembre 2019
Unité de recherche : UMR CNRS 6226 Institut des Sciences Chimiques de Rennes
Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance : Composition du Jury :

Claudine Follet	Professeure à l'Université Polytechnique Hauts-de-France	Claudine Follet	Professeure à l'Université Polytechnique Hauts-de-France
Hicham Benhayoune	Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne	Hicham Benhayoune	Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne
		Hassib Keskes	Professeur à la faculté de Médecine de l'Université de Sfax, Tunisie
		Bruno Bureau	Professeur à l'Université de Rennes 1
		Pascal Pellen	Ingénieur de recherche à la faculté d'Odontologie de l'Université de Rennes 1
		Directeur de thèse :	
		Hassane Oudadesse	Professeur à l'Université de Rennes 1

« Pour ce qui est de l'avenir, il ne s'agit pas de le prévoir, mais de le rendre possible. »

Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Monsieur Jean-Luc Adam et à Monsieur Marc Fourmigué, tous deux directeurs de l'UMR CNRS 6226 Institut des Sciences Chimiques de Rennes « ISCR » pendant le déroulement de ma thèse. Je souhaite également remercier Monsieur Zhang Xiang-Hua, responsable de l'équipe Verres et Céramiques, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire pendant la durée de ma thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur Hassane Oudadesse, Professeur à l'UMR CNRS 6226 « ISCR » dans l'équipe Verre et Céramiques de l'Université de Rennes 1 et directeur de cette thèse pour m'avoir accueilli au sein de son groupe. Je le remercie pour sa disponibilité et sa volonté de toujours mieux faire rendant ainsi cette thèse possible. Une volonté qu'il transmet avec plaisir et humanité à son entourage. La confiance et les encouragements qu'il m'a apportés ont véritablement été un moteur pour moi durant ces trois années. Il a toute ma gratitude, mon estime, et ma considération.

Je suis honoré que Madame Claudine Follet, Professeure au laboratoire Matériaux, Céramiques et Procédés Associés de l'Université Polytechnique Hauts-de-France ait pris part à ce jury en qualité de rapporteuse.

Je suis également honoré que Monsieur Hicham Benhayoune, Professeur au sein de l'INSERM UMR-S 926 Interface Biomatériaux – Tissus Hôtes de l'Université de Reims Champagne Ardenne ait pris part à ce jury en qualité de rapporteur.

Que Messieurs Hassib Keskes, Professeur, directeur et chef du service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologie de la faculté de Médecine de l'Université de Sfax en Tunisie, Bruno Bureau, Professeur à l'UMR CNRS 6226 « ISCR » dans l'équipe Verre et Céramiques de l'Université de Rennes 1, et Pascal Pellen, Ingénieur de recherche à la faculté d'Odontologie de l'Université de Rennes 1, reçoivent ici le témoignage de ma reconnaissance pour avoir participé au jury.

J'exprime toute ma gratitude et mon amitié à Bertrand Lefevre et tous mes remerciements à Anita Lucas-Girot, membres de l'équipe Biomatériaux, pour tous les moments passés ensemble.

Remerciements

Je les remercie pour leur aide, leur soutien, leur gentillesse et leur bonne humeur. Merci également aux collègues de la faculté d'Odontologie pour la réalisation des tests de cytotoxicité et pour leurs conseils.

Je remercie Francis Gouttefangeas, Loïc Joanny et Christophe Calers pour leur aide dans l'utilisation des microscopes électroniques à balayage. J'exprime mes remerciements à François Cheviré et à Franck Tessier pour la réalisation des nombreux diffractogrammes qui sont présents dans ce tapuscrit. Mes remerciements vont également à Odile Merdrignac-Conanec et à Nathalie Herbert pour la réalisation des mesures BET.

Je suis également très heureux d'avoir partagé le bureau 118 pendant ces 3 années avec Sanaa, Jihen, Zineb, Ibtissam, Latifa, Hanaa, Nourhene, et Nada toutes doctorantes en chimie et les stagiaires : Nicolas, Daphné et Clara.

J'exprime toute mon amitié à Fabrice, Vincent, Olivier C, Olivier G, Stéphane, Grégory, Ludivine, Marie, Ludovic et Emmanuelle. Merci beaucoup pour avoir donné un caractère très humain à mon séjour au laboratoire et pour tous les moments passés ensemble.

Un très grand merci à Jessica, Rajaa et Mehdi, pour m'avoir aidé et soutenu dans mon quotidien tout au long de cette thèse et d'avoir été des amis exceptionnels, pleins de bonne humeur et de sympathie. Je tenais à remercier tous les membres d'Acid ISCR particulièrement les autres membres fondateurs et le bureau qui a suivi pour leurs engagements et leurs conseils, ce sont des expériences d'où je suis sorti grandi.

Merci également à Sophie, Lucie et Margaux pour leur soutien moral malgré la distance. Je souhaite également remercier Manue pour sa présence motivante, et Aurélie pour son aide précieuse et ses encouragements. Merci à Pierre-Anthony et Alexis pour leurs soutiens et les moments de complicité partagés malgré la distance, et à Hilaria, Gopperus, Indicast et Naga pour leur présence quotidienne et leur acharnement à déformer mes recherches. Ma gratitude va également à Marie L qui m'aura supporté dans la période la plus compliquée de ce projet.

Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien indéfectible de ma maman, Laure, de mes frères, Paul, Axel et Jason et de ma mamy Michelle qui, par leurs pensées et leurs présences m'ont emmené aussi loin dans mes ambitions et mes rêves.

Sommaire

Introduction générale.....	7
Chapitre 1 : Étude bibliographique : Le tissu osseux et les biomatériaux.....	13
I. Définition du tissu osseux	15
A. Caractéristique du squelette osseux.....	15
B. Organisation du tissu osseux	16
C. Composition chimique et biologique du tissu osseux	18
D. Renouvellement du tissu osseux.....	23
E. Conclusion.....	24
II. Les biomatériaux de comblement osseux.....	25
A. Généralités et définitions	25
B. Concept de biocompatibilité.....	26
C. Les différents types de biomatériaux.....	26
III. Les verres bioactifs : biomatériaux d'origine synthétique	33
A. Généralités sur les verres.....	33
B. Concept de bioactivité	38
C. Différentes voies de synthèse	42
D. Matériaux dopés, composites et hybrides à base de verre bioactif.....	43
Chapitre 2 : Protocoles de synthèse et méthodes d'analyses physico-chimiques	55
I. Synthèses des biomatériaux étudiés : verres et nanoverres bioactifs	57
A. Synthèse par fusion des verres bioactifs purs et dopés par fusion.....	57
B. Synthèse des nanoverres bioactifs par voie sol-gel : émulsion.....	59

Sommaire

C.	Extraction de la phycocyanine, un pigment de la spiruline	63
D.	Associations nanoverre bioactif/phycocyanine et nanoverre bioactif/spiruline	64
II.	Techniques, protocoles d'analyses et de caractérisations physico-chimiques	65
A.	Analyse structurale par diffraction des rayons X (DRX)	65
B.	Identification des groupements fonctionnels par spectroscopie d'absorption infrarouge (FT-IR)	66
C.	Calcul des concentrations par spectrophotométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis).....	67
D.	Étude de la composition chimique par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)	69
E.	Mesure de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	70
F.	Caractérisation des propriétés thermiques par analyses différentielles ou thermogravimétriques.....	71
G.	Mesure de la porosité : Méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET)	72
H.	Étude de la morphologie par microscopie électronique à balayage (MEB)	73
I.	Analyse de l'état de surface par microscopie à force atomique (AFM).....	74
III.	Évaluation de la bioactivité : Tests <i>in Vitro</i>	75
A.	Étude <i>in vitro</i> en l'absence de cellules	75
B.	Étude <i>in vitro</i> en présence de cellules : tests de viabilité cellulaire	79
IV.	Évaluation biologique : Test <i>in vivo</i>	83
A.	Mise en forme des biomatériaux	83
B.	Implantation des biomatériaux : Etude <i>in vivo</i> chez un modèle animal à pertes osseuses induites	84
 Chapitre 3 : Études physico-chimiques et biologiques des verres bioactifs synthétisés par fusion		
91		
I.	Synthèses et caractérisations des verres bioactifs purs et dopés.....	93
A.	Composition chimique des verres bioactifs étudiés	93

Sommaire

B.	Caractérisation physico-chimique des verres synthétisés.....	96
C.	Conclusion.....	98
II.	Étude du comportement thermique des verres dopés en fonction de la teneur en dopant.....	99
A.	Analyse thermique différentielle des verres	99
B.	Excès d'entropie et influence des teneurs en dopants	108
C.	Conclusion.....	112
III.	Étude de la surface du 46S6 après immersion dans le SBF pour différentes durées : Etude <i>in vitro</i> en l'absence de cellule	113
A.	Introduction et préparation des échantillons de verre bioactif 46S6	113
B.	Caractérisation par différentes techniques de la surface immergée dans un liquide physiologique synthétique.....	114
C.	Analyse par ICP-OES des échanges ioniques entre le verre bioactif 46S6 et un liquide physiologique synthétique.....	118
D.	Conclusion.....	119
Chapitre 4 : Processus de contrôle de la taille des nanoparticules de verre bioactif et leurs caractérisations physico-chimiques		123
I.	Processus de contrôle de la taille des nanoparticules de verre bioactif.....	125
A.	Introduction à la méthode sol-gel de l'émulsion	125
B.	Contrôle de la taille des nanoparticules synthétisées.....	127
II.	Caractérisation physico-chimique des particules de verres obtenues par sol-gel ..	130
A.	Vérification de la composition du verre synthétisé	130
B.	Étude morphologique	131
C.	Caractérisations structurales	132
D.	Analyses thermiques.....	134
E.	Évaluation de la surface spécifique en fonction de la taille des nanoparticules.....	135

III. Comportement <i>in vitro</i> du nano verre bioactif en l'absence de cellule	136
A. Évolution cristallographique après immersion dans le liquide biologique synthétique	136
B. Étude des échanges ioniques entre les NBG et le SBF.....	137
C. Effet de la taille des particules sur la cinétique de réactivité chimique.....	138
IV. Études de la cytotoxicité	141
V. Conclusion.....	142

Chapitre 5 : Caractérisations physico-chimiques des matériaux bioactifs hybrides : nanoverre/spiruline et nanoverre/phycoyanine 147

I. Caractérisation de la spiruline et extraction de la phycoyanine	150
A. Caractérisation physico-chimique de la spiruline.....	150
B. Protocole d'extraction, rendement et pureté de la phycoyanine	152
II. Caractérisations physico-chimiques des matériaux bioactifs hybrides : nanoverre/spiruline et nanoverre/phycoyanine avant immersion	154
A. Analyses et taux d'association.....	155
B. Caractérisation structurale	156
III. Caractérisation des verres hybrides après les tests <i>in vitro</i> sans cellule.....	157
A. Caractérisation structurale	157
B. Détermination des échanges ioniques entre les biomatériaux et le milieu d'immersion	159
IV. Tests de viabilité cellulaire de l'hybride NBG-S	160
V. Conclusion.....	161

Chapitre 6 : Interactions nanoverre bioactif pur et matériau hybride (nanoverre/spiruline) avec l'environnement osseux : Etudes physico-chimiques et biologiques post *in vivo* 165

I. Modèle animal et implantations en site osseux.....	167
II. Caractérisations physico-chimiques des bioimplants après implantation	168
A. Étude morphologique par microscopie électronique à balayage	168
B. Analyse structurale par diffraction des rayons X des zones d'implantations.....	173
C. Détermination de l'évolution de la composition chimique des bioimplants en fonction du temps d'implantation.....	175
III. Etude histologique de l'impact des implants sur l'environnement du tissu osseux	178
IV. Discussion	185

Chapitre 7 : Revêtement par le nanoverre bioactif pur de disques d'alliage Ti6Al4V à usage biomédicale..... 191

I. Introduction à l'électrophorèse.....	193
A. Introduction générale.....	193
B. Mécanisme de formation de la charge.....	194
C. Formation et cinétique de déposition.....	196
II. Matériel et conditions expérimentales.....	199
A. Choix de l'alliage et préparation des disques en Ti6Al4V	199
B. Préparation de la suspension.....	200
C. Matériel et conditions expérimentales.....	201
III. Résultats et discussion.....	202
A. Effet de la taille des particules de NBG sur le dépôt à la surface du disque d'alliage	202
B. Effet de la tension électrique sur le dépôt à la surface du disque d'alliage.....	204
C. Caractérisation structurale par diffraction des rayons X des dépôts à la surface des disques d'alliage.....	206
IV. Conclusion.....	207

Sommaire

Conclusion générale	211
Perspectives.....	217
Annexes	221
Annexe I : Origine et pureté des composants des synthèses.....	223
Annexe II : Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)	224
Annexe III : Principe de la théorie Brunauer, Emmett et Teller (BET)	227
Annexe IV : Principe de la microscopie électronique à balayage (MEB)	229
Annexe V : Principe de la microscopie à forces atomiques (AFM)	231
Annexe VI : Synthèse du Simulated Body Fluid (SBF)	233
Publications.....	2334

Introduction générale

Introduction générale

Le corps humain comporte 206 os chez l'adulte et 270 chez le nourrisson. Ces os constituent le squelette, élément vital du corps par bien des aspects. Ceux-ci lui fournissent une forme extérieure, supportent et protègent ses parties molles. D'un point de vue mécanique, ils fournissent les bras de levier permettant aux muscles de créer des mouvements. En plus de leurs propriétés protectrices, les os sont également des réserves en calcium nécessaires pour le bon fonctionnement du système sanguin, la calcification des os, ainsi que le lieu de création de nombreux éléments essentiels au bon fonctionnement du corps humain.

Malgré les capacités de régénération continue du squelette, il arrive que celui-ci subisse des dégâts nécessitant une intervention extérieure. En effet, une fracture ou une autre perte de substance osseuse entraînée par un traumatisme ou par une pathologie peuvent conduire à l'altération des fonctionnalités du tissu osseux. Afin de résoudre ce problème, des professionnels de santé effectuent des actes médicaux de comblement ou de substitution du site osseux altéré. C'est dans ce cadre que ces matériaux sont essentiels pour une restauration efficace de toutes les fonctions du tissu endommagé.

Il existe de nombreux matériaux de restauration, mais la croissance démographique et les niveaux d'exigence sanitaire ont entraîné des demandes croissantes de matériaux de greffe sains. C'est pourquoi le développement de nouveaux biomatériaux synthétiques a fait d'importants progrès au cours des dernières années. Ceux-ci possèdent, en plus de leur capacité à se lier à l'os, celle de stimuler le processus de régénération osseuse. Les nouvelles découvertes chimiques et pharmaceutiques permettent de fonctionnaliser les surfaces en les transformant en véritables vectrices pour des traitements à base de molécules à intérêt physiologique. Ainsi, chirurgiens, biologistes, physiciens et chimistes travaillent en étroite collaboration sur de nouvelles générations de biomatériaux permettant à la médecine de continuer à améliorer les conditions de vie des humains au niveau du domaine des substituts osseux. Ces développements entraînent également diverses avancées dans d'autres domaines tels que : l'odontologie, l'ostéologie, la cardiologie, ou encore l'ophtalmologie.

Cette thèse est centrée sur l'élaboration et la caractérisation de biomatériaux. Elle a été effectuée au sein de l'équipe « Verres et Céramiques » dans le groupe biomatériaux de l'UMR-CNRS 6226 Institut des sciences chimiques de Rennes sous la direction du professeur Hassane Oudadesse.

Ce travail est la continuité des recherches effectuées dans notre groupe sur l'étude et le développement de biomatériaux de comblement et de substitution osseux. Cette thèse s'inscrit dans une thématique de recherche multidisciplinaire faisant intervenir chimistes, biologistes, physiciens et chirurgiens. Son sujet est le développement, l'étude physico-chimique et l'évaluation biologique de verres bioactifs micrométriques et nanométriques purs ou dopés à l'aide d'éléments ou de molécules à intérêt physiologique.

Les verres bioactifs utilisés pour le comblement osseux ont été conçus pour avoir la capacité de se lier à l'os. Cette liaison est le fruit d'une série de réactions physico-chimiques se produisant à l'interface verre/tissu osseux. Cette série de réactions est liée au mécanisme du renouvellement du tissu osseux et permet la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface du verre. Elle cristallise par la suite pour former une phase similaire à la phase minérale majoritaire de l'os : l'hydroxyapatite carbonatée. L'intérêt principal des verres bioactifs en tant que matériaux pour le comblement ou la substitution osseuse est leur capacité à former un lien solide entre le verre et le tissu osseux *via* la formation de cristaux d'hydroxyapatite. En effet, ceux-ci renforcent les liaisons entre l'implant et l'os et favorisent donc la bio-consolidation tout en apportant des ressources utiles à la repousse osseuse. C'est donc cette bioactivité des matériaux utilisés qui rend pertinente leur utilisation dans le domaine des biomatériaux en site osseux.

Ce travail s'est orienté suivant trois axes complémentaires :

i) Un objectif était d'effectuer des synthèses de verres bioactifs possédants des tailles variables. Ces échantillons, dont les tailles vont du massif macrométrique de 13 mm sur 8 mm aux particules nanométriques de 20 à 200 nm. Ils ont été obtenus en utilisant différentes méthodes de synthèse complémentaires telles que la méthode sol-gel et la méthode par fusion. Une fois les synthèses des différentes compositions et tailles de verre effectuées, celles-ci ont été caractérisées par des analyses physico-chimiques avant et après leur immersion dans un liquide physiologique minéral dont la composition chimique est proche de celle du plasma sanguin. Ces biomatériaux ont également été caractérisés par le biais d'études *in vitro* en milieu cellulaire pour s'assurer de la biocompatibilité des matériaux synthétisés, mais également pour évaluer la prolifération cellulaire au contact du matériau. Une fois tous les matériaux caractérisés, nous avons étudié l'influence de l'ajout d'éléments chimiques ou de molécules de principe actif sur la bioactivité et leurs effets sur la biocompatibilité de nos matériaux. Deux études ont été menées en parallèle.

Une première étude basée sur l'effet de l'ajout d'éléments chimiques dans la matrice vitreuse de verres bioactifs et sur leurs caractéristiques thermiques ainsi que sur leurs stabilités thermodynamiques. Cette étude a pour objectif d'évaluer les modifications physico-chimiques que l'ajout de ces éléments dans la matrice du verre engendrent. Un objectif secondaire est également la création d'une base de données rassemblant les effets de l'ajout de différents éléments métalliques dans la matrice vitreuse du verre de référence étudiée dans notre groupe.

ii) L'étude que nous avons effectuée en parallèle est l'extraction d'une molécule de principe actif utile pour la régénération osseuse en améliorant la qualité de l'os néoformé. Cette molécule provient d'une ressource disponible en abondance en Bretagne : les algues rouges. Une fois la molécule obtenue et purifiée, celle-ci ainsi que toute l'algue utilisée pour le processus d'extraction, ont été associées afin de créer deux nouveaux matériaux hybrides. Ceux-ci sont composés du verre bioactif nanométrique couplé soit à l'algue, soit au composé extrait de l'algue. Ils ont ensuite été caractérisés par des analyses physico-chimiques et biologiques identiques à celles effectuées sur les verres seuls afin de permettre une étude comparative des trois matériaux et de l'effet de chacun des éléments ajoutés.

iii) Les matériaux bioactifs hybrides et le verre bioactif nanométrique seul ont été mis en forme pour faire l'objet de tests *in vivo* dans le cadre d'une expérimentation sur le système osseux de rongeurs. Ce travail a été effectué dans le cadre d'une collaboration internationale avec la faculté de médecine de Sfax en Tunisie et le Professeur Keskes ainsi que le Docteur Mosbahi. Parallèlement à ces tests *in vivo*, les particules de verre bioactif de taille contrôlée élaborées dans le premier axe ont été utilisées dans le cadre du recouvrement de prothèses médicales métalliques par une méthode novatrice : l'électrophorèse.

Afin de développer ces différents axes de recherche, nous avons organisé ce travail en sept chapitres.

Le premier chapitre est un résumé des considérations générales de la structure et du fonctionnement du tissu osseux. Cette partie contient également une présentation des différents biomatériaux, du verre bioactif qui est le centre de cette étude, ainsi que des précisions sur le choix des différents éléments et principes actifs utilisés au cours de ce travail.

Le second chapitre présente les différents protocoles de synthèses des verres que nous avons élaborés ainsi que les méthodes physico-chimiques et biologiques ayant servies aux différentes analyses et caractérisations.

Les protocoles expérimentaux de ces différentes analyses ainsi que leur fonctionnement y sont exposés. Les protocoles de mise en forme des matériaux et les détails techniques des opérations *in vivo* sont également présentés dans cette partie.

Le troisième chapitre regroupe tous les travaux et les résultats concernant les verres obtenus par la méthode de fusion. Ceux-ci ont été exploités sous la forme de cylindres de verre ou de poudres. Une étude thermodynamique et une étude de l'évolution de la surface des verres au cours de l'immersion dans un liquide physiologique synthétique y sont présentées, en plus de leurs caractérisations physico-chimiques.

Le quatrième chapitre est consacré à la synthèse et la caractérisation des particules de verre bioactif de plusieurs tailles nanométriques. Cette partie a surtout porté sur la maîtrise de la taille des particules synthétisées par une méthode sol-gel basée sur le principe de l'émulsion. Une fois les particules obtenues, celles-ci ont été caractérisées au niveau physico-chimique, et leur bioactivité a été vérifiée. La cytotoxicité de nos particules a également été étudiée avec la collaboration du service d'odontologie et du Professeure Jeanne ainsi que des Docteurs Pellen et Bunetel.

Le cinquième chapitre concerne le travail effectué sur l'extraction du principe actif de l'algue sélectionnée pour ce travail de thèse. L'élaboration de deux hybrides verre/algue et verre/principe actif a entraîné une étude sur leurs caractérisations physico-chimiques, leur bioactivité et leur cytotoxicité. Ces études ont permis la mise en place d'une comparaison entre ces matériaux et le verre bioactif seul.

Le sixième chapitre expose tous les résultats physico-chimiques et les études biologiques effectuées sur les trois biomatériaux : le verre bioactif nanométrique seul, et les deux hybrides à base du verre nanométrique associé au principe actif extrait dans un cas et à l'algue entière dans l'autre cas. Ces résultats proviennent des expérimentations *in vivo* réalisées sur le modèle animal du rongeur.

Le septième chapitre est centré sur les essais préliminaires de déposition par électrophorèse de particules de taille contrôlée de verre bioactif sur des disques d'un alliage métallique médical. Les résultats portent sur la caractérisation physico-chimique des dépôts de verre obtenus par cette méthode.

À la fin de ce tapuscrit se trouve une conclusion générale et les perspectives que ce travail de thèse ouvre.

Chapitre 1 : Étude bibliographique :
Le tissu osseux et les biomatériaux

Chapitre 1 : Étude bibliographique : Le tissu osseux et les biomatériaux

I. Définition du tissu osseux

Le tissu osseux est caractérisé par une matrice minéralisée et rigide. La constitution de l'os est un assemblage des tissus suivants : la moelle, le périoste et le cartilage. Cet assemblage fait également intervenir un ensemble de protéines et de cellules diverses. Le tissu osseux est vascularisé, en permanent remaniement, et est essentiel au bon fonctionnement d'un être vivant. Cependant, il peut subir un traumatisme ou une pathologie entraînant une possible perte ou détérioration de celui-ci. Ces événements peuvent entraîner l'altération ou l'arrêt d'une ou plusieurs fonctions du tissu osseux. Pour remédier à ces problèmes, les praticiens procèdent à une restauration ou un remplacement du tissu altéré. L'objectif est d'abord de comprendre le rôle, les capacités, l'organisation et la composition du tissu osseux avant de chercher des moyens de substitution ou de comblement.

A. Caractéristique du squelette osseux

Le tissu osseux a différentes fonctions au sein du corps [1] :

- Un rôle dans la protection : Le système nerveux central est protégé par la boîte crânienne et les vertèbres. La protection d'organes vitaux est également assurée par des os plus souples *via* la cage thoracique.
- Un rôle dans le métabolisme : Il permet le maintien et le stockage de ressources nécessaires au bon fonctionnement du corps. Le squelette humain contient 99 % du calcium et 90 % du phosphore présents dans l'organisme lui permettant de jouer un rôle capital dans le maintien de la vie cellulaire, la transmission nerveuse ou encore la coagulation sanguine [2].

- Un rôle dans la synthèse sanguine : La moelle osseuse située au sein de l'os spongieux, contient les cellules responsables de la synthèse de toutes les lignées de cellules sanguines.
- Un rôle de soutien biomécanique : Le tissu osseux est la matrice de l'os permettant à celui-ci d'être à la fois solide et résistant ($15 \text{ kg}\cdot\text{mm}^{-2}$ et à la traction pour $20 \text{ kg}\cdot\text{mm}^{-2}$). Il est considéré comme un matériau anisotrope et viscoélastique, ces caractéristiques lui permettant de supporter les effets de la pesanteur, et de résister aux contraintes mécaniques extérieures ou intérieures, imposées par les muscles [3].

B. Organisation du tissu osseux

1. Propriétés structurales

La structure principale de l'os est initialement réticulaire puis avec le temps devient lamellaire. Une trame collagénique peu ordonnée et minéralisée de façon irrégulière est caractéristique de l'os fibreux ou réticulaire, les fibres de collagène y sont réparties de façon inégale. Cet os se forme rapidement, sans matrice préalablement établie et est mécaniquement plus faible que l'os lamellaire. On le retrouve naturellement dans les organismes en cours de développement tels que les fœtus ou lors de la réparation de défauts osseux telle qu'une fracture. Il est progressivement remplacé par l'os lamellaire.

L'os lamellaire est mécaniquement plus résistant, cela est dû à sa constitution en lamelles chacune mesurant 2 à 7 microns d'épaisseur. Ces lamelles renferment les cellules osseuses (ostéocytes) entourées par une matrice minéralisée. La presque totalité des os chez un individu adulte est de type lamellaire [3].

Le tissu osseux est composé de deux types de structures composées de ces lamelles [1]. Celles-ci sont réparties de façons à former deux structures différentes. La première structure est un alignement en parallèle de ses lamelles constituant des parois, ce sont les lamelles interstitielles. La deuxième est un assemblage de ces mêmes unités de base mais réparties de façon concentrique afin de former un cylindre appelé ostéon. Les ostéons sont centrés sur des vaisseaux sanguins associés à des fibres nerveuses.

2. Organisation architecturale

Un os est constitué de trois couches concentriques de matériaux aux fonctions diverses représentées sur la figure 1.

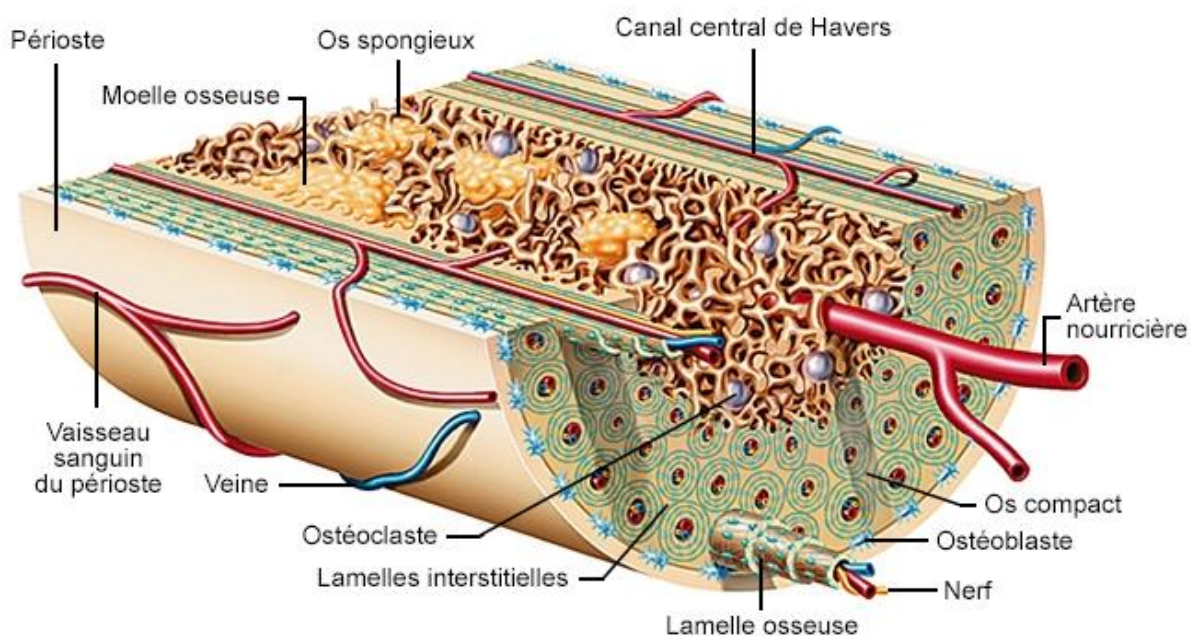


Figure 1 : Coupe longitudinale d'un os [4]

La première couche extérieure est nommée le périoste, c'est un ensemble de trois sous-couches : fibreuse, fibroblastique et ostéoblastique ayant pour objectif d'assurer la protection et la croissance en épaisseur de l'os et de porter l'insertion des tendons et des ligaments sur l'os.

La seconde couche est appelée os compact, lamellaire ou cortical. Celle-ci représente 80 % du squelette et constitue la paroi externe de la phase osseuse. Cette couche est constituée de différents assemblages de lamelles osseuses : les lamelles interstitielles et les formations d'ostéons cylindriques (200 à 300 μm de diamètre) centrées sur des canaux de Havers permettant l'irrigation de l'os. La résistance de l'os cortical dépend de plusieurs paramètres : la direction et la force d'application des contraintes, la géométrie de l'os, et les propriétés de la matrice minéralisée [3].

Finalement, la troisième couche, l'os spongieux ou trabéculaire représente les 20 % restant du squelette d'un adulte. Cet os est formé par un lavis tridimensionnel de lamelles osseuses, délimitant un labyrinthe d'espaces intercommunicants occupés par de la moelle osseuse, des cellules ostéoclastiques, et des vaisseaux sanguins. Il est en perpétuel remaniement afin d'adapter la structure osseuse aux chocs reçus et accueille donc également des ostéoblastes à la surface de sa structure comme présenté sur la figure 2.

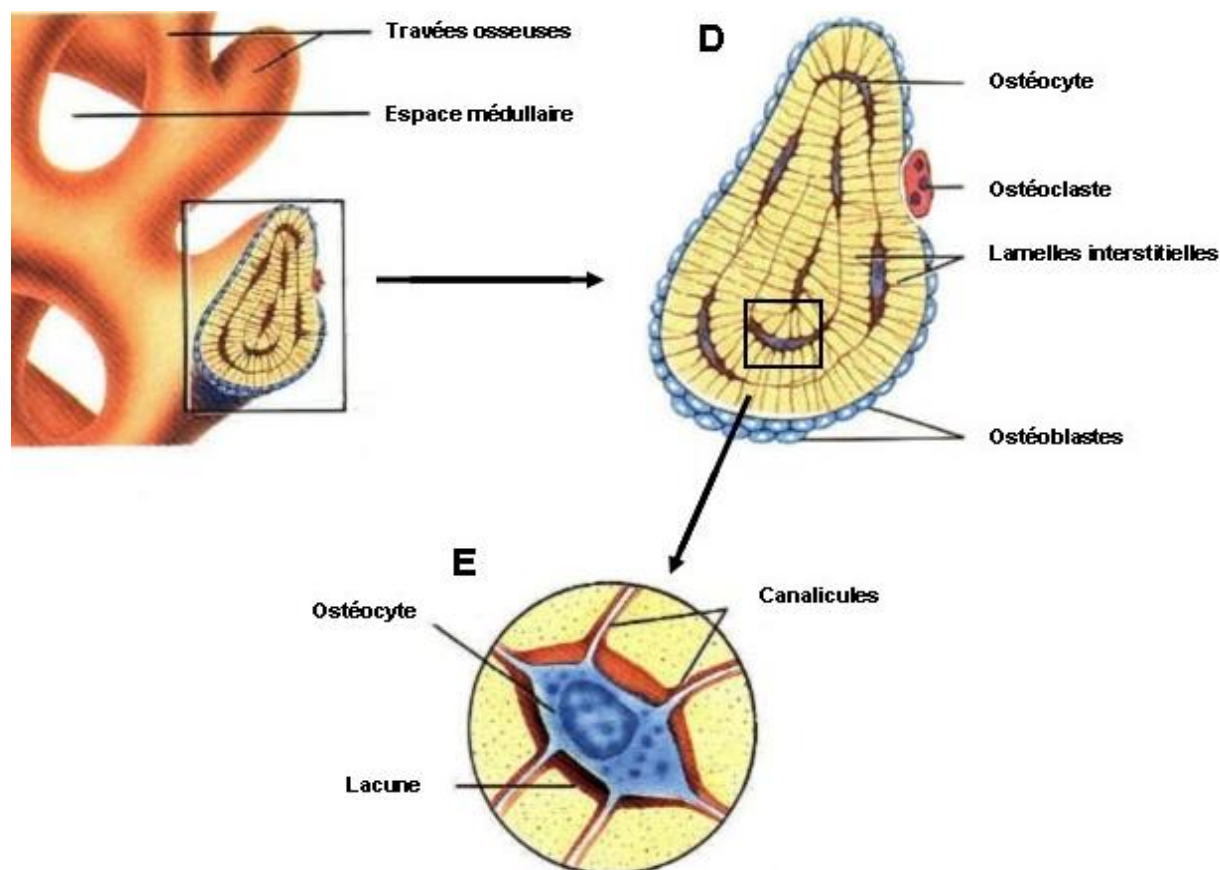


Figure 2 : Représentation de l'os cortical [5]

C. Composition chimique et biologique du tissu osseux

Le tissu osseux est une combinaison complexe de plusieurs substances organiques biologiques et minérales. Il est composé d'une matrice osseuse à l'origine de sa dureté et de sa résistance mécanique, ainsi que de cellules osseuses utiles à son renouvellement.

1. Matrice osseuse : Composition minérale

La matrice osseuse est riche en substances minérales, celles-ci représentent 70 % du poids de l'os sec. Elle est constituée d'une trame de collagène qui est une substance amorphe mais qui permet d'avoir un support de dépôt pour la substance minérale [1], ce qui contribue au renforcement mécanique de l'os au dépend de la flexibilité et de l'élasticité initiale. La matrice osseuse est en perpétuel renouvellement, cet état est dû à l'action des cellules présentes à l'intérieur de l'os [1].

La fraction minérale du tissu osseux représente 99 % du calcium et 90 % du phosphore de l'organisme [1]. Elle est principalement constituée de cristaux de calcium et de phosphore :

- Les cristaux d'hydroxyapatite hydratés mal cristallisés forment de petites plaques hexagonales où se répartissent les groupements ioniques OH^- , Ca^{2+} et PO_4^{3-} . Dans le cas d'une hydroxyapatite parfaite, ces cristaux ont pour formule chimique $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ souvent écrite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ car la maille cristalline hexagonale dipyramidale (de groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$) comprend deux molécules [6]. Sur la surface de ces cristaux hydratés ($130 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) circulent des ions Ca^{2+} labiles permettant de rapides échanges calciques dans le tissu osseux.
- Les sels de calcium, principalement des phosphates de calcium, mais également des bicarbonates, citrates et fluorures de calcium. Le fluor remplace les ions OH^- et augmente la dureté de la matrice comme présenté dans la figure 3. On y retrouve entre autres des traces de magnésium, de baryum et de strontium [1].

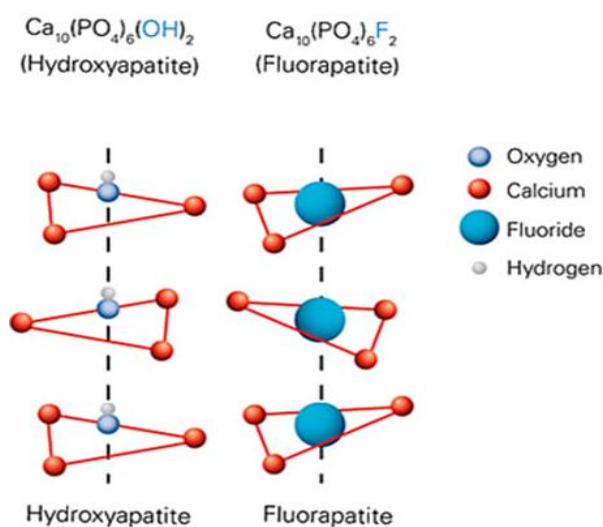


Figure 3 : Crystal d'hydroxyapatite et de fluorapatite [6]

2. Protéines et matières organiques

La matrice organique du tissu osseux est composée majoritairement de collagène de type I. Celui-ci représente 90 % de la matrice organique et détermine la morphologie des pièces osseuses et la variété du tissu osseux [1]. C'est sur cette trame de collagène que se déposent les minéraux, permettant le renforcement mécanique de l'os [1]. Les 10 % restant sont des protéines non collagéniques et sont composées de protéines osseuses (ostéocalcine), de protéines plasmatiques (albumine) et de divers facteurs de croissance.

Ainsi c'est la combinaison des parties organiques et minérales qui permet la formation et le maintien des fonctions de l'os comme montré sur la figure 4.

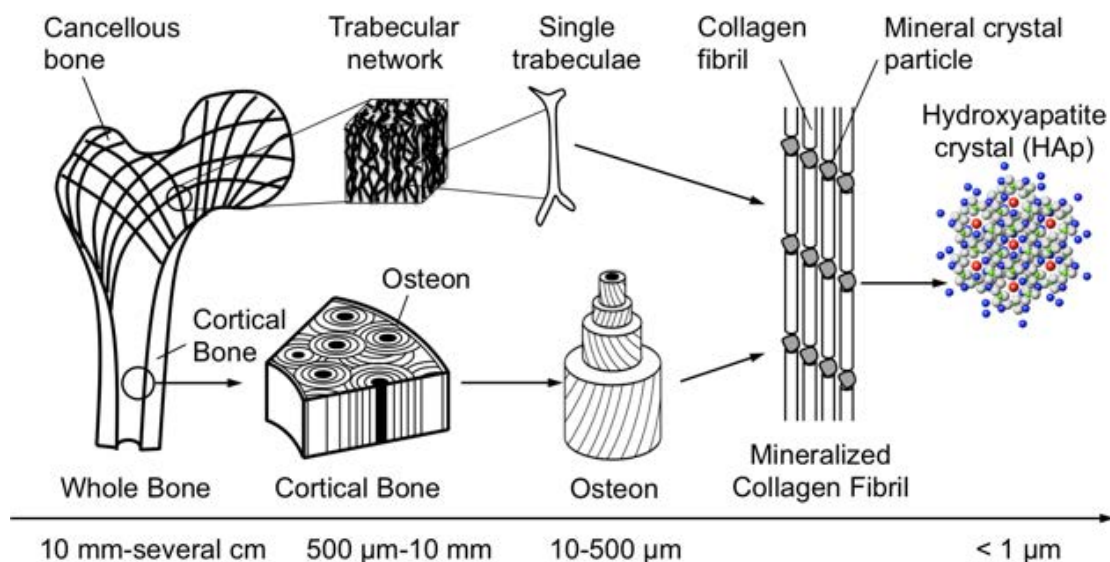


Figure 4 : Schéma de l'association des phases minérales et organiques dans le tissu osseux [7]

3. Cellules osseuses

Le fonctionnement et le renouvellement du tissu osseux sont les résultats de l'équilibre entre les activités de deux populations de cellules : les cellules formatrices et les cellules destructrices du tissu osseux. Elles sont à l'origine du maintien en état de fonctionnement de l'entièreté de ce dernier.

a) Origine des cellules du tissu osseux

Les cellules osseuses trouvent leur origine dans la moelle osseuse qui produit deux grands groupes de cellules souches :

- Les cellules souches de la lignée hématopoïétique qui vont donner les cellules sanguines et immunitaires ainsi que les cellules ostéoclastes (responsables de la résorption du tissu osseux).
- Les cellules souches mésenchymateuses qui sont à l'origine des fibroblastes (cellules responsables du renouvellement du collagène), des cellules endothéliales (responsables de la formation d'une vascularisation) et de la lignée ostéoformatrice (ostéoblastes et chondroblastes).

Notre attention s'est principalement portée sur les cellules ostéoclastiques et ostéoblastiques car ce sont elles qui sont largement responsables du renouvellement osseux.

b) Lignée ostéoclastique

L'ostéoclaste mature est une cellule géante multi nucléée de 100 μm de diamètre en moyenne. Sa partie en contact avec l'os provoque une résorption de la matrice osseuse [1].

La résorption débute par l'adhérence de l'ostéoclaste sur la surface de l'os avec constitution d'une poche hermétique, entre la membrane plissée en bas de la cellule et l'os, dans laquelle l'ostéoclaste relargue notamment des ions H^+ . Il s'ensuit une dissolution de la phase minérale du tissu osseux, suivie d'une élimination de la matrice collagénique sous l'effet d'enzymes [1].

c) *Lignée ostéoblastique*

(1) Ostéoblastes

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdes mononucléées de 20 µm de diamètre, alignées et attachées sur la matrice osseuse et caractérisées par une activité de sept enzymes importantes [1]. Leur fonction principale est de synthétiser la matrice osseuse et de participer à sa minéralisation. Au fur et à mesure que la matrice osseuse est synthétisée et minéralisée, les ostéoblastes deviennent moins actifs et changent de forme en s'aplatissant. Certains ostéoblastes s'incorporent à l'os nouveau et deviennent des ostéocytes [1].

(2) Ostéocytes

Environ 10 % des ostéoblastes matures se retrouvent piégés dans la matrice minéralisée et deviennent des ostéocytes [1].

L'ostéocyte est une cellule étoilée possédant de très nombreux prolongements cytoplasmiques qui cheminent à travers un réseau de canalicules creusé dans la matrice osseuse et baigné de liquide extracellulaire.

Ce réseau permet de relier les ostéocytes entre eux et aux cellules de la surface (ostéoblastes), assurant ainsi la transmission de diverses informations chimiques (ions, hormones) et mécaniques (mouvements de fluides, déformations, gravité) par le biais de jonctions communicantes intercellulaires. Ces cellules sont également capables de synthétiser certaines molécules notamment en réponse à un stimulus mécanique et de jouer un rôle dans les échanges calciques entre le tissu osseux et le sang [1]. Enfin, les ostéocytes expriment spécifiquement la sclérotine, puissant agent inhibiteur de la formation osseuse.

D. Renouvellement du tissu osseux

Le squelette est une structure en perpétuelle évolution. Il atteint un équilibre à l'âge adulte entre l'ostéoformation (croissance) et la résorption (destruction) du tissu osseux. Dans le cadre d'un travail sur la restauration du tissu osseux, il est capital de comprendre cette opération qui est résumée sur la figure 5.

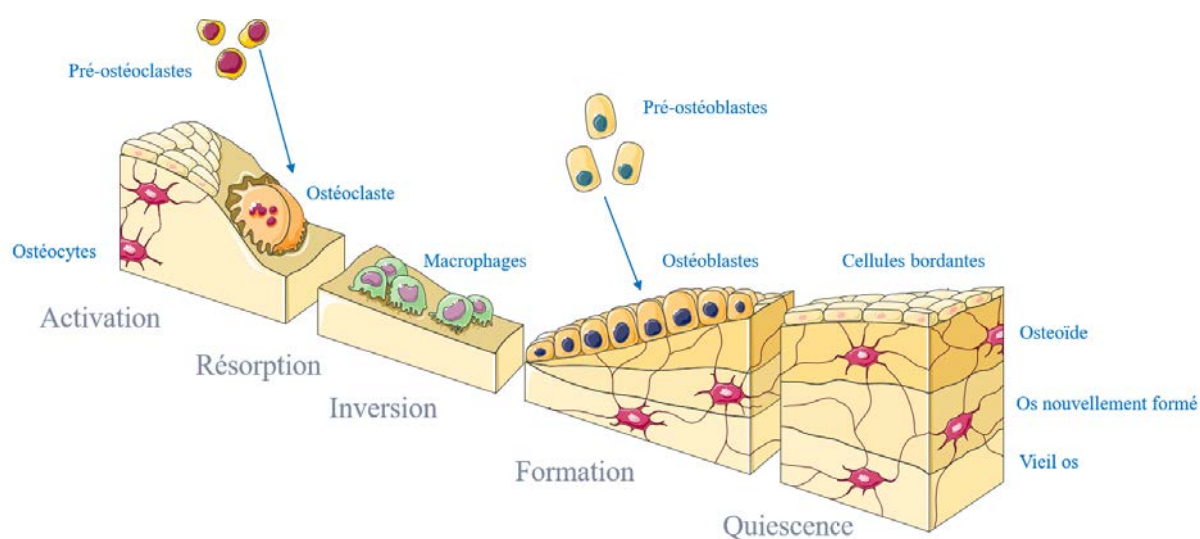


Figure 5 : Cycle du remodelage osseux [8]

Le remodelage osseux accomplit trois principales fonctions [1] :

- Il permet tout d'abord à l'organisme de réguler l'équilibre minéral du calcium et du phosphore.
- Il constitue ensuite un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique, réduisant ainsi le risque de fracture.
- C'est enfin un mécanisme de renouvellement tissulaire et de réparation des dommages osseux créés notamment lors des contraintes mécaniques cycliques.

Le remodelage osseux est le résultat de l'activité de multiples groupes cellulaires appelées BMU (Basal Multi cellular Unit), au sein desquelles agissent de manière séquentielle et couplée dans le temps et l'espace : les ostéoclastes qui résorbent l'os ancien, puis les ostéoblastes qui apposent une matrice qui se minéralisera.

Le remodelage commence par une activation des cellules bordantes qui recouvrent une surface osseuse inactive [1]. Ces cellules, tout en se rétractant, dégradent la couche collagénique sous-jacente et attirent par chimiotactisme les pré-ostéoclastes sur la zone osseuse ainsi exposée : c'est **la phase d'activation** [1].

Ces pré-ostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes actifs et adhérents à la surface osseuse : c'est **la phase de résorption** du minéral osseux et de la matrice organique créant des lacunes [1].

La **phase d'inversion** correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononuclées.

Puis survient l'arrivée des ostéoblastes dans cette lacune qu'ils combleront en apposant une nouvelle matrice organique, le tissu ostéoïde, qui sera ensuite minéralisé : c'est **la phase de formation** [1].

Vient enfin une phase pendant laquelle la minéralisation secondaire de la matrice est parachevée. Cette étape correspond à une accumulation de minéral dans la matrice indépendamment des cellules osseuses avec un rôle fondamental dans la résistance mécanique des os ; cette étape se passe pendant **la période de quiescence** avant le déclenchement d'une nouvelle phase d'activation dans la zone étudiée.

E. Conclusion

Le tissu osseux est en perpétuel renouvellement, celui-ci fait intervenir des réactions chimiques, des interactions biologiques et nécessite des caractéristiques mécaniques adaptées aux matériaux en présence. Les interactions entre les éléments qui composent ce tissu très complexe lui confèrent un rôle central. Ce rôle est de créer ou de faire intervenir de nombreux types de cellules, de protéines, d'hormones qui permettent à l'individu de vivre en bonne santé. Il est donc capital que des études pluridisciplinaires soient coordonnées et rigoureusement menées pour prendre en compte tous les paramètres requis afin de faire progresser efficacement le domaine des biomatériaux destinés à la restauration du tissu osseux.

II. Les biomatériaux de comblement osseux

A. Généralités et définitions

Le développement de nouvelles technologies entraîne l'augmentation constante de l'espérance de vie. C'est dans le cadre de ce cycle d'évolution technologique que se sont développés les biomatériaux. En effet, la préservation de l'intégrité corporelle et donc de l'autonomie des personnes sont des enjeux capitaux de notre société. Grâce aux avancées importantes de la technologie médicale, le corps humain a la possibilité de dépasser ses limites. Ainsi les progrès technologiques ont permis le déclenchement d'axes de recherches sur le développement de nouveaux matériaux. Ils sont destinés à remplir des tâches autrefois attribuées à des éléments originels du corps humain devenus inaptes à maintenir leurs fonctions à la suite de pathologies ou d'accidents.

Ainsi on retrouve ces matériaux dans des domaines tels que l'ophtalmologie avec des lentilles de contact ou des implants oculaires, dans la chirurgie cardiovasculaire avec des valves cardiaques, des stimulateurs cardiaques ou des assistances ventriculaires.

On les retrouve également dans des domaines de chirurgie dentaire avec le comblement dentaire, les implants, l'orthodontie mais également dans la chirurgie orthopédique dans le cas de réparation de fracture ou de matériaux de comblement osseux par exemple.

Au vu de toutes ces différentes applications, il est impossible de définir un biomatériau par sa nature ou par son lieu d'implantation. Il faut donc le définir en fonction de l'usage auquel il est destiné. La Conférence du Consensus, à Chester en mars 1986 a proposé de définir un biomatériau comme suivant : « Un matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical conçu pour interagir avec un ou des systèmes biologiques » [9].

Cette thèse se base sur l'étude physico-chimique et biologique de matériaux de comblement ou de substitution osseux, utilisés en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale. Ceux-ci permettent de remédier à des pertes osseuses et ainsi d'aider l'organisme à restaurer le tissu osseux. Ces pertes sont en général consécutives d'un accident, d'un traumatisme ou d'une pathologie.

B. Concept de biocompatibilité

La biocompatibilité est la propriété essentielle que doit posséder tout matériau utilisé comme biomatériau de comblement ou de substitution osseux. La notion de biocompatibilité a longtemps été considérée seulement comme l'absence des phénomènes suivants : le rejet du biomatériau implanté, l'absence d'inflammations et le déclenchement d'un processus de dégradation du biomatériau.

Aujourd'hui, elle doit prendre en compte la sûreté et l'efficacité à long terme lors de l'implantation d'un biomatériau. En 1987, une proposition définit la biocompatibilité comme « la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique » [10]. Une définition plus complète a été proposée en 1999 : « l'ensemble des interrelations entre le matériau et le milieu environnant, et leurs conséquences biologiques locales ou générales, immédiates ou différées, réversibles ou définitives » [11].

Biocompatible signifie d'une part que le matériau n'est pas à l'origine de phénomènes locaux ou systémiques néfastes pour la santé du receveur et, d'autre part, que les tissus receveurs et les liquides interstitiels ne sont pas susceptibles d'altérer le matériau (sauf lorsque cela est souhaité) au détriment de ses propriétés mécaniques, de ses qualités intrinsèques générales ou au risque de générer des produits de dégradation dangereux.

C. Les différents types de biomatériaux

Un biomatériau peut donc se définir comme suit : « Matériaux destinés à interfacer avec les systèmes biologiques pour évaluer, traiter, augmenter ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps » [12]. Il existe donc au moins deux façons de classifier les biomatériaux. La première d'entre elles est en fonction de l'interface formée avec les tissus, la seconde est en fonction de sa composition et de son origine, naturelle ou synthétique.

1. Classification par interfaces formées avec les tissus

Dans tous les cas, l'intégration d'un biomatériau entraînera une réaction des tissus vivants avec lesquels le matériau est en contact [13]. Il est possible de différencier ces différentes réactions avec les tissus. Larry Hench a proposé une classification de ces substituts en quatre sous catégories [14].

- Les biomatériaux inertes

La réponse tissulaire à un implant biologiquement inactif prend la forme d'une capsule fibreuse. Aucune liaison ne se développe entre le tissu osseux et l'implant ni de réaction inflammatoire. L'épaisseur de la capsule fibreuse dépend de plusieurs paramètres : le type de biomatériau inerte, le lieu d'implantation ou les contraintes mécaniques. Ainsi, la fixation observée est constituée par l'accroche de la matrice osseuse aux aspérités de la surface de l'implant. À long terme, cette fixation finit par se détériorer et une intervention chirurgicale est nécessaire pour retirer l'implant.

- Les biomatériaux poreux

Ce type de biomatériau interagit avec le tissu osseux par l'intermédiaire d'une fixation biologique. Des liaisons se créent donc à l'interface tissu osseux/implant par colonisation de cellules osseuses et croissance du tissu osseux dans les pores. Il est cependant nécessaire pour obtenir ce développement que les pores de l'implant soient de taille supérieure à 100 μm de diamètre. Un matériau poreux de ce type a des propriétés mécaniques forcément plus faibles qu'un matériau massif ce qui empêche son utilisation dans certaines zones de contraintes mécaniques [13].

- Les biomatériaux résorbables

Ces biomatériaux sont une alternative aux problèmes rencontrés par les matériaux inertes nécessitant une implantation de longue durée. En permettant la régénération du tissu osseux tout en se dégradant progressivement en subissant les assauts des enzymes, des cellules ou des bactéries présentes sur le lieu de l'implantation. L'avantage ici est que sa disparition se fait au profit d'un remplacement par du tissu osseux. Les produits de dégradation du matériau seront évacués naturellement par le système sous conditions que ceux-ci ne présentent aucun risque pour la santé du porteur. Un nouveau problème se présente alors, il est nécessaire de maîtriser la cinétique de résorption du matériau pour qu'elle soit en accord avec celle de l'ossification. Cette condition nécessite une étude approfondie au cas par cas en fonction du patient avant implantation [13].

- Les biomatériaux bioactifs

Ce dernier type de biomatériau permet l'obtention d'une interface tissu osseux/implant stable : la fixation bioactive. Quand le matériau bioactif est implanté dans le corps, une série de réactions physiologiques, chimiques et physiques entrent en jeu à l'interface entre le tissu osseux et l'implant. Ces réactions ont pour but la création de liaisons chimiques fortes et stables entre l'implant et le tissu osseux [13,15]. Ce travail de thèse se concentrera sur les biomatériaux bioactifs.

Des exemples de biomatériaux en fonction de leur interface tissu osseux/implant sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Exemples de biomatériaux en fonction de l'interface tissu osseux/implant

Type de biomatériau	Exemples
Inerte	Les métaux et alliages biomédicaux, principalement à base d'alumine, de zircone ou de titane
Résorbable	Les phosphates tricalciques, sulfates de calcium
Poreux et bioactif	Les carbonates de calcium, les phosphates tricalciques, les phosphates de calcium ou les géopolymères, les verres bioactifs

Une grande partie de ces matériaux peut avoir des origines biologiques ou être synthétisée pour répondre à une demande plus importante que les ressources disponibles naturellement.

2. Biomatériaux d'origine naturelle

Dans le cadre d'une restauration du tissu osseux, le meilleur matériau possible reste un biomatériau d'origine naturelle. C'est le seul matériau possédant précisément toutes les propriétés physico-chimiques et organiques nécessaires à une intégration totale. Il existe différents types de greffes osseuses, il est possible de les définir en fonction de l'origine de la greffe. La sélection suivante est hiérarchisée par taux de réussite croissant.

- Les xéno greffes

Les xéno greffes sont des greffes dont le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur. À cause de cette différence, le greffon doit subir une série de traitements afin d'éliminer tout risque de propagation d'éventuels agents infectieux. De plus les Complexes Majeurs d'Histocompatibilité (CMH) sont extrêmement différents et le maintien de la greffe nécessitera la prise d'un traitement immunosuppresseur pour éviter tout rejet.

- Les allo greffes

Sont appelées les greffes où le donneur et le receveur font partie de la même espèce biologique mais ne sont pas la même personne. Ces greffes sont les plus courantes dans le domaine médical. La principale problématique, en plus de devoir trouver un donneur, est que le CMH du donneur n'est pas le même que celui du receveur. Dans ce cas, la greffe nécessite un traitement immunosuppresseur. Plus les CMH sont ressemblants, plus la greffe a des chances de réussite ce qui favorise les dons entre individus de la même famille.

- Les auto greffes

L'auto greffe est une greffe où le greffon provient de la même personne. Le taux de réussite de ce type de greffe est maximal, étant donné que le CMH du donneur et du receveur est le même. Aucune réaction immunitaire n'est déclenchée en dehors des traumatismes liés à l'opération. Ce type de greffe n'est possible que dans certains cas et en fonction de la santé du patient ainsi que du volume de tissus osseux à restaurer.

Avec l'objectif d'offrir une autre option à l'utilisation de greffes naturelles, de nouveaux matériaux biocompatibles destinés au comblement osseux ont vu le jour et sont encore en voie de développement. L'os reste le meilleur substitut à lui-même, néanmoins les alternatives synthétiques présentent de nombreux avantages en termes de réduction du risque de transmission d'agents infectieux et de disponibilité [14,16].

3. Biomatériaux d'origine synthétique

a) *Céramiques phosphocalciques*

Les céramiques phosphocalciques regroupent de nombreux substituts osseux. Ce groupe contient principalement l'hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, avec un rapport phosphocalcique Ca/P = 1,67) mais également les phosphates tricalciques (TCP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, avec un rapport Ca/P = 1,5) sous leur deux formes α et β et les céramiques biphasées (BCP, mélange de HA et β -TCP) [17,18].

Les céramiques phosphocalciques, d'origine biologique ou synthétique peuvent être poreuses ou denses selon leurs applications. Elles sont également ostéoconductrices : elles servent de support à la repousse du tissu osseux grâce à leur porosité. Elles présentent également les avantages de pouvoir être biorésorbables et n'induisent ni réactions d'inflammations ni toxicité dans le milieu d'implantation [16].

Ce groupe de phosphate de calcium présente un élément d'intérêt particulier : l'hydroxyapatite. Celle-ci est à la fois par sa composition chimique et par sa structure ce qui se rapproche le plus de la phase minérale de l'os. L'hydroxyapatite parfaite et stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ cristallise dans le système hexagonal en suivant le groupe d'espace $P 6_3/m$. Elle possède une maille où $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$ quand parfaitement cristallisée [7,19,20]. Cette maille est visible depuis le plan (001) sur la figure 6.

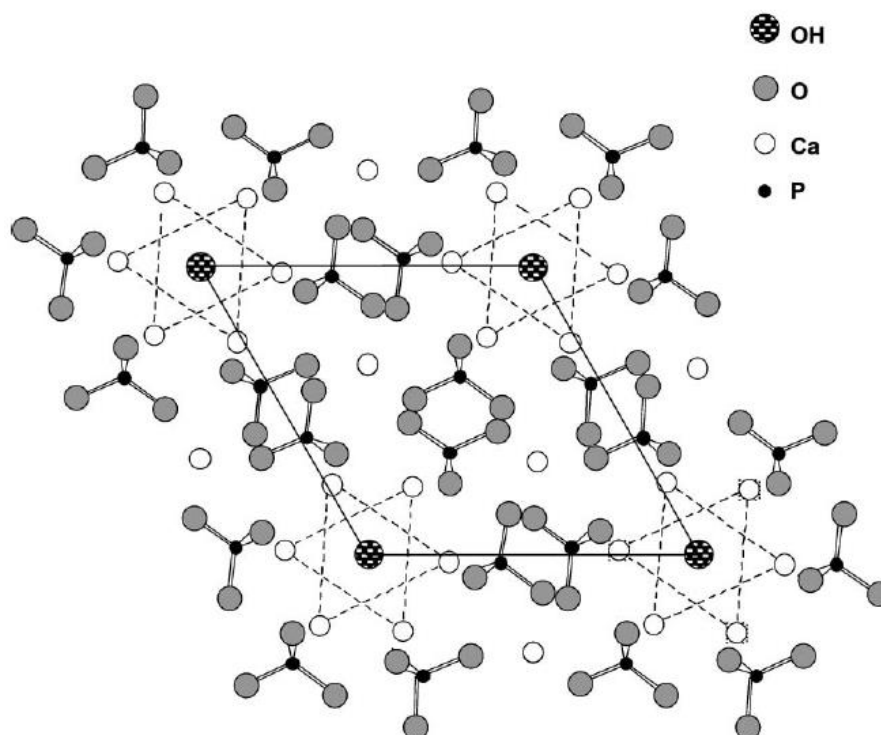


Figure 6 : Projection de la structure de l'HA dans le plan (001) [20]

Les cristaux d'HA peuvent être d'origine biologique ou synthétique. Pour l'obtenir depuis une origine biologique, une structure phosphocalcique préexistante comme le corail ou l'os est traitée thermiquement à haute température. Ce traitement permet l'élimination des éléments organiques et provoque la céramisation de la trame phosphocalcique [21].

Ce cristal est également obtenu *via* différentes voies chimiques : coprécipitation, sol-gel, ou voie hydrothermale [22,23,24].

b) Carbonates de calcium

Le carbonate de calcium (CaCO_3) présente trois variétés allotropiques : l'aragonite, la vaterite et la calcite. Il est utilisé en chirurgie orthopédique et pour la restauration de la masse osseuse depuis les années 1970. Il provenait principalement du squelette minéral du corail madréporaire du genre *Porites* [25]. Celui-ci présente une porosité remarquable car multidirectionnelle, interconnectée, avec des tailles de pores adaptées à la colonisation des cellules osseuses et dont le taux de porosité atteint les 50 %.

En plus de ces avantages structuraux, la composition chimique est majoritairement constituée de cristaux de carbonate de calcium sous forme d'aragonite [26].

Les études *in vivo* effectuées ont démontré que son utilisation entraîne sa biodégradation et une vascularisation rapide de l'implant, suivie d'une phase de résorption de ce dernier au profit du tissu osseux [25,26]. Cependant sa cinétique de résorption dépend du site d'implantation et du type de corail utilisé [27,28,29].

c) Matériaux composites et hybrides

Les paramètres nécessaires à l'obtention d'un biomatériau de bonne qualité sont multiples : une composition chimique biocompatible, un taux de porosité adapté, des propriétés mécaniques comparables à celles de l'os spongieux ou à celle de l'os cortical et la capacité d'induire la repousse osseuse. Toutes ces caractéristiques sont très difficiles à retrouver dans un seul matériau. Une des solutions envisagées est donc de créer des composites ou des hybrides, des assemblages d'éléments qui séparément possèdent une ou plusieurs caractéristiques nécessaires mais qui ensemble apportent plus que la somme de leurs caractéristiques [30].

d) Géopolymères et aluminosilicates

Cette catégorie rassemble les composites géopolymères alliant deux matériaux inorganiques : les aluminosilicates et les phosphates de calcium [31,32,33]. Il existe également la possibilité d'allier un composant inorganique avec un composant organique, qu'il soit un principe actif destiné à lutter contre une infection ou des cellules essentielles à la reconstruction du tissu osseux [34,35,36].

e) Verres bioactifs

Les verres bioactifs présentent de nombreux avantages, tels que : une composition adaptable, une disponibilité très conséquente, et une matrice vitreuse permettant l'addition de dopants et/ou de molécules à usage thérapeutique telles que le chitosan ou les bisphosphonates.

III. Les verres bioactifs : biomatériaux d'origine synthétique

Le verre est initialement utilisé dans la création d'objets décoratifs, suivant l'évolution des besoins, il a été exploité en tant que récipient étanche avant de plus amples utilisations liées à sa nature de matériau transparent. En 1969, Larry Hench a découvert les verres bioactifs [37]. L'objectif de sa recherche initiale était de mettre au point de nouveaux matériaux utilisés pour la restauration de tissus osseux pour l'Homme.

A. Généralités sur les verres

1. Définitions d'un verre

Il existe de nombreuses définitions du verre. D'un point de vue thermodynamique, le verre est un liquide figé par un refroidissement brutal ne possédant pas de structure à longue échelle.

Toutefois, la définition retenue par la communauté est celle de Zarzycki [38] : « Un verre est un solide non cristallin présentant le phénomène de transition vitreuse ». Le verre est donc un matériau non restreint par la stœchiométrie dû au désordre de sa structure, à l'inverse de matériaux cristallins.

2. Propriétés physico-chimiques du verre

a) *Phénomène de transition vitreuse*

Thermodynamiquement, le verre est obtenu à partir d'une phase liquide surfondue refroidie rapidement jusqu'à la température de transition vitreuse T_g . Pour des températures inférieures à la température de fusion T_f , l'état thermodynamique le plus stable est l'état cristallisé. Il est possible d'empêcher le processus de cristallisation en refroidissant brutalement le verre une fois sa T_f atteinte. Le refroidissement étant trop rapide, la cristallisation n'aura pas le temps de se réaliser.

On obtient alors un liquide surfondu, la perte d'énergie liée au refroidissement entrainera une augmentation de la viscosité du liquide jusqu'à ce que celui-ci devienne quasiment figé. L'augmentation de la rigidité entraînée par la réduction des mouvements microscopiques locaux entraine la création d'un système non organisé sur une longue échelle [38].

Ainsi, une fois le liquide surfondu figé, à une température inférieure à la T_g le matériau est un solide avec le désordre structurel proche de celui d'un liquide : c'est donc un verre.

b) Structure du verre

Le verre est caractérisé par un important désordre structurel. Ainsi le verre se résume à un réseau tridimensionnel irrégulier dans lequel seul l'ordre à courte distance entre les atomes est conservé. La figure 7 représente la structure de la silice SiO_2 cristalline sous la forme cristobalite et celle de la silice vitreuse. Dans tous les cas, chaque atome de silicium est lié avec quatre atomes d'oxygène et forme ainsi des tétraèdres SiO_4 . Dans le cas du cristal, le réseau forme un arrangement régulier de SiO_4 liés par leurs sommets.

Dans le cas de la matrice vitreuse, les mêmes tétraèdres sont joints par leurs sommets également mais de façon désorganisée [38].

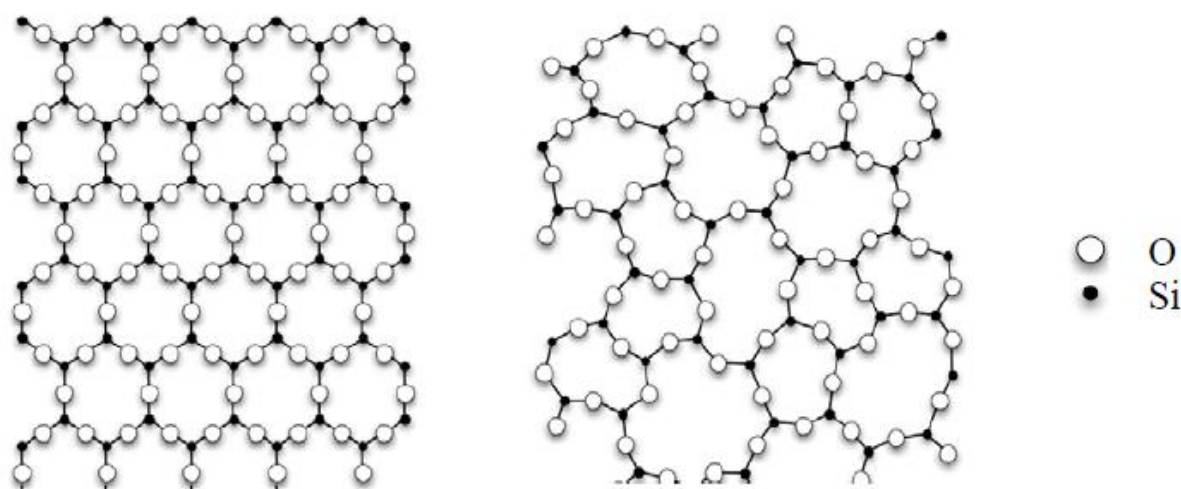


Figure 7 : Représentation 2D de réseaux de silice cristalline et vitreuse [39]

c) Composition chimique du verre

En raison de sa structure amorphe, le verre est soumis à très peu de contraintes stœchiométriques, ainsi un verre peut inclure dans une matrice une très grande variété d'éléments lui permettant des compositions parfois très complexes. Dans un verre d'oxydes, ces différents éléments sont sous forme cationique afin de former des oxydes avec l'anion de l'oxygène (O^{2-}).

Les cations pouvant servir à la formation d'un verre sont classés en trois grandes catégories en fonction du rôle qu'ils jouent dans la structure : les formateurs de réseaux, les modificateurs de réseaux et les intermédiaires. Cette classification prend en compte le nombre de coordinations de chaque cation ainsi que son électronégativité [38].

- **Les formateurs de réseaux** sont des éléments qui peuvent à eux seuls former un verre comme par exemple le silicium, le bore ou le phosphore. Ce sont des éléments métalliques de valence assez élevée, qui forment des liaisons mi-covalentes, mi-ioniques avec les atomes d'oxygène. Ils donnent des polyèdres de faible coordinence, comme SiO_4 , BO_4 ou BO_3 . Ces polyèdres sont liés par leurs sommets et forment le réseau vitreux.
- **Les modificateurs de réseaux** ne peuvent pas former de verre à eux seuls. Ce sont essentiellement les alcalins, les alcalino-terreux et certains éléments de transition ainsi que les terres rares. Ils sont habituellement plus volumineux (rayon ionique plus important) que les formateurs de réseau, faiblement chargés et donnent des polyèdres de grande coordinence. Leurs liaisons avec les atomes d'oxygène sont plus ioniques que celles établies par les formateurs. Ils peuvent avoir deux rôles structuraux bien distincts, soit modificateurs de réseau, soit compensateurs de charge.
 - Le rôle de modificateur de réseau est de casser les liaisons entre les polyèdres du réseau vitreux provoquant une dépolymérisation de ce dernier. Ils transforment alors les oxygènes pontants, qui lient deux éléments formateurs de réseau, en oxygènes non-pontants, liés à un seul formateur de réseau. C'est l'effet de réticulation visible sur la figure 8. Ceci se traduit à l'échelle macroscopique par une diminution de la température de fusion et de la viscosité.

- Les compensateurs de charge quant à eux compensent une charge négative sur un polyèdre formateur de réseau, par exemple BO_4^- , lui permettant d'être stable dans cette configuration [40].
- **Les intermédiaires** ont des fonctions différentes en fonction de la composition du verre. Ils peuvent être soit modificateurs de réseaux soit créateurs de réseaux [40].

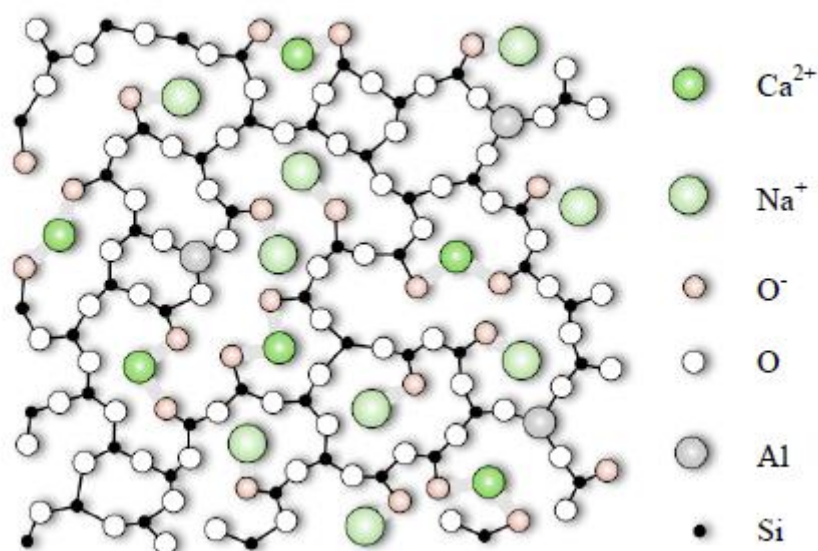


Figure 8 : Réseau d'un aluminosilicate en présence d'oxydes modificateurs de réseaux [39]

Des exemples d'oxydes, formateurs, modificateurs et intermédiaires sont rassemblés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Exemples d'oxydes pour la synthèse d'un verre [38]

Formateurs	Modificateurs	Intermédiaires
SiO_2	Li_2O	Al_2O_3
GeO_2	Na_2O	PbO
B_2O_3	K_2O	ZnO
P_2O_5	CaO	CdO
As_2O_5	BaO	TiO_2

d) Exemples d'applications

Historiquement, le verre est essentiellement utilisé pour sa propriété optique mais plus récemment aussi pour ses propriétés mécaniques. Ces propriétés varient en fonction de sa composition [41].

Les verres silicatés sont par exemple utilisés dans la vie de tous les jours en tant que récipients, dans le développement de la production d'énergie solaire ou encore dans l'industrie agroalimentaire pour leur stabilité vis à vis des composés utilisés dans ces domaines [42,43,44].

Les verres de chalcogénures sont développés pour leur utilisation dans l'optique dans le visible ou le proche infrarouge (2-22 μm) comme filtre passe-bande pour de nombreuses applications telles que les détecteurs ou les scanners [45]. On retrouve également ces verres en variant les compositions dans le stockage, le transfert de données, ou encore les fibres optiques [46,47].

Le verre est également utilisé dans le domaine du nucléaire où la nature désordonnée de sa structure lui permet d'absorber une partie des radiations et ainsi permet le stockage de déchets radioactifs de haute activité [48].

Le verre émerge également dans le domaine de la construction de bâtiments, pour ses capacités d'isolation dans le cas de fibre de verres tissés mais également pour les verres autonettoyants consacrés aux baies vitrées ou encore des verres photovoltaïques [49,50].

On retrouve également du verre métallique, possédant de très bonnes propriétés mécaniques utilisé comme renfort sous forme de fibres dans les bétons hautes performances ou encore dans des articles de sport [51].

L'utilisation principale recherchée dans ce travail de thèse est l'utilisation des verres en tant que matériaux bioactifs dans le cadre de la restauration du tissu osseux. L'exemple parfait est le Bioglass[®] 45S5. C'est un verre se composant en masse de 45 % de SiO_2 , de 24,5 % de CaO , de 24,5 % de Na_2O et de 6 % de P_2O_5 (composition molaire : 46,1 % de SiO_2 ; 26,9 % de CaO ; 24,3 % de Na_2O et 2,6 % de P_2O_5). Les premiers essais réalisés sur des fémurs de rats [52] ont permis d'obtenir des résultats montrant qu'en six semaines, les implants étaient parfaitement intégrés aux tissus osseux. Depuis, le 45S5 mais également de nouveaux produits se sont développés et sont utilisés tous les jours dans le cadre de la chirurgie orthopédique [53,54].

B. Concept de bioactivité

1. Introduction

L'objectif d'un verre bioactif est de contribuer au déclenchement du phénomène d'ostéogénèse qui est l'ensemble des phénomènes physiologiques concourant à la croissance osseuse, au remodelage osseux et à la réparation de possibles lésions osseuses.

Les matériaux dit bioactifs ont été classifiés en deux grandes catégories [14] :

- Les matériaux bioactifs à la fois ostéoconducteurs, ostéoinducteurs et ostéoproductions ;
- Les matériaux bioactifs uniquement ostéoconducteurs.

L'ostéoconduction est un ensemble de phénomènes permettant aux cellules ostéocompétentes en provenance du tissu osseux de la greffe, d'atteindre la zone osseuse à réparer. En l'absence d'ostéoconduction, l'intégration du greffon se fera uniquement par un remodelage osseux en périphérie et sera évidemment beaucoup plus longue qu'avec un produit ostéoconducteur.

Un matériau ostéoinducteur apporte une contribution au déclenchement du phénomène d'ostéoinduction qui consiste en une forte stimulation de l'ostéogénèse, consécutive à une lésion ou une fracture osseuse.

Ce phénomène entraîne la libération des facteurs de croissance osseuse et la transformation des cellules indifférenciées présentes dans la moelle osseuse en ostéoclastes et ostéoblastes. Une greffe osseuse subira un remodelage intense dès lors que ses propriétés d'ostéoconduction seront suffisantes pour permettre aux phénomènes d'ostéoinduction de se déclencher.

Un matériau ostéoproduit a la capacité de générer de l'ossification. Ce phénomène est mené par une capacité du matériau à enclencher une différenciation cellulaire qui entraînera la formation osseuse. Ce stimulus entraînant la différenciation serait une des conséquences du relargage rapide d'espèces ioniques issues du matériau lors de la dissolution de celui-ci. Les ions incriminés sont particulièrement les ions calcium et silicium. Lorsqu'ils sont relargués à une vitesse et avec une quantité adaptée, ces ions agiront sur l'activation de gènes et de facteurs de croissance [55].

Les verres bioactifs sont à la fois ostéoproductions et ostéoinducteurs.

2. Calcul de l'indice de bioactivité

La bioactivité est définie par une réponse biologique spécifique à l'introduction d'un implant. Plus particulièrement à la surface de l'implant, à l'interface entre celui-ci et le tissu vivant. Cette réponse prend forme *via* la formation d'un lien intime entre le tissu osseux vivant et l'implant. Il y a alors établissement d'un environnement compatible pour la croissance osseuse (ostéogenèse), cet environnement permet le développement d'une interface minérale qui est le lien entre les tissus et l'implant. Les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* présentent une caractéristique commune à tous les matériaux bioactifs qui est la formation d'une couche biologiquement active d'hydroxyapatite carbonatée à l'interface [56,57,58].

En fonction de la composition chimique, de la physique du verre bioactif, des différents mécanismes chimiques et biologiques liés aux caractéristiques de l'individu, la vitesse de formation de cette couche d'hydroxyapatite et la force de la liaison à l'interface os/verre sont variables.

Il a donc été introduit un indice de bioactivité qui est lié au temps nécessaire pour que 50 % de la surface de l'implant soit lié à l'os [59]. Cet indice de bioactivité est donné par la relation suivante :

$$I_B = \frac{100}{t_{0.5bb}}$$

Avec : I_B : l'indice de bioactivité

$t_{0.5bb}$: le temps en jours permettant à 50 % de la surface de l'implants de se lier à l'os (bb pour « bone bonding »).

Le système $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ développé par Hench a depuis été étudié lors de variations de composition tout en maintenant constant seulement la valeur de P_2O_5 (6 % en masse). Ces travaux ont abouti à la mise en place d'un système mettant en relation la composition chimique et l'indice de bioactivité.

Ce système prend la forme d'un triangle de composition chimique découpé en cinq régions présentées sur la figure 9.

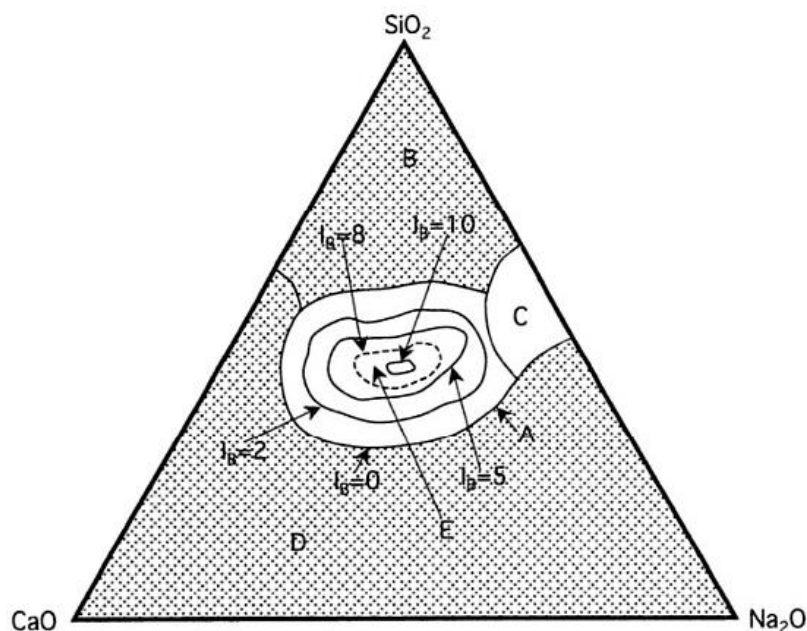


Figure 9 : Triangle de Hench et indice de bioactivité dans le système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ avec 6 % en masse de P_2O_5 [15]

- **La région E** représente la zone où les compositions possèdent les indices de bioactivité les plus élevés, elle est découpée en 5 sous-zones où l' I_B varie de 12,5 à 0. On constate que les variations en masse entre 40 et 52 % de SiO_2 présentent les plus forts indices de bioactivité. C'est dans cette zone que s'établit la composition du 45S5.
- En s'éloignant vers **la région A**, on constate une réduction de l'indice de bioactivité. L'addition de composants autres tels que le strontium, le zinc ou encore le magnésium ont des effets sur l'indice de bioactivité [60].
- Les verres dont la composition se trouvent dans **la région B** ont une réactivité trop faible et sont considérés quasiment inertes, cet état entraîne la formation d'une capsule fibreuse qui empêche la création d'un lien entre l'os et l'implant.
- **La région C** est à l'inverse une région où les verres sont trop réactifs ce qui entraîne une totale résorption de ceux-ci entre 10 et 30 jours en fonction de leur composition.
- **La région D** présente des compositions ne possédant pas la capacité de former un réseau vitreux.

3. Réactions chimiques à l'origine de la bioactivité

Le processus de bioactivité est un ensemble de réactions chimiques et biologiques se produisant à l'interface tissu osseux/implant. En fonction de la composition du verre, la cinétique de ces réactions varie mais elles aboutissent à la formation d'une couche de phosphate de calcium. Ce processus a été découpé en 11 étapes [14,61] rassemblées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Etapes de la formation d'hydroxyapatite à l'interface os/implant

Etape 1	Echange rapide de cations alcalins (Ca^{2+}) avec les H_3O^+ du milieu physiologique : $\text{Si-O-Ca}^+ + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{Si-OH} + \text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$
Etape 2	Perte de silice soluble sous forme de $\text{Si}(\text{OH})_4$ vers la solution. Les liaisons Si-O-Si se rompent et des groupements silanols Si-OH se forment à la surface du verre : $\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{Si-OH} + \text{OH-Si}$
Etape 3	Condensation et repolymérisation d'une couche à la surface riche en SiO_2 qui est appauvrie en cations alcalins ou alcalino-terreux : $\text{Si-OH} + \text{OH-Si} \Leftrightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$
Etape 4	Migration de Ca^{2+} et PO_4^{3-} vers la surface à travers la couche riche en SiO_2 pour former un film riche en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ sur cette même couche de SiO_2 . Cette migration est suivie par la croissance d'un film amorphe riche en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ par incorporation progressive de calcium et de phosphate provenant de la solution.
Etape 5	Cristallisation du film amorphe riche en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ par incorporation d' OH^- , CO_3^{2-} pour former une couche d'hydroxyapatite carbonatée.
Etape 6	Adsorption de substances biologiques (protéines, facteur de croissance) par la couche d'hydroxyapatite.
Etape 7	Action des macrophages.
Etape 8	Adhésion des cellules souches.
Etape 9	Différenciation des cellules souches en ostéoblastes et prolifération de ces derniers.
Etape 10	Génération de la matrice osseuse par formation d'une matrice minérale par agglomération de cristaux d'apatite liés entre eux par l'intermédiaire de fibres de collagène.
Etape 11	Cristallisation de la matrice minérale.

Les étapes 1 à 5 peuvent être étudiées *via* l'immersion du verre dans un liquide physiologique minéral synthétique (SBF pour Simulated Body Fluid) [62]. Les étapes 6 à 11 nécessitent la présence d'un réel milieu biologique et sont essentielles à la création du lien entre le tissu osseux et l'implant afin de lancer le cycle de renouvellement et remodelage osseux.

C. Différentes voies de synthèse

1. Synthèse par fusion

La synthèse des verres bioactifs présentée ci-dessus se fait traditionnellement par voie de fusion à haute température. Dans le cas des verres appartenant au système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ auquel a été ajouté strictement à chaque fois 6 % en masse de P_2O_5 , les oxydes SiO_2 et P_2O_5 servent à l'élaboration de la matrice vitreuse et les oxydes CaO et Na_2O de modificateurs de réseaux. Tous ces oxydes sont mélangés avant d'être calcinés, fondus à 1400 °C puis trempés à l'air. La méthode utilisée au cours de cette thèse est développée dans le chapitre 2.

2. Synthèse par voie sol-gel

Le procédé sol-gel est une voie de synthèse utilisée pour la production de céramique, de verre et de vitrocéramique à des températures comprises entre 20 °C et moins de 300 °C [63]. Cette approche permet par la polymérisation de précurseurs en phase liquide d'obtenir des matériaux vitreux sans passer par une étape de fusion très énergivore. C'est une approche permettant la création de verres bioactifs disposant de nouvelles compositions et de caractéristiques différentes des verres par fusion, particulièrement sur l'état de surface [64].

Ces réactions de polymérisation détaillées dans le chapitre 2 conduisent à la formation d'espèces de plus en plus condensées, qui forment un sol (dispersion stable de particules dans un liquide), puis un gel, d'où le nom du procédé sol-gel. Le séchage et la densification de ces gels, par traitements thermiques, permettent d'obtenir de la poudre de verre. Cet axe sera orienté plus particulièrement sur la voie sol-gel de l'émulsion [65].

La technique sol-gel tout comme la technique fusion permet au verre d'être amélioré *via* un dopage ou une insertion d'éléments d'intérêt biologique pour renforcer leur effet lors de l'implantation.

D. Matériaux dopés, composites et hybrides à base de verre bioactif

1. Définitions

Les verres bioactifs présentent déjà de nombreux avantages dans le domaine biomédical dans leur état initial. Il est tout de même possible de renforcer ou de compléter ces effets en leur additionnant d'autres produits avant ou après leur synthèse en fonction du type de matériaux que l'on souhaite concevoir : les matériaux dopés, composites ou hybrides [66].

- **Dopage** : Consiste en l'ajout d'un élément en faible quantité par rapport à la composition initiale du verre lors de la synthèse de celui-ci.
- **Matériaux composites** : Les matériaux composites sont des matériaux multi-phases possédant une phase (remplisseuse) dispersée dans une seconde phase (matrice). Ces matériaux sont obtenus après des synthèses distinctes suivies d'un mélange au niveau macroscopique effectué grâce au broyage. L'idée est d'ajouter les propriétés des deux matériaux.
- **Matériaux hybrides** : Les matériaux hybrides sont un assemblage au niveau nanométrique de différents constituants. Cette association entraîne la création d'un nouveau matériau possédant des propriétés qui n'existaient pas nécessairement dans les matériaux initiaux.

2. Composants d'intérêts biologiques

Parmi la multitude de composants utiles au bon fonctionnement et à la régénération du système osseux, nous nous sommes focalisés dans ce travail sur l'ajout de strontium et de zinc en tant que matériaux dopants.

L'utilisation de l'*Arthrospira platensis*, une cyanobactérie communément appelée spiruline et particulièrement un de ses composants : la phycocyanine sera également expérimentée et étudiée.

a) *Intérêt physiologique du strontium*

Les tissus osseux représentent 98 % ($\approx 150 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) du stockage du strontium dans le corps humain. Celui-ci possède des propriétés chimiques proches de celles du calcium et jouent un rôle important dans le renouvellement de la matrice osseuse [67,68,69].

Le strontium est connu pour sa capacité à stimuler la repousse osseuse et à empêcher la résorption de l'os. Ces caractéristiques et les recherches qui y sont liées feraient du strontium un moyen de lutter ou de prévenir l'ostéoporose [70,71,72]. L'introduction de strontium permet donc d'améliorer l'activité des ostéoblastes et sera par la suite incorporé dans la phase minérale de l'os (se substituant au calcium dans les cristaux d'hydroxyapatite) ce qui provoque une modification des caractéristiques (paramètres de maille, de taille et de cristallinité) des cristaux. Ces modifications entraînent la formation d'apatites carbonatées plus stables, rendant plus difficile la résorption de ces cristaux et donc de l'os [73].

b) *Intérêt physiologique du zinc*

Dans l'organisme, le zinc est l'un des éléments présent sous forme de trace ayant la plus forte concentration, principalement dans les tissus osseux ($\approx 117 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) [67]. Le zinc est également présent dans les organes et les muscles en plus du squelette [68,69]. Celui-ci est connu pour son rôle dans de très nombreuses fonctions biologiques comme l'activité hormonale, la synthèse protéique ou certaines réactions enzymatiques [74,75].

Dans le cadre des verres bioactifs, l'introduction de zinc permet une prolifération plus rapide des ostéoblastes, et ainsi, une meilleure repousse osseuse et une cicatrisation plus rapide [76,77]. Des travaux montrent que la présence de zinc pourrait avoir un effet sur la morphologie et la cristallisation de l'apatite biologique [78].

c) *Intérêt physiologique de la spiruline et de la phycocyanine*

Redécouverte dans les années 1950 par la communauté scientifique, la cyanobactérie *Spirulina Platensis* ou spiruline (algue bleue-verte) révèle par l'analyse de ses constituants une valeur nutritionnelle exceptionnelle du fait de sa richesse inégalée en protéines, lipides insaturés, vitamines antioxydantes et minéraux essentiels [79].

La spiruline est une cyanobactérie couramment utilisée dans le secteur de la nutrition et de l'agroalimentaire. Elle contient une large gamme de composés colorés et de grandes quantités d'éléments essentiels au développement et à la maintenance du corps humain [80]. Au-delà de ses capacités nutritionnelles intéressantes, la spiruline contient également de nombreuses protéines et molécules qui représentent un intérêt médical pour le moment sous-exploité, en particulier la phycocyanine présente dans la spiruline [81].

La phycocyanine est un composant habituellement présent dans les algues rouges et les cyanobactéries [82]. La spiruline étant la cyanobactérie qui en contient le plus, elle a donc naturellement été choisie pour un travail d'extraction à des fins scientifiques.

La phycocyanine est un pigment qui présente un intérêt biomédical très intéressant. Elle peut être utilisée en tant qu'addition anti-inflammatoire ou antibactérienne [83,84]. Des études montrent également un effet stimulant sur la différenciation des cellules souches et sur la multiplication cellulaire et un effet de chondrogenèse. Elle possède également la caractéristique d'être un capteur de radicaux libres [85,86].

Références du chapitre 1 :

- [1] Thomas, T.; Martin, A.; Lafage-Proust, M.-H. Physiologie du tissu osseux. *EMC - Appareil locomoteur* **2008**, 3 (1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0246-0521\(08\)40315-7](https://doi.org/10.1016/S0246-0521(08)40315-7).
- [2] Forbes, R. M.; Cooper, A. R.; Mitchell, H. H. The Composition of the Adult Human Body as Determined by Chemical Analysis. *J. Biol. Chem.* **1953**, 203 (1), 359–366.
- [3] Meyrueis, P.; Cazenave, A.; Zimmermann, R. Biomécanique de l'os. Application au traitement des fractures. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie* **2004**, 1 (1), 64–93. <https://doi.org/10.1016/j.emcrho.2003.11.005>.
- [4] <http://www.astrosurf.com/luxorion/bio-systemes-humains.htm> Visité Aout **2019**.
- [5] Tortora, G. J.; Grabowski, S. R.; Boudreault, F.; Boyer, M.; Desorcy, M.-C. *Principes d'anatomie et de physiologie*; De Boeck université ; Éd. du Renouveau pédagogique: Bruxelles; [Paris]; [Saint-Laurent (Québec)], **2002**.
- [6] Posner, A. S. The Mineral of Bone: *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1985**, NA; (200), 87–99. <https://doi.org/10.1097/00003086-198511000-00018>.
- [7] Liu, Y.; Luo, D.; Wang, T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small* **2016**, 12 (34), 4611–4632. <https://doi.org/10.1002/sml.201600626>.
- [8] <https://smart.servier.com/> Banque d'image visité Aout **2019** adaptée par l'auteur.
- [9] Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, **1986**; Williams, D. F., European Society for Biomaterials, Eds.; Progress in biomedical engineering; Elsevier: Amsterdam ; New York, **1987**.
- [10] Williams, D. F. Tissue-Biomaterial Interactions. *J Mater Sci* **1987**, 22 (10), 3421–3445. <https://doi.org/10.1007/BF01161439>.

- [11] Exbrayat, P. Question C.E.S : La biocompatibilité dentaires. *Journal de Biomatériaux Dentaires* **1998**, vol 13.
- [12] Williams, D. F. *The Williams Dictionary of Biomaterials*; Liverpool University Press: Liverpool, **2011**. <https://doi.org/10.5949/UPO9781846314438>.
- [13] Donaruma, L. G. Biomaterials – an Interfacial Approach, L. L. Hench and E. C. Ethridge, Academic, London, 1982, 385 Pp. No Price Given. *J. Polym. Sci. B Polym. Lett. Ed.* **1983**, 21 (8), 677–677. <https://doi.org/10.1002/pol.1983.130210815>.
- [14] Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J American Ceramic Society* **1991**, 74 (7), 1487–1510. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>.
- [15] Cao, W.; Hench, L. L. Bioactive Materials. *Ceramics International* **1996**, 22 (6), 493–507. [https://doi.org/10.1016/0272-8842\(95\)00126-3](https://doi.org/10.1016/0272-8842(95)00126-3).
- [16] Daculsi, G.; Malard, O.; Goyenvalle, E. Efficacité et performance des substituts osseux pour remplacer les allogreffes et autogreffes. *ITBM-RBM* **2005**, 26 (3), 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.rbmret.2005.04.005>.
- [17] De Groot, K. *Bioceramics Calcium Phosphate*; chapitre 5, **2018** 100–114
- [18] Groot, K. D. Effect of Porosity and Physicochemical Properties on the Stability, Resorption, and Strength of Calcium Phosphate Ceramics. *Ann NY Acad Sci* **1988**, 523 (1 Bioceramics), 227–233. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb38515.x>.
- [19] Kay, M. I.; Young, R. A.; Posner, A. S. Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature* **1964**, 204 (4963), 1050–1052. <https://doi.org/10.1038/2041050a0>.
- [20] Montel, G.; Bonel, G.; Trombe, J.-C.; Heughebaert, J.-C.; Rey, C. Progres Dans Le Domaine de La Chimie Des Composes Phosphores Solides a Structure d'apatite. Application a La Biologie et Au Traitement Des Minerais. *Pure and Applied Chemistry* **1980**, 52 (4), 973–987. <https://doi.org/10.1351/pac198052040973>.
- [21] McConnell, D. Apatite: Its Crystal Chemistry, Mineralogy, Utilization, and Geologic and Biologic Occurrences; **1973**.

- [22] Taewana, T.; Wongmaneerung, R. Synthesis Hydroxyapatite from Three Types Eggshells by Co-Precipitation Method. *AMM* **2017**, *866*, 73–76.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.866.73>.
- [23] Liu, D.-M.; Troczynski, T.; Tseng, W. J. Water-Based Sol–Gel Synthesis of Hydroxyapatite: Process Development. *Biomaterials* **2001**, *22* (13), 1721–1730.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00332-X).
- [24] Yang, Y.; Wu, Q.; Wang, M.; Long, J.; Mao, Z.; Chen, X. Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite with Different Morphologies: Influence of Supersaturation of the Reaction System. *Crystal Growth & Design* **2014**, *14* (9), 4864–4871.
<https://doi.org/10.1021/cg501063j>.
- [25] Guillemin, G.; Patat, J.-L.; Fournie, J.; Chetail, M. The Use of Coral as a Bone Graft Substitute. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21* (5), 557–567.
<https://doi.org/10.1002/jbm.820210503>.
- [26] Guillemin, G.; Meunier, A.; Dallant, P.; Christel, P.; Pouliquen, J.-C.; Sedel, L. Comparison of Coral Resorption and Bone Apposition with Two Natural Corals of Different Porosities. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23* (7), 765–779.
<https://doi.org/10.1002/jbm.820230708>.
- [27] Irigaray, J. L.; Oudadesse, H.; Blondiaux, G.; Collangettes, D. Kinetics of the Diffusion of Some Elements Evaluated by Neutron Activation in a Coral Implanted in Vivo. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles* **1993**, *169* (2), 339–346.
<https://doi.org/10.1007/BF02042992>.
- [28] Derrien, A. C.; Oudadesse, H.; Martin, S.; Lucas-Girot, A.; Cathelineau, G.; Sauvage, T.; Blondiaux, G. Mineralization Kinetics of Various Implanted Bioceramics. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **2004**, *226* (3), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2004.06.014>.
- [29] Oudadesse, H.; Derrien, A. C.; Lucas-Girot, A.; Martin, S.; Cathelineau, G.; Sauvage, T.; Blondiaux, G. In Vivo Mineral Composition Evolution of a Synthetic CaCO₃ Aragonite Used as Biomaterial for Osseous Substitution. *Instrumentation Science & Technology* **2004**, *32* (5), 545–554. <https://doi.org/10.1081/CI-200029803>.

- [30] Prestwich, G. D.; Matthew, H. Hybrid, Composite, and Complex Biomaterials. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2002**, *961* (1), 106–108. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb03058.x>.
- [31] Oudadesse, H.; Derrien, A. C.; Mami, M.; Martin, S.; Cathelineau, G.; Yahia, L. Aluminosilicates and Biphasic HA-TCP Composites: Studies of Properties for Bony Filling. *Biomed. Mater.* **2007**, *2* (1), S59–S64. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/2/1/S09>.
- [32] Oudadesse, H.; Derrien, A. C.; Lefloch, M.; Davidovits, J. MAS-NMR Studies of Geopolymers Heat-Treated for Applications in Biomaterials Field. *J. Mater. Sci.* **2007**, *42* (9), 3092–3098. <https://doi.org/10.1007/s10853-006-0524-7>.
- [33] Oudadesse, H.; Derrien, A. C.; Lefloch, M. Infrared and Nuclear Magnetic Resonance Structural Studies vs. Thermal Treatment of Geopolymers/Biphasic Calcium Phosphates. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2005**, *82* (2), 323–329. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-0898-9>.
- [34] Buckles, R. G. Biomaterials for Drug Delivery Systems. *J. Biomed. Mater. Res.* **1983**, *17* (1), 109–128. <https://doi.org/10.1002/jbm.820170110>.
- [35] Eoh, J.; Gu, L. Biomaterials as Vectors for the Delivery of CRISPR–Cas9. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (4), 1240–1261. <https://doi.org/10.1039/C8BM01310A>.
- [36] Santos, L. F.; Correia, I. J.; Silva, A. S.; Mano, J. F. Biomaterials for Drug Delivery Patches. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *118*, 49–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.020>.
- [37] Hench, L. L. The Story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* **2006**, *17* (11), 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [38] Zarzycki, J. *Glasses and the Vitreous State*; Cambridge solid state science series; Cambridge University Press: Cambridge : New York, **1991**.
- [39] Vallet-Regí, M. Ceramics for Medical Applications. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, No. 2, 97–108. <https://doi.org/10.1039/b007852m>.
- [40] Barton, J.; Guillemet, C. *Le verre science et technologie*; EDP Sciences: Les Ulis, France, **2005**.

- [41] Hand, R. J.; Tadjiev, D. R. Mechanical Properties of Silicate Glasses as a Function of Composition. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2010**, 356 (44–49), 2417–2423. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.05.007>.
- [42] Deubener, J.; Hensch, G.; Moiseev, A.; Bornhöft, H. Glasses for Solar Energy Conversion Systems. *Journal of the European Ceramic Society* **2009**, 29 (7), 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.009>.
- [43] Alameh, K.; Vasiliev, M.; Alghamedi, R.; Nur-E-Alam, M.; Rosenberg, V. Solar Energy Harvesting Clear Glass for Building-Integrated Photovoltaics. In *2014 11th Annual High Capacity Optical Networks and Emerging/Enabling Technologies (Photonics for Energy)*; IEEE: Charlotte, NC, USA, **2014**, 210–213. <https://doi.org/10.1109/HONET.2014.7029393>.
- [44] *Food Storage Stability Chapter 3*; Taub, I. A., Singh, R. P., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, **1998**.
- [45] *Matériaux émergents Chapitre 2*; Janot, C., Ilschner, B., Eds.; Traité des matériaux; Presses Polytechniques et Universitaires Romandes: Lausanne, **2001**.
- [46] Mikla, V. I.; Mikla, V. V. *Amorphous Chalcogenides: The Past, Present and Future*; Elsevier Science: Saint Louis, **2014**.
- [47] Chander, R.; Thangaraj, R. Optical and Electrical Properties of Te-Substituted Sn–Sb–Se Semiconducting Thin Films. *Thin Solid Films* **2012**, 520 (6), 1757–1761. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2011.08.054>.
- [48] Yasmin, S.; Barua, B. S.; Khandaker, M. U.; Chowdhury, F.-U.-Z.; Rashid, Md. A.; Bradley, D. A.; Olatunji, M. A.; Kamal, M. Studies of Ionizing Radiation Shielding Effectiveness of Silica-Based Commercial Glasses Used in Bangladeshi Dwellings. *Results in Physics* **2018**, 9, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.02.075>.
- [49] Surekha, K.; Sundararajan, S. Self-Cleaning Glass. In *Anti-Abrasive Nanocoatings*; Elsevier, **2015**; 81–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-211-3.00004-2>.
- [50] Zhang, W.; Lu, L.; Chen, X. Performance Evaluation of Vacuum Photovoltaic Insulated Glass Unit. *Energy Procedia* **2017**, 105, 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.321>.
- [51] Patel, A. T.; Pratap, A. Study of Kinetics of Glass Transition of Metallic Glasses. *J Therm. Anal. Calorim.* **2012**, 110 (2), 567–571. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2527-8>.

- [52] Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, 5 (6), 117–141. <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
- [53] Hench L. L.; West J. K. Biological Applications of Bioactive Glasses. *Life Chemistry Reports.* **1996**, 187–241.
- [54] Hench, L. L. Bioactive Ceramics: Theory and Clinical Applications. In *Bioceramics*; Elsevier, **1994**; 3–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-042144-5.50005-4>.
- [55] Keeting, P. E.; Oursler, M. J.; Wiegand, K. E.; Bonde, S. K.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. Zeolite a Increases Proliferation, Differentiation, and Transforming Growth Factor β Production in Normal Adult Human Osteoblast-like Cells in Vitro. *J. Bone. Miner. Res.* **2009**, 7 (11), 1281–1289. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650071107>.
- [56] Hench, L. L. Life and Death: The Ultimate Phase Transformation. *Thermochimica Acta* **1996**, 280–281, 1–13. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(95\)02632-0](https://doi.org/10.1016/0040-6031(95)02632-0).
- [57] Hench, L. L. Bioactive Materials: The Potential for Tissue Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 41 (4), 511–518.
- [58] Hench, L. L. Biomaterials: A Forecast for the Future. *Biomaterials* **1998**, 19 (16), 1419–1423.
- [59] Ducheyne, P. Bioceramics: Material Characteristics versus in Vivo Behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21 (A2 Suppl), 219–236.
- [60] Dietrich, E.; Oudadesse, H.; Lucas-Girot, A.; Le Gal, Y.; Jeanne, S.; Cathelineau, G. Effects of Mg and Zn on the Surface of Doped Melt-Derived Glass for Biomaterials Applications. *Applied Surface Science* **2008**, 255 (2), 391–395. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.06.094>.
- [61] Jones, J. R. Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids. *Acta Biomaterialia* **2013**, 9 (1), 4457–4486. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>.
- [62] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Ohtsuki, C.; Sakka, S.; Yamamuro, T. Chemical Reaction of Bioactive Glass and Glass-Ceramics with a Simulated Body Fluid. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1992**, 3 (2), 79–83. <https://doi.org/10.1007/BF00705272>.

- [63] Dislich, H.; Hinz, P. History and Principles of the Sol-Gel Process, and Some New Multicomponent Oxide Coatings. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1982**, *48* (1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(82\)90242-3](https://doi.org/10.1016/0022-3093(82)90242-3).
- [64] M. Mukundan, L.; Nirmal, R.; Vaikkath, D.; Nair, P. D. A New Synthesis Route to High Surface Area Sol Gel Bioactive Glass through Alcohol Washing: A Preliminary Study. *Biomatter*. **2013**, *3* (2), e24288. <https://doi.org/10.4161/biom.24288>.
- [65] Delben, J. R. J.; Pereira, K.; Oliveira, S. L.; Alencar, L. D. S.; Hernandez, A. C.; Delben, A. A. S. T. Bioactive Glass Prepared by Sol–Gel Emulsion. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2013**, *361*, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2012.10.025>.
- [66] Gu, H.; Liu, C.; Zhu, J.; Gu, J.; Wujcik, E. K.; Shao, L.; Wang, N.; Wei, H.; Scaffaro, R.; Zhang, J.; et al. Introducing Advanced Composites and Hybrid Materials. *Adv. Compos. Hybrid. Mater.* **2018**, *1* (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s42114-017-0017-y>.
- [67] Grupe, G.; Herrmann, B. Trace Elements in Environmental History: Proceedings of the Symposium Held from June 24th to 26th, **1987**, at Göttingen; **1988**.
- [68] Berger, M. M. Éléments traces. In *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*; Springer Paris: Paris, **2007**; 145–159. https://doi.org/10.1007/978-2-287-33475-7_11.
- [69] Oudadesse, H.; Martin, S.; Derrien, A. C.; Lucas-Girot, A.; Cathelineau, G.; Blondiaux, G. Determination of Ca, P, Sr and Mg in the Synthetic Biomaterial Aragonite by NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2004**, *262* (2), 479–483. <https://doi.org/10.1023/B:JRNC.0000046781.15503.eb>.
- [70] Takahashi, N.; Sasaki, T.; Tsouderos, Y.; Suda, T. S 12911-2 Inhibits Osteoclastic Bone Resorption In Vitro. *J. Bone. Miner. Res.* **2003**, *18* (6), 1082–1087. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.6.1082>.
- [71] Meunier, P. J.; Roux, C.; Seeman, E.; Ortolani, S.; Badurski, J. E.; Spector, T. D.; Cannata, J.; Balogh, A.; Lemmel, E.-M.; Pors-Nielsen, S.; et al. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350* (5), 459–468. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022436>.
- [72] Blake, G. M.; Fogelman, I. Long-Term Effect of Strontium Ranelate Treatment on BMD. *J. Bone Miner. Res.* **2005**, *20* (11), 1901–1904. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050810>.

[73] Boivin, G.; Deloffre, P.; Perrat, B.; Panczer, G.; Boudeulle, M.; Mauras, Y.; Allain, P.; Tsouderos, Y.; Meunier, P. J. Strontium Distribution and Interactions with Bone Mineral in Monkey Iliac Bone after Strontium Salt (S 12911) Administration. *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *11* (9), 1302–1311. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110915>.

[74] Ito, A.; Kawamura, H.; Otsuka, M.; Ikeuchi, M.; Ohgushi, H.; Ishikawa, K.; Onuma, K.; Kanzaki, N.; Sogo, Y.; Ichinose, N. Zinc-Releasing Calcium Phosphate for Stimulating Bone Formation. *Materials Science and Engineering: C* **2002**, *22* (1), 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00108-X).

[75] Yamaguchi, M.; Yamaguchi, R. Action of Zinc on Bone Metabolism in Rats. *Biochemical Pharmacology* **1986**, *35* (5), 773–777. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90245-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90245-5).

[76] Yamaguchi, M.; Oishi, H.; Suketa, Y. Stimulatory Effect of Zinc on Bone Formation in Tissue Culture. *Biochemical Pharmacology* **1987**, *36* (22), 4007–4012. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90471-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90471-0).

[77] Kishi, S.; Yamaguchi, M. Inhibitory Effect of Zinc Compounds on Osteoclast-like Cell Formation in Mouse Marrow Cultures. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *48* (6), 1225–1230. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90160-0).

[78] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Ohtsuki, C.; Sakka, S.; Yamamuro, T. Effects of Ions Dissolved from Bioactive Glass-Ceramic on Surface Apatite Formation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1993**, *4* (1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF00122969>.

[79] McCarty, M. F. Clinical Potential of *Spirulina* as a Source of Phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food* **2007**, *10* (4), 566–570. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>.

[80] Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Kumar, N. A.; Sridhar, S.; Rengasamy, R. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* **2008**, *34* (2), 77–88. <https://doi.org/10.1080/10408410802086783>.

[81] Babadzhanov, A. S.; Abdusamatova, N.; Yusupova, F. M.; Faizullaeva, N.; Mezhlumyan, L. G.; Malikova, M. Kh. Chemical Composition of *Spirulina Platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* **2004**, *40* (3), 276–279. <https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000039141.98247.e8>.

- [82] Walter, A.; Carvalho, J. C. de; Soccol, V. T.; Faria, A. B. B. de; Ghiggi, V.; Soccol, C. R. Study of Phycocyanin Production from *Spirulina Platensis* under Different Light Spectra. *Braz. arch. biol. technol.* **2011**, *54* (4), 675–682. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400005>.
- [83] Ferreira-Hermosillo, A.; Torres-Duran, P. V.; Juarez-Oropeza, M. A. Hepatoprotective Effects of *Spirulina Maxima* in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Case Series. *J. Med. Case Reports* **2010**, *4* (1), 103-109. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-4-103>
- [84] Deng, R.; Chow, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*: Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics* **2010**, *28* (4), 33–45. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x>.
- [85] Gantar, M.; Simović, D.; Djilas, S.; Gonzalez, W. W.; Miksovská, J. Isolation, Characterization and Antioxidative Activity of C-Phycocyanin from *Limnothrix* Sp. Strain 37-2-1. *Journal of Biotechnology* **2012**, *159* (1–2), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.02.004>.
- [86] EL-Sabagh, M. R.; Abd Eldaim, M. A.; Mahboub, D. H.; Abdel-Daim, M. Effects of *Spirulina Platensis* Algae on Growth Performance, Antioxidative Status and Blood Metabolites in Fattening Lambs. *JAS* **2014**, *6* (3), 92–98. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n3p92>.

Chapitre 2 : Protocoles de synthèse et méthodes d'analyses physico-chimiques

Chapitre 2 : Protocoles de synthèse et méthodes d'analyses physico-chimiques

I. Synthèses des biomatériaux étudiés : verres et nanoverres bioactifs

Cette partie développe les protocoles de synthèse et les méthodes d'analyses physico-chimiques. Les verres bioactifs étudiés ont été synthétisés par deux méthodes de synthèse distinctes, chacune présentant des intérêts. La méthode par fusion permet l'obtention de verre en grande quantité et en un temps relativement court. Ces verres présentent une flexibilité dans leurs compositions. Cette méthode permet l'obtention de verre sous forme de massifs de formes diverses en fonction de l'application souhaitée. Pour les expérimentations nécessitant un matériau sous forme de poudre, le verre bioactif synthétisé par fusion subira donc une mise en forme préalable. La voie sol-gel demande une dépense énergétique moindre que celle exigée par la fusion et permet l'obtention de particules de verre bioactif de tailles variables allant du nanomètre au micromètre. Cependant, elle requiert l'utilisation de solvants. Ces deux méthodes sont complémentaires et utilisées au cours de cette thèse pour la réalisation de différentes expérimentations en site osseux.

A. Synthèse par fusion des verres bioactifs purs et dopés par fusion

1. Synthèse du verre bioactif pur 46S6

Le verre bioactif pur de référence 46S6 a été synthétisé à partir des oxydes de silicium (SiO_2), de calcium (CaO), de sodium (Na_2O) et de phosphore (P_2O_5). Il s'agit d'une modification de composition du 45S5 proposé par Hench [1].

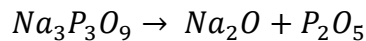
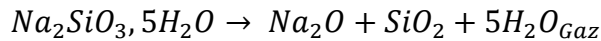
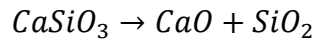
Les oxydes de base ont été obtenus par décarbonatation lors d'une étape de calcination au cours de la synthèse à partir des précurseurs suivants : Silicate de calcium (CaSiO_3), silicate de sodium pentahydraté ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), et de trimétaphosphate de sodium ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$). La pureté et l'origine des composants sont présentées dans l'annexe I.

L'objectif est l'obtention d'un verre bioactif dont la composition chimique en pourcentage massique est : **46 % SiO_2 , 24 % CaO , 24 % Na_2O et 6 % P_2O_5 .**

Les précurseurs ont été mélangés et homogénéisés à l'aide d'un mélangeur planétaire pour une durée de 2 heures. Une fois le mélange achevé, celui-ci est introduit dans un creuset en platine. Il a été utilisé car il permet d'éviter des pollutions liées à la réaction entre le creuset et les poudres, le platine ne réagissant pas avec les poudres et est également capable de résister jusqu'à une température de 1768 °C (température de fusion du platine) sans risque de contamination lors de la synthèse.

Cette synthèse comprend deux étapes de chauffe comme présentées sur la figure 10.

Une première étape de calcination à 900 °C pendant 1 heure qui a pour objectif la séparation des différents oxydes constituant le verre depuis leurs précurseurs :



La synthèse se poursuit par une étape de fusion à 1350 °C pendant 3 heures.

À l'issue des 3 heures, le mélange fondu est coulé dans des moules en laiton préchauffés à une température proche de la température de transition vitreuse ($T_g = 565$ °C). Les verres synthétisés sont ainsi recuits pendant 4 heures à une température légèrement inférieure à la température de transition vitreuse du verre de référence 46S6. Cette opération a pour but de supprimer les contraintes mécaniques résiduelles encore présentes dues à la trempe à air effectuée lors de la coulée dans les moules en laiton ($T_f = 930$ °C) préchauffés à une température proche de la T_g (560 °C). Par la suite les moules refroidissent progressivement jusqu'à température ambiante. On obtient alors des cylindres de verres de diamètre variable en fonction des moules.

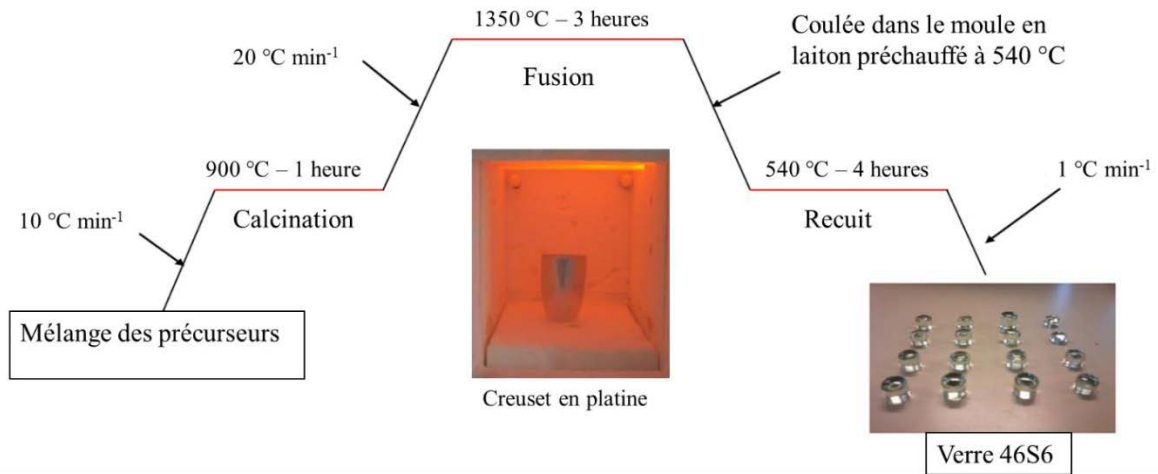


Figure 10: Schéma de la synthèse du 46S6

2. Synthèse des verres bioactifs dopés au zinc et au strontium

Les autres compositions de verres bioactifs utilisées au cours de cette étude ont été synthétisées en utilisant la même méthode que celle développée pour le verre bioactif pur. Cependant ces massifs de verres ont été mis en forme par broyage en utilisant un broyeur mécanique de type Retsch Bioblock RM100. La poudre obtenue a ensuite été tamisée *via* l'utilisation d'un tamiseur Retsch Bioblock AS200 pour obtenir une poudre de granulométrie comprise entre 40 et 60 μm . Ces poudres ont ensuite été étudiées en effectuant des analyses thermiques. Les différentes compositions comprenant du zinc ou du strontium sont présentées dans le chapitre 3.

B. Synthèse des nanoverres bioactifs par voie sol-gel : émulsion

Il existe différentes méthodes utilisant la synthèse par voie sol-gel [2]. Ce travail s'intéresse principalement au développement d'une méthode utilisant l'émulsion pour la synthèse d'un verre ternaire bioactif. Les raisons de ce choix sont développées au chapitre 4.

La synthèse du nanoverre bioactif (NBG) utilisée au cours de cette thèse a été réalisée dans un système ternaire. Sa composition chimique en pourcentage molaire est : **55 % SiO_2 , 40 % CaO et 5 % P_2O_5** .

Le verre a été préparé à partir d'orthosilicate de tétraéthyle (TetraEthyl OrthoSilicate ou TEOS), de trimetaphosphate de sodium ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$), de nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et d'ammoniaque ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). De l'octanol, du Triton X-100[®] et du cyclohexane ont également été utilisés comme surfactant et phase huileuse pour préparer les deux émulsions. La pureté et l'origine des composants sont présentées dans l'annexe I.

L'idée de cette émulsion eau dans huile (Water/Oil ou W/O) est de disperser la phase aqueuse pour former des microgouttelettes protégées par une monocouche de molécules de tensioactif dans la phase huileuse. La taille des microgouttelettes a été contrôlée en ajustant le rapport eau/tensioactif au cours de ce travail. Le protocole expérimental est basé sur la préparation et le mélange de deux émulsions différentes, A et B.

L'émulsion A est une phase aqueuse d'ammoniaque (26 mL d'ammoniaque à 30 % et 124 mL d'eau distillée) ajoutée à 9,167 g de TEOS et à 1,317 g de $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$. Deux tensioactifs (le Triton X-100[®] et l'octanol) et 350 mL de cyclohexane en tant que phase huileuse ont été ajoutés pour obtenir cette première solution d'émulsion A. Ce mélange a été maintenu sous forte agitation pendant une heure pour permettre l'hydrolyse des différents précurseurs. L'exemple de l'hydrolyse du TEOS est présentée sur la figure 11. Cette opération se termine lorsque la solution passe d'un état trouble à un état limpide.

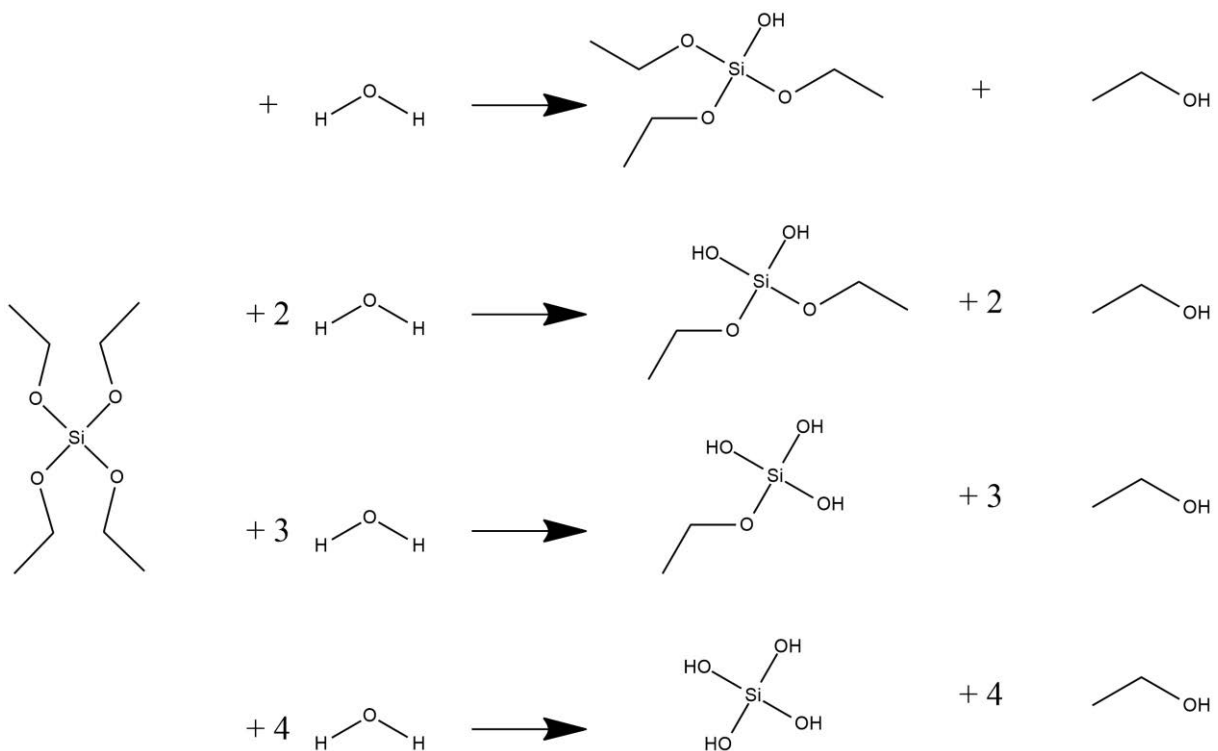


Figure 11 : Schéma de l'hydrolyse du TEOS

L'émulsion B est une phase aqueuse à base de 150 mL d'eau distillée et 7,639 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. La même quantité des deux tensioactifs et de cyclohexane a été ajoutée à la solution B. La quantité de tensioactif dans chaque émulsion a été ajustée en fonction de la taille des particules requises, ce travail est présenté dans le chapitre 4.

Les deux compositions d'émulsion sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Composition des deux émulsions

	Emulsion A	Emulsion B
Phase aqueuse	$\text{NH}_3 \text{H}_2\text{O}$, $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$, $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Surfactants	Triton X-100, Octanol	Triton X-100, Octanol
Phase huileuse	Cyclohexane	Cyclohexane

Après leur préparation séparée, les deux émulsions A et B ont été mélangées à une vitesse constante et vigoureuse pendant une heure afin de créer un contact entre tous les réactifs contenus dans les réacteurs aqueux de l'émulsion.

Par la suite, les solutions mélangées ont été laissées au repos pendant un temps de maturation variable appelé T en fonction de la taille souhaitée. La phase de maturation correspond à la période de polymérisation du verre dont la réaction est présentée sur la figure 12.

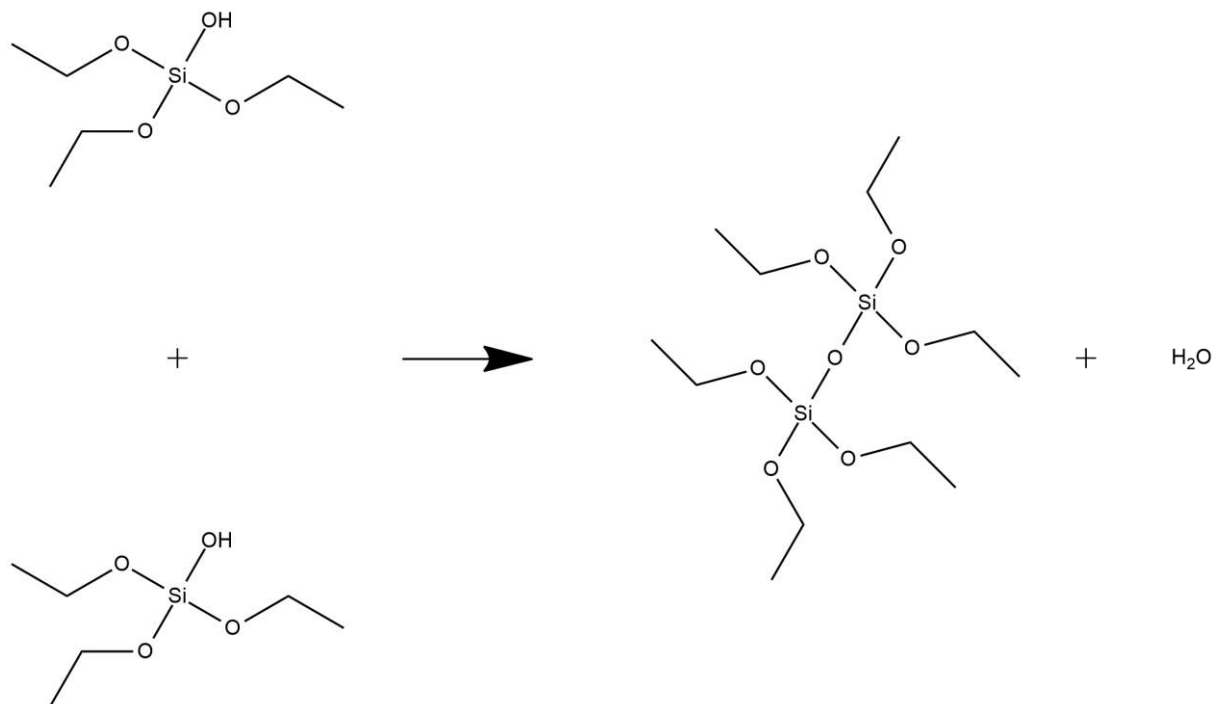


Figure 12 : Schéma de la polymérisation du TEOS

Pour la réalisation de cette synthèse, une solution d'ammoniaque a été utilisée comme catalyseur de la phase de polycondensation. Cela permet de réduire considérablement le temps de gélification par rapport au sol-gel traditionnel [3]. Le temps de maturation est passée de quelques jours à quelques heures.

Le protocole expérimental est résumé sur la figure 13.

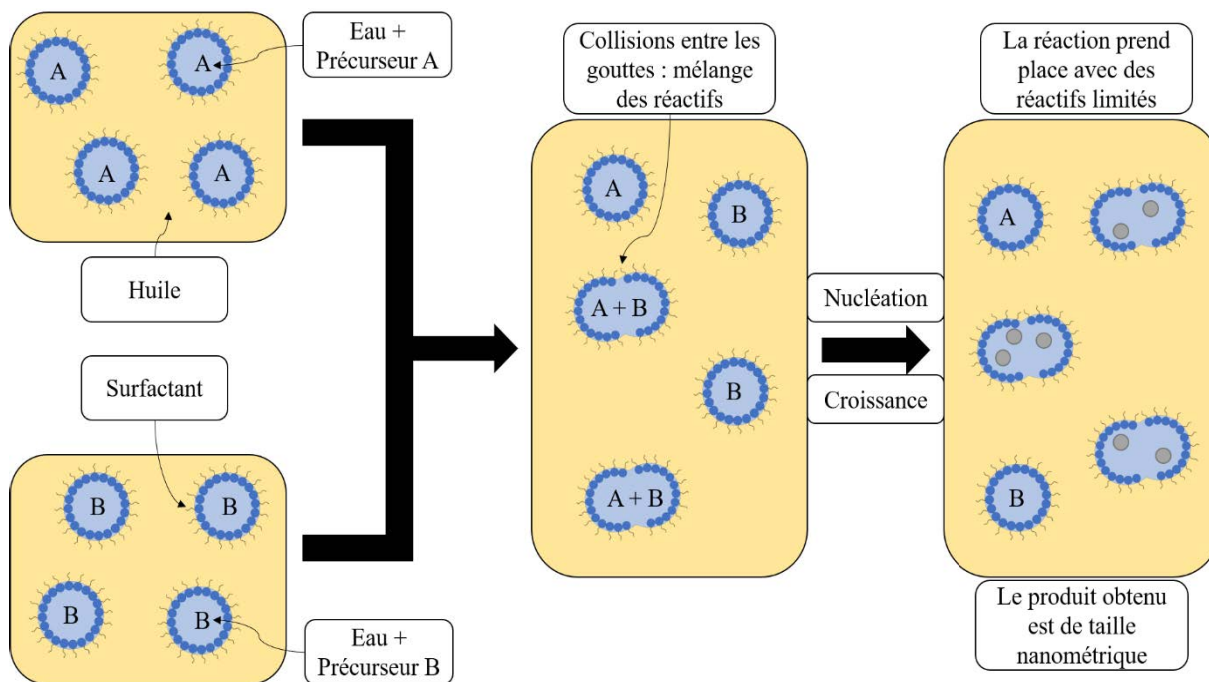


Figure 13 : Schéma du protocole de synthèse par émulsion

Après maturation, un gel blanc est recueilli par centrifugation à 10 000 g et lavé à plusieurs reprises avec de l'éthanol pour éliminer la plus grande partie des tensioactifs. Un traitement thermique est effectué pendant quatre heures à 100 °C afin d'obtenir une poudre blanche qui sera par la suite calcinée à 620 °C pendant quatre heures pour éliminer toutes traces possibles de tensioactifs. Chaque synthèse permet la production d'environ 7 g de poudre.

C. Extraction de la phycocyanine, un pigment de la spiruline

La création d'un matériau hybride verre bioactif/principe actif permettrait de renforcer et/ou d'ajouter des effets bénéfiques supplémentaires au verre utilisé seul initialement. Cette extraction avait pour objectif de récupérer le pigment phycocyanine (bleu) présent dans la spiruline en grande quantité. Une fois ce pigment extrait, il a été utilisé pour la création du matériau hybride avec le nanoverre bioactif.

Nous avons procédé à l'extraction du pigment phycocyanine à partir d'une cyanobactérie appelée *Spirulina Platensis* (communément la spiruline). L'extraction a été effectuée en collaboration avec l'équipe COOrInt de l'UMR CNRS 6226, du Professeur Bazureau et du Docteur Paquin. Il existe plusieurs méthodes possibles pour extraire la phycocyanine [4,5,6].

La méthode utilisée dans ce travail a été la suivante : les cyanobactéries séchées ont été broyées afin d'homogénéiser la taille moyenne des particules avant de passer au processus d'extraction. 2,5 g de spiruline brute ont été ajoutés dans un ballon de 125 mL avec un agitateur magnétique. Ensuite, 50 mL d'eau fraîchement distillée (pH 6,5) ont été ajoutés au ballon. Le pH a été ajusté si besoin à l'aide d'une solution de K_2HPO_4 10 mM (pH 8,99). Ce dernier joue un rôle important pour l'extraction de la phycocyanine [7]. Le ballon a été placé dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes à 40 kHz pour la destruction des parois cellulaires.

Ensuite, le ballon a été placé sans bouchon dans un micro-ondes Discover CEM disposant d'un système de contrôle de la température et de la puissance. L'extraction a été réalisée avec une puissance de 40 W et une température contrôlée de 40 °C pendant 20 minutes. Le contrôle de la température est important en raison de la dégradation des protéines de la spiruline au-delà de 55 °C [8]. Les résultats ont été centrifugés à 11 000 g pour éliminer la phase solide (débris cellulaires), puis filtrés sur un mélange célite-hydroxyapatite (50/50) en tant que phase de purification. Enfin, la solution a été congelée à l'azote liquide et lyophilisée à -56 °C pendant 3 jours.

Le schéma présenté sur la figure 14 résume l'opération d'extraction à partir de la spiruline. La photographie de la figure montre le liquide bleu obtenu à la fin de l'extraction et avant la lyophilisation.

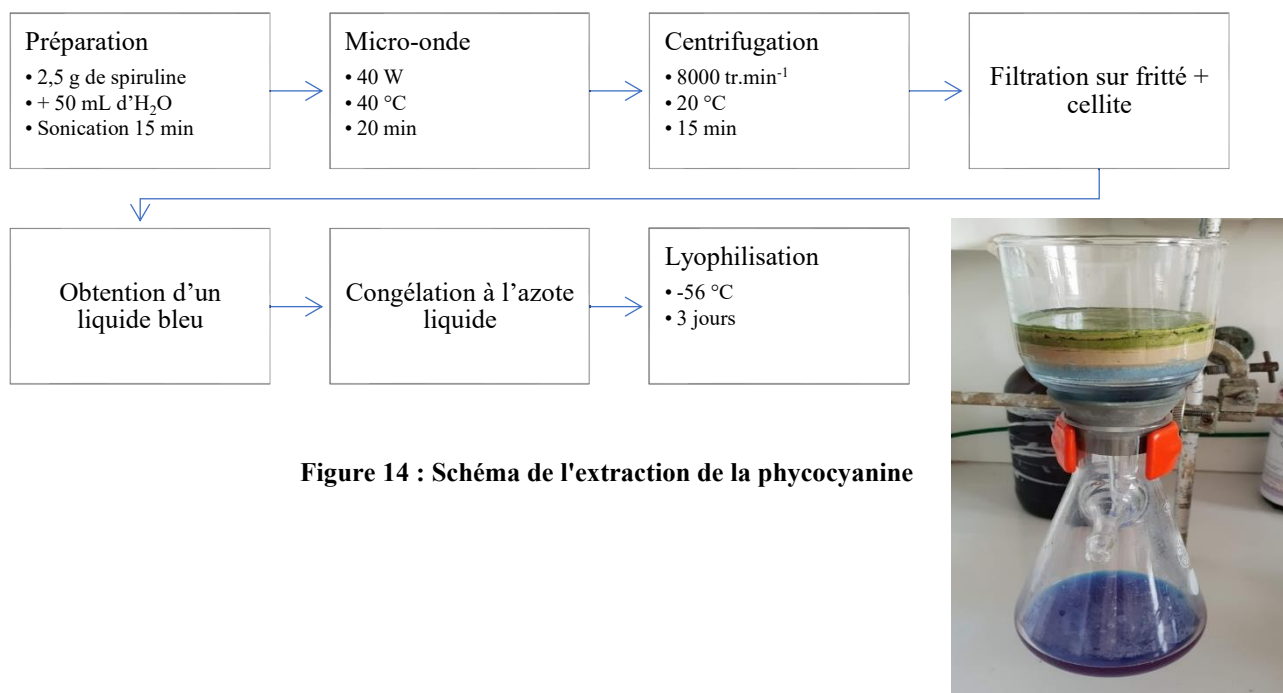


Figure 14 : Schéma de l'extraction de la phycocyanine

Les résultats concernant le taux d'extraction et la pureté de l'extrait de phycocyanine obtenus par cette méthode sont présentés au chapitre 5.

D. Associations nanoverre bioactif/phycocyanine et nanoverre bioactif/spiruline

Le protocole d'association de la poudre de nanoverre bioactif avec un composé actif a été le suivant : 1 g de nanoverre bioactif et la quantité de dopant (définie par le pourcentage de dopage du principe actif) ont été additionnés à 50 mL d'eau distillée puis mis sous forte agitation pendant une heure. Puis la solution a été congelée à l'azote liquide afin de stopper les réactions en cours et lyophiliser à -56 °C pendant 3 jours afin d'obtenir une poudre.

Ces opérations sont résumées sur le schéma de la figure 15 ci-dessous :

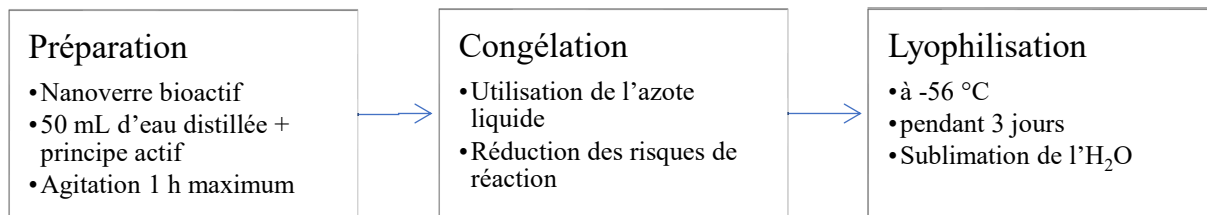


Figure 15 : Schéma du protocole d'association entre le verre bioactif et un principe actif

Les résultats des caractérisations physico-chimiques des matériaux hybrides obtenus *via* l'association avec les deux composés actifs étudiés dans cette thèse (spiruline et phycocyanine) sont présentés dans le chapitre 5.

II. Techniques, protocoles d'analyses et de caractérisations physico-chimiques

Dans cette partie nous traitons des techniques de caractérisation utilisées au cours des différentes analyses. Pour chaque méthode, une brève description du principe sera donnée et si besoin détaillée à l'aide d'annexes, ainsi que les paramètres d'acquisition, l'équipement utilisé et la préparation des échantillons.

A. Analyse structurale par diffraction des rayons X (DRX)

1. Principe

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique permettant l'accès à l'organisation spatiale des éléments du matériau étudié. Celle-ci donne accès à l'identification de phases, à la spécification de paramètres de mailles et finalement à la détermination de la structure cristalline si c'est possible [9,10,11].

Cette identification des phases cristallines est rendue possible par la détection *via* la diffraction des rayons X. La périodicité de l'arrangement spatial des cristaux est unique d'une phase à l'autre. Ces périodicités sont dues à un empilement de plans identiques dans un cristal et sont décrites *via* des longueurs correspondantes aux distances entre ces différents plans.

L'identification des phases présentes dans un échantillon se fait par comparaison du diagramme DRX obtenu au cours de l'analyse (positions et intensités des raies diffractées) avec un diagramme de référence [9,10,11].

2. Protocole expérimental

Les analyses des poudres de verre et des massifs de verre ont été enregistrées par un diffractomètre PANalytical X'Pert PRO de l'équipe Verres et Céramiques. Les mesures ont été effectuées sur une plage allant de 5 à 90 ° (2 θ) avec un pas de 0,026 ° et 40 secondes par pas. Le rayonnement X est produit par une anticathode de cuivre dont les conditions d'utilisation sont U = 50 kV et I = 40 mA. Les raies K $_{\alpha 1}$ ($\lambda_{Cu} = 1,54056 \text{ \AA}$) et K $_{\alpha 2}$ ($\lambda_{Cu} = 1,54439 \text{ \AA}$) sont isolées à l'aide d'un monochromateur arrière en graphite. Les échantillons ensuite ont été chargés sur des portes-échantillons en acier en s'assurant que la surface de l'échantillon soit bien dans le plan de référence de mesure de l'appareil.

B. Identification des groupements fonctionnels par spectroscopie d'absorption infrarouge (FT-IR)

1. Principe

La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR pour Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. L'absorption de ce rayonnement permet l'excitation des liaisons du matériau. La détection des vibrations caractéristiques à ces liaisons permet l'identification des fonctions chimiques présentes au sein du matériau [12,13,14].

Lorsque l'énergie sous forme de longueur d'onde apportée par le faisceau est proche de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement, entraînant une diminution de l'intensité (réfléchi ou transmise). L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier fournissant un rayonnement infrarouge dirigé vers l'échantillon et d'un capteur mesurant les longueurs d'ondes absorbées et l'intensité absorbée.

2. Protocole expérimental

Dans le cas de l'appareil utilisé, les échantillons doivent être mis sous la forme de pastilles. Les matériaux ont été broyés et mélangés avec du bromure de potassium (KBr), transparent à l'infrarouge et dont le rôle est de servir de matrice lors de l'analyse. Le rapport matériau/KBr est de 10 % pour 90 % en masse lors de la création de la pastille. L'analyse par infrarouge de nos échantillons a été effectuée sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker Equinox 55. La transmission infrarouge a été déterminée pour le domaine de nombre d'onde 4000 - 400 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .

C. Calcul des concentrations par spectrophotométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

1. Principe

La spectrophotométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis) soumet l'échantillon à un rayonnement entraînant une possible transition électronique *via* l'absorption de certaines longueurs d'onde. Le spectre électronique est la fonction reliant l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde [15].

La loi de Beer-Lambert indique que l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration et à la longueur d'onde d'absorption de l'échantillon et se définit comme suit :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

Avec : A_{λ} : l'absorbance à une longueur d'onde λ

ε_{λ} : le coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ à la longueur d'onde λ

l : la largeur de la cuve en cm

C : la concentration de la solution en $mol \cdot L^{-1}$

La spectroscopie UV-Vis peut donc être utilisée pour déterminer une concentration. Dans la pratique cette détermination se fait soit à l'aide d'une courbe d'étalonnage préétablie, soit en utilisant le coefficient d'extinction molaire quand celui-ci est connu.

2. Protocole expérimental

Avant de démarrer les mesures, une courbe d'étalonnage a été tracée en mesurant les intensités dans des étalons de concentrations connues. Les échantillons sous forme liquide ont été introduits dans la machine dans des cuves en quartz. Les analyses ont été réalisées sur deux spectrophotomètres différents : un premier UV Jenway 7315 et un second Agilent technologies Cary 60 UV-Vis. Les mesures ont été effectuées sur une plage de longueur d'onde allant de 190 à 1200 nm avec une résolution de 0,1 nm. L'absorbance mesurée est comprise entre - 0,300 et 3,000 avec une erreur de mesure de $\pm 0,001$. Les concentrations mesurées sont ensuite transcrites en $mg \cdot mL^{-1}$.

D. Étude de la composition chimique par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-OES)

1. Principe

Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (pour ICP-OES) ou la spectroscopie d'émission est une technique utilisée pour mesurer de façon quantitative des éléments chimiques. Elle permet la détection de ces éléments à l'état de traces (ppm) en solution [16,17].

L'échantillon est nébulisé dans un plasma d'argon (8000 K) où les atomes excités émettent une radiation caractéristique lors de leur retour à l'état fondamental. Les radiations sont dispersées par un monochromateur et détectées par des tubes photomultiplicateurs.

Les longueurs d'onde des radiations émises lors de la désexcitation (retour à l'état fondamental) sont caractéristiques des éléments et leur intensité indique leur concentration. La lumière émise par l'élément recherché est détectée, mesurée et comparée à celle émise par le même élément contenu dans des échantillons de concentration connue (étalons), analysés préalablement dans les mêmes conditions.

2. Protocole expérimental

Notre groupe de recherche utilise la spectroscopie d'émission plasma-optique à couplage inductif à l'aide d'une série iCAP 7000 (ThermoFisher Scientific). Il peut fournir une analyse multi-élément à faible coût pour mesurer des oligo-éléments dans une gamme d'échantillons liquides. En fonction de l'élément ou de la teneur, des analyses peuvent être effectuées en utilisant différentes mesures de longueur d'onde par des mesures axiales ou radiales afin d'assurer une mesure précise ($\pm 0,01$ ppm).

L'ICP-OES étant une méthode comparative, il est impératif avant de démarrer les mesures, de préparer des témoins de concentration encadrant la concentration de l'échantillon. Ces témoins permettront de créer une courbe d'étalonnage permettant au logiciel de calculer les concentrations des éléments à doser présents dans les échantillons.

Les échantillons solides sont pesés puis dissous à l'aide d'acide (nitrique 2 %) avant d'être envoyés dans le nébuliseur sous forme de fines gouttelettes par une pompe. Ces gouttelettes traversent le plasma à l'aide d'un flux d'argon. Une fois excité par le plasma, les éléments à doser émettront dès lors, des photons qui seront mesurés puis retranscrits en concentration *via* l'étalonnage réalisé précédemment.

E. Mesure de la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

1. Principe

Les mesures de taille s'effectuent à l'aide d'un processus appelé Dynamic Light Scattering (DLS). Il s'agit de mesurer le mouvement brownien de la particule et de le relier à sa taille. Pour ce faire, un laser éclaire les particules et un capteur analyse les fluctuations d'intensité dans la lumière dispersée lors du contact avec ces dernières [18]. De plus amples informations sont disponibles dans l'annexe II.

2. Protocole expérimental

Avant de procéder à la mesure, l'échantillon solide est mis en solution dans de l'eau distillée. La concentration dépend de la taille approximative de l'échantillon. Pour des échantillons dont les dimensions se situent entre 10 et 100 nm de diamètre, la solution ne doit pas dépasser une concentration de 5 % en masse. La solution est ensuite passée à l'ultrason pour 15 minutes afin d'éliminer les agrégats puis rapidement analysée. Les analyses sont effectuées sur une machine Zetasizer Nano ZS de Malvern permettant de mesurer des échantillons de tailles variant de 0,3 nm à 10 μm avec une précision de 2 %.

F. Caractérisation des propriétés thermiques par analyses différentielles ou thermogravimétriques

1. Principe

Les analyses thermiques sont un ensemble de mesures permettant de quantifier les variations de propriétés physiques ou chimiques. Ces analyses sont basées sur l'étude de variations caractéristiques de la masse ou de la conductivité thermique lors d'une augmentation ou une diminution contrôlée de la température [19].

L'Analyse Thermique Différentielle (ATD) est une méthode d'analyse se basant sur la différence de température entre un matériau évoluant sur la période de température étudiée et un matériau stable sur ce domaine de température [20]. Ce système permet d'obtenir les températures spécifiques liées à des phénomènes caractéristiques de changement de phase ainsi que les flux de chaleurs associés à ces transformations. Dans ce travail, l'analyse thermique nous permet de caractériser nos matériaux *via* les températures caractéristiques des verres : la température de transition vitreuse T_g , la température de cristallisation T_c et la température de fusion T_f .

L'autre analyse thermique utilisée au cours de ce travail est l'Analyse ThermoGravimétrique (ATG). Celle-ci permet l'étude des phénomènes thermiques qui se produisent en provoquant une variation de la masse de l'échantillon [21]. Le principe de cette technique repose sur la mesure continue au cours du temps de la masse de l'échantillon afin d'enregistrer de potentielles variations. Il est donc possible de suivre une variation de masse en fonction d'une augmentation de la température ou d'une variation à température fixe mais au cours d'un temps déterminé. La thermogravimétrie est très souvent utilisée en couplage avec l'analyse thermique différentielle.

2. Protocole expérimental

Les caractéristiques thermiques ont été mesurées en utilisant la calorimétrie à balayage différentiel (Differential Scanning Calorimetry DSC). Ces mesures ont été réalisées au moyen d'une Setaram Labsys 1600TG-DTA/DSC sous atmosphère de gaz N₂ à 0,1 MPa sans contrôle de pression.

Cet analyseur a été calibré en utilisant un étalonnage à trois pics avec SrCO₃, BaCO₃ et K₂CrO₄. La sensibilité de la thermobalance est de $\pm 0,1 \mu\text{g}$ et la précision du contrôle de la température est de $\pm 1 \text{ K}$.

Les analyses ont été réalisées avec une loi de chauffe de $5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ depuis la température ambiante (environ 20-25 $^\circ\text{C}$) jusqu'à 1350 $^\circ\text{C}$. Chaque fois, $40 \pm 0,1 \text{ mg}$ de poudre de verre ont été analysés. Les mesures ont été réalisées en utilisant une référence de platine vide identique au creuset contenant les verres analysés (mesure différentielle).

G. Mesure de la porosité : Méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET)

1. Principe

La méthode de mesure de la porosité et de la surface spécifique choisie lors de ce travail de thèse est la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET). Celle-ci permet la mesure de la surface spécifique et de la taille des pores d'un matériau à l'aide des phénomènes physiques d'adsorption/désorption d'un gaz [22,23]. Les informations obtenues sont ensuite interprétées selon le modèle BET. Le principe de cette méthode est développé dans l'annexe III.

Lors de la mesure, la cellule contenant l'échantillon est immergée dans l'azote liquide ; l'échantillon ainsi refroidi adsorbe l'azote dont la concentration diminue dans le gaz effluent. Après réchauffement de l'échantillon jusqu'à température ambiante, l'azote adsorbé est libéré, augmentant ainsi sa concentration dans l'effluent.

Les processus d'adsorption et de désorption sont représentés par des variations de concentration signalées par des pics sur l'enregistreur.

Les surfaces de ces pics sont directement proportionnelles à la quantité d'azote adsorbée ou désorbée par l'échantillon. Un circuit électronique calcule, suivant l'équation BET, le volume adsorbé de gaz puis la surface totale développée par l'échantillon.

La surface spécifique est alors obtenue en divisant la surface totale par la masse de l'échantillon. Ces analyses ont pu être réalisées grâce à l'aide précieuse du docteur Merdrignac-Conanec et de l'ingénieure Herbert.

2. Protocole expérimental

Les mesures BET ont été réalisées avec un analyseur Micromeritics ASAP 2010. L'adsorbat est un mélange hélium-azote ayant une teneur de 30 % en azote. Avant d'effectuer la moindre mesure, l'échantillon doit être dégazé par un traitement thermique à 250 °C. Cette étape est extrêmement importante pour obtenir des analyses reproductibles. Elle est nécessaire de façon à ôter de l'échantillon toutes les espèces (eau, CO₂, ...) susceptibles de se fixer durant son stockage. Ce dégazage se fait par une mise sous vide de l'échantillon, à température contrôlée.

H. Étude de la morphologie par microscopie électronique à balayage (MEB)

1. Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique basée sur le principe d'interaction électrons/matières. Un faisceau d'électrons primaires frappe la surface de l'échantillon et cet impact génère de nouveaux rayonnements : électrons secondaires, rétrodiffusés, Auger ou rayon X [24,25]. Ces rayonnements sont ensuite détectés par différents capteurs apportant des informations sur la matière composant l'échantillon. Cette technique est détaillée dans l'annexe IV.

2. Protocole expérimental

Toutes les analyses et les clichés réalisés par MEB ont été effectuées au Centre de Microscopie Electronique à Balayage et microAnalyse (CMEBA) de l'université de Rennes 1 avec l'aide des ingénieurs Calers, Gouttefangeas et Joanny.

- Préparation des échantillons

Les échantillons à analyser ont été métallisés par dépôt d'un alliage or-paladium (pulvérisation cathodique, Jeol JFC 1100) avant d'être introduits dans la chambre d'analyse. Cette métallisation permet d'éviter une accumulation importante de charges électroniques à la surface des échantillons (isolants) et réduit la profondeur de pénétration du faisceau, ce qui améliore la qualité de l'image.

- Observation des échantillons

L'observation de la surface des échantillons et la réalisation d'images s'effectuent par la collecte des électrons secondaires (contraste topographique) ou rétro-diffusés (contraste chimique), émis par la surface du matériau.

Les micrographies présentées dans ce travail de thèse ont été majoritairement réalisées sur le MEB à effet de champ Jeol JSM 6301F.

I. Analyse de l'état de surface par microscopie à force atomique (AFM)

1. Principe

La microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy AFM) est une technique basée sur le contact d'une pointe nanométrique sur la surface de l'échantillon. Cette pointe est en vibration harmonique et on lui impose une certaine amplitude de vibration.

Les interactions entre la surface de l'échantillon et la pointe modifie l'amplitude ou la fréquence de vibration de la pointe ce qui entraîne un signal électrique. Celui-ci est ensuite retransmis et transcrit par un système en données.

L'AFM permet de cartographier la surface d'un matériau mais également de définir d'éventuels changements de nature de la surface de ce matériau [26]. Le fonctionnement de l'AFM est développé dans l'annexe V

2. Protocole expérimental

Les mesures par AFM ont été effectuées dans le cadre d'une collaboration internationale avec l'entreprise Nanosurf GmbH à Langen en Allemagne.

L'échantillon est placé dans l'AFM et une pointe adaptée à la nature de l'échantillon est utilisée. Dans ce travail, les images ont été obtenues à l'aide d'une tête de numérisation FlexV5 + connectée à un contrôleur C3000 fonctionnant en mode d'imagerie phase dans l'air, avec une fréquence de vibration de 158,614 kHz et une amplitude de vibration de 1,5 V. L'analyse des images a été réalisée à l'aide du logiciel Mountain Maps.

III. Évaluation de la bioactivité : Tests *in Vitro*

Les études *in vitro* des biomatériaux synthétisés ont pour objectif de définir et d'évaluer leur cinétique de bioactivité. Dans ce but, des analyses physico-chimiques ont été mises en place pour caractériser les modifications morphologiques et/ou structurales de la surface. En complément les échanges ioniques entre le matériau et le milieu d'immersion ont été quantifiés.

A. Étude *in vitro* en l'absence de cellules

1. Introduction

La capacité à créer un échange d'ions avec le milieu d'immersion, ainsi que celle à former une couche d'hydroxyapatite à la surface de l'échantillon sont des facteurs primordiaux.

Ils indiquent la capacité d'un biomatériau à se lier aux tissus vivants. Les essais *in vitro* ont donc pour but d'évaluer ces deux capacités.

Pour réaliser ces tests, les échantillons ont été immergés dans un liquide physiologique synthétique dont la composition ionique est proche du plasma sanguin humain (appelé SBF pour Simulated Body Fluid) et dont la synthèse est décrite dans l'annexe VI.

Ce liquide a été élaboré en 1990 par Kokubo [27]. Le tableau 5 présente la composition ionique du SBF en comparaison avec la composition du plasma sanguin humain. Le pH de cette solution est ajusté à 7,4.

Tableau 5 : Concentration ioniques du SBF et du plasma sanguin humain en mM

Ions (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Les différences présentes entre le plasma sanguin humain et le SBF se focalisent sur les concentrations ioniques en Cl⁻ et en HCO₃⁻. En effet, en l'absence de matières organiques servant à l'équilibre chimique, la concentration en HCO₃⁻ si elle était identique à celle du plasma sanguin provoquerait une précipitation de CaCO₃. Ainsi, réduire la concentration dans le SBF tend à supprimer cette précipitation. Dans le cas des ions Cl⁻, aucune différence n'a été observée. Ces différences de concentration permettent un équilibre des charges dans la solution [28].

2. Protocole expérimental

Les matériaux étudiés prennent deux formes distinctes, la forme de cylindres de verre bioactif massif de 13 mm de diamètre sur 8 mm de hauteur, et sous la forme d'une poudre de granulométrie de 200 à 20 nm. Afin de déterminer la cinétique de bioactivité des différents verres élaborés et ce à différents délais.

a) *Biomatériaux sous forme de cylindres massifs*

Les cylindres de verres obtenus ont été inclus dans une résine organique afin de laisser seulement une surface contrôlée en contact avec le milieu physiologique. Puis ils ont été introduits dans des moules en téflon préalablement enduits d'un agent démoulant neutre.

Par la suite, la résine et le durcissant ont été introduits dans ces mêmes moules. Après un passage à l'étuve de 30 minutes, les cylindres de verre bioactif obtenus ont été recouverts de résine uniformément. Puis, chaque échantillon a été poli en environnement humide, de sorte que seul un côté du verre bioactif soit en contact avec le fluide physiologique lors des tests *in vitro*. De cette manière, la surface de contact du verre bioactif est identique pour tous les échantillons. Les blocs ont été ensuite rincés trois fois à l'éthanol et à l'eau distillée pour éviter toute contamination. Les échantillons se présentent sous la forme de cylindres d'un diamètre de 13 mm pour une hauteur de 8 mm, comme indiqué sur la figure 16.

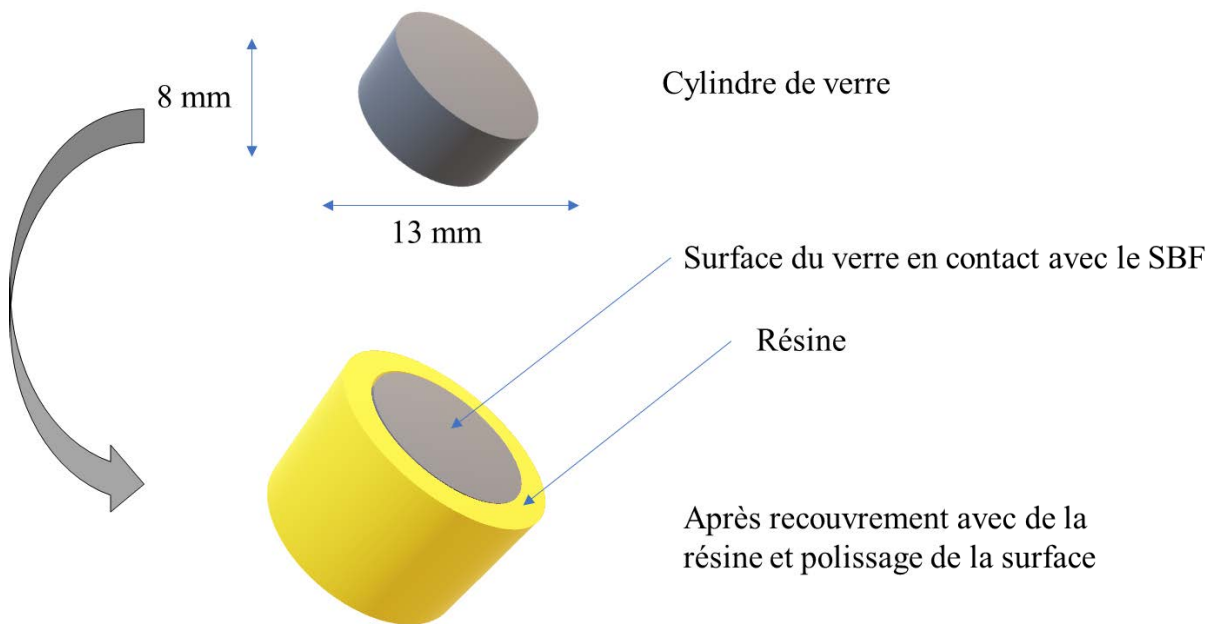


Figure 16 : Mise en forme de l'échantillon avant immersion dans le SBF

Pour les tests *in vitro*, les blocs ont été introduits dans des flacons hermétiques, puis immergés sous 8 mL de SBF, maintenus à 37 °C et sous agitation contrôlée (60 rotations par minute ou rpm) dans des incubateurs. Les délais d'immersion retenus pour les études des cylindres ont été de 15, 30 et 60 jours.

Après l'immersion, ceux-ci ont été retirés du SBF, rincés par 3 fois à l'eau distillée et finalement séchés à l'étuve à 100 °C. Ces blocs ont par la suite fait l'objet d'analyses au microscope électronique à balayage pour observer de possibles modifications de surface et d'éventuelle formation d'un carbonate de calcium. En complément et dans le cadre d'une collaboration internationale avec l'entreprise Nanosurf GmbH à Langen en Allemagne ces échantillons ont également été observés au microscope à force atomique pour une cartographie de leur surface.

b) Biomatériaux sous forme de poudre

Pour chaque taille de nanopoudres différentes obtenues au cours des travaux réalisés, 30 mg de poudre ont été immergés dans 60 mL de SBF dans des flacons hermétiques. Le choix de ce rapport 30mg/60mL a été établi au sein de notre groupe afin de favoriser le développement d'une hydroxyapatite. Les temps d'immersion adoptés pour ces expérimentations ont été les suivants : 2, 4, 8, et 24 heures puis 3, 7, 15 et 30 jours.

Les flacons ont été placés de la même façon que pour les échantillons massifs dans des incubateurs à 37 °C et sous agitation contrôlée (60 rpm) dans le but de simuler une circulation des liquides corporels.

Après immersion, une partie du SBF a été prélevée pour être dosée par ICP-OES afin de déterminer la cinétique des échanges ioniques solide/liquide, en l'occurrence ici entre le verre et le SBF. Les poudres ont été rincées par trois fois à l'eau distillée dans le but d'éliminer toute trace de potentiels sels dus aux précipitations puis séchées à l'étuve à 80 °C.

Une fois séchées, les poudres ont été analysées par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge pour suivre les modifications structurales.

B. Étude *in vitro* en présence de cellules : tests de viabilité cellulaire

La suite logique des études de bioactivité est l'étude de biocompatibilité. Ces tests ont été réalisés sur les biomatériaux sous forme de poudre obtenus après synthèse sol-gel. Ces études ont été menées par les biologistes-odontologistes du groupe Biomatériaux de l'UMR CNRS 6226.

1. Présentation des tests de cytotoxicité

a) *Caractéristiques recherchées*

Les études de compatibilité *in vitro* ont été basées sur plusieurs caractéristiques identifiées, elles sont regroupées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques liées à la biocompatibilité d'un matériau

Adhérence cellulaire	Signe de l'interaction entre la cellule et le biomatériau. Etape cruciale de l'intégration cellulaire.
Viabilité cellulaire	Vérification de l'effet non néfaste du biomatériau, soit par contact, soit par son effet de dissolution.
Prolifération cellulaire	Effet de multiplication cellulaire essentielle dans la réparation tissulaire.
Différenciation	Action de différenciation des cellules immatures pour qu'elles acquièrent des fonctions.
Effet mutagène	L'ajout du biomatériau ne doit pas entraîner une perturbation du programme génétique des cellules.

Ainsi, les verres bioactifs présentent deux actions biologiques : un effet direct, la création d'une interface d'hydroxyapatite carbonatée qui permet l'interaction avec les cellules et les tissus péri-implantaires. Un effet indirect, par la possible production de composé secondaire *via* la dissolution et le relargage du matériau.

Cette étude se concentre sur les tests colorimétriques de cytotoxicité qui mettent en évidence les différences entre les cellules de contrôles et celles additionnées au biomatériau testé. Notre attention s'est particulièrement portée sur le milieu d'insertion du biomatériau, donc les effets des produits de dissolution des biomatériaux sur les cellules.

b) Stérilisation des matériaux et préparation des milieux de tests conditionnés

La stérilisation des poudres a été effectuée par autoclavage pendant 20 minutes à 121 °C. Ces poudres ont ensuite été mises en contact d'un milieu de culture DMEM (pour Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium). Le DMEM est une solution contenant des vitamines, des acides aminés, du glucose et du fer, ce qui en fait un milieu de culture adapté pour la prolifération cellulaire.

Une fois les poudres additionnées au milieu de cultures, celui-ci est placé pendant 24 heures dans un incubateur de cellules. Le pourcentage d'ajout des poudres est de 1 % massique.

Après centrifugation le surnageant a été filtré sur des filtres de 0,22 µm de porosité afin d'éliminer le plus de particules agglomérées. Ce surnageant a ensuite été complété par du sérum de veau fœtal et le pH a été équilibré par addition d'HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S, solution tampon biochimique). Ces milieux conditionnés ont été stabilisés au moins une heure, dans l'incubateur de culture cellulaire, avant la mise en contact avec les lignées cellulaires.

c) Lignées cellulaires

Les deux lignées cellulaires utilisées au sein du laboratoire sont des lignées humaines établies ou immortelles. Ce type de cellules possède une croissance constante et est donc adapté aux tests de détermination de viabilité. Nous avons opté pour des cellules fortement impliquées dans la réparation osseuse (vascularisation et ostéogénèse) : des cellules endothéliales humaines : EA.hy926 et des ostéoblastes humains : SaOS-2.

Les cellules ont été cultivées à 37 °C sous atmosphère humide (hygrométrie > 90 %) en présence de 5 % de CO₂. Ce taux a permis au tampon carbonate/bicarbonate de sodium présent dans le milieu de culture de stabiliser le pH à 7,4 (pH physiologique).

Le milieu de culture utilisé pour chacun de ces types cellulaires est constitué de DMEM auquel il a été ajouté 10 % de FBS (pour Fetal Bovine Serum), de la P/S (Pénicilline 100 UI.mL⁻¹ et Streptomycine 100 µg.ml⁻¹), ainsi que de la glutamine (2 mM) et de l'HEPES (Solution Tampon ; 20 mM).

d) Culture cellulaire

Les cellules ont été entretenues en croissance exponentielle par deux repiquages hebdomadaires.

Elles ont été lavées deux à trois fois avec du tampon phosphate salin (phosphate buffered saline ou PBS) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺, puis décollées avec de la trypsine-EDTA. Le décollement cellulaire a été suivi sous microscope, l'addition d'un volume égal de DMEM complet inhibe l'action de la trypsine. La suspension cellulaire a été centrifugée (1000 rpm pendant trois minutes), le culot a été repris dans du DMEM complet et une numération électronique (Auto T4) a été effectuée.

e) Test colorimétrique de viabilité

Ce test permet une quantification rapide et sensible du nombre de cellules, reflet de la viabilité et de la prolifération cellulaire. Il est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. En présence du substrat MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5 diphényltétrazolium bromide), les sels de tétrazolium du substrat sont transformés en cristaux insolubles de Formazan grâce à l'activité de la succinate déshydrogénase. La quantité de sel Formazan produite par les cellules à partir du MTT est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm après dissolution des cristaux par du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou d'autres solvants comme l'isopropanol ou le dodécylsulfate de sodium (SDS). L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes.

2. Protocole expérimental

Les cellules ont été ensemencées la veille du test colorimétrique afin de permettre leur adhérence. Le surnageant a ensuite été délicatement enlevé pour être remplacé par du milieu conditionné. Les lignées ont été gardées au contact de ces milieux durant 24 à 72 heures au terme desquelles a été réalisé le test de viabilité.

La solution mère de MTT a été ajoutée au surnageant de culture de façon à obtenir une concentration finale de 1 mg.mL^{-1} (dilution au 1/5 ; soit 250 μL par puits pour une plaque de 24 puits).

Le tout a été laissé à incuber 2 à 4 heures dans une étuve de culture. À l'issue de ce temps d'incubation, le surnageant a été retiré puis une solution de DMSO (300 à 400 μL) a été ajoutée à chaque puits. Ce DMSO a pour but de faire éclater les cellules pour qu'elles libèrent leurs cristaux de Formazan qui vont ensuite se dissoudre. L'ensemble a été mis sous agitation entre 5 et 15 minutes sur un plateau pour obtenir une solution homogène. La densité optique (DO) a alors pu être lue à la longueur d'onde 550 nm.

Lors des tests, il a fallu tenir compte du témoin qui est le milieu de culture sans cellule. Ceci permet d'évaluer le bruit de fond c'est-à-dire la coloration non spécifique qui n'est pas due à la présence des cellules. Généralement le bruit de fond est faible voire négligeable.

À ces mesures ont été ajoutés le polystyrène de culture ainsi que la poudre seule qui a servi de référence pour les études comparatives de cette thèse. Les concentrations de verre bioactif utilisées ont été définies en accord avec les travaux antérieurs et la bibliographie.

Deux temps ont été retenus pour ces tests : un temps court de 24 heures pour évaluer les capacités d'adhérence au substrat et un temps moyen de 72 heures qui permet de mettre en évidence la multiplication cellulaire.

Des cellules ont également été cultivées dans le même milieu que le milieu de test mais en l'absence de biomatériaux pour constituer une référence à 100 %. La viabilité cellulaire est donnée en pourcentage en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{DO_{\text{Traité}}}{DO_{\text{Contrôle}}} * 100$$

Avec : $DO_{\text{Traité}}$: la densité optique obtenue pour les cellules traitées

$DO_{\text{Contrôle}}$: la densité optique obtenue pour les cellules de contrôles

Les expériences décrites ici ont été répliquées trois fois chacune de façon indépendante.

IV. Évaluation biologique : Test *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* ont été effectuées dans le cadre d'une collaboration internationale. Elles ont été réalisées en respectant les normes d'éthiques par la faculté de médecine de Sfax en Tunisie.

A. Mise en forme des biomatériaux

Après synthèse, les poudres de nanoverres bioactifs ont été mises en forme par pressage uni axial. La poudre prend la forme de cylindres de 13 mm de diamètre pour 3 mm de hauteur correspondant à 2 g de poudre. Elle a été pressée dans un moule de 13 mm de diamètre sous vide et avec une pression de 10 t pendant trois minutes pour obtenir des cylindres homogènes en quantité de produit et prêtes pour insertion.

Les deux types d'échantillons seront nommé NBG100 pour les implants composés de nanoverre bioactif pur de 100 nm et NBG-S qui est un composé hybride des mêmes nanoparticules de verre bioactif de 100 nm lié à 20 % en masse de spiruline.

Leur aspect est présenté sur la figure 17 avec à droite un échantillon de type NBG-S et à gauche un échantillon de type NBG100.



Figure 17 : photographie des échantillons avant insertion *in vivo*

B. Implantation des biomatériaux : Etude *in vivo* chez un modèle animal à pertes osseuses induites

1. Modèle animal et conditions d'animalerie

Le modèle choisit pour nos études est un lapin mâle de race Néo-Zélandaise, en croissance et dont le poids moyen est de deux kg. Le site d'implantation choisi des biomatériaux a été les condyles fémoraux des lapins.

Les conditions expérimentales de maintien de l'habitat de l'animal sont les suivantes :

- La température : ambiante varie entre 23 et 30 °C.
- La lumière : Le cycle d'intensité lumineuse requis pour les animaux de laboratoire est de 12h/12h (cycle jour/nuit).
- L'alimentation : Les animaux ont le libre accès à l'eau et à la nourriture qui était équilibrée d'un point de vue énergétique.

- Le bruit : il est nécessaire de contrôler les bruits engendrés par les divers équipements (mécaniques, soufflerie, dispositifs de régulation de température et par les activités du personnel...).
- La ventilation : une ventilation adéquate est absolument nécessaire, elle permet de réguler la température et l'humidité, d'assurer un bon apport d'oxygène et d'éliminer les poussières et les odeurs néfastes.
- Les cages : de tailles adaptées à celles des lapins, sont disposées de façon adjacente, de manière à améliorer les contacts sociaux de l'animal

Ces lapins ont été répartis en quatre groupes contenant chacun cinq lapins :

- Des lapins témoins
- Des lapins opérés sans implant
- Des lapins implantés avec NBG100
- Des lapins implantés avec NBG-S

Ces groupes ont été multipliés sur les quatre délais retenus pour cette étude : 15 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois.

2. Expérimentations animales : Protocole opératoire d'implantation

a) *Préparation à l'opération*

Les lapins ont été préparés à l'opération d'implantation en appliquant le protocole suivant : Une pré-anesthésie par injection intramusculaire de kétamine (kétamine 250 mg.g⁻¹ PANPHARMA, France) à la dose de 1 mL a été effectuée. Après une heure et demie, une seconde injection de kétamine de 1 mL ainsi qu'une injection d'Hypnovel® de 0,1 mL a été administrée en intramusculaire. Après la seconde injection, l'animal a été isolé et placé au calme durant 15 à 20 minutes environ, les yeux fermés.

Une anesthésie locale à l'aide de la xylocaïne (Unicaïne 2 % ®, UNIMED) à la dose de 5 mL a également été associée à l'action des autres injections.

L'association de l'anesthésie générale et locale a permis d'obtenir une bonne anesthésie ainsi qu'une bonne analgésie.

b) Déroulement de l'opération

La préparation de l'animal receveur de l'implant

Le jour de l'intervention, l'animal opéré reçoit une injection préanesthésique. Cette période, au cours de laquelle l'animal est en respiration spontanée, a été mise à profit pour réaliser la dépilation du membre opéré grâce à de la crème dépilatoire. Celle-ci a été complète et minutieuse, sur tout le condyle fémoral.

L'acte chirurgical

Des incisions cutanées et sous cutanées sont effectuées suivie d'une ouverture de l'aponévrose musculaire, l'objectif est de passer sous le corps musculaire du condyle. C'est par des ciseaux à disséquer et une rugine fine que les corps musculaires sont décollés de toute la circonférence du condyle. Une perte de 6 mm de diamètre a été créée à la surface de l'os. Les biomatériaux (NBG100 and NBG-S) ont comblé les pertes de substance osseuse pour les groupes concernés, comme prévu, aucun comblement n'a été fait pour le groupe de lapins témoins opérés.

La fermeture des plans profonds s'est faite par du fil résorbable après un lavage abondant au sérum physiologique. La suture cutanée a été réalisée au fil non résorbable. De la Bétadine gel a été appliqué avant la mise en place du pansement, sur les différentes plaies opératoires afin de les désinfecter.

c) Soins post opératoire

Un contrôle quotidien des plaies a permis de vérifier l'état des cicatrices et de nettoyer les plaies. Si besoin, les plaies ont été nettoyées au sérum physiologique et à la Bétadine gel.

Par la suite, en fonction des délais préétablis, les lapins ont été sacrifiés et les fémurs implantés ont été prélevés.

Références du chapitre 2 :

- [1] Hench, L. L. The Story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* **2006**, *17* (11), 967–978.
<https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [2] Zheng, K.; Boccaccini, A. R. Sol-Gel Processing of Bioactive Glass Nanoparticles: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *249*, 363–373.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [3] Labbaf, S.; Tsigkou, O.; Müller, K. H.; Stevens, M. M.; Porter, A. E.; Jones, J. R. Spherical Bioactive Glass Particles and Their Interaction with Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Biomaterials* **2011**, *32* (4), 1010–1018.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.082>.
- [4] Chamorro-Cevallos, G. Methods for Extraction, Isolation and Purification of C-Phycocyanin: 50 Years of Research in Review. *IJFNS* **2016**, *3* (3), 1–10.
<https://doi.org/10.15436/2377-0619.16.946>.
- [5] Hynstova, V.; Sterbova, D.; Klejdus, B.; Hedbavny, J.; Huska, D.; Adam, V. Separation, Identification and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls in Dietary Supplements Containing Chlorella Vulgaris and Spirulina Platensis Using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *148*, 108–118.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.018>.
- [6] Suresh P. Kamble, Rajendra B. Gaikar, Rimal B. Padalia and Keshav D. Shinde., Extraction and purification of C-phycocyanin from dry Spirulina powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2013**, *3* (08): 149–153.

- [7] Silveira, S. T.; Burkert, J. F. M.; Costa, J. A. V.; Burkert, C. A. V.; Kalil, S. J. Optimization of Phycocyanin Extraction from *Spirulina Platensis* Using Factorial Design. *Bioresource Technology* **2007**, *98* (8), 1629–1634.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>.
- [8] Silveira, S. T.; Burkert, J. F. M.; Costa, J. A. V.; Burkert, C. A. V.; Kalil, S. J. Optimization of Phycocyanin Extraction from *Spirulina Platensis* Using Factorial Design. *Bioresource Technology* **2007**, *98* (8), 1629–1634.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>.
- [9] Klug, H. P.; Alexander, L. E. *X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials*, 2d ed.; Wiley: New York, **1974**.
- [10] Cullity, B. D.; Stock, S. R. *Elements of X-Ray Diffraction*, 3. ed., internat. ed.; Pearson/Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, **2001**.
- [11] Jenkins, R.; Snyder, R. L. *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*; Chemical analysis; Wiley: New York, **1996**.
- [12] Sivasankar, B. *Instrumental Methods of Analysis*; Oxford University Press: New Delhi, **2012**.
- [13] Bell, R. J. *Introductory Fourier Transform Spectroscopy*; Academic Press: New York, **1972**.
- [14] Griffiths, P. R.; De Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; Chemical analysis; Wiley: New York, **1986**.
- [15] Perkampus, H.-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1992**.
- [16] Montaser, A., Golightly, D. W. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, 2nd ed.; Eds.; VCH Publishers: New York, N.Y, **1992**.
- [17] Grove, E. L. *Applied Atomic Spectroscopy*; Springer US: Boston, MA, **1978**.
- [18] Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*; **1985**.
- [19] Claudy, P. *Analyse calorimétrique différentielle : Théorie et applications de la d.s.c.*; Editions TEC & DOC : Lavoisier: Paris; Londres, **2005**.

- [20] Speyer, R. F. *Thermal Analysis of Materials*; Materials engineering; Marcel Dekker: New York, **1994**.
- [21] Wendlandt, W. W. *Thermal Analysis*, 3rd ed.; Chemical analysis; Wiley: New York, **1986**.
- [22] Rouquerol, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. Introduction. In *Adsorption by Powders and Porous Solids*; Elsevier, **1999**; 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-012598920-6/50002-6>.
- [23] Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60* (2), 309–319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>.
- [24] Oatley, C. W. The Early History of the Scanning Electron Microscope. *Journal of Applied Physics* **1982**, *53* (2), 1–13. <https://doi.org/10.1063/1.331666>.
- [25] Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*; Springer US: Boston, MA, **2003**.
- [26] *Atomic Force Microscopy in Process Engineering: Introduction to AFM for Improved Processes and Products*, 1. ed.; Bowen, W. R., Hilal, N., Eds.; Butterworth-Heinemann IChemE series; Elsevier/Butterworth-Heinemann: Amsterdam, **2009**.
- [27] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions Able to Reproduce in Vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24* (6), 721–734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>.
- [28] Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>

Chapitre 3 : Études physico-chimiques
et biologiques des verres bioactifs
synthétisés par fusion

Chapitre 3 : Études physico-chimiques et biologiques des verres bioactifs synthétisés par fusion

I. Synthèses et caractérisations des verres bioactifs purs et dopés

Les verres bioactifs étudiés dans ce chapitre ont été synthétisés par la méthode de fusion, celle-ci est présentée dans le chapitre 2. Ce travail constitue la poursuite du développement de verres bioactifs en tant que biomatériaux en site osseux. Des éléments possédant des propriétés physiologiques intéressantes pour des applications dans le domaine biomédical ont été introduits dans la matrice vitreuse. Les verres bioactifs dopés ainsi obtenus ont fait l'objet d'études physico-chimiques.

A. Composition chimique des verres bioactifs étudiés

1. Choix de la composition chimique

La composition de référence des bioverres développée dans notre groupe est le verre noté 46S6, il s'agit d'une composition à base des oxydes de silicium (SiO_2), de calcium (CaO), de sodium (NaO) et de phosphore (P_2O_5). Elle est proche de la composition développée par Larry Hench pour le Bioglass[®] 45S5 [1]. Le 46S6 est synthétisé pur, puis dopé au zinc ($46\text{S6-X}_{\text{Zn}}$) et au strontium ($46\text{S6-X}_{\text{Sr}}$).

Afin d'observer l'influence de ces éléments sur les propriétés des verres bioactifs, ils ont été introduits dans des teneurs allant de quantités similaires à celles qui existent en milieu physiologique jusqu'à des teneurs de 10 % massique pour une étude thermodynamique. Les tableaux 7 et 8 présentent les compositions étudiées en pourcentages massiques.

Tableau 7 : Compositions des verres bioactifs dopés au zinc en % massique

	SiO₂	CaO	Na₂O	P₂O₅	ZnO	Zn
46S6	46,00	24,00	24,00	6,00	0	0
46S6-0,1Zn	46,00	23,94	23,94	6,00	0,12	0,10
46S6-1Zn	46,00	23,38	23,38	6,00	1,24	1,00
46S6-5Zn	46,00	20,89	20,89	6,00	6,22	5,00
46S6-8Zn	46,00	19,04	19,04	6,00	9,92	8,00
46S6-10Zn	46,00	17,78	17,78	6,00	12,44	10,00

Tableau 8 : Compositions des verres bioactifs dopés au strontium en % massique

	SiO₂	CaO	Na₂O	P₂O₅	SrO	Sr
46S6	46,00	24,00	24,00	6,00	0	0
46S6-0,1Sr	46,00	23,94	23,94	6,00	0,12	0,10
46S6-1Sr	46,00	23,40	23,40	6,00	1,19	1,00
46S6-5Sr	46,00	21,02	21,02	6,00	5,95	5,00
46S6-8Sr	46,00	19,23	19,23	6,00	9,53	8,00
46S6-10Sr	46,00	18,04	18,04	6,00	11,91	10,00

Le protocole de synthèse des verres bioactifs est celui développé dans le chapitre 2, le verre 46S6 et les verres dopés au zinc (Zn) et au strontium (Sr) utilisent les composants présentés en annexe I.

La pureté chimique de ces composants a été revérifiée. Les compositions chimiques des verres synthétisés ont toutes été vérifiées par des analyses ICP-OES qui sont présentés en Annexe I.

2. Intérêts physiologiques des éléments dopants

Toutes les cellules sont majoritairement composées d'eau et de structures carbonées, il est donc naturel de retrouver l'oxygène, le carbone et l'hydrogène présents en très grandes quantités dans le vivant. L'azote, le phosphore et le calcium, en plus des éléments cités précédemment, représentent 95,8 % en masse de la composition du corps humain. Pourtant, le corps humain contient de nombreux autres éléments du tableau périodique sous forme de traces. Ainsi on peut distinguer quatre catégories d'éléments au sein du corps humain, celles-ci sont indiquées dans le tableau 9 [2] :

Tableau 9 : Eléments présents dans le corps humain [2]

Présence Majeure		Présence Mineure (1 % > x > 0,01 %)		Présence Trace ppm	
Oxygène	Calcium	Potassium	Magnésium	Cuivre	Silicium
Carbone	Phosphore	Fer	Iode	Fluor	Strontium
Hydrogène	Azote	Sodium	Chlore	Zinc	Aluminium

Ce travail se concentrera sur les effets du zinc et du strontium, ces deux éléments sont essentiels au bon fonctionnement du squelette et présentent des intérêts dans la restauration du tissu osseux. Pour rappel, ces intérêts sont développés dans le chapitre 2.

B. Caractérisation physico-chimique des verres synthétisés

1. Étude structurale par diffraction des rayons X

Pour les analyses de structures, trois verres ont été caractérisés : le verre pur 46S6 et deux autres verres qui présentent les plus fortes teneurs en éléments chimiques dopants soit le 46S6-10_{Zn} contenant 10 % massique du Zn et le 46S6-10_{Sr} contenant 10 % massique du Sr.

L'objectif était de suivre le changement de structure cristallographique au sein de la matrice vitreuse lors de l'ajout des dopants.

Les diffractogrammes des différents verres présentent tous un halo de diffraction entre 25 et 40 ° (2 θ). Ce halo est caractéristique d'un matériau amorphe et renseigne sur l'absence de répétibilité dans l'organisation de la matrice vitreuse.

Les diagrammes de diffractions suivants présentent les verres avec les plus fortes teneurs en dopants. Les verres avec des teneurs en dopant plus faibles présentent des profils similaires à ceux présentés sur la figure 18.

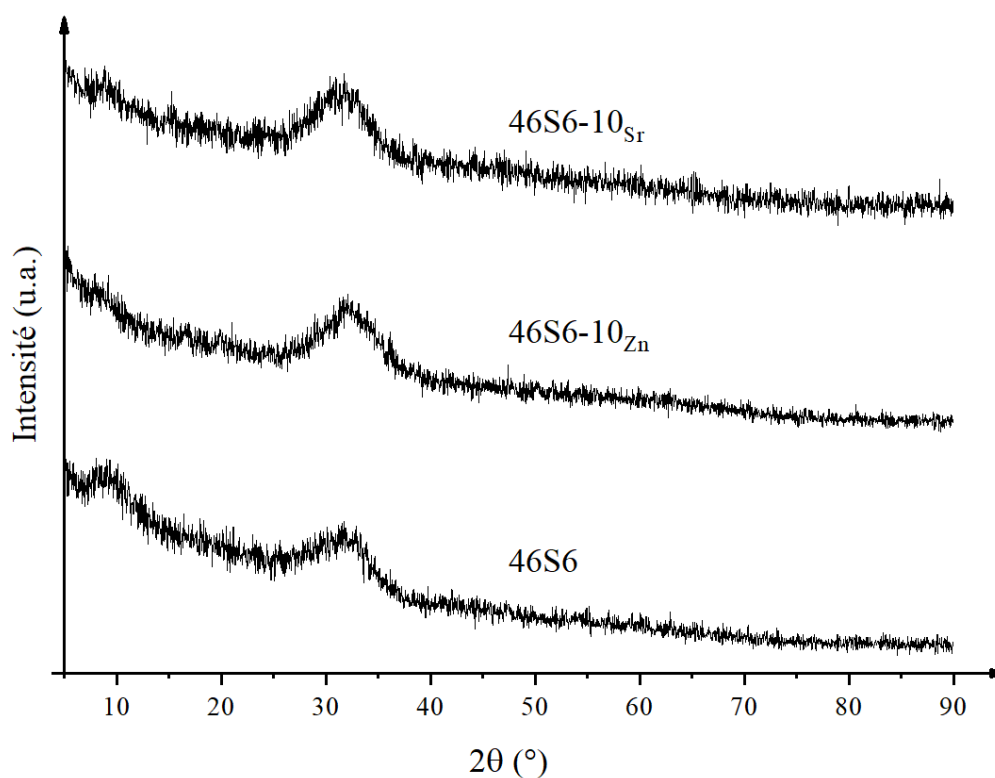


Figure 18 : Diffractogrammes des verres 46S6, 46S6-10_{Zn} et 46S6-10_{Sr}

Aucune modification structurale n'est détectable par diffraction des rayons X jusqu'à 10 % en masse d'ajout d'éléments chimiques dopants. Les recherches antérieures de notre laboratoire trouvent des résultats similaires avec d'autres éléments tels que le titane, le cuivre et l'argent [3,4].

2. Identification des groupements fonctionnels par spectrométrie d'absorption infrarouge

Les spectres de transmission obtenus par spectroscopie infrarouge des différents verres présentent des résultats similaires à des recherches antérieures au sein de notre groupe de recherche [5]. Dans un souci de clarté, les verres bioactifs présentés dans cette partie sont le verre 46S6 pur et le verre 46S6 dopée à 10 % en masse en Zn ainsi que sa version dopée en Sr. Ils sont notés 46S6-10_{Zn} et 46S6-10_{Sr}.

La spectroscopie infrarouge permet l'identification des groupements caractéristiques dans le cadre des verres phosphatés. Elle montre que l'ajout de cations entraîne une modification de la forme des spectres infrarouges et de la position de certaines bandes, particulièrement les bandes des liaisons P-O [6]. De même, il a été démontré que l'ajout dans une matrice vitreuse d'ions alcalins entraîne une plus grande organisation structurale localisée [7].

Les spectres infrarouges des verres bioactifs ont révélé plusieurs bandes caractéristiques, comme le montrent les spectres de la figure 19.

En ce qui concerne le composé de verre 46S6, les spectres FT-IR ont confirmé la présence d'une liaison chimique Si-O-Si à 924 cm⁻¹, 748 cm⁻¹ et 510 cm⁻¹ à 430 cm⁻¹ et une liaison P-O à 600 cm⁻¹. Le changement pour les verres dopés avec le Sr et le Zn à 600 cm⁻¹ révèle une modification de la liaison P-O probablement due à l'ajout du Zn, qui remplace les atomes de sodium (Na) et de calcium (Ca) dans la structure du verre. L'électronégativité plus forte du Zn contribue à la modification de la liaison P-O entraînant sa disparition sur le spectre infrarouge des verres dopés au Zn.

Lorsque le Sr est ajouté, la liaison perd de la force en raison du remplacement du Ca et du Na dans la structure.

De plus, l'apparition d'une petite bande à 680 cm^{-1} sur les 10 % en masse de Zn et 10 % en masse de Sr correspond à la formation d'une nouvelle liaison chimique Si-O-Si probablement due à une modification de structure interne telle que le remplacement du Ca par du Sr et l'électronégativité plus forte du Zn provoquant des modifications de structure liées à la modification des longueurs de liaisons.

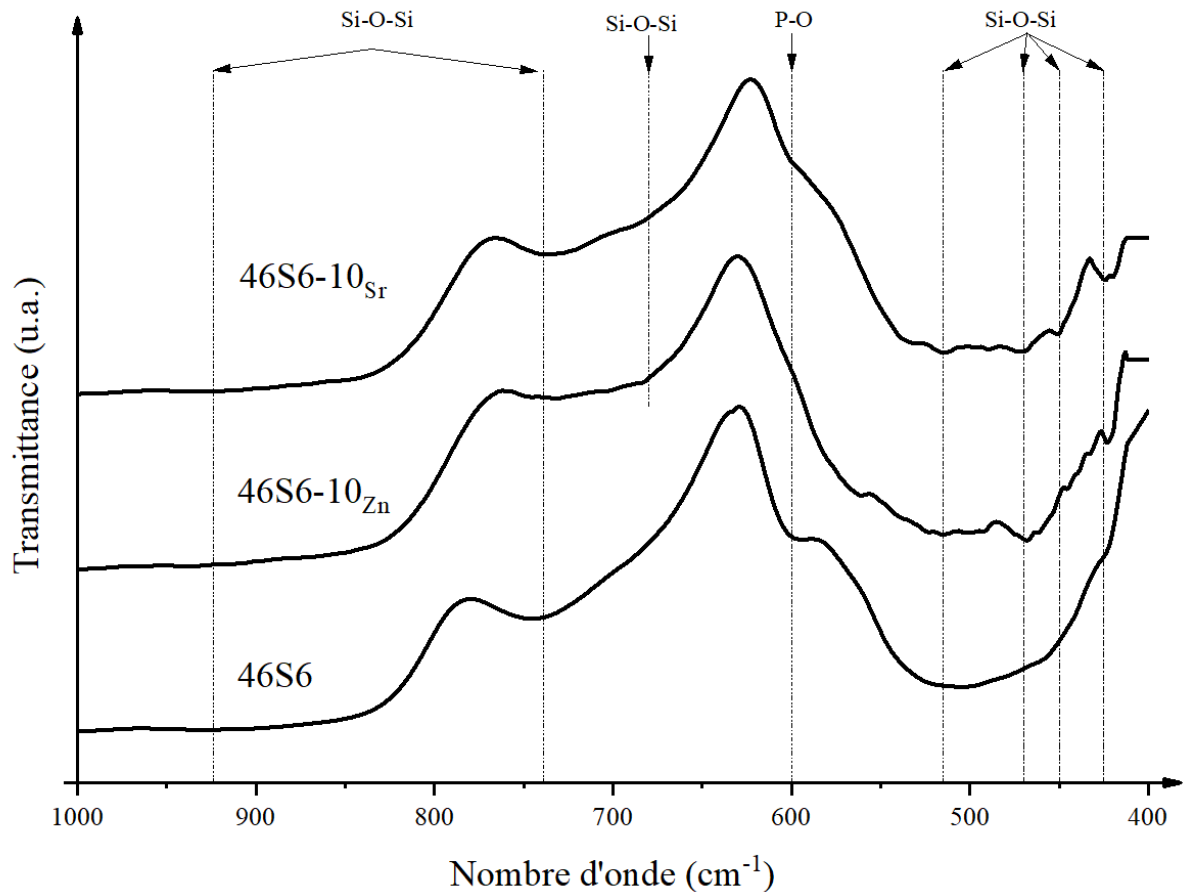


Figure 19 : Spectroscopie infrarouge des verres 46S6, 46S6-10_{Zn} et 46S6-10_{Sr}

C. Conclusion

L'ajout d'éléments métalliques dans la matrice vitreuse du verre 46S6 entraîne des modifications structurales mineures. L'introduction de 10 % en masse du Zn et du Sr entraîne des diminutions d'intensité des bandes caractéristiques des liaisons Si-O.

Elle a également un effet d'atténuation sur une bande de liaison P-O. Ces modifications sont dues à la nature des dopants ajoutés au réseau de la matrice vitreuse. En effet, l'atome de Sr est plus gros que l'atome de Zn (200 et 135 pm respectivement) alors que le Zn est plus électronégatif que le Sr (1,65 pour 0,95). Ces différences ont un effet immédiat dans l'environnement où se trouvent ces éléments ce qui entraîne des variations dans les liaisons attenantes et donc dans les résultats de spectrométrie infrarouge.

II. Étude du comportement thermique des verres dopés en fonction de la teneur en dopant

Cette étude thermodynamique est consacrée à l'analyse thermique différentielle (ATD) des différents verres synthétisés et caractérisés dans la première partie de ce chapitre. L'objectif dans celle-ci est d'observer l'effet des dopants sur les caractéristiques thermiques des verres.

Pour chaque composition, les caractéristiques thermiques ont été déterminées. La stabilité thermique des différents verres sera ensuite calculée ainsi que leurs excès d'entropie respectifs. Ces calculs permettront d'obtenir des informations sur l'effet des éléments dopants introduits et de mieux comprendre la réactivité chimique des verres, ce dernier point est capital dans le cadre d'une recherche sur la bioactivité.

A. Analyse thermique différentielle des verres

Les compositions chimiques des verres analysés sont des variations du verre 46S6 avec des variations de la quantité de dopant : 0,1 ; 1 ; 5 ; 8 et 10 en pourcentage massique. Les compositions chimiques exactes sont présentées dans la première partie de ce chapitre.

L'ATD a été utilisée pour déterminer les températures caractéristiques des verres de cette étude. Celles-ci sont : la température de transition vitreuse T_g , la température de début de cristallisation T_c et la température de début de fusion T_f .

La stabilité thermique (TS), définie selon la formule de Dietzel, a été calculée pour chaque verre [8] :

$$TS = T_c - T_g$$

Avec : TS : la stabilité thermique

T_c : la température de cristallisation

T_g : la température de transition vitreuse

1. Influence des oxydes de zinc et de strontium sur les caractéristiques thermiques des verres

a) *Effets de l'oxyde de zinc sur les températures caractéristiques des verres*

L'effet de l'oxyde de zinc (ZnO) sur les verres bioactifs varie en fonction de la quantité ajoutée. La quantité d'oxyde de sodium (Na₂O) et d'oxyde de calcium (CaO) diminue en fonction de la quantité de ZnO introduite dans les verres tout en maintenant le rapport Na₂O/CaO égal à 1. Des thermogrammes DSC avec une loi de chauffe de 5 °C.min⁻¹ sont présentés à la figure 20. Tous les thermogrammes présentent trois variations qui correspondent respectivement à la T_g , la T_c et la T_f .

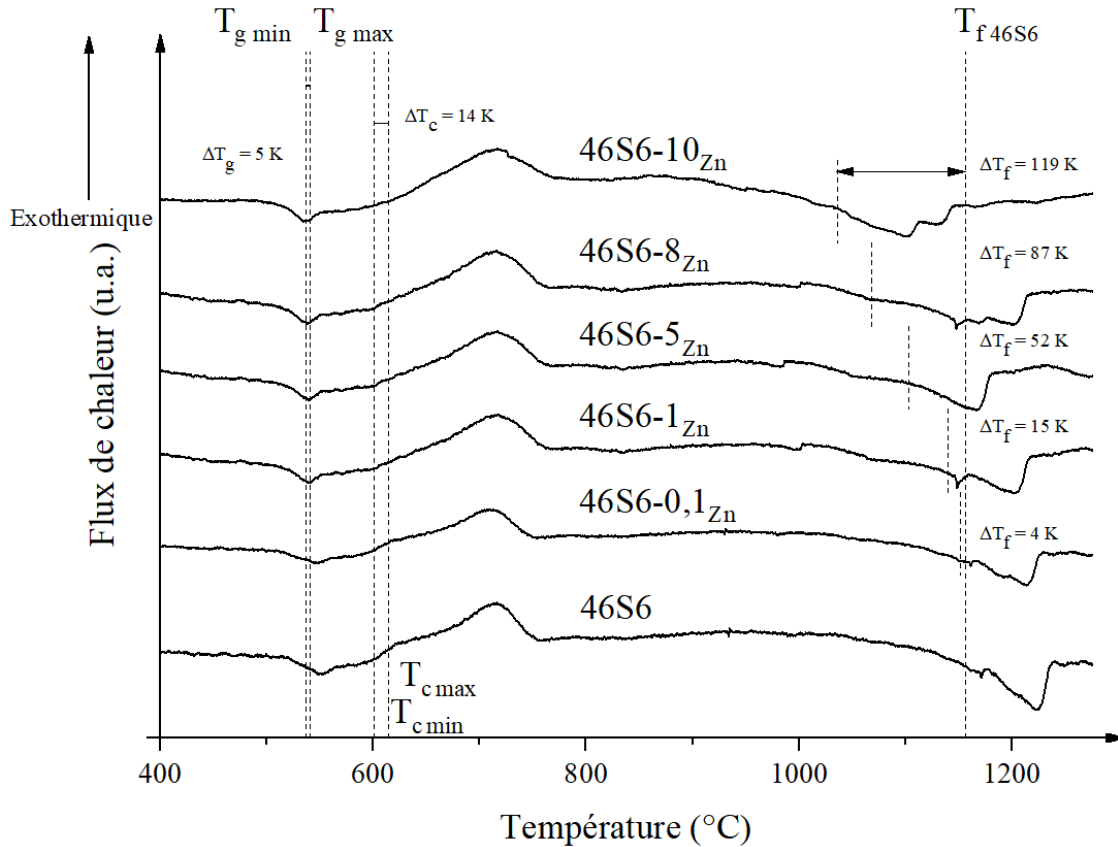


Figure 20 : Thermogrammes des verres dopés au zinc

Les variations des températures caractéristiques en fonction des différentes teneurs en ZnO montrent que la présence de celui-ci produit une faible diminution de la T_g ($\Delta T_g = 5 \text{ K}$) et des variations de la T_c ($\Delta T_c = 14 \text{ K}$). Ces faibles diminutions de la T_g et de la T_c dans tous les verres dopés au Zn sont dues à son effet sur les arrangements de structures internes. Cette transformation est révélée dans les spectres FT-IR, mais n'est pas détectée par les diagrammes de diffraction des rayons X en raison de la limite de détection du diffractomètre utilisé. Cependant, la T_f subit une variation importante en relation avec la teneur en Zn dans la matrice du verre ($\Delta T_f = 119 \text{ K}$). Le tableau 10 indique toutes les températures caractéristiques des verres dopés au Zn.

Tableau 10 : Valeurs expérimentales des températures caractéristiques et de la stabilité thermique (TS) en fonction de la teneur en Zn dans la matrice du verre

Échantillons	T _g (°C)	T _c (°C)	T _f (°C)	TS (K)
46S6	541	608	1155	67
46S6-0,1Zn	537	605	1151	68
46S6-1Zn	538	605	1140	67
46S6-5Zn	536	604	1103	68
46S6-8Zn	536	615	1068	79
46S6-10Zn	537	601	1036	64

b) Effets de l'oxyde de strontium sur les températures caractéristiques

Les effets sur les verres bioactifs dopés en oxyde de strontium (SrO) dépendent de la quantité de Sr introduite. Comme dans les verres dopés en ZnO, la quantité en Na₂O et CaO diminue en fonction de la quantité en SrO introduite dans les verres. L'introduction de SrO ne change pas la structure du réseau, car les deux charges positives de Sr²⁺ sont équilibrées et créent deux tétraèdres liés par des liaisons ioniques. De cette façon, les liaisons améliorent leur durabilité chimique. Les thermogrammes DSC réalisés avec une loi de chauffe de 5 °C.min⁻¹ sont présentés sur la figure 21. Tous les thermogrammes présentent trois phénomènes qui correspondent respectivement à la T_g, la T_c et la T_f.

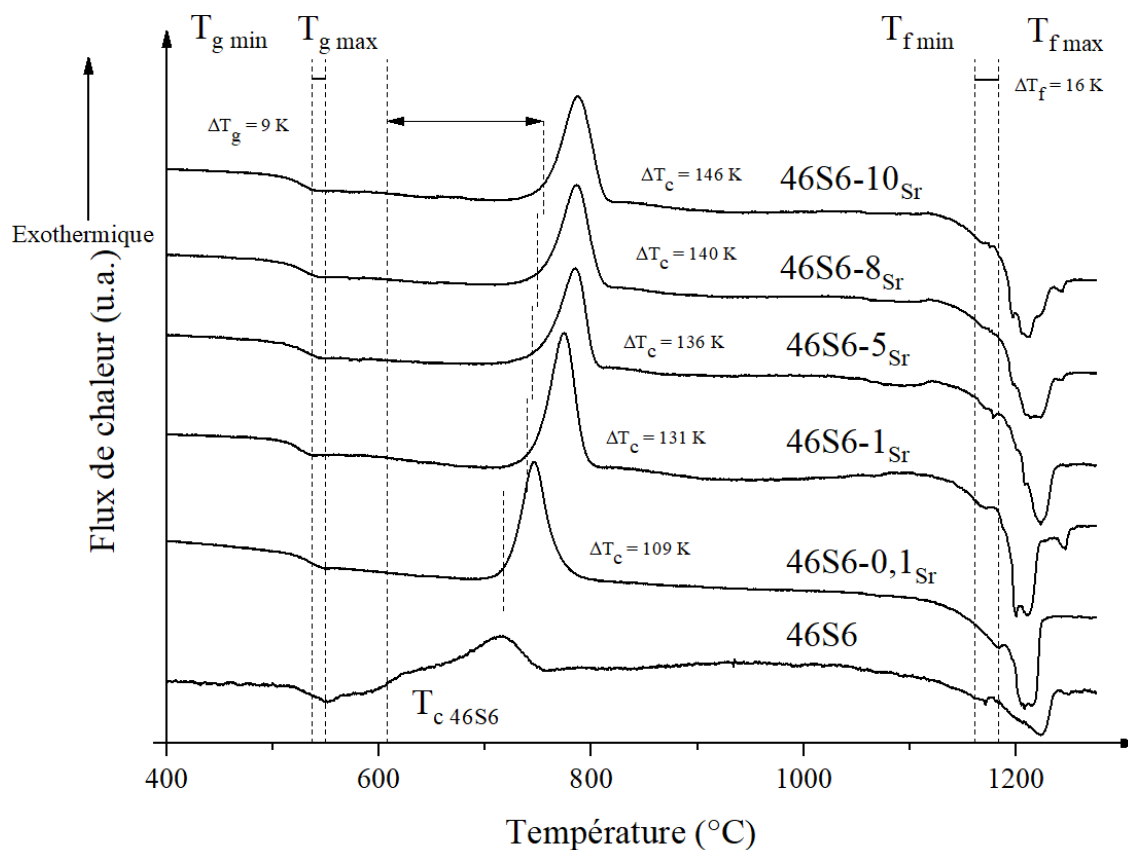


Figure 21 : Thermogrammes des verres dopés au strontium

Les résultats obtenus montrent que la teneur en Sr a peu d'effet sur la T_g et la T_f , mais qu'elle a un effet important sur la T_c ($\Delta T_c = 146 \text{ K}$).

L'augmentation de la quantité de Sr, élément alcalino-terreux, induit des variations de la T_g de 541 °C à 532 °C ($\Delta T_g = 9 \text{ K}$) et de la T_f de 1139 °C à 1155 °C ($\Delta T_f = 16 \text{ K}$). Ces variations sont dues à l'association entre la perturbation accrue du réseau vitreux provoquée par un cation Sr^{2+} légèrement plus volumineux et la résistance de la liaison Sr-O plus faible. Le tableau 11 indique toutes les températures caractéristiques des verres dopés au Sr.

Tableau 11 : Valeurs expérimentales des températures caractéristiques et de la stabilité thermique (TS) en fonction de la teneur en Sr dans la matrice du verre

Échantillons	T_g (°C)	T_c (°C)	T_f (°C)	TS (K)
46S6	541	608	1155	67
46S6-0,1Sr	539	717	1139	178
46S6-1Sr	533	739	1141	206
46S6-5Sr	537	744	1153	207
46S6-8Sr	535	748	1151	213
46S6-10Sr	532	754	1144	222

2. Comparaison des effets des différents oxydes

a) Comparaison des effets du zinc et du strontium sur la température de fusion

L'augmentation de la quantité de Zn induit la diminution de la T_f de 1155 à 1136 °C. La TS reste stable en raison de la faible variation de la T_c et de la T_g lorsque la quantité de Zn varie de 0,1 % à 10 % en masse.

Ces résultats mettent en évidence l'effet de la quantité en Zn sur toutes les caractéristiques thermiques et en particulier sur la TS. Cet effet pourrait s'expliquer par la montée en puissance du réseau modifiant les ions nécessaires pour satisfaire l'environnement de l'ion Zn²⁺, entraînant des modifications de la matrice vitreuse.

Plus la concentration de ZnO est élevée dans le verre, plus le rapport entre la quantité d'ions modificateurs de réseau et la quantité de modificateurs de réseau nécessaire pour satisfaire l'environnement de réduction des ions Zn²⁺ est faible. Cela pourrait expliquer la diminution de la T_f pour les verres dopés.

Dans une deuxième partie, les résultats indiquent que les effets du Sr sont 11 fois moins importants que ceux du Zn, comme le montre la différence entre les résultats obtenus pour 5 % en masse où $\Delta T_f = 50$ K et pour 10 % en masse avec $\Delta T_f = 108$ K. Ces résultats sont présentés sur la figure 22.

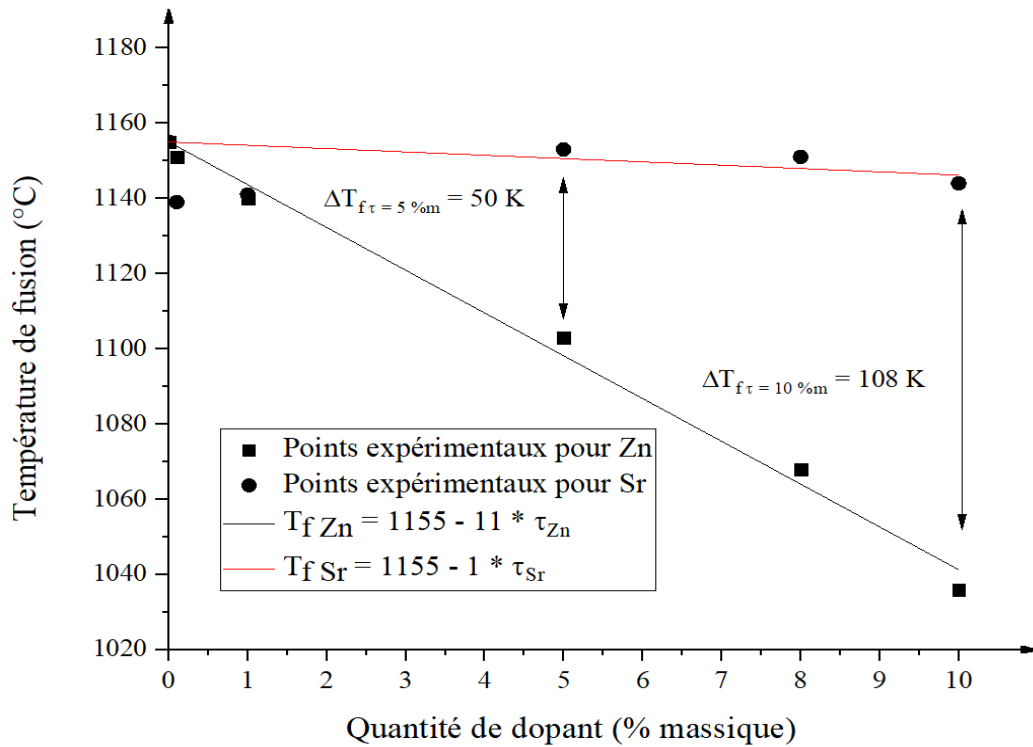


Figure 22 : Variations de la température de fusion en fonction de la nature et de la quantité du dopant

La relation mathématique entre la T_f et la quantité de dopant τ a été établie comme suit :

$$T_{f Zn} = 1155 - 11 * \tau_{Zn}$$

$$T_{f Sr} = 1155 - 1 * \tau_{Sr}$$

Avec : $T_{f Zn}$: la fonction permettant de calculer la température de fusion des verres dopés au zinc

$T_{f Sr}$: la fonction permettant de calculer la température de fusion des verres dopés au strontium

τ_{Zn} : la quantité de Zn introduite dans la matrice du verre

τ_{Sr} : la quantité de Sr introduite dans la matrice du verre

b) Comparaison des effets du zinc et du strontium sur la température de cristallisation

Des augmentations importantes de la T_c , de 608 à 754 °C, ont été observées avec l'ajout de Sr. Cet effet peut s'expliquer par l'inhibition provoquée par le Sr sur la nucléation. Cette dernière est causée par la suppression de la séparation de phase amorphe connue pour se produire dans le verre sans Sr [9].

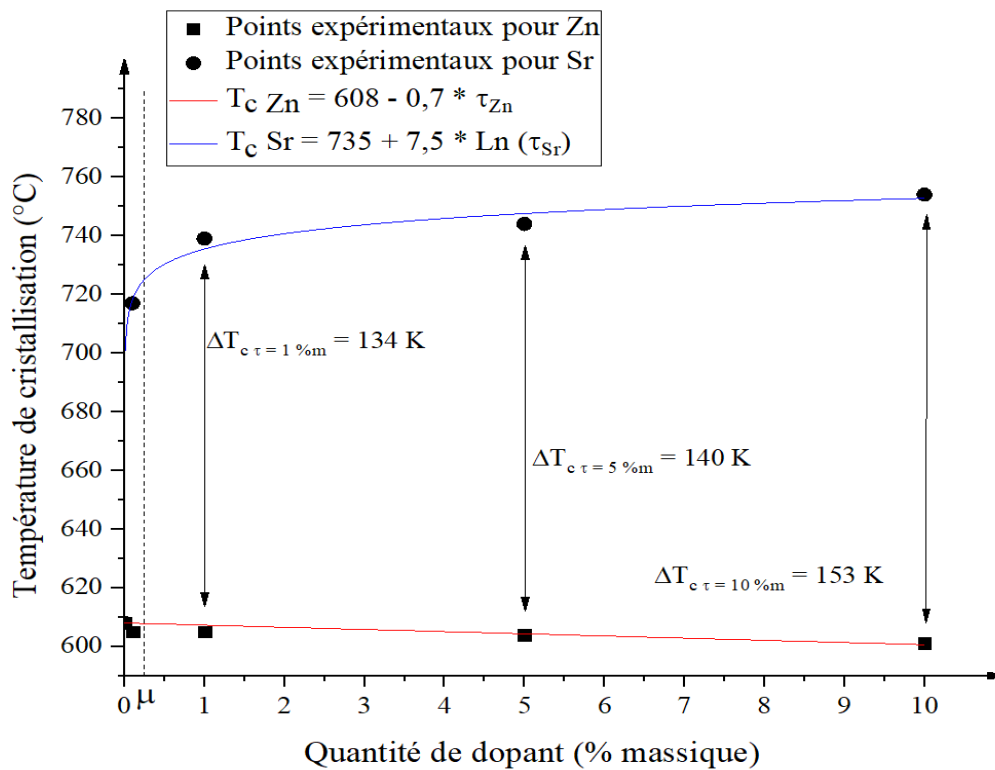


Figure 23 : Variations de la température de cristallisation en fonction :
De la nature et de la quantité de dopant

Comme le montre la figure 23, le point d'inflexion est déterminé par le symbole μ ($\mu = 0,25$ % en masse). Il représente la quantité maximale de Sr pour atteindre l'inhibition maximale de la nucléation de la matrice vitreuse. Au-delà d'une concentration de 0,25 % en masse de Sr, la cristallisation devient nettement moins efficace. Ce phénomène peut être attribué au désordre de la structure du verre apporté par le remplacement du Ca par le Sr [10].

Il peut être observé par la différence entre la T_c de chaque dopant : à ΔT_c pour 1, 5 et 10 % en masse. La variation augmente de 134 à 153 K. En ce qui concerne l'effet du Zn, les résultats montrent de très faibles variations.

La relation mathématique entre la T_c et la quantité de contenu de dopant τ a été établie comme suit :

$$T_{c Zn} = 608 - 0,7 * \tau_{Zn}$$
$$T_{c Sr} = 735 + 7,5 * Ln(\tau_{Sr})$$

Avec : $T_{c Zn}$: la fonction permettant de calculer la température de cristallisation des verres dopés au zinc

$T_{c Sr}$: la fonction permettant de calculer la température de cristallisation des verres dopés au strontium

τ_{Zn} : la quantité de Zn introduite dans la matrice du verre

τ_{Sr} : la quantité de Sr introduite dans la matrice du verre

Les deux oxydes étudiés ont des effets différents sur les caractéristiques thermiques des verres. Tandis que la quantité de Zn augmente, nous observons une diminution de la T_f . En revanche, lorsque la quantité de Sr augmente, on observe une augmentation de la T_c .

Ces modifications sont dues à leurs particularités chimiques telles que leur rayon atomique, leur électronégativité, leur point de fusion ou leur action dans la structure du verre.

3. Résumé des travaux effectués sur les variations des caractéristiques thermiques par dopage au sein de notre groupe de recherche

Des comparaisons avec nos travaux précédents ont été faites pour améliorer l'information sur les effets de plusieurs éléments métalliques sur les élaborations des verres [3,4,11,12]. Ces comparaisons ont été effectuées sur les éléments suivants : titane (Ti), cuivre (Cu), argent (Ag), Zn et Sr. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 24.

Ils montrent que chaque élément métallique présente une influence spécifique sur la T_g , la T_c ou la T_f . Les applications pourraient être adaptées dans différents domaines scientifiques.

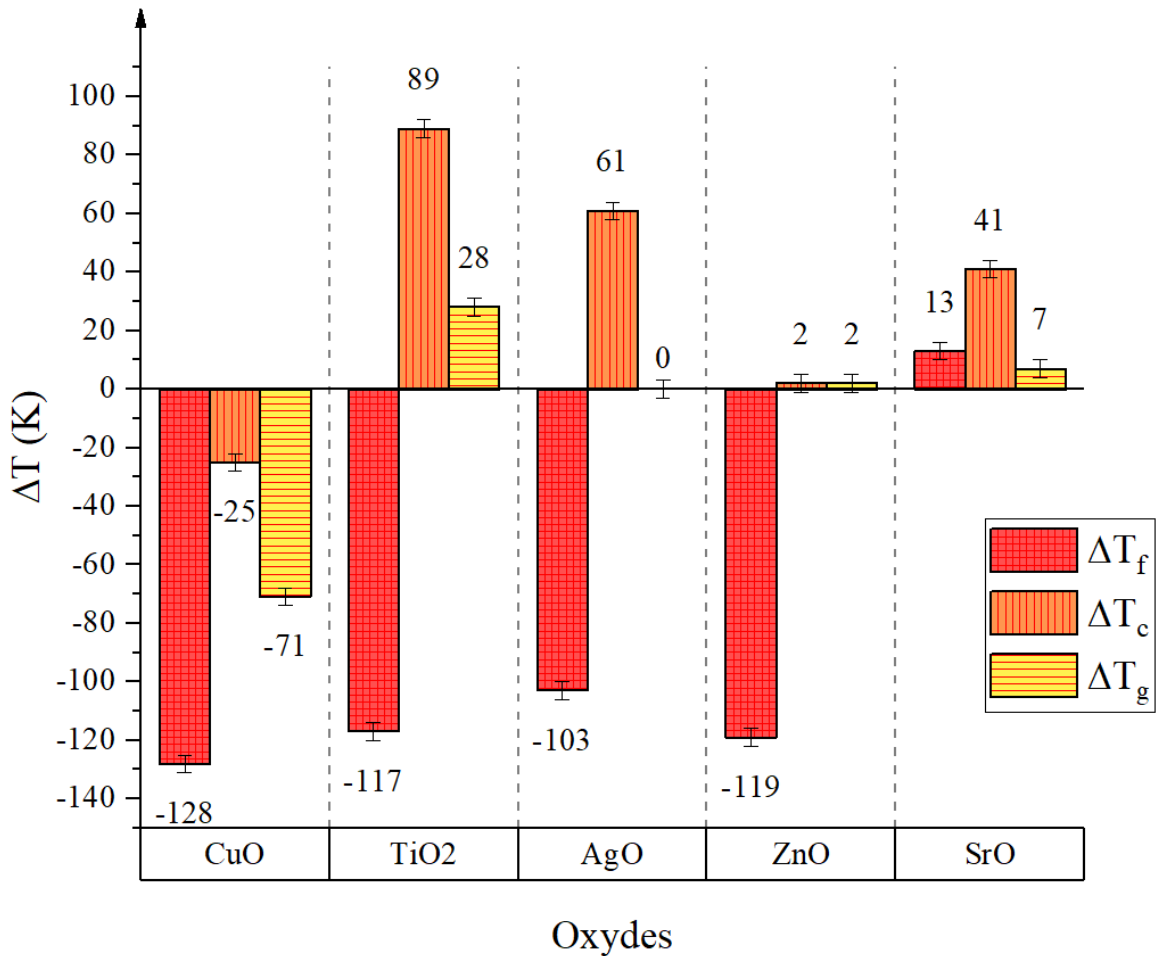


Figure 24 : Résumé des travaux sur les variations des températures caractéristiques des verres à base de 46S6 en fonction des oxydes utilisés pour le dopage

B. Excès d'entropie et influence des teneurs en dopants

1. Introduction à l'entropie de l'état vitreux

Le verre est par nature dans un état métastable, il résulte d'une brusque diminution de l'entropie entraînant un désordre structural. La formation du verre est obtenue à partir d'un liquide et d'une perte d'entropie une fois la T_g dépassée [13-14].

Il est démontré que l'entropie d'un verre est plus grande que celle d'un cristal présentant la même composition chimique à une température $T = 0$ K [15].

Il est à noter que la température de la synthèse et la loi de chauffe ont un lien avec la production d'entropie et que celle-ci est présente de façon résiduelle après la trempe du verre [16].

2. Calcul de l'excès d'entropie du verre ΔS_{exc}

Les formules suivantes conduisent à définir les variations d'entropie dans un système vitreux [17].

Cette étude consiste à calculer l'entropie à une température égale à 0 K pour les verres dopés au Zn et au Sr dans le système quaternaire $SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5$.

L'entropie du liquide S_1 à une température $T > T_f$ lors du passage du cristal au liquide est :

$$S_1 = S_0 + \int_0^{T_f} c_{ps} \frac{dT}{T} + \frac{\Delta H_f}{T_f} + \int_{T_f}^T c_{pl} \frac{dT}{T}$$

Où C_{ps} est la chaleur spécifique du solide cristallin et C_{pl} la chaleur spécifique du liquide.

S_0 est la valeur de l'entropie du cristal à $T = 0$ K. $S_0 = 0$ selon le principe de Nernst ou troisième loi de la thermodynamique.

La même relation pour S_1 est obtenue lors du passage du verre au liquide :

$$S_1 = S'_0 + \int_0^{T_g} c_{pl} \frac{dT}{T} + \int_{T_g}^{T_f} c_{pl} \frac{dT}{T} + \int_T^{T_f} c_{pl} \frac{dT}{T}$$

L'addition des deux équations conduit à l'établissement de l'entropie S'_0 du verre à $T = 0$ K avec cette relation :

$$S'_0 = \frac{\Delta H_f}{T_f} - \int_0^{T_f} (c_{pl} - c_{ps}) \frac{dT}{T}$$

De plus, la relation suivante nous amène à la variation de l'entropie :

$$\Delta S_{exc} = S(\text{liquide ou verre}) - S(\text{cristal})$$

Ainsi, à $T < T_f$:

$$\Delta S_{exc} = \frac{\Delta H_f}{T_f} - \int_{T_g}^{T_f} (c_{pl} - c_{ps}) \frac{dT}{T}$$

$$\Delta S_{exc} = \frac{\Delta H_f}{T_f} - 2.09 * Ln \frac{T_f}{T_g} + 0.48 * 10^{-3} * [T_f - T_g]$$

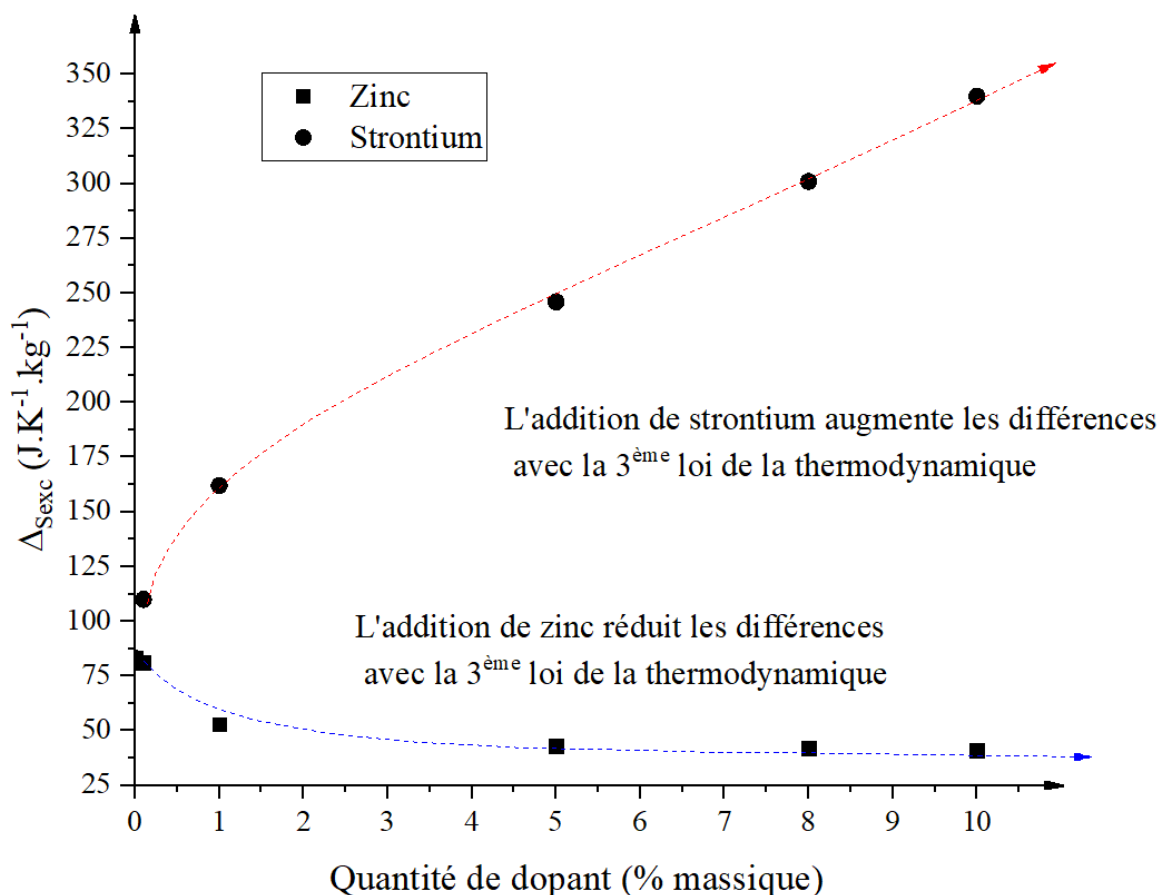
On obtient ainsi pour les verres dopés au zinc et au strontium les valeurs présentées dans les tableaux 12 et 13 :

Tableau 12 : Valeurs expérimentales d'excès d'entropie ΔS_{exc} pour le système 46S6 dopé avec différentes quantités de zinc

	46S6	46S6-0,1Zn	46S6-1Zn	46S6-5Zn	46S6-8Zn	46S6-10Zn
L_f (J.kg⁻¹)	120	118	77	61	58	56
T_g (K)	814	810	811	809	809	810
T_f (K)	1423	1424	1413	1376	1341	1309
ΔS_{exc} (J.K⁻¹.kg⁻¹)	83	81	53	43	42	41

Tableau 13 : Valeurs expérimentales d'excès d'entropie ΔS_{exc} pour le système 46S6 dopé avec différentes quantités de strontium

	46S6	46S6-0,1Sr	46S6-1Sr	46S6-5Sr	46S6-8Sr	46S6-10Sr
L_f (J.kg⁻¹)	120	156	230	352	431	483
T_g (K)	814	812	806	810	808	805
T_f (K)	1423	1412	1414	1426	1424	1414
ΔS_{exc} (J.K⁻¹.kg⁻¹)	83	110	162	246	301	340



**Figure 25 : Résumé des variations de ΔS_{exc} en fonction :
De la nature et de la quantité de dopant**

Les résultats obtenus montrent que les valeurs des entropies des verres bioactifs 46S6, des verres dopés au Zn et des verres dopés au Sr ne sont pas égales à zéro. Cependant, la ΔS_{exc} diminue de 83 $J.K^{-1}.kg^{-1}$ à 41 $J.K^{-1}.kg^{-1}$ pour le verre dopé au Zn comme indiqué dans le tableau 12 et passe de 83 $J.K^{-1}.kg^{-1}$ à 340 $J.K^{-1}.kg^{-1}$ pour le verre dopé au Sr, comme indiqué dans le tableau 13. Ces résultats sont présentés sur la figure 25. La troisième loi de la thermodynamique ne s'applique pas aux verres bioactifs élaborés dans le système quaternaire $SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5$.

Cependant, nous observons un effet contraire du Zn et du Sr sur la ΔS_{exc} . Alors que la quantité de Zn présente dans le verre augmente, on peut observer une diminution de la ΔS_{exc} . L'effet inverse peut être observé pour l'augmentation de la teneur en Sr. La diminution de la ΔS_{exc} dans le cas de l'ajout de Zn pourrait être due au renforcement de la liaison par l'électronégativité plus élevée celui-ci par rapport à l'électronégativité du Ca et du Na.

Au contraire, l'augmentation de la ΔS_{exc} en accroissant la quantité de Sr peut s'expliquer par une augmentation de la taille de l'atome qui provoque des changements dans la structure du verre.

C. Conclusion

La caractérisation structurale des verres bioactifs obtenus par fusion met en évidence leurs nature amorphe et leur capacité à former des liaisons chimiques.

Cette étude montre que l'introduction du Sr induit une augmentation à la fois de la T_g et de la T_c , ce qui conduit à une augmentation significative de la TS. D'un autre côté, l'introduction de Zn dans la matrice du verre entraîne des modifications des caractéristiques thermiques, principalement la diminution de la T_f . La présence de Zn a un impact important sur la T_f et un plus faible impact sur la TS des verres bioactifs étudiés. L'augmentation de la teneur en Zn induit une diminution de la T_f et une augmentation de la TS.

On constate que la ΔS_{exc} du verre pur ($83 \text{ J.K}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) augmente avec l'addition de Sr et diminue avec l'addition de Zn, respectivement à $340 \text{ J.K}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ et $41 \text{ J.K}^{-1}.\text{kg}^{-1}$ en fonction de la quantité de dopant.

La modification induite dans le réseau vitreux est causée par la substitution du Ca ou du Na par du Zn ou du Sr. Elle est probablement due à l'électronégativité et à la modification de la taille des atomes. Les environnements chimiques dans la matrice du verre jouent également un rôle important dans l'organisation et/ou la désorganisation de la structure microscopique des verres. Cela peut avoir un impact sur les distances interatomiques dans la matrice vitreuse et peut modifier la force des liaisons atomiques. En conséquence, le dopage et la modification de la structure du verre entraînent une modification des propriétés physiques.

La compréhension du comportement thermique a permis de mieux contrôler l'impact du dopant sur la réactivité chimique. En fonction de la nature et de la quantité de l'élément dopant, la cinétique de dégradation du verre au contact de fluides corporels synthétiques pourrait être modifiée.

III. Étude de la surface du 46S6 après immersion dans le SBF pour différentes durées : Etude *in vitro* en l'absence de cellule

A. Introduction et préparation des échantillons de verre bioactif 46S6

1. Introduction

Les évolutions dans le temps de la surface des biomatériaux et les caractéristiques des étapes de cristallisation sont développées dans cette partie. Le microscope à force atomique (AFM) permet d'analyser le comportement de surface à l'échelle nano et micrométrique [18]. Cette technique est associée à la spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) permettant de suivre les échanges ioniques dus à la croissance de la couche d'hydroxyapatite en fonction du temps d'immersion dans le SBF.

Les complémentarités entre les techniques utilisées permettent d'obtenir des informations globales sur les transformations de surface d'un système amorphe à un phosphate de calcium qui est la partie minérale de l'os mature. Le cristal d'hydroxyapatite (HA) de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ est similaire au cristal composant les os humains.

L'analyse par imagerie de phase/cartographie chimique utilisée dans cette étude peut être employée dans la caractérisation d'un composé aussi bien inorganique qu'organique et présenter une différence visible entre chaque élément [19,20].

Dans cette partie, cette mécanique sera utilisée pour caractériser la transformation de la surface des matériaux du verre en cristaux osseux matures. Les deux principales caractéristiques suivies ont été la rugosité et l'homogénéité de la surface. La rugosité a été suivie en utilisant le gradient entre la partie supérieure et inférieure de la surface. L'homogénéité a été suivie en utilisant la réaction de la sonde AFM sur la surface. Les résultats obtenus permettent d'étudier la cinétique de transformation à travers les différentes phases de la cristallisation.

L'étude portera sur les différents stades de développement de la couche HA après immersion dans un liquide physiologique synthétique (SBF) pendant trois durées différentes : 2 semaines, 1 mois et 2 mois.

2. Préparation des échantillons de verre bioactif 46S6

Les cylindres de verres obtenus après la synthèse ont été recouverts de résine uniformément. Ce protocole de préparation de l'échantillon pour les tests *in vitro* est également présenté au chapitre 2. Pour rappel, les échantillons se présentent comme de petits cylindres de 13 mm diamètre pour une hauteur de 8 mm comme illustrés sur la figure 16 dans le chapitre 2.

B. Caractérisation par différentes techniques de la surface immergée dans un liquide physiologique synthétique

1. Analyse structurale par diffraction des rayons X de la surface immergée

Les diffractogrammes présentés sur la figure 26 montrent les signes d'un début de cristallisation en fonction du temps d'immersion. Cette cristallisation est due à la croissance d'une couche de cristal très proche de l'hydroxyapatite à la surface du verre 46S6 qui a été immergé dans du SBF. Cette information valide la bioactivité du verre. Ces données permettent également d'estimer la cinétique de croissance cristallographique ainsi que les différentes phases de la croissance de la couche d'hydroxyapatite. On peut observer sur les deux principaux pics de cristallisation à 27° et à 34° (2θ) un accroissement de taille et une diminution de la largeur à mi-hauteur de ces pics avec l'augmentation de la durée d'immersion. Cet accroissement est probablement dû à l'organisation des différents éléments vers une phase cristalline de plus en plus organisée.

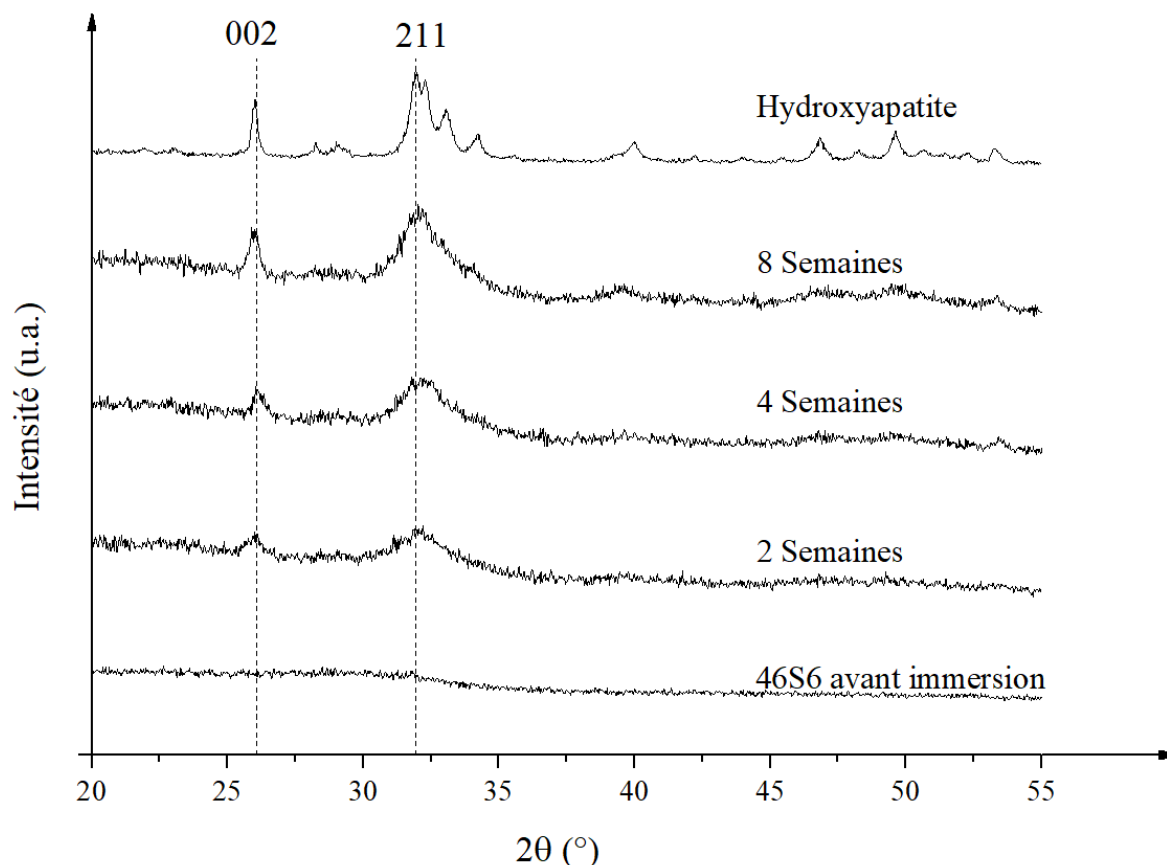


Figure 26 : Diffractogrammes des verres immergés dans un liquide physiologique synthétique et de l'hydroxyapatite comme référence

2. Investigation par microscopie à force atomique de la surface immergée

Les analyses de surface des échantillons immergés pendant différentes périodes ont été réalisées à l'aide de la microscopie électronique à force atomique (AFM). Les résultats présentent deux informations différentes, la première est le gradient de niveau et la seconde est l'homogénéité de la surface.

Tous les résultats obtenus par AFM sont rassemblés dans la figure 27 avec respectivement 1) le délai de deux semaines d'immersion, 2) le délai de 4 semaines d'immersion et 3) le délai de 8 semaines d'immersion.

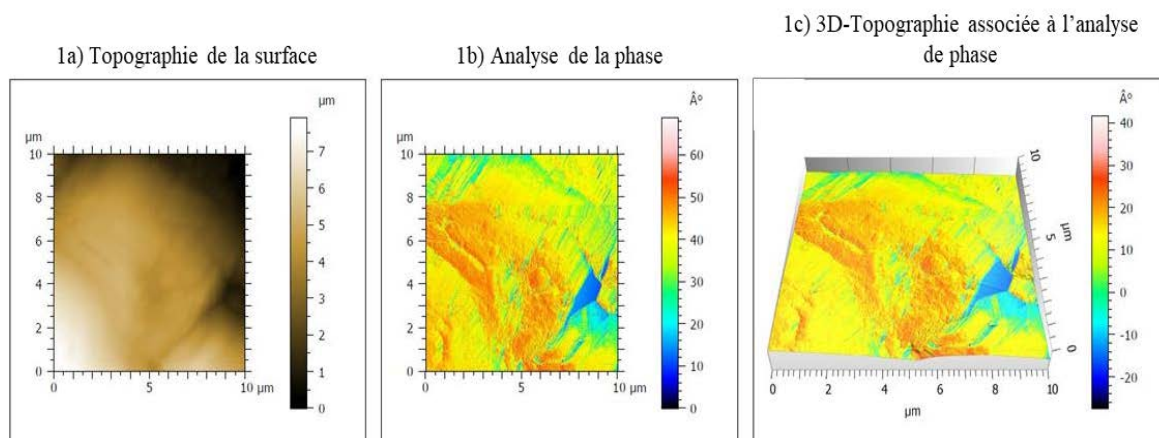
Pour l'échantillon immergé pendant 2 semaines, les résultats de topographie présentés en 1a) montrent une variation de niveau avec une différence maximale de 7,5 μm d'épaisseur, cette différence diminuant avec l'augmentation du temps d'immersion.

Pour la topographie de l'échantillon à 4 semaines d'immersion présentée en 1b), les mesures indiquent un gradient plus petit de 4 μm et enfin, pour la topologie de l'échantillon à 8 semaines d'immersion présentée en 1c), un gradient de 2,8 μm . Les résultats montrent une homogénéisation de la rugosité de la surface du verre due à la transformation de la surface en cristal à partir du verre.

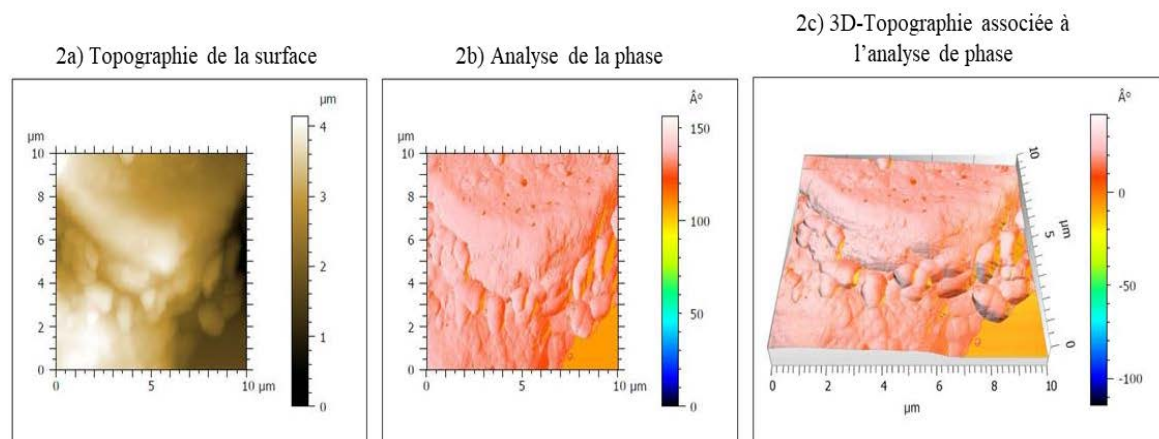
L'homogénéité de la surface est visible aux variations présentées dans les analyses de la phase. L'homogénéité pour les résultats obtenus sur l'échantillon à 2 semaines d'immersion présentés en a2) est irrégulière, et montre des variations. Celle-ci se situe dans une plage de 60 Å pour le cas de l'échantillon à 2 semaines d'immersion. Cette différence montre le contraste du matériau, une variance distincte de la composition de la surface a été également observée. Elle montre une structure cristalline, qui est probablement due à la formation d'une couche de carbonate de calcium.

Des périodes d'immersion plus longues dans du SBF montrent un signal de matériau plus uniforme avec des structures en forme de sphères qui possèdent seulement quelques défauts. Ce résultat indique que les différences de matériaux sont plus ponctuelles. De plus, les variations diminuent en intensité avec l'augmentation du temps d'immersion. Respectivement dans les limites de 15 à 40 Å pour les échantillons à 4 semaines d'immersion présentés sur la partie 2b) et à 8 semaines d'immersion sur la partie 2c) de la figure 27. Les résultats combinant phase et topographie sont disponibles dans les échantillons présentés sur les parties a3), b3) et c3) de la figure 27 pour respectivement pour les échantillons de 2 semaines, 4 semaines et 8 semaines d'immersion.

2 semaines d'immersion



4 semaines d'immersion



8 semaines d'immersion

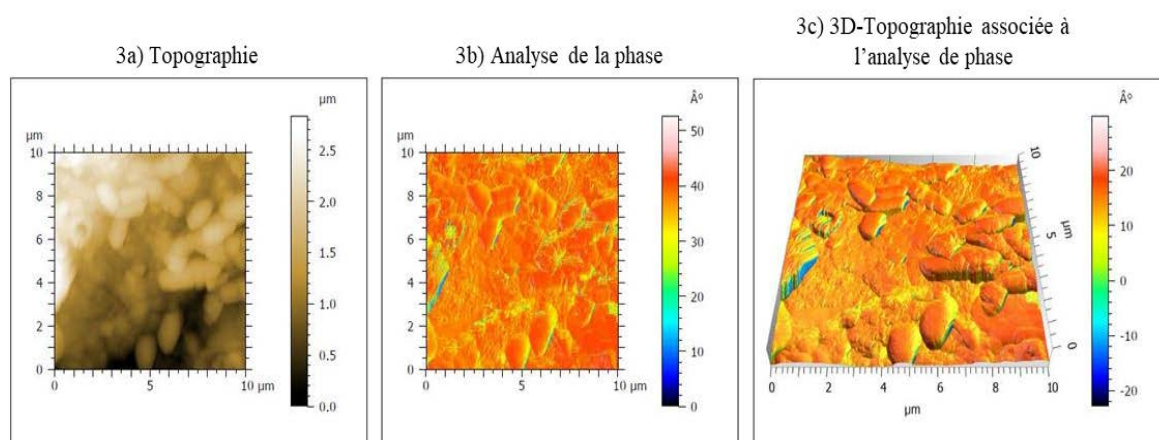


Figure 27 : Topographies, analyses de phase et topographies 3D associées aux analyses de phase pour les échantillons immergés pendant : 2, 4, et 8 semaines

C. Analyse par ICP-OES des échanges ioniques entre le verre bioactif 46S6 et un liquide physiologique synthétique

L'utilisation de l'ICP-OES permet d'effectuer des mesures avec une sensibilité élevée et d'obtenir des données précises (sensibilité d'environ 1 ppm selon la matrice analysée).

Cette technique permet de déterminer les échanges ioniques entre le verre bioactif et le SBF. Les mesures ont été effectuées sur la solution de SBF utilisée durant les immersions. Les résultats obtenus montrent des variations de concentration des éléments suivants : silicium (Si), calcium (Ca) et phosphore (P). La teneur en Si est un indicateur de la dissolution du verre alors que les teneurs en Ca et en P sont des indicateurs de la formation de phosphate de calcium.

Les résultats présentent les variations de concentration suivantes : les concentrations de Ca et de P diminuent avec le temps, la concentration en Si augmente en raison de la dissolution de la surface du verre au cours des 15 premiers jours et est suivie d'une stabilisation significative.

Ces résultats peuvent être expliqués par la dissolution du verre lorsqu'il est en contact avec le SBF, la formation d'une couche de gel de silice et enfin la formation d'un cristal de phosphate de calcium.

Ce mécanisme peut être résumé en trois phases successives :

- Dissolution de la matrice du verre
- Formation de gel de silice
- Précipitation en phosphate de calcium

Ils sont développés en cinq étapes chimiques décrites dans le chapitre 1. La figure 28 montre la variation de la concentration des éléments suivis.

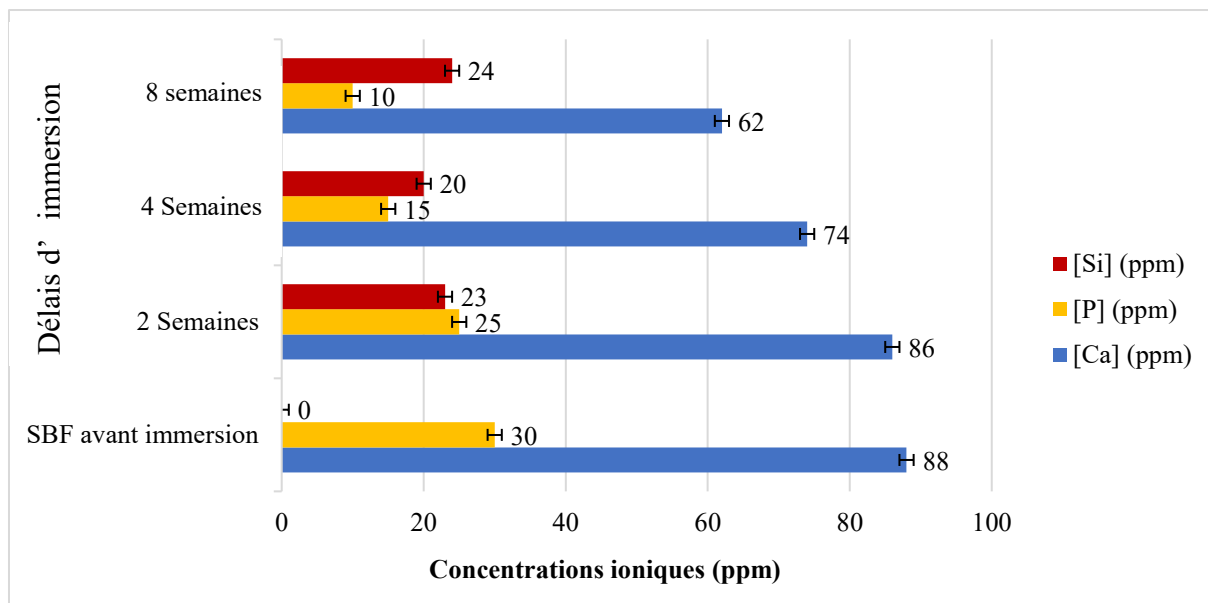


Figure 28 : Évolution de la composition du SBF en fonction du temps d'immersion

D. Conclusion

Les résultats de l'étude de l'état de surface des échantillons après immersion ont montré des modifications liées aux échanges ioniques entre les matériaux et l'environnement (SBF). Ces échanges ont entraîné des modifications de la nature de la surface en fonction de l'évolution de la matrice vitreuse en un cristal à base de phosphate de calcium. La surface en contact avec le SBF a présenté une uniformisation progressive conduisant à une diminution de sa rugosité. Celle-ci a été observée par utilisation de l'AFM en suivant l'évolution des gradients de rugosité. Ils ont diminué de $7,5 \mu\text{m}$ à $4 \mu\text{m}$ puis à $2,8 \mu\text{m}$ pour respectivement les délais d'immersion de 2 semaines, de 4 semaines d'immersion et de 8 semaines d'immersion. Nous avons également constaté l'homogénéisation de la surface due à sa cristallisation progressive. Les mesures ont montré des variations dans les gradients de phase de 60 \AA , 40 \AA puis 15 \AA pour les échantillons de respectivement 2, 4 et 8 semaines d'immersion.

Les objectifs de cette étude ont été d'améliorer la compréhension des interactions des différents éléments chimiques avec le verre bioactif. Ces connaissances permettent de développer de meilleurs biomatériaux, plus adaptables à la nature de la lésion ou de la maladie en approfondissant les modifications de la surface des biomatériaux au contact de la zone d'implantation.

Références du chapitre 3 :

- [1] Hench, L. L. The Story of Bioglass®. *J Mater Sci: Mater Med* **2006**, *17* (11), 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [2] Mitchell, H. H.; Hamilton, T. S.; Steggerda, F. R.; Bean, H. W. The Chemical Composition of the Adult Human Body and Its Bearing on the Biochemistry of Growth. *Journal of Biological Chemistry* **1945**, *158*, 625–637.
- [3] Wers, E.; Oudadesse, H.; Lefeuvre, B.; Lucas-Girot, A.; Rocherullé, J.; Lebullenger, R. Excess Entropy and Thermal Behavior of Cu- and Ti-Doped Bioactive Glasses. *J Therm Anal Calorim* **2014**, *117* (2), 579–588. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3731-5>.
- [4] Wers, E.; Oudadesse, H.; Lefeuvre, B.; Bureau, B.; Merdrignac-Conanec, O. Thermal Investigations of Ti and Ag-Doped Bioactive Glasses. *Thermochimica Acta* **2014**, *580*, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.02.001>.
- [5] Oudadesse, H.; Dietrich, E.; Bui, X. V.; Le Gal, Y.; Pellen, P.; Cathelineau, G. Enhancement of Cells Proliferation and Control of Bioactivity of Strontium Doped Glass. *Applied Surface Science* **2011**, *257* (20), 8587–8593. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.05.022>.
- [6] Jastrzębski, W.; Sitarz, M.; Rokita, M.; Bułat, K. Infrared Spectroscopy of Different Phosphates Structures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, *79* (4), 722–727. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.08.044>.
- [7] Sitarz, M. The Structure of Simple Silicate Glasses in the Light of Middle Infrared Spectroscopy Studies. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2011**, *357* (6), 1603–1608. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2011.01.007>.
- [8] Dietzel A. *Glasstruktur und Glaseigenschaften*. *Glass Technol.* **1968**; *22*, 41–49

- [9] Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J. Trace. Elem. Exp. Med.* **1998**, 11 (2–3), 119–135.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-670X\(1998\)11:2/3<119::AID-JTRA5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-670X(1998)11:2/3<119::AID-JTRA5>3.0.CO;2-3).
- [10] Hill, R. G.; Stamboulis, A.; Law, R. V.; Clifford, A.; Towler, M. R.; Crowley, C. The Influence of Strontium Substitution in Fluorapatite Glasses and Glass-Ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2004**, 336 (3), 223–229.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2004.02.005>.
- [11] Dietrich, E.; Oudadesse, H.; Lucas-Girot, A.; Mami, M. *In Vitro* Bioactivity of Melt-Derived Glass 46S6 Doped with Magnesium. *J. Biomed. Mater. Res.* **2009**, 88A (4), 1087–1096. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31901>.
- [12] Dietrich, E.; Oudadesse, H.; Lucas-Girot, A.; Le Gal, Y.; Jeanne, S.; Cathelineau, G. Effects of Mg and Zn on the Surface of Doped Melt-Derived Glass for Biomaterials Applications. *Applied Surface Science* **2008**, 255 (2), 391–395.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.06.094>.
- [13] Kivelson, D.; Reiss, H. Metastable Systems in Thermodynamics : Consequences, Role of Constraints. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103 (39), 8337–8343.
- [14] Goldstein, M. On the Reality of Residual Entropies of Glasses and Disordered Crystals. *The Journal of Chemical Physics* **2008**, 128 (15), 154510.
- [15] Nemilov, S. Zero-Point Entropy of Glasses as Physical Reality. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2009**, 355 (10–12), 607–616.
- [16] Tropin, T. V.; Schmelzer, J. W. P.; Schick, C. On the Dependence of the Properties of Glasses on Cooling and Heating Rates. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2011**, 357 (4), 1291–1302.
- [17] Zarzycki J. *Les verres et l'état vitreux Chapitre 5*. Paris : Masson ; **1982**.
- [18] Jalili, N.; Laxminarayana, K. A Review of Atomic Force Microscopy Imaging Systems: Application to Molecular Metrology and Biological Sciences. *Mechatronics* **2004**, 14 (8), 907–945. <https://doi.org/10.1016/j.mechatronics.2004.04.005>.

[19] Maver, U., Velnar, T., Gaberšček, M., Planinšek, O., Finšgar, M. Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 80, 96–111. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.014>

[20] Rao, S., Costa, K.D. Atomic Force Microscopy (AFM) in biomedical research, in: *Biomedical Imaging*. Elsevier, 41–64; **2014**. <https://doi.org/10.1533/9780857097477.1.41>

Chapitre 4 : Processus de contrôle de la
taille des nanoparticules de verre
bioactif et leurs caractérisations
physico-chimiques

Chapitre 4 : Processus de contrôle de la taille des nanoparticules de verre bioactif et leurs caractérisations physico-chimiques

I. Processus de contrôle de la taille des nanoparticules de verre bioactif

Le verre bioactif étudié (55 % SiO₂ 40 % CaO et 5 % P₂O₅) dans ce chapitre a été synthétisé par la méthode du sol-gel, celle-ci est présentée dans le chapitre 2. En complément des travaux antérieurs effectués au sein de notre groupe, l'approche par émulsion de la technique sol-gel permet le contrôle de la taille des particules de verres synthétisées appelées nanoverre bioactif (NBG pour Nano Bioactive Glass). Celles-ci présentent des propriétés physico-chimiques différentes de celles que présentent les verres obtenus par fusion.

L'objectif de cette partie est de maîtriser la taille des particules synthétisées pour différentes applications biomédicales. Des particules trop petites (dont la taille est < 100 nm) présentent un danger pour les cellules et ne pourront donc pas servir en tant que matériaux de comblement ou de substitution osseux. Les particules de taille plus réduite (20 < x < 100 nm) trouveront une utilité dans le cadre d'une étude basée sur le recouvrement de prothèses métalliques.

A. Introduction à la méthode sol-gel de l'émulsion

Deux méthodes complémentaires existent pour la synthèse du verre : la sol-gel et la fusion, les deux présentent des avantages pour des applications spécifiques.

Historiquement, la méthode de fusion permet la formation de volume important de verre sans utilisation de solvant, mais la dépense énergétique nécessaire aux synthèses est importante [1]. Plus récemment, en 1991, la synthèse par voie sol-gel est apparue [2] pour la synthèse des verres bioactifs. Cette méthode de synthèse a démontré de nombreux avantages dans le domaine de la nano-médecine et du biomédicale [3,4,5].

Cette particularité permet aux verres bioactifs obtenus par sol-gel d'avoir d'autres applications potentielles, telles que l'administration de médicaments en utilisant la surface des particules de verre comme vecteur de molécules biologiques [6,7,8] ou de molécules médicamenteuses [9].

Les possibilités d'utilisation de l'approche nanotechnologique sont très nombreuses et touchent diverses applications médicales [10]. Par exemple, la nanoscience est attrayante par rapport à la médecine régénérative tissulaire, car le contact entre les biomatériaux et les cellules se fait à un niveau nanométrique, qui correspond à la taille des tissus biologiques [11].

Cependant, les verres bioactifs traditionnels dérivés du sol-gel ont toujours été confrontés à des problèmes : l'agglomération des particules, leurs formes irrégulières ou un manque de contrôle de la taille de celles-ci. Ces problèmes ont limité l'utilisation du nanoverre bioactif dans les applications biomédicales. Dans le but d'obtenir un meilleur contrôle de la forme et de la taille des nanoparticules, de nombreuses méthodes de synthèse ont été mises au point [12]. Parmi ces procédés, la microémulsion permet, de manière simple et reproductible, d'élaborer de nombreuses nanoparticules avec des tailles contrôlées en un laps de temps relativement court, et sans utiliser de régulateur de réaction tel que le pH ou la température.

Une microémulsion est définie comme une dispersion isotrope thermodynamiquement stable de deux liquides non miscibles, car le microdomaine de l'un ou l'autre ou des deux liquides a été stabilisé par un film interfacial de molécules tensioactives. La stabilisation de cette interface entre les deux liquides permet de contrôler la taille du réacteur lors de la réaction de polycondensation utilisée pour la synthèse du verre. Ce contrôle de la taille de ces réacteurs ouvre la possibilité de réduire ou d'augmenter la quantité de composants disponibles pour la réaction. De cette manière, il est possible d'avoir un contrôle relatif sur la taille des particules synthétisées.

Ce travail de recherche porte sur une nouvelle génération de verres bioactifs. Les verres bioactifs sol-gel du système $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ ont montré un potentiel dans leurs propriétés et seront donc exploités dans cette thèse [13,14].

Le protocole de synthèse détaillé est décrit dans le chapitre 2.

B. Contrôle de la taille des nanoparticules synthétisées

Dans le processus de microémulsion, le contrôle de la taille s'applique au moyen de multiples paramètres, celui au centre de cette étude est la taille des gouttelettes où se produit la réaction de polycondensation.

Cette taille peut être contrôlée de différentes manières :

- En modifiant le rapport huile/eau,
- En modifiant le rapport eau/agent tensioactif
- En modifiant la force d'agitation entraînant la mise en contact des précurseurs
- En adaptant le temps nécessaire à la réaction de polycondensation et ainsi laisser plus ou moins de temps aux nanoparticules de verre bioactifs pour grandir
- En utilisant une catalyse contrôlée de la réaction par l'intermédiaire du pH avec l'objectif d'augmenter le taux de polycondensation [15].

Cette étude s'est concentrée sur le temps de maturation T et le rapport eau/surfactant ε . La variation du temps de maturation T et le rapport eau/surfactant ε ont été utilisées pour obtenir différentes tailles de particules de NBG. Nous avons défini ε par l'expression suivante :

$$\varepsilon = \frac{E}{S} = \frac{[n(H_2O) + n(NH_3, H_2O)]}{Oct + Tri}$$

Avec E : la quantité d'eau

S : la quantité de tensioactif

Oct : la quantité d'Octanol en mol

Tri : la quantité de Triton X100[®] en mol

ε est le paramètre principal étudié pour contrôler le diamètre des particules de NBG obtenues. De nombreux facteurs influent sur la taille des particules de verres bioactifs dérivés de sol-gel, tels que la concentration initiale en eau, la concentration en ammoniac et les oxydes utilisés pour la synthèse [16].

Notre étude s'est concentrée sur les variations du rapport ε (rapport molaire eau/tensioactif) et du temps T en tant qu'outils permettant de maîtriser la taille des particules. La modification du rapport ε nous permet de contrôler la taille de la goutte d'eau qui joue le rôle de générateur de la polycondensation. L'autre paramètre était le temps T, il permet de laisser la polycondensation et la gélification se poursuivre ou s'arrêter à un instant précis.

La figure 29 présente un exemple de courbes de distribution des tailles que nous avons obtenues en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS) sur les poudres de NBG préparées au sein du groupe dans différentes conditions expérimentales ϵ et T.

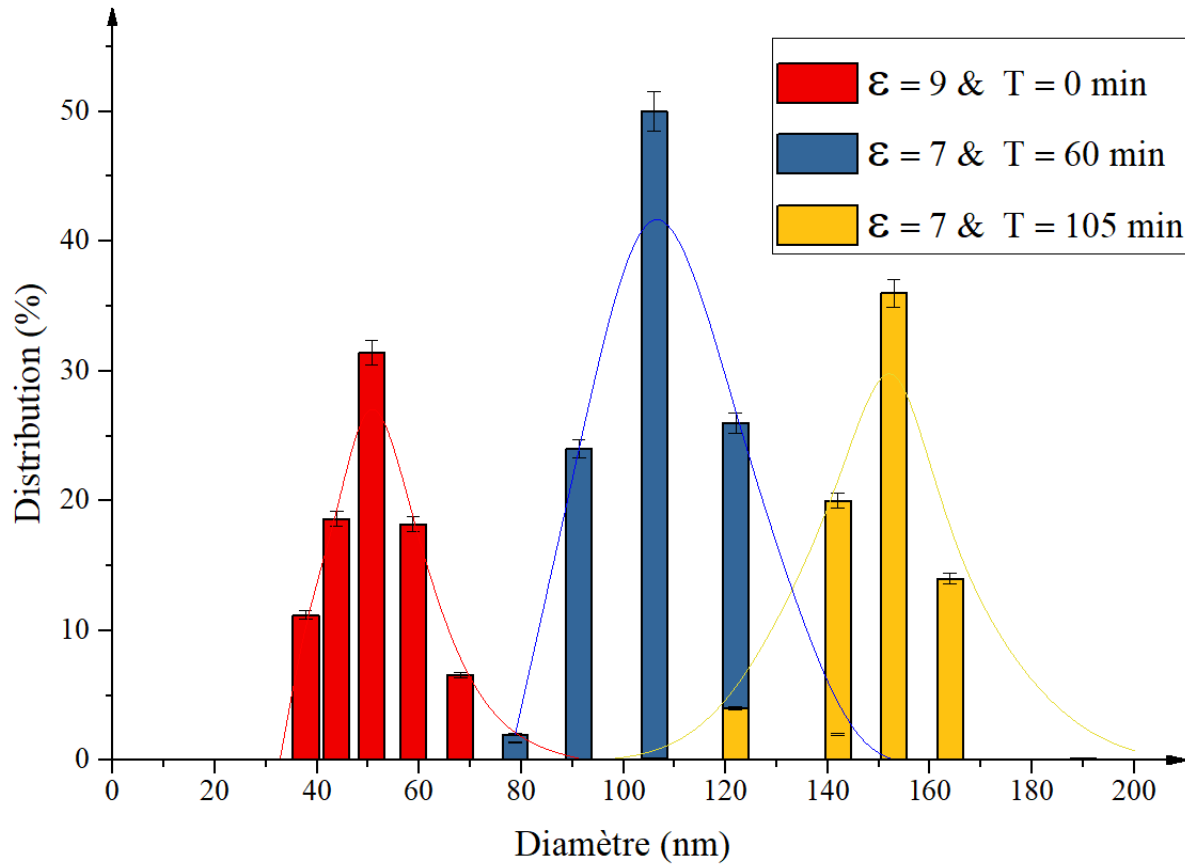


Figure 29 : Courbes de distribution des tailles obtenues *via* DLS des poudres de NBG préparées dans différentes conditions expérimentales d' ϵ et de T

La figure 30 montre la variation de la taille des particules obtenue en fonction de deux paramètres ε et T.

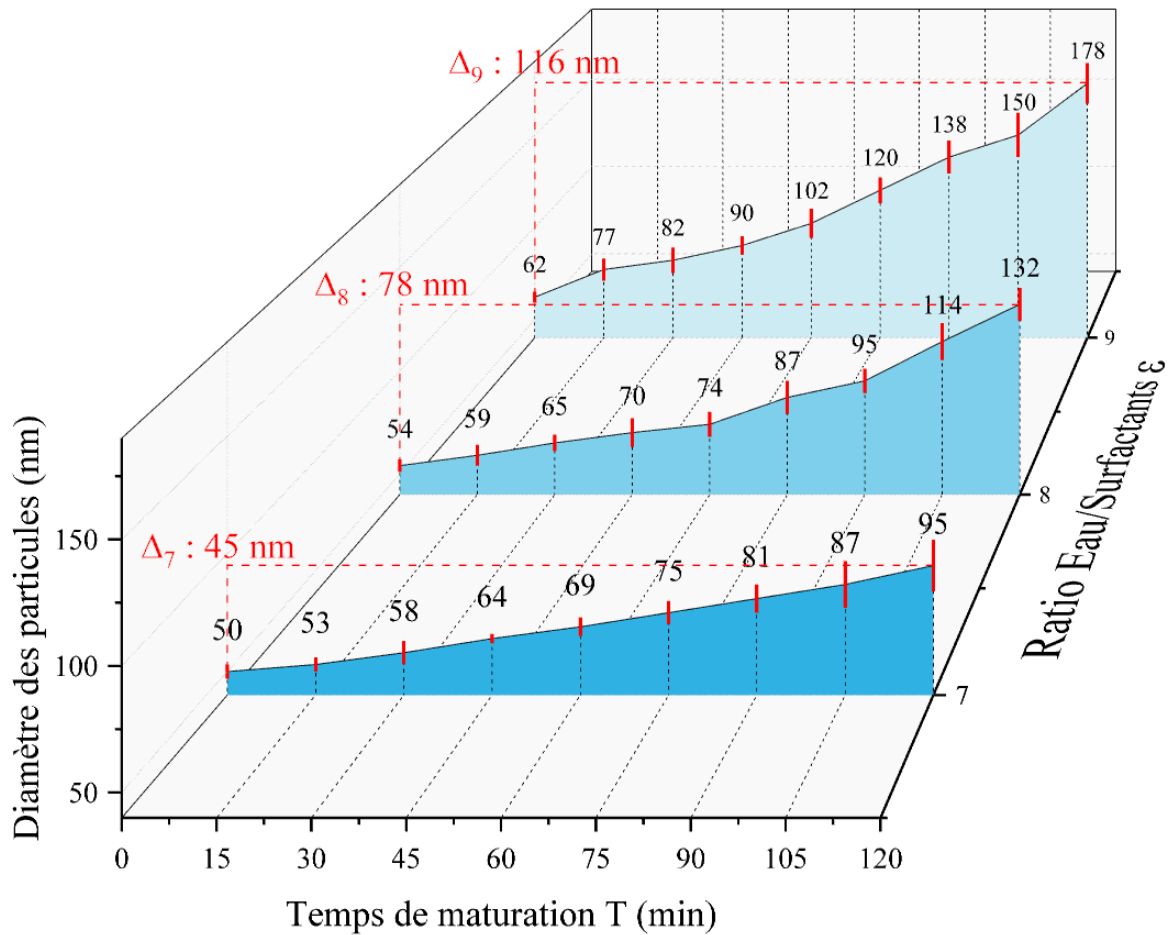


Figure 30 : Variation de la taille des particules en fonction de deux paramètres ε et T

Ces résultats ont permis l'établissement des relations mathématiques suivantes, elles relient les variations de la taille des nanoparticules au temps de maturation T :

$$f_{\Delta 9}(T) = 62 + 0,983 * T$$

$$f_{\Delta 8}(T) = 54 + 0,633 * T$$

$$f_{\Delta 7}(T) = 50 + 0,375 * T$$

Avec : $f_{\Delta \varepsilon}$: la fonction décrivant l'évolution de la taille des particules en fonction du temps

T : le temps de maturation

ε : le ratio eau/surfactants

Ces équations mettent en évidence une augmentation de $\Delta f/\Delta T$ d'un facteur de 1,6 à chaque fois que le rapport eau/surfactants augmente de 2. Cette observation est conforme à la logique de l'expérience. L'augmentation de la quantité d'eau conduit à de plus grands réacteurs. Ils contiendront donc plus de précurseurs et permettront une croissance plus rapide et en plus grande quantité des particules de verre.

Ce résultat nous permet de contrôler efficacement la taille des particules de verres bioactifs synthétisées avec 10 % de variation dans les tailles obtenues. Cette technique ouvre ainsi des perspectives quant à l'utilisation de particules de tailles variées pour diverses applications.

II. Caractérisation physico-chimique des particules de verres obtenues par sol-gel

Cette partie présente les résultats des caractérisations physico-chimiques des nanoparticules de verres synthétisées. Afin d'assurer la clarté du texte la notation NBG50 désignera par exemple des particules nanométriques de verre bioactif d'un diamètre de 50 nm.

A. Vérification de la composition du verre synthétisé

La composition chimique du verre a été mesurée à l'aide de mesures ICP-OES après sa dissolution dans l'acide fluorhydrique. Les mesures ont été effectuées sur la concentration de tous les éléments présents dans les précurseurs : silicium (Si), calcium (Ca), phosphore (P) et sodium (Na). L'origine et la pureté de ces précurseurs sont présentées dans l'annexe I.

Les résultats des mesures ne montrent aucune trace de Na dans la composition chimique du verre malgré sa présence dans les réactifs initiaux. Les mesures montrent des concentrations de Si, Ca et P conformes à la composition théorique du verre : $55,0 \pm 1,1$ % de SiO_2 , $40,0 \pm 0,8$ % de CaO et $5,0 \pm 0,2$ % de P_2O_5 en pourcentages molaires.

B. Étude morphologique

Les photographies prises à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) montrent des particules présentant une forme sphérique avec une taille d'environ 100 nm de diamètre. Un exemple de ces photographies est présenté sur la figure 31. Cet échantillon a été réalisé avec un temps de maturation de $T = 60$ min et un rapport ε de 9. La forme sphérique peut être due à la forme de la gouttelette d'eau utilisée comme réacteur de polycondensation. Les problèmes d'agglomération souvent présents dans les matériaux nanométriques sont évités par la présence de traces de tensioactifs malgré les rinçages effectués à la fin de la synthèse. Ceux-ci encore présents avant la calcination ont également la capacité d'éviter l'agglomération des NBG au cours de celle-ci et seront éliminés lors de la montée en température au-delà de 200 °C.

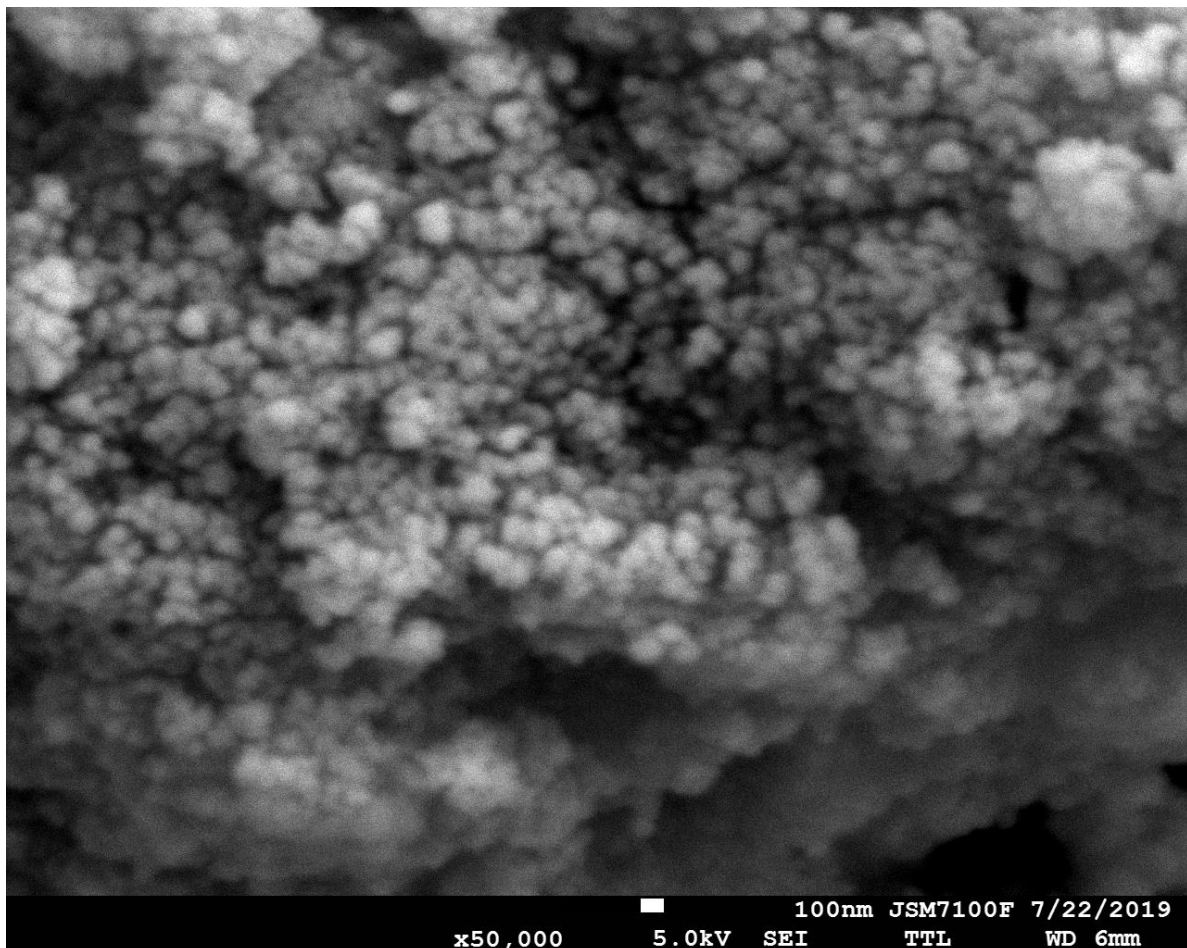


Figure 31 : Micrographie des nanoparticules de NBG100

C. Caractérisations structurales

Les diffractogrammes des NBG montrent le halo caractéristique de la phase amorphe du verre. Ce résultat est présenté sur la figure 32 pour les NBG100 après calcination et avant évaluation *in vitro*. Les résultats indiquent une microstructure amorphe visible par le halo de diffraction présent entre 20 et 35 ° (2θ) (état non cristallin). Les différents diffractogrammes de ce verre bioactif synthétisé avec différents diamètres présentent le même phénomène d'absence de pic de diffraction, ainsi pour un souci de clarté, seul le diffractogramme des NBG100 est présenté.

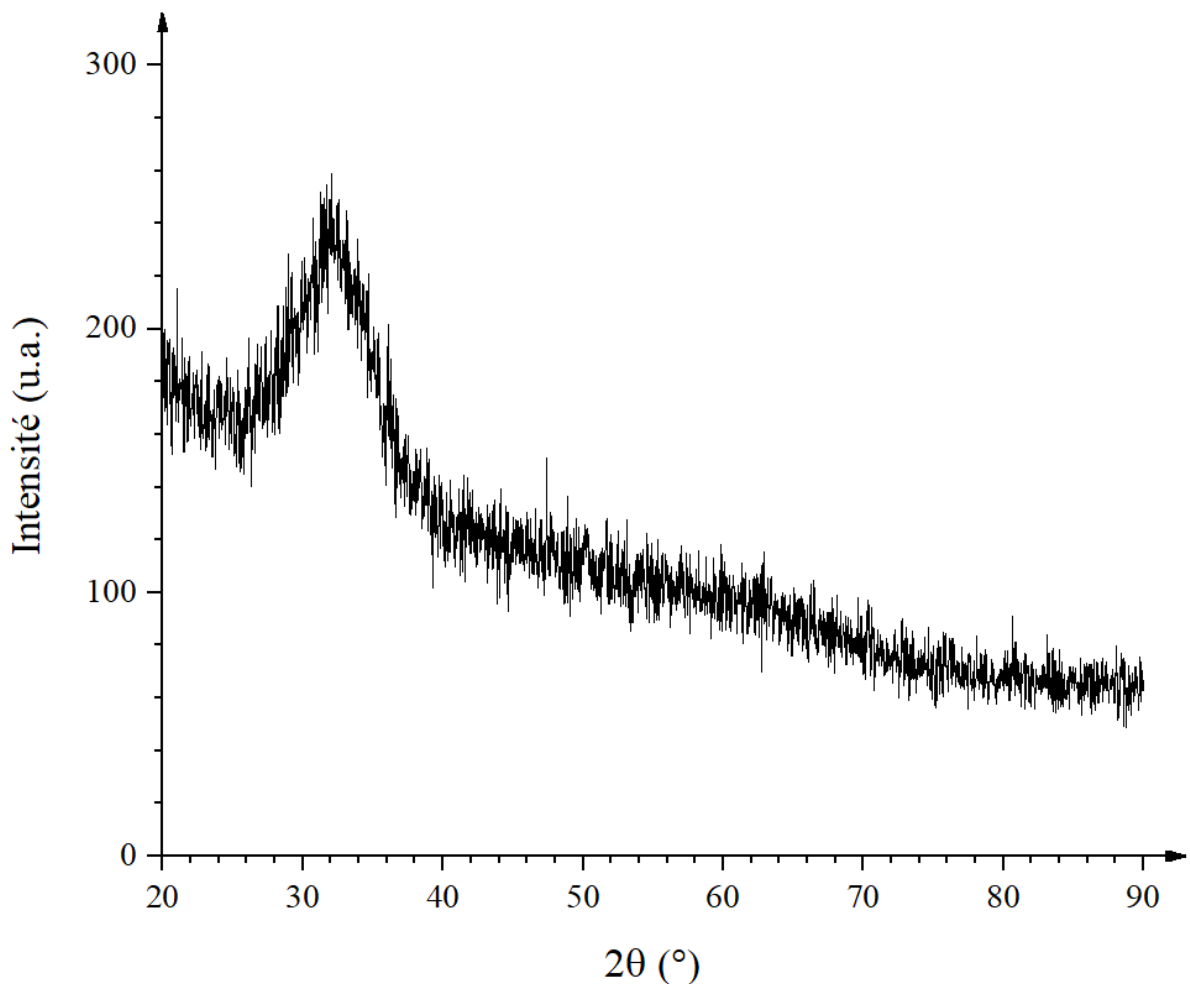


Figure 32 : Diffractogrammes des NBG100

Le spectre d'absorption infrarouge pour la poudre de NBG100 est présenté sur la figure 33. Celui-ci montre plusieurs bandes de vibration : les bandes de vibration à 470 cm^{-1} sont attribuées à un mode de liaison de groupes silicates [17]. Les bandes de vibration à 1070 , 920 , et 567 cm^{-1} sont associées à la vibration d'étirement des groupes phosphates [18]. Ces différents groupes sont caractéristiques du verre synthétisé. Le pic large présent à 3500 cm^{-1} représente les liaisons O-H de l'eau et les autres signaux correspondent à de possibles groupements carbonates.

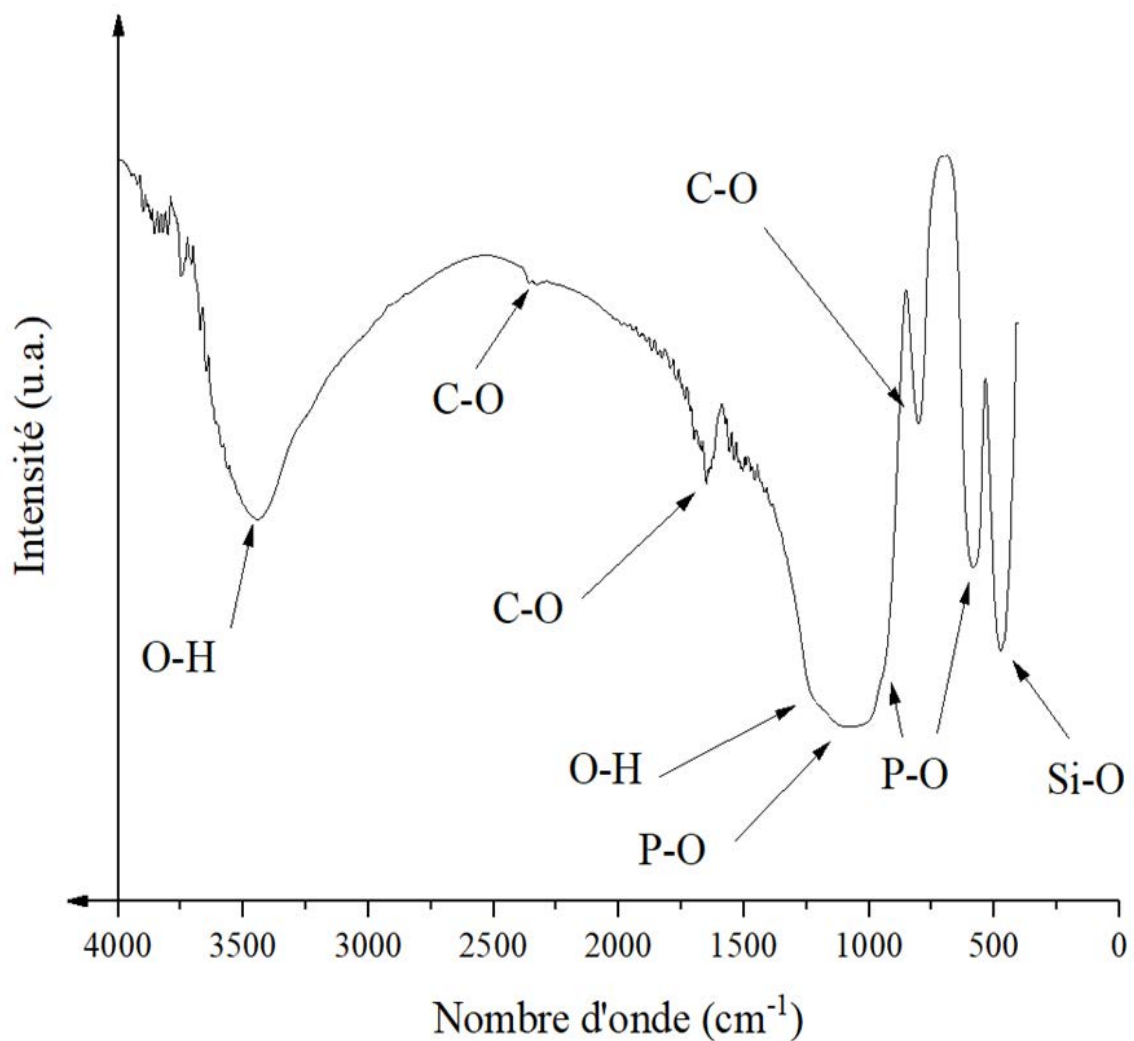


Figure 33 : Spectre infrarouge du NBG100

D. Analyses thermiques

Les analyses thermiques effectuées sur un échantillon de particules de 100 nm de diamètre présentent les trois températures caractéristiques d'un verre. La température de transition vitreuse T_g , la température de cristallisation T_c et la température de fusion T_f sont représentées sur le thermogramme de la figure 34.

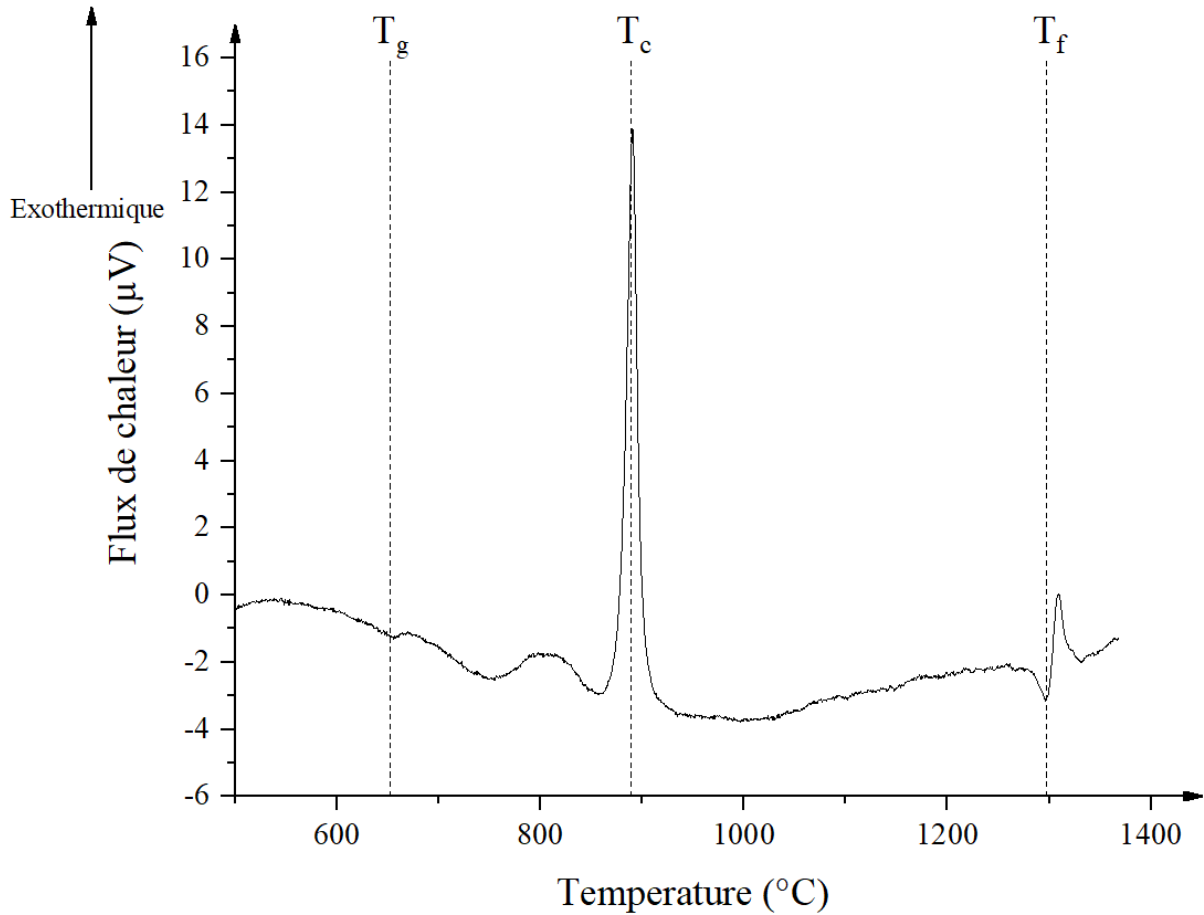


Figure 34 : Thermogramme des particules de verres de 100 nm diamètre

E. Évaluation de la surface spécifique en fonction de la taille des nanoparticules

La variation de la taille des nanoparticules et son effet sur la surface spécifique ont été étudiés.

La méthode BET a été utilisée pour analyser les poudres de NBG en fonction de leur taille. Les résultats obtenus montrent que pour les NBG50 la surface spécifique est de $83,2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

Cette valeur diminue pour les NBG100 ($71,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et plus encore pour les NBG150 ($60,7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Ces résultats confirment une diminution de la surface avec l'augmentation de la taille des particules et sont présentés sur le tableau 14.

Tableau 14 : Surface spécifique, volume et diamètre des pores pour différents diamètres de NBG

Diamètre des NBG (nm)	Surface spécifique ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)^a	Volume des pores ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)^b	Diamètre des pores (Å)^c
50 ± 3	83,2	0,13	75,54
100 ± 7	71,9	0,13	72,16
150 ± 11	60,7	0,12	71,85

^a : Incertitude expérimentale sur la surface spécifique $u(\text{sp}) = 0,1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

^b : Incertitude expérimentale sur le volume des pores $u(\text{vp}) = 0,01 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$

^c : Incertitude expérimentale sur le diamètre des pores $u(\text{dp}) = 0,01 \text{ Å}$

Une surface spécifique plus élevée pour les matériaux bioactifs améliore leurs propriétés d'adsorption des protéines et augmente la libération des ions vers le substrat. Ces deux caractéristiques permettent de supposer une amélioration de la cinétique de bioactivité.

III. Comportement *in vitro* du nano verre bioactif en l'absence de cellule

Les caractérisations suivantes sont dédiées aux particules de NBG100, car celles-ci feront l'objet dans le chapitre 6 d'expérimentation *in vivo*. Dans le but de pouvoir comprendre l'effet de ces NBG, il est nécessaire d'effectuer une caractérisation physico-chimique complète de leur comportement lors d'immersion dans un liquide biologique synthétique (SBF).

A. Évolution cristallographique après immersion dans le liquide biologique synthétique

La comparaison des différents diffractogrammes après immersion des NBG100 dans du SBF pour des durées variables confirme la formation progressive d'hydroxyapatite (HA) à la surface du verre. La figure 35 montre les diagrammes de diffraction des rayons X avant et après immersion dans du SBF pour différentes durées d'immersion, ainsi que la mesure par diffraction des rayons X de l'hydroxyapatite commerciale (Alfa Aesar CAS 12167-74-7). Après quatre heures d'immersion dans du SBF, deux pics caractéristiques d'hydroxyapatite à 26° (002) et 32° (211) (2θ) ont été observés. On constate l'apparition de pics secondaires à 54° (004) (2θ) après 24 heures d'immersion puis de pics à 39° (310) (2θ). L'intensité des pics augmente avec le temps d'immersion jusqu'à 3 jours (72 heures). Ces résultats mettent en évidence une bonne bioactivité des NBG préparés par la méthode sol-gel.

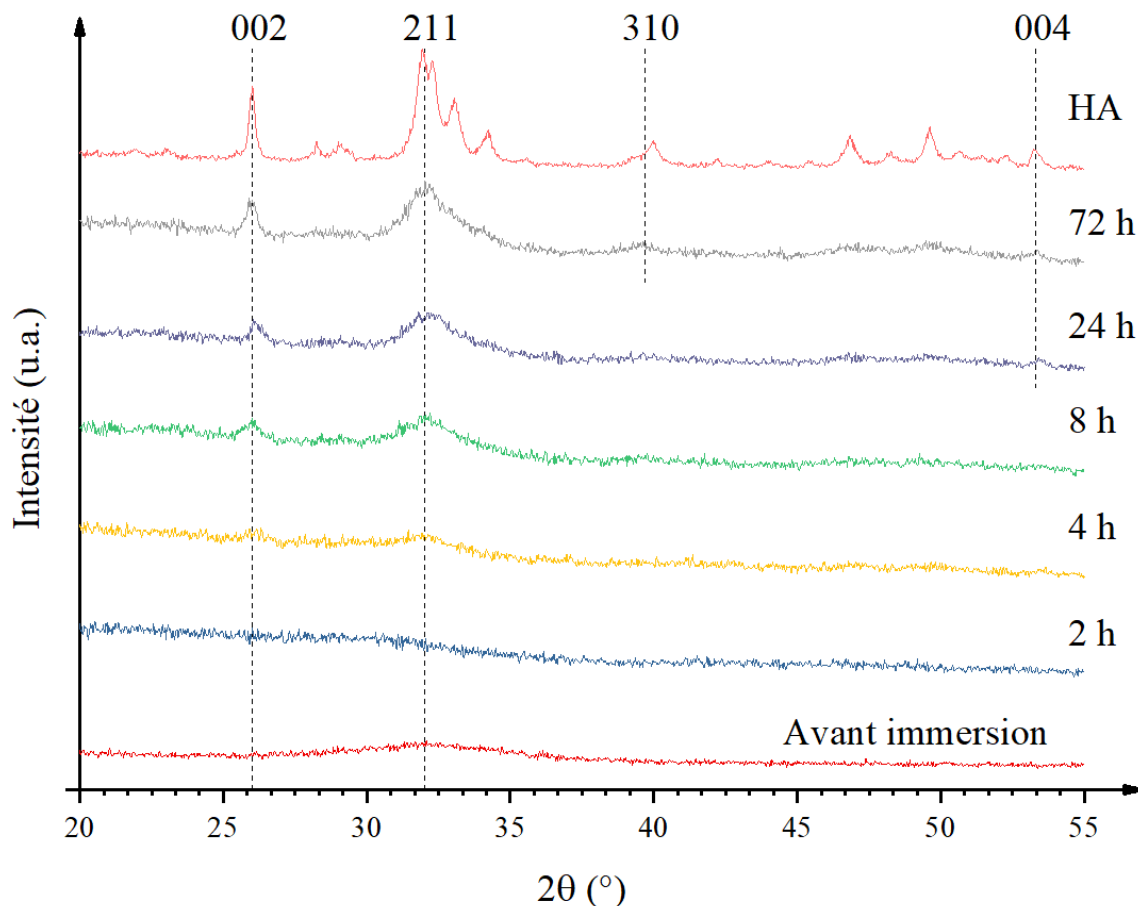


Figure 35 : Diffractogrammes des NBG100 avant et après immersion avec une référence HA

B. Étude des échanges ioniques entre les NBG et le SBF

Les concentrations ioniques des éléments Ca, P et Si ont été mesurées dans le SBF à la suite des échanges entre celui-ci et les NBG100 en utilisant une analyse par ICP-OES. Les résultats obtenus présentent une augmentation des concentrations de Ca, P et Si due à la libération de ces éléments depuis la surface du verre dans le SBF durant les deux premières heures. Par la suite, les concentrations continuent d'augmenter mais de façon plus lente sur un délai allant de 2 à 72 heures. On constate par la suite une stabilisation des concentrations à partir de 72 heures d'immersion, c'est l'établissement d'un équilibre chimique entre le milieu et la surface des NBG100. Cet état correspond au maximum de développement atteignable dans le cadre d'une expérimentation *in vitro* en l'absence de cellule. Ces résultats sont illustrés dans la figure 36.

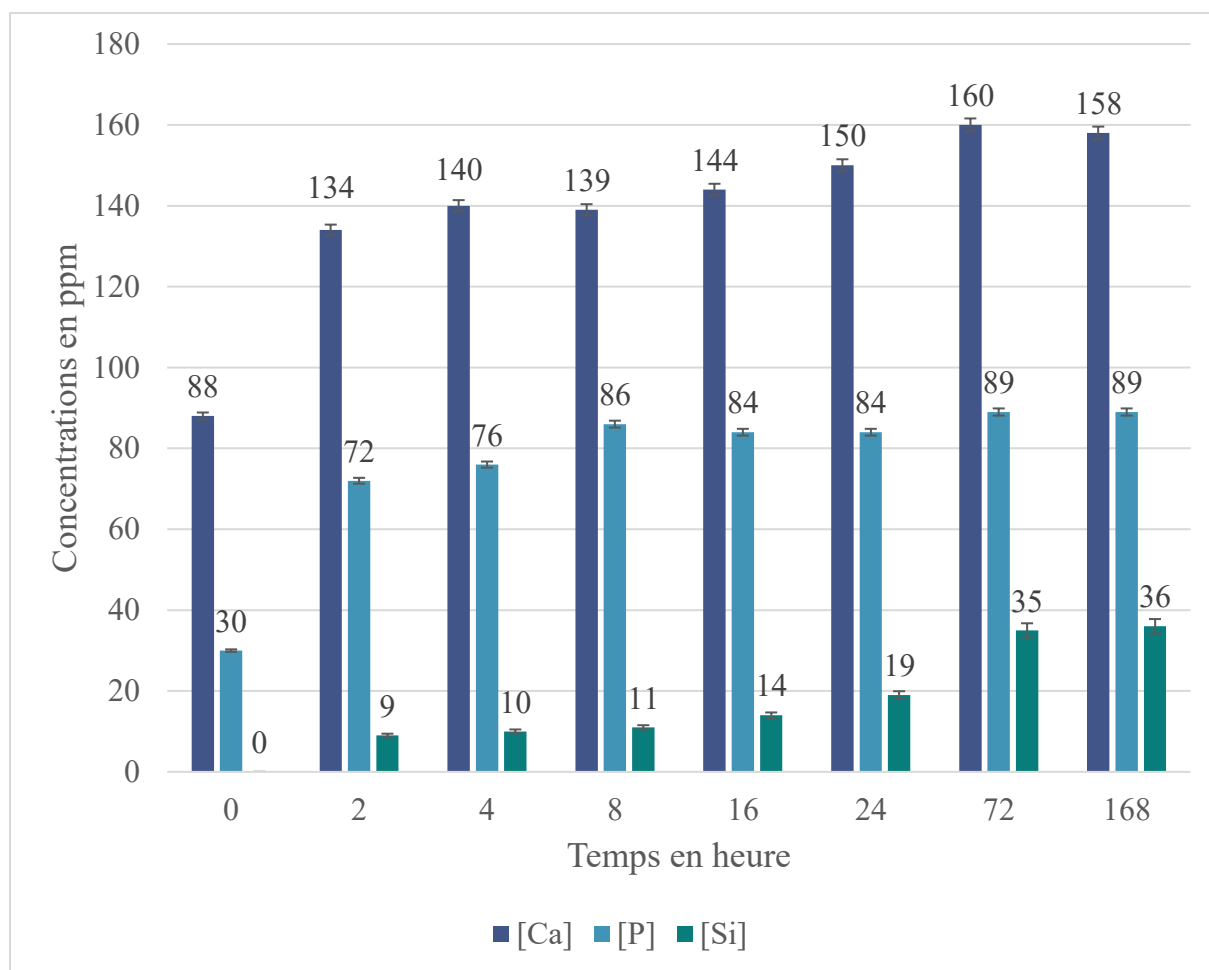


Figure 36 : Echanges ioniques entre la surface du verre et le SBF en fonction du temps

C. Effet de la taille des particules sur la cinétique de réactivité chimique

La maîtrise de la taille des particules de verres bioactifs synthétisées nous permet la mise en place d'une étude sur l'effet de ce paramètre sur la cinétique de relargage des ions déclencheurs de processus de régénération osseuse tels que l'ostéogénèse. Afin de mieux comprendre l'effet de la taille des particules sur la cinétique de relargage, des mesures ICP-OES ont été effectuées sur des échantillons de particules de 50, 100 et 150 nm de diamètre (NBG50, NBG100 et NBG150). On constate un relargage plus rapide des éléments dans le cas des petites particules que dans le cas des particules de plus grand diamètre. Ces observations sont en accord avec les modifications de la surface spécifique mesurées précédemment : plus la surface spécifique est faible, plus la particule est grande et plus le relargage est lent.

L'allure générale des variations de la concentration de chaque élément est similaire pour toutes les tailles de particules. Nous constatons néanmoins que celles concernant les NBG50 atteignent plus rapidement une situation d'équilibre chimique avec le SBF. Les résultats montrent également que l'amplitude dans les variations de concentration dans le cas des NBG150 est moindre que dans le cas des deux autres tailles de particules.

Ces résultats sont présentés dans les figures suivantes : figures 37, 38 et 39.

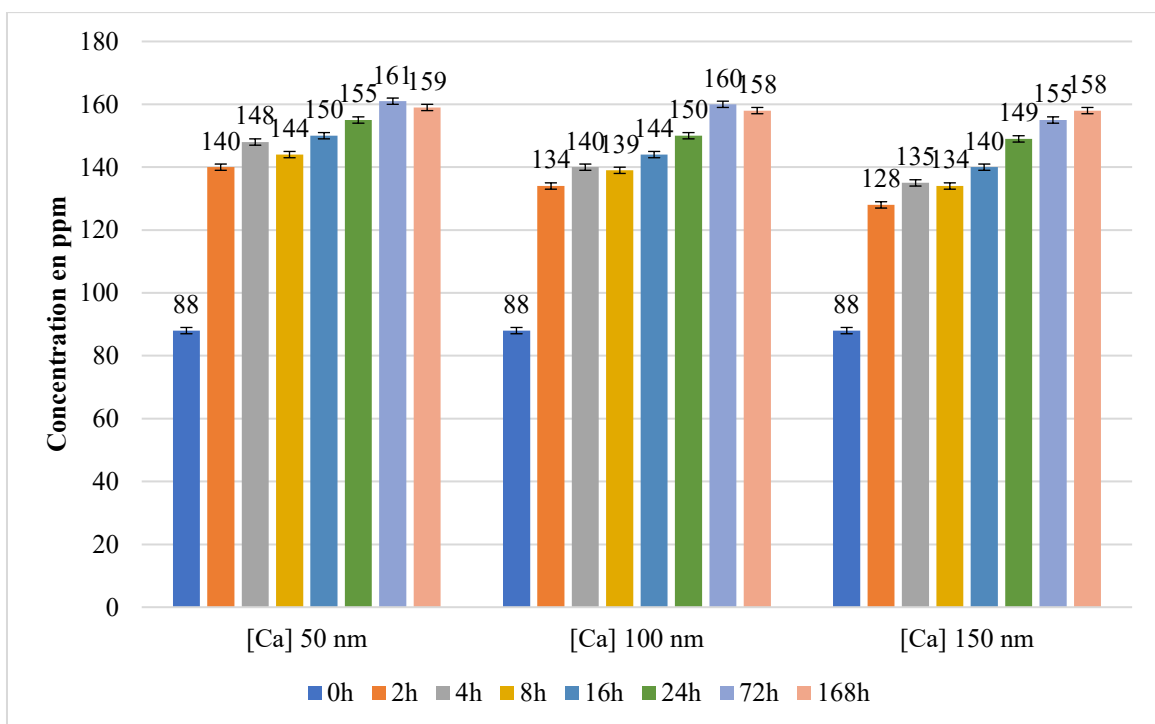


Figure 37 : Variations des concentrations en Ca dans le SBF : en fonction du diamètre des NBG et du temps d'immersion

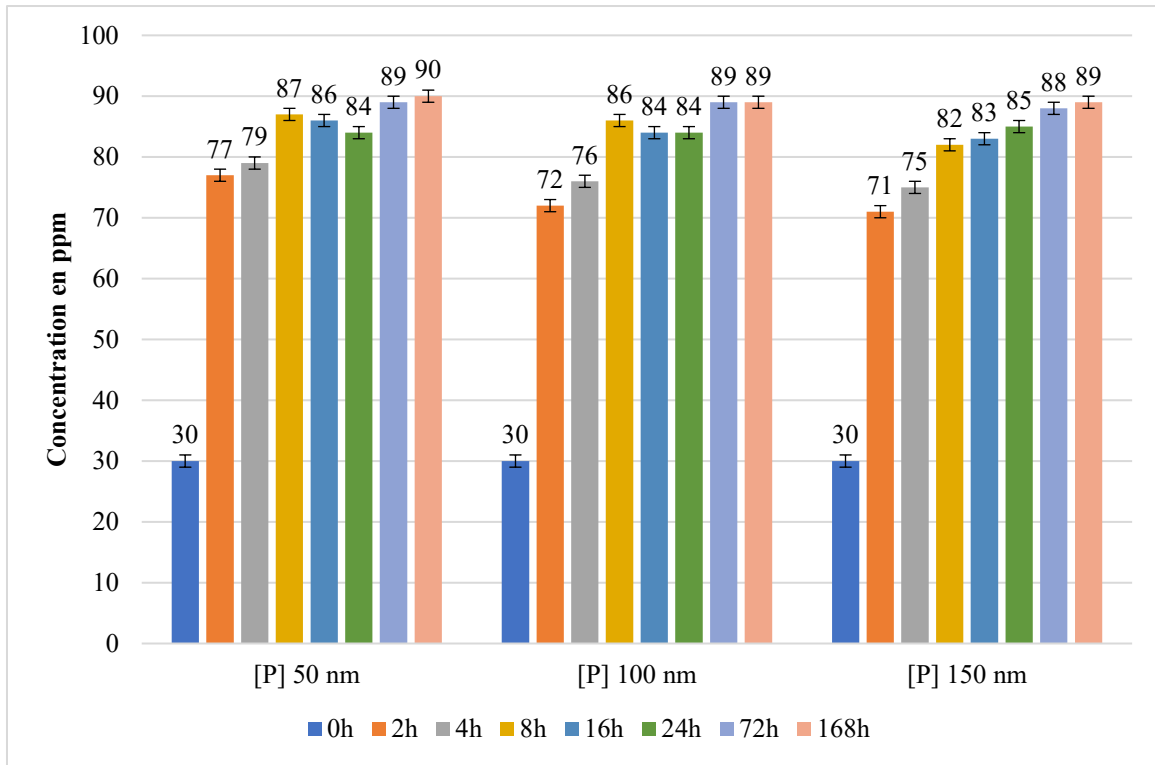


Figure 38 : Variations des concentrations en P dans le SBF en fonction du diamètre des NBG et du temps d'immersion

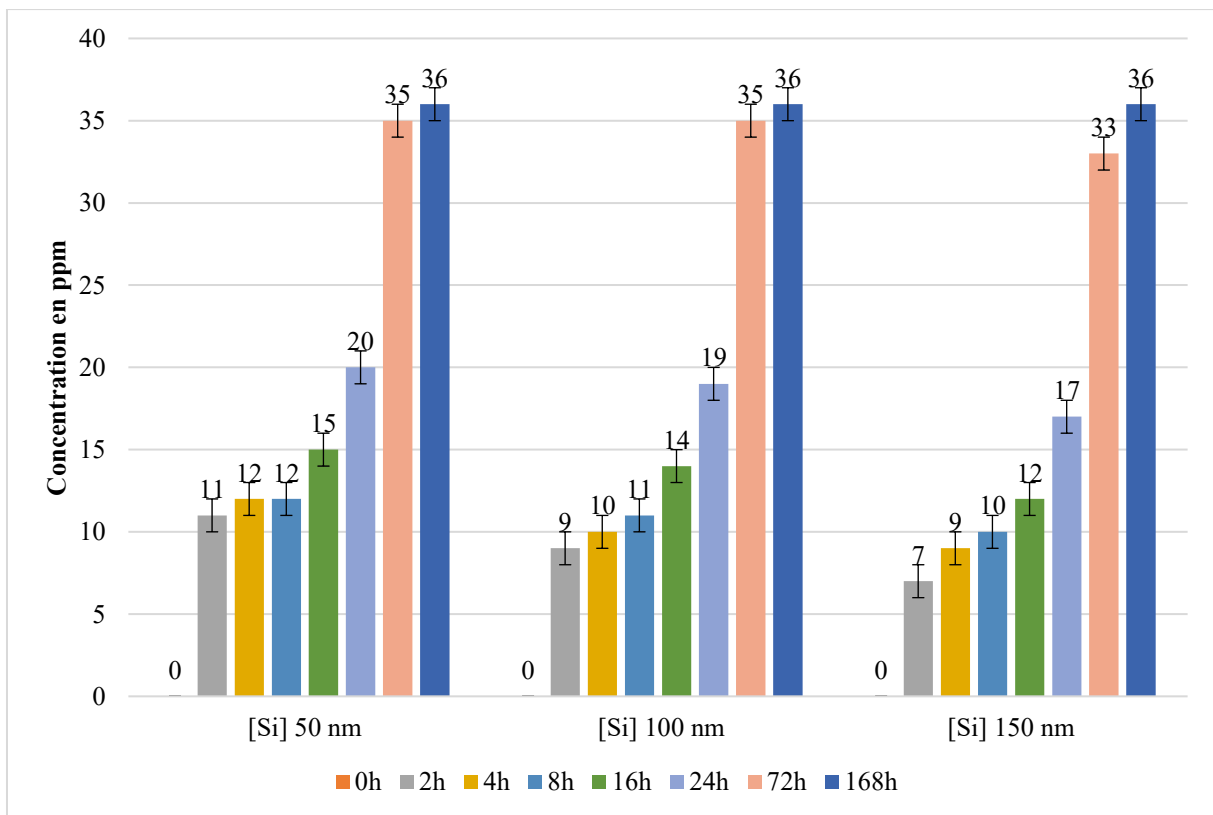


Figure 39 : Variations des concentrations en Si dans le SBF en fonction du diamètre des NBG et du temps d'immersion

IV. Études de la cytotoxicité

L'évaluation de la cytotoxicité des particules de nano verre bioactif a été effectuée suivant le protocole de test colorimétrique décrit dans le chapitre 2.

Les tests de cytotoxicité ont montré que le NBG100 est relativement bien toléré par les cellules. Les concentrations testés sont de 25, 10 et 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces concentrations sont celles utilisés dans au sein de notre laboratoire. Les concentrations de 10 et 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ présentent des taux de viabilité supérieur à 80 %. Ces résultats montrent que dans cet intervalle de concentration, les NBG100 sont utilisables pour des applications dans le domaine médical.

Néanmoins, les particules nanométriques présentent un phénomène d'agrégation une fois immergées dans le Tween[®] 20. Les résultats présentent de grandes variations et sont très difficiles à reproduire, comme le montre les variations des figures suivantes : 40 et 41.

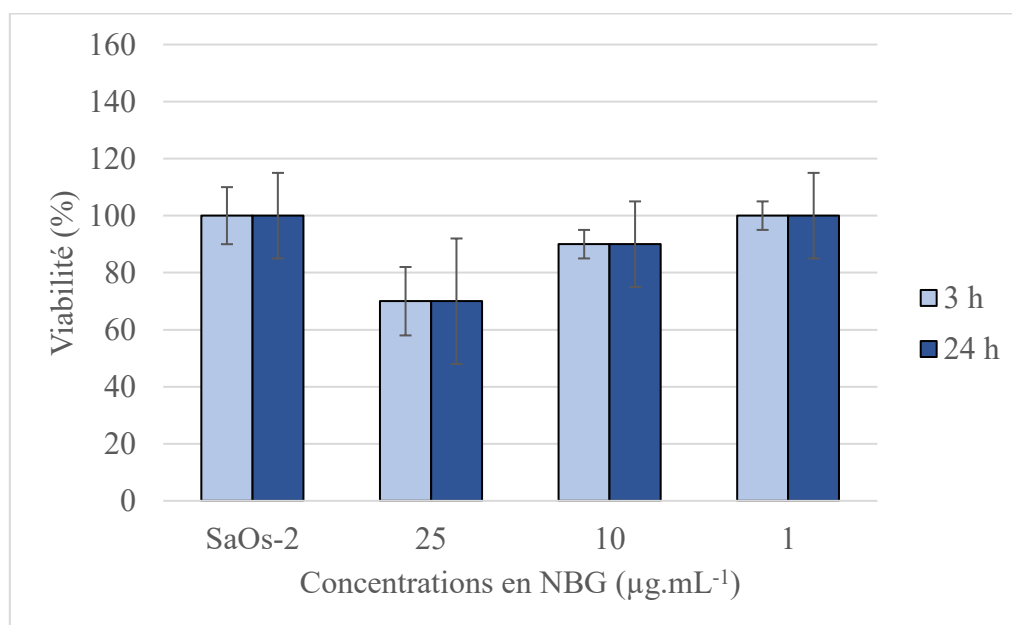


Figure 40 : Cytotoxicité des NBG100 en contact avec les cellules SaOs-2

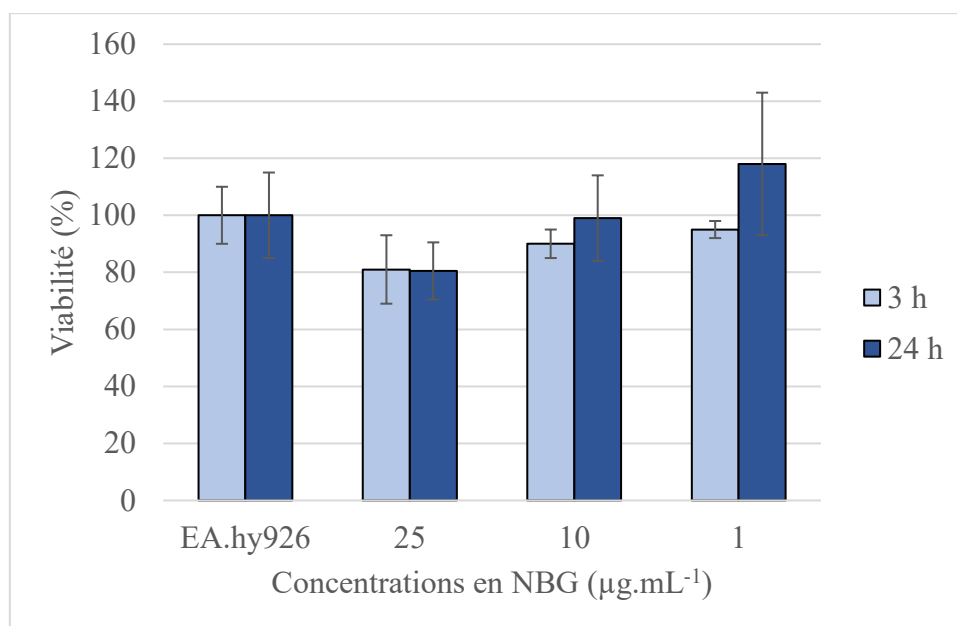


Figure 41 : Cytotoxicité des NBG100 en contact avec les cellules EA.hy926

V. Conclusion

Dans cette étude, le NBG a été préparé à l'aide d'une méthode sol-gel à émulsion rapide. Le temps de gélification et le temps de maturation ont été réduits de plusieurs heures à plusieurs minutes en utilisant une solution d'ammoniaque pour accélérer l'hydrolyse du composé primaire et la polycondensation.

Les nanoparticules obtenues ont une forme arrondie et ne présentent aucune diffraction autre qu'un halo caractéristique d'une matrice vitreuse dans les diffractogrammes. La présence de groupes silicates et phosphates composant le verre est confirmée. La taille des NBG peut être contrôlée de 20 à 200 nm de diamètre en contrôlant deux paramètres différents : le temps de maturation T et le rapport eau/tensioactif ϵ . Une relation a été établie entre le rapport eau/tensioactif et la taille de la particule permettant d'obtenir des particules de la taille désirée pour des applications dans le domaine de la régénération osseuse.

Les caractérisations réalisées pour définir la bioactivité des NBG ont permis d'établir une relation entre la taille des particules, la surface et le nombre d'échanges d'ions avec l'environnement, ce qui permet de mieux contrôler la cinétique de bioactivité des NBG en utilisant la taille des particules. Le contrôle de cette bioactivité est essentiel pour la préparation d'implants osseux. La maîtrise de la taille des particules offre plusieurs possibilités d'adaptations pour différentes applications.

Dans le cas d'une application en tant que biomatériau de comblement osseux, des tests de cytotoxicité ont également été effectués sur les NBG100 destinés à des tests *in vitro*. Les résultats montrent qu'avec des concentrations allant de 10 à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, les particules de NBG100 présentent un taux de viabilité supérieur à 80 %. En conclusion, les NBG sont des verres bioactifs dont la taille peut être adaptée en fonction de l'utilisation souhaitée.

Références du chapitre 4 :

- [1] Saboori, A.; Rabiee, M.; Moztarzadeh, F.; Sheikhi, M.; Tahriri, M.; Karimi, M. Synthesis, Characterization and in Vitro Bioactivity of Sol-Gel-Derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO Bioglass. *Materials Science and Engineering: C* **2009**, *29* (1), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.07.004>.
- [2] Li, R.; Clark, A. E.; Hench, L. L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *J. App. Biomater.* **1991**, *2* (4), 231–239. <https://doi.org/10.1002/jab.770020403>.
- [3] Lukowiak, A.; Lao, J.; Lacroix, J.; Nedelec, J.-M. Bioactive Glass Nanoparticles Obtained through Sol-Gel Chemistry. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (59), 6620–6628. <https://doi.org/10.1039/c3cc00003f>.
- [4] Curtis, A. R.; West, N. X.; Su, B. Synthesis of Nanobioglass and Formation of Apatite Rods to Occlude Exposed Dentine Tubules and Eliminate Hypersensitivity. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6* (9), 3740–3746. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.045>.
- [5] Nabian, N.; Jahanshahi, M.; Rabiee, S. M. Synthesis of Nano-Bioactive Glass-Ceramic Powders and Its in Vitro Bioactivity Study in Bovine Serum Albumin Protein. *Journal of Molecular Structure* **2011**, *998* (1–3), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.002>.
- [6] Santos, E. Sol-Gel Derived Carrier for the Controlled Release of Proteins. *Biomaterials* **1999**, *20* (18), 1695–1700. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00066-6).
- [7] Livage, J.; Coradin, T.; Roux, C. Encapsulation of Biomolecules in Silica Gels. *J. Phys.: Condens. Matter* **2001**, *13* (33), 673–691. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/13/33/202>.
- [8] Qu, H.; Bhattacharyya, S.; Ducheyne, P. 4.34 Sol-Gel Processed Oxide Controlled Release Materials ☆. In *Comprehensive Biomaterials II*; Elsevier, **2017**; 617–643. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10217-6>.

- [9] Hench, L. L. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* **2002**, *295* (5557), 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1067404>.
- [10] Saji, V. S.; Choe, H. C.; Yeung, K. W. K. Nanotechnology in Biomedical Applications: A Review. *IJNBM* **2010**, *3* (2), 119–124. <https://doi.org/10.1504/IJNBM.2010.037801>.
- [11] Misra, S. K.; Mohn, D.; Brunner, T. J.; Stark, W. J.; Philip, S. E.; Roy, I.; Salih, V.; Knowles, J. C.; Boccaccini, A. R. Comparison of Nanoscale and Microscale Bioactive Glass on the Properties of P(3HB)/Bioglass® Composites. *Biomaterials* **2008**, *29* (12), 1750–1761. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.040>.
- [12] Zhao, N. R.; Wang, Y. J.; Chen, X. F.; Yang, Y. X.; Wei, K.; Wu, G. Preparation of Bioactive Nanoparticles in the System CaO-P₂O₅-SiO₂ Using Microemulsions. *KEM* **2005**, *288–289*, 179–182. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.288-289.179>.
- [13] Hench, L. L. Sol-Gel Materials for Bioceramic Applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **1997**, *2* (5), 604–610. [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(97\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(97)80053-8).
- [14] Hench, L. L. A Genetic Theory of Bioactive Materials. *KEM* **2000**, *192–195*, 575–580. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.575>.
- [15] Hench, L. L.; West, J. K. The Sol-Gel Process. *Chemical Reviews* **1990**, *90* (1), 33–72.
- [16] Zheng, K.; Boccaccini, A. R. Sol-Gel Processing of Bioactive Glass Nanoparticles: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *249*, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [17] M, M. Comparative Study of Nanobioactive Glass Quaternary System 46S6. *Bioceram Dev Appl* **2016**, *04* (01). <https://doi.org/10.4172/2090-5025.1000072>.
- [18] Kay, S.; Thapa, A.; Haberstroh, K. M.; Webster, T. J. Nanostructured Polymer/Nanophase Ceramic Composites Enhance Osteoblast and Chondrocyte Adhesion. *Tissue Engineering* **2002**, *8* (5), 753–761. <https://doi.org/10.1089/10763270260424114>.

Chapitre 5 : Caractérisations physico-
chimiques des matériaux
bioactifs hybrides : nanoverre/spiruline
et nanoverre/phyco-cyanine

Chapitre 5 : Caractérisations physico-chimiques des matériaux bioactifs hybrides : nanoverre/spiruline et nanoverre/phycoyanine

L'idée principale de ce chapitre est de comparer l'effet de la phycoyanine seule et de la spiruline entière dans les tests de bioactivité sans cellule. La spiruline est une cyanobactérie dont la composition présente de nombreuses molécules et protéines d'intérêts physiologiques pour une bonne régénération osseuse. Parmi ces composants, la phycoyanine, un des pigments respiratoires de la spiruline avait particulièrement attiré notre attention. Afin de l'associer avec nos nanobioverres bioactifs (NBG), ce pigment a été extrait de la spiruline, puis a été purifié. La spiruline a également été associée à ce même nanoverre à des fins de comparaison. Le verre bioactif qui a été utilisé pour l'association est le nanoverre qui a été obtenu par émulsion présenté dans le chapitre 4.

L'utilisation de ce nanoverre permet d'obtenir une très grande surface spécifique autorisant son association avec une quantité importante de principe actif par rapport à l'utilisation de particules de verres plus volumineuses [1,2,3]. De plus, la nanoscience est intéressante dans le contexte de la régénération des tissus. En effet, si le contact entre les particules et le principe actif se fait au niveau nanométrique, il ne sera que plus efficace en raison de la semi-perméabilité de la membrane plasmique entourant la cellule, qui laisse passer *via* des canaux de taille nanométrique les éléments vers l'intérieur de celles-ci [4,5,6]. L'accès efficient à des interactions cellulaires est la clef permettant d'augmenter l'efficacité d'une molécule d'intérêt physiologique.

Dans cette étude, la spiruline a été caractérisée par plusieurs méthodes physico-chimiques avant de subir l'extraction de sa phycoyanine. Le résultat de cette extraction a également été caractérisé. La spiruline et le pigment extrait ont été associés à notre verre nanométrique bioactif de 100 nm (NBG100). L'association de chaque composant a eu pour objectif de créer des matériaux hybrides : le matériau hybride nanoverre bioactif/spiruline (NBG-S) et l'autre matériau hybride nanoverre bioactif/phycoyanine (NBG-P).

I. Caractérisation de la spiruline et extraction de la phycocyanine

Cette partie concerne la caractérisation physico-chimique de la spiruline. Elle servira dans la suite de ce travail comme point de comparaison entre la spiruline seule et le verre bioactif hybride verre/spiruline

A. Caractérisation physico-chimique de la spiruline

Le diffractogramme XRD de la spiruline a été réalisé sur la poudre de spiruline broyée afin d'homogénéiser la taille moyenne des particules avant de procéder au processus d'extraction. Ce diffractogramme est présenté sur la figure 42. Le diagramme de diffraction des particules présente la forme caractéristique d'un matériau de nature amorphe.

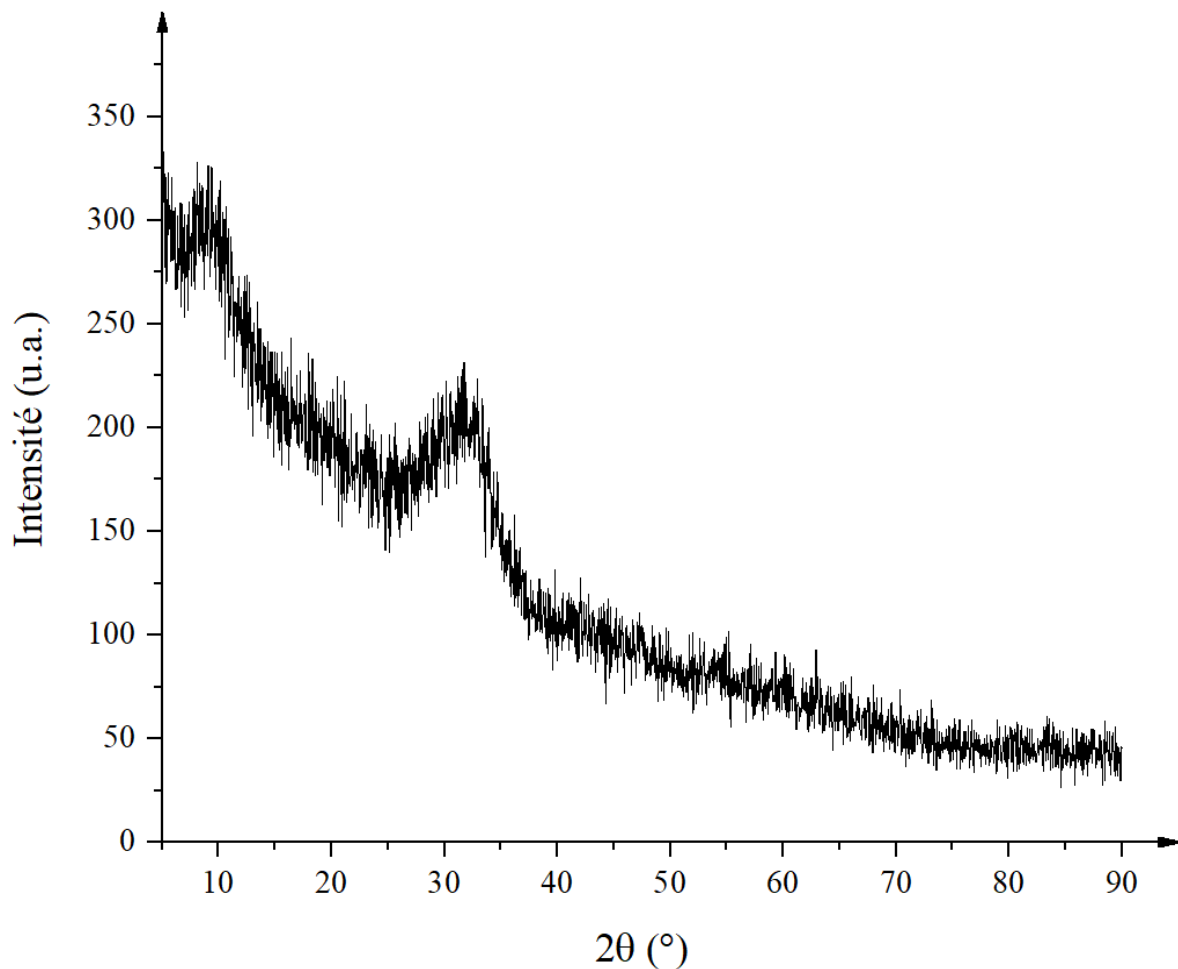


Figure 42 : Diffractogramme de la spiruline

Le spectre d'absorption UV-visible présente toutes les protéines typiques présentes dans la spiruline selon la littérature et est mis en évidence sur la figure 43 [7]. Les deux pics de chlorophylle α à 420 et 650 nm ont été identifiés, les caroténoïdes visibles par les pics à 440 et 470 nm ainsi que le pic caractéristique de phycoyanine à 615 nm ont également été identifiés.

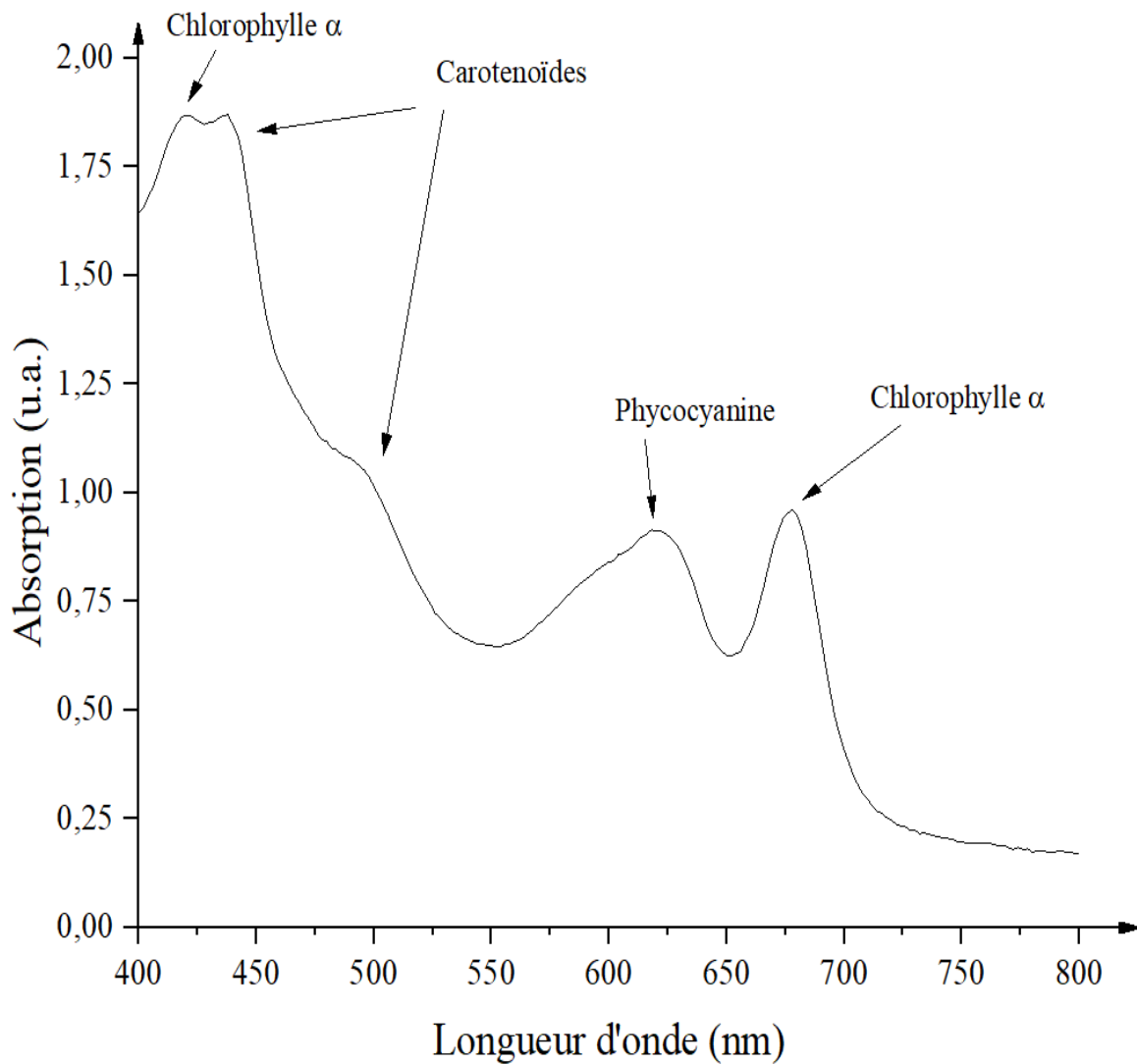


Figure 43 : Spectre UV-Vis de l'extrait de la spiruline

La spiruline a également été caractérisée par ICP-OES. Les résultats obtenus sont conformes avec ceux présents dans la littérature [8].

Les résultats de la composition chimique sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Composition de la spiruline ramenée à 1 g

Eléments	Quantité dans 1 g de spiruline sèche (µg)	Eléments	Quantité dans 1 g de spiruline sèche (µg)
Calcium	10 000	Manganèse	50
Chrome	3	Phosphore	8 000
Cuivre	12	Potassium	14 000
Fer	700	Sodium	9 000
Magnésium	4 000	Zinc	400

B. Protocole d'extraction, rendement et pureté de la phycoyanine

1. Extraction de la phycoyanine

L'extraction de la phycoyanine a été effectuée suivant le protocole d'extraction présenté dans le chapitre 2 dans le cadre d'une collaboration avec une autre équipe de l'UMR CNRS 6226 : l'équipe COInt et l'aide du professeur Bazureau et du docteur Paquin.

La phycoyanine est un pigment respiratoire utilisé pour la photosynthèse par la spiruline. Il est souvent utilisé comme complément alimentaire diététique et présente diverses propriétés pharmacologiques décrites dans le chapitre 1. Ce pigment présente un pic caractéristique en spectrométrie ultraviolette-visible à 615 nm [7].

2. Rendement de l'extraction de la phycoyanine

Le calcul lié au rendement de l'extraction de la phycoyanine se présente comme suit [9] :

$$PE = \frac{OD_{615} - 0,474 * OD_{652}}{5,34}$$

Avec : PE : la concentration en phycoyanine en mg.mL⁻¹

OD₆₁₅ : la densité optique de l'échantillon à 615 nm

OD₆₅₂ : la densité optique de l'échantillon à 652 nm

À la suite de ce premier calcul de concentration, le rendement expérimental a également été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Rendement} = \frac{PE * V}{PB}$$

Avec : V : le volume de solvant en mL

PB : le poids de la biomasse sèche utilisé pour l'extraction en mg.

Le calcul de la quantité de phyco cyanine extraite a été effectué en utilisant l'équation (1) et donne un résultat de $2,45 \pm 0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Le calcul du rendement montre que l'extraction a un ratio de 4,8 % par rapport à l'apport en biomasse brute. Étant donné que le rapport de la masse totale des pigments est de 15 % de la biomasse séchée, cela signifie que l'extraction est effectuée à environ 1/3 de la capacité totale d'extraction [10].

3. Travail de purification

La pureté du produit extrait a été calculée en utilisant la formule suivante [11] :

$$Pu = \frac{OD_{615}}{OD_{280}}$$

Avec : Pu : le ratio de pureté du produit

OD₆₁₅ : la densité optique de l'échantillon à 615 nm

OD₂₈₀ : la densité optique de l'échantillon à 280 nm

Le travail de purification a été effectué *via* le passage de l'extrait primaire à travers un mélange de poudres d'hydroxyapatite et de célite avec des proportions de 50/50. Une fois les densités optiques obtenues et utilisées, les résultats donnent un ratio de pureté $0,702 \pm 0,025$ à la fin de l'extraction et une pureté de $1,416 \pm 0,143$ après la filtration sur le mélange de poudres.

Ce ratio de pureté est considéré acceptable dans le cadre d'une utilisation en tant que composé actif dans cette thèse [12]. Le spectre comparatif UV-visible entre un extrait de spiruline complet et l'extrait après extraction est présenté sur la figure 44.

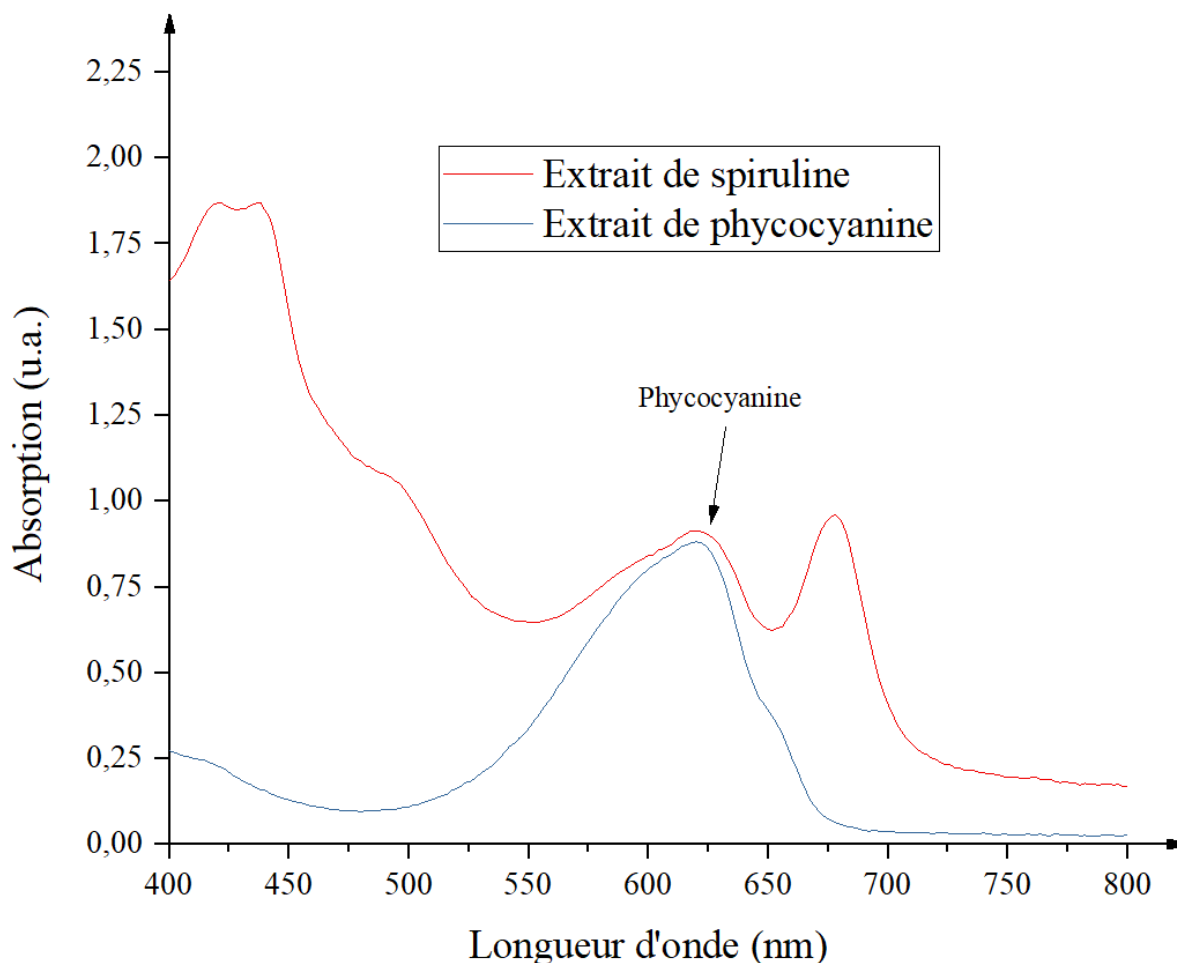


Figure 44 : Spectre UV-Vis comparatif entre l'extrait de spiruline brute avant et après extraction de la phycocyanine

II. Caractérisations physico-chimiques des matériaux bioactifs hybrides : nanoverre/spiruline et nanoverre/phyco cyanine avant immersion

Une fois la spiruline et la phycocyanine caractérisées celles-ci ont été additionnées aux nanoparticules de verre bioactif de 100 nm de diamètre (NBG100) en utilisant le protocole d'association décrit dans le chapitre 2. Les matériaux hybrides formés, l'association nanoverre/spiruline et nanoverre/phyco cyanine seront respectivement appelées NBG-S et NBG-P.

A. Analyses et taux d'association

Ce travail se base sur un taux d'association arbitraire pour l'hybride NBG-S. Celui-ci est composé du NBG100 et de 20 % en masse de spiruline complète. Afin d'avoir la possibilité de comparer l'action du pigment (phycoyanine) extrait seul et l'effet de celui-ci encore associé aux autres éléments de la spiruline, le taux de dopage a été calculé pour obtenir la même quantité de pigment dans chaque matériau étudié.

Selon la littérature [8], les phycoyanines représentent 15 % de la masse sèche de la spiruline. Le taux d'association en phycoyanine sera donc de 3 % en masse pour le NBG-P.

Le taux d'association des hybrides NBG-P et NBG-S a été vérifié en les immergeant dans de l'eau distillée et en comparant l'intensité optique à 615 nm par rapport à des solutions préalablement préparées contenant les quantités exactes de spiruline ou de l'extrait de phycoyanine. Les hybrides ont été laissés trois jours en suspension et à l'abri des variations de température ou de luminosité pour s'assurer que la majeure partie du principe actif serait visible sur par spectrométrie. Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Résultats des vérifications des taux de principe actif dans les hybrides

	Taux de dopage théorique en masse	Rapport taux mesuré/taux théorique	Variation
NBGS	20 %	88 %	± 4 %
NBGP	3 %	79 %	± 5 %

Les différences entre les taux expérimentaux calculés et les taux mesurés peuvent être dues à plusieurs facteurs [13]. Dans notre cas, le facteur principal est la dénaturation de la phycoyanine par deux effets : une exposition prolongée à un milieu dont le pH change dû à la dissolution du verre et par l'effet de la lumière.

B. Caractérisation structurale

Le diffractogramme DRX présente pour les deux matériaux hybrides le halo de diffraction compris entre 20 et 30 ° (2θ) et aucun pic de diffraction. Ces résultats attestent que le processus d'association n'a pas modifié la nature amorphe du nanoverre. En complément, le diffractogramme de l'hybride NBG-P ne présente aucune modification réelle avec le diffractogramme des NBG100 seul. L'absence de modification peut être due à divers paramètres dont : la faible concentration de phycoyanine ajoutée, l'absence de cristallisation au cours du processus d'extraction et de purification, ou encore à la modification de la protéine lors de l'établissement des contacts établis avec la surface du verre [13].

Les diffractogrammes des NBG-S et NBG-P sont présentés dans la figure 45.

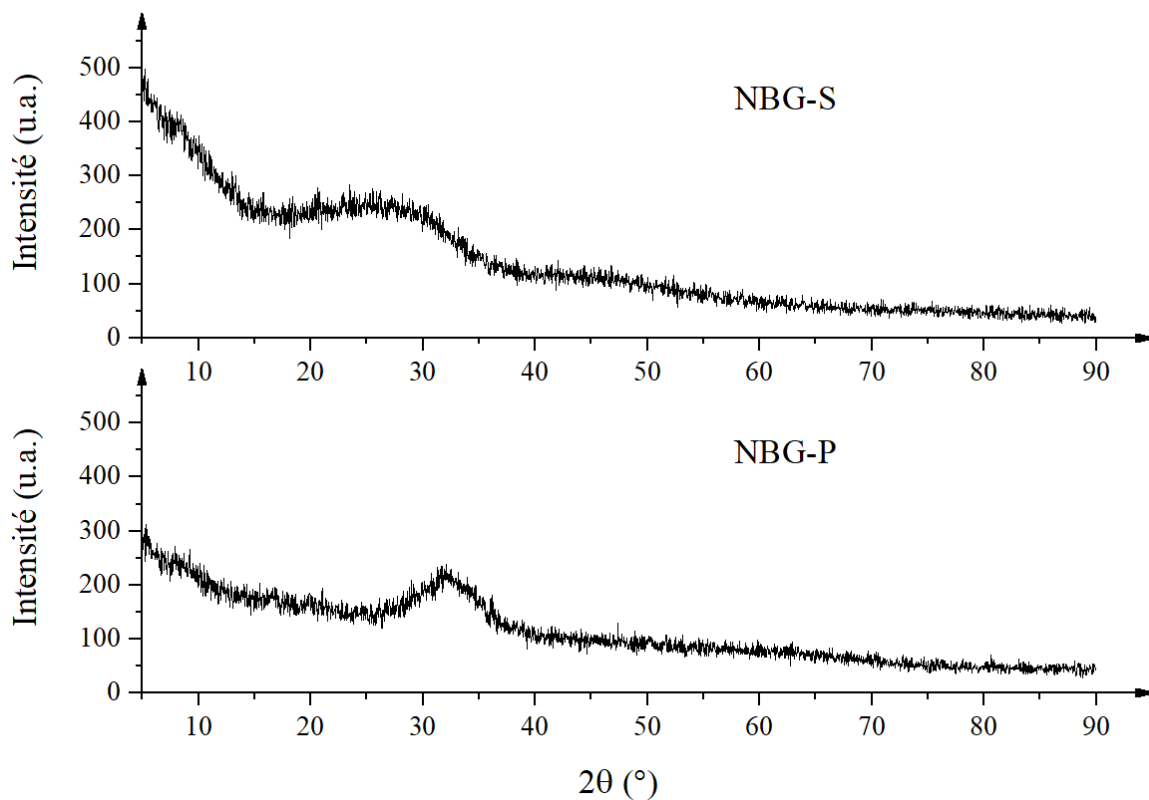


Figure 45 : Diffractogrammes des NBG-S et des NBG-P

III. Caractérisation des verres hybrides après les tests *in vitro* sans cellule

A. Caractérisation structurale

Des diffractogrammes des différents matériaux ont été effectués afin de comparer la cinétique de cristallisation en fonction du temps et des différents composants utilisés dans cette étude. Les diffractogrammes des 3 matériaux après immersion dans le SBF confirment la formation d'hydroxyapatite (HA) à la surface de ceux-ci.

La comparaison a été faite en utilisant la largeur à mi-hauteur des pics (002) et (211) de l'HA. Les résultats montrent que le diffractogramme des NBG100 et celui des NBG-P sont similaires. Ces similitudes entre NBG100 et NBG-P peuvent être dues à une quantité de phycoyanine insuffisante pour le seuil de détection ou à l'absence de modification de structure lors de l'addition de phycoyanine. Afin de simplifier les résultats, seul le diffractogramme NBG100 est présenté.

Les NBG-S présentent un taux de cristallisation plus bas. Une différence de 17 % pour 2 h, 12 % pour 4 h, 9 % pour 8 h, 5 % pour 24 h et 2 % pour 72 h. Ces différences sont calculées en utilisant les rapports des intensités des pics (002) et (211) de l'HA. Ces différences sont dues au fait que les cyanobactéries recouvrent la surface des nanoparticules de verre et réduisent la surface en contact avec le SBF. Les résultats pour les délais courts et longs sont présentés aux figures 46 et 47 en utilisant l'HA commerciale (Alfa Aesar CAS 12167-74-7) comme référence pour la progression de la cristallisation.

Ces résultats mettent en évidence la compatibilité entre la spiruline et la phycoyanine avec la croissance d'une couche de phosphate de calcium à la surface des matériaux.

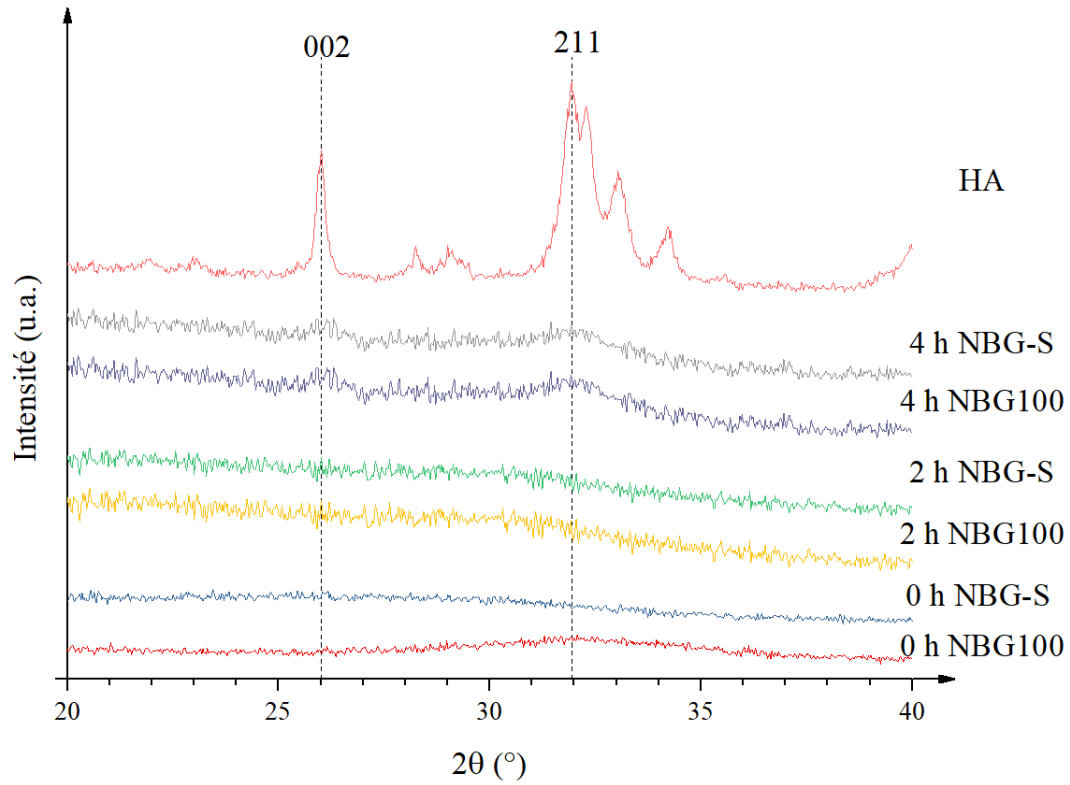


Figure 46 : Diffractogrammes comparatifs des différents biomatériaux pour les courts délais (0 à 4 h)

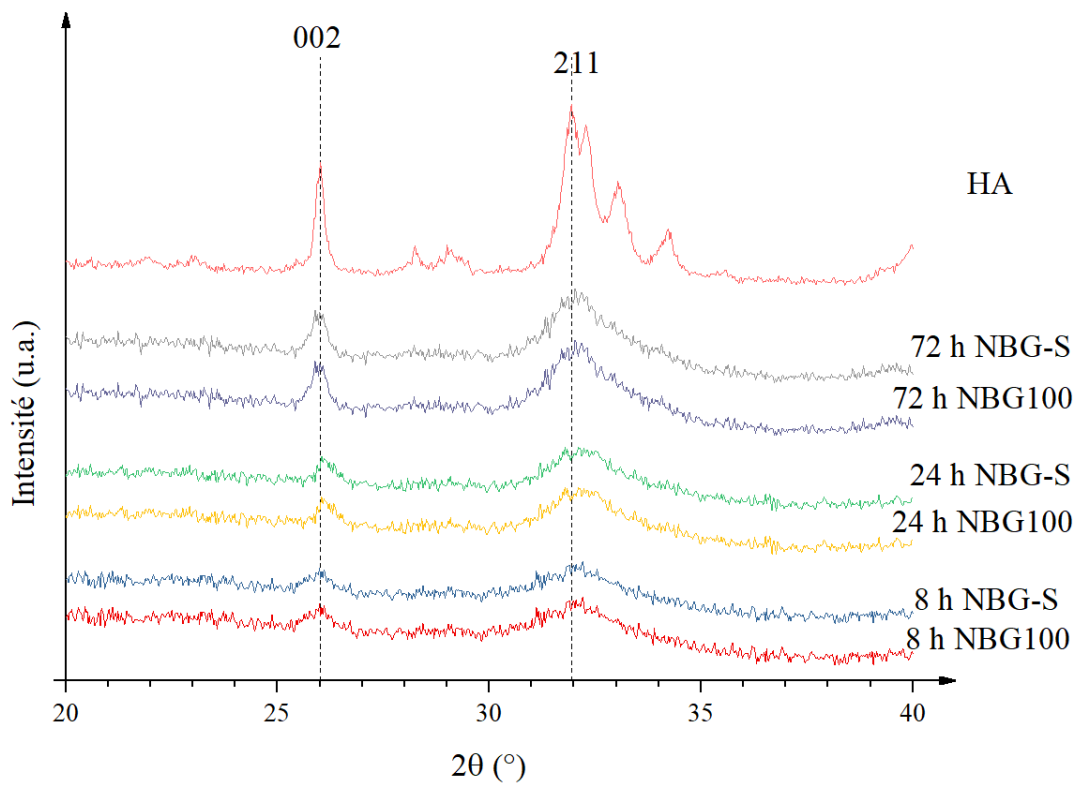


Figure 47 : Diffractogrammes comparatifs des différents biomatériaux pour les longs délais (8 à 72 h)

B. Détermination des échanges ioniques entre les biomatériaux et le milieu d'immersion

La modification de la composition chimique des biomatériaux présente des effets sur la cinétique de réactivité uniquement dans le cas des matériaux hybrides NBG-S. Dans le cas des NBG-P, comme pour les modifications structurales, les mesures sur calcium (Ca), phosphore (P) et silicium (Si) ne présentaient pas de modification avec ceux présentés par les NBG100.

Les résultats des analyses pour les NBG100 et NBG-S présentent le même schéma de modifications mais avec des valeurs différentes pour leurs concentrations respectives en Ca, P et Si. Dans les deux cas, les variations commencent par une augmentation des concentrations de Ca, P et Si dues à la libération de ces ions depuis la surface des matériaux vers le SBF. Ensuite, la concentration continuera à augmenter plus lentement jusqu'à ce que la solution atteigne un équilibre chimique. En outre, la hausse de Ca, P et Si dans le SBF dans le cas des particules de NBG100 présente une valeur supérieure à celle des particules de NBG-S.

Ces résultats sont illustrés à la figure 48. Ils peuvent être expliqués par la différence de surface entre ces deux compositions, le revêtement de spiruline sur la surface du verre échangeant lentement avec l'environnement pendant l'immersion dans le SBF.

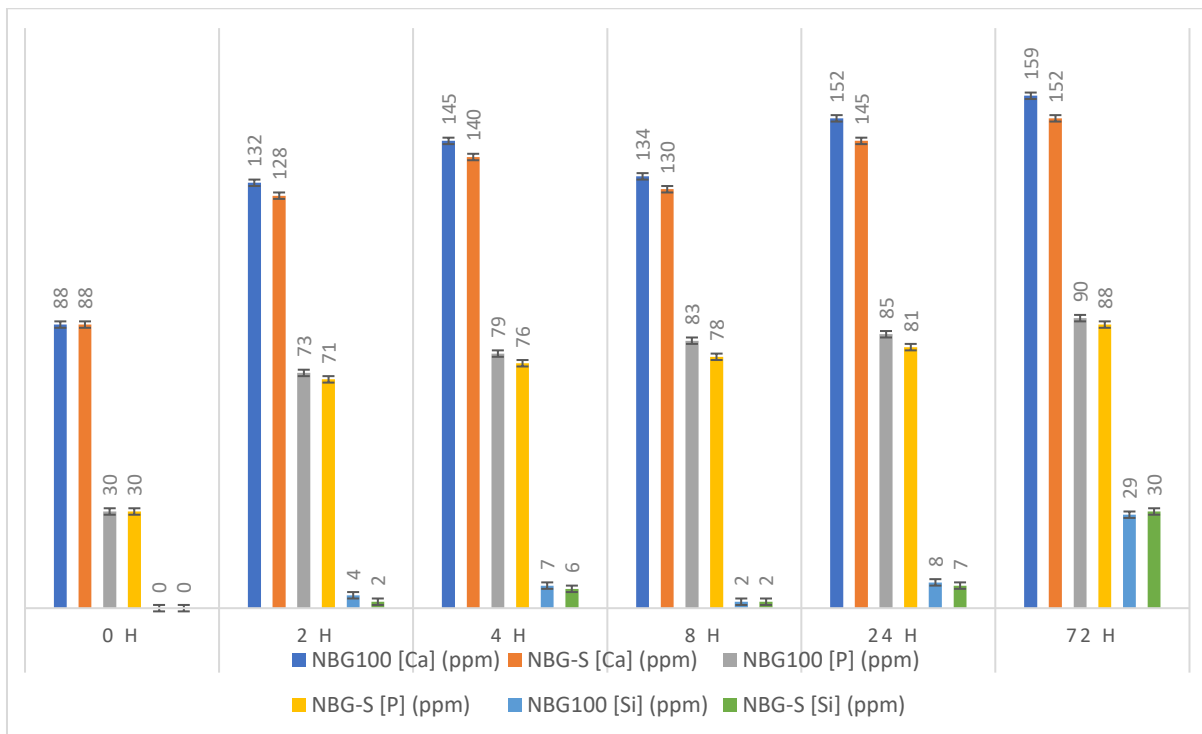


Figure 48 : Variation des concentrations de Ca, P et Si dans le SBF en fonction : de la nature des matériaux et du temps d'immersion.

IV. Tests de viabilité cellulaire de l'hybride NBG-S

Les tests de viabilité cellulaires ont été réalisés suivant le protocole présenté au chapitre 2.

La cytotoxicité de la phycoyanine ne sera pas effectuée au cours de cette thèse due à la très riche littérature traitant ce sujet [14,15,16].

Les tests de cytotoxicité effectués sur les NBG100 ont montré que le verre nanométrique est relativement bien toléré par les cellules.

Les concentrations de 10 à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sont au-dessus des 80 % de viabilité et ne présentent donc pas de toxicité pour les cellules étudiées. L'ajout de spiruline présente une toxicité plus élevée par rapport au nanoverre seul, mais reste dans la plage acceptable pour les applications à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Néanmoins, les particules nanométriques présentent un phénomène d'agrégation une fois immergées dans le Tween 20[®]. Les résultats sont présentés sur les figures 49 et 50.

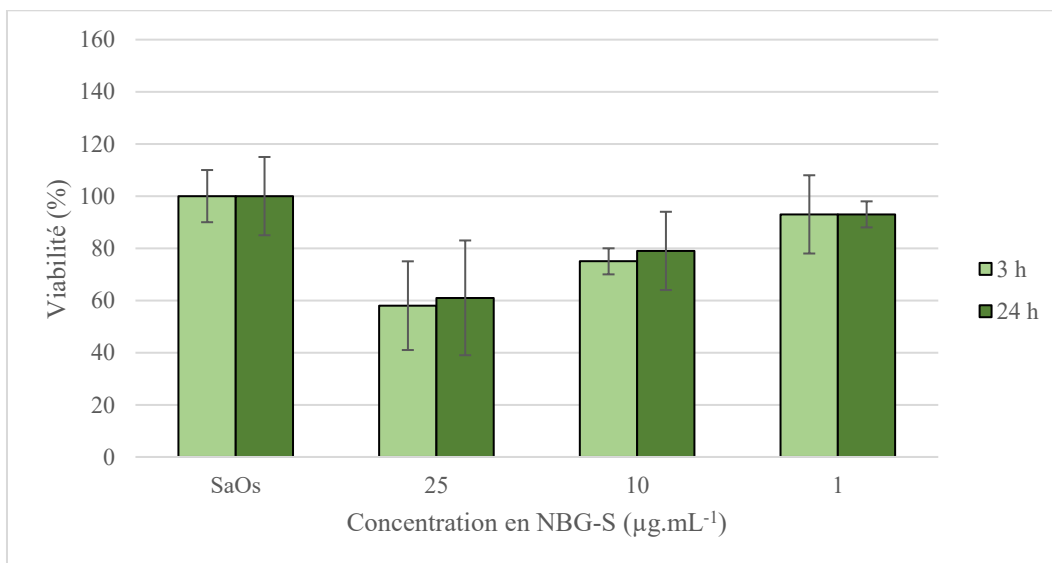


Figure 49 : Cytotoxicité de l'hybride NBG-S avec les cellules SaOs

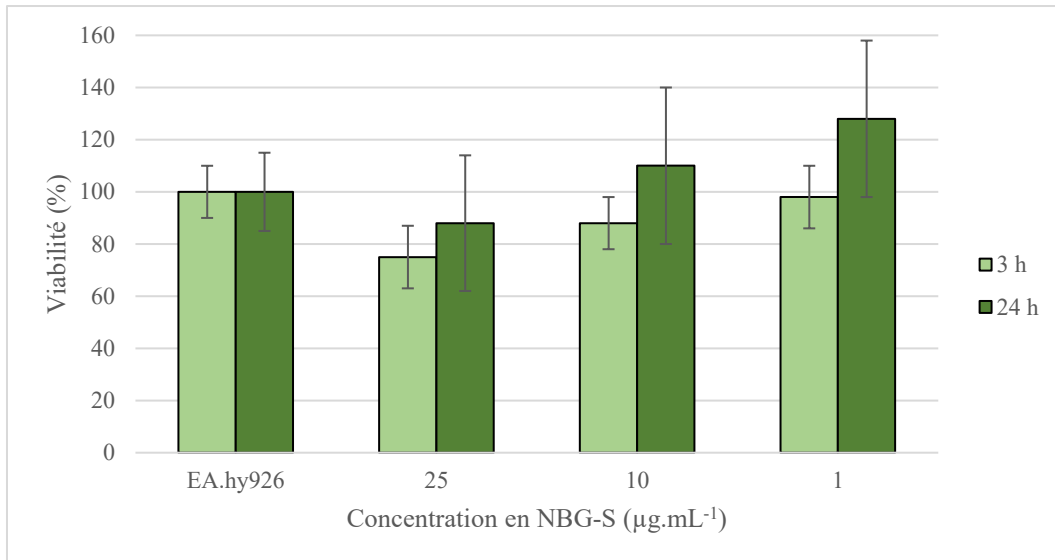


Figure 50 : Cytotoxicité de l'hybride NBG-S avec les cellules EA.hy926

V. Conclusion

La phycoyanine a été extraite avec succès de la spiruline. Le verre synthétisé, la spiruline entière et la phycoyanine ont été associés sans dénaturation de la matrice vitreuse du verre. L'étude comparative de l'effet de la phycoyanine et de la spiruline montre que leur association avec un nanoverre bioactif permet la formation d'hydroxyapatite à la surface du verre et son échange avec le milieu d'immersion.

Il a été démontré que le matériau hybride nanoverre/spiruline NBG-S présente un ralentissement de la cristallisation et un échange plus faible avec le SBF comparé au matériau hybride nanoverre/phycoyanine NBG-P et au verre pur NBG100 dans les tests *in vitro*. Enfin, le test de cytotoxicité présente des résultats positifs pour une utilisation possible dans des travaux ultérieurs en tant que biomatériaux pour des tests *in vivo*.

Références du chapitre 5 :

- [1] Wers, E.; Oudadesse, H.; Lefeuvre, B.; Lucas-Girot, A.; Rocherullé, J.; Lebullenger, R. Excess Entropy and Thermal Behavior of Cu- and Ti-Doped Bioactive Glasses. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2014**, *117* (2), 579–588. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3731-5>.
- [2] Rocton, N.; Oudadesse, H.; Lefeuvre, B. Comparison of Zn and Sr Effects on Thermal Properties and on the Excess Entropy of Doped Glasses for Use in the Biomedical Field. *Thermochimica Acta* **2018**, *668*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.08.008>.
- [3] Misra, S. K.; Mohn, D.; Brunner, T. J.; Stark, W. J.; Philip, S. E.; Roy, I.; Salih, V.; Knowles, J. C.; Boccaccini, A. R. Comparison of Nanoscale and Microscale Bioactive Glass on the Properties of P(3HB)/Bioglass® Composites. *Biomaterials* **2008**, *29* (12), 1750–1761. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.040>.
- [4] Kay, S.; Thapa, A.; Haberstroh, K. M.; Webster, T. J. Nanostructured Polymer/Nanophase Ceramic Composites Enhance Osteoblast and Chondrocyte Adhesion. *Tissue Engineering* **2002**, *8* (5), 753–761. <https://doi.org/10.1089/10763270260424114>.
- [5] Matsuda, T.; Davies, J. E. The in Vitro Response of Osteoblasts to Bioactive Glass. *Biomaterials* **1987**, *8* (4), 275–284. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(87\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(87)90115-3).
- [6] Labbaf, S.; Tsigkou, O.; Müller, K. H.; Stevens, M. M.; Porter, A. E.; Jones, J. R. Spherical Bioactive Glass Particles and Their Interaction with Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Biomaterials* **2011**, *32* (4), 1010–1018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.082>.
- [7] Paliwal, C.; Ghosh, T.; Bhayani, K.; Maurya, R.; Mishra, S. Antioxidant, Anti-Nephrolithe Activities and in Vitro Digestibility Studies of Three Different Cyanobacterial Pigment Extracts. *Marine Drugs* **2015**, *13* (8), 5384–5401. <https://doi.org/10.3390/md13085384>.

- [8] Hynstova, V.; Sterbova, D.; Klejdus, B.; Hedbavny, J.; Huska, D.; Adam, V. Separation, Identification and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls in Dietary Supplements Containing *Chlorella Vulgaris* and *Spirulina Platensis* Using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *148*, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.018>.
- [9] Bennett, A.; Bogorad, L. Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga. *The Journal of Cell Biology* **1973**, *58* (2), 419–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>.
- [10] Paliwal, C.; Ghosh, T.; Bhayani, K.; Maurya, R.; Mishra, S. Antioxidant, Anti-Nephrolithe Activities and in Vitro Digestibility Studies of Three Different Cyanobacterial Pigment Extracts. *Marine Drugs* **2015**, *13* (8), 5384–5401. <https://doi.org/10.3390/md13085384>.
- [11] Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A.; Barwell, C. Purification and Characterization of Phycocyanin from the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* Sp. IO9201. *Plant Science* **1998**, *136* (1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00113-7).
- [12] McCarty, M. F. Clinical Potential of *Spirulina* as a Source of Phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food* **2007**, *10* (4), 566–570. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>.
- [13] Chaiklahan, R.; Chirasuwan, N.; Bunnag, B. Stability of Phycocyanin Extracted from *Spirulina* Sp.: Influence of Temperature, PH and Preservatives. *Process Biochemistry* **2012**, *47* (4), 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>.
- [14] Chen, J.-C.; Liu, K. S.; Yang, T.-J.; Hwang, J.-H.; Chan, Y.-C.; Lee, I.-T. *Spirulina* and *C-Phycocyanin* Reduce Cytotoxicity and Inflammation-Related Genes Expression of Microglial Cells. *Nutritional Neuroscience* **2012**, *15* (6), 252–256. <https://doi.org/10.1179/1476830512Y.0000000020>.
- [15] Deniz, I.; Ozen, M. O.; Yesil-Celiktas, O. Supercritical Fluid Extraction of Phycocyanin and Investigation of Cytotoxicity on Human Lung Cancer Cells. *The Journal of Supercritical Fluids* **2016**, *108*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.015>.

[16] Jiang, L.; Wang, Y.; Yin, Q.; Liu, G.; Liu, H.; Huang, Y.; Li, B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *J. Cancer* **2017**, *8* (17), 3416–3429.
<https://doi.org/10.7150/jca.21058>.

Chapitre 6 : Interactions nanoverre
bioactif pur et matériau hybride
(nanoverre/spiruline) avec
l'environnement osseux :
Etudes physico-chimiques et
biologiques post *in vivo*

Chapitre 6 : Interactions nanoverre bioactif pur et matériau hybride (nanoverre/spiruline) avec l'environnement osseux : Etudes physico-chimiques et biologiques post *in vivo*

Les expérimentations *in vitro* ne sont qu'une approche préliminaire dans l'étude du comportement des biomatériaux. Une fois ces tests validés, une étude du comportement réel des biomatériaux doit être initiée dans le cadre d'une étude *in vivo* sur un modèle animal. Ces tests ont pour objectif de nous renseigner sur l'aptitude du biomatériau à induire une néoformation osseuse et les interactions avec la matière organique du lieu d'implantation.

L'objectif de cette étude a été d'analyser le comportement *in vivo* des biomatériaux élaborés. Ces analyses devraient permettre de mettre en évidence l'évolution physico-chimique et biologique du nanoverre bioactif associé à la spiruline vers une matrice osseuse

Cette étude *in vivo* a été rendue possible grâce à une collaboration internationale avec la faculté de médecine de l'université de Sfax en Tunisie et plus particulièrement avec le professeur Keskes et la docteur Mosbahi.

I. Modèle animal et implantations en site osseux

Le modèle choisit pour nos études est le lapin mâle de race néo-zélandaise, en croissance et dont le poids moyen est de 2 kg. L'implantation des biomatériaux a été réalisée dans le condyle fémoral des lapins. L'évaluation clinique a été réalisée en prenant en compte plusieurs paramètres liés à l'animal implanté : le suivi du poids, de la température corporelle et de la cicatrisation des plaies chirurgicales.

Les biomatériaux implantés sont des nanoparticules de verre bioactifs de 100 nm de diamètre (NBG100) et le matériau hybride composé de NBG100 additionné de 20 % en masse de spiruline (NBG-S).

Le procédé de mise en forme et le protocole d'implantation de ces biomatériaux sont décrits dans le chapitre 2. Les délais retenus pour les expérimentations *in vivo* sont : 15 jours, 1 mois, 3 mois et 6 mois.

Les implants à base de NBG100 pour les délais de 6 mois n'ont pu être analysés pour le moment.

II. Caractérisations physico-chimiques des bioimplants après implantation

A. Étude morphologique par microscopie électronique à balayage

L'évaluation par microscopie électronique à balayage (MEB) révèle des modifications de la morphologie au niveau de la zone d'implantation. Ces changements constituent la première étape dans l'étude de la réaction de l'implant avec l'os.

Les micrographies ont été prises au niveau de la zone de contact entre l'implant et la cavité réalisée dans l'os au cours de l'opération chirurgicale. Ces images des bioimplants NBG100 et NBG-S étant très similaires, il ne sera présenté au cours de cette section que les images obtenues sur les implants NBG-S.

La micrographie de la figure 51 présente l'implant après 15 jours d'insertion dans le tissu osseux de l'animal (marqué par un cercle rouge), on constate également un début de bioconsolidation entre l'implant et l'os (marqué par le cercle vert).

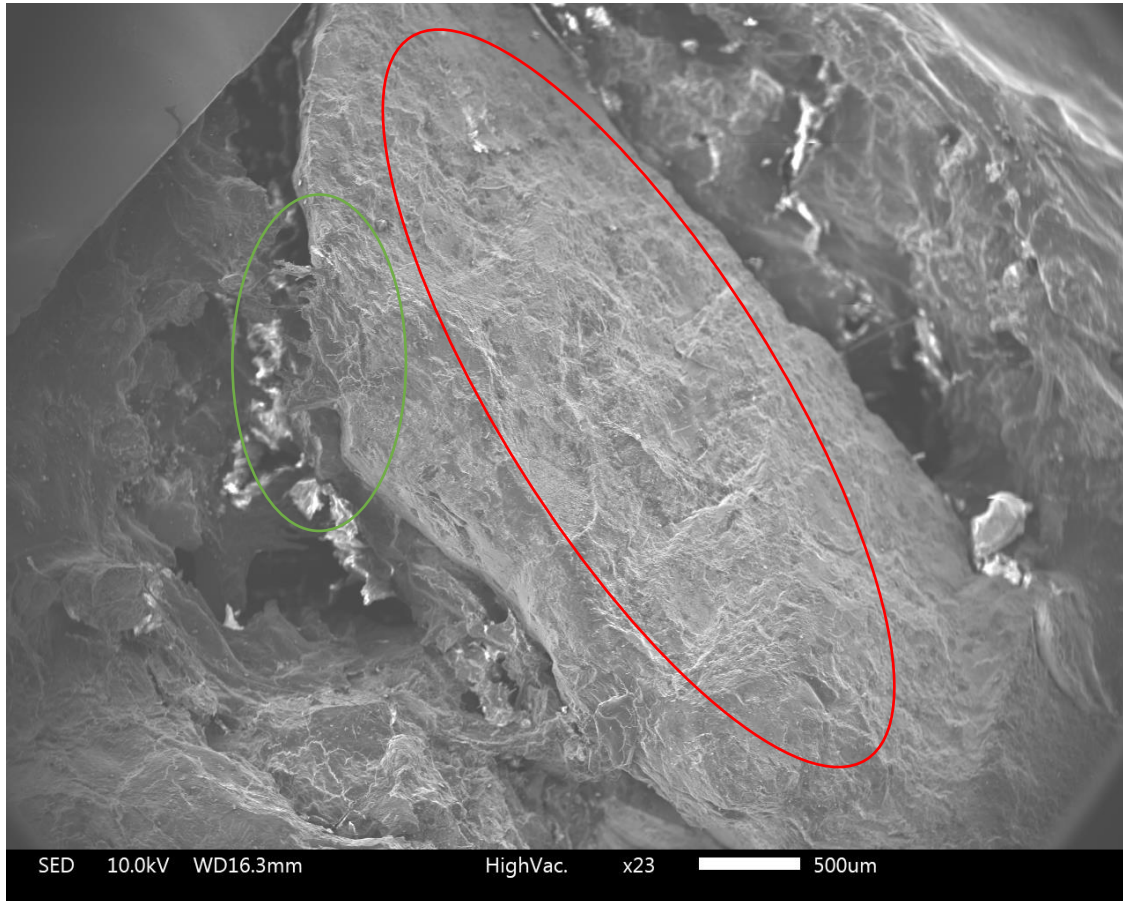


Figure 51 : Micrographie obtenue après 15 jours d'implantation des NBG-S

La figure 52 est une micrographie présentant la poursuite de la bio-consolidation entre l'implant et l'os après un délai d'implantation d'un mois. On constate également une modification de la nature de la surface du bioimplant impliquant la dégradation de celui-ci et son remplacement par des dépôts apatitiques liés au phénomène d'ostéointégration (marqué par le cercle rouge).

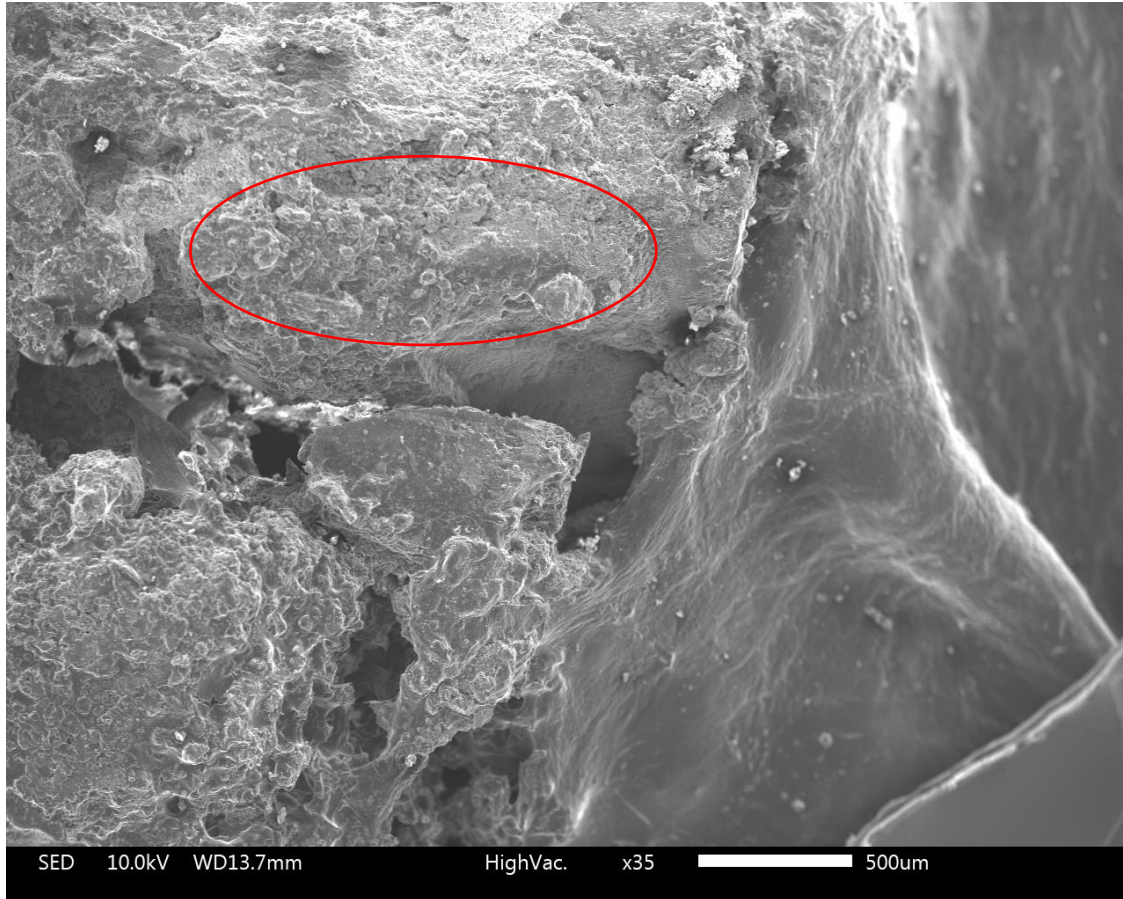


Figure 52 : Micrographie obtenue après 1 mois d'implantation des NBG-S

Après 3 mois d'implantation, la micrographie obtenue est présentée à la figure 53. Nous constatons que le bioimplant est déjà solidement lié par le phénomène de bio-consolidation à l'os et que la nature de la surface continue de se dégrader pour prendre la forme de dépôts d'apatites.

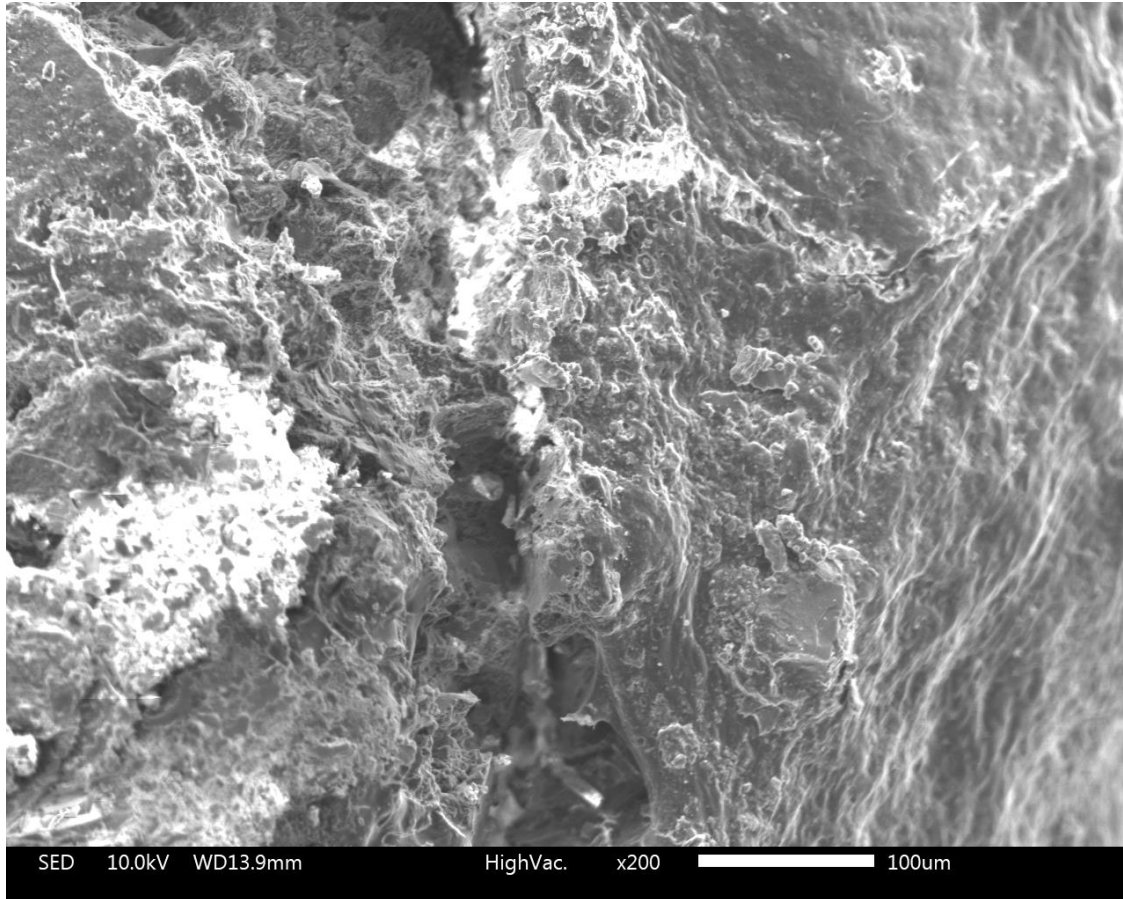


Figure 53 : Image MEB obtenue après 3 mois d'implantation des NBG-S

Après 6 mois d'implantation la micrographie obtenue est présentée à la figure 54. Le site d'implantation est très bien occupé par un nouveau tissu osseux. Ce résultat montre des processus d'ossification très importants liés à l'apparition d'un tissu osseux presque normal.

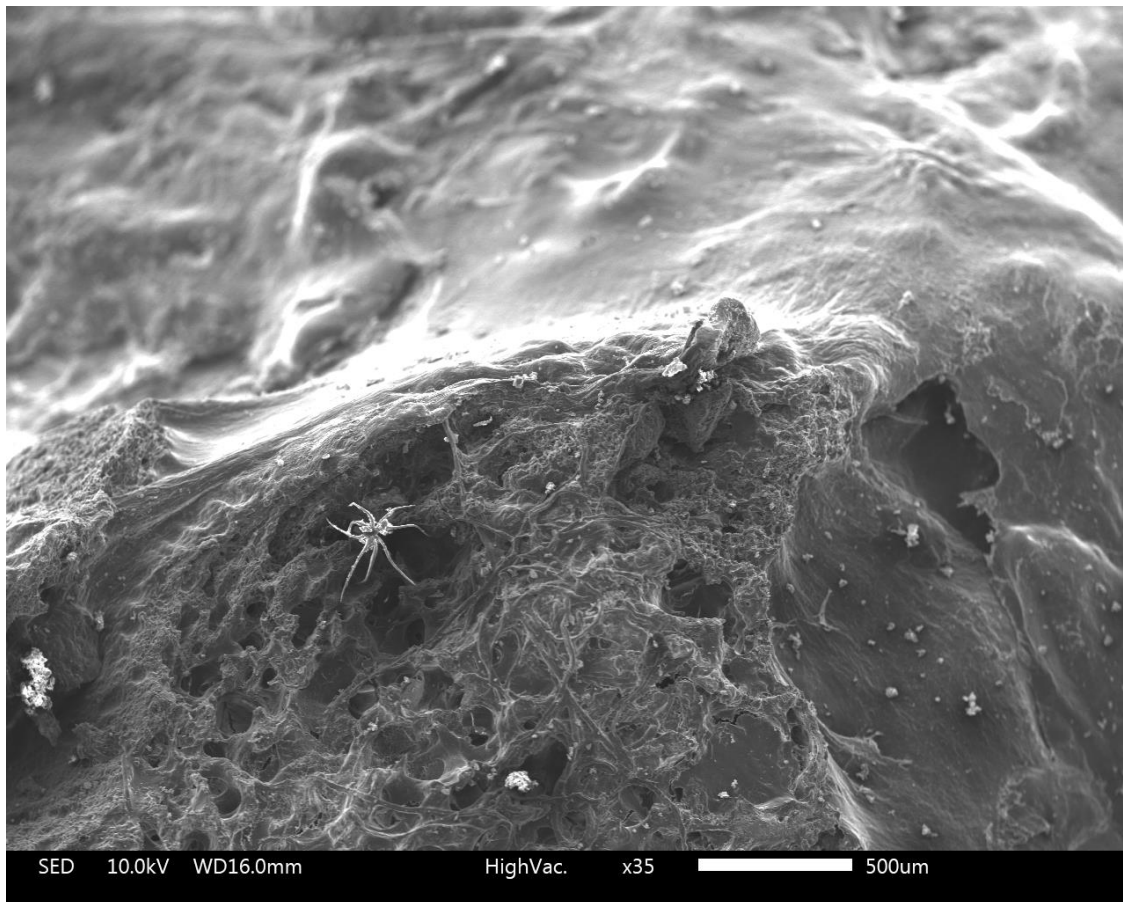


Figure 54 : Micrographie obtenue après 6 mois d'implantation

B. Analyse structurale par diffraction des rayons X des zones d'implantations

Pour réaliser ces caractérisations, les biomatériaux ont été retirés de l'os puis soigneusement polis de façon à retirer l'os lié sur les contours avant d'être broyés pour permettre une analyse.

1. Diffractions des rayons X pour les implants de NBG100

Les diffractogrammes DRX des poudres recueillies après extraction des biomatériaux des zones implantées sont visibles sur la figure 55 et montrent des changements structuraux progressifs. Le NBG100 avant implantation possède initialement une nature amorphe. Après 15 jours d'implantation nous constatons la présence de plusieurs raies encore peu intenses liées à la croissance d'une apatite biologique proche de l'hydroxyapatite. Progressivement au cours des délais de 1 mois et 3 mois nous pouvons constater la croissance de celle-ci correspondante aux plans de réflexions d'indice (002), (211) et (310). Après 3 mois d'implantation les diffractogrammes DRX obtenus sont déjà très similaires à ceux obtenus sur les condyles fémoraux des lapins témoins. Ce résultat implique une progression dans la dégradation et l'absorption de l'implant avec le temps d'implantation.

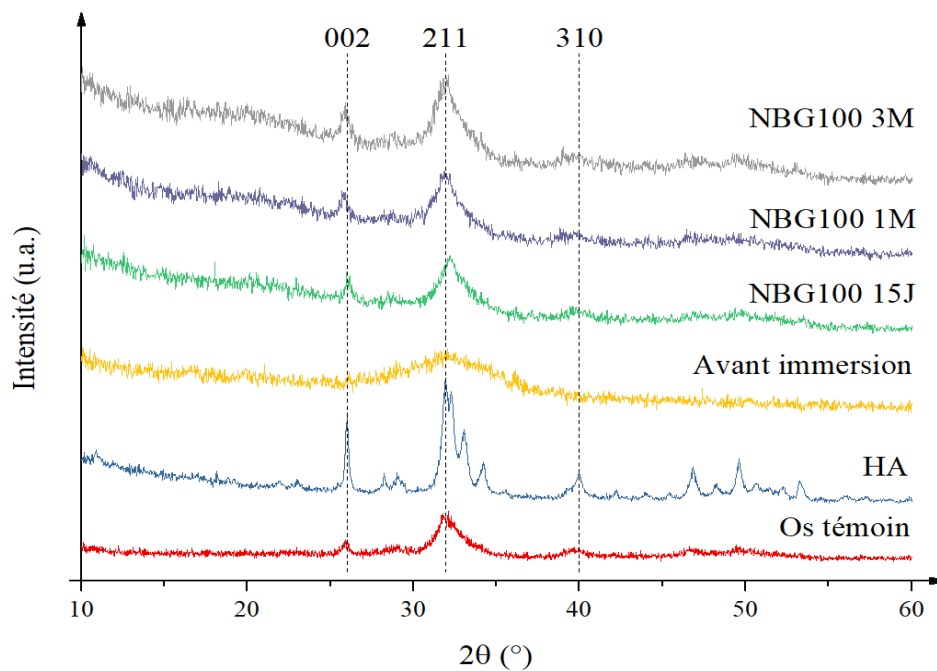


Figure 55 : Diffractogrammes des zones d'implantations des NBG100 à différents délais d'implantation

2. Diffraction des rayons X pour les implants de NBG-S

Les diffractogrammes DRX des poudres recueillies après extraction des biomatériaux des zones implantées sont visibles sur la figure 56 et montrent également des changements structuraux progressifs. Nous remarquons une évolution similaire à celle obtenue avec les NBG100 pour les trois premiers mois. Toutefois, nous constatons une cinétique de transformation vers une apatite naturelle plus lente, cet effet est visible par la moins bonne définition des pics indiquant cette cristallisation [1]. Les résultats obtenus pour les implants NBG-S après 6 mois montrent l'apparition d'un nouveau pic de diffraction à 47 ° (2 θ) lié au plan de diffraction (222) de l'hydroxyapatite ce qui nous permet de dire que l'implant est de plus en plus proche de la nature de l'os témoin après 6 mois d'implantation. Une autre différence remarquable est la présence d'un halo de diffraction dans une zone allant de 15 à 22 ° (2 θ) identifiée par une * sur la figure 56. Ce halo de diffraction peut être dû à une possible cristallisation des composants de la spiruline une fois mis en contact avec des éléments présents dans le milieu d'implantation.

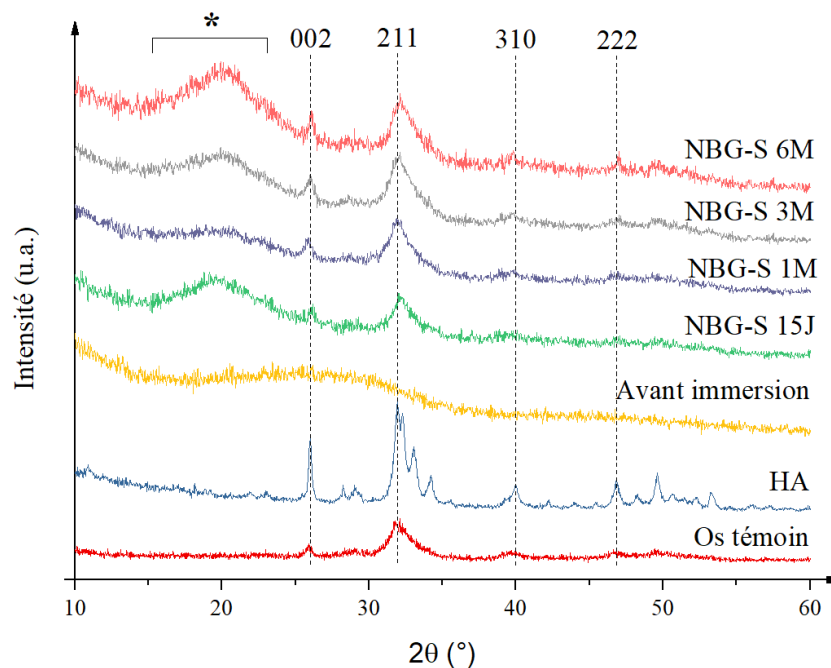


Figure 56 : Diffractogrammes des zones d'implantations des NBG-S à différents délais d'implantation

C. Détermination de l'évolution de la composition chimique des bioimplants en fonction du temps d'implantation

Les analyses suivantes ont été réalisées par dosage à l'aide de spectrométrie par torche à plasma ICP-OES. L'objectif de ces études est de comparer au cours du temps les compositions des éléments chimiques caractéristiques des os : Ca et P afin d'obtenir le rapport phosphocalcique Ca/P. L'étude se portera en premier sur les bioimplants à base de NBG100 avant de passer à l'analyse des bioimplants à base du matériaux hybride NBG100/spiruline (NBG-S)

Ces modifications de composition chimique nous ont permis de suivre les cinétiques de dissolution des bioimplants et de formation du nouveau tissu osseux.

1. Evolution de la composition chimique des bioimplants de NBG100

La figure 57 présente les résultats pour les rapports Ca/P obtenus après dissolution des bioimplants NBG100. Avant l'implantation, celui-ci est de $10,13 \pm 0,05$ et l'os témoin est à $1,72 \pm 0,03$.

Après 15 jours d'implantation, nous constatons que le rapport Ca/P du bioimplant est de $2,22 \pm 0,04$ ce qui implique une dissolution de la matrice du biomatériau et du relargage des éléments Ca et P dans le tissu osseux [2]. Cette diminution du rapport Ca/P peut être attribuée à la consommation de ces éléments qui se trouvaient dans le biomatériau. Ainsi le milieu biologique favorise la formation d'hydroxyapatite carbonatée à l'interface entre l'implant et l'os, comme observé lors des essais *in vitro*.

Après 1 mois d'implantation, nous avons observé un rapport Ca/P qui a diminué progressivement pour atteindre $2,16 \pm 0,04$. Cela peut être dû, soit à la formation d'un phosphate de calcium à la surface du bioimplant, soit à une consommation liée au début de la repousse osseuse ce qui force le rapport à revenir à des valeurs plus proches de celles de l'os témoin.

Après 3 mois d'implantation le rapport Ca/P est de $1,95 \pm 0,04$. Il a continué de se rapprocher de la valeur de l'os témoin. Ceci implique la poursuite de la croissance d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée de bonne qualité à la surface du bioimplant, à son ostéointégration et à la régénération des tissus osseux [3].

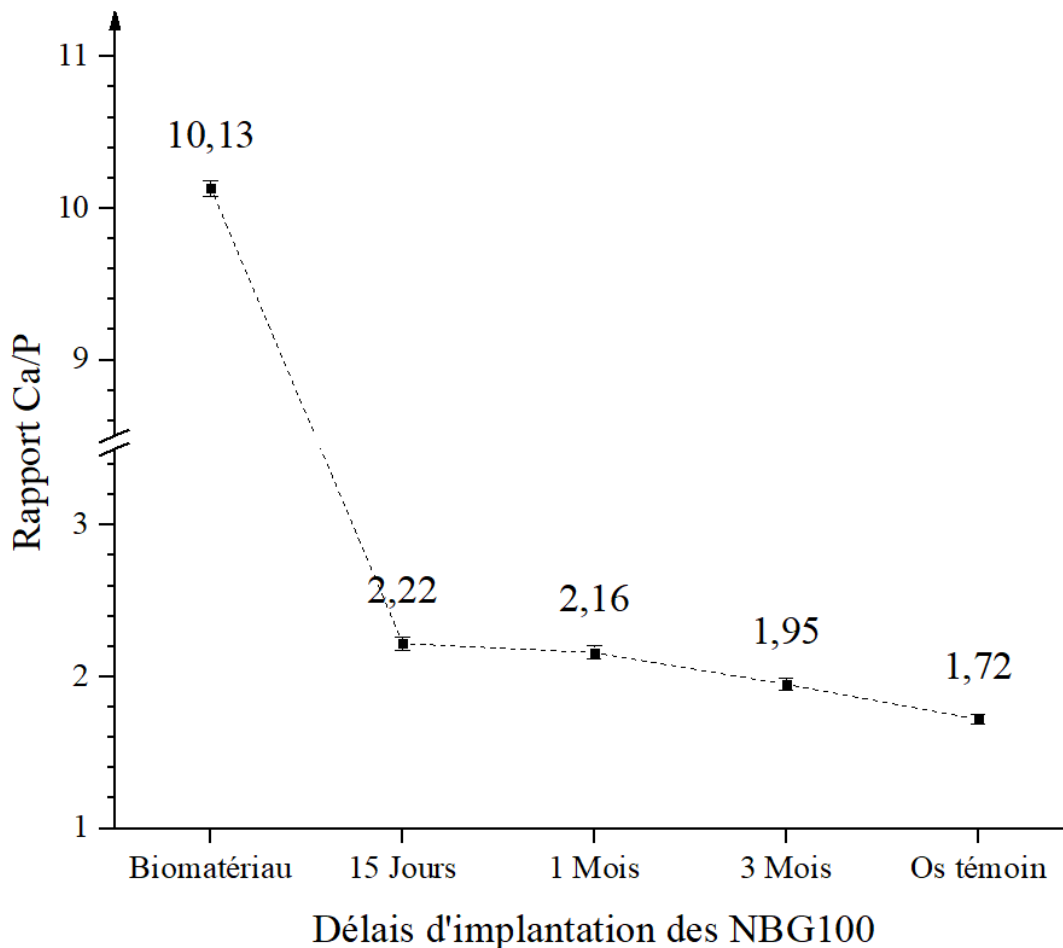


Figure 57 : Rapport Ca/P en fonction des délais d'implantation pour les bioimplants de NBG100

2. Evolution de la composition chimique des bioimplants de NBG-S

Les mêmes résultats que ceux constatés pour le cas des bioimplants NBG100 ont été observés pour nos mesures en ce qui concerne les rapports Ca/P pour les bioimplants NBG-S. Ceux-ci sont présentés sur la figure 58. Ce rapport est initialement de $8,29 \pm 0,05$ pour les bioimplants NBG-S avant implantation.

Après 15 jours d'implantation, nous constatons que le rapport Ca/P du biomatériau est de $3,21 \pm 0,04$ ce qui implique une dissolution de la matrice du biomatériau et du relargage des éléments Ca et P dans le tissu osseux mais celui-ci est plus lent que dans le cas des implants de NBG100.

Après 1 mois d'implantation, nous observons que le rapport Ca/P diminue progressivement pour atteindre $2,75 \pm 0,05$, de la même façon que pour les implants de NBG100, cela peut être dû, soit à la formation d'un phosphate de calcium à la surface de l'implant soit, à une consommation nécessaire au début de la repousse osseuse.

Après 3 mois d'implantation le rapport Ca/P est de $2,11 \pm 0,03$ et a continué à se rapprocher de la valeur de l'os témoin. Cela implique la poursuite de la croissance d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée de bonne qualité à la surface de l'implant, à son ostéointégration et à la régénération des tissus osseux de la même façon que pour les implants de NBG100.

Après 6 mois d'implantation, le rapport Ca/P est de $1,85 \pm 0,03$ et est proche de celui de l'os témoin. Ce rapprochement indique la présence d'os nouvellement formé ou la fin de l'ossification de l'implant [4].

Nous constatons cependant que les valeurs obtenues avec les implants NBG-S sont plus élevées que celles obtenues dans le cas des NBG100 pour tous les délais d'implantation.

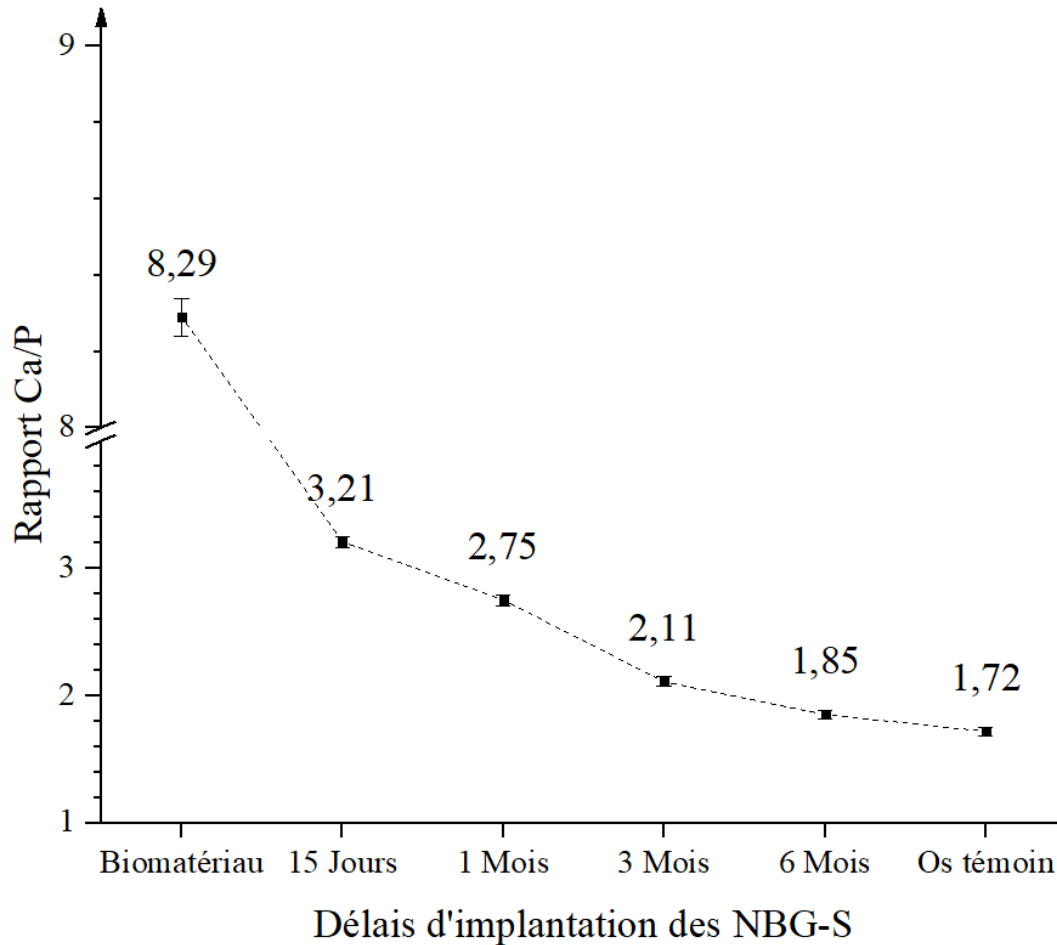


Figure 58 : Rapport Ca/P en fonction des délais d'implantation pour les bioimplants de NBG-S

III. Etude histologique de l'impact des implants sur l'environnement du tissu osseux

1. Préparation des échantillons pour les études histologiques

Après prélèvement, les échantillons osseux ont été préparés et mis en forme selon le protocole suivant [5] :

Cette préparation a pour objectif la préservation de l'état des cellules par une déshydratation et une infiltration de produits. Le nombre de bains, les produits utilisés et la température du bain sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Bains d'infiltrations des pièces osseuses

Bains	Produits	Durée (en heures)	Température (°C)
1	Acétone + xylène	1	20
2	Acétone + xylène	1	20
3	Acétone + xylène	1	20
4	Xylène	1	20
5	Méthyle-méthacrylate	1	20
6	Méthyle-méthacrylate	8	- 20

Une fois les cellules préservées, il a été nécessaire de les inclure dans des blocs de résine. Cette opération a consisté à transvaser le bain dans un récipient en plastique. La pièce a été déposée sur un petit fragment de mousse polyester, puis recouverte d'un mélange d'inclusion de façon à former un ménisque à l'affleurement avec le bord du récipient. Celui-ci a ensuite été scellé permettant de créer une atmosphère anaérobie nécessaire à la polymérisation. Une journée a été requise à celle-ci avant que les blocs puissent être démoulés et coupés.

Sur les pièces osseuses incluses dans la résine, des coupes sériées ont été réalisées à l'aide d'un microtome Polycut S Reichert Jung équipé d'un rasoir en carbure de tungstène.

Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été effectuées pour préparer les futurs échantillons séparés par des découpes de 30 µm d'épaisseur du bloc sur lequel aucune coupe n'a été récupérée. Cette opération a été répétée 4 fois en récupérant à chaque fois une coupe.

Une fois ces blocs obtenus, nous avons effectué la coloration nécessaire aux études histologiques. La coloration qui a été utilisée est appelée : Trichrome de Goldner modifié [6]. Elle permet la détection du tissu ostéoïde et du tissu minéralisé. La technique pour préparer ce trichrome est la suivante :

Les coupes ont été laissées à tremper pendant 1 heure au moins dans une solution d'acide picrique saturé, puis elles ont été rincées abondamment avec de l'eau distillée. Par la suite, elles ont été colorées par immersion dans de l'Hemalum de Meyer pendant 15 min, puis plongées dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N jusqu'à ce que l'os ait pris une teinte rose pâle.

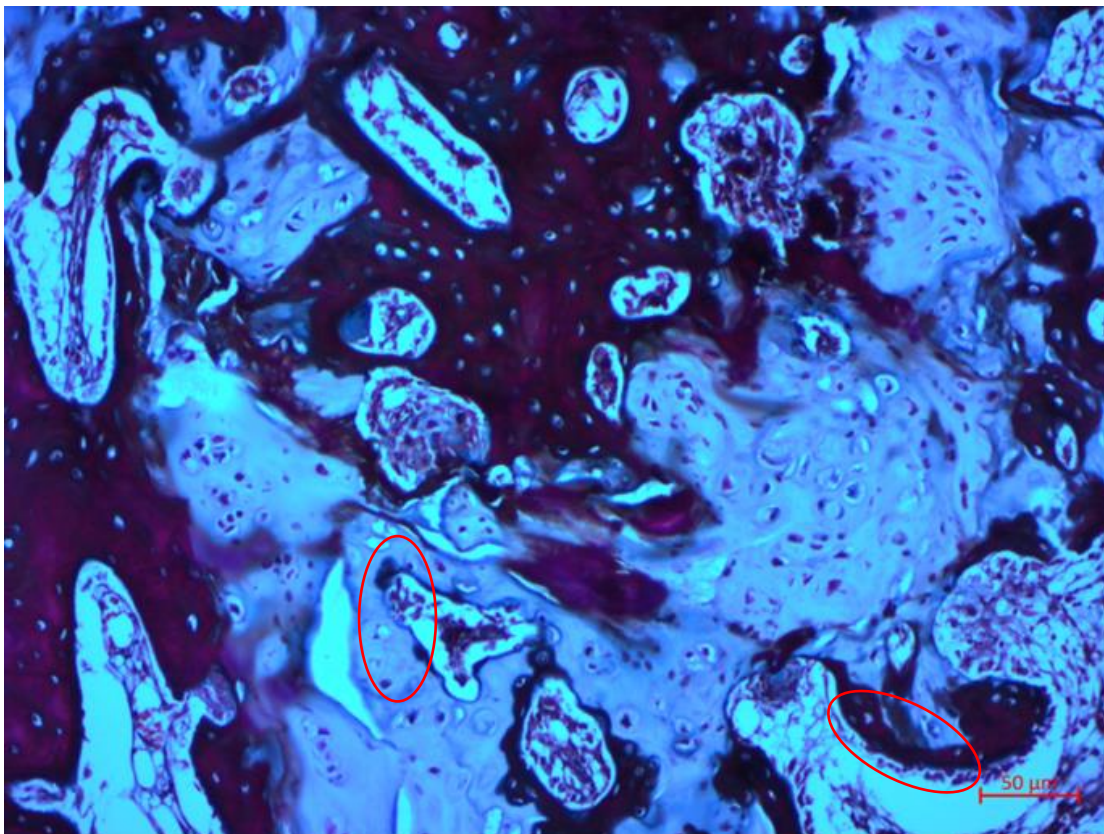
Une nouvelle fois rincées à l'eau, les coupes ont été immergées dans du carbonate de lithium jusqu'à ce que les noyaux des cellules des coupes prennent une teinte bleuâtre.

Elles ont été de nouveau rincées à l'eau distillée puis laissées immergées pendant 20 min dans une solution de Fushine Ponceau. Une fois nettoyées à l'eau acétifiée, elles ont été placées pendant 6 min dans l'acide phosphomolybdique-Orange G pour décolorer partiellement les tissus osseux. Ensuite elles ont été égouttées sans rinçage, puis immergées pendant 15 min dans une solution de fast green FCF à 0,1 %. Finalement, elles ont été rincées 2 à 3 fois dans l'eau acétifiée, et déshydratées par 3 bains de 2-propanol puis 2 bains de méthylcyclohexane.

Les implantations basées sur les NBG100 sur les délais de 15 jours et 6 mois ainsi que celles basées sur les NBG-S sur les délais de 15 jours et 1 mois ont dû être réeffectuées et n'ont pas été disponibles pour les résultats histologiques qui sont présentés dans ce travail. D'autres analyses sont également prévues pour compléter ces résultats.

2. Étude histologique des implants de NBG100

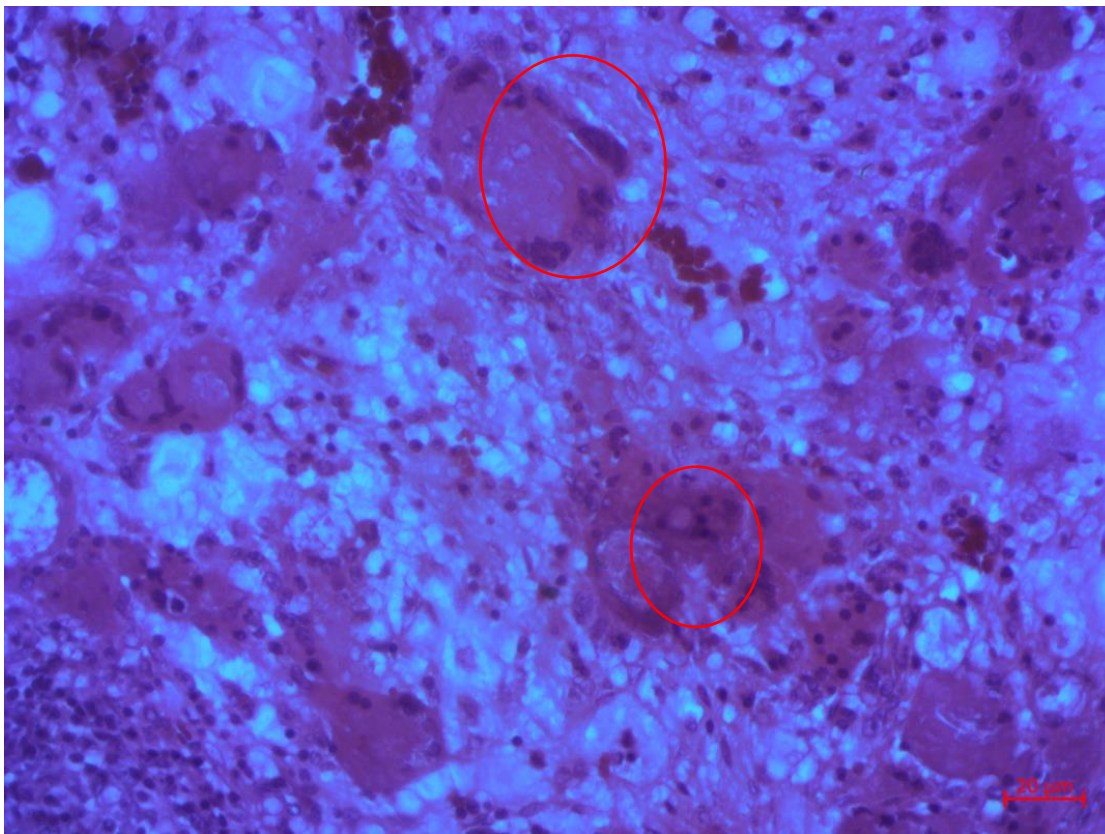
Après 1 mois d'implantation des NBG100, la présence d'une fibrose très importante a été constatée. La fibrose est le phénomène naturel utilisé pour compenser la perte osseuse et signifie le début d'une réaction de régénération. L'image présentée sur la figure 59 est une photographie du site de substitution obtenue après le délai d'1 mois. Celle-ci présente peu de reliquats du biomatériau (mis en évidence dans les cercles rouges). Ce résultat implique que celui-ci a bien été colonisé par des cellules ostéoblastiques ce qui signifie que le matériau est progressivement remplacé par un nouveau tissu osseux.



**Figure 59 : Photographie de la zone d'implantation après préparation pour les études histologiques :
Après 1 mois d'implantation des NBG100**

Après 3 mois d'implantation des NBG100, une fibrose plus conséquente que celle qui a été notée après 1 mois d'implantation a été observée. Elle indique un avancement des processus de régénération. L'image présentée sur la figure 60 est une photographie du site de substitution obtenue après le délai de 3 mois. Cette fibrose s'est manifestée en l'absence de cellules inflammatoires ou de granulomes à corps étranger qui constituent une réaction physiologique en cas d'agression extérieure. Cela implique que l'implant a bien été accepté par le site hôte et que celui-ci ne présente pas de signe de rejet.

La présence de cellules ostéoblastiques en amas (mis en évidence dans les cercles rouges) a également été notée ce qui signifie que les processus d'ossification et de bio-consolidation sont très avancés.



**Figure 60 : Photographie de la zone d'implantation après préparation pour les études histologiques :
Après 3 mois d'implantation des NBG100**

3. Étude histologique des implants de NBG-S

L'image présentée sur la figure 61 est une photographie du site de substitution des NBG-S dans le défaut créé dans le condyle fémoral. Il s'agit de la photographie obtenue après un délai de 3 mois. Elle montre une ossification endochondrale avec présence des vestiges du matériau dans le site d'implantation. Une ossification endochondrale signifie que le phénomène de formation osseuse se propage de la périphérie vers le centre du défaut. L'absence de cellules inflammatoires et de granulomes à corps étranger montre que l'implant est bien accepté par le site hôte et qu'il n'y a pas de réaction de rejet.

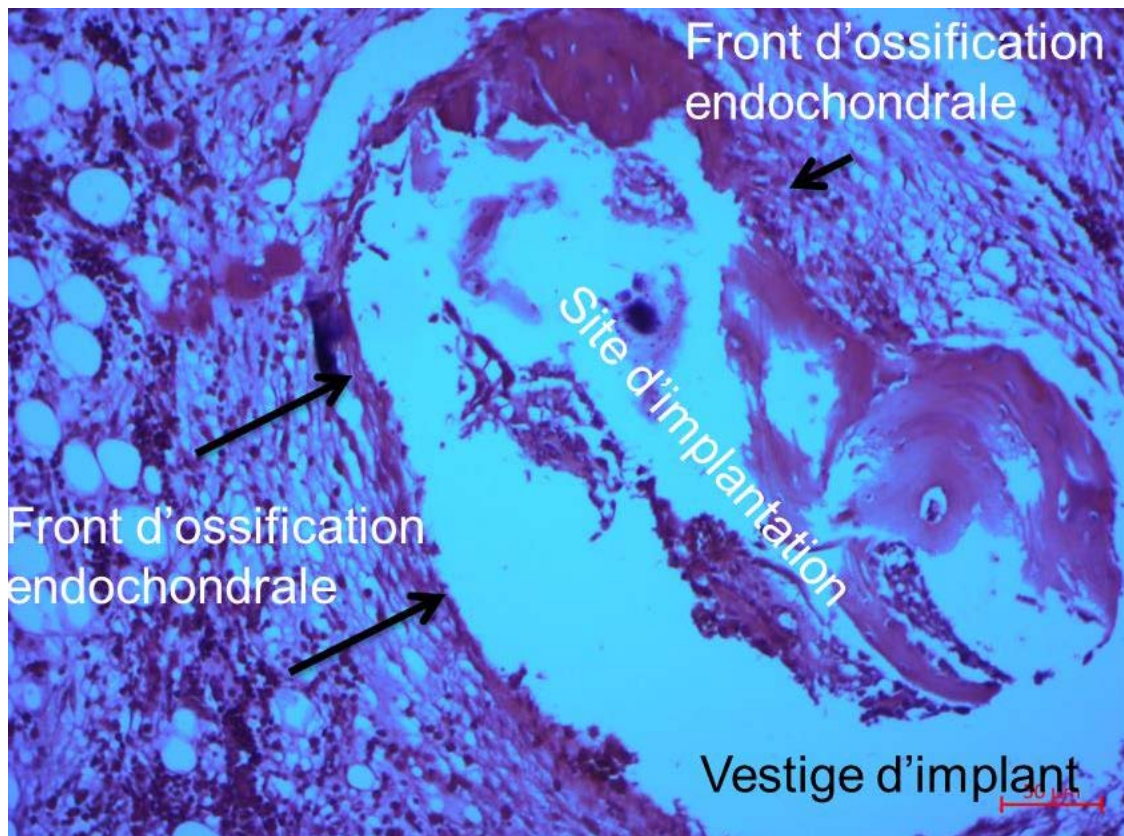
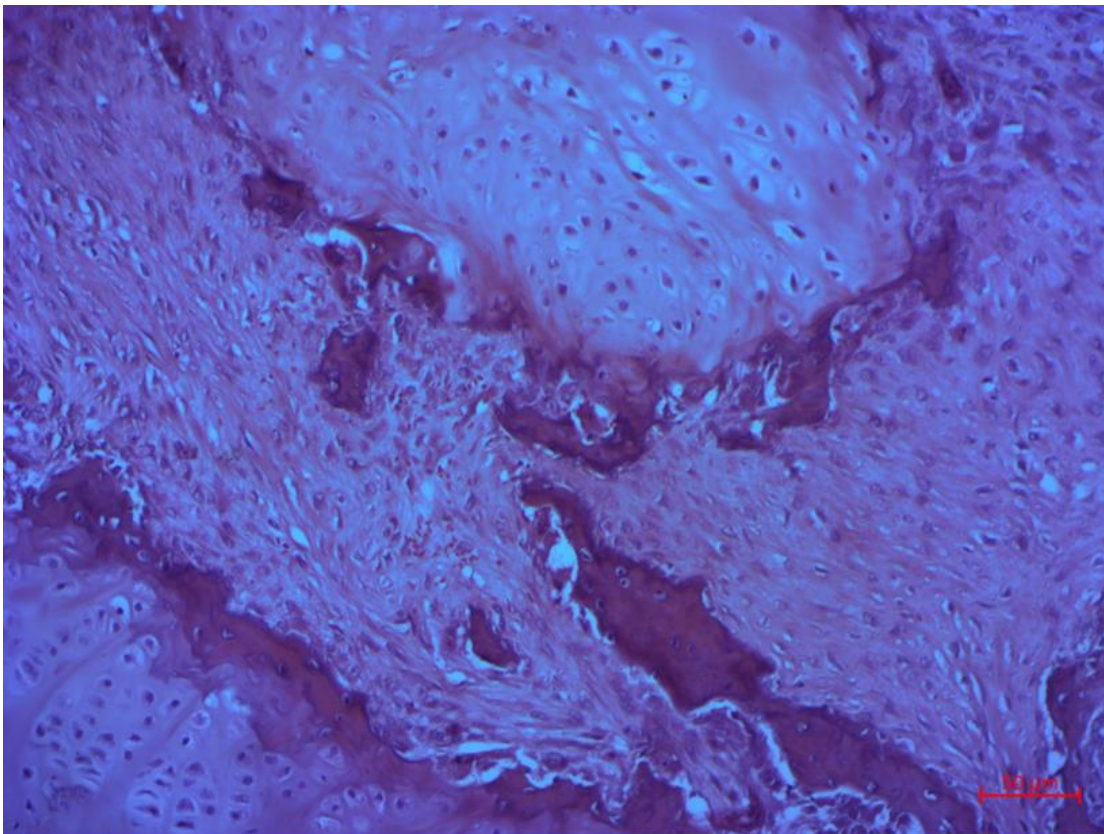


Figure 61 : Photographie de la zone d'implantation après préparation pour les études histologiques :
Après 3 mois d'implantation des NBG-S

L'image présentée sur la figure 62 est une photographie obtenue du site de substitution des NBG-S après 6 mois d'implantation. Le site d'implantation a été très bien occupé par un nouveau tissu osseux riche en cellules ostéoblastiques. Cette occupation a prouvé que le processus d'ossification a été très intense et que l'implant permet l'obtention d'un tissu osseux de bonne qualité.



**Figure 62 : Photographie de la zone d'implantation après préparation pour les études histologiques :
Après 6 mois d'implantation des NBG-S**

4. Interprétations des résultats histologiques

Les tests histologiques ont permis de mettre en lumière des caractéristiques importantes de la réaction entre le milieu d'implantation et les biomatériaux étudiés.

- Aucun des biomatériaux n'a montré de signe de nécrose osseuse ou de rejet de l'implant.
- Pour des délais identiques, les biomatériaux ont montré une fibrose plus importante que dans le cas des témoins n'ayant pas reçu d'implant. Cet état de fait implique que les biomatériaux ont déclenchés une activité ostéoblastique plus importante.
- La cinétique de consolidation a été plus rapide en présence des biomatériaux qu'avec la perte de substance laissée vide.

IV. Discussion

Pour étudier le comportement de ces implants des analyses ont été réalisées pour suivre l'évolution des propriétés physico-chimiques et les réactions biologiques liées à l'implantation. L'étude par microscopie électronique à balayage montre que les deux types d'implant ont une évolution progressive de l'ostéointégration au cours des délais de cette étude. Les analyses par diffraction des rayons X présentent une transformation de la structure initialement amorphe des implants vers une structure proche de celle des os témoins. En complément, la quantification du rapport Ca/P effectuée sur les bioimplant pour différents délais a été comparée avec son rapport initial et celui de l'os témoin. L'évolution de celui-ci nous indique que peu de temps après la mise en place de l'implant, il a directement fait l'objet du processus de biodégradation et d'ostéointégration.

Les différentes micrographies obtenues ainsi que les études histologiques montrent des phénomènes de fibroses, d'agglomérations et de différenciations cellulaires nous renseignant sur l'effet ostéoinducteur de nos bioimplants.

Des analyses histologiques ont été effectuées de façon complémentaire aux analyses physico-chimiques réalisées. Celles-ci indiquent que nos biomatériaux n'ont pas montré de signes de nécrose osseuse, ni de toxicité ou d'inflammation importante ce qui souligne la biocompatibilité de nos implants et de la spiruline choisie comme substance médicamenteuse.

Le second objectif de cette étude a été une comparaison permettant de mettre en lumière les effets de la spiruline sur les phénomènes ostéoinducteurs et d'ostéointégration ainsi que d'acceptation de l'implant par l'hôte.

En effet, la cyanobactérie *Spirulina Platensis* ou spiruline (algue bleue-verte) révèle par l'analyse de ses constituants (protéines, lipides insaturés, vitamines antioxydantes et minéraux) un potentiel dans le domaine de la restauration osseuse [7]. De plus, elle contient de grandes quantités d'éléments utiles au développement et au bon fonctionnement de l'organisme [8]. La spiruline comporte également de nombreuses protéines et molécules qui représentent un intérêt médical pour le moment sous-exploité [9]. C'est pour ces raisons qu'elle a été utilisée dans le cadre d'une comparaison entre les implants de NBG100 et les implants de NBG-S.

La base de cette comparaison est de suivre les potentiels effets de la spiruline : ses propriétés anti-inflammatoires [10], antibactériennes [11], et ses rôles de stimulation de la multiplication cellulaire [12] et de la différenciation des cellules souches [13].

Les diffractogrammes DRX présentent des résultats similaires mais l'intensité et la définition des pics de cristallisation des implants dans le cas des implants de NBG-S sont plus faibles que ceux des implants de NBG100. Il est possible que les implants de NBG-S présentent une cinétique de cristallisation plus lente que celle des implants de NBG100. Ce premier constat est renforcé par les mesures des rapports Ca/P, où on observe que malgré le rapport Ca/P initialement plus grand des implants de NBG100 pour les délais allant jusqu'à 3 mois, ces derniers retournent plus rapidement à des valeurs proches de celles du rapport de l'os témoin.

Nous émettons deux hypothèses à ce niveau : que la cinétique de réactivité plus lente des implants de NBG-S provient du processus d'association entre la spiruline et les particules de NBG100. Celui-ci implique le recouvrement des particules de NBG100 par la spiruline comme décrit dans le chapitre 2. Il est donc possible que ce recouvrement gêne les échanges ioniques essentiels pour l'intégration entre l'implant et le milieu d'implantation.

L'autre hypothèse est qu'il est également possible que ce soit un effet de la spiruline qui ralentit le processus d'intégration et de bio-consolidation. L'obtention des résultats pour 6 mois d'implantation des implants de NBG100 devrait amener d'avantage d'informations une fois disponibles.

Dans le cadre de la comparaison histologique entre les effets des NBG100 et des NBG-S, le seul délai correspondant disponible est celui des 3 mois. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence deux caractéristiques : Les implants de NBG100 laissent moins de débris que ceux de NBG-S ce qui pourrait indiquer une intégration ou une dégradation plus rapide des implants de NBG100 par rapport aux implants NBG-S. Le second résultat est que les implants de NBG100 induisent une fibrose plus importante que les implants de NBG-S. La fibrose est un processus lié au début de la régénération de la perte osseuse. Une augmentation de sa présence au cours des 3 premiers mois implique un avancement des processus de remodelage osseux pour la formation d'un nouveau tissu osseux. Ce résultat conduit à une cinétique de restauration plus rapide dans le cas des implants de NBG100.

Une étude statistique est envisagée pour ces expériences et utiliser des processus de caractérisation complémentaires permettra d'assurer cette première hypothèse.

Néanmoins ces premiers résultats dans le cas des deux types d'implants, sont prometteurs, car ceux-ci ont démontré leurs capacités d'ostéoinduction et de biocompatibilité.

Références du chapitre 6 :

- [1] Yu, S.; Hariram, K. P.; Kumar, R.; Cheang, P.; Aik, K. K. In Vitro Apatite Formation and Its Growth Kinetics on Hydroxyapatite/Polyetheretherketone Biocomposites. *Biomaterials* **2005**, *26* (15), 2343–2352. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.028>.
- [2] Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. Bone Regeneration: Current Concepts and Future Directions. *BMC Med* **2011**, *9* (1), 66–70. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.
- [3] Ebrahimi, M. Biomimetic Principle for Development of Nanocomposite Biomaterials in Tissue Engineering. In *Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics*; Elsevier, **2019**; 287–306. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813740-6.00015-6>.
- [4] Hall, B. K. Bone. In *Bones and Cartilage*; Elsevier, **2015**; 17–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416678-3.00002-1>.
- [5] Chappard, D.; Chennebault, A.; Moreau, M.; Legrand, E.; Audran, M.; Basle, M. F. Texture Analysis of X-Ray Radiographs Is a More Reliable Descriptor of Bone Loss than Mineral Content in a Rat Model of Localized Disuse Induced by the Clostridium Botulinum Toxin. *Bone* **2001**, *28* (1), 72–79. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(00\)00438-5](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(00)00438-5).
- [6] Rentsch, C.; Schneiders, W.; Manthey, S.; Rentsch, B.; Rammelt, S. Comprehensive Histological Evaluation of Bone Implants. *Biomatter* **2014**, *4* (1), e27993. <https://doi.org/10.4161/biom.27993>.
- [7] McCarty, M. F. Clinical Potential of *Spirulina* as a Source of Phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food* **2007**, *10* (4), 566–570. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.621>.
- [8] Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Kumar, N. A.; Sridhar, S.; Rengasamy, R. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* **2008**, *34* (2), 77–88. <https://doi.org/10.1080/10408410802086783>.

[9] Babadzhanov, A. S.; Abdusamatova, N.; Yusupova, F. M.; Faizullaeva, N.; Mezhlumyan, L. G.; Malikova, M. Kh. Chemical Composition of Spirulina Platensis Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* **2004**, *40* (3), 276–279.

<https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000039141.98247.e8>.

[10] Deng, R.; Chow, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina: Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. *Cardiovascular Therapeutics* **2010**, *28* (4), e33–e45.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x>.

[11] Kaushik, P.; Chauhan, A. In Vitro Antibacterial Activity of Laboratory Grown Culture of Spirulina Platensis. *Indian J Microbiol* **2008**, *48* (3), 348–352.

<https://doi.org/10.1007/s12088-008-0043-0>.

[12] Trabelsi, L.; Ben Ouada, H.; Bassa, H. Activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie filamenteuse *Arthrospira platensis*. *Phytothérapie* **2010**, *8* (5), 282–289.

<https://doi.org/10.1007/s10298-010-0577-2>.

[13] Girardin-Andréani, C. Spiruline: système sanguin, système immunitaire et cancer*. *Phytotherapy* **2005**, *3* (4), 158–161. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0095-9>.

Chapitre 7 : Revêtement par le
nanoverre bioactif pur de disques
d'alliage Ti6Al4V à usage biomédical

Chapitre 7 : Revêtement par le nanoverre bioactif pur de disques d'alliage Ti6Al4V à usage biomédical

Une application du nanoverre bioactif pour des tailles inférieures à 100 nm a été explorée dans notre travail. Il s'agit du développement d'une méthode de revêtement de prothèses métalliques en utilisant les biomatériaux précédemment caractérisés. De nombreuses solutions existent pour appliquer un revêtement sur une surface métallique. C'est la méthode d'électrophorèse dans l'éthanol qui a été retenue pour cette étude. Celle-ci permet d'obtenir une fixation suffisante des particules tout en permettant de conserver l'organisation structurale de la matière déposée en opposition à la technique de revêtement par torche à plasma utilisée actuellement.

I. Introduction à l'électrophorèse

A. Introduction générale

La technique de l'électrophorèse repose sur la migration de particules chargées au contact d'un liquide entre deux électrodes soumises à une différence de potentiel. La suspension de particules chargées est attirée et migre vers l'électrode de signe opposé à sa charge pour s'y déposer. La réalisation d'un dépôt par électrophorèse nécessite un générateur de tension et une cellule de travail dans laquelle sont placées la suspension contenant les nanoparticules et les électrodes. Le dépôt par électrophorèse permet la réalisation de dépôts de matériaux variés (polymères, céramiques, verres, ...). Une représentation de cette méthode est schématisée sur la figure 63.

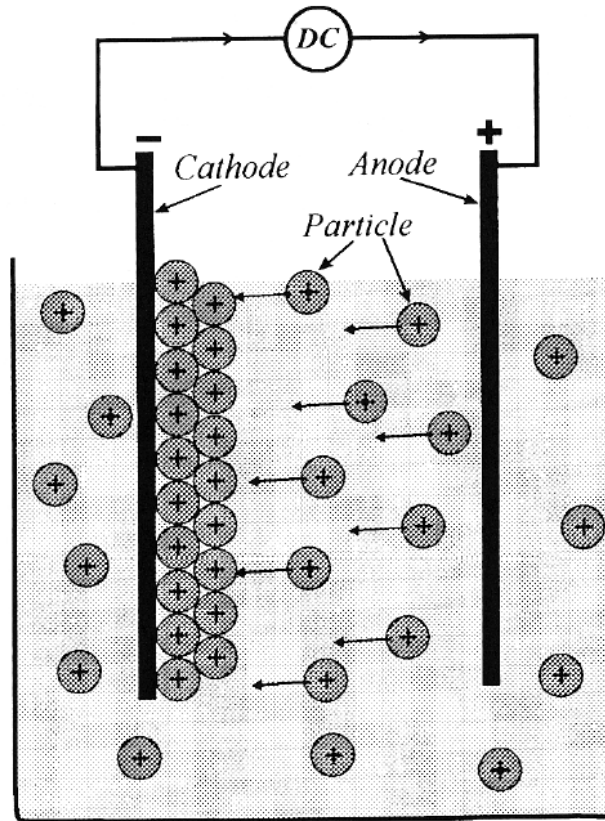
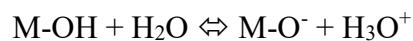
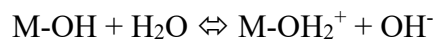


Figure 63: Schéma du principe de fonctionnement de l'électrophorèse [1]

L'électrophorèse présente l'avantage de pouvoir être utilisée dans des milieux aqueux ou organiques.

B. Mécanisme de formation de la charge

La dispersion de particules solides dans un liquide entraîne l'apparition d'interfaces solide/liquide. Les atomes présents à la surface d'une particule solide sont entourés de moins d'atomes que ceux qui sont situés en son cœur de sorte que leurs sphères de coordination sont incomplètes. Ces atomes de surface possèdent donc une réactivité spécifique. C'est cette réactivité qui entraîne un échange de protons avec le milieu de dispersion et qui conduit à la formation de groupement chargé. Par exemple dans l'eau :



Ces groupements chargés sont liés à la surface des particules et entraînent la formation de cortèges de charges.

Diverses théories expliquant le phénomène de formation de la charge de surface dans le milieu de suspension existent :

- Helmholtz : La totalité de la surface d'une particule chargée positivement est recouverte par les anions assurant ainsi une électroneutralité du système.
- Gouy-Chapman : La couche d'anions est inégalement répartie autour de la particule chargée positivement et la neutralité du système s'obtient à plus grande distance.
- Stern : Une théorie combinant les deux précédentes et arrivant à la conclusion que la neutralité d'une particule chargée positivement est obtenue par la présence d'une double couche autour de celle-ci : c'est le modèle de la double couche électronique.

C'est ce modèle de Stern qui est développé dans la suite de ce travail et qui permet la représentation d'une particule et de sa double couche électronique comme sur la figure 64.

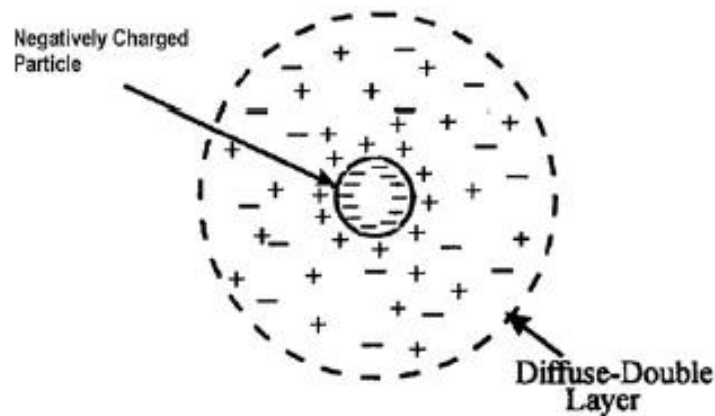


Figure 64 : Schéma de la particule chargée et de sa double couche électronique [2]

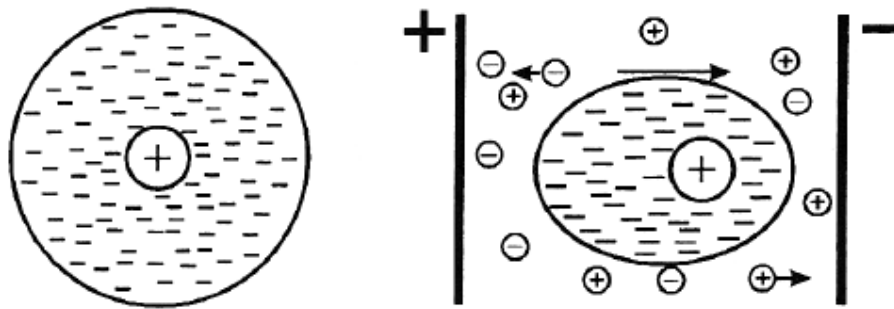
C. Formation et cinétique de déposition

1. Formation du dépôt

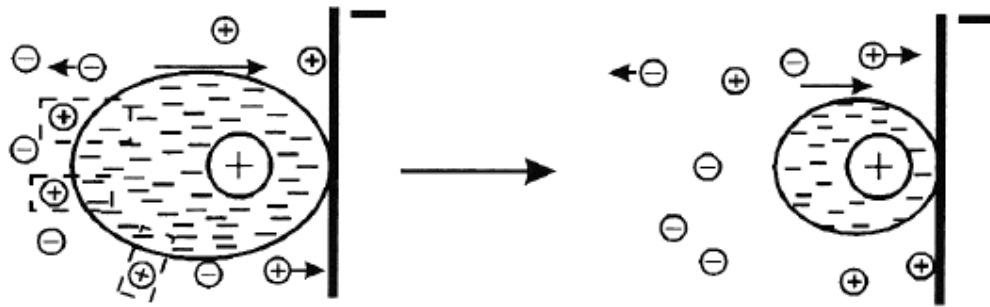
La compréhension du phénomène de formation et de cohésion du dépôt est toujours peu claire avec la technique électrophorétique. De nombreuses explications ont été avancées mais la grande quantité de matériaux déposables rend difficile les conclusions sur un phénomène physico-chimique unique couvrant toutes les possibilités d'interactions [3,4,5,6]. Une théorie possible est celle développée par Sarkar et Nicholson [1] et est présentée sur le schéma de la figure 65 [7] :

1. L'application du champ électrique déforme la double couche et crée un déplacement des espèces chargées dans la suspension.
2. Les contre-ions (X^-) de la double couche se déplacent avec la particule, augmentant ainsi leur concentration dans le dépôt par rapport à la suspension.
3. Une recombinaison avec les co-ions (Y^+) pour former un sel ($X-Y$) est alors possible dans le dépôt.
4. L'épaisseur de la double couche diminue à la suite de cette réduction locale de la concentration en ions.
5. Du fait de la faible épaisseur de la double couche de la particule fixée au substrat et de la déformation de la double couche de la particule en mouvement attirée vers l'électrode, la répulsion électrostatique entre ces particules chargées est réduite.
6. À la suite de cette diminution de l'énergie potentielle de répulsion, une coagulation entre les particules est possible.

Distorsion de la double couche



Amincissement de la double couche



Phénomène de coagulation

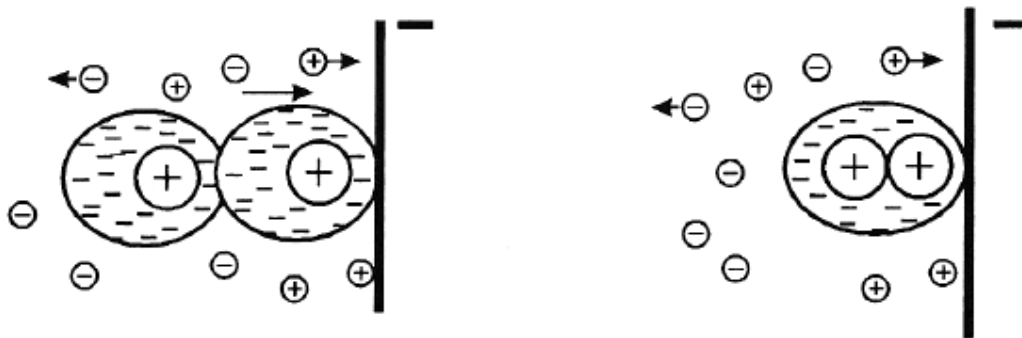


Figure 65 : Schéma de la théorie de Sarkar et Nicholson [1]

2. Cinétique de déposition

L'étude de la cinétique de dépôt par électrophorèse est un domaine de recherche physique qui nécessite la prise en considération d'un grand nombre de paramètres telles que l'intensité du champ électrique, la concentration en particules dans la suspension, la mobilité de celles-ci ou encore la diminution de la concentration due à la sédimentation. Toutes ces caractéristiques ont donné lieu à la création d'équations définissant la masse déposée en fonction du temps de déposition [1]. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à des fonctions plus simples et regroupées dans la figure 66. Les différentes courbes représentent des conditions de déposition différentes :

- I : courant et concentration en particules constants.
- II : courant constant mais concentration en particules variable.
- III : tension et concentration en particules constantes.
- IV : tension constante mais concentration en particules variable.

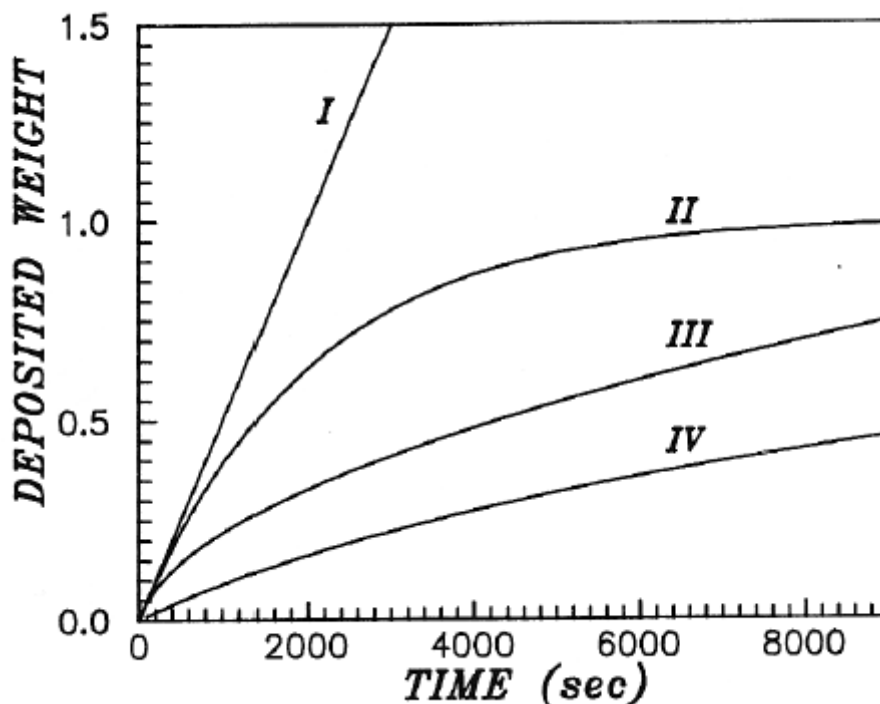


Figure 66 : Graphique du poids déposé en fonction du temps pour 4 conditions différentes de déposition [1]

II. Matériel et conditions expérimentales

A. Choix de l'alliage et préparation des disques en Ti6Al4V

1. Choix de l'alliage

L'alliage Ti6Al4V a été retenu comme alliage de support à la déposition du biomatériau que nous avons élaboré, car c'est majoritairement celui utilisé dans le domaine des prothèses métalliques du fait de ses caractéristiques adaptées [8].

Le Ti6Al4V est l'alliage phare de l'industrie du titane, également connu sous le nom Grade 5, TA6V ou Ti 6-4. Cet alliage de titane de type " α - β " est le plus couramment utilisé et représente 50 % de l'utilisation mondiale en titane [9]. Les stabilisateurs de phases sont l'aluminium et le vanadium. L'aluminium réduit la densité, stabilise et renforce la phase α tandis que le vanadium fournit une plus grande quantité de phase β , rendant l'alliage plus ductile [10]. Sa composition est décrite dans le tableau 18.

Tableau 18 : Composition de l'alliage Ti6Al4V

Eléments	Composition en % molaire
Aluminium	5,5 à 6,75
Vanadium	3,5 à 4,5
Carbone	Maximum 0,10
Fer	Maximum 0,30
Oxygène	Maximum 0,02
Azote	Maximum 0,05
Titane	Base

Son rapport dureté/ductilité exceptionnellement élevé et sa bonne résistance en fatigue sont des avantages à son adoption dans le cas de son utilisation en tant que substitut osseux. En outre, le Ti6Al4V présente aussi une excellente résistance à la corrosion dans les solutions aqueuses, acides oxydants, les chlorures, et les milieux alcalins [11]

2. Préparation des disques d'alliages Ti6Al4V

Les disques d'alliage Ti6Al4V utilisés pour ces expérimentations sont obtenus sous la forme de cylindre de 1 cm de diamètre pour 3 mm d'épaisseur. Chaque disque a fait l'objet d'un polissage mécanique en milieux aqueux à l'aide d'un papier de grain 1200 dans le but d'obtenir une surface homogène pour chaque échantillon. Elles n'ont pas été polies davantage pour permettre une surface adaptée à la déposition de particules. Les tests préliminaires ont montré qu'un polissage mécanique plus avancé ou un polissage chimique diminuait les chances de réussite d'une déposition par électrophorèse [12].

B. Préparation de la suspension

1. Choix du dispersant

La forte réactivité dans les milieux aqueux de nos nanoparticules de verres bioactifs force l'utilisation d'un système organique pour maintenir l'état vitreux des particules lors de la déposition. Néanmoins, le choix du dispersant organique reste important, car c'est un paramètre majeur lors de la déposition [13]. Les propriétés de celui-ci telles que sa conductivité et sa viscosité sont particulièrement importantes [14]. C'est l'éthanol qui a été utilisé comme dispersant dans le cas des dépositions effectuées dans ce travail. Comparativement à l'eau, l'éthanol a une concentration en ions en solution plus faible, il reste cependant possible d'y obtenir des charges par la formation d'ions éthanolates ($C_2H_5O^-$). Cette propriété en fait un candidat viable pour un dépôt électrophorétique [15].

2. Choix de la concentration en particules dans le dispersant

Une suspension est composée de particules chargées dans un liquide. La formation d'une suspension colloïdale de particules est très importante dans le cas des dépôts par l'utilisation de la technique de l'électrophorèse [16].

Un colloïde est la suspension d'une ou plusieurs substances, dispersées régulièrement dans une autre substance, formant un système à deux phases séparées. Dans un fluide, il forme une dispersion homogène de particules dont les dimensions vont du nanomètre au micromètre. Dans ce genre de suspension, des phénomènes d'agglomération ou de coagulation peuvent apparaître au cours du temps. Afin de réaliser des suspensions stables, il est capital d'identifier les différents facteurs physico-chimiques liés à la stabilité de celles-ci. Deux types de force sont considérées dans la description d'un système colloïdal : les forces de répulsion électrostatique et les forces d'attraction de Van der Waals. La théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek permet de décrire le système à partir de ces interactions [17,18]. Le taux de concentration en nanoparticules qui a été utilisé dans ce travail est de 1 % massique par rapport au dispersant (éthanol) [19].

C. Matériel et conditions expérimentales

Le générateur qui a été utilisé au cours de ces expérimentations est un PS305 XL d'APELEX possédant une capacité variable de $300\text{ V} \pm 1\text{ V}$ et $500\text{ mA} \pm 1\text{ mA}$ couplé à un système de minuterie permettant des dépôts contrôlés et répétables. L'espacement entre les deux électrodes a été choisi de façon à permettre un dépôt homogène dans l'éthanol. Il a été adapté à l'intensité du courant déployé lors des tests par le générateur. Cette distance a été fixée à 2 cm au cours des expériences préliminaires réalisées. Le montage expérimental est présenté sur la figure 67.

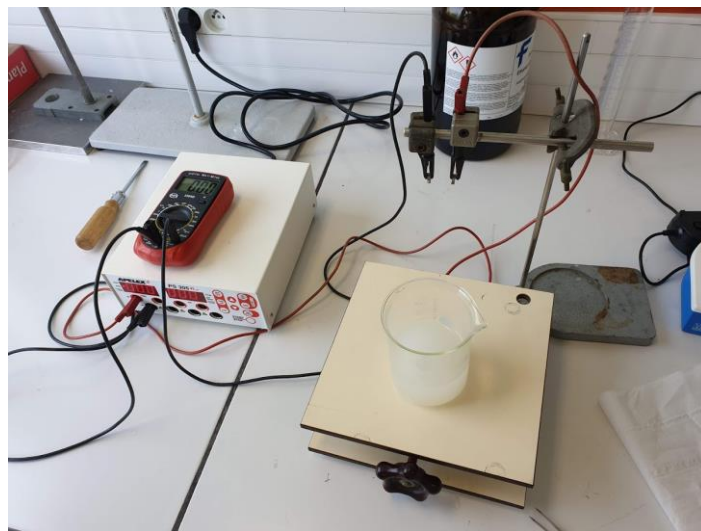


Figure 67 : Montage d'électrophorèse

III. Résultats et discussion

Les variations des paramètres expérimentaux développées dans cette étude portent sur la durée de déposition, la tension appliquée et la taille des particules. L'investigation se portera sur des caractérisations physico-chimiques, principalement sur la possible modification de la nature vitreuse ainsi que sur la densité et l'épaisseur de la couche de nanoverre bioactif.

Les mesures de l'épaisseur de la couche déposée ont été effectuées à l'aide d'un microscope digital équipé d'une technologie de mesure en 3D, le VHX-5000 de Keyence avec une précision de $\pm 0,1 \mu\text{m}$. Les mesures de masses ont été effectuées avant et après déposition sur les disques d'alliage afin d'obtenir la masse de matière déposée. Ces mesures ont été effectuées sur une balance Entris de Sartorius avec une précision de $\pm 0,0001 \text{ g}$

A. Effet de la taille des particules de NBG sur le dépôt à la surface du disque d'alliage

Les expérimentations de dépôt ont été effectuées en faisant varier la taille des nanoparticules utilisées mais en utilisant une tension électrique continue de 100 V sur les délais de déposition suivants : 1, 3, 5, 10, 15 et 20 minutes.

La figure 68 est une représentation graphique de l'épaisseur de la couche déposée en fonction du temps pour des tailles de particules variables. Nous constatons que le taux de déposition ralentit au cours du temps pour toutes les tailles de particules et que l'épaisseur des dépôts est liée à la taille des particules utilisées : plus une particule est grosse, plus le dépôt est épais. Nos analyses n'ont néanmoins pas apporté d'information sur la densité du dépôt.

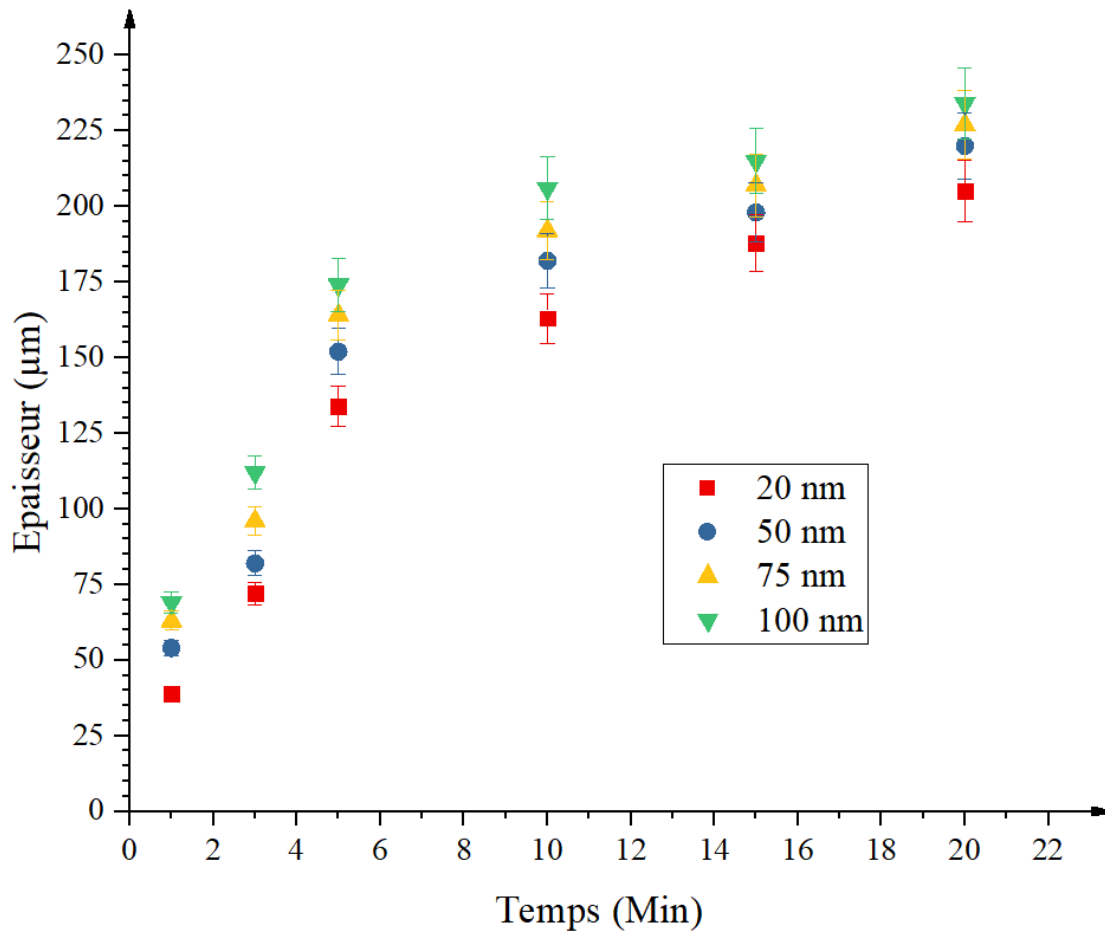


Figure 68 : Epaisseur de la couche déposée en fonction du temps pour des tailles de particules variables

La figure 69 renseigne sur la masse déposée en fonction du temps pour des tailles de particules variables. Les résultats restent très proches mais nous constatons que ce sont les particules les plus petites qui permettent de déposer le plus de masse sur la surface des disques. Cette constatation implique une plus grande densité des dépôts effectués à l'aide des petites particules.

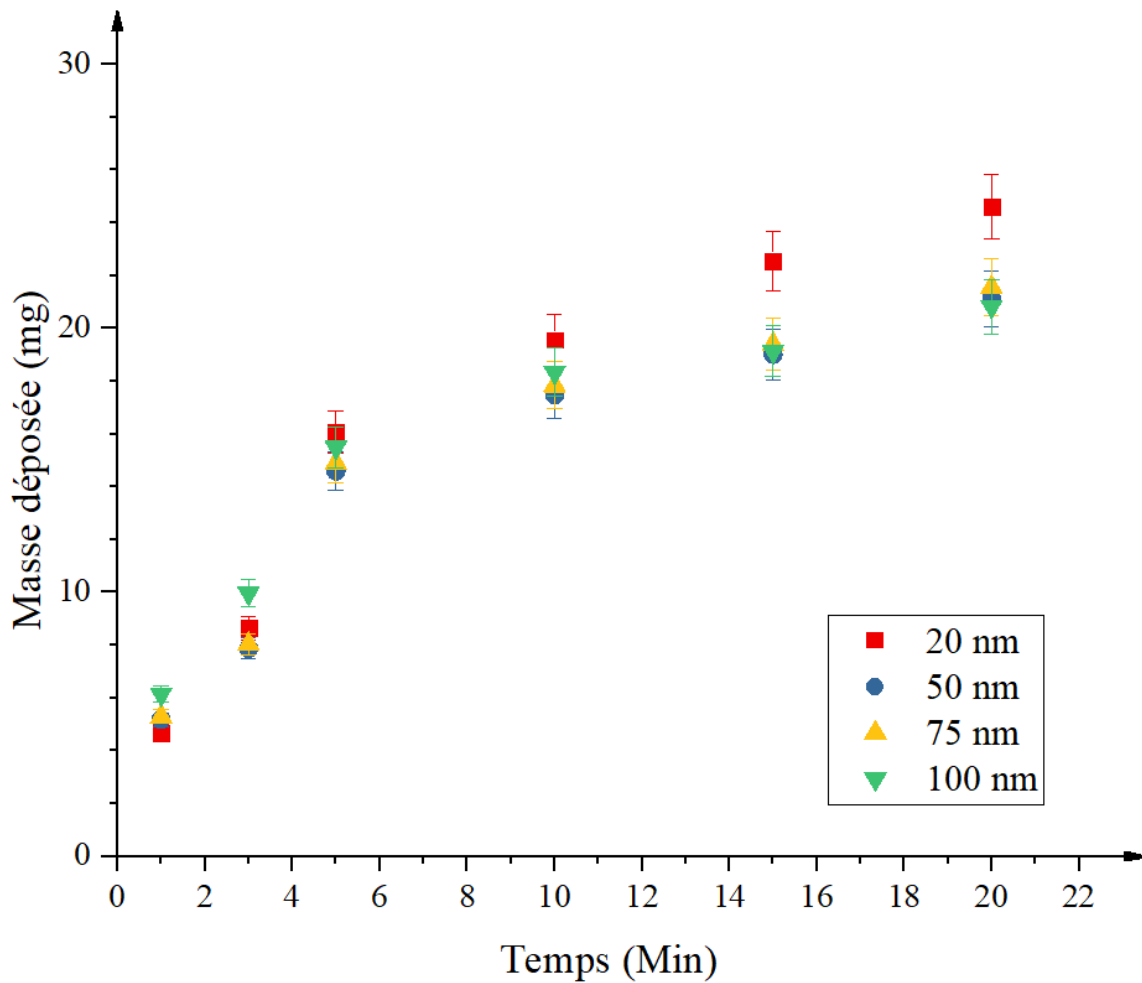


Figure 69 : Masse déposée en fonction du temps pour des tailles de particules variables

B. Effet de la tension électrique sur le dépôt à la surface du disque d'alliage

Les expérimentations de dépôt ont été effectuées en faisant varier la tension électrique utilisée mais en utilisant une taille de particule fixe de 50 nm sur les délais de déposition suivant : 1, 3, 5, 10, 15 et 20 minutes.

Les résultats sont présentés sur la figure 70, nous constatons que plus la tension appliquée est élevée plus l'épaisseur de la couche de particules déposées augmente.

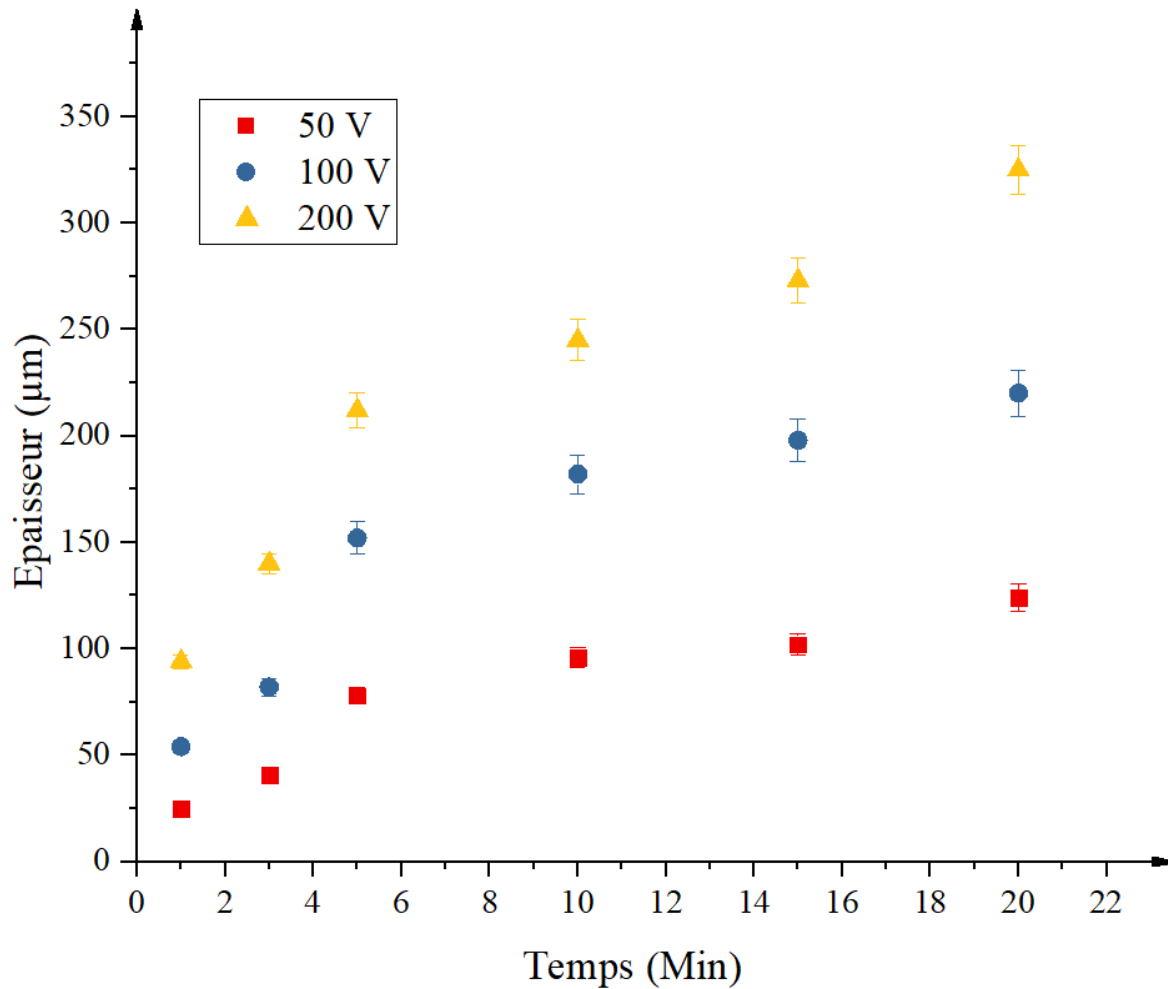


Figure 70 : Epaisseur de la couche déposée en fonction du temps pour des tensions électriques variables

La figure 71 regroupe les résultats des masses déposées à la surface des disques d'alliage en fonction du temps pour des particules de 50 nm et avec des tensions électriques variables. Nous remarquons que plus la tension électrique est forte plus la quantité de matière déposée à la surface des disques d'alliages augmente.

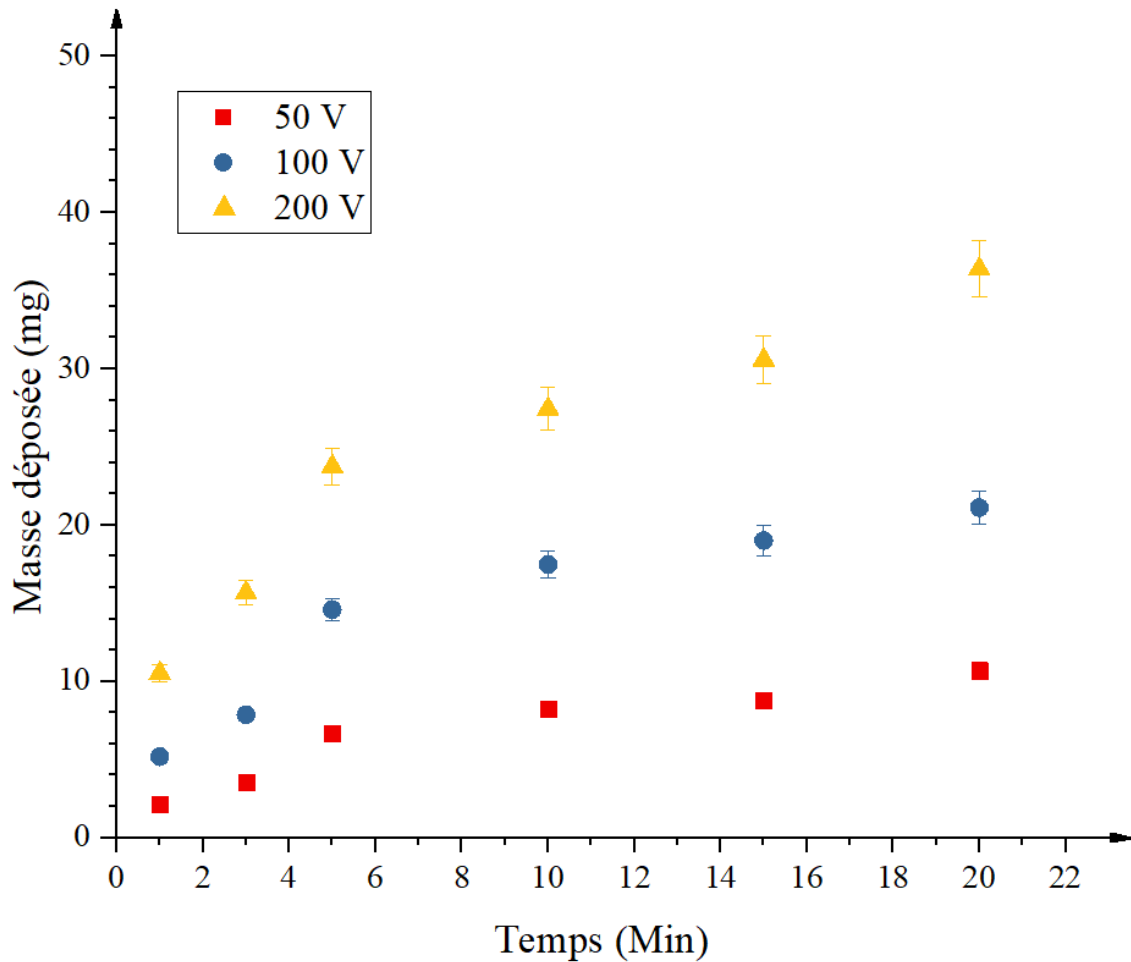


Figure 71 : Masse déposée en fonction du temps pour des tensions électriques variables

C. Caractérisation structurale par diffraction des rayons X des dépôts à la surface des disques d'alliage.

Les diffractogrammes de la figure 72 représentent les résultats obtenus de la diffraction des rayons X appliqués sur un disque d'alliage Ti6Al4V avant et après la déposition d'un nanoverre bioactif de 50 nm de diamètre. Nous constatons que les pics de diffractions présents après la déposition correspondent à ceux de l'alliage biomédical seul et également l'apparition d'un léger halo de diffraction entre 20 et 30 ° (2 θ). Celui-ci est caractéristique d'une structure amorphe correspondant ici au verre déposé à la surface du disque.

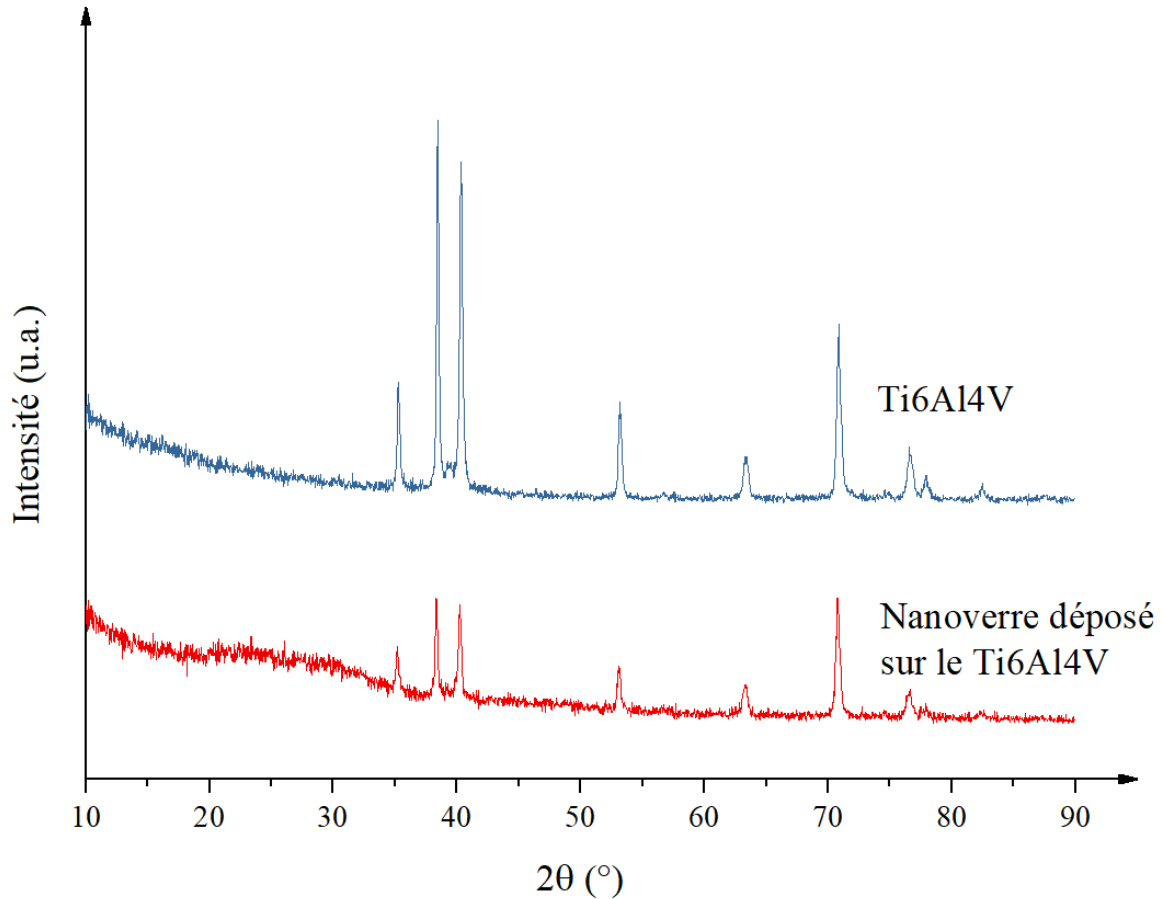


Figure 72 : Diffractogrammes DRX du disque d'alliage avant revêtement et après revêtement avec le nanoverre de 50 nm de diamètre

IV. Conclusion

La méthode de déposition par électrophorèse a été choisie afin de développer une technique de revêtement de prothèses métalliques par les nanoverres bioactifs élaborés dans cette thèse. La maîtrise de la taille des particules synthétisées a permis l'analyse de l'épaisseur et de la densité des couches déposées en fonction du temps et de la tension. Cette étude préliminaire nous indique que pour des délais de déposition identiques, plus la taille des particules est faible, plus le revêtement est dense. Un autre résultat obtenu est qu'il est possible de maîtriser l'épaisseur de la couche déposée à la surface des disques d'alliage métallique en variant la tension du courant appliquée. Ainsi en augmentant ou en réduisant l'intensité du champ entre les deux électrodes de dépôt il est possible d'obtenir un dépôt possédant une épaisseur choisie.

Un autre avantage à l'utilisation de l'électrophorèse dans le cadre d'un revêtement par des particules de verre bioactif est le maintien de la nature vitreuse des particules lors de la formation du dépôt, comme prouvées par les analyses de diffractions effectuées sur ces dépôts.

Ainsi la combinaison de ces éléments que sont la densité et l'épaisseur de la couche déposée nous permettra d'élaborer des revêtements d'alliage métallique adaptables au patient et/ou au traumatisme à traiter.

Néanmoins, de plus amples expérimentations seront nécessaires, particulièrement sur la force d'adhésion entre le dépôt et la surface et sa tenue au cours du temps sur la surface métallique.

Références du chapitre 7 :

- [1] Sarkar, P.; Nicholson, P. S. Electrophoretic Deposition (EPD): Mechanisms, Kinetics, and Application to Ceramics. *J American Ceramic Society* **1996**, *79* (8), 1987–2002. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1996.tb08929.x>.
- [2] Weiss, N. L. *SME Mineral Processing Handbook*. Society of Mining Engineers of AIME, Eds.; S.W. Mudd series; Society of Mining Engineers of the American Institute of Mining, Metallurgical, and Petroleum Engineers: New York, N.Y, **1985**, 5–42.
- [3] Hamaker, H. C. Formation of a Deposit by Electrophoresis. *Trans. Faraday Soc.* **1940**, *35*, 279–284. <https://doi.org/10.1039/tf9403500279>.
- [4] Koelmans H.; Overbee J. TH. G. Stability and electrophoretic deposition of suspensions in non-aqueous media. *Philips Res. Rep.* **1955**, *10*, 161–193.
- [5] Grillon, F.; Fayeulle, D.; Jeandin, M. Quantitative Image Analysis of Electrophoretic Coatings. *J Mater Sci Lett* **1992**, *11* (5), 272–275. <https://doi.org/10.1007/BF00729410>.
- [6] Van Tassel, J. J.; Randall, C. A. Mechanisms of Electrophoretic Deposition. *KEM* **2006**, *314*, 167–174. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.314.167>.
- [7] Dussoulier L., Elaboration de dépôts d'YBa₂Cu₃O_{7-x} par électrophorèse et projection plasma, Thèse de l'Université de Liège, **2007**
- [8] Elias, C. N.; Lima, J. H. C.; Valiev, R.; Meyers, M. A. Biomedical Applications of Titanium and Its Alloys. *JOM* **2008**, *60* (3), 46–49. <https://doi.org/10.1007/s11837-008-0031-1>.
- [9] Singh, P.; Pungotra, H.; Kalsi, N. S. On the Characteristics of Titanium Alloys for the Aircraft Applications. *Materials Today: Proceedings* **2017**, *4* (8), 8971–8982. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.07.249>.

- [10] Khorasani, A. M.; Goldberg, M.; Doeven, E. H.; Littlefair, G. Titanium in Biomedical Applications—Properties and Fabrication: A Review. *J biomater tissue eng* **2015**, 5 (8), 593–619. <https://doi.org/10.1166/jbt.2015.1361>.
- [11] Mamedov, A.; Ozturk, H.; Makas, T. Investigation of Mechanical and Microstructural Properties of Ti-6Al-4V Alloy Depending on Hot Forging Process Parameters. *Procedia Engineering* **2017**, 207, 2155–2160. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.10.974>.
- [12] Kadhim, M. J.; Abdulateef, N. E.; Abdulkareem, M. H. Evaluation of Surface Roughness of 316L Stainless Steel Substrate on Nanohydroxyapatite by Electrophoretic Deposition. *NJES* **2018**, 21 (1), 28–32. <https://doi.org/10.29194/NJES21010028>.
- [13] Farrokhi-Rad, M. Effect of Dispersants on the Electrophoretic Deposition of Hydroxyapatite-Carbon Nanotubes Nanocomposite Coatings. *J. Am. Ceram. Soc.* **2016**, 99 (9), 2947–2955. <https://doi.org/10.1111/jace.14338>.
- [14] Ferrari, B.; Moreno, R. EPD Kinetics: A Review. *Journal of the European Ceramic Society* **2010**, 30 (5), 1069–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2009.08.022>.
- [15] Plešngerová, B.; Sučík, G.; Maryška, M.; Horkavcova, D. Hydroxyapatite Coatings Deposited from Alcohol Suspensions by Electrophoretic Deposition on Titanium Substrate. *Ceramics Silikaty* **2007**, 51(1), 15–23.
- [16] Farrokhi-Rad, M. Electrophoretic Deposition of Hydroxyapatite Nanoparticles: Effect of Suspension Composition on the Electrochemical Potential Difference at Deposit/Suspensions Interface. *Mater. Res. Express* **2018**, 5 (8), 085005. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aad1a2>.
- [17] Derjaguin, B.; Landau, L.D. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Acta Physicochimica U.R.S.S.* **1941**, 14, 633–662.
- [18] Verwey E.J.W.; Overbeek J.T.G, “*Theory of the stability of lyophobic colloids*”, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **1948**
- [19] Sa’adati, H.; Raissi, B.; Riahifar, R.; Yaghmaee, M. S. How Preparation of Suspensions Affects the Electrophoretic Deposition Phenomenon. *Journal of the European Ceramic Society* **2016**, 36 (2), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2015.09.005>.

Conclusion générale

Conclusion générale

Poussé par la croissance démographique et l'augmentation des niveaux d'exigences sanitaires, le développement de nouveaux biomatériaux est devenu un enjeu majeur. Cette croissance pousse à la recherche, et à la réalisation de nouveaux biomatériaux ostéoinducteurs toujours plus efficaces dans leurs capacités à favoriser la repousse du tissu osseux. L'élaboration de ces biomatériaux nécessite une approche pluridisciplinaire. Elle fait intervenir des chimistes, des physiciens, des biologistes et de chirurgiens pour permettre leur développement.

Nous avons étudié des verres du système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$. Dans notre étude, le verre bioactif quaternaire 46S6 a été synthétisé par fusion à haute température. Deux éléments, le zinc et le strontium ont été ajoutés séparément dans la matrice vitreuse du 46S6 avec différentes teneurs. Ces compositions ont fait l'objet d'études physico-chimiques et thermodynamiques. Les résultats obtenus ont montré que toutes les compositions présentaient une structure amorphe et les groupements caractéristiques du verre. Les analyses thermiques réalisées nous ont appris que les températures caractéristiques des verres ainsi que l'excès d'entropie varient en fonction des teneurs des dopants introduits dans la matrice vitreuse. Parallèlement, la composition initiale 46S6 a fait l'objet d'expérimentations *in vitro*. Les réactions chimiques au cœur de la formation de la couche de phosphate de calcium à la surface des verres ont été investiguées. Cette étude nous a permis de suivre, en fonction du temps, l'évolution de cette couche d'hydroxyapatite carbonatée en fonction de sa morphologie ou de l'homogénéité de la composition de sa surface.

Ces résultats sont intéressants dans la mesure où nous pouvons mieux comprendre voire influencer sur la cinétique de bioactivité des verres selon l'élément introduit dans leur matrice ainsi que le suivi du processus d'ostéointégration. L'objectif de telles études est de pouvoir adapter les biomatériaux aux besoins des patients en fonction des différents métabolismes osseux qui diffèrent selon l'âge, le sexe, le site d'implantation ou la nature du défaut.

Conclusion générale

Notre avons ensuite orienté nos recherches vers une approche nanométrique des verres bioactifs. Nous avons développé une technique en utilisant l'approche sol-gel de l'émulsion permettant la synthèse de nanoparticules de nanoverre bioactifs ternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

Après ajustement de divers paramètres nous avons obtenu des nanoverres bioactifs avec des tailles de 20 à 200 nm de diamètre. Cette maîtrise de la taille des particules nous a permis de les utiliser pour deux applications distinctes. Celles dont la taille était supérieure à 100 nm ont été utilisées après mise en forme dans le cadre d'implants pour le comblement d'un défaut osseux. Quant aux particules de taille inférieure à 100 nm, elles ont été utilisées dans le cadre d'une étude sur le recouvrement de prothèses métalliques. Les particules synthétisées ont fait l'objet de caractérisations physico-chimiques et biologiques. Leur nature vitreuse à longue distance et leurs groupements caractéristiques ont été identifiés. Les résultats, lors des essais *in vitro*, ont montré une bioactivité par la formation progressive d'une couche homogène d'un carbonate de calcium après 3 jours d'immersion dans un liquide physiologique synthétique. Les résultats des tests colorimétriques de viabilité cellulaire nous ont prouvée l'absence de cytotoxicité pour les particules 100 nm destinée aux tests *in vivo*. En complément, nous avons mené une étude sur l'effet de la taille des particules sur la cinétique de réactivité chimique. Les résultats nous ont montré une variation de la cinétique de cristallisation en fonction de la taille des nanoparticules.

Ces observations nous ont menés à utiliser ces particules comme support pour la libération de substances médicamenteuses. Notre choix s'était porté sur la spiruline (*Spirulina Platensis* ou *Arthrospira Platensis*) et plus particulièrement sur une protéine présente dans sa composition : la phycocyanine. Ces deux composants d'intérêt physiologique ont fait l'objet d'une extraction puis de caractérisations physico-chimiques et biologiques avant d'être associés à notre nanoverre bioactif de 100 nm de diamètre. Le comportement bioactif de ces nouveaux matériaux hybrides a été suivi de la même façon que pour les nanoparticules de verre seules. Tous deux ont également présentés la capacité de former une apatite lors d'immersion dans un liquide physiologique. Les deux matériaux hybrides (nanoverre/spiruline et nanoverre/phycocyanine) ont été également caractérisés confirmant ainsi le maintien de leur nature amorphe. En complément, les tests colorimétriques de viabilité cellulaire effectués sur l'hybride verre/spiruline ont démontré une absence de cytotoxicité et une bonne prolifération cellulaire.

Conclusion générale

Les résultats de cytotoxicité et la capacité du nanoverre seul et des matériaux hybrides à former une couche d'apatite lors de tests *in vitro* nous ont permis de mettre en place des tests *in vivo*. Dans le cadre d'une comparaison de leur bioactivité, le nanoverre seul et l'hybride verre/spiruline ont été implantés au niveau du condyle fémorale de lapins Néo-Zélandais.

Les résultats des analyses physico-chimiques obtenus après 6 mois, ont montré un phénomène d'ostéoconduction progressif, avec une résorption du biomatériau au niveau du site d'implantation. Nous avons conclu qu'il était possible que la présence de la spiruline ait ralenti le phénomène d'ostéointégration. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour valider notre hypothèse. Néanmoins, aucun rejet, ni phénomène inflammatoire n'ont été observés pour aucun des matériaux. Les études histologiques ont montré également un excellent comportement de ces biomatériaux.

Finalement, nous avons réalisé à l'aide de particules de verre de 20 à 100 nm de diamètre des essais de déposition sur un alliage médical à base de titane par une méthode novatrice dans notre laboratoire : l'électrophorèse. Une étude comparative de l'épaisseur et de la masse du dépôt réalisé a été effectuée. Les premiers résultats sont très encourageants. Ils nous indiquent que notre maîtrise de la taille des nanoverres devrait permettre le dépôt d'un revêtement avec une densité et une épaisseur variables. Ces paramètres sont fonction de la taille des particules, de la tension électrique appliquée et du temps d'exposition des particules au champ électrique. L'analyse par diffraction des rayons X préliminaire indique que le revêtement a gardé sa nature amorphe après la déposition. La poursuite de ce projet devrait permettre de rendre plus adaptable les futures prothèses métalliques.

Perspectives

Perspectives

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse ouvrent la voie à de nombreuses possibilités d'investigation sur les biomatériaux. Celles-ci s'étendent de la synthèse de nouveaux biomatériaux, à l'amélioration de procédés déjà existants en passant par la mise en place d'éventuelles nouvelles applications.

Une des perspectives possibles est de compléter l'étude thermodynamique liée à l'ajout d'éléments dopants dans le verre de référence de notre laboratoire le 46S6. La création d'une base de données des effets physico-chimiques et biologiques de l'ajout de ces éléments dans la matrice du verre.

La maîtrise de la taille des nanoverres bioactifs est également une des possibilités d'approfondissement, en effet, une gamme de taille plus large pourrait permettre d'ouvrir ces particules à d'autres applications que celles proposées dans cette thèse. Leur utilisation est envisagée dans l'élaboration d'une nouvelle génération de biomatériaux associés à des polymères. Un système d'impression 3D permettra leur mise en forme pour la création de structures destinés à la restauration du tissu osseux.

D'autres médicaments, protéines ou des facteurs de croissance pourraient être intégrés ou greffés dans ces matériaux multifonctionnels pour développer leur capacités biologiques et biochimiques. La connaissance de la biocompatibilité et des propriétés mécaniques sera également nécessaire avant d'envisager de proposer ces matériaux pour des applications cliniques afin d'éviter par exemple de possibles infections nosocomiales.

Les premiers résultats de l'étude menée *in vivo* sont encourageants pour le matériau hybride spiruline/nanoverre bioactif. Une étude plus approfondie et une vérification de la qualité de l'os néoformé pourront être réalisées. Il serait également profitable de concrétiser la comparaison entre les hybrides avec la spiruline et avec la phycocyanine pour définir si les autres constituants de la spiruline possèdent un effet sur la qualité de la régénération osseuse. Une étude sur des variations de la concentration ajoutée de principe actif dans les matériaux hybrides pourrait également se révéler prometteuse.

Perspectives

Finally, to complete the preliminary study started by the deposit by electrophoresis, it would be important to develop a thermal treatment adapted to the material in order to effectively link the deposit to the surface of the metallic alloy. Following this treatment, the study of physico-chemical characterizations could define if the deposit is sufficiently linked to the surface and resistant in order to be used in the treatment of a bone pathology.

The different approaches proposed in this thesis work are linked to a will to improve and to propose new hybrid materials allowing to get closer to domains linked to tissue engineering and more globally to tissue medicine.

Annexes

Annexe I : Origine et pureté des composants des synthèses

Tableau I : Composants utilisés pour la synthèse des verres par fusion

Nom chimique	Source	Pureté
Oxyde de silicium (SiO ₂)	Sigma-Aldrich Chemistry	0,9980
Métasilicate de sodium (Na ₂ SiO ₃)	Fisher chemical	≥ 0,97
Métaphosphate de sodium (Na ₃ P ₃ O ₉)	Alfa Aesar	0,95
Métasilicate de calcium (CaSiO ₃)	Alfa Aesar	≥ 0,97
Carbonate de strontium (SrCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemistry	0,999
Oxyde de zinc (ZnO)	Acros Organics	0,995

Tableau II : Composants utilisés pour la synthèse des verres par sol-gel

Nom chimique	Source	Pureté
Orthosilicate de tétraéthyle (TEOS: SiC ₈ H ₂₀ O ₄)	Merck	0.98
Trimetaphosphate de sodium (Na ₃ P ₃ O ₉)	Alfa Aesar	≥ 0.95
Nitrate de calcium tétrahydraté (Ca ₂ N ₂ O ₆ 4H ₂ O)	Merck	0.99
Ammoniaque (NH ₃ H ₂ O)	Carlo ErbaReagents	≥ 0.95
Octanol (C ₈ H ₁₈ O)	Alfa Aesar	0.99
Triton X100 (C ₈ H ₁₇ C ₆ H ₄ (OC ₂ H ₄) ₉₋₁₀ OH)	Alfa Aesar	0.99
Cyclohexane (C ₆ H ₁₂)	Fisher Chemical	≥ 0.95

Annexe II : Principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (également appelée PCS - Spectroscopie par corrélation de photons) mesure le mouvement brownien des particules et le relie à leurs tailles.

Les particules sont éclairées par un laser et une analyse des fluctuations d'intensité de la lumière diffusée est réalisée. Quand une particule stationnaire est éclairée par le laser qui sert de source de lumière, elle dispersera la lumière dans toutes les directions. Un capteur est placé de façon à recevoir la lumière ainsi dispersée. Ce processus est multiplié par le nombre de particule stationnaire présente dans le flux de lumière du laser. Ainsi le capteur reçoit une image similaire à celle de la figure I composé de zone plus claires et plus obscures.

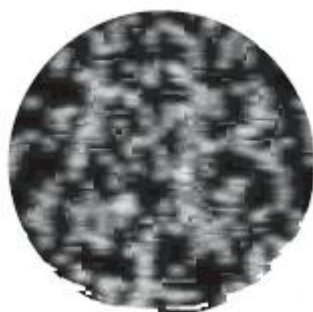


Figure I : Exemple de lumières diffracté sur le détecteur [1]

Le diagramme de la figure II montre les ondes propagées de la lumière dispersée par les particules. Les zones lumineuses sont celles où la lumière diffusée par les particules arrive à l'écran avec la même phase et interfère de manière constructive pour former un patch lumineux. Les zones sombres sont là où les ajouts de phase sont mutuellement destructeurs et s'annulent mutuellement.

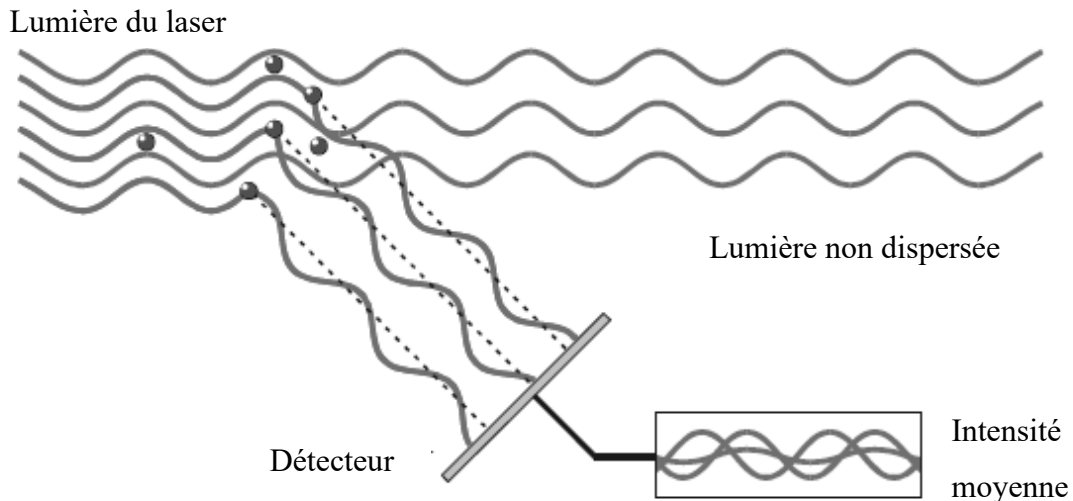


Figure II : Schéma de fonctionnement de la DLS [1]

Dans l'exemple ci-dessus, concerne des particules stationnaires. Dans cette situation, le motif reçu par le capteur sera également stationnaire en termes de position et de taille des zones.

En pratique, les particules en suspension dans un liquide ne sont jamais stationnaires. Elles se déplacent constamment en raison du mouvement brownien. Celui-ci est le mouvement des particules en raison de la collision aléatoire avec les molécules du liquide qui l'entoure. Une caractéristique importante du mouvement brownien pour la DLS est que les petites particules se déplacent rapidement et les grandes particules se déplacent plus lentement. La relation entre la taille d'une particule et sa vitesse due au mouvement brownien est définie dans l'équation de Stokes-Einstein :

$$v_d = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta * l_{rh}}$$

Avec : v_d : la constante de diffusion

η : la viscosité dynamique du solvant en poiseuille

l_{rh} : le rayon de la molécule supposé sphériques (rayon hydrodynamique) en mètre

k : la constante de Boltzmann

T : la température absolue en Kelvin

Comme les particules sont constamment en mouvement, le motif du capteur apparaîtra également en mouvement. Au fur et à mesure que les particules se déplacent, l'ajout de phase constructive et destructrice de la lumière dispersée fera croître ou diminuer en intensité les zones claires et sombres. Le système mesure le taux de fluctuation de l'intensité, puis l'utilise pour calculer la taille des particules.

[1] Zetasizer Nano User Manual, **2013**, 11-1-11-2

Annexe III : Principe de la théorie Brunauer, Emmett et Teller (BET)

La théorie BET constitue un modèle mathématique du processus d'adsorption des gaz. Cette adsorption physique d'un gaz sur toute la surface exposée d'une matière, avec le remplissage de ses pores, est appelée physisorption. Ce phénomène permet de mesurer la surface totale et d'analyser la taille des pores dans les matières nanoporeuses, microporeuses et mésoporeuses. Le procédé de mesure par physisorption implique le refroidissement de la surface du matériau mesurée, en utilisant de l'azote pour adhérer à la surface (adsorption), puis le réchauffement de la surface (désorption).

L'équation BET est donnée par la relation suivante :

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_{mono} * C} + \frac{C - 1}{V_{mono} * C} * \left(\frac{P}{P_0}\right)$$

Avec : V : le volume de gaz adsorbé

V_{mono} : le volume de la monocouche, c'est-à-dire le volume d'une couche de molécule adsorbée sur la surface

C : la constante de BET

P : la pression d'équilibre du gaz

P_0 : la pression de vapeur saturante du gaz

P/P_0 : la pression relative du gaz

L'analyse consiste à mesurer, à une température donnée et dans un certain domaine de pression relative P/P_0 , le volume V d'azote adsorbé à la surface d'un échantillon de masse connue. Le traitement analytique de l'isotherme d'adsorption obtenu ($V=f(P/P_0)$) permet de déterminer la surface spécifique S_{BET} du matériau. Pour ces mesures, les échantillons sont préalablement dégazés à 150°C sous vide secondaire. Cette procédure est appelée méthode multipoints où on fait varier la pression relative P/P_0 .

L'équation BET est en général applicable dans le domaine de pression relative (P/P_0) compris entre 0,05 et 0,35. Dans la méthode multipoints, on admet des quantités calibrées de gaz sur l'échantillon et on mesure à chaque fois la quantité de gaz adsorbée (augmentation de P/P_0). On détermine le volume de la monocouche V_{mono} à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite BET.

La surface spécifique est alors calculée en utilisant la relation suivante :

$$S_{BET} = \frac{V_{mono} * A_M * N_A}{V_M}$$

Avec : S_{BET} : la surface spécifique BET en $m^2.g^{-1}$

V_{mono} : le volume de la monocouche en $cm^3.g^{-1}$

N_A : le nombre d'Avogadro

A_M : la surface occupée par une molécule de gaz en nm^2

V_M : le volume molaire du gaz en $cm^3.mol^{-1}$

Annexe IV : Principe de la microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie à balayage se base sur la détection et l'interprétation des interactions entre un faisceau d'électrons avec le matériau analysé. Le faisceau d'électrons primaires frappe la surface de l'échantillon et cet impact génère de nouveaux rayonnements : électrons secondaires, rétrodiffusés, Auger ou rayon X [1,2]. Chacun de ces nouveaux rayonnements présente un intérêt pour la caractérisation de l'échantillon :

- **Les électrons rétrodiffusés** : Ce sont des électrons résultants de l'interaction des électrons du faisceau primaire avec des noyaux d'atomes de l'échantillon. Ils ont réagi de façon quasi élastique avec les atomes de l'échantillon et sont réémis dans une direction proche de leur direction d'origine avec une faible perte d'énergie. Ces électrons récupérés ont donc une énergie relativement élevée, allant jusqu'à 30 keV, énergie beaucoup plus importante que celle des électrons secondaires. Ils peuvent être émis à une plus grande profondeur dans l'échantillon. La résolution atteinte avec les électrons rétrodiffusés sera donc relativement faible, de l'ordre du micromètre ou du dixième de micromètre.
- **Les électrons secondaires** : Lors d'un choc entre les électrons primaires du faisceau et les atomes de l'échantillon, un électron primaire peut céder une partie de son énergie à un électron peu lié de la bande de conduction de l'atome qui a reçu le choc provoquant ainsi une ionisation par éjection de ce dernier. On appelle électron secondaire cet électron éjecté. Ceux-ci possèdent généralement une faible énergie (environ 50 eV). Chaque électron primaire peut créer un ou plusieurs électrons secondaires. Cette faible énergie ne permet pas aux électrons secondaires d'être émis plus loin que dans les couches superficielles proches de la surface. Les électrons qui peuvent être recueillis par les détecteurs sont souvent émis à une profondeur inférieure à 10 nm. Ces électrons permettent donc d'obtenir des renseignements sur la topographie de l'échantillon [2].
- **Les électrons Auger** : Lorsqu'un atome est bombardé par un électron primaire, un électron d'une couche profonde peut être éjecté et l'atome entre dans un état excité. La désexcitation peut se produire de deux façons différentes : en émettant un photon X (transition radiative ou fluorescence X) ou en émettant un électron Auger (effet Auger).

Lors de la désexcitation, un électron d'une couche supérieure vient combler la lacune créée par l'électron initialement éjecté. Durant cette transition, l'électron périphérique perd une certaine quantité d'énergie qui peut être émise sous forme de photon X ou peut alors être transmise à un électron d'une orbite plus externe et donc moins énergétique. Cet électron périphérique se retrouve à son tour éjecté et peut être récupéré par un détecteur. Les électrons Auger possèdent une très faible énergie et sont caractéristiques de l'atome qui les a émis. Ils permettent ainsi d'obtenir des informations sur la composition de l'échantillon et plus particulièrement de la surface de l'échantillon ainsi que sur le type de liaison chimique [1].

- **Les photons X** : L'impact d'un électron primaire à haute énergie peut ioniser un atome à une couche interne. La désexcitation, le remplissage de l'ordre énergétique de la structure électronique, se produit avec émission de rayons X. L'analyse de ces rayons permet d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'atome (EDS) [2].

[1] Oatley, C. W. The Early History of the Scanning Electron Microscope. *Journal of Applied Physics* **1982**, 53 (2), 1–13. <https://doi.org/10.1063/1.331666>.

[2] Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*; Springer US: Boston, MA, **2003**.

Annexe V : Principe de la microscopie à forces atomiques (AFM)

Le microscope à force atomique exploite l'interaction (attraction/répulsion) entre les atomes de d'une pointe et les atomes de la surface d'un échantillon. Elle permet d'analyser des zones allant de quelques nanomètres à quelques micromètres de côtés et de mesurer des forces de l'ordre du nanonewton.

Le microscope à force atomique permet donc de balayer la surface d'un échantillon grâce à une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible, pouvant se déplacer dans toutes les directions de l'espace, grâce à un tube piézoélectrique.

L'analyse des flexions du micro-levier permet de déterminer avec précision le parcours de la pointe, ainsi que les forces d'interactions intervenant entre elle et l'échantillon.

Les différents types de forces mesurées dépendent de la variation de la distance entre la pointe et la surface analysée. Il existe 3 modes de mesure permettant différents types de d'analyses.

Ces trois modes principaux sont :

- Le mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée du fait du principe de Pauli, et le levier est dévié. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation.
- Le mode contact intermittent ou mode Tapping est le plus utilisé, il consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude décroît (parce que la fréquence de résonance change). La rétroaction se fait alors sur l'amplitude d'oscillation du levier.
- Le mode non-contact ou modulation de fréquence permet contrairement au mode modulation d'amplitude (Tapping) de séparer directement l'effet des forces conservatives et dissipatives. Il est essentiellement utilisé sous vide. La rétroaction s'effectue soit sur la déviation soit sur la fréquence de résonance.

Il faut donc mesurer la déviation du levier. La technique la plus couramment utilisée est la mesure via réflexion d'un laser.

La pointe est montée sur un levier réfléchissant et un rayon laser se réfléchit sur celui-ci. Si le rayon du laser dévie, c'est que le levier s'est infléchi ce qui est révélateur des forces d'interactions entre la pointe et la surface. La mesure de la déviation de la pointe passe par celle de la position du faisceau laser réfléchi, ce qui s'effectue au moyen d'une photodiode circulaire divisée en quatre parts égales.

Quand le faisceau n'est pas dévié, il frappe au centre de la diode. Si le faisceau laser vient à être dévié vers le haut, les deux parties du haut recevront plus de lumière que celles du bas, et il apparaît donc une différence de tension.

L'intérêt de la mesure par laser est essentiellement l'accès qu'elle permet à une mesure secondaire qui est celle de la friction. En effet, la pointe balaie la surface et le contact génère des frottements qui infléchissent le levier autour de son axe. Cette déviation implique une différence de tension non plus entre le haut et le bas du détecteur, mais entre la droite et la gauche. On peut ainsi avoir accès aux forces de frottement existant entre la pointe et la surface, et donc de façon qualitative à la nature chimique de la surface. Le schéma de fonctionnement de l'AFM est présenté sur la figure III.

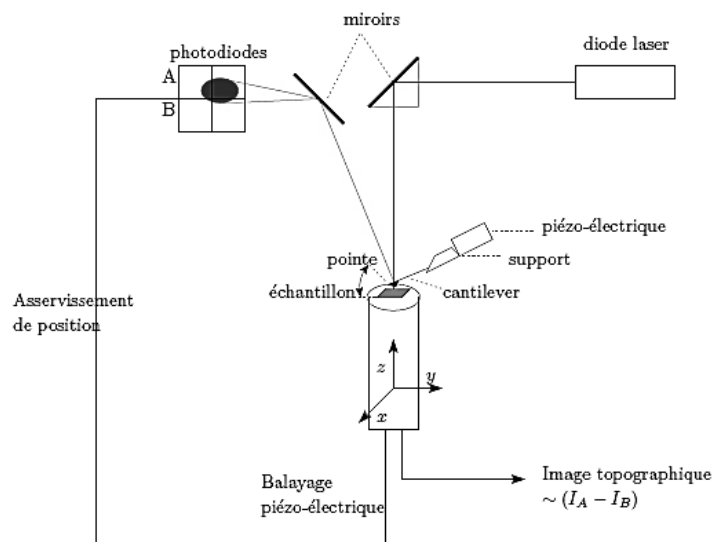


Figure III : Principe du fonctionnement d'un microscope à force atomique [1]

[1] www.wikipedia.org Page web visitées en Aout 2019

Annexe VI : Synthèse du Simulated Body Fluid (SBF)

Le SBF est une solution ne pouvant être conservée dans des conditions d'utilisations optimales que durant quelques jours. Pour résoudre ce problème, la solution de SBF est préparée en mélangeant deux solutions : Ca-SBF et P-SBF. Celles-ci peuvent être conservées pendant plusieurs semaines.

Chacune de ces solutions sont préparés séparément à partir de 990 mL d'eau chauffé au bain-marie et maintenu à 37 °C pendant les synthèses. Les réactifs sont alors ajoutés dans les proportions reportées dans les tableaux III et IV :

Tableau III : Composition de la solution de Ca-SBF

Réactifs	Quantité
TrisC₄H₁₁NO₃	0,05 mol (6,057 g)
CaCl₂	0,005 mol (0,5549 g)
MgCl₂, 6H₂O	0,003 mol (0,6095 g)

Tableau IV : Composition de la solution de P-SBF

Réactifs	Quantité
TrisC₄H₁₁NO₃	0,05 mol (6,057 g)
K₂HPO₄, 3H₂O	0,002 mol (0,4566 g)
NaHCO₃	0,008 mol (0,7056 g)
KCl	0,006 mol (0,4473 g)
NaCl	0,2758 mol (16,1061 g)

Le pH de chaque solution est ensuite ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de HCl. La fiole est ensuite complétée pour obtenir un litre de chaque solution. Ces deux solutions sont stockées au réfrigérateur (4 – 7 °C). La solution de SBF est obtenue par un mélange 50/50 des solutions de Ca-SBF et P-SBF.

Publications

PAPER • OPEN ACCESS

Study of nano bioactive glass for use as bone biomaterial comparison with micro bioactive glass behaviour

To cite this article: N Rocton *et al* 2019 *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **628** 012005

View the [article online](#) for updates and enhancements.

Study of nano bioactive glass for use as bone biomaterial comparison with micro bioactive glass behaviour

N Rocton, H Oudadesse, S Mosbahi, L Bunetel, P Pellen-Mussi and B Lefevre

University Rennes, CNRS, ISCR-UMR 6226, F-35000, Rennes, France

Corresponding author's e-mail: hassane.oudadesse@univ-rennes1.fr

Abstract. This research is based on the study of bioactivity kinetic in function of the glass particles size. Bioactive glasses have been elaborated in the ternary system SiO₂-CaO-P₂O₅. Nano bioactive glass and micro bioactive glass have been synthesized by using two different processes. They are destined for use as bone biomaterials. The comparison was focused on the kinetic of the development of a calcium phosphate layer on their surfaces after immersion in a Simulated Body Fluid (SBF). The first bioactive glass BG is a melting-made glass with a particles size of about 60 μm. The second bioactive glass NBG is a sol-gel made glass through an emulsion system of synthesized particles of about 110 nm. The growing of the calcium phosphate layer at the surface of the glasses has been followed using several physicochemical techniques. Obtained results show the development of a calcium phosphate layer similar to carbonated hydroxyapatite. It crystallises in a hexagonal system with an P6₃/m space group. While melting-made glass needs 14 days to develop carbonated hydroxyapatite like crystal, sol-gel needs only 3 days to develop similar crystals. This difference offers wide opportunities and complementarities for the use of nano or micro bioactive glasses in the biomedical field.

1. Introduction

Hench invented bioactive glasses [1-3] in the Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ system, their utility has been widely proven in the area of bone restoration. Synthetic biomaterials are a good option for replacing biological bone grafts. Bioactive glasses, calcium phosphate and calcium carbonate are examples of synthetic materials used as biomaterials in orthopaedic surgery. They have the advantage of avoiding troubles linked to disease transmission. Thus, they are available in unlimited quantity, and they can be fitted for any person contrary to heterografts and xenografts. Precise studies to evaluate the biocompatibility and the physicochemical properties are required before the introduction of new synthetic materials for use in the biotechnological field. This work is focused on bioactive glasses. These glasses are particularly interesting due to their capacity to form a carbonated hydroxyapatite layer (HA) Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. HA layer is very similar to the crystal composing the human bones. Bioactive glasses may be synthesised using two different processes, both presenting advantages. The first is the synthesis of glass by fusion, it is historically used in many works [4-8]. The second presents an alternative using the polycondensation of a silica network via a so-called sol-gel synthesis [9-14]. This study is focused on the system CaO-P₂O₅-SiO₂ which have shown some potential in their properties on biomedical field [15-17]. The synthesis and characterization of two bioactive glasses will be developed using the two different methods mentioned earlier. The development will focus on the effect of bioactive particles size on the kinetic of bioactivity.



In this study, nano-sized and micro-sized bioactive particles in the system CaO-P2O5-SiO2 were synthesized. Their chemical composition, microstructure, and bioactivity were investigated. Obtained results allow for a wider range of applications, particularly in the field of biotechnology including but not limited to bone restoration, bones regrowth, anti-bacteriological or metallic prosthesis coating.

2. Materials and methods

2.1 Glass synthesis

2.1.1 Micro bioactive glass (BG) synthesis process. Preparation of the bioactive glass (46S6) by melting was previously described in our works [18]. The 46S6 synthesized in this study is a quaternary glass with the following molar percentage composition: 46 SiO₂, 24 CaO, and 6 P₂O₅ and 24 Na₂O. The melting process for the elaboration of the bioactive glass use silicon oxide (SiO₂), Sodium metasilicate (Na₂SiO₃), Sodium metaphosphate (Na₃P₃O₉), Calcium metasilicate (CaSiO₃). These elements were weighed then mixed in a polyethene container for 2 hours in a planetary mixer. Origin and purity of these chemicals can be seen in table 1.

Table 1. Origin and purity of products for the melting process.

Chemical Name	Source	Mole fraction purity ^a
Silicon oxide (SiO₂)	Sigma-Aldrich Chemistry	0.9980
Sodium metasilicate (Na₂SiO₃)	Fisher chemical	≥ 0.97
Sodium metaphosphate (Na₃P₃O₉)	Alfa Aesar	0.95
Calcium metasilicate (CaSiO₃)	Alfa Aesar	≥ 0.97

^a Purity of these elements has been controlled but has not been purified again.

Premixed materials were melted in a platinum crucible placed in an electric furnace. The first rise of temperature rate was 10 °C min⁻¹ from 20 °C to 900 °C for a duration of 1 hour to decarbonate all products previously prepared, it is the calcination phase. After this first step, a new rise of temperature at 20 °C min⁻¹ was conducted. The temperature was stabilized to 1350 °C for 3 additional hours, it is the melting phase. The thermal elaboration process is described in figure 1. After this 3-hour period of melting, the sample was air quenched and transferred to a preheated brass mould. The last step, the glass has been annealed at T_g ± 20 K (540 °C for 46S6) for 4 hours to stabilize the glass and to reduce physical tensions due to a brutal decrease in temperature during quenching. After this thermic treatment, the glass will be crushed to micrometres then subdued through a sieve to recover 60 ± 15 µm glass powder.

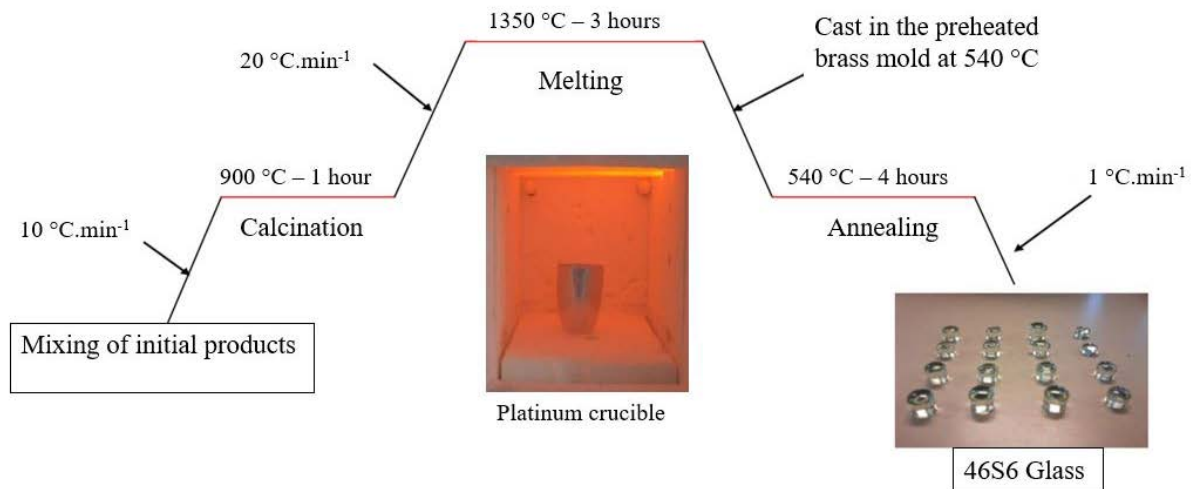


Figure 1. Thermal elaboration process for melting-made glass.

2.1.2 Nano bioactive glass (NBG) synthesis process. The nano bioactive glass (NBG) synthesized in this study is a ternary NBG with the following molar percentage composition: 55 SiO₂, 40 CaO, and 5 P₂O₅. The material was prepared from tetraethyl orthosilicate (TEOS), sodium trimetaphosphate (Na₃P₃O₉), calcium nitrate tetrahydrate (Ca(NO₃)₂ 4H₂O) and ammonia (NH₃ H₂O). Furthermore, Octanol, Triton® X-100, and cyclohexane were also used as a surfactant and oil phase to prepare the emulsion. In this water in oil emulsion, the aqueous phase is dispersed to form microdroplets protect by a monolayer of surfactant molecules. The origin and purity of the product can be seen in table 2.

Table 2. Origin and purity of products for the sol-gel process.

Chemical Name	Source	Mole fraction purity ^a
Tetraethyl Orthosilicate (TEOS: SiC ₈ H ₂₀ O ₄)	Merck	0.98
Sodium trimetaphosphate (Na ₃ P ₃ O ₉)	Alfa Aesar	≥ 0.95
Calcium nitrate tetrahydrate (Ca ₂ N ₂ O ₆ 4H ₂ O)	Merck	0.99
Ammonia (NH₃ H₂O)	Carlo Erba Reagents	≥ 0.95
Octanol	Alfa Aesar	0.99
Triton® X100	Alfa Aesar	0.99
Cyclohexane	Fisher Chemical	≥ 0.95

^a Purity of these elements has been controlled but has not been purified again

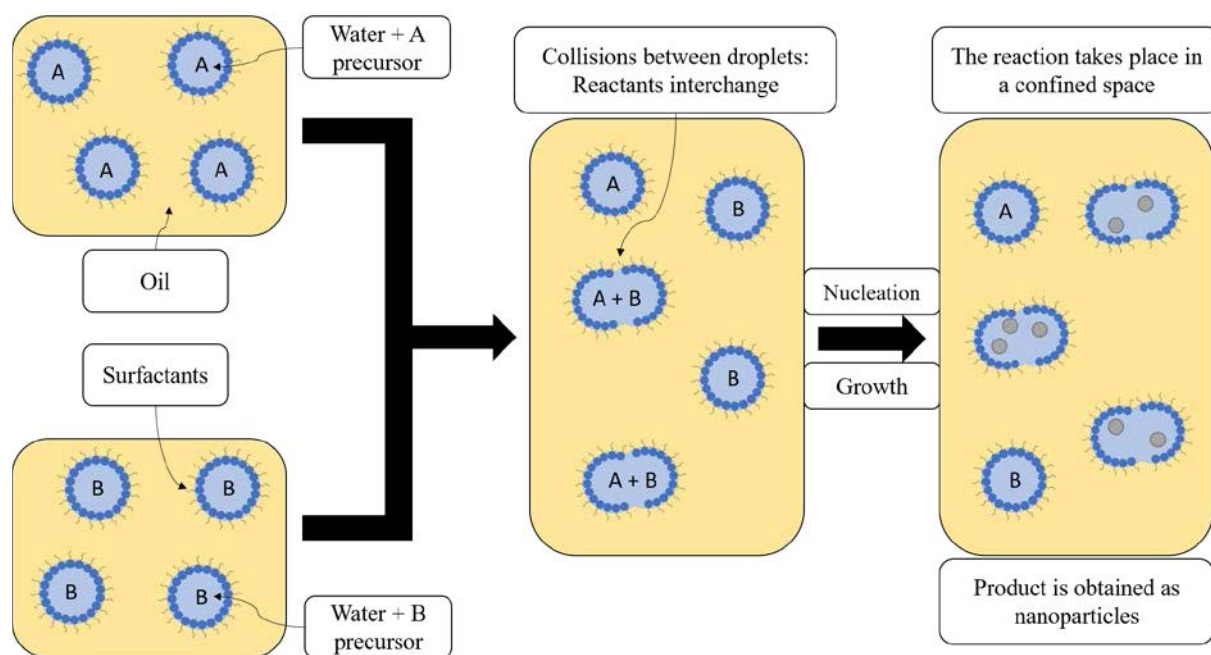


Figure 2. Diagram of the synthesis system for emulsion.

This process is based on the preparation and mixing of two different emulsions A and B. Emulsion A is an aqueous ammonia phase containing TEOS and sodium trimetaphosphate. To this emulsion will be added the two surfactants (Triton® X-100 and octanol) and the oil phase (cyclohexane). This mixture will remain strongly stirred for one hour to allow the hydrolyzation of TEOS and sodium trimetaphosphate. Emulsion B is an aqueous phase based on calcium nitrate tetrahydrate, to which will also be added the same two surfactants and cyclohexane. This synthesis system is presented in a diagram in figure 2. Both emulsion compositions are resumed in table 3.

Table 3. Composition of each emulsions.

	Emulsion A	Emulsion B
Aqueous phase	Ammonia, water	Calcium nitrate tetrahydrate, water
Surfactants	Triton® X-100, Octanol	Triton® X-100, Octanol
Oil phase	Cyclohexane	Cyclohexane

After their separated preparation, the two emulsions were mixed together for a duration of 1 hour under a constant and vigorous speed then stirring have been stopped and the preparation let to rest for 45 minutes.

After this growing time, a white product was collected by centrifugal (6000 g) and washed repeatedly with ethanol to eliminate the most surfactant. Finally, drying to solid at 100 °C for 4 h and calcinated at 620 °C for 4 h to eliminate all surfactant trace.

2.2 Physicochemical characterization techniques

2.2.1 Size and specific area measurement. The determination of the size distribution of the synthesized nano particles was obtained using Dynamic Light Scattering (DLS) through Zetasier (Nano ZS, Malvern). This technique was used to measure the hydrodynamic diameter of the nanoparticles from 1 nm to 10 µm with ± 0.4 nm using the diffraction of light. Theses hydrodynamic measurements were performed at a 90 ° angle, after the dilution of the sample ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) in a saline solution to maintain

Brownian motion. The particles were dispersed in the saline solution for 15 min in an ultrasound bath to disperse possibly-formed agglomerates.

The specific surface area was calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) N₂ adsorption-desorption method (Flowsorb II 2300, Coultronics France SA), the total pore volume and the average pore diameter are also determined.

2.2.2 Thermal analysis. Thermal characteristics of the elaborated glasses (nano and micro) have been measured by using Differential Scanning Calorimetry (DSC). Measurements of thermal characteristics were carried out by means of a Setaram Labsys 1600TG-DTA/DSC thermal analyser under N₂ gas atmosphere at 0.1 MPa without pressure control. This analyser has been calibrated using a 3-peak calibration with SrCO₃, BaCO₃, and K₂CrO₄. First experimentation has been made using the same platinum crucible of 100 µL as the one used for all the analyses to eliminate the effect of the crucible in results. The microbalance sensitivity of the thermogravimetric simultaneous thermal analyser is better than 0.1 µg and its temperature precision is ± 1 K. DSC signal is used in this work. Bioactive glasses were studied at a heating rate of 5 °C min⁻¹ raised from room temperature (around 20-25 °C) to 1350 °C. Each time, 40 ± 0.1 mg of glass powder was heated in a platinum crucible and at the same time, another empty platinum crucible was used as control (differential measurement).

2.2.3 Structure and functional groupings in elaborated materials. X-ray Diffraction (XRD) and Fourier transformed Infra-Red spectroscopy (FT-IR) have been used to control physicochemical properties of elaborated glasses. The control of the amorphous nature and the potential formation of new functional groups in these compounds were the main objectives of this characterization.

XRD patterns were recorded between 5 and 90 ° (2θ) by a PANalytical X'Pert PRO diffractometer with a precision of 0.026 ° by steps and a count time of 40 s per step using Cu Kα. Voltage was of 50 kV and the current was 40 mA during analyses. Powdered samples were prepared for XRD analysis and back-loaded into steel sample holders.

For FT-IR analysis, samples were embedded in KBr pellets and recorded by Bruker Equinox 55 spectrometer between 4000 cm⁻¹ and 400 cm⁻¹ in transmittance mode with a resolution of 2 cm⁻¹. FT-IR and XRD analyses were carried out at ambient temperature.

2.3 Soaking preparation for in vitro chemical reactivity for bioactive glasses

The in vitro bioactivity was evaluated by the immersion of 30 mg of nanopowder and 30 mg of micropowder in 60 ml of SBF [19] in the same conditions. The chemical composition of SBF is presented in table 4 and similar to the chemical composition of human blood plasma. These tests have been carried out for different duration of soaking composed by short (2, 4, 8, 16 h, 1, 3 days) or long delay (2 weeks, 1, and 2 months) and maintained at 37 °C under constant stirring. After soaking, samples have been removed from the SBF solution, rinsed with water and ethanol and dried at 75 °C for 3 h. The structure of each sample was analysed by XRD.

Table 4. Ionic composition of SBF compare to human blood plasma.

Ions (mM)	Na ⁺	K ⁺	Mg ₂ ⁺	Ca ₂ ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

Experimental concentration uncertainties u(C) = ± 0.1 mM.

2.4 Cytotoxicity tests

Cytotoxicity tests have been made for both glasses. The cytotoxicity of the micrometric glass has been studied and described in further research [20]. Due to the unknown harmfulness of nanoparticle powder, these tests have been made in a diluted solution of tween 20® added to a solution of Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM). The DMEM is a solution used for the supply of nutrients necessary for the maintenance and proliferation of different types of cells in vitro. Cytotoxicity tests have been made for two different cell line: SaOs-2 (osteoblastic) and EA.hy926 (endothelial), two durations: 3 and 24 hours and three different concentration of nanoparticles: 25, 10, 1 µg/mL [21].

2.5 Statistical analysis.

For all the tests, data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments.

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical characterization of glasses

3.1.1 Size and specific area of melting and sol-gel bioactive glasses. Dynamic light scattering results show spherical particles with medium size around 110 nm for the sol-gel-made glass as shown in figure 3.

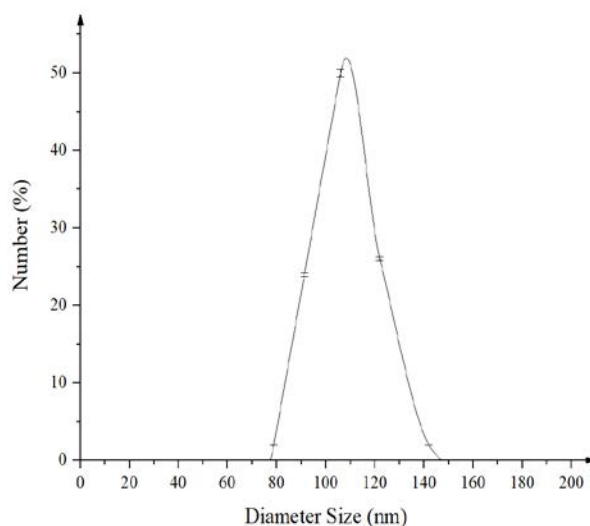


Figure 3. Size distribution of the nano bioactive glass using DLS.

The size of the glass particles synthesized by melting is ensured using sieves allowing the sizes to pass less than 40 µm and preventing the passage of sizes greater than 63 µm it results most of the particles are around 60 µm. BET obtained result show that the surface area decreases in function of particles size, from 69.4 to 1.1 m² g⁻¹. These results can be seen in table 5

Table 5. Surface area, pore volume and pore diameter of studied glasses.

Glass size	Surface area (m ² g ⁻¹) ^a	Pore volume (cm ³ g ⁻¹) ^b	Pore diameter (Å) ^c
110 nm	69.4	0.131	72.08
60 µm	1.1	0.001	33.16

^a Experimental surface area uncertainty $u(sa) = 0.1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

^b Experimental pore volume uncertainty $u(pv) = 0.01 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

^c Experimental pore diameter uncertainty $u(pd) = 0.01 \text{ \AA}$.

A higher specific surface area enables a faster ion release for bioactive materials. This rise in ion release and ions transfer allow the possibility to obtain high healing kinetic for biomaterials.

3.1.2 Thermal analysis results of studied bioactive glasses. Each DSC spectra show the presence of a glass transition temperature, a crystallisation temperature and a melting temperature respectively called as T_g , T_c and T_f . According to literature [22], each synthesized material may be a glass. DSC spectra of materials are presented in figure 4 and 5.

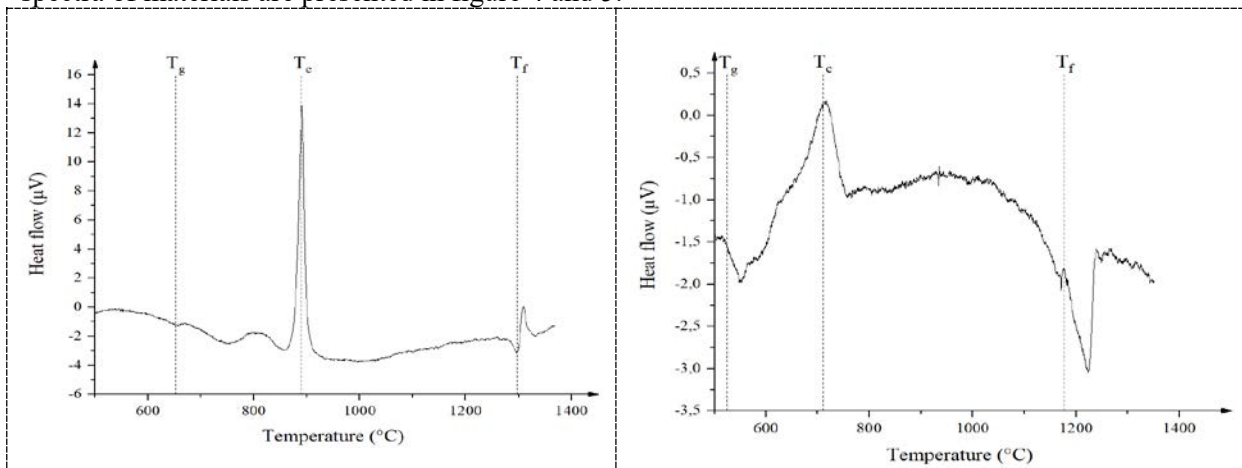


Figure 4. DSC of the sol-gel-made nano glass.

Figure 5. DSC of the melting-made micro glass.

3.1.3 Structure and functional grouping of bioactives glasses after soaking. FTIR results shown similar results for both glasses. The vibration strips at 470 cm^{-1} and 1200 cm^{-1} correspond to characteristic Si-O-Si bonds. While the vibration strips at 1400 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 925 cm^{-1} and 567 cm^{-1} correspond to the phosphate and carbonate groups. These results are shown in figure 6.

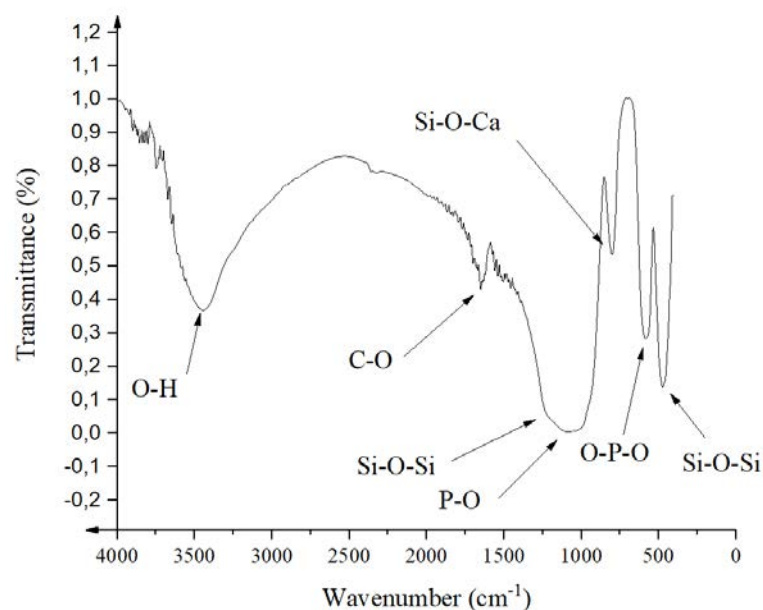


Figure 6. FTIR results of soaked glasses.

The XRD diffractogram of the micrometric material showed at figure 7 presents no sign of crystallisation before immersion. This diffractogram determine the micromaterial as glass. Results show a crystallisation of the glass into a similar form as the HA (use here as reference). The obtained results presented in this work show the first diffractograms with a crystallization effect. In the case of micrometric glass, it has been found that it is recognizable from the second week.

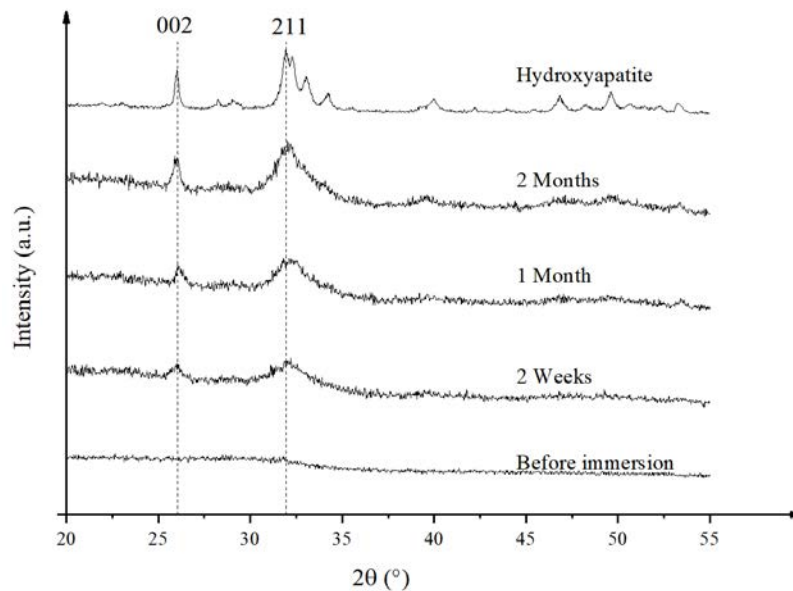


Figure 7. XRD diffractogram of melting-made micro glass before and after soaking.

The XRD diffractogram of the nanometric material showed at figure 8 doesn't presents sign of crystallisation before immersion. This diffractogram determine the nanomaterial as glass. Results show a crystallisation of the glass into a similar form as the HA. In the case of nanometric glass, it has been found that it is recognizable from the eighth hour.

The comparison between the two diffractograms allow to link the size of the bioactive particle with the specific surface area and the kinetic of crystallisation. In this case, the kinetics of crystallization is 4 times faster in the case of nanoscale bioactive glass when in that of micrometric glass whereas a factor of 70 separates their specific surface.

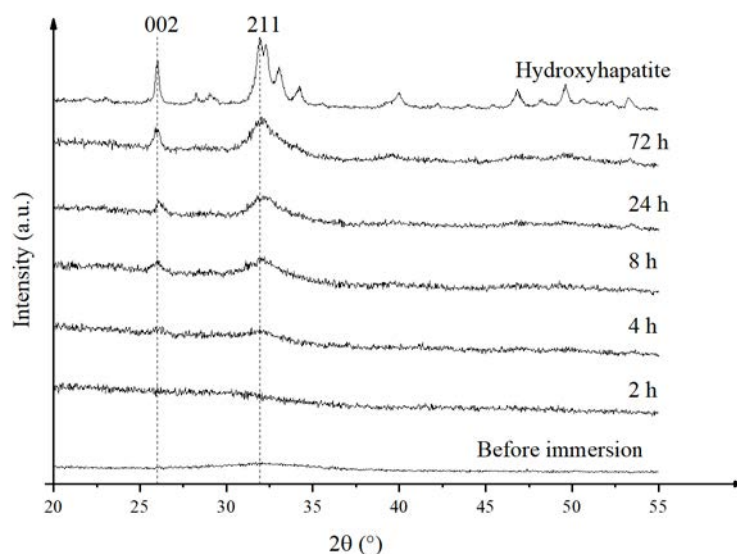


Figure 8. XRD diffractogram of sol-gel-made nano glass before and after soaking.

3.2 Cytotoxicity tests results

The cytotoxicity tests presented in figure 9 show that nanometric glass (110 nm) is relatively well tolerated by cells. These concentrations therefore have no toxicity for the cells studied. Nevertheless, the nanometric particles exhibit a phenomenon of aggregation once immersed in tween 20. The results therefore have great variation and are very difficult to reproduce as shown by the variations shown in the figure.

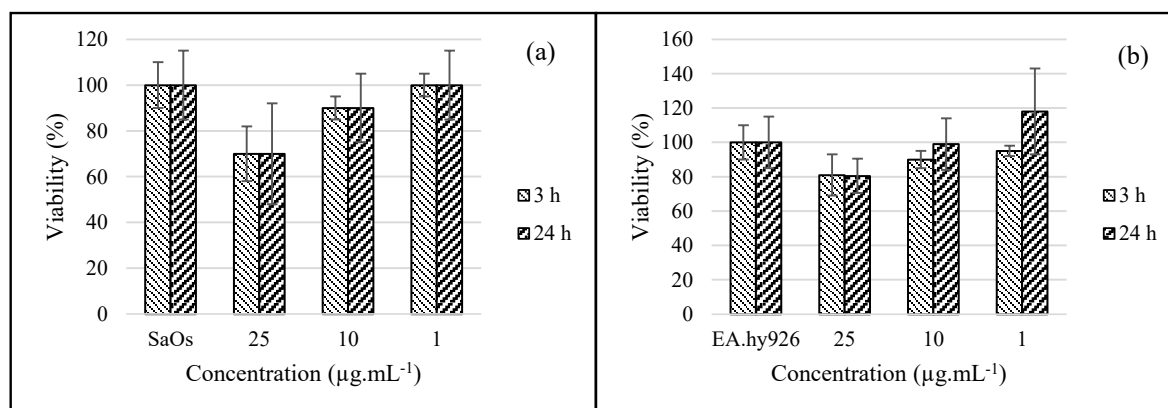


Figure 9. Viability of SaOs-2 (a) and EA.hy926 (b) cell lines as a function of nanoparticle concentration.

4. Conclusion

Despite major differences in the synthesis of the two materials presented in this article, the physicochemical characterization shows that they are bioactive glasses. Their characterisation highlights their amorphous nature and their capacity to form chemical bond and turn into crystal.

This study shows that changing the size of biomaterials causes changes in its specific surface area, pore size and ion exchanges capacity with its environment. In our case the reduction of a size ratio of 545 increases the specific surface area from 1.1 to 69.4 m² g⁻¹ and makes it possible to obtain a crystallization similar to 2 weeks of immersion in 3 days of immersion only for the case of nano bioactive glass of 110 nm.

Nevertheless, it is important to highlight other differences that may affect the kinetics of bioactivity of the glasses studied during this research. Indeed, the composition, therefore the chemical environment of the vitreous matrix plays an important role in the ion exchanges between the medium (here SBF) and the surface of the glass. Consequently, glasses properties and particularly their composition may lead to the change on the kinetic of bioactivity.

In the end, the comprehension of all the elements and more particularly of the interactions of these elements between them is very important. Accurate knowledge will allow the development of biomaterials, effective, adaptable depending on the nature of the lesion undergone, its location and the constitution of the patient. With the aim of deepening the interaction of the size of the bioactive glass nanotubes and the kinetics of bioactivity, a study has been initiated and in progress to have more data to yield significant statistics.

5. References

- [1] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC and Greenlee TK, 1971 *J. Biomed. Mater. Res.* **5** 117
- [2] Hench LL, 1998 *Biomaterials* **19** 1419
- [3] Hench LL, 2002 *Science* **295** 1014
- [4] Wers E, Oudadesse H, Lefevre B, Bureau B and Merdrignac-Conanec O, 2014 *Thermochimica Acta* **580** 79

- [5] Wers E, Oudadesse H, Lefeuvre B, Lucas-Girot A, Rocherullé J and Lebullenger R 2014 *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **117** 579
- [6] Wers E, Oudadesse H, Lefeuvre B, Merdrignac-Conanec O and Barroug A 2015 *Applied Surface Science* **353** 200
- [7] Franchini M, Lusvardi G, Malavasi G and Menabue L 2012 *Materials Science and Engineering: C* **32** 1401
- [8] Dietrich E, Oudadesse H, Lucas-Girot A, Le Gal Y, Jeanne S and Cathelineau G 2008 *Applied Surface Science* **255** 391
- [9] Zheng K and Boccaccini AR 2017 *Advances in Colloid and Interface Science* **249** 363
- [10] Hench LL and West JK 1990 *Chemical Reviews* **90** 33
- [11] Itoh H and Sugimoto T 2003 *Journal of Colloid and Interface Science* **265** 283
- [12] Lukowiak A, Lao J, Lacroix J and Nedelec JM. 2013 *Chemical Communications* **49** 6620
- [13] Nabian N, Jahanshahi M and Rabiee SM 2011 *Journal of Molecular Structure* **998** 37
- [14] Saboori A, Rabiee M, Moztarzadeh F, Sheikhi M, Tahriri M and Karimi M 2009 *Materials Science and Engineering: C* **29** 335
- [15] Hench L.L 1997 *Solid State Mater. Sci.* **2**, 604
- [16] Itoh H and Sugimoto T 2003 *J. Colloid Interface Sci.* **265** 283
- [17] Hench LL 2000 *Key Eng. Mater.* **192–195** 575
- [18] Rocton N, Oudadesse H and Lefeuvre B 2018 *Thermochimica Acta* **668** 58
- [19] Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S and Yamamuro T 1992 *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **3** 79
- [20] Oudadesse H, Dietrich E, Bui, XV, Le Gal Y, Pellen P and Cathelineau G 2011 *Applied Surface Science* **257** 8587
- [21] Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Neaime C, Nerambourg N, Cabello-Hurtado F, Cordier S, Grasset F and Jeanne S *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2018 3148
- [22] J Zarzycki, *Les verres et l'état vitreux*, 1st ed., Masson, Paris, 1982.



Full Length Article

Fine analysis of interaction mechanism of bioactive glass surface after soaking in SBF solution: AFM and ICP-OES investigations

Nicolas Rocton^a, Hassane Oudadesse^{a,*}, Bertrand Lefeuvre^a, Henrik Peisker^b, Khalid Rbii^b

^a Univ Rennes, CNRS, ISCR-UMR 6226, F-35000 Rennes, France

^b Nanosurf GmbH, Rheinstrasse 5, 63225 Langen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Bioactive glass
Surface behaviour
Hydroxyapatite
Bioactivity
Topography
Phases

ABSTRACT

Bioactive glasses have the physical characteristics enabling them to be used in bone tissue engineering applications. However, the exact mechanism of the interactions between the glass surface and environment leading to the transition from the vitreous phase to the crystalline phase remains a subject of study. This work focuses on the growth of a calcium phosphate layer on the surface of the glass after immersion in a mineral solution, which mimics the mineral phase of human blood. The investigations use the Inductively Coupled Plasma and the Atomic Force Microscopy to establish the kinetic of crystallization, the kinetic of chemical reactivity and the surface transformations such as structure, texture and morphology of the bioactive glass. Obtained results show the progressive formation of a hydroxyapatite layer within 2 weeks. This crystal which is that of the bone belongs to the crystallographic structure within space group of $P6_3/m$. In addition, results show a decrease of the gradient of thickness which varies according to the immersion time from $7.5 \mu\text{m}$ to $2.8 \mu\text{m}$ and an increase of the homogeneity of the surface visible by the lowering of the gradient in the phase measurement from 60 \AA to 15 \AA .

1. Introduction

In the field of biomedical research, many different compositions were studied for their biocompatible properties and their actions within the body. Bioactive glass in the $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ system has been widely studied and their utility in the bone restoration area has been accepted [1–5]. Since their invention [6–8], synthetic biomaterials have been considered a good option for replacing biological bone grafts. Indeed, nowadays, calcium phosphate, calcium carbonate and bioactive glasses are used as biomaterials in orthopaedic surgery. They present the advantages of being available in unlimited quantity, offering a more adaptable option outside of heterografts and xenografts and completely avoiding disease transmission. In addition, recent studies show the possibility of further benefit brought by these materials. They may have other advantages such as the functionalization of their surface for the transport of molecules [9] of biological interest and activates biological reactions useful for the restoration of bone tissue such as cell differentiation [10], osteogenesis and angiogenesis [11]. All these characteristics must be investigated during the engineering of new biomaterials. In fact, bioactivity, reaction kinetics and physicochemical analysis are essential in order to obtain data on the evolution of these materials over time. They help understanding physicochemical mechanisms responsible for surface transformations once in contact

with the physiological environment.

Nevertheless, the evolution over time of the biomaterials and the characteristics of the crystallization steps remains a topic of the current study. Atomic Force Microscope (AFM) [12] coupled with Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) enable us to analyse the surface behaviour at the nano/micro scale and its growth over the time of soaking. Before that, crystalline structure and functional groups have had to be highlighted. These analyses will follow the crystallographic structure evolutions and functional groups formation after contact with SBF. X-ray Diffraction (XRD) and Fourier Transformation Infra-Red (FTIR) techniques have been used. Complementarities between employed techniques such as XRD, FTIR, ICP-OES and AFM give a full range of information pertaining to the surface transformations from amorphous system to a calcium phosphate which is the mineral part of the mature bone. The hydroxyapatite crystal (HA) with chemical formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ layer is similar to the crystal composing human bones.

Analysis by phase imaging and chemical mapping used in this study can be used in the characterisation of inorganic as well as organic compounds and translate into a visible difference between each element [13,14]. In this study, this mechanic will be used to characterize the transformation of the surface of the materials from glass to mature bone crystals. The two main characteristics tracked have been the roughness

* Corresponding author.

E-mail address: hassane.oudadesse@univ-rennes1.fr (H. Oudadesse).

and the homogeneity of the surface. Roughness was measured using the gradient of the higher and lower part of the surface. Homogeneity was tracked by measuring vibrations of the AFM probe on the different surfaces, the change in reaction indicates a difference in the materials rugosity. In addition, measurements of layer thickness formed were made on the same samples as those used for roughness and homogeneity measurements in this work. Obtained results allow for a study of the transformation kinetics through the different phases of the crystallisation.

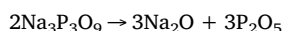
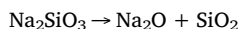
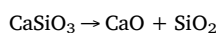
This study focuses on the synthesis of glass in the system $\text{SiO}_2\text{--Na}_2\text{O--CaO--P}_2\text{O}_5$ using the melting and quenching pathway. The chemical composition of the studied glass is 46% $\text{SiO}_2\text{--}24\%$ $\text{CaO--}24\%$ $\text{Na}_2\text{O--}6\%$ P_2O_5 called 46S6. It has been the subject of further studies within the laboratory [15,16] and present a high potential for applications on the biomedical field [17–19]. The synthesis and characterization of the 46S6 will be further discussed in this study. Such discussion will explore the different stages of development of the HA layer after immersion in a Simulated Body Fluid (SBF) for three different durations.

2. Material and methods

2.1. Preparation of bioactive glass

Sodium metasilicate (Na_2SiO_3 ; 42.06 wt%), calcium metasilicate (CaSiO_3 ; 49.51 wt%) and sodium metaphosphate ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$; 8.43 wt%) have been the initial products that were used to form the oxides SiO_2 ; CaO , Na_2O and P_2O_5 and obtain the desired composition of 46 wt% SiO_2 , 24 wt% CaO , 24 wt% Na_2O and 6 wt% P_2O_5 . Initial products have been weighed according to the quantity of glass required and mixed in a polyethylene bottle for 2 h in a planetary mixer. Origin and purity of these chemicals are presented in Table 1.

The mixed powder was melted in platinum crucibles because of its melting temperature of 1786 °C, it avoids metal releases or eventual contaminations. It was placed in an electric furnace. The first rise of temperatures rate was $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ from 20 to 900 °C for a duration of one hour corresponding to a decarbonization process in order to separate the different oxides. During this phase, following reactions took place:



This period is followed by a new rise of temperature at $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ until 1350 °C corresponding to our glass melting temperature. The melting phase consists of stabilization of the temperature at 1350 °C for three hours. The thermal elaboration process is described in Fig. 1.

After the melting phase, the sample was air quenched and transferred to a preheated cylindrical brass mould, annealed at $T_g = 540 \pm 20\text{ }^\circ\text{C}$ for 4 more hours to stabilize the glass in order to reduce physical tension due to the brutal loss of temperature during the air quenching.

Table 1
Origin and purity of products for the melting process.

Chemical Name	Source	Mole fraction purity ^a
Sodium metasilicate (Na_2SiO_3)	Fisher chemical	≥ 0.97
Sodium metaphosphate ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$)	Alfa Aesar	0.95
Calcium metasilicate (CaSiO_3)	Alfa Aesar	≥ 0.97

^a Purity of these elements has been controlled but elements have not been purified again.

2.2. Formatting the sample

Obtained cylinders of glasses have been put in wax. Following the waxing, each sample was polished in a moist environment so that only one side of the bioactive glass may be in contact with the physiological fluid during in vitro tests. In this way, the contact surface of the bioactive glass was identical for all samples. This polishing with silicon carbide paper (grain 2400) also removes the surface layer that may have been polluted. At the end of this operation, samples were rinsed using, alcohol and distilled water. Samples were shaped as small cylinders with a diameter of 13 mm for a high of 8 mm as shown in Fig. 2.

2.3. Physicochemical characterization techniques of elaborated glass

2.3.1. Thermal analysis

The glass thermal characteristics have been recorded by using Differential Scanning Calorimetry (DSC). Thermal characteristics measurements were carried out using a Setaram Labsys 1600TG-DTA/DSC thermal analyser under N_2 gas atmosphere at 0.1 MPa without precise pressure control.

2.3.2. Structure and functional groups investigations by using XRD and FTIR

X-ray Diffraction (XRD) and Fourier transformed Infra-Red spectroscopy (FTIR) have been used to control structure and functional groups of the elaborated glass. The control of the amorphous nature and the potential displacements and/or new functional groups formation in these compounds were the main objectives of this characterization.

XRD patterns were recorded between 5° and 90° (2θ) by a PANalytical X'Pert PRO diffractometer with a precision of 0.026° by steps and a count time of 40 s per step using $\text{Cu K}\alpha$. Voltage was of 50 kV and the current was 40 mA during analyses. Powdered samples were prepared for XRD analysis and back-loaded into steel sample holders.

For FTIR analysis, samples were embedded in KBr pellets and recorded by Bruker Equinox 55 spectrometer between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} in transmittance mode with a resolution of 2 cm^{-1} . XRD and FTIR analyses were carried out at ambient temperature.

2.3.3. Surface analysis by using AFM

Atomic Force Microscopy (AFM) has been used on the surface of the glass for three different immersion times corresponding to 2 weeks, 1 month and 2 months. The AFM operation mode used was phase imaging, sensitive to cantilever phase shifts due to changing interactions between the tip of the AFM cantilever and the surface. This enables topographical mapping of surfaces while simultaneously recording local material differences allowing surface structure and material domains to be directly compared. It is particularly useful in analysing polymers, composites, and surface coatings. Images have been obtained using a FlexV5+ Scanhead connected to a C3000 controller operating in Phase imaging mode in air with 158.614 kHz vibration frequency and 1.5 V vibration amplitude. Image analysis was done using Mountain Maps Software.

2.3.4. Thickness measurement of the formed hydroxyapatite layer

The thickness of the deposited layer was measured using a digital microscope with 3D measurement technology (VHX-5000, KEYENCE) with a precision of 0.1 μm . The deposited layer was scratched with a blade until the vitreous surface appeared, then the thickness was measured at different points of the sample to calculate an average.

2.4. In vitro assays

Soaking preparation for in vitro chemical reactivity has been carried out. Bioactive glass cylinders (8 mm of height and 13 mm of diameter) were placed in 8 mL of a previously prepared SBF solution. Only one

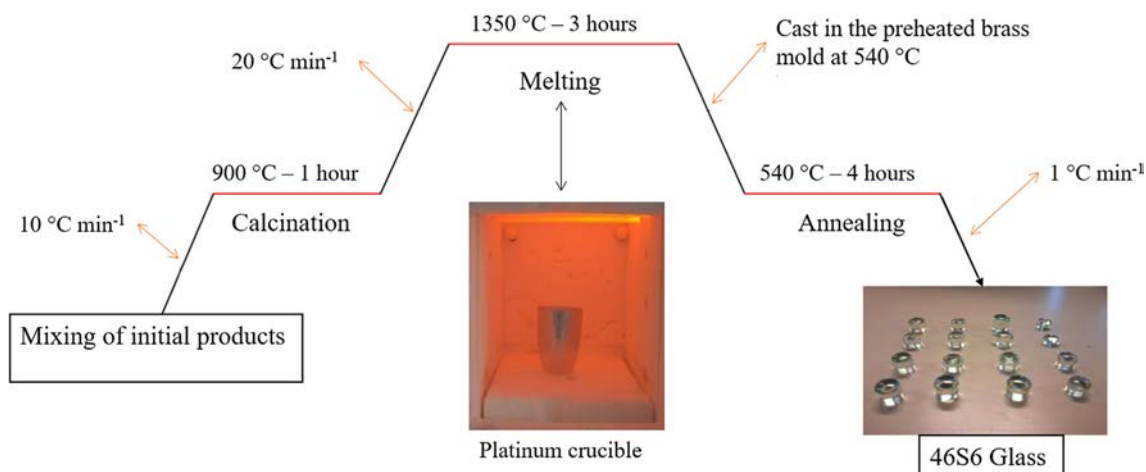


Fig. 1. Schema for the synthesis of 46S6.

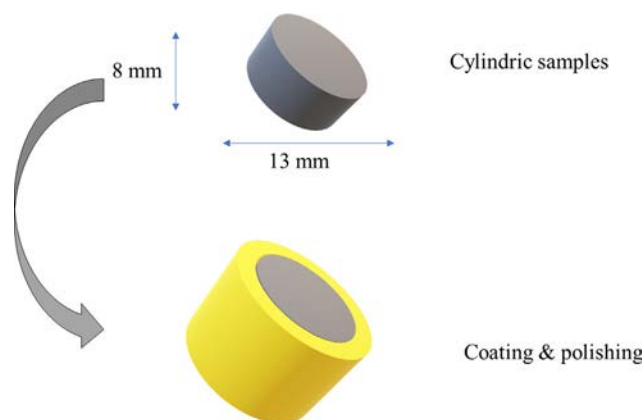


Fig. 2. Preparation of the sample's cylinders of glass/wax.

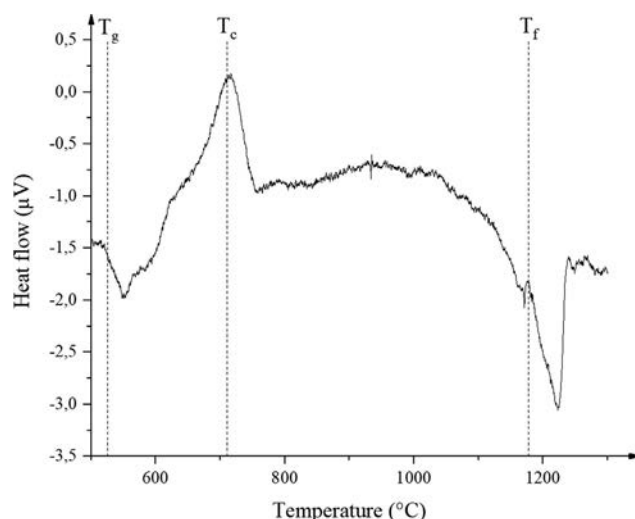


Fig. 3. DSC thermogram of 46S6.

Table 2

Ionic concentrations of SBF and human blood plasma.

Ions (Mm)	Na ⁺	K ⁺	Mg ₂ ⁺	Ca ₂ ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

surface of each cylinder has been in contact with SBF solution. Chemical composition of both SBF and human plasma are presented in Table 2 [20]. These samples were placed in an incubator with a controlled agitation of 50 revs min⁻¹ and 37 °C for fixed times. At the end of these times, each sample was rinsed thoroughly with distilled water and then dried at room temperature before shipping for AFM analysis. The SBF was also stored for analysis by ICP-OES. These analyses make it possible to highlight the ionic exchanges that took place between the surface of the immersed biomaterial and the synthetic physiological liquid. Concentrations of silicon (Si), phosphorus (P) and calcium (Ca) in remaining SBF were measured for all different periods.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization of bioactive glass

3.1.1. Thermal analysis of bioactive glass

DSC spectra show the presence of characteristic phase transition temperatures for a glass. The vitreous transition T_g, the crystallisation temperature T_c and the melting temperature T_f can be seen in Fig. 3. According to the literature [21], a glass must possess an amorphous

structure and vitreous transition temperature; these characteristics confirm that the synthesized material is a glass and validate our chemical experimental protocol.

3.1.2. Structure and functional grouping of studied bioactive glass

FTIR spectra for NBG powder presented in Fig. 4 show several vibration bands. The Si–O–Si bending signal at 465 cm⁻¹ and 1230 cm⁻¹ in relation with phosphate groups vibrations at 1100 cm⁻¹ and 585 cm⁻¹ and finally the Ca presence confirmed by the vibration bands at 800 cm⁻¹ assigned at Si–O–Ca with non-linking oxygen. The 3348 cm⁻¹ band are due to OH⁻ anions, a group from the residual H₂O adsorbed on the surface of NBG [22–26]. These results confirm the presence of all the typical groups.

XRD diffractograms presented in Fig. 5 shows signs of an increasing crystallization in the function of immersion time. This crystallization is due to the growth of a layer of the crystal similar to hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) on the surface of the 46S6 glass which was immersed in SBF. This information validates the bioactivity of the glass. These data also make it possible to set up an idea of crystallographic growth kinetics and different phases during the growth of the hydroxyapatite layer. The increase in immersion time leads to a growth in size and a decrease of the width at half height which can be observed on the two principal crystallisation peaks at 27° and 34°. This is probably due to the structuring of the different elements into each crystal phase.

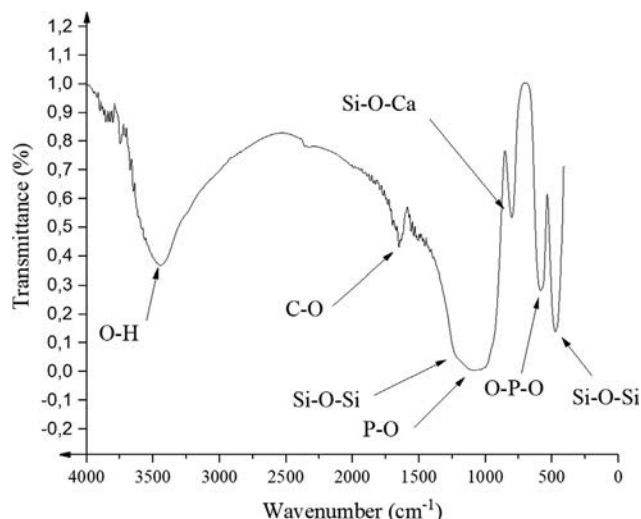


Fig. 4. FTIR spectra results of soaked 46S6.

3.1.3. Ionic exchanges and chemical reactivity of elaborated glass

The utilisation of the ICP-OES allows the measurement with high sensitivity and precise data (sensitivity of about 1 ppm depending on the analysed matrix). It allows for the determination of ionic exchanges established between the glass and the SBF. Measurements have been carried out on the remaining SBF solution. Obtained results show variations of concentration of observed elements Si, Ca and P. Si is an indicator of glass dissolution when Ca and P are indicators of calcium phosphate formation. While concentrations of Ca and P decrease with time, the Si concentration shows an increase due to the glass surface dissolution during the first 15 days that are followed by a significant stabilization. These results can be explained by the dissolution of the glass when it is in contact with SBF and the formation of a silica gel layer and finally the formation of a calcium phosphate crystal. This mechanism can be summarized in three successive phases: glass matrix dissolution followed by silica gel formation and then calcium phosphate precipitation. They are developed in five chemical stages as described

in Table 3. This result is in line with previous works [6]. Variation in the concentration of followed elements can be seen in Fig. 6.

3.2. Surface analysis using AFM

Surface analyses of the samples that have been immersed for different periods were investigated by using AFM technique. Obtained results are presented in Figs. 7–9: 2 conclusions can be drawn. The first one is the level gap and the second one is the homogeneity of the surface. 2 weeks after soaking, the topography results presented in Fig. 7a) show a variation of level with a maximum difference of 7.5 μm in thickness, this difference decreases with the increase of immersion time. Topography of the one month after soaking presented in Fig. 8a) represents a smaller gap of 4 μm . Finally, in Fig. 9a), 2 months after soaking, the topography shows a gap of 2.8 μm . Results show a decrease of the surface roughness due to the transformation of the glass surface into a calcium phosphate crystal.

Homogeneity of the surface is presented in the phase results. Homogeneity for the two weeks before soaking is presented in Fig. 7b), it shows significant variations between the high level and the low level, this gap is of about 60 \AA . This difference shows material contrast put forth by a clear and distinct variance of the surface composition. This observed phenomenon shows a crystalline structure, which is most likely due to the HA layer formation. Longer periods of immersion in SBF shows more of a uniform material signal with sphere-like structures with only a few defects pointing to the material difference. Furthermore, the phase level gap decreases with the increase of immersion time. Respectively within a range of 40 \AA and 15 \AA for the one month after soaking in SBF as shown in Fig. 8b) and the two months after soaking as shown in Fig. 9b). Phases and topography overlay are available in Figs. 7c), 8c), 9c) respectively for the two weeks, one month and two months after soaking in SBF solution.

3.3. Thickness measurement results

The measurements concerning the thickness of the hydroxyapatite layer formed show an increase in the thickness of the layer formed over time. The measurements made on the samples immersed two weeks has

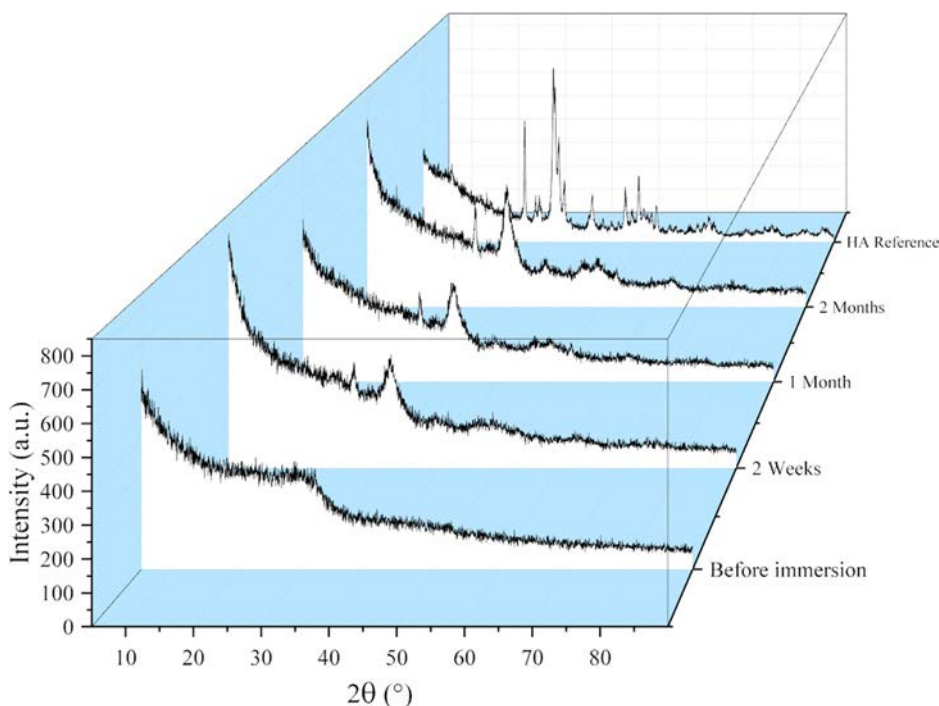


Fig. 5. DRX diffractogram of each sample from different immersion time.

Table 3
Reaction stages of bioactive glass.

Interaction mechanism between glass surface and SBF: Reaction stages	
Stage 1	Rapid exchange of cation such as Ca^{2+} with H^+ or H_3O^+ from solution: $\text{Si-O-Ca}^+ + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{Si-OH} + \text{Ca}^{2+}$
Stage 2	Loss of soluble silica in the form of Si(OH)_4 to the solution resulting from breakage of Si-O-Si bonds and formation of Si-OH at the glass/solution interface. $\text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O} = \text{Si-OH} + \text{OH-Si}$
Stage 3	Condensation and repolymerization of a SiO_2 rich layer on the surface depleted in alkali and alkaline earth cations. $\text{Si-OH} + \text{OH-Si} = \text{-Si-O-Si-} + \text{H}_2\text{O}$
Stage 4	Migration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} groups to the surface of forming CaO-PO_4^{3-} cluster on the top of the SiO_2 rich layer, followed by the growth of the amorphous CaP
Stage 5	Crystallization of amorphous CaP by incorporation of OH^- , CO_3^{2-} anions from solution to form a hydroxyl-carbonate apatite layer

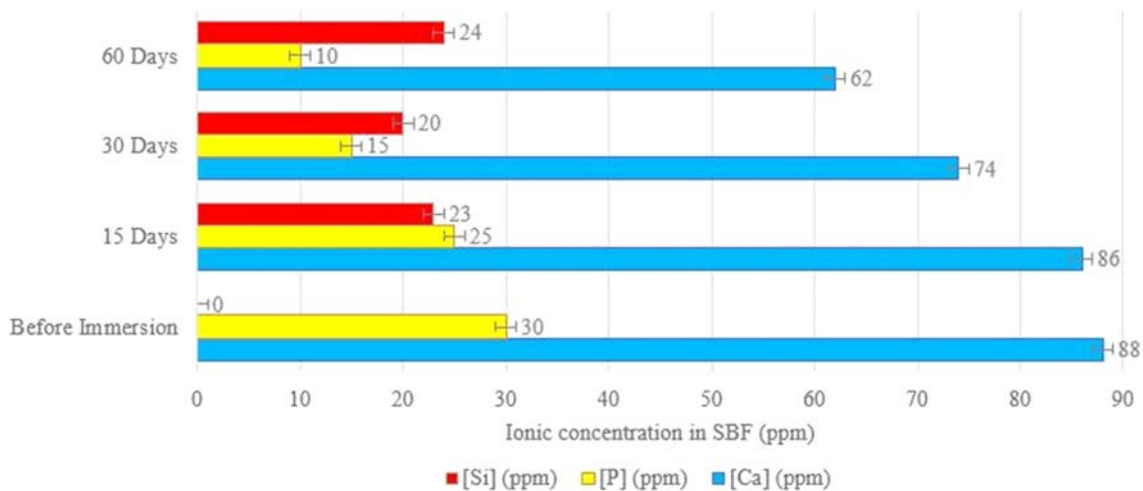


Fig. 6. Evolution of concentration of P, Si and Ca in SBF for different duration of immersion.

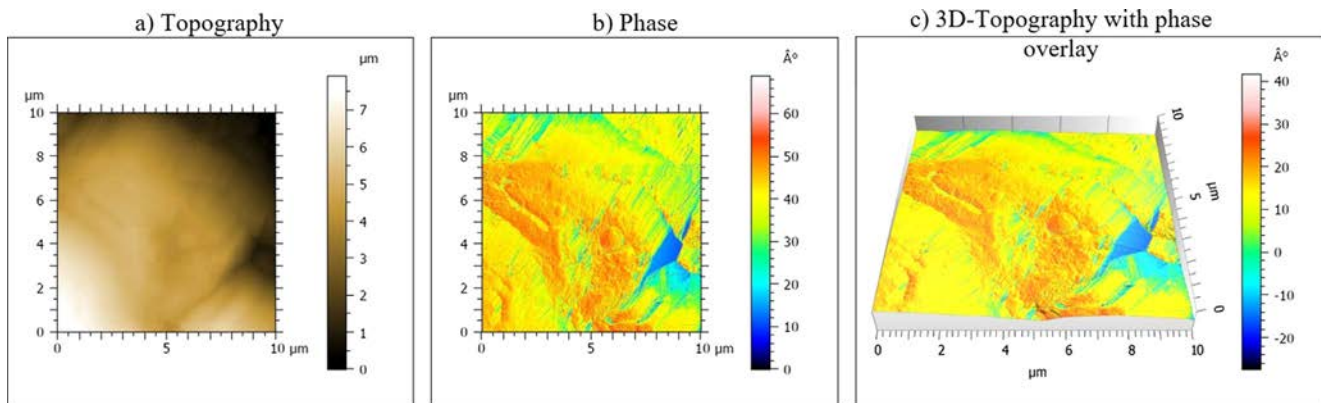


Fig. 7. Topography, phase and 3D topography with phase overlay of two weeks after soaking in SBF.

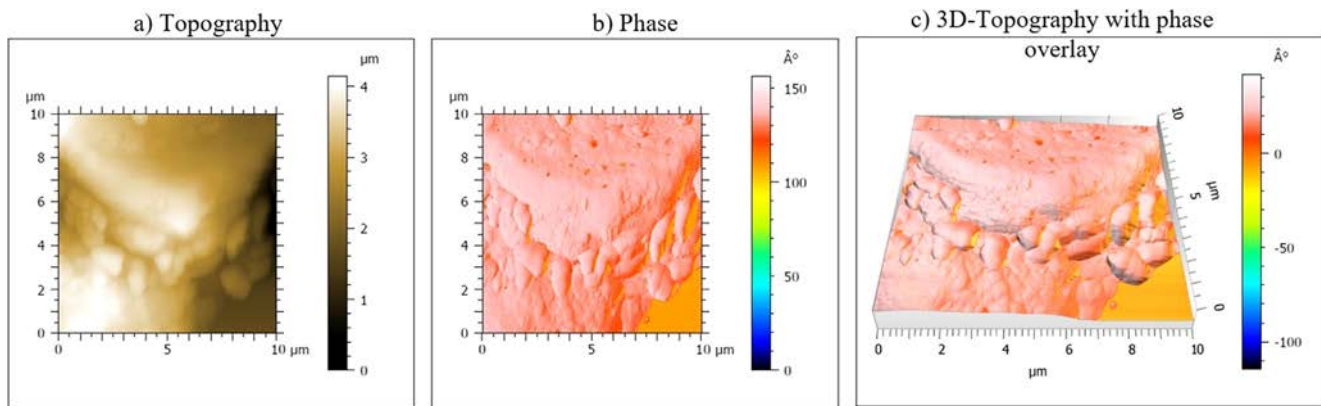


Fig. 8. Topography, phase and 3D topography with phase overlay of one month after soaking in SBF.

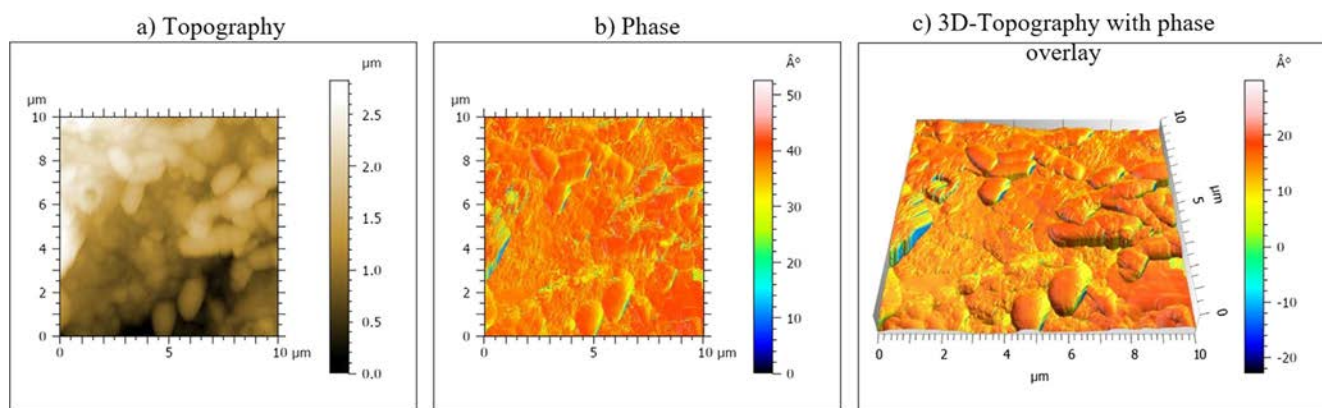


Fig. 9. Topography, phase and 3D topography with phase overlay of two months after soaking in SBF.

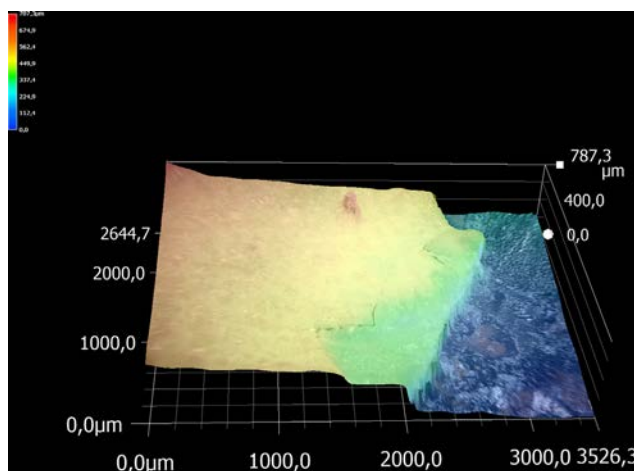


Fig. 10. Example of 3D photography for 2 months immersed sample.

an average thickness of 193.5 μm , the samples immersed for 1 month an average thickness of 248.3 μm and finally the samples immersed for 2 months an average thickness of 785.4 μm . An example of a 3D photography in the case of a sample immersed for 2 months is presented in Fig. 10.

4. Conclusion

The biomaterials 46S6 presented in this work presents all the characteristics of bioactive glass. Physicochemical characterization highlighted its amorphous nature and vitreous transition temperature and its capacity to form chemical bonds and turn into a crystal has been recorded.

Obtained results on the investigation of the surface state show the modification of the surface linked to the ionic exchanges between the materials and environment (SBF). These exchanges lead to changes in the surface state depending on the progress of the transformation of the vitreous matrix into the crystal.

The surface in contact with the liquid SBF has a progressive uniformity leading to a diminution of the roughness of its surface. This is observable using the AFM by the decrease of the level gap from 7.5 μm for the two weeks after soaking sample to 4 μm for the one month after soaking and finally to 2.8 μm for the two months after soaking sample. Another result is the homogenization of the surface due to the progressive crystallisation. Measurements show variations in the gap of phase from 60 \AA for two weeks sample to a range of 40 \AA and 15 \AA for respectively one month and two months.

In addition, measurements of the thickness of the formed layer show an increase in thickness over time. It goes from 193.5 μm for immersed

samples for 2 weeks to 785.4 μm for submerged samples for 2 months.

The objectives of this study were to enhance the comprehension of the chemical mechanism responsible for the interactions between glass and synthetic physiological liquid and then the surface behaviour of glass when it is in contact with physiological simulated solution. This knowledge allows for the development of better biomaterials, more adaptable in regard to the nature of the lesion or disease by understanding how the surface of the biomaterials undergo different modifications depending on the surrounding environment.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge François Chev r  and Franck Tessier for the X-ray diffraction analyses and Marco Portalupi (Nanosurf GmbH, Rheinstrasse 5, 63225 Langen, Germany) for the AFM measurements. Authors would like to thank University of Rennes 1 and CNRS, France for supporting funding of this work.

References

- [1] E. Wers, H. Oudadesse, B. Lefevre, B. Bureau, O. Merdrignac-Conanec, Thermal investigations of Ti and Ag-doped bioactive glasses, *Thermochim. Acta* 580 (2014) 79–84, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.02.001>.
- [2] E. Wers, H. Oudadesse, B. Lefevre, A. Lucas-Girot, J. Rocherullé, R. Leblengler, Excess entropy and thermal behavior of Cu- and Ti-doped bioactive glasses, *J. Therm. Anal. Calorim.* 117 (2014) 579–588, <https://doi.org/10.1007/s10973-014-3731-5>.
- [3] E. Wers, H. Oudadesse, B. Lefevre, O. Merdrignac-Conanec, A. Barroug, Evaluation of the kinetic and relaxation time of gentamicin sulfate released from hybrid biomaterial Bioglass-chitosan scaffolds, *Appl. Surf. Sci.* 353 (2015) 200–208, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.06.146>.
- [4] M. Franchini, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, Gallium-containing phosphosilicate glasses: synthesis and in vitro bioactivity, *Mater. Sci. Eng.: C* 32 (2012) 1401–1406, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.016>.
- [5] E. Dietrich, H. Oudadesse, A. Lucas-Girot, Y. Le Gal, S. Jeanne, G. Cathelineau, Effects of Mg and Zn on the surface of doped melt-derived glass for biomaterials applications, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 391–395, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.06.094>.
- [6] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 117–141, <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
- [7] L.L. Hench, Biomaterials: a forecast for the future, *Biomaterials* 19 (1998) 1419–1423, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00133-1).
- [8] L.L. Hench, Third-generation biomaterials, *Science* 295 (2002) 1014–1017, <https://doi.org/10.1126/science.1067404>.
- [9] Y. Xue, Z. Zhang, W. Niu, M. Chen, M. Wang, Y. Guo, C. Mao, C. Lin, B. Lei, Enhanced physiological stability and long-term toxicity/biodegradation in vitro/in vivo of monodispersed glycerolphosphate-functionalized bioactive glass nanoparticles, *Part. Part. Syst. Charact.* 36 (4) (2019) 1800507, <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800507>.
- [10] W. Niu, Y. Guo, Y. Xue, M. Chen, M. Wang, W. Cheng, B. Lei, Monodisperse branched molybdenum-based bioactive nanoparticles significantly promote osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells, *Part. Part. Syst. Charact.* 36 (7) (2019) 1900105, <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900105>.
- [11] T. Tian, W. Xie, W. Gao, G. Wang, L. Zeng, G. Miao, B. Lei, Z. Lin, X. Chen, Micro-nano bioactive glass particles incorporated porous scaffold for promoting osteogenesis and angiogenesis in vitro, *Front. Chem.* 7 (2019) 186, <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00186>.

- 3389/fchem.2019.00186.
- [12] N. Jalili, K. Laxminarayana, A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences, *Mechatronics* 14 (2004) 907–945, <https://doi.org/10.1016/j.mechatronics.2004.04.005>.
- [13] U. Maver, T. Velnar, M. Gaberšček, O. Planinšek, M. Finšgar, Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications, *TrAC Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 96–111, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.014>.
- [14] S. Rao, K.D. Costa, *Atomic Force Microscopy (AFM) in biomedical research, Biomedical Imaging*, Elsevier, 2014, pp. 41–64, <https://doi.org/10.1533/9780857097477.1.41>.
- [15] N. Rocton, H. Oudadesse, B. Lefeuvre, Comparison of Zn and Sr effects on thermal properties and on the excess entropy of doped glasses for use in the biomedical field, *Thermochim. Acta* 668 (2018) 58–64, <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.08.008>.
- [16] H. Oudadesse, E. Dietrich, X.V. Bui, Y. Le Gal, P. Pellen, G. Cathelineau, Enhancement of cells proliferation and control of bioactivity of strontium doped glass, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 8587–8593, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.05.022>.
- [17] L.L. Hench, Sol-gel materials for bioceramic applications, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2 (1997) 604–610, [https://doi.org/10.1016/S1359-0286\(97\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0286(97)80053-8).
- [18] H. Itoh, T. Sugimoto, Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles, *J. Colloid Interf. Sci.* 265 (2003) 283–295, [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00511-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00511-3).
- [19] L.L. Hench, A genetic theory of bioactive materials, *Key Eng. Mater.* 192–195 (2000) 575–580, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.575>.
- [20] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, T. Yamamuro, Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 3 (1992) 79–83, <https://doi.org/10.1007/BF00705272>.
- [21] J. Zarzycki, *Les verres et l'état vitreux*, first ed., Masson, Paris, 1982.
- [22] M. Mabouk, A.A. Mostafa, H. Oudadesse, E. Wers, A. Lucas-Girot, M.I. El-Gohary, Comparative study of nanobioactive glass quaternary system 46S6, *Bioceramics Dev. Appl.* (2016), <https://doi.org/10.4172/2090-5025.1000072> 04.
- [23] S. Kay, A. Thapa, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion, *Tissue Eng.* 8 (2002) 753–761, <https://doi.org/10.1089/10763270260424114>.
- [24] E. Palin, H. Liu, T.J. Webster, Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation, *Nanotechnology* 16 (2005) 1828–1835, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/9/069>.
- [25] T. Matsuda, J.E. Davies, The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass, *Biomaterials* 8 (1987) 275–284, [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(87\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(87)90115-3).
- [26] E.G. Hayman, M.D. Pierschbacher, S. Suzuki, E. Ruoslahti, Vitronectin—a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum, *Exp. Cell Res.* 160 (1985) 245–258.



Comparison of Zn and Sr effects on thermal properties and on the excess entropy of doped glasses for use in the biomedical field

Nicolas Rocton, Hassane Oudadesse*, Bertrand Lefeuvre

Univ Rennes, CNRS, ISCR-UMR 6226, F-35000, Rennes, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Bioactive glass
Zinc
Strontium
Thermal characteristics
Excess entropy

ABSTRACT

This research is based on the study of thermal behaviour of bioactive glass in the quaternary system $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ doped with metallic elements such as Zn and Sr destined for use as bone biomaterial. It encompasses glass transition temperature, crystallization temperature and melting temperature. This work is based on both determination and comparison of the effects of Zn and Sr on thermal characteristics after their introduction in the glass matrix. Thermal stability and excess entropy of all studied glasses have been calculated. Obtained results highlight the different effects of doping on the glasses thermal behaviour. Most notable effects are the sharp decrease of melting temperature of 10 wt% Zn-doped glass and the increase of crystallization temperature of 10 wt% Sr-doped glass. Furthermore, excess entropy of pure glass increases with addition of Sr and decreases with addition of Zn.

1. Introduction

Synthetic biomaterials are considered to be a good option for replacing bone grafts. They have the advantage of avoiding troubles linked to disease transmission, they are available in unlimited quantity, and they can be fitted for any person contrary to heterografts and xenografts. Use of synthetic biomaterials is well accepted and developed for bone restoration. Introduction of new synthetic materials for use in the biotechnological field requires precise studies to evaluate their biocompatibility and their physicochemical properties. Bioactive glasses, calcium phosphates and calcium carbonates are examples of synthetic materials used as biomaterials in orthopaedic surgery.

This work is focused on bioactive glasses. L. Hench discovered the first bioactive glass within the $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ system called Bioglass®. Since his discovery, different kind of glasses, having different chemical compositions, have been synthesized and studied [1]. Glass is an amorphous system with an unordered structure. Its structure includes variable chemical elements and oxides responsible for its matrix formation. Oxides used for synthesized glasses are classified into three groups according to their functions. The first group are the oxides, they have the capacity to form networks and produce glass without any other components; they are composed of metallic elements that can form chemical bonds with oxygen atoms. These oxides form polyhedrons that are tied by their peaks thus forming the vitreous network. The second group is the network modifying oxides, they are oxides that

are composed of alkaline and alkaline-earth elements. These elements introduced into the vitreous network will form discontinuities and crosslinking inducing reduction in viscosity of the glass [2]. Moreover, the introduction of alkaline-earth oxides like CaO will have a low impact on glass transition temperature. Meanwhile the introduction of an alkaline oxide, Na_2O for example, will reduce glass transition temperature of the bioactive glass [3].

Finally, intermediate elements include modifiers and former elements according to the chemical composition of the glasses. For this study, if there are not enough alkaline ions, Zn^{2+} will be a network modifier by creating two oxygen bridges. Alternatively, if there are enough alkaline ions, Zn^{2+} will be a network former [3].

In addition, it has been proven that ZnO nanofillers concentration significantly affects thermal properties due to its catalytic behaviour in the polymer matrix [4]. This addition of Zn^{2+} to silicate glasses improves its thermal and physical properties [2,5–7]. Furthermore, Zn is implicated in the lowering of melting temperatures and improves mechanical properties of the glass [8,9].

This study aims at investigating the effects of Zn and Sr on thermal characteristics of bioactive glasses such as glass transition temperature (T_g), crystallization temperature (T_c) and melting temperature (T_f). These have been determined by adjusting the contents of Zn and Sr. This work completes our previous research on the effects of metals such as Ti, Cu, and Ag on thermal behaviour of glasses [10–13].

Comparisons between pure glasses, Sr-doped glasses and Zn-doped

* Corresponding author.

E-mail address: hassane.oudadesse@univ-rennes1.fr (H. Oudadesse).

glasses have been carried out. Doping effects on the excess entropy (ΔS_{exc}) have also been studied. For each chemical composition of glass, ΔS_{exc} was calculated according to the variation of thermal characteristics of glasses. Above entropy matches the difference between melting entropy of crystal and entropy of glass. Contrary to crystals, prepared glasses are metastable, so they have an entropy different from null at $T = 0$ K and vary as a function of T_f [10]. This study is a logical follow-up on our previous studies [11–13].

Glass bioactivity is characterized by its ability to form a hydroxyapatite layer $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ on its surface when immersed in synthetic physiological fluid. This layer of hydroxyapatite is similar to mineral parts of the human bone. This capacity induces bone bonding and reinforces bone regrowth [14,15].

Zn is an important trace element in human bones; its presence improves biomineralization during in vitro and in vivo experiments [16–19]. It also takes part in the production of collagen [20], protein [21] and intervenes in more than 100 enzymatic processes [22]. It is also used as an anti-inflammatory agent [23].

Sr is also present in human bones, in the same quantity as Zn, it is mostly found on bone tissues [24–26]. Sr has multiple effects: it helps bone cells and bone formation during in vivo [27,28] experiments and is used as a drug for osteoporosis treatments [5].

Obtained results allow for a wider range of applications, particularly in the field of biotechnology including but not limited to: bone restoration, bones regrowth, or anti-bacteriological.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of bioactive glasses

Pure glasses, Zn-doped glasses, and Sr-doped glasses have been synthesized from the following composition: 46 wt% SiO_2 , 24 wt% CaO , 24 wt% Na_2O and 6 wt% P_2O_5 , this glass is called 46S6. This bioactive glass composition 46S6 has been studied by introducing into its matrix different concentrations of ZnO and SrO. After heating, the amount of Zn and Sr varies from 0.1 wt% to 10 wt% (46S6- X_{Zn} or 46S6- X_{Sr} where $X = 0$ wt%; 0.1 wt%; 1 wt%; 5 wt%; 8 wt% and 10 wt%). Low contents of each ion (0.1 wt% and 1 wt%) have been chosen for their link to their natural amount in bone. Other doping percentages used in this study are presented in Tables 1 and 2.

For the elaboration of the bioactive glass, SiO_2 , Na_2SiO_3 , $Na_3P_3O_9$, $CaSiO_3$, ZnO, and $SrCO_3$ were weighed and mixed in a polyethylene container for 2 h in a planetary mixer. Origin and purity of these chemicals can be see in Table 3.

The mixed powder was melted in platinum crucible placed in an electric furnace. The first rise of temperature rate was $10^\circ C \text{ min}^{-1}$ from $20^\circ C$ to $900^\circ C$ for a duration of 1 h to decarbonate all products previously mixed, it is the calcination phase. After this first step, a new rise of temperature at $20^\circ C \text{ min}^{-1}$ was conducted. The temperature was stabilized to $1350^\circ C$ for 3 additional hours, it is the melting phase. The thermal elaboration process is described in Fig. 1. After these 3-hour period of melting, the sample was air quenched and transferred to a

Table 1
Chemical compositions of pure and doped glasses (46S6- X_{Zn}) at 0.1 MPa.

Glass name	SiO_2 (wt%)	CaO (wt%)	Na_2O (wt%)	P_2O_5 (wt%)	ZnO (wt%)	Zn (wt%) ^a
46S6	46.00	24.00	24.00	6.00	0	0
46S6-0.1 _{Zn}	46.00	23.94	23.94	6.00	0.12	0.10
46S6-1 _{Zn}	46.00	23.38	23.38	6.00	1.24	1.00
46S6-5 _{Zn}	46.00	20.89	20.89	6.00	6.22	5.00
46S6-8 _{Zn}	46.00	19.04	19.04	6.00	9.92	8.00
46S6-10 _{Zn}	46.00	17.78	17.78	6.00	12.44	10.00

Standard uncertainty $u(P) = \pm 0.05$ MPa.

^a Represents the recalculated quantity of zinc added to the glass.

Table 2
Chemical compositions of pure and doped glasses (46S6- X_{Sr}) at 0.1 MPa.

Glass name	SiO_2 (wt%)	CaO (wt%)	Na_2O (wt%)	P_2O_5 (wt%)	SrO (wt%)	Sr (wt%) ^a
46S6	46.00	24.00	24.00	6.00	0	0
46S6-0.1 _{Sr}	46.00	23.94	23.94	6.00	0.12	0.10
46S6-1 _{Sr}	46.00	23.40	23.40	6.00	1.19	1.00
46S6-5 _{Sr}	46.00	21.02	21.02	6.00	5.95	5.00
46S6-8 _{Sr}	46.00	19.23	19.23	6.00	9.53	8.00
46S6-10 _{Sr}	46.00	18.04	18.04	6.00	11.91	10.00

Standard uncertainty $u(P) = \pm 0.05$ MPa.

^a Represents the recalculated quantity of strontium added to the glass.

Table 3
Origin and purity of products.

Chemical Name	Source	Mole fraction purity ^a
Silicon oxide (SiO_2)	Sigma-Aldrich Chemistry	0.9980
Sodium metasilicate (Na_2SiO_3)	Fisher chemical	≥ 0.97
Sodium metaphosphate ($Na_3P_3O_9$)	Alfa Aesar	0.95
Calcium metasilicate ($CaSiO_3$)	Alfa Aesar	≥ 0.97
Strontium carbonate ($SrCO_3$)	Sigma-Aldrich Chemistry	0.999
Zinc oxide (ZnO)	Acros Organics	0.995

^a Purity of these element has been controlled but has not been purified again.

preheated brass mold, annealed at $T_g \pm 20$ K ($540^\circ C$ for 46S6) for 4 h to stabilize the glass and to reduce physical tensions due to brutal decrease in temperature during quenching.

2.2. Thermal analysis

Thermal characteristics of the glass have been measured by using Differential Scanning Calorimetry (DSC). Measurements of thermal characteristics were carried out by means of a Setaram Labsys 1600TG-DTA/DSC (SETARAM Instrumentation, 7 rue de l'Oratoire, 69,300 Caluire, FRANCE) thermal analyser under N_2 gas atmosphere at 0.1 MPa without pressure control. This analyser has been calibrated using a 3-peak calibration with $SrCO_3$, $BaCO_3$, and K_2CrO_4 . A first experimentation has been made using the same platinum crucible of 100 μL as the one used for all the analyses to eliminate the effect of crucible in results. The microbalance sensitivity of the thermogravimetric simultaneous thermal analyser is better than $0.1 \mu g$ and its temperature precision is ± 1 K. DSC signal are used in this work. The onset temperature of crystallization ($T_{onset c}$) represents the beginning of the crystallization. The onset temperature of melting ($T_{onset f}$) represents the beginning of the melting. Bioactive glasses were studied at a heating rate of $5^\circ C \text{ min}^{-1}$ raised from room temperature (around 20 – $25^\circ C$) to $1350^\circ C$. Each time, 40 ± 0.1 mg of glass powder was heated in a platinum crucible and at the same time another empty platinum crucible was used as control (differential measurement). Thermal stability (TS) of bioactive glasses has been expressed by the difference between T_g and $T_{onset c}$ introduced by Dietzel [29,30]:

$$TS = T_{onset c} - T_g$$

Higher TS can be linked to a low glass crystallization tendency [31]. All elaborated compounds have been characterized by using several physicochemical techniques. Determination of latent fusion heats, temperatures and the processing of the thermograms were done using Setaram's Calisto software.

2.3. Structure and functional groupings in elaborated materials

X-ray Diffraction (XRD) and Fourier transformed Infra-Red

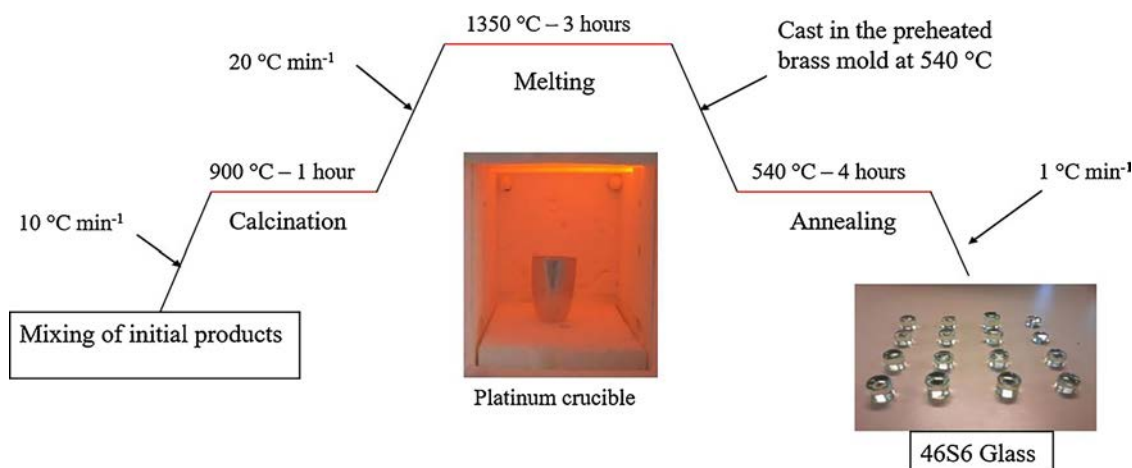


Fig. 1. 46S6 Glass synthesis scheme.

spectroscopy (FT-IR) have been used to control physicochemical properties of elaborated pure glass, Zn-doped glass and Sr-doped glass. The control of the amorphous nature and the potential formation of new functional groups in these compounds were the main objective of this characterization.

XRD patterns were recorded between 5 and 90° (2 θ) by a PANalytical X'Pert PRO diffractometer with a precision of 0.026° by steps and a count time of 40 s per step using Cu K α . Voltage was of 50 kV and the current was 40 mA during analyses. Powdered samples were prepared for XRD analysis and back-loaded into steel sample holders. For FT-IR analysis, samples were embedded in KBr pellets and recorded by Bruker Equinox 55 spectrometer between 4000 cm⁻¹ and 400 cm⁻¹ in transmittance mode with a resolution of 2 cm⁻¹. FT-IR and XRD analyses were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of doped bioactive glasses: XRD and FT-IR spectra

Obtained diffractograms of pure glass, Zn-doped glasses and Sr-doped glasses presented a diffraction halo from 20 to 40°(2 θ). Absence of peaks characterizes the amorphous property of elaborated materials. Amorphous character of bioactive glasses was not affected by the introduction of Zn or Sr with 0.1 wt% to 10 wt% contents as shown in Fig. 2.

The FT-IR spectra of bioactive glasses revealed several characteristic

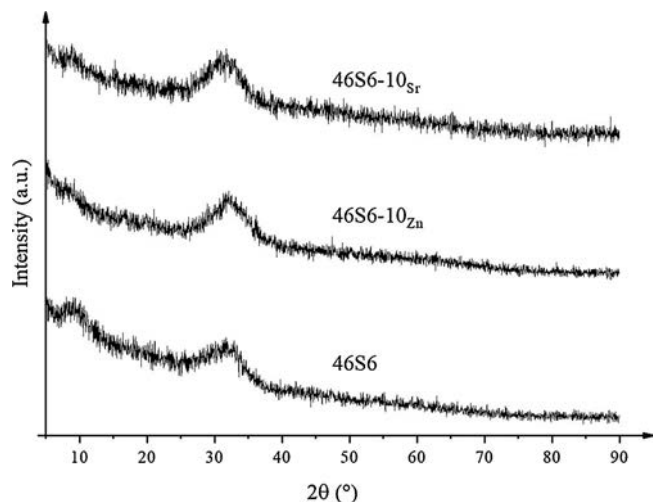


Fig. 2. XRD diffractograms of 46S6, 10 wt% Zn and 10 wt% Sr doped glasses.

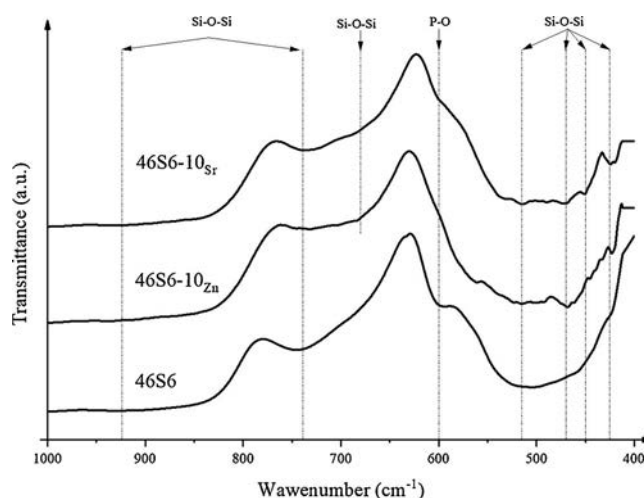


Fig. 3. FT-IR spectra for 46S6, Zn and Sr doped glasses.

bands as shown in Fig. 3. Concerning glass compound 46S6, the FT-IR spectra confirmed the presence of Si-O-Si chemical bond at 924 cm⁻¹, 748 cm⁻¹ and 510 cm⁻¹ to 430 cm⁻¹ and a P-O bond at 600 cm⁻¹. Change for the glasses doped with Sr and Zn at 600 cm⁻¹ reveals modification of the P-O bond probably due to addition of Zn, which replaces Na and Ca in the glass. The stronger electronegativity of Zn may lead to reduce the P-O bond where it disappears.

When Sr is added, the bond loses some force due to Ca and Na replacement within the structure. Also, the appearance of a small band at 680 cm⁻¹ on the 10 wt% Zn and 10 wt% Sr matches with the formation of a new Si-O-Si chemical bond probably due to internal structure modification such as the replacement of Ca by Sr and the stronger electronegativity of Zn.

3.2. Impact of Zn and Sr content on glass matrix thermal behaviour

3.2.1. Zn impact

The Zn effect on bioactive glasses varies as a function of the added amount. The amount of Na₂O and CaO decreases in function of the quantity of ZnO introduced in glasses while maintaining the Na₂O/CaO ratio equal to 1. DSC thermograms at the heating rate of 5 °C min⁻¹ are presented in Fig. 4. All thermograms present 3 variations corresponding to, respectively, T_g, T_c and T_f.

Variations of characteristic temperatures in function of the different Zn content show that the presence of Zn produces a low decrease in the T_g ($\Delta T_g = 5$ K) and variations in the T_c ($\Delta T_c = 14$ K). These low

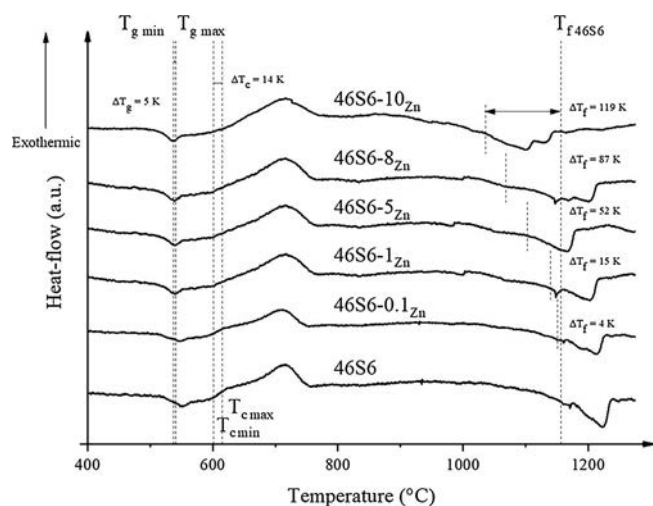


Fig. 4. DSC thermograms of 46S6 and Zn doped glasses.

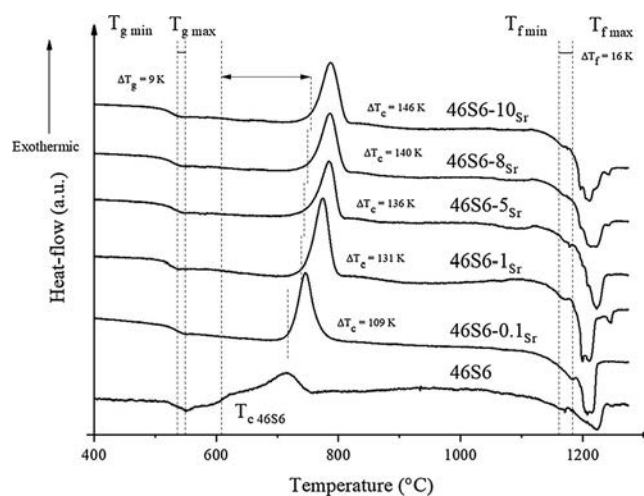


Fig. 5. DSC thermograms of 46S6 and Sr doped glasses.

Table 4

Experimental values of characteristic temperatures in functions of Zn content in the glass matrix at $P = 0.1$ MPa.

Glass name	T_g (°C) ^a	$T_{c\ onset}$ (°C) ^b	$T_{f\ onset}$ (°C) ^c	TS (K) ^d
46S6	541	608	1155	67
46S6-0.1 _{Zn}	537	605	1151	68
46S6-1 _{Zn}	538	605	1140	67
46S6-5 _{Zn}	536	604	1103	68
46S6-8 _{Zn}	536	615	1068	79
46S6-10 _{Zn}	537	601	1036	64

Standard uncertainty $u(P) = \pm 0.05$ MPa.

^a Experimental glass transition temperature uncertainty $u(T_g) = \pm 1$ K.

^b Experimental onset crystallization temperature uncertainty $u(T_c) = \pm 1$ K.

^c Experimental onset melting temperature uncertainty $u(T_f) = \pm 1$ K.

^d Experimental thermal stability uncertainty $u(TS) = \pm 2$ K.

decreases in T_g and T_c in all Zn-doped glasses could be due to the Zn effect on internal arrangements. This transformation is revealed in FT-IR spectra, but not detected by XRD patterns because of the detection limit of the used diffractometer detector. However, T_f undergoes an important variation in relation with Zn content in the glass matrix ($\Delta T_f = 119$ K). All characteristic temperatures of glasses doped with Zn can be seen in Table 4.

3.2.2. Sr impact

Effects on bioactive glasses doped with Sr depend on the amount of introduced Sr. Like in Zn-doped glasses, the amount of Na_2O and CaO decreases in relation of the quantity of SrO introduced in glasses. The introduction of SrO does not change the network structure because the two positive charges of Sr^{2+} are balanced and create two tetrahedrons linked by ionic bonds. In this way, glasses improve their chemical durability. DSC thermograms at 5°C min^{-1} heating rate are presented in Fig. 5. All the thermograms present 3 phenomena, corresponding respectively to the T_g , T_c , and T_f .

Obtained results show that Sr content has low effect on T_g and T_f , yet it has an important effect on T_c ($\Delta T_c = 146$ K).

Increase of the amount of Sr, which is an alkaline-earth element, induces variations of T_g from 541°C to 532°C ($\Delta T_g = 9$ K) and of T_f from 1139°C to 1155°C ($\Delta T_f = 16$ K). These variations are due to the association between the increased disruption in the glass network caused by slightly larger Sr cation and the weaker Sr-O bond strength. All characteristic temperatures of glasses doped with Sr can be seen in Table 5.

Table 5

Experimental values of characteristic temperatures in functions of Sr content in the glass matrix at $P = 0.1$ MPa.

Glass name	T_g (°C) ^a	$T_{c\ onset}$ (°C) ^b	$T_{f\ onset}$ (°C) ^c	TS (K) ^d
46S6	541	608	1155	67
46S6-0.1 _{Sr}	539	717	1139	178
46S6-1 _{Sr}	533	739	1141	206
46S6-5 _{Sr}	537	744	1153	207
46S6-8 _{Sr}	535	748	1151	213
46S6-10 _{Sr}	532	754	1144	222

Standard uncertainty $u(P) = \pm 0.05$ MPa.

^a Experimental glass transition temperature uncertainty $u(T_g) = \pm 1$ K.

^b Experimental onset crystallization temperature uncertainty $u(T_c) = \pm 1$ K.

^c Experimental onset melting temperature uncertainty $u(T_f) = \pm 1$ K.

^d Experimental thermal stability uncertainty $u(TS) = \pm 2$ K.

3.2.3. Comparison between Zn and Sr effect on T_f

The increase in the Zn amount induces the decrease of the T_f from 1155°C to 1136°C . TS stays stable due to the low variation in T_c and T_g when Zn amount varies from 0.1 wt% to 10 wt%.

These results highlight the effect of Zn amount on all thermal characteristics and particularly on TS. This effect could be explained by the rise of the network modifying ions needed to satisfy the environment of Zn^{2+} leading to modifications of the vitreous matrix.

The higher the concentration of ZnO is introduced into the glass, the more the ratio between the amount of network modifying ions and the amount of network modifying necessary to satisfy the environment of Zn^{2+} ions decrease. This could explain the decrease of T_f for doped glasses.

In a second part, results show that Sr effects are 11 times lesser than Zn one, as shown by the difference between the 5 wt% where $\Delta T_f = 50$ K and at 10 wt% where $\Delta T_f = 108$ K as shown in Fig. 6.

We established the mathematical relation between T_f and the quantity of dopant τ content as follows:

$$T_{fZn} = 1155 - 11 \cdot \tau_{Zn}$$

$$T_{fSr} = 1155 - 1 \cdot \tau_{Sr}$$

Where τ_{Zn} and τ_{Sr} are the amounts of introduced Zn and Sr in the glass matrix.

The value of 1155°C represents the T_f of the pure glass 46S6 ($\tau = 0$).

3.2.4. Comparison between Zr and Sr effects on T_c

Important increases of the T_c , from 608°C to 754°C have been

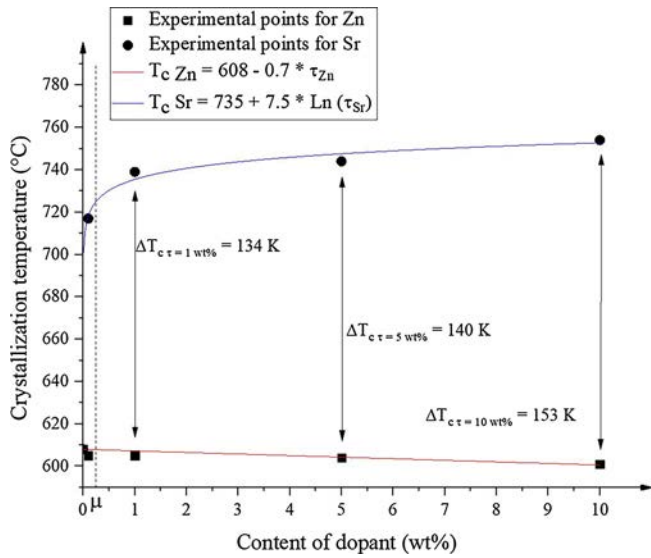


Fig. 6. Variations of T_f as a function of the Zn and Sr content.

observed with the addition of Sr. This effect may be explained by the fact that Sr inhibits bulk nucleation due to the suppression of the amorphous phase separation that is known to occur in the Sr-free glass [28] and not in this case.

As shown in Fig. 7, the inflection point is determined by the symbol μ ($\mu = 0.25\%$ by mass). It represents the amount of Sr at the maximum inhibition of the bulk nucleation. Beyond a concentration of 0.25 wt% in Sr, it becomes significantly less effective in crystallizing. This phenomenon can be attributed to the disorder in the structure of the glass brought by the replacement of Ca by Sr [32]. It can be observed by the difference between the T_c of each dopant: at ΔT_c for 1 wt%, 5 wt% and 10 wt%. The variation increases from 134 K to 153 K. With respect to the Zn effect, results show very low variations.

We established the mathematical relation between T_c and the quantity of dopant τ content as follows:

$$T_{c Zn} = 608 - 0.7 * \tau_{Zn}$$

$$T_{c Sr} = 735 + 7.5 * \ln(\tau_{Sr})$$

With τ_{Zn} and τ_{Sr} the amount of introduced Zn and Sr in glass.

The two different oxides we studied have different effects on thermal characteristics of glasses. While the quantity of Zn increases we observe a decrease in the T_f . In opposition, when the quantity of Sr

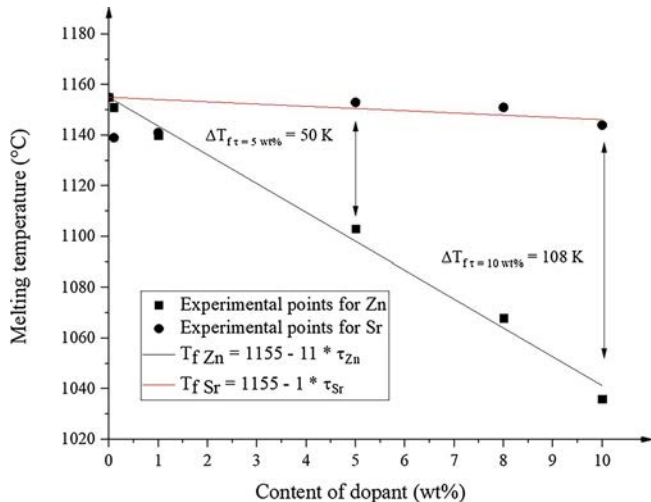


Fig. 7. Variations of T_c as a function of the Zn and Sr content.

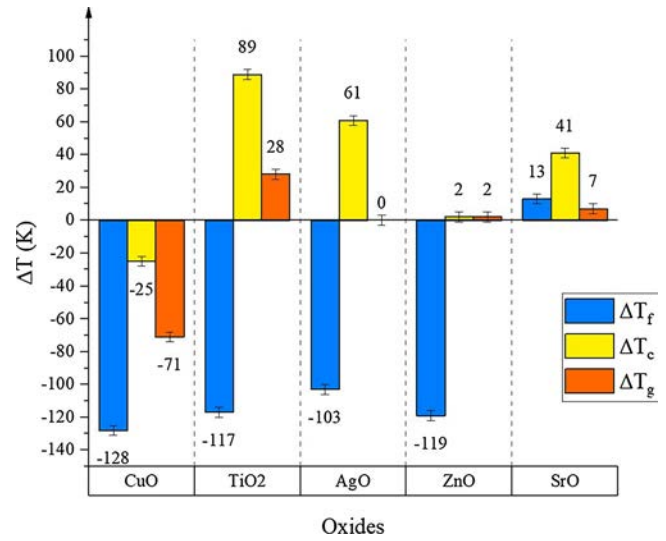


Fig. 8. Variation of different characteristic temperatures as a function of oxides: Ti, Cu, Zn, Sr and Ag.

increases we observe an increase of the T_c .

These modifications are due to their chemical particularities like their atomic radius, electronegativity, fusion point or their action in the structure of glass.

Comparisons with our previous works [11–13] have been made to improve information of the effects of several metallic elements on the glasses elaborations. In this stage, it includes: Ti, Cu, Zn, Sr and Ag. Obtained results are regrouped in Fig. 8. It shows that each metallic element presents a specific influence on T_g , T_c or T_f . Applications could be adapted in different scientific fields.

3.3. ΔS_{exc} of Zn and Sr doped glasses

This attempt consists in the calculation of entropy at a temperature equal to 0 K for Zn and Sr-doped glasses in the quaternary system SiO_2 - CaO - Na_2O - P_2O_5 .

Entropy of the liquid S_1 at a temperature $T > T_f$ during the transition from crystal to liquid is [10]:

$$S_1 = S_0 + \int_0^{T_f} c_{ps} \frac{dT}{T} + \frac{\Delta H_f}{T_f} + \int_{T_f}^T c_{pl} \frac{dT}{T}$$

Where c_{ps} specific heat of crystalline solid and c_{pl} specific heat of liquid

S_0 is the value of the entropy of the crystal at $T = 0$ K. $S_0 = 0$ according to Nernst's principle or third law of thermodynamics.

The same relation of S_1 is obtained when transitioning from glass to liquid.

$$S_1 = S'_0 + \int_0^{T_g} c_{pl} \frac{dT}{T} + \int_{T_g}^{T_f} c_{pl} \frac{dT}{T} + \int_{T_f}^{T_g} c_{pl} \frac{dT}{T}$$

Identification of the two equations conduces to the establishment of the entropy S'_0 of glass at $T = 0$ K with this relation:

$$S'_0 = \frac{\Delta H_f}{T_f} - \int_0^{T_f} (c_{pl} - c_{ps}) \frac{dT}{T}$$

The following relation leads us to the variation of the entropy:

$$\Delta S_{exc} = S(\text{liquid or glass}) - S(\text{crystal})$$

At $T < T_f$:

$$\Delta S_{exc} = \frac{\Delta H_f}{T_f} - \int_{T_g}^{T_f} (c_{pl} - c_{ps}) \frac{dT}{T}$$

Table 6

Experimental values of Excess entropy ΔS_{exc} for the system 46S6 doped with different amounts of Zn at P = 0.1 MPa.

	46S6	46S6-0.1Zn	46S6-1Zn	46S6-5Zn	46S6-8Zn	46S6-10Zn
L_f (J kg ⁻¹) ^a	120	118	77	61	58	56
T_g onset (K) ^b	814	810	811	809	809	810
T_f onset (K) ^c	1423	1424	1413	1376	1341	1309
ΔS_{exc} (J K ⁻¹ kg ⁻¹) ^d	83	81	53	43	42	41

Standard uncertainty u(P) = ± 0.05 MPa.

^a Experimental latent fusion heat uncertainty u(L_f) = ± 1 J kg⁻¹.

^b Experimental onset glass transition temperature uncertainty u(T_g) = ± 1 K.

^c Experimental onset melting temperature uncertainty u(T_f) = ± 1 K.

^d Experimental variation of Excess entropy uncertainty u(ΔS_{exc}) = ± 1 J K⁻¹ kg⁻¹.

Table 7

Experimental values of Excess entropy ΔS_{exc} for the system 46S6 doped with different amounts of Sr at P = 0.1 MPa.

	46S6	46S6-0.1Sr	46S6-1Sr	46S6-5Sr	46S6-8Sr	46S6-10Sr
L_f (J kg ⁻¹) ^a	120	156	230	352	431	483
T_g onset (K) ^b	814	812	806	810	808	805
T_f onset (K) ^c	1423	1412	1414	1426	1424	1414
ΔS_{exc} (J K ⁻¹ kg ⁻¹) ^d	83	110	162	246	301	340

Standard uncertainty u(P) = ± 0.05 MPa.

^a Experimental latent fusion heat uncertainty u(L_f) = ± 1 J kg⁻¹.

^b Experimental onset glass transition temperature uncertainty u(T_g) = ± 1 K.

^c Experimental onset melting temperature uncertainty u(T_f) = ± 1 K.

^d Experimental variation of Excess entropy uncertainty u(ΔS_{exc}) = ± 1 J K⁻¹ kg⁻¹.

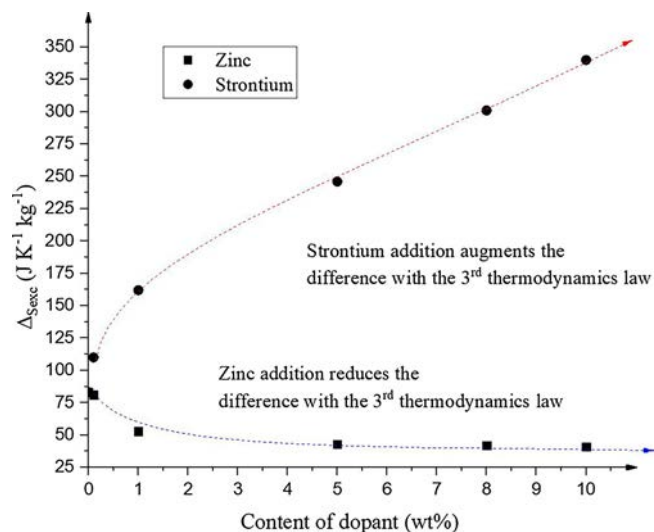


Fig. 9. ΔS_{exc} in function of Zn and Sr content.

$$\Delta S_{exc} = \frac{\Delta H_f}{T_f} - 2.09 \cdot \ln \frac{T_f}{T_g} + 0.48 \cdot 10^{-3} [T_f - T_g]$$

Results show that values of bioactive glasses 46S6, Zn-doped glasses and Sr-doped glasses are not equal to zero. However, ΔS_{exc} decreases from 83 J K⁻¹ kg⁻¹ to 41 J K⁻¹ kg⁻¹ for the Zn-doped glass as shown in Table 6 and increases from 83 J K⁻¹ kg⁻¹ to 340 J K⁻¹ kg⁻¹ for the Sr-doped glass as shown in Table 7. Our results are in line with the Zarzycki theory [10] and are presented on Fig. 9. The third law of

thermodynamics is not applicable to bioactive glasses elaborated in the quaternary system SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅.

However, we observe a contrary effect of Zn and Sr on ΔS_{exc} . While the quantity of Zn present in glass rises, we can observe a diminution of ΔS_{exc} . The opposite effect can be seen for the increase of Sr content. Diminution of ΔS_{exc} in the case of addition of Zn could be due to reinforcement of the bonding due to higher electronegativity of Zn in comparison to Ca and Na electronegativity. In contrast, rise of ΔS_{exc} by increasing the quantity of Sr may be explained by an augmentation of the atom size causing changes within the glass structure.

4. Conclusions

The characterization of bioactive glasses highlights their amorphous features and their capacity to form chemical bonds.

This study shows that the introduction of Sr induces an increase of both T_g and T_c , which leads to a significant rise in TS. Moreover, the introduction of Zn in the glass matrix causes modifications of thermal characteristics, mainly the decrease of T_f . Zn presence has an important impact on T_f and on TS of studied bioactive glasses. Increase of the Zn content induces a decrease of T_f and an increase of TS.

ΔS_{exc} of pure glass (83 J K⁻¹ kg⁻¹) increases with the addition of Sr and decreases with the addition of Zn, respectively to 340 J K⁻¹ kg⁻¹ and 41 J K⁻¹ kg⁻¹ depending on the amount of dopant. As developed in the discussion part of this article, the induced modification in the vitreous network has been caused by the substitution of Ca or Na by Zn or Sr. It is probably due to the electronegativity and atom sizes change. Chemical environments in the glass matrix also play an important role on the organisation and/or disorganisation on the microscopic structure of glasses. It may have an impact in interatomic distances in the vitreous matrix and can change the bonding strength of links resulting from this modification. Consequently, glasses properties and particularly its thermal behaviour lead to the change on thermal characteristics.

The understanding of thermal behaviour allowed to better control the impact of dopant in the chemical reactivity. In fact, depending on the content of the doping element, kinetic of glass degradation in contact with synthetic body fluids could be changed. A study of the bioactivity of these glasses has been initiated and is in progress. It needs more data to yield significant statistics.

References

- [1] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee Jr, Bonding mechanism at the interface of ceramics prosthetic materials, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* 5 (1971) 117.
- [2] H. Scholze, *Glas, Natur, Struktur und Eigenschaften*, Springer, Berlin, 1977.
- [3] J. Barton, C. Guillemet, *Le verre: science et technologie*, EDP Sciences, Les Ulis, 2004.
- [4] M.S. Gaur, P.K. Singh, R.S. Suruchi, Chauhan, Structural and thermal properties of polysulfone-ZnO nanocomposites, *J. Therm. Anal. Calorim.* 111 (2013) 743.
- [5] P.J. Meunier, D.O. Slosman, P.D. Delmas, J.L. Sebert, M.L. Brandi, C. Albanese, R. Lorenc, S. Pors-Nielsen, M.C. De Vernejoul, A. Roces, J.Y. Reginster, Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis a 2-year randomized placebo controlled trial, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (5) (2002) 2060.
- [6] R.G. Hill, A. Stamboulis, R.V. Law, A. Clifford, M.R. Towler, C. Crowley, The influence of Sr substitution in fluorapatite glass-ceramics, *J. Non-Cryst. Solids* 336 (2004) 223.
- [7] L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli, Qualitative and quantitative structure-property relationships analysis of multi-component bioglasses, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 4989.
- [8] P. Gao, Z. Xue, G. Liu, J. Zhang, Effects of Zn on the glass forming ability and mechanical properties of MgLi-based bulk metallic glasses, *J. Non-Cryst. Solids* 358 (2012) 8.
- [9] M. Karbasi, S. Saidi, G. Aryanpour, Study of structure and usage of mechanically alloyed nanocrystalline Ti-Cu-Zn powders in powder metallurgy, *Powder Metall.* 51 (2008) 250.
- [10] J. Zarzycki, *Les verres et l'état vitreux*, 1st ed., Masson, Paris, 1982.
- [11] E. Wers, H. Oudadesse, Thermal behaviour and excess entropy of bioactive glasses and Zn-doped glasses, *J. Therm. Anal. Calorim.* 115 (2013) 1.
- [12] E. Wers, H. Oudadesse, B. Lefevre, A. Lucas-Girot, J. Rocherulle, R. Lebullenger, Excess entropy and thermal behavior of Cu- and Ti-doped bioactive glasses, *J. Therm. Anal. Calorim.* 117 (2014) 579.

- [13] E. Wers, H. Oudadesse, B. Lefeuvre, B. Bureau, O. Merdrignac-Conanec, Thermal investigations of Ti and Ag-doped bioactive glasses, *Thermochim. Acta* 580 (2014) 79.
- [14] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, T. Yama, Effects of ions dissolved from bioactive glass-ceramic on surface apatite formation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4 (1993) 1.
- [15] M. Vallet-Reg, I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, Influence of P2O5 on crystallinity of apatite formed in vitro on surface of bioactive glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 46 (1999) 560.
- [16] H. Storrie, S.I. Stupp, Cellular response to zinc-containing organoapatite: an in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization, *Biomaterials* 26 (2005) 5492.
- [17] M. Yamaguchi, H. Oishi, Y. Suketa, Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture, *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 4007.
- [18] J. Eberle, S. Schmidmayer, R.G. Erben, M. Stangassinger, H.P. Roth, Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 13 (1999) 21.
- [19] D. Chen, L.C. Waite, J.W.M. Pierce, In vitro effects of zinc on markers of bone formation, *Biol. Trace Elem. Res.* 68 (1999) 225.
- [20] X. Wu, N. Itoh, T. Taniguchi, T. Nakanishi, Y. Tatsu, N. Yumoto, K. Tanaka, Zinc-induced sodium-dependent vitamin c transporter 2 expression: potent roles for osteoblast differentiation, *Arch. Biochem. Biophys.* 420 (2003) 114.
- [21] G.R. Sauer, R.E. Wuthier, Influence of trace metal ions on matrix vesicle calcification, *Bone Miner.* 17 (1992) 284.
- [22] G.R. Sauer, L.N.Y. Wu, M. Iijima, R.E. Wuthier, The influence of trace elements on calcium phosphate formation by matrix vesicles, *J. Inorg. Biochem.* 65 (1997) 57.
- [23] M. Yamaguchi, Role of zinc in bone formation and bone resorption, *J. Trace. Elem. Exp. Med.* 11 (1998) 119.
- [24] T. Molleson, Trace elements in human teeth, in: Gisela Grupe, Bernd Herrmann (Eds.), *Trace Elements in Environmental History*, 1988, p. 67 Göttingen.
- [25] G.C. Cotzias, Importance of trace substances in environmental health as exemplified by manganese, *Trace Subst. Environ. Health* 1 (1967) 5.
- [26] H. Oudadesse, S. Martin, A. Derrien, A. Lucas-Girot, G. Cathelineau, G. Blondiaux, Determination of Ca, P, Sr and Mg in the synthetic biomaterial aragonite by NAA, *J. Radioanal. Nuclear Chem.* 262 (2004) 479.
- [27] P.J. Marie, P. Ammann, G. Boivin, C. Rey, Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone, *Calcif. Tissue Int.* 69 (3) (2001) 121.
- [28] M. Yamaguchi, Role of zinc in bone formation and bone resorption, *J. Trace. Elem. Exp. Med.* 11 (2–3) (1998) 119.
- [29] A. Dietzel, Glasstruktur und Glaseigenschaften, *Glass Technol.* 22 (1968) 41.
- [30] V. Kumar, S. Sharma, O.P. Pandey, K. Singh, Thermal and physical properties of 30SrO–40SiO₂–20B₂O₃–10A₂O₃ (A = La, Y, Al) glasses and their chemical reaction with bismuth vanadate for SOFC, *Solid State Ion.* 181 (2010) 7.
- [31] I. Bardez, Etude des caractéristiques structurales et des propriétés de verres riches en terres rares destinés au confinement des produits de fission et éléments à vie longue, thesis of « Université Pierre et Marie », Curie Paris VI (2004).
- [32] R.G. Hill, A. Stamboulis, R.V. Law, A. Clifford, M.R. Towler, C. Crowley, The influence of strontium substitution in fluorapatite glasses and glass-ceramics, *J. Non-Cryst. Solids* 336 (2004) 223.

Titre : Élaboration de bioverres et de nanobioverres ostéoinducteurs associés à des molécules à usage thérapeutique

Mots clés : Bioverres et nanobioverres, synthèse par émulsion, bioactivité, molécules à usage thérapeutique, revêtement par électrophorèse, comportement *in vitro* et *in vivo*

Résumé : Ce travail concerne l'élaboration, l'étude physico-chimique et l'évaluation biologique de verres bioactifs purs et associés à des éléments chimiques ou à des molécules à usage thérapeutique. Les différents matériaux synthétisés par fusion et par voie sol-gel présentent un caractère amorphe à longue distance, et des propriétés thermiques caractéristiques des verres. Deux éléments dopants (Zn et Sr) ainsi qu'une molécule (phycocyanine) et une cyanobactérie (*Spirulina Platensis*) ont été introduits dans la matrice des bioverres élaborés. Leur réactivité chimique a été étudiée *in vitro* particulièrement les échanges solide/liquide physiologique (SBF). De plus, leur cytotoxicité (prolifération et adhésion cellulaire) a été évaluée lors des tests avec cellules. La bioactivité des verres et nanoverres bioactifs a été investiguée pour élucider la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée, cristal majoritaire de la matrice osseuse à la surface des verres bioactifs.

La synthèse par voie sol-gel et l'utilisation de la technique de l'émulsion ont permis l'élaboration de nanoparticules de verre bioactif de tailles maîtriser comprises entre 20 et 200 nm. Cette maîtrise ouvre de nombreuses possibilités d'applications dans le domaine de la nanotechnologie médicale. Ces particules ont été utilisées dans 2 applications différentes. Notre première expérimentation a été de créer deux types de bioimplants osseux composés du nanoverre seul et du nanoverre associé à une cyanobactérie. Cette étude a pour objectif de comparer les effets de la cyanobactérie lors de tests *in vitro* puis *in vivo*. Notre deuxième approche a porté sur le recouvrement d'un alliage biocompatible et l'étude des effets de la taille des particules sur les caractéristiques physico-chimiques de la couche ainsi formée.

Title: Development of osteo-inductors bioglasses and nanobioglasses associated with molecules for therapeutic use

Keywords: Bioglasses and nanobioglasses, emulsion synthesis, bioactivity, molecules for therapeutic use, coating by electrophoresis, *in vitro* and *in vivo* behavior

Abstract: This work concerns the elaboration, the physicochemical study and the biological evaluation of pure bioactive glasses associated with chemical elements or molecules for therapeutic use. The different materials synthesized by melting and by sol-gel have a long-range amorphous character and the characteristic thermal properties of the glasses. Two doping elements (Zn and Sr) as well as a molecule (phycocyanin) and a cyanobacterium (*Spirulina Platensis*) have been introduced into the matrix of bioverres. Their chemical reactivity was studied *in vitro* by following cell-free solid/liquid physiological exchanges (SBF). In addition, their cytotoxicity (proliferation and cell adhesion) was evaluated in cell tests. The bioactivity of bioactive glasses and nano-glasses has been investigated to elucidate the formation of a layer of carbonate hydroxyapatite.

It is the major crystal of the bone matrix on the surface of bioactive glasses. The sol-gel synthesis and the use of the emulsion technique allowed the development of bioactive glass nanoparticles of controlled sizes between 20 and 200 nm. This mastery opens many possibilities of applications in the field of medical nanotechnology. These particles have been used in 2 different application. Our first experiment was to create two types of bone bio-implants composed of nano-glass alone and nano-glass associated with a cyanobacterium. This study aims to compare the effects of cyanobacteria in *in vitro* and *in vivo* tests. Our second approach focused on the recovery of a biocompatible alloy and the study of the effects of particle size on the physicochemical characteristics of the layer thus formed.