



**HAL**  
open science

# Revêtements électrofilés de bioverre 45S5 et d'hydroxyapatite pour applications orthopédique et dentaire

Léa Dejob

► **To cite this version:**

Léa Dejob. Revêtements électrofilés de bioverre 45S5 et d'hydroxyapatite pour applications orthopédique et dentaire. Matériaux. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1016 . tel-03950632

**HAL Id: tel-03950632**

**<https://theses.hal.science/tel-03950632>**

Submitted on 22 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1016

# THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de  
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206  
Chimie

**Spécialité de doctorat** : Matériaux, biomatériaux et procédés innovants

Soutenue publiquement le 21/01/2021, par :

**Léa Dejob**

---

## Revêtements électrofilés de bioverre 45S5 et d'hydroxyapatite pour applications orthopédique et dentaire

---

Devant le jury composé de :

Kerdjoudj, Halima	Professeure, UFR d'Odontologie de Reims	Rapporteuse
Nedelec, Jean-Marie	Professeur, SIGMA Clermont	Rapporteur
David, Laurent	Professeur, Université Lyon 1	Examineur
Laberty-Robert, Christel	Professeure, Sorbonne Université	Examinatrice
Schlatter, Guy	Professeur, Université de Strasbourg	Examineur
Toury, Bérange	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Directrice de thèse
Salles, Vincent	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Co-directeur de thèse
Gaillard, Claire	Maître de Conférences, Université Lyon 1	Co-directrice de thèse
Attik, Nina	Ingénieure de Recherche CNRS, Université Lyon 1	Invitée
Gremillard, Laurent	Directeur de Recherche CNRS, INSA Lyon	Invité



## REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces de l'université Claude Bernard Lyon 1 et au laboratoire MATEIS de l'INSA de Lyon. Durant ces trois années, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes qui auront toutes participé, de près ou de loin, à l'avancée de ce travail.

Mes premiers et sincères remerciements s'adressent à mon encadrant de tous les jours, Vincent Salles, pour sa disponibilité sans faille, tant d'un point de vue scientifique que sur les aspects plus personnels. Merci pour ton implication et pour ta bienveillance, qui m'auront redonné confiance lorsque j'en manquais. Merci aussi pour cette bonne humeur quotidienne.

Je remercie également ma directrice de thèse, Bérangère Toury, pour sa présence si motivante et ses paroles toujours positives et valorisantes, ainsi que pour sa grande gentillesse.

J'adresse bien évidemment mes profonds remerciements à toute l'équipe du consortium ANR DECaP qui ont cru en moi pour mener ce projet de recherche. J'ai beaucoup apprécié ces journées de rencontres ainsi que les échanges très riches qui les accompagnaient et qui m'ont toujours permis d'explorer des pistes de réflexions nouvelles. Merci donc à Claire Gaillard, Elisabeth Djurado, Veronica Muller et Sandra Balvay. Je tiens particulièrement à citer deux membres de cette équipe que j'admire par l'étendue de leurs connaissances et qui ont toujours été présents pour répondre à mes questionnements avec la plus grande pédagogie, Laurent Gremillard et Solène Tadier. Merci pour votre disponibilité sans limite et vos aides précieuses, merci de m'avoir donné un exemple à suivre.

Je tiens à remercier Halima Kerdjoudj et Jean-Marie Nedelec de m'avoir fait l'honneur de rapporter mes travaux de thèse, ainsi que Laurent David, Christel Laberty-Robert et Guy Schlatter de les avoir examinés.

Je suis également très reconnaissante envers toutes les personnes qui auront contribué, grâce à leurs savoir-faire techniques, à l'obtention et à l'interprétation de nombreux résultats expérimentaux. Je pense notamment à Sandrine Cardinal pour la DRX, Benjamin Fornacciarri pour le MEB, Rodica Chiriac et François Toche pour les analyses thermiques, Chantal Lorentz et Emmanuel Chefdeville pour la RMN, René Fulchiron pour la rhéologie, Catherine Journet pour le MET, Alestair Wilson et Victor Vuillet-à-Cilles pour le tribomètre, ainsi qu'à Lucie pour m'avoir initiée au domaine particulièrement complexe des analyses statistiques. Enfin, mes remerciements très sincères vont à Nina Attik, pour le temps précieux qu'elle aura accordé à notre projet dans un contexte plutôt instable. Elle a rendu ces analyses biologiques possibles et a toujours souhaité aller toujours plus loin dans les expériences, malgré l'investissement que cela pouvait demander. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Merci à Giuliana Muzio également pour les nombreux conseils avisés dans le domaine de la biologie ainsi que pour son accueil (plus court que prévu) à Turin. J'espère que cette rencontre marque le début d'une jolie collaboration.

Ce travail a également pu progresser grâce à la contribution de plusieurs étudiants que je souhaite nommer ici. Tout d'abord, un merci spécial à « Stagiaire n°1 » (*aka* Emilie Belot), pour

ses nombreux tests qui étaient peut-être un peu répétitifs, mais qui n'auront pas entaché sa motivation et le plaisir que j'ai eu de travailler avec elle. Merci également à Shiyu Zhang, Antonin Michaudet et Jean-Baptiste Guinand pour leurs travaux. Enfin, énormes mercis à Céline Mandon, qui n'est plus étudiante depuis longtemps mais qui aura apporté une grande contribution à l'élaboration des dépôts architecturés.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu partager avec plaisir de nombreux moments durant ces trois années : toute l'équipe MBD, ainsi que les Laura(s), Constance, Victor, Céline, Angéline, Antoine, Laurie, Grégory, Lois, Nicolas, Panos, Paris, Cynthia et Nelly.

Je consacre un paragraphe spécial pour Kurt, qui entre dans à peu près toutes les catégories : merci de m'avoir fait gagner en assurance pendant les séances de TP, merci pour tes nombreux (ou plutôt innombrables) conseils scientifiques, pour ton soutien moral et pour les blagues qui allaient avec. Ma thèse aurait eu une toute autre saveur sans ta présence !

Enfin, mes remerciements plus personnels vont à ma famille, que je ne saurai jamais assez remercier pour m'avoir accompagnée dans toutes les étapes de ce parcours. Leur présence m'est essentielle et je leur dois toutes mes réussites. Cette thèse, je la leur dédie : à mon père, à ma mère et à ma grand-mère, qui maîtrise à présent (plus ou moins) la théorie de l'électrofilage comme peu de personnes de 80 ans. Merci aussi à mon amour, Cédric, d'être là, tout simplement.

## RESUME

L'alliage de titane TA6V est communément utilisé en implantologie en raison de sa biocompatibilité et de ses propriétés mécaniques intéressantes. Son manque de bioactivité est cependant à l'origine de descellement des implants, menant à terme à une nécessité de chirurgie de reprise. Dans ce contexte, des revêtements inorganiques ont été développés dans le cadre de cette thèse, avec pour objectif l'amélioration de l'ostéo-intégration des implants en TA6V. A cette fin, deux matériaux connus pour leur ostéo-conductivité ont été comparés : le verre 45S5 (de composition molaire 46,1 % SiO<sub>2</sub>, 24,4 % Na<sub>2</sub>O, 26,9 % CaO et 2,6 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) et l'hydroxyapatite phosphocalcique carbonatée. Afin de mimer l'architecture des filaments de collagène de la matrice extracellulaire osseuse, ces matériaux ont été déposés sur des substrats de TA6V sous la forme de filaments de taille micronique, *via* le procédé d'électrofilage. La synthèse originelle du verre 45S5 implique la fusion de poudres inorganiques, alors que l'hydroxyapatite est communément préparée par précipitation en voie aqueuse. Ces approches n'étant pas adaptées à la mise en forme des matériaux par électrofilage, la synthèse sol-gel a été privilégiée dans ce travail.

Plusieurs critères d'importance ont été pris en compte pour la formulation et le dépôt de systèmes sol-gel de bioverre et de phosphate de calcium. En particulier, les solutions doivent présenter des propriétés visco-élastiques adaptées au procédé d'électrofilage, mais également favoriser le dépôt de filaments adhérents et homogènes en morphologie et en composition. Les protocoles développés dans cette thèse incluent par conséquent le dépôt d'une sous-couche d'accroche par enduction centrifuge en amont de l'électrofilage, ainsi qu'une étape de traitement thermique post-électrofilage permettant l'obtention de matériaux inorganiques exempts de phases toxiques. Alors que les synthèses sol-gel des verres bioactifs et des phosphates de calcium sont habituellement préparées à partir de précurseurs nitrate, les composés acétate se sont montrés mieux adaptés à l'application visée. Les filaments d'hydroxyapatite ont de plus été déposés sur un implant dentaire de géométrie complexe, prouvant le potentiel applicatif du protocole établi. Par ailleurs, l'intérêt de la structure fibreuse des revêtements ainsi qu'une comparaison des deux compositions chimiques ont été évalués *in vitro*. Enfin, une ouverture sur la méthode d'électro-impulsion, capable de moduler à souhait la porosité et l'organisation des revêtements à l'échelle même du filament, est proposée.

Mots clef : électrofilage, sol-gel, verre 45S5, hydroxyapatite, ostéo-intégration, revêtement, TA6V, acétate



## ABSTRACT

Because of its biocompatibility and interesting mechanical properties, the titanium alloy TA6V is commonly used in implantology. Its lack of bioactivity is however responsible for the implants loosening, eventually leading to the necessity of a revision surgery. In this context, inorganic coatings have been developed throughout this thesis, with the aim of improving osteo-integration of TA6V implants. To this end, two materials, already reported to be osteo-conductive, have been compared: the bioactive glass 45S5 (molar composition: 46.1% SiO<sub>2</sub>, 24.4% Na<sub>2</sub>O, 26.9% CaO and 2.6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) as well as the carbonated hydroxyapatite. Also, these materials have been shaped in the form of micro-sized filaments, *via* the electrospinning process, in order to mimick the architecture of the collagen fibrils naturally present in the bone extracellular matrix. The historical synthesis of 45S5 bioglass involves the melt-quenching technique, while hydroxyapatite is commonly prepared by wet precipitation method. These approaches are not compatible with the electrospinning process, therefore sol-gel synthesis has been preferred in this work.

Several important requirements were taken into account for the formulation and the deposition of bioglass and calcium phosphate sol-gel solutions. In particular, the solutions need viscoelastic properties suitable for electrospinning. They also have to favour the deposition of filaments with homogeneous morphology and composition. To this end, acetate precursor revealed themselves more adapted to our application compared to nitrates compounds commonly reported in the literature for sol-gel synthesis. In addition, the upstream deposition of an adhesive undercoat by spin-coating is proposed to enhance the adhesion of fibers on the TA6V substrate. Also, a thermal treatment post-electrospinning enables the obtaining of purely inorganic materials proof against toxic phases. The benefits of the fibrous structure of the coatings, as well as a comparison between the two chemical compositions (45S5 or hydroxyapatite) were assessed *in vitro*. Also, as a proof of concept, dental implants with complex geometries were coated with hydroxyapatite filaments. Finally, an opening on the electro-writing process, capable of controlling the deposition of the coating at the filament scale, is exposed.

Key words: electrospinning, sol-gel, bioglass 45S5, hydroxyapatite, osteointegration, coating, TA6V, acetate





## SOMMAIRE

Remerciements .....	3
Résumé.....	5
Abstract .....	7
Sommaire .....	9
Introduction générale.....	13

### **Chapitre I. Etat de l'art..... 15**

Introduction.....	17
1. Silicon-based electrospun fibres.....	20
1.1. Synthesis of Si-based sols entering the composition of electrospun solutions .....	20
1.2. Preparation of silicone-based spinnable solutions .....	25
1.3. Process parameters affecting the fibre structure .....	29
1.4. Applications of silicon-based fibres in Bone Tissue Engineering .....	33
1.5. More complex glass compositions, more challenges.....	40
1.6. Summary for silicon-based electrospinning.....	42
2. Electrospinning of calcium phosphates.....	43
2.1. Introduction to calcium phosphates and their bioactivity .....	43
2.2. Calcium phosphates synthesis .....	45
2.3. From calcium phosphate solution to CaP fibres .....	49
2.4. Crystalline phases of calcium phosphate fibres .....	51
2.5. Applications of CaP fibres in Bone Tissue Engineering .....	58
2.6. Summary for calcium phosphates electrospinning.....	62
3. Concluding discussion and future trends .....	62
3.1. Positioning of the electrospinning technique .....	62
3.2. Bioactive ceramics versus resorbable polymers .....	63
3.3. Calcium phosphates versus Si-based materials .....	64

### **Chapitre II. Elaboration de revêtements électrofilés à partir de systèmes à base de précurseurs nitrate ..... 67**

Introduction.....	69
1. Elaboration de revêtements fibreux de 45S5 à partir de systèmes a base de nitrates.....	69
1.1. Partie expérimentale.....	69
1.2. Caractérisation des filaments après électrofilage.....	71
1.3. Comportements chimiques et morphologiques des filaments et du substrat de TA6V en température .....	72
1.4. Amélioration de l'adhérence des revêtements par ajout d'une sous-couche d'accroche ...	78

2. Vers un système sans nitrates .....	83
2.1. Partie expérimentale .....	83
2.2. Précurseurs chlorure .....	84
2.3. Précurseurs méthanolate .....	85
2.4. Précurseurs acétate.....	86
Conclusion .....	87

### **Chapitre III. Elaboration de revêtements électrofilés à partir de systèmes à base de précurseurs acétate..... 89**

Introduction.....	91
1. Evaluation de l'intérêt des formulations à base de précurseurs acétate.....	91
1.1. Comportement thermique des précurseurs acétate .....	91
1.2. Comportement thermique du PVA .....	94
1.3. Comportement du TA6V à 550 °C .....	95
1.4. Conclusion .....	95
2. Système verre bioactif 45S5 .....	96
2.1. Formulation d'un sol de composition définie et stable à l'échelle du procédé de mise en forme .....	96
2.2. Dépôt de revêtements électrofilés à partir du sol optimisé .....	110
2.3. Conclusion .....	121
3. Système phosphate de calcium CaP .....	121
3.1. Méthodes expérimentales .....	122
3.2. Morphologie des revêtements avant traitement thermique.....	123
3.3. Evolution du sol de CaP en température et choix de la température de traitement thermique .....	125
3.4. Caractérisation des matériaux après traitement thermique .....	127
3.5. Conclusion .....	129
Conclusion .....	131

### **Chapitre IV. Ealuation biologique des revêtements déposés sur disques plants de TA6V .....133**

Introduction.....	135
1. Le tissu osseux et son environnement dentaire.....	135
1.1. Composition et remodelage du tissu osseux .....	135
1.2. L'environnement dentaire.....	136
1.3. Modèles cellulaires pour les tests <i>in vitro</i> .....	137
2. Partie expérimentale .....	138

3.	tests préliminaires acellulaires .....	139
3.1.	Evolution du pH .....	139
3.2.	Angle de contact.....	140
4.	cytocompatibilité et prolifération cellulaire.....	141
4.1.	Cytotoxicité des matériaux.....	141
4.2.	Prolifération des cellules MG-63 sur les matériaux .....	144
4.3.	Discussion.....	145
5.	Imagerie de la lignée cellulaire MG-63.....	146
6.	Comparaison de l'Alamar Blue et de l'imagerie : limites de l'expérience.....	151
7.	Quantification de la phosphatase alcaline .....	153
	Conclusion .....	155

## **Chapitre V.....157**

	Introduction.....	159
1.	Dépôt de revêtements sur implants dentaires.....	159
1.1.	Présentation des implants dentaires .....	159
1.2.	Partie expérimentale.....	161
1.3.	Optimisation de la couche d'accroche par enduction par trempage.....	162
1.4.	Morphologie des revêtements électrofilés.....	163
1.5.	Evaluation biologique des revêtements déposés sur implants.....	165
2.	Dépôts localisés et architecturés par électro-impulsion .....	168
2.1.	Principe et intérêt de l'électro-impulsion .....	168
2.2.	Adaptation de la solution de CaP au procédé d'électro-impulsion.....	174
2.3.	Electro-impulsion de motifs localisés de phosphate de calcium .....	183
	Conclusion .....	190

## **Conclusion générale et perspectives .....**

	Techniques expérimentales .....	195
	Annexes .....	209
	Liste des abréviations.....	227
	Références.....	229



## INTRODUCTION GENERALE

Les matériaux à vocation médicale représentent un moyen d'améliorer la qualité de vie d'une population mondiale toujours plus vieillissante. Les articulations au niveau de la hanche ou du genou, en particulier, peuvent être détériorées par l'ostéo-arthrite, une pathologie entraînant une dégénérescence progressive du cartilage recouvrant les extrémités osseuses. En plus de l'apparition de douleurs pour le sujet malade, cette pathologie peut occasionner des gênes dans les mouvements ou, à terme, une perte des fonctions articulaires. La pose de prothèse peut alors s'avérer nécessaire pour soulager les douleurs ou redonner une mobilité au patient. La pose d'implants est également envisagée suite à l'apparition de défauts osseux, de fractures importantes, ou pour remplacer une dent manquante.

En France, plus de 150 000 prothèses de hanches ont été posées en 2018 et quasiment 20 000 actes de reprise ont été nécessaires [1]. Plusieurs phénomènes peuvent nécessiter une reprise de la prothèse, mais la complication majeure des prothèses totales de hanche est leur descellement aseptique. Ce dernier résulte d'une mauvaise accroche mécanique entre l'os et l'implant. Une intervention chirurgicale est alors nécessaire pour remplacer entièrement ou en partie l'implant de première intention, mais la durée de vie de l'implant de reprise est alors réduite.

Plusieurs éléments composent une prothèse, et différents matériaux peuvent être utilisés pour sa fabrication. L'alliage de titane TA6V, en particulier, est largement utilisé dans les parties de la prothèse insérées à l'intérieur des os. Bien que le TA6V soit biocompatible, son manque de bioactivité ne permet pas une accroche osseuse suffisante entre la prothèse et les tissus environnants, favorisant alors l'échec implantaire. Le dépôt d'un revêtement bioactif à la surface du TA6V permet de pallier son ostéo-intégration limitée. La projection thermique est un procédé largement utilisé, mais les phases déposées sont généralement très stables et limitent donc la réactivité du matériau. De par leur forte épaisseur, ces dépôts sont de plus sujets à délamination, entraînant une résorption osseuse ou des inflammations locales qui accentuent alors les risques de descellement.

L'efficacité du revêtement dépend largement de sa composition chimique et de sa morphologie. Pour favoriser l'accroche osseuse, le projet ANR DECaP dans lequel s'inscrit cette thèse s'intéresse donc à ces deux aspects. D'un point de vue chimique, l'accent est mis sur des matériaux de verre 45S5 et d'hydroxyapatite phosphocalcique, tous deux largement utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire osseuse. Pour favoriser la réactivité de l'hydroxyapatite, une phase peu cristallisée est envisagée. Un autre objectif du projet est d'évaluer l'influence de la morphologie du revêtement sur la réponse cellulaire. Deux procédés de dépôt, permettant d'ajuster la rugosité et la porosité des revêtements, sont étudiés : l'électro-nébulisation (ou « electrospray ») et l'électrofilage. Ces deux techniques résultent de la déformation d'une solution sous l'effet d'un champ électrique. L'électro-nébulisation entraîne le dépôt de gouttelettes, alors que des filaments de taille micronique ou submicronique sont obtenus en électrofilage.

Les revêtements par electrospray sont élaborés par Veronica Muller, doctorante en co-tutelle entre le laboratoire MATEIS (INSA Lyon) et le laboratoire LEPMI (Grenoble INP), alors que le travail rapporté dans cette thèse, réalisé entre le laboratoire MATEIS et le laboratoire LMI

(Université Lyon 1), est consacré à l'électrofilage. Cette technique permet l'obtention de matériaux qui présentent une morphologie se rapprochant de la structure de la matrice extra-cellulaire osseuse.

Le Chapitre I présente un état de l'art sur l'intérêt de l'utilisation de filaments inorganiques électrofilés pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. En particulier, les aspects liés à la synthèse sol-gel, à la mise en forme par électrofilage et aux évaluations biologiques de ces matériaux sont rapportés. Ce chapitre est proposé en anglais car il correspond à un article de revue proposé à la publication dans le journal *Acta Biomaterialia* (en cours de seconde révision au moment de la rédaction de ce manuscrit). Sur la base de ce chapitre bibliographique, des voies de synthèses sol-gel prometteuses de bioverre 45S5 et d'hydroxyapatite phosphocalcique ont été sélectionnées.

L'état de l'art souligne l'utilisation quasiment exclusive de précurseurs nitrate pour la synthèse des matériaux inorganiques étudiés. Cette formulation a été adaptée à l'élaboration de revêtements, sujet du Chapitre II. Cependant, certaines limitations à leur utilisation pour l'application visée sont mises en évidence et nous ont amenées à privilégier une synthèse à partir de précurseurs de type acétate. L'optimisation des synthèses sol-gel de verre 45S5 et d'hydroxyapatite à partir de cette famille de précurseurs est présentée dans le Chapitre III. La caractérisation morphologique et chimique des matériaux obtenus est également exposée.

L'étude des revêtements s'est poursuivie par une évaluation de leurs propriétés biologiques, détaillée dans le Chapitre IV. Cette étude a permis d'évaluer l'influence de la composition chimique des revêtements (45S5 ou phosphate de calcium) ainsi que de leur morphologie (lisse ou électrofilée) sur la réponse cellulaire.

Enfin, des études préliminaires sur des dépôts tridimensionnels sont exposées dans le Chapitre V. Dans une première partie, le dépôt de revêtements d'hydroxyapatite a été évalué sur des implants dentaires présentant une géométrie usinée complexe. Des premières évaluations biologiques sont également rapportées. Par ailleurs, dans une étude sur substrats plans, l'électrofilage a été complété par un déplacement du substrat afin de localiser précisément le dépôt du filament. Cette technique, appelée électro-impulsion, peut s'avérer intéressante pour moduler à souhait la porosité des revêtements ostéo-conducteurs.

# **Chapitre I**

## **ETAT DE L'ART**





# **ELECTROSPINNING OF *IN SITU* SYNTHESIZED SILICA-BASED AND CALCIUM PHOSPHATE BIOCERAMICS FOR APPLICATIONS IN BONE TISSUE ENGINEERING: A REVIEW**

Authors: Léa Dejob, Bérangère Toury, Solène Tadier, Laurent Gremillard, Claire Gaillard, Vincent Salles

## **INTRODUCTION**

The skeleton of vertebrates acts as a body framework and provides muscles fixation sites. Muscles induce movements of the body by pulling onto the bones to which they are attached. The endoskeleton is thus really important for the mobility of vertebrates. Different events can deteriorate this tissue such as bone loss and bone fractures, which can result from injuries via traumatism, infections and diseases. The most famous form of bone disease is osteoporosis, which results in fragile bones and an increased risk of fractures. Even though the bone is able to heal itself through a combination of biological mechanisms, this healing process can be insufficient when the bone defect is too large. For this reason, bone grafts are often required to fill voids where bone is absent. They are useful for growing bone around an implanted device such as total knee or joint replacements. The gold standard of bone grafts is autologous transplantation, which is when the bone graft comes directly from another part of the patient's body. In addition, these bone grafts are histocompatible, non-immunogenic and present osteoconduction, osteoinduction and osteogenesis [2]. However, there are some drawbacks associated with this technique such as the necessity for a double operation combined with a significant donor site injury and morbidity as well as surgical risks such as inflammation and infection, chronic pain and, above all, the high cost of the procedure. The other common procedure is allogeneic transplantation where the bone tissue comes from a donor's cadaver. Such grafts are thus correlated with higher risks of immunoreactions and transmission of infections. Also, due to high demand and low supply, a shortage in allograft materials is observed.

For all these reasons, researches have started to explore a new route using synthetic materials in order to meet all the ideal bone grafts features: high osteoinductive and angiogenic potentials, biological safety, low patient morbidity, no size restrictions, ready access to surgeons, long shelf life, reasonable cost and good reproducibility [2]. Many different materials have been investigated to create such synthetic implants for the purpose of so called "Bone Tissue Engineering" (BTE). They are either polymeric, inorganic or a combination of both. Loading with cells, proteins or drugs was also reported [3]. Besides its composition, the morphology of the material can be controlled *via* shaping procedures, including lithographic methods [4], 3D bioprinting [5] or electrospinning for example. Electrospinning is widely used indeed and the reasons for its usefulness can be explained by the natural bone structure.

Bone is a specialised form of connective tissue whose development occurs either *via* intramembranous or endochondral ossification. Regardless of the ossification process, it is always composed of both an inorganic and an organic matrix, the latter consisting largely of collagen with some hyaluronic acid and chondroitin sulfate [6]. The organic matrix is secreted and remodelled by bone cells, including osteoblasts, osteocytes, osteoclasts and fibroblasts. Fibrillar collagen serves as a mechanical framework in the bone extracellular matrix.

Nevertheless, the use of natural collagen to create biomaterials is limited. First of all, the incomplete removal of antigens during decellularisation can induce severe inflammation and rejection of the implant. Also, the extraction procedure and conditions of usage (for instance temperature and solvents) can lead to collagen protein denaturation as well as architecture degradation – both at a molecular, fibrillary or suprafibrillar network level [7,8]. In this context, electrospinning reveals itself as a promising method of reproducing the fibrous morphology of the collagen network, whose natural fibril diameter is of around 500 nm and assembles into fibres of around 5  $\mu\text{m}$  [9]. As a result, electrospinning can provide cells with a structure similar to the organic part of bone. Also, porosity created between fibres can help deliver nutrients to bone cells. This role is especially fulfilled by blood vessels and canaliculi in healthy bones [10].

Electrospinning is a powerful approach for obtaining nano- and micro- metric sized fibres. In this method, sketched in Figure I-1, a polymeric solution with appropriate viscoelastic properties is extruded through a syringe needle. An electric field between the solution and the fibre collector is created by applying a high voltage to the needle and an oppositely charged one to the collector. Alternatively, the latter can also be grounded. Under this electric field, the solution is charged with either positive or negative charges. As these charges have the same polarity, they repel each other, resulting in stretching the solution in the form of a filament. This filament is attracted by the collector due to the potential difference. During its flight to the collector, the filament dries and experiences instabilities resulting in fibre jet deviation. As a result, mats with random fibre orientation are collected on the collector. So as to prevent the jet from breaking up and maintain the continuity of the electrospun filament [11], the solutions are loaded with polymers with long macromolecular chains that can entangle together. It should be noted that this process is also compatible with the stretching of melted polymers [12].

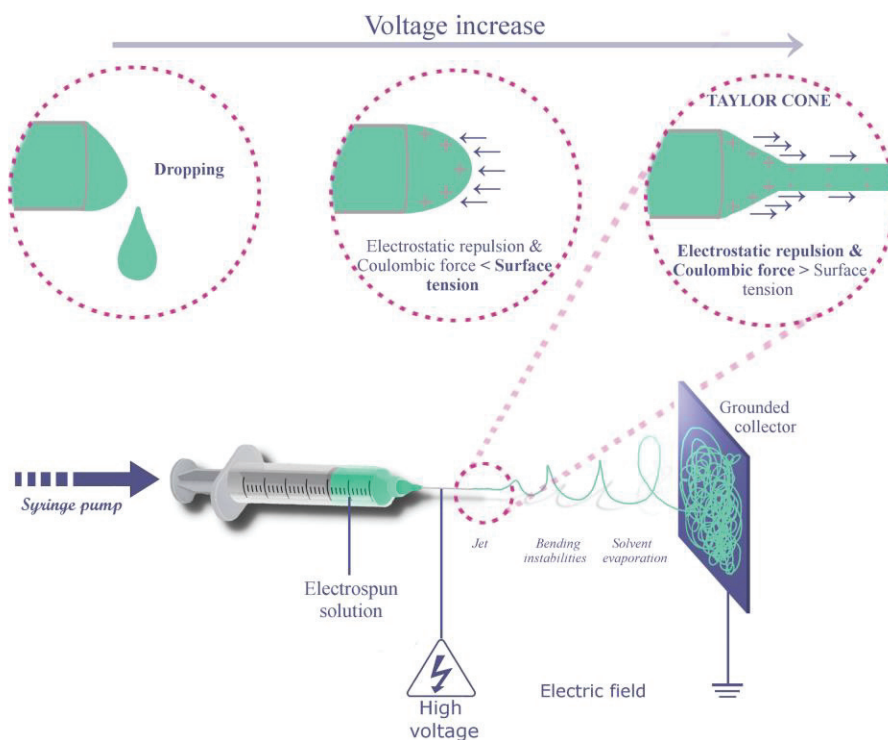


Figure I-1. Electrospinning setup and influence of the electric field strength

As previously mentioned, inorganic species also enter the composition of bone. This mineral matrix is mostly made up of calcium phosphate crystals in the form of hydroxyapatite orientated along the collagen molecules of the bone organic matrix [13]. It is noteworthy that the calcium concentration reaches 34.8 wt.% of the bone and that the one of phosphorus reaches 15.2 wt.%. Carbonates are also found in the bone (7.4 wt.%) as well as trace quantities of sodium, magnesium, potassium, fluoride and chloride salts [14]. While many researches focus on the synthesis of calcium phosphate materials in the field of bone or dental applications [15,16], other types of ceramics have been suggested and include well-known bioactive glasses [17]. These materials and their mechanisms of bioactivity will be further described in the review. The most commonly reported strategy for electrospinning these ceramics implies the dispersion of pre-synthesised nanoparticles into a polymeric solution that is simultaneously electrospun. Besides well-known calcium phosphates and bioactive glasses, other ceramics have been similarly electrospun using a dispersion of nanoparticles: including not only  $\text{CaCO}_3$  [18–20], Si-doped  $\text{CaCO}_3$  [21–27] but also Mg-based ceramics such as forsterite  $\text{Mg}_2\text{SiO}_4$  [28–30], magnesium oxide  $\text{MgO}$  [31] and amorphous magnesium phosphate [32]. Finally, clays – laponite [33], montmorillonite [34], halloysite [35] - were also marginally investigated for their potential applications in bone tissue engineering. Nevertheless, all of these mats were prepared by blending either a commercially or upstream prepared powder of ceramic into a polymer solution before electrospinning. In this review, the choice was made to focus on the *in situ* reactions of the ceramic phase within the electrospun solution. It is important to specify to what the term “*in situ*” refers. In the systems described throughout this review, sol-gel reactions start from the solution preparation and they continue all through the whole process: from the mixing of the precursors in the solution prior to syringe loading, during the electrospinning itself and they can also go on with subsequent thermal treatments. The term “*in situ*” thus encompasses the filaments fabrication process in its entirety. When the ceramic material is synthesised that way, better spatial distribution, stronger interactions between the organic and the inorganic phases and consequently superior mechanical and biological properties are expected, as will be discussed in section 1.1.1.1. Besides well-known bioactive glasses and calcium phosphates, silica, which presents bioactivity as well as a high stiffness [36], is the only electrospun material intended to be used for bone applications obtained from an *in situ* reaction.

This review gives an insight into the *in situ* synthesis and electrospinning of bioactive ceramics materials whose intended application is related to bone tissue engineering. This review is organised in two chapters: the first one focuses on silicon-based materials and separately discusses their synthesis, their electrospinning and reported bone tissue engineering applications in the literature. Shaping considerations of such fibres and effects of processing parameters on the fibrous morphology were reviewed by Nagrath *et al.* [37]. Even though these aspects are mentioned in this article because they are inextricably linked to the features of the final fibres, they are less detailed. Here, importance is given to the chemistry of the sol-gel synthesis. Also, choices about system composition and shaping of the materials are justified as far as possible by results from biological studies. The second chapter is dedicated to calcium phosphate materials.

# 1. SILICON-BASED ELECTROSPUN FIBRES

## 1.1. SYNTHESIS OF SI-BASED SOLS ENTERING THE COMPOSITION OF ELECTROSPUN SOLUTIONS

Sol-gel synthesis is the method selected to create silicon-based materials *via in situ* reaction and subsequent electrospinning. Sol-gel synthesis is a chemical process in which an alkoxide solution is slowly hydrolysed and condensed to form a sol that is a colloidal suspension. Colloidal particles grow and create discrete particles or interconnected networks of polymeric chains in which solvent molecules are trapped; this system is defined as a gel. This method is highly adaptable and allows for the possibility of tailoring the final material properties and morphology by adjusting the solution composition and process parameters. Information that is detailed in the next paragraphs about the method for preparing spinnable solutions is gathered and summarised in Figure I-2. This section 1.1 specifically deals with the “Inorganic Si-based network” orange block in the figure.

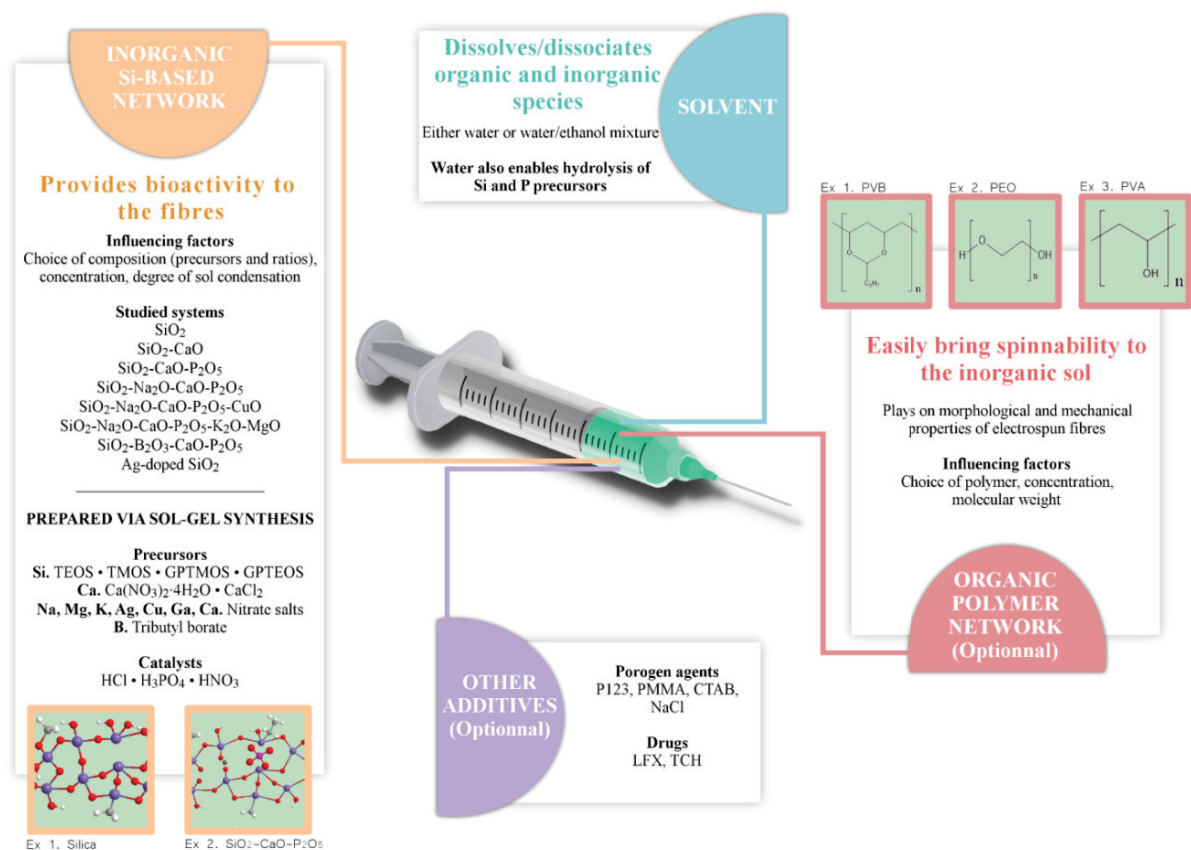


Figure I-2. Considerations for the preparation of spinnable Si-based bioceramics with adequate bioactive properties

### 1.1.1. Silica

- *Justified use of silica fibres for Bone Tissue Engineering*

Silica is the general term given to minerals composed of both silicon and oxygen. Although silica like silicon dioxide ( $\text{SiO}_2$ ) and silicones (polymeric compounds with a Si-O-Si backbone) is insoluble in water, it can release small but significant amounts of ortho-silicic acid ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) [38]. This acid is water soluble and as a result biologically available. The exact action mechanisms of silicon in bone health have not been clearly elucidated yet. However, its positive effects on collagen I synthesis, matrix mineralisation and osteoblast differentiation have been reported many times over the last few decades [21,39,40].

The earliest SBF (Simulated Body Fluid)-bioactive silica spun fibres were obtained *via* a dry spinning process in 2000 [41,42]. In this process, a pushing gas was used to extrude the spinning solution through microscale holes, without using an electric field. As a result, the fibre diameter was quite large (14-82  $\mu\text{m}$ ). Six years later, Sakai *et al.* reported on a cellular study on electrospun silica fibres [43] for the first time, to the author's knowledge. Osteoblastic cells elongated along these thin fibres - whose diameters ranged from several hundreds of nanometres to several micrometres - in the early stages of cell culture. Subsequently, they proliferated and filled the space between fibres.

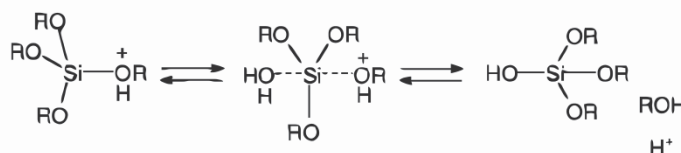
The benefits from an *in situ* synthesis of silica were evaluated by Yaping Ding *et al.* [44], who compared this method with the dispersion of fumed silica nanoparticles into a polymer solution. After electrospinning, sol-gel derived fibres displayed a stiffness two times higher and a tensile strength 32 % greater. This was due to a more uniform distribution of the inorganic phase in the polymeric matrix, as well as higher interfacial adhesion strength between the inorganic and organic phases. On the contrary, blended nanoparticles could agglomerate in the polymer matrix and cause shear stress concentrations weakening the fibres. On a biological point of view, both materials showed good MG-63 cell adhesion and proliferation, but only sol-gel derived silica-containing fibres promoted ALP (Alkaline Phosphatase) activity after 2 weeks of incubation [44]. ALP is an enzyme and biochemical marker of bone formation. As reported by the authors, this improved bioactivity could be due to the enhanced stiffness obtained by the sol-gel based approach, but also to the easier release of silicon ions during sol-gel phase degradation compared with the more stable fumed silica nanoparticles. About those analyses, it is important to note that MG-63 are human osteoblast-like cells that have been used as an *in vitro* standard model to study bone-implant interactions and biocompatibility (adhesion and proliferation of cells). They present the advantage of a rapid and endless proliferation, and they retain a differentiated phenotype under culturing conditions. Nonetheless, these are osteosarcoma-derived cells and in some experimental conditions, they behave differently than primary cells in response to biomaterials. A first investigation of material's biocompatibility with MG-63 should therefore be further confirmed with primary and target cells. Also, it is noteworthy that performing alkaline phosphatase testing on MG-63 as reported in the last cited study [44] and many others in the literature is controversial, because these cells already possess an osteoblastic phenotype.

- *Sol-gel synthesis of silica*

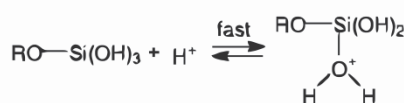
All studies reporting the *in situ* synthesis of silica networks involve a sol-gel technique in which an organosilane is hydrolysed and condensed. During the hydrolysis process, Si-OR groups react to form Si-OH and the latter condense together into Si-O-Si groups during condensation step. In most cases, TEOS (tetraethyl orthosilicate) or TMOS (tetramethoxysilane) are employed. But other silica precursors are marginally used, such as 3-glycidyloxypropyltriethoxysilane (GPTEOS) [45] and 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GPTMOS, also GPTMS) [46] for their ability to bond both organic and inorganic components through their organic and inorganic functionalities, leading to hybrid materials. Addition of GPTEOS to TEOS was also reported, by Toskas *et al.*, to increase sol-gel solution stability upon gelation [45].

Acid- and base-catalysis are efficient at accelerating the hydrolysis and condensation of sol-gel derived silica. Under acidic conditions, silica tends to form linear molecules, while highly branched clusters of silica behaving as discrete species are obtained under basic conditions [47]. All of the sol-gel *in situ* syntheses of electrospun silica for BTE are acid-catalysed, either with HCl [36,43,48–50], H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [51] or HNO<sub>3</sub> [45]. Figure I-3 displays reaction mechanisms of acid-catalysed hydrolysis and condensation of organosilanes. It is suggested that an acid catalysis is preferred over a basic one, as the latter induces the formation of spherical particles that can grow, agglomerate and precipitate, thus creating uneven distribution within the fibres [52]. This irregular distribution can lead to shear stress concentrations weakening the fibres, and we can also imagine that the fibrous structure of the material wouldn't be kept after polymer calcination if the silica phase is not continuous.

**Acid-Catalyzed Hydrolysis**



**Acid-Catalyzed Condensation**



**Figure I-3.** Reaction mechanisms of acid-catalysed hydrolysis and condensation of organosilanes. Reproduced from [47]

Silicon-containing materials can also refer to compositions where the silicon oxide network is modified by the incorporation of metallic cations. When they possess bioactive properties, these materials are referred to as “bioactive glasses”. In the research area combining *in situ* reaction and electrospinning for BTE field, they have been studied more closely than pure silica fibres.

### 1.1.2. Silicon-containing bioactive glasses

In 2016, Xiu-Rui Zhang *et al.* demonstrated that the delivery of soluble ions arising from the dissolution of bioactive glasses was not the only factor influencing the behaviour of rat BMMSC (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells). Their osteogenic differentiation was indeed more pronounced when the cells were cultured directly on the surface of the materials rather than in a transwell chamber. Also, the formation of carbonated hydroxyapatite while soaking a bioactive glass in SBF was found to be faster when the glass displayed a fibrous structure rather than a flat surface [53]. Besides, when rat BMMSC (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) were cultured on these surfaces for 5 or 10 days, a higher ALP expression was observed on the fibrous morphology [53]. Such research justifies the global strategy of electrospinning bioactive glasses that are prone to dissolution. Therefore, this section 1.1.2 gathers significant information to be considered for the preparation of such materials.

- *Introduction – Structure of bioactive glasses and link with their bioactivity*

Bioactive glasses and glass-ceramics are interesting materials for bone tissue engineering applications as they enhance osteoblast adhesion and the differentiation of mesenchymal stem cells as well as progenitor cells, and revascularization [54]. While bioactive glasses exhibit an amorphous structure, “glass-ceramics” is a widely-used term in the literature to refer to materials that consist of crystalline phases embedded into an amorphous glassy matrix. Glass-ceramics thus belong to a material class between glasses and polycrystalline ceramics [55]. Both the mechanical and biological properties of the glass-ceramics can be significantly different from those of their parent glass phase [54].

Being amorphous, bioactive glasses do not show any long-range order. However, atoms do possess a short-range arrangement within the glass. Specifically in silicate and phosphosilicate glasses, silicon and phosphorus atoms are surrounded by oxygen atoms, themselves potentially belonging to another silicon or phosphorus tetrahedra. Covalent bonds of  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$  (and sparse  $\equiv\text{P-O-P}\equiv$ ) are formed and these are called bridging oxygen atoms. They are responsible for network connectivity as they link different tetrahedral units together [56]. Therefore, silicon and phosphorus (as well as boron) are called network formers. Also, although it has been proved that P-O-Si bonds may be detected by NMR or using molecular dynamics simulations, phosphorus is mainly present in the form of orthophosphate ions charge-balanced by modifier ions [17,55,56]. For instance, sodium, calcium, magnesium, copper and potassium ions are considered as network modifiers. As orthophosphate units are barely polymerised to the silica network, they are rapidly lost from the glass when exposed to aqueous environments and so act directly in the biological media to trigger apatite formation. However, no study comparing the biological activity of silicate and phosphosilicate glasses in the form of electrospun fibres could be found to support this idea.

When network modifiers such as alkali or alkaline earth oxides are added to a phosphate or silicate glass, bridging oxygen atoms are turned into non-bridging oxygen atoms by the formation of ionic bridges ( $\equiv\text{Si-O}^- +\text{M}$  or  $\equiv\text{P-O}^- +\text{M}$ ). Increasing network modifier content therefore decreases connectivity and polymerisation of the glass. While vitreous silica is chemically very stable, the addition of modifiers of the silica network decreases its stability and



as such increases its dissolution and bioactivity. The bioactivity mechanism of these glasses is based on solution-mediated dissolution. Through ion exchanges between such dissolved species and the ones originally present in the solution (body fluid or simulated body fluid), a carbonated hydroxyapatite (either referred to as CHA or HCA [59]) layer is formed on the bioactive glass surface. This CHA layer is then able to bond with proteins on which cells can attach and are subjected to differentiation and production of the bone matrix. Nonetheless, the mechanism is not fully understood yet. For more details on bioactive glass bioactivity, readers are directed to the relevant literature [17,56,60]. When taking into account the criteria that define the scope of this review (*i.e. in situ* synthesis in the solution used for electrospinning), addition of calcium into a silicate glass has been associated with an improvement in apatite formation after soaking the fibres in SBF [61], but also to a better osteoconductivity and bone regeneration ability when the filaments were implanted *in vivo* in rabbit calvarial bone defects.

Bioactive glasses can be prepared either by using a melt-quenching (involving temperatures above 1300 °C) or a sol-gel method. Although an *in situ* synthesis during electrospinning is not compatible with the melt-quenching technique, different silicate- and phosphosilicate-glass systems have been studied to produce fibres from sol-gel *in situ* synthesis and simultaneous electrospinning.

- *Sol-Gel chemistry and resorption rates of bioactive glasses*

Optimising the sol gel synthesis involves the choice of inorganic precursors, solvent and catalyst, along with their mutual ratios. Regarding calcium-containing silicate glasses, TEOS was the main organosilane used as a silicon source, but the use of GPTMS as a coupling agent was also suggested [62]. Calcium nitrate [63] and calcium chloride [64,65] were the two reported calcium precursors for this system, which was always acid-catalysed with hydrochloric acid. For the tertiary phosphosilicate glass system composed of SiO<sub>2</sub>, CaO and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, the most commonly used precursors are TEOS, calcium nitrate tetrahydrate Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O and triethylphosphate (TEP) for the silicon, calcium and phosphorus sources, respectively [53,62,66–87]. Also, in order to avoid the incorporation of toxic nitrates in the material, calcium chloride has also been used as a calcium precursor [88,89], which removes the need for the calcination step required for nitrate elimination.

Furthermore, controlling the ratios between precursors during the synthesis helps in adjusting the bioactivity of the fibres. It was found that if the total amount of glass was kept constant between different glass-containing electrospun fibres, mineralisation in SBF and the growth of MC3T3-E1 cells were slowed down when the SiO<sub>2</sub> amount was increased in the glass composition (*i.e.* from 68S to 86S, compositions with respectively 70 and 90 mol.% of SiO<sub>2</sub>), due to its greater stability [69]. Cell morphologies after culture on the materials followed the same trend as higher cell density and larger spreading area were found in the case of 68S-containing carbon fibres. These results raise awareness of the importance of choosing adequate ratios between the oxides constituting the glass. Ideally, the chemical composition of the sol-gel has to be adjusted to fabricate bioactive glass fibres with a resorption rate of the scaffold which matches with the new bone regeneration speed.

Common issues can disrupt the formation of fibres with desired compositions. A loss of phosphorus in the nanofibers has been reported, even though it was inserted in the initial sol-gel system before electrospinning. This loss was attributed to the vaporisation of incompletely hydrolysed TEP during the electrospinning process [90]. However, the phosphorus content is rarely analysed in published researches, and deeper investigations need to be performed. In particular, a solution to overcome this loss has to be put forward to maintain the desired glass composition after electrospinning. Another issue is the difficulty in obtaining uniform calcium distribution in the electrospun fibres and the necessity to calcine them at high temperature when calcium nitrates are used as precursors. These issues have been addressed using calcium chloride as a precursor, and drying the fibres in a controlled humidity environment and in a container limiting the evaporation of solvents [89].

## 1.2. PREPARATION OF SILICONE-BASED SPINNABLE SOLUTIONS

### 1.2.1. Sol-gel and polymer solution mixture

Once prepared, silica or bioactive glasses sols are commonly mixed with a polymer solution that ease the electrospinning process by controlling the solution properties - mainly viscoelasticity, conductivity and surface tension. Figure I-2 displays the main considerations regarding polymer and solvent addition to the sol-gel system (respectively red and blue blocs in the figure). As will be discussed later in this review, the addition of a polymer is not the only method to make a silica sol spinnable under an electric field, but it is the simplest one.

Polymers are introduced into the sol to provide it with suitable properties for electrospinning. For instance, attempts at electrospinning a TEOS/GPTEOS sol with a viscosity of 11 mPa.s led to the formation of droplets [91] (Figure I-4.A). Fibres could only be obtained when a minimum viscosity of 50 mPa.s was reached through the addition of PEO (Figure I-4.B). The same authors evidenced that electrospinning occurred instead of electrospinning when PEO was replaced by chitosan with a concentration of the same order of magnitude [45]. Indeed, in addition to polymer concentration, its molecular weight also influences its ability to be electrospun. In section 1.3.2.2, the effect of polymer concentration on the structure of electrospun fibres will be presented.

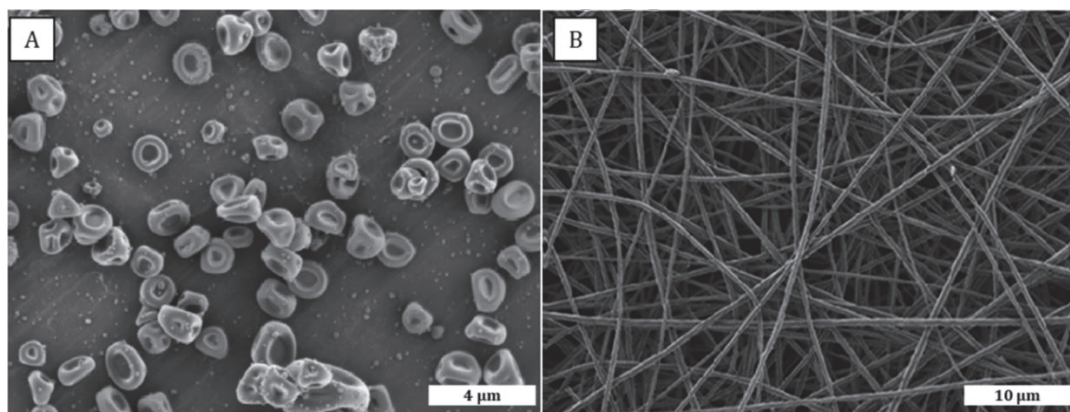


Figure I-4. Electrospun and electrospun silica solutions. (A) TEOS/GPTEOS solution with a viscosity of 11 mPa.s and (B) PEO/TEOS/GPTEOS solution with a viscosity of 50 mPa.s. Adapted from [91]

A major requirement in selecting the carrying polymer is its non-cytotoxicity and biocompatibility when it is kept in the final fibres, as well as its ability to provide good mechanical properties to the final material. When the polymer is intended to be calcined after the electrospinning process, its thermal behaviour and ease of electrospinning are the main properties to take into account. In the case of silicon-based ceramics, the most commonly used polymers are polyvinyl butyral PVB [53,70,72,82,83,92,93], polyethylene oxide PEO [45,46,91] and polyvinyl alcohol PVA [48,51,86]. But studies with polycaprolactone PCL [44,89], poly(vinyl butyral-co-vinyl alcohol-co-vinyl acetate) [73,84], gelatine [62], polyvinylpyrrolidone PVP [50], poly (L-lactic acid) PLLA [36], polylactic acid PLA [68] or a combination of PCL and PHB [88] have also been published. Natural polymers such as chitosan [45], which has the particularity of being bioactive and antibacterial, can also be used.

On top of these requirements, a suitable solvent for polymer dissolution has to be selected and most of the syntheses reported in the literature are water or water and ethanol-based systems. Water is also necessary for the hydrolysis of silicon and phosphorus precursors and thus for a successful sol-gel synthesis and glass formation. This condition implies that to enable the use of hydrophobic biodegradable polymers, the water content has to be limited but not suppressed. In the PCL/phosphosilicate bioactive glass system for example, methyletylketone (MEK) is used as a co-solvent for both PCL and inorganic precursors [89]. The water to TEOS ratio was reduced to 8, while the water to MEK (v/v) ratio was kept under the value of 1. Indeed, at lower ratios, hydrolysis reaction was too slow. Conversely, for higher ratios the polymer phase started to separate from the sol as water limits the solubility of PCL in the inorganic sol. Water content can also influence the morphology of electrospun fibres, as it modifies the hydrolysis rate of glass precursors and thus the viscosity of the solution. As a result, the fibre diameter was found to increase with an increasing water/TEOS ratio [81].

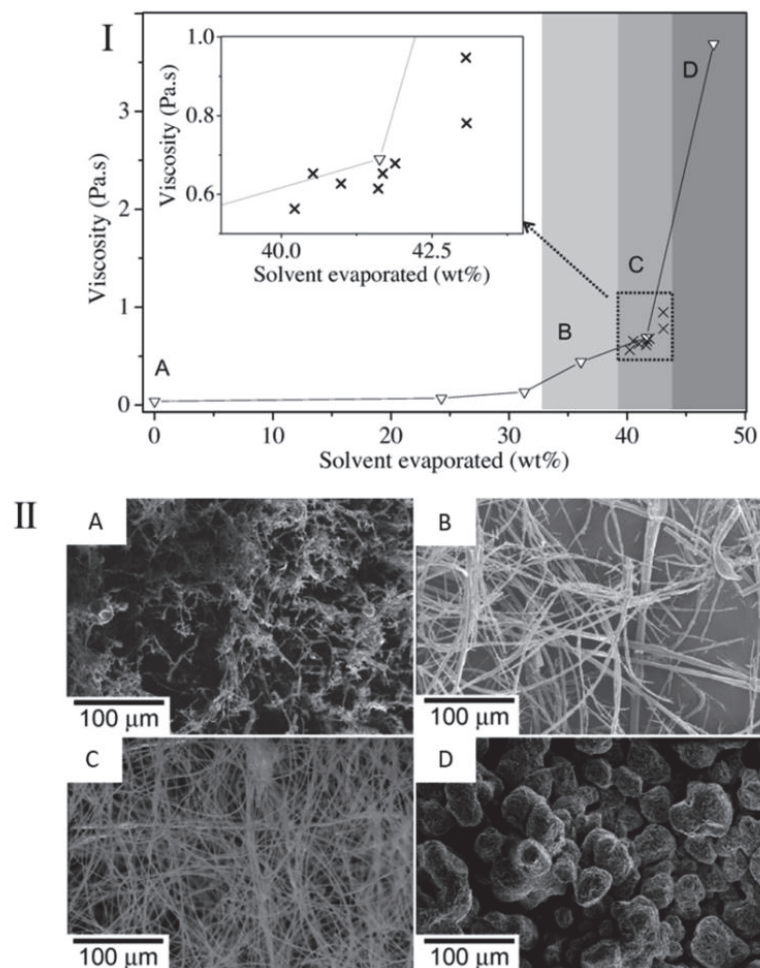
### **1.2.2. Polymer-free sol-gel solutions**

Several researchers have also studied the electrospinning of polymer-free sols. In this case, an accurate control of the rheological properties of the sol gel solution is necessary to make it viscous and elastic enough so as to enable its stretching and thus avoid spraying. Although this is a very challenging operation, this technique offers the advantage of not bringing any polymers into the electrospun fibres. Therefore, there is no need to perform any subsequent thermal treatment to eliminate the polymer chains.

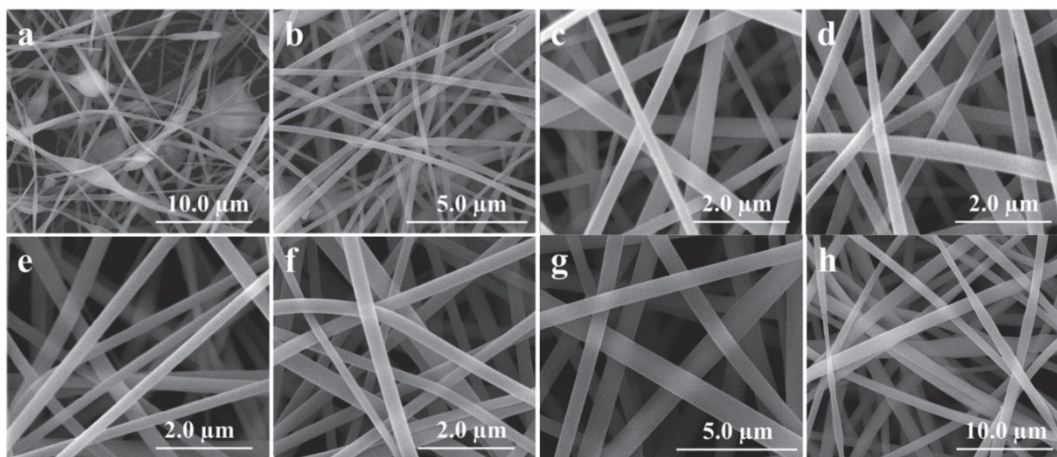
In the sparse concerned studies of polymer-free electrospinning, the synthesis protocol was very similar: for silica sols, a mixture of TEOS and ethanol was acidified using diluted hydrochloric acid. Acidic catalysis is expected to form long linear molecules in order to provide the viscoelastic properties that are necessary to stretch the jet without breaking it into droplets (role fulfilled by the polymer in the inorganic-polymer systems). Experimentally, molar ratios of TEOS:EtOH:H<sub>2</sub>O:HCl were set to 1:2:2:0.01 [43,94–96], 1:3.8:2:0.08 [49], 1:1:2:0.01 [97] or 1:1:4:0.02 [98]. Regarding Ca-containing silicate glasses (composition 70S30C: 70 mol.% SiO<sub>2</sub> and 30 mol.% CaO), calcium was incorporated in the system using calcium nitrate [63] or calcium chloride dihydrate precursors [64,65]. Molar ratios of TEOS:EtOH:H<sub>2</sub>O:HCl:Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> were set to 1:2:2.2:0.01:0.3 [63] and molar ratios of TEOS:EtOH:H<sub>2</sub>O:HCl:CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O were of

1:1:2:0.02:0.1 [64,65]. For both silica and SiO<sub>2</sub>-CaO systems, heating the sol to around 70-80 °C was necessary to increase the viscosity and for linear crosslinking of the inorganic chains, both resulting from solvent evaporation and subsequently a higher probability of species meeting and reacting in a more concentrated solution [94]. In addition, the evaporation of ethanol generates a displacement of the reaction equilibrium [63]. Varying the duration of ageing time at 60-80 °C is also a way of controlling the final viscosity of the solution [94,99].

Viscosity of the sol plays a major role in its ability to be electrospun. In the case of 70S30C glass, short fibres, long fibres or agglomerates were obtained for viscosity values of 250 mPa.s, 560-950 mPa.s and above 2.77 Pa.s respectively (Figure I-5) [63]. For comparison, in the Ca-free (100% SiO<sub>2</sub>) composition, the optimal viscosity for getting continuous fibres was found to be between 290 and 560 mPa.s. In another study, the exact same composition of the silica sol was used (TEOS:EtOH:H<sub>2</sub>O:HCl = 1:2:2:0.1) but with a slightly different ageing procedure. In that case, bead-free fibres could be obtained for viscosities higher than 110 mPa.s (Figure I-6) [94], and the most stable jet was achieved for viscosities between 130 and 160 mPa.s. However in such optimised cases, instabilities started to appear after 3 to 5 min. After that, cleaning the solidified solution at the needle tip was necessary to make the electrospinning start again.



**Figure I-5.** Change in morphology of electrospun Ca-containing SiO<sub>2</sub> bioactive glass with the evolution in solution's viscosity resulting from solvent evaporation. SEM images (II) are named after the A to D domains of graph I, which gives viscosity values of electrospun solutions. Reproduced from [63]



**Figure I-6.** SEM images of silica fibres electrospun from a polymer-free solution. Viscosity values of the sol are a) 65 mPa.s, b) 102 mPa.s, c) 110 mPa.s, d) 125 mPa.s, e) 145 mPa.s, f) 198 mPa.s, g) 398 mPa.s and h) 981 mPa.s. Reproduced from [94]

Actually, there is no threshold value of viscosity for which any sol of any composition can be electrospun because the viscosity of the solution is not the only parameter involved in its spinnability. Indeed, its elasticity is another criterion for the rheological properties to be optimal: it should be high enough to withstand the stretching of the jet under the electrical field. Although this phenomenon has been reported for polymer-only solutions [100], this feature hasn't been studied for these types of sol-gel systems.

Ideally, avoiding the use of a polymer has the advantage of limiting the temperature of the heat treatment that is usually performed to eliminate organic species (more details will be provided in section 1.3.3), but that can also lead to glass crystallisation and thus modified bioactivity. Both the silica and SiO<sub>2</sub>-CaO fibres were treated at a temperature as low as 60 °C [43,63]. Also, it was demonstrated that apatite formation in SBF was prevented by increasing the calcination temperature (up to 800 °C) of polymer-free silica fibres [95]. In fact, thermal treatment gradually eliminates Si-OH silanol groups that act as nucleation sites for apatite. In both this study and also a second one from the same authors [96], cellular tests were performed on fibres which were either non calcined [96], treated at 200 °C [95] or treated at 500 °C [96]; but the choice was made not to present the results here due to the lack of controls for the biological tests. Also, it is noteworthy that in the calcium nitrate-containing systems, high temperature would be required anyway to remove toxic nitrates before using the fibres *in vitro*.

On a biological point of view, silica fibres obtained *via* polymer-free electrospinning were shown to support MC3T3-E1 osteoblast-like cells proliferation better than tissue culture plate positive control [97]. In another study from the same research group however, cell attachment and proliferation were reduced on the silica fibrous constructs compared to tissue culture plates [98]. Even so, the expression of markers of MC3T3-E1 cell differentiation was stronger when the cells were cultured on the fibrous scaffolds. Also, a first investigation on the *in vivo* activity of these materials four weeks after their implantation in rabbit calvarial defect evidenced new bone formation without engaging soft tissue between the fibres and the new bone. This result supports the potential use of such fibres to promote bone regeneration. However, the lack of mechanical properties of these pure inorganic scaffolds was evidenced

during compressive mechanical testing: fibres are broken as a result of their brittleness and cannot get back to their initial shape after unloading [63].

### **1.3. PROCESS PARAMETERS AFFECTING THE FIBRE STRUCTURE**

As seen in the first sections, electrospinning of a silicon-containing sol or a sol/polymer hybrid is achievable by controlling the properties of the electrospun solution. Besides, the electrospinning parameters must be adapted too to produce the filaments. During the entire process leading to the formation of ready-to-use fibres, many different parameters including both chemical composition of the spinnable solution and electrospinning setup control affect the final structures of the filaments.

#### **1.3.1. Influence of the electrospinning parameters**

During electrospinning, the choice of parameters is directly related to the properties of the solution – its rheological behaviour, electric conductivity and surface tension. Indeed, an electric field high enough to overcome the surface tension of the solution is required in order to initiate jet production (Figure I-1). The stretching of the jet is also dependent on the solution's ability to carry charges, thus its electrical conductivity [11]. Nagrath *et al.* reviewed the effects of these parameters on the morphology of bioactive glass fibres resulting from *in situ* synthesis in greater detail [37]. For this reason, only general trends are given here and readers are referred to that article for more information. As literature is lacking on this subject in the case of silica, optimisation of the electrospinning process is discussed below regarding mainly bioactive glasses.

When the electric field strength was increased from 1.6 to 1.8 kV/cm for a PVP+P123/bioactive glass system [85], fibre diameters decreased from 110 to about 85 nm. Also, the fibre diameter was not significantly changed when the electric field was increased to 2.0 kV/cm. In fact, when the voltage is increased, a higher amount of charges is present on the fibre surface. The self-repulsion of these charges leads to the increase of elongation forces applied to the jet, and as a result the fibre diameter becomes smaller. When the amount of charge is too high, instabilities appear and the jet can break. Taking these parameters into consideration, average diameters of 58S fibres (mol. %: 58.0% SiO<sub>2</sub>-26.3% CaO-15.7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) can be obtained in the range from 85 to more than 400 nm by varying the polymer (PVP only or PVP and P123 mixture) concentrations and electric field value [85]. It is also necessary to find a good compromise between the values of voltage and needle-to-collector distance. Indeed, so as to get smooth fibres, this distance needs to be increased for higher voltage values [86]. It is therefore more meaningful to consider electric field (kV/cm) and not only high voltage (kV). When the working distance is too short, solvent evaporation is incomplete and leads to interconnected structures of the mats [101]. Finally, the feeding rate is another parameter to control during the electrospinning process as it influences the diameter of the obtained fibres. Also, if the feeding rate is too low, the collected fibres are not continuous [101]. No studies analysing the effects of environmental factors such as temperature and humidity, known to play a role in the electrospinning process [11], could be found for the electrospinning of *in situ* synthesised Si-based materials. In conclusion, many

factors can influence the homogeneity of the obtained fibres. Controlling these parameters represents a tool to tailor the final characteristics of the resulting fibres and to make them correspond with expected features.

### 1.3.2. Effect of the characteristics of the spinnable solution

- *Effect of sol ageing time*

An important point is that the inorganic sol that is part of the electrospun solution is also reactive and evolves with time. Hydrolysis and condensation phenomena imply at least an increase in viscosity which is usually not proportional to time.  $^{29}\text{Si}$  NMR results showed that amount of  $\text{Q}_4$  species increased with duration of ageing time of a 58S sol, which resulted in the formation of a 3D crosslinked Si network structure and thus an increase of the sol viscosity [67]. Indeed, increasing the ageing time of the solution was found to result in the same effect as an increase in PVA concentration: an enhancement of viscosity and conductivity and reduced pH [51]. Fibres diameters were also impacted, ranging from less than  $0.5\ \mu\text{m}$  with no ageing time to about  $2.0\ \mu\text{m}$  after 5 hours of ageing for the solution containing 4.5 wt.% of PVA. The time period studied was as short as 5 hours, demonstrating the rapidity of rheological changes. However, it is not specified how long the sol can be electrospun before being unspinnable due to overextended ageing time. As sol-gel chemistry is very sensitive to many parameters such as solution composition as well as external factors like temperature, reaction time and others, it is quite difficult to compare studies to each other as many processing parameters are not kept constant. For instance, Shu-Hui Xia *et al.* were able to electrospin a similar solution of hydrolysed TEOS and PVA in water after 2 days of ageing [48]. In that case, higher PVA concentration (8 wt.%), lower TEOS/PVA ratio (2.5 against 5.9 to 10.6 wt.% in the previous study), as well as different electrospinning parameters were used. All these parameters minimise the effect of the rheology changes due to gelling.

These evolving properties of the bioactive glass sol can also affect the homogeneity of the sol/polymer mixture. In particular, for the first 4 days of ageing of a 58S glass sol, small synthesised particles could easily be dispersed in a PAN solution [67]. On the contrary, after 7 days of ageing, compact aggregates formed and could hardly be dispersed in the polymeric solution, leading to an irregular distribution of particles along the fibres after electrospinning. Also, an uneven distribution of Si and Ca along the fibres was noticed. Crystallisation of the glass after heat treatment at  $1000\ ^\circ\text{C}$  was also favoured when the ageing time reached 4 days or more, with a higher crystallinity for a 7-day ageing time.

Sol-gel reaction thus needs to be accurately controlled so as to obtain homogenous solutions with appropriate properties that will allow them to be electrospun and to form glass with adequate characteristics.

- *Effect of sol/polymer ratio*

Adjusting the ratio between the polymer solution and the silica xerogel or bioactive glass sol influences the electrospun fibre morphology. While keeping constant the final concentration (11 wt.%) of PLLA in the electrospun mixtures, a reduction in fibre diameter was noticed when

the silica content was increased [36]. While the average fibre diameter of pure PLLA was  $(1330 \pm 220)$  nm, it was substantially decreased to  $(280 \pm 60)$  nm,  $(210 \pm 40)$  nm and  $(140 \pm 50)$  nm for 20, 40 and 60 wt.% silica xerogel content, respectively. Besides, the addition of PVP polymer to a bioactive glass sol resulted in the increase of the viscosity and conductivity, and a decrease in the surface tension of the solution [85]. These last two phenomena explain the decrease in fibre diameter until a certain value of PVP concentration was reached – 0.20 g/mL – leading to an average fibre diameter of around 125 nm. At higher PVP concentrations, the effect of viscosity dominates and the average diameter of the fibres increased again (around 425 nm at a PVP concentration of 0.30 g/mL).

Another interesting result is related to the core-shell structures obtained by varying this polymer/silica xerogel solutions ratio in PEO-silica xerogel hybrid fibres [91]. Indeed, when the PEO/silica xerogel weight ratio was 10 wt.% or lower, a core-shell structure with PEO as the core and silica xerogel as the shell was obtained. Following the same principle, hollow fibres of silica [102,103] and 70S30C [101] were created by electrospinning a mixture of glass precursors and PVP or PVB polymers, respectively. According to the authors, this phase separation would be caused both by solvent evaporation during electrospinning and by a low affinity between glass precursors and polymer. As discussed later (section 1.4.2), hollow fibres have been studied for drug delivery applications.

- *Effect of supplementation with a porogen agent*

Another advantage of polymer addition in the solution is linked to the creation of porosity inside and at the fibre surface. This is an interesting way of improving the bioactivity of the materials by enhancing their surface area, the amount of bioactive glass available at the surface of the fibres and consequently their dissolution rate. A system combining bioactive glass (58S) and PAN was used, but poly(methyl methacrylate) PMMA was added in the system as a porogen polymer [77]. This polymer underwent a phase separation when mixed with PAN. As its degradation temperature is lower than that of PAN, it was eliminated during heat treatment at 1000 °C in N<sub>2</sub> while PAN was transformed into carbon fibres. For a PAN/PMMA weight ratio of 4/3, the fibres displayed grooves and pores at their surface, creating an open porous structure. The pore size was of about 22 nm and the surface area of 35.0 m<sup>2</sup>/g. As a result of the increased surface area, biomineralisation, cell proliferation and osteogenic differentiation were favoured [77]. Similarly, Ravichandran *et al.* inserted shaping agent P123 into silica fibres to create mesoporosity in the fibres after their calcination [50,104].

### **1.3.3. Role of treatments on as-spun fibres**

Biodegradable polymers can be used for electrospinning purpose and then be kept in the fibres to be degraded little by little and to gradually expose the inorganic materials to the biological media and cells. For this purpose, biodegradable polycaprolactone (PCL) was used on its own with the bioactive sol [89], but also in combination with polyhydroxybutyrate (PHB) [88]. As in the last cited example, combined properties from two polymers exhibiting distinctive features can be granted to the final fibres [88]. Indeed, another positive effect of the polymer, before it is dissolved, is its contribution to the mechanical properties of the final fibres [88]. As such, PCL and PHB were selected for their flexibility and stiffness, respectively. But most commonly, fibres



are subjected to treatments once electrospun so as to increase the condensation of the silica network or to get rid of organic species and of salt precursor counter ions.

First of all, the drying and/or ageing of as-spun fibres are commonly reported right after the electrospinning process. They are pivotal steps because they are meant to evaporate solvent residues and to further condense the silica network respectively. Both the silica xerogels and bioactive glass fibres, either containing a polymer or not, were treated at temperatures ranging from room temperature to 110 °C. It was reported in section 1.3.2.1 that polycondensation of silicon networks could also be improved by varying the ageing duration of the gel before electrospinning. Another suggested way of doing this is to use an acid stream treatment [68]. After electrospinning, fibre mats were placed above HCl solutions at 40 °C for 24 hours. However, no chemical analysis was performed to prove the enhanced degree of polycondensation of the resulting fibres in that case. Also, crosslinking of silica xerogel/PVA hybrid fibres after electrospinning with glutaraldehyde was reported so that the fibres can maintain their fibrous morphology during *in vitro* or *in vivo* studies [48]. In fact it was shown that, without cross-linking, the fibres fused into a dense, non-fibrous membrane.


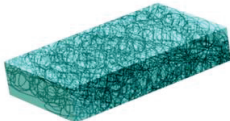
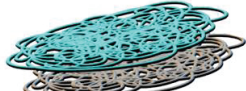

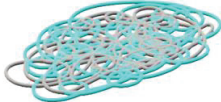
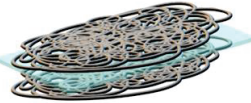

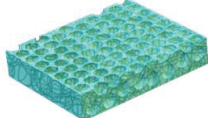
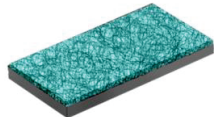
Secondly, embedding the biological ceramic into a polymer matrix that does not present bioactive features can limit the bioactivity of the fibres. Therefore a calcination step can be carried out after electrospinning (and drying/ageing if any) with the aim of exposing all the ceramic content to the biological medium. This enables the elimination of the polymer and results in the obtaining of pure inorganic fibres. The processing temperature needs to exceed the degradation temperature of the polymer. For instance, typical pyrolysis temperatures used for silica fibres are 500-550 °C so as to ensure polymer decomposition [50,51,104]. In such cases, the silica content should be high enough to maintain its fibrous morphology after calcination and to avoid the loss of filament shape; but no detailed study is available on this point. Furthermore, thermal treatment induces the integration of network modifiers within the silica network [63]. Also, as nitrates are often brought into glass systems through the use of calcium nitrate precursor, a calcination step is necessary to eliminate this toxic compound, whose thermal decomposition starts around 500 °C. It is also important not only to stabilise the glass but also not to exceed its crystallisation temperature so as not to lower its bioactivity. Calcination of 58S-containing fibre at 600 °C led to the production of inorganic XRD-amorphous fibres for example [81,85], while a wollastonite  $\text{CaSiO}_3$  phase was detected after treatment of 58S-containing PAN fibres at 1000 °C [67]. Interestingly, this study also evidenced that XRD analysis can lack sensitivity to detect some crystalline phases into electrospun fibres, due to their possible nanometric size. Indeed, crystalline wollastonite could only be detected by HR-TEM and FFT diffraction patterns. This phenomenon should be taken into account when characterizing this type of material. So far in the literature, authors have most of the time limited the crystallisation study to XRD analysis.

The calcination step also leads to the reduction of fibre diameter through the elimination of polymers and the consolidation of the glass network upon heat treatment [76,81,85]. Similarly, it also influences fibre shrinkage in the longitudinal direction, as reported in greater detail in the review of Nagrath *et al.* [37]. Finally, heat treatment was correlated with the apparition of a core-shell structure after the calcination of calcium-containing silica xerogel/PVB fibres [105]. While the distribution of elements was homogeneous in the as-spun fibres, the phase separation occurring upon heat treatment at 1000 °C was suggested to result from the decomposition of

organic species. The latter drives the silica towards the fibre surface and results in a  $\text{SiO}_2$  shell. On the contrary, a calcium rich phase remains in the core and forms  $\text{CaSiO}_3$ . This phenomenon was found to be dependent on the calcium to silicon ratio, temperature and the presence of other doping elements [105].

## 1.4. APPLICATIONS OF SILICON-BASED FIBRES IN BONE TISSUE ENGINEERING

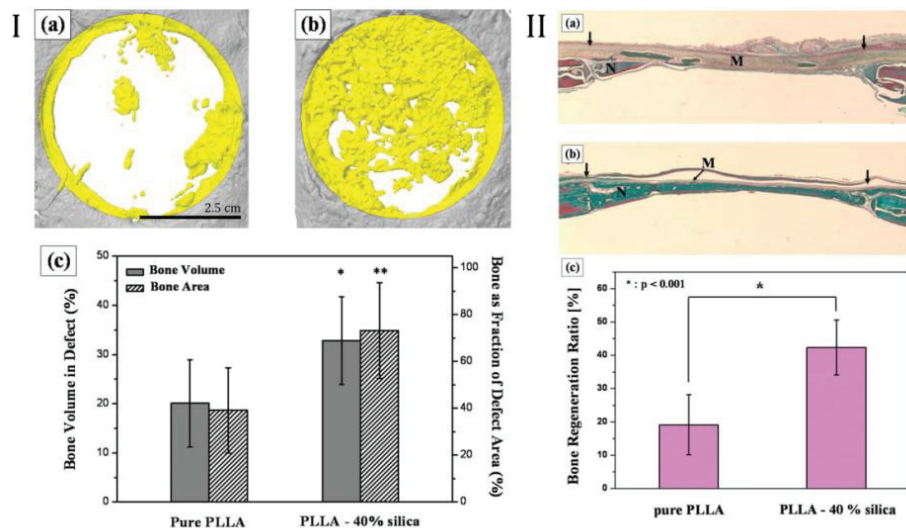
Different biological evaluations of Si-based electrospun fibres have been presented throughout this first chapter in order to justify the selection of the studied materials as well as the methods used to synthesise them. This section 1.4 is meant above all to emphasise the potential uses of silicon-based fibres for BTE. As a support, Figure I-7 gathers in broad lines all the cellular and *in vivo* studies of materials prepared with silica-based fibres. Most of them are developed in this section 1.4 but previously mentioned studies are also included. In this figure, three classes of materials are distinguished: self-supported fibres (developed in section 1.4.1), composite and biphasic materials of silicon-based fibres and either polymeric or inorganic phases (both detailed in section 1.4.3). In section 1.4.2, drug-delivery systems made of Si-based fibres are presented. However, they do not appear in Figure I-7 due to the absence of cellular or *in vivo* investigations in presence of the drugs.

SELF-SUPPORTED FIBRES	FIBRES AS FILLERS IN COMPOSITES	FIBRES IN BIPHASIC MATERIALS
<p><b>A</b></p>  <p><b>2D MATERIALS</b> Cellular assays: MG-63 on <math>\text{SiO}_2</math><sup>44</sup> • MC3T3-E1 on <math>\text{SiO}_2</math><sup>97,98</sup>, <math>\text{SiO}_2</math>-CaO<sup>61</sup>, <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math><sup>69</sup> and 13-93<sup>116</sup> • BMMSCs on <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math><sup>53,75</sup> <i>In vivo</i> implantation: <math>\text{SiO}_2</math><sup>36</sup></p>	<p><b>D</b></p>  <p><b>EMBEDDING FIBRES IN A MATRIX</b> Cellular assays: <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in PCL, MC3T3-E1 cells<sup>84,73</sup> • <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in PLA, MC3T3-E1 cells<sup>83</sup> • <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in collagen, BMMS cells<sup>93</sup> • Cu-doped 45S5 in collagen-gelatine, SaOS-2 cells<sup>114,115</sup> • <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in calcium sulfate cement, BMMSCs cells<sup>80</sup> <i>In vivo</i> implantation: <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in PCL<sup>73</sup> • <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in collagen with FGF2 growth factor<sup>93</sup></p>	<p><b>G</b></p>  <p><b>STACKING OF 2 FIBROUS MATERIALS</b> Cellular assays: <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math>/PVB fibres and silk fibroin/PVA fibres, MG63<sup>92</sup></p>
<p><b>B</b></p>  <p><b>STACKING OF FIBROUS LAYERS</b> Cellular assays: MG-63 on <math>\text{SiO}_2</math><sup>50</sup></p>	<p><b>E</b></p>  <p><b>ENTERTWINING NETWORKS OF POLYMER AND INORGANIC FIBRES</b> Cellular assays: <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> and PLLA fibres, human BMMSCs<sup>66</sup> <i>In vivo</i> implantation: <math>\text{SiO}_2</math>-CaO and PCL fibres<sup>65</sup></p>	<p><b>H</b></p>  <p><b>SANDWICH MATERIALS</b> Cellular assays: gelatin between two layers of <math>\text{SiO}_2</math> fibres, MG63<sup>104</sup></p>
<p><b>C</b></p>  <p><b>3D CONSTRUCTS</b> Cellular assays: 3T3 on <math>\text{SiO}_2</math><sup>51</sup> • MC3T3-E1 on <math>\text{SiO}_2</math>-CaO<sup>63</sup></p>	<p><b>F</b></p>  <p><b>FIBRES-CONTAINING POLYMER POROUS MATRIX</b> Cellular assays: <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> in PLA matrix, rat BMMSCs<sup>70</sup></p>	<p><b>I</b></p>  <p><b>COATING</b> Cellular assays: <math>\text{SiO}_2</math> fibres grafted on a <math>\text{SiO}_2</math>-CaO-<math>\text{P}_2\text{O}_5</math> coating dip-coated onto inert glass, fibroblasts<sup>46</sup></p>

**Figure I-7.** Different types of Si-based ceramic-containing materials studied in the field of BTE: cellular and *in vivo* studies. For the electrospun fibres, only the composition of the inorganic phase is given (polymer phase not specified)

### 1.4.1. Use of fibres as self-supported materials

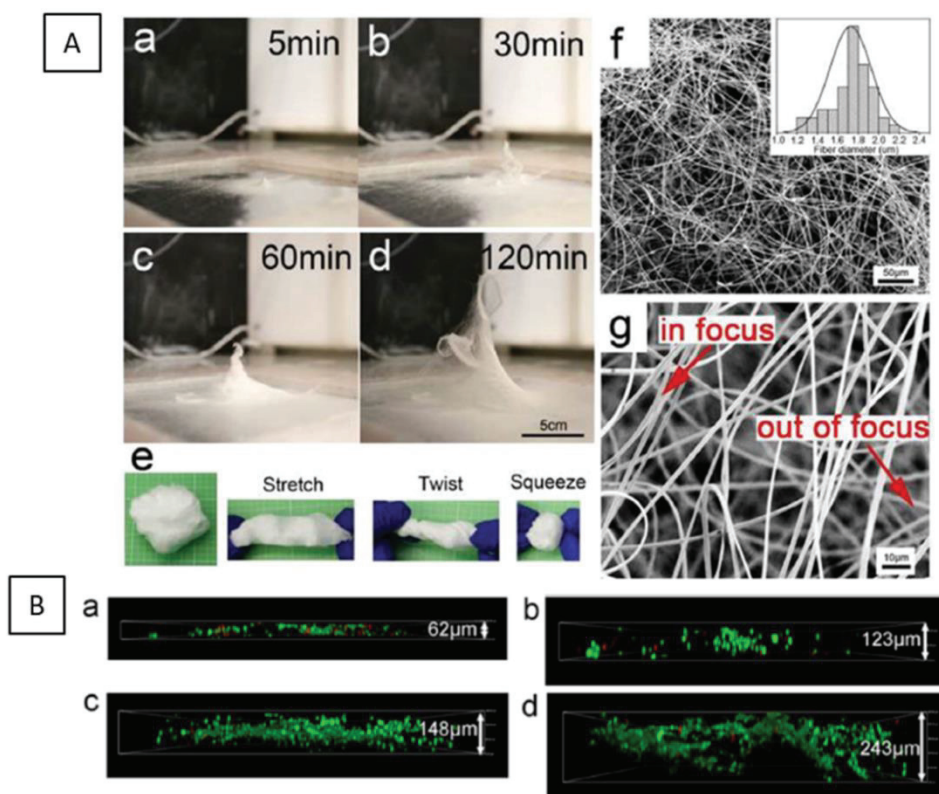
*In vivo* implantation of electrospun silica xerogel-containing fibres was reported in 2011 by Jang *et al.* [36] (representation in Figure I-7.A). Hybrid fibres were synthesised to be used as-spun in Guided Bone Regeneration (GBR). This technique aims at reconstructing damaged bone tissue through the use of a barrier membrane, both by improving regeneration of the new bone and by preventing in-growth of fibrous connective tissue into the space required for the bone regeneration. After electrospinning, PLLA polymer was kept in the final fibres to improve the mechanical properties of these silicon-based hybrids. Sufficient mechanical properties matter in order to favour an easy handling of the materials during implantation as well as to withstand external forces *in vivo*. The fibres elastic modulus was improved with the content of silica xerogel. Similarly, the tensile strength of the filaments raised with the amount of silica xerogel and reached a maximum for PLLA-40% silica xerogel fibres but dropped drastically when the silica xerogel content reached 60 % [36]. Also, the use of an excessive concentration of silica xerogel had a deleterious effect on the ductile nature of PLLA which gradually switched to a brittle behaviour as the silica xerogel content increased. From a biological point of view, increasing the silica xerogel content in PLLA-SiO<sub>2</sub> hybrid membranes led to a gain in surface hydrophilicity, in silicon release and in ALP activity of MC3T3-E1 cells. The sample containing 40 wt.% of silica xerogel was compared to pure PLLA membranes for *in vivo* experiments, for which membranes were placed in rat calvarial defects [36]. Six weeks after implantation, the higher bone regeneration ability of the hybrid membranes compared to pure PLLA ones (Figure I-8) was confirmed by both micro-CT 3D images of the defect and histological staining with Masson-trichrome and Haematoxylin-Eosin of the extracted bone tissue. In addition, no inflammatory response was revealed for either sample nor did soft tissue penetrate into the defect margin, proving the potential use of this material in GBR.



**Figure I-8.** I) Micro computed tomography images of the rat calvarial defects, 6 weeks after they were covered with (a) pure PLLA membrane and (b) PLLA-40 % silica xerogel hybrid membrane. c) Regenerated bone volume 6 weeks after the membranes were implanted (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$ ,  $n = 10$ ). II) Optical micrographs of the stained (Masson-trichrome and haematoxylin-eosin) bone tissues 6 weeks after the membranes were implanted: (a) pure PLLA nanofibrous membrane and (b) PLLA-40% silica xerogel hybrid membrane. No scale bar indicated in the original article; (c) Bone regeneration rate (ratio of the new bone to the total defect area). Arrow: edges of the defects; N: new bone; M: membrane”.

Reproduced from [36]

While the previously reported study used fibres in the form of a membrane, 3D materials can also be used. In this case, it is important to take material porosity into account. This aspect is indeed essential for cell in-growth as well as better cellular diffusion and exchange of essential nutrients throughout the structure. It has been demonstrated that stacking a few layers of fibrous silica membranes (Figure I-7.B) in order to increase material three-dimensionality was not an efficient method of improving biological behaviour [50]. Indeed, layer-by-layer stacking of such porous material reduces the macroporosity that is commonly useful for cell infiltration and angiogenesis. In order to improve the infiltration of cells in the materials, Hoa-Yang Mi et al. modified the final macroscopic architecture of fibrous silica [51]. They fabricated, *via* the calcination of self-assembled silica xerogel-PVA electrospun fibres, super absorbable 3D silica sponges with a bulk density of 16 mg/cm<sup>3</sup>, a surface area of 6.45 m<sup>2</sup>/g and a high porosity (98 %). This self-assembled 3D structure (Figure I-7.C) was obtained by adjusting the electrospinning solution parameters, mainly the PVA concentration and solution ageing. Indeed, while 2D structures (thickness not given in the original article) were obtained when 14% PVA-containing solutions were electrospun without ageing time, 3D structures were obtained when the ageing time was increased to three hours. The height of the structure reached about 10 cm after spinning for 2 h (Figure I-9.A). However, because the construct preferentially grows in the direction of the needle tip, the material doesn't become homogeneously thicker over its entire surface and takes the shape of a cone. The authors explained this three-dimensionality by the linkage formation between the TEOS and PVA occurring in the solution during ageing and in the electrospun fibres. This link leads to the formation of a highly electronegative siloxane shell among PVA molecules that causes electrostatic repulsion between the fibres and thus a loosely packed structure of deposited fibres. After calcination (800 °C, 3 h), light, soft and easily deformable silica sponges were obtained (Figure I-9.A.e). High viability and proliferation rates were obtained for 3T3 fibroblast cells cultured on these sponges [51]. As expected, cells were able to penetrate deeper into the 3D construct. Indeed, as they penetrated up to 148 µm in the silica membranes after 10 days, the maximum penetration depth was 243 µm in the silica sponges (Figure I-9.B). Yet, it is noteworthy that this penetration depth remains low compared to the thickness of the whole material. Finally, 3D structures showed a higher viability of 3T3 fibroblast cells compared to silica 2D membranes. Another possible method of producing cotton wool-like fibres was reported and involves the addition of calcium in the silica sol [63] (Figure I-7.C). This structure results from the modification of different solution parameters such as rheological properties and conductivity of the solutions, with instabilities during electrospinning leading to branching. Yet, no details are provided about the thickness of the obtained materials nor the infiltration of cells.

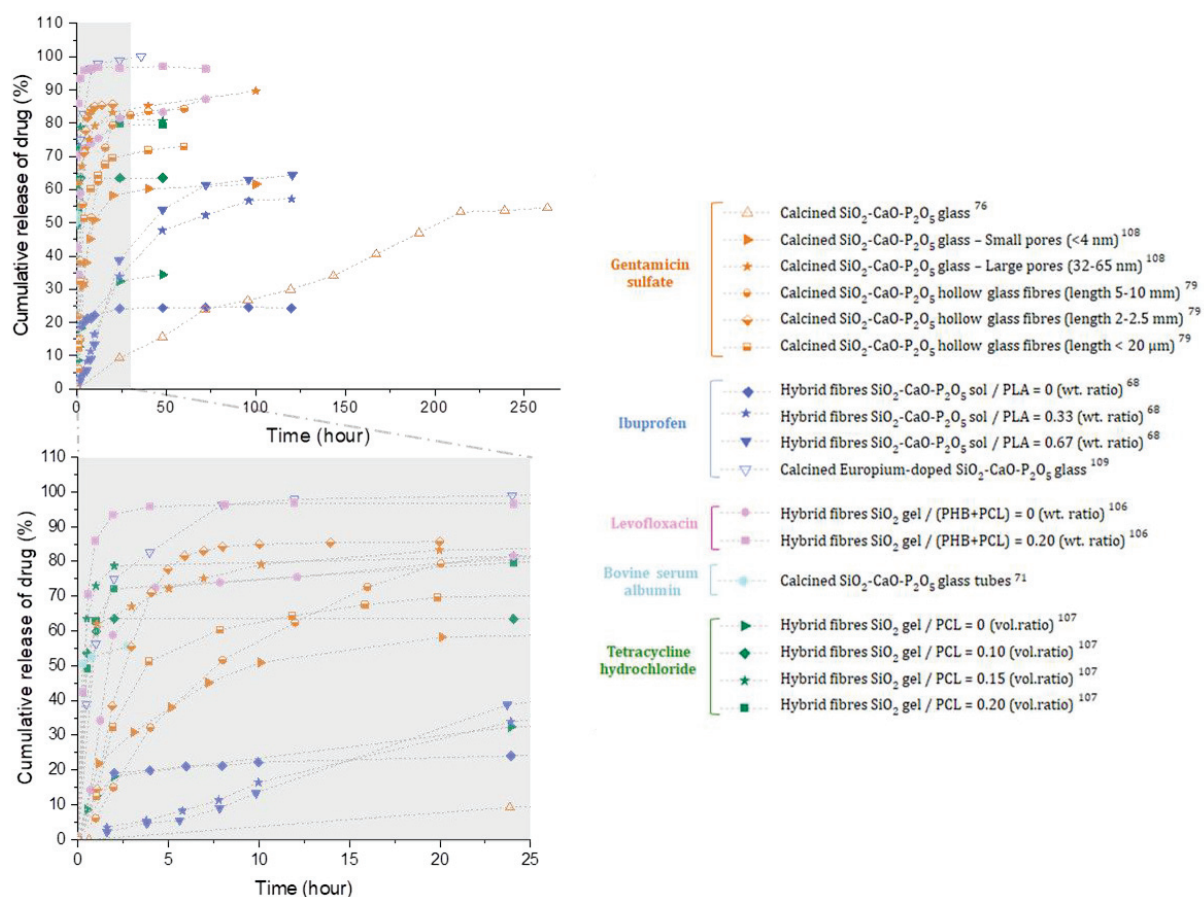


**Figure I-9.** (A)(a-d) Electrospinning of TEOS/PVA sponge and 3D development with time; (e) deformation of silica sponge on a macroscopic level; (f-g) SEM images of the resulting fibres, with a fibre diameter distribution histogram as an insert in (f). (B) Confocal images of live/dead assay, showing the penetration depth of cells cultured on (a,c) silica membranes for 3 and 10 days respectively, and on (b,d) silica sponges for 3 and 10 days respectively. Reproduced from [51]

#### 1.4.2. Applications in drug-loading/delivery systems

Bioactive glass based-fibres can be used as a carrier for antibiotics or biologically active proteins such as growth factors, cytokines or antibodies. These drug-delivery materials are promising for enhanced bone regeneration since they can direct cell activities through integrin-ligand interactions [81]. The regenerative capacity of an implanted material will then depend on the release specificities of proteins from the material. In addition, it is important that the release capacity of antibiotics should last for 5-10 days in order to be efficient [76].

As biologically active substances are sensitive to temperature, they can be introduced in the solution to be electrospun only when no heat treatment is necessary after electrospinning. Using this technique, delivery of levofloxacin (LFX) [106] and tetracycline hydrochloride (TCH) [107] was shown to be very fast as a plateau was reached within the first few hours of immersion in SBF. Also, an increased amount of silica content in the fibres was linked to faster drug delivery. Graphical comparison of these delivery rates is represented in Figure I-10.



**Figure I-10.** Comparison of literature results regarding cumulative releases of drugs loaded on silicon-based fibres. Grey area in the upper graph is magnified in the second one. Studied drugs are distinguished in the graph by their colours. For an easier reading, errors bars have not been plotted but can be found in the original articles [68,71,76,79,106–109]. It is also important to note that this graph is a comparison of cumulative release of drug in percentage of the amount of drug initially loaded on the fibres. This amount depends on the protocol used in each study

A frequent strategy to load these bioactive molecules is to create porosity on the fibres in which they can be hosted and be released. This porosity is achieved by using additional surfactant compounds or template additives. This method is thus compatible with the use of thermal treated filaments. Some systems displayed fast drug release, with a plateau in the delivery reached in 8 hours for ibuprofen [109] or in slightly more than 20 hours for gentamicin sulfate [108] (Figure I-10). Better delivery control over time was reported with ibuprofen and gentamicin sulfate. For the former, P123 was used alone as a structure-directing agent and was responsible, after dissolution in ethanol, for the creation of 4-5 nm mesopores in sol-gel synthesised phosphosilicate-containing PLA fibres [68]. No burst release was observed in the first hours of immersion and controlled delivery was displayed over around 100-120 hours of release in SBF. Total delivery was therefore 55-65 %. The amount of drug delivered was also shown to be dependent on the quantity of bioactive glass loaded on the PLA-based fibres as a higher amount of glass led to an enhanced mesoporous structure (see Figure I-10). Regarding gentamicin sulfate (GS) drug delivery system, a controlled release was obtained through the creation - after calcination of PVP and P123 contained in the as-electrospun bioactive glass fibres - of hexagonal ordered structure displaying mesoporous size of approximately 4 nm [76]. These fibres were subsequently loaded with GS and freeze-dried. Delivery was well-controlled

as the matrix exhibited prolonged and gradual release of GS over 10 days, as displayed in Figure I-10.

Another suggested method for improved drug-loading capacities is the creation of hollow fibres. It was expected that the space available for drug hosting would be enhanced, as well as interactions with a biological medium. However, burst deliveries were highlighted in both protocols proposed in the literature, either with BSA (Bovine Serum Albumin) [71] or gentamicin sulfate [79] (Figure I-10).

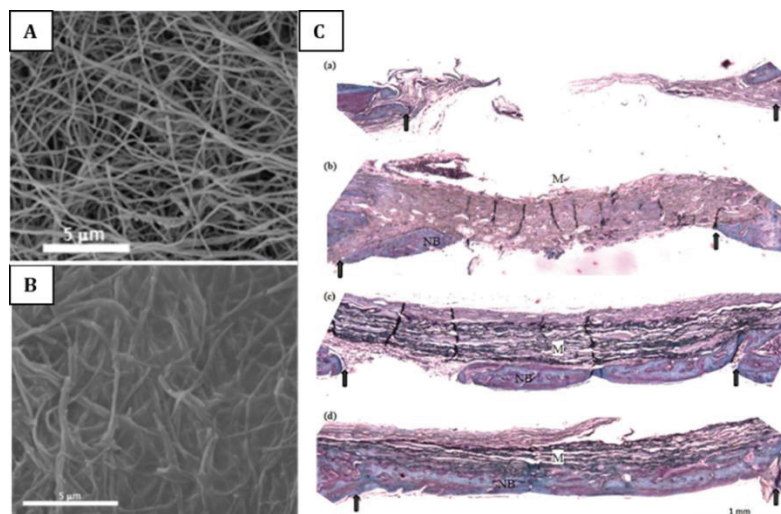
This section reported different systems developed with a view to controlling the delivery of bioactive molecules from electrospun bioactive glasses. Even though controlling the delivery rate was shown to be difficult, a few systems – being characterised by fibres with mesopores at their surfaces - seem promising. Yet, even if cytotoxic assays were carried out on TCH drug loaded silica/PCL fibres [107], there were a lack of controls such as tissue culture plate and drug-free fibres. Actually, none of the aforementioned studies determined the influence of delivered molecules on the bioactivity of the materials with *in vitro* or *in vivo* studies, information that would be very relevant to confirm the suitability of such materials in tissue engineering applications.

### **1.4.3. Use of Si-based fibres in composite and biphasic materials**

A large number of articles reports the use of *in situ* synthesised Si-based electrospun fibres in a final composite or biphasic system, where combining these inorganic fibres with polymeric matrices presents favourable conditions for degradability, biocompatibility and mechanical properties. Therefore, as outlined in the second and third columns of Figure I-7, the polymer matrix can either be used in a bulk form to integrate the inorganic fibres, or can be shaped by electrospinning.

First of all, the addition of bioactive glass in the form of electrospun fibres instead of spherical particles to a PCL solid matrix was associated with an increase in ALP activity (by 55 % compared to glass-particles loaded PCL and by approximately 240 % compared to PCL-only matrices) [73]. Also, in this composite represented in Figure I-7.D, the presence of the fibres increased the elastic modulus of the material, while a similar tensile strength to that of a filler-free PCL matrix was maintained. Besides, *in vivo* studies showed that the incorporation of bioactive glass fibres into the PCL matrix led to a thicker and higher amount of new bone formation into a calvarial bone defect [73]. Similarly, other materials combining both bioactive glass fibres and a polymeric matrix were studied, i.e. thin membranes of PCL-embedded bioactive glass fibres [84], dense sheets of PLA/bioactive glass fibres [83] and scaffolds of PLA/bioactive glass fibres in which open porous structure (porosity of around 83%) was created using NaCl particles as a porogen agent (Figure I-7.F) [70]. In each case, cell attachment and proliferation were increased in comparison with purely polymeric matrices, as well as osteoblastic responses in terms of ALP expression (and other bone gene expression in the last cited example [70]). Finally, a composite combining two inorganic materials was reported. Bioactive glass fibres were incorporated within a calcium sulfate cement for bone healing applications (Figure I-7.D) [80]. Improved mechanical properties as well as cell viability and the potential to induce osteogenic differentiation of human BMMSCs were endowed to these

composites compared to both pure calcium sulfate cements and bioactive glass fibres. In addition to bioactive ceramics, growth factors such as FGF2 fibroblast growth factor can further stimulate bone formation. Because FGF2 can sustainably be released from collagen, membranes of collagen-bioactive glass fibres (Figure I-11.A&B) were supplemented with this growth factor [93]. When the membranes were implanted into rat calvarial defect, (3.6 ± 1.6)% of new bone formation was quantified in the blank control, while it reached (31.2 ± 5.9), (44.0 ± 4.8) and (59.3 ± 14.0)% in the case of collagen membranes, collagen/bioactive glass fibres membranes, and collagen/bioactive glass fibres/FGF2 membranes respectively [93], proving the beneficial effect of this bioactive molecule. New bone formation can be seen in Figure I-11.C, which represents histological staining of the tissues 3 weeks after implantation. [93].



**Figure I-11.** SEM observation of experimental membranes of (A) calcined bioactive glass fibres and (B) the composite made of calcined bioactive glass fibres embedded within a collagen matrix. (C) Optical microscope observation of histologically stained (H&E and Koeneff's bone & cartilage staining) tissues after 3 weeks of *in vivo* implantation in rat calvarium defects. (a) blank control and (b-d) membranes were used: (b) collagen, (c) collagen-BG, and (d) collagen-BG-FGF. Notations: « M » stands for membrane and « NB » for new bone. Arrows: edges of the defects. Adapted from [93]

In the aforementioned composite scaffolds, the porosity was lost when embedding the fibres in a polymer solid matrix (Figure I-7.D) [64–66]. Therefore, fully fibrous and porous structures with interconnected pores could be obtained by combining bioactive glass and polymers both in the form of electrospun filaments (Figure I-7.E). The resulting composite materials were capable of providing soluble ions for the stimulation of osteogenic differentiation (confirmed by ALP, osteocalcin, osteonectin, collagen I and RUNX2 gene expressions) as well as a suitable platform for cell emplacement [71]. *In vivo*, this type of composite material permitted a better new bone formation compared to PCL-only fibres, and it also limited the degree of foreign body reactions [69]. The choice of polymer was important, as the acidic degradation products of PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)] inhibited apatite formation in SBF [64]. On a mechanical point of view, the addition of a PCL network intertwined with 70S30C fibres increased the maximum fracture strength of the glass material by a factor of 6, the strain to failure by 320 and the Young's modulus by 8 [65].

Combining polymer and bioactive fibres was also possible in the form of sandwich materials (Figure I-7.H). These were composed of a layer of solvent casted gelatine stacked between two mesoporous silica fibrous scaffolds [104]. The incorporation of this hydrogel layer aims to



improve the resemblance to the native extracellular matrix that naturally contains a glycosaminoglycan gel architecture along with a collagen fibrous network. Also, gelatine contains an integrin binding domain [Arg-Gly-Asp (RGD) attachment site] which is known to be involved in cell attachment. As mechanical stiffness can influence cell behaviour, two different sandwich materials were studied with the intermediate layer of gelatine either crosslinked with glutaraldehyde vapours or left uncrosslinked. The results revealed that both materials supported osteoblast adhesion, growth, proliferation and maturation. However, cell extension and infiltration were slightly favoured in uncrosslinked gelatine-based scaffolds. According to the authors, osteoblast-like cell infiltration and spreading were limited in the second scaffold by the reduction in porosity caused by crosslinking of the gelatine layer, thus creating a microenvironment confining most of the cells to the surface. Nevertheless, no data is provided in terms of the pore size distribution for each material, which would be useful in linking this result to the size of cells. In addition, the hydrogel behaviour of uncrosslinked gelatine creates a layer allowing for the diffusion of nutrients and leading to a higher infiltration of cells.

Finally, so as to be used at the interface with bone and a material with a different composition (*i.e.* a prosthetic implant or cartilage), other kinds of biphasic materials have been developed. PEO/silica composite fibres grafted on the surface of an inert glass substrate was evaluated for its use as a component of a bioactive coating (Figure I-7.I) [46]. It was found that silica nanofibres embedded in the coating favoured surface hydrophilicity and fibroblast cells proliferation. Also, for the reconstruction of osteochondral defects, a biphasic matrix was developed by electrospinning 70S glass-containing PVB filaments, subsequently coated with electrospun silk fibroin-containing PVA filaments (Figure I-7.G) [92]. Analyses confirmed that the bioactive glass fibrous side of the membrane favoured the maintenance of the osteoblastic phenotype of seeded cells, while the silk side favoured the maintenance of chondrogenetic phenotypes.

All in all, the combination of two different materials with one being inorganic Si-based electrospun fibres and the other being polymer most of the time is interesting as it contributes to improving the mechanical and biological properties compared to each material taken separately. In this section, most of the studied materials had homogeneous composition throughout their volume, but biphasic materials intended to be used at the interface between bone and another material (synthetic or natural) were also reported.

## **1.5. MORE COMPLEX GLASS COMPOSITIONS, MORE CHALLENGES**

Besides all the electrospun materials that have been detailed so far in this review - *i.e.* silica and bioactive glasses made of silicon, calcium and sometimes phosphorus - other compositions of phosphosilicate glasses were studied marginally in the literature for BTE application. The most well-known of these is 45S5 bioglass. 45S5 Bioglass® was developed by Larry Hench in the late 1960's with the aim of improving existing polymeric and metal implants which were prone to rejections through the creation of fibrous tissues that encapsulated the implanted material. The optimal composition  $45\text{SiO}_2-24.5\text{Na}_2\text{O}-24.5\text{CaO}-6\text{P}_2\text{O}_5$  (wt %) was capable of not only creating a strong interface between the bone and the implant but also of genetically activating specific cell pathways [110] responsible for the stimulation of bone growth away from the bone-implant interface. Osteogenic properties are linked to the dissolution of ions from the glass, leading to

the stimulation of osteogenic cells and production of bone matrix [17]. The original composition of 45S5 bioglass was FDA approved in 1985, and had been implanted in 1.5 million patients to repair bone and dental defects by 2016 [111]. The bioactivity of such glass can be improved by the creation of porous materials. Such features can be ascribed to the glass using sol-gel synthesis instead of melt-quenching. Nonetheless, to go even further into the creation of porosity, the formation of electrospun fibres is a promising challenge. Surprisingly, while this bioactive glass is largely studied for the formation of dense materials, there are only two articles detailing the electrospinning of 45S5 glass. The first one was published in 2014 by Deliormanli [112]. Although the process resulted in the production of fibres, crystallisation of sodium nitrate was observed at their surface. It is noteworthy that the inserted sodium precursor was sodium nitrate tetrahydrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). A heat treatment at 700 °C permitted the elimination of the polymer and of the nitrates, present both inside the fibres and crystallised at their surface. However, one can wonder if the composition of the glass initially inserted in the electrospun solution is preserved after heat treatment - especially through the elimination of sodium nitrate crystals. EDS analysis of the glass was carried out but as there are no detailed percentages reported, no conclusion can be drawn on that point. With the addition of sodium in the composition, other crystalline phases that were not present in the aforementioned Na-free glasses were obtained. Combeite  $\text{Na}_{5,27}\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  and clinophosphate  $\text{Na}_3\text{CaPSiO}_7$  started to appear after calcination at 600 °C, and crystalline sodium silicate phosphate  $\text{Na}_3\text{Ca}(\text{SiO}_3)(\text{PO}_4)$  from 700 °C. Hollow fibres of 45S5 (not totally amorphous either) were also used for drug delivery applications, but very fast releases within a few hours were evidenced [113]. In addition, bioactivity testing was very limited in both those foregoing articles. There is still a lack of similar investigations for electrospun *in situ* synthesised 45S5 glass to confirm its legitimacy for use in bone tissue engineering applications.

Cu-doped 45S5 fibres (composition 45 wt%  $\text{SiO}_2$ , 6 wt%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 23.5 wt%  $\text{CaO}$ , 1 wt%  $\text{CuO}$ , 24.5 wt%  $\text{Na}_2\text{O}$ ) were fabricated by Esmael Sharifi *et al.* [114,115]. The addition of copper (through Cu(II) nitrate trihydrate precursor) in a collagen-gelatine hydrogel was expected to improve the materials angiogenesis and osteogenesis potentials. Compared to fibre-free hydrogels, Cu-doped 45S5-containing hydrogels displayed increased phenotypic markers that are ALP, osteonectin and osteopontin after 21 days of culture. However, no comparison with 45S5 fibres-containing composites was made to estimate the influence of copper added to the glass composition.

Deliormani also electrospun 13-93 glass, with the composition in mol.%: 54.6  $\text{SiO}_2$ - 22.1  $\text{CaO}$ - 7.9  $\text{K}_2\text{O}$ - 7.7  $\text{MgO}$ - 6.0  $\text{Na}_2\text{O}$ - 1.7  $\text{P}_2\text{O}_5$  [116,117]. Magnesium and potassium precursors were also added in the form of nitrates - leading to the crystallisation of  $\text{NaNO}_3$  on as-spun fibres, eliminated during thermal treatment. 13-93 glass is known for converting to hydroxyapatite-like material more slowly than 45S5 glass. This was confirmed by SBF testing, as carbonated apatite formation was 7 times faster during the immersion of 45S5 compared to that of 13-93 [116], when the same analysis conditions were used. The incorporation of Mg and K offers the advantage of reducing the glass ability to be crystallised during heat treatment: crystalline structure only started to appear after heat treatment at 680 °C, while crystallisation was much more obvious in 45S5 fibres even at 600 °C [112] and probably occurred at lower temperatures (data not provided). Unfortunately, the cellular study reported for these 13-93 glass fibres lacks controls [116] and no cellular assay was performed on composites created by electrospinning a PCL solution containing dispersed fibres of 13-93 glass [117].

Due to their low ability to crystallise and to their reactivity higher than 13-93, borosilicate glasses were also evaluated as electrospun fibres. The chosen system had a composition of 47SiO<sub>2</sub>-23B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-25CaO-5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (mol.%) [118] and tributyl borate was used as a boron precursor. It was demonstrated that the fibres were XRD-amorphous after treatment at 700 °C and that they induced apatite precipitation on their surface during SBF immersion. However, no reference controls were used during this SBF immersion to conclude on this higher reactivity and no cellular studies were reported.

Finally, Deliormanli reported the electrospinning of 13-93 with the substitution of silicon with either gallium or cerium [119]. Such glasses were expected to improve the antibacterial properties of the obtained materials, but it was ineffective as negative responses to gram positive (*Staphylococcus aureus*) and gram negative (*Escherichia coli*) bacteria were observed: agar plates were totally covered with the bacteria after 2 days and no inhibition zone was observed around the scaffold. On the contrary, when Ag-doped silica fibres were prepared [120], a maximum of 8 hours was necessary to annihilate *Escherichia coli* bacterium, while 48 hours were required to kill *Staphylococcus aureus*. Silver element does indeed exhibit inhibitory activity or an antimicrobial effect.

## 1.6. SUMMARY FOR SILICON-BASED ELECTROSPINNING

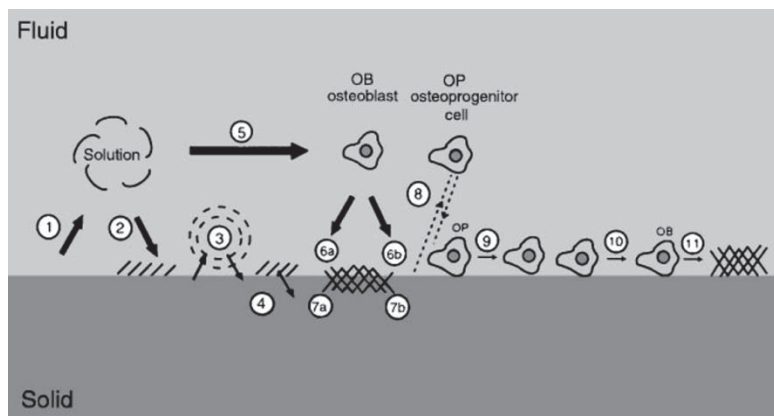
As outlined previously, silica and many different glass compositions can be successfully electrospun from solutions obtained by *in situ* sol-gel synthesis. They were shown to provide effective support for fibroblast and osteoblast cell growth and differentiation, and *in vivo* studies confirmed the potential use of such porous electrospun materials for BTE. Also, the fibrous morphology has been shown to enhance ALP expression of rat BMMSCs in comparison with smooth glass disks of the same composition. Optimising the final properties and morphologies of obtained fibres implies an important control of processing parameters, sol-gel composition and of carrying polymer if any. Drug-delivery systems could also be designed and some displayed gradual and appropriate release properties. Of all the silica-based fibres, the most commonly studied systems are SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> based. Unfortunately, promising materials with more original compositions have been subject to sparse studies. For these materials, biological analysis requires further in-depth investigation. In particular, the well-known 45S5 bioglass that has already proven its superior properties in dense scaffolds could be a promising electrospun material. Also, comparing the biological responses of Si-based electrospun fibres is difficult as the number of biological studies is limited, and also because the materials are never tested in the same conditions (composition and concentration of the inorganic phase, type of cells, and so forth).

As explained above, the bioactivity of bioactive glass is due to solution-mediated dissolution of the material and surface reactions that lead to the formation of a carbonated hydroxyapatite layer. Working directly with calcium phosphate materials is also a possible method of creating such a layer with adequate biological properties, as will be detailed in the next chapter of this review.

## 2.ELECTROSPINNING OF CALCIUM PHOSPHATES

### 2.1. INTRODUCTION TO CALCIUM PHOSPHATES AND THEIR BIOACTIVITY

Because the inorganic phase of bone is naturally made of calcium phosphate (CaP), synthetic materials of CaP possess biocompatible properties, as well as osteoconductivity and osteoinductivity [121,122]. When in contact with biological media, the surface of implanted calcium phosphate materials undergo solution-mediated surface reactions which are partly responsible for new bone formation. This may imply not just the dissolution of the CaP material but also the adsorption of ions and proteins on its surface, generally leading to the formation of a carbonated hydroxyapatite. Macrophages, osteoblast, osteoclast-like cells and undifferentiated cells can not only adhere to the resulting surface but also proliferate, potentially differentiate and synthesise the organic phase of bone matrix which is essentially made of collagen. New bone is created after a mineralisation process [123,124]. A diagram representing the interactions between bioactive calcium phosphates and their surrounding biological environment is represented in Figure I-12.



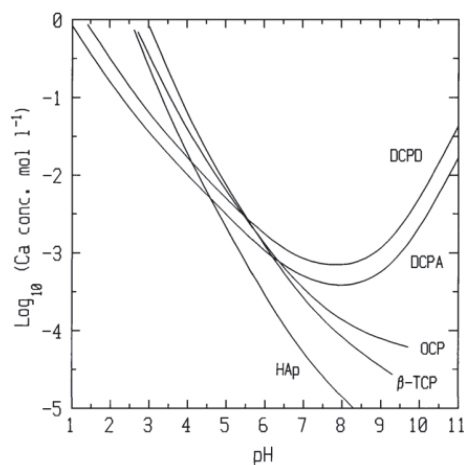
**Figure I-12.** Schematic diagram representing the events that occur at the interface between CaP and the surrounding biological environment. The list does not imply a ranking in terms of time sequence or importance. (1) dissolution from the ceramic; (2) precipitation from solution onto the ceramic; (3) ion exchange and structural rearrangement at the ceramic surface; (4) interdiffusion from the surface into the ceramic; (5) solution-mediated effects on cellular activity; (6) deposition of either the mineral phase (a), or the organic phase (b), without integration into the ceramic surface; (7) deposition with integration into the ceramic; (8) chemotaxis to the ceramic surface; (9) cell attachment and proliferation; (10) cell differentiation; and (11) extracellular matrix formation. Figure and its legend reproduced from [124]

The most commonly studied crystalline forms of CaP to create biomaterials for BTE are stoichiometric hydroxyapatite (HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) and tricalcium phosphate (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). TCP was found to stimulate bone formation by Alee in the 1920s, while the osteoconductive properties of hydroxyapatite were reported in the 1970-80s [125]. A mixture with different ratios of HAp and  $\beta$ -TCP (the rhomboedral polymorph of TCP) is also commonly used and called biphasic calcium phosphate BCP [126]. Other possible phases of calcium orthophosphates are listed in Table I-1.

NAME	FORMULA	Ca/P MOLAR RATIO	pH STABILITY RANGE
Monobasic calcium phosphate monohydrate (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	0.0-2.0
Dicalcium phosphate anhydrous (DCPA), also called monetite	$\text{CaHPO}_4$	1.0	2.0-5.5 (>80 °C)
Dicalcium phosphate dihydrate (DCPD), also called brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	2.0-6.0
Octacalcium phosphate (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	5.5-7.0
$\alpha$ -tricalcium phosphate ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	Cannot be precipitated from aqueous solution
$\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	Cannot be precipitated from aqueous solution
Amorphous calcium phosphate (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , $n = 3-4.5$ , 15%–20% $\text{H}_2\text{O}$	1.2-2.2	$\approx 5-12$
Calcium deficient hydroxyapatite (CaDHA, CDHA, CDHAp, precipitated HAp, pHA, pHAp)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ( $0 < x < 2$ )	1.50-1.67	6.5-9.5
Hydroxyapatite (HAp, OHAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	9.5-12.0
Tetracalcium phosphate (TTCP, TetCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	Cannot be precipitated from aqueous solution

**Table I-1.** Selected CaP phases of interest for biomedical applications, their chemical formula, Ca/P ratios and pH stability range. Highlighted in grey are the phases studied in the case of electrospinning of *in situ* synthesised CaP. Adapted from [127]

Taking into account the aforementioned biological process of new bone formation, it is evident that an important feature of these calcium phosphate phases is their solubility and thus the speed of their resorption. Resorption is the process by which the material is absorbed into the body, either by cells or via solution-mediated dissolution [127]. As the solubility of each CaP phase is also dependent on temperature and pH, Figure I-13 gives the solubility isotherms of a few selected calcium phosphate phases at 37 °C, which is representative of the temperature conditions experienced in the body. Such solubility isotherms couldn't be found for calcium phosphate electrospun fibres. Similarly, study on their resorption rate in the presence of cells is lacking.



**Figure I-13.** Solubility isotherms (37 °C) of few CaP phases in the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ . Notations: DCPD: Dicalcium phosphate dihydrate; DCPA: Dicalcium phosphate anhydrous; OCP: Octacalcium phosphate;  $\beta$ -TCP:  $\beta$ -tricalcium phosphate; HAp: Hydroxyapatite. Reproduced from [128]

In short, different calcium phosphate phases are studied in the field of biomaterials, especially for the repair and regeneration of bones and teeth as well as for those implants designed to replace some of their missing parts. This is also the case for CaP electrospun fibres. It should be noted that, as for bioactive glasses, dissolution is also governed by the morphology and porosity of the material. Thus, electrospinning allows for the formation of fibres that are more prone to dissolution as opposed to bulk materials. As a reminder, this review is focused on the *in situ* synthesis of inorganic materials that are subjected to electrospinning. In this chapter, the production of calcium phosphate fibres is detailed in terms of chemical synthesis, spinnability, characterisation of obtained phases and first investigations of cellular viability on these biomaterials.

## 2.2. CALCIUM PHOSPHATES SYNTHESIS

Before presenting the crystalline phases obtained after electrospinning the *in situ* synthesised calcium phosphates, the general considerations for their synthesis are first presented in this section 2.2, and also summarised in Figure I-14. Different combinations of phosphorus and calcium precursors were studied for the synthesis of calcium phosphate fibres. In the following, the reactivity of these precursors with respect to the synthesis parameters is presented.

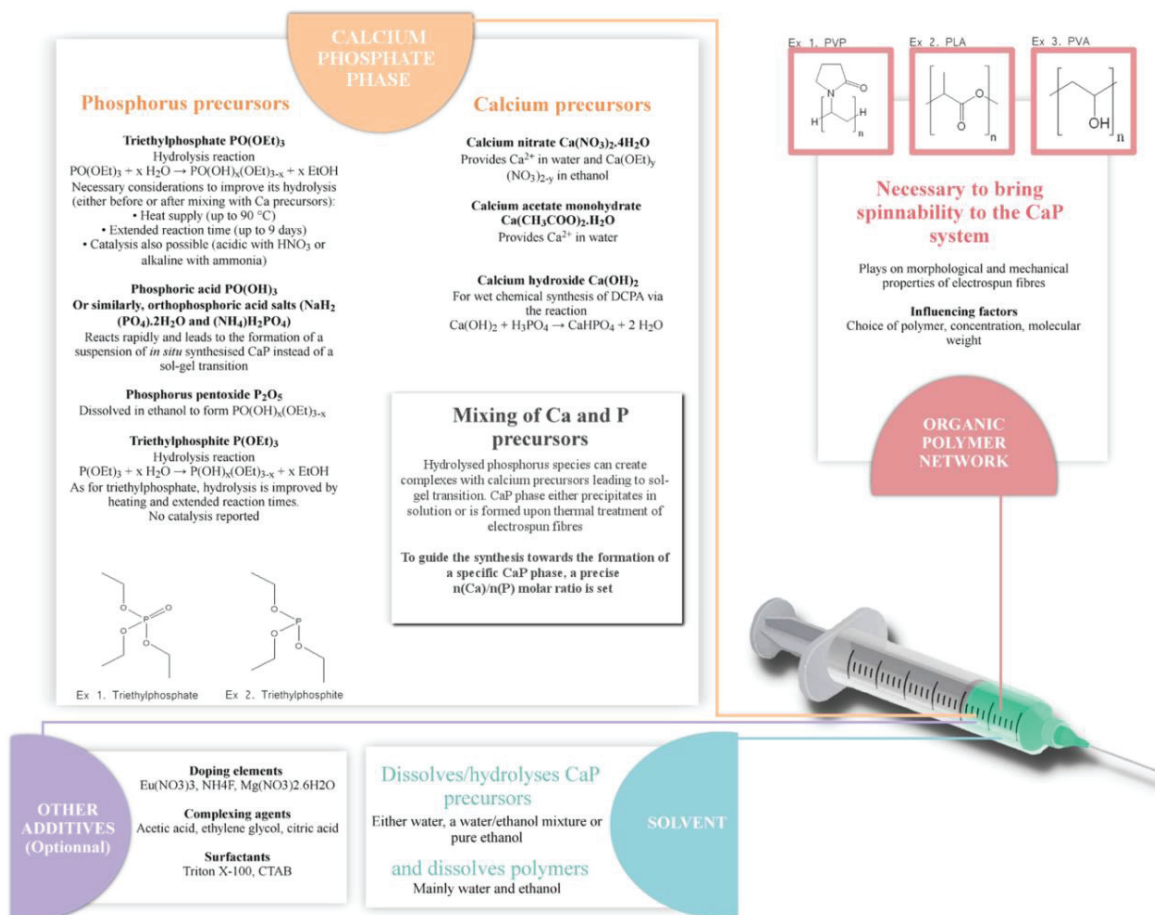


Figure I-14. Considerations for the preparation of spinnable calcium phosphate solutions with adequate bioactive properties

### 2.2.1. Choice of phosphorus precursor

A well-known method for calcium phosphate synthesis is the wet precipitation method, with the neutralisation of the different acidities of orthophosphoric acid by calcium ions. Depending on the pH, different forms of the orthophosphate ions are predominantly present in solution:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , or  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Therefore, different phases are obtained by the progressive replacement of acidic protons by calcium ions [14]. Table I-1 reports the pH stability range of different CaP phases. A calcium phosphate phase precipitates and can then be subjected, when needed, to thermal treatment to crystallise the desired phase. Sol-gel chemistry is another wet chemistry technique that can be carried out to prepare calcium phosphates. When combined with electrospinning, the sol-gel chemistry can be advantageous to the precipitation method since it doesn't lead to phase precipitation, implying a better chemical repartition into the electrospun fibres. Once more, this justifies the importance of the material *in situ* synthesis.

Using sol-gel synthesis, gel formation results from the hydrolysis and condensation of the phosphorus species present in the solution which is to be electrospun, following the same principle governing silicon species - as previously mentioned in this review. However, the commonly used phosphorus alkoxides present chemical inertia. The appropriate optimisation of the system is thus of primary importance to provide a certain chemical reactivity to the system. The most widely used phosphate precursor is triethylphosphate (TEP),  $\text{PO}(\text{OEt})_3$ , a phosphate ester with a very low hydrolysis constant rate. This hydrolysis results from a nucleophilic substitution that replaces an alkoxide  $-\text{OEt}$  by a hydroxide  $-\text{OH}$ , leading to the formation of  $\text{PO}(\text{OH})_x(\text{OEt})_{3-x}$  species. In water, hydrolysis proceeds *via* a  $\text{S}_\text{N}2$  mechanism on the  $\alpha$ -carbon atom of the alkoxy group of the ester [129]. Therefore, for the purpose of this hydrolysis, the solvents used contain reacting water, either pure or mixed with an organic solvent [130–133]. Surprisingly, hydrolysis carried out in almost pure alcohol has also been reported [134–136]. In this case, we suppose that water is supplied by both impure ethanol, ambient humidity and by the water present in the calcium nitrate tetrahydrate used as a calcium precursor in the same solution where the phosphorus is added. However in most of these cases, a lack of detail regarding the synthesis prevents the calculation of a water to TEP molar ratio to further investigate the possibility of this hydrolysis happening. Nonetheless, triethylphosphate  $\text{PO}(\text{OEt})_3$  does not react under ambient conditions: a heat supply or an acidic or alkaline catalysis is necessary. Unsubstituted trialkyl phosphates display very little sensitivity to acid catalysis [137]. For this reason, alkaline catalysis can be used to obtain  $\text{PO}(\text{OH})(\text{OEt})_2$  and subsequently acid catalysis is performed to hydrolyse di- and monoesters that hardly react at high pH [138]. Yet, in the papers referring to the electrospinning of TEP-derived calcium phosphates, acid [134] or alkaline [139] catalysis were used alone. Nitric acid was used in the former case, while ammonia was selected in the latter one. No details about the catalysis or proof of its efficiency were reported. It is briefly mentioned that a pH change from 7.5 to 6.5 proves the occurrence of TEP hydrolysis [140]. In the scope of this review, extended reaction times and heating of the precursor solution are the preferred methods of improving TEP reactivity. Indeed, before proceeding to electrospinning, a prolonged hydrolysis and/or reaction time with calcium precursor is always carried out: either of the phosphorus solution alone [132], of the mixture of phosphorus with calcium [6, 8–12, 16], or even after addition of the polymer [134,136,139]. Taking all the published papers together, this reaction time lasts for at least 24 hours but can reach up to 9 days [135]. In addition, the heat supply ranges from 30 °C to 90 °C.

Even though triethylphosphate is largely used, alternative phosphorus precursors are interesting species as they present a higher reactivity. Under ambient conditions, phosphoric acid  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (also written  $\text{PO}(\text{OH})_3$ ) reacts too fast in water. Therefore, as previously mentioned, syntheses reporting the use of phosphoric acid are not considered as sol-gel synthesis and lead to the formation of a suspension of *in situ* synthesised particles [142,143], explaining the short reaction times and absence of heating. Similarly, orthophosphoric acid salts were also employed. Specifically, monosodium phosphate dihydrate  $\text{NaH}_2(\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [144] and ammonia biphosphate  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  [131] which can both dissociate in solution, in DMSO (dimethyl sulfoxide) or water respectively, and provide ionic species for the synthesis of calcium phosphates. In addition, dissolving  $\text{P}_2\text{O}_5$  into alcohols leads to the formation of different  $\text{PO}(\text{OH})_{3-x}(\text{OR})_x$  species with chemical reactivities in between the one of phosphoric acid and triethylphosphate [138]. This precursor has thus been used for both *in situ* synthesis in the presence of ethanol and subsequent electrospinning after polymeric addition [145,146]. However, ethylene glycol as a stabilizer was necessary in one case to avoid precipitation in the solution by coordinating with calcium metal ions [146]. Another extensively used phosphorus precursor for the sol-gel synthesis of calcium phosphate is triethylphosphite (TEPI). Alkyl phosphites  $\text{P}(\text{OR})_3$  are hydrolysed much faster than alkyl phosphates  $\text{PO}(\text{OR})_3$ . Indeed, trialkyl phosphites hydrolyse in alkali several hundred times faster than the corresponding phosphates, while in acid the phosphite hydrolyzes  $10^{12}$  times as fast as the phosphates [137]. Using the same hydrolysis process that was previously suggested for triethylphosphate, hydrolysed triethylphosphite species are created as follows:  $\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_{3-x}(\text{OH})_x + x \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  [147]. This TEPI precursor has been used for the purpose of electrospinning calcium phosphates [141,148–151]. As for syntheses with triethylphosphate, the ones with triethylphosphite involve hydrolysis of the precursor in water [141,148,149], a mixture of water and ethanol [151], or in ethanol alone [150]. In this last study where ethanol is the only solvent, water brought by the calcium nitrate tetrahydrate precursor can be sufficient for triethylphosphite to hydrolyse, as the water/phosphorus molar ratio is 6.7 and therefore above the stoichiometric ratio of 3. No acid- or alkaline-catalysis were used to increase TEPI reactivity.

Subsequently to hydrolysis, hydrolysed phosphorus species can then create complexes with calcium present in the system, leading to polymerisation and as a result to a sol-gel transition [152,153].

### 2.2.2. Selection of calcium source

For calcium phosphate synthesis, hydrolysed or dissociated phosphorous precursors are mixed with calcium species. Calcium nitrate tetrahydrate is by far the most common precursor [130,132–136,139,141,143–146,148–151]. It provides  $\text{Ca}^{2+}$  calcium ions in water and  $\text{Ca}(\text{OEt})_y(\text{NO}_3)_{2-y}$  species in anhydrous ethanol, which will further interact with phosphorus species upon ageing to form Ca-P intermediates containing Ca-O-P bonds [153]. Possible reactions pathways between hydrolysed triethylphosphite and calcium nitrate in water- or ethanol-based solutions were suggested by Dean-Mo Lia *et al.* [153]. The advantages of calcium nitrate over the other precursors are its solubility and its ability to provide oxidizing agents (the nitrate anions) which facilitate the decomposition of organic species during heat treatment. Though, as previously explained, due to their toxicity, nitrates need to be eliminated at high temperature (700-800 °C) for the materials to be used in biological applications. Other calcium precursors were also selected, such as calcium acetate monohydrate which can produce calcium



ions in water [140] and calcium hydroxide  $\text{Ca(OH)}_2$ . The latter was used during the wet chemical synthesis of DCPA ( $\text{CaHPO}_4$ ), through the following reaction:  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{CaHPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$  [142]. However, none of the reported works actually investigated the reaction of hydrolysed phosphorus species with calcium precursors. Franco *et al.* briefly mentioned that an incomplete reaction could be explained by a high gel conductivity due to the dissociation of the calcium nitrate that did not react [145].

### 2.2.3. Experimental considerations for the synthesis

Experimentally, in almost all cases, calcium and phosphorus precursors are first mixed and the solution is then aged. Next, a polymer is incorporated and the resulting mixture homogenised. The benefits of polymer incorporation with regard to electrospinning are detailed in the next section. Though, in terms of the synthesis, Tesik Chae *et al.* reported that better elemental repartition was observed when PLA was first mixed with calcium precursor before the addition of the phosphorus source [144]. This observation accounted for an initial complex formation between the calcium ions and PVA carbonyl groups which form nucleation sites that are well scattered in the material. Thus, a more uniform calcium phosphate formation is obtained compared to when phosphorus is added beforehand.

Also, an important consideration is how to trigger the formation of the desired calcium phosphate phase. Indeed, each phase has a specific dissolution rate and thus biological properties, as previously explained. As was also mentioned in section 2.2.1, during the wet precipitation method, the pH of the solution is the main factor influencing the orientation of the synthesis towards a specific phase. However in all the sol-gel systems used for electrospinning, the pH was not studied and controlled by the researchers. It is supposed that the main influencing factor for this method of synthesis is the input value of calcium to phosphorus molar ratio. Intermediates containing both Ca and P in the sol are transformed into the desired CaP phases during the thermal treatment of the obtained fibres, when the organic species are decomposed. This is similar to dry synthesis, in which the precursors are mixed with a specific  $n(\text{Ca})/n(\text{P})$  molar ratio that conditions the formation of a specific phase which can be obtained during calcination. For all these reasons, the ratio between calcium and phosphorus precursors, set during the synthesis, is of prime importance.

Besides calcium and phosphorus, precursors of other elements (such as magnesium and fluorine) can be added during the material synthesis in order to incorporate desired elements into the calcium phosphate lattice and provide the materials with additional - mainly biological - properties. Both these aspects will be discussed with more details in sections 2.4.1 and 2.5.

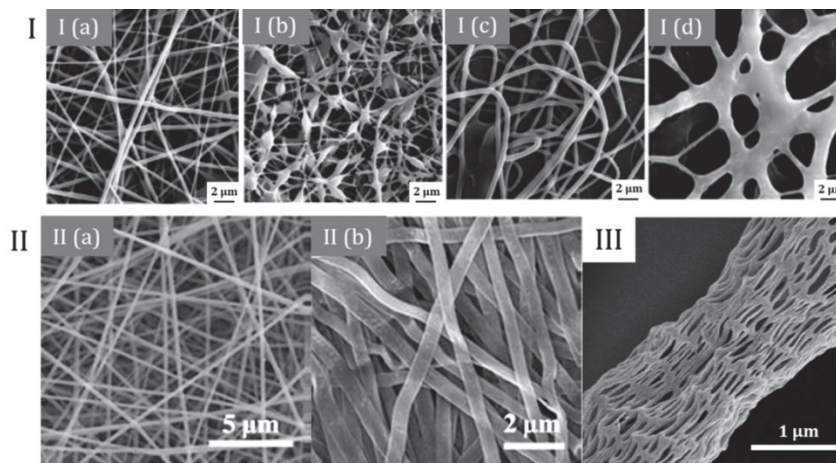
Finally, ethylene glycol was used as a complexing agent during the synthesis of calcium phosphates as a stabiliser to avoid colloidal particles gathering as they are prone to precipitation and crystallisation [146].

## 2.3. FROM CALCIUM PHOSPHATE SOLUTION TO CAP FIBRES

### 2.3.1. Electrospinning and effects of solution and process parameters

As previously presented for SiO<sub>2</sub> fibres and bioactive glasses in the first chapter (1.), polymer addition helps in improving the spinnability of the solutions. Most of the time, smooth fibres are obtained after electrospinning. However, adjusting the parameters can help in tailoring the final characteristics of the fibres, as presented for bioactive glasses in section I.3.1. The same trends are observed when adjusting electrospinning parameters for CaP materials as for SiO<sub>2</sub> or bioactive glasses.

When it comes to calcium phosphate materials, none of the published works with electrospinning could be performed without supplementing the solution with a polymer. Without a polymer, droplets instead of fibres were obtained [146,148,154]. This could be due to the lower ability of phosphorus to create a viscous gel and macromolecules as opposed to silicon-based sol-gel systems [138]. Actually, in the study of Yuanyuan *et al.* [146], while polymer-free calcium phosphate sol presented a viscosity of 25 mPa.s, uniform electrospinning could only be achieved when the viscosity was adjusted to a minimum of 63 mPa.s by adding 2% of PVP. It was also reported that beaded filaments or webs instead of individual electrospun fibres were formed when the viscosity was low [141,148,154]. For instance, smooth fibres could be obtained from a PVA-CaP sol solution with a viscosity value of about 1.4 Pa.s (see Figure I-15.I.a), while beads were obtained for a viscosity of around 0.1 Pa.s (Figure I-15.I.b) [154]. Similarly in the same study but using a PVA with a different molecular mass, smooth filaments were obtained for a viscosity of 2.6 Pa.s (Figure I-15.I.c) while a value of 0.8 Pa.s led to the formation of fused webs (Figure I-15.I.d).



**Figure I-15.** Examples of the effects of solution properties and electrospinning process on the morphologies of electrospun materials. (I) Different viscosities of PVA-CaP sols led to the formation of (a) smooth filaments and (b) beaded filaments for viscosity values of 1.4 and 0.1 Pa.s respectively (PVA molecular weight: 67 500 g/mol); (c) smooth filaments and (d) fused webs for viscosity values of 2.6 and 0.8 Pa.s respectively (PVA molecular weight: 155 000 g/mol). Adapted from [154]. (II) Adjusting electrospinning parameters led to the formation of either Europium-doped hydroxyapatite (a) filaments or (b) microribbons. Adapted from [131]. (III) Porous fibres of CaHPO<sub>4</sub> and PLA resulting from WIPF (Water Induced Pore Formation). Reproduced from [142]

For calcium phosphates, the most commonly used polymer is by far PVP [133–136,139,141,143,145,146] as it is soluble not only in water but also in ethanol, the two most commonly used solvents for the synthesis of CaP. Other sparsely used polymers are PAN [132], PVA [133,148,149,154], PLA [142,144], PLA/Polyethylene glycol PEG [144], gelatine [150], PVB [151] and PEO [140]. Increase in solution viscosity was directly linked to a raise of polymer concentration [146], polymer molecular weight [148,154] and had a direct influence on fibre diameter [146]. However, while achieving a high level of viscosity is beneficial for the purpose of electrospinning, an intimate mixing of the CaP sol and polymer macromolecules is only possible at limited viscosity [154]. Consequently, a compromise has to be found in terms of viscosity in order to allow a uniform elemental repartition of elements along the fibres (viscosity as low as possible), and a good spinnability of the solution (moderate to high values of viscosity).

The electrospinning process itself can also be optimised to tailor the fibre morphology by varying the process parameters, such as the tip-to-collector distance, spinning voltage or relative humidity [146]. For instance, it was possible to obtain CaP microribbons instead of nanofibres by increasing the PVP concentration (from 8.7 to 9.8 wt%), the feeding rate (from 0.5 to 0.75 mL/h), the voltage (from 8 to 10 kV) and the needle to collector distance (from 16 to 16.5 cm) during electrospinning (see Figure I-15.II) [131]. In their study, Touny and Bhaduri created porosity by Water Induced Pore Formation (WIPF) resulting from a cement forming reaction of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  with phosphoric acid [142] (see Figure I-15.III). This reaction creates water as a by-product as well as heat, which improves solvent evaporation during electrospinning. As water is not a solvent for PLA (the polymer used in that case), it creates pores through the evaporation of unmixed droplets. The feeding rate, spinning voltage and calcium phosphate content play a role in water and heat formation as well as solvent evaporation, making it possible to tailor the resulting porosity.

Furthermore, it was possible to supplement the calcium phosphate solution with additives - in addition to polymers - in order to ease the electrospinning process. The presence of citric acid in the solution helped to reach adequate conductivity for electrospinning [149]. Its use also ensured that the fibrous structure was maintained both before and after the heat treatment of the as-spun fibres that displayed moisture instability [149]. Acetic acid was used as a complexing agent to endow better stability to the electrospinning process [143]. Indeed, the aim was to chelate the conductive metal ions that are responsible for the effective ionic strength of the solutions, which destabilises the electrospinning process. This acid however modified the crystalline phases obtained after calcination (this will be discussed later in section 2.4.2.). Similarly, little is said about the reasons that prompted the use of triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol) as a surfactant, but it was suggested that this facilitated the spinnability and stabilisation of the electrospun jet [144]. Finally, the production rate could be increased *via* needle-less electrospinning (NLE) also known as free liquid surface electrospinning [149]. In the corresponding method, the solution which is to undergo electrospinning is loaded into a bath with a rotating electrode. Numerous fibres are created directly and ejected to the collector from the surface of the electrode.

### 2.3.2. Thermal treatment

Post-treatments of as-spun fibres are usually necessary to eliminate the carrying polymer and thus obtain pure inorganic fibres. Nevertheless, this step is principally necessary to crystallise the CaP phases from the calcium and phosphorus intermediates formed by sol-gel, as discussed in the next section (2.4). In addition, controlling the thermal treatment can increase their crystallinity [149]. On the contrary, dicalcium phosphate anhydrous is obtained at low temperature and therefore in that case, no calcination is required [142,144]. Also, the degradation of this phase into calcium pyrophosphate ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) - an undesired toxic element - occurs at around 320-340 °C [14]. Furthermore, drying the fibres at 85 °C for 5 hours was shown to be beneficial in maintaining the initial morphology of the electrospun fibres, whereas those filaments merged into connected fibre webs when dried at room temperature for 24 hours [141]. Different effects result from thermal treatment and include the loss of fibrous morphology when electrospun fibres present uneven structures [154], the formation of micropores at the fibres surface [154] and a shrinkage of fibre diameter [131,134,141,146,151].

## 2.4. CRYSTALLINE PHASES OF CALCIUM PHOSPHATE FIBRES

As previously discussed, the differences in each calcium phosphate phase - in terms of chemical composition or crystallinity - impact on their dissolution behaviours and as a result on their bioresorption rate and bioactivity [121]. In the literature, *in vitro* evaluation of *in situ* synthesised and subsequently electrospun CaP material is very poorly reported, while no *in vivo* study could be found. However, different CaP phases can be obtained and are presented in this section, to give an initial insight into the potential synthesis and processability of calcium phosphate nanofibres. Three paragraphs are developed below; each of them is dedicated to one of the main (and desired) phases composing the final material: hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate or dicalcium phosphate anhydrous. A summary of the obtained phases in respect to the synthesis conditions is presented in Table I-2.

It is assumed that the input value of Ca/P atomic ratio in the sol-gel system orientates the formation of a preferred CaP phase during thermal treatment. Table I-1 gives the Ca/P ratios of different phases of calcium phosphate. Stoichiometric hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  for instance has a Ca/P molar ratio of 1.67, while it is 1.50 for  $\beta$ -TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . This is the reason why different calcium to phosphorus values are chosen for calcium phosphate sol-gel synthesis, depending on which crystalline phase is desired after the heat treatment of the as-spun fibres. Nonetheless, obtaining a single-phase calcium phosphate is very challenging.

### 2.4.1. Hydroxyapatite

In a few studies, the Ca/P molar ratio was set to 1.67 with the aim of obtaining a stoichiometric hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . It was shown that XRD amorphous calcium phosphates were not only obtained as-spun [130,146] but also after treatment at 400 °C [141] or even 500 °C [145]. Crystallisation usually began around 500–600 °C [141,145,150] and increased with the rise in temperature. Crystallisation of pure hydroxyapatite was reported by M. Streckova *et al.* [149] after sintering electrospun fibres at 800 °C.

However, undesired crystalline phases could also appear beside hydroxyapatite upon sintering due to different factors such as change in pH, ageing time, as well as the order of addition of the precursors [123] and the temperature and the atmosphere of the thermal treatment. Another common event disturbing the stoichiometric hydroxyapatite lattice is the substitution of ions, such as  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{HO}^-$  by  $\text{CO}_3^{2-}$  that may lead to the apparition of new phases ( $\beta$ -TCP, CaO) after calcination. In the case of *in situ* synthesis and electrospinning of CaP, no reasons are given for the apparition of additional undesired phases besides HA in the published papers and probably a lack of analysis can be noticed, but more details about the stability and apparition of new phases during the synthesis of bulk hydroxyapatite are available in the literature [14,128].

For instance Zang *et al.* did indeed evidence the carbonation of calcium phosphate by FTIR in as-spun fibres, through the presence of vibration modes of  $\text{CO}_3^{2-}$  at 1427 and 870  $\text{cm}^{-1}$  [134]. XRD analysis confirmed the phase separation of stoichiometric hydroxyapatite and calcium oxide after treatment at 800 °C. Similarly, Jung-Hee Lee and Young-Jin Kim state that they obtained hydroxyapatite after the treatment of amorphous fibres at both 600 and 800 °C [150]. However, the presence of the diffraction peak at 37 °(2 $\theta$ ) (XRD analysis with a copper anticathode) seems to support the formation of a supplementary CaO phase, which is consistent with the carbonation of apatite evidenced by FTIR at lower temperature. The apparition of  $\beta$ -TCP after treatment of amorphous fibres at 600 °C was also reported [141], as well as the formation of both  $\beta$ -TCP and CaO after calcination of fibres at a temperature comprised between 600 and 800 °C [133,145]. It was also reported that the choice of the polymer also affects the nature of obtained CaP phases while composition of the CaP sol is kept identical [155]. Yet, no investigation on the influencing factor was made to understand this phenomenon.

Obtaining a single-phase hydroxyapatite thus represents a challenging task, and undesired phases such as  $\beta$ -TCP and CaO can crystallise during heat treatment. Actually, because a polymer is necessarily added in the CaP solution to be electrospun, the calcination step performed on the filaments leads to the formation of carbonates that enter the hydroxyapatite lattice. New phases can then appear by decomposition of the resulting carbonated HAp upon treatment [14]. An adequate characterisation of the obtained material is thus required to evidence the presence of a carbonated phase, which can be detected by FTIR but not by XRD. Furthermore, while  $\beta$ -TCP is a biocompatible phase and is sometimes required to optimise the solubility of CaP materials, the presence of CaO has to be avoided due to its strongly alkaline pH which could be detrimental to osteoblastic cells [156].

Adding doping elements to the apatite lattice can also be beneficial in obtaining materials with additional biological or optical properties. Doping a hydroxyapatite phase with Europium using  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  enabled photoluminescent fibres to be obtained (see the 2.5. “applications” section for more details) without disturbing the apatite lattice [131]. The same outcome was noted with the incorporation of fluorine (using  $\text{NH}_4\text{F}$ ) within the apatite lattice to form  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$ , where  $x = 0.25$  [151]. Contraction of the lattice along the a-axis direction while the c-axis remained unchanged was consistent with the literature and confirmed fluorine positioning in the hydroxyl site. In contrast, doping fibres with magnesium using magnesium nitrate hexahydrate ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) resulted in the formation of Mg-whitlockite ( $(\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14})$ ) and traces of MgO after heat treatment instead of doped-hydroxyapatite [149]. Fluorine-doped apatitic fibres were expected to have high stability properties, to stimulate bone cell responses and improve mineralisation and bone formation but no biological assays were reported [151].

Applications of europium and magnesium doped CaP fibres will be further detailed in their own dedicated section (2.5.1 and 2.5.2 respectively).

### 2.4.2. Tricalcium Phosphate

Tricalcium phosphates  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  are calcium phosphate phases distinguishable by their allotropic forms. The rhomboedral polymorph of TCP is called  $\beta$ -TCP and has been used clinically as a bone filler and artificial tooth root and skull [136]. Its synthesis, physico-chemical properties and *in vivo* behaviour have been reviewed recently [157]. For its synthesis in electrospun solutions, a Ca/P molar ratio equals to 1.50 is experimentally set.

As previously outlined for stoichiometric hydroxyapatite, obtaining pure  $\beta$ -TCP fibres can be challenging. Indeed, for a fixed Ca/P ratio of 1.50, different phases besides or instead of  $\beta$ -TCP were obtained after annealing as-spun fibres [143]: CaO,  $\alpha$ -TCP (the high temperature polymorph of TCP) and other CaDHA. The amount of each phase was shown to be dependent on the type of heating apparatus (convection oven or microwave oven, both of which display different heating/cooling rates), on the dwelling time and on the presence or absence of acetic acid which is used as a chelating agent to stabilise the electrospinning process. Although  $\beta$ -TCP starts forming at 800 °C [14], it is usually heated at high temperatures around 1100 °C for better stability and density [158]. However, a loss of fibrous structure was evidenced when  $\beta$ -TCP/PVP-based fibres were annealed above 1000 °C. On the contrary when using PAN-based fibres, sintering of the material at 1100 °C under  $\text{N}_2$  atmosphere is compatible with a conservation of fibrous morphology [132]. As a result, carbon nanofibres decorated with  $\beta$ -TCP nanoparticles were obtained. Formation of an apparently pure  $\beta$ -TCP phase crystallised during thermal treatment was confirmed by HR-TEM, SAED pattern and XRD. It was decided not to go into too much detail on these materials in this review, due to the uneven repartition of the ceramic phase in the fibres, but readers are redirected to the original papers for further details on their biological evaluation [132].

### 2.4.3. Dicalcium phosphate anhydrous

Dicalcium phosphate anhydrous (DCPA)  $\text{CaHPO}_4$  is a calcium phosphate with a higher solubility than HAp and  $\beta$ -TCP (Figure I-13). This phase was reported to enhance bone healing during *in vivo* testing of rabbit calvaria defects [159]. Also called monetite, this material was electrospun following an *in situ* synthesis in the presence of a spinnable polymer. A reaction of calcium nitrate tetrahydrate and sodium phosphate monobasic dihydrate was carried out at pH 4 in a mixture of organic solvents [144]. In another study, DCPA was also synthesised *via* an *in situ* cement forming reaction, but it was suggested that unreacted calcium hydroxide  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  may be found in the final material [142]. In both these articles reporting the formation of DCPA electrospun fibres, no thermal treatment was required to induce monetite crystallisation. In actual fact this phase decomposes at low temperatures to form calcium pyrophosphate, a reason why thermal treatment should be avoided. However, the presence of polymers in the solution during monetite synthesis highly limits its crystallisation. It is suggested that polymer molecular chains hinder the transportation of precursor ions during nucleation and crystal growth. EDX mapping also evidenced the lack of homogeneity in phosphorus and calcium repartition in the prepared fibres.

#### 2.4.4. Conclusion on the crystallinity of electrospun CaP fibres

Even though it has been reported that it is possible to prepare fibres of hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate and dicalcium phosphate anhydrous deriving from an *in situ* reaction and further electrospinning, obtaining single-phase materials is a challenging task. These aforementioned studies prove the importance of precisely controlling both the environment of the precursors during CaP synthesis and the conditions for heat treatment so as to initiate crystallisation of the desired calcium phosphate phase. While undesired crystallised phases can result from the substitution of some ions in the CaP lattice, controlling these substitutions can allow for the preparation of new materials with advanced properties. This was the expected result when synthesised CaP was doped with europium [131], magnesium [149] or fluorine [151]. After thermal treatments, electrospun fibres are made of calcium phosphates crystallites with sizes up to 100 nm [133,134,143–145,151,155] and spherical [131,132,134] or polygonal [151] shapes. Also, the size of the crystallites increases with the temperature of the thermal treatment [133,134,145,155]. When comparing fibres treated at 600 and 800 °C, the size ratio can even reach a value of 17 [155]. Applications of these CaP doped-fibres will be presented in the following section.

Ca/P precursors and doping elements (if any)	Ca/P molar ratio	Polymer	Solvents	Other additives	Synthesis conditions before electrospinning	Thermal treatments and CaP phases evidenced by XRD analysis	Ref
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphate	1.67	Not specified	Distilled water 2-methoxyethanol		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 2-3 h</li> <li>Ageing 48 h at 80-90 °C</li> <li>Solvent evaporation</li> <li>Mixing 10 h with the polymer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 1 h at 150 °C</li> <li>Then treated for 2 h at 350 °C (2 °C/min) followed by: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 h at 500 °C → HAp, CaO, CaHPO<sub>4</sub>, β-TCP</li> <li>- 1 h at 600 °C → HAp, trace of β-TCP</li> </ul> </li> </ul>	[130]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.67	PVP (1,300,000 g/mol)	Ethanol	With or without ethylene glycol as stabiliser	<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 10 min</li> <li>Polymer addition and stirring for 24 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 24 h → XRD amorphous</li> <li>Then 3 h at 350 °C (1 °C/min) and 1 h at 600 °C (10 °C/min) → HAP</li> </ul>	[146]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphate	1.67	PVP (1,300,000 g/mol)	Water Ethanol		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 15 min and aged 2 h at 45 °C</li> <li>Mixing with PVP solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 24 h at RT or for 5 h at 85 °C</li> <li>Then annealing for 10 min at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 400 °C → Amorphous</li> <li>- 500 °C → Beginning of crystallisation</li> <li>- 600 °C → HAP + β-TCP</li> </ul> </li> </ul>	[141]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.67	PVP (1,300,000 g/mol)	Water Ethanol		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 24 h</li> <li>Mixing with PVP solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 24 h and treated at 350 °C for 2 h (2 °C/min)</li> <li>Then, treated for 30 min (10 °C/min) at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 °C → Amorphous</li> <li>- 600 °C → HAP</li> <li>- 700 °C → HAP + β-TCP + CaO</li> </ul> </li> </ul>	[145]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphate	1.67	Gelatin	Ethanol Water TFE		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 24 h at 40 °C, then aged at 60 °C for 6 h</li> <li>Solvent evaporation for 1 h</li> <li>Mixing with gelatin solution, 12 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Treated for 1 h at 200 °C</li> <li>Then, post treatment for 1 h at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 400 °C → Amorphous</li> <li>- 600 °C → HAP + CaO</li> <li>- 800 °C → HAP + CaO</li> </ul> </li> </ul>	[150]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphate	1.67	PVP (1,300,000 g/mol)	Water		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 24 h</li> <li>Mixing with polymer solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 24 h at 60 °C and treatment at 350 °C for 2 h (1 °C/min)</li> <li>Then, post treatment for 1 h (10 °C/min) at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 600 °C → HAP</li> <li>- 800 °C → HAP + β-TCP + CaO</li> </ul> </li> </ul>	[133]



Ca/P precursors and doping elements (if any)	Ca/P molar ratio	Polymer	Solvents	Other additives	Synthesis conditions before electrospinning	Thermal treatments and CaP phases evidenced by XRD analysis	Ref
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphite	1.67	PVA (85,000-124,000 g/mol)	Water	Citric acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors mixed for 2 h at RT</li> <li>Addition of citric acid, ageing for 8 h at 80 °C</li> <li>Mixing with PVA solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 30 min at 80 °C</li> <li>Then, post treatment for 6 h (10 °C/min) at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 600 °C → HAp</li> <li>- 800 °C → HAp</li> </ul> </li> </ul>	[149]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphite Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O					<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying for 30 min at 80 °C</li> <li>Then, post treatment for 6 h (10 °C/min) at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 600 °C → poorly crystallised whitlockite (Ca<sub>18</sub>Mg<sub>2</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>14</sub>)</li> <li>- 800 °C → whitlockite, MgO</li> </ul> </li> </ul>		
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphate	1.67	PVP (40,000 g/mol)	Ethanol		<ul style="list-style-type: none"> <li>Precursors are mixed in ethanol for 3 h and aged for 48 h at 80 °C</li> <li>Mixing with PVP solution for 24 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Treatment at 300 °C for 1 h (5 °C/min)</li> <li>Then, post treatment for 1 h (5 °C/min) at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 600 °C → HAp, CaO</li> <li>- 800 °C → HAp, CaO</li> </ul> </li> </ul>	[134]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	1.67	PVP (1,300,000 g/mol)	Water Ethanol pH is stabilised at 2-3 adding HNO <sub>3</sub>	Citric acid CTAB N-cetyltrimethylammonium bromide	<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors are mixed with citric acid solution</li> <li>Addition of CTAB</li> <li>Addition of PVP, mixing for 3 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>As-spun → Amorphous</li> <li>Then, post treatment for 3 h (1 °C/min) at: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 °C → Amorphous</li> <li>- 600 °C → Eu-doped HAp</li> <li>- 700 °C → Eu-doped HAp</li> <li>- 800 °C → Eu-doped HAp + weak trace of CaO</li> </ul> </li> </ul>	[131]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphite NH <sub>4</sub> F	1.67	PVB	Ethanol Water		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors are stirred for 24 h and then aged for 10 days</li> <li>Vortexed with PVB solution and stirring for 24 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Treated for 2 h at 700 °C (1 °C/min) → Fluorinated HAp</li> </ul>	[151]

CaP precursors and doping elements (if any)	Ca/P molar ratio	Polymer	Solvents	Other additives	Synthesis conditions before electrospinning	Thermal treatments and CaP phases evidenced by XRD analysis	Ref
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphite	1.67	Gelatin	Ethanol TFE Water		<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors are mixed for 24 h at 40 °C and aged for 6 h at 60 °C</li> <li>Solvent evaporation for 1 h</li> <li>Mixing with polymer solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Treated for 2 h at 200 °C (1 °C/min)</li> <li>Then, post treatment for 6 h (1 °C/min) at:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 600 °C → Mainly amorphous</li> <li>- 700 °C → HAp + β-TCP</li> <li>- 800 °C → HAp + β-TCP</li> </ul> </li> </ul>	[155]
		PVP (1,300,000 g/mol)	Ethanol Water			<ul style="list-style-type: none"> <li>Treated for 2 h at 350 °C (1 °C/min)</li> <li>Then, post treatment for 6 h (1 °C/min) at:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 600 °C → HAp + CaO</li> <li>- 700 °C → HAp + CaO</li> <li>- 800 °C → HAp</li> </ul> </li> </ul>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Phosphoric acid	1.50	PVP (360,000 g/mol)	Ethanol Water	With or without acetic acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>Separate solutions of precursors are mixed</li> <li>Addition of PVP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Treatment at 950 °C for 1.5 h, without acid: β-TCP, HAp, α-TCP</li> <li>Or treatment at 1050 °C               <ul style="list-style-type: none"> <li>- With acid → CaDHA, α-TCP, CaO</li> <li>- Without acid → β-TCP, α-TCP, CaO</li> </ul> </li> </ul>	[143]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O Triethylphosphite	1.50	PAN (100,000 g/mol)	Water DMF		<ul style="list-style-type: none"> <li>Ca precursor is added in a solution of hydrolysed TEP, stirring for 120 h at RT</li> <li>Addition of PAN solution, stirring for 6 h at RT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Treatment at 260 °C for 30 min</li> <li>Then, heating at 1100 °C for 2 h in N<sub>2</sub> → β-TCP</li> </ul>	[132]
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> )•2H <sub>2</sub> O	1.65	PLA PEG (20,000 g/mol)	THF DMF DMSO	Triton X-100	<ul style="list-style-type: none"> <li>Calcium precursor is dissolved in the PLA solution</li> <li>Mixing with the NaH<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)•2H<sub>2</sub>O solution, stirring for 24 h</li> <li>Synthesis is performed at pH 4</li> <li>Mixing with PEG solution for 6 h</li> <li>Addition of Triton X-100 solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Washing with deionised water by vacuum filtration and freeze drying in a lyophilizer → DCPA, weakly crystallised</li> </ul>	[144]
Ca(OH) <sub>2</sub> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Not given	PLA (114,000 g/mol)	Water DMF Chloroform	NaHCO <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mixing H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and NaHCO<sub>3</sub> with water</li> <li>Addition of Ca(OH)<sub>2</sub></li> <li>Mixing with PLA solution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drying at RT → very poorly crystallised DCPA, possible trace of Ca(OH)<sub>2</sub></li> </ul>	[142]

**Table I-2.** Overview of CaP phases obtained in relation to solutions compositions and thermal treatments carried out on electrospun fibres. Phases reported are the ones detected in XRD diffractograms. Ca/P molar ratios are the one set experimentally for the synthesis

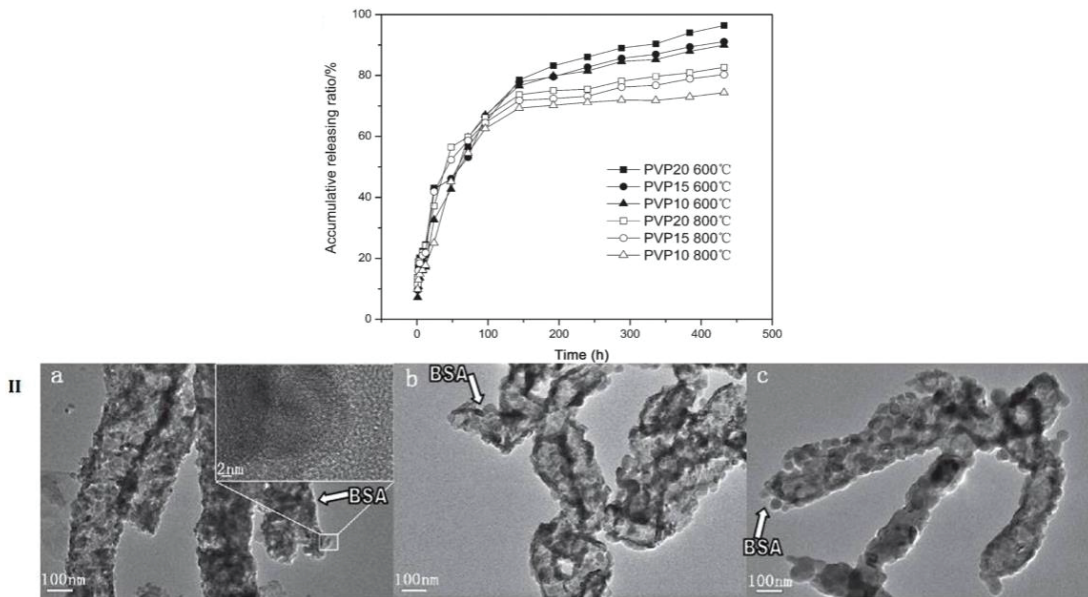
## 2.5. APPLICATIONS OF CAP FIBRES IN BONE TISSUE ENGINEERING

Although several studies report the production of calcium phosphate nanofibres, their characterisation is quite limited and in particular, their biological application properties have been poorly investigated. In the following will be presented the assessment of their potential application as drug carriers, followed by investigations into the *in vitro* biocompatibility of CaP nanofibres and CaP nanofibrous coatings.

### 2.5.1. CaP fibres as drug carriers

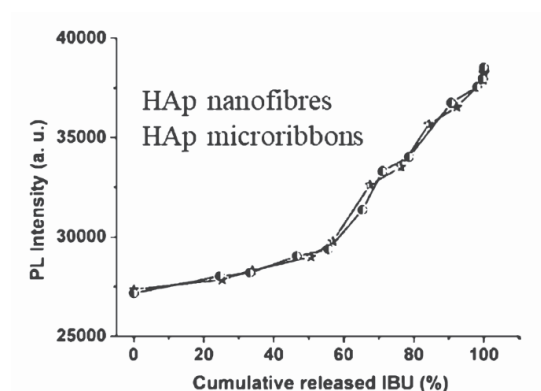
The first reported application of CaP electrospun fibres was their use as drug carriers to control and extend drug release time in the body. The aim was to deliver therapeutic drugs directly to the targeted cells or tissues as well as maintaining the optimum concentration for delivering an efficient therapeutic effect [131]. Just like bioactive glasses, hydroxyapatite based-fibres can present the appropriate surface properties for such applications. First of all, they can display the mesoporosity necessary for hosting the medicine, but the -OH group at their surface can also bind directly to the drugs. Indeed, the hydroxyl group reacts with appropriate drug functional groups without spoiling their molecular structure [131]. Diffusion, resorption of calcium phosphate and ionic exchanges between the medium and the fibres are the main mechanisms leading to the release of medicines from calcium phosphate nanocarriers.

It is in this scope that fibres consisting in apatitic interconnected grains of approximately 24 to 40 nm were created [134], as presented in Figure I-16.II. The porosity created by narrow intervals between those sintered grains was assumed to be capable of hosting the studied protein, BSA (Bovine Serum Albumin); but the size of the porosity is not mentioned. When protein-adsorbed HAp fibres were dispersed in PBS, BSA was initially released at a relatively large rate and accumulative release reaches around 70% within the first 6 days (Figure I-16.I), which is a suitable timescale for drug release purposes. During this step, no difference was observed between the samples with distinct HAp sizes (which depend directly on the CaP sol concentration in the electrospun solution as well as on the sintering temperature). Then, sustained release at a steady and slow rate continued until day 18. During this last stage, higher released amounts were evidenced for samples containing more CaP sol and calcined at lower temperatures. However, no statistical error bars are drawn, rendering the analysis difficult regarding the influence of these parameters.



**Figure I-16.**I-Cumulative release curve of BSA from HA fibres. PVP concentration remained constant in all electrospun solutions (25 w/v%). PVP20, PVP15 and PVP10 contained respectively 20, 15 and 10 wt% of HAp precursor based on the weight of PVP.  
 II- FESEM images of some HAp fibres: PVP10 treated at (a) 600 and (b) 800 °C; (c) PVP20 treated at 800 °C. Arrows indicate examples of possible BSA loading sites. Adapted from [134]

Another study investigated hydroxyapatite-based nanofibres and microribbons as drug carriers of Ibuprofen, a nonsteroidal analgesic and anti-inflammatory drug commonly used as a drug model [131]. The drug was loaded in mesopores created at the fibre/ribbon surface (pore size close to 14 nm) through the thermal removal of CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) micelles. In this case, a burst release was evidenced as the entire content of the loaded drug was released after 24 hours. However, an interesting aspect of this research is the doping of nanofibres and microribbons with europium, which provides red photoluminescence that can help in evaluating the efficiency of drug release. Indeed, the presence of ibuprofen in the fibres quenches the luminescence of  $\text{Eu}^{3+}$ , leading to a decrease in emission intensity. When ibuprofen is released, the quenching effect is weakened and results in an increase in emission intensity. Although the relation between the cumulative released amount of drug (determined *via* ibuprofen's absorbance) and photoluminescent emission intensity is not linear, both values can be correlated by a monotonic function, as illustrated in Figure I-17. After optimisation, this fluorescent effect could be useful for tracking the drug-release process.

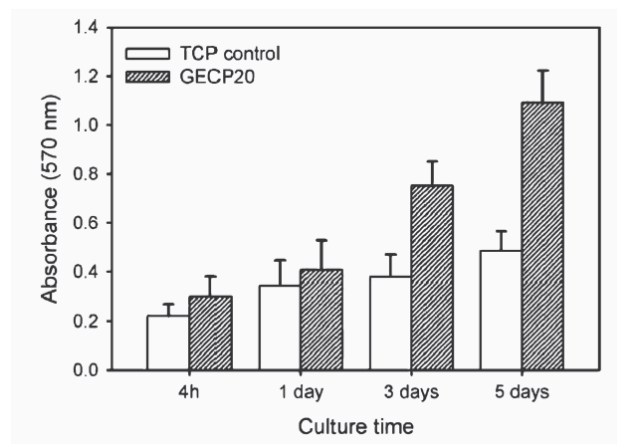


**Figure I-17.**Photoluminescent emission intensity of  $\text{Eu}^{3+}$  in IBU-HAp nanofibres and microribbons, as a function of cumulative amount of released ibuprofen. Reproduced from [131]

Similarly to Si-based filaments, fibres of CaP produced for drug delivery purpose have not been biologically tested. Thus, no conclusion on the beneficial or detrimental effect of the delivered drug on cell activity can be drawn.

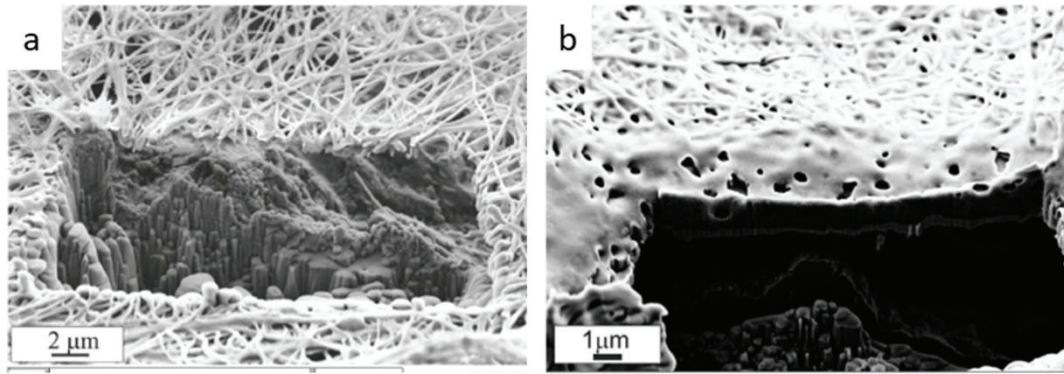
### 2.5.2. First *in vitro* investigations of CaP electrospun fibres

Only few biological studies have been reported for the characterisation of calcium phosphate electrospun fibres. Two acellular assessments were made on CaP materials in simulated body fluid (SFB) [133,150]. But because the layers formed on the immersed materials were not characterised at all in these studies, results are not reviewed here as it would be hard to draw a conclusion on such poor investigations. In actual facts, only two articles in the literature report the *in vitro* cellular assessment of CaP electrospun fibres, while no *in vivo* study could be found. *In vitro* investigations of HAp fibres demonstrated that these ceramic fibres favoured the proliferation of mouse calvaria osteoblasts (MC3T3-E1) compared to tissue culture plate (Figure I-18).



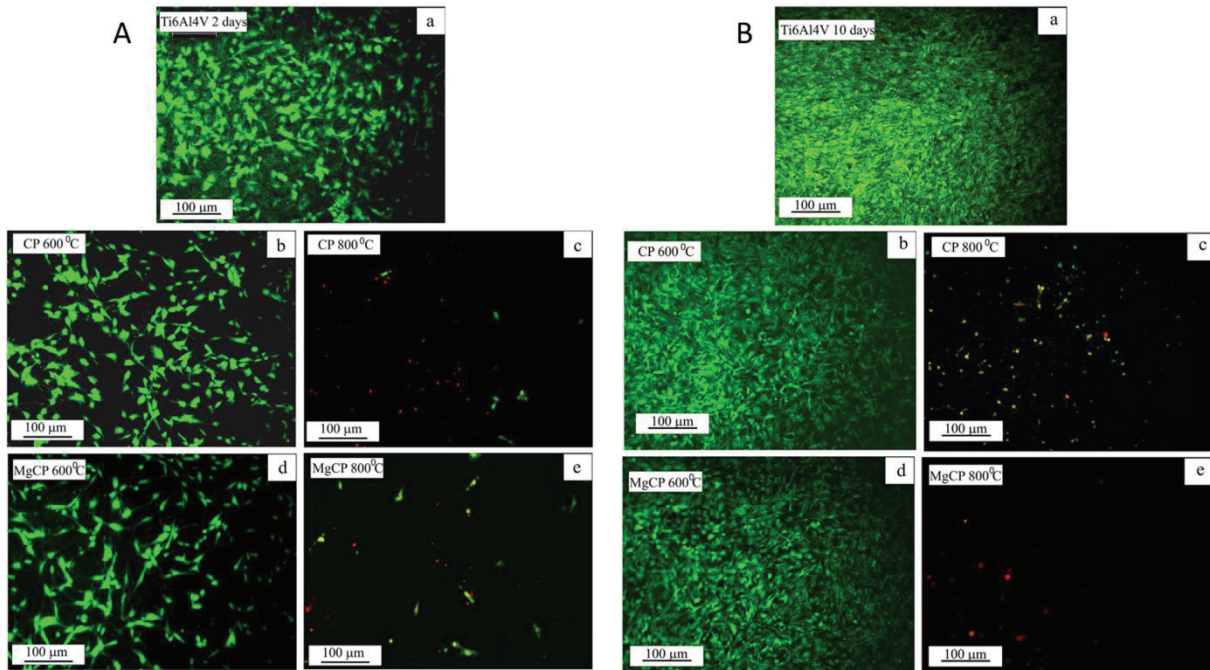
**Figure I-18.** Viability of MC3T3-E1 cells cultured onto HAp ceramic fibres (named “GECP20”) as a function of time. Reproduced from [150]

M. Streckova et al. created for their part calcium phosphate fibrous coatings (1-2  $\mu\text{m}$ ) on the surface of Ti-6Al-4V titanium alloy [149]. Also called TA6V, this alloy is used extensively in the field of orthopaedics and dental applications. Titanium presents good biocompatibility, resistance to corrosion and mechanical strength. However, Ti and its alloys lack bioactivity and osseointegration. For these reasons, coatings can be applied to their surface to act as a biological active layer that will favour implant fixation at the implantation site. In addition, magnesium, which is naturally present in bone composition, was used as a doping element with a view to improving the biocompatibility of these HAp coatings. As shown in Figure I-19, the coatings doped with magnesium exhibited a lower porosity compared to undoped hydroxyapatite fibres.



**Figure I-19.** SEM/FIB observation of bioactive coatings of a) HAp and b) Mg doped calcium phosphate after thermal treatment at 600 °C. Reproduced from [149]

Also, coated samples treated at 600 °C presented slightly lower biocompatibility compared to nude untreated TA6V substrates, based on proliferation assay (MTS) and live-dead fluorescent staining (Figure I-20). Nonetheless, the addition of magnesium did not permit an enhancement of the biocompatibility of the CaP coatings. Though, after 10 days of culture, the density of viable cells was significantly enhanced on all samples and no dead cells were seen. In contrast, a strong cytotoxicity of samples calcined at 800 °C was demonstrated by both MTS proliferation assay and live/dead imaging, regardless of the culture time and the chemical composition (HAp or Mg-whitlockite). It is suggested that this cytotoxicity is caused by the formation of needle-like particles of rutile resulting from the titanium oxidation at 800 °C. In this article [149], samples calcined at 600 °C present good preliminary results in terms of biological compatibility, even though the latter remains lower than the one of bare untreated TA6V substrates. A further in-depth investigation would now be necessary, such as an examination of the osteoinductivity of the coatings.



**Figure I-20.** Morphology and density of osteoblastic cells after A) 2 and B) 10 days of culture. Cell culture was made on a) Pure TA6V substrates; CaP coated TA6V substrates calcined at b) 600 °C and c) 800 °C; Mg-CaP coated TA6V substrates calcined at d) 600 °C and e) 800 °C. Reproduced from [149]

## 2.6. SUMMARY FOR CALCIUM PHOSPHATES ELECTROSPINNING

Calcium phosphates are promising materials for the preparation of electrospun bone tissue engineering scaffolds. Nonetheless, the synthesis of a single-phase calcium phosphate is quite challenging and unexpected phases can present adverse effects on cells. After *in situ* synthesis, the shaping of such materials in nanofibres was documented by a few researchers, however biological investigations into these materials are terribly lacking, as they are limited to only two *in vitro* studies. Therefore, efforts should be put in the obtaining of pure calcium phosphate phases (such as hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate), and characterisations should be further investigated, both on a composition and biological point of view.

## 3. CONCLUDING DISCUSSION AND FUTURE TRENDS

### 3.1. POSITIONING OF THE ELECTROSPINNING TECHNIQUE

When designing materials for BTE applications, some specific requirements in terms of scaffolds structures have to be considered. In particular, the optimal pore size for cell migration in bone scaffolds has been estimated at 100-500  $\mu\text{m}$  [160], provided that the pore geometry permits the entry of the cells. There is however a lack of consensus on this value, as other authors report the best pore size to be 100-350  $\mu\text{m}$  [161] or even 10-400  $\mu\text{m}$  [162]. Beside these large pores, the presence of pores close to the micrometre scale plays a complementary role: it ensures the flow of nutrients, the evacuation of cell wastes and can also favour the angiogenesis of the materials [161,163]. The largest porosity is also responsible for an enhanced specific surface area, and results in an increased adsorption of proteins [164]. Moreover, an interconnectivity of the porosity is an essential requirement for the movement of cells, nutrients and wastes through the scaffolds [165]. As already reported in this review, the fibrillary collagen naturally present in the bone ECM displays diameters of a few hundred of nanometres [166]. Mimicking this nanoscale morphology serves as a tool to improve the cellular responses. Indeed, while large porosity is ideal for cell migration and vascularization, nano-sized substrates act as protein, cells and mineral binding architecture [162,167].

Different techniques can be used to create 3D materials with porous structures, including solvent casting and particulate leaching, gas foaming, or freeze drying [165,166,168]. Yet, none of these techniques can play on the nano-architecture of the scaffolds. Nanofibers of polymers can be prepared by phase separation or self-assembly [167], however, these methods only apply to some specific polymers and only short strands of nanofibers can be obtained. Also, the low amount of fibres created by self-assembly is not suitable for mass production. Therefore, the electrospinning method stands out as it enables the production of long and continuous nanofibers with large surface area. The experimental setup is simple, low cost and suitable for a large scale production. A wide range of materials can be shaped by this technique and as detailed in this review, it is compatible with an *in situ* synthesis of bioceramics. Compared to the suspension of pre-synthesised nanoparticles, this *in situ* synthesis brings about a more homogenous repartition of the inorganic phase within the electrospun fibres, avoiding as such aggregation of the particles and inhomogeneous properties. With the electrospinning method,

fibres display diameters of submicron sizes. As detailed previously, fibres diameters can be adapted by adjusting the synthesis and electrospinning parameters (such as the sol ageing time, the sol and polymer concentrations, the flow rate or the voltage applied). The porosity naturally created between electrospun fibres is usually well interconnected but the pore size ranges from several to tens of micrometres [167]. This size is suitable for the flow of nutrient; even so it prevents the penetration of cells into the scaffolds. For this reason, the electrospinning method may be more adapted to create bioactive coatings on inert implants, as the infiltration of cells is not required. Comparatively, additive manufacturing techniques are well adapted for tailoring the pore size of engineering scaffolds, and large dimensions can be reached. Nonetheless, these methods are mostly not compatible with the obtaining of nanofibers, because the resolution is generally higher than a few tens of microns [169]. The more advanced additive manufacturing techniques are the two-photon polymerization and the electro-writing electrospinning [170]. With the first method, the resolution usually reaches around 100-200 nm but the necessity for photo-curable resins limits the diversity of materials being adapted to this process. Another well-resolved technique is the electro-writing electrospinning, where the electrospinning process is combined with a displacement of the collector along the X, Y and Z axis, so as to precisely localise the deposition of the filament [170]. In that case, the resolution is of several micrometres.

Taking into account all of these available methods for producing BTE scaffolds, obtaining both sub-micron filaments mimicking the collagen structure of the bone ECM and adequate porosity appears challenging. Therefore, combining two methods such as electro-writing and electrospinning could be considered so as to create scaffolds with tailored porosity, yet with the surface of the scaffolds displaying submicron filaments that are favourable to cell adhesion, proliferation and differentiation.

### **3.2. BIOACTIVE CERAMICS VERSUS RESORBABLE POLYMERS**

The biodegradability of a BTE scaffold enables its gradual replacement with the new bone. Therefore, the degradation rate of the scaffold should be controlled, and degraded residues should be nontoxic [165]. Polymer materials have been extensively investigated for their use as bone regenerative scaffolds. While natural polymers provide bio-functional molecules that guarantee their bioactivity, they can yet generate immunogenic responses or microbial contamination [162,171]. On the other hand, synthetic polymers present tunable properties in terms of degradation rate for instance. But even though they can be biocompatible, they present a reduced bioactivity, a lack of cells recognition sites and of osteoconductivity [166,171]. On the contrary, the bioactive properties of some bioceramics – such as bioactive glasses and calcium phosphates – result from their ability to produce, *via* solution-mediated surface reaction, a carbonated hydroxyapatite layer on their surface. This layer is necessary for a bond with bone tissue to occur. Some bioceramics can also trigger osteoconductivity and osteoinductivity [165,172]. In this review paper, the supplementation of polymer materials with bioactive ceramics has indeed evidenced an improvement in their ability to regenerate bone tissue *in vivo*: by comparing either polymer-only with polymer-bioactive ceramic electrospun fibres [36], polymer matrices with and without electrospun bioactive glasses embedded in them [73,93], or finally by considering mats composed of electrospun PCL fibres either alone or intertwined with an electrospun network of bioactive glass [65].



In spite of their bioactivity, bioceramics are inadequate for load bearing applications due to their inherent brittleness (feature of hard materials with small elongation to failure) [162,172]. This property limits their use on their own, but combining them with polymers can counterbalance their reduced mechanical properties. When combining the *in situ* synthesis of the inorganic phase and a subsequent electrospinning, purely inorganic fibres can be obtained after polymer calcination or by polymer-free synthesis. These inorganic fibres are characterised by tensile strengths below or equal to 0.1 MPa, Young modulus of a few mega Pascals [51,63,65], and a compressive strength of 0.15 MPa [63]. When the polymer was kept in the hybrid fibres, these properties were improved (tensile strength of a few mega Pascals [36,44,62,68,88,92,106,107], Young modulus of several tens [36,88,92,107] to more than 100 MPa of mega Pascals [44,88,106] and a compressive strength lower than 1 MPa [68]) but still low compared to natural bone. In actual facts, the best mechanical properties could be obtained when purely inorganic fibres were inserted into matrices of polymer (tensile strength of 10 MPa, Young modulus of 0.2 GPa [73]) or of calcium sulfate cement. In that case, the Young modulus and the compressive strength varied between 0.4 and 0.82 GPa and between 17 and 30 MPa, respectively, depending on the amount of fibrous filler [80]. These values are close to the mechanical features of cancellous bone, which are: a tensile strength of 7.4 MPa, a compressive strength of 4-12 MPa and a Young modulus of 0.02-0.5 GPa [173].

A major challenge in bone tissue engineering is to develop a scaffold material that is mechanically strong and yet biodegradable. This review has confirmed, on a biological point of view, the interest of shaping bioceramics into nano- or micro-fibres through electrospinning. However, to counteract their lack of mechanical resistance, future research should focus on the development of composite materials, where the matrix embedding the fibres presents mechanical strength as well as biodegradable properties, in order to expose gradually the bioactive fibres to the surrounding area. Also, the fibres could be contained into or deposited on the surface of a mechanically strong 3D printed grid with adequate porous feature to enable cell migration. Finally, these inorganic fibres could also be deposited on orthopedic implants so as to benefit from the strength of the bioinert metal (such as TA6V).

### **3.3. CALCIUM PHOSPHATES VERSUS SI-BASED MATERIALS**

Both bioactive glasses and calcium phosphates are bioactive materials, as they can improve bone cell growth and enhance bone tissue formation [174]. As the formation of a carbonated hydroxyapatite layer at their surface is solution-mediated, controlling their dissolution rate is critical for tissue regeneration. While hydroxyapatite possesses a high chemical stability that restricts its dissolution *in vivo*,  $\beta$ -tricalcium phosphate is characterized by an adversely resorbability rate [174]. As detailed in this review paper, the electrospinning of these two phases have been considered in the literature. However, a strong lack in biological evaluation, both *in vitro* and *in vivo* has been noticed and should be looked at in the future. Also, a common strategy to obtain intermediate properties of dissolution in bulk materials is based on the preparation of biphasic calcium phosphate, a mixture of HAp and  $\beta$ -TCP, whose dissolution can be tailored by the ratio set between the two phases. This ratio would likely be hard to control if the two phases were to be *in situ* synthesised into the same electrospun fibre. Thus, alternatively, the two materials could be prepared in two different solutions that would be

simultaneously electrospun to create one biphasic electrospun mat. Though, materials prepared from biphasic calcium phosphates exhibit rather two different kinetics of resorption (the one of HAp and the one of  $\beta$ -TCP) than one intermediate rate. Therefore, the use of bioactive glasses is interesting in the sense that its composition can be easily adapted to adjust its dissolution behaviour. Indeed, as the concentration of the network former decreases in the glass, its solubility increases. In this review, this tendency has also been reported on electrospun fibres [69]. Bioglass 45S5, which contains 46.1 mol.% of silica, is known to have to most stimulatory effect on bone cell function. Also, when implanted in bone, bioglass has been shown to accelerate bone growth three times more than HAp [174]. The electrospinning of this material after *in situ* synthesis is really sparsely reported, and limitations on the obtaining of a homogeneous glass network were evidenced [112]. Future studies could therefore address these limits. Besides the well-studied  $\text{SiO}_2$ -CaO and  $\text{SiO}_2$ -CaO- $\text{P}_2\text{O}_5$  systems, other more complex compositions have been reported to produce electrospun fibres, including the glass 13-93 - for its ability to keep its amorphous structure at higher temperature than 45S5 [116] - or Ag-doped silica, for its antibacterial potential [120]. Yet, only preliminary results were available on these materials. Also, it is worth mentioning that none of the reported studies compared CaP and Si-based materials on a biological point of view.

Moreover, this review brought to light the difficulty in controlling the synthesis of these two types of ceramics. Regarding calcium phosphates, obtaining pure phases of either HAp,  $\beta$ -TCP or DCPA is challenging. For instance calcium oxide, which is indirectly toxic to cells, often appears in the final fibres. This phase results from the strong tendency of calcium phosphate to incorporate other ions into its lattice [174] in combination with the high thermal treatment imposed to the fibres after electrospinning. This treatment is nevertheless necessary to crystallise the desired CaP phase and to eliminate the toxic nitrate ions brought by the calcium nitrate precursor, which is extensively used in the reported studies. Regarding bioactive glasses, the deviations in composition with respect to the expected glass network are due to a loss of phosphorus during the synthesis/electrospinning process [88], as well as a tendency of the glass to crystallise upon heat treatment [67,112]. For these glasses, the thermal treatment also favours the entry of calcium, if any, in the glass network. All in all, for both kinds of materials, efforts should be put into the optimisation of their synthesis in order to obtain fibres of the expected composition. We can for instance imagine using other precursors to avoid bringing nitrates that only decompose at high temperature, as previously mentioned in a few articles [64,65,140,142].

Finally, beside the use of bioactive ceramics, mesoporosity could be provided to the electrospun fibres in a way to host bioactive molecules and use them as drug delivery systems. Interesting drug release kinetics throughout several days have indeed been reported for bioactive glass [68,76] or HAp [134] fibres, while burst releases were evidenced when using hollow fibres [71,79]. Nonetheless, a strong lack of biological evaluation regarding the impact of the released drugs on cell behaviour is noticed, and should be addressed in the future.



# **Chapitre II**

**ELABORATION DE REVETEMENTS ELECTROFILES  
A PARTIR DE SYSTEMES A BASE DE PRECURSEURS  
NITRATE**



## INTRODUCTION

Le chapitre bibliographique révèle que les filaments électrofilés de biocéramiques sont majoritairement utilisés sous forme de matériaux autosupportés. Seule une étude publiée en 2018 rapporte le dépôt de filaments de phosphates de calcium sur un substrat en alliage de titane [149], mais il est important de noter que ce travail a été publié postérieurement à nos premières études. Par ailleurs, l'étude bibliographique a mis en évidence l'utilisation très majoritaire de précurseurs nitrate dans les systèmes électrofilables de verres bioactifs et de phosphates de calcium. Dans ce contexte, nous nous sommes naturellement tournés vers cette famille de précurseurs, avec comme premier objectif de reproduire les synthèses les plus prometteuses de la littérature pour ensuite les adapter à la fabrication de revêtements fibreux par électrofilage.

Ce chapitre traite uniquement du verre 45S5, sur lequel toutes les optimisations ont été réalisées. La première partie est dédiée à la préparation de revêtements fibreux sur TA6V pour lesquels morphologie, composition chimique et comportement thermique ont été étudiés. Les résultats nous ont alors conduits à proposer, dans la seconde partie du chapitre, le remplacement des précurseurs nitrate par d'autres familles de précurseurs afin d'obtenir des systèmes sol-gel potentiellement mieux adaptés à l'élaboration de revêtements fibreux.

### 1. ELABORATION DE REVETEMENTS FIBREUX DE 45S5 A PARTIR DE SYSTEMES A BASE DE NITRATES

Le verre 45S5 est composé, en pourcentages molaires, de 46,1% de  $\text{SiO}_2$ , 24,4% de  $\text{Na}_2\text{O}$ , 26,9% de  $\text{CaO}$  et 2,6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Dans l'ensemble du document, on associera le terme « 45S5 » aux solutions et filaments préparés à partir de précurseurs introduits en proportions stœchiométriques par rapport à la composition visée (et rappelée ci-dessus) même si la composition chimique finale n'a pas encore été déterminée.

#### 1.1. PARTIE EXPERIMENTALE

Les produits chimiques, procédés de mise en forme et techniques de caractérisation utilisés dans ce travail sont présentés en détails dans la partie Techniques Expérimentales (page 195). Les différents protocoles de synthèse du 45S5 et des CaP ayant été modifiés tout au long de ce travail, ils seront présentés spécifiquement dans chaque chapitre en fonction des études réalisées.

- *Préparation de la solution électrofilable de 45S5*

Une première solution a été préparée en se basant sur le protocole expérimental de Deliormanli [112]. A ce jour, il s'agit de la seule synthèse rapportée dans la littérature pour la mise en forme du matériau 45S5 par électrofilage.

Dans un premier temps, le TEOS est introduit dans une solution aqueuse d'acide nitrique à 0,1 M ( $[Si] = 1,8 \text{ M}$ ). Le mélange est agité (210 tr/min) pendant une heure pour permettre l'hydrolyse du TEOS. Puis, tous les composés - TEP,  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - sont ajoutés un à un après que la solution précédente ait été agitée pendant une heure. Les quantités ajoutées permettent de respecter les rapports molaires du verre 45S5, soit  $n(\text{Si})/n(\text{Ca})=1,7$ ,  $n(\text{Si})/n(\text{Na})=0,9$  et  $n(\text{Si})/n(\text{P})=8,9$ . Dans un second temps, une solution aqueuse de PVA à 10 %<sub>massique</sub> contenant 0,5 %<sub>volumique</sub> de surfactant Surfynol® SE et 1 %<sub>volumique</sub> d'éthanol est préparée. Elle est ensuite ajoutée à la première solution et le mélange est agité toute une nuit à 25 °C. Dans ce système, la concentration finale en élément silicium est  $[Si] = 0,88 \text{ M}$  et la concentration finale en PVA est de 5 %<sub>masse/vol</sub> (*note :  $x$  %<sub>masse/vol</sub> correspond à  $x \text{ g}/100 \text{ mL}$* ). Le protocole de synthèse est schématisé sur la Figure II-1.

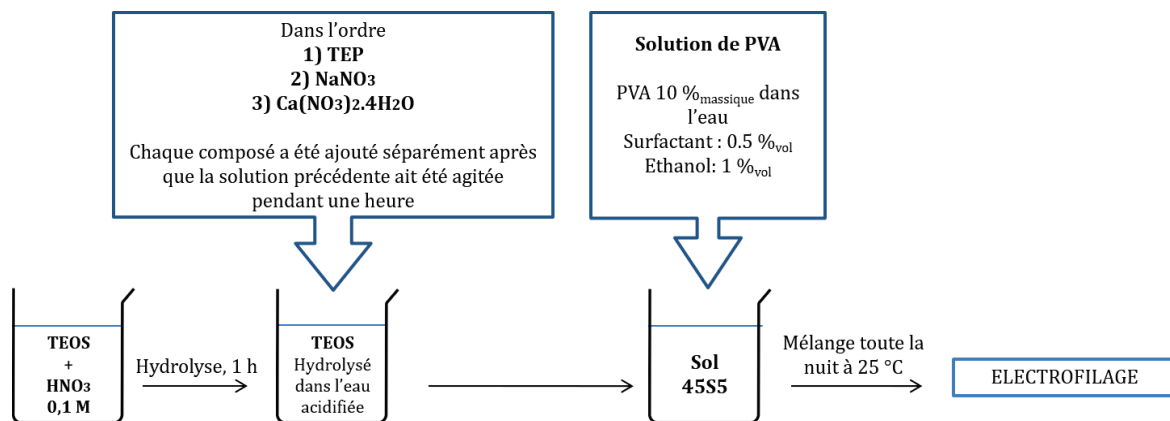


Figure II-1. Schéma du protocole de synthèse de la solution électrofilable de 45S5 à base de précurseurs nitrate

Une seconde solution plus concentrée en sol de 45S5 a été préparée dans les mêmes conditions afin d'obtenir une concentration finale en élément silicium  $[Si] = 1,17 \text{ M}$  et une concentration finale en PVA de 3,5 %<sub>masse/vol</sub>. Dans ce cas, le surfactant Surfynol® SE et l'éthanol ont été supprimés du système.

- *Electrofilage*

Les solutions ont ensuite été mises en forme par le procédé d'électrofilage, dont le principe est détaillé dans l'Annexe 1. Ici, le collecteur (feuille d'aluminium ou substrat TA6V) est placé à une distance de 8 cm de l'aiguille. Le débit est fixé à 0,25 mL/h et la tension est ajustée autour d'une valeur moyenne de 7,8 kV afin d'obtenir un filage stable. Après leur mise en forme, les filaments sont vieillies à 60 °C pendant 18 h.

Notons que les matériaux autosupportés sont obtenus par électrofilage sur feuille d'aluminium puis prélèvement du mat à l'aide d'une pince, alors que les revêtements sont obtenus par dépôt direct des filaments sur le substrat de TA6V.

## 1.2. CARACTERISATION DES FILAMENTS APRES ELECTROFILAGE

Une première série d'échantillons a été préparée avec la solution présentant une concentration  $[Si] = 0,88 \text{ M}$ . Les filaments ont été déposés sur de l'aluminium en guise de collecteur. Les images MEB des filaments obtenus après vieillissement sont proposées sur la Figure II-2.

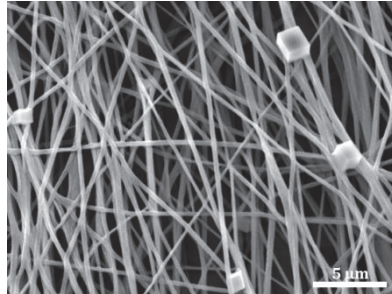


Figure II-2. Image MEB de la surface des filaments après électrofilage

Les filaments présentent un diamètre régulier, estimé à  $(0,33 \pm 0,05) \mu\text{m}$  (analyse d'image, 30 mesures). La présence de polyèdres réguliers est également constatée à la surface des filaments. Une analyse EDS ciblée sur ces formes géométriques montre la présence majoritaire des éléments Na, N et O, dans les proportions molaires 1 : 0,95 : 2,82. La composition expérimentale est donc très proche de celle du  $\text{NaNO}_3$  (rapports molaires 1 : 1 : 3). Ce résultat est conforté par une analyse DRX effectuée sur les filaments. En effet, le diffractogramme correspondant (Figure II-3) met en évidence la présence de  $\text{NaNO}_3$  sous forme de nitronatrite (PDF #01-085-0850). Sur ce diffractogramme, on note également la présence de signaux relatifs au titane (PDF #01-089-2959) provenant du substrat métallique.

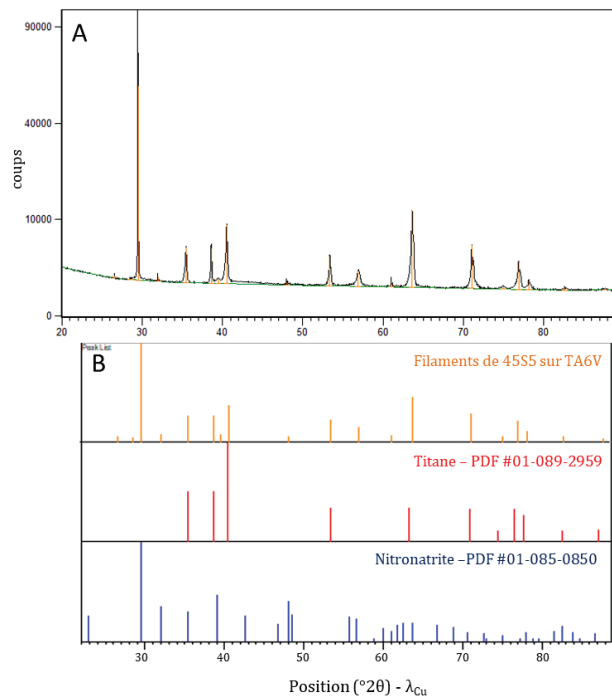


Figure II-3. A) Diffractogramme des filaments (système 45S5) déposés sur substrat de TA6V et B) Comparaison des pics expérimentaux avec ceux du titane (PDF #01-089-2959) et de la nitronatrite  $\text{NaNO}_3$  (PDF #01-085-0850)



Les polyèdres présents à la surface des filaments sont donc identifiés comme des cristaux de  $\text{NaNO}_3$ , formés lors de l'électrofilage. En effet, l'évaporation du solvant lors du trajet du filament jusqu'au collecteur peut limiter la solubilité du composé nitrate et provoquer sa recristallisation. Si Deliormanli a également fait état de cette cristallisation post-filage dans l'article référence, l'impact de cette dernière sur la mise en forme du matériau et sur sa composition finale n'a pas été discuté. Sur le premier point, expérimentalement, nous avons observé que les filaments se repoussent mutuellement et ne se déposent pas sur le collecteur. Dans certains cas, ce phénomène est tellement marqué que le dépôt croît en direction de l'aiguille jusqu'à former un matériau reliant l'aiguille et le substrat, ce qui provoque l'apparition d'arcs électriques et, en conséquence, l'arrêt du filage. Dans ce contexte, un collecteur rotatif a été mis en place. Sa rotation entraîne mécaniquement les filaments, qui peuvent ainsi se déposer sur le collecteur. Ces perturbations dans le filage sont attribuées à la présence des sels métalliques, puisque les filaments se déposent facilement sur un collecteur fixe lorsque le  $\text{NaNO}_3$  est supprimé de la synthèse. La seconde problématique en lien avec la recristallisation de  $\text{NaNO}_3$  à la surface des filaments est à relier à la composition chimique de ces derniers. En effet, si le nitrate de sodium cristallise à leur surface, il est attendu que la composition finale du verre diffère de la composition désirée : le sodium présent sous forme de cristaux sera éliminé lors de la décomposition des nitrates en température plutôt que de s'insérer dans le réseau de verre.

### 1.3. COMPORTEMENTS CHIMIQUES ET MORPHOLOGIQUES DES FILAMENTS ET DU SUBSTRAT DE TA6V EN TEMPERATURE

#### 1.3.1. Choix des températures de traitement thermique

En raison de leur toxicité, les nitrates doivent être éliminés des matériaux utilisés pour des applications médicales. Une analyse ATG-DSC des filaments électrofilés est proposée sur la Figure II-4.

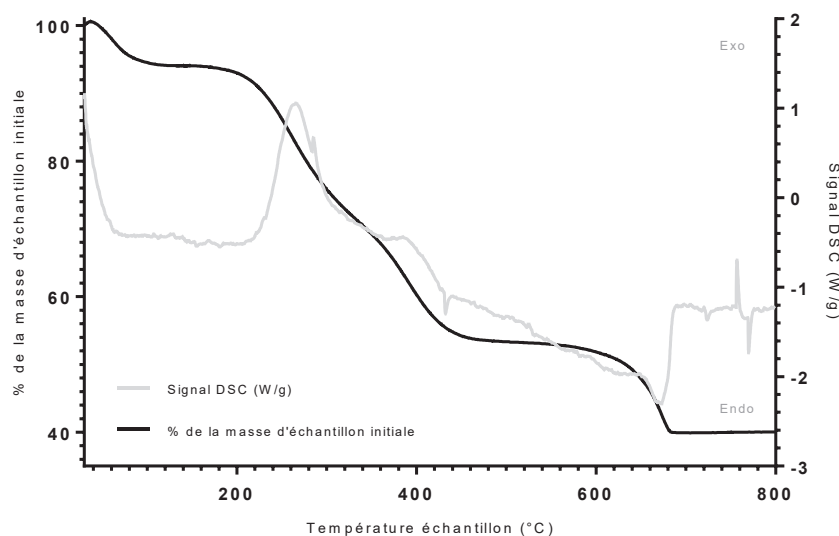


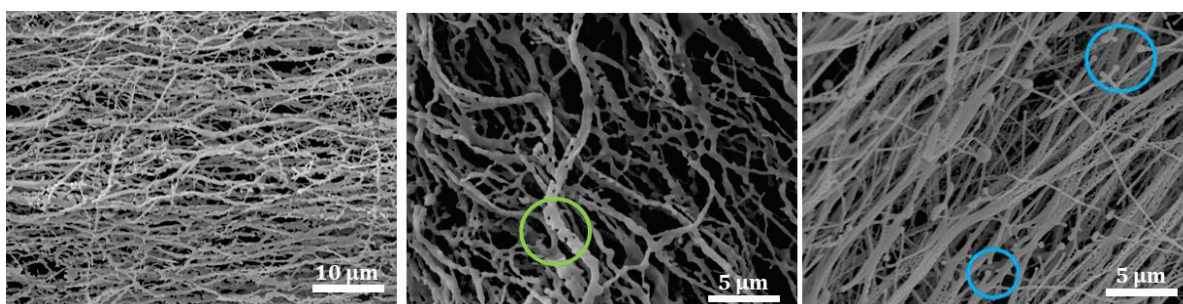
Figure II-4. Thermogrammes ATG-DSC des filaments contenant les précurseurs de 45S5 après électrofilage

La décomposition des nitrates apparaît sous la forme d'une réaction endothermique avec perte de masse débutant à 560 °C et qui semble se terminer autour de 700 °C. C'est donc cette dernière température qui a été choisie pour le traitement thermique des matériaux. Une vitesse de chauffe assez lente (1 °C/min) est adoptée afin d'éliminer le polymère sans créer de contraintes importantes qui pourraient modifier la morphologie des filaments.

### 1.3.2. Comportement des filaments en température

- *Comportement morphologique*

Les images MEB enregistrées sur les mats autosupportés traités à 700 °C sont présentées sur la Figure II-5.



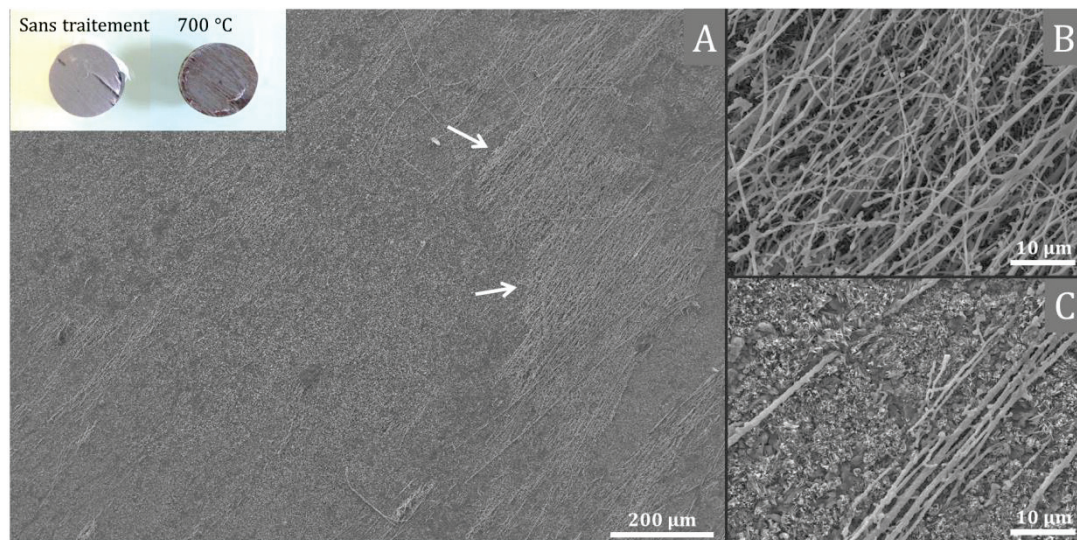
**Figure II-5.** Images MEB de la morphologie des filaments après traitement thermique à 700 °C. Les cercles bleus mettent en évidence des phénomènes de rupture de filaments, et les cercles verts l'apparition de porosité

Tout d'abord, il peut être observé que le traitement thermique entraîne la disparition des cristaux de  $\text{NaNO}_3$ , comme attendu à cette température. Par ailleurs, les filaments ont perdu leur forme cylindrique régulière originale et apparaissent très inhomogènes. La disparition des cristaux de  $\text{NaNO}_3$  au cours du traitement thermique peut être à l'origine d'inhomogénéités localisées sur les filaments, telles que les ruptures signalées par des cercles bleus. Les images montrent également la formation de porosité (encerclée en vert) qui peut être générée par le tensioactif présent initialement dans la solution polymère (cf. chapitre bibliographique) ou une conséquence de la faible concentration en éléments inorganiques de la solution électrofilée. Notons de plus que l'électrofilage du système 45S5 mène à des résultats peu reproductibles. Le fait de ne pas pouvoir contrôler la température et l'humidité lors de la mise en forme peut expliquer en partie ce manque de reproductibilité : l'humidité a un effet direct sur l'évaporation du solvant et par conséquent, on peut s'attendre à ce qu'elle influence la quantité de  $\text{NaNO}_3$  formée à la surface des filaments, ainsi que la fréquence d'apparition des défauts liés à son élimination.

Par ailleurs, un important retrait volumique est constaté sur les filaments autosupportés lors de leur traitement thermique (images non présentées ici). Dans le but de limiter ce retrait, une solution plus concentrée en composés inorganiques a été utilisée, avec une concentration en silicium de 1,17 M (contre 0,88 M dans la synthèse référence). Notons également que le tensioactif et l'éthanol, n'ayant pas montré d'intérêt particulier dans la qualité de l'électrofilage, ont été supprimés du système. Dans ce cas, le retrait surfacique est moins important et peut

alors être calculé par analyse d'image (avant et après traitement thermique) ; il est estimé à 33 %.

Cependant, lorsque les filaments sont déposés directement à la surface de substrats de TA6V (toujours dans le cas  $[Si] = 1,17 \text{ M}$ ), le revêtement fibreux ne présente aucune adhésion au substrat. La seule manipulation des échantillons pour les retirer de la feuille d'aluminium servant de support suffit à décoller les filaments du TA6V. L'image macroscopique de la pastille obtenue après électrofilage, présentée sur la Figure II-6, permet de visualiser ce manque d'adhésion.

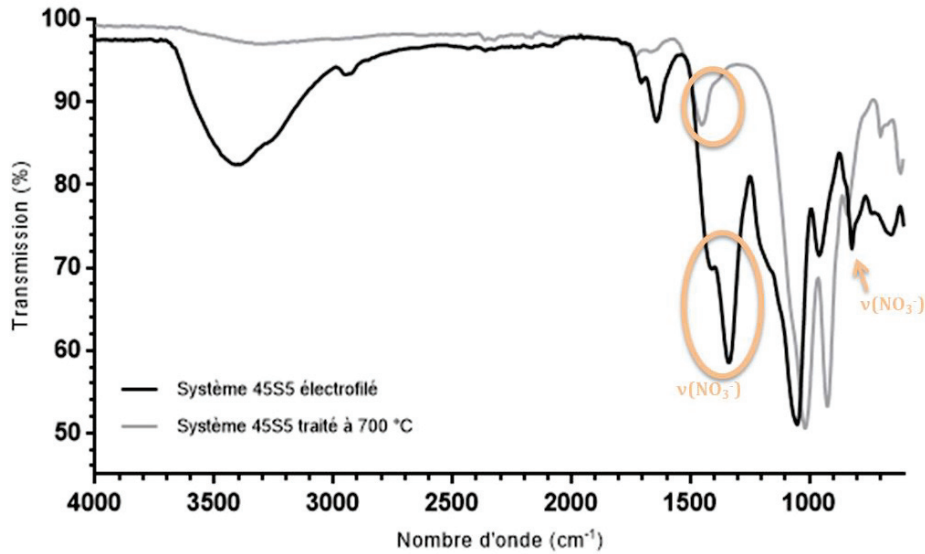


**Figure II-6.** Images MEB des revêtements déposés sur substrat de TA6V. L'image macroscopique en encart montre les échantillons avant et après traitement thermique. L'imagerie par MEB montre A) la juxtaposition de zones riches en filaments signalées par des flèches (agrandissement sur figure B) et des zones de substrat découvert (agrandissement sur figure C)

Le revêtement fibreux semble cependant mieux adhérer au substrat après un traitement thermique à 700 °C, ce qui peut être expliqué par le phénomène de transition vitreuse du 45S5 se produisant autour de 550 °C [175] (et probablement visible sur la Figure II-4 à 527 °C par une rupture de pente du signal DSC). Par conséquent, le retrait surfacique observé sur les matériaux autosupportés est fortement limité dans le cas où les filaments sont déposés comme revêtements sur le TA6V. Néanmoins, dans ce dernier cas, une fissuration du revêtement fibreux est constatée. Ce phénomène est mis en évidence sur l'image macroscopique de la pastille après traitement à 700 °C ainsi que sur les images au MEB. Des zones denses en filaments, signalées par des flèches sur la Figure II-6.A et agrandies sur la Figure II-6.B, semblent brutalement coupées, laissant alors apparaître le substrat (Figure II-6.C).

- *Comportement chimique*

La composition chimique des filaments a été analysée par IRTF et DRX. Le spectre infrarouge et son interprétation sont présentés sur la Figure II-7.



1. Filaments après électrofilage, non traités thermiquement

Nombre d'onde	Attribution
≈ 3400 cm <sup>-1</sup>	v(OH) H <sub>2</sub> O + v(OH) PVA
2942 – 2966 cm <sup>-1</sup>	v(C-H) PVA
1704 cm <sup>-1</sup>	v(C=O) PVA
1640 cm <sup>-1</sup>	Déformation de cisaillement (O-H) de l'eau
1416 cm <sup>-1</sup>	Déformation CH <sub>2</sub> du PVA + v <sup>as</sup> (NO <sub>3</sub> )
1338 cm <sup>-1</sup>	v(NO <sub>3</sub> ) <sup>as</sup> asymétrique + Déformation (C-H) du PVA
Large bande avec intensité maximale à 1050 cm <sup>-1</sup> et épaulements à 1168 et 1210 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O-Si) prédomine (+contribution v(C-O) du PVA)
950 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O-C) symétrique + Si-(OH) (nature - élongation ou déformation - non identifiée)
820 cm <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>as</sup> déformation hors du plan + v(C-O) PVA
Epaulement 788 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O)
740 cm <sup>-1</sup>	Bande non identifiée certainement due à Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (par comparaison avec le spectre expérimental de Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O pur)
656 cm <sup>-1</sup>	Déformation hors du plan (O-H)

Notation: v, vibration d'élongation

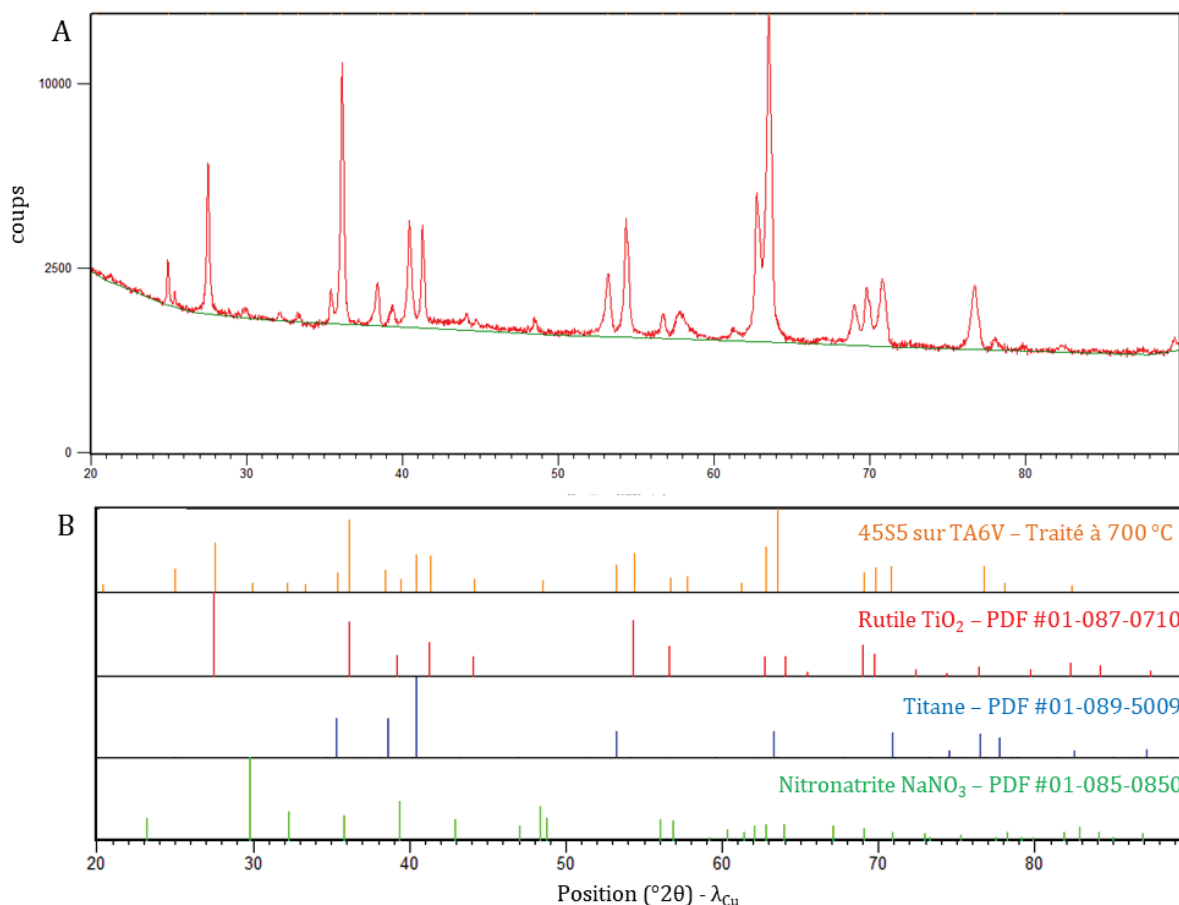
2. Après traitement à 700 °C

Nombre d'onde	Attribution
1726 cm <sup>-1</sup>	v(C=O), potentiellement due à la formation de carbonates
1662 cm <sup>-1</sup>	Déformation de cisaillement (O-H) de l'eau adsorbée en surface
1444 cm <sup>-1</sup>	v <sup>as</sup> (NO <sub>3</sub> )
Epaulement 1373 cm <sup>-1</sup>	v(NO <sub>3</sub> ) <sup>as</sup> asymétrique
1018 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O-Si)
926 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O non pontant), v(Si-O-M) avec M : Ca ou Na
842 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O) + contribution NO <sub>3</sub> <sup>as</sup> déformation hors du plan
700 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O) symétrique
614 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O-Si) symétrique
740 cm <sup>-1</sup>	Bande non identifiée certainement due à Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (par comparaison avec le spectre expérimental de Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O pur)

Figure II-7. Spectre IRTF du système 45S5 avant et après traitement thermique à 700 °C et attribution des signaux. L'interprétation est basée sur les tables de Socrates [176] et de Rubio *et al.* [177].

L'analyse infrarouge permet de rendre compte d'une forte diminution de la concentration en nitrates dans les filaments qui ont été traités thermiquement à 700 °C. Cependant, l'élimination n'est pas complète. En effet, bien que l'intensité des bandes à 1416 et 1338 cm<sup>-1</sup>, assignées à l'élongation de la liaison N-O de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, soit fortement réduite sur le spectre de l'échantillon traité en température, deux signaux décalés à 1444 et 1373 cm<sup>-1</sup>, mais toujours apparentés aux nitrates, subsistent. La même observation est faite sur la bande à 820 cm<sup>-1</sup>, attribuée à la déformation hors du plan de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, qui est réduite et décalée à 842 cm<sup>-1</sup> sur les matériaux traités thermiquement. Les décalages de bandes sont dus à des modifications de l'environnement chimique des nitrates en raison notamment de l'élimination du polymère, de la condensation du réseau de verre ou de l'entrée potentielle des ions dans ce réseau. Il est en effet intéressant de noter l'apparition d'un signal à 926 cm<sup>-1</sup> sur le spectre infrarouge des matériaux traités en température, assigné à l'élongation de la liaison entre un atome de silicium et un atome d'oxygène non pontant de type Si-O-Métal. Celle-ci suggère qu'une partie des ions métalliques a pu s'insérer dans le réseau de verre lors du traitement.

L'analyse en diffraction des rayons X (Figure II-8) permet également d'appuyer l'hypothèse de la présence résiduelle des nitrates puisque des pics de faible intensité, notamment celui à  $29,92^\circ 2\theta$ , correspondent à la phase de nitronatrite  $\text{NaNO}_3$  (PDF #01-085-0850). Ainsi, il conviendrait d'augmenter la température du traitement thermique pour décomposer totalement les nitrates. Les autres phases majoritaires détectées en DRX sont associées au substrat de TA6V : Ti (PDF #01-089-5009) et  $\text{TiO}_2$  (PDF #01-087-0710). Pour ces deux phases, des orientations cristallines préférentielles sont envisagées. En particulier, la forte intensité du pic à  $63,75^\circ 2\theta$ , attribué au titane, peut s'expliquer par une orientation préférentielle de cette phase, comme rapporté précédemment dans la littérature [178].



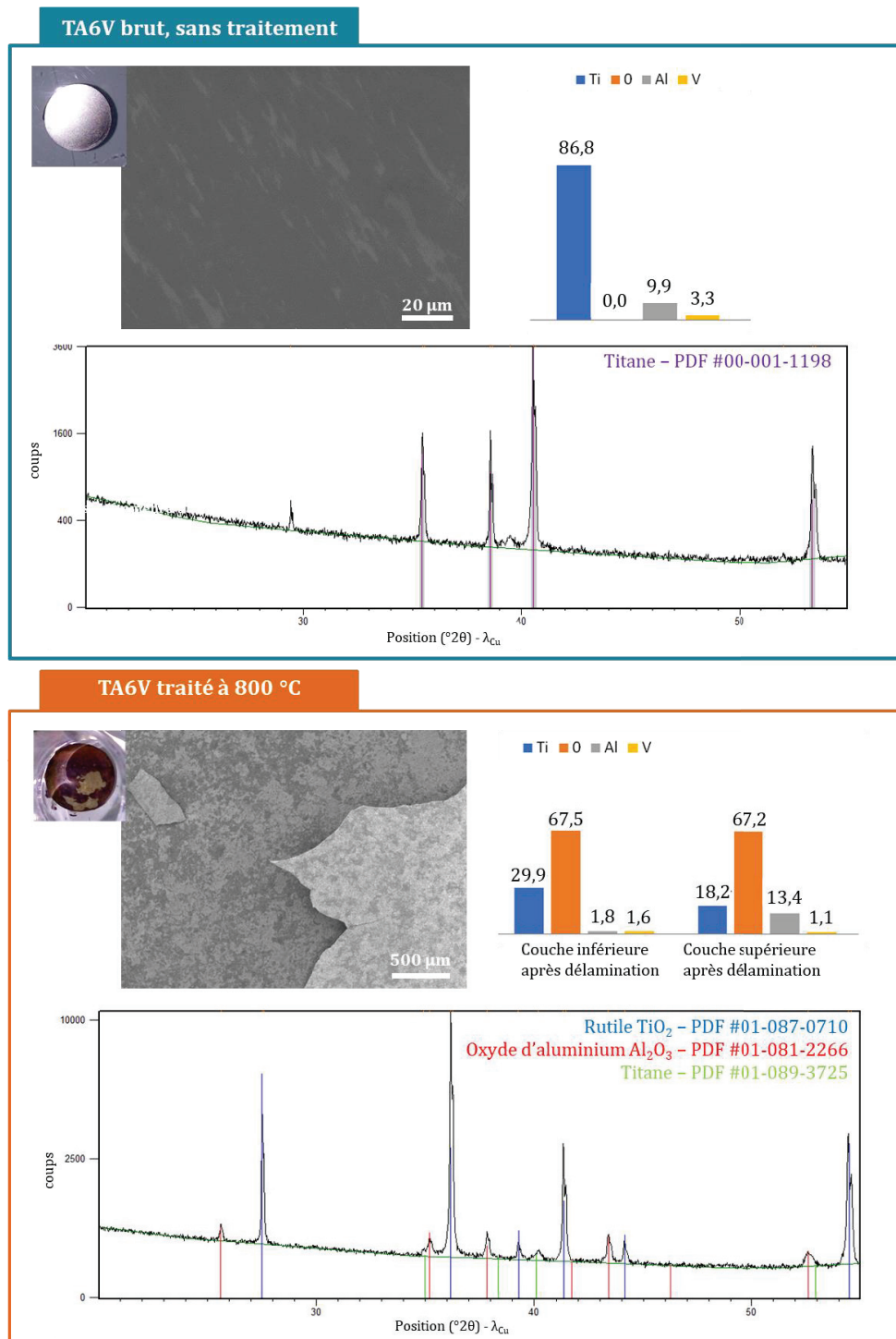
**Figure II-8.** A) Diffractogramme du système 45S5 après traitement thermique à 700 °C et B) Attribution des signaux majoritaires

Par ailleurs, l'analyse par EDS réalisée sur l'échantillon donne des rapports molaires moyens Si/Ca de 2,3 et Si/Na de 2,0 alors que les rapports attendus sont de 1,7 et 0,9, respectivement. L'hypothèse faite que la cristallisation du  $\text{NaNO}_3$  entraîne le détritage en sodium des filaments lors du traitement thermique est soutenue par ces résultats. Le phosphore n'est quant à lui pas détecté, et ce résultat sera traité ultérieurement dans le Chapitre III.

### 1.3.3. Comportement du substrat à 800 °C

Avec pour objectif d'éliminer totalement les espèces nitrates des matériaux finaux, un nouvel essai de traitement thermique a été réalisé à 800 °C. Cependant, si elle peut permettre

l'élimination des nitrates, une telle température entraîne l'altération du substrat de TA6V. En effet, ce dernier s'oxyde : l'analyse EDS réalisée sur le substrat seul traité à 800 °C fait apparaître une grande quantité d'oxygène (Figure II-9). Par ailleurs, une analyse DRX réalisée sur le substrat seul et traité en température fait apparaître des phases cristallines de  $\text{TiO}_2$  (rutile, PDF #01-087-0710) et de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (PDF #01-081-2266) résultantes de l'oxydation (Figure II-9).



**Figure II-9.** Analyse des substrats de TA6V - avant et après traitement thermique à 800 °C - par photographie macroscopique, MEB, EDS (valeurs en % atomique) et DRX. Les positions des pics renseignées dans les fiches PDF utilisées pour l'identification des phases sont indiquées en couleurs sous les courbes expérimentales

Cette oxydation non négligeable entraîne même la délamination de la couche d'oxyde apparue à la surface des substrats (Figure II-9), à l'origine du décollement des filaments de la surface des pastilles de TA6V (Figure II-10).



**Figure II-10.** Photographie macroscopique d'un échantillon présentant la délamination des filaments déposés à la surface de TA6V (1 cm de diamètre) après traitement thermique à 800 °C

#### **1.4. AMELIORATION DE L'ADHERENCE DES REVETEMENTS PAR AJOUT D'UNE SOUS-COUCHE D'ACCROCHE**

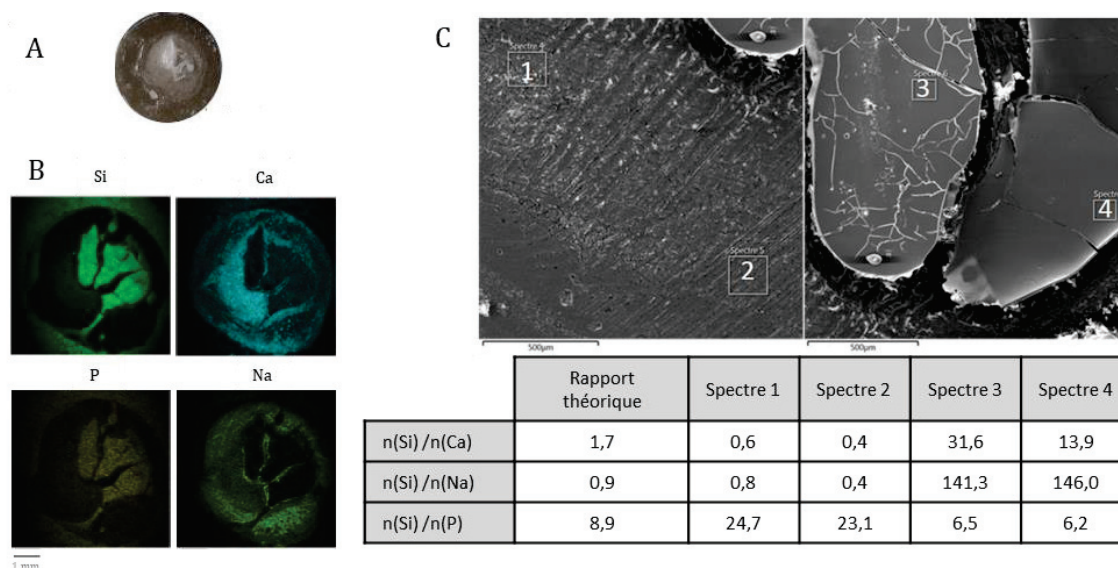
Afin de limiter les phénomènes de retrait surfacique, de mauvaise adhésion et de fissuration cités dans la partie précédente, il a été envisagé de déposer une sous-couche d'accroche sur le TA6V avant le dépôt des filaments. Cette dernière devrait permettre d'améliorer le contact entre le revêtement fibreux et le substrat et par conséquent l'adhésion du revêtement. Le fait que la sous-couche d'accroche soit encore solvatée lors de l'électrofilage laisse penser qu'elle sera capable d'« emprisonner » les premiers filaments déposés et ainsi de les maintenir en place pour favoriser l'accroche du mat sur le substrat.

Le choix du procédé de dépôt s'est porté sur la technique d'enduction centrifuge, présentée en Annexe 2 et qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapportée pour la réalisation de revêtements de 45S5. Ce procédé, qui présente l'avantage d'être très simple à mettre en place, permet également, si le protocole est adapté, la préparation de films solvatés. La sous-couche est préparée avec la même solution que celle utilisée pour l'électrofilage, afin que ces deux dépôts successifs (homogène et fibreux) présentent un retrait surfacique similaire.

##### **1.4.1. Optimisation de la sous-couche d'accroche**

Ce travail d'optimisation a été en partie réalisé par Emilie Belot durant son projet de recherche de master 1 (Master Nanoscale Engineering, Université de Lyon) et a consisté dans un premier temps à supprimer le polymère dans le système sol-gel et à concentrer davantage la solution de départ. En effet, la présence de PVA, qui est éliminé lors du traitement thermique, accentue le retrait volumique du matériau et peut favoriser l'apparition de fissures. Or ce polymère n'est pas nécessaire à la mise en forme par enduction centrifuge. Ainsi, la solution à déposer est préparée dans les mêmes conditions expérimentales et stœchiométriques que la solution utilisée précédemment pour l'électrofilage (Figure II-1), sans ajout de solution polymère et avec une concentration finale en élément silicium de 1,76 M. Après dépôt par enduction centrifuge (650 tr/min, 30 secondes), le film démouille la surface du substrat et forme un îlot central épais (Figure II-11.A). L'apparition de fissures et la délamination du revêtement sont constatés dès le séchage à température ambiante. Une analyse EDS (Figure II-11.B) montre une séparation de

phase, avec la présence de zones riches en silicium et phosphore (les plus épaisses) et d'autres riches en calcium et sodium (les plus fines). La variabilité des rapports atomiques expérimentaux selon la zone analysée confirme l'inhomogénéité chimique du film (Figure II-11.C).



**Figure II-11.** A) Image macroscopique du revêtement déposé par enduction centrifuge, sans traitement thermique ; B) Cartographie EDS de la surface de la pastille et C) imagerie et analyse EDS de zones localisées de la surface, sur des parties fines (1 et 2) et épaisses (3 et 4)

De nombreux tests d'optimisation ont donc été entrepris en vue d'améliorer l'homogénéité chimique et morphologique du dépôt. Dans un souci de clarté, seules les optimisations les plus pertinentes sont présentées ici.

Tout d'abord, les intervalles de temps entre l'ajout des trois derniers précurseurs ont été réduits à 15 minutes, avec pour objectif d'intégrer les précurseurs de phosphore, sodium et calcium au réseau de silice dès le début de sa formation et ainsi conduire à une meilleure homogénéité à l'échelle atomique. Une durée d'hydrolyse du TEOS de 1 heure a été conservée pour garantir la formation d'un sol monophasique.

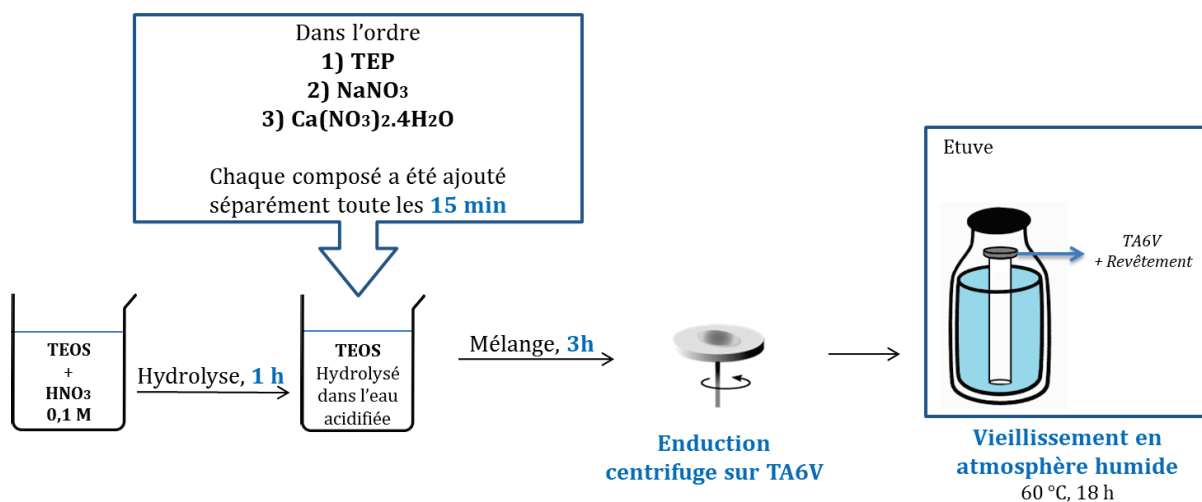
Par ailleurs, dans la synthèse initiale, les revêtements sont vieillis 18 heures à 60 °C pour permettre la réticulation du réseau de silice et l'évaporation de l'eau servant de solvant. Il a été envisagé que la fissuration du revêtement déposé par enduction centrifuge pouvait être liée à l'évaporation trop rapide du solvant (présent en quantité importante), induisant ainsi un retrait important et inhomogène du matériau. Pour conserver la composition choisie et ne pas avoir à modifier le type de solvant, la vitesse de séchage du film semble être le paramètre principal à contrôler [179]. Dans les premières étapes du séchage, les conditions extérieures, et plus particulièrement la température et l'humidité, contrôlent l'apparition de fissures. F. Boulogne *et al.* ont montré l'intérêt d'un fort taux d'humidité lors du séchage d'un revêtement de silice [180] : un matériau non fissuré a pu être obtenu pour une humidité relative de 95 %. Ceci s'explique par une évaporation lente de l'eau, et donc des contraintes faibles dans le revêtement lors du séchage. Procéder au vieillissement à un taux d'humidité très important assure également une bonne mobilité des espèces durant la réticulation, hypothèse émise pour obtenir un réseau de verre homogène. D'un point de vue expérimental, pour créer cette atmosphère saturée en humidité, les pastilles revêtues sont placées dans des bouteilles en verre fermées



contenant de l'eau, et ce durant toute la durée du vieillissement. Le tout est refroidi lentement avant de dévisser les bouchons des flacons. L'humidité peut alors diminuer lentement, et le revêtement sèche en conséquence. Les bouchons sont complètement retirés une heure après refroidissement.

De plus, afin de réduire la détérioration du revêtement, une couche plus fine est appliquée en augmentant la vitesse rotationnelle durant l'enduction centrifuge. Enfin, les pastilles sont traitées par plasma atmosphérique avant le dépôt par enduction, afin de nettoyer la surface et favoriser l'accroche des revêtements.

Ainsi, le protocole résultant de ces optimisations est schématisé sur la Figure II-12. Le TEOS est hydrolysé 1 heure dans une solution aqueuse d'acide nitrique à 0,1 M ( $[\text{Si}] = 1,8 \text{ M}$ ). Le TEP est ajouté dans le sol de silicium, puis le nitrate de sodium et le nitrate de calcium sont introduits dans la solution 15 min après l'ajout de TEP et de  $\text{NaNO}_3$ , respectivement. Les quantités de chaque précurseur satisfont la composition du verre 45S5, sachant que la concentration finale en élément silicium est  $[\text{Si}] = 1,76 \text{ M}$ . Le sol est agité pendant 3 heures avant d'être déposé sur la pastille de TA6V précédemment traitée par plasma atmosphérique. Pour l'enduction centrifuge, deux gouttes de sol sont déposées sur les substrats et les paramètres suivants sont appliqués : 500 tr/min pendant 2 secondes puis 1000 tr/min pendant 30 secondes. Puis, deux autres gouttes sont de nouveau déposées et les pastilles sont mises en rotation à 500 tr/min pendant 2 secondes puis 2000 tr/min pendant 30 secondes pour obtenir une couche d'accroche fine. Les échantillons sont ensuite vieillis à 60 °C pendant 18 heures dans une atmosphère humide précédemment décrite.



**Figure II-12.** Schéma du protocole de synthèse et d'enduction centrifuge optimisé pour le dépôt sur pastilles de TA6V du système 45S5 à base de précurseurs nitrate

Les résultats montrent une nette réduction de la quantité et de la taille des fissures après vieillissement (Figure II-13.A) et traitement à 800 °C (Figure II-13.B). De plus, les cartographies EDS dans ce système le plus abouti montrent que le traitement thermique permet de diminuer très fortement les séparations de phases observées avant traitement.

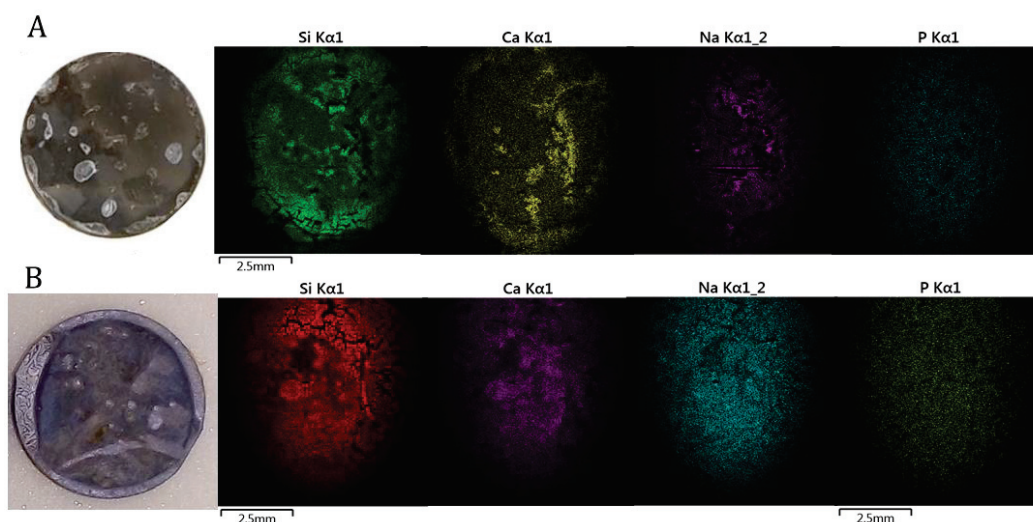


Figure II-13. Photographie macroscopique et cartographie EDS des revêtements optimisés avant et après traitement thermique (pastilles de 1 cm de diamètre)

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$  peuvent en effet entrer dans le réseau du verre et former des liaisons Si-O-Metal, comme suggéré précédemment par l'analyse infrarouge des filaments (Figure II-7). Dans le cas du verre 70 %  $\text{SiO}_2$ -30 % CaO (en pourcentages molaires) par exemple, les ions calcium n'entrent dans le réseau que lorsque ce dernier est traité à des températures supérieures à 400 °C [181,182]. Cependant, la diffusion des ions est limitée lors du traitement thermique [183], d'où l'intérêt de limiter la séparation de phase en amont de ce dernier, afin d'obtenir un revêtement final homogène. De plus, il est important de noter que l'élément phosphore est difficilement détecté dans ces matériaux.

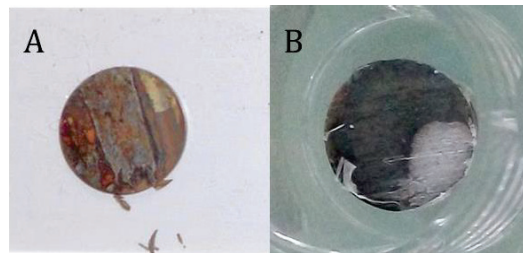
Même si le démouillage est limité et que la distribution en espèces chimiques est plus homogène après optimisation du protocole de synthèse et de dépôt, l'enduction centrifuge du sol à base de précurseurs de nitrates reste difficile et peu reproductible.

#### 1.4.2. Revêtements obtenus par électrofilage sur la sous-couche d'accroche

Bien que la composition chimique et l'homogénéité de la sous-couche d'accroche ne soit pas optimales, cette dernière a tout de même été utilisée pour préparer des revêtements mixtes (sous-couche d'accroche + filaments). La solution électrofilable est préparée par mélange de la solution d'enduction centrifuge (cf. protocole partie 1.4.1.) avec une solution de PVA, de façon à obtenir des concentrations finales de  $[\text{PVA}] = 7 \text{ \%}_{\text{masse/vol}}$  et  $[\text{Si}] = 1,00 \text{ M}$ . Les pastilles de TA6V enduites par la sous-couche d'accroche sont fixées sur le collecteur rotatif (cf. Techniques Expérimentales, 2.), et le dépôt de filaments par électrofilage est réalisé directement sur les sous-couches encore humides (0,30 mL/h, 10 kV, 8 cm).

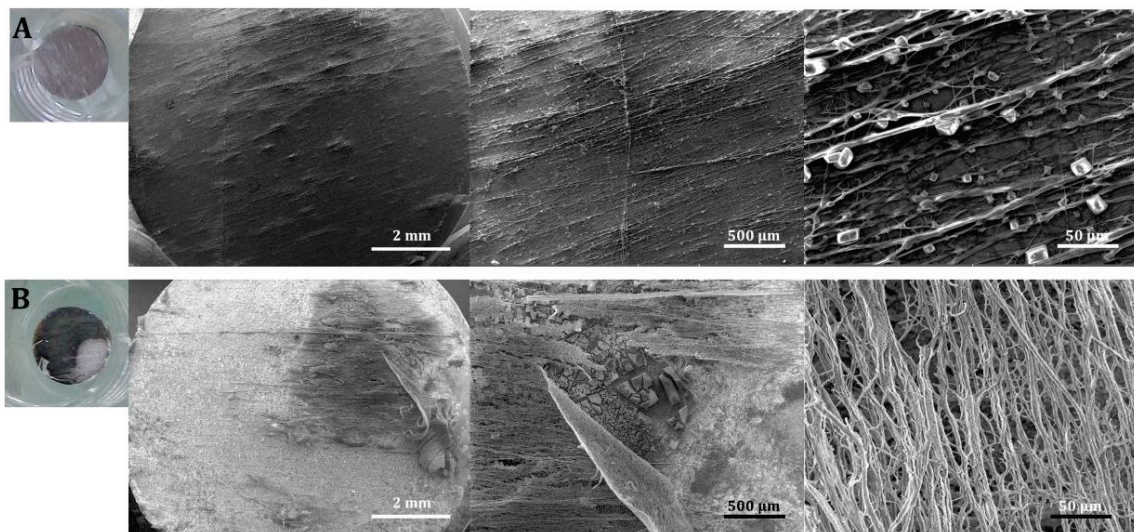
L'observation MEB des échantillons montre que l'ajout d'une sous-couche d'accroche permet de limiter l'oxydation du substrat lors du traitement thermique (Figure II-14). En effet, la comparaison des revêtements avec et sans sous-couche montre une diminution notable des zones oxydées et une limitation importante de la délamination. Ce résultat est en accord avec la littérature qui rapporte que l'ajout d'une couche sol-gel d'oxyde par enduction centrifuge,

trempage ou déposition électrolytique, permet de limiter la corrosion de substrats de titane [184].



**Figure II-14.** Photographies macroscopique des revêtements composés des filaments électrofilés A) sans et B) avec une sous-couche d'accroche par enduction centrifuge (pastilles de 1 cm de diamètre), après traitement à 800 °C

Une répartition non homogène du revêtement, et principalement de la sous-couche, est cependant constatée (Figure II-14.B et Figure II-15.B). Un démouillage de la sous-couche localisé sur un côté de la pastille est causé par la rotation du collecteur qui entraîne la couche solvatée lors du dépôt fibreux. Le revêtement contient donc une zone localisée plus épaisse, qui tend à délaminer sous l'effet du traitement thermique (Figure II-15.B).



**Figure II-15.** Images MEB des revêtements mixtes (sous-couche d'accroche + filaments). A) avant et B) après traitement thermique à 800 °C

Les revêtements mixtes présentent donc une meilleure adhérence dans les zones fines de la sous-couche et les filaments traités thermiquement conservent une géométrie fibreuse. Cependant, des phénomènes de délamination subsistent dans les zones épaisses, qui résultent d'un démouillage lors de l'électrofilage.

D'un point de vue général, l'optimisation du protocole de préparation des revêtements à partir de précurseurs nitrate ne permet pas d'atteindre une homogénéité de composition chimique satisfaisante.

## 2. VERS UN SYSTEME SANS NITRATES

La première partie de ce chapitre a mis en évidence les difficultés liées à l'utilisation de systèmes à base de précurseurs nitrate pour la fabrication d'un revêtement fibreux de 45S5 par électrofilage. Nous nous sommes alors naturellement tournés vers l'étude d'autres familles de précurseurs.

### 2.1. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le Tableau II-1 présente les compositions chimiques des nouveaux sols préparés avec des précurseurs autres que les nitrates : les chlorures, méthanolates et acétates.

	CHLORURE	METHANOLATE $n(H_2O)/n(TEOS) = 2$	METHANOLATE $n(H_2O)/n(TEOS) = 4$	ACETATE <i>Ajout des sels directement dans le sol</i>	ACETATE <i>Pré-solubilisation des sels avant ajout dans le sol</i>
Précurseur de Si	[TEOS] = 1,76 M				[TEOS] = 0,93 M
Catalyseur acide <i>De façon à avoir <math>pH_{exp} \approx 2</math></i>	[HCl] = 0,03 M	[CH <sub>3</sub> COOH] = 0,30 M			
Eau	[H <sub>2</sub> O] = 31,7 M	[H <sub>2</sub> O] = 3,5 M	[H <sub>2</sub> O] = 7,0 M	[H <sub>2</sub> O] = 31,7 M	[H <sub>2</sub> O] = 42,6 M <i>Les acétates de Na et Ca étant solubilisés séparément et en parallèle de l'hydrolyse du TEOS</i>
Précurseur de P	[TEP] = 0,20 M				[TEP] = 0,10 M
Précurseur de Na	[NaCl] = 1,86 M	[CH <sub>3</sub> ONa] = 1,86 M		[CH <sub>3</sub> COONa] = 1,86 M	[CH <sub>3</sub> COONa] = 0,97 M
Précurseur de Ca	[CaCl <sub>2</sub> ] = 1,06 M	[(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> Ca] = 1,06 M		[(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Ca] = 1,06 M	[(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Ca] = 0,55 M
Ethanol		[(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> Ca] = 8,90 M	[(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> Ca] = 7,87 M		

Tableau II-1. Compositions des sols pour le système 45S5 sans précurseurs nitrate

Pour la préparation des différentes solutions, le TEOS est tout d'abord hydrolysé dans une eau acidifiée (pH=2) pendant une heure. Puis, le TEP, le précurseur de sodium, le précurseur de calcium et la solution polymère (le cas échéant) sont successivement ajoutés, en respectant une heure d'intervalle entre chaque ajout. Il peut être ajouté que la durée de mélange optimale de 15 minutes entre les trois derniers précurseurs n'avait pas encore été déterminée, raison pour laquelle un intervalle de temps d'une heure est utilisé ici.

Dans les cas où les solutions sont électrofilées, elles sont, au préalable, mélangées avec un rapport équi-volumique à des solutions polymères. Pour les systèmes à base de chlorures, les sols sont mélangés à une solution de PVA à 10 %<sub>masse/vol</sub> dans l'eau ; la concentration en PVA de la solution filée est alors de 5 %<sub>masse/vol</sub>. Pour les systèmes à base de méthanolates, les sols sont mélangés à une solution de PVP à 10 %<sub>masse/vol</sub> dans l'éthanol. Après mélange, les concentrations en éléments constituant le verre (Si, P, Ca et Na) correspondent aux concentrations utilisées par Deliormanli dans le système nitrates, soit, pour le silicium, [Si]=0,88 M.

## 2.2. PRÉCURSEURS CHLORURE

Les premiers précurseurs utilisés sont de type chlorure. Les ions chlorure présentent l'avantage d'être naturellement présents dans le plasma humain. En concentration raisonnable, un relargage de ces ions sur le site d'implantation n'apparaît donc pas comme problématique. Il ne sera alors pas nécessaire d'éliminer ces ions des revêtements par traitement thermique. La composition du sol à base de chlorures (chlorures de sodium et de calcium et acide chlorhydrique) est renseignée dans le Tableau II-1. Ce sol est ensuite mélangé avec un rapport équivalent à une solution de PVA à 10 %<sub>masse/vol.</sub>

Les expériences d'électrofilage présentent les mêmes limites que dans le cas de l'utilisation de précurseurs nitrate : les filaments se repoussent et ne se déposent pas sur le collecteur. L'utilisation d'un collecteur rotatif ne facilite que difficilement le dépôt des filaments sur l'aluminium. De la même façon, l'application d'une tension négative au collecteur, en vue d'attirer préférentiellement les filaments sur le collecteur plutôt que sur tous les autres éléments environnant le montage, ne présente pas non plus d'amélioration (tension sur le collecteur de -5,35 kV et tension sur l'aiguille de +6,34 kV). Lorsque le champ électrique est coupé, l'électrofilage s'interrompt et les filaments qui se repoussaient ne sont alors plus soumis au champ électrique et retombent par gravité sur le collecteur. De cette façon, des filaments ont pu être collectés et vieillies à 60 °C. Les filaments obtenus, présentés sur la Figure II-16, apparaissent perlés.

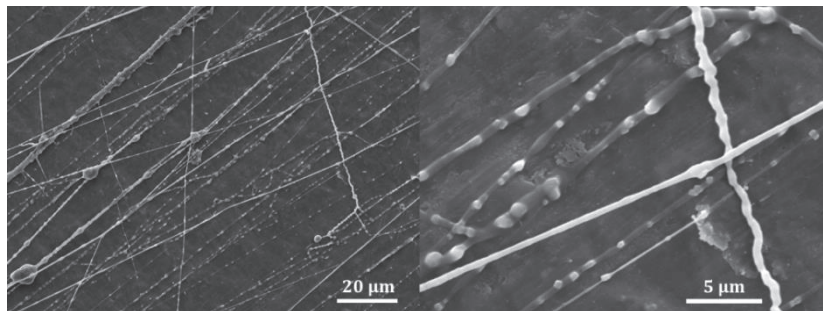


Figure II-16. Images MEB des filaments synthétisés avec des précurseurs de type chlorure sur collecteur rotatif.

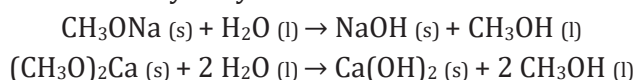
Les analyses EDS réalisées sur les zones inhomogènes montrent une quantité importante en atomes chlore et sodium, laissant donc supposer la présence de NaCl sous forme solide au sein des filaments. Une analyse par DRX aurait permis de valider cette hypothèse mais elle n'a pas pu être réalisée sur ce matériau, obtenu en quantité insuffisante pour ce type d'analyse. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la présence de NaCl au sein des fibres : une dissolution incomplète du sel dans la solution de départ ou la précipitation de ce dernier dans le jet lors de l'électrofilage. L'hypothèse d'une dissolution incomplète semble la moins convaincante. En effet, la solution de départ est homogène avec une concentration en NaCl de 1,86 M, bien inférieure à la limite de solubilité de ce sel dans l'eau (6,13 M à 20 °C). Par ailleurs, la littérature rapporte que les précurseurs minéraux peuvent induire des cristallisations de sels de sodium dans les verres 45S5 sous forme massive, à la fois avec des précurseurs nitrate et des précurseurs chlorure [185]. En conséquence, la cristallisation de sel au sein des filaments entraîne, comme dans le cas de l'utilisation des nitrates, la préparation d'un matériau non homogène et ayant une composition chimique éloignée de celle attendue pour le matériau 45S5.

L'utilisation de précurseurs chlorure ne permet donc pas d'améliorer le système et cette approche n'est pas conservée.

### 2.3. PRÉCURSEURS MÉTHANOLATE

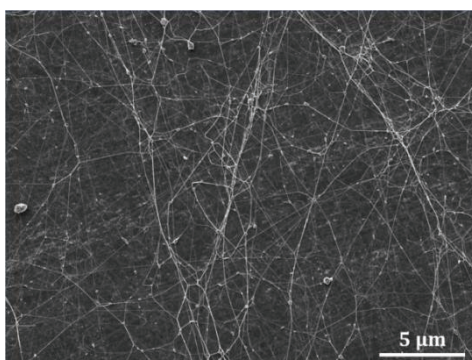
Etant donné que les précurseurs minéraux provoquent la cristallisation de sels de sodium au sein des filaments, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de précurseurs organiques et plus particulièrement sur des précurseurs méthanolate de type Metal-O-CH<sub>3</sub>. Pereira *et al.* suggèrent en effet que ces précurseurs apportent une meilleure homogénéité que les précurseurs nitrate pour la préparation d'un verre CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> [186].

Il est à noter que les méthanolates peuvent conduire, en présence d'eau, à la précipitation d'hydroxydes selon les réactions d'hydrolyses suivantes :



En conséquence, l'éthanol, bon solvant des méthanolates de sodium et de calcium, a été utilisé en remplacement de l'eau comme solvant dans nos solutions. Cependant, puisqu'une quantité minimale d'eau est nécessaire pour hydrolyser le TEOS, deux rapports  $r=n(\text{H}_2\text{O})/n(\text{TEOS})$  ont été testés. Le premier,  $r=4$ , permet de satisfaire les conditions d'hydrolyse stœchiométriques des quatre fonctions alcoxydes du TEOS. Le second,  $r=2$ , permet de limiter l'ajout d'eau, tout en permettant l'hydrolyse complète du TEOS grâce aux molécules d'eau issues de la condensation des fonctions silanols. Les compositions de ces deux systèmes sont données dans le Tableau II-1.

Expérimentalement, l'ajout des précurseurs méthanolate à la solution de TEOS hydrolysé (avec  $r=2$  ou  $r=4$ ) provoque l'apparition d'un précipité accompagnée, dans le cas de  $r=4$ , d'un fort dégagement de chaleur. Ces phénomènes indiquent l'hydrolyse d'au moins une partie des méthanolates de calcium et leur précipitation sous forme d'hydroxydes. Une précipitation de carbonate de calcium peut également se produire *via* la réaction entre l'hydroxyde de calcium et du CO<sub>2</sub> atmosphérique éventuellement dissous en solution. Pour permettre l'électrofilage, le sol a été mélangé à une solution de PVP, qui, contrairement au PVA, présente l'avantage d'être soluble dans l'éthanol. La précipitation précédemment évoquée peut être observée dans les filaments obtenus après électrofilage (Figure II-17).



**Figure II-17.** Images MEB des filaments du système 45S5 synthétisés avec des précurseurs méthanolate avec  $r=2$ . Paramètres de filage : distance aiguille-collecteur fixe = 8 cm, débit = 0,20 mL/h et tension = 4,63 kV

L'utilisation de précurseurs méthanolate semble donc elle aussi incompatible avec la production de filaments électrofilés de 45S5.

## 2.4. PRÉCURSEURS ACÉTATE

Une seconde famille de précurseurs organiques peut être envisagée. Il s'agit des acétates, qui ont déjà été utilisés dans la littérature pour la synthèse de verres quaternaires (de type  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ ) sous forme massive [187–189]. Le Tableau II-1 rassemble les informations relatives à la composition des solutions préparées.

Lorsque les sels d'acétates sont ajoutés sous forme solide directement dans le sol de TEOS-TEP, le système gélifie instantanément dès l'ajout d'acétate de sodium. Afin d'augmenter le temps de gel, les précurseurs de sodium et de calcium sont pré-solubilisés séparément, avant d'être ajoutés dans le sol de TEOS-TEP. Un minimum d'eau a été utilisé pour les pré-hydrolyses afin de diluer au minimum le système final (Tableau II-1, dernière colonne). Les limites de solubilités expérimentales ont été déterminées et utilisées pour l'étape de pré-solubilisation : 355 g/L pour l'acétate de sodium (solubilité théorique de 362 g/L à 0 °C) et 365 g/L pour l'acétate de calcium (solubilité théorique de 400 g/L). Avec ce protocole, le temps de gélification du sol est de 3 heures environ après l'ajout du dernier précurseur, l'acétate de calcium. Cependant, seule une partie du sol gélifie puisque l'on note la présence d'une phase liquide au-dessus du gel formé.

En conséquence, même s'il nécessite une optimisation, le système acétate peut être considéré comme le système le plus prometteur. Il permet premièrement de s'affranchir de l'utilisation de précurseurs minéraux. Par ailleurs, il conduit à un sol homogène et stable durant quelques heures.

## CONCLUSION

Dans ce premier chapitre expérimental, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de revêtements fibreux de verre 45S5 par électrofilage. Une synthèse de la littérature dédiée à l'obtention de mats autosupportés a été reproduite et adaptée pour répondre à notre objectif : le dépôt de filaments sur substrat métallique de TA6V. La littérature rapporte majoritairement l'utilisation de systèmes à base de nitrates de calcium et de sodium et d'acide nitrique. Leur emploi dans nos propres études est à l'origine de nombreuses difficultés rencontrées. En effet, dans le cas du système 45S5, l'électrofilage n'est pas stable car les filaments, présentant des surfaces non homogènes et chargées localement par des cristaux minéraux, se repoussent. Par ailleurs, un traitement thermique à des températures supérieures à 700 °C est indispensable à l'élimination des espèces nitrate, toxiques et non souhaitées pour les applications biomédicales. Ce traitement provoque une oxydation importante du TA6V, impliquant la modification de sa topographie de surface et la délamination du revêtement fibreux déposé à sa surface. De plus, les matériaux obtenus après traitement thermique présentent de forts retraits surfaciques, des phénomènes de fissurations et de faible adhérence au substrat. Notons qu'en parallèle de ces travaux sur le 45S5, nous avons mené une étude sur l'élaboration de revêtements de CaP à partir de précurseurs nitrate, et que ces mêmes limitations ont été constatées. Dans le but d'améliorer ces différents points, l'ajout d'une sous-couche d'accroche déposée par enduction centrifuge avant l'électrofilage a été proposé. Bien que présentant une inhomogénéité dans la distribution des espèces chimiques, cette sous-couche s'est montrée d'intérêt, notamment concernant l'adhérence des filaments et la protection du TA6V contre l'oxydation.

Des systèmes sans nitrates ont donc été envisagés et testés sur la synthèse de verre 45S5. L'utilisation de chlorures mène à des inhomogénéités chimiques au sein du matériau et à des instabilités au filage similaires à celles observées avec les nitrates. Par ailleurs, les systèmes à base de méthanolates sont difficilement exploitables en raison d'une incompatibilité entre le besoin d'eau pour hydrolyser le TEOS et la réactivité de ce solvant en présence de méthanolates, qui provoque une précipitation en solution. C'est pour l'ensemble de ces raisons que les systèmes à base de précurseurs acétate ont été envisagés par la suite. Dans ce dernier cas, des sols relativement homogènes ont pu être préparés en solution aqueuse. Néanmoins, une étude approfondie est nécessaire pour augmenter la durée de gélification du sol et permettre son utilisation par électrofilage. Le chapitre suivant s'intéresse donc à la synthèse et à la caractérisation de systèmes préparés à base de précurseurs de type acétate.





# **Chapitre III**

**ÉLABORATION DE REVETEMENTS ELECTROFILES  
A PARTIR DE SYSTEMES A BASE DE PRECURSEURS  
ACETATE**



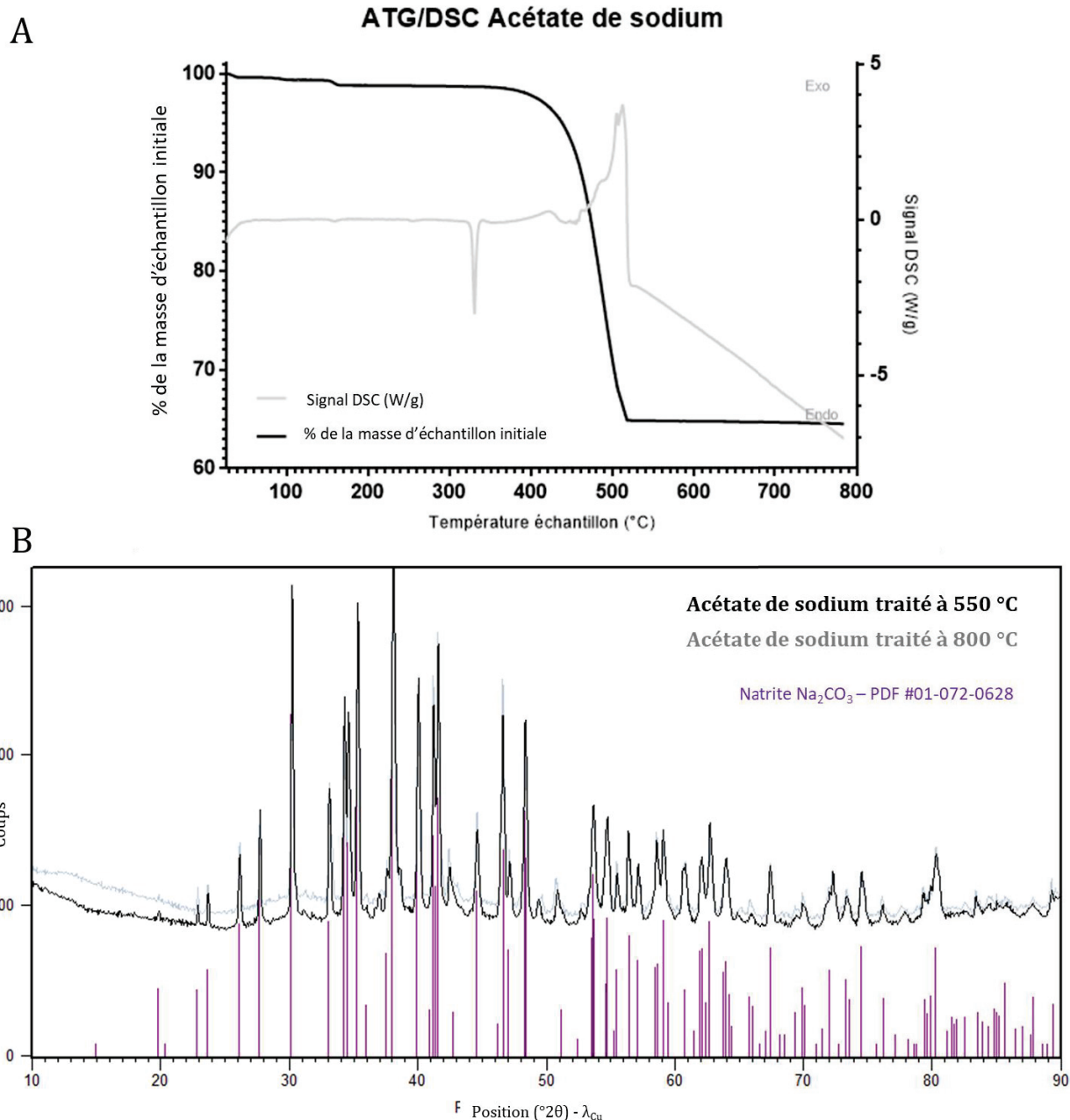
## INTRODUCTION

Ce troisième chapitre est dédié à l'élaboration des revêtements électrofilés de verres 45S5 et de phosphate de calcium à partir de précurseurs acétate. De par leur nature chimique et leur comportement en température, les acétates présentent, en effet, un intérêt certain pour la préparation de revêtements fibreux sur substrat de TA6V. Ces deux points sont détaillés dans la première partie de ce chapitre. La deuxième partie présente le lien entre la chimie sol-gel du verre 45S5 et la préparation de sols électrofilables. En effet, différentes optimisations ont été nécessaires pour obtenir des sols de composition définie et stables à l'échelle des procédés de mise en forme (électrofilage et enduction-centrifuge). La caractérisation chimique des matériaux obtenus est également exposée. Enfin, la troisième partie est consacrée à l'élaboration et à la caractérisation des revêtements de CaP élaborés à partir de précurseurs acétate.

### 1.EVALUATION DE L'INTERET DES FORMULATIONS A BASE DE PRECURSEURS ACETATE

#### 1.1. COMPORTEMENT THERMIQUE DES PRECURSEURS ACETATE

Le traitement thermique de l'acétate de sodium entraîne sa décomposition en carbonate de sodium à partir de 390 °C, selon la réaction :  $2 \text{CH}_3\text{COONa} \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3$ . Cette décomposition apparaît sur l'ATG-DSC du précurseur sous la forme d'un pic exothermique et d'une perte de masse sur une plage de température comprise entre 390 et 520 °C (Figure III-1.A.). Une analyse par DRX (Figure III-1.B) réalisée sur l'acétate de sodium traité thermiquement à 550 °C confirme sa conversion en carbonate de sodium (PDF #01-072-0628). Cette phase est conservée après une élévation de la température jusqu'à 800 °C (Figure III-1.B).

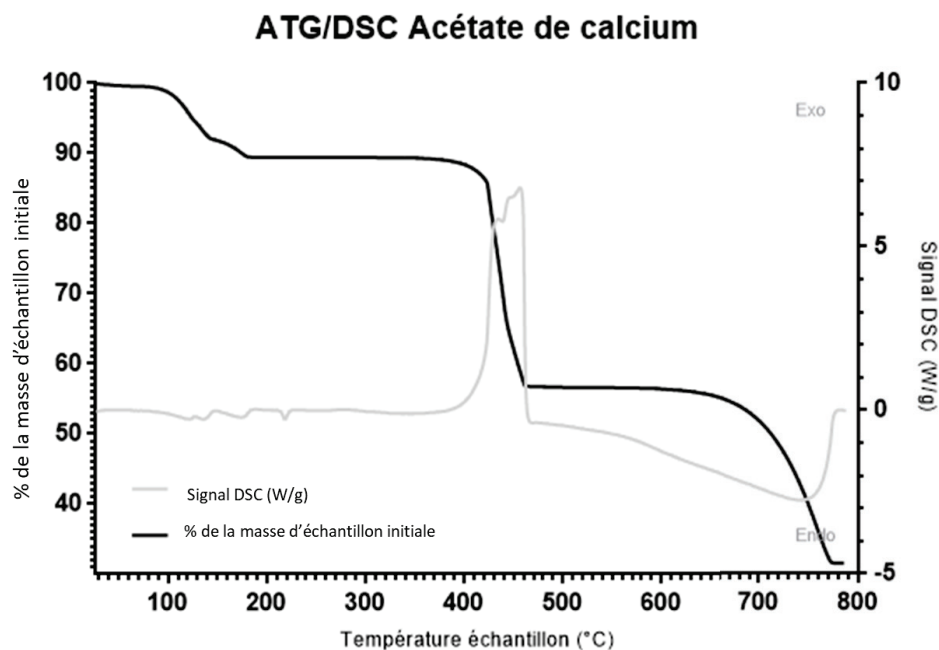


**Figure III-1.** A) Thermogrammes ATG-DSC de l'acétate de sodium entre 30 et 800 °C. Traitement sous air, avec une rampe en température de 5 °C/min. B) Diffractogrammes du composé obtenu après traitement thermique de l'acétate de sodium à 550 et 800 °C

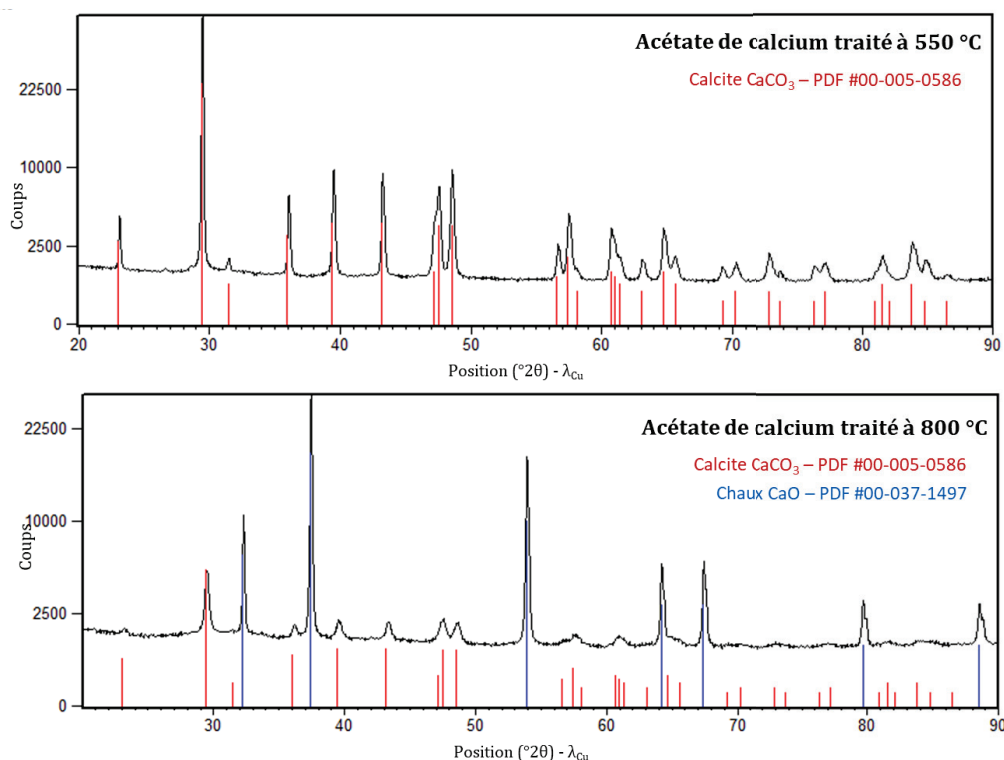
De même, le traitement thermique de l'acétate de calcium fait apparaître une décomposition de l'acétate en carbonate entre 370 et 460 °C, *via* une perte de masse associée à un pic exothermique en ATG-DSC (Figure III-2.A). Cette réaction de décomposition est confirmée par la présence de carbonate de calcium sur le diffractogramme obtenu après traitement du précurseur à 550 °C (Figure III-2.B). L'équation de la réaction est :  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CH}_3\text{COCH}_3$ . A plus hautes températures, les carbonates sont décomposés en oxydes selon la réaction  $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$ . D'après l'ATG-DSC, cette réaction exothermique avec perte de masse se produit entre 600 et 780 °C environ. La présence de chaux CaO est en effet mise en évidence sur le diffractogramme enregistré sur la poudre de précurseur traitée à 800 °C (Figure III-2.B). Toutefois, la réaction de décomposition n'est pas totale à 800 °C puisque le

diffractogramme présente un mélange des deux composés : le carbonate de calcium, minoritaire, et l'oxyde de calcium, majoritaire.

A



B



**Figure III-2.** A) Thermogrammes ATG/DSC de l'acétate de calcium entre 30 et 800 °C. Traitement sous air, avec une rampe en température de 5 °C/min. b) Diffractogrammes du composé obtenu après traitement thermique de l'acétate de calcium à 550 et 800 °C

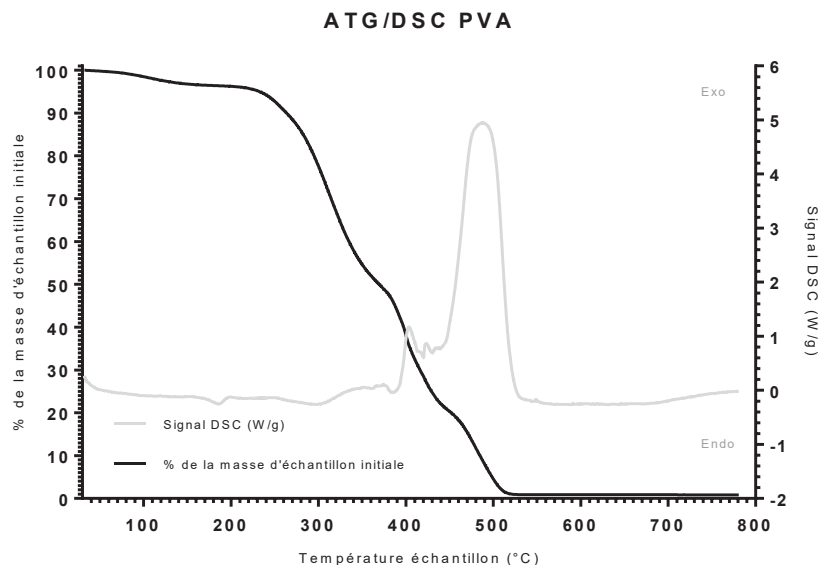
Ces analyses montrent qu'une température minimale de 520 °C est donc nécessaire à la conversion des acétates en carbonates. Il est à noter que cette conversion est recherchée pour répondre au mieux à l'application envisagée. En effet, la présence d'espèces acétate résiduelles,

au caractère basique, entrainerait une variation de pH dans le milieu de culture ou sur le site d'implantation lors de sa dissolution. Au contraire, les carbonates de calcium présentent une bonne biocompatibilité [190,191]. Ils sont en effet étudiés pour des applications en régénération osseuse [19,192–194]. De plus, l'hydroxyapatite qui entre dans la composition de l'os humain est naturellement carbonatée, et la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée intervient dans les mécanismes de bioactivité des verres [56] et des CaP [124]. En revanche, le traitement thermique ne doit pas entrainer la formation d'oxyde de calcium CaO. Comme évoqué dans le chapitre bibliographique, ce composé présente un effet cytotoxique indirect sur les cellules, *via* une augmentation de pH [195,196]. Un traitement thermique des matériaux à une température comprise entre 520 et 620 °C semble, par conséquent, un bon compromis pour éliminer les acétates sans produire d'oxydes.

## 1.2. COMPORTEMENT THERMIQUE DU PVA

Les précurseurs d'acétates de sodium et de calcium étant solubles dans l'eau, les systèmes 45S5 et CaP peuvent être formulés en solution aqueuse. L'alcool polyvinylique, soluble dans l'eau, reste donc bien adapté à ces systèmes.

Dans le but d'obtenir des filaments 100 % inorganiques, l'alcool polyvinylique contenu dans les filaments doit être totalement éliminé par traitement thermique. La dégradation thermique du PVA se déroule en deux étapes, dominées respectivement par des réactions d'élimination (groupements hydroxyle et acétate du PVA) et des réactions de scissions de chaînes [197]. Expérimentalement, ces deux étapes sont observées sur le signal DSC du PVA sous forme de pics exothermiques dont les maximums respectifs sont situés à 400 et 490 °C (Figure III-3).



**Figure III-3.** Thermogrammes ATG-DSC de l'alcool polyvinylique PVA entre 30 et 800 °C. Traitement sous air, avec une rampe en température de 5 °C/min.

Le thermogramme indique également que le PVA est totalement décomposé à 540 °C, température correspondant à la fin de la perte de masse en ATG. Cette température est donc

compatible avec celle nécessaire à la conversion des acétates en carbonates, tout en évitant la formation de CaO.

### 1.3. COMPORTEMENT DU TA6V A 550 °C

Le dernier paramètre à prendre en considération dans la détermination de la température idéale du traitement thermique des biomatériaux est le comportement du substrat en température sous air. Le phénomène d'oxydation du TA6V étant proportionnel à sa température de traitement, nous avons choisi une température minimale sur la plage 540-620 °C, à savoir 550 °C. Après traitement thermique à 550 °C, une coloration bleue de la pastille est observée macroscopiquement en raison de la croissance de la couche d'oxyde de titane  $TiO_2$  (Figure III-4). Son épaisseur est cependant suffisamment faible pour ne pas induire de délamination. En effet, une couleur bleue sombre correspond à une couche d'épaisseur approximative de 35 nm [198]. Aucune délamination de couche d'oxyde n'a d'ailleurs été observée à l'œil nu ou par microscopie électronique à balayage (Figure III-4).

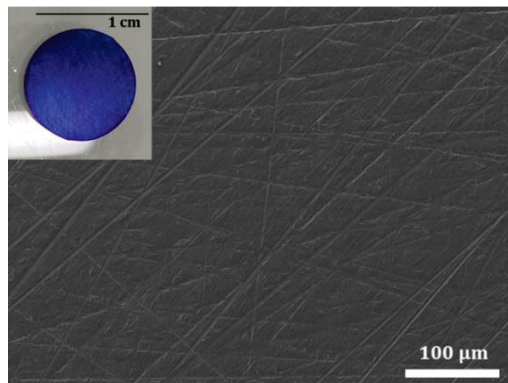


Figure III-4. Image MEB du substrat de TA6V après traitement thermique à 550 °C et photo macroscopique en encart

### 1.4. CONCLUSION

Les précurseurs acétate semblent adaptés à la préparation de solutions sol-gel qui seront utilisées pour réaliser des revêtements fibreux de bioverre ou de CaP. La température de 550 °C en particulier permet de décomposer le polymère et de convertir les précurseurs acétate en composés carbonatés. Cette température est de plus suffisamment faible pour éviter la formation de CaO ou une oxydation trop importante du substrat de TA6V.



## 2.SYSTEME VERRE BIOACTIF 45S5

### 2.1.FORMULATION D'UN SOL DE COMPOSITION DEFINIE ET STABLE A L'ECHELLE DU PROCEDE DE MISE EN FORME

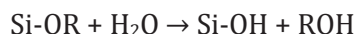
Les premiers essais sur le système acétate ont été présentés en fin du Chapitre II. Bien que ce type de système soit prometteur d'un point de vue composition chimique et comportement thermique, l'inhomogénéité du sol et son évolution rapide restent problématiques pour sa mise en forme par enduction centrifuge ou par électrofilage. Une étude de la composition du sol a donc été entreprise, afin de rendre compatible sa durée de stabilité et le temps nécessaire à sa mise en forme, en considérant la production reproductible de plusieurs dizaines d'échantillons à la suite.

#### 2.1.1. Importance du ratio TEOS : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH

- *La catalyse par l'acide acétique*

Au cours de la synthèse sol-gel, un alcoxyde métallique est hydrolysé et condensé pour former une suspension colloïdale appelée sol. Dans le cas particulier de la synthèse d'un verre de silice, des alcoxydes de silicium Si(OR)<sub>4</sub> sont hydrolysés et condensés suivant les réactions suivantes :

*Hydrolyse*



*Condensation*



Les vitesses relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation des alcoxydes de silicium sont fortement dépendantes du pH de la solution. Elles peuvent donc être modulées par l'ajout de catalyseurs acides ou basiques. La Figure III-5 schématise les vitesses relatives des étapes d'hydrolyse et de condensation d'un alcoxysilane en fonction du pH de la solution.

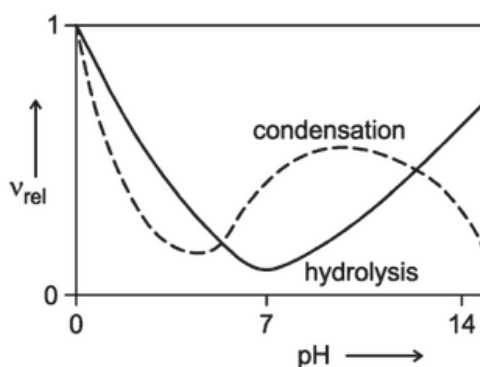


Figure III-5. Vitesses relatives des réactions d'hydrolyse et de condensation des alcoxysilanes Si(OR)<sub>4</sub> en fonction du pH en solution. Reproduit de [199]

En milieu acide, l'hydrolyse est favorisée et la condensation est l'étape limitante [199,200]. Dans ce cas, la croissance du réseau est favorisée et conduit à la formation de chaînes polymériques interconnectées. Au contraire, à pH neutre ou modérément basique, l'hydrolyse est l'étape lente : les espèces hydrolysées sont immédiatement consommées par une rapide condensation. La

nucléation est alors favorisée et conduit à la formation d'un gel colloïdal. Ces colloïdes grossissent et peuvent s'agglomérer et précipiter.

Une répartition non uniforme des particules dans les filaments conduirait à des propriétés chimiques et mécaniques inhomogènes. Il a donc été décidé dans notre cas de privilégier la synthèse d'un gel polymérique, et donc de favoriser l'hydrolyse par rapport à la condensation. La présence de chaînes continues plutôt que de particules discrètes dans les filaments peut également favoriser la conservation de leur morphologie lors de l'élimination du polymère en température.

Lors des premiers tests réalisés avec l'acide acétique, la quantité d'acide a été ajustée pour obtenir un pH proche de 2. Or pour un même pH, le sol à base de nitrates gélifiait beaucoup moins rapidement que celui à base d'acétates. La variation des vitesses d'hydrolyse et de condensation n'est donc pas uniquement dépendante du pH. En fait, contrairement au cas des acides inorganiques tels que  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , la catalyse par l'acide acétique est indépendante du pH. Le mécanisme, initialement proposé par Pope and Mackenzie [201] est présenté sur la Figure III-6.

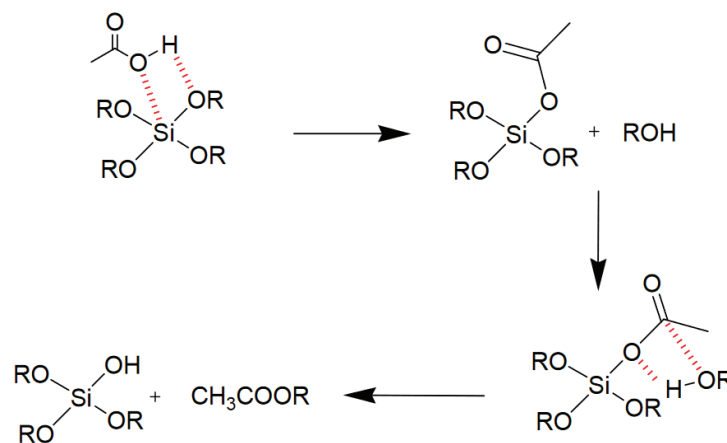
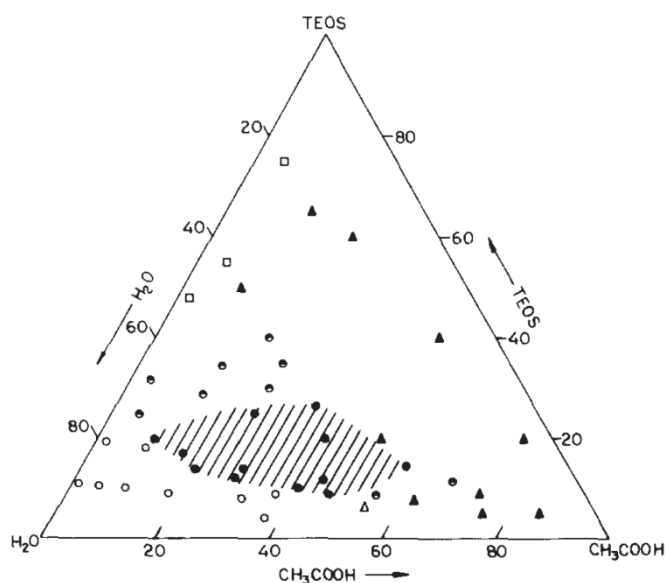


Figure III-6. Mécanisme de catalyse de l'hydrolyse d'alcoxyasilane par l'acide acétique. Reproduit de [202]

Dans ce mécanisme, la réaction de l'acide acétique avec un alcoxyasilane  $\text{Si}(\text{OR})_4$  conduit à la formation d'un intermédiaire d'ester de silyle, qui réagit facilement sur une fonction alcool pour former le silanol  $\text{Si}-\text{OH}$ . Les protons acides ne jouent pas de rôle dans ces mécanismes, rendant la catalyse par l'acide acétique indépendante du pH. Elle est en revanche dépendante de la concentration en acide acétique.

- *Partie expérimentale*

Le système ternaire TEOS-eau-acide acétique a été étudié par Karmakar *et al.* [203]. Le diagramme ternaire issu de leur travail est présenté sur la Figure III-7. En fonction des rapports molaires fixés entre les trois composés, les systèmes dérivés peuvent former des sols homogènes, des mélanges non miscibles ou des précipités.



**Figure III-7.** Diagramme ternaire dans le système TEOS-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>COOH, et observations sur le type de système obtenu : Zone hachurée et ● Particules sphériques, ● Mélange de particules sphériques et de particules irrégulières, ▲ Particules irrégulières, □ Mélange de liquides non miscibles, ○ Sol homogène. Reproduit de [203]

Pour notre étude, nous cherchons des compositions conduisant à la formation de sols homogènes. D'après le diagramme, ces sols sont obtenus pour une concentration de TEOS inférieure à 20 %<sub>mol</sub> et une quantité d'eau minimale d'environ 60 %<sub>mol</sub>. Différents mélanges respectant ces conditions ont donc été préparés. L'homogénéité des sols a été vérifiée macroscopiquement après une heure de réaction. Pour les sols s'avérant homogènes, la synthèse a été poursuivie par ajout des autres précurseurs, en respectant les rapports  $n(\text{Si})/n(\text{P}) = 8,9$ ,  $n(\text{Si})/n(\text{Na}) = 0,9$  et  $n(\text{Si})/n(\text{Ca}) = 1,7$ . Le triéthylphosphate est ajouté directement dans le sol de silicium après une heure d'agitation. Puis, les acétates de sodium et de calcium pré-solubilisés dans l'eau sont introduits dans le sol 15 min après l'ajout de TEP et de CH<sub>3</sub>COONa, respectivement. Les concentrations de pré-hydrolyse sont de  $[\text{CH}_3\text{COONa}] = 4,4 \text{ M}$  et  $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}] = 2,3 \text{ M}$ .

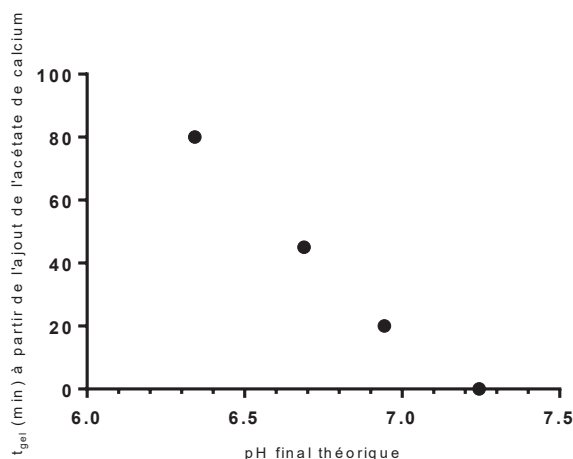
- *Influence du rapport TEOS : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH sur le temps de gel du sol 45S5*

Le temps de gel (noté  $t_{\text{gel}}$ ) a été déterminé à l'œil nu et correspond à la durée qui s'écoule entre l'ajout du dernier précurseur et la gélification (*i.e.* lorsque le système s'oppose à la rotation de l'agitateur magnétique). L'incertitude estimée sur le temps de gel est de quelques minutes ( $\approx 2\text{-}3 \text{ min}$ ). Les observations sur l'évolution des sols des différentes compositions sont rassemblées dans le Tableau III-1.

TEOS : H <sub>2</sub> O : CH <sub>3</sub> COOH (% <sub>molaire</sub> )	pH théorique	Temps de gel à partir de l'ajout d'acétate de calcium (min)
10 : 85 : 5	7,24	0
10 : 80 : 10	6,94	20
10 : 72 : 18	6,69	45
8 : 60 : 32	6,34	80

**Tableau III-1.** Compositions des sols de TEOS entrant dans la synthèse du 45S5 et temps de gel des sols de 45S5

Le temps de gel des sols homogènes de 45S5 dépend des rapports initiaux TEOS : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH. Etant donné que trois paramètres ont été variés simultanément (les concentrations en TEOS, en eau et en acide), l'évolution du temps de gel est tracé en fonction du pH théorique des sols sur le graphique de la Figure III-8. Les pH ont été calculés en prenant en compte l'acide acétique (AH) introduit dans le sol de départ ainsi que les ions acétates (A<sup>-</sup>) apportés par les précurseurs de sodium et de calcium, selon l'équation de Henderson-Hasselbalch :  $\text{pH} = \text{pK}_{\text{aAH/A}^-} + \log ([\text{A}^-]/[\text{AH}])$ .



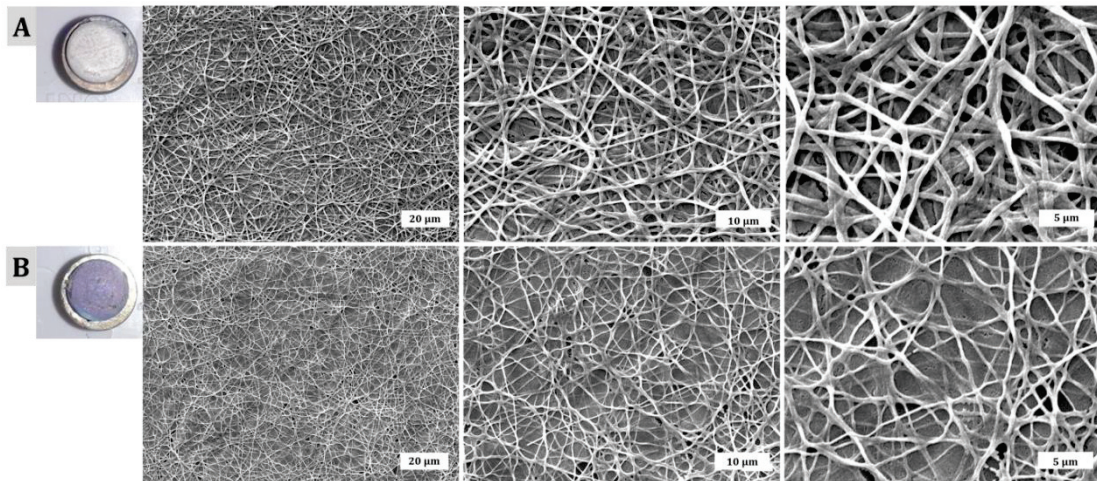
**Figure III-8.** Evolution du temps de gel des sols de 45S5 en fonction du pH théorique des formulations contenant différents rapports TEOS : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH

L'analyse du graphique montre que le temps de gel est fortement dépendant du pH de la solution, comme dans le cas d'une catalyse par un acide fort (cf. Figure III-5) ; et pour les mélanges étudiés, le pH est compris entre 6,3 et 7,3. Une augmentation du pH sur cette plage favorise la réaction de condensation, entraînant de ce fait une diminution du temps de gel. Le temps de gel le plus long est obtenu pour le sol préparé avec des rapports molaires TEOS : Eau : Acide de 8 : 60 : 32. Même si la gélification reste assez rapide (1h20), ce sol a été testé pour la préparation de revêtements lisses par enduction centrifuge et de filaments par électrofilage.

- *Préparation de revêtements fibreux à partir du sol optimisé*

Un quart d'heure après l'ajout du dernier composé (l'acétate de calcium), du PVA à 30 %<sub>mass/vol</sub> dans l'eau a été ajouté au sol optimisé pour obtenir, après mélange, une concentration finale en PVA de 7 %<sub>mass/vol</sub>. Cette solution a été électrofilée (distance de 8 cm, débit de 0,25 mL/h et tension de 6,18 kV). Pour s'affranchir du problème récurrent du manque d'adhérence des filaments au substrat, ce dernier a été préalablement recouvert d'une sous-couche par enduction centrifuge (1600 tr/min pendant 30 secondes) à partir du sol initial (sans PVA).

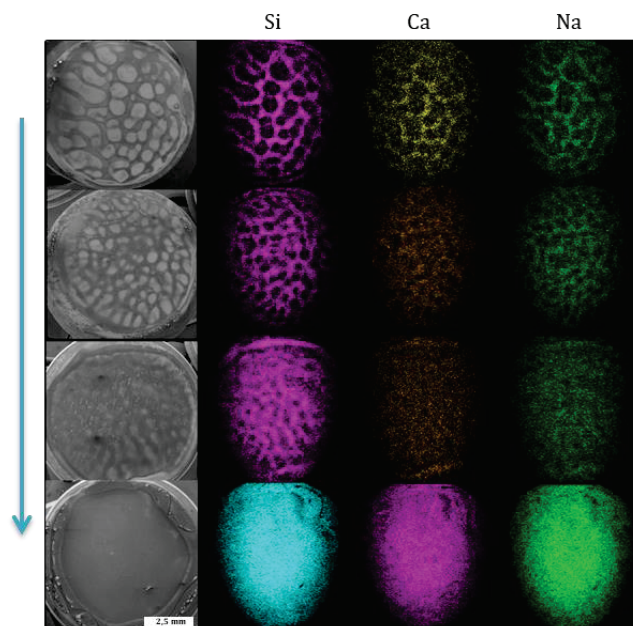
Les images MEB des échantillons avant et après traitement thermique à 550 °C sont présentées sur la Figure III-9. Avant traitement thermique (Figure III-9.A), les filaments apparaissent lisses et homogènes et présentent un diamètre moyen de (0,5 ± 0,1) μm (30 mesures par analyse d'image). Après traitement à 550 °C (Figure III-9.B), les filaments conservent leur morphologie avec un diamètre moyen réduit à (0,28 ± 0,04) μm. Sur cette seconde série d'images, on constate également que les filaments sont bien piégés dans la sous-couche et donc que cette dernière remplit sa fonction.



**Figure III-9.** Images macroscopiques et MEB des dilamets électrofilés déposés sur une sous-couche humide déposée par enduction centrifuge sur du TA6V. Système 45S5 à base de précurseurs acétate, A) avant et B) après traitement thermique à 550 °C

Si ces premiers résultats sont convaincants, il en reste que l'évolution rapide du sol en gel provoque des modifications des propriétés rhéologiques du système qui perturbent l'électrofilage. Ainsi, après plusieurs dizaines de minutes, le jet devient instable, la solution est plus difficilement extrudée et des filaments discontinus sont formés (résultats non montrés ici).

Contrairement à ce qui est constaté en électrofilage, la qualité du revêtement déposé par enduction centrifuge est améliorée avec l'augmentation de la viscosité du sol (Figure III-10). En effet, si le sol est utilisé 15 minutes après l'ajout du dernier précurseur, il démouille la surface de la pastille et induit un recouvrement partiel du substrat. Avec le vieillissement du sol, le revêtement devient plus homogène. Néanmoins, après une durée d'utilisation trop longue, le sol devient trop visqueux et ne peut alors plus être enduit.



**Figure III-10.** Images MEB et cartographies EDS montrant l'évolution de la qualité du revêtement dans le système 45S5 déposé par enduction centrifuge. La flèche représente l'augmentation de l'intervalle de temps entre l'ajout de l'acétate de Ca et le dépôt du revêtement par enduction centrifuge

Ainsi, un revêtement très homogène est obtenu 50 minutes environ après l'ajout du précurseur de calcium. Notons que les éléments de silicium, calcium et sodium sont très uniformément répartis à la surface du substrat, et qu'aucune séparation de phase n'apparaît. Le phosphore n'est cependant pas détecté, et ce point sera abordé dans la partie 2.1.3.

Même si l'utilisation du sol optimisé permet la préparation d'échantillons satisfaisants, l'évolution trop rapide de ses propriétés rhéologiques ne permet pas d'obtenir plusieurs dizaines d'échantillons homogènes à la suite. Des dépôts lisses ou fibreux de bonne qualité ne sont en effet obtenus que sur une plage de temps très restreinte. Les sols de 45S5 doivent donc être stabilisés pour pallier cette limite dans l'élaboration des revêtements.

### 2.1.2. Ajout du GPTMS comme stabilisateur du réseau sol-gel

Classiquement, en chimie sol-gel, l'ajout d'un co-solvant de type alcool permet de diminuer la réactivité du système [203,204]. Cependant, comme cela a été rapporté par Herbert Henstock [205] et ainsi que nous avons pu le constater expérimentalement, le mélange d'éthanol et d'acétate de calcium entraîne – dans nos conditions expérimentales – la formation d'un gel. Cette approche ne peut donc être envisagée ici. Une autre solution consiste à ajouter au sol de référence un précurseur moins réactif. Il pourrait s'agir d'un précurseur de type organoalcoxysilane dont l'un des groupements alcoxydes est remplacé par une fonction organique non hydrolysable. Dans ce sens, l'ajout de GPTMS ((3-Glycidyloxypropyl)triméthoxysilane), dont la structure est présentée sur la Figure III-11, a donc été étudié. La chaîne organique présente sur ce précurseur apporte de plus un encombrement stérique qui limite la réactivité des groupements méthoxy [204].

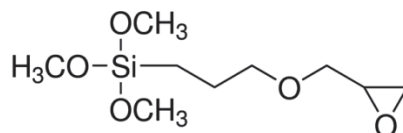
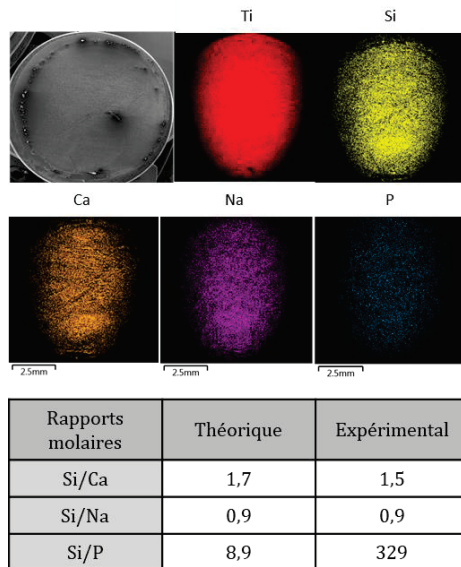


Figure III-11. Molécule de GPTMS (3-Glycidyloxypropyl)triméthoxysilane

Ainsi, un nouvel essai a été réalisé en conservant les rapports Si : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH = 8 : 60 : 32 du sol mais en apportant le silicium sous la forme d'un mélange TEOS : GPTMS en proportion 77 : 23 (%<sub>molaire</sub>). Comme attendu, l'ajout de GPTMS permet d'augmenter la stabilité du sol, puisque la gélification n'est observée qu'après plusieurs jours d'agitation. Le sol est donc stable à l'échelle des deux procédés de mise en forme.

La Figure III-12 propose une image MEB associée à une analyse EDS réalisée sur un revêtement préparé par enduction centrifuge à partir du sol intégrant du GPTMS, puis traité à 550 °C.



**Figure III-12.** Image MEB et cartographies ESD du revêtement lisse à partir du sol de 45S5 dans le système acétate, déposé par enduction centrifuge et traité à 550 °C. Le sol est formulé tel que : Si : H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>COOH = 8 : 60 : 32, TEOS : GPTMS = 77 : 23 (%<sub>molaire</sub>), précurseur de phosphore = TEP

Comme le montre le tableau inséré dans la Figure III-12, la répartition des éléments Si, Ca, Na et P est homogène, et les rapports atomiques expérimentaux Si/Ca et Si/Na sont en accord avec les valeurs attendues. En revanche, une quantité importante de phosphore est perdue dans les revêtements, effet étudié dans le paragraphe suivant.

### 2.1.3. Etude du précurseur de phosphore et de sa réactivité

- *Influence du précurseur de phosphore*

La perte de l'élément phosphore lors du traitement thermique de sol-gel de différents verres a déjà été rapportée dans la littérature, notamment concernant des filaments électrofilés [90]. Des études ont montré que cette perte était dépendante du procédé de synthèse et du choix du précurseur [206,207]. En considérant dans un premier temps le type de précurseur, source de phosphore, deux alternatives à l'utilisation du triéthylphosphate (TEP) ont été envisagées : le triéthylphosphite (TEPI) et le (2-diéthylphosphatoéthyl)triéthoxysilane (DEPETES). Le triéthylphosphite est en effet le précurseur utilisé dans nos systèmes CaP (développés en parallèle du 45S5, cf. partie 3. de ce chapitre) et dont les matériaux dérivés présentent un taux de phosphore attendu. Le DEPETES a quant à lui été choisi en raison de ses trois groupements hydrolysables Si-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Nous pouvons en effet émettre l'hypothèse que si la réactivité des groupements P-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> est limitée dans nos conditions de synthèse, la réactivité des groupements Si-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> permettrait d'intégrer le phosphore dans le réseau de verre directement par la formation de liaisons covalentes Si-O-Si. Notons que dans le cas de l'utilisation du DEPETES, la quantité de GPTMS a été réduite afin de conserver une concentration en silicium équivalente dans tous les systèmes. Enfin, puisque le protocole de synthèse des CaP étudiés en parallèle implique des étapes d'hydrolyse de plusieurs heures en température, il a été décidé d'insérer les précurseurs de phosphore dans le sol de Si soit directement, soit après une pré-hydrolyse dans l'eau pendant 24 h à 37 °C (concentration de pré-hydrolyse [P] = 0,47 M). Afin de ne pas diluer le système dans le cas d'une pré-hydrolyse, le précurseur de sodium a été

solubilisé directement dans la solution du précurseur de phosphore une demi-heure avant ajout dans le sol de silicium.

Pour tester ces nouvelles compositions et les comparer à nos références (avec le TEP) les différents sols obtenus ont été déposés par enduction centrifuge sur des substrats de TA6V, puis les échantillons ont été traités à 550 °C. Les rapports molaires Si/P déterminés par EDS sur les différents revêtements sont rassemblés dans le Tableau III-2.

	TEP		TEPI		DEPETES	
	Ajout direct	Pré-hydrolyse	Ajout direct	Pré-hydrolyse	Ajout direct	Pré-hydrolyse
<b>Rapport Si/P</b> (Théorique: 8,9)	Phosphore non détecté	Phosphore non détecté	Phosphore non détecté	8,9	11,4	9,7

**Tableau III-2.** Détermination du rapport molaire Si/P par cartographie EDS sur des revêtements déposés par enduction centrifuge et traités à 550 °C. Chaque sol-gel est préparé en faisant varier la nature du précurseur de phosphore, en présence ou non d'une pré-hydrolyse

Le phosphore n'est pas détecté lorsque le TEP est utilisé comme précurseur, et ce avec ou sans pré-hydrolyse. Au contraire, la pré-hydrolyse du triéthylphosphite permet de conserver le phosphore dans le rapport attendu (Si/P = 8,9), alors qu'un ajout direct mène à un matériau déficient en phosphore. Enfin, le DEPETES permet de conserver le phosphore au sein du matériau final quelle que soit la méthode d'ajout, même si une pré-hydrolyse du précurseur permet de se rapprocher du taux attendus. Ces résultats confirment la relation entre réactivité du précurseur et sa capacité à être retenu dans le matériau final après traitement thermique. En particulier, la présence de groupements Si-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> dans le DEPETES peut être responsable de la meilleure réactivité avec le réseau de silice, même en l'absence de pré-hydrolyse.

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi de conserver le triéthylphosphite. En effet, le DEPETES entraîne l'apparition rapide d'un trouble en solution, qui peut suggérer une stabilité réduite du sol. De plus, le revêtement à base de TEPI pré-hydrolysé est très homogène et les rapports expérimentaux déterminés par EDS sont en accord avec les rapports molaires introduits lors de la synthèse : Si/Ca<sub>exp</sub>=1,9 (introduit : 1,7), Si/Na<sub>exp</sub>=0,7 (introduit : 0,9) et Si/P<sub>exp</sub>=8,9 (introduit : 8,9). Afin de mieux comprendre la conservation du phosphore dans ce système, le rôle de la pré-hydrolyse a été étudié, à la fois sur le TEP et le TEPI.

- *Etude de l'hydrolyse du TEPI et du TEP*

L'hydrolyse des précurseurs de TEP et de TEPI ([P] = 0,47 M) a été suivie par RMN <sup>1</sup>H et <sup>31</sup>P *in situ* dans le tube RMN chauffé à 37 °C. Cette méthode permet de suivre la réaction en continu sur 48 heures. Notons que pour le TEPI, des spectres ont également été enregistrés à partir de prélèvements faits dans une réaction préparée dans un flacon. De cette façon, il a été possible de confirmer que le protocole *in situ* était représentatif de la réaction se produisant en flacon dans nos conditions de synthèse.



### Hydrolyse du TEP

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  ne présentent pas de différence 30 minutes ou 47 heures après l'ajout de triéthylphosphate dans l'eau (Figure III-13).

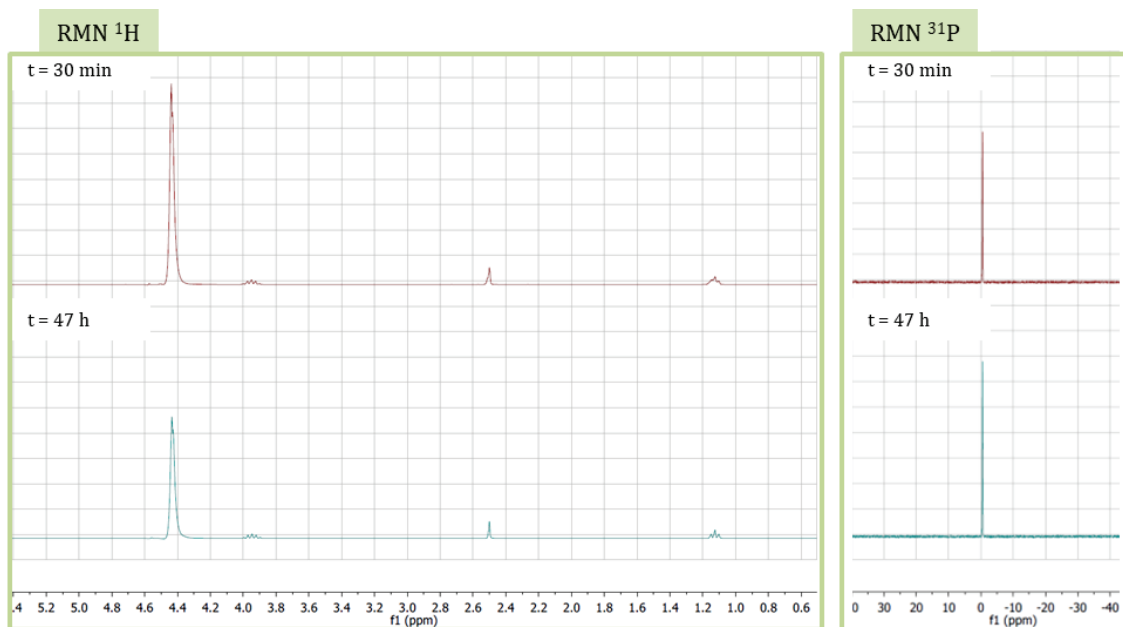


Figure III-13. Spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  du suivi cinétique de la réaction du triéthylphosphate dans l'eau

Les spectres acquis 30 minutes après le mélange sont en effet attribués au TEP (Figure III-14).

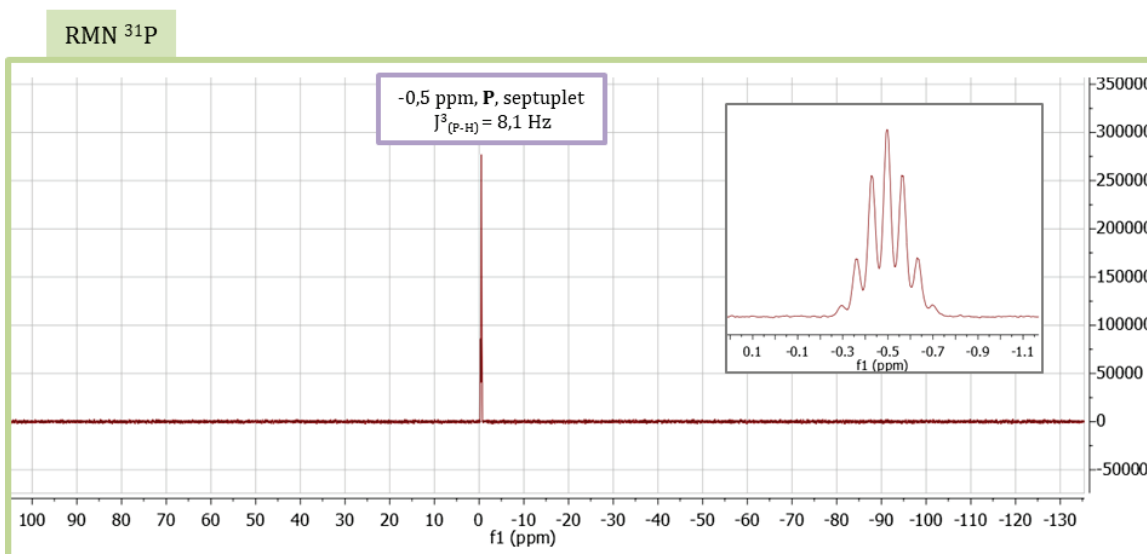
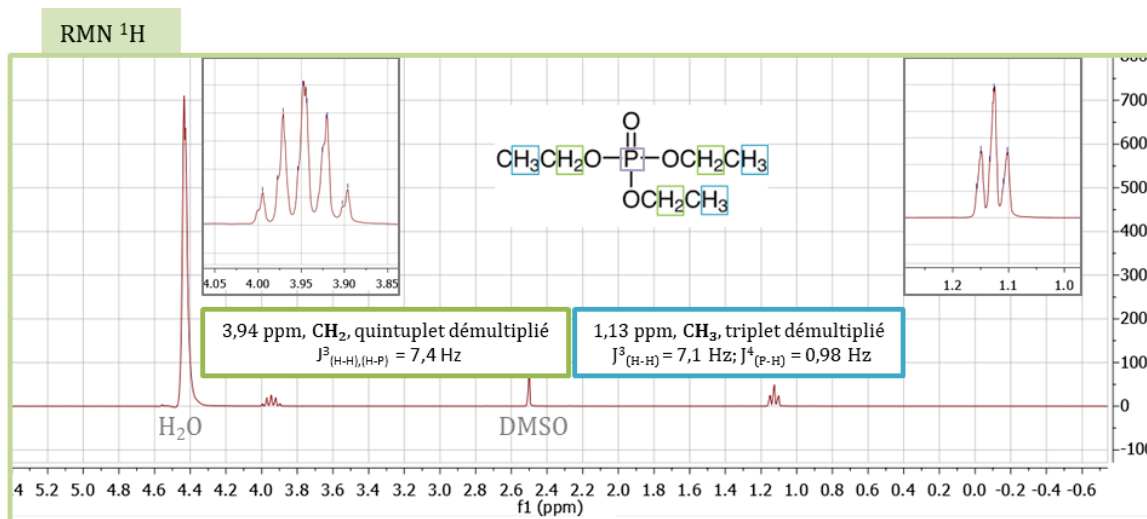


Figure III-14. Attribution des différents signaux dans les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  du mélange TEP dans l'eau

Les protons des  $\text{CH}_3$  apparaissent à 1,13 ppm (triplet démultiplié,  $J^3_{(\text{H-H})}=7,1 \text{ Hz}$  et  $J^4_{(\text{P-H})}=0,98 \text{ Hz}$ ) et les protons des  $\text{CH}_2$  à 3,94 ppm sous forme de quintuplet démultiplié. La forme de quintuplet est due à des constantes de couplage  $J^3_{(\text{H-H})}$  et  $J^3_{(\text{P-H})}$  proches, rendant les voisins H et P équivalents pour les H des  $\text{CH}_2$ . La constante de couplage du quintuplet peut donc être notée  $J^3_{(\text{H-H}),(\text{H-P})} = 7,4 \text{ Hz}$ . Les signaux dus aux  $\text{CH}_2$  et aux  $\text{CH}_3$  montrent également une autre démultiplication de très faible constante, sûrement due au fait que les groupements ne soient pas parfaitement équivalents. En RMN du phosphore, un septuplet apparaît à -0,5 ppm ( $J^3_{(\text{P-H})} = 8,1 \text{ Hz}$ ). Ces deux spectres confirment qu'une seule espèce phosphorée est présente en solution.

Le triéthylphosphate est donc parfaitement stable sur une durée de 47 heures dans nos conditions de pré-hydrolyse.

## Hydrolyse du TEPI

Contrairement au TEP, le TEPI réagit avec l'eau, puisqu'une évolution des spectres  $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$  est observée lors du suivi de la réaction sur plus de 2 jours. Pour plus de visibilité, seuls certains spectres sont affichés sur la Figure III-15.

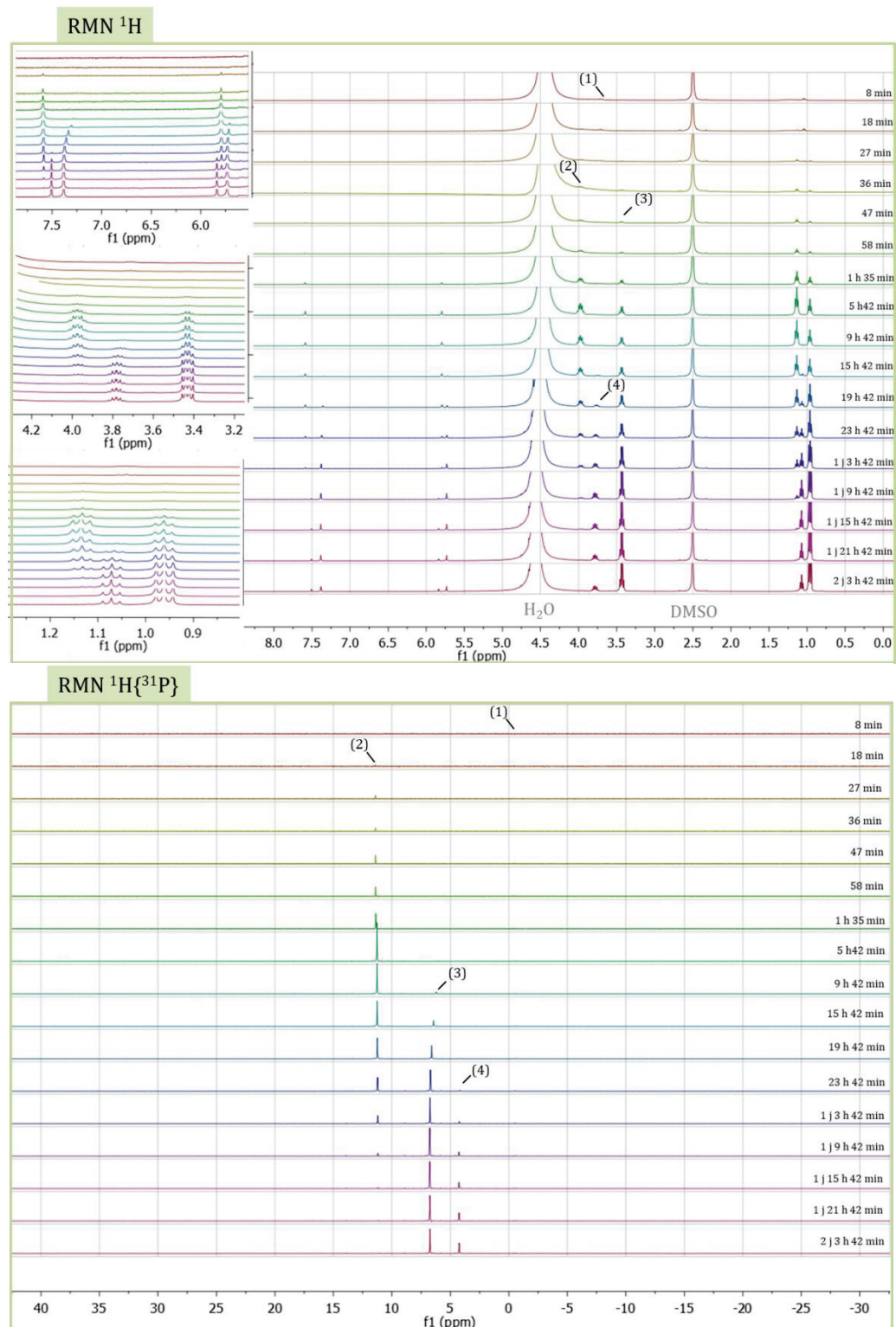


Figure III-15. Spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$  de l'hydrolyse du TEPI, suivi cinétique

L'attribution des signaux est présentée sur la Figure III-16.

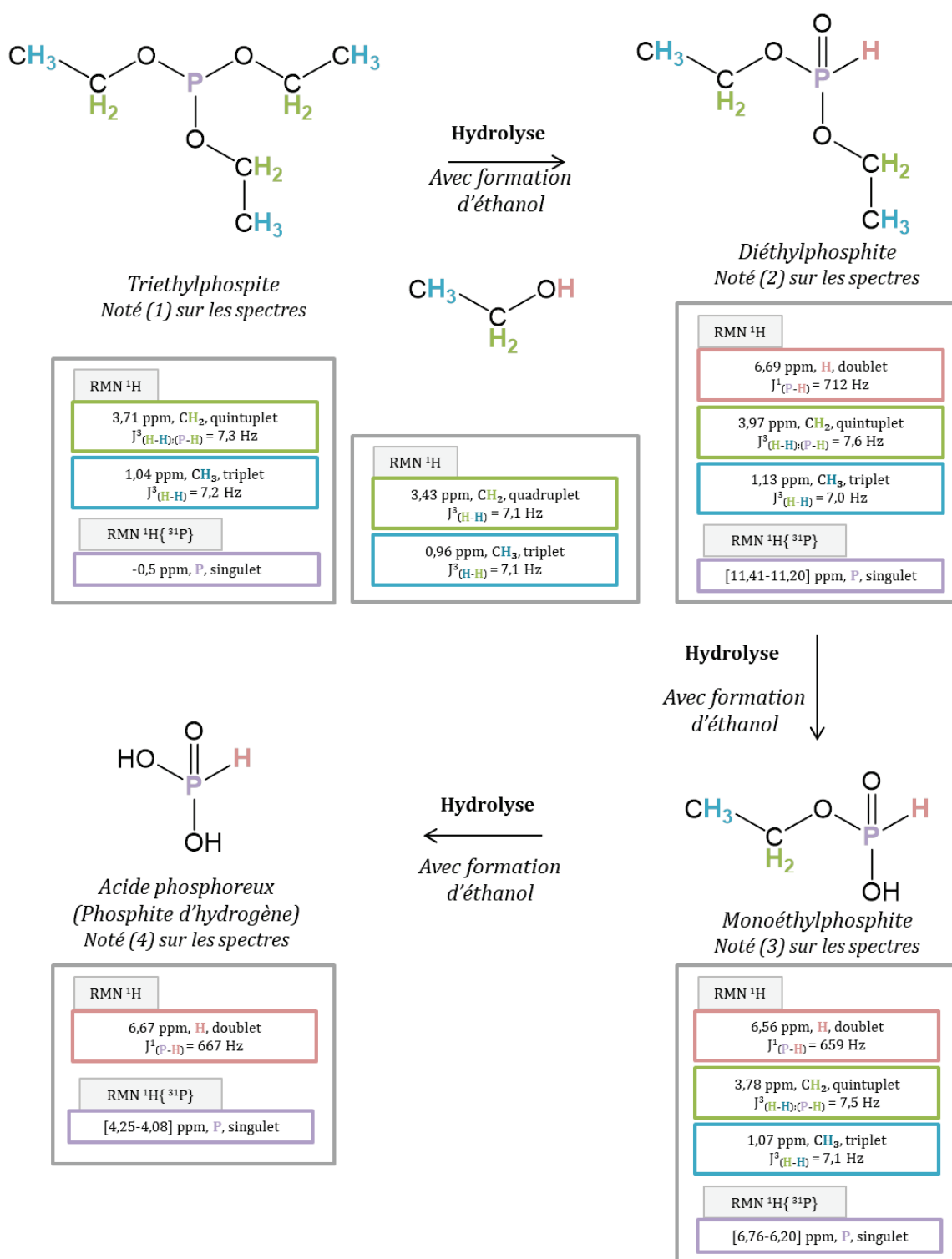
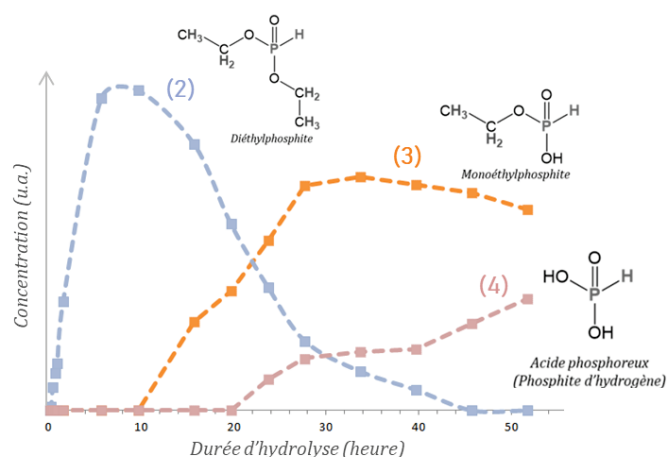


Figure III-16. Attribution des signaux de RMN  $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$  aux différentes espèces formées par hydrolyse du TEPI

Tout d'abord, il est suggéré que la faible intensité des signaux dus au TEPI (notés (1) sur les spectres de la Figure III-15) est causée par son manque de solubilité dans l'eau : le TEPI est situé au-dessus de l'eau dans le tube RMN, et donc présent en faible quantité dans la partie sondée.

Les espèces hydrolysées du TEPI ainsi que l'éthanol formés étant miscibles avec l'eau, leurs signaux apparaissent par la suite avec des intensités plus élevées que ceux du TEPI.

Le premier produit d'hydrolyse du TEPI est le diéthyl (hydrogène) phosphite, qui apparaît après moins d'une demi-heure de réaction. Alors que l'hydrolyse des alcoxy-silanes entraîne la formation de groupements Si-OH, dans le cas du TEPI, un groupement  $O=P(-H)$  apparaît. La molécule hydrolysée portant ce groupement est un tautomère prototropique de l'espèce portant un P-OH [208,209]. Expérimentalement, seule l'espèce possédant le groupement  $O=P(-H)$  est observée, en raison de la plus grande stabilité de ce tautomère [208]. La présence des doublets de constante de couplage de 600-700 Hz, constatée dans les spectres expérimentaux, est en effet caractéristique d'une  $J_{P-H}$ . En se basant sur ce signal, le seul présent dans les spectres  $^1H$  des trois espèces hydrolysées, il est possible de comparer qualitativement les cinétiques de formation et de disparition de ces espèces, comme proposé sur la Figure III-17. Le monoéthylphosphite, espèce formée par hydrolyse de deux groupements  $-OCH_2CH_3$  dans le TEPI, apparaît après un peu moins de 10 heures de réaction. L'hydrolyse se poursuit ensuite, et le diéthylphosphite disparaît après plus de 40 heures d'hydrolyse, alors qu'en parallèle l'acide phosphoreux  $H_3PO_3$  est formé après environ 24 heures de réaction. Tous les produits d'hydrolyse sont donc des H-phosphonates.



**Figure III-17.** Comparaison qualitative des cinétiques de formation et de réaction des produits d'hydrolyse du TEPI. Quantification basée sur l'intégration des signaux P-H en RMN  $^1H$ .

### Conclusion

Les différentes analyses par RMN ont mis en évidence l'absence de réactivité du TEP dans l'eau sur une période de 47 heures. Au contraire, dans les mêmes conditions de réaction, le triéthylphosphite est hydrolysé progressivement et avec des cinétiques plus ou moins rapides en diéthylphosphite, monoéthylphosphite et finalement en acide phosphoreux.

Ainsi, lorsque la solution de TEPI pré-hydrolysée pendant 24 heures est ajoutée dans le sol de silicium, les espèces hydrolysées présentes en solution sont majoritairement le diéthylphosphite et le monoéthylphosphite. L'hydrolyse du phosphore jusqu'à l'acide phosphoreux peut, de plus, se poursuivre pendant toute la durée de la synthèse sol-gel du verre. La présence de ces espèces hydrolysées plutôt que du TEPI permet donc une meilleure intégration de ces molécules au sein du réseau de silicium et ainsi de conserver le phosphore dans le matériau final de 45S5. Cette conservation du phosphore peut résulter de la formation de liaisons hydrogène entre les

groupements O=P-OH des H-phosphonates et le réseau de verre, comme proposé précédemment dans la littérature [207]. Il peut également être envisagée la formation de liaisons Si-O-P par condensation entre les deux types de précurseurs, silane et H-phosphonates. Dans les deux cas, il en résulte une meilleure intégration des espèces phosphorées au sein du réseau inorganique. A l'opposé, la nature chimique du TEP et le fait qu'il ne s'hydrolyse pas dans nos conditions expérimentales permettent d'expliquer qu'il s'insère difficilement dans le réseau et qu'il soit ainsi perdu par volatilisation au cours du traitement thermique ( $T_{\text{ébullition}} = 215 \text{ °C}$ ).

- *Lien entre l'utilisation du TEPI et l'apparition d'instabilités dans la solution*

Alors que l'ajout d'espèces hydrolysées de TEPI permet de conserver le phosphore dans les matériaux après traitement thermique, la présence de H-phosphonates semble déstabiliser, en parallèle, le sol de 45S5. En effet, le sol devient trouble, laiteux puis précipite au bout de quelques heures de réaction.

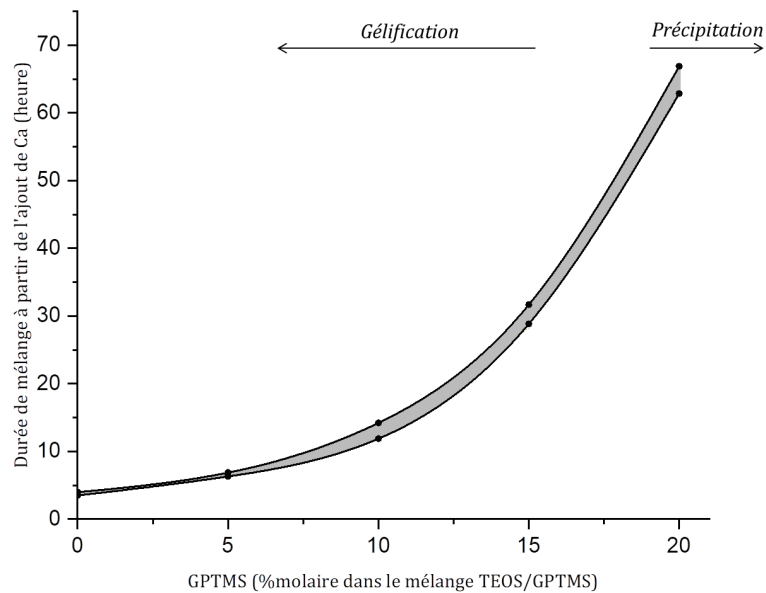
Dans un premier temps et pour comprendre les raisons de cette déstabilisation, le précipité formé a été filtré, séché et analysé par EDS. Les éléments silicium, oxygène et carbone sont majoritaires dans sa composition. Dans un second temps, plusieurs synthèses ont été préparées, en enlevant certains précurseurs de la formulation pour comprendre quelles pouvaient être les interactions entre composés. En l'absence de TEPI ou lorsque celui-ci n'est pas pré-hydrolysé, aucune précipitation n'est observée. De plus, seul le TEOS entraîne la formation du précipité, alors qu'un sol homogène est conservé si seul le GPTMS est introduit comme précurseur de silicium. Il semblerait donc que ce soit l'association des deux composés - TEPI hydrolysé et TEOS - qui soit à l'origine de la déstabilisation du sol.

Comme l'a montrée l'analyse RMN, l'hydrolyse du TEPI conduit à la formation d'espèces hydrolysées possédant des fonctions acides P-OH : le monoéthyl phosphite (une fonction P-OH,  $pK_a = 2,17$ ), formé après environ 10 h d'hydrolyse et l'acide phosphoreux (deux fonctions P-OH,  $pK_{a1} = 1,26$  et  $pK_{a2} = 6,7$ ) qui apparaît après environ 24 h d'hydrolyse. La présence de ces espèces peut favoriser la condensation du TEOS. Cette hypothèse est en accord avec le fait que la précipitation n'apparaît que si le précurseur TEPI est pré-hydrolysé, et qu'elle est accélérée lorsque la durée de pré-hydrolyse du TEPI est rallongée à 45 h. Cette hypothèse est de plus confortée par la littérature, qui montre une diminution du temps de gel d'un sol  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  ou sa précipitation lors de l'ajout d'acide phosphorique  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , alors que le sol reste stable en présence de TEP, moins réactif [206].

- *Optimisation de la quantité de GPTMS dans le système avec TEPI*

Il apparaît donc que l'hydrolyse du TEPI, nécessaire pour conserver le phosphore dans le matériau final, provoque aussi une condensation plus rapide du TEOS. Ce phénomène entraîne la formation de particules localisées de  $\text{SiO}_2$  plutôt qu'une répartition homogène des éléments dans le réseau. Nous avons donc travaillé sur le rapport TEOS : GPTMS pour tenter de déterminer une nouvelle composition idéale (en présence de TEPI) qui permette de rendre le sol visqueux plus rapidement, dans le but d'obtenir un dépôt non démouillant avant l'apparition du précipité. Les rapports molaires TEOS : GPTMS testés sont : 95 : 5 ; 90 : 10 ; 85 : 15 et 80 : 20.

Toutes les solutions sont transparentes, homogènes et fluides après synthèse. Une caméra est installée devant les solutions en agitation, afin de pouvoir suivre leur évolution en continu sur plusieurs jours. Les images sont ensuite analysées pour déterminer le moment de l'apparition d'instabilités. Le terme « instabilité » concerne à la fois une gélification du système et/ou l'apparition d'un trouble ou d'un précipité. Les observations sont rassemblées sur la Figure III-18. Etant donné que la méthode de détermination est visuelle, mais aussi que les phénomènes ne sont pas instantanés, un bandeau gris permet de visualiser la plage d'incertitude concernant l'apparition des instabilités.



**Figure III-18.** Apparition des instabilités dans le sol de 45S5 selon la quantité de GPTMS. Le bandeau gris rend compte de l'intervalle de temps sur lequel se produit l'évolution. Pour une quantité de GPTMS inférieure ou égale à 15 %, l'instabilité est une gélification. Pour 20 % de GPTMS, il s'agit de l'apparition d'un précipité

Pour une concentration en GPTMS inférieure ou égale à 15 %<sub>molaire</sub>, les solutions gélifient, alors que pour une concentration de 20 %<sub>molaire</sub>, la solution précipite. La solution à 20 %<sub>molaire</sub> est donc rejetée car elle ne permet pas une répartition homogène des éléments dans le verre. Pour un rapport molaire TEOS : GPTMS de 85 : 15, une solution suffisamment stable sur plusieurs heures est obtenue et permet de déposer un revêtement ne démouillant pas la surface du TA6V. Pour des concentrations de GPTMS inférieures, le sol gélifie trop rapidement pour permettre la préparation de plusieurs dizaines d'échantillons à la suite.

## 2.2. DEPOT DE REVETEMENTS ELECTROFILES A PARTIR DU SOL OPTIMISE

### 2.2.1. Protocole de synthèse et de mise en forme

Le protocole optimisé découlant des différentes études présentées jusqu'ici est schématisé sur la Figure III-19. Il a été utilisé pour la préparation de revêtements déposés par enduction centrifuge et électrofilage.

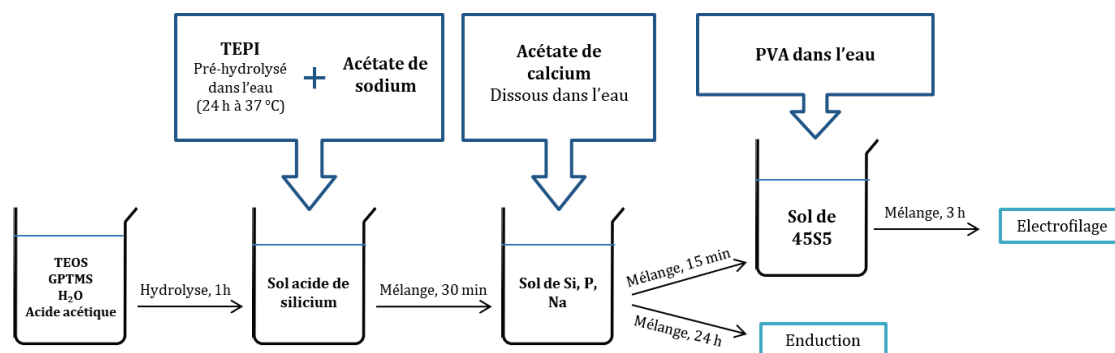


Figure III-19. Protocole de synthèse du sol-gel de 45S5 optimisé à partir de précurseurs acétate

Les précurseurs de silicium sont ajoutés dans de l'eau acidifiée tel que  $\text{Si} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} = 8 : 60 : 32$  et  $\text{TEOS} : \text{GPTMS} = 85 : 15$  (%molaires). Après une heure d'agitation à température ambiante, la solution de TEPI/acétate de sodium est ajoutée au sol. Pour préparer cette solution, le TEPI est pré-hydrolysé dans l'eau à 37 °C pendant 24 heures ( $[\text{P}]=0,47$  M) et l'acétate de sodium est solubilisé dans ce mélange 30 min avant l'ajout dans le sol de Si ( $[\text{CH}_3\text{COONa}] = 4,4$  M). Notons que la solution TEPI/acétate de sodium est ramenée à température ambiante avant ajout dans le sol. Après 30 minutes d'agitation du sol Si/P/Na, l'acétate de calcium pré-solubilisé (pré-solubilisation à  $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}] = 2,3$  M) est ajouté. Les rapports molaires Si/P = 8,9 ; Si/Na = 0,9 et Si/Ca = 1,7 sont respectés dans le mélange final.

La solution est agitée pendant 24 heures après ajout de l'acétate de calcium pour la préparation de films ou de poudres. Dans ce cas, la concentration en silicium est  $[\text{Si}] = 0,90$  M. Pour préparer des poudres, la solution est ensuite vieillie pendant 18 heures puis séchée pendant 24 heures à 60 °C, sans étape de mise en forme. Pour préparer des revêtements lisses, la solution est déposée par enduction centrifuge pendant 1 minute à 2000 tr/min (accélération de 200 tr/min/s<sup>2</sup>).

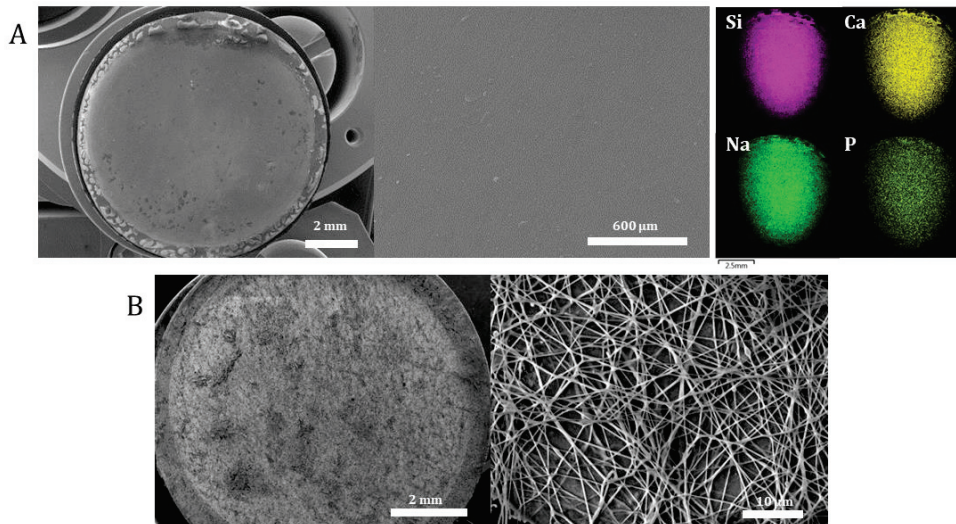
Pour l'électrofilage, la solution est complétée par l'ajout de PVA (mélange à 30 %<sub>mass/vol</sub> dans l'eau) 15 minutes après l'ajout d'acétate de calcium. L'électrofilage est réalisé environ 3 heures après l'ajout de PVA. Dans cette solution,  $[\text{Si}] = 0,70$  M et  $[\text{PVA}] = 7\%$ <sub>mass/vol</sub>. Un collecteur rotatif est utilisé et les paramètres suivants sont utilisés : distance collecteur-aiguille de 9 cm, tension de 11 kV et débit de 0,15 mL/h.

Après mise en forme le cas échéant, les échantillons sont vieillis à 60 °C pendant 18 h en atmosphère humide, et traités thermiquement à 550 °C, si nécessaire.

### 2.2.2. Caractérisation morphologique des revêtements

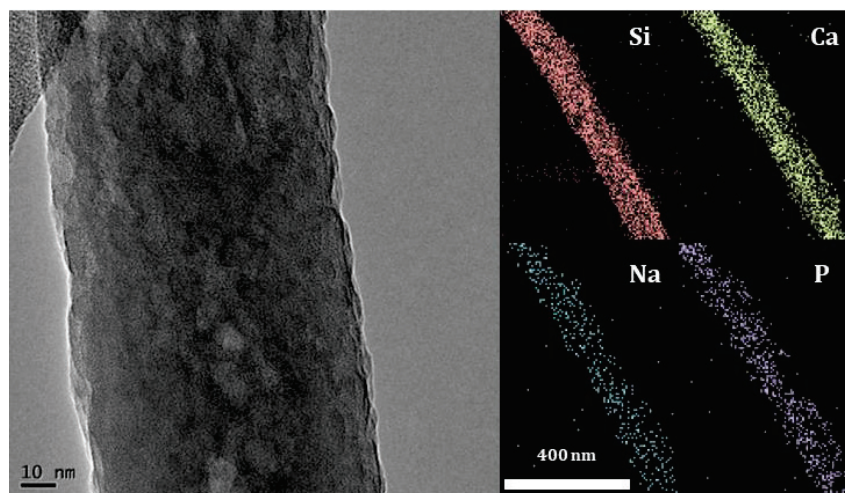
En suivant le protocole de synthèse optimisé, des revêtements homogènes ont été déposés par enduction centrifuge (Figure III-20.A.). Les analyses EDS montrent des rapports molaires entre les différents éléments du verre 45S5 de Si/Ca = 1,9, Si/Na = 0,8 et Si/P = 10,1, en accord avec les valeurs attendues. L'épaisseur du revêtement lisse a été estimée à environ 3 μm sur une section par MEB.





**Figure III-20.** Images MEB et cartographies EDS des revêtements dans le système 45S5 formulé à partir de précurseurs acétate. Selon le procédé de mise en forme, les revêtements sont A) lisses après enduction centrifuge et B) fibreux et poreux après électrofilage. Les échantillons ont été traités à 550 °C

Par ailleurs, l'ajout de PVA dans la solution permet la préparation de filaments de diamètre moyen ( $0,3 \pm 0,1$ )  $\mu\text{m}$  (Figure III-20.B.). La répartition uniforme, à l'échelle nanométrique, des différents éléments au sein même des filaments est confirmée par une analyse MET-EDS (Figure III-21). Notons qu'expérimentalement parlant, la présence des différents ions dans le sol induit une forte conductivité de la solution (15 mS/cm), responsable d'instabilités et de plusieurs interruptions dans le filage. De plus, les filaments arrivant sur la cible sont repoussés par ceux déjà déposés. Un collecteur rotatif est donc nécessaire pour forcer le dépôt de plusieurs couches de filaments.



**Figure III-21.** Image MET et cartographie EDS des filaments dans le système 45S5 formulé à partir de précurseurs acétate

Les revêtements lisses ou fibreux obtenus apparaissent donc homogènes en composition. Même si la composition de la solution induit des discontinuités dans le filage, ce dernier reste possible. Afin de mieux caractériser le matériau chimiquement, des analyses sur poudre ont été réalisées.

### 2.2.3. Caractérisations thermique et chimique du matériau

Étant donné qu'il est assez difficile d'obtenir une quantité de filaments suffisante pour des caractérisations ATG-DSC ou FTIR et qu'en DRX ou DRX à incidence rasante, la contribution du substrat est trop importante pour discerner les signaux dus au revêtement, ces analyses ont été réalisées sur des poudres.

- *Comportement thermique*

Les thermogrammes obtenus par ATG-DSC sont présentés sur la Figure III-22.

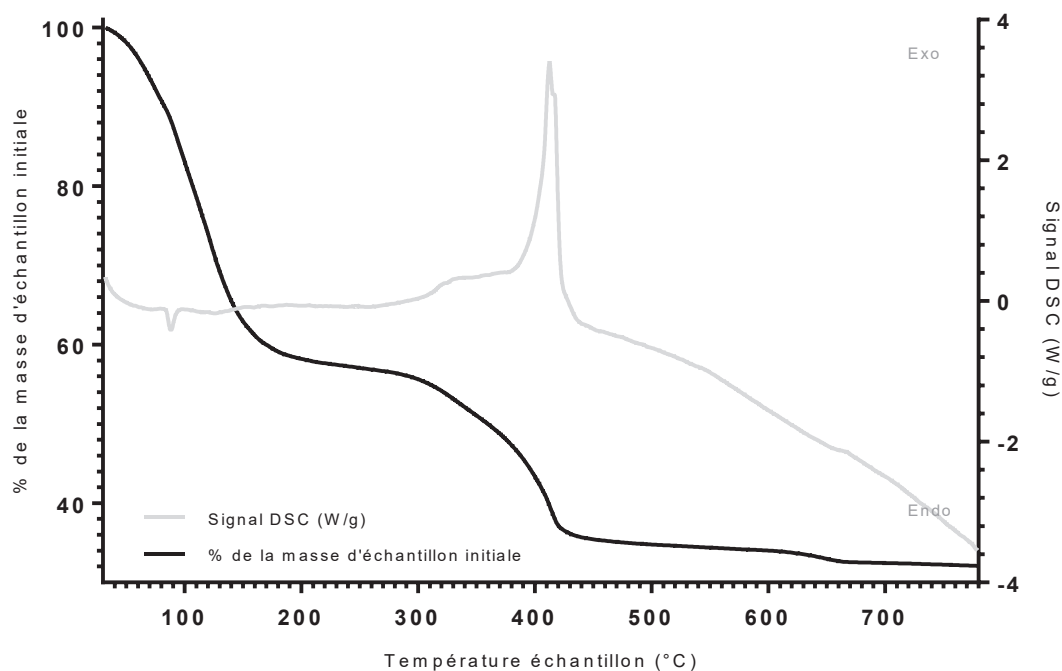
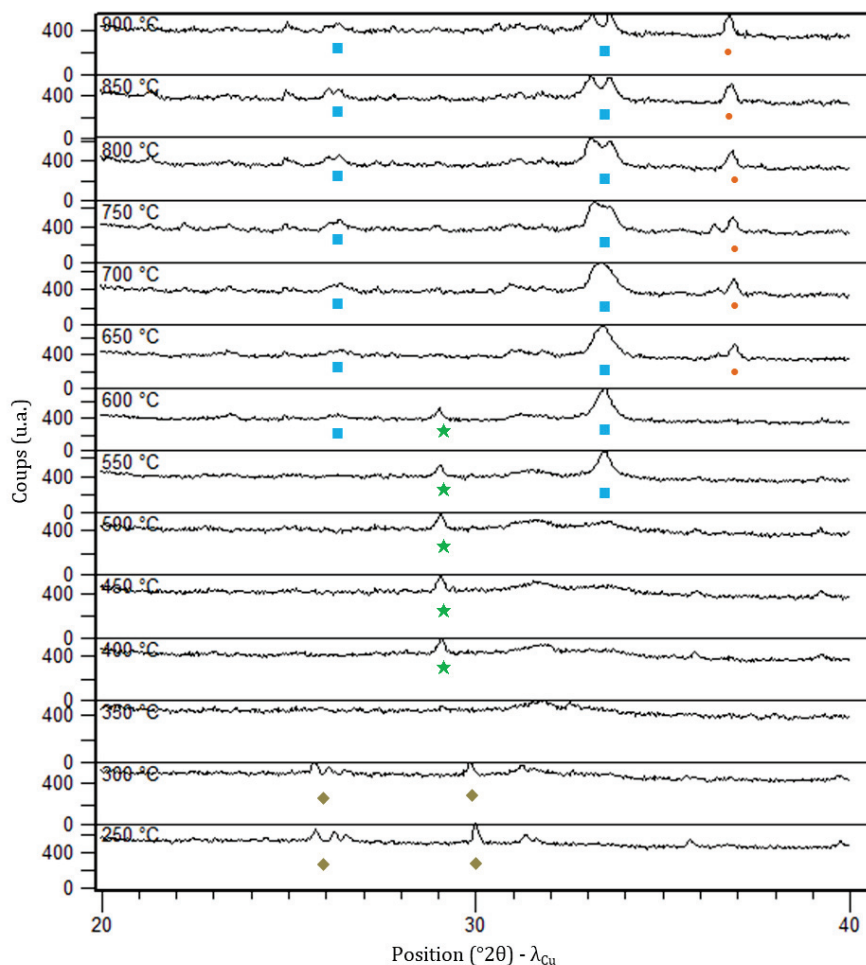


Figure III-22. Thermogrammes ATG-DSC des poudres dans le système 45S5 synthétisées à partir de précurseurs acétate. Analyse réalisée dans l'air entre 30 et 800 °C

La courbe ATG laisse apparaître deux pertes de masses séparées. La première, de 42 % entre 30 et 190 °C, est attribuée à la déshydratation du matériau. La seconde perte de masse d'environ 22 % comprise entre 200 et 425 °C, qui apparaît moins continue, peut être attribuée à la décomposition de plusieurs composés. Dans ce sens, la courbe DSC montre plusieurs signaux exothermiques : un pic aplati et de faible intensité de 310 à 380 °C puis un autre plus intense dont le maximum est situé à 378 °C. Le sommet de ce dernier est de plus dédoublé, avec un deuxième maximum un peu moins intense à 417 °C. Ce signal, qui présente un bord abrupt vers les hautes températures, est attribué à une cristallisation, alors que les deux signaux exothermiques précédents sont dus à des décompositions de cinétiques différentes. Les phénomènes de décompositions concernent les chaînes organiques contenues dans les différents précurseurs, ainsi que la décomposition des précurseurs à base d'ions acétate. Les carbonates ainsi formés cristallisent dans le matériau et sont donc responsables du pic exothermique de cristallisation à 417 °C. A 550 °C, une rupture dans la pente du signal DSC, sans perte de masse en ATG, peut être causée par la transition vitreuse du verre, déjà constatée

précédemment à la même température [175]. Enfin, une faible perte de masse entre 615 et 665 °C est expliquée par la décomposition des carbonates en oxydes qui apparaît sur l'ATG référence vers 640 °C (Figure III-2.A). Le fait que le signal DSC ne fasse pas apparaître de phénomène endothermique qui caractérise cette décomposition peut-être expliqué par la présence d'un phénomène antagoniste, la cristallisation du 45S5, qui a déjà été constatée autour de 610 °C [210,211] ou 670 °C [212]. Ici, le maximum du signal exothermique attribué à cette cristallisation apparaît à 660 °C. L'intensité de ce signal est faible car il est compensé par le phénomène endothermique de décomposition des carbonates.

Pour approfondir la caractérisation, une analyse par DRX *in situ* en température a été réalisée (Figure III-23).



**Figure III-23.** Diffractogrammes *in situ* en température du système 45S5 à base d'acétates. Les phases identifiées sont : ★ Carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$ , PDF #00-05-0586 ; ● Oxyde de calcium  $\text{CaO}$ , PDF #01-082-1690, ◆ Acétate de sodium, PDF #00-029-1158, ■  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ , PDF #012-0671 ;  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  PDF #01-077-2189 ou combeite  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ , PDF #00-01-1078

L'acétate de sodium (PDF #00-029-1158) est identifié à 250 °C (pic principal à 30,0 °2θ), mais avec un décalage compris entre 0,6 et 1 °2θ environ par rapport à la fiche PDF de référence. Ce décalage est dû à un écart entre la mise à zéro de l'axe Z du goniomètre et la position réelle de l'échantillon. Ce décalage des pics est pris en compte pour l'identification des autres phases apparaissant sur les diffractogrammes.

L'acétate de sodium n'est plus visible à 350-400 °C en raison de sa décomposition. A cette température, le carbonate de calcium (PDF #00-05-0586) cristallise (pic principal à 29,1 °2θ). Cette phase disparaît vers 650 °C, température à laquelle apparaît l'oxyde de calcium (PDF #01-082-1690, pic principal à 36,9 °2θ). Ces phénomènes et les températures associées sont en accord avec l'analyse par ATG-DSC (Figure III-22).

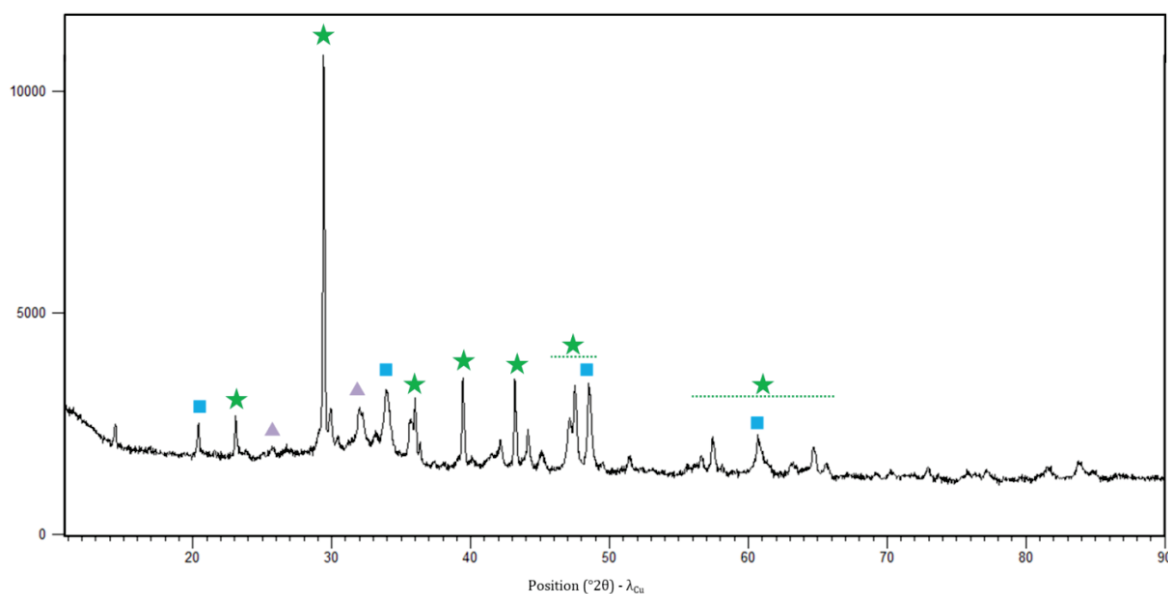
En parallèle de ces phénomènes de décomposition, le verre cristallise. Cette phase cristalline apparaît nettement à partir de 550 °C en DRX, alors que le phénomène de cristallisation semble se produire à 660 °C en DSC. Ce décalage est cependant cohérent avec le fait qu'une vitesse de chauffe plus faible ait été utilisée en DRX (1°C/min, comme lors de la synthèse) qu'en ATG-DSC (5 °C/min). La phase la plus souvent rapportée dans la littérature après cristallisation du verre 45S5 est la combéite, de formule  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  ou  $\text{Na}_2\text{Ca}_2(\text{SiO}_3)_3$  [212-218]. D'autres phases telles que  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  [210,219,220],  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$  [212], la wollastonite  $\text{CaSiO}_3$  [216] ou une phase proche de l'hydroxyapatite [221] ont également été signalées. Les fiches PDF des phases  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  (PDF #00-01-1078),  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  (PDF #01-077-2189) et  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$  (PDF #00-012-0671) concordent toutes avec nos résultats expérimentaux. Cependant, en raison du faible rapport signal/bruit des diffractogrammes obtenus et de la plage réduite de balayage, il n'est pas possible de spécifier plus précisément quelle phase est formée lors du traitement thermique. Notons aussi que la séparation du pic à 33,4 °2θ en deux pics à 33,1 et 33,6 °2θ qui se produit à partir de 750 °C a déjà été constatée précédemment, et a été attribuée dans ce cas à une variation des paramètres de maille dans une phase  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  lors de l'élévation de température [210].

Ces analyses thermiques permettent à nouveau de confirmer que la température de 550 °C est adaptée pour le traitement des matériaux dans le système 45S5. Cette température permet d'éliminer les acétates et d'éviter la formation d'oxyde de calcium. Elle marque également le début de la cristallisation du verre. Notons cependant que la cristallisation du 45S5 n'entraîne pas forcément une perte de sa bioactivité, mais modifie plutôt la cinétique de cette dernière [222]. Le verre 45S5 faiblement cristallisé peut de cette façon conserver des propriétés biologiques intéressantes, même si cet aspect doit être évalué par des tests biologiques.

- *Caractérisation chimique du système 45S5 après traitement thermique*

### DIFFRACTION DES RAYONS X

Le diffractogramme obtenu sur la poudre traitée à 550 °C est présenté sur la Figure III-24.



**Figure III-24.** Diffractogramme de la poudre dans le système 45S5 à base d'acétates, après traitement à 550 °C. Les phases identifiées sont : ★ Carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$ , PDF #00-05-0586, ■  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  PDF #01-077-2189 ou combeite  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ , PDF #00-01-1078 et ▲ Hydroxyapatite, PDF #01-072-1243

En accord avec les résultats du suivi DRX en température, du  $\text{CaCO}_3$  (PDF #00-05-0586) et une phase cristallisée à partir du verre sont identifiés dans la poudre traitée à 550 °C. Pour cette expérience réalisée à température ambiante, l'échantillon est plus facilement placé dans le plan de référence du goniomètre et par conséquent, la position expérimentale du pic d'intensité maximale du  $\text{CaCO}_3$  (29,42 °2θ) correspond exactement à la valeur valeur inscrite dans la fiche PDF de référence. Cette analyse, plus précise, permet d'affiner l'attribution des pics de la phase cristallisée à partir du verre (pic d'intensité maximale à 33,92 °2θ) : les phases de combeite  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  (PDF #00-01-1078) et de  $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  (PDF #01-077-2189) correspondent à notre signal. Cependant, la distinction entre ces deux phases n'est pas aisée car elles sont iso-structurales. De plus, la phase étant peu cristallisée, un affinement de structure par la méthode de Rietveld n'est pas envisageable ici. Enfin, un signal supplémentaire non observé en DRX *in situ* apparaît à 32,24 °2θ, mais l'indentification de la phase associée est difficile en raison de la faible intensité du signal. Une possibilité envisagée est la présence d'hydroxyapatite (PDF #00-036-0642). Notons aussi que lors du refroidissement, le CaO ne cristallise pas. Pour mieux comprendre l'évolution des phases, et en particulier la cristallisation de la phase qui apparaît à 32,24 °2θ, une DRX *in situ* pourrait être réalisée lors de la descente en température, après chauffage à 550 °C.

Les spectres enregistrés en infrarouge sur la poudre avant et après traitement thermique à 550 °C sont présentés sur la Figure III-25, et l'attribution des signaux est proposée dans le Tableau III-3.

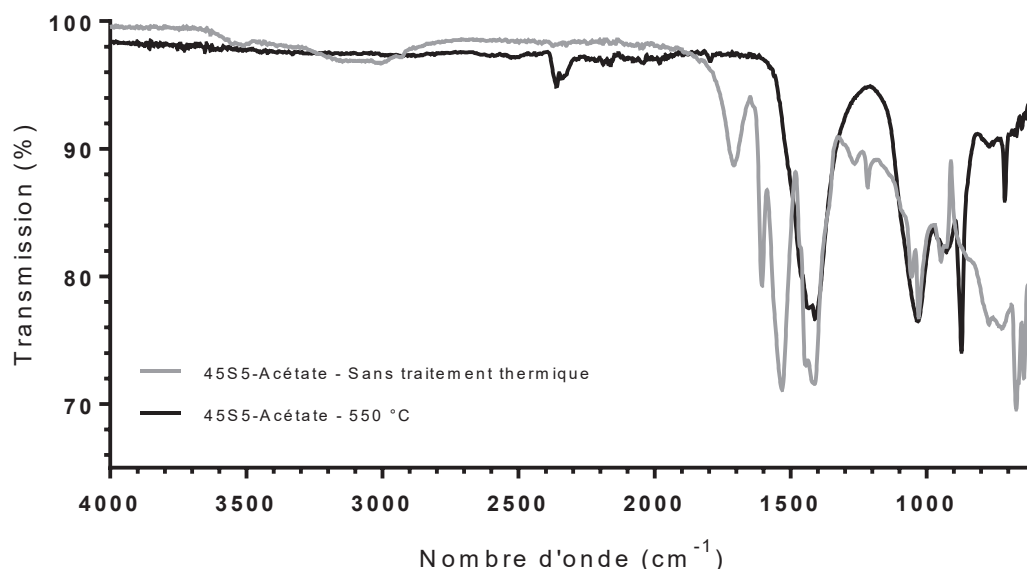


Figure III-25. Spectres IRTF du 45S5 à base d'acétates, avant et après traitement

AVANT TRAITEMENT THERMIQUE	
Nombre d'onde	Attribution
1707 cm <sup>-1</sup>	v(C=O) acétates
1604 et 1531 cm <sup>-1</sup>	v <sub>asym</sub> (C-O) acétates
1445 et 1411 cm <sup>-1</sup>	v <sub>sym</sub> (C-O) acétates
1265 et 1216 cm <sup>-1</sup>	v(C-O-C) acétates + v(C-O) GPTMS
1055 et 1029 cm <sup>-1</sup>	v <sub>asym</sub> (Si-O-C) et/ou v(Si-O-Si)
946 cm <sup>-1</sup>	v <sub>sym</sub> (Si-O-C), ρ(C-H) dans le réseau de Si, v(Si-OH)
927 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
770 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O)
722 cm <sup>-1</sup>	Pic non attribué
670 cm <sup>-1</sup>	δ(O-C-O) acétates
642 cm <sup>-1</sup>	Déformation O-C-O acétates
617 cm <sup>-1</sup>	Vibrations de déformation hors du plan des acétates
APRES TRAITEMENT THERMIQUE A 550 °C	
Nombre d'onde	Attribution
2359-2328 cm <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> de l'air
1431 et 1409 cm <sup>-1</sup>	v <sub>3</sub> (C-O) des carbonates CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
1033 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O-Si) (v <sub>asym</sub> (Si-O-C) devraient être éliminés en température)
928 cm <sup>-1</sup>	v(Si-O non pontant), v(Si-O-Métal)
871 cm <sup>-1</sup>	v <sub>2</sub> (C-O) des carbonates CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
712 cm <sup>-1</sup>	v(C-O) des carbonates CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>

Notations : v : vibration d'élongation ; ρ : rotation plane ; δ : cisaillement

Tableau III-3. Attribution des signaux IRTF obtenus sur le système 45S5 à base d'acétates, avant et après traitement thermique. Références utilisées pour l'interprétation : [176,177,223,224]

La comparaison des spectres obtenus avant et après traitement thermique montre une décomposition totale des acétates (disparition des v(C=O) à 1707 cm<sup>-1</sup> entre autres) en carbonates (apparition des v<sub>2</sub>(C-O) à 871 cm<sup>-1</sup> par exemple). Après traitement thermique, la

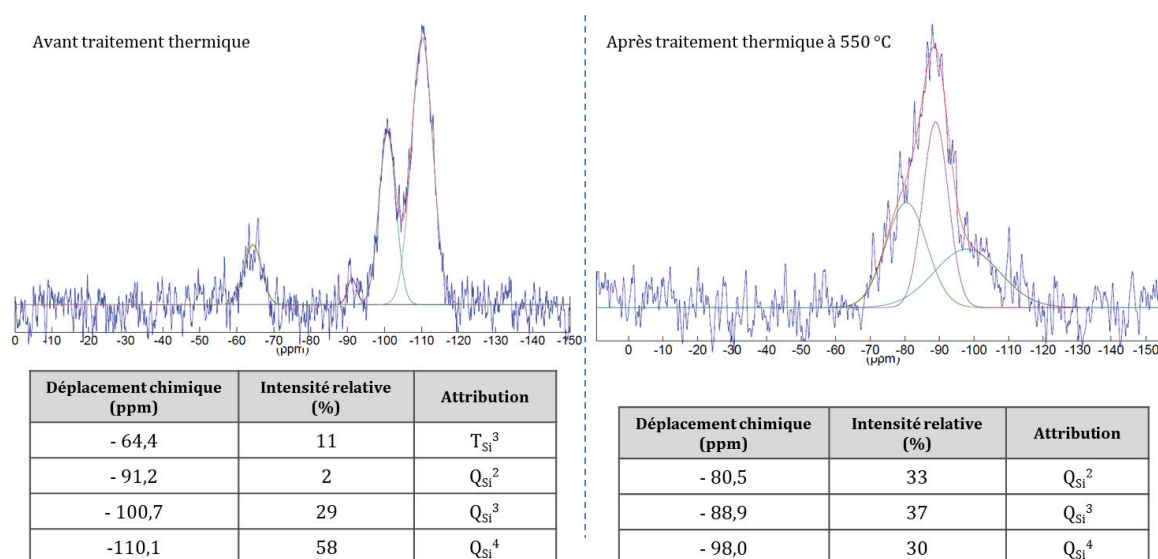
bande à  $928\text{ cm}^{-1}$  est attribuée aux  $\nu(\text{Si-O})$ , où O est non pontant. La présence de liaisons Si-O, avec O non pontant, indique une entrée des cations métalliques (sodium et calcium) dans le réseau de verre et dans les phases cristallisées précédemment décrites.

### RMN DU SOLIDE

Des analyses en RMN du solide sur le silicium  $^{29}\text{Si}$  et le phosphore  $^{31}\text{P}$  ont été réalisées afin de mieux décrire la structure du verre.

#### *RMN du $^{29}\text{Si}$ (HPDEC)*

Les spectres RMN du  $^{29}\text{Si}$  enregistrés sur les poudres avant et après traitement à  $550\text{ °C}$  sont proposés sur la Figure III-26.



**Figure III-26.** Spectres RMN  $^{29}\text{Si}$  sur les poudres dans le système 45S5 à base de précurseurs acétate, avant et après traitement thermique

Avant traitement, le spectre fait apparaître deux signaux attribués à des espèces de type  $T_{\text{Si}}$  et  $Q_{\text{Si}}$  du silicium. Plus précisément, la décomposition du signal permet l'identification d'espèces  $T_{\text{Si}}^m$  avec  $m=3$  et d'espèces  $Q_{\text{Si}}^n$  avec  $n = \{2, 3, 4\}$  (Figure III-26). L'attribution des différents déplacements chimiques à ces espèces est basée sur la littérature [225]. Ces résultats indiquent que les trois fonctions Si-O-CH<sub>3</sub> du GPTMS ont totalement condensé, puisque seules des espèces  $T_{\text{Si}}^3$  apparaissent. De plus, toutes les molécules de TEOS ont condensé avec au minimum deux autres précurseurs de silicium (TEOS ou GPTMS). Le taux important de  $Q_{\text{Si}}^4$  (58 %) indique en outre une forte condensation du système.

Avec le traitement thermique, l'environnement chimique autour des noyaux de silicium est modifié, entraînant un shift dans les déplacements chimiques. En particulier, l'insertion des cations métalliques de sodium et de calcium entraîne un déblindage des signaux. Les déplacements chimiques obtenus sont d'ailleurs en accord avec les déplacements rapportés dans la littérature sur différents verres [226–228]. La dépolymérisation du verre causée par le traitement thermique supporte également l'hypothèse de l'entrée des ions dans le réseau. En effet, on constate une diminution importante des  $Q_{\text{Si}}^4$  (de 58 à 30 %) ainsi qu'une augmentation importante des  $Q_{\text{Si}}^2$  (de 2 à 33 %). Cette dépolymérisation a déjà été rapportée dans la littérature

[226] : elle entraîne l'augmentation du nombre de Si-NBO (NBO pour *Non binding oxygen* ou « oxygènes non pontant ») dont la charge négative est compensée par les cations métalliques Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Notons aussi que la disparition des espèces T<sub>Si</sub> après traitement s'explique par le clivage de la liaison Si-C du GPTMS et son remplacement par une liaison Si-O.

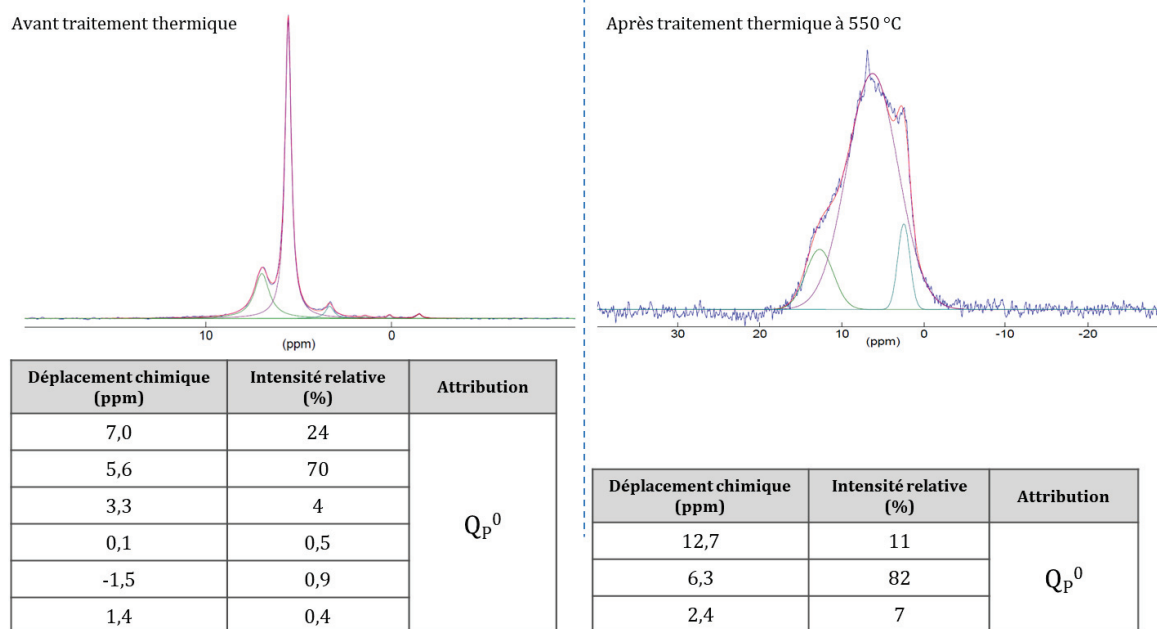
Par rapport aux différentes études RMN rapportées dans la littérature (Tableau III-4), le réseau de verre 45S5 obtenu avec notre protocole de synthèse apparaît plus condensé. Cependant, la quantité importantes d'espèces Q<sub>Si</sub><sup>2</sup> et Q<sub>Si</sub><sup>3</sup> reste favorable à la dissolution des verres *in vitro* [228].

	Intensités relatives (%)				
	Expérimentales	Renny Mathew <i>et al.</i> [228]	Fitzgerald <i>et al.</i> [229]	Pedone <i>et al.</i> – CMD model [227]	Araujo <i>et al.</i> [230]
Q <sub>Si</sub> <sup>1</sup>	0	6,6	0	12,2	1,6
Q <sub>Si</sub> <sup>2</sup>	33	72,4	69	54,5	55,9
Q <sub>Si</sub> <sup>3</sup>	37	21	31	33,3	39,2
Q <sub>Si</sub> <sup>4</sup>	30	0	0	0	3,3

**Tableau III-4.** RMN <sup>29</sup>Si sur poudre traitées a 550 °C, système 45S5 à base de précurseurs acétate. Comparaison des résultats expérimentaux aux résultats de la littérature

### RMN du <sup>31</sup>P (HPDEC)

Les spectres RMN du <sup>31</sup>P enregistrés sur les poudres avant et après traitement à 550 °C sont proposés sur la Figure III-27.



**Figure III-27.** Spectres RMN <sup>31</sup>P sur les poudres dans le système 45S5 a base d'acétate, avant et après traitement thermique

Avant traitement thermique, le spectre montre deux espèces à base de phosphore majoritaires dans l'échantillon, à 7,0 et 5,6 ppm (aires des signaux de 24 et 70 % respectivement). Ces déplacements chimiques sont similaires à ceux déterminés en RMN du liquide pour le



monoéthylphosphite (6-7 ppm) et l'acide phosphoreux (4-4,5 ppm). En revanche, le suivi de l'hydrolyse du TEPI a mis en évidence qu'après 24 h de pré-hydrolyse, le diéthylphosphite et le monoéthyl phosphite étaient majoritairement présents en solution, alors que l'acide phosphoreux commence seulement à être formé. La présence du signal aux bas déplacements chimiques laisse donc supposer qu'après mélange avec le sol de silicium, l'hydrolyse des espèces de phosphore se poursuit dans le sol de 45S5, expliquant l'apparition des signaux à 5,6 et 3,3 ppm dans l'analyse sur poudre. Ces différents signaux en RMN du solide ne peuvent pas être attribués avec précision, mais résultent des interactions entre les espèces de phosphore hydrolysées et les molécules environnantes (précurseurs de sodium, de calcium et molécules à base de silicium). Il peut être précisé que l'acide phosphoreux a déjà été détecté à 5,2 et 3,2 ppm selon les espèces environnantes [231]. Enfin, l'apparition de signaux à de faibles déplacements chimiques (1,4, -1,5 et 0,1 ppm) pourrait s'expliquer par l'oxydation de l'acide phosphoreux en acide phosphorique. L'acide phosphorique a en effet été utilisé comme référence à 0 ppm, et ces différents signaux pourraient être causés par divers environnements chimiques autour de cette molécule. Notons tout de même que ces espèces restent minoritaires (moins de 2 % des espèces de phosphore).

La décomposition du signal obtenu sur le matériau traité en température fait apparaître trois pics centrés à 12,7, 6,3 et 2,4 ppm. Les deux pics à 12,7 et à 2,4 ppm peuvent être attribués à des espèces orthophosphates ( $Q_p^0$ ) situées dans des environnements très riches en cations sodium et calcium, respectivement. Il a en effet été montré qu'en augmentant le ratio Na/Ca dans un verre, la densité électronique des liaisons P-O était augmentée, de même que le déblindage électronique, entraînant une augmentation du déplacement chimique [232-234]. Ainsi, un verre phosphosilicate ne contenant que des ions sodium présente un pic  $Q_p^0$  à 13,9 ppm [232], alors qu'un verre phosphosilicate ne contenant que des ions calcium présente un pic  $Q_p^0$  autour de 3 ppm [233,235]. Le signal à 6,3 ppm semble donc être dû à un environnement mixte d'ions sodium et calcium autour des espèces orthophosphates, ce qui explique la plus grande largeur à mi-hauteur du signal à 6,3 ppm que de ceux à 12,7 et 2,4 ppm.

Aucune espèce  $Q_p^1$  n'est détectée dans notre système. Une prédominance des espèces orthophosphates, dont la charge négative est contrebalancée par les cations métalliques, est en accord avec les résultats rapportés dans la littérature (Tableau III-5). Cette forme prédominante des  $Q_p^0$  est d'ailleurs nécessaire à la dissolution du phosphore, qui est directement reliée à la bioactivité du verre.

	Intensités relatives (%)			
	Expérimentales	Renny Mathew <i>et al.</i> [228]	Fitzgerald <i>et al.</i> [229]	Pedone <i>et al.</i> - CMD model [227]
$Q_p^0$	100	95,9	100	73,3
$Q_p^1$	0	4,1	0	26,7

**Tableau III-5.** RMN  $^{31}P$  sur poudre traitées à 550 °C, système 45S5 à base de précurseurs acétate. Comparaison des résultats expérimentaux aux résultats de la littérature

## Conclusion

L'ensemble des analyses RMN semble confirmer l'entrée des cations dans le réseau de verre. Les cations contre-balancent à la fois les espèces de silicium et de phosphore, et leur distribution est majoritairement mixte, même si des zones riches en calcium et d'autres riches en sodium semblent être présentes autour des espèces de phosphore. La répartition des cations autour des oxygènes pontants ou non pontants des espèces de silicium et de phosphore peut être étudiée plus précisément par RMN de l'oxygène  $^{17}\text{O}$ , comme rapporté par A. Pedone *et al.* [227]. Cependant, l'échange isotopique du  $^{17}\text{O}$  se produisant lors du traitement thermique rend cette analyse peu adaptée à notre méthode de synthèse.

## 2.3. CONCLUSION

Le sol de 45S5 préparé à partir de précurseurs acétate est fortement sensible aux variations de composition. Chaque composé influence en effet les vitesses d'hydrolyse et de condensation des espèces conduisant à la formation du réseau de verre. Dans ce contexte, les concentrations en eau, acide acétique, TEOS, et GPTMS ont été optimisées. Par ailleurs, l'hydrolyse du précurseur de phosphore augmente l'instabilité du sol, mais cette réaction est nécessaire pour obtenir la composition souhaitée de verre en élément phosphore. L'évolution du sol étant significative sur une journée et demie environ, des suivis dans le temps sont envisagés en rhéologie et en RMN  $^{29}\text{Si}$ . Ces analyses permettraient de relier le degré de condensation du verre avec les propriétés viscoélastiques des solutions et leur capacité à être électrofilées ou déposées par enduction centrifuge. A partir des compositions optimisées, des revêtements homogènes en composition ont pu être obtenus.

Les caractérisations chimiques montrent qu'après traitement thermique, les matériaux ne sont pas totalement amorphes. Du carbonate de calcium ainsi que des phases cristallines apparaissent. Bien que les phases cristallisées puissent ralentir la bioactivité des matériaux, elles ne présentent pas de toxicité. Il serait cependant intéressant de suivre l'évolution des phases cristallines lors du refroidissement des matériaux après leur traitement thermique. L'application d'une trempe, pouvant permettre d'éviter la cristallisation de ces phases, serait également à étudier. L'analyse RMN informe de plus que le réseau de verre n'est pas totalement condensé. Il peut donc libérer en solution des ions riches en silicium et phosphore sur le site d'implantation et permettre ainsi la formation de la couche d'hydroxyapatite carbonatée.

Alors que l'intérêt de la couche d'accroche a été constaté macroscopiquement, des tests mécaniques doivent être réalisés dans les études futures pour valider ces observations. Ces caractérisations plus poussées permettraient également d'évaluer la tenue mécanique des revêtements en vue de l'insertion des implants *in vivo*.

## 3. SYSTEME PHOSPHATE DE CALCIUM CAP

Les phosphates de calcium sont des matériaux inorganiques largement utilisés en ingénierie tissulaire osseuse. Plus particulièrement, l'hydroxyapatite, le  $\beta$ -tricalcium phosphate et le phosphate de calcium biphasique entrent dans la composition de nombreux matériaux en vue

d'applications osseuses. Après implantation, l'hydroxyapatite stœchiométrique est peu réactive puisque sa dégradation se produit sur plusieurs dizaines d'années [236]. Cependant, une diminution de sa cristallinité peut augmenter sa solubilité ainsi que sa bioactivité [236,237]. Dans ce contexte, le projet DECaP s'intéresse à l'élaboration de revêtements d'hydroxyapatite faiblement cristallisés.

L'hydroxyapatite stœchiométrique présente une maille cristalline de formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Cette phase est cependant sujette à de nombreuses substitutions cristallines. Les substitutions cationiques impliquent le remplacement total ou partiel des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par des ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ou  $\text{Sr}^{2+}$  notamment. Les substitutions anioniques concernent les ions  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{OH}^-$ . Les ions phosphate peuvent être substitués par des ions  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^-$  ou  $\text{SO}_4^{2-}$  par exemple, et les ions hydroxyle par  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{CO}_3^{2-}$  notamment [238]. De cette façon, les ions carbonate peuvent substituer les ions hydroxyle ou phosphate dans la maille d'HAp, entraînant une carbonatation de type A ou de type B, respectivement. Ces substitutions sont de plus accompagnées de processus de compensation de charge. Dans le cas de l'hydroxyapatite carbonatée, la substitution entraîne la diminution du nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  *via* la formation de lacunes : l'hydroxyapatite est dite déficiente en calcium, et  $n(\text{Ca})/n(\text{P}) < 1,67$ . L'étude de ces substitutions est nécessaire pour contrôler la réactivité et la pureté des matériaux synthétisés.

Cette partie rend compte de l'élaboration des revêtements électrofilés de CaP ainsi que de leur caractérisation morphologique et chimique.

### 3.1. METHODES EXPERIMENTALES

- *Synthèse*

Le chapitre bibliographique a mis en avant différentes synthèses possibles de filaments électrofilés de CaP. Bien qu'une étude rapporte l'élaboration de revêtements électrofilés d'hydroxyapatite sur substrats de TA6V [149], cette dernière a été publiée après le début de ce travail de thèse et à ce moment-là, seules des synthèses de mats autosupportés étaient disponibles. Le choix de la synthèse référence s'est alors porté sur un travail publié en 2014 par J.H. Lee, Y.J. Kim [150] pour deux raisons essentielles : 1) le rapport molaire  $n(\text{Ca})/n(\text{P})$  a été fixé à 1,67 afin d'orienter la synthèse vers la formation d'hydroxyapatite et 2) il a été montré que les matériaux ne présentaient pas de cytotoxicité pour les cellules MC3T3-E1 et que leur prolifération était supérieure sur les filaments que sur le témoin plastique. La synthèse référence a dans un premier temps été reproduite, mais de nombreuses limitations ont été observées. Les mêmes inconvénients liés à la présence de nitrate que ceux détaillés dans le Chapitre II avec le 45S5 ont été constatés. De plus, le polymère de gélatine induit une perte de la morphologie des filaments dans les revêtements après traitement en température. Le protocole présenté sur la Figure III-28, issu de plusieurs travaux d'optimisation, propose donc l'utilisation de précurseurs acétate et du polymère PVA.

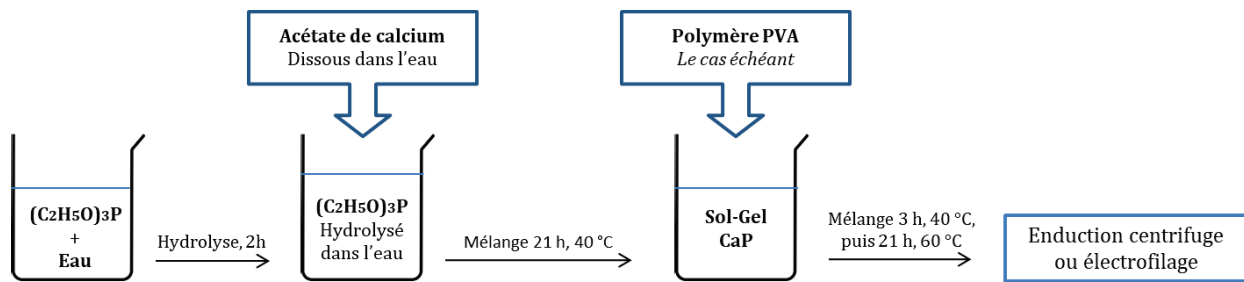


Figure III-28. Protocole de la synthèse sol-gel du phosphate de calcium (Système CaP-Acétate)

Le triéthylphosphite est pré-hydrolysé dans l'eau pendant 2 heures pendant qu'une solution aqueuse d'acétate de calcium est préparée. Les deux solutions sont ensuite mélangées puis agitées à 40 °C pendant 21 heures. Le PVA est alors ajouté sous forme de poudre. La concentration finale en polymère dépend du procédé de mise en forme :  $[PVA] = 7 \text{ \%}_{\text{masse/vol}}$  pour l'électrofilage, alors que  $[PVA] = 1 \text{ \%}_{\text{masse/vol}}$  pour l'enduction centrifuge. En parallèle, un essai d'enduction centrifuge sans ajout de PVA a également été réalisé. Après ajout du polymère, la solution est agitée pendant 3 heures à 40 °C puis pendant 21 heures à 60 °C. La solution finale présente une concentration en calcium de 1,5 M et un rapport molaire  $n(\text{Ca})/n(\text{P})$  de 1,67 qui correspond à celui de l'hydroxyapatite stœchiométrique.

- *Mise en forme*

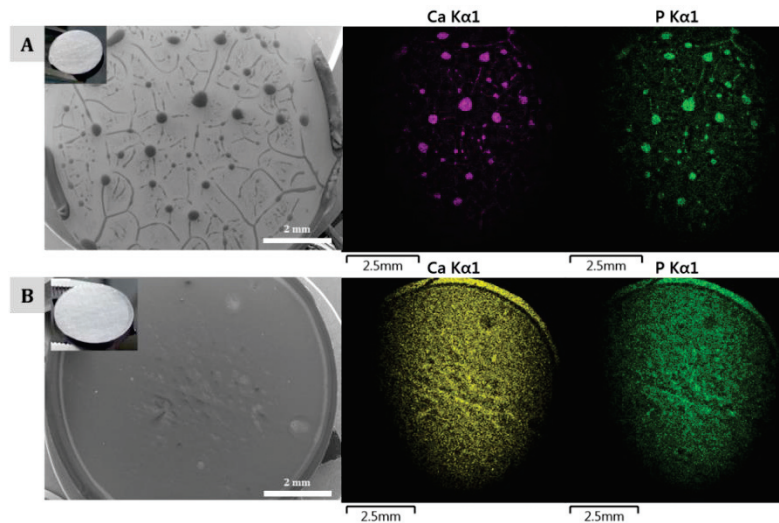
Pour obtenir le matériau sous forme de poudre, la solution préparée est séchée à 60 °C pendant 24 h (dans ce cas,  $[PVA] = 0 \text{ \%}$ ). Les solutions ont également été déposées sur des pastilles de TA6V, soit par enduction centrifuge, soit par électrofilage. Le dépôt par enduction centrifuge est réalisé à 2500 tr/min pendant 60 secondes. Pour le dépôt par électrofilage, la pastille est placée sur un collecteur fixe à une distance de 12 cm de l'aiguille. Afin d'obtenir le jet le plus stable possible, les valeurs de débit sont ajustées et comprises entre 0,05 et 0,12 mL/h, et la tension entre 9,4 et 10,3 kV. Certains échantillons (poudres ou revêtements) sont traités à 550 °C pendant 2 heures.

### 3.2. MORPHOLOGIE DES REVÊTEMENTS AVANT TRAITEMENT THERMIQUE

Lors des premiers essais, le CaP a été synthétisé dans l'éthanol. Ce solvant n'est pas adapté au système à base d'acétate, puisqu'un gel se forme lors du mélange de l'acétate de calcium avec l'éthanol. L'eau a donc été choisie comme solvant dans ce nouveau système. En plus de solubiliser l'acétate de calcium, l'eau favorise également l'hydrolyse du triéthylphosphite et la solubilisation du PVA.

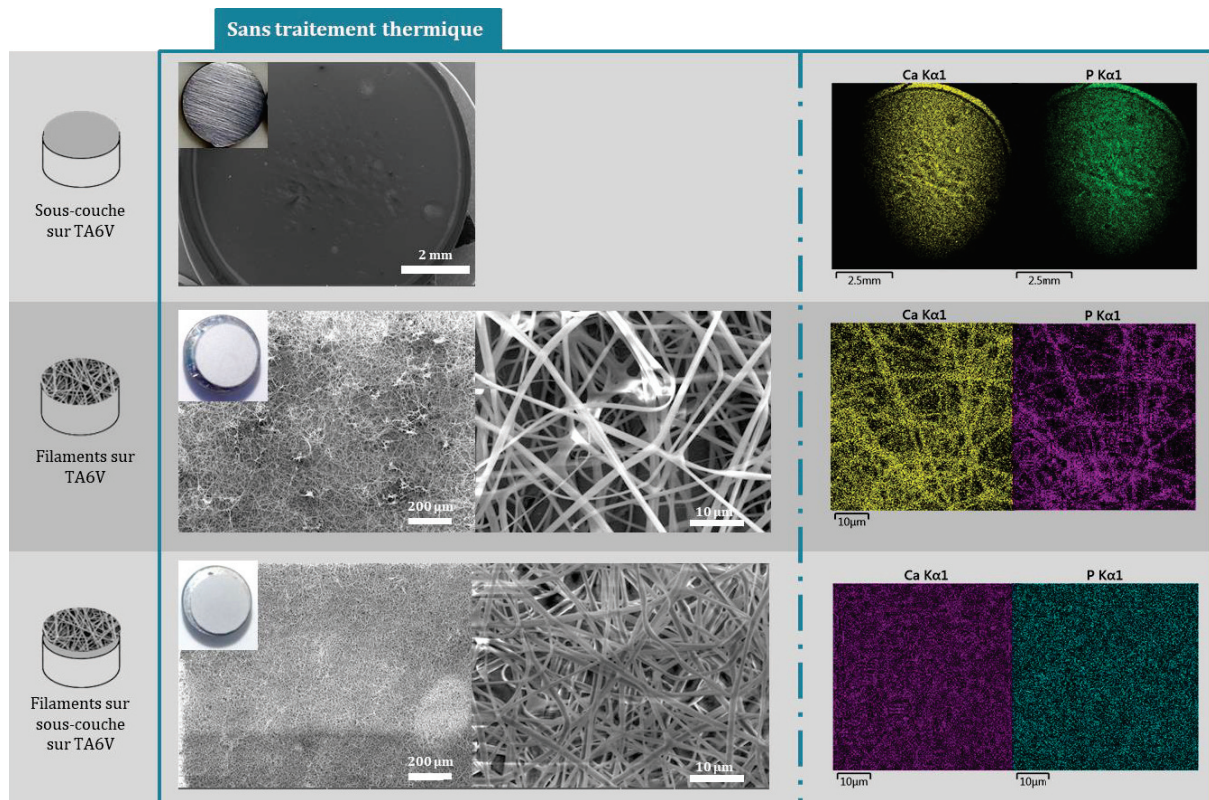
Après synthèse, le sol de CaP est très fluide et une fois déposé par enduction centrifuge, il démouille la surface des pastilles. Il en résulte un revêtement très hétérogène, constitué d'îlots présentant de fortes concentrations en calcium et phosphore (Figure III-29.A). Contrairement au sol de 45S5, celui de CaP ne présente pas d'évolution de ses propriétés rhéologiques dans le temps qui pourrait améliorer la qualité de la couche déposée. Avec l'ajout d'une faible quantité de PVA dans la solution ( $1 \text{ \%}_{\text{masse/vol}}$ ), un dépôt recouvrant a été obtenu avec une répartition très

homogène des espèces Ca et P (Figure III-29.B). Le rapport molaire  $n(\text{Ca})/n(\text{P})$  déterminé dans le revêtement par analyse chimique en EDS est de 1,5.



**Figure III-29.** Images macroscopique et MEB, et cartographie EDS des revêtements lisses de CaP déposés par enduction centrifuge sur des pastilles de TA6V de 1 cm de diamètre. Sol-gel avec A) [PVA] = 0 % et B) [PVA] = 1 %. Echantillons non traités thermiquement

L'électrofilage du sol de CaP est rendu possible par l'ajout d'une concentration en polymère de [PVA] = 7 %<sub>masse/vol</sub>. Les images MEB des filaments obtenus, avec ou sans sous-couche, sont présentés sur la Figure III-30.



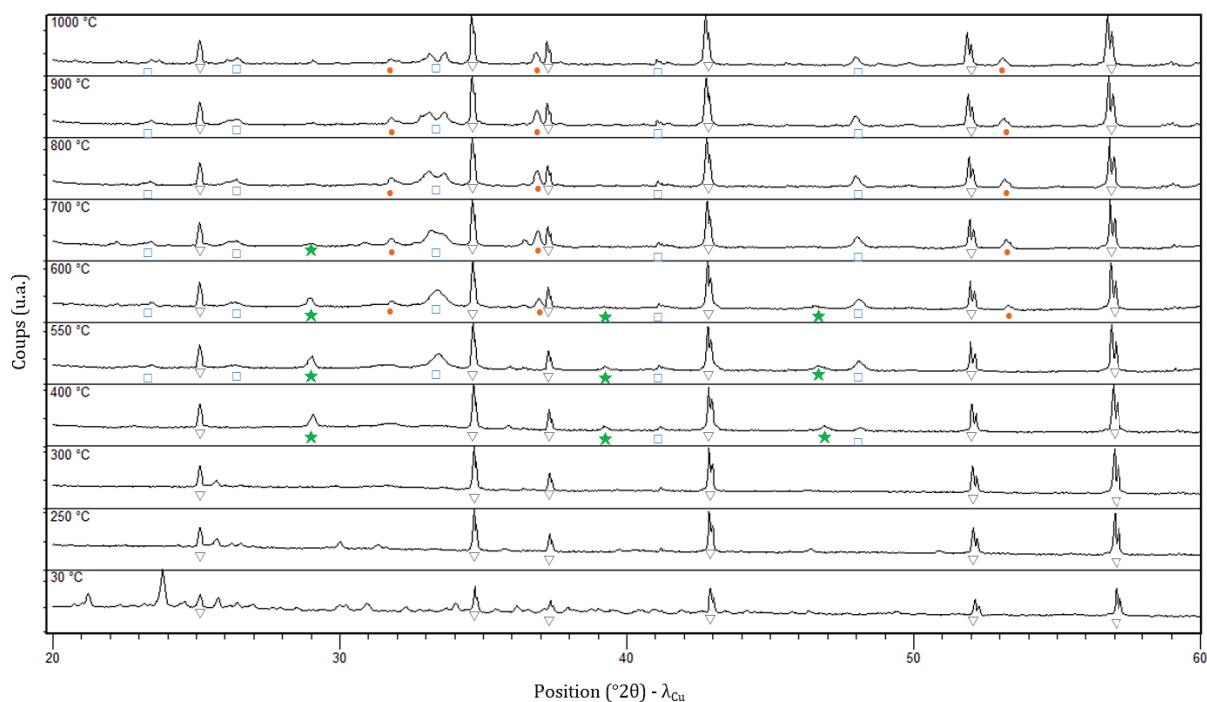
**Figure III-30.** Images macroscopique et MEB, et cartographie EDS des revêtements lisses et électrofilés (avec ou sans sous-couche d'accroche) de CaP déposés sur des pastilles de TA6V de 1 cm de diamètre. Echantillons non traités thermiquement.

La morphologie des filaments est homogène, en particulier lorsqu'une sous-couche est ajoutée. Le diamètre des filaments n'est pas modifié par la présence de la sous-couche d'accroche. Une analyse d'image (40 mesures sur 3 échantillons) a permis de déterminer un diamètre moyen de  $(1,3 \pm 0,3) \mu\text{m}$ .

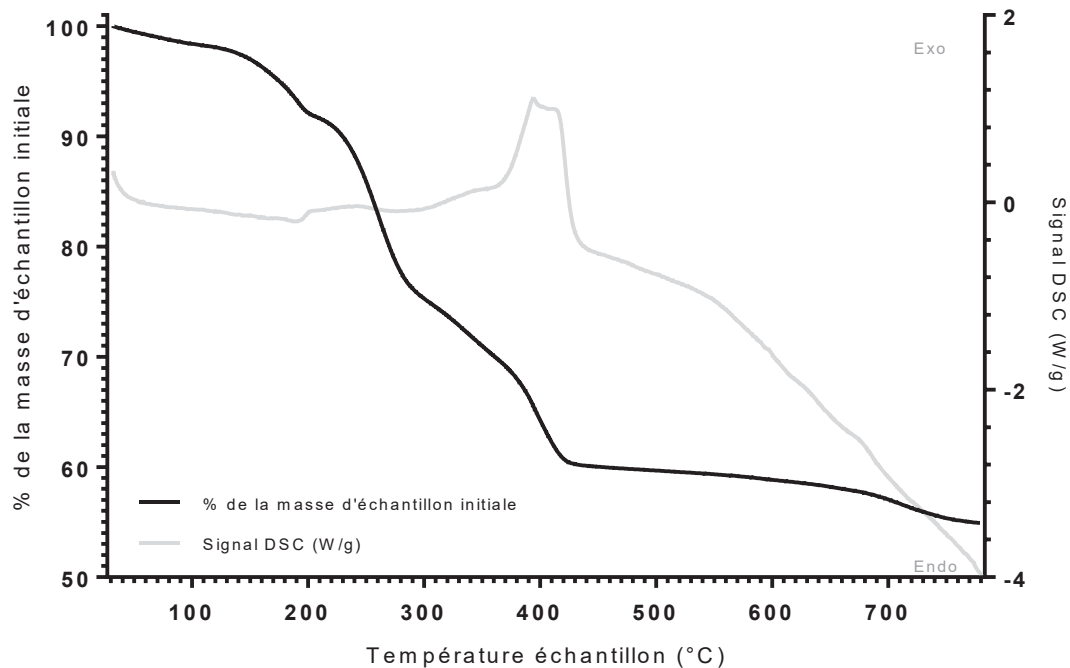
De plus, la répartition des éléments calcium et phosphore est non seulement homogène sur la couche lisse, mais également au sein même des filaments. Notons que pour l'échantillon comportant une sous-couche d'accroche et les filaments, on ne parvient pas à distinguer les filaments par analyse EDS car les ions calcium et phosphore de la sous-couche sont également détectés.

### 3.3. EVOLUTION DU SOL DE CaP EN TEMPERATURE ET CHOIX DE LA TEMPERATURE DE TRAITEMENT THERMIQUE

Afin d'évaluer le comportement thermique des matériaux, des analyses par DRX en température et ATG-DSC ont été réalisées sur poudre. Il est en effet difficile d'obtenir des quantités de filaments suffisantes pour les analyser directement par ces techniques. Les diffractogrammes enregistrés sont présentés sur la Figure III-31 et les courbes d'ATG-DSC sur la Figure III-32.



**Figure III-31.** Diffractogrammes *in situ* en température de la poudre dérivée du sol de CaP à base d'acétate. Les phases identifiées sont signalées par :  $\nabla$  Substrat de corundum  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (PDF # 00-046-1212) ;  $\star$  Carbonate de calcium calcite  $\text{CaCO}_3$  (PDF #00-005-0586) ;  $\bullet$  Oxyde de calcium lime  $\text{CaO}$  (PDF #01-082-1690) ;  $\blacktriangle$  Acétate de calcium hydraté (PDF #00-019-0200) ;  $\square$  Phase de phosphate de calcium



**Figure III-32.** Thermogrammes ATG-DSC de la poudre dérivée du sol de CaP à base d'acétate. Analyse sous air à 5 °C/min

Pour les analyses de DRX en température, la poudre a été déposée sur un substrat d'alumine  $Al_2O_3$  dont les pics caractéristiques sont visibles sur les diffractogrammes, avec un décalage compris entre 0,5 et 0,9  $^{\circ}2\theta$  par rapport à la fiche PDF choisie comme référence (PDF #00-046-1212). Ce décalage est dû à un écart entre la mise à zéro de l'axe Z du goniomètre et la position réelle de l'échantillon. Malgré la forte contribution du substrat d'alumine, d'autres espèces peuvent être identifiées. Leur identification prend en compte le décalage des pics observé sur le substrat.

Au cours de la montée en température, le thermogramme fait apparaître une perte de masse de 30 à 315 °C, associée à un signal endothermique. Dans la littérature disponible sur les hydroxyapatites, ce phénomène a été associé à une déshydratation de l'eau de surface et de l'eau de structure [128,239–241]. L'acétate de calcium (PDF #00-019-0200) est identifié dans le diffractogramme enregistré à 30 °C. Les signaux dus à cette phase (pics à 21,2 et 23,8  $^{\circ}2\theta$  et massifs entre 25,7 et 27,01  $^{\circ}2\theta$  et entre 30,02 et 31,0  $^{\circ}2\theta$ ) diminuent en température jusqu'à disparaître à 400 °C. Entre 315 et 445 °C environ, une perte de masse associée à un pic exothermique apparaît en ATG-DSC. Ce phénomène est attribué à la décomposition des acétates en carbonates, ainsi qu'à la décomposition des chaînes organiques restantes sur les molécules de TEPI. En effet, à partir de 400 °C, une phase de  $CaCO_3$  (PDF #00-005-0586) apparaît en DRX, avec des pics à 28,9, 39,3 et 46,8  $^{\circ}2\theta$ . Au-delà de 550 °C, le signal dû aux carbonates diminue en intensité, jusqu'à disparaître à 700 °C. En parallèle de cette décomposition, l'oxyde de calcium se forme dans l'échantillon (PDF #01-082-1690) et apparaît à partir de 600 °C à 31,9, 37,0 et 53,2  $^{\circ}2\theta$ . Ce résultat est cohérent avec l'analyse thermogravimétrique, selon laquelle la conversion des carbonates en oxydes commence autour de 550-600 °C (perte de masse associée à un pic endothermique). L'oxyde de calcium est conservé jusqu'à 1000 °C en DRX. D'autres signaux, indiqués par des carrés bleus sur la Figure III-31, sont attribués à la cristallisation d'une

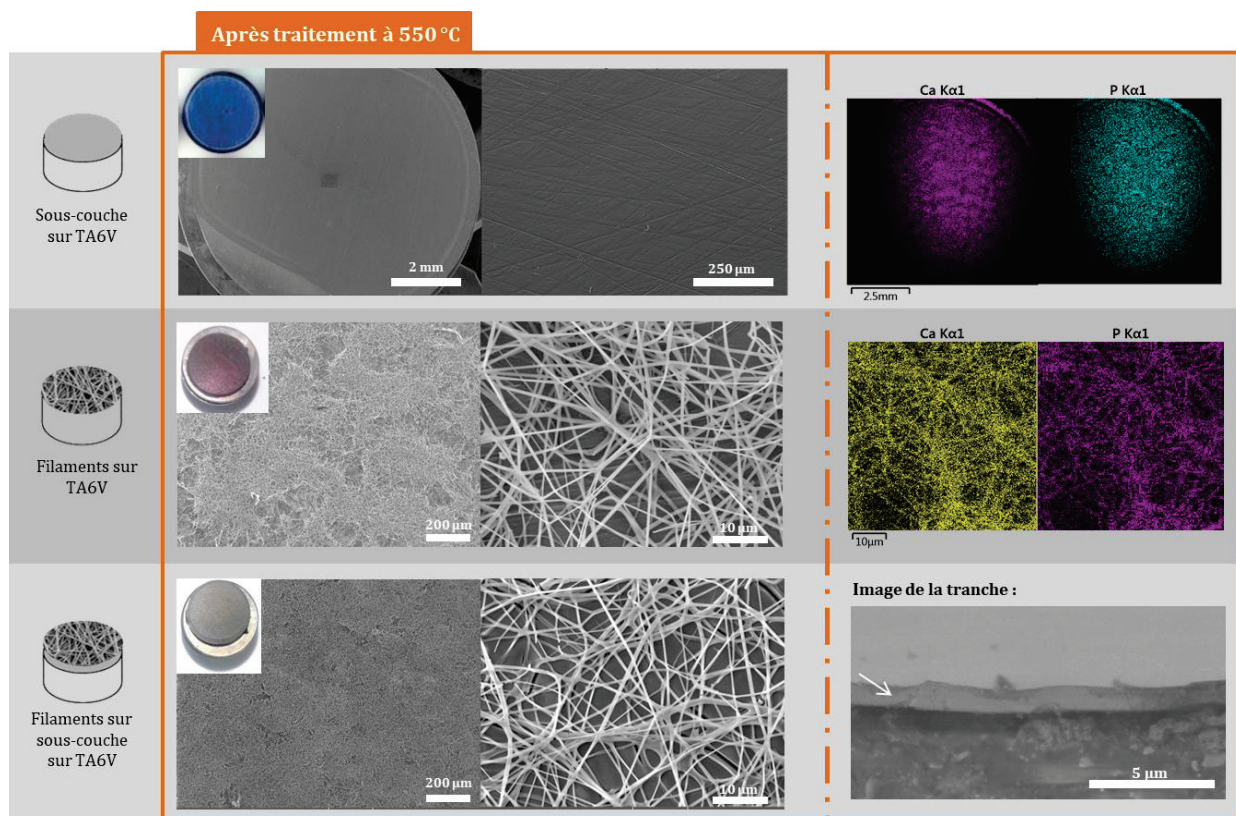
phase de phosphate de calcium, probablement de l'apatite. Cependant, les pics sont peu définis et une analyse plus poussée est présentée dans la partie 1.4.2. pour identifier cette phase.

D'après ces analyses en température, un traitement à 550 °C, déjà choisi pour le système 45S5, est donc également adapté pour cette synthèse de phosphate de calcium. Cette température permet la décomposition du polymère et des acétates, mais également d'éviter la formation d'oxyde de calcium. Enfin, la phase de phosphate de calcium cristallisée commence à apparaître à partir de 400 °C en DRX. Un traitement à 550 °C permettrait donc d'éviter une cristallisation trop importante de cette phase, et donc de préserver une meilleure réactivité.

### 3.4. CARACTERISATION DES MATERIAUX APRES TRAITEMENT THERMIQUE

#### 3.4.1. Caractérisation morphologique

La Figure III-33 rassemble les observations morphologiques des revêtements lisses et électrofilés après leur traitement à 550 °C.



**Figure III-33.** Images macroscopique et MEB, et cartographie EDS des revêtements lisses et électrofilés (avec ou sans sous-couche d'accroche) de CaP déposés sur des pastilles de TA6V de 1 cm de diamètre. Echantillons traités à 550 °C. Pour les revêtements électrofilés sur une sous-couche, une observation de la tranche permet de visualiser l'épaisseur du revêtement (indiqué par une flèche blanche).



Après traitement thermique, la couche déposée par enduction centrifuge conserve son intégrité et aucune fissure n'est observée. Les filaments déposés directement sur TA6V ou sur la sous-couche conservent leur morphologie. Avec le traitement thermique, le diamètre moyen des filaments est cependant réduit à environ  $(0,7 \pm 0,2) \mu\text{m}$ , contre  $(1,3 \pm 0,3) \mu\text{m}$  avant traitement (40 mesures sur 3 échantillons). Des effets de retraits surfaciques apparaissent de plus en l'absence de sous-couche et entraînent la formation de zones plus ou moins denses en filaments. En plus de limiter cet effet, la présence de la sous-couche permet également de limiter l'oxydation du substrat (différence de coloration des substrats). L'épaisseur du revêtement composé d'une sous-couche et des filaments a été estimée à  $1 \mu\text{m}$  par analyse d'image sur la section du revêtement (Figure III-33). Enfin pour ce revêtement, un rapport  $n(\text{Ca})/n(\text{P}) = 1,7$  a été déterminé par EDS.

### 3.4.2. Caractérisation chimique

Le spectre obtenu par infrarouge ainsi que l'attribution des différents signaux sont représentés sur la Figure III-34.

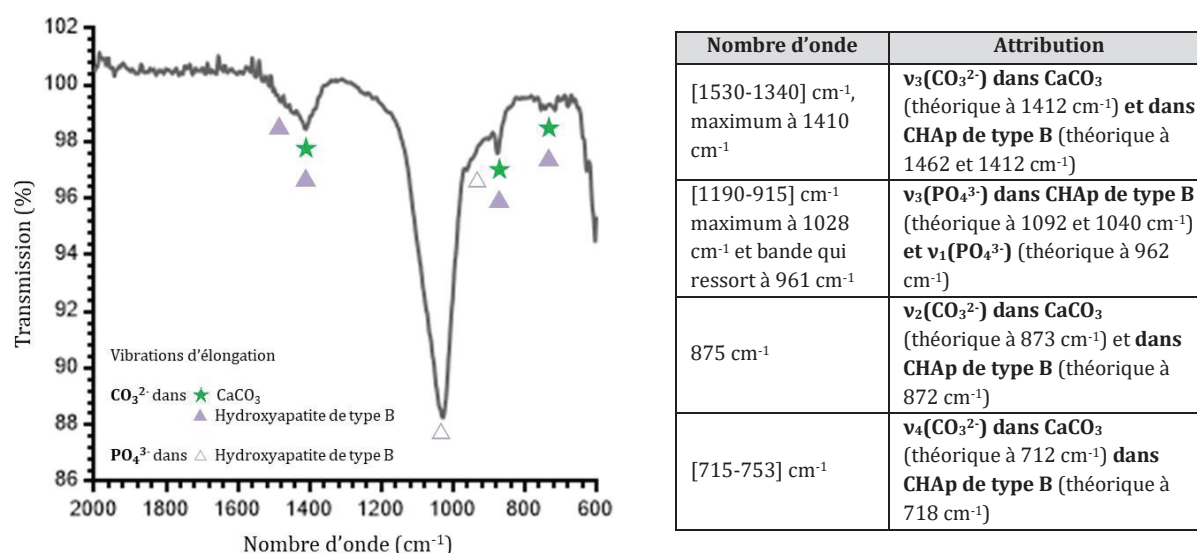
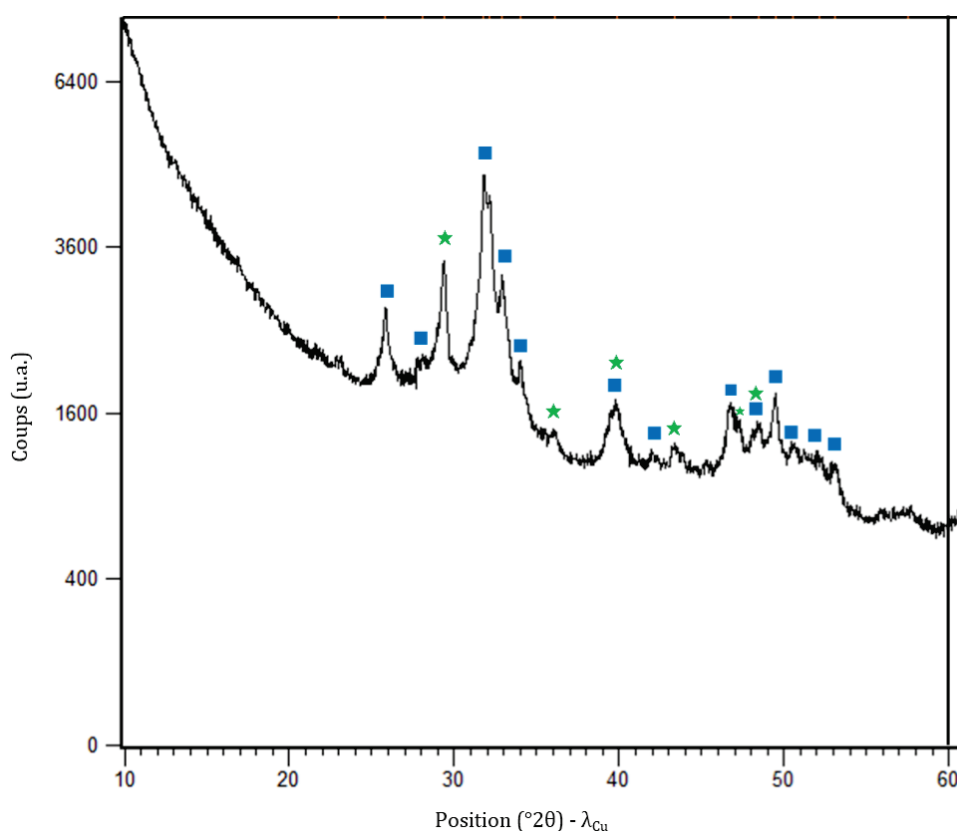


Figure III-34. Spectre IRTF de la poudre de CaP traitée à 550 °C, et attribution des différents signaux (attribution basée sur les références [14,176] et sur le spectre expérimental du carbonate de calcium présenté dans l'Annexe 5)

Le protocole de synthèse ainsi que les analyses précédentes par ATG-DSC et DRX permettent de supposer la présence de carbonates de calcium dans le matériau après traitement à 550 °C. Les signaux à 1410, 875 et autour de 715  $\text{cm}^{-1}$ , présents sur le spectre IR, sont en accord avec cette hypothèse. Ces mêmes signaux correspondent également à la présence d'ions carbonate dans les sites B d'une hydroxyapatite. Le spectre infrarouge expérimental ne semble pas supposer la présence d'hydroxyapatite carbonatée en site A, en raison de l'absence d'une bande à 1543  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$  des carbonates en sites A). La relocalisation des carbonates des sites B aux sites A se produit en température [14], mais ne semble donc pas se produire à 550 °C dans nos conditions de synthèse. De plus, la large bande entre 1190 et 915  $\text{cm}^{-1}$  est assignée aux ions  $\text{PO}_4^{3-}$  dans l'hydroxyapatite non stœchiométrique. Enfin, les bandes larges laissent supposer une faible

crystallinité de cette phase. L'insertion d'ions carbonate dans l'hydroxyapatite a en effet été reliée à sa perte de cristallinité [239].

La présence de  $\text{CaCO}_3$  (PDF #00-005-0586, pic caractéristique à  $29,4^\circ 2\theta$ ) et d'une phase d'hydroxyapatite (PDF #01-072-1243, pic à  $32,8^\circ 2\theta$ ) est confirmée par analyse DRX réalisée sur l'échantillon traité à  $550^\circ\text{C}$  (Figure III-35). Notons cependant que l'analyse DRX ne permet pas de différencier directement une hydroxyapatite stœchiométrique d'une hydroxyapatite carbonatée, information donnée par l'analyse infrarouge. Il est également important de noter l'absence d'une quantité détectable de monoxyde de calcium après traitement à  $550^\circ\text{C}$  (pic caractéristique à  $37,36^\circ 2\theta$  (PDF #00-082-1690)), ou d'autres phases cristallines de CaP. Enfin, la largeur importante des pics obtenus confirme l'une des conclusions de l'analyse infrarouge : l'apatite obtenue est faiblement cristalline.



**Figure III-35.** Diffractogramme sur poudre de CaP-Acétate, après traitement thermique à  $550^\circ\text{C}$ .  
★ Carbonate de calcium calcite  $\text{CaCO}_3$  (PDF #00-005-0586); ■ Hydroxyapatite (PDF #01-072-1243)

### 3.5. CONCLUSION

Le chapitre bibliographique de cette thèse a permis de mettre en évidence la difficulté d'obtenir des phases pures de phosphates de calcium par synthèse sol-gel *in situ*. Notre protocole permet d'obtenir une hydroxyapatite carbonatée de type B. Cette carbonatation limite la cristallinité de la phase d'apatite, à l'origine d'une meilleure dissolution du matériau *in vitro* et *in vivo* [239]. De plus, l'hydroxyapatite composant l'os humain est naturellement carbonatée, avec une quantité de carbonates d'environ 4 à 8 %<sub>massique</sub>. Pour une grande variété d'espèces, la substitution la plus courante dans l'os est celle de type B [239]. Les matériaux synthétisés à partir de précurseurs

acétate sont donc particulièrement adaptés à l'application visée. En plus de l'hydroxyapatite carbonatée, les matériaux synthétisés contiennent également du carbonate de calcium, phase étudiée pour ses propriétés biologiques. Pour compléter les analyses chimiques, des caractérisations réalisées directement sur les revêtements plutôt que sur poudre doivent être envisagées comme perspective, afin d'évaluer l'influence de la mise en forme du matériau sur sa composition. Comme pour le 45S5, les propriétés mécaniques des revêtements doivent également être évaluées. Enfin, les matériaux obtenus présentent des filaments homogènes. L'intérêt d'allier cette morphologie avec la composition de CHAp est étudié dans le chapitre suivant, par l'étude *in vitro* du comportement biologique des revêtements.

## CONCLUSION

L'utilisation de précurseurs acétate dans les synthèses sol-gel permet de préparer des matériaux de compositions souhaitées, à la fois dans le cas du 45S5 et du phosphate de calcium. Après mise en forme par électrofilage, des filaments homogènes sont obtenus. L'ajout d'une sous-couche par enduction centrifuge permet d'améliorer l'accroche des filaments au substrat de TA6V, mais également de limiter l'oxydation de ce dernier et d'éviter tout retrait surfacique du revêtement. Par ailleurs, en déposant uniquement une couche par enduction centrifuge, des revêtements lisses peuvent être préparés. Une comparaison biologique avec les revêtements fibreux est alors rendue possible ; cette étude est le sujet du Chapitre IV, dans lequel les deux compositions chimiques sont également comparées.



# **Chapitre IV**

**EVALUATION BIOLOGIQUE DES REVETEMENTS  
DEPOSES SUR DISQUES PLANS DE TA6V**



## INTRODUCTION

Un biomatériau peut être défini comme « un matériau destiné à interagir avec des systèmes biologiques pour évaluer, traiter, augmenter ou remplacer un tissu, un organe, ou une fonction du corps » (Williams, 1999) [242]. En ce sens, le processus d'élaboration de biomatériaux implique d'évaluer leur performance biologique avant d'envisager une utilisation clinique. La « biocompatibilité », terme couramment utilisé bien qu'un peu vague, rend compte de cette performance. La biocompatibilité d'un matériau est estimée par différentes observations et mesures qualitatives et quantitatives [243]. Dans le domaine de l'implantologie par exemple, Hench rapporte quatre types de réponses du tissu hôte face à l'insertion d'un corps étranger : 1) la mort des cellules alentour de l'implant est causée par un matériau cytotoxique, 2) un tissu fibreux d'épaisseur variable peut se former autour d'un matériau s'il est non toxique et biologiquement inactif, mais capable d'induire une inflammation chronique, 3) une liaison interfaciale peut apparaître entre le tissu hôte et un matériau non toxique et biologiquement actif, et 4) un matériau non toxique résorbable peut être remplacé par le tissu néoformé [244]. L'évaluation des propriétés biologiques d'un biomatériau peut être réalisée dans un premier temps *in vitro*, c'est-à-dire *via* l'utilisation de cultures cellulaires dans des conditions artificielles définies et contrôlées. L'adhésion, la viabilité, la morphologie, la prolifération, la colonisation ainsi que la différenciation cellulaires sont couramment étudiées dans ce cas [242].

Dans ce projet de thèse, les matériaux ont été développés pour des applications en implantologie, et plus spécifiquement au contact de l'os. Ces contacts peuvent se faire au niveau de prothèses orthopédiques ou bien entre l'os de la mâchoire et un implant dentaire. Ces deux applications médicales ont donc été envisagées. Ce Chapitre IV est consacré à l'étude de la biocompatibilité des revêtements élaborés dans le cadre de cette thèse. Une première partie théorique est consacrée à la description des tissus impliqués dans les deux types d'applications visées, *i.e.* orthopédique et odontologique. Les résultats expérimentaux des tests acellulaires et des tests *in vitro* sont ensuite développés, comme une première investigation de la performance biologique des matériaux développés. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec Sandra Balvay, technicienne au laboratoire MATEIS, et Nina Attik, ingénieure de recherche CNRS au laboratoire LMI.

## 1. LE TISSU OSSEUX ET SON ENVIRONNEMENT DENTAIRE

### 1.1. COMPOSITION ET REMODELAGE DU TISSU OSSEUX [13,245,246]

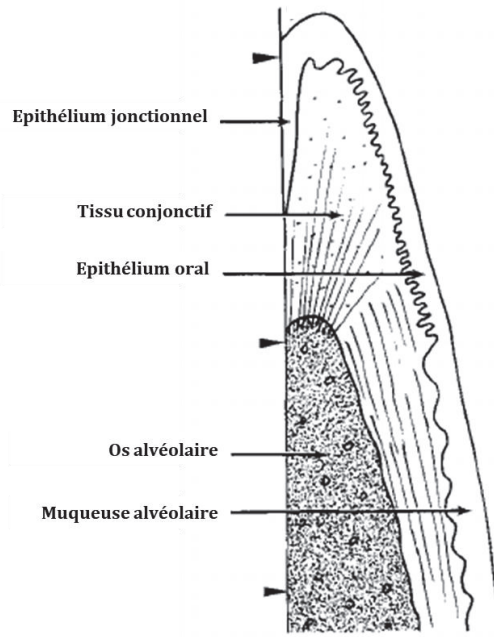
Quatre grands types de tissus sont retrouvés chez tous les vertébrés : ils peuvent être épithéliaux, conjonctifs, musculaires et nerveux. La distinction entre ces tissus repose sur leurs origines embryonnaire, leurs propriétés fonctionnelles ainsi que sur l'agencement des cellules entre elles [247]. En particulier, le tissu conjonctif est un ensemble de cellules non jointives dans une matrice cellulaire développée. Le tissu osseux entre dans cette catégorie. L'os présente une architecture complexe avec des zones denses (« os compact ») entourant des réseaux légers d'os trabéculaire. Ce tissu conjonctif croît par apposition, c'est-à-dire par dépôt progressif de matrice sur des surfaces libres par des cellules appelées ostéoblastes. Cette croissance peut suivre deux voies différentes : l'ossification endochondrale (cas des os longs) ou l'ossification membranaire



(cas des os plats). Dans le cas de l'ossification membranaire, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules précurseurs mésenchymateuses dérivées de la crête neurale. Pour l'ossification endochondrale, les ostéoblastes proviennent de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire ou adipocytaire. La matrice osseuse sécrétée par les ostéoblastes est composée essentiellement de fibres (collagène de type I et faibles quantités de collagène de type III et IV) et de minéraux, principalement des phosphates de calcium. Les ostéoblastes synthétisent également des protéines matricielles, des protéoglycanes ainsi que des molécules régulatrices solubles et des cytokines. De l'eau entre également dans la composition de cette matrice extracellulaire. Les ostéoblastes qui déposent cette matrice peuvent soit rester libres à la surface, soit être peu à peu inclus dans leur propre sécrétion. Dans ce cas, les ostéoblastes deviennent alors des ostéocytes, cellules qui ne peuvent plus se diviser mais qui possèdent une faible activité métabolique. De plus, les ostéocytes sont contenus dans des lacunes et sont liés entre eux par des prolongements cellulaires contenus dans des canaux minuscules appelés canalicules. Des vaisseaux sanguins et des nerfs parcourent également ce tissu, maintenant les cellules de l'os vivantes et réactives lorsque l'os est endommagé. Enfin, l'os est remodelé en permanence par les actions contraires des ostéoblastes, formateurs de nouvelle matrice, et des ostéoclastes, qui dégradent l'ancienne.

## **1.2. L'ENVIRONNEMENT DENTAIRE**

Les implants dentaires sont fixés sur l'os alvéolaire qui entoure et maintient la dent sur l'arcade maxillaire et la mandibule. Les parois alvéolaires sont bordées d'os compact et les zones inter-alvéolaires contiennent de l'os spongieux. Cependant, l'élaboration d'implants dentaires nécessite de prendre en compte l'architecture du parodonte, qui correspond à l'ensemble des tissus de maintien de la dent. Un implant dentaire n'est en effet pas seulement en contact avec l'os alvéolaire, mais il l'est également avec différents tissus alentours, et plus particulièrement avec l'épithélium jonctionnel et le tissu conjonctif, comme illustré sur la Figure IV-1 [248-250]. La gencive est une partie de la muqueuse buccale et constitue aussi la partie la plus périphérique du parodonte. Au niveau du collet des dents, la gencive entoure ces dernières et forme un anneau nommé l'épithélium jonctionnel, comprenant des cellules épithéliales [251]. Le tissu conjonctif est le tissu prédominant de la gencive. Il est composé de fibres de collagène (60 % du volume tissulaire, majoritaire face aux autres types de fibres), de fibroblastes (5 %), ainsi que de vaisseaux et de nerfs inclus dans une matrice extracellulaire (35 %). Les fibroblastes représentent 65 % de la population cellulaire du tissu conjonctif du corps humain et sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif [252].



**Figure IV-1.** Interface entre un implant et les tissus parodontaux. La surface de l'implant est indiquée par les triangles noirs. Adapté de [250]

L'ostéo-intégration de l'implant, définie comme la « jonction anatomique et fonctionnelle directe entre l'os vivant remanié et la surface de l'implant mis en charge » (Brånemark *et al.*, 1985), comprend différentes étapes de réparation et de remodelage osseux. Les tissus péri-implantaires (gencive et os) formés autour de l'implant permettent son ostéo-intégration ainsi que son maintien.

### 1.3. MODELES CELLULAIRES POUR LES TESTS *IN VITRO*

L'interaction cellules-matériaux a été évaluée dans un premier temps avec des cellules MG-63. Cette lignée cellulaire humaine, obtenue à partir d'ostéosarcomes, est utilisée comme un modèle standard dans le domaine de la recherche osseuse. Bien que des ostéoblastes primaires humains (HOB) soient parfaitement adaptés à cette étude, la grande variabilité de leurs caractéristiques, dépendantes des donneurs, peut induire un manque de reproductibilité dans les résultats. Les MG-63 sont donc intéressantes pour une première investigation. Ces cellules partagent des caractéristiques communes avec les ostéoblastes primaires, telles que l'expression de la plupart des sous unités de l'intégrine, une organisation similaire des structures cellulaires internes et l'adhésion aux surfaces modifiées physico-chimiquement. De plus, comparée aux cellules primaires, la lignée cellulaire immortalisée MG-63 est facilement entretenue lors des différents passages en culture cellulaire. Enfin, elle possède un fort taux de prolifération ainsi qu'une relative stabilité phénotypique. Ces caractéristiques permettent un grand nombre de répétitions des tests biologiques et la reproductibilité des résultats [253].

Concernant l'application en implantologie dentaire, les MG-63 sont également adaptées pour mimer l'interaction cellule-os alvéolaire. Parallèlement à ces cellules, des fibroblastes gingivaux ont également été étudiés. Ils permettent d'évaluer la réponse des tissus entrant en contact avec l'implant au niveau du col implantaire. En effet, les fibroblastes sont les cellules majoritaires du

tissu conjonctif, et également les moins spécialisées. Elles sont contenues dans l'ensemble du tissu conjonctif de l'organisme, et lorsqu'un tissu est lésé, elles prolifèrent, migrent vers la blessure et produisent de grandes quantités de matrice de collagène qui contribue à isoler et réparer le tissu lésé. De plus, son caractère différencié peut être adapté *in vitro*, puisque des interconnexions sont possibles vers les cellules osseuses, les cellules adipeuses, les cellules du muscle lisse et les cellules cartilagineuses. Les fibroblastes sont aussi facilement cultivés *in vitro*, raison pour laquelle ils sont très utilisés pour les études de biologie cellulaire [13].

## 2. PARTIE EXPERIMENTALE

Dans ce chapitre, les matériaux obtenus dans le système 45S5 à partir de précurseurs acétate et nitrate sont notés 45S5-Acétate et 45S5-Nitrate, respectivement. De même, les revêtements dans le système CaP, synthétisés avec des précurseurs acétate, sont notés CaP-Acétate. Les revêtements obtenus par enduction centrifuge sont considérés comme non rugueux, et sont donc notés 45S5-Acétate-Lisse ou CaP-Acétate-Lisse. Au contraire, les revêtements obtenus par électrofilage sur une couche humide déposée par enduction centrifuge sont notés 45S5-Acétate-Filaments, 45S5-Nitrate-Filaments et CaP-Acétate-Filaments.

L'évolution du pH lors de l'immersion des échantillons dans le milieu de culture a été étudiée à un stade de la thèse où les revêtements électrofilés n'étaient pas encore aboutis. Pour cette raison, dans cette étude, seuls les échantillons lisses de 45S5-Acétate et de CaP-Acétate ont été testés, ainsi que la pastille brute de TA6V. Les principales considérations pour la préparation de ces revêtements sont rassemblées dans le Tableau IV-1. Les protocoles de préparation des substrats, de dépôt par enduction centrifuge et de traitement thermique sont détaillés dans les Techniques Expérimentales.

	45S5-Acétate-Lisse	CaP-Acétate-Lisse
<b>Substrat</b>	TA6V poli P240 + Traitement plasma	TA6V poli P240 + Traitement plasma
<b>Composition de la solution déposée</b>	<p>[Si] = 0,85 M</p> <p>Avec</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (molaire) = 8 : 60 : 32 dans le sol initial</li> <li>• TEOS:GPTMS (molaire) = 77 : 23</li> <li>• Si/Ca = 1,7; Si/Na = 0,90 et Si/P = 8,9 (rapports molaires)</li> </ul> <p><i>Précurseurs : acétate de Ca, acétate de Na, triéthylphosphite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvant : Eau</li> </ul> <p><i>Protocole utilisé Chapitre III, partie 2.1.2.</i></p>	<p>PVA = 1 %<sub>masse/vol</sub></p> <p>[Ca] = 1,5 M</p> <p>Avec</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• n(Ca)/n(P) = 1,67</li> </ul> <p><i>Précurseurs : acétate de Ca, triéthylphosphite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvant : Eau</li> </ul> <p><i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 2.2.1</i></p>
<b>Paramètres de dépôt par enduction par centrifuge</b>	2000 tr/min, 30 s, 200 tr/min/s <sup>2</sup>	
<b>Traitement thermique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vieillessement : 18 h à 60 °C (atmosphère humide)</li> <li>• Calcination : 2 h à 550 °C (rampe 1 °C/min)</li> </ul>	2 h à 550 °C (rampe 1 °C/min)
<b>Stérilisation</b>	Traitement thermique à 180 °C pendant 2h30 (atmosphère sèche)	

Tableau IV-1. Conditions expérimentales pour la préparation des revêtements lisses déposés sur les pastilles de TA6V, dans le but d'étudier la variation de pH du milieu de culture lors de l'immersion de ces matériaux

Pour les mesures d'angle de contact et les tests cellulaires, les revêtements ont été préparés à la fois sous forme lisse et électrofilée, en suivant les optimisations présentées dans le Chapitre II et dans le Chapitre III pour les systèmes nitrate et acétate, respectivement. Pour cette raison, les détails de leur préparation sont rassemblés dans l'Annexe 6. Des contrôles ont également été ajoutés : des lames de verre, couramment utilisées dans les évaluations *in vitro*, ainsi que des pastilles de TA6V, non traitées ou traitées thermiquement à 550°C (température utilisée pour le traitement des systèmes acétate) ou à 800 °C (température utilisée pour le traitement des systèmes nitrate). Tous les protocoles des tests acellulaires et cellulaires ainsi que le détail sur les tests statistiques sont rassemblés dans les Techniques Expérimentales.

### 3. TESTS PRELIMINAIRES ACELLULAIRES

#### 3.1. EVOLUTION DU PH

Au cours des études *in vitro*, le pH du milieu de culture est maintenu constant grâce à un effet tampon. Il est néanmoins nécessaire de vérifier que l'immersion des échantillons dans ce milieu n'implique par une variation importante de son pH, effet qui pourrait être nocif pour les cellules. Un pH d'environ 7,4 est idéal pour la plupart des cellules humaines. Cette valeur de pH est de plus celle du sang humain.

Les résultats expérimentaux montrent que le pH diminue faiblement sur une durée de 7 jours, et ce pour tous les échantillons (TA6V, revêtement de 45S5-Acétate-Lisse et revêtement de CaP-Acétate-Lisse), mais également pour le milieu ne contenant pas de matériaux (Figure IV-2). Pour le milieu sans échantillon par exemple, le pH, initialement à 7,46, diminue à 7,23 après 7 jours d'immersion. Cette évolution peut être attribuée à une formation d'acide carbonique par solvatation dans l'eau du CO<sub>2</sub> environnant. Notons que ces évolutions sont faibles par rapport à la précision de la mesure de pH, que nous avons estimée à environ 0,05-0,1 unité pH. L'incertitude sur cette mesure est cependant difficile à évaluer précisément puisqu'elle dépend fortement de la qualité de l'étalonnage.

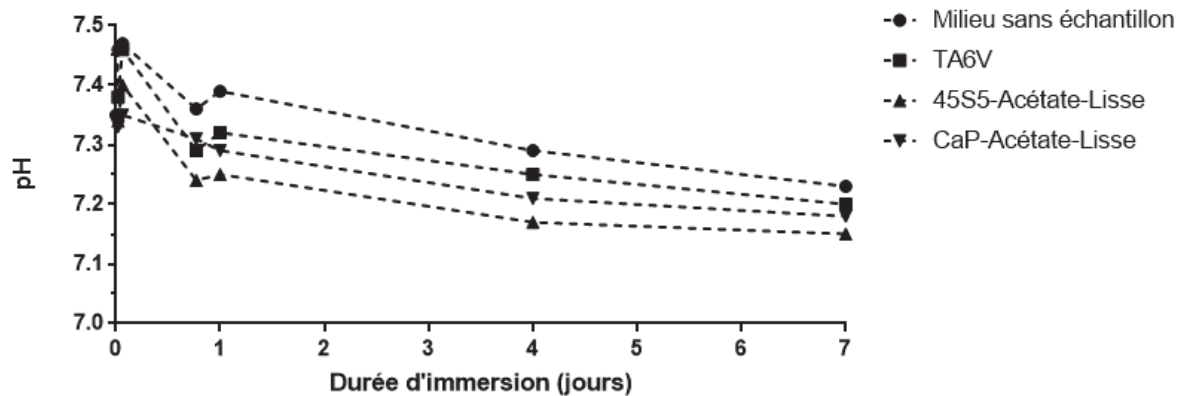
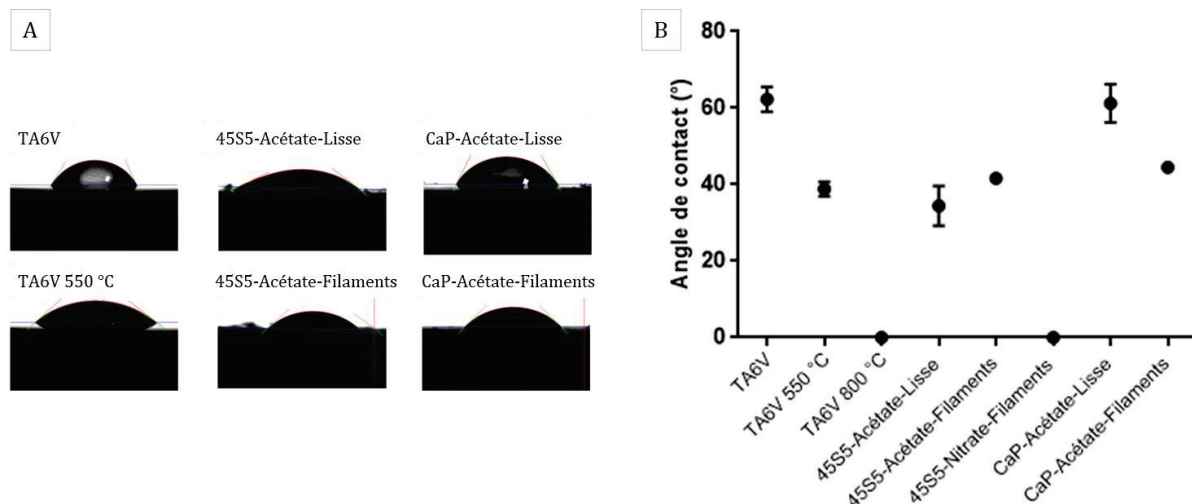


Figure IV-2. Evolution du pH du milieu de culture en l'absence ou en présence de TA6V brut ou de TA6V recouvert d'un revêtement lisse de 45S5-Acétate ou de CaP-Acétate

La Figure IV-2 montre également que la présence des échantillons semble diminuer faiblement le pH du milieu d'immersion. Ces évolutions peuvent être associées à des interactions de surface, en particulier à des phénomènes d'adsorption d'électrolyte à la surface des substrats ou à des phénomènes de dissolution pour les biocéramiques. Des analyses de surface, électrochimiques ou des dosages du milieu seraient nécessaires pour avancer des hypothèses plus précises. Malgré l'acidification du milieu, les variations de pH restent faibles avec l'ajout des échantillons, et ce sur une durée de 7 jours : les différents matériaux paraissent donc adaptés pour une étude *in vitro*.

### 3.2. ANGLE DE CONTACT

*In vitro*, l'adhésion des cellules, notamment des fibroblastes et des cellules ostéoblastiques, est favorisée sur les substrats qui sont modérément à fortement hydrophiles. Cette hydrophilie des matériaux permet l'adsorption des protéines telles que la fibronectine [254]. Cependant, les surfaces extrêmement hydrophiles inhibent l'adhésion des cellules. Au contraire, les surfaces trop hydrophobes entraînent des dénaturations des protéines adsorbées, qui ne sont alors plus reconnues par les cellules [255]. Plusieurs études estiment que l'adhésion cellulaire est optimale sur les matériaux à hydrophilie modérée, en particulier pour un angle de contact autour de 40 °. Expérimentalement, les angles de contact mesurés sur les pastilles de TA6V avec et sans revêtements sont tous inférieurs à 90 ° (Figure IV-1).



**Figure IV-3.** A) Images caméra et B) valeurs des angles de contact entre les différents matériaux et l'eau. Sur le graphique, les barres d'erreur représentent les écarts-types sur N=2 mesures.

Toutes les surfaces sont donc considérées comme hydrophiles. En particulier, les revêtements de 45S5-Acétates lisses et électrofilés présentent une hydrophilie modérée (angle de contact de 34 et 42 ° respectivement). De même, l'angle de contact mesuré sur le revêtement électrofilé de CaP-Acétate est de 44 °, alors que celui mesuré pour le revêtement lisse de même composition est de 61 °, très proche de celui du TA6V (62 °) reconnu pour sa biocompatibilité. Ces matériaux présentent donc une hydrophilie adaptée à l'adhésion cellulaire. Cependant, le TA6V traité à 800 °C ainsi que le 45S5-Nitrate-Filaments présentent un angle de contact si faible que la valeur de 0 ° a été retenue. Comme évoqué précédemment, cette grande hydrophilie peut réduire ou/et empêcher l'adhésion cellulaire.

## 4. CYTOTOXICITE ET PROLIFERATION CELLULAIRE

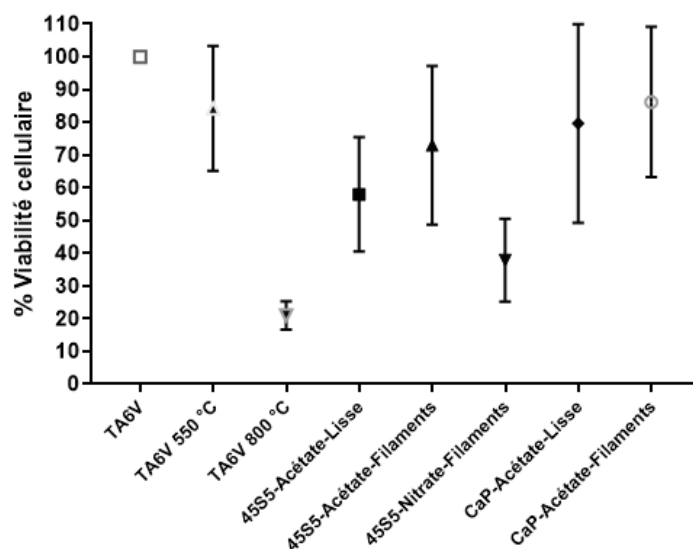
### 4.1. CYTOTOXICITE DES MATERIAUX

Afin d'évaluer l'influence des différents revêtements sur la viabilité cellulaire, une mesure quantitative de cette dernière a été réalisée par le test d'AlamarBlue après un jour de culture des cellules au contact des matériaux. Le principe de cette analyse est de quantifier, par mesure d'absorbance, la résorufine formée dans le milieu par les cellules métaboliquement actives (cf. Techniques Expérimentales, partie 4.1.2). La mesure d'absorbance dépend donc du nombre de cellules présentes ainsi que de leurs activités métaboliques individuelles. Ce type de test, proposant une mesure de la viabilité des cellules *via* leur activité métabolique, est suggéré dans la norme ISO 10 993 encadrant l'évaluation biologique des dispositifs médicaux.

La validité de l'expérience a été vérifiée par l'absence de changement de couleur du réactif de l'Alamar Blue dans un puits de culture sans cellules. Parallèlement, une augmentation de l'absorbance a été confirmée dans le cas de cellules cultivées sur une lame de verre utilisée comme témoin positif. Enfin, les absorbances de tous les échantillons ont été normalisées en fixant la viabilité cellulaire à 100 % sur le TA6V. Ce dernier a été choisi comme contrôle car il sert de substrat aux différents revêtements et sa biocompatibilité est avérée dans la littérature.

#### 4.1.1. Lignée d'ostéoblastes MG-63

Les résultats obtenus avec les MG-63 sont présentés sur la Figure IV-4.



**Figure IV-4.** Viabilité des cellules MG-63 au contact des matériaux après 24 h de culture. Les données résultent de la moyenne sur N=9 reproductions, et les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les viabilités cellulaires ont été normalisées par rapport au substrat de TA6V non revêtu

Le résultat du test statistique ANOVA affiche une valeur-p inférieure à 0,0001, signifiant qu'une différence significative existe entre les groupes étudiés. Le test post hoc permet alors de comparer plus spécifiquement les groupes entre eux.

En se concentrant dans un premier temps sur l'analyse des pastilles de TA6V, il apparaît que l'application d'un traitement thermique à 550 °C n'entraîne pas une diminution statistiquement significative de la cytocompatibilité du matériau ( $p=0,85$ ). L'oxydation du substrat générée par ce traitement semble donc suffisamment faible pour ne pas impacter la viabilité des cellules à sa surface. En revanche, un traitement à une température de 800 °C entraîne une nette diminution de l'activité métabolique des MG-63. Cette dernière est en effet réduite de 79 % par rapport au TA6V brut ( $p<0,0001$ ). Or un matériau est considéré comme cytotoxique pour une diminution d'au moins 30 % de la viabilité cellulaire (norme ISO 10 993). L'hypothèse est faite que cette toxicité est due 1) à la très forte hydrophilie du revêtement (cf. Figure IV-1), empêchant une bonne adhérence cellulaire 2) au détachement des cellules induit par la délamination du substrat sur lequel elles auraient pu adhérer et 3) à la présence de fragments d'oxydes détachés de la surface du TA6V et pouvant détériorer les cellules.

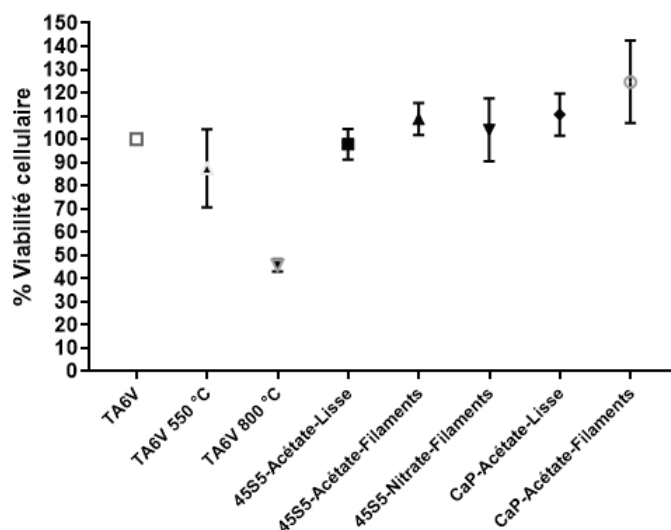
L'effet de l'ajout d'un revêtement par enduction centrifuge dépend de la composition chimique du matériau déposé. Dans le cas du système CaP synthétisé à partir de précurseurs acétate, l'ajout d'une couche lisse n'entraîne pas de différence statistiquement significative de la viabilité cellulaire par rapport au TA6V ou par rapport au TA6V traité à 550 °C ( $p=0,39$  et  $p>0,99$ , respectivement). Au contraire, l'ajout d'une couche lisse dans le système 45S5 synthétisé à partir de précurseurs acétate induit un effet cytotoxique, puisque l'activité métabolique est diminuée de 42 % par rapport au substrat de TA6V ( $p<0,001$ ). Cependant, notons que la comparaison directe des revêtements lisses de CaP-Acétate et de 45S5-Acétate ne montre pas de différence statistiquement significative ( $p=0,33$ ). De plus, dans ces deux systèmes, l'ajout de filaments ne

semble pas influencer significativement la cytotoxicité des revêtements ( $p=0,72$  pour la comparaison des revêtements lisses et électrofilés de 45S5-Acétate, et  $p=0,99$  pour la comparaison des revêtements lisses et électrofilés de CaP-Acétate).

Enfin, le revêtement électrofilé formulé dans le système 45S5 à partir de précurseurs nitrate (traité à 800 °C) présente un effet cytotoxique, puisque l'activité métabolique des cellules diminue de 62 % par rapport au TA6V ( $p<0,0001$ ) et de 35 % par rapport au revêtement électrofilé de 45S5-Acétate ( $p<0,0001$ ). Ce phénomène peut être expliqué par une forte hydrophilie du matériau (cf. Figure IV-1), empêchant l'adhérence cellulaire, ainsi que par l'oxydation du substrat lors de son traitement thermique à 800 °C. La présence des filaments semble cependant atténuer la cytotoxicité des pastilles de TA6V traitées à 800 °C, puisque l'échantillon avec filaments présente une viabilité cellulaire 17 % plus élevée que le substrat de TA6V traité à 800 °C ( $p=0,001$ ). Une hypothèse probable est que dans les zones ne délaminant pas, les cellules sont directement en contact avec des filaments du système 45S5-Nitrate, qui présentent aux cellules une surface chimiquement plus favorable que le  $TiO_2$ . Par ailleurs, on peut supposer que la réaction d'oxydation est moins importante pour la surface du TA6V située sous les filaments, expliquant une toxicité plus faible de cette même surface.

#### 4.1.2. Cellules primaires de fibroblastes gingivaux humains

La viabilité cellulaire des hGF cultivées sur les matériaux durant 24 heures est présentée sur la Figure IV-5.



**Figure IV-5.** Viabilité cellulaire des hGF mises en culture sur les différents substrats – Analyse par Alamar Blue après 24 h de culture (N=9 reproductions). Les résultats sont normalisés par rapport à la lame de verre et les barres d'erreur représentent les écart-types

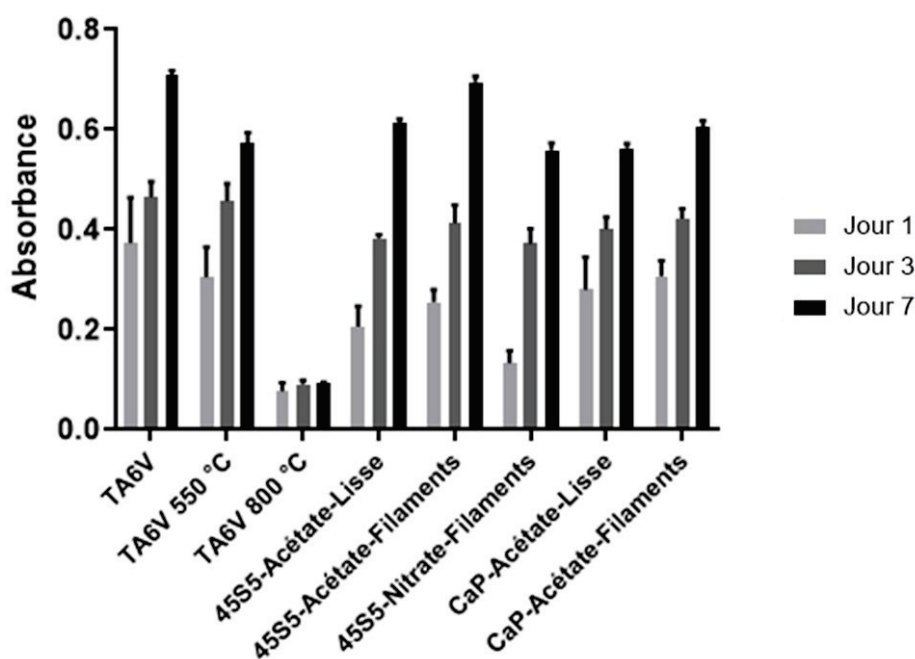
Ce graphique permet de constater que tous les échantillons testés présentent une viabilité cellulaire équivalente ou supérieure à celle du TA6V brut au jour 1, montrant l'absence de cytotoxicité de ces matériaux. Seul le TA6V traité à 800 °C présente un effet cytotoxique, puisque l'activité métabolique des hGF diminue dans ce cas de 54 % par rapport au TA6V brut ( $p<0,0001$ ). L'ajout de revêtements lisses dans les systèmes CaP-Acétate et 45S5-Acétate ne permet pas d'augmenter la viabilité cellulaire de manière significative par rapport au TA6V brut



( $p=0,56$  et  $p>0,999$  respectivement). Ces deux revêtements ne présentent pas non plus d'activités métaboliques statistiquement différentes entre eux ( $p=0,26$ ), en accord avec les résultats obtenus sur les MG-63. De la même façon, l'ajout des filaments sur le revêtement lisse n'influence pas la viabilité des hGF de manière significative, à la fois pour le CaP-Acétate ( $p=0,36$ ) et pour le 45S5-Acétate ( $p=0,45$ ). Concernant le revêtement électrofilé à partir du système 45S5-Nitrate, aucune différence significative avec le revêtement électrofilé dans le système 45S5-Acétate n'est observé ( $p=0,98$ ), ni par rapport au TA6V ( $p=0,999$ ). Cependant, la présence du revêtement permet d'augmenter la viabilité cellulaire de 58 % par rapport au TA6V traité à 800 °C ( $p<0,0001$ ).

## 4.2. PROLIFERATION DES CELLULES MG-63 SUR LES MATERIAUX

Les données de prolifération cellulaire, présentées sur la Figure IV-6, résultent de l'analyse par Alamar Blue sur une durée de 7 jours (mesures faites 1, 3 et 7 jours après la mise en contact des cellules avec les échantillons). Notons que pour ce test, la normalité des données a été vérifiée pour tous les échantillons, excepté le CaP-Acétate-Lisse au septième jour de culture. Ce résultat étant marginal, il apparaît donc cohérent de conserver l'ANOVA pour l'analyse des résultats.



**Figure IV-6.** Activité métabolique des cellules MG-63 au contact des matériaux, après 1, 3 et 7 jours de culture. Les valeurs d'absorbance ont été mesurées sur N = 9 reproductions. Les barres d'erreur représentent les écarts-types

Le test ANOVA permet de conclure que les moyennes obtenues pour chaque échantillon ne sont pas toutes identiques ( $p<0,0001$ ). De plus, l'effet du temps de contact est significatif et il diffère en fonction du type d'échantillon, et inversement. Notons que sur la totalité du test le temps de contact explique à lui seul 23 % la variation de la viabilité cellulaire. Le type d'échantillon lui influence à 67 % la variation de la viabilité cellulaire.

Les résultats du test post-hoc permettent des comparaisons plus spécifiques. Tout d'abord, notons l'effet marqué de la prolifération cellulaire puisque pour tous les échantillons, l'activité métabolique augmente significativement entre le jour 1 et le jour 7, même si cette augmentation reste très faible sur le TA6V traité à 800 °C. Si la prolifération cellulaire suit un rapport similaire pour les pastilles de TA6V (1,9), de TA6V traité à 550 °C (1,9), ainsi que pour les revêtements de CaP lisses (2,0) et électrofilés (2,0), l'effet de la prolifération est plus marqué pour les matériaux de 45S5. Ce rapport atteint en effet 3,0 pour les revêtements lisses et 2,7 pour les revêtements électrofilés. Le meilleur taux de prolifération est obtenu pour les revêtements électrofilé de 45S5-Nitrate (rapport de 4,2), mettant en évidence l'apport bénéfique des filaments pour l'activité des cellules, indépendamment de la toxicité avérée du substrat de TA6V traité à 800 °C. En effet au jour 7, la viabilité cellulaire est 1,3 plus faible sur les revêtements électrofilés de 45S5-Nitrate que sur les pastilles de TA6V ( $p < 0,0001$ ) alors qu'au jour 1, ce ratio était de 2,8 ( $p < 0,0001$ ). La comparaison de ces deux résultats semble soutenir le fait que la prolifération cellulaire puisse prendre le dessus sur la cytotoxicité initiale.

Après sept jours de culture, le témoin de TA6V présente l'activité métabolique la plus élevée. Cependant, ce résultat est statistiquement équivalent à celui obtenu sur le revêtement électrofilé de 45S5-Acétate ( $p > 0,9999$ ). Par ailleurs, la comparaison des structures lisses et électrofilées des revêtements de 45S5-Acétate ne permet pas de conclure sur un effet positif de la présence des filaments ( $p = 0,36$ ) en réalisant le test ANOVA sur les formes logarithmiques des données, transformation nécessaire pour satisfaire les hypothèses de ce test statistique (cf. Techniques Expérimentales, partie 4.1.2). La même conclusion peut être faite sur les matériaux de CaP, pour lesquels les résultats sur les échantillons lisses et électrofilés ne montrent pas de différence significative ( $p = 0,91$ ). La présence de revêtement lisse de CaP-Acétate diminue cependant d'un facteur 1,26 la viabilité cellulaire au jour 7 par rapport à celle constatée sur les pastilles de TA6V ( $p = 0,001$ ), mais la différence n'est pas significative entre ce revêtement et le TA6V traité à 550 °C ( $p > 0,999$ ). En revanche, l'ajout des filaments de CaP rend la différence de viabilité cellulaire non significative au jour 7 par rapport au TA6V brut ( $p = 0,10$ ) ou par rapport au TA6V traité à 550 °C ( $p = 0,99$ ).

Enfin, l'activité métabolique des MG-63 après 7 jours de culture ne semble pas être influencée par la composition chimique des revêtements (45S5-Acétate ou CaP-Acétate) puisque les différences entre ces groupes ne sont pas significatives, que ce soit sous forme lisse ( $p = 0,89$ ) ou sous forme de filaments ( $p = 0,23$ )

Pour confirmer ou non ces tendances, l'analyse est complétée par des observations en microscopie électronique à balayage et en microscopie confocale dans la partie 5.

### 4.3. DISCUSSION

Bien que les revêtements électrofilés de biocéramiques soient très peu rapportés dans la littérature, nos résultats expérimentaux peuvent être positionnés par rapport à deux études.

Hae-Won Kim *et al.* [53] ont étudié un verre de composition  $70 \text{ SiO}_2 - 25 \text{ CaO} - 5 \text{ P}_2\text{O}_5$  (en %<sub>molaire</sub>). Ils ont montré que la viabilité des cellules BMSCs au deuxième jour était 1,19 fois supérieure sur ce matériau quand il était préparé sous la forme de filaments électrofilés plutôt que sous la

forme de pastilles frittées. Après 5 jours de culture cellulaire au contraire, la viabilité des BMSCs est 1,18 fois supérieure sur les revêtements lisses, suggérant que cette surface est plus favorable à la prolifération cellulaire qu'une structuration fibreuse. Dans notre cas, les différences d'activités métaboliques ne sont pas statistiquement significatives entre les deux morphologies du 45S5-Acétate au cours de la culture cellulaire, à la fois avec les MG-63 et les hGF. Notons cependant que des cellules souches ont été utilisées dans le travail de Hae-Won Kim *et al.* [53], et que celles-ci sont plus sensibles que les lignées ostéoblastes MG-63 de notre étude.

Par ailleurs, dans une étude de M. Streckova *et al.* [149], l'ajout d'un revêtement électrofilé d'hydroxyapatite sur du TA6V a été associé, après 2 jours de culture, à une diminution de la viabilité des cellules MC3T3-E1 d'environ 22 % par rapport à celle obtenue sur le TA6V brut. Dans notre cas, l'influence semble moins marquée puisque la différence de viabilité obtenue sur ces deux matériaux n'est pas significative après un jour de culture des MG-63. Au contraire dans le cas des hGF, le revêtement présente une viabilité supérieure au TA6V de 25 %. L'étude de M. Streckova *et al.* [149] met également en évidence la forte cytotoxicité et l'inhibition de la prolifération des cellules par les matériaux revêtus et traités à 800 °C, confortant alors nos résultats sur ce type de matériaux.

Alors que les biocéramiques ont été évaluées pour leur application en ingénierie tissulaire osseuse, comme le rapporte le premier chapitre de cette thèse, peu d'études portent sur leur évaluation en tant que revêtements. Avec nos résultats, de nouvelles informations sont donc apportées, notamment : l'évaluation de revêtements électrofilés de 45S5, leur comparaison directe avec les revêtements CaP, ainsi qu'une comparaison entre des revêtements lisses et électrofilés de CaP.

## 5. IMAGERIE DE LA LIGNEE CELLULAIRE MG-63

Après 7 jours de culture à la surface des différents substrats, les cellules MG-63 ont été fixées et observées au microscope électronique à balayage ou au microscope confocal, après déshydratation ou marquage fluorescent, respectivement. L'imagerie électronique permet d'imager la structure externe de la cellule, alors que la microscopie confocale permet d'observer spécifiquement le noyau des cellules et leurs filaments d'actine. Ces filaments du cytosquelette sont en particulier responsables des phénomènes de mobilité et de transmission des forces [256]. Notons que les cellules mortes, qui présentent des capacités d'adhérence limitées, sont éliminées de la surface des échantillons lors des différents rinçages. Le nombre de cellules retrouvées sur un matériau après sept jours de culture est donc directement relié à la capacité du matériau à permettre l'adhésion, la croissance, l'étalement et la colonisation cellulaire.

Les images MEB et confocales des MG-63 cultivées sur les substrats contrôles (sans revêtements) sont présentées sur les Figure IV-7 et Figure IV-8, respectivement. Pour les échantillons avec revêtements, la Figure IV-9 rassemble les images MEB et la Figure IV-10 les images au microscope confocal. Dans les images obtenues au MEB, l'image au plus faible grossissement permet de visualiser la répartition des cellules sur les substrats. Les grossissements supérieurs ont été imagés dans les zones présentant les plus fortes densités cellulaires.

L'observation de la lame de verre permet dans un premier temps de valider le succès de l'expérience, tant concernant la culture cellulaire que les protocoles de fixation, de déshydratation et de marquage fluorescent (Figure IV-7 et Figure IV-8). Les cellules à la surface de ce matériau présentent en effet une morphologie ostéoblastique typique, et forment un tapis cellulaire recouvrant la totalité de la surface de l'échantillon. Ce résultat est en accord avec la capacité qu'ont les lames de verre (utilisées comme supports contrôles dans les études cellulaires) de permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire.

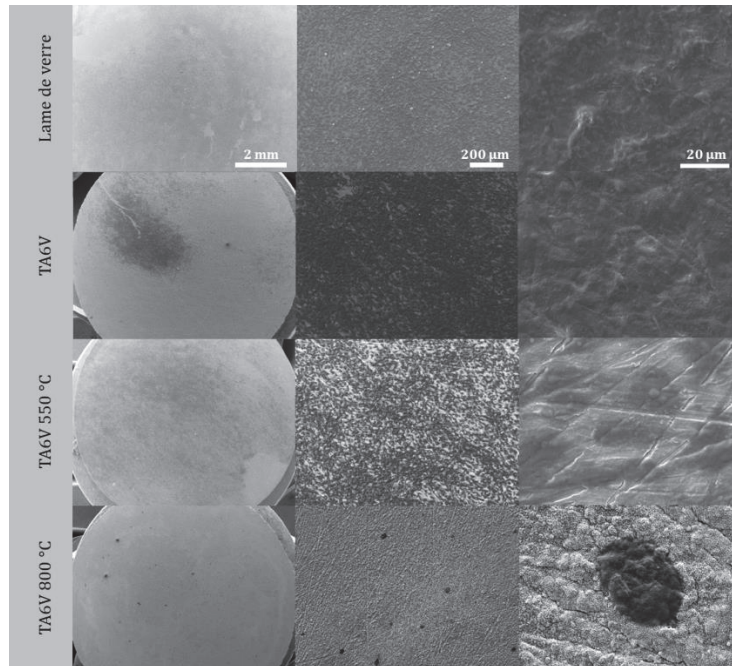


Figure IV-7. Images MEB des MG-63 cultivées à la surface des substrats contrôles, sans revêtement

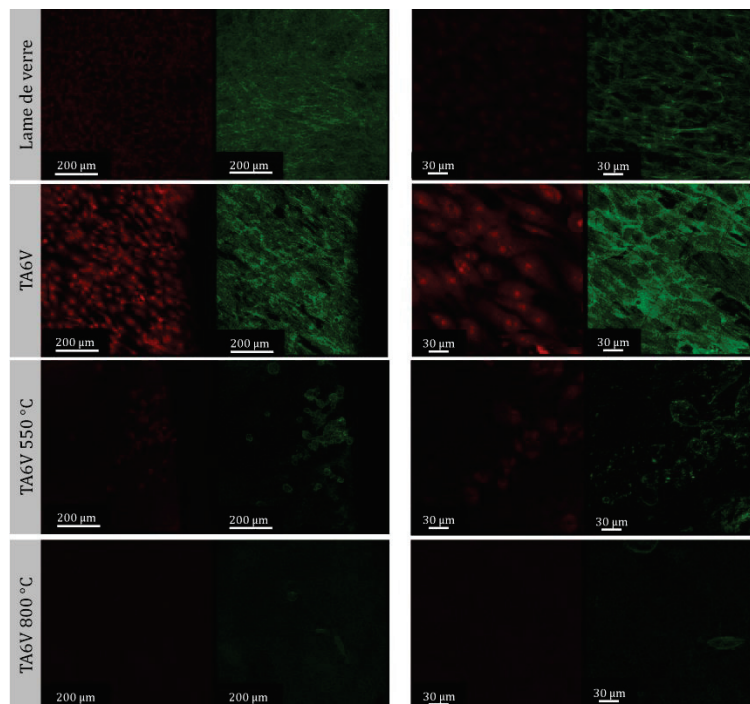


Figure IV-8. Microscopie confocale des MG-63 cultivées à la surface des substrats contrôles, sans revêtements. Les noyaux des cellules apparaissent en rouge et les filaments d'actine en vert

Le TA6V est également connu pour sa biocompatibilité. Comme pour la lame de verre, les cellules cultivées à la surface du TA6V présentent une morphologie étalée (Figure IV-7 et Figure IV-8) et ces cellules atteignent la confluence dans une zone localisée de la pastille. Cependant, le traitement thermique effectué sur ces pastilles de TA6V limite fortement la densité de cellules sur les surfaces. Pour la pastille traitée à 550 °C, les MG-63 ont proliféré sur toute la surface de l'échantillon, mais sans former de zone très dense. Pour un traitement à 800 °C, seules quelques cellules sont retrouvées sur toute la surface du matériau. Dans les deux cas, les cellules présentent des morphologies plutôt rondes et non étalées, signe d'une souffrance cellulaire.

En présence d'un revêtement lisse de 45S5-Acétate, le nombre de cellule restant après 7 jours de culture est limité et les cellules sont très disséminées sur la surface (Figure IV-9 et Figure IV-10). De plus, sur les images MEB, elles adoptent une morphologie sphérique.

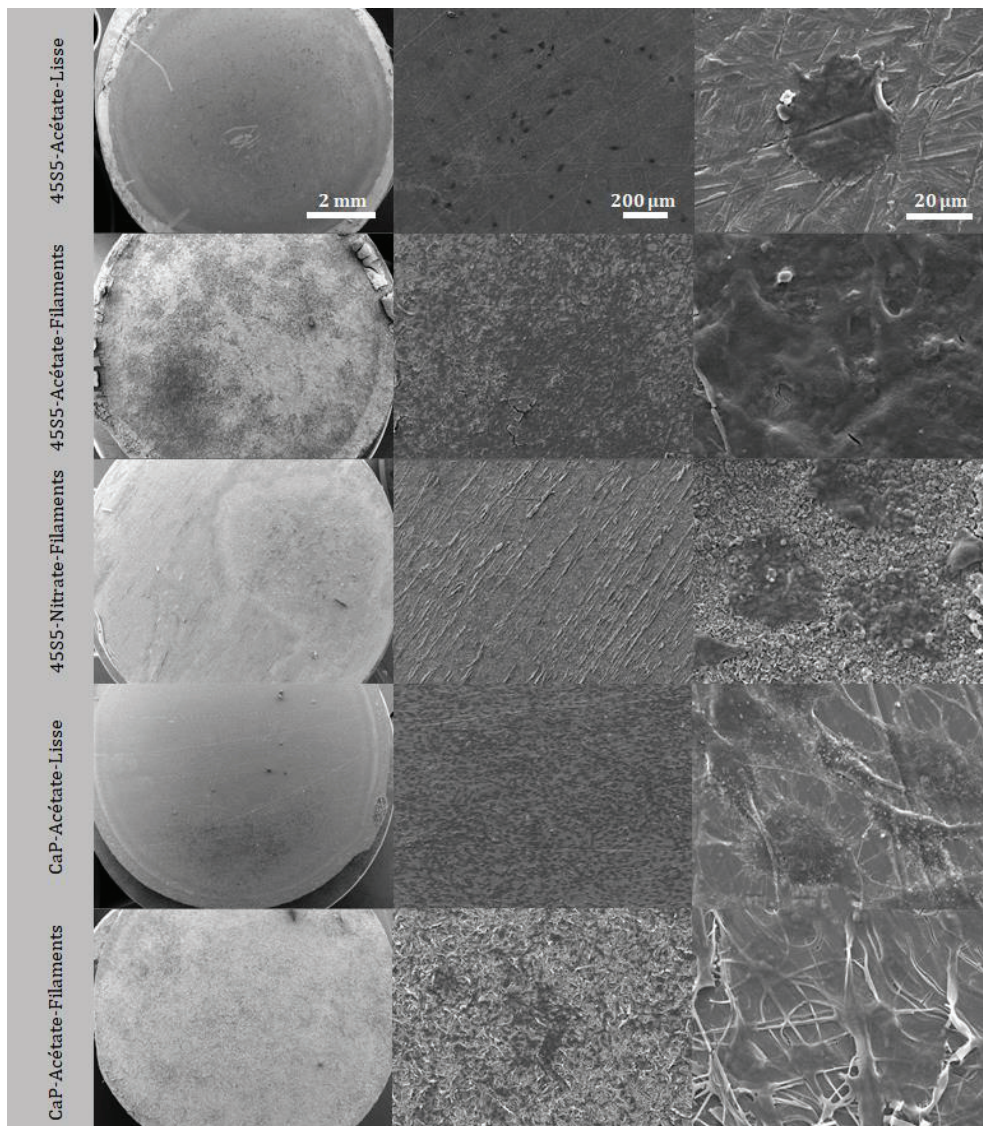
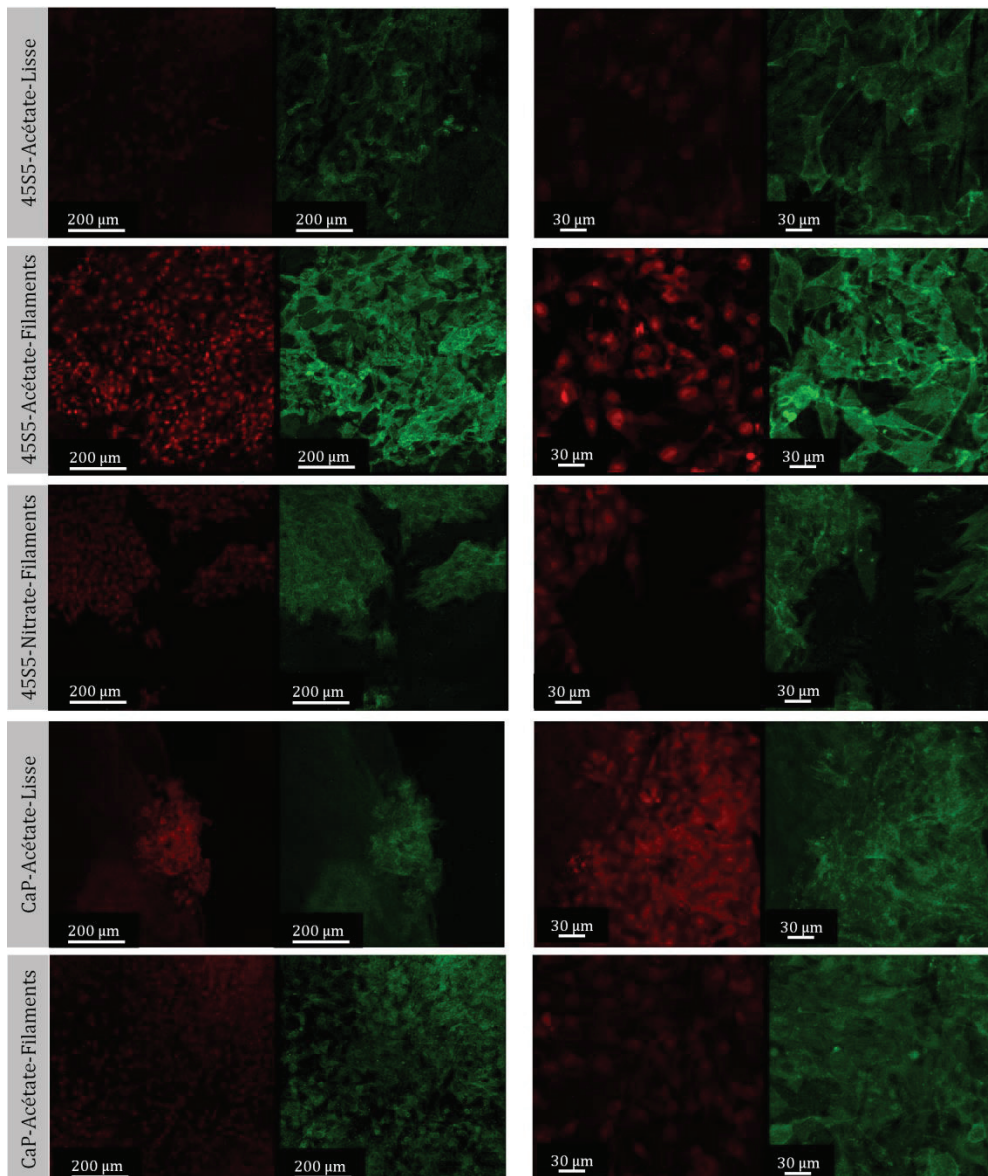


Figure IV-9. Images MEB des MG-63 cultivées à la surface des revêtements de CaP et 45S5



**Figure IV-10.** Microscopie confocale des MG-63 cultivées à la surface des revêtements de CaP et de 45S5. Les noyaux des cellules apparaissent en rouge et les filaments d'actine en vert

Lorsque des filaments 45S5-Acétate sont ajoutés sur le revêtement, la densité de MG-63 devient beaucoup plus importante, et les cellules s'allongent pour prendre une morphologie ostéoblastique typique et atteindre la confluence dans certaines zones. Au contraire, le revêtement lisse préparé à partir du système CaP-Acétate permet un meilleur étalement cellulaire que le 45S5-Acétate. La répartition des cellules reste cependant concentrée dans une zone localisée de la pastille. Pour cette composition également, l'ajout de filaments permet une prolifération des cellules sur la quasi-totalité de la pastille, et plusieurs zones de fortes densités cellulaires apparaissent. En comparant les deux compositions chimiques en présence de filaments, le système 45S5-Acétate permet d'obtenir des zones bien plus confluentes que le système CaP-Acétate, même si les deux systèmes permettent une meilleure colonisation que les revêtements lisses, c'est-à-dire que les cellules recouvrent une surface plus importante du revêtement. Lorsque les MG-63 sont très concentrées, les filaments sont englobés dans le tapis cellulaire, signe d'une bonne affinité entre les matériaux et les cellules. Pour ces deux systèmes électrofilés, des images au MEB ont été acquises dans des zones de densité moyenne, enfin de

visualiser la morphologie cellulaire adoptée sur les filaments électrofilés de biocéramiques (Figure IV-11). Il semblerait d'après ces images que les cellules s'allongent le long des filaments, et plus spécifiquement pour les revêtements de CaP-Acétate, confirmant leur affinité avec ce matériau, mais également avec cette morphologie spécifique de nanofilaments.

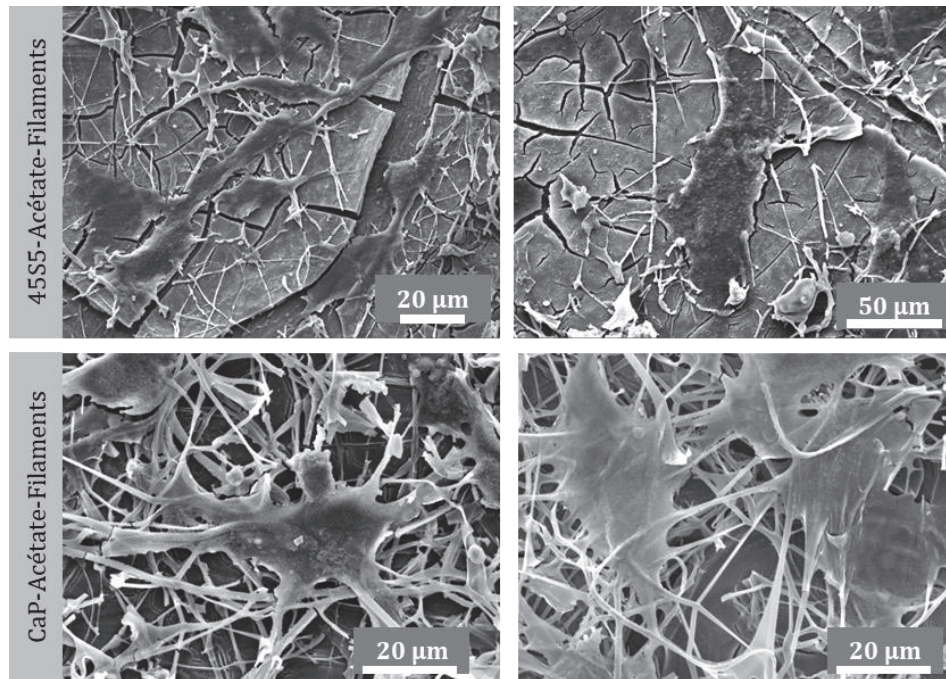


Figure IV-11. Images MEB des MG-63 cultivées à la surface des revêtements électrofilés de CaP-Acétate et 45S5-Acétate – Zones de densité cellulaire intermédiaire

Enfin, les revêtements électrofilés dans le système 45S5-Nitrate semblent inhiber la croissance des MG63. En effet, l'imagerie électronique montre que seules quelques cellules de morphologie sphérique sont présentes sur la totalité du substrat (Figure IV-9). Un amas cellulaire a été observé en microscopie confocale, mais cet amas est entouré de zones vides de cellules (Figure IV-10). La croissance cellulaire est inhomogène, comme l'est le revêtement à base de nitrates, déjà étudié dans le Chapitre II. Le nombre de cellules est largement diminué par rapport à l'échantillon de TA6V, mais augmenté par rapport à la pastille de TA6V traitée à 800 °C. La présence du revêtement semble donc limiter la toxicité due au traitement thermique du substrat. Il peut également être noté que les filaments de 45S5-Nitrate subissent une résorption importante durant la durée de la culture cellulaire.

Ces différentes observations permettent de mettre en évidence que les cellules atteignent la confluence à la fois sur le témoin de TA6V et sur le 45S5-Acétate électrofilé. Dans ce dernier cas cependant, une meilleure colonisation de la surface est constatée. Le revêtement électrofilé de CaP-Acétate présente également une bonne colonisation ainsi que des zones de densité cellulaire particulièrement élevée. La morphologie des filaments semble donc prometteuse, puisqu'en comparaison, les revêtements lisses présentent une limitation soit à l'étalement des cellules, soit à leur colonisation du revêtement.

Enfin, une analyse EDS des matériaux de 45S5-Acétate et de CaP-Acétate, lisses ou électrofilés, montre que les éléments constitutifs des revêtements sont toujours présents à la surface du substrat de TA6V après 7 jours de culture (Figure IV-12).

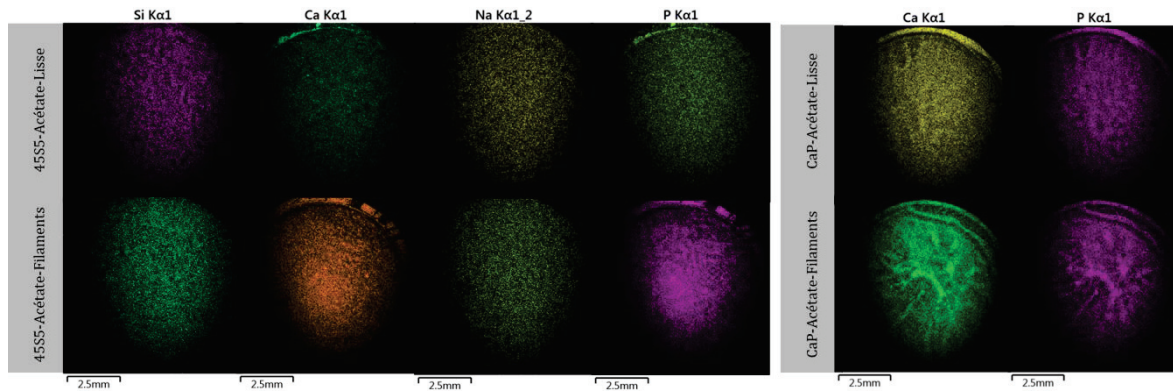


Figure IV-12. Cartographie EDS des revêtements de 45S5-Acétate et CaP-Acétate, lisses et électrofilés, après 7 jours de culture cellulaire

Des craquelures apparaissent cependant dans le revêtement de 45S5, comme montré sur la Figure IV-11, suggérant un début de résorption. Les filaments de cette composition semblent également avoir subi un début de dissolution/résorption. Il est difficile de trouver dans la littérature une vitesse de dissolution/résorption idéale des revêtements pour leur application en tant qu'implants orthopédiques [257]. Une stabilité *in vitro* sur une période de 7 jours au minimum semble cependant cohérente, puisque la résorption est accélérée *in vivo*, et que le revêtement doit présenter une durée de stabilité suffisamment élevée pour initier l'accroche cellulaire à la surface de l'implant. Cette analyse EDS pourrait être complétée par une étude plus précise du relargage des différents éléments dans le milieu, notamment par ICP (spectrométrie à plasma à couplage inductif) au cours du temps.

## 6. COMPARAISON DE L'ALAMAR BLUE ET DE L'IMAGERIE : LIMITES DE L'EXPERIENCE

La comparaison des résultats de viabilité cellulaire des MG-63 obtenus après 7 jours de culture (par le test d'Alamar Blue) avec les imageries MEB et confocal fait apparaître quelques incohérences. En particulier, la viabilité obtenue pour le TA6V traité à 800 °C est de 13 % par rapport au TA6V, et pourtant quasiment aucune cellule n'est observée à la surface de ce matériau. Similairement, le revêtement 45S5-Acétate-Lisse entraîne une viabilité cellulaire de 87 % par rapport au TA6V, mais le nombre de cellules observées à sa surface est limité, et en particulier sur les observations au MEB. La même tendance est constatée pour le revêtement 45S5-Nitrate-Filament. La différence entre le nombre de cellules observées par MEB ou par la méthode confocale peut être expliquée par la plus grande facilité de décoller involontairement des cellules de la surface des revêtements lors de la préparation des matériaux pour le MEB. Le protocole implique en effet un plus grand nombre de lavages ainsi qu'un processus de déshydratation - et donc une probabilité plus élevée de détacher les cellules de la surface des matériaux - par rapport au protocole de préparation des matériaux pour l'imagerie confocale.

De plus, la surestimation de la viabilité cellulaire par le test d'Alamar Blue est attribuée à une prolifération des cellules au fond des puits des cultures. Lors de l'ensemencement, certaines cellules n'ont pas adhéré à la surface des matériaux et ont pu atteindre le fond du puits, dont le plastique favorise la croissance cellulaire. Cette hypothèse est appuyée par l'observation au microscope optique des puits de culture, après retrait des échantillons (Figure IV-13).



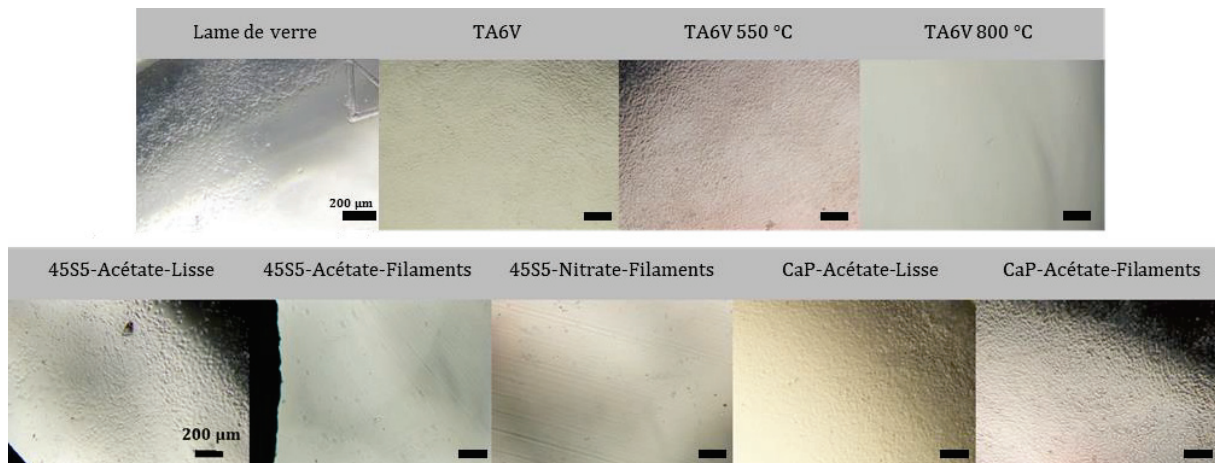


Figure IV-13. Imagerie optique du fond des puits de culture après 7 jours de culture cellulaire des MG-63 – Après retrait des échantillons

Cette prolifération additionnelle, hors de l'échantillon, surestime alors le résultat de viabilité cellulaire censé être représentatif de la surface des échantillons. Le taux de prolifération hors échantillon devrait être similaire pour chaque matériau (excepté la lame de verre qui possède un diamètre plus grand que les autres échantillons), puisque les puits sont tous composés du même plastique, et que la surface accessible à la prolifération dans le fond du puits est identique (même diamètre de puits, même diamètre d'échantillon). Il est alors possible d'imaginer que l'ordre de classement entre les viabilités cellulaires des différents matériaux est cohérent avec la prolifération ayant effectivement lieu sur la pastille. Il est néanmoins possible de constater que pour certains échantillons, la densité cellulaire est très faible voire nulle dans le fond du puits (TA6V traité à 800 °C, 45S5-Acétate-Filaments, 45S5-Nitrates-Filaments). Ce résultat peut s'expliquer soit par une toxicité indirecte du matériau (relargages de composés toxiques), soit également par un décollement des tapis cellulaires lors des différents lavages, phénomène couramment rencontré pour ce type de test. La toxicité indirecte (*i.e* sans contact direct entre les cellules et le matériau) pourrait en particulier concerner le TA6V traité à 800 °C, puisque la viabilité calculée par Alamar Blue au septième jour reste faible, à une valeur de 13 % par rapport au TA6V.

L'interprétation des résultats des tests *in vitro* développés dans ce chapitre doivent donc prendre en compte ce biais de mesure. En revanche, l'observation (MEB ou confocale) n'image quant à elle que la surface des échantillons et est donc spécifique du comportement cellulaire sur l'échantillon, indépendamment d'une prolifération dans le fond du puits. Les observations faites sur ce résultat peuvent donc être considérées comme plus fiables que les mesures d'Alamar Blue. En pratique, il faudrait, avant chaque réaction avec le réactif d'Alamar Blue, déplacer les échantillons dans une autre plaque de culture. De cette façon, les cellules présentes au fond des puits de culture ne seraient pas comptabilisées. Ce point sera pris en compte dans les tests *in vitro* présentés dans le Chapitre V suivant.

## 7. QUANTIFICATION DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

Lors de l'ostéogénèse, des cellules ostéoprogénitrices se différencient en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Au cours de cette différenciation ostéoblastique, plusieurs marqueurs sont exprimés de façon séquentielle [246]. Certains marqueurs sont précoces (Cbfa1/Runx2), d'autres associés à la phase de prolifération (c-fos, histone H4) ou de maturation (collagène de type I, ostéopontine, TGF- $\beta$ , fibronectine). Enfin, des marqueurs tardifs de la différenciation sont exprimés au début de la minéralisation de la matrice par les ostéoblastes différenciés (ostéocalcine, sialoprotéine osseuse). La phosphatase alcaline (ALP) est un gène ostéoblastique précoce de la différenciation.

Expérimentalement, le potentiel ostéo-inducteur des matériaux a été évalué par dosage de la phosphatase alcaline produite à l'intérieur des cellules hGF après 10 jours de culture sur les échantillons. Pour ce test, le matériau dans le système 45S5-Nitrate ainsi que le TA6V traités à 800 °C n'ont pas été étudiés, en raison des limitations associées à leur cytotoxicité précédemment évoquée. Les résultats du test ALP sont présentés sur la Figure IV-14. Tous les échantillons présentent des activités ALP statistiquement différentes entre elles ( $p < 0,0001$ ), excepté le couple CaP-Acétate-Filaments/TA6V ( $p = 0,18$ ).

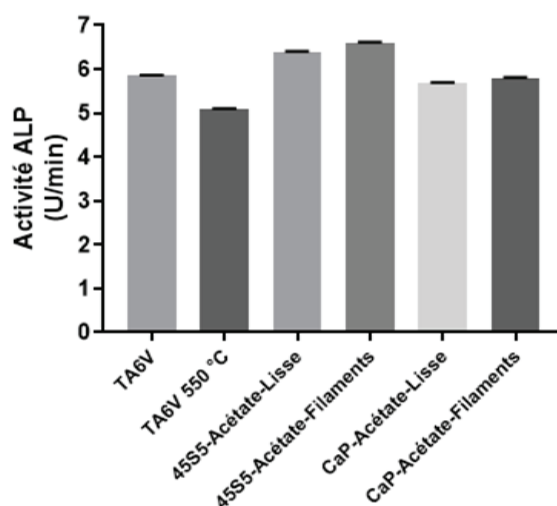


Figure IV-14. Dosage de la phosphatase alcaline (ALP) intracellulaire après 10 jours de culture des cellules primaires hGF sur les matériaux

Il est tout d'abord nécessaire de noter que tous les échantillons présentent une activité ALP non nulle, substrat nu de TA6V compris. En fait, il a été montré que le temps de culture des cellules hGF pouvait augmenter leur taux d'ALP [258]. Il est donc probable que les cellules, utilisées aux passages 3 et 5 pour l'ensemencement sur les matériaux, possédaient déjà une certaine expression de ce marqueur.

La comparaison des différents matériaux montre tout d'abord que l'activité ALP du TA6V est réduite par le traitement thermique à 550 °C (facteur 1,15). Les revêtements lisses de CaP-Acétate et de 45S5-Acétate présentent une meilleure activité ALP que le TA6V traité à 550 °C (facteurs 1,11 et 1,25 respectivement). Par rapport au TA6V non traité, le revêtement lisse de 45S5-Acétate présente une meilleure expression de cette enzyme (facteur 1,09), contrairement au revêtement lisse de CaP qui entraîne sa diminution par rapport au TA6V (facteur 0,97).

L'ajout des filaments sur les revêtements permet d'en améliorer l'activité ALP : d'un facteur 1,03 pour le 45S5-Acétate, et d'un facteur 1,02 pour le CaP-Acétate. Cependant, l'ajout des filaments ne permet pas d'atteindre une activité ALP supérieure pour le revêtement électrofilé de CaP-Acétate par rapport au TA6V, les deux résultats n'étant pas statistiquement différents ( $p=0,18$ ). Au contraire, l'ajout de filaments de 45S5-Acétate permet d'augmenter cette activité d'un facteur 1,12 par rapport au TA6V. La comparaison des résultats obtenus pour le 45S5-Acétate lisse ou électrofilé est cohérente avec un article de la littérature, qui a comparé l'ALP produite dans des cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse de rat (BMMSC), selon que ces cellules soient cultivées sur du verre électrofilé ou sur un disque obtenu par frittage d'une poudre de même composition ( $70 \text{ SiO}_2 \cdot 25 \text{ CaO} \cdot 5 \text{ P}_2\text{O}_5$ ) [53]. Les auteurs ont observé au jour 10 une stimulation de l'activité ALP d'un facteur 1,05 fois pour les matériaux électrofilés par rapport aux surfaces frittées. Expérimentalement, nous avons obtenus un rapport de 1,03. Dans l'article évoqué, un milieu de différenciation a été utilisé pour la culture cellulaire. Or l'utilisation d'un milieu de différenciation ostéogénique permet d'amplifier le phénomène d'ostéogénèse [259,260]. Ces milieux contiennent généralement de la dexaméthasone, de l'acide ascorbique et du  $\beta$ -glycerophosphate [261]. Un milieu de différenciation ostéogénique pourrait donc dans notre étude être utilisé pour exacerber la différenciation des hGF, et par conséquent la production d'ALP sur les revêtements présentant les meilleurs potentiels. Il a en effet été montré que les fibroblastes gingivaux pouvaient être différenciés en ostéoblastes, mais que cette différenciation nécessitait généralement l'ajout de facteurs de transcription ou de croissance [262-264], ou d'avoir recourt à des méthodes d'épigénétique [265]. De même, des tests complémentaires à notre étude pourraient être réalisés avec des cellules souches mésenchymateuses, en étudiant l'expression de différents marqueurs de la différenciation ostéoblastique.

## CONCLUSION

L'étude des propriétés biologiques des revêtements a permis dans un premier temps d'évaluer leur cytocompatibilité. Pour les MG-63, une diminution statistiquement significative de la cytocompatibilité du TA6V est constatée lors de l'ajout d'un revêtement lisse de 45S5 à sa surface. Au contraire, la viabilité cellulaire est similaire pour les revêtements de CaP-Acétate (lisse et filament) et de 45S5-Acétate-Filaments par rapport au TA6V. Avec les cellules hGF, l'ajout du revêtement CaP-Acétate lisse ou de revêtements 45S5-Acétate lisse et électrofilé permet de conserver une viabilité cellulaire comparable à celle obtenue sur le TA6V, alors que la présence de revêtement électrofilé de CaP-Acétate permet de l'augmenter.

De plus, entre le premier et le septième jour de culture, le taux de prolifération des MG-63 est plus élevé sur les revêtements 45S5-Acétate (lisses et filaments) que sur les revêtements CaP-Acétate et le TA6V. Cette capacité à stimuler la prolifération cellulaire permet d'atteindre au septième jour une viabilité cellulaire sur les revêtements de 45S5 équivalente à celle observée sur le TA6V. La viabilité des MG-63 au jour 7 est inférieure sur le CaP-Acétate lisse que sur le TA6V ; elle est par contre équivalente sur l'alliage métallique et le CaP-électrofilé.

Bien que les résultats de l'Alamar Blue ne montrent pas de différences statistiquement significatives entre les revêtements lisses et électrofilés (pour les matériaux de 45S5-Acétate et CaP-Acétate), l'imagerie des cellules MG-63 met en évidence une meilleure propagation des cellules sur les revêtements électrofilés, ainsi que l'apparition de zones de fortes densités pouvant même atteindre la confluence. Les cellules recouvrent alors totalement les filaments, piégés dans le tapis cellulaire. Dans les zones de densité moyenne, les cellules montrent une morphologie allongée dans la direction des filaments, et ce plus particulièrement pour la composition CaP-Acétate.

Sachant que le TA6V utilisé comme contrôle est connu pour sa biocompatibilité, toutes ces observations permettent de valider la capacité qu'ont les revêtements de 45S5-Acétate et de CaP-Acétate à stimuler la croissance et la prolifération cellulaire, et en particulier en présence de filaments. Notons qu'au contraire, les matériaux électrofilés de 45S5-Nitrates présentent un nombre très limité de cellules à leur surface, très probablement en raison de la cytotoxicité avérée du TA6V traité à 800 °C. Ce constat permet donc de valider la stratégie de synthétiser les céramiques à partir de nouveaux précurseurs acétate.

Enfin, le potentiel de différenciation des hGF a été évalué par quantification de la phosphatase alcaline intra-cellulaire. L'activité de cette enzyme est plus élevée pour les cellules cultivées sur les revêtements de 45S5-Acétate que sur le TA6V. Elle est en revanche plus faible pour les cellules cultivées sur les revêtements CaP-Acétate-Lisse que sur le TA6V, mais équivalente sur le revêtement CaP-Acétate-Filaments et le TA6V. Pour les deux céramiques, CaP-Acétate et 45S5-Acétate, l'activité ALP est favorisée en présence de filaments (par rapport aux revêtements lisses).

L'ensemble des résultats est donc prometteur pour des applications orthopédiques et dentaires et semble justifier l'apport bénéfique des filaments sur les deux types de compositions chimiques, 45S5-Acétate et CaP-Acétate. Cependant, des tests complémentaires doivent être

réalisés afin d'estimer plus précisément la viabilité cellulaire par le test d'Alamar Blue. Il faudrait en effet déplacer les matériaux dans une nouvelle plaque de culture, avant de réaliser la réaction et la mesure. Cet aspect sera pris en compte dans le chapitre suivant. D'autres évaluations quantitatives de la cytocompatibilité des matériaux permettraient également de compléter les résultats, notamment par des comptages des cellules au cours de la culture cellulaire, par des mesures de la libération de la lactate deshydrogenase, ou par de l'imagerie live/dead. De plus, les cinétiques de relargage des ions constitutifs des différents revêtements (45S5 ou CaP, lisses ou électrofilés) pourraient être étudiées par ICP afin d'évaluer leur effet sur l'activité cellulaire. En outre, l'activité ALP pourrait être évaluée dans un milieu de différenciation ostéoblastique. Afin d'évaluer plus précisément la différenciation cellulaire, des tests sur cellules souches mésenchymateuses ont été imaginés, en partenariat avec Giuliana Muzio de l'université de Turin. Ainsi, l'expression d'autres marqueurs de différenciation ostéoblastiques - tels que Run-X2, COLL-I, OP ou OC - peuvent être étudiés par RT-PCR ou ELISA. Des tests biochimiques (colorimétriques ou de fluorescence) permettraient également d'évaluer la sécrétion de matrice extra-cellulaire osseuse et sa calcification, *via* la quantification du collagène, du calcium, et des glycosaminoglycanes. Enfin, il pourrait être envisagé d'étudier les intégrines, afin de comparer les interactions cellules/revêtements selon que ce dernier présente une surface lisse ou recouverte de filaments. Avant cela, la possibilité de déposer les revêtements sur des implants réels, présentant des morphologies plus complexes, doit être évaluée. Cette étude est présentée dans le Chapitre V de cette thèse.

# **Chapitre V**

**VERS UNE APPROCHE 3D : ELECTROFILAGE DE  
CAP SUR IMPLANTS USINES & DEPOTS  
ARCHITECTURES PAR ELECTRO-IMPRESSION**



## INTRODUCTION

Les chapitres précédents ont montré la possibilité de préparer des revêtements sur substrat métallique par électrofilage de systèmes synthétisés par chimie sol-gel *in situ*. Les formulations proposées dans cette thèse permettent la synthèse du verre 45S5 (partiellement cristallisé) et d'hydroxyapatite carbonatée. Par rapport aux revêtements lisses, les revêtements fibreux montrent un potentiel de différenciation ostéoblastique plus élevé, ouvrant la possibilité d'une utilisation en implantologie orale ou orthopédique. Les procédés de mise en forme ainsi que l'évaluation biologique des matériaux présentés jusqu'ici ont été appliqués uniquement à des pastilles de TA6V qui possèdent une surface plane. Cette géométrie n'est toutefois pas représentative de la surface des implants réels et utilisés cliniquement. La transition vers un modèle plus proche des substrats pouvant être utilisés en implantologie nous a donc paru nécessaire. Une étude de faisabilité a ainsi été initiée sur des implants dentaires. Cette étude, dédiée au dépôt des filaments sur un substrat tridimensionnel, représente la première partie de ce chapitre. D'autre part, dans le but de fournir aux cellules un environnement le plus favorable possible, la possibilité de contrôler la porosité et l'architecture des revêtements a été évaluée. Cet aspect est présenté et discuté dans la deuxième partie de ce chapitre. La technique utilisée est l'électro-implosion, procédé combinant l'électrofilage et les principes de la fabrication additive par impression 3D. Pour ces deux études plus exploratoires, il a été choisi de se concentrer exclusivement sur les matériaux à base de phosphate de calcium. En effet, les solutions issues de ce système présentent un comportement plus stable au filage qui pourrait favoriser le dépôt des filaments sur des implants ou en électro-implosion.

## 1. DEPOT DE REVETEMENTS SUR IMPLANTS DENTAIRES

### 1.1. PRÉSENTATION DES IMPLANTS DENTAIRES

Afin d'étudier la possibilité de recouvrir des pièces de morphologie complexe, des implants dentaires ont été utilisés comme substrat. La solution implantaire est aujourd'hui une technique largement utilisée dans le domaine de l'odontologie. Les implants sont indiqués dans le traitement d'un édentement unitaire, partiel ou complet. La partie assurant le maintien de l'implant avec les tissus biologiques se présente sous forme d'une vis, principalement en titane (grade 1 à 4 selon la pureté) ou en alliage TA6V (grade 5). Sur la vis viennent se positionner un pilier trans-gingival et une couronne prothétique (souvent en céramique) pour la bonne occlusion de l'implant.

Les implants utilisés proviennent de la gamme « Axiom® multi level » développée par la société Anthogyr. Ce kit de chirurgie dentaire offre un large choix de solutions chirurgicales et prothétiques adaptées pour chaque indication et chaque patient. Dans ce sens, deux types d'implants sont proposés dans le kit : les implants endo-osseux « Axiom® Bone Level » dont le positionnement est sous-crestal et les implants transmuqueux « Axiom® Tissue Level » qui sont stabilisés au-dessus du niveau de la crête osseuse. Tous les implants de la gamme sont en titane médical Grade V (TA6V) auquel est apportée une rugosité de surface par sablage soustractif à l'aide de particules abrasives de phosphate de calcium biphasé (appelé traitement de surface



BCP - *biphasic calcium phosphate* - par la société Anthogyr). La rugosité de surface ( $R_a$  compris entre 1,5 et 2  $\mu\text{m}$ ) permet un meilleur ancrage de l'implant au niveau de l'os. L'implant est connecté à la prothèse *via* un verrou de fixation et une bague de maintien. Pour les implants Axiom® Tissue Level, la connection est directe, alors que pour les implants Axiom® Bone Level, elle se fait *via* un pilier (Figure V-1.A).



Figure V-1. A) Présentation du kit de chirurgie dentaire "Axiom multi level" de la marque Anthogyr et B) Implant de type « bone level ». Reproduit à partir de la documentation d'Anthogyr [266].

Dans cette étude, un implant de type « Bone Level » de 14 mm de longueur et de 5,2 mm de diamètre a été utilisé. L'implant a une forme cylindro-conique et possède un filet asymétrique progressif auto-taroudant pour une insertion guidante (Figure V-1.B). Ce profil dit REG est adapté aux implantations sur sites cicatrisés et sur tous types d'os (contrairement au profil PX qui est adapté aux faibles densités osseuses).

L'ostéo-intégration de ces implants a été validée cliniquement. Il est donc important de préciser que l'objectif de l'étude n'est pas l'amélioration de l'ostéo-intégration des implants, mais d'évaluer la possibilité de déposer les revêtements par électrofilage sur un substrat présentant un relief complexe.

## 1.2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

- *Enduction par trempage*

L'importance de l'ajout d'une sous-couche d'accroche a été démontrée lors de l'élaboration de dépôts électrofilés sur pastilles de TA6V. Cependant, la méthode de dépôt par enduction centrifuge jusqu'alors utilisée n'est pas adaptée à la forme cylindrique des implants dentaires. Le procédé d'enduction par trempage a donc été choisi comme alternative (*cf.* Techniques Expérimentale, partie 2).

La solution de CaP utilisée est identique à celle préparée pour l'enduction centrifuge des pastilles (Chapitre III, partie 3.1). Pour rappel, il s'agit d'un système aqueux dans lequel la concentration en acétate de calcium est fixée à 1,5 M et où le rapport molaire  $n(\text{Ca})/n(\text{P})$  de 1,67 est satisfait. La concentration en PVA est fixée à 1 %<sub>masse/vol.</sub>

L'épaisseur de la couche finale de solution déposée par enduction par trempage dépend essentiellement de deux paramètres, facilement contrôlables, que sont la viscosité de la solution et la vitesse de retrait du substrat de la solution. Ainsi, le dépôt a été réalisé avec la solution précédemment décrite diluée par un facteur 0, 2, 4 ou 7, pour obtenir des concentrations en calcium de 1,5 M, 0,75 M, 0,38 M ou 0,21 M respectivement. De plus, différentes vitesses de retrait ont été testées, à savoir 0,6, 1,8, 2,7 et 4,5 mm/s dans le but d'obtenir un dépôt le plus homogène possible.

- *Electrofilage*

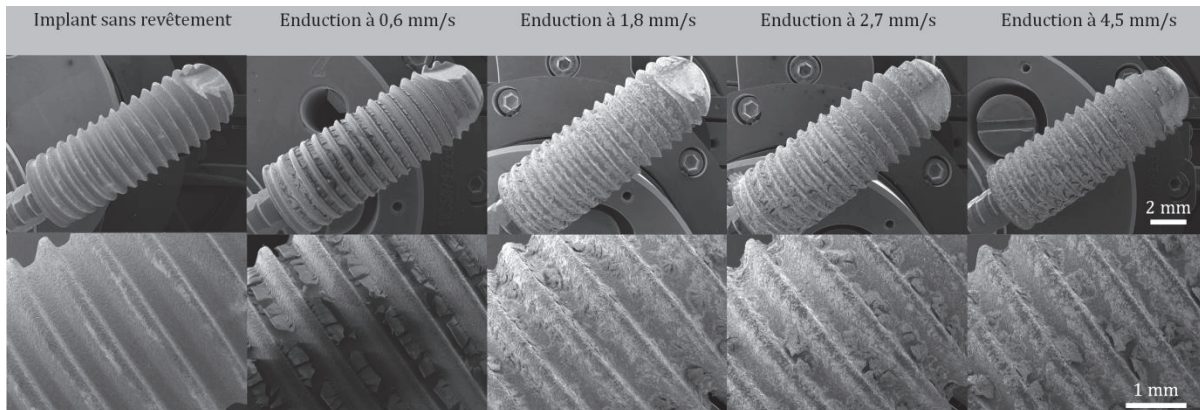
Une fois la couche d'accroche déposée par trempage, les implants sont disposés dans l'axe de rotation du collecteur rotatif, selon le dispositif présenté dans les Techniques Expérimentales (Figure 2).

La solution électrofilable est identique à celle présentée dans le Chapitre III (partie 3.1). Les concentrations en acétate de calcium et en TEPI ont été fixées à 1,5 M et 0,9 M respectivement (pour satisfaire un rapport molaire  $n(\text{Ca})/n(\text{P})$  de 1,67), et celle de PVA à 7 %<sub>masse/vol.</sub>

Les paramètres suivants ont été sélectionnés pour l'électrofilage : une durée du dépôt de 45 min pour chaque implant, une distance de travail de 6 cm, un débit de 0,05 mL/h et une tension comprise entre 6 et 7 kV. L'humidité relative a été mesurée entre 42 et 50 % pour une température comprise entre 23 et 25 °C. Afin de ne pas orienter les filaments sur les implants, une faible vitesse de rotation, d'environ 60 tours/min, a été utilisée. Après électrofilage, les implants ont été laissés en rotation pendant 30 minutes au minimum afin de permettre le séchage de la couche d'accroche déposée par trempage. En effet lors d'un séchage statique, des coulures peuvent apparaître sous l'effet de la gravité.

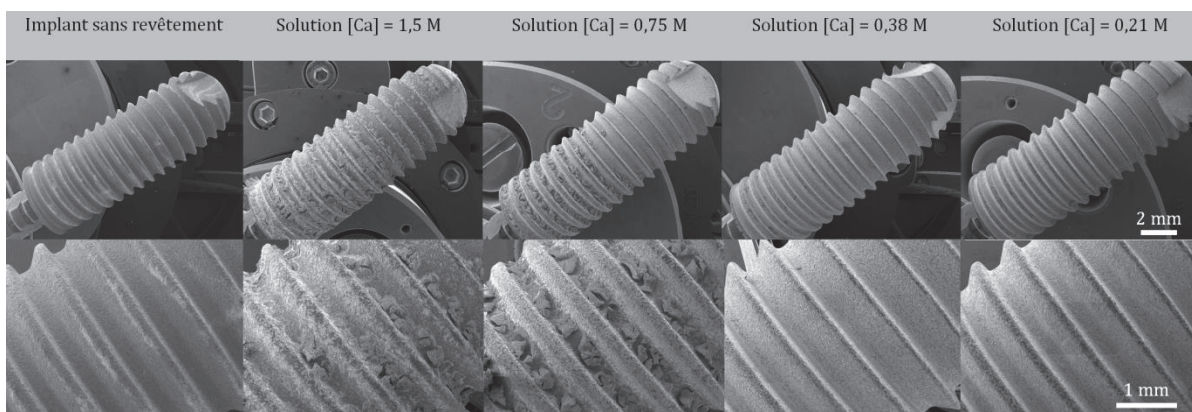
### 1.3. OPTIMISATION DE LA COUCHE D'ACCROCHE PAR ENDUCTION PAR TREMPAGE

Les paramètres d'enduction ont dans un premier temps été étudiés en vue d'obtenir une sous-couche d'accroche la plus homogène possible en termes d'épaisseur et de morphologie. La Figure V-2 rassemble les images MEB, après traitement à 550 °C, de sous-couches déposées sur les implants à différentes vitesses de retrait, pour une concentration en calcium de 1,5 M. En comparaison, un implant non revêtu mais également traité en température est présenté.



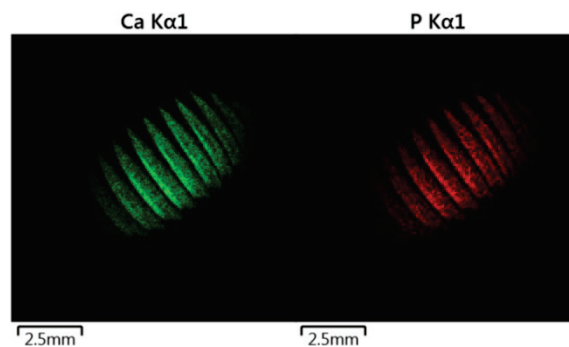
**Figure V-2.** Images MEB des revêtements déposés par enduction par trempage à différentes vitesses pour une solution [Ca] = 1,5 M. Un implant contrôle sans revêtement est également présenté. Les implants ont été traités thermiquement à 550 °C

Pour la plus faible vitesse (0,6 mm/s), un dépôt très fissuré et présentant une accumulation de matière dans le creux du filetage est observé. Pour des vitesses de retrait supérieures, les implants sont totalement recouverts mais la présence de fissures persiste dans les creux du filetage. Par ailleurs, de petits amas de matière provenant probablement d'un écaillage de la couche sont constatés pour les plus grandes vitesses de dépôts. Afin de limiter les défauts et obtenir une couche plus fine et sans fissures, l'utilisation de solutions plus diluées ([Ca] = 0,75, 0,38 et 0,21 M) a été évaluée. La Figure V-3 regroupe les images MEB des implants recouverts à une vitesse de 2,7 mm/s à partir de ces différentes solutions.



**Figure V-3.** Images MEB des revêtements déposés par enduction par trempage pour des solutions plus ou moins diluées ([Ca] comprise entre 0,21 et 1,5 M). La vitesse de dépôt est fixée à 2,68 mm/s pour chaque échantillon. Un implant contrôle sans revêtement est également présenté. Les implants ont été traités thermiquement à 550 °C

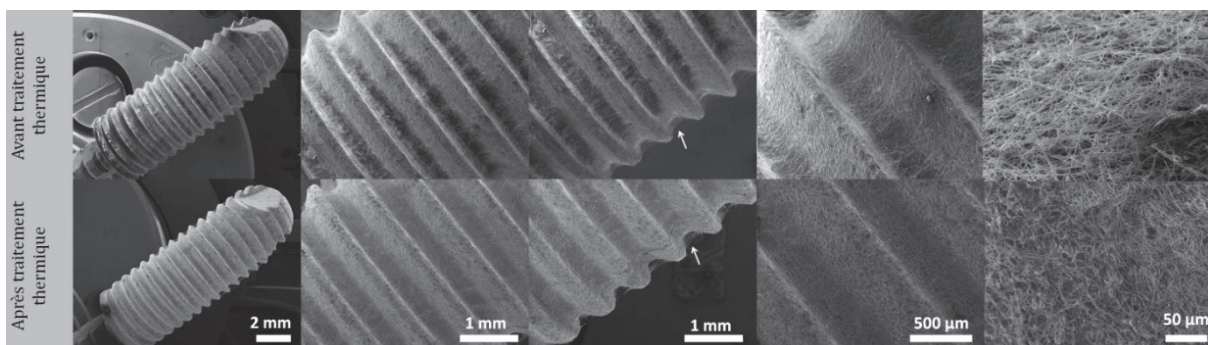
Une nette amélioration de la qualité de la couche est constatée pour une diminution de la concentration de la solution déposée. En effet, pour une concentration en calcium inférieure ou égale à 0,38 M, l'accumulation de matière dans les creux du filetage est évitée et aucune fissure de la couche n'est observée. On s'attend de plus à ce qu'une plus grande quantité de matière soit conservée avec la solution à 0,38 M par rapport à la solution à 0,21 M. Ces résultats nous ont alors amenés à privilégier, pour la préparation de la sous-couche d'accroche par enduction par trempage, une solution de concentration en calcium de 0,38 M et une vitesse de retrait du substrat de 2,68 mm/s. Pour vérifier la présence homogène des éléments calcium et phosphore sur l'ensemble du dépôt, une analyse EDS a été réalisée. Une répartition continue et homogène de ces deux éléments est constatée, prouvant la présence d'une couche recouvrante (Figure V-4).



**Figure V-4.** Cartographie EDS de la répartition des éléments calcium et phosphore le long de l'implant après dépôt d'une couche d'accroche par enduction par trempage. Dépôt d'une solution de concentration  $[Ca] = 0,38$  M avec une vitesse de dépôt de 2,7 mm/s

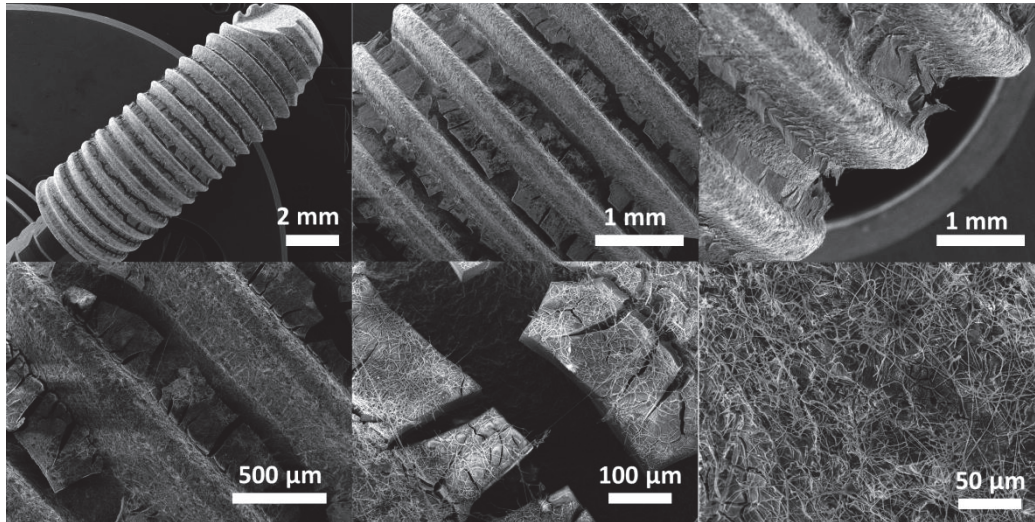
#### 1.4. MORPHOLOGIE DES REVÊTEMENTS ÉLECTROFILÉS

Les implants enduits d'une sous-couche d'accroche ont été disposés sur l'axe de rotation du moteur pour procéder au dépôt des filaments de CaP par électrofilage. Il peut être mentionné que l'électrofilage est stable et que les filaments ne sont pas spécifiquement attirés par les crêtes du filetage, qui auraient pu présenter des effets de pointe et donc une accumulation locale des filaments. Les résultats obtenus avant et après traitement thermique, présentés sur la Figure V-5, montrent que les filaments recouvrent totalement l'implant et que le mat déposé conserve son intégrité, sans fissure au sein des filaments.



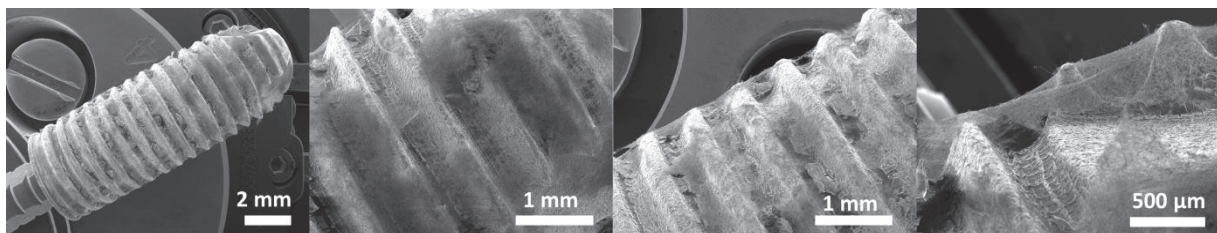
**Figure V-5.** Images MEB des implants recouverts d'une sous-couche par enduction par trempage  $[Ca] = 0,38$  M, vitesse de dépôt 2,7 mm/s) et de filament électrofilés, avant et après traitement thermique. Les flèches blanches indiquent des zones où le dépôt n'épouse pas parfaitement le relief de l'implant

Toutefois, le dépôt ne semble pas épouser parfaitement le relief du filetage (zones indiquées par des flèches blanches). Les filaments forment une toile plus ou moins tendue entre les sommets de ce dernier. En fait, cette capacité qu'a le dépôt à se déposer ou non dans le creux du filetage semble très sensible aux conditions expérimentales. En effet, lors de tests réalisés sur des sous-couches épaisses ( $[\text{Ca}] = 1,5 \text{ M}$ , vitesse dépôt =  $0,6 \text{ mm/s}$ ), les résultats obtenus montrent que les filaments épousent parfaitement la morphologie de l'implant après traitement thermique (Figure V-6).



**Figure V-6.** Images MEB des implants recouverts d'une sous-couche, après enduction par trempage ( $[\text{Ca}] = 1,5 \text{ M}$ , vitesse de dépôt  $0,6 \text{ mm/s}$ ), et de filament électrofilés. Filaments épousant parfaitement la morphologie de l'implant après traitement thermique

A l'inverse, des filaments très « cotonneux » qui restent en surface de l'implant sont déposés si la solution reste trop longtemps dans le système seringue-aiguille avant d'être électrofilée (Figure V-7).



**Figure V-7.** Images MEB des implants recouverts d'une sous-couche par enduction par trempage ( $[\text{Ca}] = 0,38 \text{ M}$ , vitesse de dépôt  $2,7 \text{ mm/s}$ ) et de filament électrofilés. Dépôts cotonneux obtenus lorsque la solution stationne trop longtemps dans l'aiguille de la seringue – Après traitement thermique

Ce phénomène est évité en renouvelant le contenu de l'aiguille avant d'électrofiler la solution sur chaque nouvel implant. Il semblerait donc que la solution évolue dans le système seringue-aiguille et que cette évolution soit responsable d'un dépôt plus ou moins proche de la morphologie de l'implant. A ce jour, l'origine de ce phénomène n'a pas été expliquée. Bien que les tests de reproductibilité pourraient être approfondis, les résultats sont déjà prometteurs. Ils soulignent en effet la possibilité d'obtenir des filaments épousant parfaitement la forme du filetage.

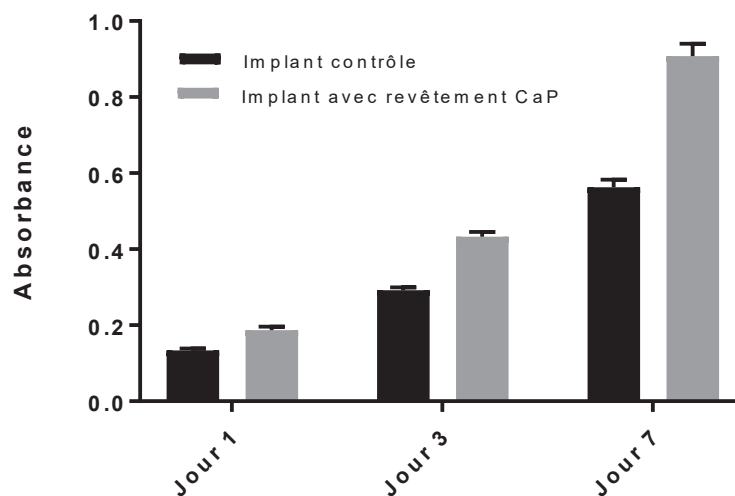
Les implants revêtus d'une sous couche d'accroche et de filaments électrofilés ont ensuite été évalués biologiquement avec des cellules MG-63. Cette évaluation est présentée dans la partie 1.5 suivante.

### 1.5. EVALUATION BIOLOGIQUE DES REVETEMENTS DEPOSES SUR IMPLANTS

Afin d'évaluer la cytocompatibilité des revêtements, des tests *in vitro* ont été menés sur des implants bruts fournis par la société Anthogyr ainsi que sur des implants revêtus et traités en température (550 °C). Les protocoles des tests cellulaires sont détaillés dans les Techniques Expérimentales. Le protocole de l'analyse par Alamar Blue a été adapté afin de prendre en compte le biais de mesure mis en évidence dans le Chapitre IV. En effet, les implants ont été placés dans une nouvelle plaque de culture avant chaque test d'Alamar Blue. De cette façon, le changement de couleur du milieu n'a été provoqué que par l'activité métabolique des cellules présentes à la surface de l'implant. Au contraire, les cellules ayant proliféré sur le plastique du fond du puits n'ont pas été prises en compte dans les résultats.

- *Cytotoxicité et prolifération*

Les résultats du test d'Alamar Blue sont présentés sur la Figure V-8.



**Figure V-8.** Résultats du test d'Alamar Blue réalisé sur des cellules MG-63ensemencées sur les implants avec et sans revêtement électrofilé de CaP. Les données résultent de la moyenne sur N=8 reproductions et les barres d'erreur représentent les écarts-types. Tous les échantillons présentent des résultats statistiquement différents ( $p < 0,0001$ , test ANOVA et comparaisons multiples post-hoc).

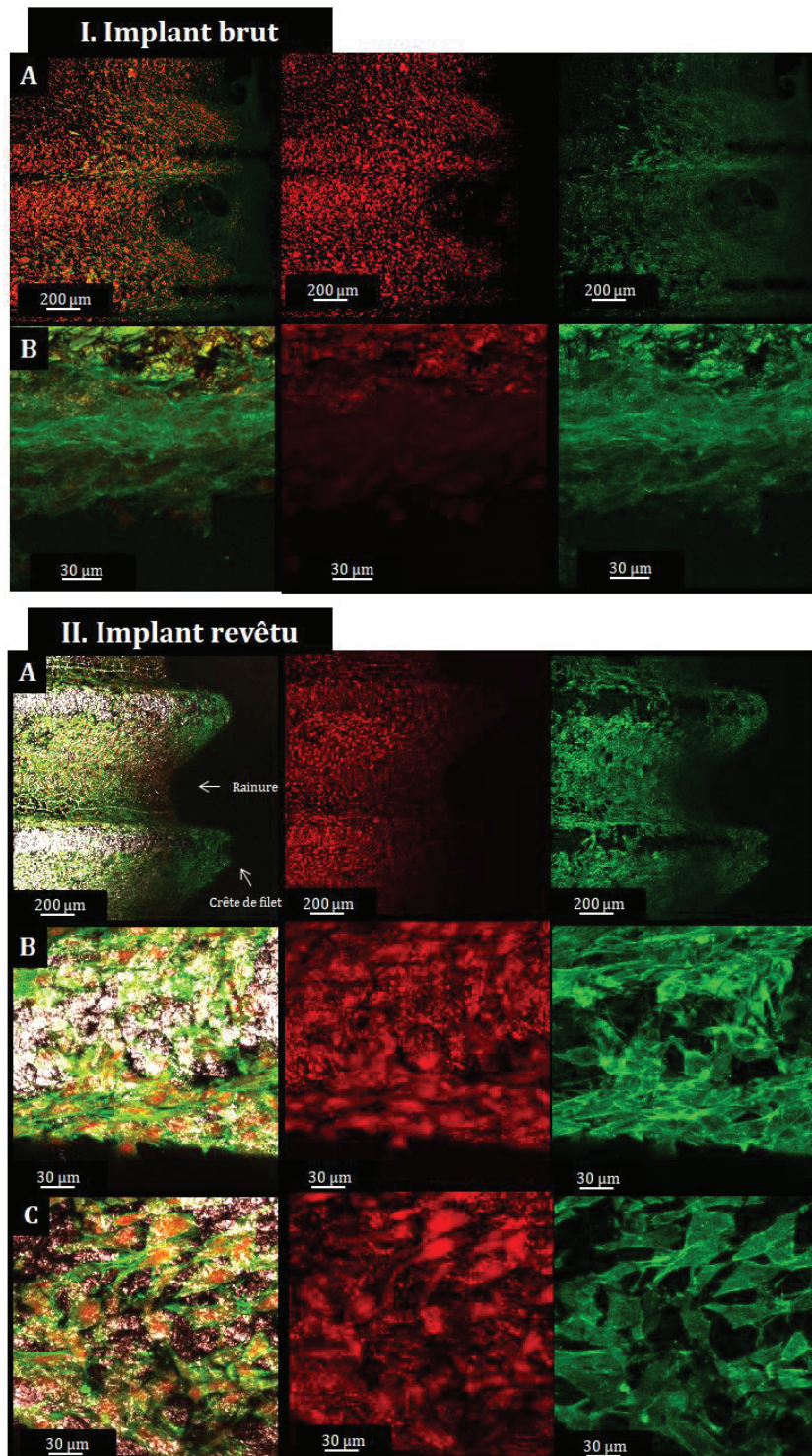
Tout d'abord, l'analyse ANOVA nous informe que sur la totalité du test le temps de contact explique à lui seul 82 % la variation de l'activité métabolique. Le type d'échantillon influence à 12 % la variation l'activité métabolique. Plus précisément, les résultats montrent que la cytocompatibilité (résultat au jour 1) de l'implant brut est augmentée d'un facteur 1,40 par l'ajout du revêtement électrofilé. De plus, le taux de prolifération des cellules entre le premier et le septième jour de culture est plus important sur l'implant revêtu (facteur 4,85) que sur

l'implant brut (facteur 4,21). En conséquence, l'activité métabolique des cellules est plus importante sur l'implant avec revêtement après 7 jours de culture cellulaire (augmentation de 1,61 par rapport à l'implant brut). Ces résultats suivent les mêmes tendances que ceux présentés dans le chapitre précédent sur les substrats plans. Cependant, les différences entre le TA6V et le revêtement CaP sont plus marquées dans cette étude que sur des pastilles planes. Ceci peut être principalement expliqué par le fait que la prolifération des cellules dans le fond du puits n'est pas prise en compte ici, et permet de considérer uniquement l'effet du substrat sur la réponse cellulaire.

En comparaison avec la littérature, M. Streckova *et al.* obtiennent quant à eux une viabilité cellulaire des MC3T3-E1 inférieure sur les revêtements électrofilés de CaP par rapport au TA6V brut après 1 jour de culture, et inférieure après 10 jours [149]. Nos revêtements présentent donc de meilleurs résultats en termes de cytocompatibilité et de prolifération cellulaire. Les différences peuvent notamment s'expliquer par un protocole de synthèse différent, puisque des précurseurs nitrate ont été utilisés par M. Streckova *et al.*

- *Microscopie confocale des cellules sur implants*

Les résultats de l'imagerie confocale sont présentés sur la Figure V-9. Notons tout d'abord que les cellules apparaissent moins étalées sur les implants non revêtus, avec une morphologie non typique des MG-63 (Figure V-9.I). Cependant, l'auto-fluorescence du titane ajoute du bruit de fond aux images et perturbe donc leur analyse.



**Figure V-9.** Microscopie confocale des cellules MG-63 cultivées à la surface I) des implants non revêtus et II) des implants recouverts de filaments de CaP. Marquage du noyau des cellules en rouge et de leurs filaments d'actine en vert. Pour l'implant brut : A) vue d'ensemble du filetage et B) grandissement sur la rainure. Pour l'implant revêtu : A) vue d'ensemble du filetage revêtu et grandissement sur les zones correspondant B) à la crête du filet et C) au fond de la rainure du filetage

Une répartition homogène des cellules est mise en évidence à la surface de l'implant revêtu, y compris dans la rainure du filet (Figure V-9.II.C). Seules les crêtes du filet montrent des densités cellulaires moins importantes (Figure V-9.II.B). Cette observation peut s'expliquer par le fait que dans les puits de culture, les implants sont déposés sur leur flan : les crêtes, directement en



contact avec le fond du puit, sont moins accessibles pour les cellules. Les implants ont de plus tendance à rouler dans le fond du puit, entraînant probablement un détachement cellulaire. De plus, la courbure convexe des supports de culture a déjà été identifiée comme étant moins favorable à la migration cellulaire, en comparaison aux courbures concaves [267]. Sur le reste de l'implant cependant, une importante densité cellulaire est constatée. Les cellules présentent des cytosquelettes bien étalés, indiquant une colonisation des MG-63 en plus de leur adhésion à la surface du revêtement.

En conclusion, cette étude préliminaire sur implants dentaires représente une preuve de concept sur la possibilité de recouvrir par électrofilage des implants possédant des structures en relief. De plus, le revêtement d'hydroxyapatite carbonatée présente une surface propice à la viabilité, à la prolifération et à la colonisation cellulaire.

## 2. DEPOTS LOCALISES ET ARCHITECTURES PAR ELECTRO-IMPRESSON

### 2.1. PRINCIPE ET INTERET DE L'ELECTRO-IMPRESSON

La méthode d'écriture directe par électro-impession est un procédé additif rapide et peu coûteux permettant de créer des motifs de haute résolution (quelques micromètres) en couplant l'électrofilage conventionnel avec un mouvement spatial du collecteur. Comme présenté dans le chapitre bibliographique de cette thèse, cette technique permet de créer des matériaux présentant des porosités adaptées à la colonisation cellulaire. Il nous a donc semblé intéressant d'utiliser cette méthode sur les matériaux de phosphate de calcium. Le but ultime serait de pouvoir comparer les réponses biologiques sur des revêtements présentant des architectures plus ou moins poreuses, rugueuses et orientées, obtenues soit par électrofilage, soit par électro-impession.

#### 2.1.1. Contrôle du filament par dépôt en champ proche

Lors de l'électrofilage conventionnel, présenté en Annexe 1, la solution de polymère ou le polymère fondu prend la forme d'un cône de Taylor en sortie d'aiguille. Le jet initié à l'extrémité de ce cône suit une trajectoire rectiligne sur une certaine longueur (appelée distance de jet stable) de quelques millimètres ou centimètres. Cette distance rectiligne est fortement dépendante des propriétés physico-chimiques de la solution et des paramètres expérimentaux. Le filament rectiligne est ensuite soumis à des instabilités et sa trajectoire est déviée de la ligne droite reliant l'aiguille au collecteur. Des phénomènes de courbures et de lasso apparaissent alors et rendent la trajectoire du jet incontrôlable et responsable du dépôt aléatoire des filaments sur le collecteur. Il en résulte une structure de mat non tissée typique du procédé d'électrofilage classique.

Afin de guider le dépôt des filaments, il est possible d'utiliser des collecteurs spécifiques tels que des collecteurs en mouvement. Cependant, le degré de contrôle sur la localisation du dépôt est

fortement dépendant de la distance aiguille-collecteur. Pour rendre compte de l'importance de ce paramètre, considérons le jet électrofilé et ses mouvements de déviation, illustrés sur la Figure V-10. Trois domaines sont à différencier : la distance sur laquelle le jet est rectiligne, celle où le jet subit une seule instabilité et celle où le jet est contraint à plusieurs instabilités. En plaçant le collecteur dans ces différentes zones, l'électrofilage est dit à champ proche, à champ moyen et à champ lointain, respectivement [268].

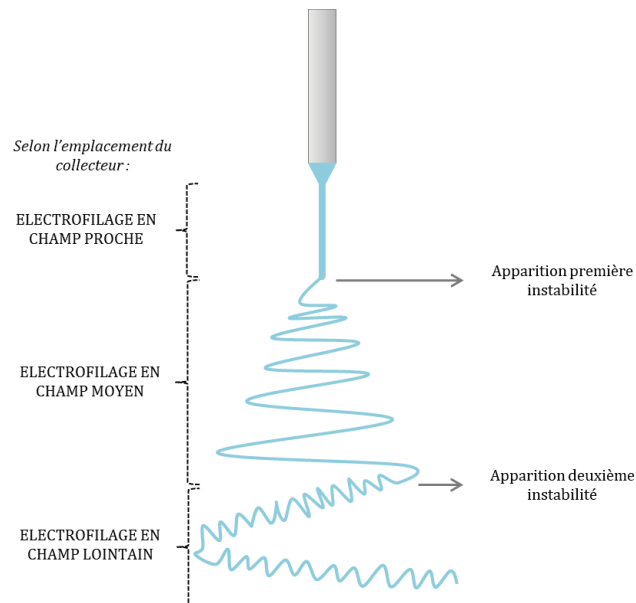


Figure V-10. Corrélation entre stabilité du jet et type d'électrofilage

L'électrofilage en champ lointain - associé à plusieurs instabilités de jet - ne permet pas un contrôle de la trajectoire du jet à l'échelle du filament. Par contre, il est possible de forcer le cône formé par le filament instable à suivre une trajectoire déterminée afin de déposer les filaments non tissés selon un motif plus ou moins complexe. Le jet peut en effet être orienté à l'aide d'électrodes [269] ou de collecteurs rotatifs [270]. Des motifs spécifiques peuvent également être obtenus par l'ajout d'un fil électrique relié à la masse sous un collecteur isolant, comme présenté sur la Figure V-11. Dans ce cas, le jet se dépose préférentiellement sur les zones du substrat se trouvant au-dessus du fil électrique.

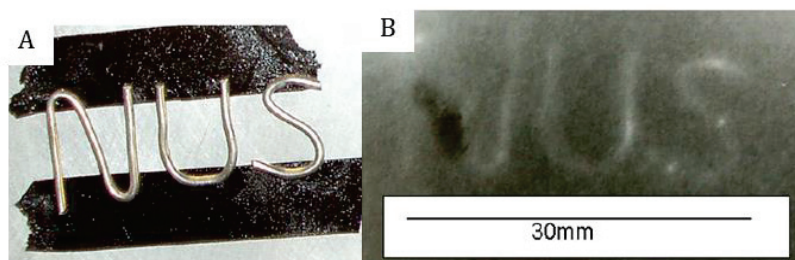
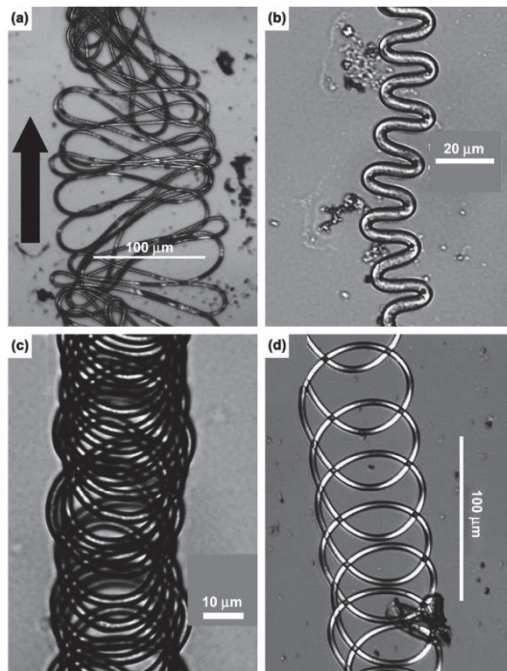


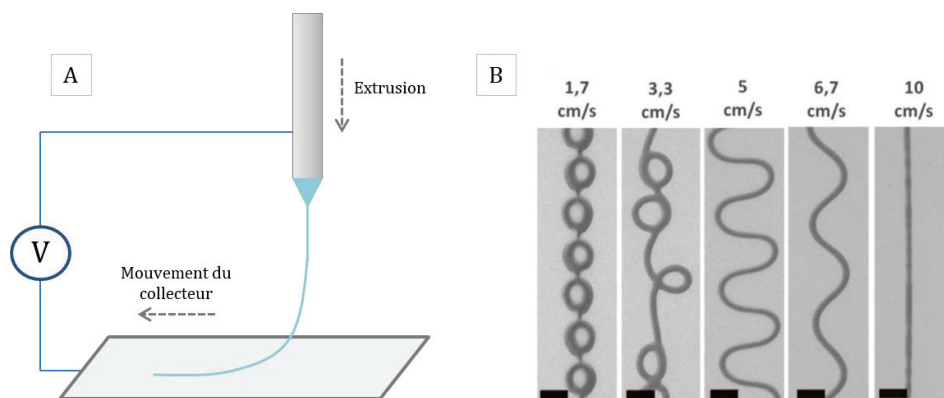
Figure V-11. Insertion d'un fil électrique relié à la masse sous une lamelle de verre lors de l'électrofilage. A) Géométrie du fil de fer et B) Géométrie du dépôt électrofilé résultant. Adapté de [270]

En condition de champ moyen, un déplacement linéaire du collecteur permet des dépôts de serpentins plus ou moins enroulés sur eux-mêmes. La géométrie en serpentins résulte directement de la première instabilité s'appliquant sur le filament électrofilé. La Figure V-12 rassemble quelques exemples de géométries formées avec des filaments de polystyrène [271].



**Figure V-12.** Images MEB de serpentins de polystyrène obtenus par électrofilage en champ moyen. Le mouvement du collecteur (vitesse de 2 m/s) suit la direction indiquée par la flèche noire. Image reproduite de [271]. Les différences de conditions expérimentales entre les figures a, b, c et d ne sont pas précisées dans l'article d'origine

Enfin, le jet peut être contrôlé à l'échelle du filament en utilisant une distance aiguille-collecteur inférieure à la distance de jet stable. Cette technique, nommée électrofilage en champ proche ou « near-field electrospinning » en anglais, peut également être associée au terme « électroimpression ». Un filament continu peut de cette façon être déposé de manière rectiligne sur un collecteur en mouvement (Figure V-13.A). Pour cela, la trajectoire rectiligne du jet n'est pas la seule condition à respecter. En effet, la vitesse de déplacement du collecteur doit être comparable à la vitesse du filament, cette dernière étant fonction du champ électrique appliqué. La vitesse du collecteur est généralement comprise entre 10 et 200 mm/s [170]. L'influence de la vitesse du collecteur sur la morphologie d'un filament de polycaprolactone est montrée sur la Figure V-13.B.

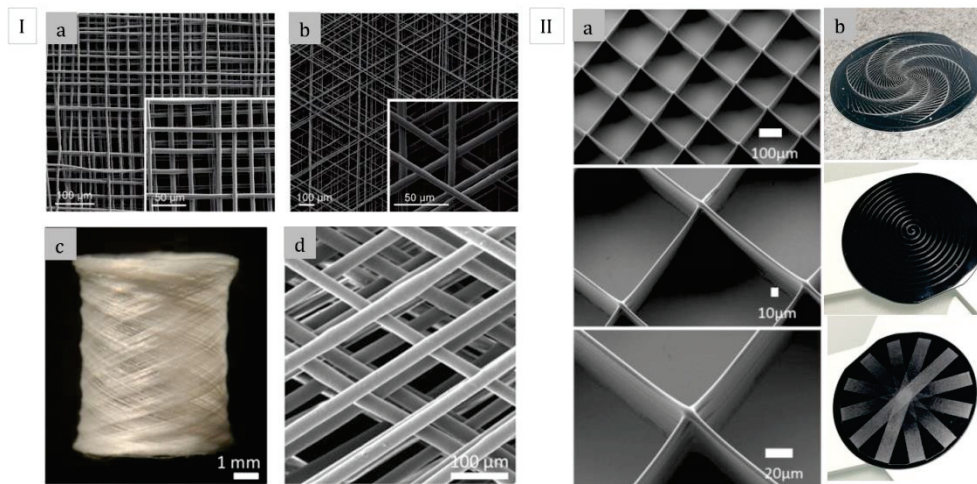


**Figure V-13.** A) Schéma de l'électrofilage en champ proche et B) Morphologie d'un filament de polycaprolactone déposé pour différentes vitesses du collecteur. Débit de 0,02 mL/h, distance de travail de 3 mm (barre d'échelle de 50 μm). Reproduit de [272]

Selon la vitesse du collecteur, des boucles, des sinusoides ou des lignes droites sont déposées sur le collecteur en mouvement. Il est à noter que le choix de la distance de travail doit être un compromis entre une distance assez courte pour garder un filament rectiligne et une distance suffisante pour permettre l'évaporation du solvant avant que le filament n'atteigne le collecteur (ou sa solidification dans le cas du filage de polymères fondus).

### 2.1.2. Elaboration de structures complexes

En champ proche, il est également possible de préparer des structures 3D si le collecteur peut se déplacer dans les trois directions de l'espace. Ainsi, un déplacement selon l'axe z permet de superposer plusieurs couches de filaments. Un empilement précis nécessite par conséquent une bonne résolution du placement du collecteur dans l'espace selon les axes x et y [170]. Des motifs spécifiques, dont des exemples sont donnés sur la Figure V-14, peuvent alors être obtenus.



**Figure V-14.** Images MEB et macroscopiques d'exemples de motifs obtenus par electrofilage en champ proche. I) Electrofilage de PCL fondu avec une orientation de a) 90 ° et b) 60 ° entre les différentes couches de lignes parallèles [273]; c) et d) un mouvement rotatif du collecteur en plus de son déplacement linéaire pour l'obtention de tubes (vues macro- et microscopiques respectivement) [274]. II) Electrofilage de PCL en solution : a) grilles empilant 20 couches de filaments avec une orientation de 90 ° entre les couches [272] et b) autres structures possibles, avec notamment des structures courbées (échelle : substrats de 5 cm de diamètre) (échantillons préparés par Céline Mandon au LMI, résultats non publiés)

Le diamètre du filament déposé peut lui aussi être contrôlé en faisant varier les paramètres expérimentaux tels que le débit d'extrusion, la valeur du champ électrique ainsi que la vitesse de déplacement du collecteur [273]. La versatilité de la technique et la diversité des motifs réalisables sont cependant limitées par deux paramètres. Le premier est la continuité du jet : une extrusion continue de la solution est nécessaire, puisqu'une interruption de l'électrofilage induit des défauts dans le motif. Le second concerne les changements de direction du collecteur : ces derniers s'accompagnent d'une perte de vitesse et donc d'un étirage possiblement différent du jet par rapport à celui observé à vitesse constante. L'ajout de déplacements additionnels (ne faisant pas partie du motif désiré) permet de conserver une vitesse constante au niveau de la structure souhaitée ; cet aspect est abordé plus en détails dans l'Annexe 3.

### 2.1.3. Considérations biologiques

L'ingénierie tissulaire consiste à régénérer des tissus endommagés en créant des assemblages (ou « scaffolds ») permettant de reproduire les contraintes structurales et physico-chimiques de la matrice extracellulaire (ECM). Le tissu osseux présente une architecture complexe avec différents niveaux d'organisation entre les échelles nano- et macroscopiques [160], comme schématisé sur la Figure V-15.

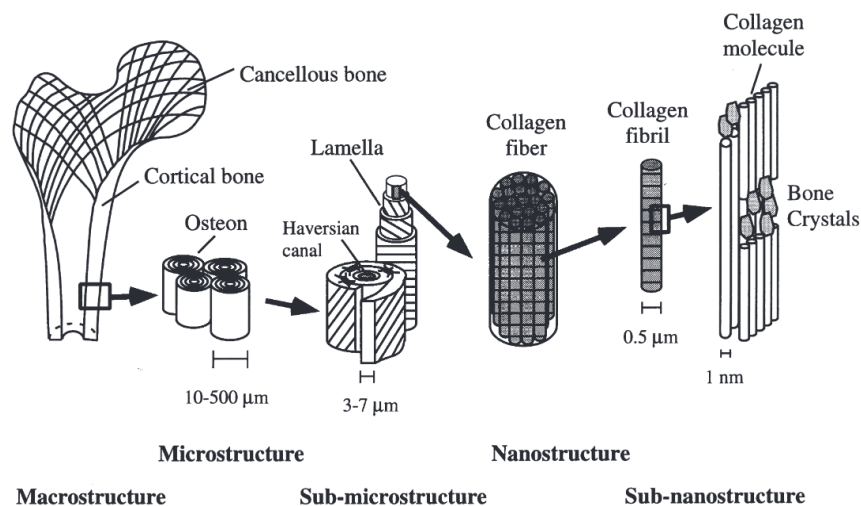


Figure V-15. Organisation structurale hiérarchique de l'os. Reproduit de [275]

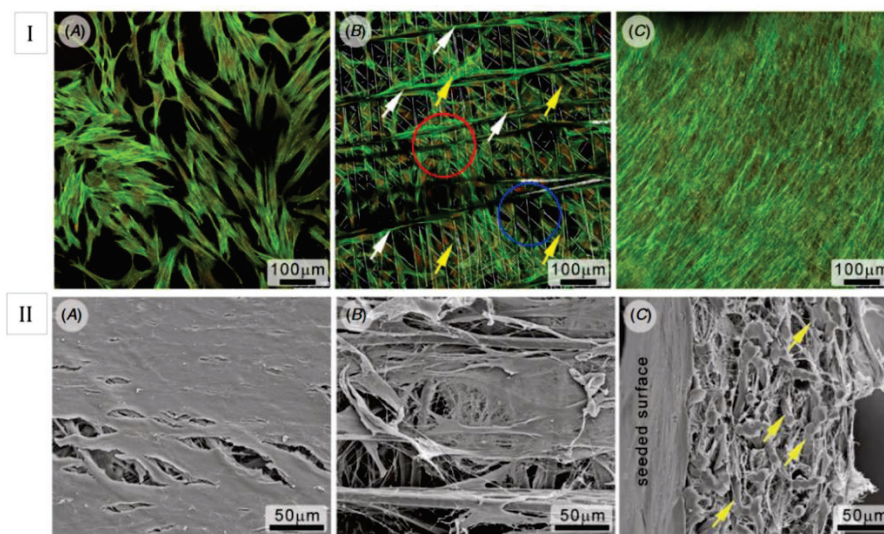
Si reproduire à l'identique la structure de l'os n'est pas envisageable (cela représenterait de nombreux challenges dans l'exécution), la simplification dans le design des scaffolds se doit cependant de prendre en compte certains critères spécifiques. En particulier, son architecture doit permettre la colonisation cellulaire et le flux de nutriments à travers sa porosité ; ces aspects sont discutés en détails dans le chapitre bibliographique (Chapitre I, partie 3.1). De plus, les propriétés mécaniques du scaffold interviennent dans l'activité cellulaire. L'os est en effet un tissu mécano-sensible, c'est-à-dire que les cellules répondent à des stimuli mécaniques [276] et la croissance osseuse, dictée par les ostéoblastes, en dépend. La structure hiérarchisée de l'os permet de supporter les forces extérieures induites par les mouvements du corps, et cette structure est directement reliée aux pressions mécaniques subies par les cellules. Kian Eichholz et David Hoey ont en effet montré que les caractéristiques morphologiques d'un motif électro-imprimé influencent directement ses propriétés mécaniques et par conséquent la forme des cellules qui y sont cultivées, l'expression des protéines associées aux signalements mécaniques (YAP), ainsi que l'expression de marqueurs ostéogéniques [277].

Notons que, bien que l'électrofilage conventionnel soit largement utilisé pour la préparation de matériaux pour l'ingénierie tissulaire en général, et l'ingénierie tissulaire osseuse en particulier [160], les tailles de pores obtenues par cette méthode sont généralement de quelques micromètres ou de quelques dizaines de micromètres [167]. Pour des structures inorganiques, qui sont difficilement déformables, ces tailles sont donc incompatibles avec l'infiltration cellulaire, mais adaptées à la circulation des nutriments. L'électrofilage conventionnel semble donc plus particulièrement adapté à l'élaboration de revêtements sur implants, pour lesquels l'infiltration cellulaire n'est pas nécessaire (contrairement aux scaffolds nécessitant une régénération dans le volume). Dans notre étude, l'intérêt de déposer les revêtements par

électro-impulsion permettrait de pouvoir, à terme, déterminer les architectures présentant des porosités et contrainte mécaniques optimales pour l'activité cellulaire.

#### 2.1.4. L'électro-impulsion pour l'ingénierie tissulaire

L'élaboration de structures polymères électrofilées en champ proche a été appliquée à l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire [278], de greffes vasculaires [279] ou encore de l'os [280]. Dans ce dernier cas par exemple, les fibroblastes ont montré une croissance localisée à partir de points d'ancrage au niveau des intersections dans un motif de PCL (Figure V-16.I). Les cellules ont initialement étéensemencées sur la face supérieure du scaffold mais sa porosité a permis l'infiltration des cellules à travers l'épaisseur totale du matériau après 14 jours de culture (Figure V-16.II).



**Figure V-16.** I) Microscopie confocale des fibroblastes cultivés sur A) des lamelles de verre et B) et C) des scaffolds de PCL après 7 et 14 jours de culture, respectivement. Les flèches indiquent la position de fibroblastes ayant proliféré le long des filaments de PCL (flèches blanches) et à travers la porosité (flèches jaunes). Les cercles de couleur identifient des zones de forte (cercle rouge) et faible (cercle bleu) densités de filaments et de cellules. II) Microscopie MEB montrant l'infiltration des cellules après 14 jours de culture. Les fibroblastes sont présents sur A) la face supérieure où les cellules ont étéensemencées, B) la face opposée du scaffold et C) l'intégralité de l'épaisseur (flèches jaunes : points d'attache des fibroblastes aux filaments de PCL). Reproduit de [280]

#### 2.1.5. Ajout de charges inorganiques

La polycaprolactone est un polymère largement utilisé pour l'électro-impulsion, et ce principalement à l'état fondu. Des filaments composites intégrant des céramiques ont également été déposés en mélangeant des poudres céramiques avec le polymère avant impulsion. Par exemple, des composites PCL/HAp ont été déposés par électro-impulsion voie fondue [281–283]. Les ostéoblastes cultivés à la surface des motifs montrent une croissance guidée à la fois par les filaments et la structure du motif imprimé. De plus, une meilleure prolifération des cellules a été suggérée avec l'augmentation de la concentration en hydroxyapatite [283]. Le verre bioactif 455S a également été intégré dans des structures électro-imprimées mais aucune évaluation biologique n'a été réalisée [284,285]. La présence du bioverre 455S (ou du 455S dopé

au Strontium) semble en outre perturber le jet lors de son dépôt [285]. Il est à noter que la littérature ne rapporte aucune synthèse de structure 100 % inorganique par électro-impulsion.

## 2.2. ADAPTATION DE LA SOLUTION DE CaP AU PROCÉDE D'ÉLECTRO-IMPULSION

Comme mentionné précédemment, la technique d'électro-impulsion implique des conditions de filage en champ proche. Dans ce sens, il est important de pouvoir utiliser une solution présentant une longueur de jet stable (notée LJS) suffisamment élevée en sortie d'aiguille. Or la solution de CaP et PVA jusqu'alors utilisée pour préparer nos revêtements ne présente pas une distance rectiligne suffisante. On a en effet pu constater une diminution de la distance de jet stable lors de l'ajout du sol inorganique dans la solution de PVA, comme présenté sur la Figure V-17.

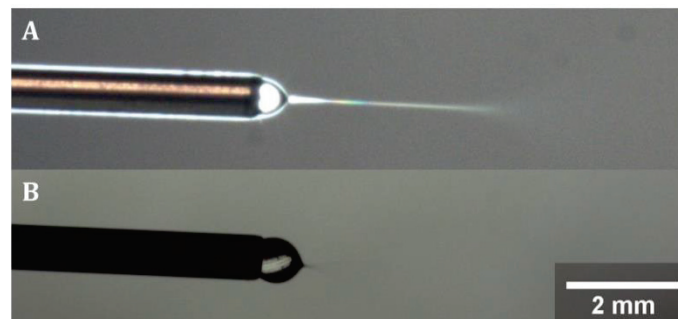


Figure V-17. Imagerie du jet électrofilé de A) PVA 7% et B) PVA 7% + sol de CaP avec  $[Ca] = 1,5 \text{ M}$  et  $Ca/P = 1,67$

Alors qu'une solution de PVA seul à 7 %<sub>masse/vol</sub> dans l'eau présente une longueur de jet stable de 3,4 mm, la même solution incorporant le sol de CaP présente un jet perturbé dès la sortie de la goutte. Une explication proposée est que la présence des sels augmente la conductivité de la solution, impliquant de plus grandes instabilités sous l'effet du champ électrique [11]. Afin de stabiliser la trajectoire de ce dernier, la composition de la solution électrofilée a été modifiée, comme expliqué dans cette partie 2.2.

Une étude préliminaire d'électro-impulsion des solutions de CaP, non détaillée ici, a été réalisée avec le PEO de masse molaire  $M_w = 200\,000\text{-}300\,000 \text{ g/mol}$  comme polymère. Bien que des filaments aient pu être déposés de manière rectiligne par électro-impulsion, leur morphologie était perdue lors du traitement thermique. Ce phénomène peut être associé aux propriétés thermiques du polymère et plus précisément à sa brutale dégradation thermique, mise en évidence par analyse ATG-DSC (non montrée ici). De plus, une concentration minimale de 17 %<sub>masse/vol</sub> de PEO est nécessaire à l'obtention de filaments homogènes et non perlés. Cette quantité non négligeable, associée à une décomposition rapide en température, entraîne alors une perte de la structure des filaments.

Pour rappel, il a été montré dans les chapitres précédents que l'utilisation de solutions contenant 7 %<sub>masse/vol</sub> de PVA permettait de préparer des filaments céramiques qui conservent leur morphologie en température. Dans ce contexte, des solutions contenant un mélange de PVA et de PEO ont alors été utilisées. Le PEO permet de rendre le jet plus stable, et l'ajout de PVA

permet de limiter la quantité de PEO à un minimum compatible avec la conservation de la morphologie des filaments lors du traitement en température. Ainsi, un PEO de haut poids moléculaire - 5 000 000 g/mol - est choisi en complément du PVA pour apporter des propriétés viscoélastiques adéquates aux solutions électro-imprimées. L'augmentation du poids moléculaire est en effet associée à une meilleure stabilité des jets sous champ électrique [11]. Cette étude a été réalisée par Shiyu Zhang, étudiante en master 1 Nanoscale Engineering de l'université Lyon 1.

### 2.2.1. Partie expérimentale

La Figure V-18 schématise le protocole utilisé pour la préparation des solutions électro-imprimées. Le triéthylphosphite est pré-hydrolysé dans l'eau pendant 2 heures pendant qu'une solution aqueuse d'acétate de calcium est préparée. Les deux solutions sont ensuite mélangées puis agitées à 40 °C pendant 21 heures. Le polymère (PEO et/ou PVA) est ensuite ajouté sous forme de poudre. Lorsque le PVA est utilisé, sa concentration finale est de 6 %<sub>masse/vol</sub>. Pour le PEO, une gamme de concentrations comprises entre 0 et 1 %<sub>masse/vol</sub> est réalisée. Au-delà de cette concentration, des problèmes de solubilité sont constatés. Après ajout du polymère, la solution est agitée pendant 3 heures à 40 °C puis pendant 21 heures à 60 °C. La solution finale présente une concentration en calcium de 1,5 M et un rapport molaire Ca/P de 1,67.

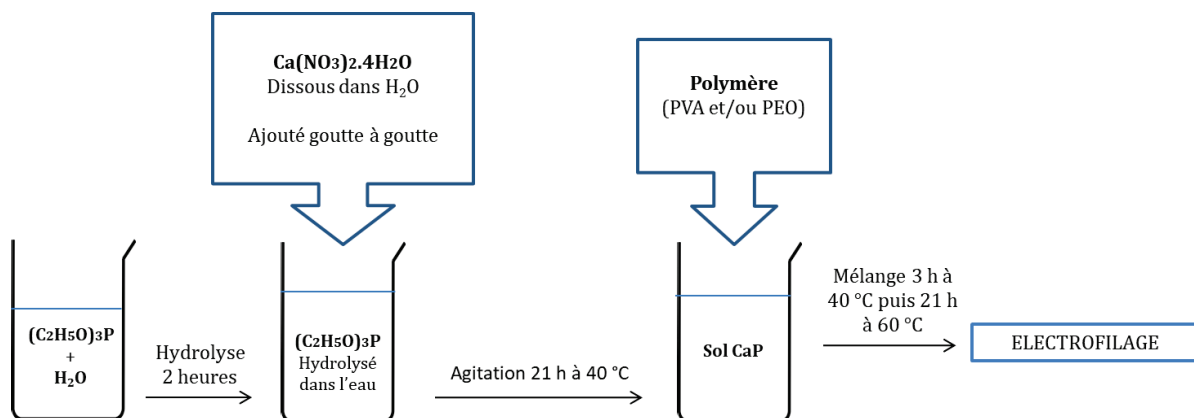


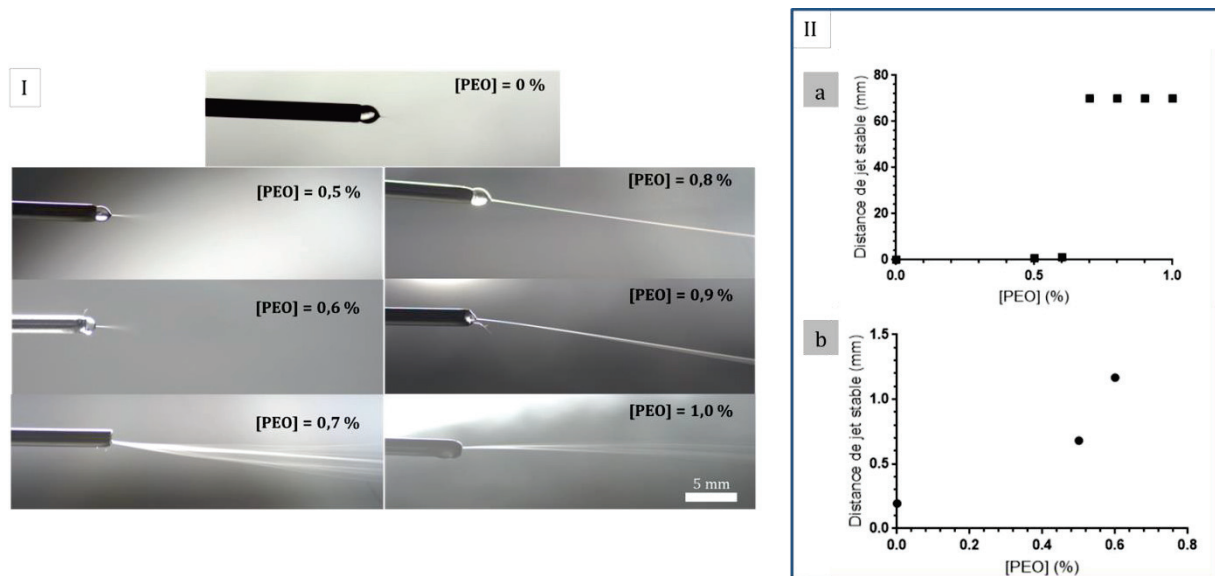
Figure V-18. Schéma de synthèse des solutions de CaP en vue d'une utilisation en électro-impression

Une première étude a été menée en électrofilage classique (sans déplacement du collecteur) pour déterminer les distances de jet stable des solutions. La distance de travail est fixée à 7 cm, les valeurs de débit sont comprises entre 0,02 et 0,12 mL/h, et la tension entre 2 et 10 kV.

### 2.2.2. Etude de la stabilité du jet en fonction de la concentration en PEO

Sept solutions ont été préparées avec des concentrations en PEO comprises entre 0 et 1 %<sub>masse/vol</sub>, les concentrations en CaP et PVA restant fixes. Les images du jet en sortie d'aiguille en fonction de la concentration en PEO sont proposées sur la Figure V-19.I. Les longueurs de jet stable, déterminées par analyse d'image, sont quant à elles reportées sur la Figure V-19.II.





**Figure V-19.** I) Images du jet électrofilé en sortie d'aiguille pour des solutions de concentration en PEO variable: [PEO] ∈ [0 ; 1,0] %masse/vol (et [PVA]= 6 %masse/vol). II) a) Mesures des distances de jet stable en fonction de la concentration en PEO et b) Même graphique sur une plage de données plus restreinte

Notons tout d'abord que sur les images enregistrées pour les solutions à 0,7 et 1,0 %<sub>masse/vol</sub> de PEO, on distingue plusieurs lignes composant le jet. Ces dernières sont dues à la faible vitesse d'acquisition de la caméra (de quelques images par seconde) et à l'oscillation rapide du jet sur un faible rayon de giration. Par ailleurs, l'observation des images montre que l'augmentation du taux de PEO dans la solution permet de rendre le jet plus rectiligne. Pour des concentrations en PEO inférieures à 0,6 %<sub>masse/vol</sub>, l'ajout de PEO est associé à une faible augmentation de la longueur de jet stable. En effet, la distance augmente d'un facteur 6 entre les solutions de concentrations [PEO] = 0 %<sub>masse/vol</sub> (LJS<sub>PEO 0 %</sub> = 0,2 mm) et [PEO] = 0,6 %<sub>masse/vol</sub> (LJS<sub>PEO 0,6 %</sub> = 1,2 mm). En revanche, une brusque augmentation de la distance de jet stable est constatée pour une concentration en polymère de 0,7 %<sub>masse/vol</sub> : le facteur d'augmentation de la longueur rectiligne est alors de 58 entre les solutions de concentration [PEO] = 0,6 %<sub>masse/vol</sub> (LJS<sub>PEO 0,6 %</sub> = 1,2 mm) et [PEO] = 0,7 %<sub>masse/vol</sub> (LJS<sub>PEO 0,7 %</sub> = 70 mm). Enfin, un palier est observé à partir de cette même concentration en PEO (0,7 %<sub>masse/vol</sub>) puisque les solutions de concentrations supérieures présentent un jet rectiligne jusqu'au collecteur, soit sur une distance de 7 cm.

Cette augmentation brutale de la stabilité du jet a déjà été rapportée dans la thèse de Laura Bourdon [272], et ce pour différentes solutions polymères (PEO, PLGA, PCL) et différents poids moléculaires. Pour le PEO à 5 000 000 g/mol par exemple, les instabilités du jet ont été éliminées pour une concentration de 0,7 %<sub>masse/vol</sub>. Ce résultat est donc identique à celui obtenu dans notre cas en présence de PVA et de phosphate de calcium. Même à très faible concentration, le PEO à haut poids moléculaire permet d'augmenter considérablement la longueur de jet stable des solutions. Dans des solutions de polymères, l'allongement de cette distance de jet stable a été reliée à une augmentation de la viscosité et de l'élasticité des solutions [272]. Ces paramètres permettent en effet au filament de mieux résister aux instabilités résultant du champ électrique, et donc de conserver une trajectoire plus rectiligne. Afin de valider ces hypothèses, la partie suivante (2.2.3) présente une analyse rhéologique de plusieurs solutions.

Il est également important de noter qu'une solution de phosphate de calcium contenant jusqu'à 1,0 %<sub>masse/vol</sub> de PEO permet de conserver la morphologie des filaments après traitement

thermique (Figure V-20). Pour limiter la quantité de PEO tout en conservant un filage très stable et rectiligne, il a donc été décidé de poursuivre les investigations en électro-impulsion avec la solution contenant 0,8 %<sub>masse/vol</sub> de PEO.

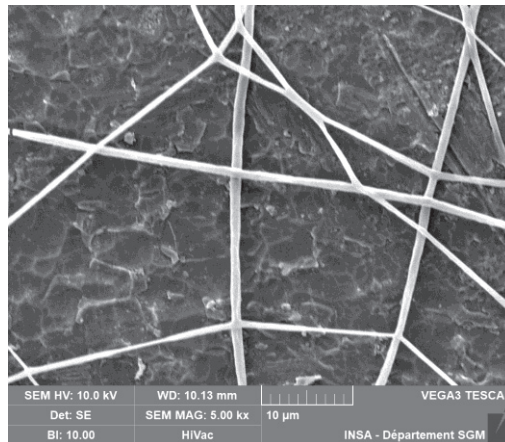


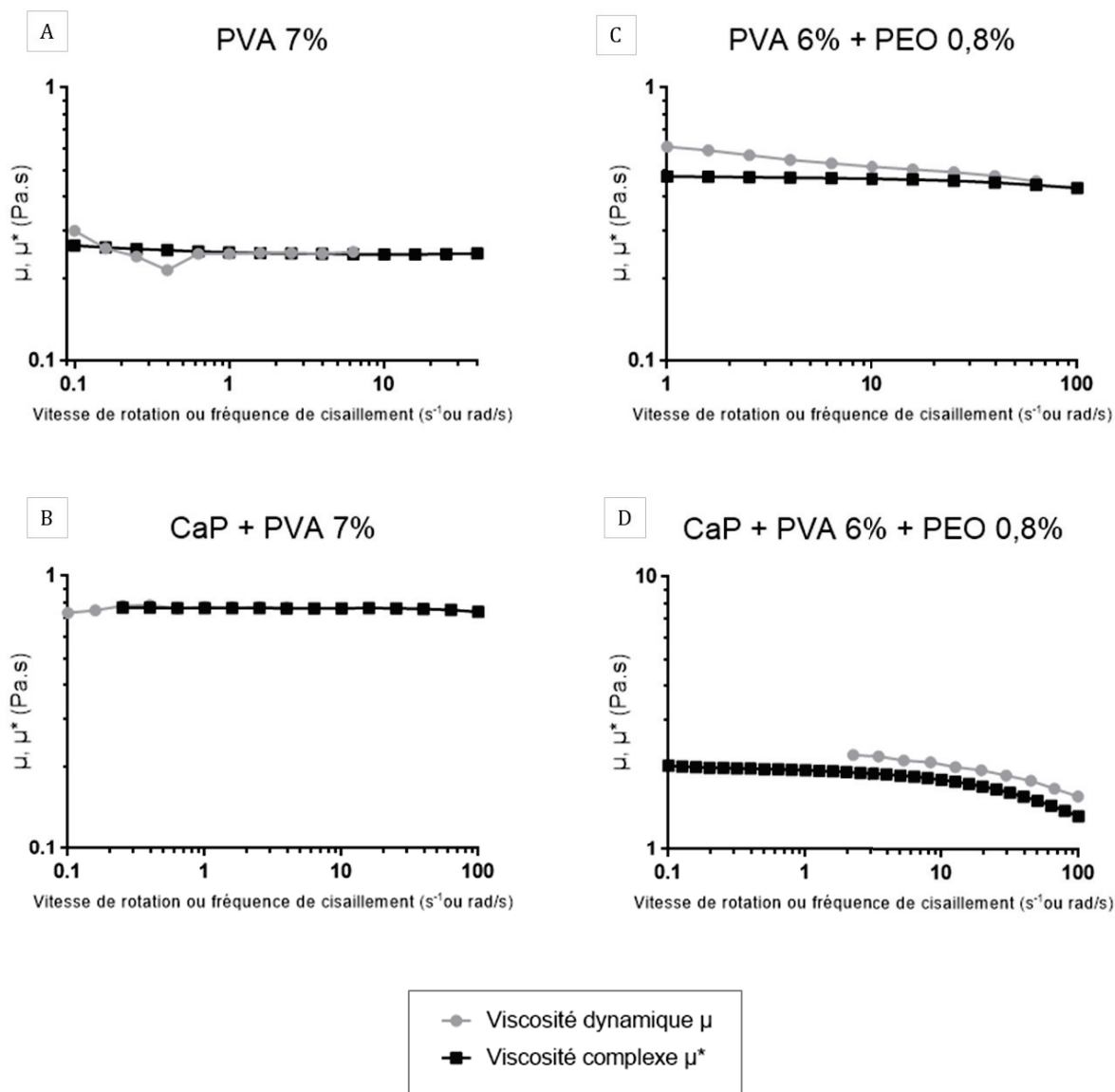
Figure V-20. Image MEB des filaments électrofilés de CaP obtenus avec la solution contenant 1,0 %<sub>masse/vol</sub> de PEO. Après traitement thermique à 550 °C

### 2.2.3. Etude rhéologique des solutions électrofilables

Afin d'établir un lien entre la composition de la solution et sa stabilité au filage, une analyse rhéologique des solutions de CaP utilisées en électrofilage classique et en électro-impulsion a été réalisée. Pour cela, des expériences ont été réalisées en régimes statique et dynamique sur un rhéomètre de type Couette (cf. Techniques expérimentales). Les viscosités ont été déterminées graphiquement, et le modèle rhéologique de Maxwell généralisé [286] et la loi de comportement de Carreau-Yasuda [287] ont été envisagés pour déterminer les temps de relaxation de ces solutions.

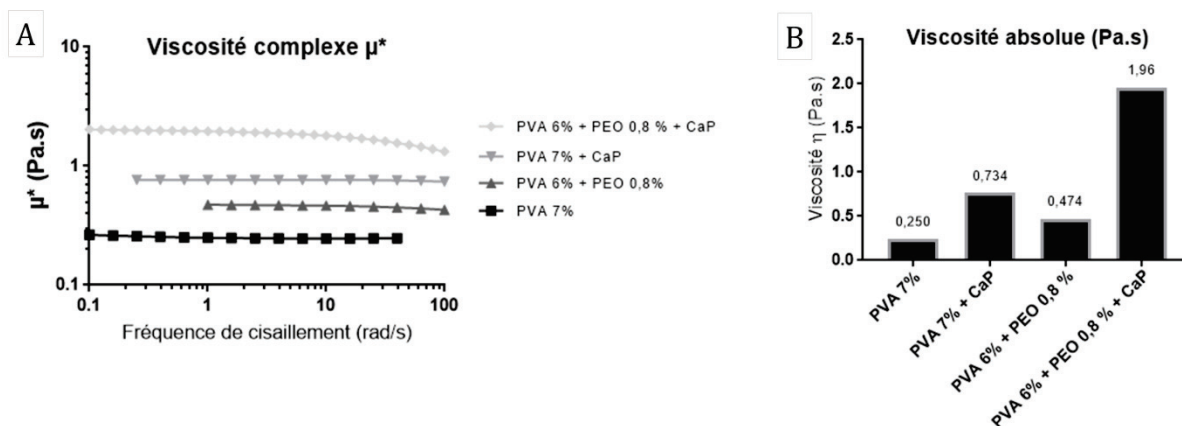
- *Détermination de la viscosité*

La Figure V-21 représente les graphiques de viscosités dynamique (obtenue en régime statique) et complexe (obtenue en régime dynamique) des solutions électrofilables de CaP. Pour rappel, la solution CaP+PVA (avec 7 %<sub>masse/vol</sub> de PVA) est utilisée en électrofilage conventionnel pour former un dépôt aléatoire du filament. Comme vu précédemment, la solution CaP+PVA+PEO (avec 6 %<sub>masse/vol</sub> de PVA et 0,8 %<sub>masse/vol</sub> de PEO) est quant à elle adaptée au procédé d'électro-impulsion. Pour ces deux systèmes, les solutions de polymères associées, c'est-à-dire sans ajout de précurseurs de phosphate de calcium, ont également été étudiées à titre de comparaison.



**Figure V-21.** Evolution des viscosités dynamiques et complexes en fonction de la fréquence de cisaillement pour les solutions de A) PVA à 7 %<sub>masse/vol</sub> ; B) PVA à 7 %<sub>masse/vol</sub> contenant le sol de CaP ([Ca] = 1,52 M) ; C) PVA à 6 %<sub>masse/vol</sub> et PEO à 0,8 %<sub>masse/vol</sub> ; D) PVA à 6 %<sub>masse/vol</sub>, PEO à 0,8 %<sub>masse/vol</sub> et contenant le sol de CaP ([Ca] = 1,52 M)

Les courbes de la Figure V-21.A montrent que la viscosité dynamique  $\mu$  de la solution de PVA est peu stable aux faibles fréquences : la solution n'était probablement pas à l'équilibre dans le cylindre du rhéomètre au début de la mesure rhéologique. A plus haute fréquence, les valeurs de viscosité dynamique et de viscosité complexe sont comparables, en adéquation avec la loi empirique de Cox-Merz. Cette adéquation est également valable pour toutes les autres solutions. Pour cette raison, les viscosités des différentes solutions ont été déterminées uniquement à partir des courbes de viscosité complexe  $\mu^*$ . Les courbes obtenues pour chaque solution sont comparées dans un même graphique sur la Figure V-22.A.

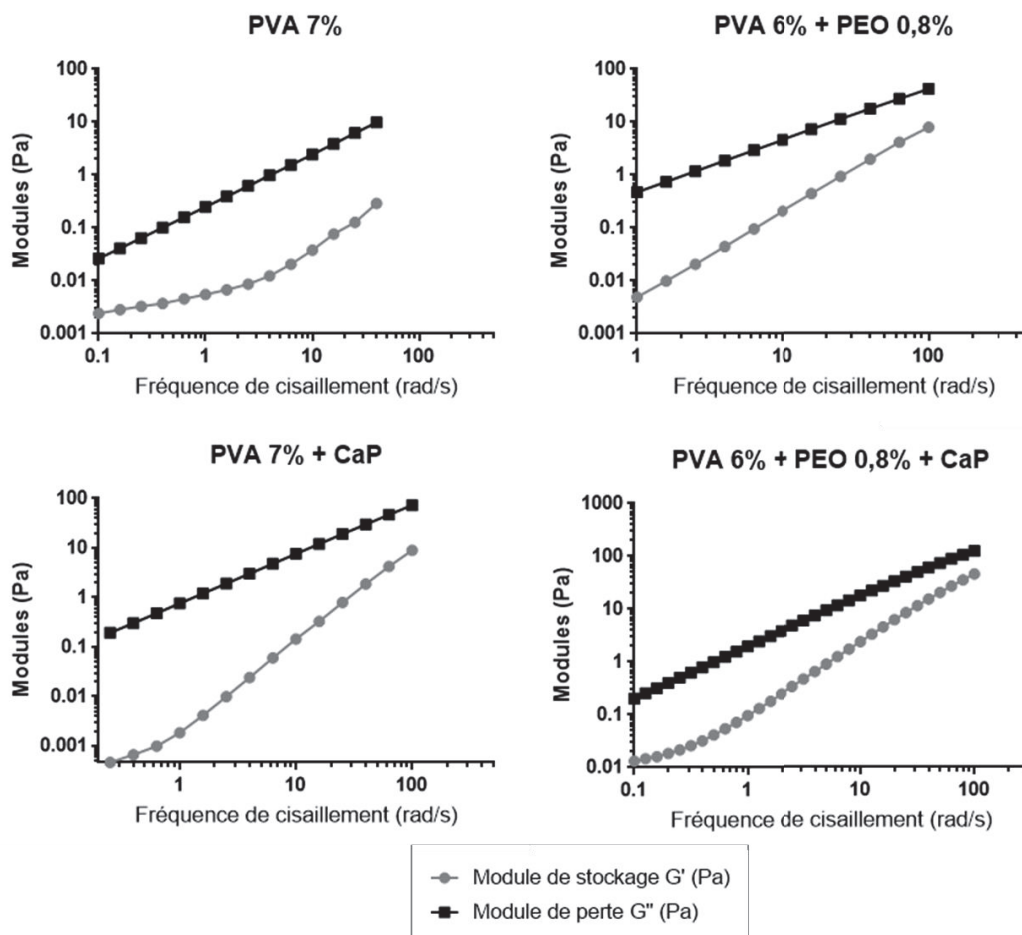


**Figure V-22.** A) Evolution de la viscosité complexe des solutions et B) Comparaison des valeurs de viscosité mesurées à 1 rad/s pour les solutions de PVA seul, du mélange PVA+PEO, ainsi que les solutions contenant les sols de CaP (mélanges PVA+CaP et PVA+PEO+CaP).

Les solutions de PVA, de PVA+PEO et de PVA+CaP montrent un comportement newtonien. En effet, leur viscosité n'est pas fonction de la fréquence de cisaillement sur le domaine de fréquence étudié. La solution de PVA+PEO+CaP montre quant à elle un plateau newtonien aux faibles fréquences et un très léger comportement rhéofluidifiant, c'est-à-dire que sa viscosité diminue avec l'augmentation de la fréquence de cisaillement. Ce comportement est cependant très peu marqué : les fluides rhéofluidifiants montrent généralement des variations de viscosité d'une décade environ, alors qu'elle est ici très inférieure à l'unité. Pour les quatre solutions étudiées, il paraît donc tout à fait adapté de considérer la viscosité à 1 rad/s comme viscosité absolue  $\eta$ . Les valeurs de viscosité alors retenues sont représentées sur la Figure V-22.B.

- *Détermination des temps de relaxation*

Le temps de relaxation  $\lambda$  d'une solution caractérise son élasticité : il correspond en effet au temps nécessaire à la solution pour retrouver son état d'équilibre après qu'elle ait été soumise à une sollicitation mécanique. Expérimentalement, il peut être déterminé en prenant l'inverse de la fréquence de cisaillement correspondant au point de croisement des courbes  $G'$  (module élastique ou « de stockage ») et  $G''$  (module visqueux ou « de perte »). Pour les solutions étudiées ici, les courbes de  $G'$  et  $G''$  ne se croisent pas dans le domaine de fréquence étudié (Figure V-23).



**Figure V-23.** Modules de perte et de stockage mesurés en régime dynamique pour les solutions de PVA seul, du mélange PVA+PEO, ainsi que des solutions contenant les sols de CaP (mélange PVA+CaP et PVA+PEO+CaP)

Le modèle de Maxwell généralisé et la loi de comportement de Carreau-Yasuda ont été envisagés pour déterminer les temps de relaxation des solutions. Les fluides étant principalement newtoniens, la loi de Carreau-Yasuda ne permet pas de déterminer les temps de relaxation pour les solutions de PVA, PVA+PEO et PVA+CaP. De la même façon, l'ajustement du modèle de Maxwell n'est pas suffisamment précis pour déterminer des valeurs de temps de relaxation pour les différentes solutions. Cependant, il ressort (qualitativement) de cette analyse que la solution PVA+PEO+CaP présente un temps de relaxation supérieur aux trois autres solutions.

- *Discussion : lien entre propriétés viscoélastiques et stabilité du jet en électrofilage*

Différentes observations peuvent être faites par l'analyse des graphiques de la viscosité complexe et des modules de perte et de stockage.

#### *INFLUENCE DU POLYMER*

Il apparaît tout d'abord que le mélange PVA+PEO présente une distance de jet stable maximale (jusqu'au collecteur, soit 7 cm), alors qu'elle est inférieure à 7 mm pour la solution de PVA à 7 %<sub>masse/vol</sub>. L'influence de l'ajout de PEO dans la solution de PVA n'est pas directement interprétable en raison d'une concentration différente en PVA dans les deux solutions (6 et

7 %<sub>masse/vol</sub>). L'ajout de PEO peut cependant être qualitativement relié à la différence de viscosité entre ces deux solutions, responsable de la stabilisation du jet en électrofilage.

#### INFLUENCE DES PRECURSEURS INORGANIQUES

L'ajout du sol de phosphate de calcium dans les solutions de polymères augmente leur viscosité. Pour la solution à 7 %<sub>masse/vol</sub> de PVA ( $\eta_{\text{PVA}} = 0,250 \text{ Pa.s}$ ), l'ajout de charge inorganique entraîne une augmentation de la viscosité d'un facteur 3 ( $\eta_{\text{PVA+CaP}} = 0,734 \text{ Pa.s}$ ). Pour la solution à 6 %<sub>masse/vol</sub> de PVA et 0,8 %<sub>masse/vol</sub> de PEO ( $\eta_{\text{PVA+PEO}} = 0,474 \text{ Pa.s}$ ), l'ajout de CaP multiplie la valeur de viscosité d'un facteur 4,2 ( $\eta_{\text{PVA+PEO+CaP}} = 1,96 \text{ Pa.s}$ ) et entraîne également une augmentation non quantifiée du temps de relaxation. D'un point de vue purement qualitatif, la présence de charges peut faire apparaître des points d'enchevêtrement supplémentaires entre les chaînes polymères, limitant alors leur mouvement relatif et l'écoulement de la solution. Cet effet engendre l'augmentation de viscosité de la solution. De plus, l'augmentation de l'élasticité du système PVA+PEO avec l'ajout de charges peut être associée à des interactions chimiques apparaissant entre les cations de calcium et les oxygènes contenus dans les chaînes polymères, à l'origine d'une modification dans le dépliement de ces dernières [288].

En ce qui concerne l'électrofilage, la solution de PVA semble être déstabilisée par l'ajout de CaP puisque la distance de jet stable diminue dans ce cas d'un facteur 33 (LJS<sub>PVA</sub> = 6,6 mm, LJS<sub>PVA+CaP</sub> = 0,2 mm) (Figure V-24). Étant donné qu'il n'est pas attendu qu'une augmentation de la viscosité déstabilise le filage de la solution, il peut être avancé que la variation de conductivité résultant de l'ajout de charges dans la solution déstabilise fortement le jet sous l'effet du champ électrique. En effet, la solution PVA+CaP possède une conductivité de 21,2 mS/cm, augmentant d'un facteur d'environ 4 la conductivité de la solution de PVA. En comparaison, la solution PVA+PEO semble être suffisamment stable pour que l'ajout de charges inorganiques ne déstabilise pas significativement le jet lors du filage. La distance de jet stable est en effet maximale – c'est-à-dire que le jet est rectiligne jusqu'au collecteur – en présence et en l'absence de CaP (Figure V-24).

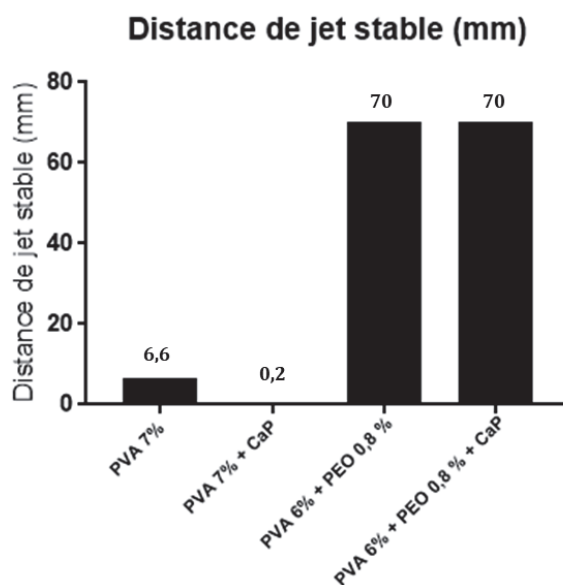
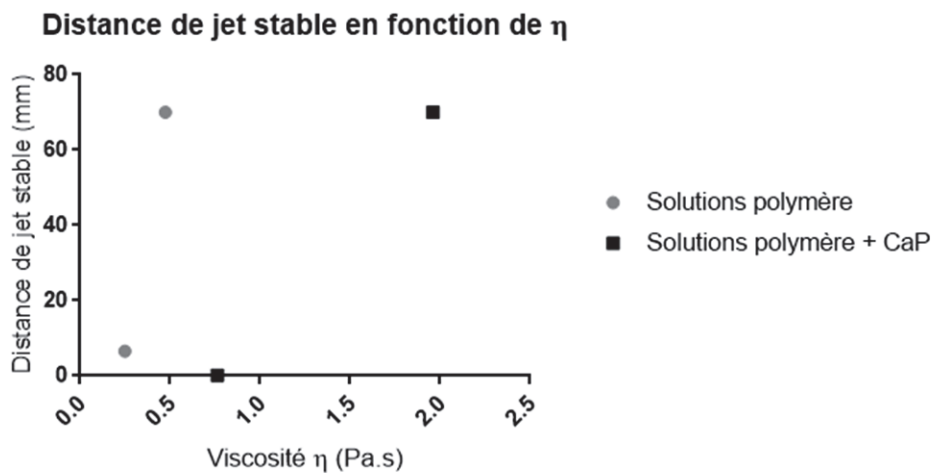


Figure V-24. Distances de jet stable des solutions étudiées

La comparaison des propriétés viscoélastiques de la solution utilisée en électro-implosion (PVA+PEO+CaP) avec celle utilisée en électrofilage classique (PVA+CaP) permet de révéler une augmentation de la viscosité d'un facteur 2,7 ( $\eta_{\text{PVA+CaP}} = 0,734 \text{ Pa.s}$ ,  $\eta_{\text{PVA+PEO+CaP}} = 1,96 \text{ Pa.s}$ ) avec l'ajout de PEO. Le temps de relaxation augmente aussi, mais le rapport n'a pas pu être quantifié. De plus, la distance de jet stable augmente d'un facteur 350 (le jet étant rectiligne jusqu'au collecteur) pour la solution PVA+PEO+CaP ( $\text{LJS}_{\text{PVA+CaP}} = 0,2 \text{ mm}$ ,  $\text{LJS}_{\text{PVA+PEO+CaP}} = 70 \text{ mm}$ ). La thèse de Laura Bourdon a fait le lien entre l'élongation de la distance de jet stable et l'augmentation de la viscosité et du temps de relaxation de solutions polymères. Dans notre cas, il semble que les différentes solutions ne soient pas directement comparables entre elles. Il est en effet nécessaire de prendre en compte la variation de conductivité avec l'ajout de CaP. En comparant les solutions qui présentent des conductivités semblables, c'est-à-dire d'un côté en l'absence de CaP (solutions de polymères) et de l'autre en leur présence (solutions de polymères + CaP), le graphique obtenu semble vérifier la tendance de l'augmentation de la distance de jet stable avec la viscosité (Figure V-25). Cependant, un nombre plus important de mesures pour compléter ce graphique serait nécessaire pour valider ces tendances.



**Figure V-25.** Evolution de la distance de jet stable en fonction de la viscosité des solutions, selon qu'elles contiennent ou non les précurseurs de CaP

Les différentes observations ont permis de mettre en lumière les paramètres de la solution de PVA+PEO+CaP qui la rendent adaptée au procédé d'électro-implosion. La présence de PEO semble augmenter la viscosité de la solution, mais limite également la sensibilité de la solution polymère aux instabilités créées par l'ajout des précurseurs de CaP. Une étude sur les interactions créées entre les chaînes de polymères (PVA et PEO) avec ces précurseurs inorganiques permettrait d'éclaircir les raisons de cette stabilisation.

## 2.3. ELECTRO-IMPRESSION DE MOTIFS LOCALISES DE PHOSPHATE DE CALCIUM

### 2.3.1. Partie expérimentale

La préparation de la solution électro-imprimable suit les optimisations présentées dans la partie 2.2. précédente. Les composés utilisés sont donc les mêmes et le protocole de synthèse est repris ici à l'identique, en fixant cette fois une concentration en PEO 5M à 0,8 %<sub>masse/vol.</sub>. Pour rappel dans cette solution aqueuse, la concentration de PVA est fixée à 6 %<sub>masse/vol.</sub>, celle de calcium à 1,5 M et le rapport molaire de calcium sur phosphore à 1,67.

L'imprimante utilisée pour l'électro-impression ainsi que le principe de pilotage sont présentés dans les Techniques Expérimentales et dans l'Annexe 3.

### 2.3.2. Défi du dépôt sur matériaux conducteurs

- *Apparition d'arcs électriques*

L'étude présentée ici a été menée avec l'aide de Céline Mandon, chercheuse contractuelle au LMI. Lors des premiers tests, une feuille d'aluminium a été disposée directement sur le plateau métallique de l'imprimante - lui-même relié à la masse électrique - pour servir de collecteur des filaments. Dans un premier temps, le but était simplement d'initier l'électrofilage et d'obtenir des conditions de filage stables avec un collecteur statique. A cette fin, différentes combinaisons de paramètres d'électrofilage ont été envisagées, avec une faible distance de travail (comprise entre 3 et 6 mm) pour contrôler précisément le dépôt du filament, un débit variant entre 0,01 et 1,0 mL/h et une tension comprise entre 1,6 et 3,0 kV. Cependant, pour toutes les combinaisons testées, des arcs électriques apparaissent entre la pointe de l'aiguille et le collecteur (Figure V-26.A). Ce phénomène très inhabituel est expliqué par la forte conductivité de la solution (21,2 mS/cm) causée par la présence d'ions en solution. L'arc électrique entraîne un arrêt du filage en plus d'un séchage instantané de la solution à la pointe de l'aiguille et, dans la plupart des cas, d'un arrêt de la machine. Pour ces raisons, seuls de courts fragments de filaments sont observés, comme montré sur la Figure V-26.B, plutôt que le dépôt d'un filament continu. Le même phénomène se produit lorsque les pastilles de TA6V sont utilisées comme collecteur.

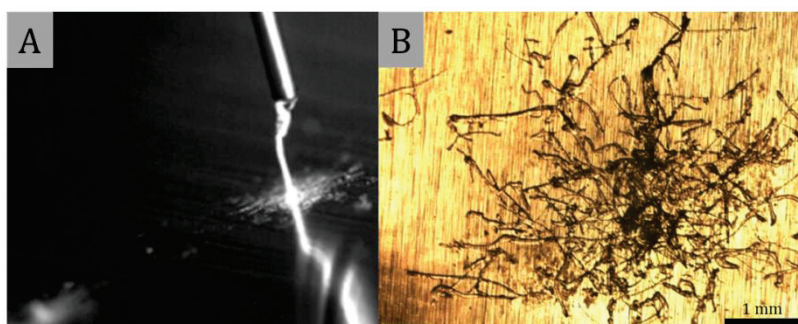


Figure V-26. A) Photo macroscopique d'un arc électrique apparaissant entre l'aiguille et le collecteur métallique statique et B) Microscopie optique des dépôts associés obtenus

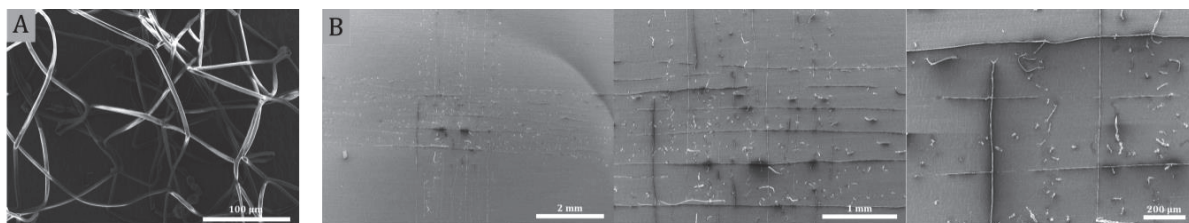


Les arcs électriques peuvent apparaître entre deux surfaces conductrices dans l'air lorsque ce dernier est ionisé. Plus les surfaces conductrices sont proches et le champ électrique important, plus l'ionisation est facilitée. Dans un gaz, un arc électrique apparaît lorsque le champ électrique créé dépasse le champ disruptif du milieu. Pour l'air sec, la valeur du champ disruptif se situe autour de quelques kilovolts par millimètre, et la présence d'humidité dans l'air diminue la valeur du champ disruptif de ce milieu, facilitant alors l'apparition des arcs [289].

Pour ces raisons, différentes stratégies ont été envisagées pour éviter l'apparition d'arcs électriques lors de l'électrofilage à faible distance de travail. Ces stratégies, étudiées plus en détails dans les paragraphes ci-après, sont les suivantes : 1) limiter la conductivité électrique du collecteur, 2) diminuer l'humidité dans l'enceinte de l'imprimante afin d'augmenter la valeur du champ disruptif du milieu et 3) éliminer les charges de surface du collecteur *via* un traitement de surface par un flux d'air ionisé.

- *Ajout d'une couche isolante entre le substrat conducteur et le plateau métallique*

Afin de limiter la conductivité électrique du substrat, une plaque en carton (épaisseur 3-4 mm) a été insérée entre la feuille d'aluminium et le plateau métallique de l'imprimante. Le dépôt a été réalisé dans un premier temps en mode statique afin de déterminer les paramètres initiant le jet le plus stable possible. L'ajout du carton isolant permet d'éliminer tous les arcs électriques observés à l'œil nu et de cette façon, des filaments continus peuvent être obtenus (Figure V-27.A). Un motif d'une couche a donc été déposé en ajoutant un déplacement du collecteur (Figure V-27.B).



**Figure V-27.** Images MEB du dépôt sur feuille d'aluminium isolée du plateau métallique par du carton. A) dépôt statique et B) dépôt d'une grille 1 couche avec mouvement du collecteur à 1000 mm/min  
Paramètres de dépôt : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 3 mm, tension = 2,2 kV

Les filaments composant la grille présentent de nombreuses ruptures nettes le long de leur parcours. Même si aucun arc n'est visuellement constaté, les conditions ne permettent pas d'effectuer un dépôt de filaments de manière stable. Il n'est pas exclu que ce comportement soit toujours lié à la formation de micro-arcs, non visibles à l'œil nu.

- *Diminution de l'humidité de l'air*

L'ajout d'une plaque de carton entre le collecteur et le plateau étant bénéfique à l'élimination des arcs électriques, cette disposition est conservée pour étudier l'influence de l'humidité de l'air dans l'enceinte de l'imprimante. Habituellement contrôlée à une valeur de  $(40 \pm 1) \%$ , l'humidité relative de l'enceinte a été réduite à 30 % pour cette étude. Dans ces conditions, aucun arc électrique n'est visuellement constaté et les filaments apparaissent continus (Figure V-28).



**Figure V-28.** Microscopie optique du dépôt sur feuille d'aluminium isolée du plateau métallique par du carton - humidité relative de 30 %. Grille une couche avec pour paramètres de filage : débit = 0,05 mL/h, distance de travail = 5 mm, tension = 2,10 kV, vitesse du collecteur = 1000 mm/min

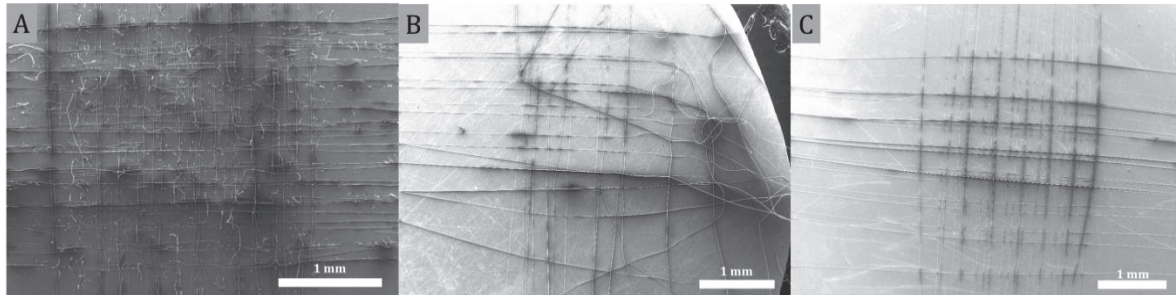
Cependant, le faible taux d'humidité facilite en contrepartie l'évaporation du solvant. La solution sèche rapidement à la pointe de l'aiguille provoquant l'arrêt du filage, qui ne peut alors être que de courte durée. La réalisation de structures de plusieurs couches successives est donc limitée, tout comme la reproductibilité de l'expérience. Bien que la diminution de l'humidité semble éviter l'apparition de courts-circuits, cette solution n'est donc pas totalement adaptée à la solution formulée. Pour limiter l'évaporation, un solvant moins volatil que l'eau devrait en effet être utilisé, mais l'étude entière de la chimie des précurseurs devraient être revue en ce sens.

- *Traitement de surface par ionisation*

Le fait d'isoler électriquement le substrat métallique du reste du plateau (par le carton) induit l'accumulation des charges électriques apportées par le filament. Ceci a pour effet, à court terme, de diminuer la différence de potentiel entre l'aiguille et le collecteur. La diminution du champ électrique induit une diminution de la force d'étirage exercée sur la solution, jusqu'à une interruption totale du filage dans le cas où le champ électrique devient inférieur au seuil de filabilité de la solution. Afin d'éviter ce phénomène, le substrat métallique est régulièrement exposé à un flux d'air ionisé. L'ioniseur produit des ions, alternativement positifs et négatifs, au travers d'un corona de décharge. Ces ions permettent de décharger une surface. Dans la thèse de Laura Bourdon [272], cette technique a permis de limiter le nombre de défauts obtenus sur des motifs électro-imprimés sur des lames de verre. L'ionisation est ainsi réalisée avant de débiter l'impression, mais aussi entre chacune des couches.

L'ionisation a été réalisée sous forme de balayages de l'échantillon selon les axes x et y. La seringue contenant la solution et la buse de l'ioniseur étant fixes et distants de 20 cm environ, les mouvements du collecteur sont donc relatifs à ces deux objets. De cette façon, pendant les étapes d'ionisation de l'échantillon, l'électrofilage est initié dans une autre zone du plateau (au-delà de l'échantillon) : lorsque le collecteur se déplace pour positionner l'échantillon sous la seringue contenant la solution de CaP, le filament électrofilé est donc stable.

Deux configurations ont été testées. Pour la première, une pastille de TA6V est disposée sur une plaque de carton, elle-même déposée sur le plateau de l'imprimante. Pour la deuxième configuration, la pastille est déposée sur une feuille plastique (de type transparent pour rétroprojection) fixée sur le plateau, puis entourée de plusieurs lames de verre. Dans les deux cas, des grilles de 5 couches ont été déposées (Figure V-29.B pour la configuration avec carton et Figure V-29.C pour la configuration avec lames de verre) et comparées à une grille à cinq couches obtenue sans ionisation (Figure V-29.A).

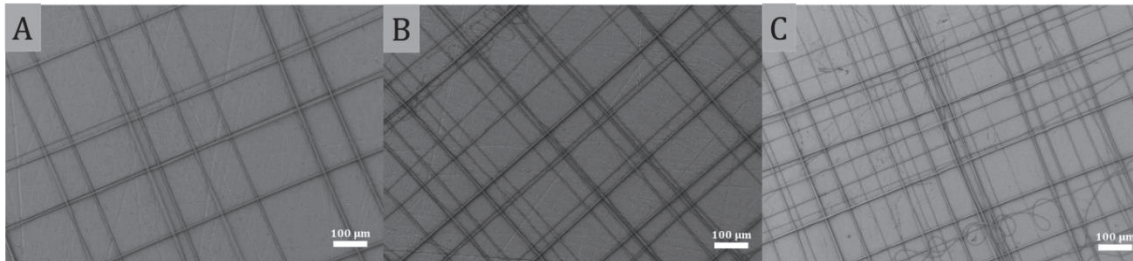


**Figure V-29.** Images MEB montrant l'influence de l'ionisation sur la structure des grilles à cinq couches. A) Sans ionisation, pastille isolée par du carton, paramètres de dépôt : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 3 mm, tension = 2,2 kV, vitesse plateau = 1000 mm/min ; B) Avec ionisation du substrat, pastille isolée par du carton, paramètres de dépôt : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 4 mm, tension = 2,2 kV, vitesse plateau = 500 mm/min ; C) Avec ionisation du substrat, pastille entourée par des lames de verre, paramètres de dépôt : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 4 mm, tension = 2,2 kV, vitesse plateau = 500 mm/min

La comparaison des images montre que l'ajout d'une étape d'ionisation permet, tout comme la réduction de l'humidité relative, de limiter la rupture du filament pendant le dépôt. Les lames de verre placées autour de la pastille permettent d'obtenir un motif dont les filaments suivent leur trajectoire selon les axes x et y. En l'absence de ces lames en effet, les filaments sont déviés de leur trajectoire, et ce d'autant plus que les filaments se rapprochent du bord de la pastille (Figure V-29.B). Ces améliorations ne permettent pas d'obtenir la structure idéale mais la plupart des filaments semblent se superposer selon une même ligne, les lignes les plus hautes étant les plus sombres en microscopie électronique (Figure V-29.C). Il est possible que la déviation de certains filaments soit facilitée par la répulsion électrostatique si les charges de surface ne sont pas bien éliminées entre chaque couche. Cela conduit à un dépôt localisé entre deux lignes du motif théorique, qui sont normalement espacées de 200  $\mu\text{m}$ . Comme déjà évoqué pour les problèmes d'arcs électriques, la forte concentration en ions calcium peut également jouer un rôle dans ce cas en maintenant une plus forte polarisation du filament qui se dépose.

Étant donné que l'ajout des lames de verre isolantes autour de la pastille de TA6V améliore la stabilité du jet et la régularité des structures imprimées, un nouvel essai a été réalisé en déposant les filaments sur des substrats de TA6V préalablement recouverts d'une couche de CaP, elle-même isolante. Cette couche a été déposée par enduction centrifuge et traitée en température à 550  $^{\circ}\text{C}$  (cf. protocole Chapitre III, partie 3.1). Avant électro-impulsion, les substrats sont soumis à un flux d'air ionisé. La couche de CaP ne semble cependant pas assez épaisse et donc suffisamment isolante pour permettre d'obtenir des structures régulières. Comme le montre la Figure V-30.A, on observe toujours un décalage entre les lignes déposées et l'espacement irrégulier ne concorde pas avec la valeur consignée de 200  $\mu\text{m}$ . Les filaments de la deuxième couche sont proches de ceux de la première couche et l'espacement entre les lignes est

le même, cependant les deux couches ne sont pas superposées. En augmentant le nombre de couches à 4 (Figure V-30.B) ou 5 (Figure V-30.C), les défauts sont de plus en plus nombreux et combinent des défauts de positionnement et des défauts d'empilement. Afin d'évaluer le rôle de la conductivité du substrat, des matériaux totalement isolants ont été utilisés comme collecteurs.

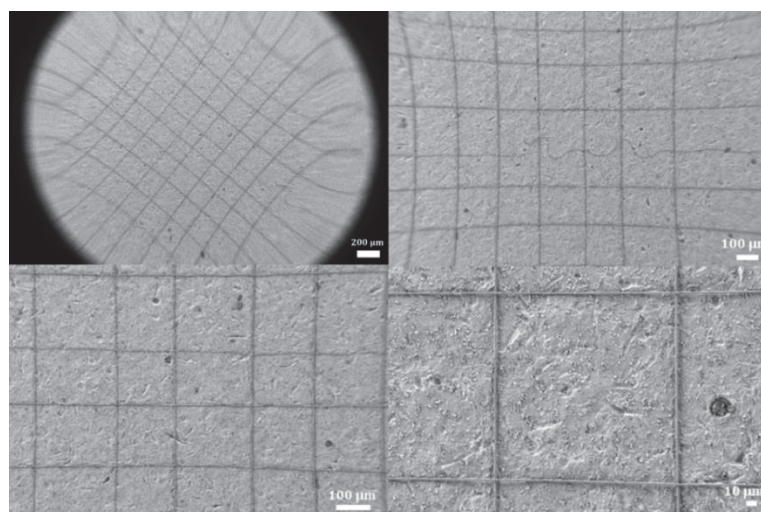


**Figure V-30.** Images MEB de grilles à A) 2, B) 4, et C) 5 couches sur des pastilles de TA6V recouvertes d'une couche de CaP et ionisées. Paramètres d'électrofilage : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 4 mm, tension = 2,2 kV, vitesse du plateau = 500 mm/min.

- *Dépôt sur substrats isolants*

D'après les résultats précédents, il apparaît que le dépôt des filaments de CaP est facilité sur un substrat isolé, contrairement aux dépôts habituellement réalisés par électrofilage. L'utilisation d'un collecteur conducteur permet en effet l'évacuation vers la masse des charges présentes à la surface des filaments. Pour rappel, ces charges sont apportées au jet *via* le générateur de tension, et sont responsables de son étirage. Pour les matériaux isolants au contraire, les charges ne sont pas évacuées vers la masse et s'accumulent sur le substrat, empêchant ainsi l'attraction du jet vers cette surface.

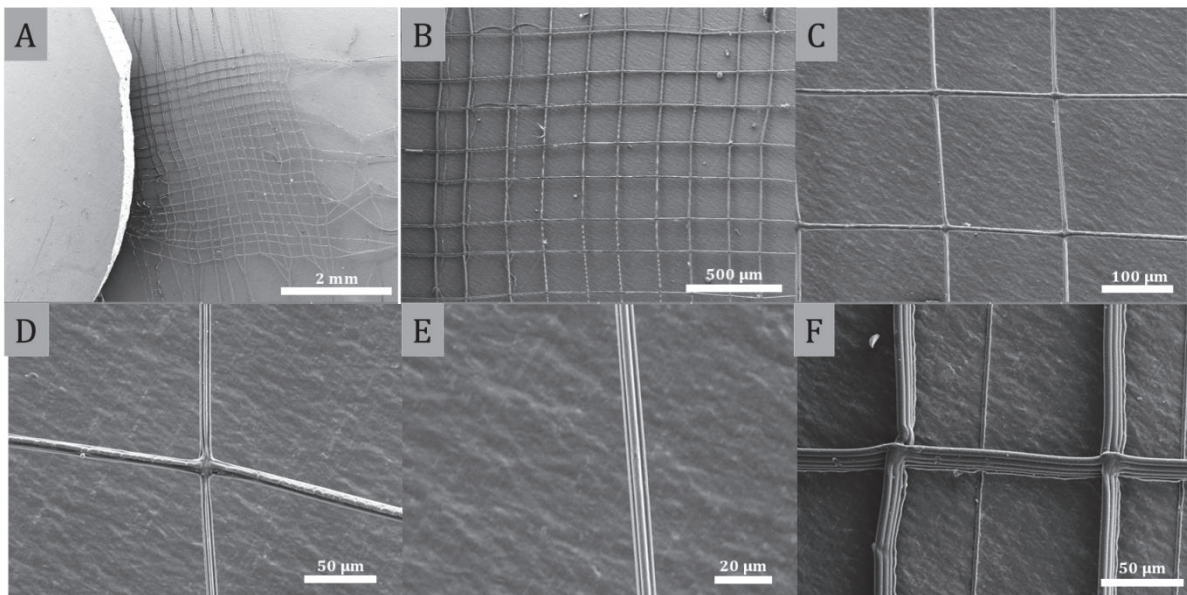
Afin de confirmer cette tendance qu'ont les substrats isolants à faciliter l'électro-implosion de cette solution en particulier, une grille à une couche a été déposée sur une lame de verre sans la soumettre au préalable à l'ionisation. La grille obtenue, présentée sur la Figure V-31, présente un motif beaucoup plus régulier que ceux ayant été obtenus sur les substrats métalliques.



**Figure V-31.** Images MEB d'une grille composée d'une couche sur une lamelle de verre (directement positionnée sur le plateau métallique de l'imprimante). Paramètres de filage : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 4 mm, tension = 2,13 kV, vitesse du plateau = 500 mm/min

Le filament présente un diamètre régulier sur tout le motif (environ 2  $\mu\text{m}$ ) et la distribution de l'espacement entre les lignes de la grille est proche des 200  $\mu\text{m}$  fixés théoriquement dans le G-code. Une étude plus statistique a été réalisée sur 59 espacements selon les axes x et y. Les valeurs sont comprises entre 140 et 280  $\mu\text{m}$ , avec 52 % des valeurs entre 180 et 220  $\mu\text{m}$ . Sachant que l'incertitude de repositionnement du collecteur est de  $\pm 20$   $\mu\text{m}$ , plus de la moitié des valeurs d'espacement sont cohérentes avec le motif renseigné dans le G-Code. Les déviations des espacements entre lignes vers des valeurs plus élevées ou plus faibles sont dues à des phénomènes inhérents au procédé, tels que la répulsion électrostatique entre les filaments et le jet lors de l'électro-impulsion.

Par un concours de circonstance, une grille composée de 5 couches parfaitement empilées a été obtenue. La pastille de TA6V a en effet été mal positionnée par rapport à l'emplacement de la zone de dépôt, et l'électro-impulsion s'est déroulée entre le bord de la pastille de TA6V et la surface du plateau de l'imprimante (Figure V-32.A). Dans ce cas-là, la grille imprimée présente théoriquement des sous-couches comportant 20 lignes parallèles de 19 mm de long, un espacement de 200  $\mu\text{m}$  entre chaque ligne et un empilement de 5 couches (chaque couche comportant 2 sous-couches, l'une selon l'axe x et l'autre selon l'axe y). Comme montré sur la Figure V-32(A-E), les cinq couches sont parfaitement superposées sur la quasi-totalité de la grille.



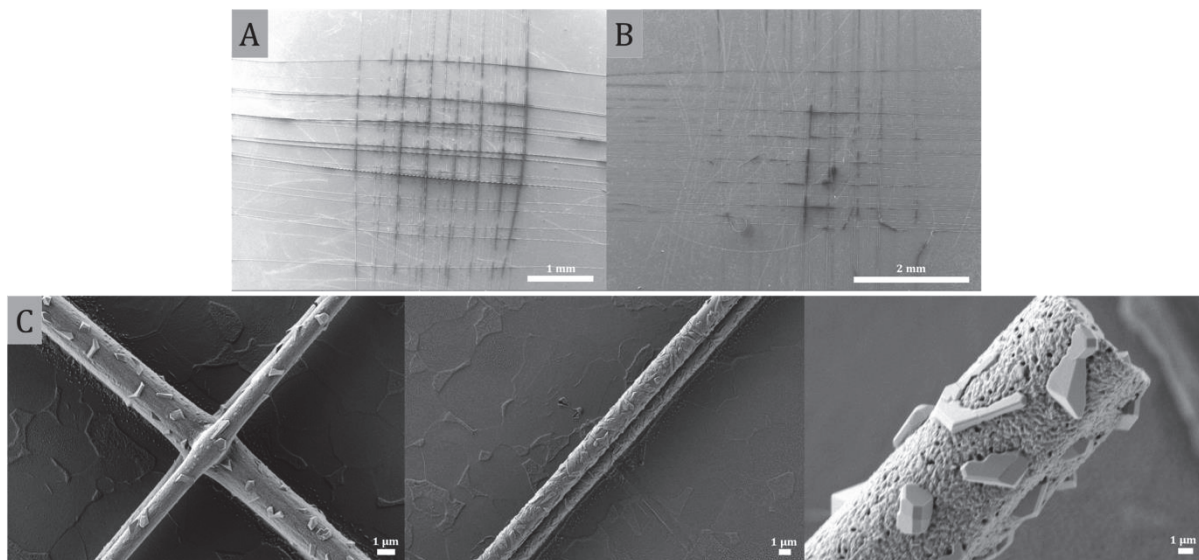
**Figure V-32.** Images MEB d'une grille 5 couches obtenue dans l'air. Paramètres de filage : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 3 mm, tension = 2,77 kV, vitesse du plateau = 500 mm/min.

Aux points d'intersections entre les sous-couches, les filaments fusionnent, ce qui implique une stabilité de la structure, sans glissement des filaments les uns par rapport aux autres. Seules quelques lignes présentent un décalage entre la première couche et les couches suivantes (Figure V-32.F). La grille ayant été obtenue entre deux surfaces positionnées sur des plans différents selon l'axe z, les quelques déformations observées peuvent résulter de la manipulation ultérieure de la structure. Sur cette grille, les murs ont une largeur d'environ 8  $\mu\text{m}$ . La distribution de l'espacement entre les lignes est encore meilleure que pour le dépôt sur la lamelle de verre, puisque, sur 53 mesures, l'étendue des valeurs est réduite à l'intervalle 160-250  $\mu\text{m}$ , et 56 % des valeurs sont comprises entre 180 et 220  $\mu\text{m}$ .

Les raisons de la meilleure régularité du dépôt sur les surfaces isolantes restent encore incertaines. La localisation des charges dans le jet électrofilé n'est en effet pas connue et pourrait aider à la compréhension des phénomènes mis en jeu. Afin d'étudier de plus près ces phénomènes, les charges en solution peuvent être caractérisées par exemple par leur potentiel zéta.

### 2.3.3. Effet du traitement thermique

Comme présenté tout au long de cette thèse, un traitement thermique des matériaux est nécessaire afin d'éliminer les espèces organiques présentes dans les filaments et de convertir l'acétate de calcium en  $\text{CaCO}_3$ . Les dépôts aléatoires de CaP ont montré que la structure des filaments était conservée lors du traitement en température. Il s'agit ici de vérifier que le dépôt très localisé des filaments n'empêche pas de conserver leur morphologie lors du traitement. La grille étudiée, comportant 5 couches, a été déposée sur une pastille de TA6V ionisée et entourée de lames de verre. Les images obtenues permettent de confirmer la conservation des filaments lors du traitement thermique, et l'empilement plutôt correct des différentes couches (Figure V-33).



**Figure V-33.** Images MEB d'une grille obtenue A) avant et B) après traitement thermique à 550 °C (d'autres grossissements en C). Paramètres de filage : débit = 0,01 mL/h, distance de travail = 4 mm, tension = 2,2 kV, vitesse du plateau = 500 mm/min

Des cristaux apparaissent à la surface des filaments, phénomène jamais constaté auparavant sur les filaments de CaP déposés par électrofilage conventionnel. La limite de résolution du microscope utilisé n'a pas permis de déterminer la composition de ces cristaux par EDS. Cette analyse a seulement permis d'identifier une répartition homogène le long des filaments des éléments phosphore et calcium. Une analyse avec un microscope électronique à transmission pourrait permettre d'identifier ces cristaux et d'expliquer leur apparition. Cependant, l'expérience n'ayant pu être réalisée qu'une seule fois, une confirmation de la reproductibilité de cette cristallisation semble également nécessaire.

## CONCLUSION

Dans ce chapitre, l'élaboration de revêtements plus complexes que des dépôts aléatoires sur surfaces planes a été explorée. Une véritable application de ces revêtements ne sera en effet possible que s'ils peuvent être déposés sur des surfaces non planes, tels que le sont les implants utilisés en orthopédie ou en dentisterie.

Les résultats préliminaires montrent la possibilité de revêtir des implants dentaires par de l'hydroxyapatite, à la fois par enduction par trempage et par électrofilage. Les revêtements déposés sont de plus biocompatibles et permettent la prolifération cellulaire. Actuellement, l'une des principales sources de complications entraînant l'échec implantaire est la péri-implantite (maladie inflammatoire d'origine infectieuse). Cette maladie conduit à la destruction des tissus entourant l'implant fonctionnel. Lors des phases de cicatrisation dentaire (ou phase de bio-intégration) et de maintenance dentaire, des complications peuvent avoir lieu au niveau de la zone de jonction entre l'implant et les tissus mous (au niveau du col implantaire), qui est considérée comme la « zone à risque ». En effet, une perte d'attache gingivale ou une néoformation insuffisante de l'attache au niveau du col implantaire peut entraîner une inflammation causée par une infiltration bactérienne. Ce processus inflammatoire se répand au niveau de l'os alvéolaire, entraînant progressivement la perte de l'implant. Bien que les données sur les maladies péri-implantaires soient limitées, Zitzmann et Berglundh ont révélé qu'entre 5 et 20 ans après la pose de l'implant, les péri-implantites touchaient entre 28 et 56 % des patients [290]. Les futures évaluations biologiques réalisées sur les matériaux développés dans le cadre de cette thèse devront donc comprendre une étude au niveau de ce col implantaire, en cultivant à son contact des cellules spécifiques de la gencive, telles que des fibroblastes gingivaux et des cellules épithéliales. Il serait enfin intéressant d'évaluer l'activité antibactérienne des revêtements sur les germes responsables des péri-implantites afin d'estimer le potentiel applicatif des revêtements.

D'un autre côté, le procédé d'électro-impulsion a été évalué afin de contrôler précisément la porosité et la structure des dépôts. L'électro-impulsion a été permise par l'augmentation de la distance de jet stable de la solution, par ajout dans la formulation d'un polymère de haut poids moléculaire, le PEO à 5 000 000 g/mol. Contrairement à nos prévisions, la solution de CaP utilisée se dépose plus facilement sur des substrats isolants que sur des conducteurs. Toutefois, même si des défauts subsistent, la structure a pu être imprimée sur des échantillons de TA6V isolés électriquement de la masse électrique. Des porosités plus larges que celles atteintes en électrofilage conventionnel sont accessibles. Il serait ainsi intéressant de cultiver des cellules sur les échantillons présentant différentes porosités et morphologies, et d'étudier leur comportement en réponse à ces structures. Enfin, il est nécessaire de préciser que la structure des filaments est conservée lors des traitements thermiques, entraînant alors la création de structures électro-imprimées 100 % inorganiques, résultat jamais publié dans la littérature à notre connaissance.

Enfin, combiner les deux techniques présentées dans ce chapitre pourrait présenter un certain intérêt. En déposant le filament en champ proche, l'implant pourrait être revêtu d'un matériau à porosité contrôlée. La combinaison d'un dépôt en champ proche avec la rotation d'une pièce à recouvrir a déjà fait l'objet d'études pour l'application en ingénierie tissulaire [274] et pourrait également être appliqué à nos objectifs.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse a été d'améliorer la bioactivité d'un alliage de titane utilisé en implantologie orthopédique et dentaire. En ce sens, des revêtements ont été développés dans le but de fournir une surface d'accroche idéale aux cellules présentes sur le site d'implantation. Deux aspects principaux ont été pris en compte, à savoir la composition chimique du revêtement et sa morphologie. Deux matériaux inorganiques largement utilisés en ingénierie tissulaire osseuse ont donc été synthétisés par voie sol-gel : un verre bioactif de type 45S5, ainsi qu'un phosphate de calcium, l'hydroxyapatite carbonatée. Par ailleurs, la mise en forme de ces matériaux inorganiques par le procédé d'électrofilage a été considérée dans le but de créer des structures fibreuses et poreuses, mimant ainsi les fibres de collagène naturellement présentes dans la matrice extracellulaire osseuse. Cette technique nécessite d'apporter aux solutions, *via* un polymère, les propriétés viscoélastiques nécessaires à l'élongation du jet électrofilé sous l'influence du champ électrique.

L'optimisation du protocole des synthèses sol-gel s'est montrée indispensable à l'obtention de matériaux homogènes et de composition souhaitée. Alors que la majorité des synthèses de la littérature rapporte l'utilisation de précurseurs de type nitrate, ce composé s'est révélé inadapté pour l'application visée. En effet, en plus d'entraîner des séparations de phases au sein du verre, des cristaux de nitrate de sodium apparaissent à la surface des filaments électrofilés. En outre, les nitrates sont des composés toxiques devant être éliminés des matériaux pour envisager une quelconque application biomédicale. Or, le traitement thermique nécessaire à leur décomposition implique des températures supérieures à 700 °C. Celles-ci entraînent une oxydation importante du TA6V, à l'origine de la délamination du revêtement fibreux déposé à sa surface.

Différents précurseurs ont alors été envisagés pour remplacer les nitrates dans la synthèse du 45S5. Alors que les chlorures et méthanolates entraînent également des inhomogénéités dans les matériaux, les acétates se sont montrés plus intéressants. Leur réaction de décomposition en composés carbonatés nécessite en effet une température de traitement de 550 °C, qui permet la décomposition du polymère sans induire de délamination du substrat métallique.

Cependant, le remplacement des composés nitrate par des précurseurs acétate bouleverse les cinétiques d'hydrolyse et de condensation du sol de 45S5. La formulation des systèmes à base d'acétate a donc été adaptée afin d'éviter la précipitation en solution ou un temps de gel trop court, incompatible avec la mise en forme des matériaux par électrofilage. Cette optimisation a nécessité une étude de la réactivité des sols en fonction des concentrations relatives en acide, en eau et en précurseurs de silicium et de phosphore. Par ailleurs, l'hydrolyse du précurseur de phosphore s'est montrée indispensable à la conservation de cet élément dans le matériau final. À la suite de ces optimisations, les sols de 45S5 présentant des propriétés viscoélastiques suffisamment stables à l'échelle du procédé de mise en forme ont été obtenus. En ce qui concerne la synthèse du phosphate de calcium, un sol moins réactif et donc plus stable a été plus facilement obtenu.

Dans les deux cas, des revêtements fibreux ont été déposés sur TA6V préalablement recouvert d'une sous-couche lisse, déposée par enduction centrifuge, servant d'accroche aux filaments électrofilés. Les filaments obtenus sont homogènes et conservent leur structure après traitement thermique, sans induire de délamination du substrat.



Du point de vue de la composition chimique, du carbonate de calcium est retrouvé dans les deux matériaux, 45S5 et CaP, traités à 550 °C. Ce carbonate n'est cependant pas cytotoxique, puisqu'il est lui-même étudié pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse. De même, des phases cristallines apparaissent en faible proportion dans le verre. Bien que ces dernières puissent ralentir la bioactivité des matériaux, elles ne présentent pas de toxicité. L'analyse RMN montre de plus que le réseau de verre n'est pas totalement condensé. Il peut donc se solubiliser sur le site d'implantation pour fournir des ions silicium, phosphore et calcium et permettre ainsi la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée. Dans les matériaux de CaP, la phase synthétisée est une hydroxyapatite carbonatée de type B peu cristallisée. Cette phase est naturellement présente dans l'os humain, et présente une meilleure réactivité que l'hydroxyapatite stœchiométrique.

Plusieurs études peuvent être envisagées dans la poursuite de ce travail. Tout d'abord, il serait intéressant de relier l'état de condensation du verre de 45S5 (déterminé par suivi cinétique en RMN) avec les propriétés rhéologiques de la solution et finalement avec sa capacité à être déposée par enduction centrifuge et électrofilage. Par ailleurs, deux aspects importants restent à étudier sur les revêtements. En premier lieu, une caractérisation des matériaux sous forme de revêtements permettrait de déceler une éventuelle influence du procédé de mise en forme sur la composition finale des matériaux. Tout aussi importante, une étude approfondie des propriétés mécaniques des revêtements doit être menée, d'autant plus que l'insertion des prothèses sur le site d'implantation implique des contraintes mécaniques assez importantes pouvant détériorer les revêtements.

Des cellules ont ensuite été cultivées à la surface des revêtements afin d'évaluer la cytocompatibilité de ces derniers. L'étude a été réalisée avec une lignée cellulaire de MG63 et des cellules primaires de fibroblastes gingivaux humains. Ces deux types de cellules sont particulièrement adaptés aux applications orthopédiques et dentaires. La tendance qui se dégage des tests d'Alamar Blue est que la viabilité cellulaire des MG-63 après 7 jours de culture est similaire sur les revêtements inorganiques électrofilés et sur le TA6V brut, déjà connu pour sa biocompatibilité. Ce test ne montre en revanche pas de différence significative entre les revêtements lisses et fibreux. Cependant, la prolifération non contrôlée au fond des puits de culture a entraîné un biais de mesure dans ces résultats. En considérant les résultats d'imagerie des MG63 plus représentatifs, une meilleure propagation des cellules peut être admise sur les revêtements recouverts de filaments. Les cellules s'allongent selon la direction des filaments et colonisent la surface, jusqu'à créer des zones de forte densité cellulaire où les cellules englobent les filaments et pénètrent dans l'épaisseur du revêtement. Ces derniers étant biodégradables, on peut donc s'attendre *in fine* à une bonne accroche des cellules sur le substrat de TA6V. Par ailleurs, l'expression par les hGF de la phosphatase alcaline, une enzyme informant du potentiel de différenciation cellulaire, est favorisée sur les revêtements électrofilés par rapport aux revêtements lisses. Les revêtements de 45S5 présentent de plus une meilleure activité ALP que le TA6V brut, contrairement aux revêtements de CaP. Afin de comprendre cette différence, les cinétiques de relargage des ions constitutifs des différents revêtements (45S5 ou CaP, lisses ou électrofilés) pourraient être étudiées par ICP. Des études complémentaires permettraient d'approfondir l'étude de la bioactivité des revêtements. En premier lieu, l'activité ALP pourrait être évaluée dans un milieu de différenciation ostéoblastique. De plus, des cellules souches sont envisagées pour suivre la différenciation cellulaire par l'expression de différents marqueurs de différenciation ostéoblastiques (Run-X2, COLL-I, OP, OC) par RT-PCR ou ELISA. La sécrétion de matrice extracellulaire ainsi que sa calcification pourraient également être évaluées *via* la

quantification du collagène, du calcium et des glycosaminoglycanes par des tests biochimiques (colorimétrie et fluorescence). Enfin, une évaluation de l'activité antibactérienne des revêtements sur les germes responsables des péri-implantites permettrait d'estimer le potentiel applicatif des revêtements en implantologie orale.

Une preuve de concept a d'autre part été apportée en déposant les revêtements d'hydroxyapatite sur des implants dentaires. La technique d'enduction par trempage s'est révélée efficace pour le dépôt de la sous-couche d'accroche sur des substrats de forme complexe, là où l'enduction centrifuge atteint ses limites. La rotation de l'implant selon son axe de révolution permet de recouvrir par électrofilage toute la surface de l'implant avec les filaments. Le procédé étant relativement sensible à l'évolution du sol de CaP, des études de reproductibilité doivent être engagées. De plus, des résultats biologiques préliminaires ont montré que l'ajout du revêtement permettait d'améliorer la cytocompatibilité et la prolifération cellulaire des MG63 par rapport à des implants contrôle non revêtus. Ce travail ouvre la voie à des analyses biologiques plus poussées, incluant des études de différenciation cellulaire et de propriétés antibactériennes, ainsi que des dépôts sur des implants de forme de plus en plus complexes. Notons que les implants utilisés lors de ce travail présentent un filetage particulièrement fin, poussant au maximum la difficulté d'obtenir un revêtement conformant. Le niveau de détail n'est en effet pas aussi important sur les pièces orthopédiques de type prothèses de hanche et de genou. Des revêtements conformants devraient donc être obtenus sans grande difficulté.

Enfin, l'électro-impulsion a été employée dans le but de diversifier les morphologies des revêtements. Cette technique permet le dépôt localisé du jet électrofilé, et donc de contrôler précisément l'architecture et la porosité des revêtements. L'utilisation de cette technique nécessite un contrôle fin du jet d'électrofilage, qui doit être rectiligne sur toute la distance de travail. Cette linéarité du jet a été permise par l'ajout d'un polymère de haut poids moléculaire : en augmentant la viscosité et l'élasticité de la solution, les instabilités du jet ont pu être éliminées tout le long de sa trajectoire. Contrairement à nos prévisions, la solution de CaP se dépose plus facilement sur des substrats isolants que sur des surfaces conductrices. Ce phénomène est certainement lié à la présence de charges inorganiques dans le filament, mais des études plus poussées permettraient d'établir un lien entre la présence de ces charges et la difficulté d'obtenir des grilles régulières sur des substrats conducteurs. Toutefois, bien que les grilles déposées présentent des défauts, des porosités plus larges que celles atteintes en électrofilage conventionnel ont pu être créées. L'idée à terme serait de déterminer les structures idéales - en termes de taille des filaments, de géométrie de structure et de porosité - à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Ces résultats devront également être comparés à ceux obtenus sur les revêtements déposés par électro-spray dans le cadre de la thèse de Veronica Muller. Le dépôt du filament en champ proche pourrait également être entrepris sur des implants de morphologie complexe afin de guider le jet spécifiquement dans les creux et dans les bosses de l'implant à revêtir. Ce procédé pourrait se révéler intéressant sur de grosses pièces orthopédiques en particulier.



# TECHNIQUES EXPERIMENTALES



Les produits chimiques, procédés de mise en forme et techniques de caractérisation utilisés dans ce travail de thèse sont ici présentés. Les différents protocoles de synthèse du 45S5 et du CaP ayant été modifiés tout au long de ce travail, ils sont présentés spécifiquement dans chaque chapitre en fonction des études réalisées.

## 1.COMPOSES ET MATERIAUX

### 1.1.COMPOSES ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES MELANGES SOL-GEL

Le Tableau 1 regroupe l'ensemble des produits chimiques utilisés dans les formulations sol-gel.

PRODUIT	ABREVIATION-FORMULE	PURETE	FOURNISSEUR
Tétraéthylorthosilicate	TEOS	> 99,0 %	Sigma Aldrich
3-Glycidyloxypropyl)triméthoxysilane	GPTMS	98 %	Gelest
Triéthylphosphate	TEP	> 99,8 %	Sigma Aldrich
Triéthylphosphite	TEPI	98 %	Sigma Aldrich
2-Diéthylphosphatoéthyl-triéthoxysilane	DEPETES	95 %	Gelest
Acétate de sodium <i>Utilisé pour les études présentées dans le Chapitre II Mais contamination au soufre</i>	CH <sub>3</sub> COONa		Sigma Aldrich
Acétate de sodium <i>Utilisé pour les études présentées à partir du Chapitre III</i>	CH <sub>3</sub> COONa	99,99 %	Roth
Acétate de calcium <i>Utilisé pour les études présentées dans le Chapitre II Mais contamination au soufre</i>	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Ca		Merk
Acétate de calcium <i>Utilisé pour les études présentées à partir du Chapitre III</i>	CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Ca	99 %	Roth
Chlorure de calcium	CaCl <sub>2</sub>		Prolabo
Chlorure de sodium	NaCl		Prolabo
Méthanolate de calcium	(CH <sub>3</sub> O) <sub>2</sub> Ca	97 %	Merck
Méthanolate de sodium	CH <sub>3</sub> ONa	98 %	Alfa Aesar
Nitrate de calcium tétrahydraté	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	99,95 %	Merck
Nitrate de sodium	NaNO <sub>3</sub>	99,99 %	Sigma Aldrich
Alcool polyvinylique	PVA (88 000-97 000 g/mol, hydrolysé à 87-89 %) <i>Utilisé pour les études présentées à partir du Chapitre III</i>		Alfa Aesar
Alcool polyvinylique	PVA (Masse molaire non renseignée, hydrolysé à 86-89 %) <i>Utilisé pour les études présentées à partir du Chapitre III Permet une meilleure stabilité au filage que la référence Alfa Aesar</i>		Chang Chun Petrochemical
Polyoxyéthylène	PEO (5 000 000 g/mol)		Alfa Aesar
Polyvinylpyrrolidone	PVP (1 300 000 g/mol, K 85-95)		Acros Organics
Éthanol absolu	EtOH		Carlo Erba
Acide acétique	CH <sub>3</sub> COOH	≥99,5 %	Sigma Aldrich
Acide chlorhydrique	HCl	37 %	Carlo Erba
Acide nitrique	HNO <sub>3</sub>	65%	Carlo Erba
Surfynol® SE			Evonik

Tableau 1. Références des composés entrant dans la composition des mélanges sol-gel

Tous ces composés sont utilisés sans aucune modification ou purification. L'eau ultra pure (conductivité 18,2 M $\Omega$ .cm) est de l'eau déminéralisée au laboratoire (système de purification Purelab option, Elga).

## 1.2. SUBSTRATS DE TA6V

- *Pastilles*

Les substrats de TA6V ELI (grade 23), fournis par ACNIS International, sont des pastilles de 1 cm de diamètre et de (2,0  $\pm$  0,5) mm d'épaisseur. Les pastilles, utilisées comme collecteurs des filaments, sont utilisées après polissage. Différents niveaux de polissage ont été réalisés en fonction des études : poli miroir pour les pastilles utilisés dans les études présentées dans les Chapitres II et V et polissage au disque P240 pour les études des Chapitres III et IV, afin dans ce dernier cas d'améliorer l'adhérence du film.

Le protocole de polissage commence par le collage au Crystalbond des pastilles sur un disque métallique servant de porte-échantillons à la polisseuse. Une polisseuse automatique de la marque Buehler (modèle EcoMet® 250 Grinder-Polisher) appartenant au laboratoire MATEIS est utilisée. Le protocole de polissage a été optimisé à MATEIS spécifiquement pour le polissage miroir de matériaux de titane. Tout au long du protocole, la tête de polissage sur laquelle est accroché le porte-échantillons est mise en rotation à 60 tr/min, et la force appliquée est de 5 N par disque de TA6V collé au porte échantillon.

### *Polissage miroir*

Les disques de carbure de silicium (Carbimet plain, Buehler) suivants sont successivement utilisés pour le polissage : P400 (rotation plateau 150 tr/min, polissage jusqu'à planéité), P600 (rotation plateau 150 tr/min, 5 min), P800 (rotation plateau 150 tr/min, 8 min), P1200 (rotation plateau 150 tr/min, 10 min), P2500 (rotation plateau 120 tr/min, 15 min). Entre chaque changement de disque, les échantillons sont rincés à l'eau. La dernière étape de polissage (vitesse plateau 120 tr/min, 30 minutes) est réalisée sur un tissu de polissage (Chemomet, Buehler) imbibé d'une solution d'OPS (Struers) diluée par de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % (ratio volumique OPS : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % = 75 :25). Pour finir, les pastilles sont nettoyées aux ultrasons dans un mélange acétone-eau, puis dans de l'acétone seule.

### *Polissage P240*

Dans ce cas, seul un disque de carbure de silicium de rugosité P240 est utilisé (rotation plateau 150 tr/min, polissage jusqu'à planéité). Après nettoyage, ces pastilles sont de plus traitées par plasma atmosphérique (appareil ULS/1 torche v12 de chez ASCYS) pendant une dizaine de secondes afin de nettoyer leur surface et permettre une meilleure accroche du revêtement.

- *Implants dentaires*

Des implants dentaires en TA6V ont également été utilisés comme substrat. Ces implants de 14 mm de longueur et de 5,2 mm de diamètre ont été offerts par la société Anthogyr (référence « Bone Level » de la gamme Axiom Multilevel). Les implants sont traités par plasma atmosphérique pendant une dizaine de seconde avant utilisation.

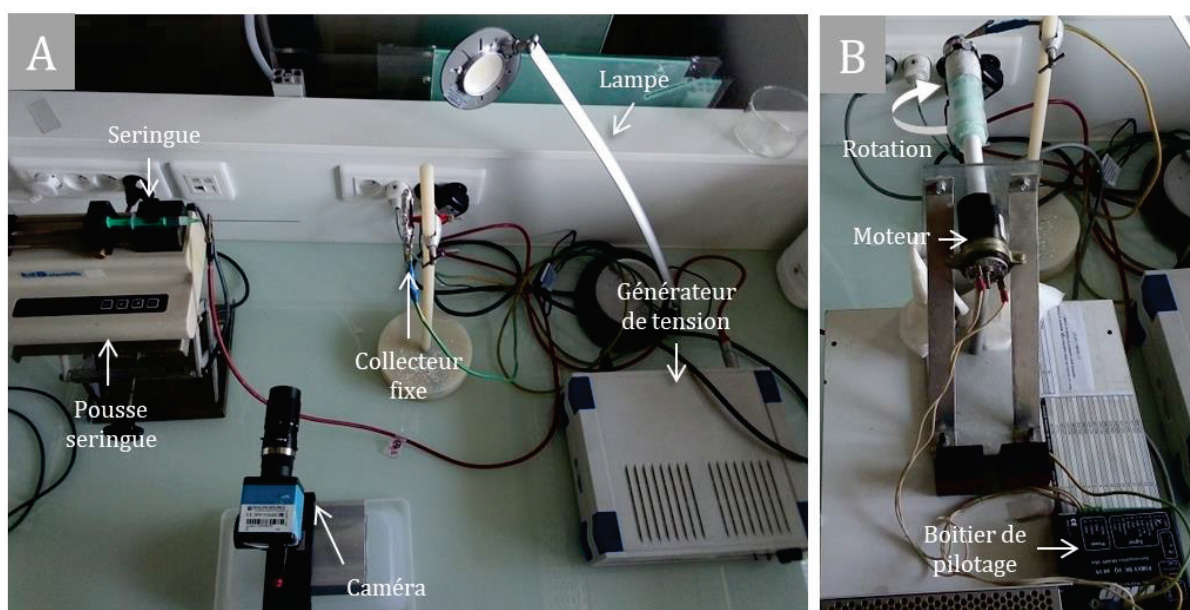
## 2. PROCÉDES DE MISE EN FORME

- *Electrofilage*

Le procédé d'électrofilage a été brièvement présenté dans le chapitre bibliographique. Plus d'informations sur cette technique peuvent être trouvées dans l'Annexe 1 « *Electrofilage* ». Cette dernière présente certains aspects théoriques de la méthode et insiste sur des considérations expérimentales importantes.

Expérimentalement, une seringue de 2 mL (Injekt, B. Braun) est remplie avec la solution de précurseurs. Une aiguille 21G de 12 cm de longueur (B. Braun, diamètre interne 0,51 mm, diamètre externe 0,81 mm) est fixée à l'extrémité de la seringue. L'extrémité de l'aiguille est préalablement polie afin d'obtenir une pointe non biseautée, le biseau étant responsable d'une répartition inhomogène des charges à l'extrémité de l'aiguille lors de l'électrofilage. L'extrusion de la solution est assurée par un pousse-seringue (KDS-100, KD Scientific). L'aiguille est reliée à un générateur haute tension (marque ISEG, 0 à +30 kV) grâce à une pince crocodile. Enfin, un collecteur relié à la masse électrique est placé face à l'aiguille pour recueillir les filaments.

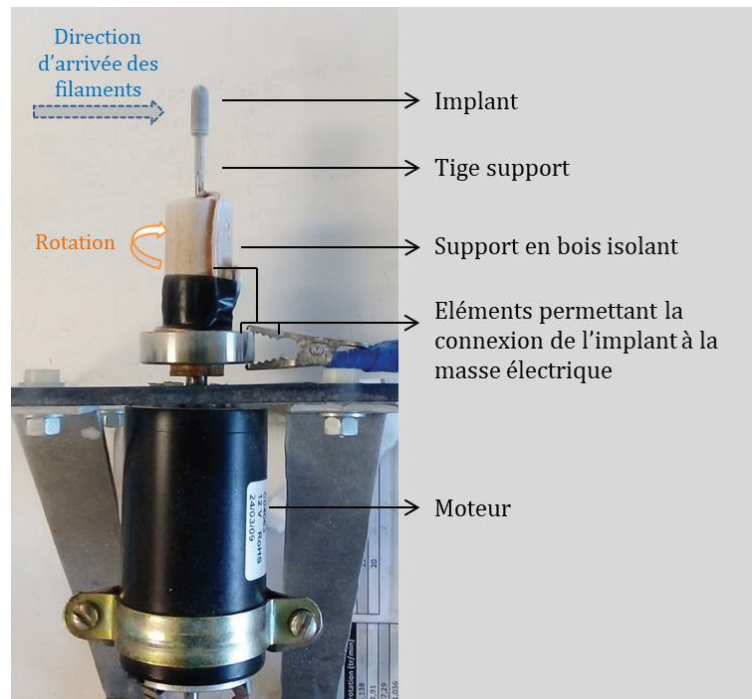
Trois types de collecteurs ont été utilisés dans ce travail. Pour le dépôt sur pastilles, le collecteur fixe (Figure 1.A) est une plaque métallique maintenue sur une potence, alors que le collecteur rotatif (Figure 1.B) comprend un tube en verre pouvant être mis en rotation, grâce à un moteur, selon son axe de révolution. Dans les deux cas, les collecteurs sont recouverts de papier aluminium et les pastilles de TA6V sont fixées à la surface de l'aluminium grâce à du scotch conducteur électrique (scotch « carbone », généralement utilisé pour la microscopie électronique) pour permettre l'évacuation des charges électriques. Une caméra (DFK 41AU02, Imaging source) est utilisée pour visualiser la solution en sortie d'aiguille et permet donc de déterminer visuellement si l'électrofilage a lieu ou non.



**Figure 1.** A) Montage d'électrofilage utilisé avec un collecteur fixe et B) Collecteur rotatif et boîtier de pilotage du moteur



Pour les dépôts sur implants dentaires, ces derniers sont disposés dans l'axe de rotation du collecteur rotatif, selon le dispositif présenté sur la Figure 2. Le dispositif en rotation est relié à la masse par un roulement à billes.



**Figure 2.** Montage d'électrofilage adapté aux implants cylindriques. L'implant est mis en rotation selon son axe de révolution

Il est important de noter que les montages n'étant pas placés dans une enceinte thermostatée, aucun ajustement de température et d'humidité n'est possible. Toutefois, les expériences ont été menées dans un laboratoire dont la température de l'air est régulée. Celle-ci a pu évoluer entre 21 et 25 °C en fonction des saisons. L'humidité relative a quant-à-elle été mesurée à des valeurs comprises entre 22 et 70 %.

- *Enduction centrifuge*

Le procédé d'enduction centrifuge est présenté en Annexe 2 « *Enduction centrifuge* ». L'appareil utilisé est un SPIN 150 de la marque SPS (Semiconductor Production Systems Europe). Pour le dépôt, deux gouttes de solutions sont déposées sur le substrat de TA6V, puis une accélération de 200 tr/min/s<sup>2</sup> est appliquée au substrat. Les durées et vitesses de rotation sont précisées dans les différents chapitres en fonction des essais expérimentaux.

- *Enduction par trempage*

L'enduction par trempage est une méthode simple couramment utilisée pour le dépôt de couches minces. Elle consiste à immerger la pièce à enduire dans la solution de précurseurs, puis à la retirer à vitesse constante et contrôlée, comme illustré sur la Figure 3. Les vitesses de retrait sont précisées dans la suite de cette thèse en fonction des tests réalisés.

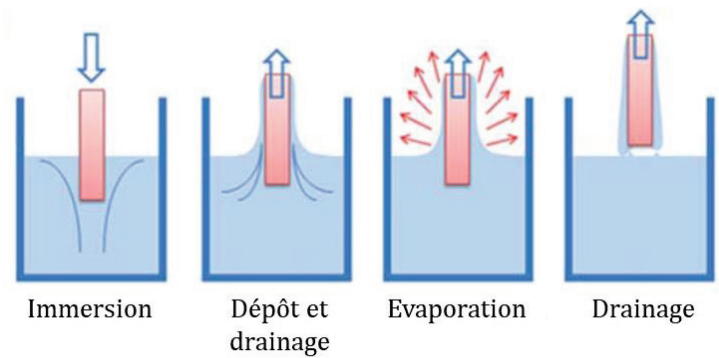


Figure 3. Etapes du procédé d'enduction par trempage. Adapté de [291].

- *Electro-implosion*

L'imprimante utilisée pour l'électro-implosion ainsi que le principe de pilotage sont présentés en Annexe 3. Le filament électrofilé est déposé grâce à l'imprimante sur différents substrats : feuille d'aluminium, pastille de TA6V poli miroir et lame de verre. Les conditions d'électrofilage (débit, tension, distance de travail et vitesse du collecteur) sont précisées pour chaque résultat présenté dans le Chapitre V.

Le G-Code employé permet l'obtention d'une grille formée de plusieurs carrés de même dimension. Le dépôt est composé de plusieurs couches, elles-mêmes constituées de deux sous-couches : une première de 15 lignes de 20 mm orientées selon l'axe x et espacées de 200  $\mu\text{m}$  puis d'une seconde de 13 lignes de 20 mm orientées selon l'axe y (soit selon une rotation de 90 ° par rapport à la première sous-couche). Le dépôt architecturé prend donc la forme d'une grille à l'intersection des sous-couches. Cette grille est centrée sur le substrat. Pour cette étude, le nombre de couches est compris entre 1 et 5.

Dans certains cas qui seront précisés, un ioniseur à air pulsé (ESPO50, Automax) est utilisé pour décharger la surface du collecteur.

### 3.TRAITEMENTS THERMIQUES

Le vieillissement des matériaux de 45S5 est réalisé à l'étude à 60 °C (Mettert U25).

Les traitements thermiques (four à moufle, Nabertherm P330) commencent par une rampe de montée en température de 1 °C/min. Les températures de paliers (550°C, 700 et 800°C) sont maintenues constantes durant deux heures.

## 4. METHODES DE CARACTERISATION

### 4.1. CARACTERISATIONS MORPHOLOGIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

- *Microscopie optique*

Un microscope optique de la marque Olympus (Olympus BX60) a permis l'observation optique des revêtements.

- *Microscopie Électronique à Balayage (MEB) – Spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS)*

Un MEB Tescan Vega 3 appartenant au département Science et Génie des Matériaux de l'INSA de Lyon a été utilisé pour les observations et les caractérisations par analyse dispersive en énergie. Certaines images ont également été obtenues sur un MEB ZEISS Merlin Compact du Centre Technologique des Microstructures de Lyon. Les échantillons sont fixés sur des plots métalliques à l'aide de scotch carbone, et certains d'entre eux sont préalablement métallisés à l'or (90 secondes, 30 mA, Bal-Tec SCD 005).

Pour l'imagerie, un détecteur d'électrons secondaires est utilisé. Selon les réglages, la valeur de tension est comprise entre 7 et 13 kV, l'intensité du faisceau entre 8 et 10 unités, la distance de travail entre 7 et 10 mm, et les valeurs de grandissements entre 32 et 10 000.

Pour l'EDS (détecteur d'électrons secondaires), la distance de travail est fixée à 15 mm, la tension varie entre 15 et 25 kV et l'intensité de faisceau entre 15 et 18 unité, afin d'obtenir un temps mort inférieur à 20 % et un taux de comptage proche de 10 000 coups/s. Notons que l'EDS est une méthode semi quantitative : sa précision est de 1 % atomique dans le cas idéal, non représentatif de nos conditions expérimentales. De plus, des pertes de phosphore ont déjà été constatées sous l'effet du faisceau d'électron [292], ce qui peut influencer la précision des résultats présentés dans ce travail.

- *Microscopie électronique à transmission (MET)*

Les observations par microscope électronique à transmission ont été réalisées sur le MET JEOL 2100F au Centre Technologique des Microstructures de Lyon. Ce microscope est équipé d'une caméra Garan Ultrascan 1000. Le mode haute résolution est utilisé pour l'imagerie (200 kV) et le mode EDS permet la cartographie élémentaire.

- *Analyses thermogravimétriques (ATG) / Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)*

Les thermogrammes en ATG-DSC ont été réalisés par Rodica Chiriac et François Toche de la plateforme d'analyse thermique du LMI avec une Thermobalance Mettler Toledo TGA/DSC2. Les mesures sont faites sous air et sur une gamme de température allant de l'ambiante jusqu'à 800 °C, avec une rampe de 5 °C/min.

- *Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)*

Les analyses par infrarouge à transformée de Fourier par réflectance totale atténuée ont été réalisées sur un spectrophotomètre IR700 de la marque Safas. Les spectres sont enregistrés entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 2  $\text{cm}^{-1}$  et un pas de 1 ou 2  $\text{cm}^{-1}$ . Le spectrogramme final moyenne l'enregistrement de 10 spectres. Un blanc est réalisé à l'air avant d'analyser les échantillons (liquides ou solides). Le spectre du blanc est soustrait automatiquement du spectre expérimental par le logiciel.

- *Diffraction de rayons X (DRX)*

Le diffractomètre utilisé est un D8 Advance de la marque Bruker appartenant au laboratoire MATEIS. Le générateur de rayons X possède une anticathode en cuivre (longueur d'onde des rayons X  $\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1,541 \text{ \AA}$ ). Les réglages du générateur sont de 40 mA et 40 kV. Le montage reprend la géométrie Bragg-Brentano avec un détecteur 1D Si à pistes LynxEye. Les scans à température ambiante sont enregistrés entre 20 et 90  $^{\circ}2\theta$  avec un incrément d'angle de 0,020  $^{\circ}2\theta$  et une vitesse d'acquisition de 200 secondes par scan. Le logiciel utilisé pour l'analyse de phases est X'Pert HighScore de PANalytical.

Pour les analyses *in situ* en température, l'échantillon est placé dans un four et chauffé à 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  jusqu'à 250  $^{\circ}\text{C}$ . Un diffractogramme est enregistré à température constante à cette température, puis tous les 50  $^{\circ}\text{C}$  jusqu'à 1000  $^{\circ}\text{C}$  au maximum. A partir de 250  $^{\circ}\text{C}$ , la montée en température se fait à 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Les scans sont réalisés avec un incrément d'angle de 0,030  $^{\circ}2\theta$  et une vitesse d'acquisition de 1 ou 2 secondes par pas.

- *Rhéologie*

Des mesures rhéologiques ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre (AR2000, Advanced Rheometer), en partenariat avec Pr. René Fulchiron du laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP, Université Lyon 1). Expérimentalement, les mesures sont effectuées en régime statique (expérience de relaxation) et en régime dynamique, avec une géométrie Couette. Cette géométrie est composée d'un cylindre plein fixe disposé à l'intérieur d'un cylindre creux mobile. Le fluide à étudier est disposé dans l'espace disponible entre les deux surfaces solides. En régime statique comme en régime dynamique, la fréquence de cisaillement est variée sur une plage de fréquence comprise entre 0,1 et 100  $\text{s}^{-1}$  ou  $\text{rad}/\text{s}$ , respectivement. Les temps de relaxation sont déterminés à partir des études dynamiques et grâce au modèle de Maxwell généralisé. Le principe est de faire correspondre, à partir de la méthode des moindres carrés, les courbes expérimentales avec des courbes générées par le modèle de Maxwell sur une plus grande plage de fréquences non accessibles expérimentalement.

- *Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)*

*RMN liquide :  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  et  $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$*

Les spectres RMN en phase liquide ont été collectés sur un spectromètre Advance Nanobay V3-I (400 MHz) par Emmanuel Chefdeville de la plateforme d'analyse du Centre Commun de RMN (Université Lyon 1). Les échantillons sont mis en rotation à une vitesse de 20 Hz et chauffés à 37  $^{\circ}\text{C}$ . Les noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  (avec ou sans découplage du proton) sont sondés, avec un pulse

radiofréquence de 15  $\mu\text{s}$  pour  $^1\text{H}$  et de 12  $\mu\text{s}$  pour  $^{31}\text{P}$ , un temps d'acquisition de quelques secondes (1 à 5 s) et un délai de recyclage de plusieurs microsecondes (entre 10 et 80  $\mu\text{s}$ ). Pour chaque noyau sondé, entre 2 et 4 acquisitions sont collectées.

#### *RMN solide : $^{29}\text{Si}$ , $^{31}\text{P}$*

Les spectres RMN en phase solide ont été enregistrés sur un spectromètre Avance III 500WB par Chantal Lorentz de la plateforme de caractérisation de l'IRCE Lyon. Deux noyaux sont sondés : le  $^{29}\text{Si}$  (spin  $\frac{1}{2}$ ) et le  $^{31}\text{P}$  (spin  $\frac{1}{2}$ ). Les échantillons sont mis en rotation à une vitesse de 10 kHz. Les spectres HPDEC du  $^{29}\text{Si}$  sont enregistrés avec une sonde double H/X de 4 mm, une fréquence spectrale de 99,34 MHz, un temps de pulse de 4  $\mu\text{s}$ , un délai de recyclage de 240 secondes et 600 acquisitions sont collectées. Les spectres HPDEC du  $^{31}\text{P}$  sont enregistrés avec une sonde triple H/X/Y de 4 mm, une fréquence spectrale de 202,41 MHz, un temps de pulse de 3,25  $\mu\text{s}$ , un délai de recyclage de 60 secondes et 140 acquisitions sont réalisées. Les déplacements chimiques sont normalisés par rapport au  $\text{Q}_8\text{M}_8$  pour le  $^{29}\text{Si}$  (12,4 ppm) et par rapport à  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à 85%<sub>massique</sub> pour le  $^{31}\text{P}$  (0 ppm).

## **4.1. CARACTERISATION BIOLOGIQUE**

### **4.1.1. Tests acellulaires**

- *Evolution du pH du milieu de culture*

Les échantillons sont immergés dans 2 mL de milieu de culture (RPMI 1640 supplémenté avec 10 %<sub>vol</sub> de sérum de veau fœtal, et 1 %<sub>vol</sub> d'antibiotique antifongique) dans une plaque de culture 24 puits. Un milieu de culture sans échantillon est également ajouté comme contrôle dans un puits. Les plaques de cultures sont placées dans un incubateur à 37 °C (atmosphère humide, 5 % de  $\text{CO}_2$ ) entre chaque mesure de pH (pH 510, EUTECH Instruments). Les mesures sont réalisées sur une durée de 7 jours.

- *Angle de contact*

L'hydrophilie des échantillons est déterminée par mesure de l'angle de contact formé entre une goutte d'eau (volume de 5  $\mu\text{L}$ ) et la surface des matériaux (« Drop shape analyser », D04010 Easy Drop, Krüss). Pour chaque échantillon, deux mesures sont répétées sur deux réplicats.

### **4.1.2. Tests cellulaires : Évaluation de la cytocompatibilité**

Les protocoles d'évaluation biologiques présentés ici résultent de plusieurs optimisations visant à améliorer l'adhésion des cellules MG-63 lors de leur ensemencement sur les échantillons.

- *Culture cellulaire*

Deux types de cellules sont utilisés pour caractériser le comportement cellulaire sur les échantillons étudiés. Les MG63 proviennent d'une lignée cellulaire d'ostéosarcome (lignée MG63, référence CRL1427, ATCC). Les hGF, cellules primaires de fibroblastes gingivaux humains,

ont été isolées à partir de biopsies de tissu gingival récoltées lors d'extractions orthodontiques (un consentement des patients et l'approbation des comités éthiques locaux ont été obtenus, en accord avec la législation française en vigueur ; Service de Consultations et de Traitements Dentaires, Hospices Civils de Lyon).

Avant mise en contact avec les échantillons, les cellules sont cultivées dans des flacons de culture. Le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco 11995040, Thermo Fisher Scientific) est supplémenté avec 10 %<sub>vol</sub> de sérum fœtal bovin (FBS pour fetal bovine serum, référence A4766, Thermo Fisher Scientific), 5 %<sub>vol</sub> de pénicilline/streptomycine (référence 15070063, Thermo Fisher Scientific) et 1 %<sub>vol</sub> d'amphotéricine B (référence 15290018, Thermo Fisher Scientific). Le sérum fœtal bovin contient des nutriments nécessaires à la croissance et à la survie des cellules (facteurs de croissance, protéines, vitamines, oligo-éléments, hormones), le mélange pénicilline/streptomycine prévient les contaminations bactériennes, et l'amphotéricine est un antibiotique antifongique. Durant toute la durée de la culture, les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours et les cellules repiquées tous les 5 jours. Lorsque qu'une quantité suffisante de cellules est obtenue (passages 5 et 7 pour les MG63, 3 et 5 pour les hGF), ces dernières sont mises en contact avec les matériaux étudiés.

Pour ce faire, les cellules sont détachées des flasques de culture par action de la trypsine, centrifugées (1200 rpm/min), re-suspendues dans du milieu et comptées à l'aide d'un Scepter automatique (Merck Millipore). Puis, les cellules sontensemencées avec une densité de 2x10<sup>3</sup> cellules de MG63 par pastille de TA6V ou de 2x10<sup>4</sup> cellules d'hGF. Pour les tests sur implants, 1,3x10<sup>4</sup> cellules de MG63 sontensemencées par échantillon.

Les cellules sont concentrées dans un faible volume de milieu, déposées sur les substrats et mises en incubation pendant plusieurs heures (3 pour les MG63, 4 pour les hGF) pour leur permettre de se fixer spécifiquement à la surface des matériaux. Puis, le reste du milieu (dépourvu de cellules) est rajouté afin d'immerger totalement les échantillons dans le puits de culture (1 mL de milieu au total). Les plaques contenant les échantillons sont ensuite incubées pendant toute la durée de la culture cellulaire (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

- *Activité métabolique*

La cytocompatibilité des matériaux est évaluée par le test d'Alamar Blue, *via* une quantification de l'activité métabolique des cellules cultivées sur ces matériaux. Le réactif d'Alamar Blue™ (référence DAL1025, Thermo Scientific) contient une molécule, la résazurine, qui est convertie par réaction d'oxydo-réduction en résorufine par les cellules métaboliquement actives [293]. La résazurine est soluble dans l'eau et est responsable de la couleur bleue que prend le milieu de culture après ajout de ce colorant. Au contraire, la résorufine est de couleur rose et fluorescente. Elle peut donc être détectée par fluorométrie ou spectrophotométrie. La quantité de résorufine formée est directement proportionnelle au signal d'absorbance ou de fluorescence mesuré, et l'intensité du signal peut être reliée à l'activité métabolique des cellules présentes dans le puits étudié. En effet, les cellules endommagées et non viables (cellules métaboliquement inactives) ne présentent pas de fort pouvoir réducteur et entraînent une formation limitée de résorufine. L'activité métabolique dépend donc de l'état de santé des cellules mais aussi du nombre de cellules présentes dans le milieu.

Expérimentalement, la solution d'Alamar Blue™ est directement ajoutée dans les puits de culture pour atteindre une concentration finale de 10 % (v/v) et les plaques sont incubées pendant 5 heures. La réaction d'oxydo-réduction étant photosensible, les plaques de cultures sont incubées dans le noir et les manipulations sont réalisées sous le minimum de lumière possible. La quantité de résorufine formée est déterminée par mesure d'absorbance à 570 et 600 nm *via* un lecteur de plaque (Infinite® M 200 PRO, NanoQuant plate, Tecan). Pour chaque matériau testé, les cellules sont cultivées sur 3 reproductions d'un même échantillon (pastille ou implant), et pour chacun, l'absorbance est mesurée sur 3 prélèvements de milieu. Ainsi, chaque matériau donne N=9 mesures d'absorbance, utilisées pour les analyses statistiques. Le test d'Alamar Blue est réalisé après 1, 3 et 7 jours de culture des cellules MG-63 sur les échantillons étudiés, et après 1 jour pour les cellules hGF.

Afin de vérifier la validité du test, une lame de verre est utilisée comme témoin positif: elle ne présente en théorie pas de cytotoxicité pour les cellules, et permet leur prolifération. De plus, un témoin négatif est utilisé pour vérifier que les conditions expérimentales - et notamment l'apport de lumière qui n'a pas pu être totalement éliminé - n'entraînent pas de changement colorimétrique du milieu. Ce témoin est un puits de culture rempli de milieu, sans échantillon ni cellule.

- *Préparation des échantillons pour l'observation MEB*

Après 7 jours de culture sur les substrats, les échantillons sont rincés trois fois au PBS (tampon phosphate salin, référence 70011044, Thermo Fisher Scientific) à 37 °C et les cellules sont fixées par immersion pendant 30 minutes dans un bain de PBS contenant 3,7 %<sub>vol</sub> de formaldéhyde (ACROS Organics, référence 10426730). Après trois autres rinçages, les cellules sont déshydratées par immersion pendant 20 minutes dans des bains d'éthanol de concentration croissante (25, 35, 50, 75, 90 et 95 %<sub>vol</sub> dans l'eau). Un bain final est effectué dans l'éthanol absolu pendant une heure. Ces bains de concentration croissante permettent de déshydrater progressivement les cellules sans modifier leur morphologie. Les échantillons sont ensuite séchés à l'air, métallisés à l'or (90 s, 30 mA ; modèle SCD 050, Bal-Tec sputter coater) et observés au microscope optique à balayage TESCAN Vega 3 (Département Science et Génie des Matériaux, INSA Lyon).

- *Préparation des échantillons pour l'observation au microscope confocal*

Un marquage fluorescent des cellules permet d'observer leur morphologie à la surface des revêtements et des contrôles. Après 7 jours de culture sur les substrats, les échantillons sont rincés trois fois au PBS et les cellules sont fixées par immersion pendant 30 minutes dans un bain de PBS contenant 3,7 %<sub>vol</sub> de formaldéhyde. Après trois autres rinçages au PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton X100 (Fisher Bioreagents, référence 10102913, 1 %<sub>vol</sub> dans le PBS) et les sites de marquage non spécifiques sont saturés par de la BSA (albumine de sérum bovin délipidé, Corning, référence 354331, 1 %<sub>vol</sub> dans le PBS). Les microfilaments d'actine sont marqués par la phalloïdine Alexa Fluor 488 (fluorescence verte, Invitrogen, référence A12379, 1 %<sub>vol</sub> dans le PBS). Les noyaux cellulaires sont marqués par l'iodure de propidium (fluorescence rouge, Invitrogen, eBioscience, ratio volumique 1 : 3000 dans le PBS). Les cellules marquées sont examinées sous un microscope confocal (LEICA SP5 X, Centre

d'Imagerie Quantitative Lyon-Est CIQLE, Lyon). Les longueurs d'ondes d'excitations sont de 488 nm et 535 nm pour l'Alexa Fluor 488 et l'iodure de propidium respectivement, et les longueurs d'onde d'émission sont de 539 et 617 nm.

- *Phosphatase alcaline (ALP)*

La phosphatase alcaline (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, notée ALP pour «alkaline phosphate») est une enzyme qui est exprimée au cours de la différenciation ostéoblastique [246]. Elle peut donc être dosée afin de rendre compte du potentiel ostéoinducteur des matériaux. Dans un tampon alcalin, la phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse d'esters phosphates. Dans le kit utilisé, le p-nitrophényl phosphate (pNPP) est utilisé comme substrat. Ce composé, une fois déphosphorylé par l'ALP, se transforme en p-nitrophénol (pNP) de couleur jaune ( $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$ ) [294]. Une mesure colorimétrique permet alors le dosage du pNP, qui est relié à la concentration en ALP contenue dans les cellules.

Le kit K412-500 (BioVision) est utilisé en suivant les instructions du fabricant. Les cellules hGF sont ensemencées à la surface des échantillons à une densité de  $10^3$  cellules/échantillon. Après 10 jours de culture cellulaire dans le milieu de croissance, les cellules sont récoltées par action de la trypsine (ensuite inhibée par du sérum de veau fœtal). Après centrifugation (1200 tr/min, 5 min), les cellules sont lysées par ajout du tampon essai (volume total porté à 80  $\mu\text{L}$ ). Cette lyse permet de détruire la membrane cellulaire afin d'extraire les protéines du cytoplasme, de la membrane et du noyau. Puis, 50  $\mu\text{L}$  de pNPP (5 mM) sont ajoutés, et la réaction est stoppée après 1 h d'incubation à température ambiante par ajout de 20  $\mu\text{L}$  de «solution stop». Un contrôle sans cellule permet de déterminer le blanc, qui est soustrait aux résultats des échantillons testés. Pour ce blanc, 80  $\mu\text{L}$  de milieu surnageant sont mélangés à 20  $\mu\text{L}$  de «solution stop» et, après ajout de 50  $\mu\text{L}$  de dNPP standard (5 mM), la solution est incubée pendant 1 h (température ambiante, à l'abri de la lumière). Après homogénéisation, l'absorbance des solutions (échantillons et blanc) est mesurée à 405 nm.

Parallèlement à la préparation des échantillons et du blanc, une droite d'étalonnage est obtenue à partir de différents étalons de pNPP (concentrations connues de 0, 4, 8, 12 et 20 nmol/puits). L'enzyme ALP est ajoutée dans ces puits, et après 1 h d'incubation, la réaction est stoppée par la «solution stop». La mesure d'absorbance pour chacun de ces étalons permet de tracer une droite d'étalonnage ( $R^2_{\text{exp}} = 0,991$ ).

Après mesure d'absorbance, la concentration en pNP contenue dans les échantillons est obtenue à partir de cette droite d'étalonnage. L'activité ALP est ensuite calculée grâce à la relation suivante :  $\text{Activité ALP} = A/V/T$  avec A la quantité de pNP (en  $\mu\text{mol}$ ), V le volume de suspension cellulaire dans le tampon essai (en mL), et T le temps de réaction (en min). L'unité de l'activité ALP ainsi calculée est l'unité glycine, correspondant à la quantité d'enzyme entraînant l'hydrolyse d'une micromole de pNPP par minute à un pH de 9,6 et à 25 °C. L'activité ALP est ainsi exprimée en U/min.

- *Microscopie optique*

Après 7 jours de culture cellulaire, le fond des puits de culture est imagé par microscopie optique inversée (Olympus CKX41).



- *Analyses statistiques*

Le principe des analyses statistiques est présenté en Annexe 5. Pour les deux types de cellules étudiées, les MG63 et les hGF, la viabilité cellulaire est mesurée sur N=9 reproductions. Pour les implants dentaires, la viabilité des MG63 est mesurée sur N=8 reproductions car une valeur aberrante a été supprimée. Les analyses statistiques sont réalisées sur le logiciel GraphPad Prism 7.04 et sur le logiciel Jamovi 1.2.27. L'erreur de première espèce ( $\alpha$ ) est choisie égale à 0,05, en accord avec la littérature. Cela signifie que toutes les valeurs-p inférieures ou égales à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

Pour les tests d'Alamar Blue, la normalité des données est vérifiée par le test de d'Agostino & Pearson. La sphéricité, initialement évaluée par le test de Mauchly's, est corrigée par la méthode de Greenhouse-Geisser lorsque nécessaire (valeur-p du test de Mauchly's significatif). Enfin, l'homogénéité des variances est vérifiée par le test de Brown-Forsythe uniquement pour les résultats bruts obtenus sur implants. Pour les résultats sur pastilles, les données sont donc utilisées sous leur forme logarithmique. Cette méthode peut être employée pour homogénéiser les variances. Une fois ces différentes hypothèses validées, un test ANOVA à un facteur permet d'analyser les données de cytotoxicité, alors qu'un test ANOVA à deux facteurs sert à l'analyse des résultats de prolifération. Dans les deux cas, les comparaisons multiples sont permises par l'utilisation d'un test Post Hoc dit de Tukey.

Pour le test ALP, l'analyse statistique est réalisée sur N=4 reproductions par échantillon. Pour le substrat de TA6V traité à 550 °C, l'une des 4 reproductions présente une donnée aberrante, rendant les données non normalement distribuées et les variances non homogènes. Cette donnée a donc été supprimée. La normalité du reste des données (sous leur forme brute, et non logarithmique) est évaluée par le test de Shapiro Wilk ( $p=0,88$  ; N trop faible pour réaliser le test de d'Agostino & Pearson) et l'homogénéité par la méthode de Brown-Forsythe ( $p=0,80$ ). Un test ANOVA à un facteur est donc utilisé pour analyser ces données et les comparaisons multiples sont permises par le test Post Hoc de Tukey.

Sur les représentations graphiques des différents résultats, les barres d'erreurs encadrant les moyennes représentent les écart-types. Ces derniers permettent de montrer la variabilité des mesures pour chaque échantillon.

# ANNEXES



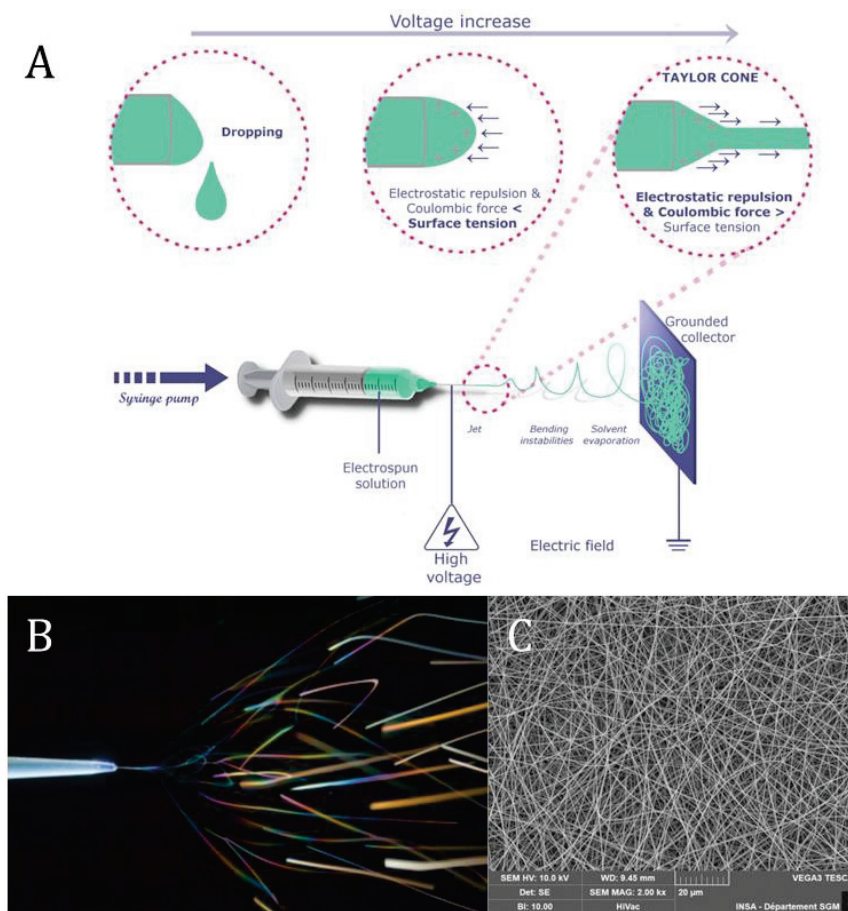
# ANNEXE 1. ELECTROFILAGE

L'électrofilage est une technique de mise en forme permettant la préparation de filaments de faibles diamètres (microniques et submicroniques) à partir de solution polymère. Le développement du procédé d'électrofilage est basé sur différents travaux qui étudient l'effet d'un champ électrique sur un liquide [295]. Au tout début du 17<sup>ème</sup> siècle notamment, William Gilbert observe l'attraction électrostatique que peut subir une goutte de liquide. Au 18<sup>ème</sup> siècle, George Mathias Bose s'intéresse quant à lui à la production d'aérosols par l'application de forts potentiels électriques à un liquide. Mais c'est Charles Vernon Boys qui le premier rapporte, en 1888, la formation de filaments à partir de solutions visqueuses soumises à un champ électrique [296]. En effet, il observe qu'en connectant un plat sur lequel sont déposés des liquides visqueux à une machine électrique, ces derniers atteignent le bord du plat et peuvent être éjectés sous forme de fins filaments avant d'être collectés sur tout support conducteur. Boys parle alors de filage électrique et l'applique à différents matériaux visqueux tels que la laque, la cire d'abeille, la cire à cacheter, ou encore de la gomme de gutta-percha. Par ailleurs, le chercheur constate que le quartz ne peut pas être filé par l'usage de l'électricité : seule une élongation mécanique du matériau est possible. Le procédé de filage électrique a été breveté pour la première fois par Cooley en 1900 [297], puis différents brevets s'enchaînent, avec une contribution d'au moins 22 brevets par Anton Formhals dans les années 1930-1940. Ces différents brevets ont pour sujet le procédé d'électrofilage lui-même ou son utilisation comme moyen de production de la soie artificielle [298]. En 1977, le dépôt de filaments polymères électrofilés à la surface de prothèses fait l'objet d'un brevet par Graham Ernest Martin [299]. Bien qu'existant depuis près un siècle et demi, la méthode d'électrofilage est surtout très étudiée dans les groupes de recherche depuis les années 1990.

## 1. Principe physique de l'électrofilage

Le procédé d'électrofilage permet de créer des filaments microniques ou submicroniques à partir de solutions polymères ou de polymères fondus. Sous l'une de ces deux formes liquides, le polymère est introduit dans une seringue et est extrudé, à l'aide d'un pousse-seringue, à débit fixe à travers une aiguille. Une goutte sphérique est alors formée à l'extrémité de l'aiguille. En augmentant la tension, les charges électriques s'accumulent sur la goutte jusqu'à ce que leur répulsion soit suffisante pour surpasser les forces électrostatiques qui maintiennent le liquide sous forme de goutte (Figure 1.A). La goutte s'allonge et prend la forme d'un cône, appelé cône de Taylor, à partir duquel un jet est initié. Ce nom provient du physicien Geoffrey Ingram Taylor qui a, dans les années 1960, travaillé à la modélisation mathématique de ce cône [300]. Si les propriétés viscoélastiques de la solution sont inadaptées, alors le jet se divise en un aérosol de fines gouttelettes de liquide (on parle alors d'électrospray). Si au contraire le liquide a des propriétés viscoélastiques telles que l'enchevêtrement des molécules permette une élongation du jet sans que ce dernier ne se brise en gouttelettes, alors le jet prend la forme d'un filament continu qui se dirige vers un collecteur relié à la masse. Lors de son trajet, le filament est soumis à des instabilités, résultant principalement des répulsions électriques des charges. Un lasso est alors formé (Figure 1.B). La trajectoire du filament en forme de lasso entraîne une élongation importante du jet qui est à l'origine des faibles diamètres de filaments déposés. Le solvant de la solution peut sécher lors du trajet, ou le polymère, s'il est fondu, peut se refroidir rapidement ; le

filament arrive alors sous forme solide sur le collecteur. De plus, la forme du lasso implique un dépôt aléatoire du filament lorsque celui-ci atteint le collecteur (Figure 1.C)



**Figure 1.** Le procédé d'électrofilage. A) montage expérimental et naissance du filament, B) Visualisation des instabilités subies par le jet lors de son trajet vers le collecteur [295] et C) Exemple d'un dépôt obtenu par électrofilage (solution de PVP, 8 %<sub>masse/vol</sub> dans l'éthanol)

Bien qu'assez simple à mettre en place, le procédé d'électrofilage nécessite le contrôle d'un certain nombre de paramètres liés au polymère (ou à la solution) ainsi qu'aux conditions de filage. La reproductibilité du procédé est assurée par la maîtrise de ces différents paramètres. De plus, un ajustement de ces mêmes paramètres permet de contrôler la morphologie et le diamètre des filaments collectés. Il est important de préciser que ces divers paramètres sont interdépendants.

## 2. Paramètres influant l'électrofilage de solutions polymères

Dans cette partie, on s'intéressera uniquement à l'électrofilage de solutions polymères, qui est le plus fréquemment reporté et le procédé utilisé dans cette thèse.

- *Propriétés de la solution*

La viscosité de la solution joue un rôle important sur son habilité à être électrofilée. Elle peut être ajustée par variation de la concentration d'un polymère donné ou bien de son poids

moléculaire. Par ailleurs, les chaînes de polymères en solution doivent être suffisamment longues pour pouvoir s'enchevêtrer et apporter de l'élasticité à la solution. C'est cet enchevêtrement qui va permettre à la solution de s'étirer sans rompre sous l'effet du champ électrique. Pour de très faibles valeurs de viscosité ou d'élasticité, le phénomène d'électrospray prédomine et aucun filament n'est formé. Avec l'augmentation de la viscosité, des filaments perlés et finalement des filaments homogènes sont obtenus [301]. Enfin, une viscosité trop importante peut entraîner la production de rubans plutôt que de filaments, un séchage de la solution en sortie d'aiguille, voire une impossibilité d'extruder le liquide pour les valeurs les plus élevées. Sur la plage de viscosité permettant l'obtention de filaments homogènes, les viscosités les plus importantes caractérisent les solutions capables de résister au mieux aux instabilités lors du filage : les filaments obtenus sont alors plus larges et se déposent sur une surface réduite.

La conductivité de la solution est un autre facteur à prendre en compte : une solution de forte conductivité aura tendance à être plus étirée par le champ électrique et à être plus sujette aux instabilités électriques. Il a été montré que les filaments obtenus pouvaient être plus fins et déposés sur une surface plus large que pour des conductivités plus faibles [11].

Enfin, la tension superficielle de la solution est également un paramètre important. En effet, pour initier le jet, la force électrostatique doit dépasser la tension superficielle de la solution. Lors du trajet de la solution jusqu'au collecteur, la tension superficielle peut également induire une tendance du liquide à prendre une forme sphérique, de manière à minimiser sa surface d'échange avec le gaz environnant. Ce phénomène est à l'origine de l'apparition de perles à la surface des filaments ou, dans le cas extrême, de la formation de gouttes. Plus une solution est visqueuse, moins sa tension superficielle a d'impact sur la morphologie des solutions. L'apparition de perles est favorisée par une vitesse d'évaporation lente du solvant. Notons aussi que l'ajout de tensioactifs peut permettre l'abaissement d'une forte tension superficielle de la solution [302].

- *Paramètres inhérents au montage d'électrofilage*

Le champ électrique (généralement exprimé en kV/cm) est un paramètre clef de l'électrofilage. Il dépend de la tension appliquée à la solution et de la distance fixée entre l'aiguille et le collecteur. La tension permet de transmettre à la solution les charges qui vont initier son étirage : une tension seuil, positive ou négative, est donc requise. Au-delà de ce seuil, une augmentation de la tension entraîne la production de filaments plus fins, résultant d'un étirage plus important de la solution sous l'effet d'un nombre de charges plus important [303]. Néanmoins, si la tension augmente encore, le volume étiré peut être supérieur au volume de solution mis à disposition par le débit choisi : le diamètre des filaments augmente momentanément, le cône de Taylor rentre dans l'aiguille et le filage s'arrête. Un autre phénomène possible est l'apparition de jets secondaires (phénomène appelé « multijet »).

Le champ électrique peut également être modifié en rapprochant l'extrémité de l'aiguille de la surface du collecteur. Dès lors, la distance parcourue par le jet est raccourcie et le champ électrique, ainsi augmenté, induit généralement une accélération du jet. En contrepartie, si le temps de vol du filament est réduit de manière trop importante, l'évaporation du solvant n'est plus suffisante pour permettre aux filaments de sécher correctement avant d'atteindre le collecteur [304].

Le débit permet de gérer la quantité de solution extrudée à l'extrémité de l'aiguille. Pour obtenir un électrofilage stable, un équilibre doit être atteint entre le volume extrudé d'une part, et le volume étiré sous l'effet du champ d'autre part. Si le rapport entre les deux n'est pas optimal alors le filage peut s'interrompre (débit trop faible), ou l'excès de solution non étirée peut tomber sous forme de gouttes par gravité (débit trop élevé). En comparant des filages stables, une augmentation de débit implique l'élargissement du diamètre des filaments [305], voire l'apparition de perles à leur surface. L'évaporation de solvant peut également être perturbée pour des valeurs de débit élevées.

Enfin, le choix du collecteur est important puisqu'il conditionne la réception des filaments filés. Le plus souvent, des collecteurs conducteurs (en aluminium par exemple) sont choisis et reliés à la masse afin d'évacuer les charges et d'avoir une différence de potentiel fixe tout au long du procédé. Cependant, pour un dépôt épais, les charges seront plus difficilement évacuées en raison du caractère souvent isolant des polymères, et le filage perdra alors en stabilité. Ce phénomène peut être compensé en augmentant très légèrement la tension appliquée au cours du temps. Un collecteur rotatif peut également être utilisé pour orienter les filaments [306] ou faciliter leur séchage [307].

- *Conditions environnementales*

Les conditions environnementales influent sur la reproductibilité de la technique, notamment car elles peuvent modifier les vitesses d'évaporation du solvant. Par exemple, si le solvant est aqueux, un faible taux d'humidité peut entraîner une obstruction de l'aiguille sous l'effet du séchage trop rapide de la solution, alors qu'un séchage plus lent peut être obtenu pour des valeurs d'humidité plus élevées. Un fort taux d'humidité peut également être utilisé pour décharger le filament [308] ou pour induire la formation de pores par condensation d'eau à la surface des filaments [309]. La température va quant-à-elle directement jouer sur la viscosité et la cinétique d'évaporation du solvant, avec les mêmes conséquences que présentées précédemment.

## ANNEXE 2. ENDUCTION CENTRIFUGE

L'enduction centrifuge, appelée « *spin-coating* » en anglais, permet d'obtenir des revêtements homogènes et de faible épaisseur, de quelques nano- ou micromètres. Le principe est simple : une force centrifuge appliquée au substrat permet d'étaler une solution sur ce dernier. La force visqueuse et la tension superficielle de la solution permettent de maintenir la solution sur le substrat lors du dépôt.

D'un point de vue pratique, le procédé peut être décrit en plusieurs étapes. Dans un premier temps, un liquide est déposé sur le substrat à recouvrir. La quantité utilisée est en large excès par rapport à la quantité de solution nécessaire pour former le dépôt final. Le substrat, statique, est accéléré progressivement jusqu'à une vitesse choisie, généralement de plusieurs centaines de tours par minute. Lors de cette accélération, le liquide est soumis à un écoulement radial vers l'extérieur, sous l'action de la force centrifuge créée. Lorsque l'intégralité du substrat est recouverte par la solution, l'excès de liquide est éjecté, à vitesse constante, sous forme de gouttelettes et l'épaisseur du dépôt diminue. Cette étape d'amincissement du revêtement est gouvernée par les forces visqueuses du liquide, dont l'épaisseur finale dépendra. Des effets de bords peuvent induire des inhomogénéités d'épaisseur du revêtement sur la périphérie du substrat. Ces inhomogénéités dépendent entre autres de la tension de surface et de la viscosité de la solution, mais aussi de la vitesse de rotation. Enfin, la dernière étape du procédé correspond à l'évaporation du solvant de la solution déposée : le revêtement est solidifié et son épaisseur diminue encore. L'ensemble des étapes du procédé est schématisé sur la Figure 2.

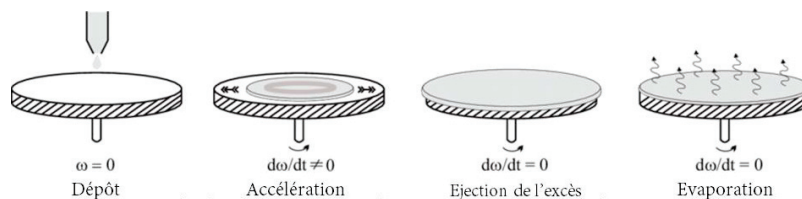


Figure 2. Les différentes étapes du procédé d'enduction centrifuge. Avec  $\omega$  la vitesse angulaire [310]

L'approche de Meyerhofer permet de prédire l'épaisseur finale  $h_f$  du revêtement. La formule découlant de cette approche,  $h_f = x \left( \frac{e}{2(1-x)K} \right)^{1/3}$ , qui permet de rendre compte de l'épaisseur du film déposé est fonction de plusieurs facteurs :

- $x$ , la quantité effective de solide dans la solution déposée
- $e$ , la constante d'évaporation telle que  $e = C\sqrt{\omega}$

La constante  $e$  est elle-même dépendante de la vitesse angulaire  $\omega$  et de  $C$ , une constante de proportionnalité qui rend compte de l'évaporation du solvant dans les conditions expérimentales (type de flux d'air au-dessus du substrat, diffusivité des molécules de solvant dans l'air).

- $K$ , la constante d'écoulement telle que  $K = \frac{\rho\omega^2}{3\eta}$

La constante  $K$  est elle-même dépendante de  $\omega$ , de la densité  $\rho$  de la solution et de sa viscosité  $\eta$ .

Tous ces paramètres sont donc à prendre en compte pour l'élaboration de revêtement par la technique d'enduction centrifuge.



# ANNEXE 3. PRESENTATION DE L'IMPRIMANTE D'ELECTRO-IMPRESSION

## 1. Présentation de l'imprimante

L'appareil d'électro-impression a été réalisé sur mesure par l'entreprise Tobeca, spécialisée dans le montage d'imprimantes 3D, dans le cadre de la thèse de Laura Bourdon [272]. Les éléments nécessaires à l'électro-impression sont disposés dans une enceinte de 2,5 mètres de long, 1,7 mètres de haut et 1,2 mètres de profondeur (Figure 3). L'enceinte peut être fermée hermétiquement, ce qui permet de procéder en conditions de température et d'humidité stables tout au long du dépôt. Un système de ventilation assure l'évacuation de tout composé toxique qui pourrait être utilisé.

L'électrofilage est assuré par un pousse-seringue et un générateur de tension, tous deux contrôlés directement via le logiciel REPETIER. Une seringue contenant la solution à déposer est introduite dans le système d'extrusion. Pour une seringue de 1 mL, la valeur de débit minimale atteignable est de 0,005 mL/h. L'aiguille de la seringue est reliée à un générateur de haute tension de polarité positive qui peut varier entre 0 et 30 kV.

Le dépôt localisé du filament électrofilé est assuré par le mouvement spatial d'un collecteur métallique mesurant 40x40 cm<sup>2</sup>. Ce plateau mobile est pilotable selon les directions X, Y et Z *via* le logiciel REPETIER. L'accélération du plateau est fixée à 1000 m/s<sup>2</sup> et les déplacements peuvent atteindre jusqu'à 50 cm/s.

Enfin, les conditions environnementales sont contrôlables dans ce bâti. L'humidité peut être comprise entre 25 et 75 % (avec une sensibilité de régulation autour de la valeur cible de 2 %). Un brumisateuse d'eau permet l'apport en humidité, alors qu'une entrée d'air comprimé permet l'appauvrissement de l'enceinte en humidité. Le capteur d'humidité est placé à 10 cm de la pointe de l'aiguille afin de rendre compte des conditions environnementales à l'emplacement du filage. La température est quant à elle régulée par un climatiseur réversible permettant d'opérer à des températures comprises entre 15 et 30 °C.

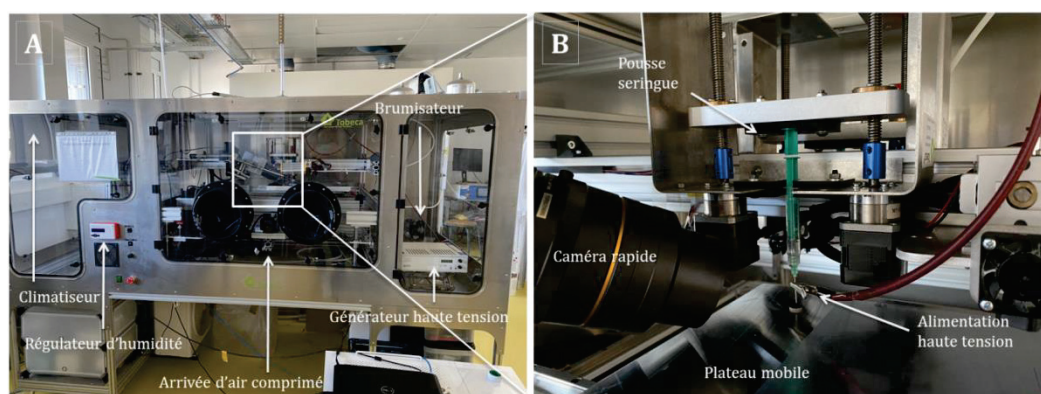


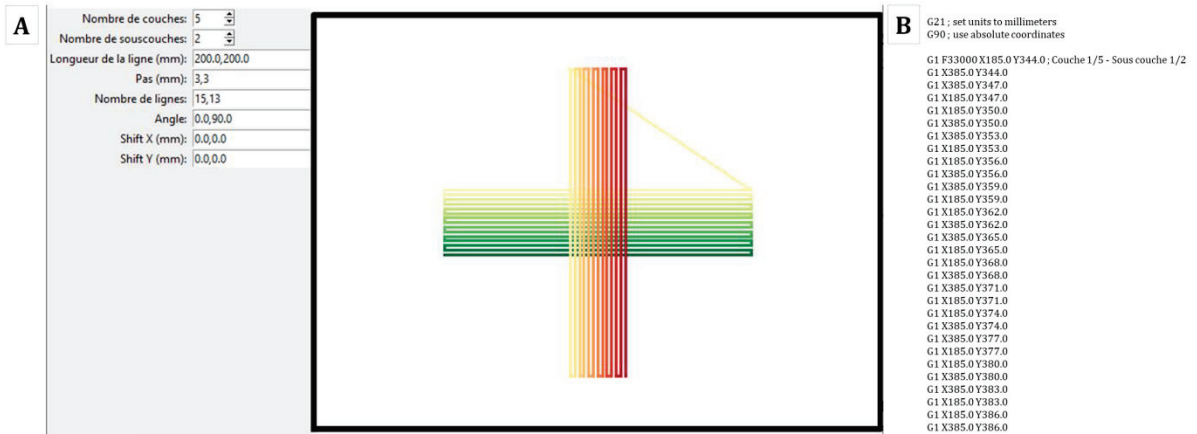
Figure 3. A) Bâti de l'imprimante TOBECA avec B) un aggrandissement sur la zone d'électro-impression

## 2. Pilotage de l'imprimante

Différents paramètres de l'imprimante sont contrôlés par un GCODE, un fichier texte de commande numérique. Ce dernier contient une séquence d'instructions permettant de piloter numériquement la machine. Une technique répandue consiste à modéliser la structure à imprimer sur un logiciel de modélisation 3D. Le logiciel REPETIER calcule alors automatiquement à partir de ce modèle les coordonnées, vitesses de déplacement et débits à utiliser pour obtenir le motif, et les transcrit en commande dans un fichier GCODE. Dans un souci de meilleur contrôle des paramètres d'impression de la structure, le GCODE a dans notre cas été codé manuellement pour les commandes concernant la tension électrique et le débit, et à l'aide d'un logiciel spécifiquement élaboré pour le contrôle des déplacements.

L'insertion dans le GCODE d'une ligne commençant par « M42 » indique que les paramètres du générateur sont à modifier. La commande « M42 » est suivie des lettres S et P, reliées respectivement aux valeurs de tension et de courant. Des chiffres sont accolés aux lettres S et P pour donner les instructions de valeurs. Le courant est toujours fixé à sa valeur minimale (P4) et la tension est modifiée. La commande S50 par exemple permet de fixer la tension à 5,4 Kv. Un incrément de  $n=1$  entre les valeurs de  $S_n$  implique une variation de tension de 0,1 Kv. La commande spécifique S255 permet d'initier la haute tension. L'extrusion est également codée dans le GCODE *via* l'instruction E qui code la distance en millimètre extrudé, la valeur étant donnée par un chiffre accolé à E. Suivant le même principe, F code la vitesse d'extrusion en mm/min. Pour l'extrusion, chaque ligne de code permet de coder seulement 30 secondes d'extrusion : il est donc nécessaire de copier la ligne autant de fois que nécessaire pour avoir une extrusion continue durant la totalité du filage.

Enfin, les GCODE de déplacement ont été obtenus grâce un logiciel spécifique développé par Colin Bousige et Arnaud Brioude du LMI. Le logiciel permet de renseigner les paramètres d'une structure composée de différentes couches de lignes parallèles (Figure 4). Chaque orientation est nommée « sous-couche » et contient plusieurs lignes parallèles dont le nombre, la longueur et l'espacement (pas) est à préciser. A chaque couche, le filament est déposé cycliquement selon les paramètres de la sous-couche 1, de la sous-couche 2, et ainsi de suite jusqu'à la sous-couche n, puis reprend le cycle à partir de la sous-couche 1. Le nombre total de couche est à renseigner, ainsi que l'angle entre chaque sous-couche. Le centre de chaque sous-couche peut également être décalée par rapport aux autres en X et en Y (« shifts »). Il est important de noter que le motif de grille n'est obtenu qu'à l'intersection de plusieurs sous-couches. Enfin, le fait d'avoir des lignes plus longues que les dimensions du motif est volontaire: ceci permet en effet de prendre en compte les pertes de vitesse du collecteur lors des changements de direction et donc d'assurer une linéarité des lignes dans le motif.



**Figure 4.** A) Interface du logiciel permettant de renseigner les paramètres de grille et B) Début du GCODE généré (exemple de la première couche)

# ANNEXE 4. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats d'analyses biologiques sont sujets à des variabilités et imprécisions expérimentales, ce qui rend difficile l'identification de réelles différences entre les groupes étudiés. Les statistiques permettent d'extrapoler les résultats obtenus sur une quantité de données limitée et d'en déduire une conclusion plus générale. Les statistiques permettent alors de quantifier l'incertitude de cette conclusion.

Dans notre cas, des tests statistiques ont été employés pour analyser les résultats d'activité métabolique obtenus à partir des mesures d'absorbance du test de l'Alamar Blue. Lors de ces tests, des cellules ont été cultivées sur différents substrats avec ou sans revêtement. Afin d'étudier la variance des résultats, chaque condition a été reproduite  $N = 9$  fois.

## 1. Choix du test statistique

Une analyse de variance ANOVA (« ANalysis Of Variance » en anglais) a été sélectionnée comme test statistique. Ce test paramétrique permet l'analyse simultanée de plus de deux échantillons indépendants. Pour le test de cytotoxicité (activité métabolique au jour 1), où seul le substrat peut affecter la viabilité cellulaire (mesurée après un jour de culture), une analyse ANOVA à un facteur (*one-way* ANOVA) est choisie. Le cas spécifique de l'ANOVA à deux facteurs (*two-ways* ANOVA) rend possible l'étude de l'influence de deux variables sur une population donnée. Ce test est particulièrement adapté à l'analyse de prolifération (comparaison des activités métaboliques aux jours 1, 3 et 7), pour laquelle la viabilité cellulaire est non seulement dépendante du type d'échantillon, mais également du temps de mise en culture sur ces surfaces. Plus spécifiquement, une ANOVA sur mesures répétées permet de rendre compte de ce facteur temps, étant donné que des mesures ont été réalisées sur les mêmes échantillons à différents temps.

## 2. Interprétation des résultats du test

Le but du test statistique choisi est de comparer les valeurs de viabilités cellulaires obtenues en moyennant les résultats expérimentaux sur  $N$  mesures. Une hypothèse nulle est posée sous la forme : « Les populations sont identiques ». Une « valeur-p » est calculée *via* le test statistique choisi. Le principe mathématique de ces tests n'est pas abordé ici car dépasse le cadre de cette thèse. Les calculs ont été réalisés *via* les logiciels spécialisés GraphPad Prism 7.04 et Jamovi 1.2.27.

La valeur-p représente la probabilité d'obtenir des résultats de test au moins aussi extrêmes que les résultats effectivement observés, en supposant que l'hypothèse nulle est correcte. Autrement dit, la valeur-p est une probabilité, entre 0 et 1, qui répond à la question : « dans une expérience de cette taille, si les populations ont réellement les mêmes moyennes, quelle est la probabilité d'observer une différence au moins aussi large entre les moyennes des échantillons que celle observée ? ». L'hypothèse nulle est donc rejetée si la valeur-p est suffisamment faible. Dans le cas contraire, il y a échec du rejet de l'hypothèse nulle. Il est à noter que l'échec du rejet de l'hypothèse nulle ne permet pas de prouver que cette dernière est vraie. On dit que les preuves ne sont pas assez grandes pour garantir le rejet de l'hypothèse nulle.

La méthode de la valeur-p consiste à rejeter l'hypothèse nulle si la valeur-p est inférieure ou égale à  $\alpha$ , avec  $\alpha$  le niveau de significativité. De manière générale dans la littérature,  $\alpha$  est fixé à 0,05 (ce qui équivaut à un intervalle de confiance de 95 %). Si la valeur-p est supérieure à  $\alpha$ , alors il y a échec du rejet de l'hypothèse nulle. Au contraire, les résultats sont considérés comme « statistiquement différents » si la valeur-p est inférieure à  $\alpha$ .

### 3. Vérification des hypothèses du test

Tous les tests statistiques sont basés sur une liste de suppositions. Le test ANOVA, choisi dans le cadre de notre étude, est un test paramétrique. Il apporte donc beaucoup plus d'informations que d'autres tests dit non-paramétriques. Cependant, les tests paramétriques sont basés sur un nombre d'hypothèses plus important, qu'il convient dans un premier temps de vérifier. Les hypothèses présentées ci-après sont à vérifier dans le cadre d'une ANOVA.

Tous les tests statistiques sont basés sur l'hypothèse que les données résultent de l'utilisation d'échantillons aléatoires, représentatifs d'une plus large population de valeurs qui aurait pu être collectée. Cette hypothèse est validée dans notre cas par le choix aléatoire des échantillons obtenus expérimentalement.

- *Test de normalité*

Le test ANOVA repose sur l'hypothèse que les données récoltées ou les résidus (erreurs expérimentales) suivent une loi normale, ou distribution Gaussienne. Cette hypothèse de distribution normale peut être évaluée *via* un test de normalité. La valeur-p obtenue répond à la question : « si l'on sélectionne des échantillons de manière aléatoire à partir d'une population Gaussienne, quelle est la probabilité d'obtenir un échantillon qui dévie de la distribution Gaussienne autant (ou plus) que cet échantillon ? ». De ce fait, une valeur-p supérieure à  $\alpha$  signifie que les données sont cohérentes avec une distribution Gaussienne. A noter aussi que le test ANOVA est considéré comme un test robuste à la normalité, c'est-à-dire que même avec des données non normales, les résultats du test sont aussi satisfaisants que si les données (ou résidus) étaient normalement distribuées.

Cette hypothèse de distribution normale peut être évaluée *via* le test de normalité de d'Agostino & Pearson.

- *Test d'homogénéité (pour les tests ANOVA à un et à deux facteurs)*

L'homogénéité des variances est une autre hypothèse du test ANOVA. Elle signifie que chaque groupe est échantillonné à partir de populations ayant la même variance (et donc le même écart-type), même si la moyenne diffère.

Le test d'homogénéité de Brown-Forsythe a été utilisé pour l'analyse de nos données expérimentales.

- *Test de sphéricité (pour les tests ANOVA sur mesures répétées)*

L'hypothèse de sphéricité suppose que les variances des différences entre les différents groupes sont égales.

L'analyse de la sphéricité de nos données expérimentales a été réalisée *via* le test de Mauchly's W.

#### **4. Test ANOVA et post-hoc test**

Le test ANOVA permet de comparer simultanément différents groupes. L'hypothèse nulle est donc que les moyennes de toutes les populations sont identiques. Dans le cas où l'analyse ANOVA entraîne un rejet de l'hypothèse nulle, on peut se demander quelles sont les moyennes qui diffèrent de manière significative. Pour cela, des comparaisons multiples sont réalisées à l'aide de tests Post Hoc. Dans notre cas, le test HSD (« honestly significant difference ») de Tukey a été choisi.

# ANNEXE 5. INFRAROUGE DU CARBONATE DE CALCIUM

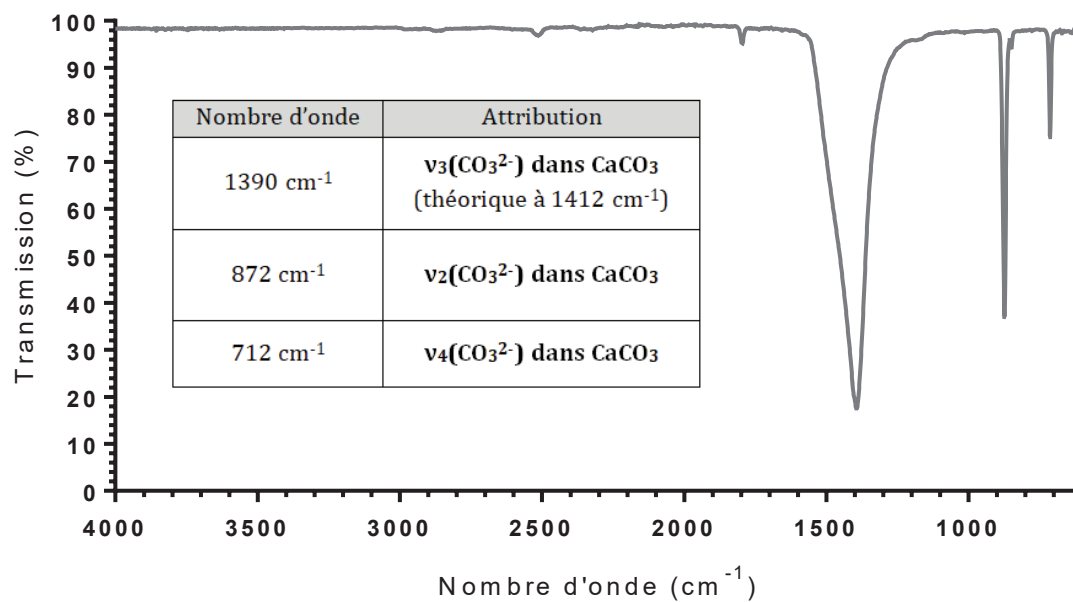


Figure 5. Spectre infrarouge obtenu sur l'acétate de calcium traité à 550 °C

# ANNEXE 6. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LES TESTS BIOLOGIQUES

Les principales conditions de préparation des revêtements sont rassemblées dans le Tableau 1 pour le système 45S5-Acétate (lisse et électrofilé), dans le Tableau 2 pour le système CaP-Acétate (lisse et électrofilé) et dans le Tableau 3 pour le système 45S5-Nitrate (lisse et électrofilé). Les protocoles de préparation des substrats, de dépôt du revêtement et de traitement thermique sont détaillés dans les Techniques Expérimentales. Pour les synthèses des solutions, des renvois sont faits dans le tableau vers les protocoles détaillés déjà présentés précédemment dans cette thèse.

	45S5-Acétate-Lisse	45S5-Acétate-Filaments
Substrat	TA6V poli P240 + Traitement plasma	45S5-Acétate-Lisse, avec couche d'accroche encore humide (avant traitement thermique)
Composition de la solution déposée	<p>[Si] = 0,90 M</p> <p>Avec</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (molaire) = 8 : 60 : 32 dans le sol initial</li> <li>• TEOS:GPTMS (molaire) =85:15</li> <li>• Si/Ca = 1,7; Si/Na = 0,90 et Si/P = 8,9 (rapports molaires)</li> </ul> <p><i>Précurseurs : acétate de Ca, acétate de Na, triéthylphosphite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvant : Eau</li> </ul> <p><i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 2.2.1</i></p>	<p>[Si] = 0,70 M [PVA] = 7 %<sub>masse/vol</sub></p> <p>Avec</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Si:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (molaire) = 8 : 60 : 32 dans le sol initial</li> <li>• TEOS:GPTMS (molaire) =85:15</li> <li>• Si/Ca = 1,7; Si/Na = 0,90 et Si/P = 8,9 (rapports molaires)</li> </ul> <p><i>Précurseurs : acétate de Ca, acétate de Na, triéthylphosphite</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solvant : Eau</li> </ul> <p><i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 2.2.1</i></p>
Paramètres de dépôt	<b>Par enduction centrifuge</b> 2000 tr/min, 1 min, 200 tr/min/s <sup>2</sup>	<b>Par électrofilage</b> Collecteur rotatif; Distance : 9 cm ; Tension : 11 kV; Débit : 0,15 mL/h ; Durée : 2 heures
Traitement thermique	2 h à 550 °C (rampe 1 °C/min)	
Stérilisation	Stérilisation UV (lampe 15 W, 254 nm), à 15 cm pendant 40 min	

**Tableau 1.** Considérations expérimentales pour la préparation des revêtements de 45S5-Acétate lisses et électrofilés, utilisés pour les mesures d'angles de contact et les tests cellulaires



	<b>CaP-Acétate-Lisse</b>	<b>CaP-Acétate-Filaments</b>
<b>Substrat</b>	TA6V poli P240 + Traitement plasma	CaP-Acétate-Lisse, avec couche d'accroche encore humide (avant traitement thermique)
<b>Composition de la solution déposée</b>	[PVA] = 1 % <sub>masse/vol</sub> [Ca] = 1,5 M  Avec • n(Ca)/n(P) = 1,67 <i>Précurseurs : acétate de Ca, triéthylphosphite</i> • Solvant : Eau  <i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 3.1</i>	[PVA] = 7 % <sub>masse/vol</sub> [Ca] = 1,5 M  Avec • n(Ca)/n(P) = 1,67 <i>Précurseurs : acétate de Ca, triéthylphosphite</i> • Solvant : Eau  <i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 3.1</i>
<b>Paramètres de dépôt</b>	<b>Par enduction centrifuge</b> 2500 tr/min, 1 min, 200 tr/min/s <sup>2</sup>	<b>Par électrofilage</b> Collecteur fixe ; Distance : 12 cm ; Tension : 9,4 kV ; Débit : 0,05 mL/h ; Durée : 45 minutes
<b>Traitement thermique</b>	2 h à 550 °C (rampe 1 °C/min)	
<b>Stérilisation</b>	Stérilisation UV (lampe 15 W, 254 nm), à 15 cm pendant 40 min	

**Tableau 2.** Considérations expérimentales pour la préparation des revêtements de CaP-Acétate lisses et électrofilés, utilisés pour les mesures d'angles de contact et les tests cellulaires

	<b>45S5-Nitrate-Lisse</b>	<b>45S5-Nitrate-Filaments</b>
<b>Substrat</b>	TA6V poli P240 + Traitement plasma	45S5-Nitrate lisse, encore humide (avant traitement thermique)
<b>Composition de la solution déposée</b>	[Si] = 1,24 M  Avec • Si:HNO <sub>3</sub> (molaire) = 97 : 3 • Si/Ca = 1,7; Si/Na = 0,90 et Si/P = 8,9 (rapports molaires) <i>Précurseurs : nitrate de Ca, nitrate de Na, triéthylphosphite</i> • Solvant : Eau  <i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 1.4.1</i> <i>(En ajoutant une étape de pré-hydrolyse du TEPI)</i>	[PVA] = 7 % <sub>masse/vol</sub> [Si] = 1,00 M  Avec • Si:HNO <sub>3</sub> (molaire) = 97 : 3 • Si/Ca = 1,7; Si/Na = 0,90 et Si/P = 8,9 (rapports molaires) <i>Précurseurs : nitrate de Ca, nitrate de Na, triéthylphosphite</i> • Solvant : Eau  <i>Protocole détaillé : Chapitre III, partie 1.4.1</i> <i>(En ajoutant une étape de pré-hydrolyse du TEPI)</i>
<b>Paramètres de dépôt</b>	<b>Par enduction centrifuge</b> 1400 tr/min, 1 min, 200 tr/min/s <sup>2</sup>	<b>Par électrofilage</b> Collecteur rotatif ; Distance : 8 cm ; Tension : 10 kV ; Débit : 0,30 mL/h ; Durée : 42 minutes
<b>Traitement thermique</b>	• Vieillessement : 18 h à 60 °C (atmosphère humide) • Calcination : 2 h à 800 °C (rampe 1 °C/min)	
<b>Stérilisation</b>	Stérilisation UV (lampe 15 W, 254 nm), à 15 cm pendant 40 min	

**Tableau 3.** Considération expérimentales pour la préparation des revêtements de 45S5-Nitrate lisses et électrofilés, utilisés pour les mesures d'angles de contact et les tests cellulaires

Dans le système 45S5-Nitrate, les optimisations détaillées dans le Chapitre II ont été conservées, expliquant les différences de concentration en ion silicium entre les formulations à base d'acétates ou de nitrates dans le système 45S5. Cependant, la durée d'électrofilage a été adaptée afin d'extruder une quantité de silicium identique pour les deux matériaux (en prenant en compte la concentration en silicium et le débit d'extrusion). Notons aussi que dans le système 45S5-Nitrate, initialement formulé avec du TEP, le TEPI a été ici préféré comme précurseur du phosphore. Le Chapitre III prouve en effet sa meilleure réactivité, responsable de la conservation du phosphore dans le matériau final.



## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>ALP:</b> Alkaline phosphatase	<b>LJS :</b> Longueur de jet stable
<b>ATG :</b> Analyse thermogravimétrique	<b>MAS:</b> Magic angle spinning
<b>BCP:</b> Biphasic calcium phosphate	<b>MCPM:</b>
<b>BMMSC:</b> Bone marrow mesenchymal stem cell	Monobasic calcium phosphate monohydrate
<b>BSA:</b> Bovine serum albumin	<b>MEB :</b> Microscope électronique à balayage
<b>BTE:</b> Bone tissue engineering	<b>MET :</b> Microscope électronique à transmission
<b>CaDHA:</b> Calcium deficient hydroxyapatite	<b>MEK:</b> Methyléthylketone
<b>CaP:</b> Calcium phosphate	<b>NLE:</b> Needle less electrospinning
<b>CHA, HCA ou CHAp:</b> Carbonated hydroxyapatite	<b>OCP:</b> Octacalcium phosphate
<b>CTAB:</b> N-cetyltriméthylammonium bromide	<b>PAN:</b> Polyacrylonitrile
<b>DCPA:</b> Dicalcium phosphate anhydrous	<b>PBS:</b> Phosphate buffered saline
<b>DCPD:</b> Dicalcium phosphate dihydrate	<b>PCL:</b> Polycaprolactone
<b>DEPETES :</b>	<b>PEG:</b> Polyethylene glycol
(2-diéthylphosphatoéthyl)triéthoxysilane	<b>PEO:</b> Polyethylene oxide
<b>DMSO:</b> Diméthyl sulfoxyde	<b>PHB:</b> Polyhydroxybutyrate
<b>DRX :</b> Diffraction des rayons X	<b>PLA:</b> Polylactic acid
<b>DSC:</b> Calorimétrie différentielle à balayage	<b>PLGA:</b> Poly(lactic-co-glycolic acid)
<b>ECM:</b> Extracellular matrix	<b>PLLA:</b> Poly(L-lactic acid)
<b>EDS :</b> Energy-dispersive X-ray spectroscopy	<b>PMMA:</b> Poly(méthyl méthacrylate)
<b>FGF:</b> Fibroblast growth factor	<b>PVA:</b> Polyvinyl alcohol
<b>GBR:</b> Guided bone regeneration	<b>PVB:</b> Polyvinylbutyral
<b>GPTEOS:</b> 3-glycidyloxypropyltriéthoxysilane	<b>PVP:</b> Polyvinyl pyrrolidone
<b>GPTMOS ou GPTMS:</b>	<b>RMN :</b> Résonance magnétique nucléaire
3-glycidyloxypropyltriméthoxysilane	<b>SEM:</b> Scanning electron microscopy
<b>GS:</b> Gentamicin sulfate	<b>SBF:</b> Simulated body fluid
<b>HAp:</b> Hydroxyapatite	<b>TCH:</b> Tetracycline hydrochloride
<b>hEnSC:</b> human endometrial stem cell	<b>TCP:</b> Tricalcium phosphate
<b>hGF:</b> human gingival fibroblasts	<b>TEOS:</b> Tetraéthylorthosilicate
<b>HPDEC:</b> High power decoupling	<b>TEP:</b> Triéthylphosphate
<b>ICP :</b> Inductively coupled plasma	<b>TEPI:</b> Triéthylphosphite
<b>IRTF :</b> Infrarouge à transformée de Fourier	<b>TMOS:</b> Tetraméthoxysilane
<b>LFX:</b> Levofloxacin	<b>TTCP:</b> Tetracalcium phosphate
	<b>WIPF:</b> Water induced pore formation



## REFERENCES

- [1] R. Erivan, G. Villatte, J. Dartus, N. Reina, S. Descamps, S. Boisgard, Evolution et projection de la chirurgie de la hanche en France de 2008 à 2070 : étude épidémiologique avec analyse de tendance et projection, *Rev. Chir. Orthop. Traumatol.* 105 (2019) 803–812. doi:10.1016/j.rcot.2019.09.127.
- [2] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363–408.
- [3] M. Dang, L. Saunders, X. Niu, Y. Fan, P.X. Ma, Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering, *Bone Res.* 6 (2018).
- [4] P. Bajaj, R.M. Schweller, A. Khademhosseini, J.L. West, R. Bashir, 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16 (2014) 247–276.
- [5] H. Ma, C. Feng, J. Chang, C. Wu, 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy, *Acta Biomater.* 79 (2018) 37–59.
- [6] G. Pocock, C.D. Richards, *Human Physiology : The Basis of medicine*, Oxford Core Texts, 2006.
- [7] M.M. Giraud Guille, N. Nassif, F.M. Fernandes, Collagen-based materials for tissue repair, from bio-inspired to biomimetic, in: *Mater. Des. Inspired by Nat. Funct. through Inn. Archit.*, The Royal Society of Chemistry, 2013.
- [8] U. Cheema, M. Ananta, V. Mudera, Collagen: applications of a natural polymer in regenerative medicine, in: D. Eberli (Ed.), *Regen. Med. Tissue Eng. - Cells Biomater.*, IntechOpen, 2011.
- [9] A.K. Nair, A. Gautieri, S.-W. Chang, M.J. Buehler, Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone, *Nat. Commun.* 4 (2013).
- [10] S.C. Cowin, L. Cardoso, Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue, *J. Biomech.* 48 (2015) 842–854.
- [11] Z. Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; Teo, W.E.; Ma, An introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific Publishing Co., 2005. doi:10.1142/9789812567611\_0003.
- [12] T.B. Brown, P.D. Dalton, D.W. Hutmacher, Melt electrospinning today: an opportune time for an emerging polymer process, *Prog. Polym. Sci.* 56 (2016) 116–166. doi:https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.01.001.
- [13] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Biologie moléculaire de la cellule*, 6ème édit, Lavoisier Médecine Sciences, 2017.
- [14] P. Ducheyne, K. Healy, D.W. Hutmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick, eds., *Comprehensive Biomaterials II - 2nd Edition*, Elsevier, 2017.
- [15] J. Jeong, J.H. Kim, J.H. Shim, N.S. Hwang, C.Y. Heo, Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration, *Biomater. Res.* 23 (2019).
- [16] J.S. Al-Sanabani, A.A. Madfa, F.A. Al-Sanabani, Application of calcium phosphate materials in dentistry, *Int. J. Biomater.* (2013).
- [17] J.R. Jones, Review of bioactive glass: from Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4457–4486. doi:10.1016/j.actbio.2012.08.023.
- [18] P. Wutticharoenmongkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, P. Supaphol, Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 70–77.

doi:10.1002/mabi.200500150.

- [19] Z. Cao, D. Wang, L. Lyu, Y. Gong, Y. Li, Fabrication and characterization of PCL/CaCO<sub>3</sub> electrospun composite membrane for bone repair, *RSC Adv.* 6 (2016) 10641–10649. doi:10.1039/c5ra22548e.
- [20] K. Fujihara, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers, *Biomaterials.* 26 (2005) 4139–4147. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.014.
- [21] D.M. Reffitt, N. Ogston, R. Jugdaohsingh, H.F. Cheung, B.A. Evans, R.P. Thompson, J. Powell, G. Hampson, Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro, *Bone.* 32 (2003) 127–135.
- [22] T. Wakita, A. Obata, G. Poologasundarampillai, J.R. Jones, T. Kasuga, Preparation of electrospun siloxane-poly(lactic acid)-vaterite hybrid fibrous membranes for guided bone regeneration, *Compos. Sci. Technol.* 70 (2010) 1889–1893. doi:10.1016/j.compscitech.2010.05.014.
- [23] A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, Y. Ota, T. Kasuga, Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1248–1257. doi:10.1016/j.actbio.2009.11.013.
- [24] N. Takeuchi, M. Machigashira, D. Yamashita, Y. Shirakata, T. Kasuga, K. Nogushi, S. Ban, Cellular compatibility of a gamma-irradiated modified siloxane-poly(lactic acid)-calcium carbonate hybrid membrane for guided bone regeneration, *Dent. Mater. J.* 30 (2011) 730–738. doi:10.4012/dmj.2011-075.
- [25] T. Kasuga, A. Obata, H. Maeda, Y. Ota, X. Yao, K. Oribe, Siloxane-poly(lactic acid)-vaterite composites with 3D cotton-like structure, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2349–2357. doi:10.1007/s10856-012-4607-5.
- [26] D. Lee, H. Maeda, A. Obata, K. Inukai, K. Kato, T. Kasuga, Aluminum silicate nanotube modification of cotton-like siloxane-poly(L- lactic acid)-vaterite composites, *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/169721.
- [27] A. Obata, H. Ozasa, T. Kasuga, J.R. Jones, Cotton wool-like poly(lactic acid)/vaterite composite scaffolds releasing soluble silica for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 1649–1658. doi:10.1007/s10856-013-4930-5.
- [28] S. Naghieh, E. Foroozmehr, M. Badrossamay, M. Kharaziha, Combinational processing of 3D printing and electrospinning of hierarchical poly(lactic acid)/gelatin-forsterite scaffolds as a biocomposite: Mechanical and biological assessment, *Mater. Des.* 133 (2017) 128–135. doi:10.1016/j.matdes.2017.07.051.
- [29] M. Kharaziha, M.H. Fathi, H. Edris, Effects of surface modification on the mechanical and structural properties of nanofibrous poly( $\epsilon$ -caprolactone)/forsterite scaffold for tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 4512–4519. doi:10.1016/j.msec.2013.07.002.
- [30] M. Kharaziha, M.H. Fathi, H. Edris, Development of novel aligned nanofibrous composite membranes for guided bone regeneration, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 24 (2013) 9–20. doi:10.1016/j.jmbbm.2013.03.025.
- [31] A. Suryavanshi, K. Khanna, K.R. Sindhu, J. Bellare, R. Srivastava, Magnesium oxide nanoparticle-loaded polycaprolactone composite electrospun fiber scaffolds for bone-soft tissue engineering applications: In-vitro and in-vivo evaluation, *Biomed. Mater.* 12 (2017) 55011. doi:10.1088/1748-605X/aa792b.
- [32] H. Zhou, M. Nabiyouni, B. Lin, S.B. Bhaduri, Fabrication of novel poly(lactic

- acid)/amorphous magnesium phosphate bionanocomposite fibers for tissue engineering applications via electrospinning, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 2302–2310. doi:10.1016/j.msec.2013.01.058.
- [33] S. Wang, R. Castro, X. An, C. Song, Y. Luo, M. Shen, H. Tomás, M. Zhu, X. Shi, Electrospun laponite-doped poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 23357. doi:10.1039/c2jm34249a.
- [34] A.K. Gaharwar, S. Mukundan, E. Karaca, A. Dolatshahi-Pirouz, A. Patel, K. Rangarajan, S.M. Mihaila, G. Iviglia, H. Zhang, A. Khademhosseini, Nanoclay-enriched poly( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun scaffolds for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Tissue Eng. Part A.* 20 (2014) 2088–2101. doi:10.1089/ten.tea.2013.0281.
- [35] G. Nitya, G.T. Nair, U. Mony, K.P. Chennazhi, S. V. Nair, In vitro evaluation of electrospun PCL/nanoclay composite scaffold for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 1749–1761. doi:10.1007/s10856-012-4647-x.
- [36] T.S. Jang, E.J. Lee, J.H. Jo, J.M. Jeon, M.Y. Kim, H.E. Kim, Y.H. Koh, Fibrous membrane of nano-hybrid poly-L-lactic acid/silica xerogel for guided bone regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 100 B (2012) 321–330. doi:10.1002/jbm.b.31952.
- [37] M. Nagrath, A. Alhalawani, A. Rahimnejad Yazdi, M.R. Towler, Bioactive glass fiber fabrication via a combination of sol-gel process with electro-spinning technique, *Mater. Sci. Eng. C.* 101 (2019) 521–538. doi:10.1016/j.msec.2019.04.003.
- [38] L.M. Jurkić, I. Cepanec, S. Kraljević Pavelić, K. Pavelić, Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy, *Nutr. Metab. (Lond)*. 10 (2013).
- [39] R. Jugdaohsingh, Silicon and bone health, *J. Nutr. Health Aging*. 11 (2007) 99–110.
- [40] K. Szurkowska, J. Kolmas, Hydroxyapatites enriched in silicon – Bioceramic materials for biomedical and pharmaceutical applications, *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 27 (2017) 401–409.
- [41] M. Jokinen, T. Peltola, S. Veittola, H. Rahiala, J.B. Rosenholm, Adjustable biodegradation for ceramic fibres derived from silica sols.pdf, 20 (2000) 1739–1748.
- [42] T. Peltola, M. Jokinen, S. Veittola, H. Rahiala, A. Yli-Urpo, Influence of sol and stage of spinnability on in vitro bioactivity and dissolution of sol-gel-derived SiO<sub>2</sub> fibers, *Biomaterials*. 22 (2001) 589–598. doi:10.1016/S0142-9612(00)00219-2.
- [43] S. Sakai, Y. Yamada, T. Yamaguchi, K. Kawakami, Prospective use of electrospun ultra-fine silicate fibers for bone tissue engineering, *Biotechnol. J.* 1 (2006) 958–962. doi:10.1002/biot.200600054.
- [44] Y. Ding, Q. Yao, W. Li, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, J.A. Roether, The evaluation of physical properties and in vitro cell behavior of PHB/PCL/sol-gel derived silica hybrid scaffolds and PHB/PCL/fumed silica composite scaffolds, 136 (2015) 93–98.
- [45] G. Toskas, C. Cherif, R.D. Hund, E. Laourine, B. Mahltig, A. Fahmi, C. Heinemann, T. Hanke, Chitosan(PEO)/silica hybrid nanofibers as a potential biomaterial for bone regeneration, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 713–722. doi:10.1016/j.carbpol.2013.01.068.
- [46] I. Das, G. De, L. Hupa, P.K. Vallittu, Porous SiO<sub>2</sub> nanofiber grafted novel bioactive glass-ceramic coating: A structural scaffold for uniform apatite precipitation and oriented cell proliferation on inert implant, *Mater. Sci. Eng. C.* 62 (2016) 206–214. doi:10.1016/j.msec.2016.01.053.
- [47] A.M. Buckley, M. Greenblatt, The sol-gel preparation of silica gels, *J. Chem. Educ.* 71 (1994) 599. doi:10.1021/ed071p599.



- [48] S.H. Xia, S.H. Teng, P. Wang, Synthesis of bioactive polyvinyl alcohol/silica hybrid fibers for bone regeneration, *Mater. Lett.* 213 (2018) 181–184. doi:10.1016/j.matlet.2017.11.084.
- [49] Z. Ma, G. Dong, C. Lv, J. Qiu, Core-shell glass fibers with high bioactivity and good flexibility, *Mater. Lett.* 88 (2012) 136–139. doi:10.1016/j.matlet.2012.08.045.
- [50] R. Ravichandran, S. Gandhi, D. Sundaramurthi, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 24 (2013) 1988–2005. doi:10.1080/09205063.2013.816930.
- [51] H.Y. Mi, X. Jing, B.N. Napiwocki, Z.T. Li, L.S. Turng, H.X. Huang, Fabrication of fibrous silica sponges by self-assembly electrospinning and their application in tissue engineering for three-dimensional tissue regeneration, *Chem. Eng. J.* 331 (2018) 652–662. doi:10.1016/j.cej.2017.09.020.
- [52] C.R. Silva, C. Airoidi, Acid and base catalysts in the hybrid silica sol-gel process, *J. Colloid Interface Sci.* 195 (1997) 381–387. doi:10.1006/jcis.1997.5159.
- [53] H.W. Kim, H.E. Kim, J.C. Knowles, Production and potential of bioactive glass nanofibers as a next-generation biomaterial, *Adv. Funct. Mater.* 16 (2006) 1529–1535. doi:10.1002/adfm.200500750.
- [54] G. Kaur, Bioactive glasses - Potential biomaterials for future therapy, Series in, Springer, 2017. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845692049500120>.
- [55] W. Höland, G.H. Beall, Glass-Ceramics, in: *Handb. Adv. Ceram. Mater. Appl. Process. Prop.* Second Ed., 2013: pp. 371–381.
- [56] A.R. Boccaccini, D.S. Brauer, L. Hupa, eds., *Bioactive Glasses - Fundamentals, technology and applications*, Royal Society of Chemistry, 2017.
- [57] L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli, A. Pedone, S. Ulderico, Medium-range order in phospho-silicate bioactive glasses: Insights from MAS-NMR spectra, chemical durability experiments and molecular dynamics simulations, *J. Non. Cryst. Solids.* 354 (2008) 84–89. doi:https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2007.06.076.
- [58] A. Tilocca, A.N. Cormack, N.H. de Leeuw, The structure of bioactive silicate glasses: new insight from molecular dynamics simulations, *Chem. Mater.* 19 (2007) 95–103. doi:https://doi.org/10.1021/cm061631g.
- [59] R.A. McCauley, *Corrosion of Ceramic Materials - Third Edition*, CRC Press, 2016.
- [60] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials.* 32 (2011) 2757–2774. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.
- [61] Y.J. Seol, K.H. Kim, M.K. Young, A.K. In, S.H. Rhee, Bioactivity, pre-osteoblastic cell responses, and osteoconductivity evaluations of the electrospun non-woven SiO<sub>2</sub>-CaO gel fabrics, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 90 B (2009) 679–687. doi:10.1002/jbm.b.31334.
- [62] C. Gao, Q. Gao, Y. Li, M.N. Rahaman, A. Teramoto, K. Abe, In vitro evaluation of electrospun gelatin-bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 2588–2599. doi:10.1002/app.37946.
- [63] G. Poologasundarampillai, D. Wang, S. Li, J. Nakamura, R. Bradley, P.D. Lee, M.M. Stevens, D.S. McPhail, T. Kasuga, J.R. Jones, Cotton-wool-like bioactive glasses for bone regeneration, *Acta Biomater.* 10 (2014) 3733–3746. doi:10.1016/j.actbio.2014.05.020.
- [64] I.A. Kim, S.H. Rhee, Effects of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) degradability on the

- apatite-forming capacity of electrospun PLGA/SiO<sub>2</sub>-CaO nonwoven composite fabrics, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 93 (2010) 218–226. doi:10.1002/jbm.b.31578.
- [65] Y. Seol, K. Kim, I.A. Kim, S. Rhee, Osteoconductive and degradable electrospun nonwoven poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/CaO-SiO<sub>2</sub> gel composite fabric, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 94A (2010) 649–659. doi:10.1002/jbm.a.32738.
- [66] M. Shamsi, M. Karimi, M. Ghollasi, N. Nezafati, M. Shahrousvand, M. Kamali, A. Salimi, In vitro proliferation and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts on nanocomposite scaffolds based on bioactive glass (64SiO<sub>2</sub>-31CaO-5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)-poly-L-lactic acid nanofibers fabricated by electrospinning method, *Mater. Sci. Eng. C.* 78 (2017) 114–123. doi:10.1016/j.msec.2017.02.165.
- [67] X. Jia, T. Tang, D. Cheng, C. Zhang, R. Zhang, Q. Cai, X. Yang, Micro-structural evolution and biomineralization behavior of carbon nanofiber/bioactive glass composites induced by precursor aging time, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 136 (2015) 585–593. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.09.062.
- [68] X. Han, D. Wang, X. Chen, H. Lin, F. Qu, One-pot synthesis of macro-mesoporous bioactive glasses/polylactic acid for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C.* 43 (2014) 367–374. doi:10.1016/j.msec.2014.07.042.
- [69] Q. Yang, G. Sui, Y.Z. Shi, S. Duan, J.Q. Bao, Q. Cai, X.P. Yang, Osteocompatibility characterization of polyacrylonitrile carbon nanofibers containing bioactive glass nanoparticles, *Carbon N. Y.* 56 (2013) 288–295. doi:10.1016/j.carbon.2013.01.014.
- [70] J.J. Kim, G.Z. Jin, H.S. Yu, S.J. Choi, H.W. Kim, I.B. Wall, Providing osteogenesis conditions to mesenchymal stem cells using bioactive nanocomposite bone scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 2545–2551. doi:10.1016/j.msec.2012.07.038.
- [71] J. Xie, E.R. Blough, C.H. Wang, Submicron bioactive glass tubes for bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 8 (2012) 811–819. doi:10.1016/j.actbio.2011.09.009.
- [72] K.T. Noh, H.Y. Lee, U.S. Shin, H.W. Kim, Composite nanofiber of bioactive glass nanofiller incorporated poly(lactic acid) for bone regeneration, *Mater. Lett.* 64 (2010) 802–805. doi:10.1016/j.matlet.2010.01.014.
- [73] J.H. Jo, E.J. Lee, D.S. Shin, H.E. Kim, H.W. Kim, Y.H. Koh, J.H. Jang, In vitro/in vivo biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly( $\epsilon$ -caprolactone) composite materials, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 91 (2009) 213–220. doi:10.1002/jbm.b.31392.
- [74] F. Hsu, M. Lu, R. Weng, H. Lin, Hierarchically biomimetic scaffold of a collagen-mesoporous bioactive glass nanofiber composite for bone tissue engineering, *Biomed. Mater.* 10 (2015) 25007. doi:10.1088/1748-6041/10/2/025007.
- [75] X.R. Zhang, X.Q. Hu, X.L. Jia, L.K. Yang, Q.Y. Meng, Y.Y. Shi, Z.Z. Zhang, Q. Cai, Y.F. Ao, X.P. Yang, Cell studies of hybridized carbon nanofibers containing bioactive glass nanoparticles using bone mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14. doi:10.1038/srep38685.
- [76] F.Y. Hsu, R.C. Weng, H.M. Lin, Y.H. Lin, M.R. Lu, J.L. Yu, H.W. Hsu, A biomimetic extracellular matrix composed of mesoporous bioactive glass as a bone graft material, *Microporous Mesoporous Mater.* 212 (2015) 56–65. doi:10.1016/j.micromeso.2015.03.027.
- [77] C. Zhang, D. Cheng, T. Tang, X. Jia, Q. Cai, X. Yang, Nanoporous structured carbon nanofiber-bioactive glass composites for skeletal tissue regeneration, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 5300–5309. doi:10.1039/C5TB00921A.

- [78] B. Han, X. Zhang, H. Liu, X. Deng, Q. Cai, X. Jia, X. Yang, Y. Wei, G. Li, Improved bioactivity of PAN-based carbon nanofibers decorated with bioglass nanoparticles, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 25 (2014) 341–353. doi:10.1080/09205063.2013.861169.
- [79] B.Y. Hong, X. Chen, X. Jing, H. Fan, Z. Gu, Fabrication and drug delivery of ultrathin mesoporous bioactive glass hollow fibers, *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 1503–1510. doi:10.1002/adfm.200901627.
- [80] M. Shams, N. Nezafati, D. Poormoghadam, S. Zavareh, A. Zamanian, A. Salimi, Synthesis and characterization of electrospun bioactive glass nanofibers-reinforced calcium sulfate bone cement and its cell biological response, *Ceram. Int.* 46 (2020) 10029–10039. doi:10.1016/j.ceramint.2019.12.270.
- [81] Y. Li, B. Li, G. Xu, Z. Ahmad, Z. Ren, Y. Dong, X. Li, W. Weng, G. Han, A feasible approach toward bioactive glass nanofibers with tunable protein release kinetics for bone scaffolds, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 122 (2014) 785–791. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.08.022.
- [82] H.-W. Kim, J.H. Song, H.E. Kim, Bioactive glass nanofiber–collagen nanocomposite as a novel bone regeneration matrix, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 79 (2006) 698–705. doi:10.1002/jbm.a.30848.
- [83] H.W. Kim, H.H. Lee, G.S. Chun, Bioactivity and osteoblast responses of novel biomedical nanocomposites of bioactive glass nanofiber filled poly(lactic acid), *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 85 (2008) 651–663. doi:10.1002/jbm.a.31339.
- [84] H.H. Lee, H.S. Yu, J.H. Jang, H.W. Kim, Bioactivity improvement of poly( $\epsilon$ -caprolactone) membrane with the addition of nanofibrous bioactive glass, *Acta Biomater.* 4 (2008) 622–629. doi:10.1016/j.actbio.2007.10.013.
- [85] W. Xia, D. Zhang, J. Chang, Fabrication and in vitro biomineralization of bioactive glass (BG) nanofibres, *Nanotechnology.* 18 (2007) 135601. doi:10.1088/0957-4484/18/13/135601.
- [86] Z. Ghaffarian, A. Faghihimani, A. Doostmohammadi, M.R. Saeri, Fabrication, characterization and process parameters optimization of electrospun 58S bioactive glass submicron fibers, *Adv. Ceram. Prog.* 1 (2015) 16–21.
- [87] L. Wu, Y. Dou, K. Lin, W. Zhai, W. Cui, J. Chang, Hierarchically structured nanocrystalline hydroxyapatite assembled hollow fibers as a promising protein delivery system., *Chem. Commun. (Camb).* 47 (2011) 11674–6. doi:10.1039/c1cc14709a.
- [88] Y. Ding, W. Li, T. Müller, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, Q. Yao, J.A. Roether, Electrospun polyhydroxybutyrate/poly( $\epsilon$ -caprolactone)/58S sol-gel bioactive glass hybrid scaffolds with highly improved osteogenic potential for bone tissue engineering, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 17098–17108. doi:10.1021/acsami.6b03997.
- [89] B.A. Allo, A.S. Rizkalla, K. Mequanint, Synthesis and electrospinning of  $\epsilon$ -polycaprolactone-bioactive glass hybrid biomaterials via a sol-gel process, *Langmuir.* 26 (2010) 18340–18348. doi:10.1021/la102845k.
- [90] D. Cheng, R. Xie, T. Tang, X. Jia, Q. Cai, X. Yang, Regulating micro-structure and biomineralization of electrospun PVP-based hybridized carbon nanofibers containing bioglass nanoparticles via aging time, *RSC Adv.* 6 (2016) 3870–3881. doi:10.1039/C5RA23337B.
- [91] G. Toskas, C. Cherif, R.D. Hund, E. Laourine, A. Fahmi, B. Mahltig, Inorganic/organic (SiO<sub>2</sub>)/PEO hybrid electrospun nanofibers produced from a modified sol and their surface modification possibilities, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2011) 3673–3681. doi:10.1021/am200858s.

- [92] J. Christakiran M, P.J.T. Reardon, R. Konwarh, J.C. Knowles, B.B. Mandal, Mimicking hierarchical complexity of the osteochondral interface using electrospun silk-bioactive glass composites, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 8000–8013. doi:10.1021/acsami.6b16590.
- [93] K.S. Hong, E.C. Kim, S.H. Bang, C.H. Chung, Y. Il Lee, J.K. Hyun, H.H. Lee, J.H. Jang, T. Il Kim, H.W. Kim, Bone regeneration by bioactive hybrid membrane containing FGF2 within rat calvarium, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 94 (2010) 1187–1194. doi:10.1002/jbm.a.32799.
- [94] K. Geltmeyer, Jozefien; Van der Schueren, Lien; Goethals, Frederik; De Clerck, Optimum sol viscosity for stable electrospinning of silica nanofibres, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 67 (2013) 188–195.
- [95] S. Sakai, T. Yamaguchi, R.A. Putra, R. Watanabe, M. Kawabe, M. Taya, K. Kawakami, Controlling apatite microparticles formation by calcining electrospun sol-gel derived ultrafine silica fibers, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 61 (2012) 374–380. doi:10.1007/s10971-011-2637-y.
- [96] T. Yamaguchi, S. Sakai, R. Watanabe, T. Tarao, K. Kawakami, Heat treatment of electrospun silicate fiber substrates enhances cellular adhesion and proliferation, *J. Biosci. Bioeng.* 109 (2010) 304–306. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.08.482.
- [97] M. Hwang, Y.-K. Lee, B.-S. Lim, S.-H. Rhee, Osteoblast-like cell behaviors on non-woven silica fabric, *Key Eng. Mater.* 309–311 (2006) 469–472. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.309-311.469.
- [98] Y.M. Kang, K.H. Kim, Y.J. Seol, S.H. Rhee, Evaluations of osteogenic and osteoconductive properties of a non-woven silica gel fabric made by the electrospinning method, *Acta Biomater.* 5 (2009) 462–469. doi:10.1016/j.actbio.2008.07.004.
- [99] S.-H. Rhee, Y.-K. Lee, B.-S. Lim, Bioactive non-woven silica fabric made through electrospinning method, *Key Eng. Mater.* 309–311 (2006) 465–468. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.309-311.465.
- [100] J.H. Yu, S. V. Fridrikh, G.C. Rutledge, The role of elasticity in the formation of electrospun fibers, *Polymer (Guildf)*. 47 (2006) 4789–4797. doi:10.1016/j.polymer.2006.04.050.
- [101] B. Song, L. Wu, C. Wu, J. Chang, Preparation of hollow bioactive glass nanofibers by a facile electrospinning method, *Biomed. Glas.* 1 (2015) 136–139. doi:10.1515/bglass-2015-0013.
- [102] X.H. Li, C.L. Shao, Y.C. Liu, A simple method for controllable preparation of polymer nanotubes via a single capillary electrospinning, *Langmuir*. 23 (2007) 10920–10923. doi:10.1021/la701806f.
- [103] W. Wang, J. Zhou, S. Zhang, J. Song, H. Duan, M. Zhou, C. Gong, Z. Bao, B. Lu, X. Li, W. Lan, E. Xie, A novel method to fabricate silica nanotubes based on phase separation effect, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 9068–9072. doi:10.1039/c0jm02120b.
- [104] R. Ravichandran, D. Sundaramurthi, S. Gandhi, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, Bioinspired hybrid mesoporous silica-gelatin sandwich construct for bone tissue engineering, *Microporous Mesoporous Mater.* 187 (2014) 53–62. doi:10.1016/j.micromeso.2013.12.018.
- [105] Z. Du, L. Guo, T. Zheng, Q. Cai, X. Yang, Formation of core-shell structured calcium silicate fiber via sol-gel electrospinning and controlled calcination, *Ceram. Int.* 45 (2019) 23975–23983. doi:10.1016/j.ceramint.2019.08.099.
- [106] Y. Ding, W. Li, A. Correia, Y. Yang, K. Zheng, D. Liu, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, H.A. Santos, J.A. Roether, Electrospun polyhydroxybutyrate/poly( $\epsilon$ -caprolactone)/sol-gel-

- derived silica hybrid scaffolds with drug releasing function for bone tissue engineering applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 14540–14548. doi:10.1021/acsami.8b02656.
- [107] K.-H. Shin, Y.-H. Koh, H.-E. Kim, Synthesis and characterization of drug-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone)/silica hybrid nanofibrous scaffolds, *J. Nanomater.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/351810.
- [108] B.Y. Hong, X. Chen, X. Jing, H. Fan, B. Guo, Z. Gu, X. Zhang, Preparation, bioactivity, and drug release of hierarchical nanoporous bioactive glass ultrathin fibers, *Adv. Mater.* 22 (2010) 754–758. doi:10.1002/adma.200901656.
- [109] S. Huang, X. Kang, Z. Cheng, Y. Jia, J. Lin, Electrospinning preparation and drug delivery properties of Eu<sup>3+</sup>/Tb<sup>3+</sup> doped mesoporous bioactive glass nanofibers, *J. Colloid Interface Sci.* 387 (2012) 285–291. doi:10.1016/j.jcis.2012.08.004.
- [110] F. Baino, S. Hamzehlou, S. Kargozar, Bioactive glasses: where are we and where are we going?, *J. Funct. Biomater.* 9 (2018). doi:10.3390/jfb9010025.
- [111] J.R. Jones, D.S. Brauer, D.C. Greenspan, S. Consulting, B. Court, S. Augustine, Bioglass and bioactive glasses and their impact on healthcare, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 7 (2016) 423–434. doi:10.1111/ijag.12252.
- [112] A.M. Deliormanli, Preparation and in vitro characterization of electrospun 45S5 bioactive glass nanofibers, *Ceram. Int.* 41 (2014) 417–425. doi:10.1016/j.ceramint.2014.08.086.
- [113] D. Durgalakshmi, S. Balakumar, Phase separation induced shell thickness variations in electrospun hollow Bioglass 45S5 fiber mats for drug delivery applications, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 15316–15323. doi:10.1039/C5CP01738F.
- [114] E. Sharifi, M. Azami, A.M. Kajbafzadeh, F. Moztarzadeh, R. Faridi-Majidi, A. Shamousi, R. Karimi, J. Ai, Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*. 59 (2016) 533–541. doi:10.1016/j.msec.2015.09.037.
- [115] E. Sharifi, S. Ebrahimi-Barough, M. Panahi, M. Azami, A. Ai, Z. Barabadi, A.M. Kajbafzadeh, J. Ai, In vitro evaluation of human endometrial stem cell-derived osteoblast-like cells' behavior on gelatin/collagen/bioglass nanofibers' scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 104 (2016) 2210–2219. doi:10.1002/jbm.a.35748.
- [116] A.M. Deliormanli, Preparation, in vitro mineralization and osteoblast cell response of electrospun 13-93 bioactive glass nanofibers, *Mater. Sci. Eng. C*. 53 (2015) 262–271. doi:10.1016/j.msec.2015.04.037.
- [117] R. Konyalı, A.M. Deliormanli, Preparation and mineralization of 13-93 bioactive glass-containing electrospun poly-epsilon-caprolactone composite nanofibrous mats, *J. Thermoplast. Compos. Mater.* (2019). doi:10.1177/0892705718772889.
- [118] C. Gao, Q. Gao, X. Bao, Y. Li, A. Teramoto, K. Abe, Preparation and in vitro bioactivity of novel mesoporous borosilicate bioactive glass nanofibers, *J. Am. Ceram. Soc.* 94 (2011) 2841–2845. doi:10.1111/j.1551-2916.2011.04434.x.
- [119] A.M. Deliormanli, Electrospun cerium and gallium-containing silicate based 13-93 bioactive glass fibers for biomedical applications, *Ceram. Int.* 42 (2016) 897–906. doi:10.1016/j.ceramint.2015.09.016.
- [120] H. He, J. Wang, Q. Gao, M. Chang, Z. Ren, X. Zhang, X. Li, W. Weng, G. Han, Ag-silica composite nanotube with controlled wall structures for biomedical applications, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 111 (2013) 693–698. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.015.
- [121] R.L. Reis, S. Weiner, Learning from nature how to design new implantable biomaterials: from biomineralization fundamentals to biomimetic materials and processing routes,

- Dordrecht Kluwer Academic Publishers - NATO science series, 2005.  
<https://books.google.com/books?id=dfI-AAAAQBAJ&pgis=1>.
- [122] J. Lu, H. Yu, C. Chen, Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review, *RSC Adv.* 8 (2018) 2015–2033. doi:10.1039/C7RA11278E.
- [123] C. Combes, C. Rey, *Biomatériaux à base de phosphates de calcium*, Tech. l'ingénieur. (2013).
- [124] P. Ducheyne, Q. Qiu, Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function, *Biomaterials.* 20 (1999) 2287–2303.
- [125] K. de Groot, Calcium phosphate ceramics: their current status, in: J. Boretos, M. Eden (Eds.), *Contemp. Biomater.*, Noves Publications, 1984: pp. 477–492.
- [126] G. Daculsi, Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute, *Biomaterials.* 19 (1998) 1473–1478.
- [127] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications, *Materials (Basel).* 10 (2017) 334.
- [128] J.C. Elliott, *Studies in Inorganic Chemistry, Volume 18*, Elsevier science, Amsterdam, The Netherlands, 1994.
- [129] V.E. Bel'skii, Kinetics of the hydrolysis of phosphate esters, *Russ. Chem. Rev.* 46 (1977) 828.
- [130] Y. Wu, L.L. Hench, J. Du, K.-L. Choy, J. Guo, Preparation of hydroxyapatite fibers by electrospinning technique, *J. Am. Ceram. Soc.* 87 (2005) 1988–1991. doi:10.1111/j.1151-2916.2004.tb06351.x.
- [131] Z. Hou, P. Yang, H. Lian, L. Wang, C. Zhang, C. Li, R. Chai, Z. Cheng, J. Lin, Multifunctional hydroxyapatite nanofibers and microbelts as drug carriers, *Chem. A Eur. J.* 15 (2009) 6973–6982. doi:10.1002/chem.200900269.
- [132] H. Liu, Q. Cai, P. Lian, Z. Fang, S. Duan, The biological properties of carbon nanofibers decorated with  $\beta$ -tricalcium phosphate nanoparticles, *Carbon N. Y.* 48 (2010) 2266–2272. doi:10.1016/j.carbon.2010.02.042.
- [133] R. Faridi-Majidi, N. Nezafati, M. Pazouki, S. Hesaraki, The effect of synthesis parameters on morphology and diameter of electrospun hydroxyapatite nanofibers, *J. Aust. Ceram. Soc.* 53 (2017) 225–233. doi:10.1007/s41779-017-0028-8.
- [134] C. Zhang, H. Li, Z. Guo, B. Xue, C. Zhou, Fabrication of hydroxyapatite nanofiber via electrospinning as a carrier for protein, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 17 (2017) 1018–1024. doi:10.1166/jnn.2017.12620.
- [135] T.R. Tadjiev, S. Chun, H. Kim, I. Kang, S. Kim, Preparation and characterization of calcium metaphosphate nanofibers via electrospinning, *Key Eng. Mater.* 330–332 (2007) 207–210. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.330-332.207.
- [136] T.R. Tadjiev, S. Chun, H. Kim, I.K. Kang, S. Kim, Preparation and characterization of beta-tricalcium phosphate nanofibers via electrospinning, *ASBM7 Adv. Biomater. VII.* 342–343 (2007) 817–820. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.330-332.207.
- [137] F.H. Westheimer, S. Huang, F. Covitz, Rates and mechanisms of hydrolysis of esters of phosphorus acid, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 181–185. doi:10.1021/ja00209a029.
- [138] J. Livage, P. Barboux, M.T. Vandenborre, C. Schmutz, F. Taulelle, Sol-gel synthesis of phosphates, *J. Non. Cryst. Solids.* 147&148 (1992) 18–23.
- [139] X. Song, F. Ling, H. Li, Z. Gao, X. Chen, Tuned morphological electrospun hydroxyapatite

- nanofibers via pH, *J. Bionic Eng.* 9 (2012) 478–483. doi:10.1016/S1672-6529(11)60143-1.
- [140] K. Starbova, E. Krumov, D. Karashanova, N. Starbov, Polyoxyethylene assisted electrospinning of nanofibers from calcium phosphate sol solution, *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 11 (2009) 1319–1322.
- [141] Y. Ding, X. Yuan, J. Zhao, W. Guo, X. Wang, Formation of ultrafine apatite fibers by sol-gel/electrospinning, *Chem. Res. Chinese. U.* 23 (2007) 366–369. doi:10.1016/j.1andurbplan.2006.10.012.
- [142] A.H. Touny, S.B. Bhaduri, A reactive electrospinning approach for nanoporous PLA/monetite nanocomposite fibers, *Mater. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 1304–1312. doi:10.1016/j.msec.2010.07.015.
- [143] G. Cadafalch Gazquez, H. Chen, L. Moroni, B.A. Boukamp, J.E. ten Elshof,  $\beta$ -Tricalcium phosphate nanofiber scaffolds with fine unidirectional grains, *Mater. Lett.* 208 (2017) 118–121. doi:10.1016/j.matlet.2017.05.038.
- [144] T. Chae, H. Yang, F. Ko, T. Troczynski, Bio-inspired dicalcium phosphate anhydrate/poly(lactic acid) nanocomposite fibrous scaffolds for hard tissue regeneration: In situ synthesis and electrospinning, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 102 (2014) 514–522. doi:10.1002/jbm.a.34715.
- [145] P.Q. Franco, C.F.C. João, J.C. Silva, J.P. Borges, Electrospun hydroxyapatite fibers from a simple sol-gel system, *Mater. Lett.* 67 (2012) 233–236. doi:10.1016/j.matlet.2011.09.090.
- [146] Z. Yuanyuan, L. Yike, L. Qian, L. Zhongjun, Size control of electrospun hydroxyapatite nanofibers by sol-gel system, *J. Nanomater.* 13 (2013) 6581–6587. doi:10.1166/jnn.2013.7738.
- [147] D. Liu, T. Troczynski, D. Hakimi, Effect of hydrolysis on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite and its application to bioactive coatings, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 13 (2002) 657–665.
- [148] X. Dai, S. Shivkumar, Electrospinning of hydroxyapatite fibrous mats, *Mater. Lett.* 61 (2007) 2735–2738. doi:10.1016/j.matlet.2006.07.195.
- [149] M. Streckova, T. Sopcak, R. Stulajterova, M. Giretova, L. Medvecky, A. Kovalcikova, Needleless electrospinning employed for calcium and magnesium phosphate coatings on titanium substrates, *Surf. Coat. Technol.* 340 (2018) 177–189. doi:10.1016/j.surfcoat.2018.02.063.
- [150] J.H. Lee, Y.J. Kim, Hydroxyapatite nanofibers fabricated through electrospinning and sol-gel process, *Ceram. Int.* 40 (2014) 3361–3369. doi:10.1016/j.ceramint.2013.09.096.
- [151] H.W. Kim, H.E. Kim, Nanofiber generation of hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite bioceramics, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 77 (2006) 323–328. doi:10.1002/jbm.b.30376.
- [152] A. Beganskien, O. Dudko, R. Sirutkaitis, R. Giraitis, Water based sol-gel synthesis of hydroxyapatite, *Mater. Sci.* 9 (2003) 383–386.
- [153] D. Liu, T. Troczynski, W.J. Tseng, Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development, *Biomaterials.* 22 (2001) 1721–1730.
- [154] X. Dai, S. Shivkumar, Electrospinning of PVA-calcium phosphate sol precursors for the production of fibrous hydroxyapatite, *J. Am. Ceram. Soc.* 90 (2007) 1412–1419. doi:10.1111/j.1551-2916.2007.01569.x.
- [155] T. Sebastian, T.R. Preisker, L. Gorjan, T. Graule, C.G. Aneziris, F.J. Clemens, Synthesis of hydroxyapatite fibers using electrospinning: A study of phase evolution based on polymer

- matrix, J. Eur. Ceram. Soc. 40 (2020) 2489–2496. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2020.01.070.
- [156] L.-L. Tseng, C.-M. Ho, W.-Z. Liang, Y.-D. Hsieh, C.-R. Jan, Comparison of efficacies of different bone substitutes adhered to osteoblasts with and without extracellular matrix proteins, J. Dent. Sci. 8 (2013) 399–404.
- [157] M. Bohner, B.L.G. Santoni, N. Döbelin,  $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: synthesis and properties, Acta Biomater. (2020). doi:10.1016/j.actbio.2020.06.022.
- [158] E. Champion, Sintering of calcium phosphate bioceramics, Acta Biomater. 9 (2013) 5855–5875.
- [159] F. Tamimi, J. Torres, C. Kathan, R. Baca, C. Clement, L. Blanco, E. Lopez Cabarcos, Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules, J. Biomater. Res. Part A. 87 (2008) 980–985. doi:0.1002/jbm.a.31842.
- [160] D.P. Bhattarai, L.E. Aguilar, C.H. Park, C.S. Kim, A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering, Membranes (Basel). 8 (2018). doi:10.3390/membranes8030062.
- [161] K. Whang, D.R. Elenz, E.K. Nam, D.C. Tsai, C.H. Thomas, G.W. Nuber, F.H. Glorieux, R. Travers, S.M. Sprague, K.E. Healy, Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture, Tissue Eng. 5 (1999) 35–51. doi:10.1089/ten.1999.5.35.
- [162] J.R. Porter, T.T. Ruckh, K.C. Popat, Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies, Biotechnol. Prog. 25 (2009) 1539–1560. doi:10.1002/btpr.246.
- [163] J. Soulié, Synthèse par voie sol-gel et réactivité in vitro de verres bioactifs dopés, mésostructurés et macrostructurés. Caractérisation par micro-faisceaux d'ions, Université Clermont II - Blaise Pascal, 2011.
- [164] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, Acta Biomater. 9 (2013) 8037–8045. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.014.
- [165] S. Chahal, A. Kumar, F.S.J. Hussian, Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. A review, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 30 (2019) 1308–1355. doi:10.1080/09205063.2019.1630699.
- [166] P. Chocholata, V. Kulda, V. Babuska, Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration, Materials (Basel). 12 (2019). doi:10.3390/ma12040568.
- [167] G. Chiara, F. Letizia, F. Lorenzo, S. Edoardo, S. Diego, S. Stefano, B. Eriberto, Z. Barbara, Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction, Int. J. Mol. Sci. 13 (2012) 737–757. doi:10.3390/ijms13010737.
- [168] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, Mater. Sci. Eng. C. 78 (2017) 1246–1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [169] A. Wubneh, E.K. Tsekoura, C. Ayranci, H. Uludağ, Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering, Acta Biomater. 80 (2018). doi:10.1016/j.actbio.2018.09.031.
- [170] L. Bourdon, J. Maurin, K. Gritsch, A. Brioude, V. Salles, Improvements in resolution of additive manufacturing: advances in two-photon polymerization and direct-writing electrospinning techniques, ACS Biomater. Sci. Eng. 4 (2018) 3927–3938. doi:10.1021/acsbomaterials.8b00810.



- [171] F. Donnalaja, E. Jacchetti, M. Soncini, M.T. Raimondi, Natural and synthetic polymers for bone scaffolds optimization, *Polymers (Basel)*. 12 (2020). doi:10.3390/POLYM12040905.
- [172] Q. Chen, C. Zhu, G.A. Thouas, Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites, *Prog. Biomater.* 1 (2012). doi:10.1186/2194-0517-1-2.
- [173] M.I. Sabir, X. Xu, L. Li, A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 5713–5724. doi:10.1007/s10853-009-3770-7.
- [174] A. El-Ghannam, Bone reconstruction: From bioceramics to tissue engineering, *Expert Rev. Med. Devices.* 2 (2005) 87–101. doi:10.1586/17434440.2.1.87.
- [175] L. Lefebvre, Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 2007.
- [176] G. Socrates, Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts, Third edit, John Wiley & Sons, 2001. doi:10.1002/jrs.1238.
- [177] F. Rubio, J. Rubio, J.L. Oteo, A FT-IR study of the hydrolysis of tetraethylorthosilicate (TEOS), *Spectrosc. Lett.* 31 (1998) 199–219. doi:10.1080/00387019808006772.
- [178] M. Krbal, H. Sopha, D. Pohl, L. Benes, C. Damm, B. Rellinghaus, J. Kupčík, P. Bezdička, J. Šubrt, J.M. Macak, Self-organized TiO<sub>2</sub> nanotubes grown on Ti substrates with different crystallographic preferential orientations: Local structure of TiO<sub>2</sub> nanotubes vs. photo-electrochemical response, *Electrochim. Acta.* 264 (2018) 393–399. doi:10.1016/j.electacta.2018.01.113.
- [179] P. Xu, A.S. Mujumdar, B. Yu, Drying-induced cracks in thin film fabricated from colloidal dispersions, *Dry. Technol.* 27 (2009) 636–652. doi:10.1080/07373930902820804.
- [180] F. Boulogne, F. Giorgiutti-Dauphiné, L. Pauchard, How to Reduce the Crack Density in Drying Colloidal Material?, *Oil Gas Sci. Technol.* 69 (2014) 397–404. doi:10.2516/ogst/2013119.
- [181] S. Lin, C. Ionescu, K.J. Pike, M.E. Smith, J.R. Jones, Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 1276–1282. doi:10.1039/b814292k.
- [182] E.M. Valliant, C.A. Turdean-Ionescu, J. V. Hanna, M.E. Smith, J.R. Jones, Role of pH and temperature on silica network formation and calcium incorporation into sol-gel derived bioactive glasses, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 1613–1619. doi:10.1039/c1jm13225c.
- [183] B. Yu, C.A. Turdean-Ionescu, R.A. Martin, R.J. Newport, J. V. Hanna, M.E. Smith, J.R. Jones, Effect of calcium source on structure and properties of sol-gel derived bioactive glasses, *Langmuir.* 28 (2012) 17465–17476. doi:10.1021/la303768b.
- [184] L.M. Muresan, Corrosion Protective Coatings for Ti and Ti Alloys Used for Biomedical Implants, in: *Intell. Coatings Corros. Control*, Elsevier Inc., 2015: pp. 585–602. doi:10.1016/B978-0-12-411467-8.00017-9.
- [185] R. Catteaux, Étude de bioverres sol-gel à base de SiO<sub>2</sub>, CaO, Na<sub>2</sub>O, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et dopés à l'argent, Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis, 2015.
- [186] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 693–698. doi:10.1002/jbm.820280606.
- [187] D. Fernando, N. Attik, M. Cresswell, I. Mokbel, N. Pradelle-Plasse, P. Jackson, B. Grosgeat, P. Colon, Influence of network modifiers in an acetate based sol-gel bioactive glass

- system, *Microporous Mesoporous Mater.* 257 (2018) 99–109. doi:10.1016/j.micromeso.2017.08.029.
- [188] D. Fernando, P. Colon, M. Cresswell, C. Journet, N. Pradelle-Plasse, P. Jackson, B. Grosogeat, N. Attik, The influence of precursor addition order on the porosity of sol-gel bioactive glasses, *Dent. Mater.* 34 (2018) 1323–1330. doi:10.1016/j.dental.2018.06.003.
- [189] A. Kumar, S. Murugavel, Influence of textural properties on biomineralization behavior of mesoporous bioactive glasses, *Biomed. Glas.* 1 (2015) 12–19. doi:10.1515/bglass-2015-0002.
- [190] E.C. Shors, E.W. White, G. Kopchok, I. International, S. Circle, Biocompatibility, osteoconduction and biodegradation of porous hydroxyapatite, tricalcium phosphate, sintered hydroxyapatite and calcium carbonate in rabbit bone defects, *Mater. Res. Soc.* 110 (1989) 211–217.
- [191] S. Biradar, P. Ravichandran, R. Gopikrishnan, V. Goornavar, J.C. Hall, V. Ramesh, S. Baluchamy, R.B. Jeffers, G.T. Ramesh, Calcium carbonate nanoparticles: Synthesis, characterization and biocompatibility, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11 (2011) 6868–6874. doi:10.1166/jnn.2011.4251.
- [192] Y. zhuo Huang, Y. rong Ji, Z. wen Kang, F. Li, S. fang Ge, D.P. Yang, J. Ruan, X. qun Fan, Integrating eggshell-derived CaCO<sub>3</sub>/MgO nanocomposites and chitosan into a biomimetic scaffold for bone regeneration, *Chem. Eng. J.* 395 (2020) 125098. doi:10.1016/j.cej.2020.125098.
- [193] H. Liao, H. Mutvei, M. Sjöström, L. Hammarström, J. Li, Tissue responses to natural aragonite (*Margaritifera* shell) implants in vivo, *Biomaterials.* 21 (2000) 457–468. doi:10.1016/S0142-9612(99)00184-2.
- [194] A. Piattelli, G. Podda, A. Scarano, Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate, *Biomaterials.* 18 (1997) 623–627. doi:10.1016/S0142-9612(96)00158-5.
- [195] R.G. Tilkin, J.G. Mahy, N. Régibeau, C. Grandfils, S.D. Lambert, Optimization of synthesis parameters for the production of biphasic calcium phosphate ceramics via wet precipitation and sol-gel process, *ChemistrySelect.* 4 (2019) 6634–6641. doi:10.1002/slct.201901175.
- [196] K.A. Hing, I.R. Gibson, P.A. Revell, S.M. Best, W. Bonfield, Influence of phase purity on the in vivo response to hydroxyapatite, *Key Eng. Mater.* 192–195 (2001) 373–376. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.192-195.373.
- [197] Z. Peng, L.X. Kong, A thermal degradation mechanism of polyvinyl alcohol/silica nanocomposites, *Polym. Degrad. Stab.* 92 (2007) 1061–1071. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.02.012.
- [198] Documentation technique L.Klein SA, TITAN Grade 23 TiAl6V4 ELI, 0041 (n.d.) 3–7. <http://www.kleinmetals.ch/shop/datenblatt/E/705.pdf>.
- [199] D. Levy, M. Zayat, eds., *The Sol-Gel Handbook*, John Wiley & Sons, 2015.
- [200] Dossier technique: le procédé sol-gel, RESCOLL, Cent. Technol. (n.d.). <http://rescoll.fr/blog/wp-content/uploads/2009/04/dossier-technique-sol-gel-blog-rescoll1.pdf> <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2017.11.048>.
- [201] E.J.A. Pope, J.D. Mackenzie, Sol-gel processing of silica, II. The role of the catalyst, *J. Non. Cryst. Solids.* 87 (1986) 185–198. doi:10.1016/S0022-3093(86)80078-3.
- [202] Cahier technologique sol-gel, n.d.
- [203] B. Karmakar, G. De, D. Kundu, D. Ganguli, Silica microspheres from the system tetraethyl

- orthosilicate-acetic acid-water, *J. Non. Cryst. Solids.* 135 (1991) 29–36. doi:10.1016/0022-3093(91)90439-D.
- [204] S. Brinker, G. Scherer, *Sol-gel science, The physics and chemistry of sol-gel processing*, Academic Press Limited, 1990.
- [205] H. Henstock, Calcium acetate gels, *Trans. Faraday Soc.* 29 (1933) 1101–1107. doi:10.1039/tf9332901101.
- [206] C. Fernandez-Lorenzo, L. Esquivias, P. Bardoux, J. Maquet, F. Taulelle, Sol-gel synthesis of SiO<sub>2</sub>-P2O<sub>5</sub> glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 176 (1994) 189–199.
- [207] S.-P. Szu, L.C. Klein, M. Greenblatt, Effect of precursors on the structure of phosphosilicate gels : <sup>29</sup>Si and <sup>31</sup>P MAS-NMR study, *J. Non. Cryst. Solids.* 143 (1992) 21–30.
- [208] B.G. Janesko, H.C. Fisher, M.J. Bridle, J.L. Montchamp, P(=O)H to P-OH tautomerism: A theoretical and experimental study, *J. Org. Chem.* 80 (2015) 10025–10032. doi:10.1021/acs.joc.5b01618.
- [209] S.K. McIntyre, T.M. Alam, <sup>17</sup>O NMR investigation of phosphite hydrolysis mechanisms, *Magn. Reson. Chem.* 45 (2007) 1022–1026. doi:10.1002/mrc.
- [210] L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin, Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments, *Acta Mater.* 55 (2007) 3305–3313. doi:10.1016/j.actamat.2007.01.029.
- [211] A. El-Ghannam, E. Hamazawy, A. Yehia, Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behavior  $\zeta$  potential, and protein adsorption, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 387–395. doi:10.1002/1097-4636(20010605)55:3<387::AID-JBM1027>3.0.CO;2-V.
- [212] H.A. ElBatal, M.A. Azooz, E.M.A. Khalil, A. Soltan Monem, Y.M. Hamdy, Characterization of some bioglass-ceramics, *Mater. Chem. Phys.* 80 (2003) 599–609. doi:10.1016/S0254-0584(03)00082-8.
- [213] O.P. Filho, G.P. LaTorre, L.L. Hench, Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5, *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 509–514. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199604)30:4<509::AID-JBM9>3.0.CO;2-T.
- [214] D.C. Clupper, L.L. Hench, Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5, *J. Non. Cryst. Solids.* 318 (2002) 43–48. doi:10.1016/S0022-3093(02)01857-4.
- [215] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini, 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 2414–2425. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.11.025.
- [216] E. Coon, A.M. Whittier, B.M. Abel, E.L. Stapleton, R. Miller, Q. Fu, Viscosity and crystallization of bioactive glasses from 45S5 to 13-93, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* (2020) 1–13. doi:10.1111/ijag.15837.
- [217] O. Bretcanu, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos, R. Conradt, I. Thompson, A.R. Boccaccini, Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass® powder, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 3299–3306. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2009.06.035.
- [218] S. Kashyap, K. Griep, J.A. Nychka, Crystallization kinetics, mineralization and crack propagation in partially crystallized bioactive glass 45S5, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 762–769. doi:10.1016/j.msec.2010.06.019.
- [219] A.R. Boccaccini, Q. Chen, L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass®-derived glass-ceramics, *Faraday Discuss.* 136 (2007) 27–44. doi:10.1039/b616539g.
- [220] L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, R. Zenati, D. Bernache-Assolant, Sintering

- behaviour of 45S5 bioactive glass, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1894–1903. doi:10.1016/j.actbio.2008.05.019.
- [221] 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.* 2 (1971) 117–141. doi:10.1002/jbm.820050611.
- [222] D. Bellucci, V. Cannillo, A. Sola, An overview of the effects of thermal processing on bioactive glasses, *Sci. Sinter.* 42 (2010) 307–320. doi:10.2298/SOS1003307B.
- [223] K. Ito, H.J. Bernstein, The vibrational spectra of the formate, acetate, and oxalate ions, *Can. J. Chem.* 34 (1956) 170–178. doi:10.1139/v56-021.
- [224] A. Musumeci, R. Frost, E. Waclawik, A spectroscopic study of the mineral paceite (calcium acetate), *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 67 (2007) 649–661. doi:10.1016/s0190-9622(07)01588-5.
- [225] K.J.D. MacKenzie, M.E. Smith, eds., Chapter 4. <sup>29</sup>Si NMR, in: *Multinucl. Solid-State NMR Inorg. Mater.*, 2002: pp. 201–268. doi:10.1016/s1470-1804(02)80005-0.
- [226] Z. Lin, J.R. Jones, J. V. Hanna, M.E. Smith, A multinuclear solid state NMR spectroscopic study of the structural evolution of disordered calcium silicate sol-gel biomaterials, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 2540–2549. doi:10.1039/c4cp04492d.
- [227] A. Pedone, T. Charpentier, G. Malavasi, M.C. Menziani, New insights into the atomic structure of 45S5 bioglass by means of solid-state NMR spectroscopy and accurate first-principles simulations, *Chem. Mater.* 22 (2010) 5644–5652. doi:10.1021/cm102089c.
- [228] R. Mathew, B. Stevansson, A. Tilocca, M. Edén, Toward a rational design of bioactive glasses with optimal structural features: Composition-structure correlations unveiled by solid-state NMR and MD simulations, *J. Phys. Chem. B.* 118 (2014) 833–844. doi:10.1021/jp409652k.
- [229] V. FitzGerald, D.M. Pickup, D. Greenspan, G. Sarkar, J.J. Fitzgerald, K.M. Wetherall, R.M. Moss, J.R. Jones, R.J. Newport, A neutron and X-ray diffraction study of bioglass® with reverse Monte Carlo modelling, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 3746–3753. doi:10.1002/adfm.200700433.
- [230] M.S. Araujo, A.C. Silva, J.F. Bartolomé, S. Mello-Castanho, Structural and thermal behavior of 45S5 Bioglass®-based compositions containing alumina and strontium, *J. Am. Ceram. Soc.* 103 (2020) 3620–3630. doi:10.1111/jace.17061.
- [231] M.H. Kudzin, R. Zylla, Z. Mrozinska, P. Urbaniak, <sup>31</sup>P NMR investigations on roundup degradation by AOP procedures, *Water.* 11 (2019). doi:10.3390/w11020331.
- [232] R. Mathew, B. Stevansson, M. Edén, Na/Ca intermixing around silicate and phosphate groups in bioactive phosphosilicate glasses revealed by heteronuclear solid-state NMR and molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 5701–5715. doi:10.1021/acs.jpcc.5b01130.
- [233] R. Mathew, C. Turdean-Ionescu, B. Stevansson, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, Direct probing of the phosphate-ion distribution in bioactive silicate glasses by solid-state NMR: Evidence for transitions between random/clustered scenarios, *Chem. Mater.* 25 (2013) 1877–1885. doi:10.1021/cm400487a.
- [234] K.J.D. MacKenzie, M.E. Smith, eds., Chapter 7. NMR of other commonly studied nuclei, in: *Multinucl. Solid-State NMR Inorg. Mater.*, 2002. doi:10.1016/S1470-1804(02)80008-6.
- [235] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear solid-state NMR studies of ordered mesoporous bioactive glasses, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 5552–5562. doi:10.1021/jp7107973.

- [236] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury*. 31 (2000) D37–D47. doi:10.1016/S0020-1383(00)80022-4.
- [237] W. Xue, X. Liu, X. Zheng, C. Ding, Effect of hydroxyapatite coating crystallinity on dissolution and osseointegration in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 74 (2005) 553–561. doi:10.1002/jbm.a.30323.
- [238] S. Diallo Garcia, Les hydroxyapatites, un système basique atypique modulable par la synthèse : vers l'identification des sites actifs, Université Pierre et Marie Curie, 2013.
- [239] E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri, Carbonated hydroxyapatite as bone substitute, *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 2931–2937. doi:10.1016/S0955-2219(03)00304-2.
- [240] A.M. Sofronia, R. Baies, E.M. Anghel, C.A. Marinescu, S. Tanasescu, Thermal and structural characterization of synthetic and natural nanocrystalline hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C*. 43 (2014) 153–163. doi:10.1016/j.msec.2014.07.023.
- [241] A. Krajewski, M. Mazzocchi, P.L. Buldini, A. Ravaglioli, A. Tinti, P. Taddei, C. Fagnano, Synthesis of carbonated hydroxyapatites: Efficiency of the substitution and critical evaluation of analytical methods, *J. Mol. Struct.* 744–747 (2005) 221–228. doi:10.1016/j.molstruc.2004.10.044.
- [242] M. Fini, R. Giardino, In vitro and in vivo tests for the biological evaluation of candidate orthopedic materials: benefits and limits, *J. Appl. Biomater. Biomech.* 1 (2003) 155–63. doi:10.1177/228080000300100301.
- [243] A.F. von Recum, ed., Handbook of biomaterials evaluation. Scientific, technical and clinical testing of implant materials, Macmillan, 1986.
- [244] K.M.R. Nuss, B. von Rechenberg, Biocompatibility issues with modern implants in none - A review for clinical orthopedics, *Open Orthop. J.* 2 (2008) 66–78. doi:10.2174/1874325000802010066.
- [245] Raven, Johnson, Mason, Losos, Singer, Biologie, 4ème édit, DeBoeck supérieur, 2019.
- [246] P. Marie, Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste, *Médecine/Sciences*. 17 (2001) 1252–1259.
- [247] E. Lelievre, J. Denoëud, J. Roques, E. Hamard-Péron, M. Airaud, Biologie, Fluoresc, 2018.
- [248] V. Pivodovaa, J. Frankovaa, J. Ulrichovaa, Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky*. 155 (2011) 109–116. doi:10.5507/bp.2011.021.
- [249] F.Y. Teng, C.L. Ko, H.N. Kuo, J.J. Hu, J.H. Lin, C.W. Lou, C.C. Hung, Y.L. Wang, C.Y. Cheng, W.C. Chen, A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012 (2012). doi:10.1155/2012/687291.
- [250] M.A. Listgarten, Soft and hard tissue response to endosseous dental implants, *Anat. Rec.* 245 (1996) 410–425. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<410::AID-AR20>3.0.CO;2-R.
- [251] S. Yajima-Himuro, M. Oshima, G. Yamamoto, M. Ogawa, M. Furuya, J. Tanaka, K. Nishii, K. Mishima, T. Tachikawa, T. Tsuji, M. Yamamoto, The junctional epithelium originates from the odontogenic epithelium of an erupted tooth, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–7. doi:10.1038/srep04867.
- [252] U. de M. Cours de la faculté d'odontologie, Histophysiologie du parodonte, n.d.
- [253] S. Staehlke, H. Rebl, B. Nebe, Phenotypic stability of the human MG-63 osteoblastic cell line at different passages, *Cell Biol. Int.* 43 (2019) 22–32. doi:10.1002/cbin.11073.

- [254] K. Anselme, A. Ponche, M. Bigerelle, Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 224 (2010) 1487–1507. doi:10.1243/09544119JEIM901.
- [255] K.S. Masters, K.S. Anseth, Cell-material interactions, *Adv. Chem. Eng.* 29 (2004) 7–46. doi:10.1016/S0065-2377(03)29002-5.
- [256] A.T. Michelot, *Dynamique des filaments d'actine: de la molécule individuelle à la formation de structures organisées*, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2007.
- [257] F. Fazan, P.M. Marquis, Dissolution behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 11 (2000) 787–792. doi:10.1023/A:1008901512273.
- [258] I.K. Lee, M.J. Lee, H.S. Jang, The interrelationship between human gingival fibroblast differentiation and cultivating time, *Tissue Eng. Regen. Med.* 10 (2013) 60–64. doi:10.1007/s13770-013-0371-y.
- [259] I. Nishimura, R. Hisanaga, T. Sato, T. Arano, S. Nomoto, Y. Ikada, M. Yoshinari, Effect of osteogenic differentiation medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional culture with radial flow bioreactor, *Regen. Ther.* 2 (2015) 24–31. doi:10.1016/j.reth.2015.09.001.
- [260] N.Z. Mostafa, H. Uludağ, M. Varkey, D.N. Dederich, M.R. Doschak, T.H. El-Bialy, In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration, *Open Dent. J.* 5 (2011) 139–145. doi:10.2174/1874210601105010139.
- [261] R. Monterubbianesi, M. Bencun, P. Pagella, A. Woloszyk, G. Orsini, T.A. Mitsiadis, A comparative in vitro study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts, *Sci. Rep.* 9 (2019). doi:10.1038/s41598-018-37981-x.
- [262] J.H. Shin, K.H. Kim, S.H. Kim, K.T. Koo, T. Il Kim, Y.J. Seol, Y. Ku, I.C. Rhyu, C.P. Chung, Y.M. Lee, Ex vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using gingival fibroblasts promotes bone regeneration in rats, *J. Clin. Periodontol.* 37 (2010) 305–311. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01522.x.
- [263] K. Yamamoto, T. Kishida, Y. Sato, K. Nishioka, A. Ejima, H. Fujiwara, T. Kubo, T. Yamamoto, N. Kanamura, O. Mazda, Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) 6152–6157. doi:10.1073/pnas.1420713112.
- [264] Y. Chang, B. Cho, S. Kim, J. Kim, Direct conversion of fibroblasts to osteoblasts as a novel strategy for bone regeneration in elderly individuals, *Exp. Mol. Med.* 51 (2019). doi:10.1038/s12276-019-0251-1.
- [265] Y. Cho, B. Kim, H. Bae, W. Kim, J. Baek, K. Woo, G. Lee, Y. Seol, Y. Lee, Y. Ku, I. Rhyu, H. Ryoo, Direct gingival fibroblast/osteoblast transdifferentiation via epigenetics, *J. Dent. Res.* 96 (2017) 555–561. doi:10.1177/0022034516686745.
- [266] Site web de la société Anthogyr, (n.d.). <https://www.anthogyr.fr/>.
- [267] L. Pieuchot, J. Marteau, A. Guignandon, T. Dos Santos, I. Brigaud, P.F. Chauvy, T. Cloatre, A. Ponche, T. Petithory, P. Rougerie, M. Vassaux, J.L. Milan, N. Tusamda Wakhloo, A. Spangenberg, M. Bigerelle, K. Anselme, Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes, *Nat. Commun.* 9 (2018). doi:10.1038/s41467-018-06494-6.
- [268] Y. Huang, N. Bu, Y. Duan, Y. Pan, H. Liu, Z. Yin, Y. Xiong, Electrohydrodynamic direct-writing, *Nanoscale.* 5 (2013) 12007–12017. doi:10.1039/c3nr04329k.
- [269] L. Yang, W. Yuan, J. Zhao, F. Ai, X. Chen, A novel approach to prepare uniaxially aligned nanofibers and longitudinally aligned seamless tubes through electrospinning, *Macromol.*

- Mater. Eng. 296 (2011). doi:10.1002/mame.201100195.
- [270] W.E. Teo, S. Ramakrishna, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology*. 17 (2006) R89–R106. doi:10.1088/0957-4484/17/14/R01.
- [271] T. Han, D.H. Reneker, A.L. Yarin, Buckling of jets in electrospinning, *Polymer (Guildf)*. 48 (2007) 6064–6076. doi:10.1016/j.polymer.2007.08.002.
- [272] L. Bourdon, Microstructures bioactives par électroimpression voie solvant pour la régénération tissulaire, Université Claude Bernard Lyon 1, 2019.
- [273] T.D. Brown, P.D. Dalton, D.W. Hutmacher, Direct writing by way of melt electrospinning, *Adv. Mater.* 23 (2011) 5651–5657. doi:10.1002/adma.201103482.
- [274] T.D. Brown, A. Slotosch, L. Thibaudeau, A. Taubenberger, D. Loessner, C. Vaquette, P.D. Dalton, D.W. Hutmacher, Design and fabrication of tubular scaffolds via direct writing in a melt electrospinning mode, *Biointerphases*. 7 (2012). doi:10.1007/s13758-011-0013-7.
- [275] J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Med. Eng. Phys.* 20 (1998) 92–102. doi:10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
- [276] H.N. Kim, A. Jiao, N.S. Hwang, M.S. Kim, D.H. Kang, D.H. Kim, K.Y. Suh, Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 536–558. doi:10.1016/j.addr.2012.07.014.
- [277] K.F. Eichholz, D.A. Hoey, Mediating human stem cell behaviour via defined fibrous architectures by melt electrospinning writing, *Acta Biomater.* 75 (2018) 140–151. doi:10.1016/j.actbio.2018.05.048.
- [278] H. Chen, A.D.B.F.B. Malheiro, C. Van Blitterswijk, C. Mota, P.A. Wieringa, L. Moroni, Direct writing electrospinning of scaffolds with multidimensional fiber architecture for hierarchical tissue engineering, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 38187–38200. doi:10.1021/acsami.7b07151.
- [279] R. Huang, X. Gao, J. Wang, H. Chen, C. Tong, Y. Tan, Z. Tan, Triple-layer vascular grafts fabricated by combined E-Jet 3D printing and electrospinning, *Ann. Biomed. Eng.* (2018). doi:10.1007/s10439-018-2065-z.
- [280] B.L. Farrugia, T.D. Brown, Z. Upton, D.W. Hutmacher, P.D. Dalton, T.R. Dargaville, Dermal fibroblast infiltration of poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds fabricated by melt electrospinning in a direct writing mode, *Biofabrication*. 5 (2013). doi:10.1088/1758-5082/5/2/025001.
- [281] F.L. He, D.W. Li, J. He, Y.Y. Liu, F. Ahmad, Y.L. Liu, X. Deng, Y.J. Ye, D.C. Yin, A novel layer-structured scaffold with large pore sizes suitable for 3D cell culture prepared by near-field electrospinning, *Mater. Sci. Eng. C*. 86 (2018) 18–27. doi:10.1016/j.msec.2017.12.016.
- [282] X. Qu, P. Xia, J. He, D. Li, Microscale electrohydrodynamic printing of biomimetic PCL/nHA composite scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Lett.* 185 (2016) 554–557. doi:10.1016/j.matlet.2016.09.035.
- [283] A. Abdal-hay, N. Abbasi, M. Gwiazda, S. Hamlet, S. Ivanovski, Novel polycaprolactone/hydroxyapatite nanocomposite fibrous scaffolds by direct melt-electrospinning writing, *Eur. Polym. J.* 105 (2018) 257–264. doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.05.034.
- [284] G. Hochleitner, M. Kessler, M. Schmitz, A.R. Boccaccini, J. Teßmar, J. Groll, Melt electrospinning writing of defined scaffolds using polylactide-poly(ethylene glycol) blends with 45S5 bioactive glass particles, *Mater. Lett.* 205 (2017) 257–260. doi:10.1016/j.matlet.2017.06.096.

- [285] K.A. Blackwood, N. Ristovski, S. Liao, N. Bock, J. Ren, G.T.S. Kirby, M.M. Stevens, R. Steck, M.A. Woodruff, Improving electrospun fibre stacking with direct writing for developing scaffolds for tissue engineering for non-load bearing bone, *IFMBE Proc.* 46 (2015) 125–128. doi:10.1007/978-3-319-11776-8.
- [286] T. Annable, R. Buscall, R. Ettelaie, D. Whittlestone, The rheology of solutions of associating polymers: Comparison of experimental behavior with transient network theory, *J. Rheol.* (N. Y. N. Y). 37 (1993) 695–726. doi:10.1122/1.550391.
- [287] M. Ortiz, D. De Kee, P.J. Carreau, Rheology of concentrated poly(ethylene oxide) solutions, *J. Rheol.* (N. Y. N. Y). 38 (1994) 519–539. doi:10.1122/1.550472.
- [288] S.M. Acuña, J.M. Bastías, P.G. Toledo, Direct measurement of interaction forces between bovine serum albumin and poly(ethylene oxide) in water and electrolyte solutions, *PLoS One.* 12 (2017) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0173910.
- [289] G. Daveau, T. Martire, J.J. Huselstein, P. Enrici, Applications des arcs électriques, *J3eA.* 7 (2008) 1010. doi:10.1051/j3ea:2008009.
- [290] N.U. Zitzmann, T. Berglundh, Definition and prevalence of peri-implant diseases, *J. Clin. Periodontol.* 35 (2008) 286–291. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x.
- [291] H.K. Raut, V.A. Ganesh, A.S. Nair, S. Ramakrishna, Anti-reflective coatings: A critical, in-depth review, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 3779–3804. doi:10.1039/c1ee01297e.
- [292] N. Rangavittal, A.R. Landa-Cánovas, J.M. González-Calbet, M. Vallet-Regí, Structural study and stability of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate: Two important bioceramics, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 660–668. doi:10.1002/1097-4636(20000915)51:4<660::AID-JBM14>3.0.CO;2-B.
- [293] S.N. Rampersad, Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors.* 12 (2012) 12347–12360. doi:10.3390/s120912347.
- [294] D. Loncle, Génie enzymatique, in: Doin (Ed.), 1992.
- [295] S.C. Tang, Ben Zhong, Alaa S. Abd-El-Aziz, *Electrospinning: Principles, Practice and Possibilities*, RSC Polymer Chemistry Series, 2015. , www.rsc.org.
- [296] C. V. Boys, On the production, properties, and some suggested uses of the finest threads, *Proc. Phys. Soc. London.* 9 (1887) 8–19. doi:10.1088/1478-7814/9/1/303.
- [297] J.F. Cooley, Improved methods of and apparatus for electrically separating the relatively volatile liquid component from the component of relatively fixed substances of composite fluids, 6385, 1900.
- [298] N. Tucker, J.J. Stanger, M.P. Staiger, H. Razzaq, K. Hofman, The history of the science and technology of electrospinning from 1600 to 1995, *J. Eng. Fiber. Fabr.* 7 (2012) 63–73. doi:10.1177/155892501200702s10.
- [299] G.E. Martin, I.D. Cockshott, F.J.T. Fildes, *Fibrillar lining for prosthetic device*, 1977.
- [300] G.I. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field, *Proc. R. Soc. London.* 280 (1964) 383–397. doi:10.1098/rspa.1964.0151.
- [301] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer (Guildf).* 40 (1999) 4585–4592. doi:10.1016/S0032-3861(99)00068-3.
- [302] J.Y. Zheng, M.F. Zhuang, Z.J. Yu, G.F. Zheng, Y. Zhao, H. Wang, D.H. Sun, The effect of surfactants on the diameter and morphology of electrospun ultrafine nanofiber, *J. Nanomater.* (2014). doi:10.1155/2014/689298.
- [303] Z. Liu, K. Ju, Z. Wang, W. Li, H. Ke, J. He, Electrospun jets number and nanofiber



- morphology effected by voltage value: numerical simulation and experimental verification, *Nanoscale Res. Lett.* 14 (2019). doi:10.1186/s11671-019-3148-y.
- [304] C.J. Buchko, L.C. Chen, Y. Shen, D.C. Martin, Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer (Guildf)*. 40 (1999) 7397–7407. doi:10.1016/S0032-3861(98)00866-0.
- [305] S. Zargham, S. Bazgir, A. Tavakoli, A.S. Rashidi, R. Damerchely, The effect of flow rate on morphology and deposition area of electrospun Nylon 6 nanofiber, *J. Eng. Fiber. Fabr.* 7 (2012) 42–49. doi:10.1177/155892501200700414.
- [306] E.D. Boland, G.E. Wnek, D.G. Simpson, K.J. Pawlowski, G.L. Bowlin, Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: A study of poly(glycolic acid) electrospinning, *J. Macromol. Sci. Part A*. A38 (2001) 1231–1243. doi:10.1081/MA-100108380.
- [307] L. Wannatong, A. Sirivat, P. Supaphol, Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene, *Polym. Int.* 53 (2004) 1851–1859. doi:10.1002/pi.1599.
- [308] D. Li, G. Ouyang, J.T. McCann, Y. Xia, Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes, *Nano Lett.* 5 (2005) 913–916. doi:10.1021/nl0504235.
- [309] S. Megelski, J.S. Stephens, D. Bruce Chase, J.F. Rabolt, Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules*. 35 (2002) 8456–8466. doi:10.1021/ma020444a.
- [310] F. Choueikani, Étude des potentialités de couches minces sol-gel dopées par des nanoparticules magnétiques pour la réalisation de composants magnéto-optiques intégrés, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, 2009.