



HAL
open science

Procédé innovant utilisant le CO₂ haute pression pour la modification et la fonctionnalisation de phosphates de calcium

Clémentine Aubry

► **To cite this version:**

Clémentine Aubry. Procédé innovant utilisant le CO₂ haute pression pour la modification et la fonctionnalisation de phosphates de calcium. Matériaux. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2019. Français. NNT : 2019INPT0134 . tel-04169843

HAL Id: tel-04169843

<https://theses.hal.science/tel-04169843>

Submitted on 24 Jul 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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Science et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par :

Mme CLEMENTINE AUBRY

le jeudi 12 décembre 2019

Titre :

Procédé innovant utilisant le CO₂ haute pression pour la modification et la fonctionnalisation de phosphates de calcium

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT)

Directeur(s) de Thèse :

MME SOPHIE CAZALBOU

MME SEVERINE CAMY

Rapporteurs :

M. JEAN-CHRISTOPHE HORNEZ, UNIVERSITE DE VALENCIENNES

M. PIERRE LAYROLLE, INSERM NANTES

Membre(s) du jury :

M. JACQUES FAGES, ECOLE NLE SUP DES MINES ALBI CARMAUX, Président

Mme FLORENCE BARRERE-DE GROOT, Kuros Biosciences BV, Membre

Mme SEVERINE CAMY, TOULOUSE INP, Membre

Mme SOPHIE CAZALBOU, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. STÉPHANE GONCALVES, SOCIETE TEKNIMED, Invité

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury ayant accepté d'évaluer mon travail et d'y avoir apporté leurs retours:

Pierre Layrolle, directeur de recherche 1ère classe Inserm, de l'Université de Nantes ;

Jean Christophe Bornez maître de conférences à l'Université Polytechnique des Hauts-de-France,

merci à vous deux d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et de m'avoir permis son amélioration grâce à vos remarques.

Jacques Fages, professeur à l'IMT des Mines Albi Carmaux, vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie.

Florence Barrère de Groot, cheffe de projet chez Kuros Bioscience dont les travaux m'ont inspiré tout au long de ce travail, merci pour vos retours sur le projet.

Stéphane Goncalves, chef R&D chez Teknimed, je vous remercie d'avoir rendu cette thèse possible.

Enfin, je remercie la région Occitanie pour le financement de ces travaux.

Je souhaite bien évidemment remercier mes directrices de thèse dont la patience et l'énergie m'ont permis de mener ce travail à bien.

Sophie, ton dynamisme et toutes les initiatives que tu m'as laissé prendre m'ont permis de grandir et de m'affirmer. J'ai beaucoup ri en te voyant fumer sur des places de parking cachées de tous, dans des boîtes à fumeurs intérieures comme extérieures. J'ai moins aimé découvrir le goût de l'oursin à 8h du matin même si ça m'a permis de te voir déguster des brochettes de moineaux. Des onsen japonais aux déménagements toulousains, je te remercie de ta présence, de la liberté que tu m'as laissée et de l'autonomie que tu m'as faite gagner.

Séverine, tu m'as parfois moins vu qu'initialement imaginé. Je te remercie pour la patience dont tu as fait preuve, ton enthousiasme, ton aide au travers notamment de ce marasme administratif qui, tu le sais, est pour moi un enfer. Merci également de ce dernier coup de pouce avant la soutenance qui m'a beaucoup aidé à tenir le coup jusqu'au bout. Ta bienveillance, ta rigueur et ton sourire ont été des éléments essentiels de ces trois ans.

Je n'ai pas eu ma représentation de flamenco et mon cœur se fend à cette idée mais j'ai été chanceuse de parcourir ce long chemin qu'est la thèse en votre compagnie. Je ne

saurais trop vous remercier notamment pour les corrections orthographiques de l'enfer de ces derniers mois.

En plus de mes deux directrices, j'ai eu la chance d'être accompagnée dans ce travail par deux équipes formidables.

Christophe, merci beaucoup pour ton aide en cette fin de thèse tout particulièrement et les partenariats, notamment avec Thierry A...ais qui nous ont permis d'aller plus loin dans la compréhension des phénomènes mis en jeu dans notre d.ude. Je te remercie également pour ta bonne humeur permanente, pour l'école d'd.é parisienne et l'orgie de bonbons ; pour ces deux voyages en Corée qui ont été extraordinaires : du séjour chez les moines aux barbecue presque végétariens. C'était génial de voir ton regard briller face aux sucreries à peu près autant que pour un résultat. encourageant ! :tvferei encore du temps que tu as passé pour m'aider dans les derniers moments de la rédaction.

Christèle, tu as su amener un nouveau regard sur mon travail ainsi qu'un soutien indéfectible cette dernière année, tes retours détaillés m'ont permis d'aller plus loin dans mon travail et d'approfondir mes connaissances, tout ça avec une énergie incroyable et un sourire toujours présent.

Jerémy, j'ai adoré partager ces moments à - 20°C en Corée, manger des choses étranges et observer bébé ours servir papa ours et se dire que décidément, les doctorants cc n'est plus cc que c'était ici! :\\forci aussi pour tes précieux conseils scientifiques, le calme dont tu fais preuve et que tu as su me transmettre... enfin un peu quoi !

Sandrine que dire ... Tu es la maman des doctorants pharma, sans toi nos thèses ne seraient pas possibles! Tu m'as sauvé la vie une demi-douzaine de fois, tu as été là pour tous les coups de blues et tu as su me donner les bons conseils qui ont permis de terminer cette thèse! Ton franc parlé, ta bonne humeur et les énormissimes boîtes de bonbons et gâteaux (merci les jumeaux) sont les indispensables de pharma, alors pour tout ça : merci.

Nlarie-Line, merci pour toutes ces pauses thé à papoter du Japon, les heures de ñMEI3 et les casses têtes ICP en ta compagnie. Tu m'as permis de sortir de ma grotte lors de mes journées de microscopie interminables, tu m'as accueillie toujours avec un immense sourire et une incroyable joie de vivre.

Merci aussi à Ghislaine. Tu as une écoute incroyable et tu prends sacrément soin de toute la petite bande de doctorants que nous sommes. Tu dégages une énergie folle et c'était génial de te poursuivre du bar basque à l'Entrepote, eu... non pardon. J\iti adoré te CROISER là-bas! J'en profite pour donner une mention spéciale pour le trio que tu as formé avec Christèle et Camille un bel exemple pour nous tous, mais ne le disons pas trop fort, Camille risquerait de prendre la grosse tête...!

Merci également à Olivier et Cédric, les deux compères fumeurs du labo! Olivier, je te remercie particulièrement pour les heures, que dis-je, les jours entiers passés au RA \IAK, tes analyses et toute ton aide!

Carole, Gwennaëlle, je vous ai bien embêtées que ce soit avec des aprêms de compression ou des centaines de I3ET, pour vos réponses toujours promptes et votre patience, je vous remercie.

Audrey, Fabien, Christel, Sophie G. , la super team pharma ; quel plaisir de débattre avec vous et de vivre dans notre petite maison qu'est la coque B. Enfin jusqu'à ce que le toit de notre petite maison s'écroule (rire jaune). Vous m'avez particulièrement subi les derniers mois d'écriture, soutenue jusqu'au bout ; que ce soit avec des séances d'aquagym, des bouillottes, des tartes aux poivrons ou des pots entiers de féta, et tellement aidé pour le jour J! ivierci mille fois.

David merci de ton aide, en toute circonstance, scientifiquement ; pour le voyage en Australie ; les hypothétiques stages en herboristerie et surtout, merci de ta perpétuelle bonne humeur.

Laurent, Fabrice et Christian merci de nos échanges scientifiques et de votre bienveillance.

Professeur Oh, merci de votre accueil au sein de l'Université de Yonsei.

Enfin qu'aurait été mon aventure australienne sans l'accueil et la bienveillance du professeur Bessim Ben Yissan ? De la visite des laboratoires les plus high-tech de l'UTS, aux cours d'herboristerie chinoise dispensés par Ilan en passant par ces moments de convivialité partagés dès ma première année en France je ne peux que vous remercier du fond du cœur et espérer vous revoir à Venise, Toulouse ou Sydney.

Dans tout ça je n'oublie pas les collègues doctorants qui sont également une part importante voir primordiale de l'expérience de thèse :

Merci à tous les membres du LGC, particulièrement Astrid et Hélène qui ont fait mille et un efforts pour me faire partager la vie de labo malgré ma faible présence. Marion et Maëlla, nous n'avons fait que nous croiser mais j'ai pour autant adoré nos échanges. Maxou... ton excès me laisse encore et toujours entre le rire et les larmes. Dans tous les cas tes gnocchis aux pestos vont me manquer terriblement et je dois bien l'avouer tu es un bon partenaire d'œnologie... même si sacrément chauvin! Je félicite donc Priscillia pour avoir supporté :tvfaxou au bureau mais aussi pour cette incroyable énergie qu'elle y a amené. Tu es passionnée, pédagogue et attentionnée, bref tu es encore quelqu'un que j'ai détesté découvrir pendant ces années d'aventures.

Elle fait presque partie des murs et je crois qu'elle ne quittera jamais vraiment l'équipe : notre Ambra.cita. Merci pour ces innombrables soirées, ces fous rires, ces appels interminables é notre :vfarinette partie si loin pour la moitié de sa thèse. :\\Merci pour ta bonne humeur permanente, ton sourire et tes expressions aussi fleuries que la plupart de mes robes.

Et c'est comme ça qu'on en arrive à Cam'ouille, l'vlonseur Pierre, enfin Camille quoi ! Le papi du bureau quand je suis arrivée ou presque. L'homme qui m'a trninôc dans la beme, m'enfonçant mes ailes de fée clochette dans le dos dès notre première année d'IKSA! Vv'ait a minute... nop still not me!!! Tu es d'une énergie et d'une gentillesse incroyable, taquin, tu as amené la bonne humeur avec toi dans le bureau, à Ambleteuse et jusqu'au Vietnam paraît-il... Bref, un must to have en thèse ce petit Camille.

]vfarine, nous avons commencé ensemble. Comme j'aime à le raconter, fa i encore l'image de toi au week-end de l'école doc', le visage illuminé par la présence de charcut'. Quel plaisir d'évoluer à tes cotés tout au long de ces trois ans ! Des randos dans les Pyrénées, aux soirôcs oeno en passant. par les soirées papotes, Chartreuse, escape game... Tu es devenu une amie et je suis sûre qu:encore pleins d'aventures nous attendent, à Toulouse, en Ecosse ou à Sherbrook !

Passons un peu au tour des doctorants de pharma qui m'ont le plus supportée tout au long de ces trois ans. Dès mon arrivé j'ai été accueilli chaleureusement par deux ours, enfin un des deux ...

Guillaume, papa de pharma, tu as fait une thèse brillante et je suis sûre que tu es le meilleur :v'fCF de tout Strasbourg ! Tu m'as souri de suite et aidé à chaque instant de ma découverte de ce nouvel univers qu'était la recherche, de là à dire que tu as un peu été un grand frère, il n'y a qu'm pas. J'ai adoré nos longues discutiom;: refaire le monde au labo comme au Hoogarden et ça avec ton acolyte de toujours : le grand Sylvanus.

Sylvain, ça a été merveilleux de te voir évoluer tout au long de ta dernkre année de thèse, de te voir te remettre à la rédaction plus récemment après toutes tes aventures à l'autre bout du monde. Tu es quelqu'un de déterminé, d'attentionné et tu es devenu très important dans ma vie. Je suis impatiente qu'on se retrouve au détour d'une randonnée botanique sur ce continent ou un autre.

Les gars, j'attends donc avec impatience la soirée Vodka Ouzbek: de celle dont vous avez le secret, où on se prendra en main et où on mettra en place cette ferme pédagogique! Et maintenant les petits nouveaux !

Laure₁ tu es incroyable. Tu es restée un mois en pharma et tu t'es intégrée discrètement mais complètement! Toujours motivée, le sourire aux lèvres, c'est un plaisir de partager des moments en ta compagnie.

Thibault, co-thésard d'unour! Kous avons affronté les aléas du sécheur ensemble et fais des réunions de travail jusqu'aux moments les plus chauds de l'été toulousain! Tu m'as aussi supportée lors de mes appels chirgence : <<thib thib j'ai les ¾ de ma molaire en moins, c'est normal? >>.I3rcf je sais que tu croules sous le travail mais tu es toujours là, toujours motivé et toujours prêt à aider en cas de besoin, en bref une belle personne pour qui je croise les doigts dans cet.te dernière ligne droite avant ta consôcrntion en tant que prof.

J'en arrive à la team Girod en commençant par notre petit. Simon. Venu du froid et étant passé par le pays des kangourous tu nous es arrivé tout frais, plein de gentillesse, avec un accent du nord parfois mélangé au québécois, un amour pour la chanson française et une curiosité et bienveillance sans limite. Juste merci (ravoir intégré l'équipe, tu illumines nos jours.

La seconde et non la moindre : \faylis. Collègue, copine, amie puis coloc je ne m'attendais pas à ça quand on nous a annoncé ton arrivée. :Mais je n'ai pu que t'aimer de suite₁ tu es toi aussi un rayon de soleil dans le bureau, toujours prête à aider les autres₁ à l'écoute et le sourire aux lôvracs. Ton coté bonne vivante, tes pulls à paillet.tes, ton regard malicieux tout. va terriblement me manquer. Je t'envoie d'avance tout.c mon énergie pour cet.te fin de thèse qui s'annonce intense et super excitante mais je ne m'inquiète pas, tu as tous les outils pour réussir!

Et enfin, la petite dernière (ou presque, Laure ne te vexe pas mais c'est comme ça que je la vois), Clémence. Dès ta première venue au labo, tu nous as plu : ta simplicité, ta grande gentillesse, ta sensibilité et en même temps tes regards en coin qui en disent long! Je te remercie pour les discussions interminables autour de thés, pour cette passion du fromage qui nous réunies aussi. Tu es devenue une amie et je suis impatiente qu\m se retrouve pour les soutenances à venir et bien plus encore!

Les filles, je vous remercie pour tous cc que vous avc fait. jusqu'au dernier moment. de cette thèse.

Je remercie enfin toutes les personnes merveilleuses que j'ai croisées et pas trop traumatisées j'espère : :Maxime, le meilleur stagiaire du monde ; Léa, avec des conseils toujours bien vus ; Eren, Pedro, Giovanni et Alejandro pour votre bonne humeur au labo ; Hugo fourmi (oui, oui désolée, mais tu sais bien que je suis obligée) pour m'avoir trainée dans les manifs ; Ipek, Cristina et Santi pour m'avoir accompagnée dans mon aventure australienne ; :vilou, Dogak, :-Jamo pour m'avoir fait. découvrir les horaires de travail coréens mais aussi et surtout pour m'avoir permis ces merveilleux séjours à \Vonju ; Simon, :viorgane, Clémence et tous les toulousains de la vie militante qui m'ont

permis d'échapper à l'univers académique et de participer à de merveilleux projets ... Une mention spéciale aussi pour les trois ours de la rue du Font Doré, en particulier celui qui m'a nourri de Pannettone et su inventer un calendrier de l'avant de rendu de thèse. Enfin je remercie mes amis Lyonnais : Claire, Julie, Julia; Odran et Rémy en tête; mais aussi le; voironnai;; Florence, Julien et bien sûr Murielle pour m'avoir accompagnée depuis longtemps et en particulier ces dernier;; mois.

Ces trois années ont été une aventure scientifique et humaine extraordinaire que je recommencerais sans hésiter, merci à tous.

Table des matières

Abréviations.....	11
Introduction.....	13
Partie 1 : Analyse bibliographique.....	17
1.1 Le minéral osseux et ses analogues de synthèse.....	17
1.1.1 L'os.....	17
1.1.2 Les apatites biomimétiques.....	20
1.2 Les substituts osseux.....	25
1.2.1 Caractéristiques d'un substitut osseux.....	26
1.2.2 Substituts d'origine naturelle.....	27
1.2.3 Substituts synthétiques.....	28
1.3 Fonctionnalisation des biomatériaux.....	39
1.3.1 Les problèmes post chirurgicaux.....	39
1.3.2 La stimulation.....	44
1.4 Procédés de mises en forme des phosphates de calcium.....	47
1.4.1 Mise en forme des céramiques poreuses.....	48
1.4.2 Revêtements.....	50
1.5 Le CO₂ supercritique.....	54
1.5.1 Le CO ₂ et les biomatériaux.....	55
1.5.2 Délipidation osseuse.....	55
1.5.3 Synthèse de dispositifs poreux.....	56
1.5.4 Agent de carbonatation minérale.....	58
1.6 Les objectifs de ce travail.....	64
Partie 2 : Matériaux et méthodes.....	65
2.1 Matériaux.....	65
2.2 Méthodes.....	69
2.2.1 Procédé CO ₂	69
2.2.2 Méthodes de caractérisation.....	74
2.2.3 Microscopie électronique à balayage.....	75
2.2.4 Spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman.....	75
2.2.5 Diffraction des rayons X.....	76
2.2.6 RMN en phase solide.....	77
2.2.7 Porosimétrie à mercure.....	77
2.2.8 Mesure de la surface spécifique BET (Brunauer, Emmett et Teller).....	77

2.2.9 Echange ioniques	78
2.2.10 Tests de libération	78
2.2.11 Tests biologiques.....	79
2.3 Conclusion	82
Partie 3 : Modification de céramiques.....	85
3.1 Traitement des poudres	87
3.1.1 HA	93
3.1.2 amTCP	99
3.1.3 HA/amTCP	108
3.2 Traitement de cubes de céramiques	121
3.2.1 Poudres traitées thermiquement	121
3.2.2 Substituts céramiques poreux.....	125
3.2.3 Influence de la température de traitement	136
3.2.4 Influence de la pression.....	139
3.2.5 Influence du temps traitement.....	143
3.2.6 Influence du rapport L/S.....	146
3.2.7 Influence du temps de repos	148
3.2.8 Influence de la durée de décompression	150
3.2.9 Influence du vide post-procédé.....	152
3.2.10 Influence de la nature du milieu (eau/SBF).....	155
Partie 4 : Elaboration de céramiques dopées.....	161
4.1 Zinc.....	162
4.1.1 Poudres.....	163
4.1.2 Cubes de céramiques.....	169
4.2 Argent.....	180
4.2.1 Poudres.....	181
4.2.2 Cubes de céramique	188
4.3 Cuivre.....	198
4.3.1 Poudres.....	199
4.3.2 Cubes de céramique	206
4.4 Strontium.....	215
4.4.1 Poudres.....	216
4.4.2 Cubes de céramique	222
4.5 Bilan	230
Conclusion générale et Perspectives.....	237
Annexes 241	
Annexe 1 : Clichés MEB.....	241
Annexe 2 : Porogrammes	242

Annexe 3. Cartographies EDX des cubes.....	243
Bibliographie.....	245
Table des tableaux	277
Table des figures :	279
Résumé du projet de thèse.....	286
Abstract :	286
Productions scientifiques.....	288

Abréviations

Différentes abréviations sont utilisées tout au long de ce manuscrit et sont définies ici :

HA : Hydroxyapatite

TCP : TriCalcium Phosphate (am : amorphous, α ou β)

BCP : BiCalcium Phosphate

OCP : OctoCalcium Phosphate

PCA : Poorly Crystalline Apatite

PCCA : Poorly Carbonated Crystalline Apatite

DCPD: DiCalcium Phosphate Dihydrate

MEB: Microscope Electronique à Balayage

EDX : Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

FTIR : Fourier Transform InfraRed Spectroscopy, Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier

DRX : Diffraction des Rayons X

SAA : Spectroscopie d’Absorption Atomique, technique de dosage

BET : Théorie Brunauer, Emmett et Teller, mesure de surface spécifique

ICP : Inductively Coupled Plasma, Spectroscopie à plasma à couplage inductif

Introduction

Le vieillissement de la population enregistré ces dernières décennies a fait apparaître des pathologies liées à l'âge ainsi que des problématiques de dépendance et d'autonomie lorsqu'apparaît une limitation fonctionnelle physique avec incapacité d'assurer les activités de la vie quotidienne. C'est en vue d'améliorer la qualité de vie des patients et de leur permettre de recouvrer une activité physique normale que les biomatériaux utilisés comme substituts osseux ont vu le jour puis se sont largement développés. En France, en 2011, 42778 substituts osseux ont été facturés et 60% d'entre eux étaient des substituts osseux synthétiques, majoritairement à base de céramiques peu réactives telle que l'Hydroxyapatite (HA). Il est cependant difficile d'obtenir un substitut idéal, à la fois poreux, chimiquement similaire à l'os, ayant des propriétés mécaniques en compression adaptées... Des recherches prometteuses sont aujourd'hui réalisées afin de proposer des substituts plus proches du minéral osseux, dotés d'une phase phosphocalcique biomimétique permettant ainsi une ostéointégration plus rapide. Cette phase, bien que proche des phases phosphocalciques couramment utilisées (HA, TCP...) est en réalité une apatite mal cristallisée, carbonatée et très réactive. Elle ne permet cependant pas encore à échelle industrielle, d'être mise en forme comme substitut massif ayant des propriétés mécaniques et une porosité similaire à l'os.

Une autre stratégie favorisant la biointégration vise à déposer à la surface de dispositifs existants un revêtement biomimétique capable de modifier les caractéristiques physico-chimiques et le comportement biologique de celui-ci. Des techniques par voie humide permettent alors des dépôts réactifs d'apatites biomimétiques ou des phases phosphocalciques hydrolysables en apatite telles que la brushite (DCPD) ou les phosphates octocalciques (OCP).

De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens. Certains, inspirés des travaux réalisés par Kokubo ont permis de revêtir des substrats d'une couche apatitique très réactive à partir de solutions métastables¹. Le CO₂ peut alors être utilisé à la fois pour modifier le pH des solutions métastables et éloigner ainsi le système réactionnel de sa zone d'instabilité et modifier la composition des phases précipitées.

Ce procédé présente l'avantage de permettre le traitement de surfaces de formes complexes mais souffre des difficultés liées à son utilisation à l'échelle industrielle. D'autres travaux réalisés au CIRIMAT dans le cadre de la thèse d'Hélène Autefage²

ont également proposé de modifier la surface de céramiques poreuses (HA/ β TCP) en déposant un revêtement biomimétique réactif et nanoporeux par un procédé d'imprégnation-séchage d'un nanogel phosphocalcique. Cette technique a cependant montré des limites notamment quant à l'adhésion du revêtement au substrat.

De plus, les infections lors de l'utilisation de dispositifs classiques, sont devenues l'un des risques majeurs liés aux interventions chirurgicales. Si les traitements prophylactiques par voie intraveineuse ou *per os* restent d'actualité, ils n'en restent pas moins longs et peu efficaces en raison du manque de pénétration intra-osseuse. De plus, en 2014, un rapport publié par l'OMS dresse un tableau complet sur la résistance actuelle aux antibiotiques qui entraîne une grave menace pour la santé publique. La même année, la DGS (Direction Générale de la Santé), publie des directives destinées aux professionnels de santé ainsi qu'aux patients sur le bon usage des antibiotiques. Elle souligne notamment le fait que dans 30% à 50% des cas, les prescriptions d'antibiotiques dans les établissements de santé peuvent être inappropriées et que les infections par des bactéries résistantes aux antibiotiques entraînent une morbidité et une mortalité accrues, ainsi qu'une augmentation de la durée du séjour hospitalier.

C'est en vue de proposer de nouvelles alternatives que durant cette dernière décennie, les recherches se tournent vers le développement de nouveaux biomatériaux capables de libérer *in situ* des éléments actifs (ions ou principes actifs) susceptibles de prévenir ou traiter certaines complications post-opératoires (infections, inflammations...) et d'éviter l'utilisation excessive des traitements systémiques.

Les principes actifs (PA) associés aux matériaux de comblement sont alors : la gentamicine, la vancomycine, la tétracycline ou l'acide fusidique pour prévenir les risques infectieux et l'ibuprofène, l'indométacine ou l'acide salicylique pour prévenir les risques inflammatoires. Ceux-ci sont associés aux matériaux existants : ciments, hydrogels ou matériaux composites. Mais ces systèmes de délivrance présentent certaines limites : ainsi ils ne permettent pas de prévenir ou de traiter à la fois les risques infectieux et les risques inflammatoires et le manque de stabilité de certains PA limite la mise en forme galénique.

Une autre option commence à émerger consistant à utiliser des ions métalliques biologiquement actifs pour prévenir les risques liés à l'intervention mais aussi pour favoriser la régénération osseuse ³. Ainsi, les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} sont connus pour stimuler la formation osseuse, les ions Cu^{2+} , Ag^+ sont connus pour leurs propriétés bactéricides et sont capables de prévenir les risques d'infection et l'ion Zn^{2+} possède entre autre des propriétés anti-inflammatoires. Comme précédemment, ils sont associés à des matériaux déjà existants et leur libération dépend fortement de leur capacité à intégrer

la structure apatitique (ce qui induit une libération extrêmement lente liée à la résorption de la matrice) ou de leur capacité à s'adsorber à la surface des nanocristaux apatitiques conduisant à une libération plus rapide par échanges ioniques.

C'est en partant de ce constat que ce travail de thèse propose une étude autour de l'amélioration de la bioactivité de substituts phosphocalciques déjà existants. Les dispositifs étudiés ici seront des cubes poreux de céramique frittée d'HA/ β TCP (65/35%) disponibles sur le marché sous le nom de Ceraform®. Ces céramiques présentent en effet de nombreux avantages dans le domaine de la régénération osseuse (biocompatibilité, bonne résistance mécanique, présence de macro et micro-porosité). Le procédé mis en place vise à la fois à conserver leurs propriétés et à rendre leur surface plus réactive grâce à la précipitation d'un nouveau revêtement phosphocalcique, mais également à conférer des propriétés supplémentaires aux substituts *via* l'inclusion d'espèces ioniques, et ce en une seule étape.

Dans cette démarche le CO₂ à haute pression a été choisi comme agent d'acidification du milieu réactionnel et comme ion capable de participer aux réactions chimiques induites par le traitement. Le CO₂ présente de nombreux avantages notamment pour le développement de produits ou matériaux à usage biomédical. Etant gazeux en conditions ambiantes, il ne laisse en effet aucun résidu dans les matériaux et peut être recyclé. Le CO₂ est déjà utilisé dans ce domaine à des fins très variées (mise en forme de matrices poreuses, nanoparticules, carbonatation...). Porté en conditions supercritiques, il a déjà entre autre été utilisé pour la délipidation osseuse, étape nécessaire lors de traitement d'allogreffes. Il a par aussi montré son intérêt dans le domaine de la carbonatation minérale, notamment des phosphates de calcium.

La première partie de ce mémoire permettra de présenter le contexte dans lequel se place cette étude en définissant dans un premier temps le minéral osseux et ses analogues de synthèse. Les possibilités de fonctionnalisation des substituts osseux seront aussi présentées ainsi que leurs techniques de mise en forme. Cela permettra de dégager les pistes d'amélioration de la bioactivité des dispositifs déjà présents sur le marché. Enfin les utilisations du procédé CO₂ choisi dans cette étude, autant dans le domaine des biomatériaux que de la carbonatation, seront décrites. Les objectifs de ce travail seront alors mis en place au regard de la littérature étudiée.

La partie matériaux et méthode permettra dans un deuxième temps la description des outils mis en place pour mener cette étude à bien.

Dans la troisième partie, la possibilité de créer un revêtement très réactif sur des céramiques, dont les surfaces le sont initialement très peu, sera évaluée. Un milieu aqueux étant nécessaire à la précipitation d'apatite biomimétique, les modifications seront

amorçées dans de l'eau et en utilisant le CO_2 comme agent modificateur de pH. Ce travail consistera donc à observer les possibilités de modification puis d'étudier les paramètres du procédé influents sur ces dernières.

Enfin la dernière partie permettra d'évaluer l'impact d'ajout d'espèces ioniques au sein du milieu réactionnel lors du procédé CO_2 haute pression précédemment développé. L'objectif sera de mettre en évidence l'éventuelle inclusion d'espèces actives durant le procédé de modification surfacique. Différentes espèces ont été choisies dans ce travail : zinc, argent, cuivre et strontium pour leurs propriétés énoncées plus haut. Leur introduction lors du procédé même de modification de surface pourrait permettre, en une seule étape, à la fois un remaniement de surface mais aussi l'intégration d'espèces bioactives attribuant de nouvelles propriétés au matériau : réactivité de surface; anti-inflammatoire, antibactérien, stimulant de la régénération osseuse...

Partie 1 : Analyse bibliographique

Le travail bibliographique présenté ici s'attachera dans un premier temps à présenter le minéral osseux, son origine, sa composition. Les différents substituts osseux seront détaillés par la suite ainsi que les différentes méthodes de fonctionnalisation. Enfin les procédés utilisés pour mettre en forme ces substituts et leurs éventuels revêtements seront présentés.

L'orientation du travail de thèse proposé sera justifiée en fonction du contexte global décrit dans cette première partie.

1.1 Le minéral osseux et ses analogues de synthèse

Dans le règne du vivant de nombreux animaux présentent des tissus minéralisés. L'ivoire, le bois de cerf ou les arêtes de poissons peuvent être évoqués mais aussi l'os, l'émail ou la dentine des vertébrés ⁴ ⁵... Ces tissus minéralisés forment, chez l'homme, un squelette.

Ce dernier a plusieurs fonctions. La première est mécanique, car il confère une structure rigide au corps capable alors de se mouvoir sous l'action des muscles. Il protège également les organes et surtout a une fonction métabolique de régulation du calcium et du phosphore, minéraux primordiaux pour le bon fonctionnement du muscle cardiaque, entre autres.

1.1.1 L'os

a. Les types d'os

L'os est lui-même un terme générique pour qualifier différents tissus minéralisés. Ainsi différents types d'os peuvent être identifiés ⁶. Ils diffèrent par leur taille, leur forme ou encore leur composition.

Chacun est composé de plusieurs parties ayant elles-mêmes des structures et compositions parfois différentes :

-L'os cortical, aussi appelé os compact, est adapté pour résister aux contraintes mécaniques et constitue la partie périphérique de l'os. Il a une structure lamellaire et est constitué de groupes de cylindres concentriques formés de fibres. Au centre de chaque groupe, appelé ostéon, se trouvent les canaux de Havers, dans lesquels se logent des vaisseaux sanguins.

-L'os spongieux (ou trabéculaire) se présente comme de minces plaques, séparées par la moelle. Celui-ci est donc peu dense et possède une faible résistance mécanique. Il est toujours enveloppé par de l'os compact. L'os spongieux étant riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins, il permet les échanges métaboliques.

b. Le remodelage osseux

Les 206 os⁷ que comporte le squelette humain sont en perpétuel remodelage. Chez l'adulte, ils se renouvellent en moyenne de 10% par an. Les cellules impliquées dans ce mécanisme sont ^{8,9} :

-Les ostéoclastes qui sont des cellules géantes poly-nucléées responsables de la résorption du tissu minéral.

-Les ostéoblastes dont la prolifération diminue avec l'âge et qui permettent la création et la minéralisation de nouveaux tissus osseux. Il est à noter que leur activité, leur capacité à minéraliser une matrice, est actuellement principalement évaluée par la présence d'une enzyme : la phosphatase alcaline (ALP) ¹⁰ .

-Les ostéocytes qui sont eux d'anciens ostéoblastes devenus matures, englobés dans l'os qu'ils ont participé à créer. Ils font partie des éléments favorisant le maintien de la matrice extra cellulaire.

Ce remodelage se fait sur de petites surfaces appelées *Bone Remodeling Unit* (BMU), d'environ 100 µm de côté.

La régénération de l'os a lieu en quatre étapes :

- l'activation ;
- la résorption osseuse ;
- l'inversion ;
- la formation.

Le remodelage osseux concerne aussi bien l'os cortical que l'os spongieux. Le cycle de régénération commence par l'activation des précurseurs des ostéoclastes, suivie par la différenciation des ostéoblastes.

Lors de la résorption osseuse, les ostéoclastes détruisent la matrice osseuse ancienne puis s'autodétruisent selon le processus appelé apoptose.

Parallèlement, la phase d'inversion a lieu, les précurseurs ostéoblastiques sont activés et les ostéoblastes se différencient.

La formation osseuse fait intervenir les ostéoblastes. Cette étape permet de combler la cavité qui vient d'être formée avec de la matrice extracellulaire organique, dite matrice ostéoïde, minéralisée par la suite.

Les ostéoblastes sont d'une part détruits par apoptose et d'autre part transformés en deux types de cellules : les ostéocytes, logés dans des cavités creusées dans la matrice osseuse, et les cellules bordantes, précurseurs des ostéoblastes, recouvrant la surface de

l'os et pouvant se différencier en ostéoblastes en sortant de leur état de sommeil appelé état quiescent.

Grâce à ces phénomènes, le capital osseux de chaque individu évolue au cours de la vie. Alors qu'il est en augmentation jusqu'à 3 ans après la puberté, il se stabilise pendant les 35 années suivantes. S'ensuit une phase de diminution, plus fortement marquée chez la femme.

c. Composition

L'os est un tissu naturel composite, constitué de deux phases distinctes mais intimement associées. L'une est minérale, représentant environ 70 % en masse, et est composée de phosphate de calcium à structure apatitique et nanocristallin, responsable de la rigidité et de la résistance mécanique.

La seconde phase est organique. Elle contient essentiellement du collagène de type I (~ 20 % massique), des protéoglycanes et des protéines non collagéniques qui confèrent une ductilité et une ténacité certaines au composite qu'est l'os. D'un point de vue mécanique, le collagène (protéine formée de longues chaînes d'acides aminés) étant présent sous forme de fibres en triple hélice, il constitue une matrice organique tridimensionnelle, elle-même minéralisée. Ceci permet une étroite interaction entre les composantes minérales et organiques du tissu osseux. Le collagène amène par ailleurs une flexibilité dans la direction des fibres alors que le phosphate de calcium permet d'améliorer les propriétés du matériau en compression ¹¹ .

La Figure 1 indique, à titre indicatif, les différents constituants du tissu osseux classés selon leurs proportions massiques moyennes au sein de la partie médiane d'un os humain long, pour un individu d'âge adulte (% massique moyen) ^{12,13} :

		% massique
<i>i</i>	minéral (apatite)	64
<i>ii</i>	collagène de type I	22
<i>iii</i>	eau	9
<i>iv</i>	protéines non-collagéniques	3
<i>v</i>	cellules	2

Figure 1 Composition massique moyenne de l'os long humain proposée d'après Legeros¹² par Euw¹⁴

Ce tissu très spécifique diffère en fonction de divers critères tels que le type d'os, le sexe, la condition physique (liée aux sollicitations mécaniques) ... Les nanocristaux de l'apatite eux-mêmes, thermodynamiquement métastables, évoluent aussi avec l'âge ^{15,16} .

1.1.2 Les apatites biomimétiques

Des études ont montré que l'apatite était la phase cristalline phosphocalcique la plus stable thermodynamiquement dans les conditions physiologiques ^{4,17}. La phase principale constituant le minéral osseux est ainsi une apatite phosphocalcique bien qu'elle présente certaines spécificités dont un caractère nanocristallin et une sous-stœchiométrie en ions hydroxydes et calcium.

a. Définition d'une apatite

Les apatites sont, de manière générale, une famille d'oxydes complexes se caractérisant par la formule brute suivante :



où Me est typiquement un cation métallique bivalent, XO_4 un anion trivalent et Y un anion monovalent (par exemple OH^- , F^- ou Cl^-).

Parmi les phosphates de calcium, on identifie le composé stœchiométrique nommé hydroxyapatite (HA) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, caractérisé par un rapport molaire $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$. Ce composé cristallise généralement sous forme de maille hexagonale comme représenté sur la Figure 2. Les paramètres de mailles des cristaux sont typiquement $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$ ¹⁸. Les angles α et β sont égaux à 90° et γ est égal à 120° .

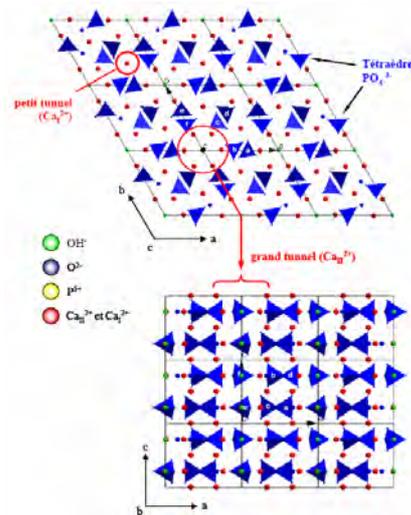


Figure 2 Structure cristallographique de l'hydroxyapatite ¹⁹

b. L'apatite osseuse

L'apatite osseuse est une phase carbonatée, déficiente en calcium et en ions hydroxydes (non-stœchiométrique), faiblement cristallisée et constituée de cristaux de taille nanométrique. Ils sont le plus souvent présents sous forme de plaquettes de l'ordre de 50

nm de long, 25 nm de large et 2 à 5 nm d'épaisseur ²⁰ . Une telle morphologie plaquettaire est inattendue, puisque les synthèses *in vitro* conduisent généralement à une morphologie sous forme d'aiguilles ou de bâtonnets ²¹ .

La composition du minéral osseux, bien que variable selon des paramètres déjà évoqués comme l'âge ou le sexe, a été évaluée. Elle est comparée dans le Tableau 1 aux autres tissus minéralisés du corps humain ²² .

Tableau 1 Composition chimique de l'os, la dentine et l'émail d'un individu d'un âge indéterminé et d'une apatite stœchiométrique de synthèse, obtenue par analyse chimique élémentaire²²

Elément (% massique)	Os	Dentine	Email	Apatite stœchiométrique
Ca	34,80	35,10	36,50	39,60
P	15,20	16,90	17,70	18,50
Na	0,90	0,60	0,50	-
Mg	0,72	1,23	0,44	-
K	0,03	0,05	0,08	-
C inorganique	1,48	1,12	0,7	-
F	0,03	0,06	0,01	-
Cl	0,13	0,01	0,30	-

Le ratio Ca/P est ici inférieur à celui de l'HA stœchiométrique, prenant par exemple des valeurs de 1,33 et n'atteignant jamais 1,67. Etant carbonaté, il est plus approprié d'exprimer non pas le rapport Ca/P mais bien le rapport Ca/(P+C). A titre indicatif, le tissu osseux d'un os compact d'un homme de 57 ans présente un Ca/P de 1,77 ²³ . Cette sur-stœchiométrie est justement due à la non prise en compte des carbonates. Le rapport Ca/(P+C) est alors de 1,57. De manière générale, *in vivo*, de l'apatite non maturée à l'os, ce rapport évolue de 1,3 à 1,5 ^{24,25} . La formule brute moyenne d'une apatite osseuse peut s'exprimer comme suit ¹⁸ :



Équation 1

Dans cette apatite, une partie des ions PO_4^{3-} est substituée par des anions bivalents tels que les carbonates CO_3^{2-} ou hydrogénophosphate HPO_4^{2-} . La compensation de charge est alors principalement compensée par des lacunes en sites Ca^{2+} et OH^- .

Il est important d'évoquer la réactivité de l'apatite osseuse (ou encore des apatites nanocristallines de synthèse, dites « biomimétiques »). Les cristaux sont en effet composés d'un cœur d'apatite faiblement cristallisée recouvert d'une couche ionique hydratée labile riche en ions facilement mobilisables (Figure 3) ^{18,26-29} . Cette couche hydratée provient vraisemblablement des conditions de formation en solution de l'apatite

en conditions physiologiques H et son hydratation permet de diminuer l'énergie de surface des nanocristaux et alimente de plus la croissance du cœur apatitique.

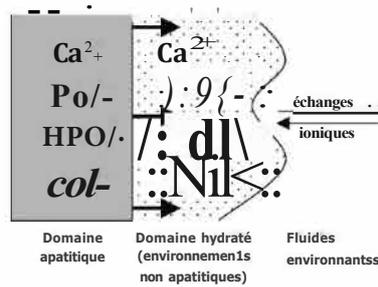


Figure 1 : Schéma représentant une apatite biomimétique avec le domaine apatitique à gauche, la couche labile l'intermédiaire et les échanges ioniques facilités avec le fluide l'environnement.

Au sein de cette couche, les ions de surface non-apatitiques sont particulièrement « labiles », c'est-à-dire aisément mobilisables dans des réactions chimiques de surface. Des échanges ioniques avec d'autres espèces en solution sont ainsi facilités et essentiellement réversibles. Les ions CO_3^{2-} peuvent ainsi remplacer des ions HPO_4^{2-} de surface, les OH^- peuvent remplacer les ions Ca^{2+} ...²⁷⁻³¹. De nombreuses espèces ioniques (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} ...) présentes dans le plasma sanguin peuvent ainsi intégrer la couche hydratée^{32,33}, voire à terme s'incorporer dans le cœur apatitique sous forme de substitution de cœur. Ces échanges/substitutions peuvent se faire aussi bien avec des ions biologiquement actifs (tel que Sr^{2+} , anti-ostéoporotique ou Cu^{2+} antibactérien) qu'avec des ions toxiques (tel que Pb^{2+}). Les cristaux apatitiques permettent de plus, de par cette réactivité, de participer à l'homéostasie des liquides physiologiques environnants avec, entre autre, un rôle de régulateur de pH en cas d'acidose via la libération de carbonates et d'orthophosphates.

L'incorporation d'ions dans la structure apatitique peut mener, en fonction des caractéristiques relatives des ions en question, à des modifications potentiellement analysables. Par exemple, les données de DRX peuvent se trouver impactées par une substitution au cœur des cristaux : il existe des modèles de prédiction de ces phénomènes (équilibre électrique, création de lacune...)^{34,35}. De plus, les échanges ioniques de surface peuvent parfois (ex : CO_3^{2-}/HPO_4^{2-}) modifier les données spectroscopiques (FTIR, Raman, Raman ...).

La substitution la plus importante en masse est celle des ions carbonates (8% massique de l'os humain en moyenne, bien que cette valeur évolue, notamment avec l'âge). De plus, les ions carbonates ont un rôle crucial dans la formation d'une couche en surface des cristaux d'apatites : ces ions sont en effet connus pour être des inhibiteurs de croissance cristalline pour l'apatite (au même titre que d'autres composés tels que les ions pyrophosphates; magnésium...). En ralentissant l'évolution de l'apatite vers une phase très cristallisée; ils permettent le maintien de la phase non apatitique. Cette

incorporation modifie ainsi la solubilité et la taille des cristaux ^{5,22,34}. Les carbonates peuvent intégrer la structure apatitique sur deux types de sites cristallographiques ³⁵ :

- Les carbonates de type A se substituent aux ions OH^- .
- Les carbonates de type B se substituent aux ions PO_4^{3-} .

En marge de cela, des carbonates labiles (non-apatitiques) peuvent aussi être présents au sein de la couche hydratée en surface des nanocristaux.

Ces différents types de carbonates sont présents dans l'apatite osseuse. Les phénomènes de carbonatation synthétique seront détaillés plus loin dans ce manuscrit.

Il est à noter enfin que l'apatite osseuse (ou ses analogues de synthèse biomimétiques) étant thermodynamiquement métastable, comme récemment quantifiée par calorimétrie ³⁶, celle-ci évolue inexorablement lorsqu'elle est en conditions humides vers une composition plus proche de la stœchiométrie et des cristaux de dimensions plus importantes³⁷. Ce processus est dénommé « maturation ». Il a notamment été étudié via l'évolution d'apatites carbonatées de synthèse en milieu aqueux. Au travers des échanges ioniques, le phosphate de calcium semble tendre vers une structure plus stable et plus cristalline dans le temps ³⁷⁻⁴⁰.

Les carbonates présents dans la couche hydratée vont avoir tendance à intégrer la structure cristalline avec le temps, particulièrement sur les sites de type B. Il en résulte une perte drastique des carbonates de la couche hydratée. On peut noter que de manière générale, leur présence initiale dans la couche hydratée diminue la vitesse de cristallisation, le temps de maturation de l'apatite ³⁸. Le pH de l'environnement dans lequel l'apatite évolue aurait également une influence sur sa maturation en jouant notamment sur la protonation des PO_4 environnants ⁴⁰. Ordinairement, avec le temps la couche hydratée diminue et nourrit la phase mature et mieux cristallisée de l'apatite.

c. Minéralisation de la matrice collagénique dans l'os

Dans l'os, la phase minérale semble suivre le motif collagénique en triple hélice. Comme évoqué précédemment, les cristaux retrouvés dans l'os ont une forme allongée suivant l'axe cristallographique c , parallèle à celui de la fibre de collagène.

Cependant, la minéralisation de l'os est un mécanisme encore mal connu bien que de nombreuses études aient déjà été menées. Deux théories principales s'en dégagent :

Le premier modèle consiste en la nucléation-croissance d'apatite entre les fibrilles de collagène ³. La nucléation serait initiée à l'intérieur de vésicules extracellulaires : les vésicules matricielles, présentes sur la membrane plasmique externe des ostéoblastes ^{41,42}. Ce serait l'activité biologique de ces dernières qui conduirait à l'augmentation locale de la concentration en précurseurs ioniques (Ca^{2+} , PO_4^{3-} ...). Cela créerait une sursaturation pouvant induire une nucléation spontanée homogène de l'apatite. Suite à l'augmentation

de la taille des germes ayant évolué en cristaux, les vésicules matricielles se dégradent. C'est de cette manière que les cristaux seraient expulsés au sein du fluide extra.cellulaire et viendraient se déposer sur la matrice extra.cellulaire ²¹ .

Suite à la découverte d'apatite au sein même des fibrilles de collagène, la deuxième théorie, celle de nucléation hétérogène, a été développée. Ici, il y aurait création d'une nouvelle phase de phosphate de calcium à partir de la solution métastable qu'est le plasma sanguin. Initialement ce seraient des résidus peptidiques au sein des fibrilles de collagène qui permettraient d'amorcer la nucléation. C'est ce type de mécanisme qui a pu inspirer par la suite les techniques de synthèse des apatites biomimétiques.

12 Les substituts osseux

Pour rappel, les os ont plusieurs rôles primordiaux. Cependant, au cours d'une vie, on peut subir des pertes osseuses pour différentes raisons : traumatiques, tumorales ou dégénératives ⁴⁵ .

Des biomatériaux, dont il convient de donner la définition, sont alors utilisés. D'après la Société Européenne des Biomatériaux, un biomatériau est un « matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle » (1986 et 1991, Conférence de Chester (Royaume-Uni)). Ce serait donc un matériau, utilisé pour remplacer une partie ou une fonction du corps de manière sûre et fiable, acceptable du point de vue économique et physiologique ⁴⁶ et ce, de manière pérenne.

Le marché des substituts osseux, toutes stratégies confondues, représente plus de 2 millions d'implantations par an dans le monde ⁴⁵ et est en constante progression. Ils sont utilisés dans de nombreuses chirurgies : orthopédique, dentaire, neurologique, esthétique...

Même si le dénommé « gold standard » est longtemps resté l'os naturel, humain (auto ou allogreffe) ou animal (xenogreffe), il présente malgré tout plusieurs inconvénients. En premier lieu, la gestion des banques d'os pour les allo et xenogreffes ainsi que leur traitement demandent un suivi très strict. De plus, les autogreffes, les greffes provenant du patient lui-même, multiplient les sites d'opérations et potentiellement d'infections, c'est pourquoi les substituts synthétiques sont apparus comme une alternative particulièrement intéressante à développer.

Il faut cependant noter que les substituts osseux et leur cahier des charges ont évolué dans le temps. Alors que dans les années 1960 les substituts de première génération (métaux, polymères ou céramiques inertes) visent la restauration et la réparation, les substituts de seconde génération (céramiques bioactives : matériaux apatitiques, bio-verre) apportent la notion de bioactivité par libération d'ions calcium et phosphates. Les substituts de troisième génération (substituts fonctionnalisés...) utilisés quant à eux dès les années 1990 confèrent une propriété supplémentaire : la volonté d'induire la régénération de l'os et quelquefois de réduire les risques liés à la chirurgie (inflammations, infections).

De manière générale, les substituts osseux doivent présenter certaines propriétés communes telles que la biocompatibilité, l'ostéointégration, l'ostéoconduction voire l'ostéoinduction mais aussi la gestion de la résorbabilité. Tous ces paramètres sont primordiaux et définissent la capacité des matériaux à remplacer l'os.

1.2.1 Caractéristiques d'un substitut osseux

a. Biocompatibilité

La biocompatibilité est la capacité d'un matériau à remplir une fonction spécifique avec une réponse de l'hôte appropriée. Un dispositif biocompatible est composé d'un matériau étranger ne provoquant pas de rejet, de réaction toxique, de lésion ou d'effets nocifs. Un matériau biocompatible sera donc accepté par le système immunitaire ⁴⁷⁻⁴⁹. En revanche, un matériau non-biocompatible entraînera une réaction inflammatoire importante. Ce paramètre semble donc le premier à rechercher pour développer un substitut.

b. Bioactivité/Ostéointégration

La bioactivité telle que la décrit L. Hench est la propriété d'engendrer des réponses biologiques spécifiques à l'interface implant/tissu, résultant de la formation de liaisons entre le tissu et le matériau ⁵⁰.

De manière plus spécifique, la bioactivité dans le domaine de la régénération osseuse est souvent reliée à l'ostéointégration, qui représente la capacité d'un matériau à adhérer à la surface de l'os hôte sans production d'une couche de tissu fibreux ⁵¹.

Lors de l'implantation, de nombreux mécanismes biologiques interviennent. Dans un premier temps et grâce aux fluides biologiques environnants ou aux sécrétions cellulaires, des molécules biologiques s'adsorbent en surface du matériau implanté. Ce sont surtout des protéines présentes dans la Matrice Extra Cellulaire comme le collagène. Les cellules se lient par la suite à ces protéines *via* des récepteurs spécifiques. Elles vont ensuite communiquer, proliférer et sécréter différentes protéines pour créer une interface entre le matériau et les tissus hôtes ⁵². C'est la force de liaison de cette interface qui va déterminer l'ostéointégration du matériau. Si ce dernier n'est pas accepté par le corps, il subit une encapsulation fibreuse ^{53,54}. Cette couche épaisse est composée d'un tissu collagénique anormal. Ce phénomène est favorisé par une interface à faible stabilité mécanique. D'autres caractéristiques entrent en jeu telles que : la chimie de surface, sa structure ou encore les contraintes mécaniques qui s'y appliquent.

c. Ostéoconduction/induction

L'ostéoconduction et l'induction sont deux propriétés à distinguer ⁵⁵.

L'ostéoconduction est la capacité qu'a un matériau implanté en site osseux à attirer le matériel cellulaire et vasculaire du tissu osseux adjacent nécessaire, permettant ainsi une meilleure intégration dans le corps. Il favorise l'invasion vasculaire et cellulaire du tissu hôte au matériau.

L'ostéoinduction est la capacité d'un matériau à promouvoir la différenciation cellulaire, permettant la synthèse d'une nouvelle matrice osseuse. Des tests d'implantation en site non osseux permettent de mettre en lumière cette propriété exceptionnelle. Certains biomatériaux associés à des facteurs de croissance ont montré ces propriétés. Cependant certains auteurs affirment que cette propriété peut être contrôlée grâce à la maîtrise de

certaines paramètres tels que la composition chimique, la géométrie de surface ou encore la topographie de surface ⁵. Cela pourrait ainsi permettre d'optimiser les propriétés des matériaux en les rendant ostéo-inductifs sans ajout de protéines ou facteurs de croissance, dont l'utilisation est souvent complexe. On peut citer dans ce cadre la modification de dispositifs de céramique HA/ β TCP réalisée par *Autefage et al.* ². Grâce à l'ajout de nanocristaux d'apatite biomimétique en surface, ces substituts ont été rendus ostéoinducteurs et non simplement conducteurs.

d. Résorbabilité

La résorbabilité est un facteur primordial des substituts osseux. Lorsque le substitut est destiné à se résorber totalement pour laisser place au nouveau tissu osseux, sa vitesse de résorption (liée entre autres à la porosité du matériau et à sa solubilité) doit idéalement coïncider avec la vitesse de formation de l'os nouvellement créé. Si la vitesse de résorption est trop rapide, cela entraînera, d'une part, une perte du soutien mécanique et, d'autre part, un épuisement rapide des espèces ioniques libérées et potentiellement utilisées par les ostéoblastes pour former la nouvelle matrice osseuse.

Concernant les substituts osseux à base de phosphate de calcium, il est possible d'ajuster ce paramètre. En effet, grâce à des solubilités très différentes, ils permettent, sous forme de mélange, d'atteindre une résorbabilité très contrôlée. Ainsi concernant les substituts poreux, des mélanges massiques d'Hydroxyapatite/ β TCP allant de 70/30 à 60/40 ont été présentés de l'intérêt ⁵⁶⁻⁵⁸. Dans ce cas, c'est le β TCP qui a la solubilité la plus grande et se dissout en premier sous action cellulaire en libérant des éléments favorables à la néo-formation osseuse, alors que l'Hydroxyapatite sert de support de germination et permet au matériau de maintenir son intégrité ainsi qu'un support mécanique continu.

Considérant les propriétés que doit posséder un substitut osseux, différentes stratégies peuvent être mises en place pour réaliser la substitution. Elles sont classées par matériaux et détaillées dans les paragraphes suivants.

1.2.2 Substituts d'origine naturelle

L'autogreffe est souvent considérée comme le « gold standard » et l'une des meilleures alternatives au remplacement d'une partie osseuse. Cela consiste à prélever de l'os du patient lui-même pour le réimplanter sur le site présentant un défaut osseux ayant besoin d'être comblé. Au regard du cahier des charges présenté précédemment, il semble en effet correspondre au substitut idéal : il est ostéoconducteur, contient différentes cellules et facteurs ostéoinducteurs et ne présente pas de risques de rejets.

Cependant des limitations existent. En premier lieu, la quantité d'os pouvant être prélevée est limitée. Cette solution ne peut donc pas s'appliquer à des défauts osseux importants. Cette technique requiert également deux sites opératoires et donc démultiplie les risques d'infections mais aussi une augmentation du temps d'opération ⁵⁹. De plus,

la qualité osseuse n'est pas forcément suffisamment bonne pour permettre son utilisation (cas des patients atteints d'ostéoporose par exemple).

Face à ces limitations, l'utilisation d'allogreffes et de xéno greffes a été développée. Les allogreffes consistent en l'utilisation d'os d'un donneur différent du receveur mais faisant partie de la même espèce (banque d'os) alors que les xéno greffes utilisent des substituts osseux provenant d'espèces différentes telles que les os d'origine bovine ou le corail.

Cela peut cependant entraîner des problèmes de réactions immunitaires voire de rejets. Le fait que ces greffons puissent être porteurs d'agents viraux tels que le VIH demande également une vigilance toute particulière et une gestion conséquente *via* des banques de données très contrôlées ainsi qu'un traitement complexe de ces matériaux qui sera détaillé par la suite. Enfin, selon la préparation des greffons, les résultats semblent inégaux et les propriétés (ostéoinductrices, mécaniques...) pas forcément conservées ^{60,61}.

Au regard des défauts évoqués concernant ces deux types de substituts, la recherche s'est naturellement orientée vers des substituts de synthèse.

1.2.3 Substituts synthétiques

Parmi les substituts synthétiques développés, nous pouvons citer dans un premier temps les biomatériaux à base de polymères et de métaux. Ces deux types de matériaux sont tous deux utilisés dans le domaine de la réparation osseuse mais leurs propriétés mécaniques très différentes font qu'ils sont utilisés pour des applications spécifiques différentes (sites porteurs ou non...).

Les polymères peuvent être d'origine naturelle, comme le collagène, ou issus de la pétrochimie. Ils offrent alors des possibilités bien différentes de par leur nature. Les polymères biosourcés (alginate, chitosan, collagène) peuvent correspondre, de par leurs propriétés, à la partie organique de l'os. Ils sont donc intéressants dans ce domaine. Ils présentent cependant quelques limitations, notamment en termes de coûts et de facilité d'accès...

Les polymères synthétiques (PLA, PGA, PCL...) ont eux aussi leur intérêt, présentant par exemple des propriétés de résorption modulables en fonction de la masse moléculaire. Les possibilités de mise en forme très variées en font des matériaux très versatiles, cependant la plupart ne sont pas considérés comme bioactifs. De plus, leur mise en forme implique souvent l'utilisation de solvants toxiques pouvant rester à l'état de traces dans le produit final. Certains encore, lors de leur dégradation *in vivo*, entraînent des changements de pH importants pouvant donner lieu à des inflammations conséquentes. Leur utilisation se fait donc souvent sous forme de composite où ils sont alliés avec d'autres matériaux.

Les métaux sont également largement utilisés dans le domaine des substituts osseux et particulièrement en orthopédie. En effet, leurs propriétés mécaniques en font d'excellents candidats pour la réparation de sites sous fortes contraintes mécaniques ou d'articulation. Cependant ils ne sont en aucun cas résorbables. En fonction de leur utilisation, ils sont

destinés soit à rester de manière permanente (prothèses de hanche, genoux...) soit à être retirés lors d'une seconde intervention chirurgicale (broches, plaques...).

Ces matériaux sont souvent qualifiés de bioinertes et c'est la raison pour laquelle De Groot, dès les années 1980, a proposé l'utilisation de certains métaux recouverts par un dépôt d'hydroxyapatite obtenu par revêtement plasma⁶². Dès lors, de nombreux travaux se focalisent sur les revêtements de matériaux métalliques destinés à améliorer leur capacité d'intégration⁶³⁻⁶⁵.

Evoqués dans le cadre de revêtements, les matériaux céramiques présentent bien plus de possibilités dans le domaine de la régénération osseuses. Ces céramiques seront présentées dans la partie suivante.

- ***Les céramiques***

Les céramiques font partie des premiers matériaux utilisés par l'homme. Elles sont aujourd'hui utilisées de différentes manières et notamment dans le domaine de notre étude qui concerne la régénération osseuse. Elles sont appelées dans ce cadre-là : biocéramiques.

Elles peuvent être réparties en deux catégories : les céramiques bioinertes et les céramiques bioactives, ainsi qu'en deux sous-catégories : les céramiques réhabitables (poreuses) et non-réhabitables (denses).

- i. Les céramiques bioinertes*

Un matériau est défini comme bioinerte lorsqu'il n'interagit pas avec l'environnement biologique auquel il est intégré tout en n'engendrant pas de rejet. Ce type de céramiques a historiquement été le premier à avoir été développé. Alors que de nombreuses céramiques sont testées, la première à se dégager comme substitut osseux est l'Alumine (Al_2O_3)⁶⁶ puis dans un second temps la Zircone (ZrO_2)⁶⁶ qui est la plus utilisée aujourd'hui. Ces céramiques ont une bonne biocompatibilité ainsi qu'une résistance à l'usure certaine. Leurs propriétés mécaniques sont largement supérieures à celles des céramiques en général et en font des candidats idéaux pour les prothèses de tête fémorales notamment. Bien que biocompatibles, elles ne sont cependant pas bioactives. De nombreuses études visent aujourd'hui à leur amélioration, *via* notamment l'introduction de porosité^{67,68} ou la modification de l'état de surface qui, comme cité plus haut, pourraient être des facteurs induisant la bioactivité. Dans cette démarche, ces céramiques sont parfois également utilisées avec d'autres céramiques dites bioactives.

ii. Les céramiques bioactives

Bien que de cristallinité différente et ayant des méthodes de mise en forme autres, de par leur composition chimique similaire, les bioverres et autres céramiques, typiquement phosphocalciques, présentent un intérêt capital dans le domaine des substituts osseux. Ces composés, dits bioactifs, ont été développés dès les années 70⁵⁰. Leur bioactivité semble provenir de leur habilité à précipiter une couche d'apatite faiblement cristallisée carbonatée à leur surface⁶⁹ au contact des fluides biologiques. Selon le matériau étudié, cette précipitation a lieu plus ou moins vite.

Les verres sont amorphes et principalement composés de $\text{SiO}_2/\text{CaO}/\text{Na}_2\text{O}/\text{P}_2\text{O}_5$. Leur vitesse de résorption peut être modifiée notamment *via* la proportion d'oxyde de silicium incluse⁷⁰. De même, grâce à l'ajout d'autres composés, il est possible d'engendrer une précipitation partielle menant à des bioverres-céramiques. Cette famille de composés est déjà largement utilisée. Des travaux de recherches visent cependant à modifier leur composition pour ajuster leurs propriétés, ou à diversifier les techniques de mise en forme permettant la création de nouvelles architectures plus adaptées⁷¹⁻⁷³.

D'autres matériaux similaires font eux aussi partie des substituts dits bioactifs et parmi elles, les phosphates, sulfates et carbonates de calcium. Tous ont montré un intérêt dans le domaine de la régénération osseuse de par leur bioactivité mais aussi leur variété de composition et leurs multiples méthodes possibles de mises en forme.

En raison de leur composition proche de celle du minéral osseux et pour tous les avantages précédemment évoqués, les phosphates de calcium font plus particulièrement l'objet de très nombreuses recherches.

Leur résorption *in vivo* est l'un de leurs avantages principaux. Elle est caractérisée par le taux et la vitesse de résorption. En fonction de ces critères, une interface est créée en surface du matériau et son intégrité détermine l'intégration aux tissus biologiques du matériau implanté. La dissolution du substitut doit suivre la vitesse de la formation osseuse, et, selon les sites d'implantation, également maintenir des propriétés mécaniques minimales.

Ainsi, la vitesse de résorption a-t-elle été un enjeu primordial du développement des substituts phosphocalciques. Cette vitesse est conditionnée à la fois par l'environnement dans lequel le substitut est établi et par la nature même du matériau implanté. Il existe deux mécanismes de résorption *in vivo*. Le premier repose uniquement sur la capacité du matériau implanté à se résorber dans le milieu biologique. Ceci peut être anticipé en évaluant la solubilité des matériaux implantés. La seconde repose sur l'action cellulaire et ne s'évalue qu'*in vivo*.

De même la résorption d'un substitut dépendra de plusieurs critères : sa nature cristalline et sa composition chimique mais aussi sa structure (matériaux poreux, poudre...). On

peut noter les différences de solubilité des phosphates de calcium dans les conditions biologiques. Leur mise en forme aura également une influence, comme le frittage^{74,75}. Un matériau phosphocalcique bioactif et biorésorbable implanté, soluble dans le milieu biologique, libérera du calcium et du phosphate. Ces derniers migrant à la surface par osmose viendront former une couche d'apatite biomimétique⁷⁶. C'est elle qui permettra l'adhésion à l'os naturel.

La composition des phosphates de calcium peut varier *via* l'introduction d'autres ions ou groupes ioniques dans la maille cristalline de certains d'entre eux, tels que du cuivre, du zinc voire des carbonates métalliques. Ces éléments peuvent ainsi modifier leurs propriétés physico-chimiques et biologiques.

Les phosphates de calcium purs (non carbonatés) sont souvent caractérisés par leur ratio molaire Ca/P comme présenté dans le Tableau 2.

Tableau 2 Récapitulatif des Phosphates de Calcium utilisés dans le domaine des biomatériaux

Nom	Abréviation	Formule	Ratio Ca/P	-log Ksp à 25°C*
<i>Phosphate monocalcique monohydraté</i>	MCPM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , H ₂ O	0,5	
<i>Phosphate monocalcique anhydre</i>	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,5	
<i>Phosphate dicalcique dihydraté</i>	DCPD (brushite)	CaHPO ₄ , 2H ₂ O	1	6,59 ⁷⁷
<i>Phosphate dicalcique anhydre</i>	DCPA (monétite)	CaHPO ₄	1	6,90 ⁷⁸
<i>Phosphate octocalcique</i>	OCP	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ , 5H ₂ O	1,33	96,16 ⁷⁹
<i>Phosphate Tricalcique amorphe</i>	ACP	Ca ₃ (PO ₄) ₂ , nH ₂ O	1,5	
<i>Phosphate tricalcique β</i>	β-TCP	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	28,9 ⁸⁰
<i>Phosphate tricalcique α</i>	α-TCP	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5 ⁸¹
<i>Hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique</i>	HAP	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	116,8 ⁷⁸
<i>Apatite non stœchiométrique</i>	ns-HAP	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (HPO ₄ , CO ₃) _x (OH) _{2-x}	1,34-1,66	
<i>Phosphate tétracalcique</i>	TTCP	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2	38 ⁸²

* K_{sp} : produit de solubilité, représente la constante d'équilibre de dissociation d'un composé ionique. Lorsque sa valeur est très faible, le $pK_{sp} = -\log(K_{sp})$ est utilisé.

Il est important de noter qu'ils ont tous des solubilités différentes en phase aqueuse. Ces dernières évoluent en fonction du pH et de la température du milieu dans lequel ils sont immergés ³².

La Figure 4 montre bien l'influence de la concentration de calcium et du pH sur la nature des phases phosphocalciques précipitées. Ainsi en jouant sur ces deux paramètres lors de la synthèse, il est possible de générer un phosphate de calcium précis.

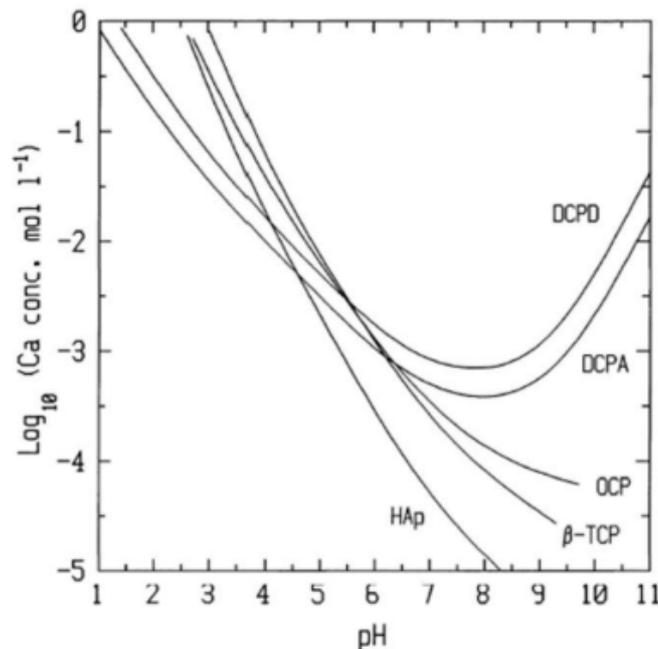


Figure 4 Isothermes de solubilité des différents phosphates de calcium dans le système $Ca(OH)_2-H_3PO_4-H_2O$ à 37 °C calculés avec le programme RAMESES³²

Les paragraphes qui suivent décrivent plus spécifiquement les phases phosphocalciques d'intérêt dans cette étude.

- **Les phosphates tricalciques (TCP)**

Les phosphates tricalciques sont caractérisés par leur ratio Ca/P égal à 1,5 et leur formule $Ca_3(PO_4)_2$. Il est possible de discerner trois phases cristallines différentes :

- La première est la phase apatitique ($Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$). Elle est souvent la phase intermédiaire menant par voie solide aux autres phases de TCP. Elle est extrêmement soluble et s'hydrolyse facilement en apatite biomimétique. Cette propriété en fait un phosphate de calcium intéressant dans le domaine de la régénération osseuse mais dont l'utilisation se limitera à certaines applications, notamment celles où le maintien des propriétés mécaniques à long terme n'est pas nécessaire ⁸³.

- La seconde phase est l' α -TCP. Cette phase, métastable à température ambiante, est stabilisée entre 1120 et 1470°C⁸⁴. Très soluble, cette phase est notamment utilisée dans les ciments pour sa capacité à s'hydrolyser en apatite⁸⁵.
- Enfin la phase β -TCP (rhomboédrique), est obtenue par voie solide et est stabilisée entre 850 et 1125°C. Moins soluble que l' α -TCP mais beaucoup plus que l'HA, elle est souvent utilisée dans le domaine de la régénération osseuse, autant dans les ciments que dans les substituts blocs ou poreux. Son alliage avec une phase HA est fréquemment employé car leurs différences de solubilité permettent l'obtention de substituts résorbables en différentes étapes⁸⁶. Dans cette famille, on peut notamment citer le produit CERAFORM® de la société Teknimed qui est un substitut poreux composé de β TCP/HA avec un ratio massique 35/65 et qui sera l'objet principal de notre étude.

- ***Brushite et Monétite***

La brushite (DCPD) et la monétite (DCPA) sont appelées phases dicalciques et sont les seuls phosphates de calcium à présenter un ratio Ca/P égal à 1 et fixe³². Leur différence réside dans leur degré d'hydratation. Le phosphate de calcium anhydre ou monétite (DCPA) s'obtient par chauffe du phosphate de calcium dihydraté ou brushite (DCPD) à 180°C ou par précipitation directe en milieu acide à 60°C.

Il est intéressant de constater l'absence de DCPA dans les minéralisations biologiques or ce dernier est plus stable en condition physiologique que le DCPD. Pourtant c'est le DCPD qui est observé dans le corps humain. Cela est dû à la différence de vitesse de croissance cristalline ; en effet le DCPD croît plus rapidement que le DCPA. La cinétique l'emporte donc sur la thermodynamique dans ce cas³².

Nous nous intéresserons ici principalement au DCPD. Ce dernier peut être un précurseur du phosphate de calcium octocalcique (OCP) mais aussi de l'apatite. En effet, à des pH compris entre 6,2 et 7,4 et des températures faibles (25-37°C), le DCPD en milieu aqueux s'hydrolyse en OCP. A des températures plus élevées il s'hydrolyse directement en une phase apatitique³². Il est également possible que le DCPD, au sein de fluides biologiques, soit dissous pour re-précipiter en phosphate amorphe (ACP) qui cristalliserait ensuite en OCP avant d'évoluer en apatite⁸⁷. La présence furtive et transitoire de ces différentes phases fait qu'il est parfois difficile de les mettre en évidence.

Le Tableau 3 ci-dessous présente les différentes caractéristiques du DCPD et les techniques de caractérisation permettant de les identifier.

Tableau 3 Tableau d'assignation de la Brushite pour différentes techniques de caractérisation⁸⁸

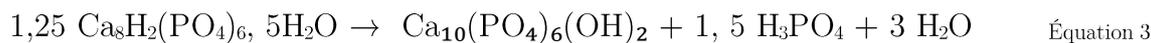
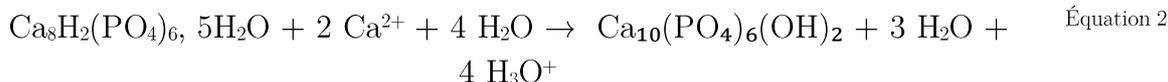
Brushite (DCPD)					
<i>Spectroscopie RAMAN</i>		<i>Spectroscopie Infrarouge</i>		<i>DRX</i>	
Bande de vibration (cm ⁻¹)	Groupements associés	Bande de vibration (cm ⁻¹)	Groupements associés	Pics (°)	Plans correspondants
1132	ν ₃ PO ₄	3000	OH-	13,57	020
1119		3600		24,36	021
1079		1652		34,11	041
1061		1217	ν ₅ Ca ₂ HPO ₄	35,58	-221
986	ν ₁ PO ₄	1062	ν ₆ Ca ₂ HPO ₄	39,88	-220
588	ν ₄ PO ₄	985	ν ₂ Ca ₂ HPO ₄	Fiche JCPDS	
525		872	ν ₃ Ca ₂ HPO ₄	# 09-0077	
411	ν ₂ PO ₄	526	ν ₄ Ca ₂ HPO ₄		
381					

- ***La phosphate octocalcique (OCP)***

Le phosphate octocalcique (OCP) se caractérise par la formule suivante Ca₈(PO₄)₄(HPO₄)₂, 5H₂O. Ce phosphate de calcium a un ratio Ca/P égal à 1,3.

Il peut être synthétisé par précipitation par double décomposition ou, comme évoqué précédemment, par hydrolyse d'une phase DCPD³². De la même manière que le DCPD, il fait partie des CaP dits acides. Cela signifie qu'il est plus soluble en milieu neutre par rapport aux CaP ne contenant que des PO₄³⁻⁸⁹. Cette dissolution engendrera une diminution de pH liée à la libération d'HPO₄.

L'OCP serait une phase transitoire, précurseur de l'apatite du minéral osseux. Il participerait à la minéralisation de la matrice collagénique. Cependant, sa présence a difficilement été prouvée à cause de différents facteurs. En effet, les cristaux formés sont de taille extrêmement réduite, mais surtout ils se transforment très rapidement pour former l'apatite osseuse, le milieu biologique étant un environnement dans lequel ce phosphate de calcium est métastable. De manière générale, l'hydrolyse de cette phase est conditionnée par plusieurs paramètres : le pH du milieu, les concentrations en ions présents, la taille des cristaux ainsi que la disponibilité des ions calcium. Elle se fait d'après les équations suivantes :



Le Tableau 4 ci-dessous présente les différentes caractéristiques de l'OCP et les techniques de caractérisation permettant de les identifier.

Tableau 4 Tableau d'assignation de l'OCP pour différentes techniques de caractérisation ⁶⁵

OCP					
<i>Spectroscopie RAMAN</i>		<i>Spectroscopie Infrarouge</i>		<i>DRX</i>	
Bande de vibration (cm-1)	Groupements associés	Bande de vibration (cm-1)	Groupements associés	Pics (°)	Plans correspondants
1112	v3PO4	1295	v3PO4	4,66	010
1079		1193		Fiche JCPDS	
1052		1137		00-026-1056	
1048		1121			
1036		1103			
1027		1077			
1011		1055			
1005		1037			
966		v1PO4		1023	v1PO4
959	1000				
619	v4PO4	962	v4PO4		
609		627			
591		601			
577		575			
523	v2PO4	560	v2PO4		
451		524			
427		466			
409		449			
353					

- *De l'hydroxyapatite aux apatites biomimétiques de synthèse*

Comme évoqué précédemment, les apatites représentent une famille de composés. L'hydroxyapatite stœchiométrique cristallise sous forme hexagonale (groupe d'espace P6₃/m). Sur la projection du plan (001), deux types de tunnels sont visibles : les premiers occupés par des ions calcium et les seconds par des groupements OH (Figure 5).

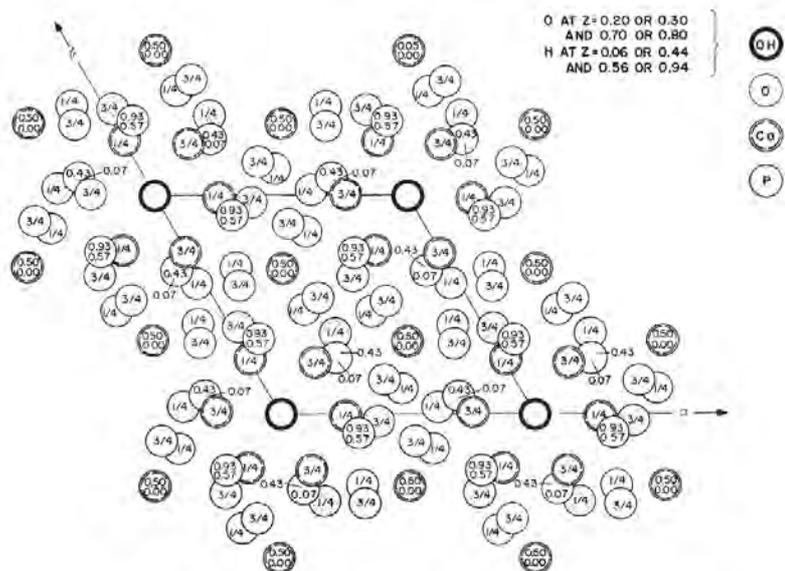


Figure 5 Projection (001) de la structure cristalline de l'hydroxyapatite ⁹⁰

La synthèse d'apatites, de par leur stabilité en milieu neutre à alcalin, est relativement aisée. L'obtention d'une hydroxyapatite peut se faire par voie sèche ou humide. Cependant une phase pure et bien cristallisée requiert l'utilisation de produits de départ exempts d'impuretés et une calcination à haute température (1000°C) ⁹¹ .

L'hydroxyapatite stœchiométrique calcinée est peu soluble à pH physiologique ⁶⁹ et, par conséquent, chimiquement très stable.

On peut alors s'interroger sur la question de leur résorption *in vivo*. Elle a été prouvée comme existante mais d'évolution très lente, notamment lors d'études sur des revêtements de prothèse métalliques. Sur ce type de matériau, comportant une couche fine d'HA (60+/-15 µm) cette dernière a été considérée comme complètement résorbée autour de 8 ans après l'implantation ⁸² . Des études ont également été menées sur des substituts composés uniquement d'HA, ou de mélanges d'HA/βTCP tels que les substituts poreux BCP (BiCalcium Phosphate). Alors que le βTCP se résorbe plus rapidement, l'HA s'est ici également montrée très lente à se résorber ⁹³⁻⁹⁶ .

Ce phosphate de calcium est surtout utilisé pour sa composition chimique proche de celle du minéral osseux et notamment pour ses propriétés ostéoconductrices ⁵⁰, qui en font un matériau privilégié pour la régénération osseuse.

En spectroscopie infrarouge, RAMAN comme en DRX, l'hydroxyapatite possède une signature singulière. Les bandes et pics correspondants sont répertoriés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 Tableau d'assignation de l'HA avec différentes techniques de caractérisation ⁸⁸ .

Hydroxyapatite					
<i>Spectroscopie RAMAN</i>		<i>Spectroscopie Infrarouge</i>		<i>DRX</i>	
Bande de vibration (cm ⁻¹)	Groupements associés	Bande de vibration (cm-1)	Groupements associés	Pics (°)	Plans correspondants
1077	ν ₃ PO ₄	3572	OH	30	2
1064		630		37	211
1057		1090	ν ₃ PO ₄ ³⁻	37,5	112
1048		1030		38,4	300
1041		960	ν ₁ PO ₄ ³⁻	39,8	202
1034		600	ν ₄ PO ₄ ³⁻	46,6	310
1029		570		54,8	222
961		ν ₁ PO ₄	474	ν ₂ PO ₄ ³⁻	58,3
614	ν ₄ PO ₄				Fiche JCPDS
607					# 09-0432
591					
580	ν ₂ PO ₄				
448					
433					

L'hydroxyapatite n'est cependant pas la seule apatite à être utilisée dans le domaine de la substitution osseuse. Il a déjà été évoqué que l'os est en réalité une apatite carbonatée, faiblement cristallisée et sous-stœchiométrique. Ce type d'apatite est synthétisable en laboratoire.

Alors que l'HA peut être synthétisé à haute température, les apatites biomimétiques ne peuvent être préparées qu'en solution. Selon la quantité et le type de substitution voulus, deux types de synthèses sont possibles : la précipitation par double décomposition ou l'hydrolyse de phosphates de calcium métastables tel que le phosphate de calcium amorphe ou les phosphates dicalciques (dihydraté ou anhydre) ⁹⁷ .

Il est possible d'ajuster leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques et de moduler leur vitesse de résorption et leur réactivité ⁹⁷ . Il est à noter que les paramètres de pH et de température jouent dans ces synthèses un rôle majeur ³⁷ .

Alors que la synthèse par double décomposition forme directement l'apatite au ratio Ca/P désiré, la synthèse par hydrolyse est plus lente et ne permet jamais d'atteindre la stœchiométrie. Dans le cas de ce type de synthèse, on peut souligner que la vitesse de formation de l'apatite biomimétique est très lente comparée à ses précurseurs comme le DCPD ou l'OCP. Bien que thermodynamiquement plus stable que ces phases, sa cinétique de formation est beaucoup plus lente.

Il est important d'évoquer les difficultés de caractérisation de cette phase apatitique faiblement cristallisée, surtout en cas de mélanges de phosphates de calcium et en particulier en présence d'autres phases hydratées comme l'OCP. Cette apatite étant mal cristallisée; il est difficile de l'observer en DRX notamment. On peut cependant noter la présence de la couche ionique hydratée sur les spectres FTIR par la détection de bandes spécifiques. Les décompositions de la zone 650-500 cm^{-1} permettent ainsi de mettre en valeur la présence de deux bandes, à 530-534 et 617 cm^{-1} , respectivement témoin d'ions HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} non apatitiques (donc non observées sur le spectre de l'hydroxyapatite stœchiométrique). Ces groupes ioniques font partie de la couche hydratée présente sur ce type d'apatite.

Il est possible d'aller plus loin dans le domaine de la régénération osseuse en allant vers l'ajout de composés - ioniques ou moléculaires - et ayant des propriétés spécifiques aux matériaux décrits ci-dessus. Ainsi, le domaine de la fonctionnalisation des matériaux est un domaine de recherche en expansion, permettant de moduler encore plus avant les potentialités des substituts en fonction des applications médicales visées.

13 Fonctionnalisation des biomatériaux

La fonctionnalisation des substituts répond à une évolution de ces derniers. En effet, pour aller plus loin et leur conférer de nouvelles propriétés telles que des propriétés capables de réduire les risques liés à l'intervention chirurgicale (inflammations, infections...) ou pour libérer localement des ions bioactifs capables d'impacter l'activité cellulaire (ex : stimuler les ostéoblastes), de nombreuses stratégies ont été mises en place.

1.3.1 Les problèmes post chirurgicaux

L'un des premiers risques lors d'une chirurgie est le risque infectieux.

Lors par exemple des chirurgies de l'appareil ostéo articulaire, des risques d'infections dites « nosocomiales » existent. Les infections nosocomiales désignent des infections contractées dans une institution de santé (INSV 2009). Les sources peuvent être à la fois endogènes ou exogènes et certains facteurs accentuent les risques (l'âge, les traitements, la pathologie...).

La prévention d'infections sur les sites d'implantation osseuse semble donc primordiale. Différentes stratégies antibactériennes sont ainsi développées, certaines passives en empêchant les pathogènes d'adhérer à la surface ⁹⁹, d'autres actives avec l'intégration d'agents anti bactériens.

Il est important de souligner que la nature du matériau utilisé joue un rôle de même que son état de surface ¹⁰⁰.

Un second problème pouvant nécessiter un traitement en cas de chirurgie de l'os est l'inflammation. Celle-ci, lorsqu'elle est peu importante, peut être considérée comme un processus bénéfique. Le phénomène peut être défini comme suit : lors d'une lésion, le corps doit réagir vite. Il forme alors un caillot puis augmente le volume sanguin aux alentours afin d'y amener différents types de cellules à la fois de défenses immunitaires mais aussi de cicatrisations. Cela forme un gonflement, appelé hématome, qui se résorbe avec le temps. Si dans les tissus mous ce phénomène est bénéfique, lorsqu'il s'agit de l'os, l'hématome peut rester beaucoup plus longtemps et être de taille très importante. Dououreux, ce phénomène pourrait être diminué tout en gardant son intérêt biologique ¹⁰¹.

Lors de l'implantation d'un substitut phosphocalcique, une légère inflammation diminue le pH local en engendrant une dissolution superficielle de l'implant avec une libération locale d'ions qui seront utilisés par les ostéoblastes pour former la néo-matrice osseuse. Cette inflammation et les cellules l'accompagnant pourraient également jouer un rôle important dans la vascularisation de l'implant ¹⁰².

a. Introduction de principes actifs

i. *Agents antibiotiques*

En vue de résoudre les problématiques d'infection lors de la chirurgie, différentes stratégies peuvent être mises en place. Bien entendu, des solutions systémiques existent mais elles nécessitent des traitements au long cours et restent peu efficaces en raison du manque d'accessibilité.

Parmi les solutions locales classiquement utilisées, la plupart utilisent des antibiotiques classiques : la gentamicine, la tobramycine, la vancomycine...¹⁰³. Dans ce cadre, les billes de PMMA chargées d'antibiotiques sont particulièrement utilisées. Elles sont placées à l'intérieur du corps, en contact avec la zone à risque avant suture.

D'autres recherches visent à ajouter les antibiotiques directement aux phosphates de calcium. Différents supports à base de phosphates de calcium ont été utilisés. Des études portant sur l'ajout d'actifs *via* un mélange de solutions d'antibiotiques ont été réalisées avec les ciments¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. D'autres ont porté sur l'adsorption sur des granules et blocs poreux de β -TCP ou d'HA via des imprégnations/séchages de fluides^{107,108} (eau, sang, fluides « Bone Marrow Aspirate »...) riches en antibiotiques. Permettant d'amener les actifs directement sur sites, ils évitent ainsi les surdoses et l'utilisation abusive de ce type de substances. De plus, les phosphates de calcium ont montré dans ce domaine une capacité à réguler le profil de libération des molécules et permettent ainsi une libération prolongée. Certains travaux ont également intégré les antibiotiques dans les structures phosphocalciques grâce à des revêtements de polymères, modulant ainsi le profil de relargage¹⁰⁹.

Bien que l'utilisation ciblée, grâce aux dispositifs décrits ci-dessus, soit une avancée qui permette de mieux gérer les doses administrées, l'usage d'antibiotiques pose aujourd'hui de plus en plus question car celui-ci est souvent inapproprié ou inefficace. De plus, les surdoses et l'utilisation systématique de ces produits conduisent à des problèmes d'antibiorésistance, devenus une préoccupation majeure de santé publique¹¹⁰.

ii. *Agents anti-inflammatoires*

Comme évoqué antérieurement, l'inflammation peut devenir rapidement un problème en cas de chirurgie de l'os c'est pourquoi des composés anti-inflammatoires sont systématiquement prescrits. Cette solution est dite systémique puisqu'elle consiste à prendre des comprimés par voie orale, le principe actif étant alors diffusé dans l'ensemble du corps, y compris dans la zone à risque. Les molécules utilisées de manière générale sont des corticoïdes, anti-inflammatoires stéroïdiens. En effet, les anti-inflammatoires dits non stéroïdiens, les plus courants et largement utilisés -voire en vente libre-, auraient des effets négatifs sur la régénération osseuse¹¹¹.

Il serait donc intéressant de développer des substituts possédant intrinsèquement des propriétés anti-inflammatoires pour une action locale. Ainsi dans les ciments notamment

des recherches ont été menées pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires de composés directement liés à des phosphates de calcium tels que de l'acide salicylique et de l'Indométacine ¹¹² .

b. Introduction d'ions bioactifs

Comme il a été dit, les questions d'antibiorésistance sont au cœur des préoccupations de santé actuelles. Une des stratégies développées pour contourner ce problème est l'utilisation d'éléments métalliques. Ces derniers ont en effet un large spectre d'action, les rendant d'un intérêt certain. Des espèces se dégagent comme le cuivre, l'argent, le zinc...

i. Les agents métalliques anti-infectieux

• L'argent

L'argent peut conférer différentes propriétés aux matériaux auxquels il est ajouté. Son action est à la fois inhibitrice de la formation de biofilm¹¹³⁻¹¹⁶ et de la prolifération bactérienne¹¹⁷⁻¹²⁰ et anti-virale¹²¹ . Son efficacité anti-bactérienne serait même supérieure à celle observée pour les composés similaires dopés au cuivre ou au zinc. Bien que de nombreuses recherches soient menées sur ce composé, il s'avère que ses mécanismes d'action sont encore mal connus. Il est communément admis que l'argent a une affinité particulière avec des groupements de protéines. Il interviendrait ainsi directement sur la synthèse de l'énergie au sein des bactéries¹²² mais aussi sur la perméabilité de leur membrane ou encore leur ADN, rendant ainsi impossible toute réplication^{123,124} .

Des doses bien définies de cet agent sont donc bénéfiques pour le genre d'application envisagée ici. L'argent est le seul dopant utilisé dans cette étude qui ne soit pas présent naturellement dans l'organisme. Son activité bénéfique antibactérienne doit être mise en regard avec sa cytotoxicité. En effet, alors qu'une quantité de seulement 35 ppb montre déjà des activités antibactériennes¹²⁴, une dose trop importante peut être létale pour les cellules. La concentration maximum dans les fluides biologiques aux abords de matériaux dopés ne doit donc pas dépasser 2,5µg/mL¹¹⁹ . Le profil de libération de cette espèce est alors un élément clé qu'il faut maîtriser. Il faut également prendre en compte la nature du milieu dans lequel l'argent est libéré. Des études ont montré qu'au-delà de 1ppm l'Ag se complexait avec le chlore et perdait ses propriétés antibactériennes¹²⁵ .

Des phosphates de calcium substitués à l'argent sont déjà utilisés. Les substitutions semblent se produire entre les calciums de type I et l'argent. Sa charge ionique est de 1 et non de 2 contrairement au Calcium, ce qui entraîne un déséquilibre de charge limitant son taux d'intégration au sein de la structure. La quantité maximale d'Ag introduit semble être très dépendante du mode de synthèse (sol-gel, co-précipitation, échange ionique...).

Lors de synthèses par co-précipitation, le pH environnant serait également un paramètre important quant à la nature du composé argenté se formant ⁴⁹. Les conditions acides favorisent la formation d'Ag₃PO₄ alors que des conditions alcalines permettent d'obtenir des apatites nanocristallines monophasées enrichies en argent bien qu'à des taux plus faibles qu'à pH neutre. Alors que le taux théorique de remplacement de Ca²⁺ par Ag⁺ dans une hydroxyapatite a été défini comme étant de 20% ¹²⁶, le taux expérimental, bien que variant beaucoup dans la littérature, a pu n'être que de 1,8% sans apparition de phase secondaire comme un phosphate d'argent par exemple ¹²⁷.

Contrairement à des espèces comme le zinc ou le cuivre, la présence d'argent n'influencerait pas la croissance cristalline des phosphates de calcium ⁴⁹.

Enfin, il est à noter que ce composé n'ayant pas les mêmes dimensions que le calcium (rayon atomique), son ajout à la maille cristalline a une influence sur le volume de cette dernière ¹²⁸. Cela a donc également une influence sur les pics de diffraction, les raies (hk0) se décalant vers les hauts angles alors que les (00l) se décalent vers les bas angles ¹²⁶.

- **Le cuivre**

Le cuivre est un élément naturellement présent dans le corps humain. Il est essentiel pour le métabolisme osseux ¹²⁹ et participe à la production de radicaux libres dans les tissus régénérés ¹³⁰. Un adulte a dans son corps 100-150 mg de cuivre et doit maintenir un apport journalier de 30µg/kg. Ses os en contiennent en moyenne 0,6µg/g ¹³¹.

Dans le cadre de la régénération osseuse et de l'accélération de ce processus, cet élément a largement été étudié depuis quelques années, permettant une alternative peu coûteuse, plus stable et plus sûre que les approches génétiques ou les facteurs de croissance ¹³². Ses activités sont multiples : il serait à la fois antibactérien, stimulant de l'angiogenèse (création de nouveaux vaisseaux sanguins) et de la production d'ostéoblaste ¹³²⁻¹³⁴.

Concernant son activité antibactérienne, différents mécanismes sont mis en jeu, c'est pourquoi, bien que certaines études ¹³⁵ aient montré une possibilité de résistance antibactérienne, cet élément reste préférable à des traitements antibiotiques par exemple. Le cuivre sous sa forme ionique peut réagir avec certaines protéines et ainsi mettre en danger la perméabilité membranaires des bactéries ^{135,136}. De même il peut intervenir sur l'alimentation en énergie et la pression interne de la bactérie, mais aussi directement sur son ADN empêchant ainsi sa reproduction^{137,138}. Sous forme ionique, son activité antibactérienne serait encore plus puissante sur les bactéries à Gram positif ¹³³.

Une quantité trop importante de ce dopant peut cependant être nuisible à la production d'ostéoblaste ¹³⁹. Introduit sous forme CuCl₂, le cuivre a montré une cytotoxicité plus importante que celle du zinc ¹⁴⁰. Il est nécessaire de souligner que l'activité est surtout dépendante de la cinétique de libération du cuivre dans le milieu et non de la quantité intrinsèque dans le matériau. De même, la forme sous laquelle est intégré le cuivre est très importante. Des études menées sur des phosphates de calcium contenant des oxydes

de cuivre ont montré une certaine cytotoxicité due à l'augmentation du pH environnant¹³⁴. Il est à noter que ce phénomène pourrait aussi être lié à la présence d'oxyde quel qu'en soit le type.

Cet élément peut être intégré de deux manières dans la structure même des phosphates de calcium : lors de la synthèse par co-précipitation^{137,141,142} ou par échange ionique postérieurement à la synthèse^{131,143,144}.

Il existe différents principes de substitutions du cuivre dans les apatites. Cet élément se substitue principalement sur les sites de Ca(II)^{142,145} ou par mécanisme interstitiel à des températures élevées (>100°C)¹³⁴.

Il intégrerait parfois les lacunes et/ou tunnels hexagonaux¹⁴⁴. Plus la quantité de cuivre intégrée est importante, plus la composition de l'apatite formée est éloignée de la stœchiométrie, ceci étant indiqué par une baisse du ratio Ca/P¹⁴².

Les paramètres a et c de la maille cristalline de l'apatite diminuent légèrement et par conséquent, son volume également lorsque la quantité de cuivre intégrée augmente. Une légère baisse de la cristallinité est également constatée^{134,137,146}, ce qui est cohérent avec le fait que le rayon atomique du cuivre est plus petit que celui du calcium. Cet élément peut donc être considéré comme inhibiteur de la croissance cristalline, ce qui s'avérera être un paramètre déterminant de notre étude.

ii. Le zinc, agent anti-inflammatoire

Le zinc est lui aussi un élément indispensable du métabolisme humain. Le corps d'un adulte peut contenir jusqu'à 1300-2300 mg dont 28% est stocké dans la masse osseuse. Ses actions sont multiples. Il accélérerait la croissance osseuse, aiderait à la différenciation des cellules¹⁴⁷ et aurait même une activité anti bactérienne. Des études ont également montré une activité anti-inflammatoire, le différenciant des autres éléments métalliques habituellement utilisés.

Les études concernant son activité sur les cellules osseuses montrent une fois de plus un effet dose-dépendant important. Une trop grande quantité peut en effet entraîner une inflammation des tissus alentour. En revanche une dose adaptée agit directement sur les facteurs de croissance de l'os. Il a d'ailleurs été prouvé que le zinc est un élément nécessaire à la croissance humaine¹⁴⁸. Une déficience chez l'enfant peut causer de graves retards de croissance. Il inhiberait les ostéoclastes¹⁴⁸ et stimulerait la croissance des ostéoblastes^{144,149}. De manière générale il augmente la vitesse de cicatrisation en favorisant la multiplication cellulaire. Il reste l'élément métallique le moins cytotoxique. L'effet du zinc est plus bactériostatique qu'antibactérien, contrairement au cuivre et à l'argent¹⁵⁰. Cet élément intervient directement sur l'ADN des bactéries¹³⁷. Il peut également se lier à la membrane et mettre en péril la perméabilité^{137,151}, bloquer la respiration¹⁵² et diminuer la fertilité des bactéries.

De la même manière que d'autres éléments métalliques, il existe deux voies d'intégration du zinc aux phosphates de calcium, lors de la synthèse de ces derniers via un procédé de

co-précipitation ou de post précipitation avec échange ionique. La place que le zinc vient prendre au sein de la structure apatitique fait encore débat.

Certains auteurs proposent l'intégration du zinc sur les sites OH au cœur de la maille hexagonale ^{153,154}. D'autres auteurs positionnent la substitution du zinc sur les sites de calcium de type II ¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Le rayon atomique du zinc étant plus petit que celui du calcium, la maille cristalline serait alors modifiée. Les paramètres a et c diminuent ainsi que le volume de la maille ¹⁵⁸. Il en découle des cristaux de plus petite taille et une diminution de la cristallinité.

1.3.2 La stimulation

La médecine régénérative est devenue un enjeu majeur ces dernières années. Le domaine de la régénération osseuse est le domaine s'étant développé le plus tardivement vers ces tendances.

Malgré tout, l'ingénierie tissulaire osseuse ¹⁵⁹ a enfin pris son essor. Ainsi, dans ce cadre, il a été défini que le substitut osseux idéal serait la combinaison d'un support et d'éléments favorisant son activité. Ces derniers peuvent être intégrés au support sous forme ionique tels que les supports phosphocalciques, ou d'origine biologique tels que des cellules souches ou spécialisées ¹⁶⁰.

L'étude des cellules de la régénération osseuse a permis de découvrir la protéine BMP (Bone Morphogenetic Protein). Cette dernière permet de déclencher la cascade d'interactions biologiques menant à la création d'une nouvelle matrice osseuse. Son étude a mené à différentes stratégies, notamment cellulaires ¹⁶¹ ou géniques ¹⁶², visant à stimuler la régénération osseuse.

Cependant, l'utilisation de ces techniques, bien que pouvant être favorable, est à nuancer, notamment sur certains sites peu vascularisés. Les questions de gestion et de sécurité de ce genre de matériel biologique sont également à évoquer- un suivi, stockage, transport et des exigences réglementaires très spécifiques étant appliquées- c'est pourquoi il est intéressant de développer des substituts synthétiques amenant par eux-mêmes une forte ostéogénèse. Dans le cadre de l'utilisation de supports phosphocalciques, différentes espèces ioniques, déjà connues par le corps humain, présentent donc un intérêt évident.

a. Le strontium

Le strontium est un élément naturellement présent dans le corps, en particulier dans le plasma humain ¹⁶³ (0,11-0,31 μ mol.L⁻¹). La plupart des réserves de cet élément se trouvent dans l'os. Cependant, selon l'âge ou l'activité physique, sa teneur peut varier de manière significative ^{164,165}.

Des études ont montré son rôle dans la formation osseuse et la re-minéralisation d'où son intérêt thérapeutique certain ^{38,165,166}. Il aurait la capacité d'inhiber l'activité des ostéoclastes et d'augmenter celle des ostéoblastes d'où le fait qu'on l'a proposé comme

traitement contre les effets de l'ostéoporose. Il améliorerait également la synthèse du collagène dans l'os ¹⁶⁷⁻¹⁶⁸ .

Une quantité trop importante peut à l'inverse diminuer la densité osseuse et inhiber l'absorption du calcium.

Dans les apatites, le strontium se substitue de manière préférentielle au calcium de type II ^{iv} . Le strontium venant également modifier la structure cristalline, son intégration est notamment visible lors d'analyses aux rayons X. Des modifications sur les bandes des groupements hydroxyles sont également nettement visibles en IR ¹⁷⁰ . Bien que cela dépende du taux d'intégration du strontium, ce dernier semble avoir une influence sur la vitesse de cristallisation de l'OCP mais également et de manière plus marquée sur celle de l'HA. Il allongerait aussi la durée de maturation de l'OCP vers l'apatite ¹⁷¹ . Concernant les PCA, lors d'immersions en solution riche en strontium, il a été montré que le strontium peut intégrer la phase cristalline en faible quantité mais reste principalement dans la couche hydratée, en proportion variable selon la maturation du cristal. Quoique de diamètre atomique plus important que certains composés comme le magnésium, il s'intègre bien mieux à la structure apatitique. Il est alors réversible en cas d'échange ionique inverse avec du calcium ⁱⁿ .

Comme l'intégration de cet ion métallique -comme d'autres- déforme la maille de l'apatite, il augmenterait également la solubilité du matériau en phase aqueuse ^m .

b. Magnésium

Le magnésium est le quatrième cation le plus présent dans le corps humain avec 1mol pour un corps de 70 kg. La moitié de ce magnésium est stockée dans les os. La concentration des fluides extracellulaires est de 0,7-1,05mmol/L et cette homéostasie est maintenue grâce aux intestins et aux reins. Si cette concentration est trop importante ($>1,05\text{mmol/L}$), elle peut entraîner des paralysies musculaires, de l'hypotension ou encore des détresses respiratoires ¹⁷⁴ .

Ce métal aurait la propriété de stabiliser l'ADN et l'ARN mais aussi et surtout un effet stimulant sur la régénération osseuse ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ .

Ainsi il est utilisé dans le domaine de la régénération osseuse. Il a été étudié sous différentes formes, la plupart du temps pures, sous forme métallique et comme matériaux poreux. Sous son aspect poreux, il présente des propriétés mécaniques similaires à l'os et semble alors une solution bien adaptée dans le cadre de la régénération osseuse de sites porteurs. Cependant, de nombreux problèmes de corrosion en font un objet d'étude à largement approfondir et optimiser ¹⁷⁸ .

Il est parfois allié aux phosphates de calcium dans le but d'améliorer leurs propriétés stimulantes dans le domaine de la régénération osseuse. Il peut être intégré, principalement lors de co-précipitation, sous forme d'ions à la structure apatitique sur les sites Ca(I) et Ca (II) bien que de manière préférentielle sur le I. La quantité intégrable est limitée à 13%mol ¹⁷⁹ . Lors d'échanges ioniques de courtes comme de longues durées, dans le cas d'apatite, le Mg n'intègre pas le cœur apatitique. Cela pourrait être dû à sa tendance à s'entourer de molécules polaires telles que les molécules d'eau. Les complexes ainsi formés auraient du mal à pénétrer dans la couche hydratée et à s'y fixer. De plus, il est possible qu'une fois fixés ces complexes empêchent la diffusion d'autres ions ³⁸ .

De manière générale, le magnésium aurait une forte propension à inhiber la cristallisation des phosphates de calcium ¹⁸⁰⁻¹⁸² . Nous verrons par la suite que cela en fait un mauvais candidat comme agent dopant dans le cadre de notre étude dans laquelle la cristallisation d'une nouvelle phase de phosphates de calcium sera un enjeu majeur.

Après avoir défini les phosphates de calcium et étudié les différentes espèces qui pourraient y être intégrées pour leur conférer des propriétés supplémentaires, les différentes possibilités de mises en forme de ces matériaux vont être présentées.

14 Procédés de mises en forme des phosphates de calcium

Les phosphates de calcium sont largement utilisés dans le domaine de la régénération osseuse, notamment pour leur facilité de mise en forme. Ainsi sont-ils utilisés sous formes de ciments, de revêtements, ou encore comme dispositifs («scaffolds ») denses ou poreux^{48,18,84}. Ces différents produits ont chacun des spécificités et donc des applications différentes.

Les substituts sur lesquels nous nous focaliserons dans cette étude sont des substituts solides poreux. Ce type de produits possède les propriétés des phosphates de calcium frittés : ils permettent de maintenir des propriétés mécaniques en compression et de remplir des défauts importants, mais permettent également une invasion cellulaire de par une porosité contrôlée adaptée à la réhabilitation osseuse. Différents paramètres ont été déterminés comme primordiaux pour ce genre de substituts denses poreux.

Un des facteurs essentiels conditionnant les propriétés de ces substituts est leur architecture¹⁵⁷ et leur porosité. En effet, la maîtrise de cette dernière autorise la migration et la prolifération des ostéoblastes ainsi que des cellules mésenchymateuses et favorise la vascularisation des implants¹⁸⁵. Cet envahissement cellulaire est l'une des clefs de voûte qui conduit à l'ostéointégration des biomatériaux osseux. Néanmoins, le volume poreux et/ou le diamètre des pores optimum qui permettraient une réponse biologique de l'organisme la plus favorable possible ne peuvent pas être définis *a priori* avec précision. En effet, la diversité des tissus osseux vivants (de densités variables) et la variété des matériaux de substitution (de solubilité et résorbabilité variables) ne permettent pas de déterminer des paramètres structuraux généraux utilisables à l'ensemble des matériaux de comblement osseux. Ceux-ci devraient, idéalement, pouvoir être adaptés au site d'implantation en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques et mécaniques du tissu hôte.

En revanche, de nombreux travaux portant sur l'importance des paramètres structuraux des biomatériaux ont permis de mettre en évidence quelques règles dimensionnelles à respecter. Ainsi, Hulbert et al.¹⁸⁶ ont montré que les pores doivent présenter un diamètre supérieur à 100 μm pour permettre d'accueillir les cellules osseuses mais de nombreuses études ont exposé qu'un diamètre de pores supérieur à 300 μm permettait d'améliorer l'ostéogénèse. De plus, cette porosité doit idéalement être interconnectée^{187,188}. La présence de micropores (de diamètre inférieur à 10 μm) et de nanopores joue par ailleurs un rôle important dans l'efficacité de reconstruction de ces matériaux, notamment sur leurs propriétés ostéoconductrices et/ou ostéoinductrices¹⁸⁹⁻¹⁹¹. De par leur taille, ces pores ne peuvent pas accueillir de cellules mais peuvent servir à leur ancrage dans l'implant. Webster et al.¹⁹² ont découvert que les ostéoblastes adhéraient mieux sur des céramiques nanoporeuses, alors que les fibroblastes y adhéraient moins bien.

Il est possible que ces pores agissent comme un réservoir de biomolécules et facteurs biologiques à l'origine de la formation de néo matrice osseuse¹⁹³⁻¹⁹⁶. Ils pourraient

également simplement augmenter la surface disponible grâce à une importante surface spécifique^{193,197} pour la reprécipitation de l'apatite, première étape de l'ostéointégration. Enfin, ils pourraient générer une force capillaire^{198,199}. Cette dernière permettrait l'invasion des fluides au cœur de la matrice et favoriserait ainsi une meilleure distribution de la matrice néo-formée ainsi qu'une épaisseur plus importante *in vivo*.

De récentes études ont ainsi montré la présence de collagène, de cellules, voire de minéral osseux dans les micropores des matériaux de phosphates de calcium²⁰⁰⁻²⁰³.

1.4.1 Mise en forme des céramiques poreuses

De nombreuses méthodes ont été développées pour produire des matériaux poreux de céramiques phosphocalciques HA pure, β TCP ou HA/TCP (Biphasic Calcium Phosphate-BCP). Ces techniques sont adaptées selon la porosité visée tout en optimisant les propriétés mécaniques en compression, élément essentiel pour ce type de produit.

Parmi les méthodes développées il est possible d'évoquer le *freeze casting*²⁰⁴, le *gas foaming*²⁰⁵ ou plus récemment le *foaming in situ*²⁰⁶. Ces techniques visent à stabiliser une émulsion avant la phase de frittage finale, faisant coalescer les grains de céramiques²⁰⁷.

L'impression 3D est l'une des techniques actuellement étudiée. Elle pourrait permettre d'améliorer le compromis : propriétés mécaniques/pourcentage de porosité, cette problématique étant l'une des plus compliquées à satisfaire²⁰⁸. Comme cité précédemment, une porosité maximale est souhaitable mais également le maintien des propriétés mécaniques en compression. Ce type d'impression pourrait aussi permettre la production de formes beaucoup plus complexes voire personnalisées pour le patient.

Différentes techniques d'impression 3D sont actuellement développées.

La technique « lit de poudre » permet à l'aide d'un laser de venir fritter localement la couche de poudre préalablement répandue. Des techniques à base d'extrusion de mélange céramique et liant organique sont également étudiées. Ces procédés très prometteurs sont encore à optimiser²⁰⁹. De très récentes recherches envisagent même une double impression, métallique puis céramique, ce qui permettrait d'obtenir des substituts parfaitement personnalisés et dont les propriétés, notamment mécaniques, pourraient être grandement améliorées²¹⁰.

Des travaux ont également permis la production de substituts de β TCP à la porosité parfaitement contrôlée grâce à un réseau de billes de polymère (PMMA)²¹¹. Ces dernières sont partiellement dissoutes en surface pour former un réseau plus ou moins dense de polymère. Cette empreinte est ensuite imprégnée d'un mélange eau/céramique puis frittée, cette dernière étape permettant d'obtenir le réseau poreux final. L'interconnectivité et la porosité sont ajustables en fonction de la taille des billes utilisées. Cette technique permet un excellent contrôle de ces deux paramètres et la possibilité de produire des substituts avec différentes porosités permettant d'imiter au plus près la structure osseuse naturelle.

Bien que prometteuses, ces techniques ne sont pas encore réellement présentes à l'échelle industrielle.

Le moyen de mise en forme de matériaux poreux le plus répandu dans le domaine industriel reste aujourd'hui la réplique de substrat obtenu par imprégnation. En mousses polymères, ces substrats permettent des taux de porosité importants avec une tortuosité et une gamme de pores contrôlés mais aussi interconnectés ²⁰⁷. Cette technique de mise en forme est également facilement mise en œuvre, ce qui en fait une technique très utilisée dans le domaine industriel.

Les mousses polymères, souvent en polyuréthane, sont pressées afin d'évacuer l'air présent puis trempées dans un mélange dit « barbotine ». Cette barbotine est composée d'un mélange liquide, contenant notamment du PEG (Poly Ethylène Glycol) et une poudre de céramique. Les proportions de poudre dans ce mélange font partie des paramètres pouvant faire varier la porosité du substitut obtenu. Une fois imprégnées, les mousses sont séchées puis frittées (Figure 6). Lors de la dernière étape, les hautes températures permettent d'enlever toutes traces de polymère tout en rendant intègre la phase céramique.

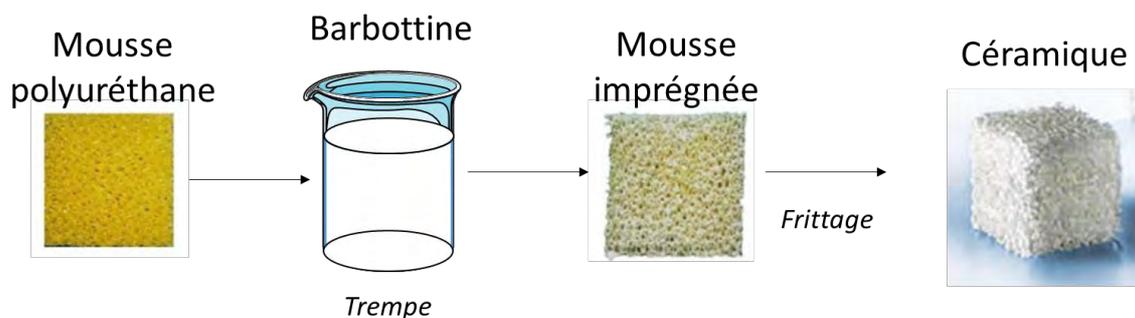


Figure 6 Procédé d'imprégnation de mousse polyuréthane

C'est cette dernière technique qui a été employée afin de préparer les substituts utilisés dans cette étude. Ce sont des cubes de 3x3 mm d'HA/ β TCP (65/35) à la porosité définie (100-400 μ m), qui seront décrits en détail dans la partie suivante.

De tels substituts présentent des macroporosités maîtrisées mais l'ajout de microporosités ou de porosités additionnelles de tailles nanométriques pourrait conférer des propriétés d'ostéointégration supplémentaires. De plus, les matériaux utilisés sont des céramiques biphasiques constituées d'un mélange 35% HA et 65% β TCP (m/m). Or il a déjà été évoqué que ces phosphates de calcium ne sont pas les plus bioactifs.

L'objectif de cette étude est donc de modifier la surface lisse et peu réactive de ces matériaux poreux de manière à obtenir une porosité nanométrique en surface créée par l'enchevêtrement et l'arrangement de nanocristaux hautement réactifs.

Une modification de surface pourrait également permettre une fonctionnalisation des céramiques traitées par ajout d'agents biologiquement actifs (anti-infectieux, anti inflammatoires ...).

Les différentes techniques de modification de surface des céramiques sont présentées ci-après.

1.4.2 Revêtements

Le substrat étudié ici étant des céramiques, seules les techniques permettant la précipitation de phases d'intérêt telles que le DCPD, l'OCP ou l'apatite biomimétique seront présentées.

a. Plasma à froid

Les techniques de revêtement par plasma s'adressent uniquement aux substrats métalliques. Alors que le revêtement par torche à plasma ²¹² est une technique de revêtement maintenant largement étudiée, elle ne permet cependant pas la création de revêtements d'apatites biomimétiques sur des matériaux céramiques. En effet, dans ce procédé les poudres de céramiques, avant d'atteindre le support, passent par une torche à plasma dont l'atmosphère chargée possède une température comprise entre 5000 et 10000°C. Ainsi l'utilisation de températures élevées ne permet pas l'emploi de composés thermiquement instables comme les apatites biomimétiques.

Selon les paramètres appliqués, il est possible de faire une projection de la sorte tout en minimisant la chauffe de l'apatite. C'est le principe de la projection plasma à froid. Cela permet de projeter de la même manière la poudre et de créer un revêtement uniforme. Si des apatites biomimétiques sont employées, elles pourront ainsi garder en partie leurs propriétés bioactives et notamment l'intégrité de leur couche hydratée ²¹³.

b. Procédés par immersion

Ces procédés se font à basse température et en milieu aqueux. Ils permettent le revêtement de formes complexes par différents types de phosphates de calcium selon les conditions de synthèse : de l'OCP à l'apatite carbonatée ^{214,215}.

Plus que de formes complexes, les substrats ainsi revêtus peuvent être de multiples natures : céramiques ¹, métalliques ²¹⁵, polymères ²¹⁶, composites ²¹⁷ ...

Ce procédé est décliné en deux types : des immersions successives de bains de calcium puis de phosphate ou une immersion simple souvent en milieu métastable.

c. Immersions successives

Le plus souvent utilisé sur des hydrogels ²¹⁸, polymères ²¹⁶ et plus récemment sur des matériaux métalliques ²¹⁹, ce procédé consiste en une immersion, dans un premier temps dans un bain de sel de calcium ou de phosphate, puis d'un rinçage avant la plongée dans le bain contenant l'autre ion, avant d'être séché et rincé de nouveau. Ce procédé présente l'avantage d'évoluer dans des milieux stables ne précipitant que sur le substrat riche en ion complémentaire, permettant de précipiter un phosphate de calcium.

d. Immersions simples - Slurry

Pour ce type d'immersion, le substrat est trempé dans le mélange d'une phase liquide, le plus souvent organique, et d'un gel solide particulière. L'utilisation de phases organiques

se justifie par leur rapidité d'évaporation, paramètre primordial de cette technique. Ces mélanges et synthèses de phosphates de calcium sont souvent réalisés par voie sol-gel ²²⁰

Les éléments à revêtir sont immergés ou centrifugés dans le mélange à vitesse constante. Le nombre de trempes déterminera l'épaisseur du revêtement ²²¹.

e. Immersion simples - Solution métastable

Beaucoup de techniques de revêtements d'apatite biomimétique impliquent l'usage d'une solution métastable venant précipiter en surface du substrat.

Ces techniques reposent sur la déstabilisation du système métastable permettant d'atteindre une valeur critique de concentration menant à une précipitation ².

Le substrat est introduit dans la solution métastable qui sera déstabilisée par la suite. Différents milieux et techniques de déstabilisation sont utilisés aujourd'hui. La première des méthodes développées a été l'immersion dans un liquide similaire en concentration de différents sels au plasma sanguin (Simulated Body Fluid ou SBF) dont la composition est donnée dans le Tableau 6.

Tableau 6 Concentrations ioniques du Simulated Body Fluid ^{222,223}

	<i>Concentration (mM)</i>	
	<i>Plasma Humain</i>	<i>SBF</i>
Na^+	142	142
K^+	5	5
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl	103	148,8
HCO_3^-	27	4,2
HPO_4^{2-}	1	1
SO_4^{2-}	0,5	0

Cette solution métastable riche en phosphates et en calcium permet, à température et pression ambiantes, la précipitation d'apatite ¹ et ce, sur tout type de support (Figure 7). Ce procédé simule une minéralisation naturelle et prend un certain temps, de plusieurs jours à plusieurs semaines. Cette mise en œuvre est, de plus, compliquée par la nature métastable de l'environnement utilisé qui précipite très facilement sur toute surface. Un nettoyage de tous les éléments post-précipitation est donc nécessaire, le phosphate de calcium se formant sur le substrat mais aussi sur l'intégralité du dispositif. D'autres méthodes ont donc été développées afin de rendre ce milieu plus facilement manipulable.

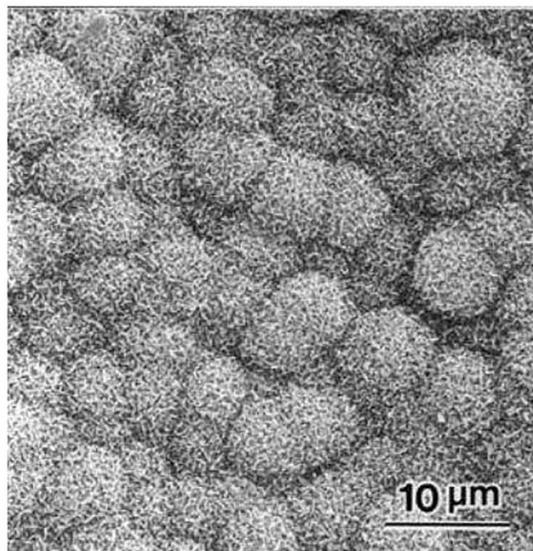


Figure 7 : Photographie microscopique de la structure poreuse obtenue par immersion dans le SDF 2

Certaines méthodes utilisent des solutions de phosphates de calcium et l'EDTA²⁻. Ce dernier se lie au calcium, le rendant ainsi indisponible pour une éventuelle précipitation. Le milieu est alors stable et peut être manipulé facilement. Une fois chauffé, l'EDTA libère le calcium et la précipitation a lieu. Les phosphates de calcium ainsi précipités sont en général bien cristallisés.

D'autres techniques jouent sur les différences de solubilité à haute et basse température des phosphates de calcium. Le substrat sur lequel on souhaite former le revêtement est chauffé et plongé dans les solutions saturées maintenues à des températures faibles.

Des variantes de la technique d'immersion dans le SDF existent également, notamment les immersions successives dans des bains de SDF différents. Le premier bain permet la précipitation de phosphates de calcium amorphes. Le second, dans une solution sur-concentrée, permet la cristallisation d'autres phases qui s'accumulent sur les CaP précédemment formés, ces derniers agissant comme noyau de croissance. Afin d'obtenir des revêtements d'épaisseur conséquente et une précipitation rapide, il faut augmenter au maximum la quantité de Ca et P présents dans le milieu réactionnel mais des limites apparaissent alors à cause de la solubilité de ces derniers dans la solution. Il faut de ce fait modifier le pH des solutions employées pour augmenter la solubilité des CaP et par conséquent la concentration maximale qu'il est possible d'atteindre.

Une des techniques envisagées pour modifier le pH de la solution environnante est l'utilisation d'un bullage de CO₂ pour acidifier le milieu aqueux initialement saturé et éviter la précipitation immédiate de phosphate de calcium. Lorsque le bullage est stoppé, la solution libère le CO₂ dissous en excès et le pH augmente progressivement jusqu'à la neutralité, ce qui provoque la précipitation. Cependant, d'après les travaux préliminaires de Antefage et al., cette technique ne semble pas adaptée aux dispositifs poreux HA/TCP (biphasiques) à la structure complexe, présentés dans cette étude.

Bien que relativement nouvelle, l'utilisation de CO₂ dans le domaine des biomatériaux, et plus particulièrement son utilisation comme agent acidifiant réversible, est particulièrement pertinente pour plusieurs raisons que nous allons détailler par la suite.

15 Le CO₂ supercritique

Le CO₂ est largement présent sur terre. De manière générale dans le domaine des procédés, lorsqu'il est utilisé comme solvant ou réactif, il est considéré comme non toxique, non inflammable et non corrosif. Etant disponible en grande quantité, il est peu onéreux en comparaison des nombreux solvants organiques liquides pouvant être utilisés. De manière générale, le CO₂ supercritique est reconnu comme solvant GRAS (Generally Recognized As Safe). On peut également souligner la facilité d'élimination de ce composé après utilisation par simple changement d'état (retour aux conditions atmosphériques).

Le CO₂ peut se trouver et être utilisé sous différentes formes : liquide, solide, gaz mais aussi supercritique (Figure 8). Dans ce domaine, situé au-delà de sa température et de sa pression critique (31 °C et 74 bar, Figure 7), il a des propriétés particulières et a été largement étudié dans de nombreux domaines, notamment en tant que solvant d'extraction, jusqu'à l'échelle industrielle.

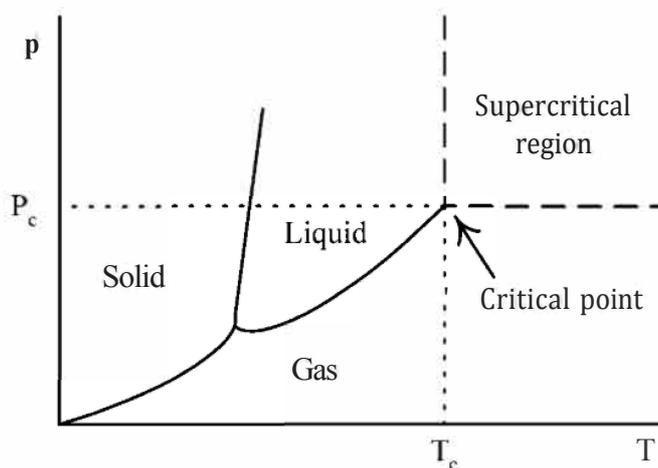


Figure 8 Diagramme de phase, le point critique du CO₂ est 304,25 K et 72,9 atm^m

Sous cette forme, le CO₂ a des propriétés intermédiaires entre celles du liquide et du gaz. En effet, il possède une masse volumique proche de celle du liquide et sa viscosité, sa compressibilité et son coefficient de diffusion sont plutôt de l'ordre de grandeur des gaz²⁸. Sa faible masse volumique lui permet d'avoir des propriétés de solvant alors que sa faible viscosité lui confère une certaine diffusivité. Le CO₂ fait partie des gaz les plus utilisés en condition supercritique de par sa température critique très basse (31 °C), en comparaison d'autres composés d'intérêt, notamment l'eau (374 °C). Cela permet d'atteindre cet état avec un apport d'énergie raisonnable mais également de pouvoir utiliser cette technologie sur des matériaux thermosensibles particulièrement dans les domaines pharmaceutique, cosmétique ou alimentaire et de privilégier des procédés à basse température.

Il existe de nombreuses revues ou ouvrages présentant un état de l'art des applications de ce composé, que ce soit à l'échelle des laboratoires ou même industrielle.

En lien avec ce travail, nous détaillerons plus spécifiquement par la suite les applications liées au domaine des biomatériaux, ainsi que la mise en œuvre de CO₂ en tant qu'agent de carbonatation de phases minérales.

1.5.1 Le CO₂ et les biomatériaux

De par les différents avantages évoqués précédemment, le CO₂ a été utilisé dans de nombreux procédés, allant des applications visant le traitement chimique à la mise en forme dans le domaine de la régénération tissulaire.

Le CO₂ supercritique est par exemple employé dans le domaine agro-alimentaire. Il sert ainsi à l'extraction de la caféine, d'huiles essentielles ou d'hydrolats²⁹. La stérilisation de certains produits peut, dans ce cadre, être faite avec ce processus également.

Cette technologie, très versatile, peut aussi être évoquée dans l'extraction^{230m} notamment lipidique²³, dans différents types de synthèses,^{233,234} parfois en tant que catalyseur^{2,5} ou encore dans le domaine des bioraffineries^{236,237}.

Dans le domaine biomédical, en plus de sa destination à des fins de stérilisation²³⁸, différents usages du CO₂ haute pression ou supercritique ont été développés, l'utilisation principale dans ce domaine restant la purification et surtout la mise en forme des biopolymères^{29,239,240}.

En plus de la mise en forme de polymères poreux, on peut citer l'électrospinning sous CO₂ supercritique permettant de produire des fibres poreuses. D'autres techniques visent à l'obtention de particules de biopolymères (lécithine, caséine...) à la forme et à la taille ajustables, chargées d'éléments actifs tels que des lysozymes, de l'insuline²⁷... D'autres techniques encore ont été envisagées grâce au CO₂ pour imprégner des dispositifs médicaux polymériques en agents actifs²⁴¹. On peut évoquer les travaux de Masmoudi et al^{241,242} dont l'objectif est d'imprégner des lentilles de contact en PMMA avec une drogue antibiotique.

Nous orienterons ici l'analyse bibliographique sur le domaine spécifique des substituts concernant la régénération osseuse puis la capacité de carbonatation du CO₂. Dans ce cadre, le CO₂ a alors été utilisé à la fois pour traiter des substituts d'origine naturelle mais aussi comme facteur de mise en forme pour des dispositifs poreux ou encore des synthèses de nanoparticules.

1.5.2 Délipidation osseuse

Une étude sur la délipidation osseuse a été menée dans les années 1990. Elle a donné lieu à un brevet actuellement exploité par la société Biobank via le procédé Supercrit[®] (Figure 9). Les matériaux de 2nd^e génération ne sont alors que peu développés et les allo- et xénogreffes sont encore un enjeu majeur. Dans le but de trouver une solution aux difficultés de traitement des allo- et xénogreffes, le CO₂ est utilisé sous forme

supercritique afin de retirer toute trace de lipides des os. En effet, après prélèvement des os humains ou d'origine animale, il est nécessaire de les traiter avant implantation afin d'enlever les facteurs immunitaires pouvant provoquer un rejet mais aussi tout risque d'infection.

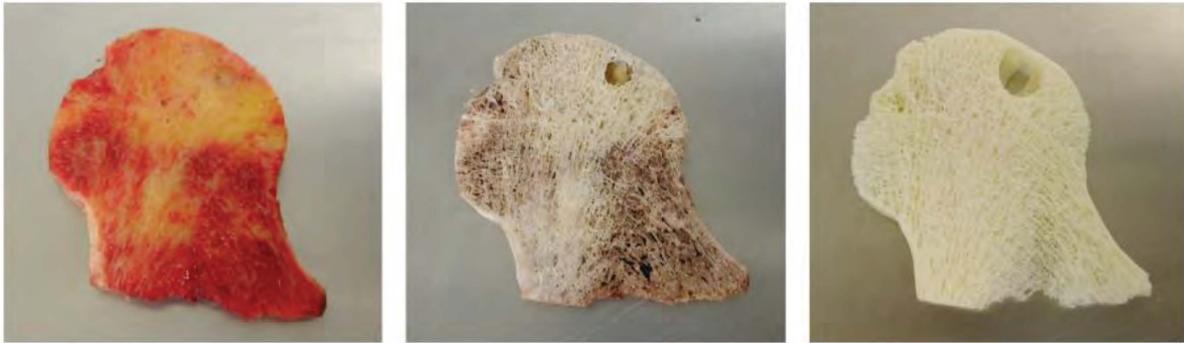


Figure 9 Tête fémorale avant, pendant et après le procédé de nettoyage supercritique Supercrit[®] de l'entreprise Biobank

De plus, une bonne mouillabilité des substituts étant souhaitable pour l'invasion cellulaire ainsi que l'accès aux microporosités, il est d'intérêt d'enlever la phase lipidique. De fait, cette étape est automatiquement réalisée suivie de la déprotéinisation mais à l'aide de solvants chimiques, potentiellement adsorbés en surface et nocifs. C'est pour cette raison que l'utilisation du CO₂ supercritique, excellent solvant des molécules non polaires comme les lipides, a été développée dans ce cadre ^{24,3,244} .

1.5.3 Synthèse de dispositifs poreux

Ainsi que vu précédemment, les dispositifs poreux sont excellents pour la régénération osseuse. Différentes techniques impliquant plusieurs matériaux ont été mises au point. Parmi elles, certaines mettent en jeu le CO₂ supercritique : l'inversion de phase, le moussage, l'imprégnation... Ces deux dernières techniques proposent la mise en forme de polymères. La plupart des procédés visant à mettre en forme ces matériaux utilisent des solvants organiques potentiellement dangereux. De la même manière que pour la délipidation, l'usage de CO₂ permet ici d'éviter leur usage.

Le moussage ²⁴⁵ consiste à utiliser le CO₂ comme agent porogène. Les polymères utilisés sont souvent amorphes et ont de bonnes affinités avec le CO₂. Une fois placé dans une enceinte fermée, le CO₂ est injecté et atteint des pressions pouvant aller jusqu'à 250bar. En se solubilisant dans le polymère, le CO₂ modifie la température de transition vitreuse de ce dernier. La mise sous pression mais aussi la vitesse de décompression ainsi que la température sont des paramètres influant sur la mise en forme des polymères et l'architecture des pores obtenus. Ainsi, en ajustant les paramètres de pression et de température, il est directement possible d'obtenir l'architecture désirée. De nombreux polymères ont été mis en forme de cette manière (Cellulose, PLA, PLGA, PCL...) afin de développer un matériau poreux pour la régénération tissulaire en général ^{246,247} . Des composites polymères/céramiques ont également été mis en forme de cette façon, alliant

ainsi du PLA avec des poudres d'HA et β TCP dont le mélange avait été assuré par une étape d'injection préalable (Figure 10) ²⁴⁸ .

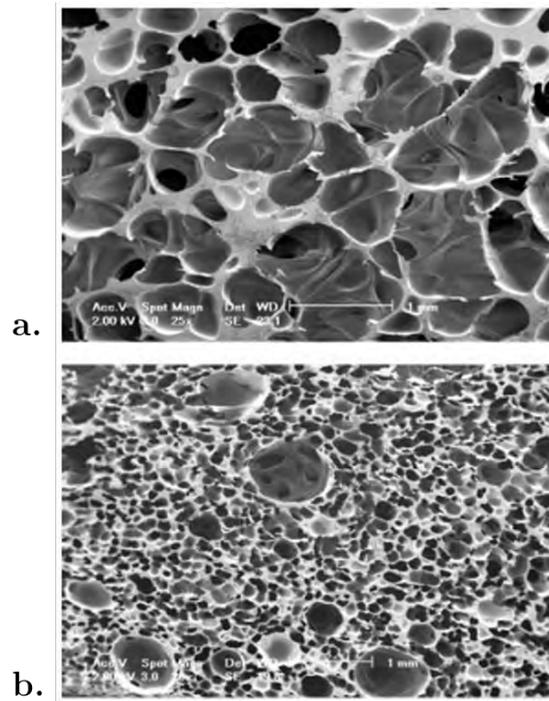


Figure 10 Effet de la pression de saturation sur la morphologie de la mousse de PLA a. 150 bar; 5.1°C/s; 12.1 bar/s; b. 242 bar; 4.4°C/s; 13.3 bar/s²⁴⁸

L'inversion de phase consiste à réaliser une émulsion de deux phases, l'une contenant le polymère, non miscible avec une seconde ²⁴⁹ . Cette dernière a une grande affinité avec le CO₂. Une fois placée dans une enceinte et mise en contact avec différents bains successifs de CO₂ liquide, la phase miscible sera retirée du milieu et le polymère récupéré sous forme de structure poreuse. De la même manière, le contrôle des paramètres de mise sous pression ainsi que de dégazage est essentiel afin de ne pas écraser la structure des mousses. Ici aussi, de nombreux polymères ont été utilisés (PMMA, PLLA...).

Le CO₂ a également permis la mise en forme de polymère via le moussage par extrusion. Ce procédé consiste à introduire le CO₂ avant extrusion dans le polymère. Ce dernier agira alors comme un plastifiant, permettant l'utilisation de polymères sensibles à la dégradation thermique dans de telles conditions, mais aussi d'agent porogène lors de la dépressurisation ²⁵⁰ .

De récentes recherches montrent même l'utilisation de polymères d'origine naturelle contenant des facteurs de croissance particulièrement intéressants pour la régénération tissulaire : le lysat plaquettaire ²⁵¹ . Ce dernier est en fait directement issu de la centrifugation/sonification de sang humain.

Enfin et dans l'objectif d'aller vers des substituts fonctionnalisés, le CO₂ supercritique peut être utilisé comme solvant d'imprégnation. Afin d'apporter des propriétés supplémentaires au substitut, des espèces actives y sont intégrées. Grâce à ses propriétés de diffusion favorables, le CO₂ supercritique semble être un candidat idéal pour ce type d'application. Les matériaux utilisés sont des polymères. Il faut alors que le principe actif

soit soluble dans le CO₂ et que le polymère ait des affinités particulières avec le CO₂, comme pour le moussage ²²⁷. Concernant les matériaux poreux, on peut évoquer des recherches visant à mettre en forme et imprégner des mousses PLA de molécules anticancer ²⁴² via une seule étape en atmosphère CO₂ supercritique.

Le CO₂ a permis de mettre en forme de nombreux substituts aux différentes propriétés. Or, des recherches ont également montré qu'il pouvait avoir un effet stérilisant ²⁵²⁻²⁵⁶. En effet, il a été découvert que cette technologie avait la capacité de tuer la plupart des microorganismes et d'inactiver les virus, ceci incluant la plupart des souches pathogènes humaines ²³⁸. Il est à noter que l'inactivation de virus demande l'utilisation de conditions extrêmes, où notamment la dégradation de protéines n'est pas un enjeu. Cette propriété a été prouvée sur des lots d'os de bovins puis humains ²⁵⁷.

Différents types de bactéries se sont révélés impactés voire totalement neutralisés. De manière générale, elles peuvent être divisées en deux groupes : les gram+ et les gram-. Ces deux groupes ont des membranes différentes et réagissent de manières distinctes à leur environnement. Le CO₂ a montré sa capacité à neutraliser ces deux groupes sur différents supports, notamment *Bacillus subtilis* dans le cas d'os cortical humain ^{238,254}.

1.5.4 Agent de carbonatation minérale

Le phénomène de carbonatation minérale a lieu naturellement et peut être décrit par l'équation 4 :



Ce phénomène naturel est subi dans un grand nombre de cas mais peut également être mis à profit dans le cadre de certaines applications. Cela se produit notamment dans le cas du stockage de CO₂ en poches rocheuses ²⁵⁸.

Il est important de souligner le fort impact de CO₂ en milieu aqueux. En se solubilisant dans l'eau, il forme de l'acide carbonique qui se dissocie selon l'Équation 5, l'Équation 6 et la Équation 7, modifiant le pH de l'eau jusqu'à des pH de l'ordre de 3 (Figure 12). Des études expérimentales et de modélisation ont permis de corrélérer de manière précise le pH de l'eau saturée en CO₂ en fonction de la température et de la pression. En effet, dépendant de ces paramètres, la solubilité du CO₂ évolue et donc le pH ²⁵⁹. C'est d'ailleurs sur ce principe que reposent les techniques de revêtement évoquées avec le SBF sursaturé ²⁶⁰.

Selon le PH, différentes espèces sont prédominantes dans le milieu eau/CO₂ comme décrit sur la Figure 11.

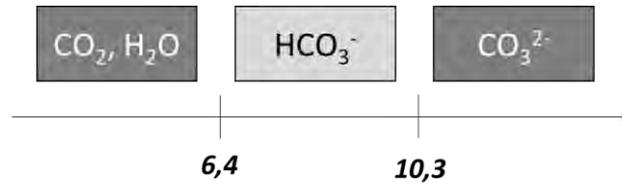


Figure 11 Domaine de prédominance du CO₂ dans l'eau

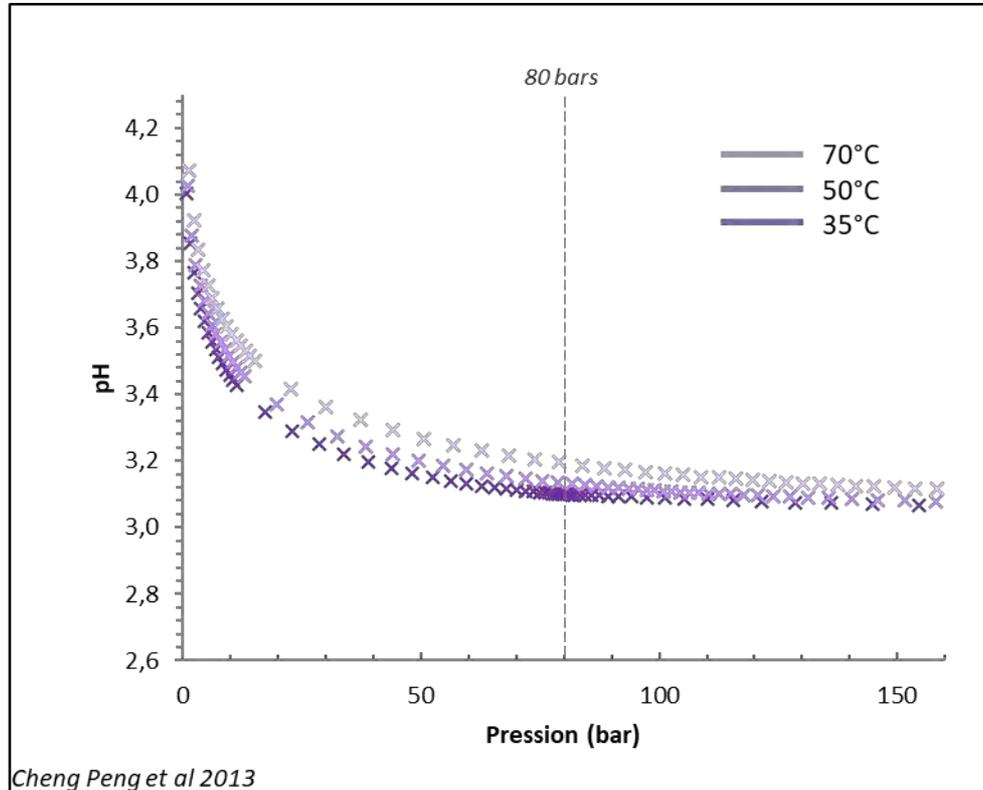
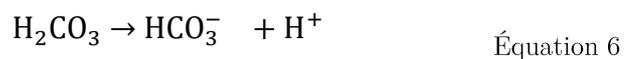


Figure 12 Valeurs expérimentales de pH de l'eau à différentes températures en fonction de la pression²⁵⁹



En outre, le CO₂ a été utilisé pour synthétiser des carbonates de calcium ou bien carbonater des minéraux comme des apatites. Il a été montré ²⁶¹ que l'introduction de carbonates de calcium dans les matériaux de la régénération osseuse semble être un pas de plus vers des substituts plus similaires à l'os. De plus, de nombreuses études portent sur leurs synthèses sous atmosphère de CO₂. Des structures morphologiques très similaires à celles présentées dans ces travaux de thèse ont également été observées c'est pourquoi leur synthèse sera abordée dans la suite de ce travail bibliographique.

a. Synthèse de carbonates de calcium

Les carbonates de calcium ont de multiples applications, à la fois dans la dépollution^{262,263} des sols, l'industrie du tabac²⁶⁴ mais aussi la cosmétique²⁶⁵⁻²⁶⁷, le domaine pharmaceutique^{268,269} ou encore la régénération osseuse²⁷⁰. Pour cela différentes méthodes de synthèse ont été mises au point. La première est appelée par double décomposition et consiste en un mélange de deux solutions, l'une de chlorure de calcium et l'autre de carbonate de sodium à différentes températures selon le carbonate de calcium désiré (vatérite, aragonite...) ²⁷⁰. D'autres méthodes consistent à faire circuler un flux de CO₂ dans des composés (solide ou liquide) contenant du calcium. Il existe notamment trois techniques utilisant ce gaz : une en voie solide-gaz et deux autres en voie humide. La voie solide-gaz consiste à simplement faire circuler un flux de CO₂ contenant de l'eau dans de la poudre de Ca(OH)₂ sèche à 50°C et 100bar²⁷¹, la saturation du CO₂ en eau se faisant via le passage dans une chambre de saturation contenant de l'eau distillée. Cette technique a l'avantage de conduire à un fort taux de conversion et de produire une poudre non agglomérée sans solvant.

Les deux voies humides sont : *l'emulsion templating* et le *bubble templating*^{272,273}. Le CO₂ sous sa forme supercritique a été prouvé comme accélérant ces synthèses en milieu aqueux, ce dernier étant trente fois plus soluble qu'à température et pression ambiantes²⁷⁴.

La technique du *bubble templating* notamment permet de synthétiser des sphères de CaCO₃. Un mélange de solution d'ammonium et de chlorure de calcium est utilisé, dans lequel du CO₂ gazeux est injecté. Selon le pH initial de la solution il a été montré que différents mécanismes de formation sont mis en jeu. Pour des pH plus bas, inférieurs à 10, il semblerait que les nuclei originaux coagulent alors que pour des pH plus élevés, supérieurs à 10, il y ait un phénomène de croissance des nucléis originaux. Il est à noter que la quantité de CO₂ influe également sur la cinétique de précipitation²⁷². Dans le cas de synthèse de sphères, des sphères incomplètes ont notamment été observées. Différents paramètres influent sur la taille des objets obtenus par cette méthode (flux de CO₂, pH...).

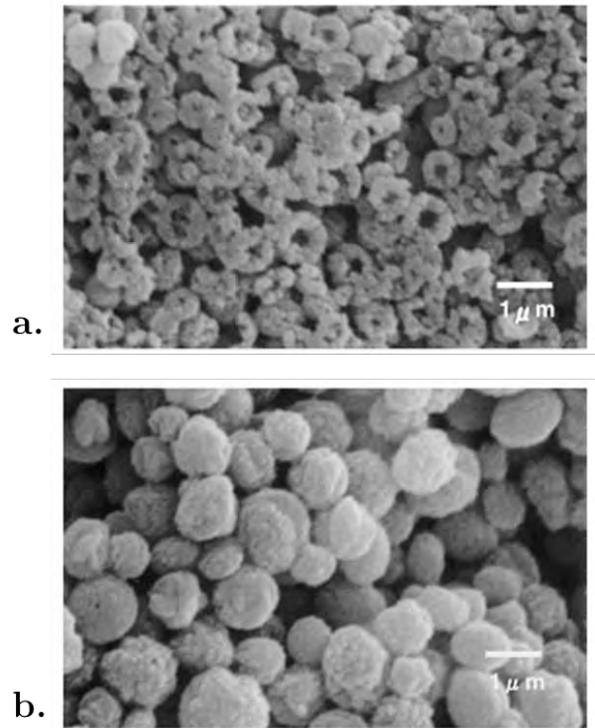


Figure 13 Particules de CaCO_3 produite à des pH initiaux de a. 10 et b. 9.7 ²⁷²

b. Carbonatation de minéraux

De nombreux minéraux ont fait l'objet d'études de carbonatation pour différentes raisons, notamment l'olivine $(\text{Mg,Fe})_2$ et la serpentine $((\text{Mg,Fe,Ni})_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4)$. Ces dernières ont pour but principal la séquestration de CO_2 et ne seront donc pas développés ici.

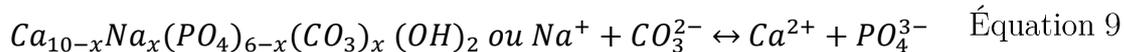
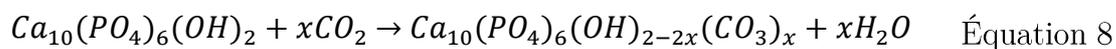
La carbonatation du béton a également été largement étudiée ²⁷⁵. Non volontaire, elle induit un vieillissement prématuré des bétons amenant à une dégradation importante. Elle se produit dans les pores initialement créés à cause de l'excédent d'eau utilisé dans le mélange. Lorsque le béton sèche et perd cette eau, les pores se remplissent d'air, contenant du CO_2 , ce qui entraîne la réaction de carbonatation. Les bétons initialement saturés en eau voient la propagation de ce phénomène limitée par la formation de calcite bouchant le réseau éventuel de pores et empêchant le gaz d'aller plus loin.

Par des phénomènes identiques, le CO_2 est utilisé dans le domaine de la carbonatation minérale pour des applications biomédicales. Comme décrit précédemment, l'os est un phosphate de calcium carbonaté immature et réactif. Ainsi, le développement de structures similaires à l'os dans le but de le régénérer est important. La synthèse de phases carbonatées immatures obtenues à partir de matériaux minéraux existants permettrait d'obtenir des matériaux réactifs capables de favoriser voire d'initier la formation osseuse.

Il a été défini dans la section 1.1.2 que deux types de substitutions, type A et type B, étaient possibles dans ce minéral. A celles-ci s'ajoute la formation des carbonates de la couche hydratée qui ne seront pas discutés ici et ne concernent que les apatites biomimétiques. Ainsi, différentes synthèses peuvent mener à des apatites uniquement de type A ou de type B ainsi que des apatites mixtes, selon les conditions du procédé.

Les apatites de types A (substitution des -OH) sont plus faciles à produire. En plus de la synthèse par réaction simple de composants, dite par double décomposition, il est possible d'introduire des ions carbonates dans de l'hydroxyapatite. Cela peut être réalisé sous flux continu de CO₂ à des températures allant de 900 à 1000°C sur des temps longs compris entre 15 et 144 heures^{32,276,277}. Cette solution nécessitant une quantité d'énergie importante, d'autres techniques ont été développées, notamment la trempe dans un milieu aqueux saturé en CO₂ pendant un temps long (2 mois) à des température ambiantes²⁷⁸.

Les apatites substituées de type B sont plus complexes à obtenir. En effet, alors que la balance des charges est maintenue pour la substitution de type A (Équation 8), elle ne l'est pas pour la substitution B. Les différentes méthodes d'inclusion de carbonates de ce type impliquant des espèces substituantes du Ca, il est difficile d'obtenir une phase pure (Équation 9). En général leur synthèse se fait par précipitation contrôlée via des solutions contenant du calcium, du phosphate et des ions carbonates à pH élevés. Ce dernier est au-dessus de 8 et peut être maintenu grâce à de l'ammoniaque²⁷⁹.



Des méthodes de synthèse d'apatite carbonatée à la fois en A et en B à l'aide de CO₂ ont également été étudiées²⁸⁰, les apatites co-substituées étant les plus ressemblantes à l'os naturel.

Il est possible d'incorporer des carbonates dans la structure apatitique fraîchement précipitée grâce à un processus d'échange ionique. Ceux-ci permettent d'intégrer des groupements CO₃²⁻ dans la couche hydratée mais aussi au sein de la phase mieux cristallisée, principalement sur les sites B⁴⁰.

Une autre méthode consiste dans la modification de plusieurs paramètres de la synthèse classique en milieu aqueux de ces apatites²⁸⁰. Du calcium a été mis en excès afin de favoriser la formation d'une apatite substituée par des carbonates, probablement de type B dans ces conditions, et de tendre vers un ratio Ca/(P+C) de 1,67. Les carbonates ont été introduits grâce à un bullage de CO₂ dans l'eau. Cette synthèse se différencie des synthèses classiques²⁷⁰ qui introduisent les carbonates sous forme de carbonate de sodium ou d'ammonium mettant en solution des ions non nécessaires.

Par la suite, lors d'éventuelles phases de frittage, un flux de CO₂ permanent a été imposé. Cela a également permis de passer outre un autre verrou : celui de la perte des carbonates intégrés lors du frittage²⁸¹.

Il a été montré ici que le CO₂ est d'intérêt dans le domaine des biomatériaux en partie grâce à son caractère biocompatible et grâce aux paramètres de procédés qu'il propose comme l'utilisation de faible température.

Il s'est avéré être utilisé pour différentes raisons comme dans le domaine de la mise en forme avec les mousses polymères ou son utilisation en tant que modificateur de pH lors

de synthèse, principalement de phosphates de calcium. Enfin, sa capacité à apporter ou synthétiser des carbonates a été soulignée.

Ainsi, l'emploi de CO semble prometteur pour notre étude dont les objectifs sont détaillés ci-dessous.

1.6 Les objectifs de ce travail

Les substituts poreux d'HA/ β TCP sont des substituts osseux largement utilisés aujourd'hui. Cependant et comme montré dans cet état de l'art, ce mélange de céramiques, bien qu'à dissolution contrôlée, ne permet pas un bon processus d'ostéointégration. La surface lisse et peu réactive chimiquement limite leur bioactivité.

Le travail présenté se propose de modifier les dispositifs déjà existants et commercialisés afin d'en améliorer la bioactivité par un remaniement chimique de surface. L'utilisation de CO₂ en milieu aqueux et porté à haute pression sera étudiée comme procédé permettant de modifier la surface de ces structures initialement biphasiques.

L'objectif est ici d'évaluer l'intérêt de ce procédé pour produire un revêtement d'une nouvelle phase de phosphate de calcium dont la composition chimique est plus proche de celle de la phase minérale de l'os comme de l'apatite carbonatée déficiente en calcium ou une des phases intermédiaires d'intérêt telles que le DCPD ou l'OCP. De plus, une modification de la morphologie de surface par création d'une nanoporosité engendrée par l'enchevêtrement des nanocristaux biomimétiques pourrait également induire une capacité à favoriser et initier la formation osseuse (caractère ostéoinducteur²).

Le procédé étudié pourrait permettre, par une simple étape supplémentaire après production des dispositifs céramiques, d'améliorer la bioactivité de ces substituts. Le CO₂, bien que déjà utilisé dans le domaine de la synthèse et de la carbonatation ainsi que de la mise en forme pour les biomatériaux, n'a que rarement été utilisé comme agent modificateur de pH pour créer un revêtement. Les études ayant présenté ce type d'utilisation portaient de solution métastable dont le pH était modifié par le CO₂, limitant ainsi son rôle à la régulation du pH et utilisant une solution difficilement industrialisable. Pour cette raison, le revêtement d'un phosphate de calcium grâce à un environnement simplement aqueux semble d'intérêt.

De plus, dans le cadre d'une fonctionnalisation, la possibilité d'intégrer différentes espèces ioniques au substitut sera évaluée. Les espèces ont été choisies en fonction de leurs propriétés et de leurs capacités à s'intégrer aux phosphates de calcium, comme vu dans cet état de l'art :

- Le zinc pour son aspect anti-inflammatoire
- Le cuivre et l'argent pour leurs propriétés anti bactériennes
- le strontium pour ses propriétés stimulant la régénération osseuse.

Le but de la deuxième partie de cette étude est donc d'évaluer la possibilité d'intégrer ces espèces ioniques au sein du revêtement pendant sa formation. Le procédé étudié pourrait ainsi permettre en une seule étape de conférer une bioactivité grâce à un revêtement de phosphate de calcium davantage biomimétique mais aussi différentes activités biologiques selon les espèces utilisées.

Partie 2 : Matériaux et méthodes

Cette deuxième partie s'attache à présenter les outils expérimentaux et d'analyse mis en œuvre dans cette étude. Dans un premier temps, les matériaux utilisés y sont décrits. Le procédé expérimental ainsi que les différents protocoles le sont dans un deuxième temps. Enfin, les méthodes d'analyse et de caractérisation employées sont détaillées.

2.1 Matériaux

Deux formes de matériaux à base de phosphates de calcium ont été utilisées pour la totalité de l'étude : des poudres et des céramiques macroporeuses. Les poudres ont d'abord été utilisées afin de mieux comprendre les modifications induites par le procédé lorsqu'elles sont mises en contact avec un environnement aqueux sous haute pression de CO₂. L'application de cette technique sur des cubes poreux déjà commercialisés a ensuite été envisagée.

Poudres :

Différentes phases de phosphates de calcium sous forme de poudres ont été utilisées : des poudres d'hydroxyapatite (HA) commerciales, des poudres que nous avons synthétisées au CIRIMAT (phosphate de calcium amorphe (amTCP) avec Ca/P=1,5) et un mélange HA/amTCP en proportions massiques 65/35). L'entreprise Teknimed a fourni la poudre d'HA stoechiométrique (Blocky®).

La poudre de Phosphate Tricalcique (phosphate de calcium amorphe, amTCP) a été synthétisée au laboratoire en utilisant la méthode de co-précipitation du TCP développée par Heughebaert²⁸² avec un rapport Ca/P=1,5. Une partie de cette poudre a été traitée thermiquement à 1000°C pendant 2H et une DRX a permis de vérifier la présence unique d'une phase de βTCP. La poudre synthétisée correspond donc bien à un amTCP.

Les analyses des poudres commerciales et synthétisées au laboratoire (micrographies MEB, surface spécifique, diagrammes DRX et spectres FTIR) sont présentées dans les Figure 14, 2 et 3.

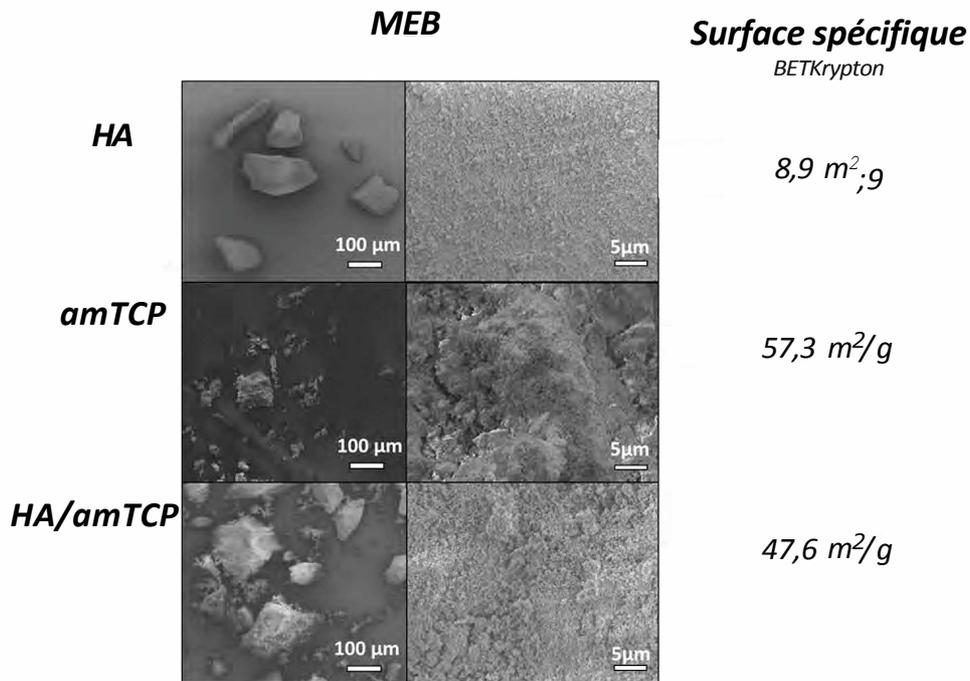


Figure H Images MEB et surfaces spécifiques (BET Krypton) des poudres utilisées dans ce travail.

Les images MEB de la poudre tHA montrent de larges grains d'une à plusieurs centaines de μm (Figure 14). L'amTCP présente des grains majoritairement plus petits de l'ordre du μm, avec une surface spécifique bien plus importante.

Dans le mélange des deux phases, on retrouve des particules des deux tailles et une surface spécifique élevée, inférieure à celle de amTCP, du fait de la présence d'HA.

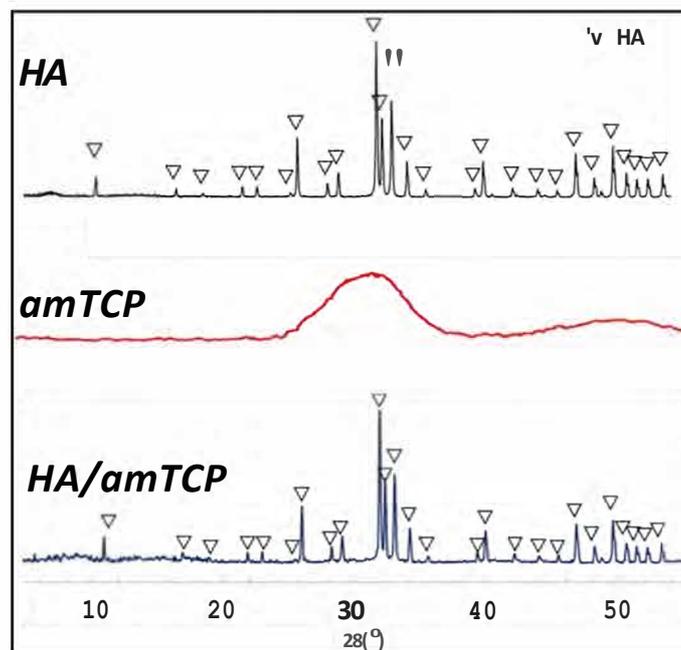


Figure 15 Diffractogrammes des poudres brutes obtenus par DRX

Le diffractogramme de la poudre d'HA montre bien une poudre bien cristallisée d'HA, confirmée par la présence des pics référencés (JCPDS : 00-009-0432) (Figure 15). L'amTCP étant un composé amorphe, aucun pic n'est visible en DRX. Enfin dans le cas

du mélange des deux, la phase d'amTCP étant minoritaire, on retrouve la phase bien cristallisée d'HA.

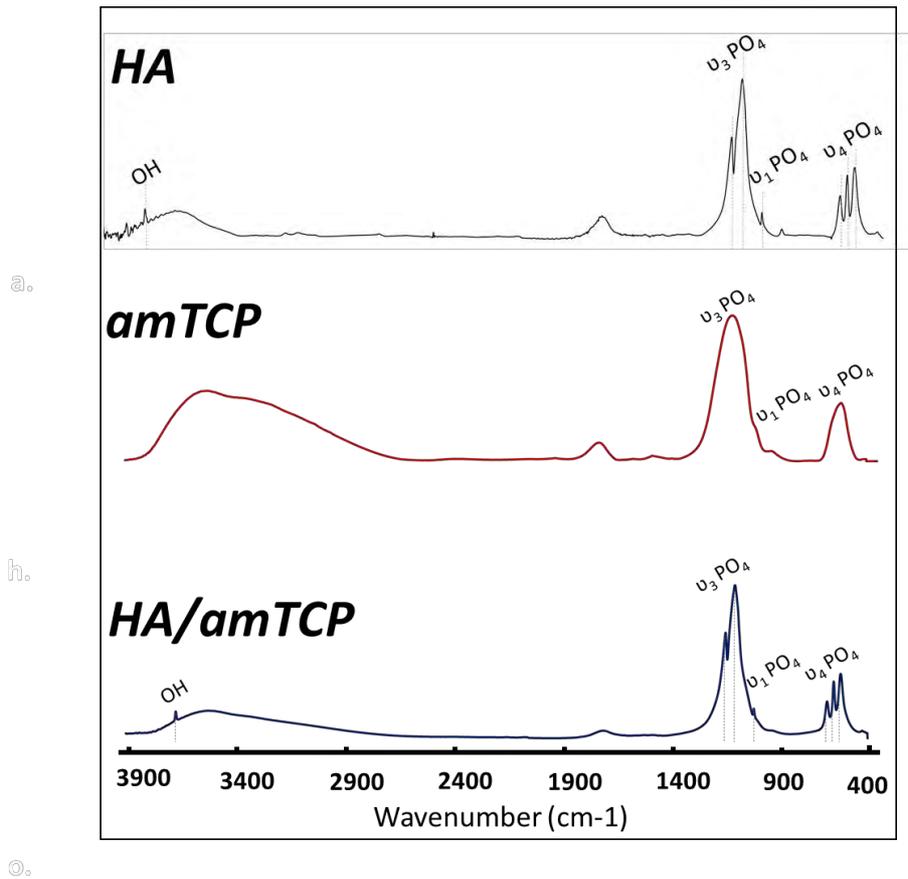


Figure 16 Spectres FTIR des poudres brutes

Enfin les spectre FTIR de l'HA et de l'amTCP correspondent également à ce qui est attendu⁸⁸, avec une absence de carbonate (Figure 16). Concernant le mélange des deux poudres, le spectre est similaire à celui de l'HA, seul un élargissement au niveau des $\nu_3 \text{PO}_4$ est constaté.

Cubes de céramique :

Les céramiques biphasiques commerciales d'HA/ β TCP sous forme de cubes ont été fournies par la société Teknimed. Ce sont des cubes macroporeux (diamètre des pores de 100 à 400 μm) Ceraform® d'HA/ β TCP (proportions massiques 65/35) de 3 mm de côté. Pour certaines expériences décrites dans la partie 3, ces cubes ont également été broyés au mortier afin d'obtenir une poudre fine de céramique pouvant être plus facilement analysée notamment par DRX et spectroscopie d'absorption infrarouge en mode transmission avant et après traitement CO_2 .

Cubes Ceraform® (HA/TCP,65/35)



a 0,66m²/g

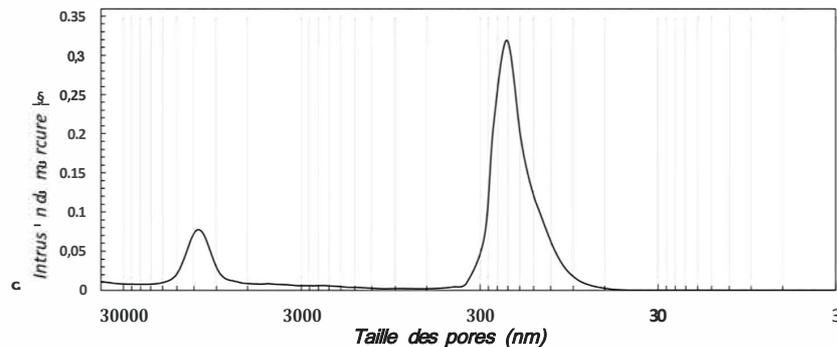
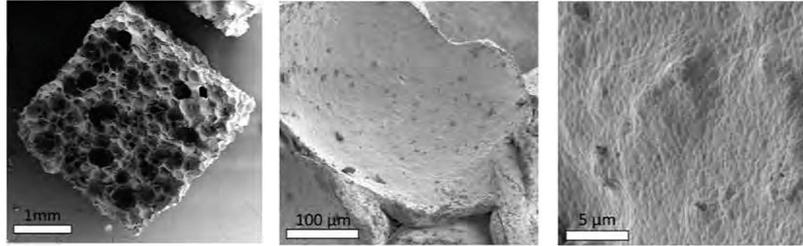


Figure 17 Caractérisation des cubes de Ceraform a Surface spécifique (BET Krypton), b. micrographies SEM, c. Porogramme (Porosimétrie à l'Azote).

Les substituts étudiés présentent une surface lisse caractéristique des céramiques frittées (b. Figure 17). Ces derniers ont une surface spécifique faible, $<1 \text{ m}^2/\text{g}$ (a. Figure 17) nécessitant l'utilisation de Krypton pour les mesures BET.

Les porosités inférieures à 30000 nm ont été évaluées. Deux gammes de pores se dégagent : l'une entre 30000-1000 nm et la seconde, plus importante, entre 1000-10nm.

Cubes de céramique broyés :

Afin d'étudier la faisabilité de modification des cubes avec le procédé CO₂ haute pression: des essais sur des poudres issues de ces dernières ont été réalisés. Les cubes ont été broyés au mortier. La poudre obtenue a une surface spécifique de $11,3 \text{ m}^2/\text{g}$, du même ordre de grandeur que celle de la poudre (i:HA).

2.2 Méthodes

2.2.1 Procédé CO₂

a. Dispositifs – Sécheur CO₂ supercritique

Le dispositif utilisé pour le traitement des céramiques est une enceinte initialement conçue pour réaliser du séchage par CO₂ supercritique (E3100) de la société Quorum Technologies-UK (Figure 18 et Figure 19). Cette enceinte est régulée en température grâce à une double enveloppe dans laquelle circule de l'eau, régulée en température grâce à un Cryostat Isotemp Fischer Scientific-USA.

La chambre est remplie à basse température de manière à ce que le CO₂ dans l'enceinte soit liquide. Elle est ensuite chauffée ce qui fait varier la pression dans la chambre. Si la pression est trop élevée la vanne de sortie est utilisée pour évacuer une partie du CO₂ et obtenir la pression de traitement souhaitée.

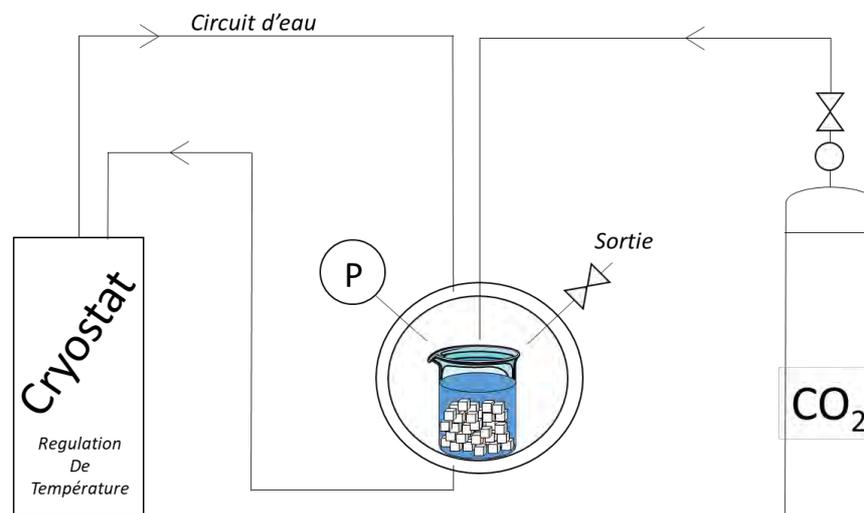


Figure 18 Schéma du sécheur à CO₂ supercritique appliqué aux cubes de céramiques immergés dans une solution aqueuse



Figure 19 Photo du sécheur CO₂ supercritique

b. Description du protocole opératoire

Poudres non dopées :

Le procédé de modification des poudres par le CO₂ se fait en plusieurs étapes.

Dans un premier temps, une masse de 0,1 g de céramique est répartie de la manière la plus homogène possible au fond d'un bécher. L'eau désionisée (10 mL) est ajoutée avec un rapport massique Liquide/Solide égal à 100 (L/S = 100) avant la mise en place du bécher dans la chambre. La température du sécheur est réglée à 5°C.

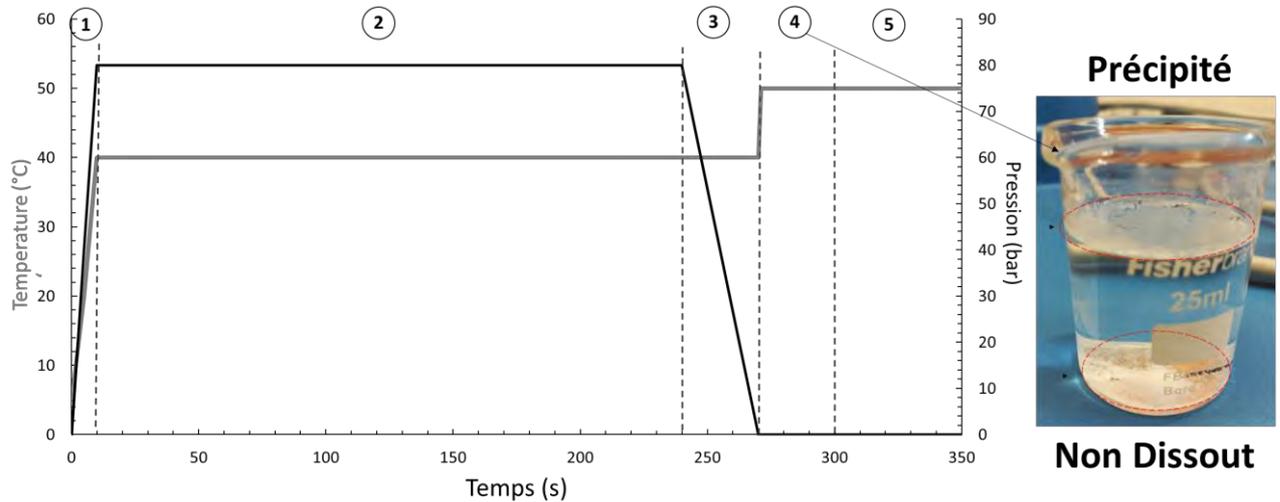


Figure 20 Paramètres (température et pression) mis en œuvre au cours des différentes étapes du traitement des poudres au CO₂ supercritique [1- Pressurisation, 2-4 h de traitement, 3- Décompression, 4- Précipitation, 5-Début de la phase de séchage 24 h]

Le CO₂, liquide à 5°C, est introduit dans la chambre. Une fois remplie au $\frac{3}{4}$, l'enceinte est montée en température jusqu'à la température désirée (40°C) (Etape 1, Figure 20 et Figure 21). Lors de cette montée en température, la pression augmente graduellement dans la chambre. Le CO₂ passe en phase supercritique dès que les 31°C et 74 bar sont atteints. La pression est régulée grâce à la vanne de sortie si nécessaire pour atteindre la pression voulue (80 bar). Les paramètres de pression et température sont maintenus pendant un temps donné (généralement 4 h) (Etape 2, Figure 20 et Figure 21). Ce temps a été déterminé via une étude préliminaire comme étant le temps minimum pour un rendement maximum de carbonates, à partir de solutions concentrées d'acétate de Zinc mis en contact avec du CO₂ à 80 bar et 40°C. Ces espèces pouvant être d'intérêt dans notre cas, ce temps a été conservé pour la plupart des essais de l'étude. La pression est ensuite réduite progressivement jusqu'à atteindre la pression atmosphérique en 30 min (Etape 3, Figure 20 et Figure 21). A cette étape, le bécher est récupéré et une partie de la poudre est toujours visible au fond, elle est appelée *Non dissoute*. Le bécher est alors mis à l'étuve à 50°C pendant 1 h. Une nouvelle phase apparaît alors en surface (Etape 4, Figure 20 et Figure 21). Elle est prélevée et appelée *Précipitée*. Les deux poudres sont séchées pendant 24 h à l'étuve à 50°C (Etape 5, Figure 20 et Figure 21) pour analyses.

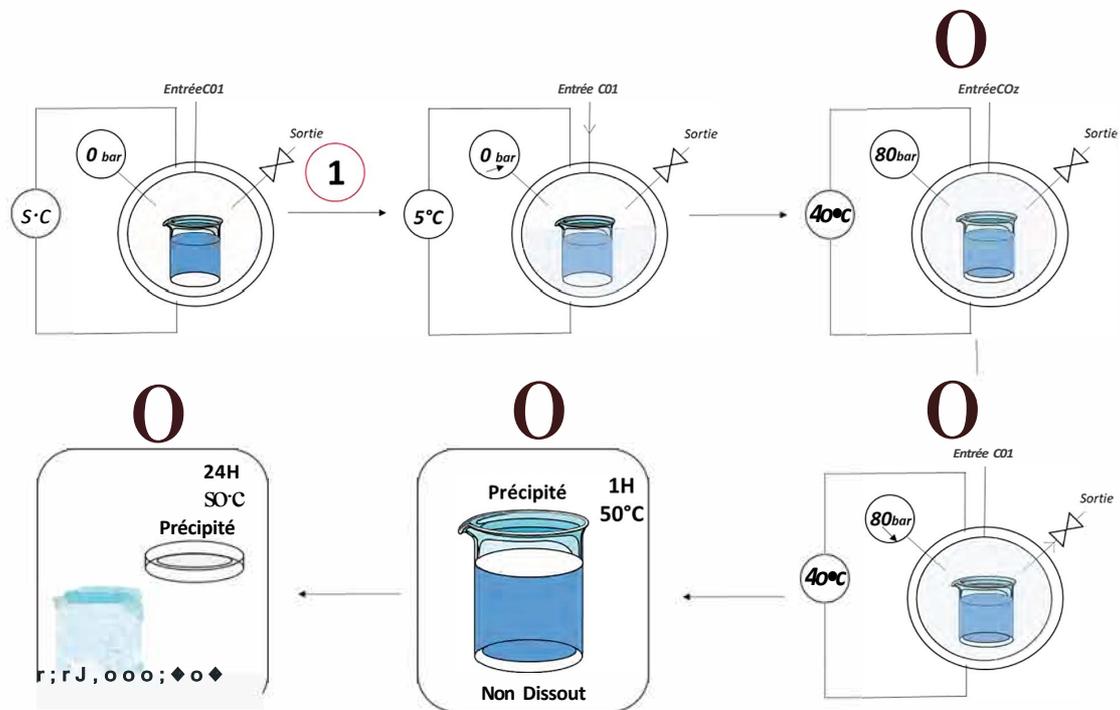


Figure 21 : Schéma du protocole de modification des poudres à l'aide du sècheur à CO₂ supercritique

Poudres dopées :

Le procédé permettant d'obtenir les poudres dopées est identique à celui utilisé précédemment. et seul l'échantillon initial est préparé différemment.

Ici la poudre de céramique sera uniformément répartie au fond du bécher puis recouverte avec une solution aqueuse d'acétate du métal d'intérêt que nous souhaitons utiliser comme dopant (acétate de zinc, acétate de Sr...). Les acétates de Zinc, Cuivre, Argent et Strontium ont été achetés chez Sigma Aldrich.

Trois concentrations de métal ont été utilisées pour chaque ion métallique dopant choisi, dénommées : Minirnmn, Intermédiaire et Mai:irnmn (Tableau 7).

Tableau 7 : Détails des solutions dopantes d'acétates d'ions métalliques utilisées dans ce travail.

Espèce ionique active	Concentration d'espèce ionique active dans solution initiale (mg/L)	Nom utilisé	Concentration d'acétate correspondante (g/L)
Zinc	88	<i>Zn Minimum</i>	0,25
	175	<i>Zn Intermédiaire</i>	0,5
	350	<i>Zn Maximum</i>	1
Cuivre	88	<i>Cu Minimum</i>	0,25
	175	<i>Cu Intermédiaire</i>	0,5
	350	<i>Cu Maximum</i>	1
Argent	88	<i>Ag Minimum</i>	0,14
	175	<i>Ag Intermédiaire</i>	0,27
	350	<i>Ag Maximum</i>	0,54
Strontium	88	<i>Sr Minimum</i>	0,21
	175	<i>Sr Intermédiaire</i>	0,41
	350	<i>Sr Maximum</i>	0,82

Le contre-ion acétate a ici été privilégié. En effet, l'introduction des espèces désirées aurait également pu se faire sous forme notamment d'autres sels métalliques solubles (chlorure, nitrate...). Cependant, afin de ne pas endommager les parois du sécheur au cours du traitement (libération de chlorures) ou former des complexes peu respectueux de l'environnement au cours du traitement (notamment dans le cas des nitrates), nous avons privilégié des sels d'acétate.

c. Cubes de céramique

Traitement des cubes sans dopage :

Le protocole CO₂ de référence utilisé pour les cubes macroporeux de céramique suit les mêmes étapes que celui utilisé pour les poudres.

Un certain nombre de cubes (10 g) sont mis dans un bécher et recouverts d'eau désionisée (20 g) avec donc un rapport L/S égal à 2.

Un rapport L/S plus petit a été choisi ici. En effet, n'ayant pas besoin de prélever les poudres en surface et souhaitant obtenir une modification surfacique importante, il a été choisi de diminuer la quantité de liquide présente. Cela pourrait permettre de concentrer au maximum les espèces issues de la dissolution et possiblement favoriser un revêtement plus important. Ce paramètre fera cependant l'objet d'une étude afin d'évaluer au mieux son influence.

Une fois le bécher placé dans la chambre du sécheur, cette dernière est réglée à 5°C. Le CO₂ est ensuite introduit jusqu'aux $\frac{3}{4}$ de la chambre. Les étapes de montée en température et pression sont identiques à celles qui ont été décrites précédemment,

comme le montre la Figure 22 : Schéma du protocole de traitement des cubes macroporeux de céramiques Figure 22. Les cubes une fois sortis du sécheur sont conservés dans le liquide utilisé pour le traitement pendant une heure (1 h) (Etape 4, Figure 22). Ils sont ensuite séchés à l'étuve pendant 24 h à 50 °C (Etape 5, Figure 22).

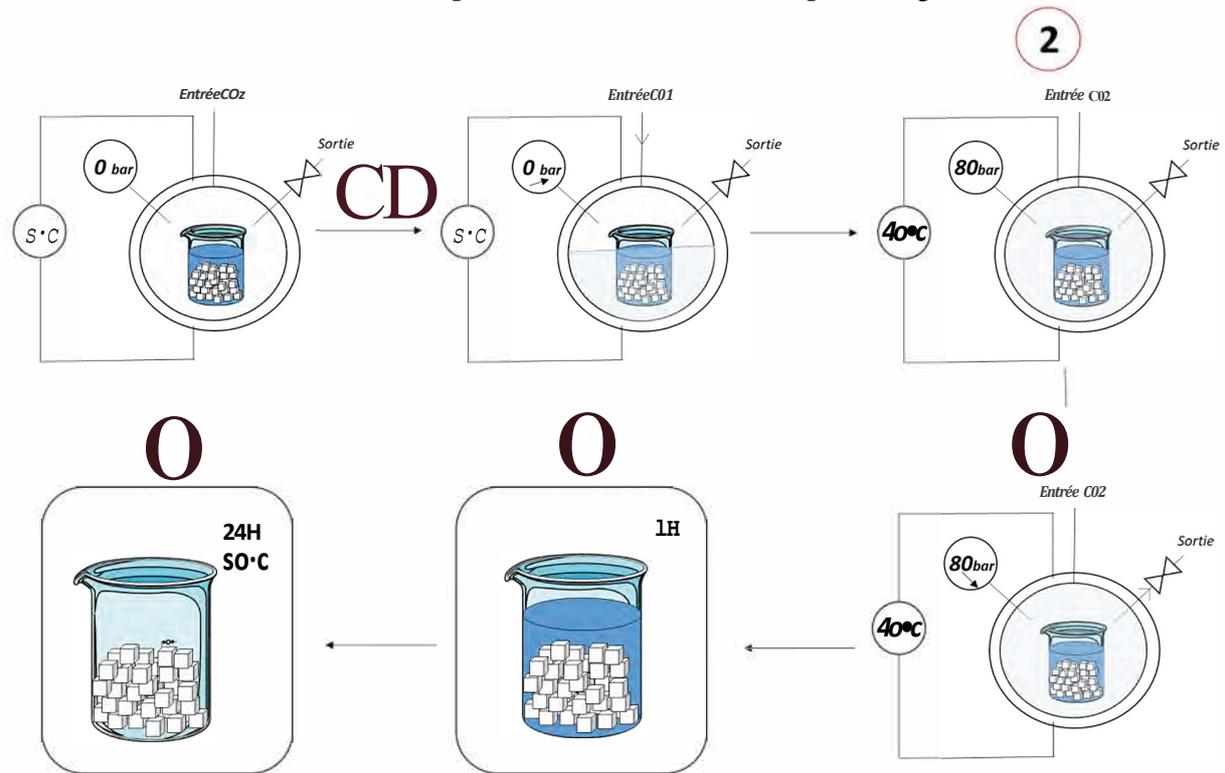


Figure 22 : Schéma du protocole de traitement des cubes macroporeux de céramiques

Comme il sera présenté dans la partie 3, l'influence des paramètres du procédé sur la modification des cubes de céramiques a été étudiée.

Comme évoqué précédemment, le rapport liquide/solide a été choisi comme paramètre à évaluer (0, 2, 20). Le temps de contact sous pression (4h, 100h) et le temps de repos dans le milieu après le procédé (0, 30min, 24H) ont également été modifiés.

Enfin, des paramètres opératoires tels que la pression (60, 80, 100bar), la température (40, 50, 80 °C) ou la durée de décompression (2min, 30min, 24h) ont également fait l'objet d'étude. Un ensemble des paramètres opératoires et leur gamme d'étude sont rassemblés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Détails des paramètres du procédé pour les différentes expériences réalisées sur les cubes céramiques

	L/S	Temps de traitement (heures)	Temps de repos; dans le milieu post-procédé (min)	Pression (bar)	Température (°C)	Temps de dépressurisation (min)	Vitesse de pression	Milieu
Protocole de référence	2	1	1	80	40	30	/	Eau
Température	2	1	1	80	50	30	/	Eau
	2	1	1	80	80	30	/	Eau
Pression	2	1	1	60	-10	30	/	Eau
	2	4	1	100	-10	30	/	Eau
Temps de traitement	2	100	1	80	-10	30	/	Eau
Support L/S	Sec	1	1	80	-10	30	/	Eau
	20	1	1	80	-10	30	/	Eau
Temps de repos; dans le milieu post-procédé	2	1	0	80	-10	30	/	Eau
	2	1	21	80	-10	30	/	Eau
Temps de dépressurisation	2	1	1	80	-10	2	/	Eau
	2	1	1	80	-10	1440	/	Eau
Vitesse de pression	2	4	1	80	-10	30	Oni	Eau
Milieu	2	1	1	80	-10	30	/	SBF

Traitement des cubes avec dopage *in-situ* :

Le protocole de traitement des cubes avec dopage *in situ* a été réalisé selon le protocole de référence décrit précédemment pour les cubes sans dopage, en utilisant les mêmes solutions d'acétates que celles qui ont été utilisées pour le dopage des poudres (Tableau 7).

2.2.2 Méthodes de caractérisation

Différentes techniques de caractérisation ont été mises en œuvre afin d'effectuer une caractérisation physico-chimique la plus fine possible des produits obtenus après les différents types de traitement. Les poudres non dopées ont été analysées par spectroscopies vibrationnelles (FTIR et RAMAN), DRX et MEB. Les poudres dopées ont été en plus analysées par EDX.

Dans un premier temps, les cubes ont été broyés. La poudre a par la suite été traitée afin d'appliquer le protocole de modification des poudres et ainsi d'évaluer la possibilité de modification de la céramique composant les cubes. Par la suite, les blocs poreux non broyés ont directement été traités puis caractérisés par MEB, porosimètre à mercure et BET Krypton. Lorsque les analyses FTIR-ATR et DRX n'ont pas donné de résultats concluants, d'autres techniques ont été utilisées afin d'identifier la nouvelle phase de solide formée par précipitation comme la RMN du solide et les échanges ioniques.

Les cubes dopés ont également été analysés par EDX. Enfin leurs propriétés biologiques ont pu être évaluées *via* des tests préliminaires antibactériens ainsi que des tests de viabilité et de mesure d'ALP (phosphatase alcaline, un des marqueurs de l'activité cellulaire).

Finalement certains des milieux aqueux utilisés pendant le procédé ont également été analysés par ICP afin de disposer à la fois des compositions de la solution et du solide (céramique). L'ensemble de ces méthodes est présenté dans la section ci-dessous.

2.2.3 Microscopie électronique à balayage

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope FEG JSM 7100F TTLS (Fields Emission Gun, JEOL, Japon). La distance de travail utilisée est de 10 mm et la tension d'accélération de 2 kV en raison de l'accumulation des électrons (augmentation de la charge) sur la surface isolante des matériaux céramiques même une fois métallisés. Avant analyse, les échantillons ont été collés sur un scotch carbone double face puis métallisés à l'or grâce à un évaporateur SI50B Sputter Coater (Edwards, UK) pendant 90s. Des clichés ont été pris à différents grossissements.

2.2.4 Spectroscopies vibrationnelles FTIR et Raman

La spectroscopie vibrationnelle est particulièrement utile dans cette étude puisqu'elle permet de sonder les liaisons chimiques covalentes en présence dans le matériau étudié. La spectroscopie FTIR nous permet d'évaluer globalement la composition du matériau en mode transmission (préparation d'une pastille de l'échantillon dans du KBr) et la microspectroscopie Raman permet de cibler l'analyse sur une zone définie de l'échantillon. Il est important de souligner que, concernant l'étude de la modification des cubes de céramiques biphasiques macroporeuses, ces analyses n'ont pas pu être réalisées en raison de la faible épaisseur de la couche modifiée à la surface mais aussi du fait que le substrat comme la couche modifiée sont constitués de phosphates de calcium ; il a été très difficile de les distinguer de la structure initiale, que ce soit avec la spectroscopie Raman comme la spectroscopie FTIR en mode réflexion totale atténuée (ATR). En revanche, la poudre issue de cubes broyés modifiée à bien pu être analysée via ces techniques (FTIR en mode Transmission, Raman). Ces méthodes d'analyse sont décrites plus en détails ci-dessous.

a. Spectroscopie Infra rouge

Le spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) utilisé ici est un spectromètre Nicolet 5700 (Thermo Electron). Les analyses ont été réalisées dans une gamme spectrale de 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} et 64 accumulations en soustrayant le bruit de fond instrumental.

Des pastilles ont été élaborées avec 1 mg de poudre du matériau à analyser et 300 mg de KBr (qualité spectroscopique) et mises en forme à l'aide d'une presse et d'une pression de 8 tonnes.

Les données spectroscopiques ont été traitées grâce au logiciel OMNIC.9.6. La ligne de base a été tracée ainsi qu'une normalisation sur la bande $\nu_3\text{PO}_4$. Cette normalisation a par la suite permis de quantifier les aires sous la courbe des bandes carbonates sur la gamme spectrale de 1580-1380 cm^{-1} . Elle a également permis, grâce au logiciel Labspec 6, la décomposition des bandes dans la gamme 650-500 cm^{-1} . En utilisant les assignations de la littérature et en faisant une décomposition Gauss/Lorentzienne, cela a permis de mettre en valeur la présence d'une couche hydratée de l'apatite en présence. Cette dernière est en effet visible dans cette zone via la présence de bandes caractéristiques de groupes ioniques labiles qu'elle contient tels que PO_4^{3-} ou HPO_4^{2-} , respectivement 617 and 530 cm^{-1} .

b. Micro-spectroscopie Raman

Les spectres Raman ont été obtenus grâce au microscope confocal Raman Labram HR 800 Yvon Jobin (HORIBA YVON JOBIN- Japon). Le laser utilisé est dans le vert (longueur d'onde 532 nm) avec un réseau 600 traits, un grandissement optique de 100, une ouverture de 100% et 3 accumulations pendant 15 s.

Afin de distinguer autant que possible les phases, et bien que l'analyse soit plus longue, des essais à 1800 traits, 3 accumulations de 60 s chacune ont été également réalisés. Bien qu'ils conduisent à une perte d'intensité, la résolution est bien meilleure et permet ainsi une analyse plus fine des différentes phases en présence.

Les spectres ont ensuite été traités avec le logiciel Labspec 6. La ligne de base a été tracée pour chaque spectre. De la même manière que pour les spectres FTIR, des décompositions ont été faites. Des bandes ont été assignées en fonction de la littérature et des décompositions Gauss/Lorentziennes ont ensuite été imposées permettant ainsi de définir la participation de chaque bande et d'affiner l'analyse des phases en présence.

2.2.5 Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X nous a permis d'identifier les phases cristallines présentes dans les échantillons de poudre avant et après traitement avec du CO_2 à haute pression. Le diffractomètre utilisé est un Bruker D8 avec une anticathode au cuivre ($K_\alpha = 1.5406 \text{ \AA}$) sous 40 kV et 40 mA. Le diffractomètre a été utilisé en mode rasant avec un porte-échantillon en silicium spécial en raison des petites quantités de poudres obtenues. Les paramètres de mesures sont les suivants : la gamme d'angles 2θ de 2-80°, un pas de 0,02° et un temps de comptage de 2 s.

Lors de mesures sur des quantités de poudre particulièrement faibles, des halos sont parfois visibles autour de 8° et 14°. Cela est dû à la présence du porte échantillon.

2.2.6 RMN en phase solide

Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) en phase solide du noyau ^{31}P mais aussi du couplage H-P, ont été réalisées en collaboration avec Thierry Azais du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris.

Ces analyses ont été menées sur un Avance 300 Bruker spectrometer (7.0T) avec une sonde double-résonance Magic Angle Spinning (MAS) de 4 mm. Ces analyses ont été menées sur les substituts poreux avant et après traitement CO_2 afin de déterminer la nature des nouvelles phases précipitées.

Une série de mesure ^{31}P simple impulsion à 5kHz a été faite sur les substituts de références non traités puis traités.

Des mesures ont ensuite été faites en polarisation croisée afin d'évaluer l'environnement plus ou moins proche du phosphore : ^{31}P {découplé ^1H }. Les temps de recyclage entre chaque impulsion (7,5 et 1,5 s) et de contact (10, 1 ms et 200 μs) ont alors été modifiés.

Enfin une analyse hétéronucléaire 2D, ^1H - ^{31}P , des substituts poreux modifiés a été menée avec les paramètres suivants : n_{MAS} : 5 kHz, RD = 1.5 s, t_{CP} = 200 μs .

2.2.7 Porosimétrie à mercure

La porosité par intrusion de mercure permet d'obtenir des informations sur les caractéristiques du réseau poreux d'un échantillon solide. La gamme de tailles de pores accessible au sein du matériau est comprise entre 3 nm et 360 μm . Cette technique donne ainsi accès à la distribution de la taille des pores. Elle permet ici de déterminer les éventuelles modifications de porosités des cubes macroporeux de céramiques biphasiques après traitement au CO_2 à haute pression.

Les mesures ont été réalisées sur l'appareil de type AutoPore III (Micromeritics Instruments Inc-USA). La distribution de la taille des pores a été calculée comme le volume différentiel d'intrusion de mercure tracé en fonction de la taille des pores.

2.2.8 Mesure de la surface spécifique BET (Brunauer, Emmett et Teller)

Les mesures de surface spécifique des poudres et cubes de céramiques macroporeuses ont été réalisées selon la méthode BET basée sur l'adsorption physique gaz-solide dans la gamme de pressions partielles de gaz adaptée pour appliquer la loi BET. Sur les cubes, cela a permis de déterminer les éventuelles modifications apportées par le traitement au CO_2 à haute pression. Le gaz utilisé est le Krypton en raison des faibles surfaces spécifiques des matériaux étudiés.

L'appareil utilisé est de type ASAP 2010 (Micromeritics- USA) et ce type de mesure est basé sur la méthode Brunauer, Emmett et Teller.

Avant analyse, les échantillons ont été dégazés pendant 12 h à 50°C. Durant la mesure la température est maintenue à 77 K.

Des mesures ont été faites plusieurs fois sur les substituts poreux de céramique BCP *Non Traités* et *Traités* avec le protocole à 1h repos, et sont respectivement de 0.6 ± 0.006 m²/g et 0.98 ± 0.02 m²/g. Des erreurs faibles sont constatées. L'incertitude de la machine est, elle donnée à 0.03 m²/g

De par une quantité limitée de céramiques disponibles et l'accessibilité à la technique, les autres mesures présentées dans cette étude n'ont pu être doublées, les mesures seront donc à prendre avec précaution.

2.2.9 Echange ioniques

Ces essais ont été mis en place afin de déterminer ou non la présence de nanocristaux apatitiques en surface des céramiques modifiées grâce au procédé CO₂ haute pression.

Des échanges ioniques sont possibles lorsqu'une telle phase est mise en présence d'une solution ionique, des échanges étant possible très rapidement entre la couche hydratée et son environnement.

Ainsi, des cubes (3.3g) *Non Traités* et *Traités* ont été indépendamment immergés dans une solution (30mL) de Mg (3.5 M) pendant 10 min, ce temps étant suffisant pour permettre un échange³¹. Trois séries d'échantillons ont été produits pour un même type de céramique.

Trois rinçages à l'eau désionisée avec un passage aux ultrasons ont été réalisés afin d'enlever au mieux tout résidu de magnésium non lié aux céramiques.

Les substituts ont ensuite été dissouts dans 6 mL de solution d'acide chloridrique à 1%. Le dosage du magnésium dans ces solutions a ensuite été fait grâce à des mesures de Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) ANALYTIK JENA.

Des cubes de céramiques non immergés dans la solution ont également fait l'objet d'une dissolution et de mesure de concentration en magnésium.

2.2.10 Tests de libération

Ces tests ont permis de déterminer la cinétique de libération des espèces ioniques bioactives (Ag, Zn, Cu, Sr) contenues dans les cubes dopés. Le milieu utilisé ici est un liquide simulant les fluides biologiques (Simulated Body Fluid-SBF). Cependant, de nature métastable, il a été dilué ici afin d'éviter la précipitation d'un phosphate de calcium supplémentaire qui aurait pu influencer la libération des espèces ioniques introduites au cours du traitement. Une solution ajustée à pH 7,2 et contenant 90% de la totalité des sels contenus dans le SBF a donc été utilisée. Cette solution sera appelée SBF à 90% ou SBF 0,9.

Milieu réactionnel :

L'eau utilisée pour préparer les solutions mises en œuvre pour cette étude est de l'eau désionisée. Le milieu aqueux classiquement utilisé a été remplacé pour l'une des

expériences par une solution de type Simulated Body Fluid (SBF) à 90% dont la composition est indiquée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Composition du SBF à 90% d'après Kokubo ²⁸³

Composé	Quantité pour 1 L (g)
NaCl	7,2315
NaHCO ₃	0,3195
KCl	0,2025
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,2079
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,2799
1.0 M-HCl	35,1000
CaCl ₂	0,2628
Na ₂ SO ₄	0,0648
Tris	5,5062

Les céramiques (10 g) ont été immergées dans une solution de SBF à 90%, préparée comme décrit dans le Tableau 9 (200 mL) et placées sur une plaque d'agitation magnétique. Le milieu a ensuite été prélevé (15mL) à différents temps (15 min, 1h, 2h, 3h, 5h, 7h, 24h, 48h, 72h, 7 jours, 9 jours, 14 jours, 17 jours et 21 jours). A chaque prélèvement, 15 mL de SBF 90% est ajouté pour compenser la quantité de milieu prélevé. Ces facteurs de dilution sont pris en compte dans les calculs des concentrations déterminées par la suite grâce aux dosages.

Les ions d'intérêt et en particulier les ions dopants de chaque prélèvement ont été dosés par spectrométrie ICP grâce à un spectromètre ULTIMA2R (HORIBA – JOBIN YVON, Japan).

2.2.11 Tests biologiques

Les tests biologiques ont été réalisés sur les cubes, car ce sont les matériaux qui à terme pourraient être implantés, contrairement aux poudres qui ont été étudiées à des fins de compréhension des phénomènes physico-chimiques associés à leur traitement au CO₂ à haute pression. Ces tests biologiques préliminaires ont été menés sur tous les cubes : référence, simplement modifiés et modifiés en présence d'espèces actives (Zn, Sr, Cu, Ag). Malgré le fait que des travaux ont permis de prouver que le CO₂ haute pression pouvait être utilisé comme procédé de stérilisation ^{238,253,254}, aucun test n'a été réalisé au cours de ce travail pour confirmer cette hypothèse et un soin particulier a été apporté aux échantillons afin de maintenir le plus possible leur potentielle stérilité. Ils ont également été stérilisés sous UV (253,7 nm) une heure avant de débiter toute analyse biologique.

a. Tests cellulaires

Ces tests ont été réalisés à l'University of Technology of Sydney (UTS).

Les essais cellulaires ont été réalisés sur des cellules primaires de souris, le type cellulaire étant des ostéoblastes de souris 3T3E1. Le milieu de culture utilisé est un MEM (Minimum Essential Media) contenant 10% de sérum bovin fœtal et 5% de pénicilline/streptomycine, l'incubateur utilisé pour la prolifération étant maintenu à 37°C à 5% de CO₂.

Deux paramètres ont été évalués à 7 jours : la viabilité ainsi que l'ALP (Phosphatase alcaline) grâce à des kits différents, mais reposants tout deux sur la modification de l'absorbance du milieu.

Les mesures d'absorbance ont été réalisées à 600 nm grâce au spectrophotomètre Tecan Infinite M1000 Pro Multilabel Microplate Reader.

i. Viabilité cellulaire

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire, le protocole PrestoBlue™ de Thermo Scientific a été appliqué. Ce protocole repose sur l'introduction de résazurine, un réactif, dans le milieu cellulaire. La quantité est ajustée en fonction du volume de chaque puit (cellule et milieu). Une fois le réactif introduit il faut attendre 10 min d'incubation à 37°C. Ce dernier va être réduit en résorufine par les cellules encore métaboliquement actives. Ce composé modifiant l'absorbance du milieu, il permet d'évaluer le nombre de cellules encore en vie. Ainsi plus l'absorbance est élevée, plus le nombre de cellules vivantes est élevé.

ii. ALP

L'ALP (Phosphatase Alcaline) est un marqueur caractéristique des ostéoblastes. Elle aurait un rôle dans la différenciation cellulaire. Cette enzyme est connue pour être un des marqueurs biochimiques les plus reconnus de l'activité des ostéoblastes. Son rôle n'est pas encore parfaitement compris mais elle serait largement impliquée dans la minéralisation osseuse, notamment concernant la précipitation de phosphates de calcium lors de la formation de la nouvelle matrice osseuse^{284,10}. C'est pourquoi sa quantification pourrait permettre d'appréhender l'activité cellulaire des ostéoblastes en présence.

Un kit « p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System » (Sigma-Aldrich-USA) a été utilisé pour ces tests. Ce test est de type ELISA, qui repose sur une réaction enzymatique. Le substrat utilisé ici est le 4-nitrophényl-phosphate. Le produit de la réaction est le 4-nitrophénol. Ici aussi, plus l'absorbance est élevée plus il y a d'ALP.

Les cellules ont été introduites dans chaque puit à raison de 5000 cellules/cube céramique ainsi qu'un milieu nutritif DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Elles ont ensuite été incubées 3 jours avant les premières mesures puis 4 jours supplémentaires pour faire la mesure définitive à 7 jours.

b. Tests antibactériens

Ces analyses ont été réalisées à l'Université de Yonsei- Corée du Sud.

Ces tests ont été conduits avec deux souches de bactéries : l'une Gram+ (*B. Subtilis*) et l'autre Gram – (*E. Coli*). Les essais ont été réalisés en triplicat pour chaque matériau à tester.

Les cubes (1 g) ont dans un premier temps été mis en contact avec un milieu contenant les bactéries (1 mL soit 10 000 bactéries). Après 24 h d'incubation à 37°C sous agitation le milieu est prélevé et mis en culture sur une plaque d'agar-agar. Là encore, les échantillons incubent pendant 24 h à 37°C (Figure 23).

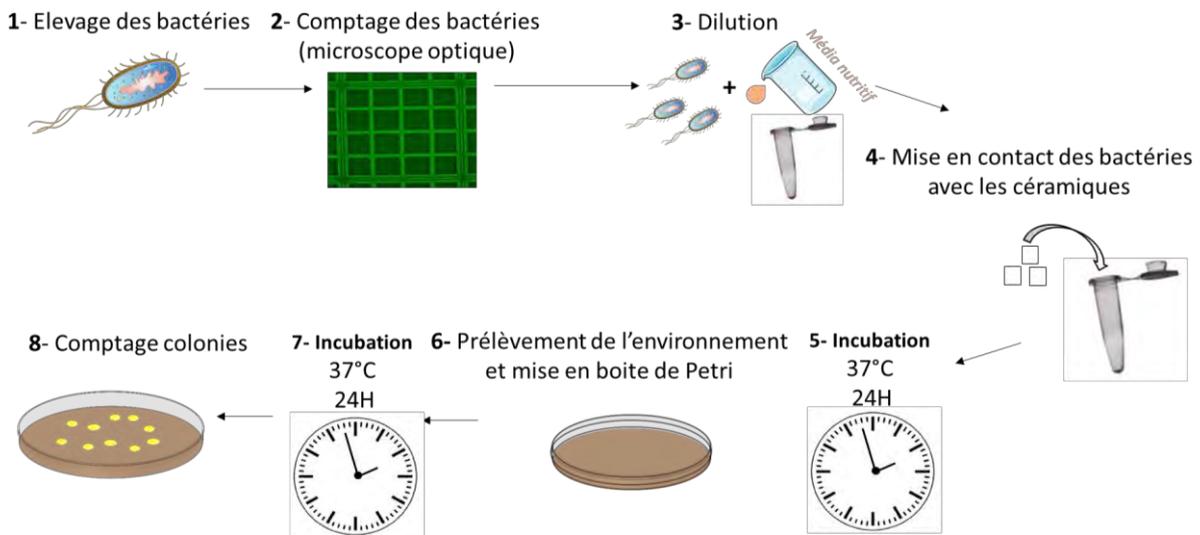


Figure 23 : Les grandes étapes du protocole des essais antibactériens

Les colonies sont alors comptées. Un contrôle (plaque avec bactéries n'ayant été en contact avec aucun cube) est utilisé à chaque fois afin de pouvoir évaluer l'efficacité des cubes céramiques dopés avec une évolution normale des bactéries. Un exemple des résultats obtenus après incubation est présenté sur la Figure 24.

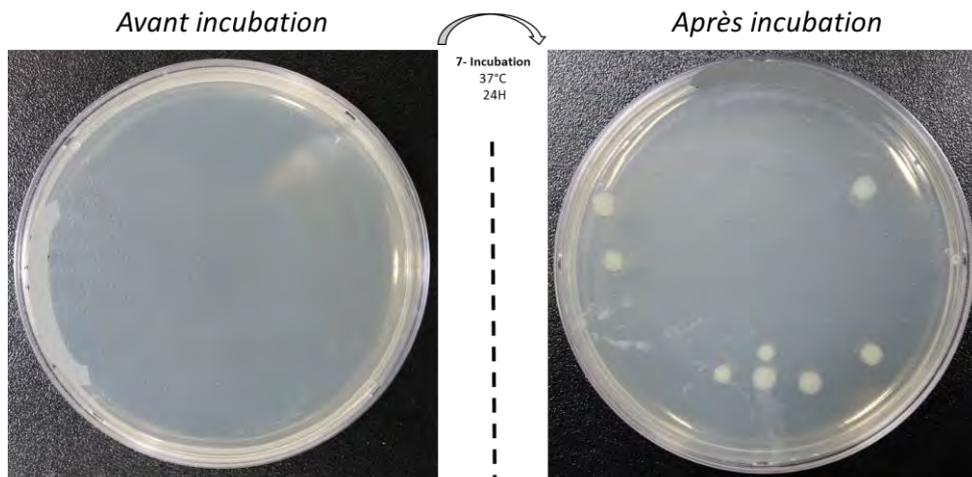


Figure 24 : Exemple de résultats obtenus lors des essais antibactériens, ici la bactérie *E. Coli* avec l'échantillon dopé au *Sr Intermédiaire*

Les résultats sont exprimés en ratio d'inhibition d'après la formule suivante :

$$\text{ratio d'inhibition} = \left(1 - \frac{\text{Nombre de colonie}}{\text{Nombre de colonies sur la plaque de contrôle}}\right) \times 100\% \quad 2-1$$

Plus le ratio d'inhibition est fort, plus l'activité antibactérienne des cubes est importante. Un ratio négatif signifie que le nombre de colonie est plus important sur l'échantillon que sur le contrôle.

2.3 Conclusion

L'ensemble des échantillons produits et les méthodes de caractérisation utilisées dans cette étude sont ainsi résumées dans le Tableau 10 .

Tableau 10 Résumé des différents échantillons produits et des techniques employées pour les analyser.

		<i>MEB-FEG</i>	<i>FTIR</i>	<i>RAMAN</i>	<i>DRX</i>	<i>RMN</i>	<i>Porosimétrie Mercure</i>	<i>BET Krypton</i>	<i>Tests de libération</i>	<i>Tests cellulaires</i>	<i>Tests antibactériens</i>
		<i>LGG</i>	<i>GIRIMAT</i>	<i>GIRIMAT</i>	<i>GJRIMAT</i>	<i>LCMPC Paris</i>	<i>GIRIJJAT</i>	<i>LGG</i>	<i>GIRIMAT</i>	<i>UTS Australie</i>	<i>Université Yonsei Corée du Sud</i>
						<i>Destructive</i>	<i>Destructive</i>		<i>Destructive</i>	<i>Destructive</i>	<i>Destructive</i>
<i>Cubes</i>	<i>Références</i>	X				X	X	X		X	X
	<i>Modifiés CO₂</i>	X				X	X	X		X	X
	<i>Modifiés CO₂ dopés</i>	X					X	X	X	X	X
<i>Poudres</i>	<i>Références</i>	X	X	X	X			X			
	<i>Modifiées CO₂</i>	X	X	X	X						
	<i>Modifiés CO₂ dopés</i>	X	X	X	X						

Partie 3 : Modification de céramiques

Il a été montré dans la partie 1 que les apatites biomimétiques carbonatées sont des phosphates de calcium d'intérêt dans le domaine de la régénération osseuse. En effet, leur composition chimique et leur structure cristalline, analogues à celles du minéral osseux, couplées à la présence d'une couche hydratée de surface qui leur confère leur réactivité, font de ces composés des candidats idéaux pour une utilisation en tant que dispositifs médicaux pour la réparation osseuse.

Leur synthèse se fait généralement à basse température à pression atmosphérique ou par hydrolyse d'autres phases phosphocalciques, dans tous les cas en milieu aqueux⁹⁷.

D'autre part, le CO₂ a montré lors de différentes recherches, à la fois sa capacité de carbonatation mais aussi sa capacité à modifier le pH d'un environnement aqueux et ce de manière réversible. ^{226,271,285}

La première partie de ce travail se propose d'évaluer les possibilités de modification de céramiques phosphocalciques grâce à un procédé en phase aqueuse assisté par du CO₂ à haute pression.

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent aux modifications chimiques de surface des céramiques au cours du traitement, nous avons souhaité dans un premier temps effectuer les traitements CO₂ sur des céramiques à l'état de poudre. Nous avons choisi des poudres de même composition chimique que celles utilisées pour la confection des dispositifs poreux en céramiques phosphocalcique biphasiques (BCP) que nous étudierons dans la deuxième partie de cette étude.

Comme nous le verrons par la suite, les modifications induites au cours du traitement CO₂ sont liées à la solubilité des phosphates de calcium en milieu aqueux. Afin d'augmenter les effets du traitement et de faciliter la caractérisation des nouvelles phases déposées ou formées, nous avons choisi d'utiliser des poudres non traitées thermiquement⁵ et par conséquent qui possèdent une solubilité nettement supérieure à celle des poudres frittées qu'on retrouve dans les céramiques BCP. Les caractéristiques de ces poudres ont été présentées dans la partie précédente.

Cette étude a été menée sur des poudres de compositions différentes afin de déterminer les mécanismes impliqués et identifier les différences de comportement selon la nature des poudres de départ. L'étude relative à chaque poudre sera présentée séparément : dans un premier temps nous présenterons les résultats obtenus avec l'HA, puis le TCP amorphe (amTCP) et enfin le mélange massique 65/35 de ces deux poudres/phases, proportions similaires à celles utilisées pour produire les céramiques BCP (HA/ β TCP) commerciales qui ont été mises en œuvre dans cette étude.

Dans un deuxième temps, la poudre directement issue de cubes de BCP finement broyés a été traitée. L'étude s'est poursuivie par la modification de ces cubes et l'identification

des phases précipitées en surface. Enfin l'influence des différents paramètres du procédé de traitement par CO₂ haute pression en milieu aqueux, comme la pression, la température ou la vitesse de décompression sur l'intégrité du revêtement a été évaluée.

3.1 Traitement des poudres

Cette première étude a été menée sur des poudres non traitées thermiquement : Une poudre d'HA, de TCP amorphe (amTCP) et enfin une poudre constituée d'un mélange massique 65% HA et 35% amTCP ont été utilisées afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors du traitement en milieu aqueux en contact avec du CO₂ haute pression et d'évaluer l'impact de la composition initiale de la poudre sur les phases nouvellement précipitées. Les conditions expérimentales de ces tests sont 80 bar, 40 °C et 4 h de mise en contact. Dans cette partie, l'influence de ces paramètres n'a pas été étudiée, l'objectif étant de mettre en évidence les modifications de structure chimique observées sur ces phases.

Le dispositif décrit dans la partie 2 (enceinte haute pression) ne permettant pas de suivre *in situ* les paramètres principaux de l'étude, comme la concentration en ions calcium, phosphates, carbonates et le pH local pendant le procédé, les poudres seront caractérisées post-traitement par diffraction des rayons X, spectroscopies infra-rouge (FTIR) et RAMAN et microscopie électronique à balayage (MEB). Cela permettra d'établir des hypothèses concernant les mécanismes mis en jeu au cours du traitement CO₂ haute pression. Les résultats seront présentés séparément pour chaque type de poudre.

Une quantité (0,1 g) de poudre d'HA (surface spécifique 8,9 m²/g) ou d'amTCP (surface spécifique 57,3 m²/g) est recouverte d'eau distillée en considérant un rapport massique liquide sur solide égal à 100 (L / S = 100) et introduite dans la cellule du sécheur CO₂ supercritique réglée à 5 °C. L'appareil est ensuite rempli de CO₂ liquide, avant d'être chauffé à 37 °C (Figure 26- Partie 1). Lorsque la température augmente, la pression augmente jusqu'à atteindre 80 bar. La dissolution du CO₂ dans l'eau se produit, accompagnée par la formation d'acide carbonique selon les équations 3-1 à 3-3, conduisant à l'acidification de la solution à un pH qui, d'après les données expérimentales de la littérature serait de 3,1²⁵ dans les conditions utilisées ici (Figure 25).

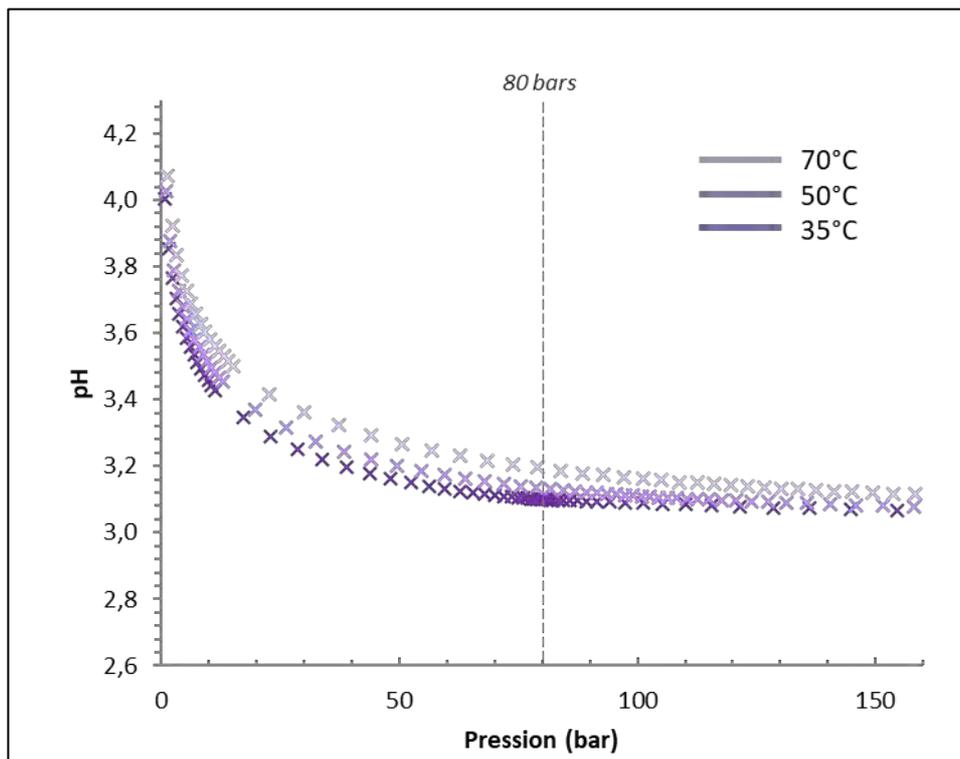
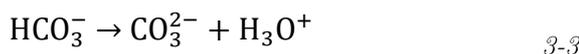
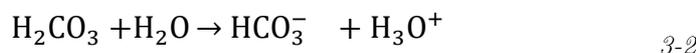
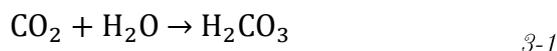


Figure 25 Données expérimentales de mesure de pH d'un milieu aqueux à différentes pression de CO₂ et différentes températures²⁵⁹

A ce pH, le CO₂ est présent dans le milieu sous forme de CO₂ dissout et d'H₂CO₃ :



Le système est maintenu à 40°C et 80 bar pendant 4 heures (Figure 26-partie 2), puis lentement décomprimé pendant 30 minutes (Figure 26- Partie 3). Une température basse a été choisie en fonction des paramètres de synthèse requis pour obtenir une apatite biomimétique⁹⁷. Une telle température favorise un pH bas tel que montré dans la littérature⁹⁷. La diminution de la pression et le dégazage progressif du CO₂ dissout induisent une augmentation lente du pH jusqu'au retour à la neutralité. À la fin de l'expérience une poudre est visible au fond du bécher, qui est appelée *Poudre Fond*.

L'ensemble du bécher contenant la poudre et le milieu aqueux est ensuite placé dans une étuve ventilée à 50°C pendant une heure pour accélérer le phénomène d'évaporation de l'eau (Figure 26- Partie 4). Au cours de cette étape, un nouveau dépôt est formé à l'interface air-eau ; cette nouvelle phase solide est référencée dans la suite de l'étude comme : *Poudre Surface*. Cette nouvelle phase solide se forme lentement à l'interface des phases liquide et gazeuse pour recouvrir, en fin d'expérience, toute la surface de la

solution. Ce dépôt *Poudre Surface* est ensuite prélevé et séché en même temps que la *Poudre Fond* pendant 24 h à 50 ° C (Figure 26- partie 5).

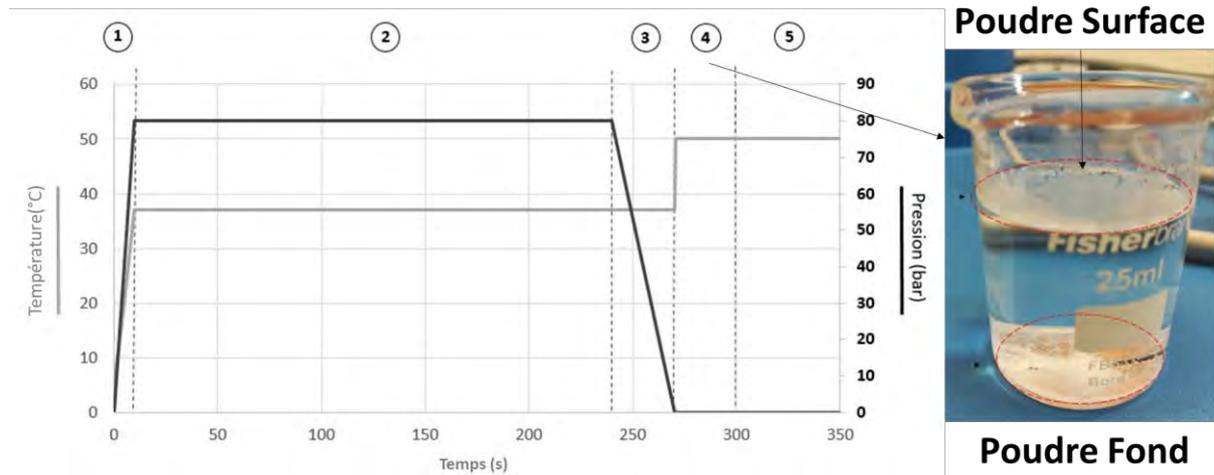


Figure 26 Paramètres (température et pression) définis au cours des étapes du processus [1- Pressurisation, 2- 4 h de traitement, 3- Décompression, 4- Précipitation d'une nouvelle phase en surface, 5- Début de l'étape de séchage de 24 h]

Il est important de noter que la quantité de poudre restante au fond du bécher (*Poudre Fond*) est inversement proportionnelle à la solubilité de la phase traitée, avec des solubilités telles que : solubilité amTCP > HA. Ainsi, en fonction de la poudre traitée, une perte de masse entre la quantité de poudre introduite et la *Poudre Fond* restante, est comprise entre 5% et 20% environ.

La solubilité thermodynamique des poudres dans ces conditions a été évaluée grâce au logiciel de spéciation chimique PHREEQC. PHREEQC est un logiciel de modélisation géochimique capable de décrire les réactions chimiques et les processus de transport dans l'eau. Il est basé sur la chimie à l'équilibre de solutions aqueuses avec d'autres composants, tels que des minéraux, des gaz, des solutions solides et des surfaces absorbantes. Dans notre cas, nous l'avons utilisé pour connaître les espèces en présence compte tenu de leur solubilité dans le milieu, en tenant compte des constantes de solubilité des composés. Les cinétiques de dissolution/solubilisation, inconnues et, dans notre cas, difficiles à déterminer, n'ont pas été prises en compte, de même que l'état des poudres introduites (surface spécifique, traitement thermique...). Ces simulations permettent cependant de définir la gamme de pH potentiellement atteinte en solution et la quantité de solide pouvant théoriquement être dissoute dans nos conditions expérimentales avant d'atteindre la saturation.

Les résultats présentés sur la Figure 27 correspondent à la simulation d'un ajout, étape par étape, d'une quantité définie de céramiques (HA ou β TCP), jusqu'à atteindre la saturation d'un milieu composé d'eau saturée en CO₂ (la pression partielle de CO₂ dans le ciel gazeux est imposée et l'équilibre liquide-vapeur du système CO₂-eau est prédit par

une approche hétérogène dans laquelle le comportement de la phase CO_2 est représenté par l'équation d'état de Peng-Robinson ²⁸⁶ et la phase liquide par le modèle de Debye-Huckel étendu ²⁸⁷. La saturation du milieu est atteinte peu à peu lorsque la quantité de poudre sous forme solide (non dissoute) augmente dans le système. Les simulations ont été effectuées à partir d'Hydroxyapatite pure et de TCP sous sa forme β (Whitlockite), la forme amorphe n'étant pas disponible dans la base de données PHREEQC.

La solubilité plus importante du TCP ³² dans le mélange HA/TCP a ainsi été confirmée dans notre système. En effet, on constate sur la Figure 27 qu'environ $2,7 \cdot 10^{-5}$ moles de HA, soit 0,0132 g, peuvent être solubilisées dans 10 mL d'eau (correspondant à une solubilité massique de 1,32 g/L), alors qu'il est possible de dissoudre environ $6,6 \cdot 10^{-5}$ moles de TCP soit 0,0205 g (correspondant à une solubilité massique égale à 2,045 g/L). Le pH atteint, lorsque la solution est saturée, sera dans les deux cas proche de 4,5 (valeur légèrement plus faible dans le cas du TCP).

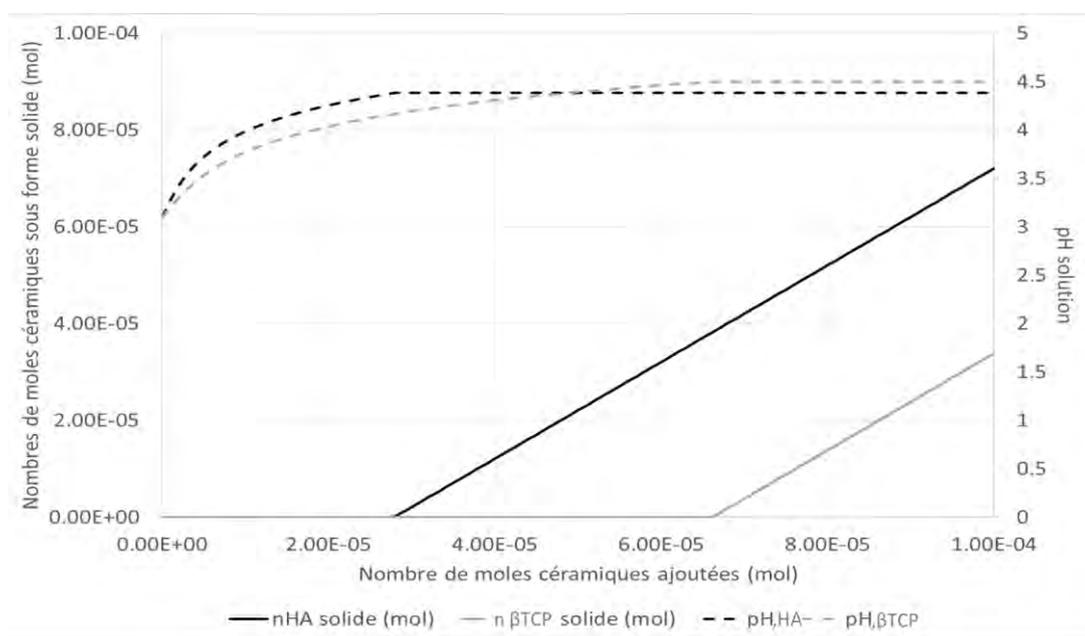


Figure 27 Evolution théorique du nombre de moles de céramiques sous forme solide et du pH de l'eau lors de l'ajout de céramique (HA et TCP) dans 10 mL d'eau en présence de CO_2 à 80 bar et 40°C (calculs PHREEQC)

Les pertes de masse moyennes observées sur les poudres, de l'ordre de 5 à 20%, sont donc de l'ordre de grandeur des pertes de masse que l'on devrait observer si la totalité de l'eau était saturée. Sur les 0,1 g de poudre introduites dans 10 mL d'eau, seuls 0,0132 g de HA (soit environ 13%) et 0,0205 g de TCP (soit environ 20%) pourraient être solubilisés dans le milieu aqueux d'après les valeurs de solubilités théoriques obtenues grâce à PHREEQC. Les valeurs légèrement inférieures obtenues peuvent s'expliquer par les cinétiques de dissolution. Celles-ci peuvent être influencées d'une part par la taille des particules et notamment leur surface spécifique ainsi que par d'éventuelles hétérogénéités en solution, responsables de gradients de concentration des espèces dissoutes pouvant ralentir le processus de dissolution. Dans notre cas, le milieu n'étant pas agité, des gradients de concentration seront présents dans le milieu.

Dans le cadre de cette étude préliminaire, visant à identifier la nature chimique des espèces présentes aux différents stades du procédé, nous n'avons pas étudié l'influence de ces paramètres, ni celle de la pression, la température ou du rapport L/S, sur les quantités de poudre dissoute obtenues.

Ainsi, lors de la phase de dissolution des poudres, différentes espèces ioniques (Ca^{2+} , HPO_4^- , PO_4^- , H^+ ...) sont libérées dans la solution. Celles-ci diffusent progressivement créant ainsi un gradient de concentration qui dépend de la distance considérée par rapport à la surface de la poudre traitée. La libération des groupements phosphates et hydroxyde (pour HA) entraîne une augmentation locale du pH (Figure 27). Toutes les espèces ioniques disponibles au cours du traitement dans le milieu aqueux proviennent de la céramique à l'exception des carbonates qui proviennent de la dissolution de CO_2 . De plus, la protonation des groupements anioniques (phosphates et carbonates) permet d'assurer la neutralité électrique de l'environnement.

Les modifications de pH à l'échelle macroscopique dans le milieu au cours du processus de dissolution ont été mises en évidence expérimentalement grâce à l'utilisation d'un indicateur coloré (Figure 28), le bleu de bromophénol, dont le virage entre le bleu, pour les pH plus basiques et le jaune, pour des pH plus acides, se trouve entre 3 et 4,6. Sur les images obtenues après 10 min sous pression de CO_2 (Figure 28) la majorité de la solution est jaune, le pH est donc proche de 3. En revanche, un gradient de couleur est observable, un halo bleuté s'étant formé autour de la poudre confirmant un pH local plus élevé qui peut être responsable d'une dissolution progressive de la poudre et d'une diffusion des espèces ioniques ainsi libérées.

Ces observations ne peuvent pas être étayées par des simulations avec PHREEQC, car à ce stade nous ne pouvons tenir compte des cinétiques de dissolution et diffusion des espèces dans le milieu.

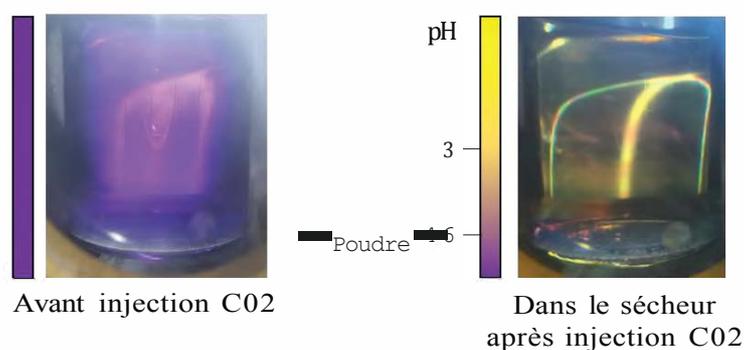


Figure 28 Images de la poudre HA/amTCP immergée dans une solution eau, bleu de bromophénol (virage du bleu au jaune à 8-4.6)

Lors de la décompression (retour à la pression atmosphérique), la libération du CO_2 dissous entraîne une augmentation progressive du pH dans l'ensemble du milieu jusqu'à se stabiliser une heure environ après avoir atteint la pression atmosphérique.

L'environnement change rapidement de couleur, moins d'une minute après le traitement, le pH global a dépassé 4,6 et la couleur de la solution est redevenue bleue dans son ensemble. Des mesures de pH obtenues à l'aide d'un pH-mètre, à la sortie du réacteur ont cependant permis d'observer un gradient de pH allant jusqu'à 1 unité pH entre le fond et la surface et évoluant en permanence. Ce dernier étant plus acide au fond qu'à la surface en contact avec l'air (l'interface de dégazage).

C'est durant l'heure de séchage à 50 °C que la poudre appelée Poudre S11.rjâce se forme à la surface de la solution (à l'interface solution-air) (Figure 29). Visuellement il a été possible d'observer que la première étape de formation du précipité consiste en la formation de germes particulaires éparses qui nucléent progressivement pour entrer en contact et fusionner pour former des plaques en surface. Ces plaques grandissent jusqu'à ne former plus qu'une pellicule recouvrant la surface entière du bécher.



Figure 29 Photo de Poudre Surface de l'HA/amTCP en formation

Afin de déterminer l'influence de la nature chimique de la poudre de départ sur les phases précipitées au cours du traitement, l'expérience précédemment décrite a été réalisée sur chacune des poudres (HA amTCP et HA/amTCP) et les résultats obtenus dans chaque cas sont présentés ci-après.

3.1.1 HA

Cette expérience a été menée sur une poudre d'HA commerciale n'ayant pas subi de traitement thermique.

Afin de déterminer la nature des poudres obtenues après traitement : *Poudre Fond* et *Poudre Surface*, des analyses DRX et FTIR ont été réalisées avant et après traitement. Les diagrammes de diffraction des RX des poudres recueillies après traitement de la poudre d'HA de départ mettent en évidence des structures cristallines apatitiques très similaires entre la poudre de référence et la *Poudre Fond* (JCPDS 00-009-0432) (Figure 30).

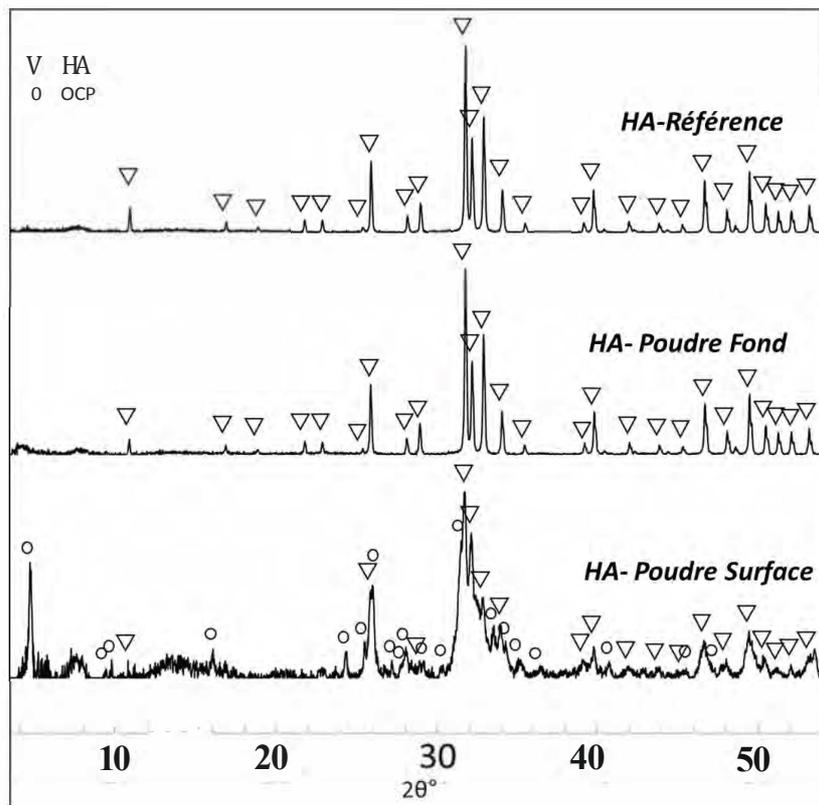


Figure 30 DRX de poudre d'HA, référence, Poudre Fond et Poudre Surface

En revanche le diffractogramme RX de la *Poudre Surface* met en évidence la présence de deux phases : une phase apatitique mal cristallisée caractérisée par des raies élargies par rapport aux raies de la référence et la présence d'OCP (JCPDS 00-026-1056). Les halos présents à 8° et 14° sur les diffractogrammes des poudres modifiées ne sont pas représentatifs car les analyses ont été réalisées sur une quantité très faible de poudre, engendrant un rapport bruit/signal important. Cette remarque est valable pour les expériences suivantes, réalisées avec les céramiques amTCP et HA/amTCP.

Des analyses de spectroscopie FTIR sont venues compléter les mesures DRX (Figure 31).

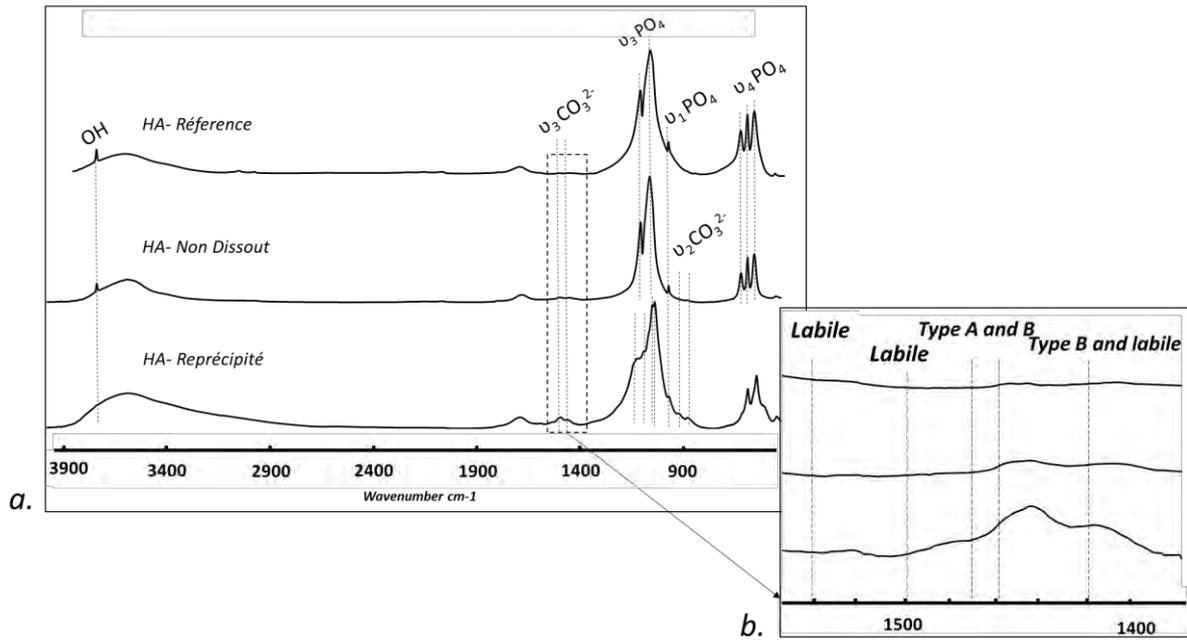


Figure 31 Spectre FTIR normalisé sur la ν_3 des PO_4 de la poudre d'HA référence, Poudre Fond, Poudre Surface,
a. Domaine 400-3900 cm^{-1} , b. Domaine 1380-1580 cm^{-1}

Les analyses par spectroscopie FTIR réalisées sur la poudre de référence et la *Poudre Fond* permettent de confirmer la présence majoritaire d'HA identifiée par les bandes caractéristiques à différentes longueurs d'ondes : $\nu_1 \text{PO}_4 - 962 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_4 \text{PO}_4 - 601 \text{ cm}^{-1}$, 575 cm^{-1} , 561 cm^{-1} ; OH 3175 cm^{-1} ...⁸⁸. La *Poudre Surface* est, elle, principalement composée d'OCP identifié par les bandes caractéristiques : $\nu_3 \text{PO}_4 - 1300-100 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_1 \text{PO}_4 - 962 \text{ cm}^{-1}$, P-OH des $\text{HPO}_4^{2-} - 917 \text{ cm}^{-1}$ 861 cm^{-1} , $\nu_4 \text{PO}_4 - 627 \text{ cm}^{-1}$ 601 cm^{-1} 575 cm^{-1} 560 cm^{-1} 524 cm^{-1} ...⁸⁸. L'absence de bande caractéristique de la vibration des groupements OH à 1375 cm^{-1} atteste de l'absence d'une HA stœchiométrique. Les bandes phosphate correspondant à une apatite carbonatée mal cristallisée (PCCA), en dehors de celles des carbonates, sont probablement confondues avec les bandes phosphate de l'OCP. Ces résultats viennent confirmer les conclusions faites grâce aux analyses DRX montrant la présence d'une phase apatitique et d'OCP.

Des bandes attribuées à des groupements carbonates sont visibles dans différentes zones ($1600-1300 \text{ cm}^{-1}$ et $900-800 \text{ cm}^{-1}$) comme indiqué dans le Tableau 11. Leur présence sera ici principalement évaluée dans la zone $1600-1300 \text{ cm}^{-1}$, en raison de la présence d'une bande HPO_4 à 917 cm^{-1} et de la faible intensité des bandes carbonates dans le domaine de vibration $900-800 \text{ cm}^{-1}$ des $\nu_2 \text{CO}_3$ qui rendent peu aisée l'identification des bandes dans ce domaine.

Tableau 11 Tableau des attributions des bandes carbonates en spectroscopie FTIR

Position (cm-1)	Attribution	
1540	$\nu_3 \text{CO}_3$	type A
1500		labile
1460-1470		type A et B
1420		type B et labile
880	$\nu_2 \text{CO}_3$	type A
871		type B
866		labile

Sur les spectres FTIR des *Poudre Fond* et *Poudre Surface*, présentés sur la Figure 31, les domaines de vibration des groupements carbonates permettent de discriminer les types de carbonates présents : carbonates de type A, carbonates de type B et carbonates labiles⁸⁸. Les carbonates de type A correspondent à une substitution des ions OH⁻ dans l'apatite, alors que les carbonates de type B concernent les substitutions d'ions PO_3^{2-} ^{48,88}. Les carbonates labiles sont contenus dans la couche hydratée de l'apatite²⁸⁸. Ici, le spectre de la *Poudre Fond* montre une présence faible des trois types de carbonates mais principalement de type B et labiles. Le spectre de la *Poudre Surface* semble contenir les mêmes types de carbonates mais en quantité plus importante.

Cette phase carbonatée ne peut être liée qu'à la présence d'une quantité plus ou moins importante d'apatite. Cette phase est bien connue mais peu visible en dehors de sa composante carbonates sur les spectres FTIR dans le cas présent.

En effet, concernant la *Poudre Fond*, les analyses réalisées par diffraction des RX ont révélé uniquement une phase bien cristallisée d'HA. Il semble peu probable que la phase initiale ait pu être carbonatée. La présence de carbonates relèverait donc d'une faible présence d'apatite carbonatée mal cristallisée. Cette dernière ne pourrait pas être visible sur les diffractogrammes de RX et les spectres FTIR en raison de sa faible cristallinité et quantité.

Concernant la *Poudre Surface*, elle est principalement composée d'OCP. Or l'OCP carbonatée n'existe pas²⁸⁹. La présence de bandes carbonates sur les spectres FTIR serait donc un indicateur de la présence d'une phase supplémentaire de PCCA.

L'étude MEB a permis d'observer les poudres avant (Référence a, b sur la Figure 32) et après traitement (*Poudre Fond* c, d et *Poudre Surface* e, f, g sur la Figure 32).

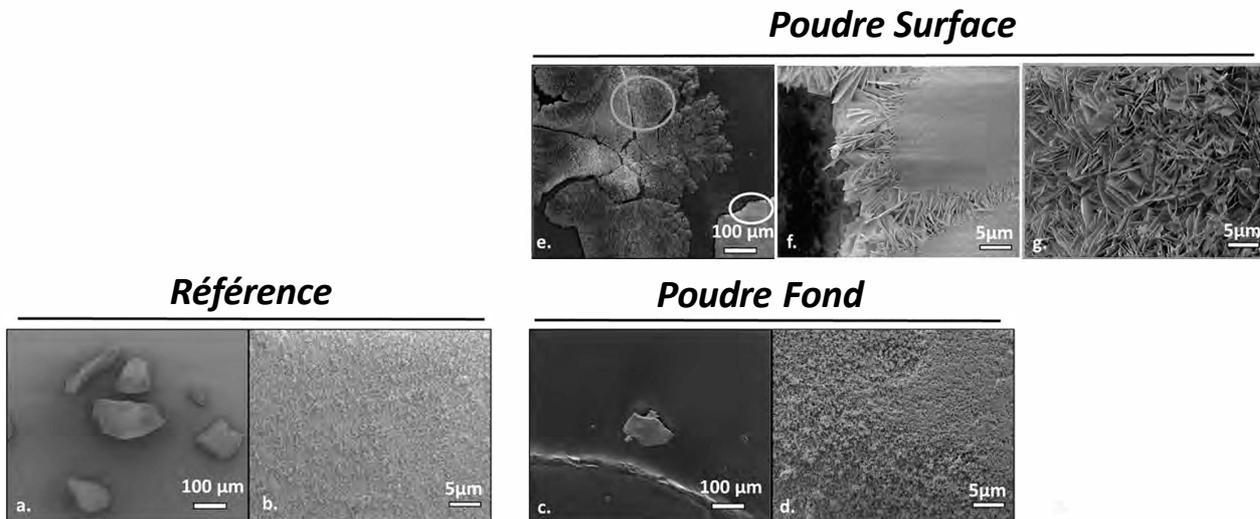
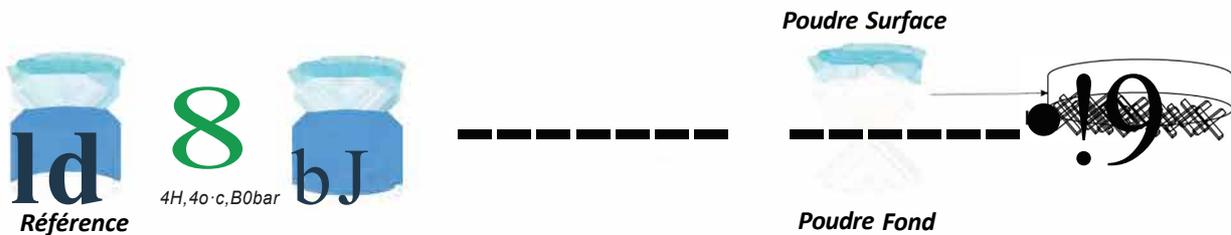


Figure 32 Images MEB des poudres de référence (a , b) et modifiées : Poudre Fond (c , d) et Poudre Surface (e, f, g) d'HA, h. dessin de a Poudre Surface

La poudre de référence montre des grains d'environ 150 à 200 nm avec une surface d'aspect lisse.

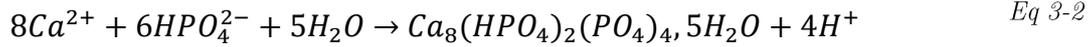
Les grains de *Poudre Fond* ont un aspect très similaire à la poudre de référence. Cela confirme les analyses DRX et FTIR où une phase bien cristallisée, identique à la référence a été constatée. Un aspect plus granuleux de la surface des grains à certains endroits pourrait laisser penser qu'une fine couche de nanocristaux d'apatite a pu se déposer en de rares endroits. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec l'hypothèse posée précédemment (interprétation FTIR, Figure 31) concernant les ions carbonates qui seraient attribués à une phase d'apatite mal cristallisée précipitée au cours du traitement. En revanche la *Poudre Surface* présente de grandes plaques avec une face lisse correspondant à la face en contact avec l'air (f. Figure 32), et une face recouverte de plaquettes (g. Figure 32) correspondant à la face tournée vers le fond du bécher, la plus complètement immergée dans l'eau comme illustré par le schéma (h. sur la Figure 32). Les plaquettes recouvrant cette face sont de tailles homogènes et très intriquées. Leur aspect est caractéristique des observations réalisées sur les cristaux d'OCP²⁹⁰. Cela est cohérent avec les analyses DRX et FTIR qui mettent en évidence une présence importante de cette phase. La grande plaque en surface semble composée de plusieurs petites plaquettes ayant fusionnées. Cela correspond aux observations macroscopiques faites durant l'heure de maturation, identiques pour les trois expériences et illustrées sur le mélange HA/amTCP (Figure 29).

Malgré la faible solubilité dans l'eau de HA à pH neutre ($K_{sp}=10^{-m}$), sa dissolution est causée par la diminution du pH induite par la formation d'acide carbonique dans la phase aqueuse grâce à l'atmosphère de CO₂ à l'état supercritique. Cette dissolution partielle est d'ailleurs illustrée par une diminution de la masse enregistrée entre la poudre de référence introduite et la *Poudre Fond* et surtout par la formation à la surface de la solution de la *Poudre Surface*.

La *Poudre Fond* est principalement composée de l'HA initialement introduite. Cela signifie que malgré la dissolution (une partie de la poudre au cours du traitement et la libération des espèces ioniques nécessaires à la formation de nouvelles phases phosphocalciques (Ca²⁺, HPO₄, PO₄, OH, HC(3)), leur concentration n'est pas suffisante pour donner lieu à la précipitation d'une quantité notable de CaP à la surface des grains de poudre. Une légère présence de carbonates visibles par spectroscopie FTIR. évoque cependant la présence d'une faible quantité d'apatite carbonatée mal cristallisée. Sa précipitation se fait d'après la littérature, à des pH proches du pH physiologique⁹⁷. Sa formation serait donc possible grâce à la remontée du pH lors du dégazage, pendant laquelle les ions carbonates se forment par dissociation de l'acide carbonique. De plus, sa nucléation pourrait être facilitée par la présence des grains d'HA qui agiraient comme des germes donnant lieu à une nucléation secondaire.

Alors que les modifications sont faibles pour la *Poudre Fond*, la *Poudre Surface*, elle, présente des phases très différentes de la poudre initiale.

La *Poudre Surface* nucléée à plusieurs endroits en surface de la phase aqueuse lors de la phase de maturation puis se développe jusqu'à recouvrir complètement la surface. Cette précipitation d'une nouvelle phase est vraisemblablement en partie due à l'évaporation locale de l'eau qui engendre une augmentation locale de la concentration des espèces ioniques libérées pendant la dissolution de HA. En considérant C la concentration du système, C_0 la concentration à saturation et C_1 la concentration de l'interface de croissance, l'évaporation en surface pourrait mener, en accord avec la condition $C > C_1 > C_0$ et le degré de sursaturation ($C_1 - C_0$), à l'équilibre de cristallisation. Ce phénomène peut être qualifié de nucléation primaire hétérogène²⁹. Ce type de nucléation décrit la nucléation *via* un germe issu de la solution mère sur un solide étranger. Cette dernière se produisant pendant l'heure de maturation, le pH n'est pas encore revenu à la neutralité, mais est en réalité plus proche de 5-6, d'après les mesures de pH réalisées pendant cette phase. Or les analyses DRX et IR ont montré la présence de deux phases dans cette poudre : de l'OCP mais aussi du PCCA. L'OCP précipitant à des pH plus faibles, il est possible qu'elle soit la première phase qui nucléée en surface d'après l'une des équations suivantes 32 :



De plus, la morphologie en feuillets observée sur la face orientée vers le milieu aqueux est typique de l'OCP. Ainsi, cette phase pourrait nucléer et croître progressivement en surface. Cette réaction engendrerait dans une moindre mesure une légère acidification du milieu. On sait également que ce phosphate de calcium peut être un précurseur, *via* un phénomène d'hydrolyse, de l'apatite ³², seconde phase observée ici.

Ce phénomène apparaît à des pH proches du pH physiologique (~7,4), donc plus élevés et pourrait par conséquent être favorisé sur la partie supérieure de la plaque, plus proche de l'interface eau/air. Cette interface étant le lieu du dégazage, le pH est légèrement plus élevé dans cette zone. La présence de carbonates au sein de cette dernière structure pourrait s'expliquer par la présence des ions bicarbonates HCO_3^- et carbonates CO_3^{2-} dans l'environnement.

A la suite de cette expérience permettant de mettre en lumière le comportement de l'HA lors d'un tel traitement, une expérience similaire a été menée à partir de poudre de TCP amorphe (amTCP).

3.1.2 amTCP

Comme précédemment décrit dans le cas de l'HA, la poudre d'amTCP a subi, dans un milieu aqueux (L/S=100), un traitement CO₂ haute pression pendant 4H, à 80bar et 40°C. Suite à une heure de séchage à 50°C la poudre en surface a été prélevée. La *Poudre Fond* et celle nouvellement créée en surface, la *Poudre Surface*, ont été prélevées et ensuite séchées.

Comme précédemment, ces poudres modifiées ainsi que la poudre de référence ont été analysées par diffraction des rayons X, spectroscopie FTIR et observation au MEB.

Les analyses DRX ont confirmé la structure amorphe du TCP utilisé comme référence (Figure 34).

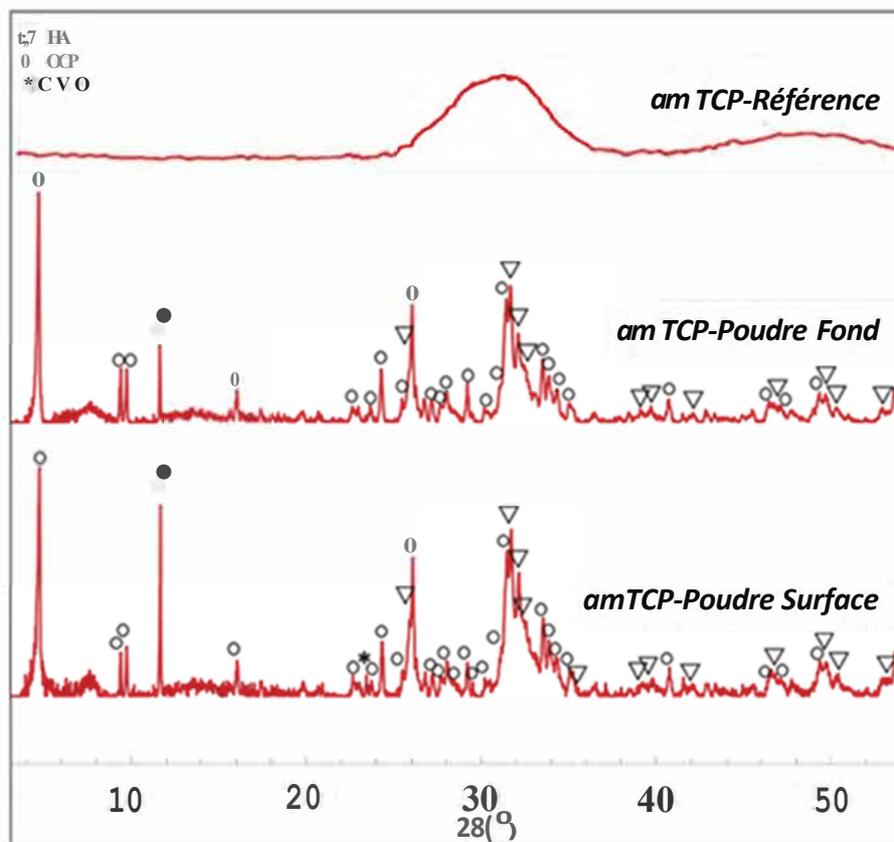


Figure 33 DRX de Poudre de TCP, Référence et modifiées : Poudre Fond et Poudre Surface

Suite au procédé CO₂, la *Poudre Fond* est constituée d'autres phases. Il s'agit d'un mélange de DCPD (JCPDS 00-011-0293), d'OCP et d'apatite.

La *Poudre Surface* est également composée de ces trois phases. Ici encore, l'analyse quantitative des mélanges ne peut pas être effectuée à partir des données de DRX (et

notamment de la raie 020 du DCPD) en raison d'un rapport bruit/signal trop important lié à la faible quantité de poudre disponible pour effectuer l'analyse.

Les analyses FTIR confirment une phase majoritaire d'OCP dans les poudres modifiées (Figure 34).

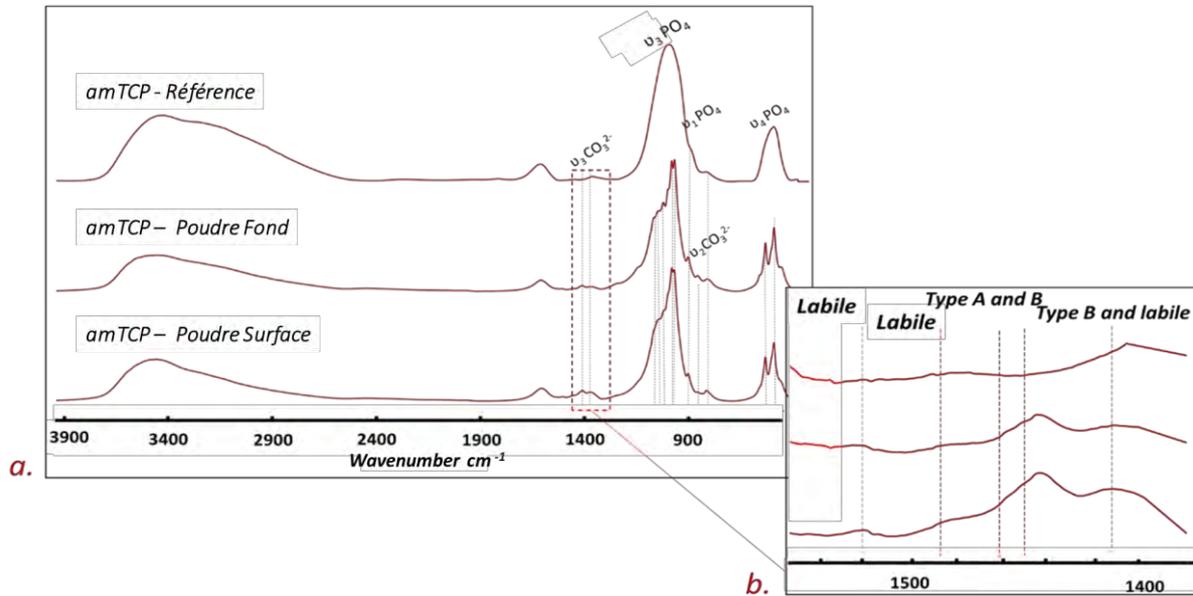


Figure 34 Spectre FTIR normalisé sur la ν_3 des PO_4 de la poudre de TCP Référence, Poudre Fond et Poudre Surface, a. Domaine 400-3900 cm^{-1} , b. Domaine 1380-1580 cm^{-1}

De manière identique à ce qui avait été observé sur les poudres d'HA modifiées, une augmentation des carbonates, principalement de type B et labile, est visible sur les spectres des poudres modifiées. L'augmentation des carbonates entre la *Poudre Fond* et la *Poudre Surface* a été également confirmée *via* des mesures d'aires sous la bande dans le domaine 1600-1300 cm^{-1} soit les ν_3 des carbonates sur les spectres normalisés sur la bande $\nu_1\text{PO}_4$. Une moyenne de 75% d'augmentation de la zone a été constatée entre les deux poudres modifiées.

L'analyse des micrographies MEB présentées sur la Figure 35 montre que les grains de la référence amTCP sont plus petits (20-30 μm) que ceux observés pour la référence d'HA. Leur surface est également d'aspect lisse.

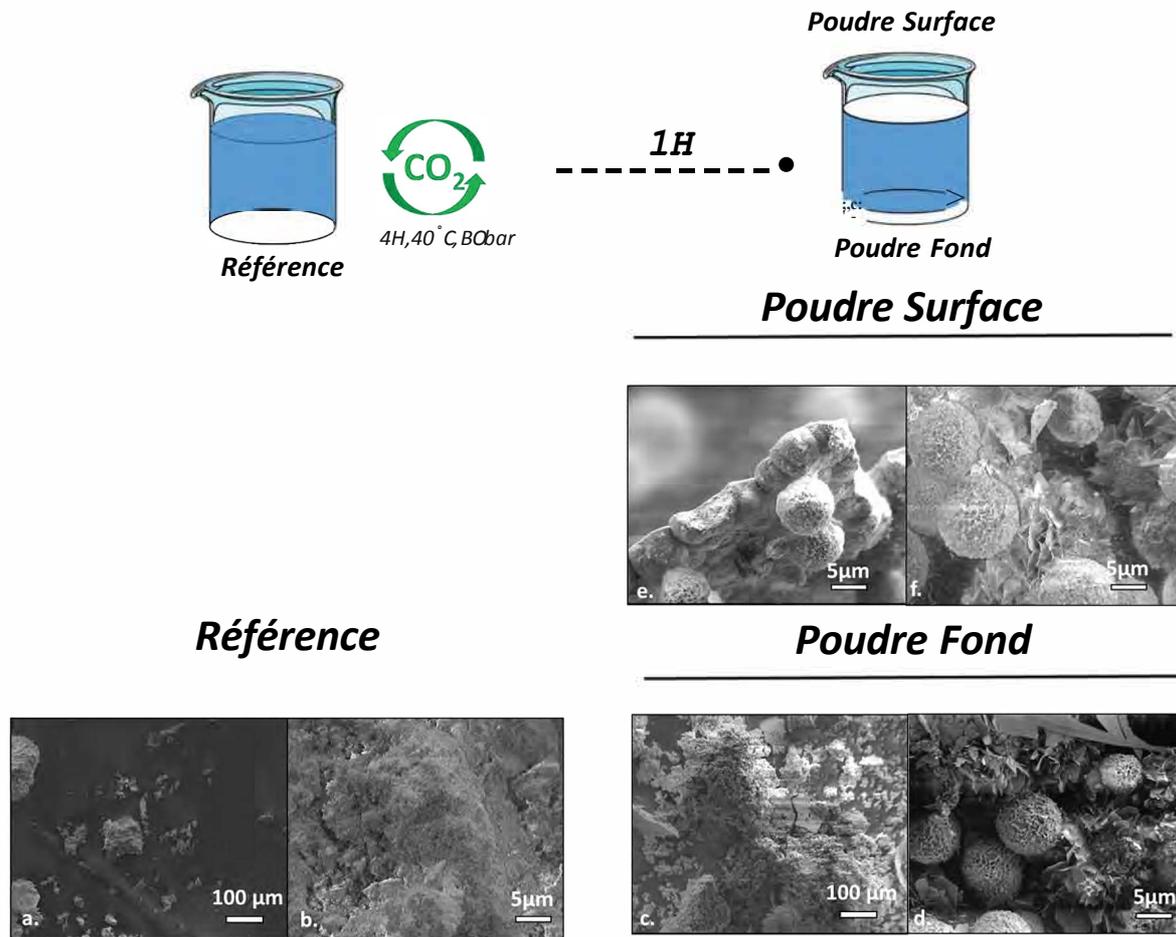


Figure 35 Images MEB des poudres, références (a. , b.) et modifiées : Poudre fond (c. , d.) et Poudre Surface (c. , L) d'amTCP

Ces images montrent une modification importante de la structure des grains entre les poudres de référence, la Poudre Fond et la Poudre Surface. Après traitement, la poudre initiale semble avoir complètement disparu (c., d. Figure 35). La Poudre Fond est constituée d'un ensemble de sphères lisses et/ou recouvertes partiellement ou complètement de feuillet pouvant ainsi être qualifiées de « rose des sables »²⁹³. De rares structures en rubans sont à noter, pouvant évoquer une phase DCPD ou une croissance préférentielle d'une phase d'OCP²⁹⁴.

Alors que les sphères s'agencent de manière éparse ou en amas dans la Poudre Fond, la Poudre Surface présente un aspect global de plaque lisse d'un côté (face exposée à l'air) et des structures sphériques de l'autre (face tournée vers le fond du bûcher et totalement immergée). Les structures sphériques composant la plaque de la Poudre Surface présentent très peu de sphères recouvertes de feuillet.

En raison de la solubilité importante de l'amTCP²⁹⁵, les modifications observées lors du traitement sous CO₂, c'est-à-dire suite à la mise en contact de la poudre avec un milieu acidifié par l'acide carbonique, sont très importantes. En effet, il est possible de constater

la totale disparition de la poudre originale qui a laissé place à deux poudres modifiées composées de plusieurs phases : DCPD, OCP et apatite mal cristallisée carbonatée.

Le DCPD est un phosphate de calcium qui précipite à pH modérément acide (-4,5-5,5)^{02*} Mais la présence des deux autres phases OCP et apatitique, qui précipitent à des pH plus proches du pH physiologique, est témoin de différents mécanismes et d'une évolution de pH au sein du milieu. Il est possible que le DCPD ait précipité avant les deux autres phases, lorsque le pH est encore acide. Il peut être noté qu'à la sortie du réacteur, une poudre est présente au fond du bécher. En revanche il n'est pas possible à ce stade d'affirmer si la précipitation de cette phase se fait dans le réacteur ou post-traitement, au début de la phase de repos. Une expérience supplémentaire devra être menée afin d'éclaircir ces mécanismes.

Lors de la phase de maturation suivant le procédé de traitement, en raison du dégazage progressif de la solution, le pH remonte jusqu'à atteindre la neutralité. Il est probable qu'un phénomène de dissolution/reprécipitation soit à l'origine de la formation d'OCP. L'hydrolyse du DCPD vers l'OCP est courant et largement étudié dans la littérature^{32,2%}.

De même, avec l'augmentation du pH qui se produit pendant la phase de repos post-procédé CO₂ durant laquelle le dégazage se poursuit, et grâce à la présence d'eau, il est probable que la phase apatitique se forme par hydrolyse de l'OCP avec consommation du calcium encore disponible en solution. Il est à noter que cette transformation topotactique peut acidifier dans une certaine mesure le milieu²⁷. Ce phénomène de précipitation d'OCP en premier lieu, alors que cette phase n'est pas thermodynamiquement la plus stable, est connu sous le nom de règle d'Ostwald^{219,298}. Cette dernière affirme que lors de la transformation de phase, la première à germer n'est pas nécessairement celle qui est thermodynamiquement la plus stable mais bien celle ayant l'énergie libre la plus proche de l'état original^{WS}.

Les structures en forme de sphères poreuses lisses mais aussi les structures en forme de « rose des sables » obtenues ont déjà été décrites dans la littérature^{29u 99,300}. Les feuilletts observés sur les sphères poreuses pourraient être le résultat d'une nucléation secondaire.

D'autre part, en surface du liquide, un phénomène de nucléation, dans un premier temps épars, a été observé et forme la Poudre Sm'face. Des germes nucléent, croissent et se rencontrent pour former une plaque en surface, comme déjà observé dans le cas de l'HA. Ici aussi, cela pourrait être dû à l'évaporation de l'eau de surface qui engendre une augmentation locale de la concentration ionique à l'interface eau-air pendant la phase de maturation (hors du réacteur) qui passe au-delà du seuil de nucléation. En raison de la dissolution totale d'amTCP, la concentration en espèces ioniques est plus importante que pour l'expérience réalisée avec la poudre d'HA. Il est possible qu'une première phase de DCPD précipite en surface de manière précoce avant d'être elle-même hydrolysée en OCP puis à nouveau hydrolysée par la suite en apatite. En raison de la grande solubilité d'amTCP en milieu acide (comparée à HA), la précipitation arriverait plus tôt que ce qui a été observé avec HA, à un moment où une plus grande quantité de CO₂ est encore présente dans le milieu, qui est de ce fait plus acide et favorise ainsi la formation de la

phase de type DCPD. Cette hypothèse est avancée notamment en raison de la phase DCPD identifiée dans la poudre *Poudre Surface*. Ici aussi, le DCPD s'hydrolyserait rapidement en OCP, formant une plaque en surface. La partie supérieure de la plaque, à l'interface air/eau serait soumise à un pH plus élevé qui pourrait faciliter la transformation de phase OCP en apatite.

Bien que sous forme d'une grande plaque recouvrant la totalité de la surface du liquide, la *Poudre Surface* de l'amTCP, contrairement à celle de l'HA, est composée de sphères plus ou moins recouvertes de feuillets.

Ce type de sphères d'OCP a déjà été observé dans la littérature grâce à différents procédés, notamment celui dit de « templating » par bullage de CO₂^{301,302}. Ce procédé utilise différents agents de chélation (EDTA et acide citrique) afin de former de petites bulles sphériques dans un environnement aqueux. Le calcium présent dans le milieu s'adsorbe en surface, entraînant une croissance de CaP, en l'occurrence d'OCP, autours de ces bulles. Bien que différents du travail présenté ici, des résultats comparables en résultent. Dans le présent travail, les bulles de CO₂ pourraient agir comme des points de nucléation en modifiant localement la tension de surface du milieu, la concentration de calcium et phosphate locale, ainsi que le pH. En effet, comme c'est le cas ici avec l'amTCP, si une quantité importante de CaP est dissoute dans le milieu, la sursaturation est potentiellement atteinte, menant à un phénomène de cristallisation.

Des sphères d'apatite similaires, plus ou moins recouvertes de feuillets ont également été observées dans d'autres travaux, que ce soit par « templating » par bullage CO₂ ou simple utilisation d'agents de chélation^{301,303}. La taille des feuillets pourrait dépendre de différents paramètres comme la pression ou le pH. Ce mécanisme de recouvrement des sphères pourrait être favorisé par un pH légèrement acide³⁰³. Ainsi, dans notre expérience réalisée sur l'amTCP, un changement local de pH probablement dû à la conversion de l'OCP vers l'apatite pourrait être un des facteurs influant l'accroissement de la taille de ces feuillets.

La modification de la *Poudre Fond* avec entre autre la présence de DCPD et la disparition des phases initiales nous a poussées à approfondir la question des étapes subies par la poudre pendant ce traitement. Pour cela, une expérience supplémentaire a été menée à partir de la *Poudre Fond*.

- ***Evolution de la Poudre Fond amTCP***

La poudre d'amTCP a ici été traitée de la même manière c'est-à-dire pendant 4H à 80bar, 40°C sous CO₂ haute pression en milieu aqueux. En revanche, la *Poudre Fond* a été prélevée sans attendre que la *Poudre Surface* ne se forme, c'est-à-dire immédiatement à la sortie du réacteur CO₂ après l'étape de décompression. Cette étape est représentée et entourée en rouge sur la Figure 36.

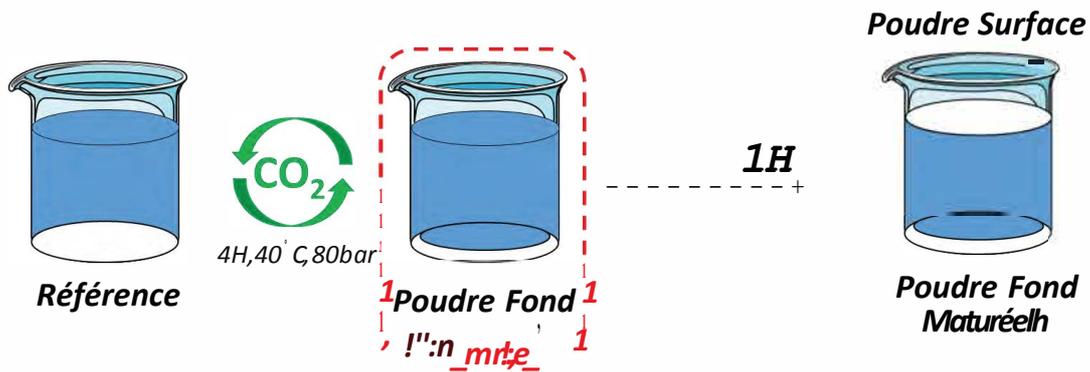


Figure 36 Btape8 du procédé utilisé pour l'analyse de la Poudre fond d'amTCP

Cette *Poudre Fond* non maturée a été analysée de la même manière que précédemment par diffraction des rayons X, spectroscopie FTIR et MEB. Ces résultats sont présentés en parallèle des résultats précédemment obtenus afin de pouvoir être comparés.

Les analyses DRX ont montré (Figure 37) que, suite au procédé CO₂, la *Poudre Fond* non maturée est complètement différente et composée d'une seule phase de phosphate de calcium : le DCPD (JCPDS 00-011-0293). Comme précédemment évoqué, ce CaP se forme préférentiellement à pH faible (~4.5-5.5).

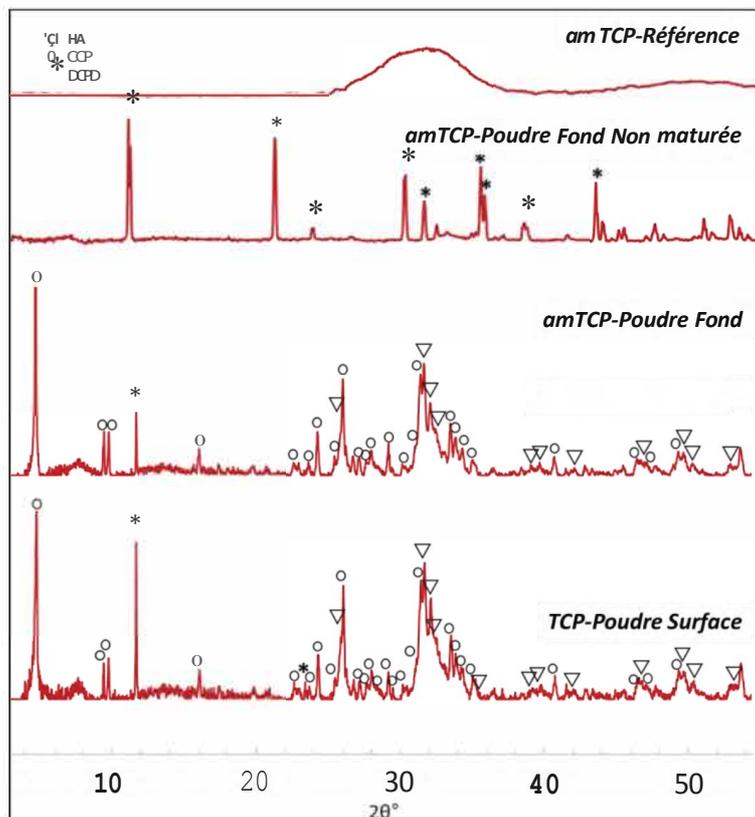


Figure 37 DRX de la Poudre d'amTCP, de référence, Poudre Fond non maturée et maturée, Poudre Surface

Les analyses FTIR confirment la présence de DCPD dans la *Poudre Fond* non maturée (Figure 38). Aucune trace de carbonate n'est présente à cette étape du procédé sur cette poudre

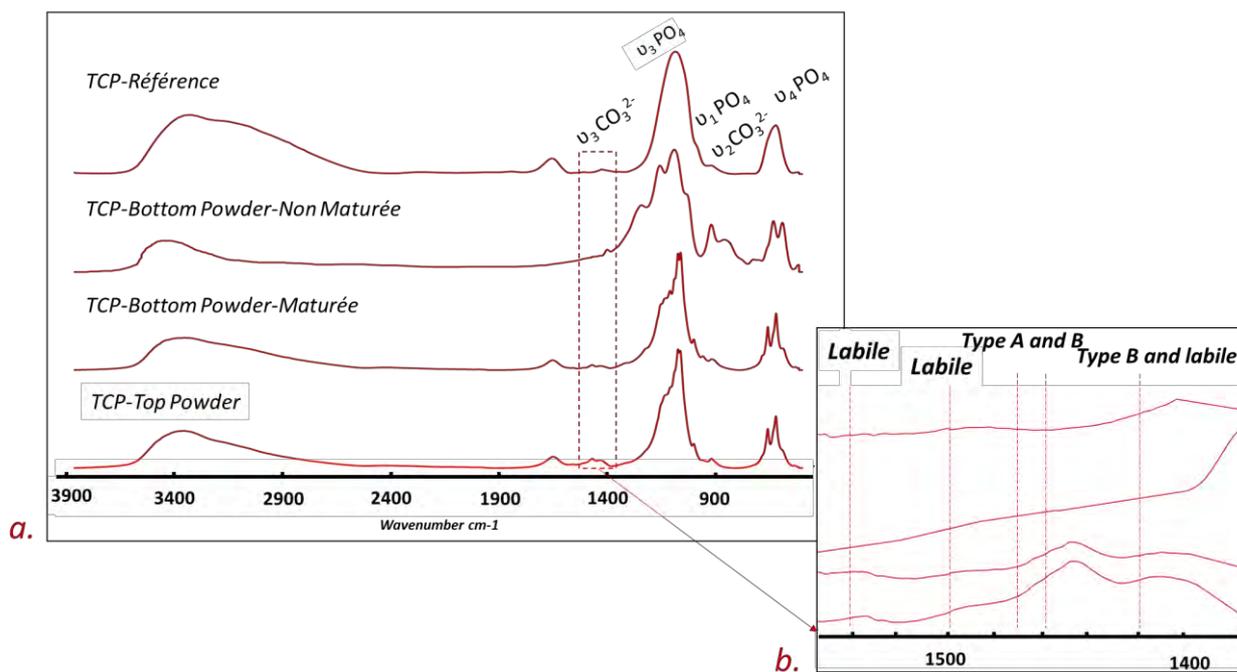


Figure 38 Spectres FTIR normalisés sur la ν_3 des PO₄ de poudre d'amTCP de référence, Poudre Fond non maturée et maturée, Poudre Surface, a. Domaine 400-3900 cm⁻¹, b. Domaine 1380-1580cm⁻¹

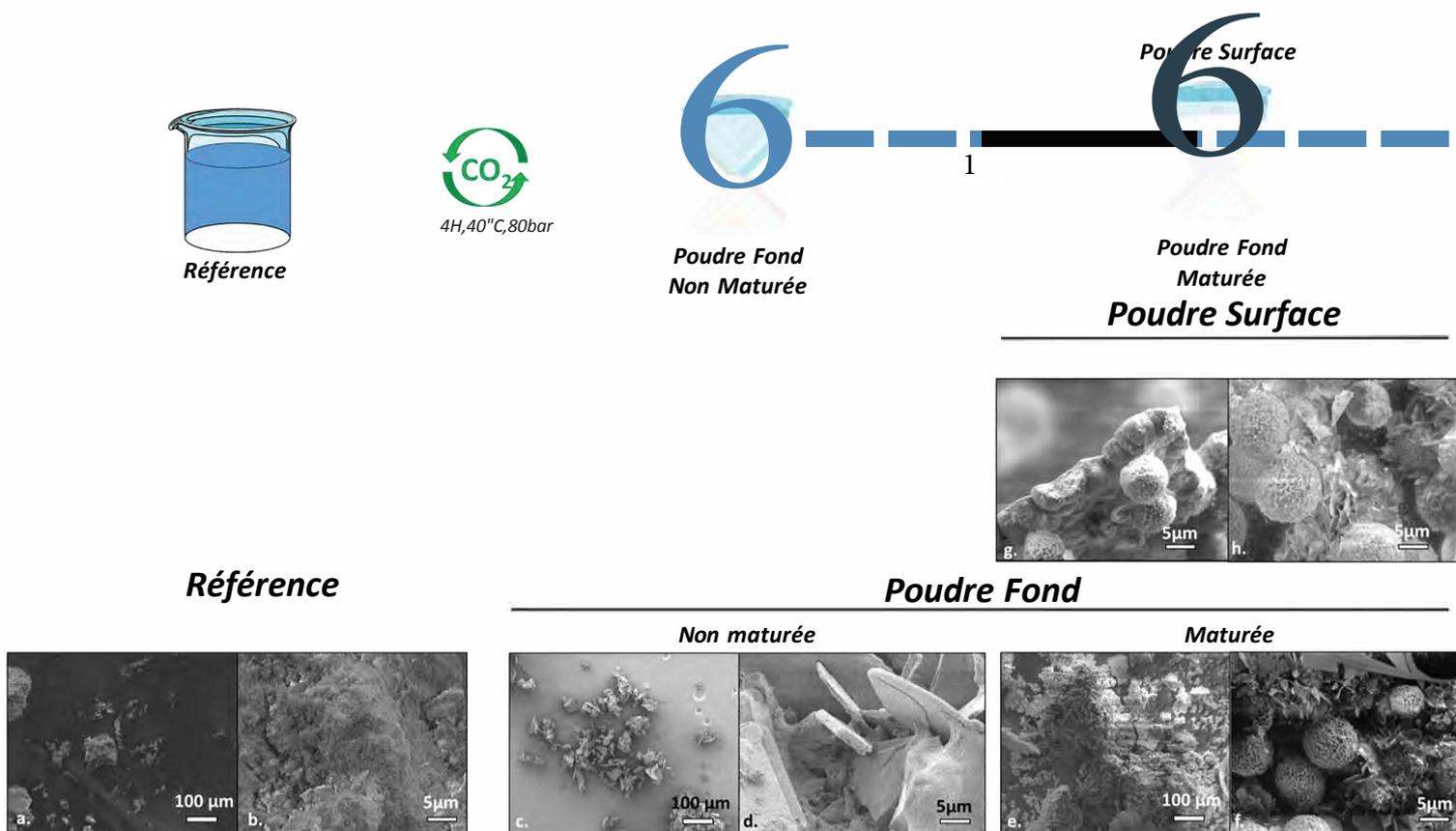


Figure 39 Images MEU des poudres, références (a., b.) et modifiées : Poudre Fond Non Maturée (c., d.) et /maturée (e., f.) et Poudre Surface (g., h.) d'arnTCP

L'observation des micrographies JEB présentées sur la Figure 39 montre une modification importante de la structure des grains entre les poudres de référence (a., b. Figure 39), la *Poudre Fond non maturée* (c., d. Figure 39) et la *Poudre Fond maturée* (e., f. Figure 39). Tout de suite après traitement, la poudre initiale semble avoir complètement disparu. De larges structures plaquettaires l'ont remplacée et composent la *Poudre Fond non maturée*. Ces images permettent de confirmer la présence de DCPD constatée par DRX et FTIR ^{mi}.

Il y a bien précipitation d'une nouvelle phase durant la phase de traitement à l'intérieur du réacteur, alors qu'une quantité importante de CO₂ est encore dissoute dans le milieu et le pH est bas, de l'ordre de 5,3 en surface.

La phase DCPD est encore présente en faible quantité par la suite après une heure de maturation dans le milieu, sur la *Poudre Fond maturée* mais aussi dans la *Poudre Surface*.

Il est possible que toute la phase TCP soit dissoute et que la nucléation de nouvelles phases se produise plus tôt que pour l'expérience réalisée avec la poudre d'HA. Le milieu serait alors encore chargé en CO₂, et à un pH plus faible. Il est possible que la grande quantité d'espèces ioniques en présence, due à la dissolution complète de la poudre initiale, entraîne rapidement et à pH acide, une sursaturation locale qui conduirait à un phénomène de nucléation primaire hétérogène¹⁰. Cette nucléation peut être qualifiée

d'hétérogène car ne se produisant pas dans tout le volume de solution mais bien au fond du bécher à l'endroit où des germes de TCP restants pourraient agir comme des germes pour la nucléation de cette nouvelle phase de phosphate de calcium ¹⁸.

Comme décrit précédemment, l'augmentation du pH par la suite ainsi que la présence d'espèces ioniques dans l'environnement sont susceptibles de provoquer des phénomènes de dissolution/reprécipitation permettant la formation d'OCP ³². C'est un phénomène d'hydrolyse courant et largement étudié dans la littérature ^{2,2%}.

3.1.3 HA/amTCP

De la même manière que les études précédentes, celle-ci se fera au travers de différentes techniques de caractérisation : la DRX, FTIR et MEB. Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en jeu, une étude RAMAN a également été réalisée.

Le diagramme de diffraction des RX (Figure 40) de la poudre de référence est caractéristique d'une HA bien cristallisée.

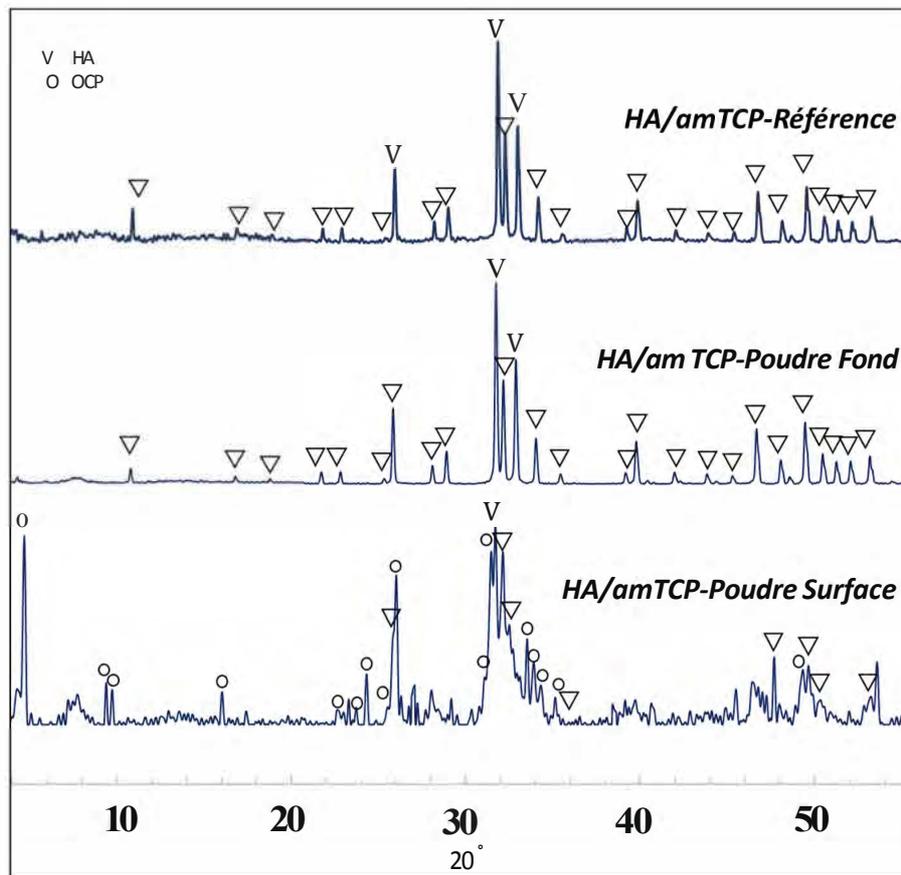


Figure 40 DRX de la Poudre d'HA/TCP, de référence, Poudre Fond, Poudre Surface

Malgré la présence dans le mélange de TCP amorphe, celui-ci n'est pas visible sur le diagramme de diffraction. Ce dernier étant amorphe, il est caractérisé par la présence d'un halo diffus sur le diagramme RX, d'intensité nettement plus faible par rapport aux raies caractéristiques de l'HA ; il n'est donc pas identifiable sur le diffractogramme.

D'après l'analyse réalisée par diffraction des RX, la *Poudre Fond* est une phase d'HA pure. Le bruit de fond enregistré sur la ligne de base observé pour dans le mélange initial a maintenant disparu. Cela pourrait être dû à la disparition de la phase d'amTCP initiale. La *Poudre Surface* est semblable à la *Poudre Surface* observée avec l'HA et correspond donc à un mélange d'apatite et d'OCP.

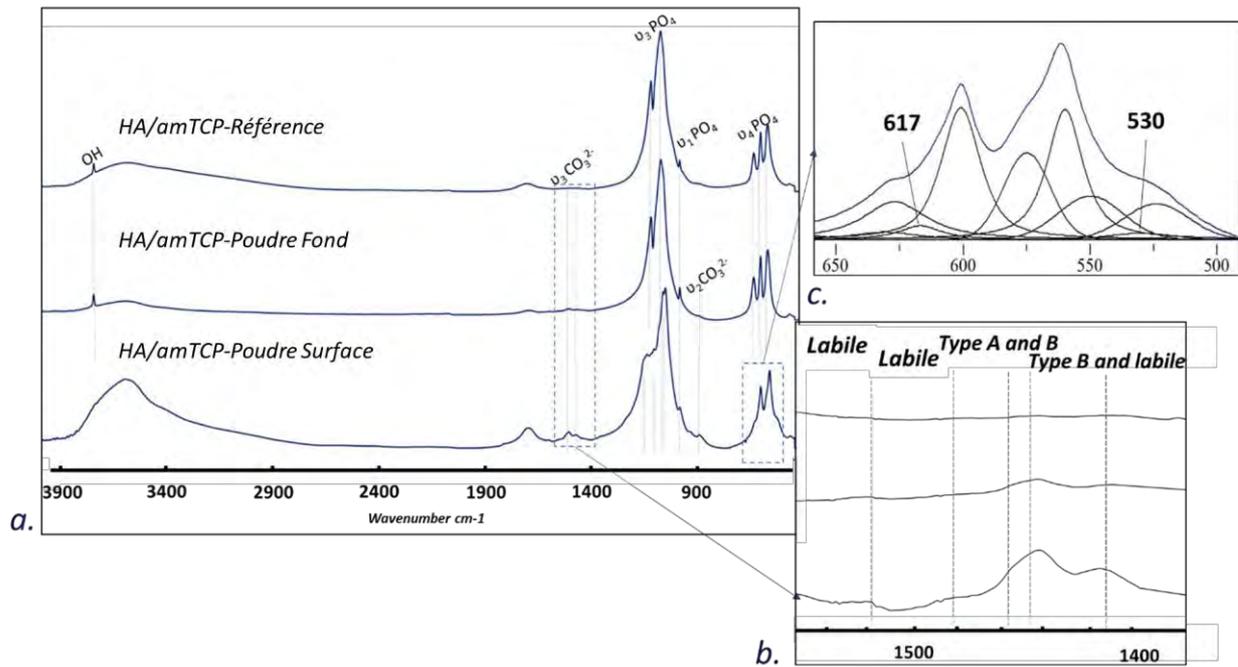


Figure 41 Spectres FTIR normalisés sur la ν_3 des PO_4 de la poudre d'HA/TCP référence, Poudre Fond, Poudre Surface, a. Zone 3900-400 cm^{-1} , b. Domaine 1580-1380 cm^{-1} , c. Domaine 700-450 cm^{-1} décomposé

Les spectres FTIR présentés sur la Figure 41, de la même manière que les diffractogrammes DRX, sont très semblables à ceux présentés sur les poudres modifiées d'HA. En effet, une HA est retrouvée dans la *Poudre Fond* ainsi qu'une faible présence de carbonates. Comme précédemment, les bandes carbonates visibles sur les spectres FTIR pourraient être attribuées à la présence de nanocristaux d'apatite carbonatée mal cristallisée à la surface des phases existantes.

La *Poudre Surface*, en plus de présenter une phase majoritaire d'OCP, présente des intensités des bandes carbonates plus importantes, ici aussi évaluées grâce à une mesure d'aire sous la courbe. L'augmentation de carbonatation entre la *Poudre Fond* et la *Poudre Surface* est ici de 55%. Une décomposition de la bande dans le domaine 700-450 cm^{-1} a permis de confirmer la présence d'environnements labiles phosphate (PO_4^{3-} et HPO_4^{2-}) dit non apatitiques à 530 et 617 cm^{-1} en accord avec la littérature⁹⁸. Ces groupements phosphates non apatitiques prouvent l'existence d'une couche hydratée à la surface des nanocristaux d'apatite, alors que la présence de carbonates permettait de supposer la présence de PCCA.

Les résultats obtenus au MEB présentent, de la même manière que les résultats DRX et FTIR, de fortes similarités avec ceux de l'expérience menée sur l'HA (Figure 42).

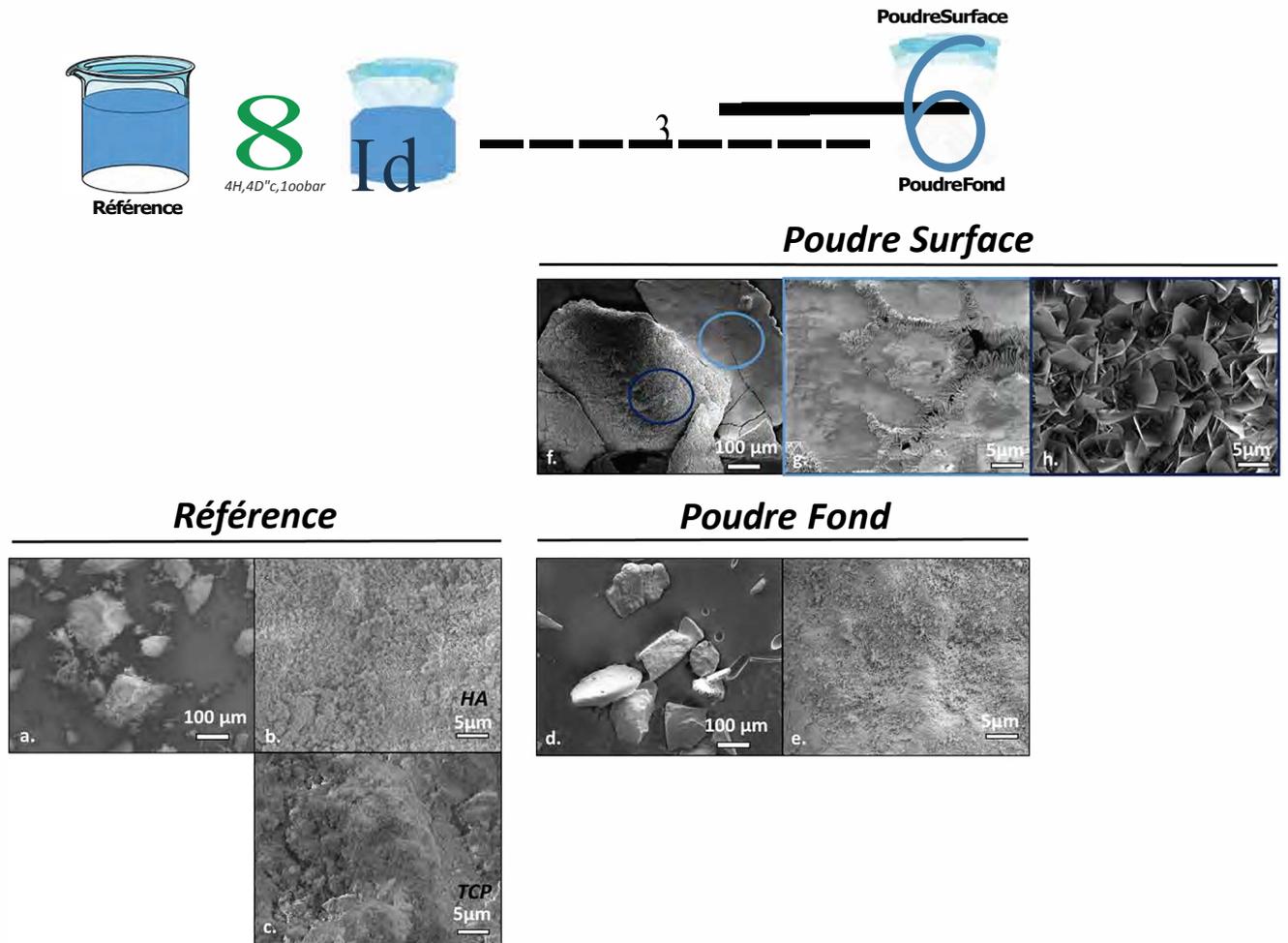


Figure 42 images MEB d'HA/TCP Référence (a, b, c), Poudre Fond (d, e) et Poudre Surface (f, g, h)

En effet; la Poudre Fond ne semble plus contenir que les grains de l'HA initiale. Une dissolution importante de la phase amTCP pourrait avoir eu lieu. En effet; les grains de petites tailles du mélange; identifiés préalablement comme étant de l'amTCP, ne sont plus présents. La disparition de la phase amorphe au cours du traitement est d'ailleurs en parfaite adéquation avec les résultats précédemment obtenus avec la poudre d'amTCP. La persistance des grains tHA est, elle, cohérente avec les résultats obtenus sur la poudre d'HA traitée.

La *Poudre Surface* du mélange HA/amTCP est, comme celle de l'HA, composée de plaques fusionnées à la fois lisses, du côté exposé vers la surface et recouvertes de plaquettes de l'autre côté. Les plaquettes recouvrant cette deuxième face sont cependant plus importantes que celles observées sur la *Poudre Surface* d'HA. Leur nombre et leur intrication semblent les mêmes, mais certaines semblent avoir grandi de manière préférentielle. Ces plaquettes, en accord avec les analyses DRX et FTIR, sont typiques de l'OCP^{2,10}.

Les phénomènes mis en jeu ici semblent donc similaires à ceux décrits dans l'analyse de la poudre d'HA traitée.

La seule subsistance, dans la *Poudre Fond*, de la phase HA introduite initialement dans le mélange et la disparition de la phase amTCP sont en accord avec la solubilité de ces composés à pH acide. En raison d'une solubilité moins importante de l'HA et d'une quantité moindre d'amTCP, la quantité de céramique dissoute n'est pas suffisante pour qu'un remaniement total de la poudre initiale soit visible ou qu'une nouvelle phase nucléée pendant le procédé CO₂, comme pour l'amTCP. De la même manière que pour l'expérience avec la poudre d'HA, l'apparition de bandes correspondant aux carbonates sur les spectres FTIR des échantillons traités, pourrait être due à la précipitation au cours du traitement de nanocristaux d'apatite mal cristallisée riches en ions carbonates.

En accord avec les mesures de diffraction des RX (Figure 40), FTIR (Figure 41) et MEB (Figure 42), la *Poudre Surface* semble être constituée d'un mélange d'OCP et d'apatite. Il est intéressant de souligner l'introduction de carbonates au sein de cette nouvelle phase, visibles sur les spectres FTIR. Comme évoqué précédemment, l'OCP carbonatée n'étant pas une phase envisageable, c'est l'apatite nouvellement formée qui doit accueillir des carbonates au sein de sa structure ou de son environnement labile. Le temps de dégazage d'environ une heure permet une présence accrue de CO₂ dans l'eau tout au long de la formation de la *Poudre Surface*. De la même manière que sur la *Poudre Surface* de l'HA, la nucléation d'OCP en premier, s'hydrolysant en apatite par la suite, est probable.

On peut noter la taille importante de certains feuillets recouvrant la face inférieure de la *Poudre Surface*. Ceci est différent de l'expérience réalisée avec la poudre de HA et pourrait être lié à la plus grande quantité d'espèces ioniques disponibles due à la dissolution importante de l'amTCP. Cette dernière pourrait permettre une croissance préférentielle de certains feuillets.

Les mécanismes de nucléation restent à confirmer. Des analyses par spectroscopie RAMAN ont été réalisées dans le but d'analyser plus localement la *Poudre Surface* du mélange HA/amTCP et de faire les liens entre les phases en présences, les différentes morphologies et les mécanismes de transformation/maturations.

Cette technique, proche de la spectroscopie infra-rouge, couplée avec un microscope optique permet de cibler la zone à analyser grâce à différents grossissements et une sonde de quelques μm . Ainsi, une partie de la grande plaque de *Poudre Surface* d'HA/amTCP a été analysée à différents endroits (en z, la profondeur, en y, du bord au centre de la plaque) afin de confirmer la localisation des deux phases majoritairement retrouvées dans cette poudre que sont l'apatite et l'OCP.

Ces deux phosphates de calcium sont différenciables *via* différentes bandes se situant principalement entre 1100 et 850 cm^{-1} . Dans un premier temps, une différence est visible sur la ν_3 PO₄. L'OCP possède des bandes correspondant à 1011 et 1005 cm^{-1} , ce qui n'est pas le cas de l'apatite. Une autre bande de l'OCP est présente à 916 cm^{-1} et correspond à l'élongation des liaisons des P-(OH) des HPO₄⁶⁻. La différence entre ces deux phosphates de calcium est également visible sur la bande principale de la ν_1 PO₄. Alors que l'apatite présente une bande à 960 cm^{-1} , l'OCP présente deux bandes dans cette même zone à 966

et 959 cm^{-1} . Un spectre présentant une convolution des deux phases aura donc une bande $\nu_1\text{ PO}_4$ élargie par rapport à une apatite. La décomposition de cette zone peut permettre de dissocier les deux phases.

Mesures en z, depuis la surface recouverte de feuillets (dirigée vers le fond du bécher) jusqu'à la surface plane (dirigée vers l'interface eau/air) :

Des premières mesures ont été réalisées à différentes épaisseurs de la plaque de *Poudre Surface* d'HA/amTCP, $z=0\mu\text{m}$ étant la face recouverte de plaquettes ou feuillets (face orientée vers le milieu aqueux) et $z=10\mu\text{m}$, la face lisse orientée vers l'air (Figure 43).

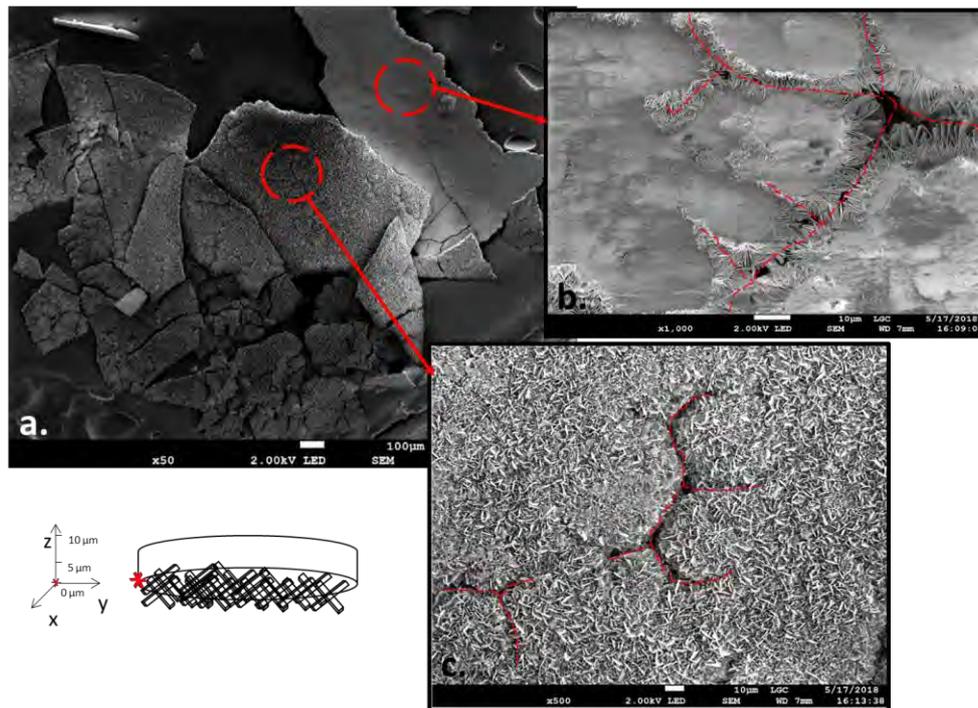


Figure 43 a. Images MEB de la Poudre Surface HA/TCP : b. face lisse et c. face recouverte de feuillets

Ces analyses ciblées ont permis d'observer des gradients de composition d'OCP et d'apatite entre les faces supérieure et inférieure de la plaque constituant la *Poudre Surface*.

Une décomposition de la zone $1100\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ des spectres obtenus à différents z a permis de déterminer que la phase d'OCP, caractérisée par les bandes 966 et 958 cm^{-1} , est plus présente sur la face recouverte de plaquettes ($z=0\mu\text{m}$) (Figure 44), engendrant un élargissement de la bande $\nu_1\text{ PO}_4$. Sur ce même spectre ($z=0\mu\text{m}$), composé principalement d'OCP, la présence d'une bande à 948 cm^{-1} pourrait indiquer la présence d'une phase amorphe.

En revanche, la face lisse ($z=10\mu\text{m}$) présente une phase majoritaire d'apatite dont la bande principale caractéristique de la $\nu_1\text{ PO}_4$ 960 cm^{-1} est prédominante.

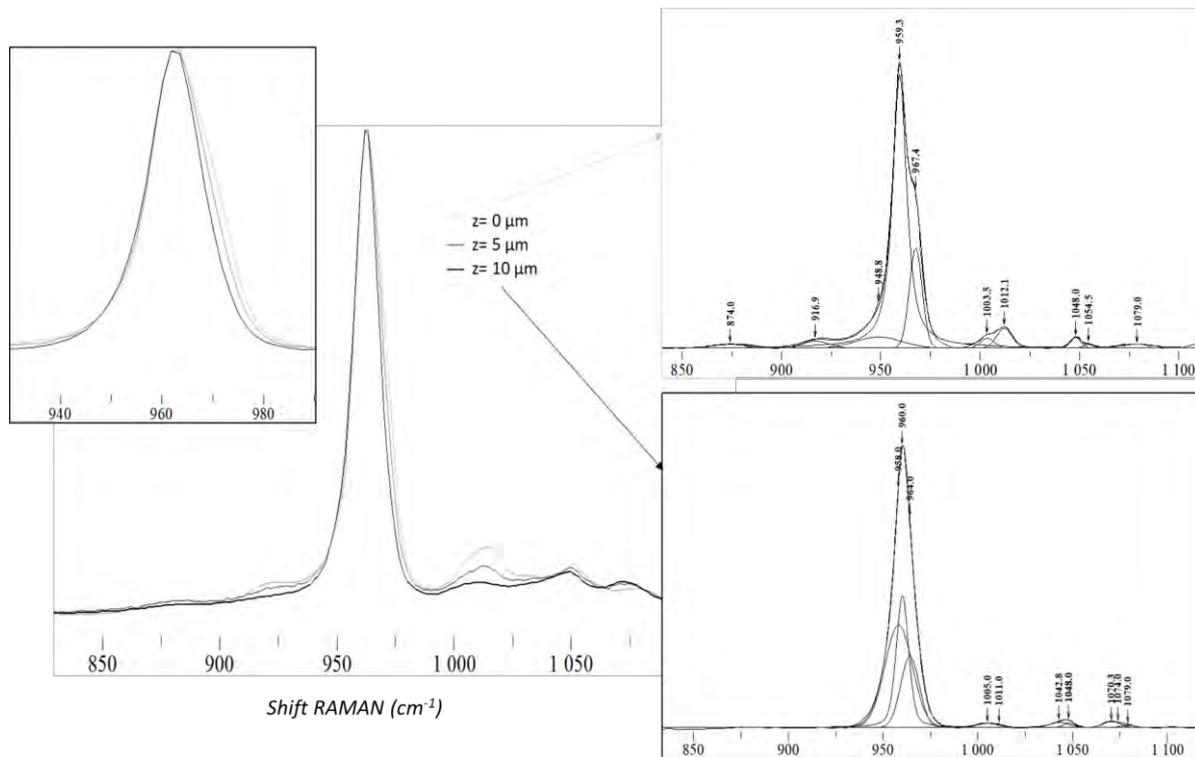


Figure 44 spectre RAMAN de la Poudre Surface d'HA/TCP ($z=0\mu\text{m}$ étant la surface recouvert de plaquettes et $z=10\mu\text{m}$ la surface lisse)

Ce gradient de composition en épaisseur a été évalué grâce au calcul du ratio: $r = \frac{\nu_3 \text{ PO}_4(\text{OCP})}{\sum \nu_1 \text{ PO}_4}$. Ce dernier permet d'évaluer la proportion d'OCP par rapport à la totalité des phosphates de calcium en présence. Ce ratio a été calculé le long de l'axe z , l'épaisseur, (a. Figure 45). Le gradient selon l'épaisseur montre donc que la face lisse ($z=10\mu\text{m}$) est la plus riche en apatite ($r=0,04$ pour $z=10\mu\text{m}$ contre $r=0,07$ pour $z=5\mu\text{m}$).

Analyse en y, depuis le centre vers le bord de la plaque :

Cette analyse a aussi été effectuée selon l'axe y allant du bord de la plaque vers son centre (b. Figure 45). L'analyse en y présente également un gradient de composition : la phase d'OCP est davantage présente au bord de la plaque qu'en son centre ($r=0,08$). Une cartographie 3D de la plaque de la Poudre Surface d'HA/amTCP a été réalisée afin d'apprécier au mieux les nuances de composition en y et z . Trois valeurs de z ont été sélectionnées et présentées Figure 45.

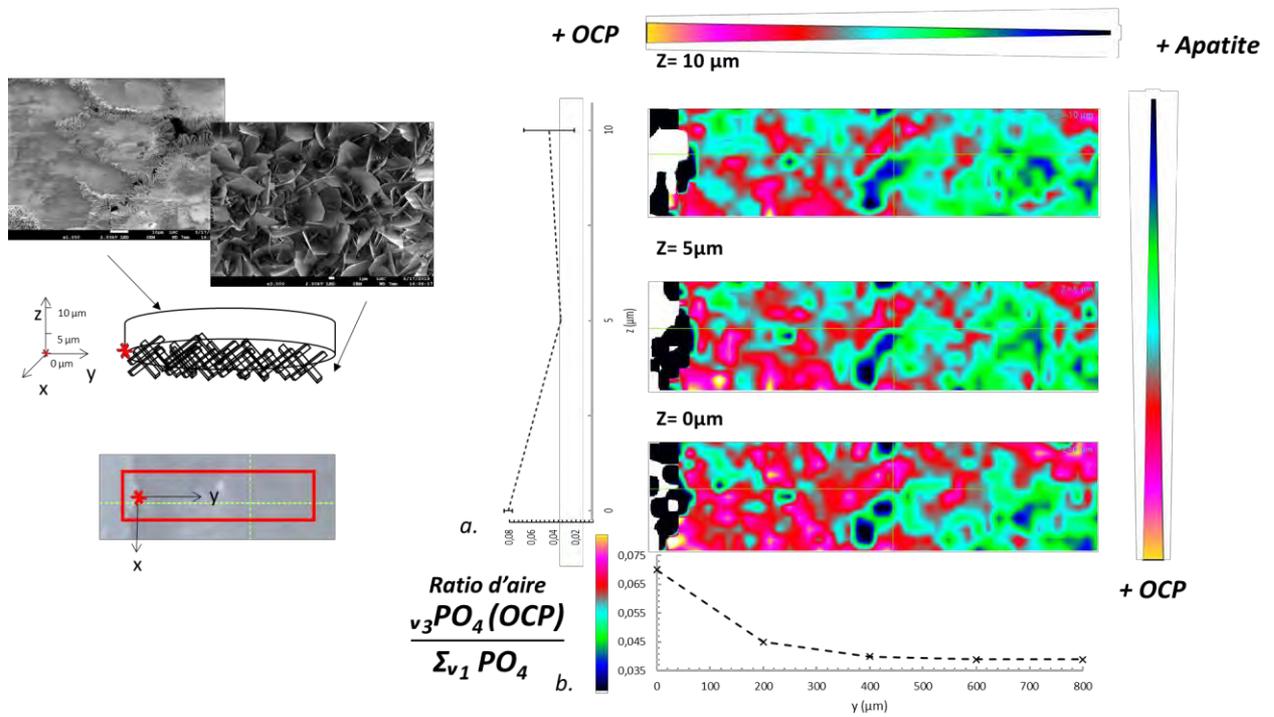


Figure 45 Cartographie 3D de la Poudre Surface d' HA/TCP et les ratios $v_3 PO_4(OCP)/\Sigma v_1 PO_4$ en z (a) et en y (b)

Les plaques plus petites formant la grande plaque semblent chacune comporter des gradients de composition : le cœur est plus riche en apatite et la périphérie en OCP. Ceci rappelle les observations macroscopiques faites lors de la précipitation de cette phase : des germes se forment en surface avant de coalescer. Les gradients de composition OCP/apatites sont donc bien observés à deux échelles sur le plan (x,y) : dans chacune des petites plaques formant la plus grande, mais aussi sur la plus grande formée de toutes ces plus petites.

Les gradients de composition observés sur la *Poudre Surface* d'HA/amTCP sont tels que l'apatite est davantage présente à la surface et au cœur de la plaque principale et tendent à confirmer la transformation d'une phase primaire d'OCP en apatite. Cette transformation serait liée à une hydrolyse de l'OCP vers une phase plus stable thermodynamiquement dans ces conditions. Une telle transformation suit la loi d'Ostwald énonçant que la première phase précipitée n'est pas toujours thermodynamiquement la plus stable^{306,307}. La vitesse de conversion dépend notamment de la température^{308,309}. A noter qu'ici, les quantités d'espèces ioniques changeant entre autre en permanence, il est impossible d'évaluer la vitesse de ce phénomène. Cette transformation serait basée sur la réorganisation de la structure cristalline en une structure hexagonale avec une perte partielle d'eau, d'ions phosphate et parfois de calcium³¹⁰. La présence d' HCO_3 , ce qui est le cas ici pendant le dégazage, est connue comme accélérateur de cette conversion.^{226,311}

La différence de composition observée sur une même plaque en z pourrait indiquer que cette nouvelle phase neo-formée grandit non seulement selon le plan (x,y) jusqu'à recouvrir la surface mais aussi en épaisseur, selon le plan (y,z).

Ainsi, la composition de la céramique évolue de la surface vers le bas du bécher, où le pH est plus acide en raison du CO₂ toujours présent en plus grande quantité, ce qui favorise la formation d'OCP³².

Les gradients de compositions observés sur chaque grain initial indiquent que ce phénomène de maturation s'applique à différentes échelles : sur chaque petite plaque formée dans les premiers temps de la précipitation mais aussi sur la plaque principale une fois les petites plaques fusionnées. Il est intéressant de noter que la conversion en apatite se fait dans toutes les directions pendant que la plaque poursuit sa croissance.

Cette étude sur les poudres HA, amTCP et HA/amTCP a permis de donner les clés de compréhension nécessaires à l'étude du mélange de poudre. Cependant, afin de valider les hypothèses concernant la formation mais surtout la maturation de la *Poudre Surface*, une expérimentation supplémentaire a été réalisée afin de mettre en évidence les phénomènes ayant lieu pendant cette phase du procédé. Afin de tendre vers un mélange de phases couramment utilisé dans les BCP aujourd'hui commercialisés, seul le mélange HA/amTCP a été étudié dans cette expérience.

a. Effet de l'étape de maturation

Les précédentes expériences ont montré les modifications induites sur des poudres de composition connue au cours du traitement réalisé en CO₂ haute pression. Certains mécanismes de précipitation de phosphates de calcium en milieu aqueux puis de maturation dans ce milieu ont été mis en évidence : l'OCP semble se former en surface et tend à la recouvrir en même temps qu'un phénomène d'hydrolyse de cette dernière permet la formation de PCCA.

Afin de confirmer le phénomène de maturation de la *Poudre Surface* du mélange HA/amTCP, celle-ci a été laissée sept jours dans le milieu aqueux post-procédé avant d'être prélevée et séchée. Elle a été appelée *Poudre Surface Maturée* et a été caractérisée par DRX et spectroscopies FTIR et RAMAN.

L'analyse DRX (Figure 46) permet de confirmer la présence majoritaire d'une apatite mal cristallisée sur la Poudre Surface. L'analyse DRX (Figure 46) permet de confirmer la présence majoritaire d'une apatite mal cristallisée sur la Poudre Surface.

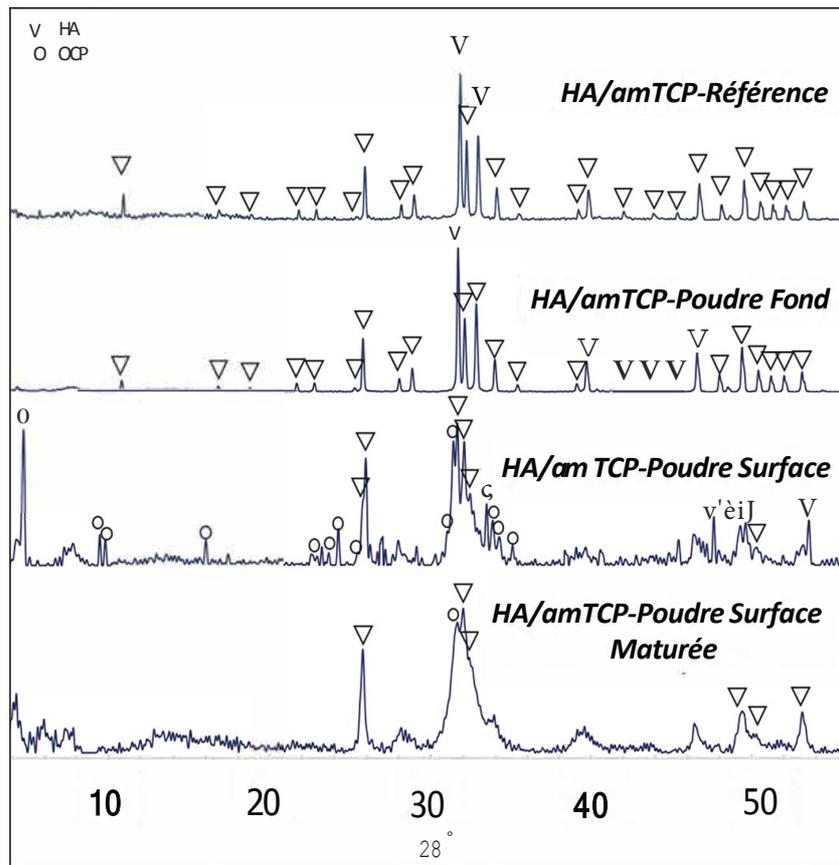


Figure 46 DRX d'HA/TCP, de Référence, Poudre Fond, Poudre Surface et Poudre Surface :Maturée 1 semaine

Après une semaine de maturation, l'OCP n'est plus visible, en particulier le pic (010) caractéristique de l'OCP situé à $4,7^\circ$.

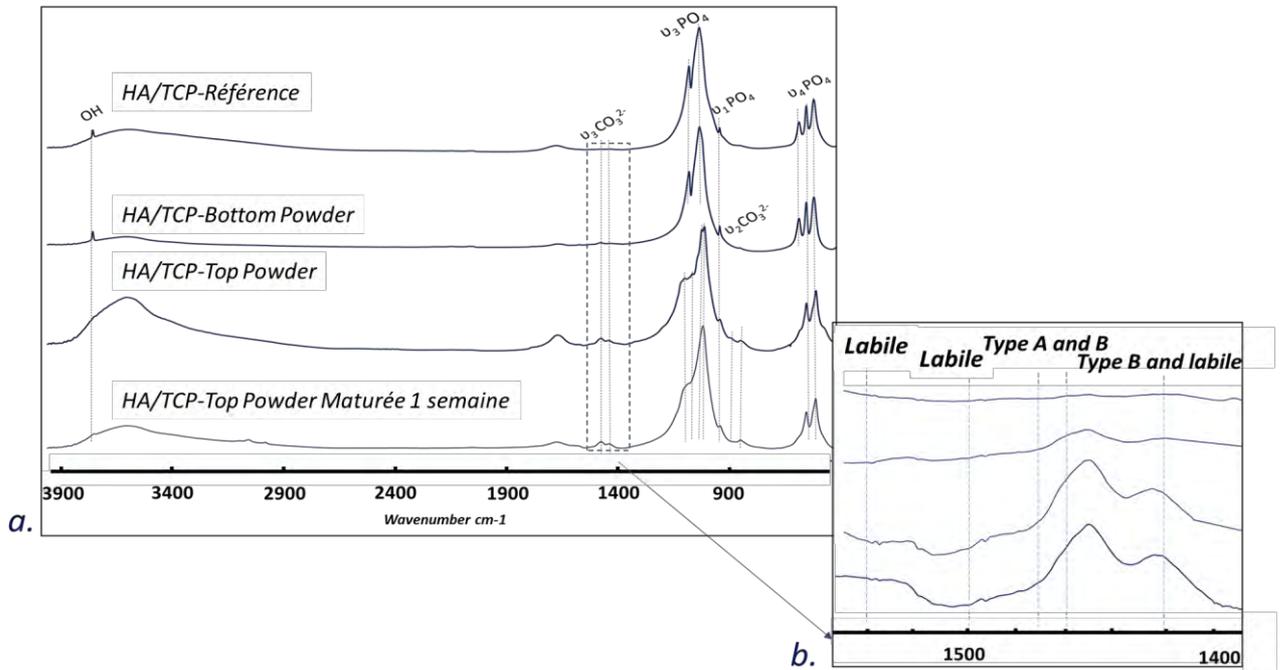
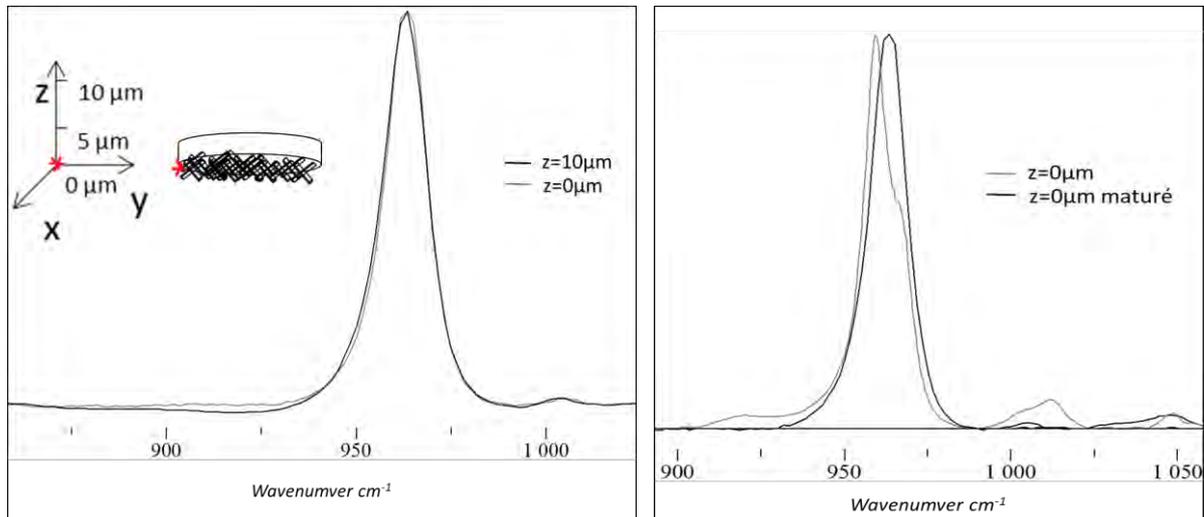


Figure 47 Spectre FTIR normalisé sur la ν_3 des PO₄ de la poudre d'HA/TCP de Référence, Poudre Fond, Poudre Surface et Poudre Surface maturée 1 semaine, a. Domaine 3900-400 cm⁻¹, b. Domaine 1580-1380cm⁻¹

L'analyse FTIR (Figure 47) permet d'apprécier la présence de groupements carbonates sur la *Poudre Surface Maturée*. Cependant certaines différences sont visibles : les bandes caractéristiques des ν_3 de l'OCP sont moins présentes et un début de bande OH (3176 cm⁻¹) est visible.

Des analyses RAMAN ont été réalisées à la fois sur la face initialement lisse ($z=10\mu\text{m}$) et la face initialement recouverte de plaquettes ($z=0\mu\text{m}$) afin d'évaluer la présence éventuelle d'un gradient de composition comme observé sur la plaque *Poudre Surface* précédemment étudiée (Figure 48).



a. Poudre Surface Maturée $z=0$ et $z=10\mu\text{m}$

b. Poudre Surface et Poudre Surface Maturée $z=0\mu\text{m}$

Figure 48 Spectre RAMAN a. HA/TCP Poudre Surface Maturée 1 semaine à $z=0\mu\text{m}$ face recouverte de feuillet et $z=10\mu\text{m}$, face lisse b. HA/TCP Poudre Surface et Poudre Surface Maturée à $z=0\mu\text{m}$, face lisse

L'analyse RAMAN de la bande $\nu_1 \text{PO}_4$ de la Poudre Surface Maturée à différents z montre que les deux faces sont désormais composées de phase apatitique (a. Figure 48). La comparaison à un z défini, $z=0\mu\text{m}$, où la Poudre Surface présentait une quantité plus importante d'OCP permet de mettre en avant l'évolution dans le temps (b. Figure 48). Sur la Poudre Surface Maturée, l'OCP n'est plus visible sur cette face $z=0\mu\text{m}$, alors qu'elle était la phase majoritaire sur la Poudre Surface.

Ces mesures confirment l'hypothèse de conversion de phase initiale d'OCP vers une phase apatitique plus stable avec le temps.

Enfin les images MEB (Figure 49) confirment l'évolution constatée sur les analyses précédentes.

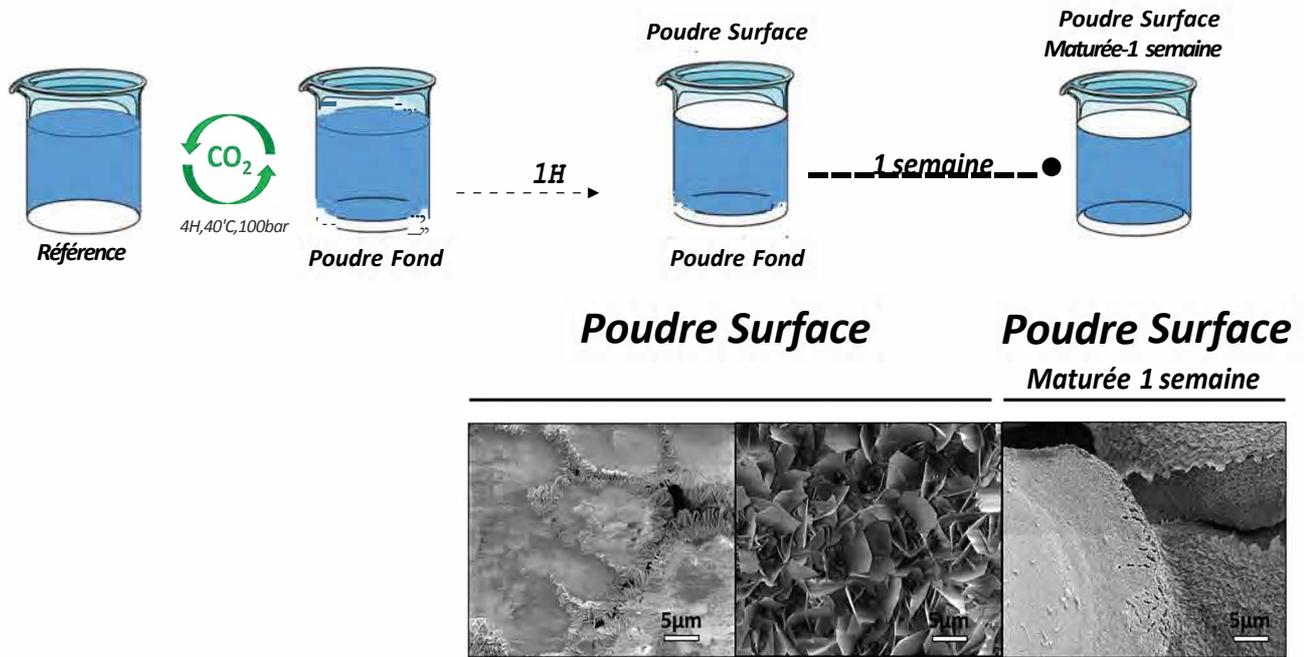


Figure 49 Images .\JEU de la Poudre Surface cl Poudre Surface ..\aturôle 1 semaine HA/amTCP

Ces images permettent de constater la disparition des plaquettes caractéristiques de l'OCP dans la *Poudre Surface Maturée*. Un phénomène de clissolution/reprécipitation a pu accompagner l'hydrolyse de cette phase vers Papatite carbonatôc mal cristallisée.

Conclusion sur le travail présenté sur les poudres

La possibilité de modifier des poudres de phosphates de calcium classiquement utilisés dans le domaine médical grâce au procédé CO₂ supercritique vient d'être validée sur des poudres particulièrement réactives. Les caractérisations réalisées sur les différentes poudres ont permis d'élaborer certaines hypothèses conduisant aux nouvelles phases formées pendant le procédé. Ainsi, les mécanismes impliqués présumés peuvent-ils être résumés par le schéma présenté sur la Figure 50.

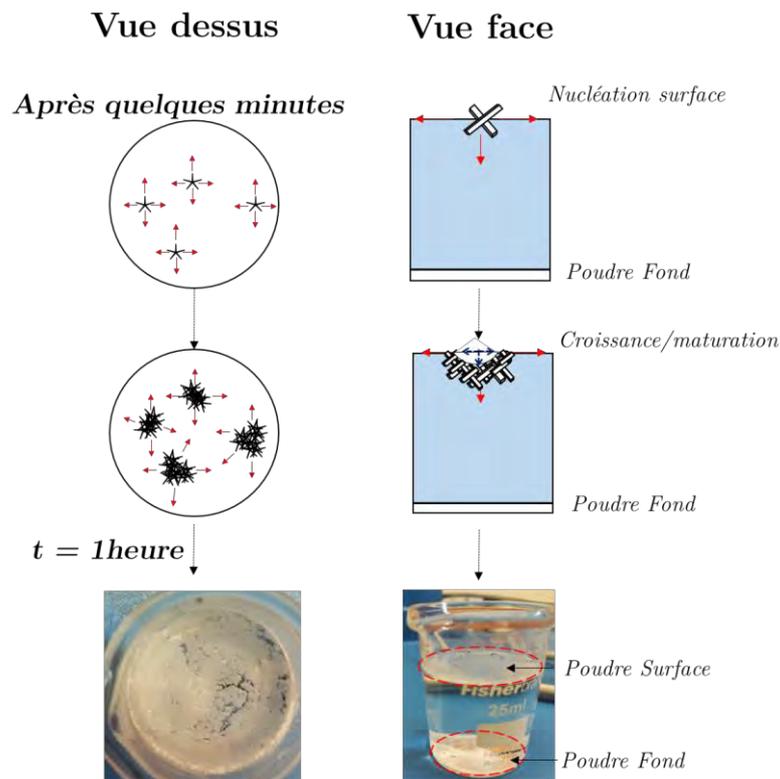


Figure 50 Schéma illustrant les mécanismes de germination-croissance cristalline lors de la phase de repos du procédé . Les flèches rouges représentent le sens de développement des plaques et les bleus, présentes sur le schéma de la phase intermédiaire en surface, l'hydrolyse de l'OCP vers la PCCA

Ces modifications, qui conduisent à la formation de phases d'apatites biomimétiques très réactives et qui utilisent un procédé simple, utilisant un milieu compatible avec une application médicale, sans adjuvant chimique, pourraient permettre la fabrication d'une nouvelle famille de biomatériaux plus réactifs obtenus à partir des biomatériaux les plus couramment utilisés sur le marché.

C'est pourquoi la possibilité de modification de céramiques phosphocalciques poreuses biphasiques (BCP) a été évaluée grâce à ce procédé, et les résultats vont être présentés dans la suite de l'étude. Les céramiques BCP utilisées sont composées d'HA et β TCP avec un rapport massique (65/35) ; elles ont été obtenues par frittage à 1100°C, ce qui limite de fait la bioactivité de ces biocéramiques.

3.2 Traitement de cubes de céramiques

Dans cette section, nous présentons dans un premier temps les résultats obtenus en appliquant les mêmes conditions de traitement aux blocs de céramiques BCP que celles présentées précédemment à la poudre obtenue à partir du broyage des cubes commerciaux de céramiques BCP commerciales. Nous détaillons ensuite les résultats obtenus après traitement des cubes poreux. Une fois la faisabilité évaluée, l'identification des nouvelles phases formées a été réalisée à l'aide de différentes méthodes (échanges ioniques et RMN du solide), et les résultats associés sont présentés. Enfin l'influence des différents paramètres du procédé sur la modification des cubes de céramique BCP sera mise en évidence, permettant ainsi d'amener des éléments de réponse afin de comprendre les phénomènes impliqués.

3.2.1 Poudres traitées thermiquement

L'étude de la modification des poudres *via* le procédé CO₂ haute pression ayant permis de mettre en évidence des modifications importantes liées à la précipitation de différents CaP d'intérêt, des essais similaires ont été réalisés sur les poudres d'HA/ β TCP (rapport massique 65/35) obtenues en broyant des cubes poreux (BCP) connus et disponibles à l'échelle industrielle (Ceraform).

Les substituts céramiques cubiques, une fois broyés au mortier (surface spécifique 11,3 m²/g) ont subi un traitement CO₂ avec le protocole déjà explicité et utilisé précédemment. Une quantité trop faible de *Poudre Surface* a rendu tout prélèvement et analyse impossible.

Ce pré-résultat (absence de poudre surface) permet dans un premier temps de considérer une dissolution moindre des phosphates de calcium en présence, comparé à l'étude précédente menée sur un mélange d'HA et d'amTCP non traité thermiquement. En effet, la quantité de *Poudre Surface* formée est liée à la quantité d'espèces ioniques disponibles en solution et par conséquent à la capacité du matériau à être dissout.

Pour la fabrication des BCP les poudres ont été frittées à 1100°C, traitement thermique qui les a rendues moins solubles³¹². En l'absence de *Poudre Surface*, les résultats présentés dans cette partie concernent uniquement la poudre précédemment identifiée comme la *Poudre Fond*.

La poudre traitée a dans un premier temps été caractérisée par DRX (Figure 51) et spectroscopie FTIR (Figure 52).

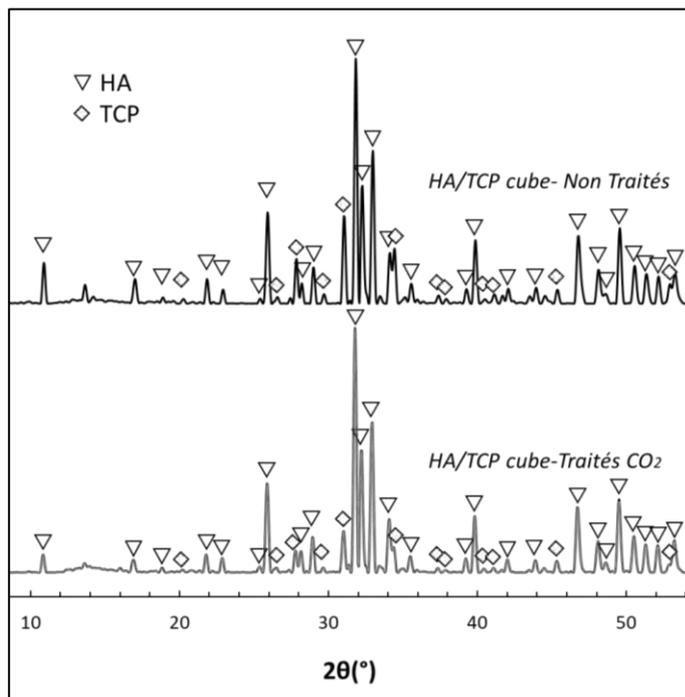


Figure 51 DRX de la Poudre de BCP Non Traitée et Traitée au CO₂ haute pression

Les analyses DRX réalisées sur la poudre de substitués broyés, *Non Traitée*, met en évidence le mélange de phases Hydroxyapatite (HA) et β TCP (JCPDS-00-009-0432 et JCPDS-00-009-0169 respectivement). Le ratio massique a pu être évalué grâce au logiciel Match! et une base de données adaptées. Elle utilise la méthode RIR (Reference Intensity Ratio) et permet ainsi d'établir à partir d'un rapport d'intensité des pics, des rapports massiques des phases en présence. Il semble que le ratio massique soit en réalité plus proche de 70/30 que de 65/35 d'HA/ β TCP, comme indiqué initialement et précisé par le fournisseur.

La poudre *Traitée CO₂* est également constituée d'un mélange de deux phases HA et β TCP. Il est cependant intéressant de noter les modifications de la composition du mélange HA/ β TCP engendrées par le traitement CO₂ (Tableau 12).

Tableau 12 %massique des phases HA et β TCP dans les poudres de céramiques BCP

	% massique	
	HA	β TCP
Poudre Non traitée-% théorique	65	35
Poudre Non Traitée-mesurée DRX	70	30
Poudre Traitée-mesurée DRX	85	15

Il semble qu'une partie importante du β TCP (environ 50%) ait été consommée ou modifiée pendant le traitement CO₂ haute pression. L'analyse DRX ne permet cependant pas

l'identification d'une nouvelle phase comme de l'OCP, qui aurait pu se former lors du traitement. Cependant si une faible quantité de PCCA est précipitée, elle ne sera pas visible sur le diffractogramme DRX.

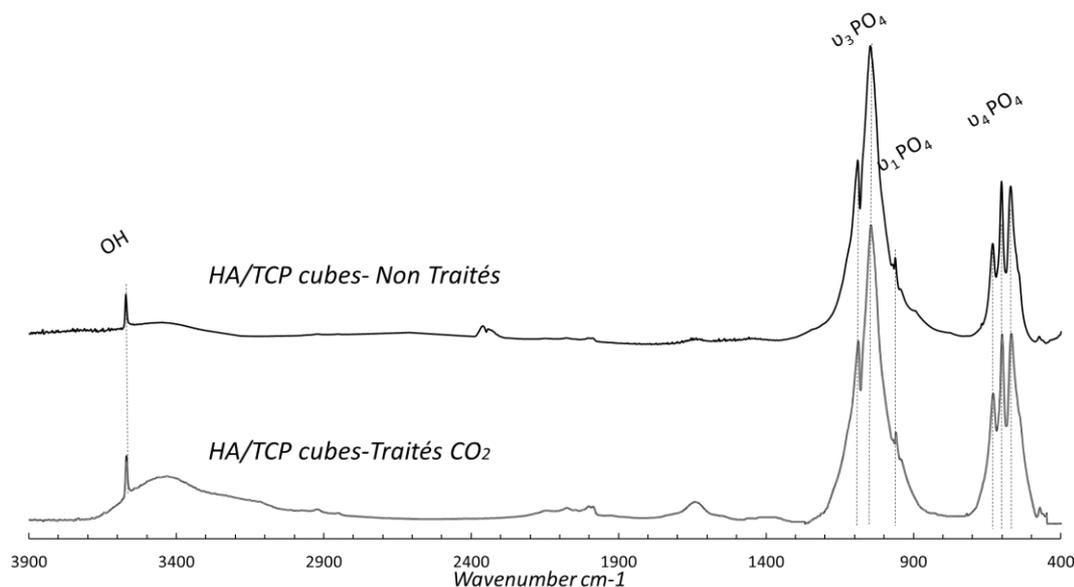


Figure 52 Spectre FTIR de la Poudre de BCP broyés Non Traitée et Traitée CO_2

Les spectres FTIR obtenus sur la poudre non traitée sont caractéristiques de l'HA. Il est normal de ne pas distinguer le β TCP en raison de la plus faible quantité présente mais aussi car les différentes bandes caractéristiques du β TCP ($\nu_1 \text{PO}_4$, $\nu_3 \text{PO}_4$, $\nu_4 \text{PO}_4$...) sont confondues avec celles de HA⁸⁸. Le spectre FTIR obtenu sur la poudre *Traitée CO_2* est strictement identique à celui obtenu avec la poudre initiale. Aucune différence n'est visible ni même la présence de bandes carbonates qui aurait pu indiquer la présence de PCCA.

Les poudres ont tout de même été observées au MEB (Figure 53).

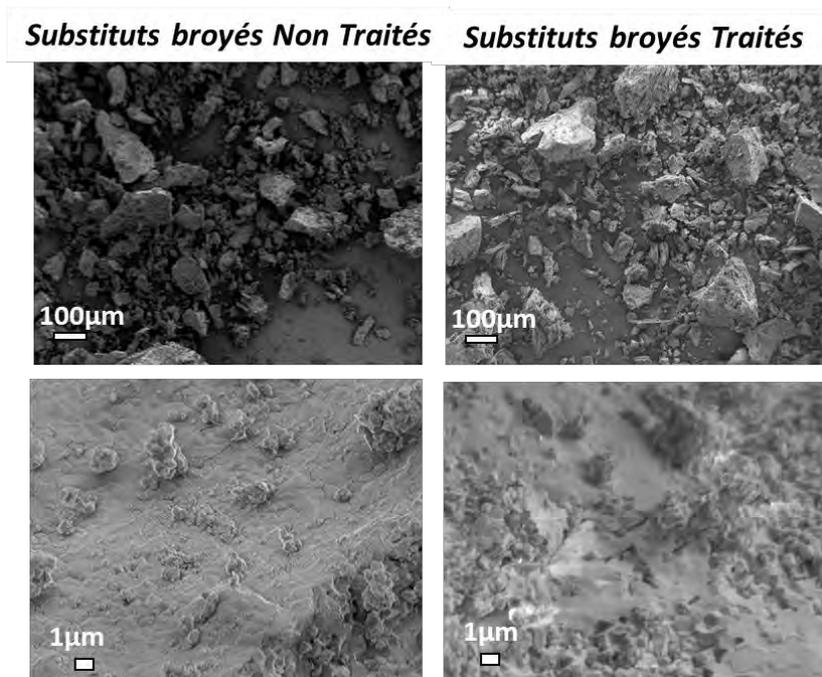


Figure 53 Images MEB des poudres de substituts broyées, Non Traitées et Traitées CO₂

La présence de grains de différentes tailles est visible autant sur la référence que sur la *Poudre Traitée*. Cependant aucune modification liée au traitement CO₂ n'est visible. Aucune nouvelle phase n'est visible en surface des grains.

Ces analyses préliminaires ont permis de mettre en évidence la dissolution partielle de la phase β TCP présente initialement dans la céramique. Ces résultats sont à lier avec la solubilité des phases qui constituent la céramique. En effet, d'après les données présentées dans la littérature³² et les calculs théoriques présentés au début de cette partie, le β TCP est plus soluble que l'HA dans des conditions identiques³², il apparaît normal de constater sa dissolution préférentielle par rapport à la phase HA.

En revanche, contrairement aux observations faites sur les poudres HA/amTCP non calcinées présentées dans la partie précédente, aucune nouvelle phase n'a été mise en évidence. Ainsi, la dissolution du β TCP au cours du traitement CO₂ n'engendre pas la précipitation d'une nouvelle phase phosphocalcique.

Comme décrit plus tôt cela pourrait venir d'une quantité insuffisante de céramique dissoute qui ne permet pas d'atteindre une sursaturation suffisante dans les conditions opératoires utilisées dans cette étude pour favoriser la germination d'une nouvelle phase.

Bien que cet essai réalisé à partir de cubes BCP broyés n'ait pas permis de mettre en évidence les mêmes résultats que sur les poudres non-frittées, des essais ont été menés directement sur les substituts poreux, et une attention particulière a été portée sur le rapport L/S lors du traitement au CO₂, paramètre pouvant influencer la concentration en espèce ioniques disponibles pour l'éventuelle précipitation de nouvelles phases.

3.2.2 Substituts céramiques poreux

La possibilité de modifier en surface les cubes BCP poreux à l'aide du procédé CO₂ a été évaluée.

Dans un premier temps, nous présentons sur la Figure 54 les observations au MEB réalisées sur les cubes BCP poreux *non traités* et *traités* avec le protocole de référence : 40°C, 80bar, 4H avec L/S=2 (2.2.1.b). Ce ratio correspond, au vu des récipients utilisés, à une immersion complète des blocs de céramique, ses dernières affleurant la surface du liquide.

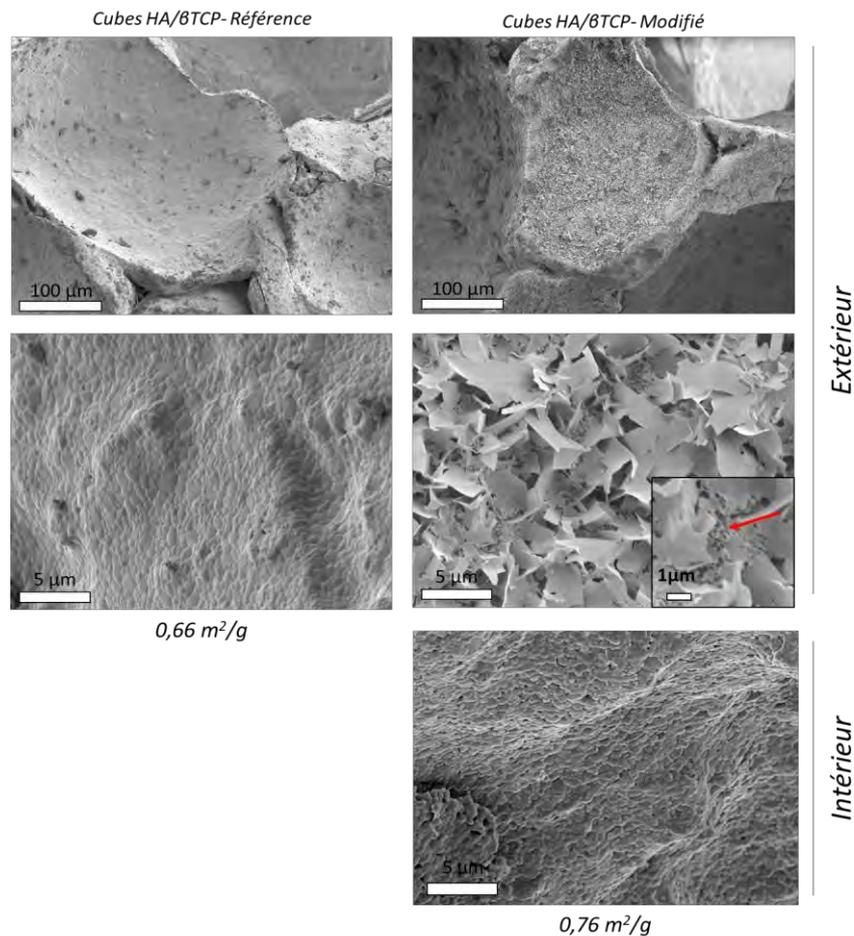


Figure 54 Images MEB de cubes poreux HA/βTCP de Référence et traités 4H, 40°C 80bar et surface spécifique correspondante (BET Krypton)

Les observations MEB (Figure 54) permettent de remarquer la surface lisse classique des céramiques frittées de type BCP non traitées. En revanche, une modification de la surface est nettement visible sur les cubes BCP traités. Un revêtement dense, indiqué par une flèche rouge sur la Figure 54, semble recouvrir la surface initiale et des plaquettes plus larges semblent avoir précipité par-dessus. Ce revêtement est homogène en surface. En revanche les pores à l'intérieur des cubes BCP ne présentent pas de modification visible. Des images

supplémentaires des substituts obtenus avec ce protocole dit «de référence » sont présentées en Annexe 1.

La surface spécifique de la céramique BCP de référence est faible mais a tendance à augmenter une fois le traitement au CO₂ effectué. Malgré la faible quantité du revêtement déposé à la surface des cubes BCP, l'augmentation de surface spécifique serait liée aux phases déposées qui présentent une surface spécifique plus importante. Les mesures de porosité obtenues à l'aide d'un porosimètre à mercure ont permis d'évaluer les modifications du réseau poreux engendrées par le traitement (Figure 55).

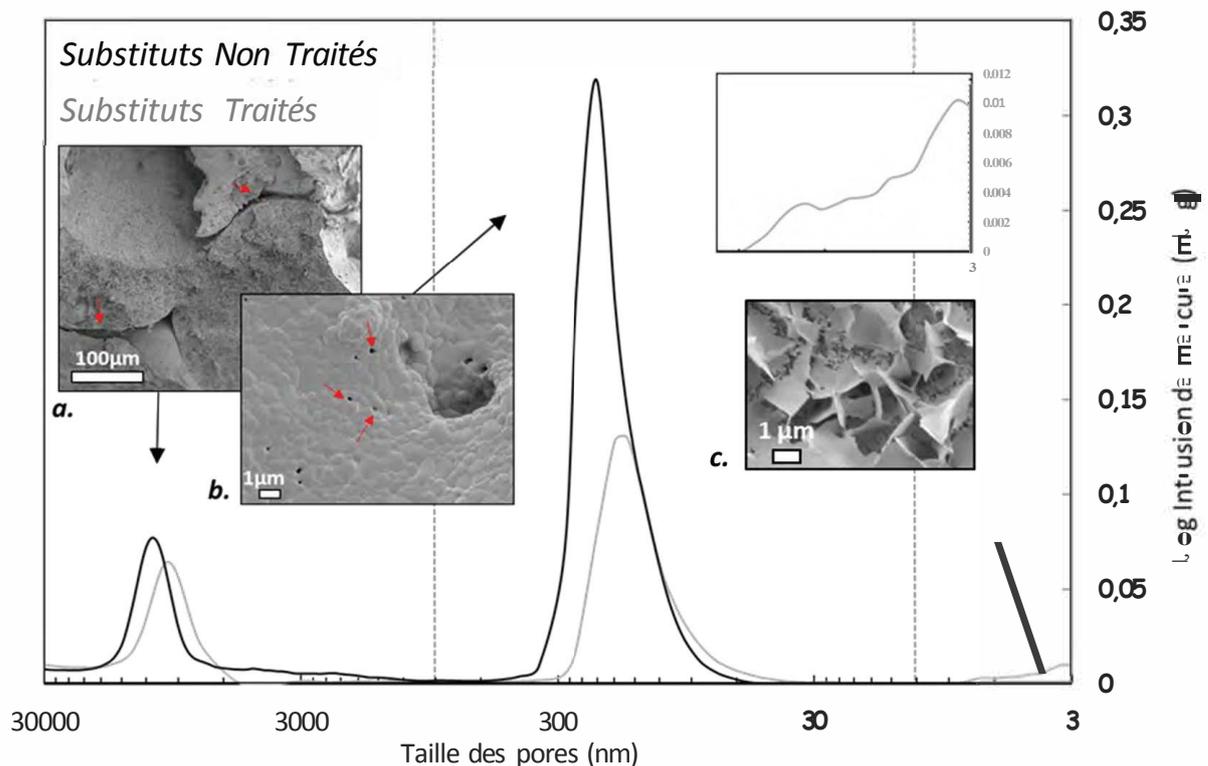


Figure 55 Porogramme des cubes BCP de référence et des cubes BCP traités avec le protocole de référence d a.,b. MEB des substituts Non Traités

Les substituts non traités présentent deux populations de pores distinctes. La première autour de 11000 nm pourrait correspondre aux interstices désignés Figure 55 a. La deuxième population se trouve autour de 200nm et est elle-même composée de différentes populations. Ceci a été vérifié en évaluant la dérivée du porogramme présenté, ce dernier présentant plusieurs points d'inflexion dans cette zone (Annexe 2). Différentes inflexions montrent bien que le pic visible est lui-même composé de plusieurs pics. Cette deuxième population pourrait être liée aux défauts de frittage observables par exemple sur l'image b. de la Figure 55.

Ces mesures de porosimétrie permettent d'observer une redistribution de la taille des pores sur les cubes céramiques BCP traités en comparaison avec les cubes initiaux. Trois

gammes de taille de pores peuvent être identifiées sur les cubes *Traités* présentant des modifications : 1000-30000 nm, 30-1000 nm et 3-30 nm.

Un décalage des populations de pores situées entre 1000-30000 nm et 10-1000 nm vers les plus petits diamètres de pores pourrait indiquer une diminution de la taille de certaines gammes de pores sur les substituts traités. Il est possible que cette diminution de taille de pores soit due à la couche nouvellement précipitée. Ainsi, les cristaux qui tapissent la surface des pores pourraient engendrer une diminution de leur diamètre.

La création d'une mésoporosité (2-50 nm) est observable sur les cubes de céramiques BCP traités, cette dernière sera ici appelée par la suite de manière simplifiée « nanoporosité » afin de faciliter la compréhension. L'apparition de ce nouveau réseau poreux nanométrique est probablement due au revêtement nouvellement formé visible sur les images MEB (Figure 54), dont l'agencement des particules engendre la création d'un réseau de taille nanométrique supplémentaire (c. Figure 55).

a. RMN du solide

Des mesures en RMN du phosphore ont été réalisées sur les substituts BCP de référence *Non Traités* ainsi que sur les cubes *Traités* au CO_2 .

Des premières mesures par RMN en phase solide du ^{31}P ont été faites en simple impulsion sur les céramiques *Non Traitées* et *Traitées*. Elles sont représentées respectivement sur les Figure 56 et Figure 57. Sur les deux spectres, deux pics principaux sont observés, à 2.3 et 0 ppm. D'après la bibliographie³¹³ le pic à 2.3 ppm peut être attribué à l'hydroxyapatite (HA)³¹⁴, et le pic à 0 ppm à du βTCP ³¹⁵. Cela est cohérent avec la composition HA/ βTCP des substituts étudiés. Aucune différence n'est visible entre les échantillons traités et non traités.

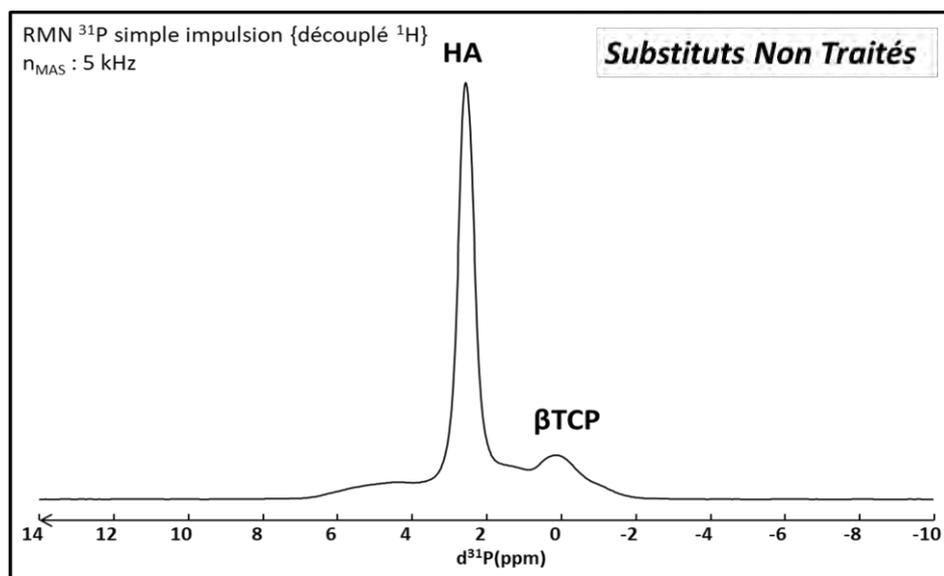


Figure 56 Spectre RMN ^{31}P simple impulsion des substituts BCP Non Traités

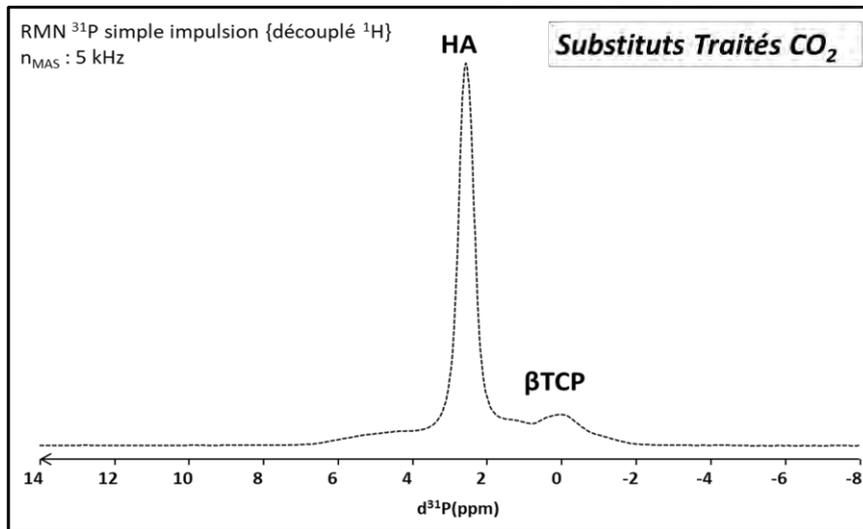


Figure 57 Spectre RMN ^{31}P simple impulsion du substitut BCP Traité CO_2

Des mesures complémentaires ont alors été réalisées en polarisation croisée du proton vers le phosphore dans le but de mettre en évidence les phases protonées. Le βTCP ne sera donc pas visible. Plusieurs mesures ont été réalisées à différents temps de contact permettant ainsi de sonder l'environnement plus ou moins proche du phosphore. Des temps courts permettent également de mettre en évidence des phases moins organisées *via* des élargissements de pics. Un temps de recyclage court pourra alors augmenter ce signal, visant une identification plus formelle.

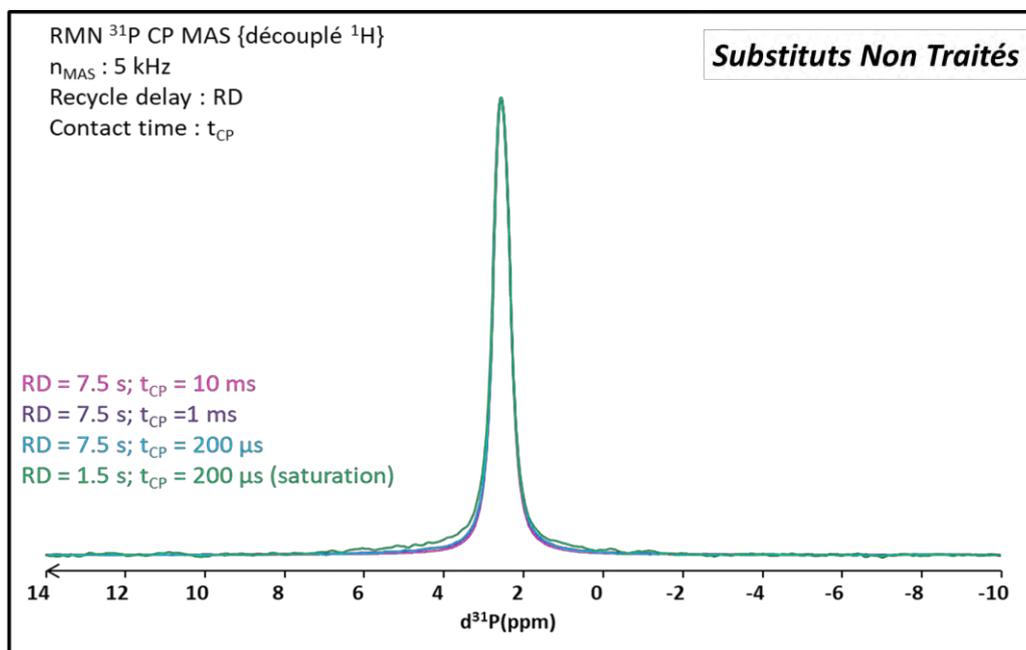


Figure 58 Spectres RMN ^{31}P en polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ des BCP Non Traités

Les substituts *Non Traités* présentent, comme attendu puisque la phase βTCP ne peut pas être détectée dans ces conditions $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$, des spectres caractéristiques de la phase HA

(Figure 58). Le signal est similaire quel que soit le temps de contact. Aucune phase supplémentaire n'est détectée.

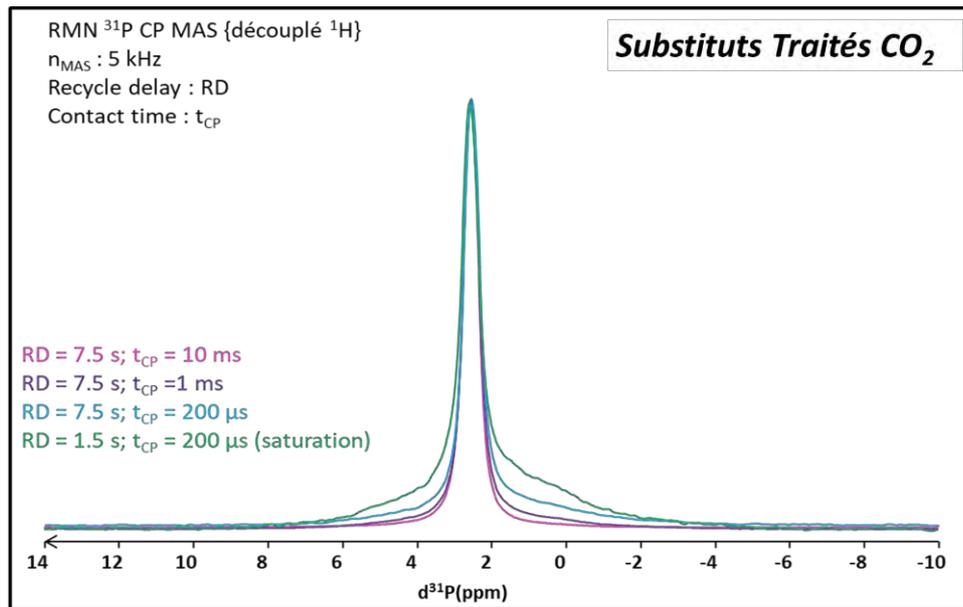


Figure 59 Spectres RMN ^{31}P en polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ de céramiques BCP Traités CO_2

Au contraire, les substituts *Traités* au CO_2 se comportent de manière différente (Figure 59). Les temps de contact de plus en plus courts font en effet apparaître de manière significative un élargissement au pied du pic caractéristique de l'apatite. Cet élargissement met en évidence la présence d'une phase désordonnée et riche en ions HPO_4^{2-} .

Un temps de recyclage plus court confirme une phase désordonnée avec un élargissement encore plus notable du pied du pic de l'apatite (Figure 59). Cela est le signe d'un fort désordre ou degré d'hydratation par rapport à celui de l'HA, constituant principal du substitut. Des acquisitions en 2D (^{31}P , ^1H) sont venues compléter l'étude afin de tenter d'identifier plus finement le(s) CaP nouvellement formé(s) (Figure 60).

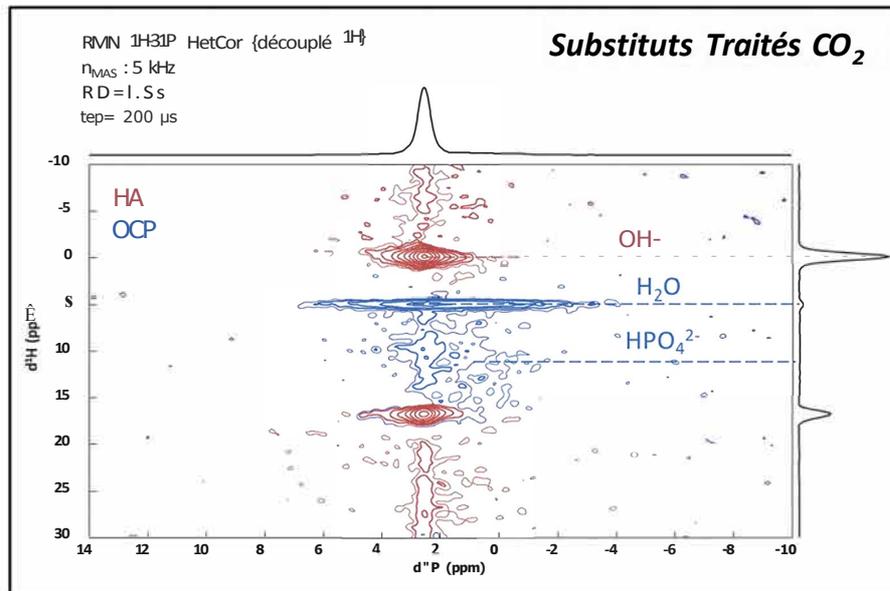


Figure 60 2D R\N ($^1\text{H}, ^1\text{P}$) de substitu\B3CP Trait\ au CO_2

Cette mesure en R\N 2D permet de sonder la proximit\ entre les noyaux ^{31}P et ^1H . Des zones de corr\elation sont alors clairement visibles sur la Figure 60. Elles t\emoignent d'une part de l'existence d'interactions entre des groupements phosphat\ menant \ une contribution ^1H peu large et des ions OH^- , ce qui est attendu pour la phase hydroxyapatite (en rouge sur la Figure 60). D'autre part, l'on voit d'autres corr\elations (en bleu sur la Figure 60) entre des noyaux phosphore et des mol\cules d'eau ainsi qu'avec des ions HPO_4^{2-} qui indique donc la pr\esence d'au moins une phase hydrat\e et contenant des ions hydrog\enophosphate. Pour examiner plus avant cette phase, les projections du signal du phosphore de la Figure 60 ont \t\e retrac\es sur la Figure 61.

Ces trac\es valident les conclusions tir\ees ci-dessus, avec pr\esence d'HA (corr\elation avec les ions OH^- \ 0 ppm) et la pr\esence d'une phase suppl\ementaire avec un signal ^1H moins bien r\esolu.

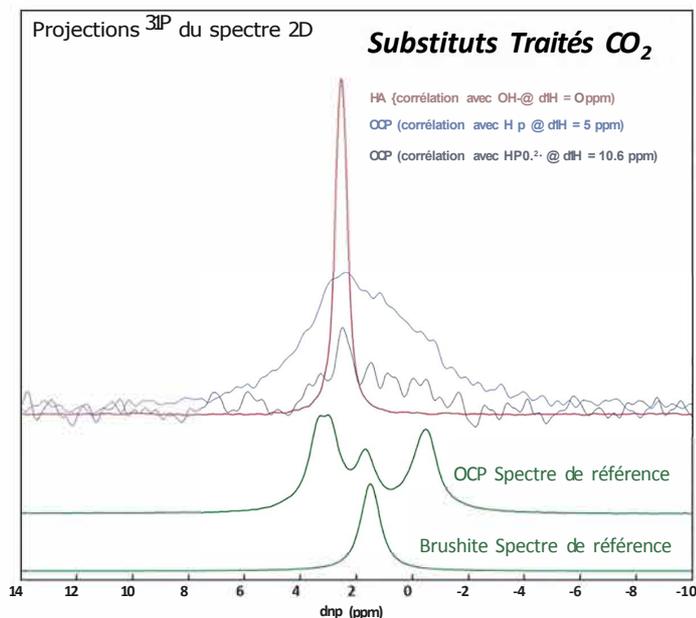


Figure 61 Projections ^{31}P de la mesure 2D RtTI (^{31}P , ^1H) de substituts BCP Traités CO_2

La phase supplémentaire ayant été identifiée comme hydratée sur les précédentes analyses, le spectre est comparé aux références de CaP hydratés (OCP et brushite ou DCPD). La comparaison indique que le signal se rapproche nettement de celui de l'OCP; bien qu'avec des pics moins bien définis.

La phase supplémentaire nouvellement précipitée en surface pourrait donc être une phase d'OCP « mal » cristallisé, par exemple encore en cours de formation. Ce résultat est en cohérence avec les résultats obtenus dans la première partie de cette Partie 3 sur les poudres modifiées au CO_2 haute pression.

En revanche, notons que la présence additionnelle (en plus de cette phase OCP) d'une éventuelle apatite (possiblement carbonatée) faiblement cristallisée ne peut ni être confortée ni invalidée sur la base de ces analyses RVTI. En effet, compte tenu de la très forte proportion d'HA dans les composés, la présence en surface d'une autre phase apatitique ne peut pas être détectée.

C'est pourquoi des échanges ioniques ont été réalisés, en marge de ces analyses RVTI, pour déterminer si une phase néoformée (autre FOCP) est présente et capable d'échanger rapidement des ions « labiles », ce qui est l'une des caractéristiques des apatites nanocristallines analogues du minéral osseux, dont les nanocristaux sont recouverts, comme pour les, d'une couche ionique hydratée non apatitique très réactive.

b. Echange ionique

Comme discuté dans la Partie 1, les apatites nanocristallines (biomimétiques) sont connues pour posséder, à la surface de leurs nanocristaux, une couche ionique hydratée non-apatitique et dont les ions sont aisément mobilisables. Ceci peut notamment être mis en évidence par échanges ioniques rapides en immergeant l'apatite nanocristalline dans une solution contenant l'ion « marqueur » susceptible de remplacer l'ion « cible », comme démontré par exemple dans le cas d'échanges d'ions Ca^{2+} de surface par les ions Mg^{2+} ou Sr^{2+} ^{31,38}. Cette particularité est assez caractéristique des apatites nanocristallines, car cette mobilité ionique de surface ne se retrouve pas (ou bien moins notablement) dans les autres phases phosphocalciques⁹⁷. Etudier les capacités que possède un composé phosphocalcique à échanger rapidement (en quelques minutes à température ambiante) une partie des ions Ca^{2+} de surface par des ions tels que Mg^{2+} contenus dans la solution d'immersion, par exemple, peut donc être utilisé comme un moyen indirect de présumer de la présence d'apatite nanocristalline au sein de l'échantillon analysé. Cette approche a été réalisée ici en immergeant, dans une solution aqueuse riche en ions Mg^{2+} , des substituts BCP poreux *Traités* ou non au CO_2 haute pression. La Figure 62 reporte les résultats obtenus en quantifiant la quantité d'ions Mg^{2+} contenus dans les céramiques suite aux échanges. Les résultats sont présentés en ramenant les valeurs au gramme de cube traité. Les données obtenues sur des céramiques non immergées, sont aussi reportées. Les résultats obtenus sur les céramiques non traitées démontrent la présence d'impureté Mg dans les cubes initiaux (0,5 nmol/g de céramique), l'alcalino-terreux magnésium étant souvent associé aux précurseurs calciques. Cependant, la Figure 62 indique une teneur notablement plus élevée – entre 4 et 7 fois supérieure – pour les cubes ayant été immergés dans une solution riche en ions Mg^{2+} , que les cubes aient été préalablement traités ou pas. Ceci est probablement imputable à la grande porosité des cubes, rendant le lavage et donc l'élimination du sel de magnésium non adsorbé particulièrement difficile. Néanmoins, et de manière très intéressante, la teneur en magnésium des cubes *après traitement* au CO_2 haute pression est significativement plus élevée (d'un facteur 1,6), avec une valeur de $3,6 \pm 0,6$ nmol/g, alors que les cubes n'ayant pas subi ce traitement atteignent une teneur en Mg de $2,2 \pm 0,4$ nmol/g.

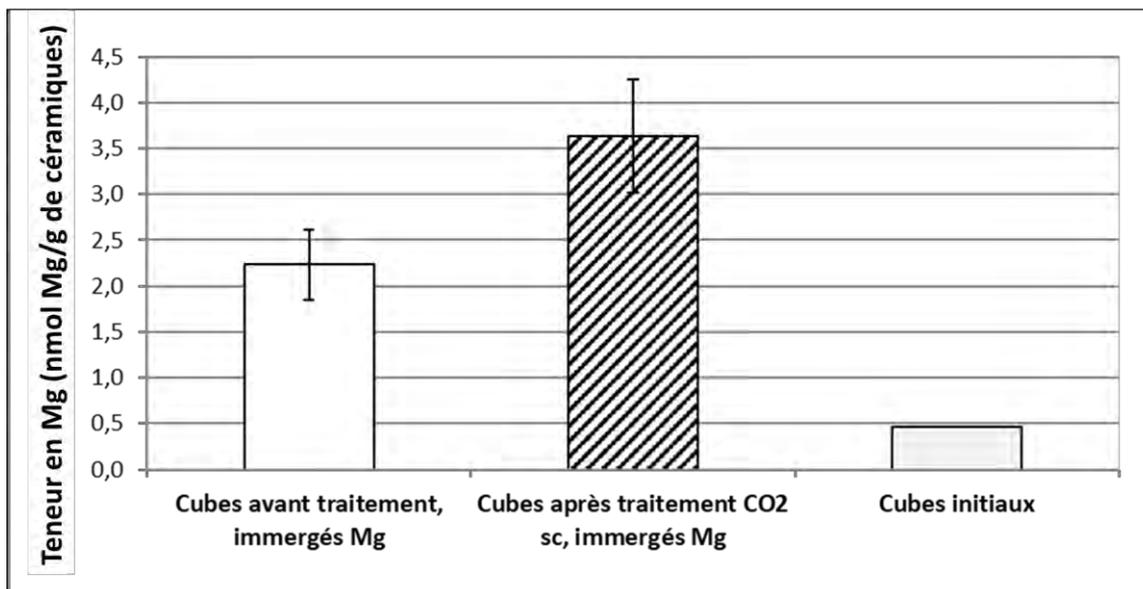


Figure 62 Teneur moyenne en ions Mg^{2+} des échantillons traités ou non au CO_2 supercritique (protocole standard) et après immersion dans une solution d'ions Mg^{2+} (1 mol/L, température ambiante). Les données obtenues sur des cubes initiaux, non immergés, sont aussi reportées.

Le traitement au CO_2 permet donc l'incorporation supplémentaire de magnésium à hauteur de $1,4 \pm 0,7$ nmol/g de cubes. Cette augmentation importante suggère très fortement la présence, au sein des échantillons traités, d'une phase apatitique nanocristalline, ce qui vient conforter les résultats obtenus en RMN.

En plus de la phase principale d'OCP mal cristallisée identifiée en RMN, cet échange ionique a permis de mettre en évidence la présence d'une PCCA. Les phases identifiées sont donc identiques aux phases obtenues lors des essais de traitement du mélange de poudre HA/amTCP. Il est ainsi vraisemblable que des mécanismes similaires soient mis en jeu.

Conclusion :

Il a été montré que le procédé CO₂ permettait l'obtention d'un revêtement de phosphate de calcium. Ce dernier a pu être identifié comme étant un mélange d'une phase d'OCP et d'une phase apatitique mise en avant grâce à la présence d'une couche hydratée labile.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur le mélange (HA/amTCP) de poudres modifiées.

Ainsi, de la même manière que pour les poudres, les cubes subiraient une dissolution partielle lors du traitement sous CO₂, ce dernier acidifiant le milieu. Il a été montré sur la poudre issue des substituts broyés que c'était principalement la phase TCP qui se dissolvait. Les céramiques étant composées à la fois d'HA et de β TCP, les grains d'HA, peu solubles pourraient agir comme des sites de nucléation pour la nouvelle phase de CaP qui précipite. Il est ici difficile d'accéder à des informations telles que le moment précis de la première nucléation : durant la mise sous pression, pendant la décompression ou encore durant la phase de repos. L'étude suivante visant à étudier l'impact de différents paramètres sur le procédé développé tentera de préciser ces mécanismes.

A noter que les observations réalisées sur les surfaces poreuses interne et externe des cubes mettent en évidence la présence du revêtement nanoparticulaire sur les surfaces poreuses externes du substitut alors que les surfaces poreuses internes ne paraissent pas recouvertes. Cependant, celles-ci sont pourtant en contact avec de l'eau saturée en CO₂, comme l'ensemble des cubes BCP. Ainsi, en supposant qu'une dissolution du cube a bien lieu, et dans le cas où les nouvelles phases seraient précipitées durant ou après la phase de décompression, il est aussi envisageable que des bulles de CO₂ se forment au sein des pores des cubes BCP lors de la décompression. Elles seraient alors responsables de la formation de zones sèches au sein desquelles la solution contenant les espèces dissoutes n'est plus présente, ce qui empêcherait la précipitation et la création d'un nouveau revêtement nanoparticulaire sur les surfaces internes des cubes BCP.

Enfin il est possible que les phénomènes de dissolution ne soient pas identiques à l'extérieur et à l'intérieur du substitut. En effet, à l'intérieur des porosités, l'espace étant confiné, il est possible que les espèces ioniques libérées par la dissolution saturer rapidement l'environnement. Le pH, diminué par le CO₂ pourrait alors vite remonter dans les porosités. Les porosités et la tortuosité du réseau ne permettant pas une diffusion facile des espèces ioniques libérées, le remaniement de surface est peut-être moindre. En effet, sur les surfaces externes en constante présence d'un milieu acidifié, la diffusion des espèces ioniques dans le

milieu pourrait permettre une libération plus importante de calcium et de phosphate, indispensable à la re-précipitation.

Ces essais ont permis de confirmer un remaniement de surface des cubes de céramiques BCP poreux conformément aux résultats déjà constatés sur les poudres. En revanche les mécanismes mis en jeu restent à préciser.

La partie suivante a pour objectif d'observer l'influence des différents paramètres du procédé sur l'état du revêtement ainsi que d'affiner la compréhension des phénomènes. Les techniques de caractérisation utilisées ici seront la porosimétrie à mercure afin d'évaluer la porosité, le BET Krypton pour la mesure de surface spécifique ainsi que le IVIEB afin de visualiser l'état de surface des échantillons.

3.2.3 Influence de la température de traitement

La température à laquelle est maintenu le réacteur CO_2 pendant le temps de traitement a été modifiée et 3 températures ont été testées à 80 bar et pour un traitement de 4H : 40°C (température définie par le protocole de référence), 50°C et 80°C.

Dans cette gamme de températures, la solution est en équilibre avec un ciel gazeux constitué de CO_2 à l'état de gaz dense, dans lequel une fraction d'eau est solubilisée. A 80 bar, la température a également une influence sur la solubilité du CO_2 dans l'eau, ce qui se traduit par une très faible diminution du pH.

La température a également une influence sur la solubilité des phases HA et βTCP dans le milieu. Celles-ci ont été prédites avec PHREEQC sur l'intervalle de températures considéré ici et les résultats théoriques sont présentés sur la Figure 63. On peut constater, comme l'indique la littérature²⁹⁵, que la solubilité des espèces diminue lorsque la température du milieu augmente, ce qui est cohérent avec la légère augmentation du pH. Dans tous les cas, la solubilité d'HA est plus faible que celle du βTCP , cette différence s'atténuant avec l'augmentation de température.

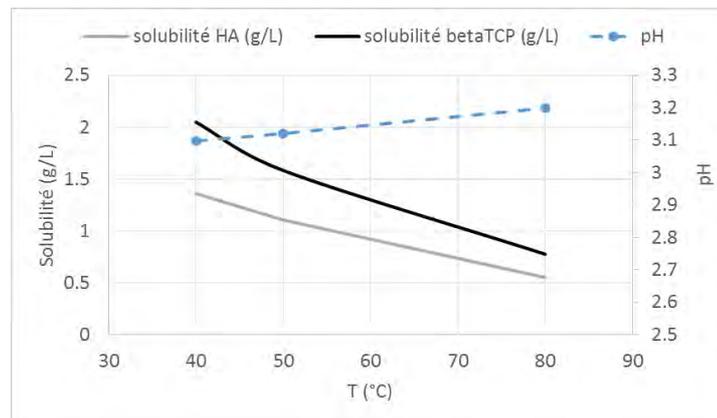


Figure 63 Evolutions du pH initial de l'eau et des solubilités (en g/L) de HA et βTCP dans l'eau en contact avec du CO_2 en fonction de la température à 80 bar.

Les observations MEB (Figure 64) permettent de visualiser les différences d'aspect du revêtement obtenu en fonction des conditions de traitement.

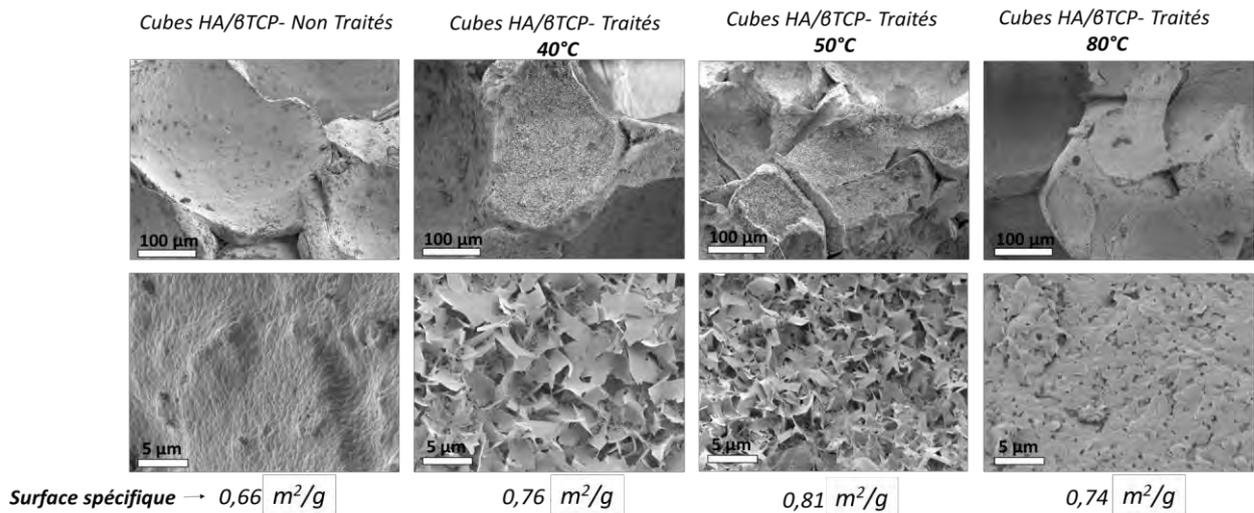


Figure 64 Clichés MEB et mesures de surface spécifique des substituts céramiques BCP Non Traités, Traités à 40°C, 50°C et 80°C

A 40°C, comme déjà observé (3.2.2), un revêtement dense sous de grandes plaquettes recouvre la surface. Lorsque la température est augmentée à 50°C, nous pouvons observer un revêtement similaire au précédent mais les cristaux en surface sont sous forme de plaquettes plus petites. Les plaquettes étant plus petites à 50°C, la surface spécifique mesurée serait légèrement plus importante. L'erreur de mesure sur cette technique étant de 0,03m²/g, la différence est ici significative. L'aspect observé après le traitement à 80°C est cependant différent. Les plaquettes sont très faiblement présentes et la surface spécifique serait moins élevée qu'à 50°C. Les faibles modifications enregistrées sont à relier avec la plus faible solubilité des espèces. Ainsi, les modifications de l'organisation des feuillets pourraient être dues à un affaissement des feuillets sur la surface des pores, conduisant à une diminution de la surface spécifique. Il est cependant difficile d'expliquer à ce stade les résultats obtenus à cette température. A 80°C, il est intéressant de noter la dissolution partielle de la céramique. D'après les études préliminaires (3.2.1) il est probable que cette dissolution soit la conséquence de la dissolution des particules de β TCP. Des feuillets épars semblent malgré tout recouvrir en grande partie la surface. La surface spécifique est plus élevée que celle des substituts *Non Traités*.

Les mesures de porosimétrie à mercure permettent d'amener un nouvel éclairage à ces hypothèses (Figure 65).

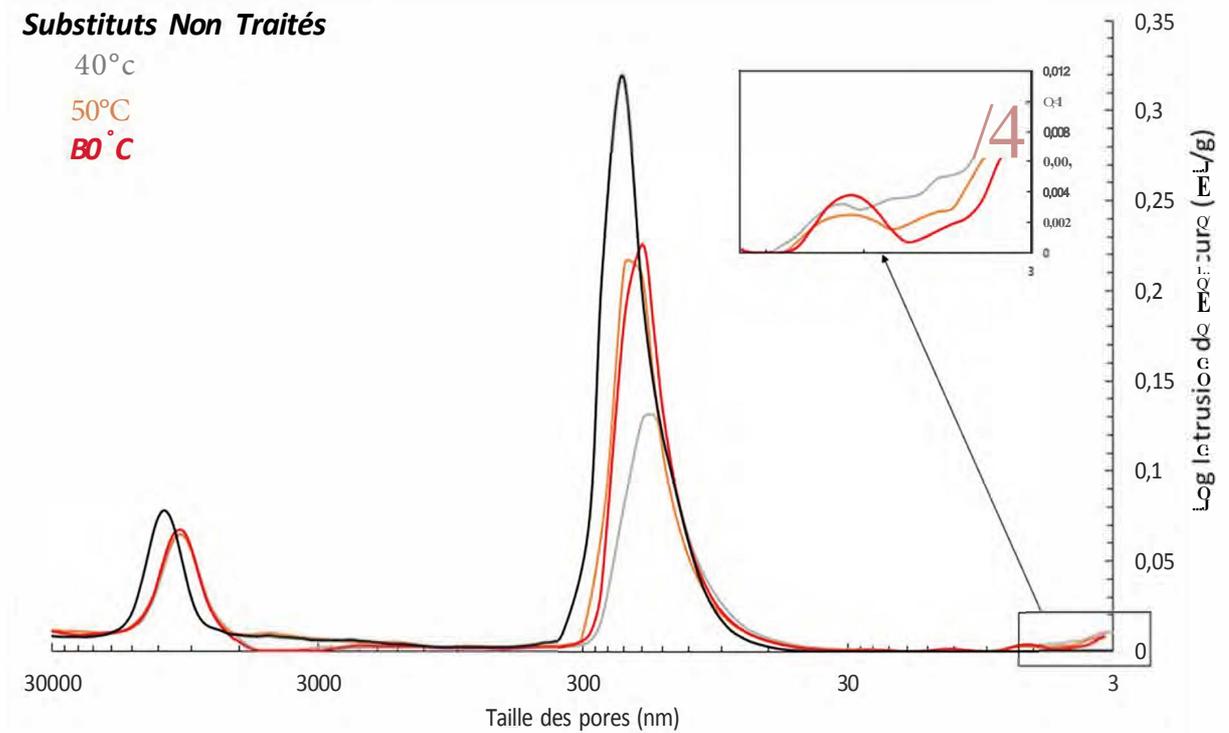


Figure 4 Porogrammes des substituts BCP non traités, traités à 40°C, 50°C et 80°C

Une observation globale permet dans un premier temps de constater dans le cas des céramiques traitées, un décalage vers la droite des deux populations de pores précédemment identifiées sur les céramiques non traitées, quelle que soit la température, dans les gammes 1000-30000nm et 10-1000nm. Une porosité de taille inférieure à 10nm est également visible sur l'ensemble des substituts céramiques BCP traités. Cette dernière pourrait correspondre aux porosités créées par la précipitation de nouveaux cristaux. Il est possible que ces mêmes cristaux soient à l'origine des diminutions de tailles de pores observés précédemment. La différence d'intensité du pic entre 10-1000nm entre le substitut BCP de référence et les céramiques traitées montre que le traitement induit une diminution significative de la population de pores de diamètres compris entre 10 et 1000nm.

Une concentration plus importante de calcium et de phosphate dans le milieu, à basse température, pourrait ainsi favoriser la précipitation d'une nouvelle phase. On peut noter que selon la quantité de calcium et de phosphate disponible et selon les mécanismes de nucléation il est également possible que différentes phases phosphocalciques précipitent, entraînant différentes morphologies de la couche formée en surface et par voie de conséquence, une modification plus ou moins marquée de la surface spécifique globale du matériau. Ainsi la formation de PPCA nanocristallins engendrerait-elle une augmentation conséquente de la surface spécifique alors que la formation de feuillettes phosphocalciques de grandes dimensions aurait une influence moins marquée sur la valeur de la surface spécifique.

3.2.4 Influence de la pression

La pression est le deuxième paramètre permettant de modifier les propriétés du CO₂ et sa solubilité dans le milieu aqueux. Ici la température a été maintenue à 40°C. Trois valeurs de pression ont été testées : 60bar, 80bar (pression du protocole de référence) et 100bar. A 60bar, le CO₂ se trouve à l'état gazeux et non à l'état supercritique contrairement à 80 et 100bar. Cependant, le CO₂ étant ici en contact avec une grande quantité d'eau, on considèrera la phase CO₂ contenant de l'eau comme une phase gaz dense.

Comme précédemment, les calculs réalisés avec PHREEQC permettent de connaître l'évolution de la solubilité des espèces pures HA et β TCP à 40°C en fonction de la pression. Les résultats sont présentés sur la Figure 66. Celle-ci augmente en même temps que le pH diminue très faiblement (passant de 3,13 à 60bar à 3,07 à 100bar), en raison d'une quantité plus importante de CO₂ dissous dans l'eau. La différence de solubilité entre HA et β TCP s'accroît légèrement avec la pression.

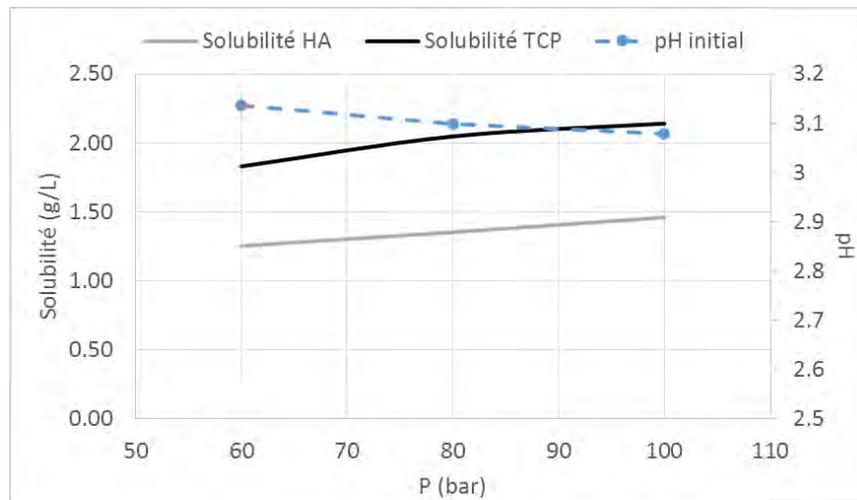


Figure 66 Evolutions du pH initial de l'eau et des solubilités (en g/L) de HA et β TCP dans l'eau en contact avec du CO₂ en fonction de la pression à 40°C.

D'après les images MEB présentées (Figure 67), la pression semble avoir un effet sur le revêtement formé.

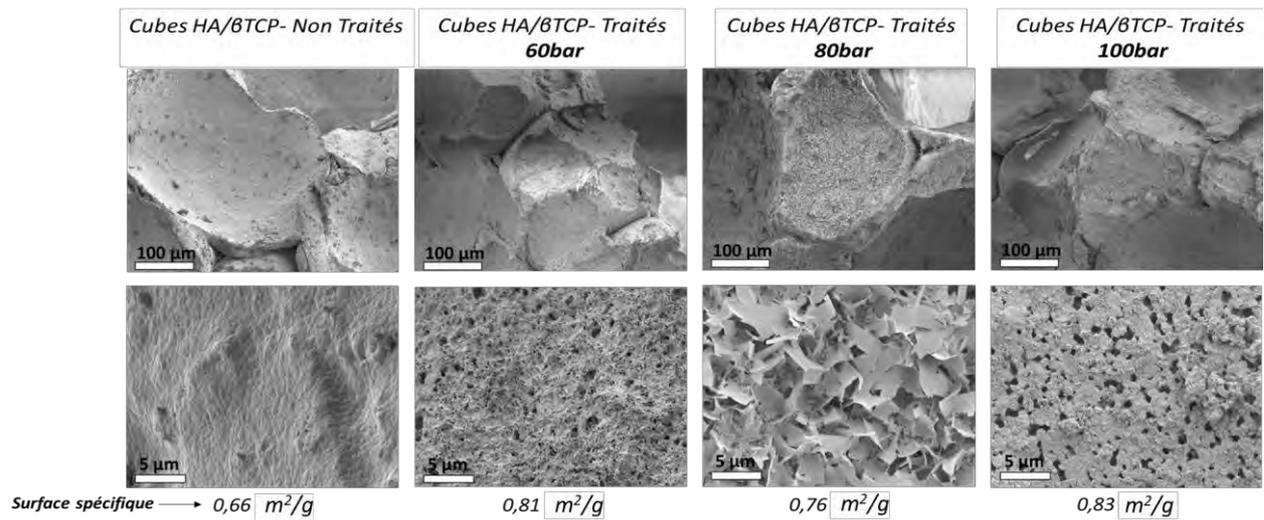


Figure 67 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) des substituts céramiques BCP Non Traités et Traités 60bar, 80bar et 100bar

A 60bar un revêtement constitué de petits cristaux nanométriques recouvre la surface. Ce revêtement évoque les résultats obtenus en immergeant le support phosphocalcique fritté dans une solution sursaturée de SBF^{316} . Il est, de plus, identique à celui qu'on peut observer sous les plaquettes identifiées comme étant de l'OCP sur du substitut céramique traitée avec le protocole de référence à 80bar. La surface spécifique est plus importante que celle du cube non traité ou que celle obtenue sur le cube traité avec le protocole de référence.

Enfin à forte pression (100bar) une dissolution partielle est nettement visible. On constate des trous d'environ $1\mu m$ évoquant la disparition de certains grains. D'après les essais préliminaires de modification de poudres issues de céramiques broyées, la dissolution semble majoritairement concerner la phase β TCP. Les grains restants, potentiellement ceux d'HA, semblent recouverts d'un début de revêtement assez similaire à celui obtenu à 60bar. Ici aussi la surface spécifique est plus importante que celle des substituts non traités et quasi-similaire aux valeurs obtenues à 60bar.

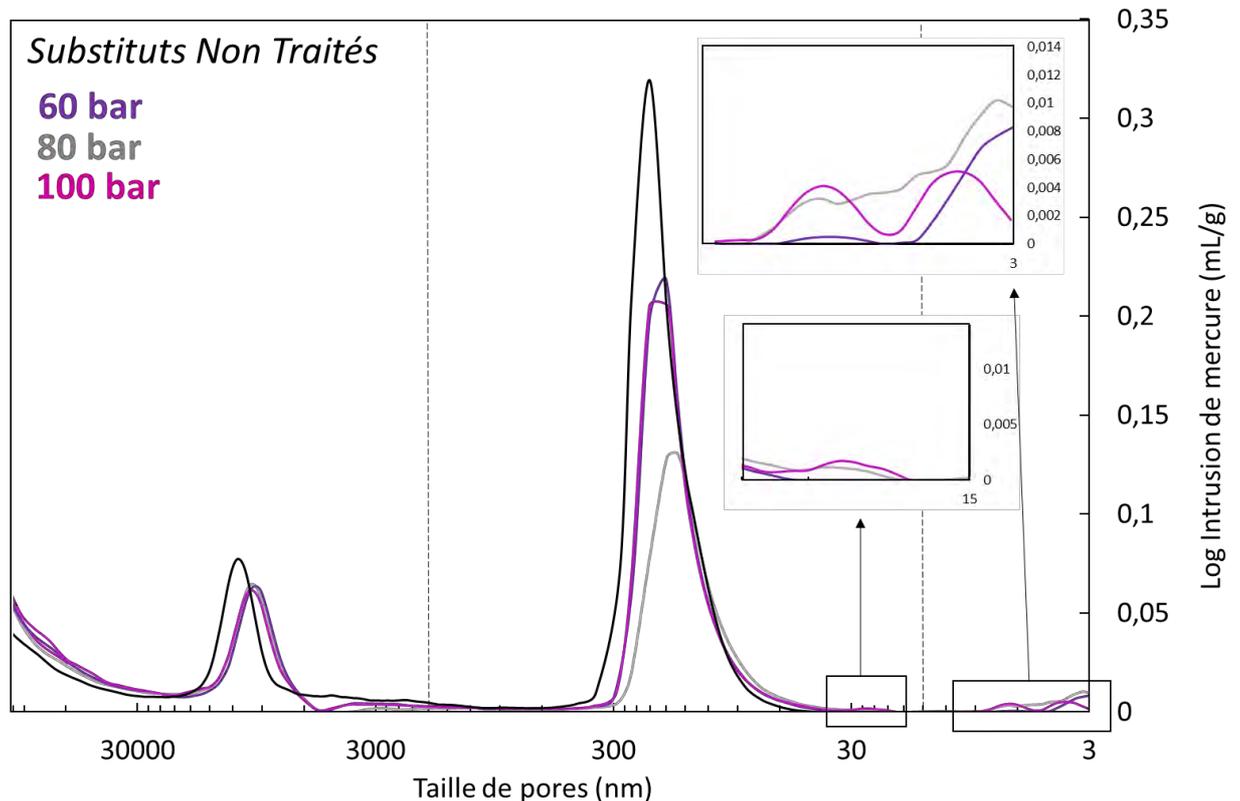


Figure 68 Porogrammes des substituts BCP Non Traités et Traités à 60, 80 et 100 bar

Les mesures de porosimétrie à mercure (Figure 68) permettent de constater ici aussi un décalage des deux populations identifiées à 1000-30000nm et 10-1000nm sur les trois échantillons traités (Figure 68). Alors que la quantité de pores dans la gamme 1000-30000nm semble inchangée, une diminution dans la gamme 10-1000nm est visible pour les trois types d'échantillon traités. Une nanoporosité est également visible quelle que soit la pression utilisée lors du protocole CO₂. Une petite proportion de pores est détectée autour de 25 nm pour les échantillons traités à 100bar.

Plus la pression est grande, plus la quantité de CO₂ est importante dans la cellule de taille toujours identique. Cependant le milieu aqueux est saturé en CO₂ à basse comme à haute pression, bien qu'une quantité de CO₂ légèrement plus importante soit dissoute à haute pression. La littérature et les calculs présentés plus haut (Figure 66) nous montrent également qu'à même température, le pH de l'eau en présence de CO₂ est peu sensible à la pression²⁵⁹. Nous avons vu également que la solubilité des céramiques était légèrement plus importante à forte pression (celle de β TCP passe par exemple de 1,83 g/L à 60 bar à 2,14 à 100bar). En revanche, la quantité de CO₂ étant plus importante dans la cellule dans un espace confiné similaire, et la quantité dissoute dans l'eau étant également plus grande, la quantité de CO₂ évacuée du milieu pendant la phase de décompression sera plus importante (temps de décompression identique dans tous les cas et égal à 30 min). Cette étape pourrait avoir un impact sur la phase de précipitation des cristaux dissous sur la surface du matériau. Cependant, il reste à ce stade très difficile de comprendre les processus de précipitation et

leur variabilité en fonction des conditions de traitement, ces phénomènes ayant lieu pendant la phase dynamique de retour en conditions de pression atmosphérique.

3.2.5 Influence du temps traitement

Le temps de traitement correspond au temps pendant lequel les cubes sont mis en contact avec le milieu aqueux saturé en CO₂, donc à pH acide proche de 3. Les résultats sont ici comparés pour deux durées de traitement différentes, 4H (le temps utilisé lors du protocole de référence) et une durée plus importante de 100H.

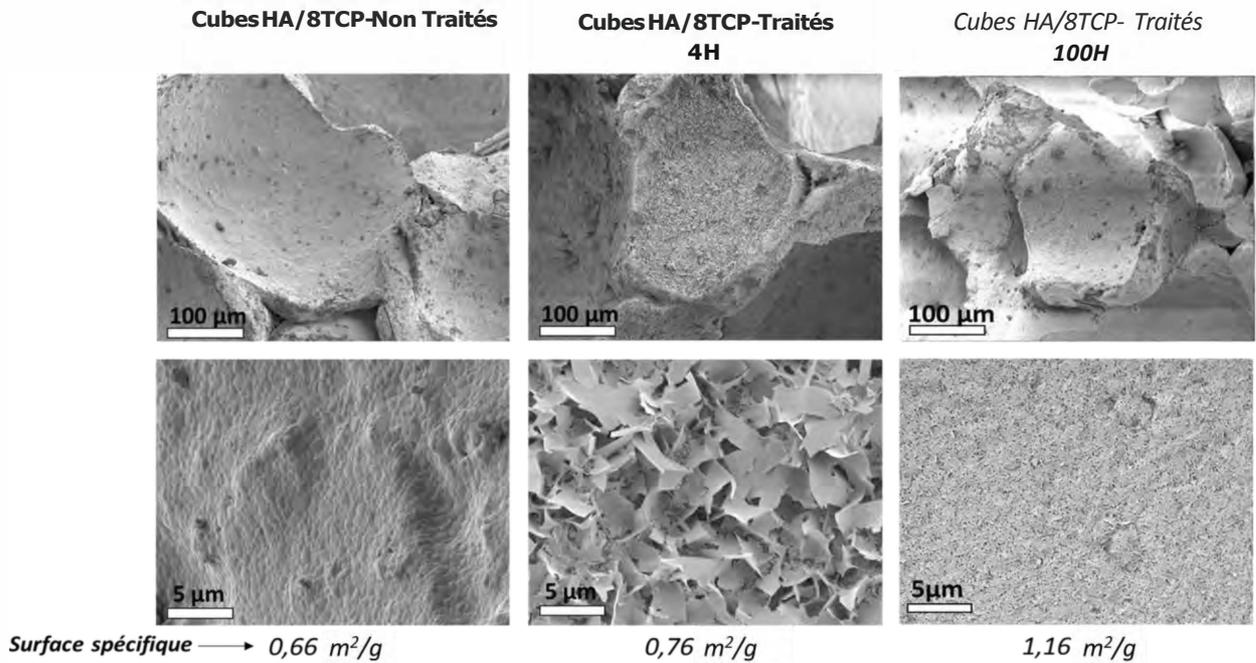


Figure 69 Clichés MEE et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substituts céramiques BCP Non Traités, et Traités pendant 4H et 100H

Il est intéressant de noter l'aspect singulier du précipité obtenu après 100H de traitement (Figure 69). La surface a été remaniée et les grains originaux ne sont plus visibles. Le revêtement paraît dense et l'apparition de petites aspérités a permis une augmentation de la surface spécifique (1,16 cm²/g).

Les porogrammes issus des mesures de porosimétrie à mercure (Figure 70) montrent ici des résultats différents.

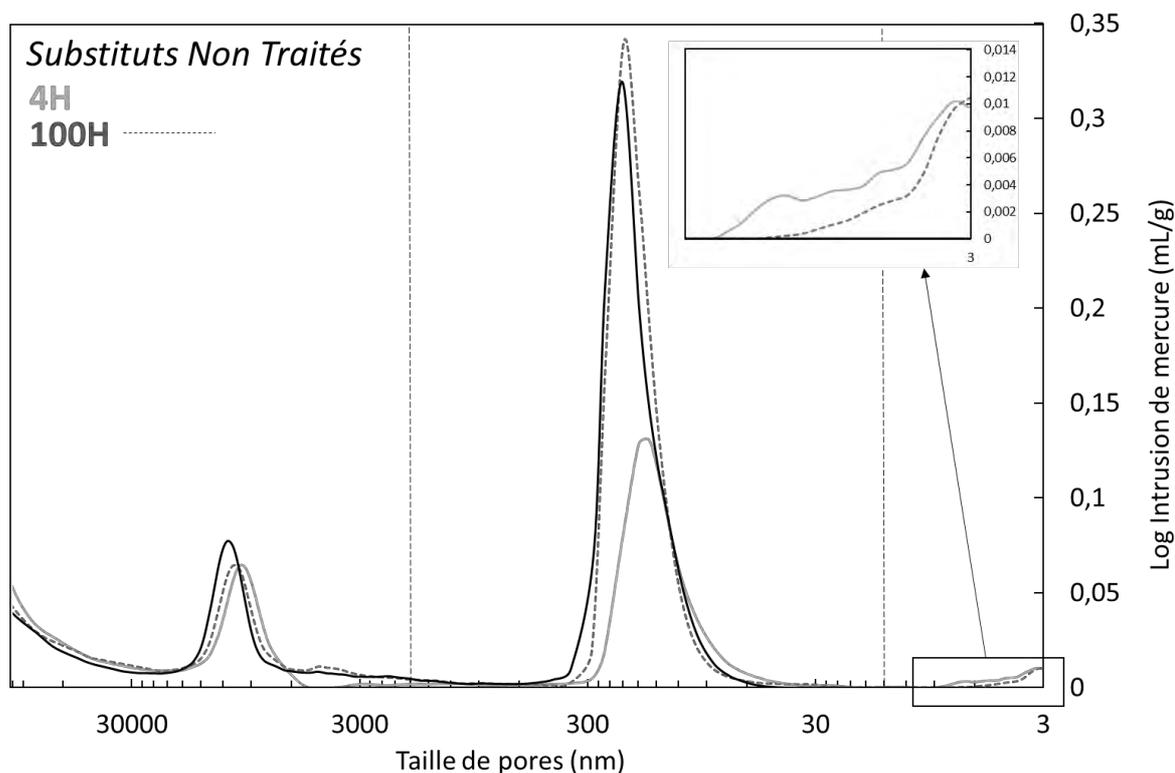


Figure 70 Porogramme des substituts BCP Non Traités, et Traités pendant 4H et 100H

La population de pores entre 1000-30000 nm des substituts traités pendant 100H est décalée vers les plus petites tailles par rapport à la céramique BCP *Non Traitée* mais légèrement moins que dans le cas des céramiques BCP traitées 4H, le protocole de référence. Le décalage observé après le traitement peut être attribué à la précipitation des nouveaux cristaux sur la surface des céramiques. Cependant ceux-ci apparaissent comme plus aplatis contre la surface après 100H de traitement (Figure 69). Le diamètre des pores se retrouve alors, de manière attendue, de nouveau très similaire à ceux des substituts *Non Traités*.

De la même manière, alors que les céramiques BCP traitées étudiées jusqu'à présent voyaient la population poreuse autour de 200nm diminuer (comme on peut l'observer sur les résultats obtenus pour un traitement de 4H), les céramiques traitées pendant 100H ne montrent qu'un léger décalage. Ce dernier correspond à la fois à une faible réduction du diamètre des pores de cette dimension mais aussi à une augmentation de leur quantité.

Enfin, une porosité inférieure à 10 nm est également visible sur les céramiques traitées pendant 4H et 100H.

Quelques hypothèses peuvent être formulées quant aux phénomènes pouvant conduire aux observations ci-dessus. Les céramiques traitées pendant 100H ayant été en contact prolongé avec un environnement acide, il est vraisemblable qu'une plus grande quantité de céramique ait été dissoute. Pendant cette durée, en plus du β TCP de surface susceptible de se dissoudre plus rapidement, l'HA de surface a pu également subir une dissolution partielle. Un ratio Ca/P différent serait alors disponible pour la précipitation et être la conséquence de

l'apparition d'autres phases que l'OCP, caractéristique des grandes plaquettes observées à 4H et non 100H.

Une quantité plus importante de CaP dissout pourrait aussi permettre, comme observé lors des expériences sur la poudre d'amTCP, une nucléation précoce, potentiellement pendant la phase sous pression, laissant un temps plus long aux cristaux de CaP pour croître. La phase nouvellement formée serait ainsi soumise plus longtemps à des phénomènes de dissolution-réprécipitation menant à un revêtement similaire à celui obtenu avec les poudres modifiées mûries sept jours observées en première partie de ce travail (3.1.3.a).

3.2.6 Influence du rapport L/S

L'influence de la quantité du milieu aqueux entourant les céramiques a été évaluée, dans les conditions expérimentales de référence soit 80 bar, 40 °C et 4H de traitement.

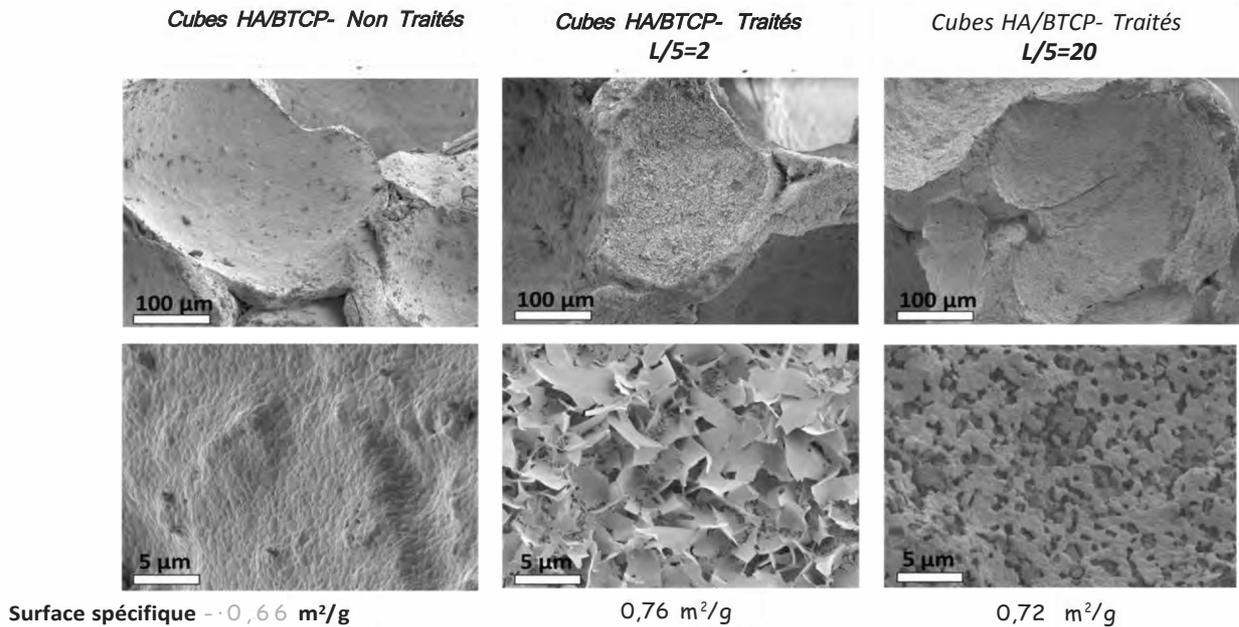


Figure 71 Clichés MEE et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substituts céramiques BCP Non Traités, Traités avec un rapport L/S =2 et L/8=20

Deux rapports Liquide/Solide ont été comparés : L/S=2 (celui du protocole de référence) et L/S=20. Les céramiques traitées avec le rapport L/S=20 montrent une dissolution de surface importante (Figure 71) et aucune trace de précipitation de CaP n'est visible. En revanche, la dissolution partielle de la céramique mise en évidence par l'apparition de « trous » sur les images MEB induit une augmentation de la surface spécifique par rapport à celle des substituts céramiques BCP non traités.

Les porogrammes (Figure 72) des céramiques BCP traités montrent ici aussi des déplacements de pics pour les céramiques traitées par rapport aux céramiques non traitées.

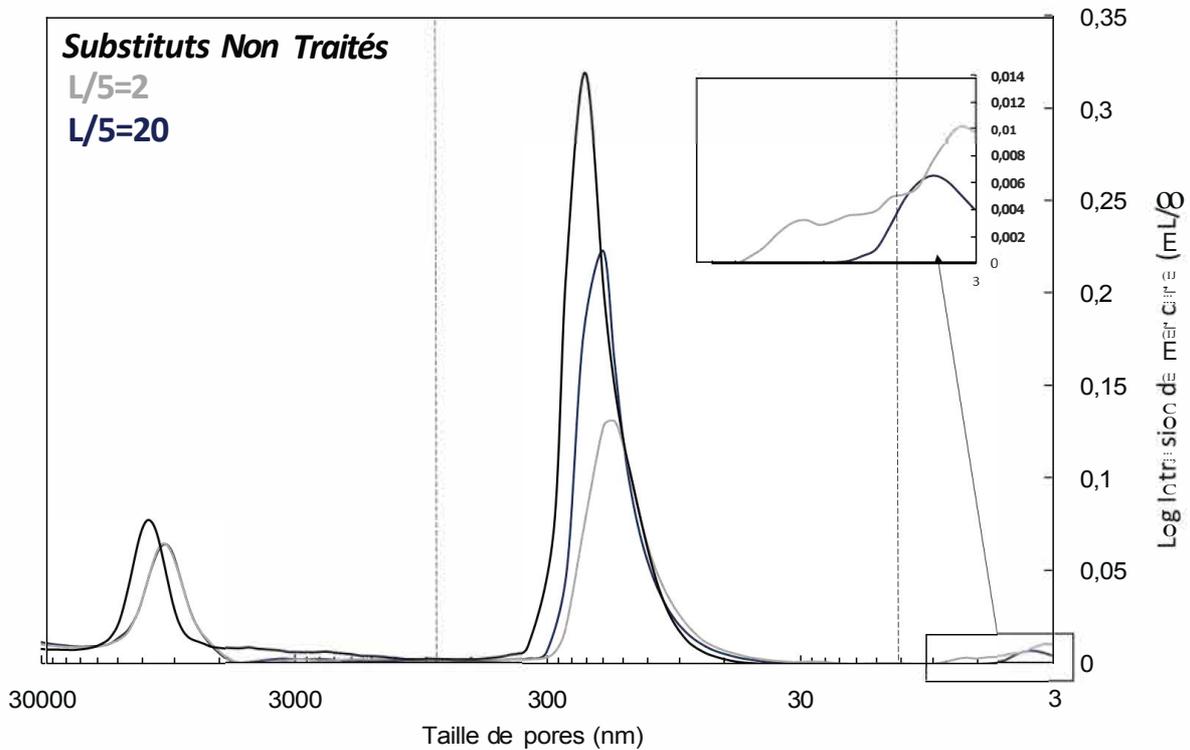


Figure 72 Porogrammes des substituts BCP Non Traités et Traités avec L/S=2 et L/S=20

La population 1000-30000nm des substituts céramique BCP traités est similaire pour les deux valeurs de L/S mais décalée à droite vers les tailles plus petites par rapport aux *Non Traités*. Le diamètre de ces pores est donc réduit.

Ce décalage de la population 10-1000nm est également visible sur les traités ainsi qu'une diminution de population, plus importante pour L/S=2 que pour L/S=20. Bien que moins importante pour la grande quantité d'eau, une porosité inférieure à 10nm est visible. Cette augmentation de porosité de quelques nanomètres est difficilement identifiable sur les images MEB (Figure 71).

La quantité de phase aqueuse disponible influence bien le revêtement obtenu. Cependant une quantité trop importante d'eau ne permet pas ou peu la création d'un revêtement obtenu par réprécipitation. Dans ce cas, par contre, la dissolution a bien lieu et a pu être mise en évidence (Figure 71). Un effet de confinement pourrait être nécessaire pour atteindre C_0 la concentration nécessaire à la précipitation d'une nouvelle phase. Le rapport L/S=2 correspond à l'immersion minimale de la totalité des cubes dans les récipients utilisés : l'eau affleure leur surface. Ce média étant nécessaire à la modification, c'est la quantité minimale d'eau nécessaire permettant un revêtement.

3.2.7 Influence du temps de repos

Dans le protocole de référence, 1h de repos après la décompression a été observé. Pendant ce temps de repos, les cubes de céramiques sont laissés au sein de la phase aqueuse avant d'être séchés puis caractérisés. L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'impact de ce temps de repos sur le revêtement obtenu. Pour cela nous avons analysé les échantillons sans temps de repos (OH) et après un temps plus long de repos (24H). Les images MEB obtenues sont présentées sur la Figure 73 .

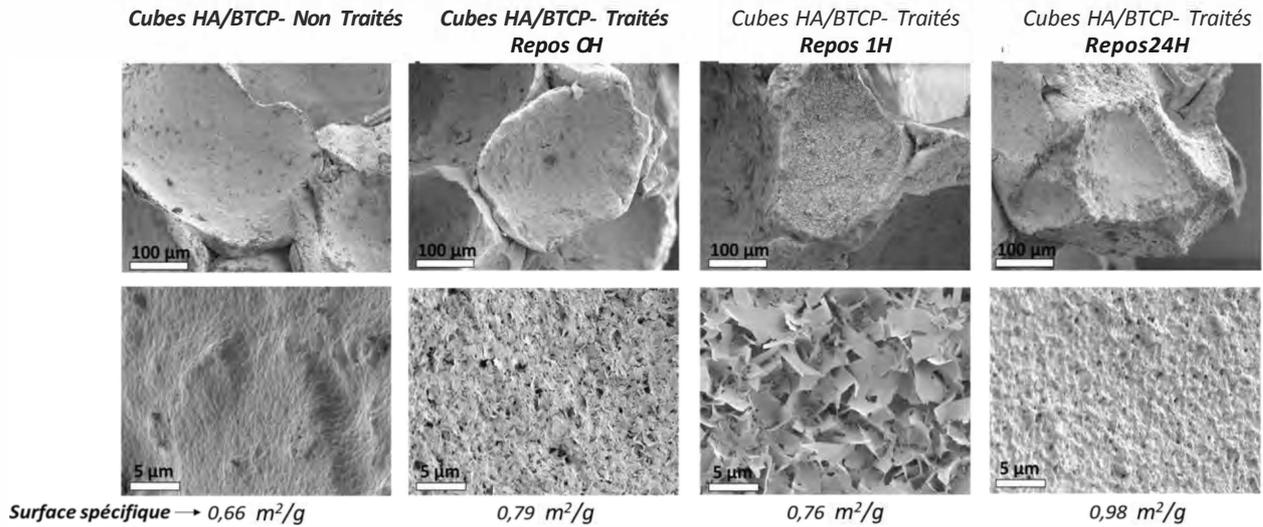


Figure 73 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substitut céramiques BCP Non Traités et Traités sans temps de repos ou avec 1h et 24H de repos

Sans aucun temps de repos, un reprecipité est déjà visible en surface des cubes (Figure 73). Il rappelle l'aspect d'un revêtement d'apatite nanocristalline obtenu par immersion dans une solution saturée de SBF ³¹⁶ (1.4.2.e). Après 1H de repos, de larges plaquettes se sont formées au-dessus de ce tapis. A 24H de repos, la surface spécifique est significativement plus grande et l'aspect observé au MEB est différent de celui des céramiques correspondant au protocole de référence. Les plaquettes ne sont plus présentes mais le revêtement proche de la céramique s'est densifié. Un tel revêtement augmente la surface spécifique.

Ici aussi les porogrammes (Figure 74) des substituts traités montrent des modifications. Sans temps de repos (OH), une gamme de pores n'est pas présente concernant la population à 1000-30000 nm.

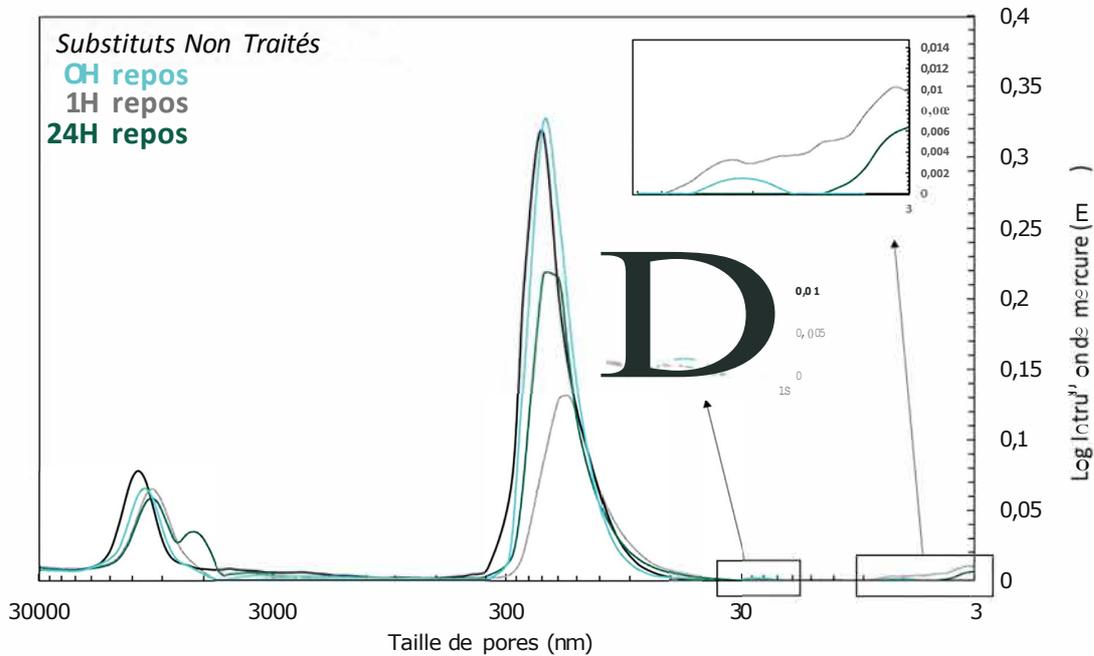


Figure 74 Porogrammes des substituts 13CP _Non Traités cl Traités avec des Temps de repos 0H, 1H cl 24H

En revanche la gamme inférieure de 10 à 1000 nm est peu modifiée autour de 200 nm. Des porosités à 24 nm sont en revanche créées ainsi que sur la gamme 3-10 nm. Des modifications sont aussi présentes sur le porogramme à 24H de repos. En plus d'un décalage de la gamme 1000-30000 nm, une nouvelle population de pores est visible autour de 6300 nm. Une réduction du diamètre des pores entre 10-1000nm peut également être notée ainsi que l'apparition de porosités de quelques nm, témoin du tapis nouvellement précipité.

Alors que les diamètres des pores sont peu modifiés sans temps de repos, ce temps semble influencer à la fois une précipitation de cristaux créant des porosités entre 3-10 nm ainsi qu'une réduction des deux autres gammes de pores. La densification du revêtement de précipité pourrait être à l'origine de ce remaniement.

Le revêtement sans temps de repos suggère qu'il y a un début de précipitation avant la phase de repos dans le milieu; que ce soit à l'intérieur du réacteur lorsqu'il est sous pression ou pendant la phase de décompression pour retour à la pression atmosphérique.

Cinq heures de repos supplémentaire permet la croissance des cristaux en forme de plaquettes cH)CP. Différents paramètres peuvent rentrer en ligne de compte pour la croissance de ces dernières, et notamment le gradient de pH pouvant exister entre la surface de la céramique et celle de la phase aqueuse. La quantité de Ca et P est également en permanente évolution et joue par conséquent sur la reprécipitation;³

Après 24H de repos, les plaquettes ont disparu et le tapis semble s'être densifié. Cela pourrait évoquer un principe de dissolution/reprécipitation⁹⁷ comme observé sur les poudres mûries d'HA/arnTCP dans la première partie de ce travail (:3.1.3.a). Il est possible que les phases précipitées évoluent dans le milieu aqueux revenu à un pH neutre. Les plaquettes cFOCP pourraient alors se hydrolyser en PCCA⁹ L nê

3.2.8 Influence de la durée de décompression

La vitesse de décompression correspond au temps fixé pour décompresser l'enceinte et ramener ainsi le système à pression atmosphérique. Pendant la phase de décompression du CO₂, le pH de l'environnement des céramiques, ainsi que la température sont modifiés. Il faut noter que le pH ne remonte de manière significative qu'à la toute fin de la décompression, lorsque la pression atteint les 25 bar²⁵⁹. Nous avons pu constater visuellement que des bulles se créent également dans la phase aqueuse à cette pression, laissant ainsi s'échapper le CO₂ du milieu aqueux.

Trois vitesses de décompression ont été choisies : 2min, 30min (temps utilisé dans le protocole de référence) et 24H.

La vitesse de décompression semble bien influencer l'aspect de la couche de reprécipité (Figure 75).

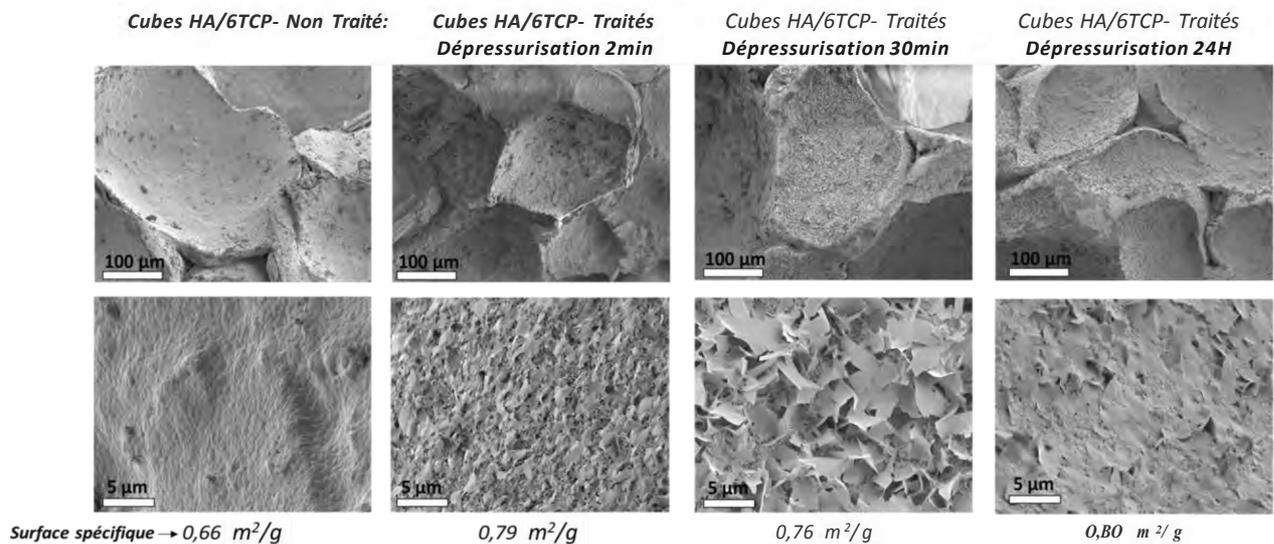


Figure 75 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substitut céramiques BCP Non Traités, et Traités avec un temps de décompression de 2min, 30min et 24H.

Bien qu'il soit présent dans les trois cas, l'aspect du revêtement formé est différent. Alors que le revêtement est composé d'un « tapis » régulier sur lequel quelques plaquettes commencent à apparaître pour la décompression en 2min, ces plaquettes sont bien plus développées après 30 min de décompression. Enfin pour la décompression très lente (24H), ces plaquettes semblent présentes mais couchées ou aplaties sur la surface. Pour ces derniers cubes de céramique, la surface spécifique est plus importante que dans le cas de la référence.

Ici aussi, les différentes populations de pores sont impactées par le traitement (Figure 76).

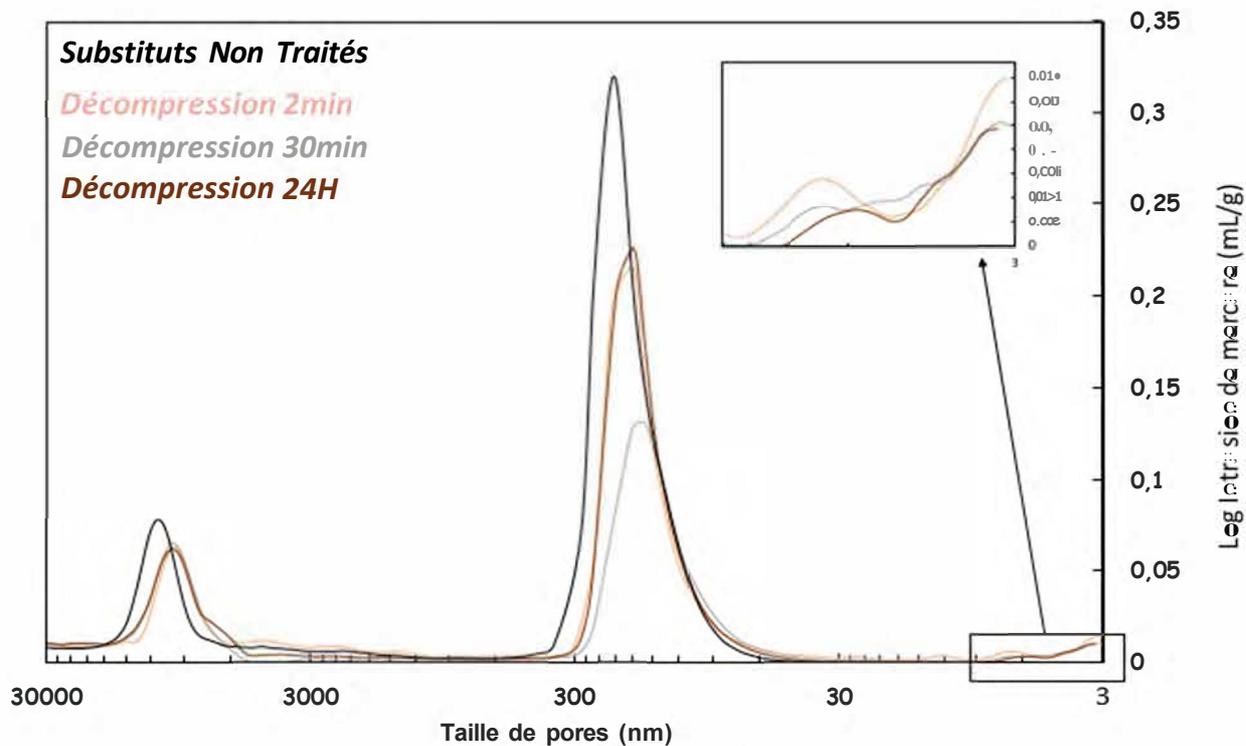


Figure 76 Porosimétrie des substituts RCP Non Traités, et Traités avec une durée de décompression de 2min, 30min et 24H ainsi que des substituts dépressurisés 2min mais ayant reposé dans le milieu 24H.

La zone 1000-30000nm est décalée à droite quel que soit le temps de dépressurisation. Concernant la population 10-1000nm, il y a non pas un décalage mais bien une diminution de la quantité de pores de dimensions centrées autour de 200nm. On peut aussi noter la diminution de cette population particulièrement importante pour les cubes ayant subi un traitement puis décomprimé pendant 30min (protocole de référence).

Comme indiqué précédemment, les revêtements observés sont impactés par le temps de décompression de la chambre. Ce temps influence le temps nécessaire pour retrouver un pH neutre et pourrait ainsi influencer le début de nucléation et donc de formation des cristaux a priori très dépendants de ce paramètre. Les essais précédents ont montré que même sans repos dans le milieu post-procédé, un revêtement s'était formé. La formation d'une nouvelle phase s'amorce donc avant le repos.

Le temps d'évolution dans le milieu a aussi été montré comme influant. Cependant, une évolution différente des revêtements selon la vitesse de décompression est visible. La remontée plus ou moins rapide du pH pourrait permettre la précipitation de différents CaP.

Si comme nous le supposons, la précipitation et surtout la croissance des cristaux commencent lors de la phase de décompression, une décompression rapide, avec une remontée en pH par conséquent plus rapide, conduirait à une phase de nucléation très courte de CaP à pH acide. Un temps de décompression plus long laissera plus de temps aux cristaux pour se former, le pH évoluant plus lentement, cela pourrait influencer la nature de la phase phosphocalcique précipitant, notamment via des concentrations de Ca et P différentes à des pH similaires et des temps d'évolution plus long pour les cristaux.

3.2.9 Influence du vide post-procédé

Une des observations faites sur les échantillons traités avec le protocole de référence était que le revêtement était observable sur la surface des pores extérieurs mais pas à l'intérieur du substitut.

La première hypothèse émise est que, lors de la décompression et donc du dégazage de la solution, des bulles de CO₂ se forment dans le réseau poreux empêchant la précipitation dans les pores internes.

Une seconde hypothèse émise expliquant le manque de précipité à l'intérieur des cubes est que, en supposant l'invasion d'eau jusqu'au cœur des cubes de céramique, la dissolution partielle des surfaces internes conduit à une augmentation locale du pH qui reste stable en raison d'un certain confinement de la solution et des phénomènes réduits de diffusion à l'intérieur du matériau pouvant être dus à la tortuosité du réseau poreux.

Afin d'évaluer la véracité de ces hypothèses, un essai a été mené en plaçant les cubes sous vide après la phase de dégazage et avant l'heure de repos. L'objectif étant de favoriser le renouvellement de la solution piégée dans le réseau poreux.

Le temps sous vide a été minimisé afin d'éviter une décarbonatation du milieu aqueux post procédé.

Les images MEB (Figure 77) obtenues sur les cubes mis sous vide en post-procédé montrent une amorce de précipité sur certains grains.

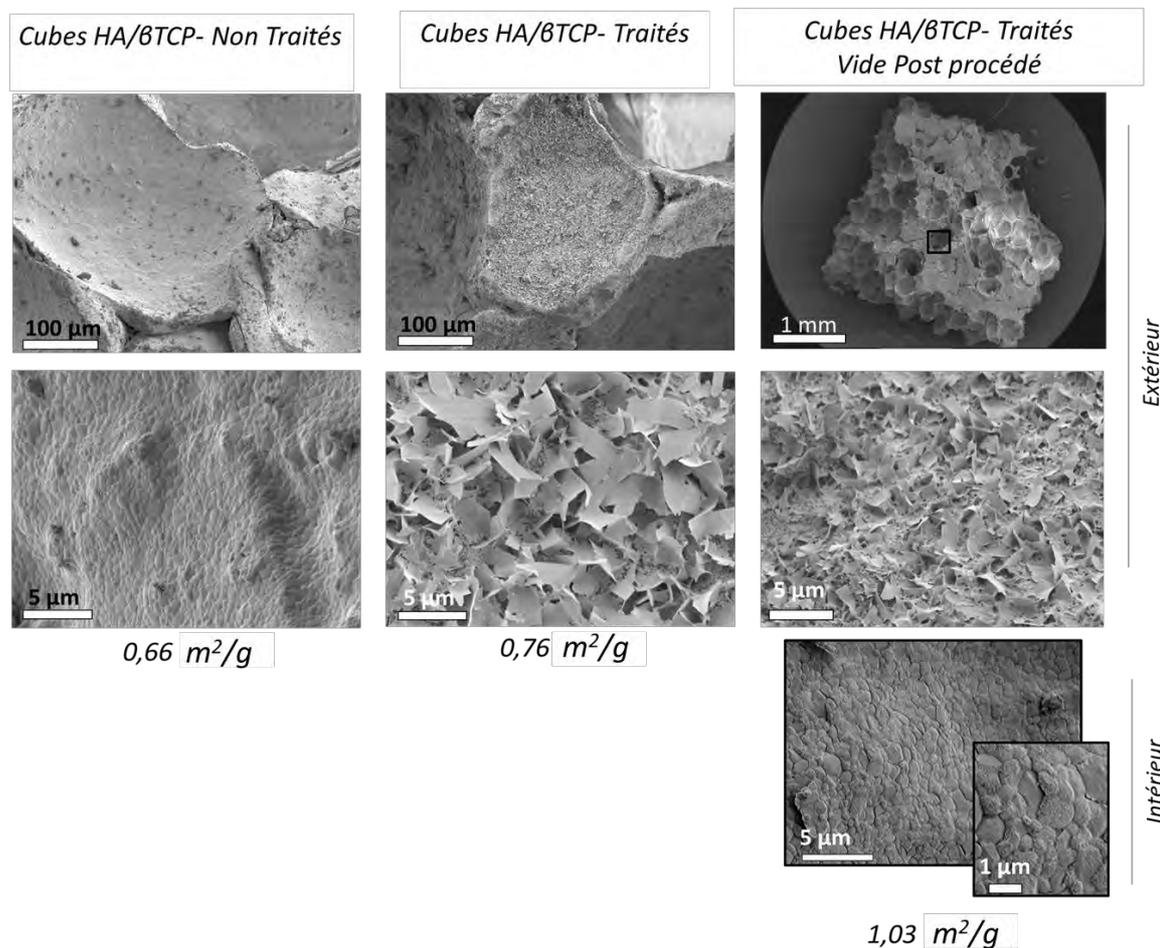
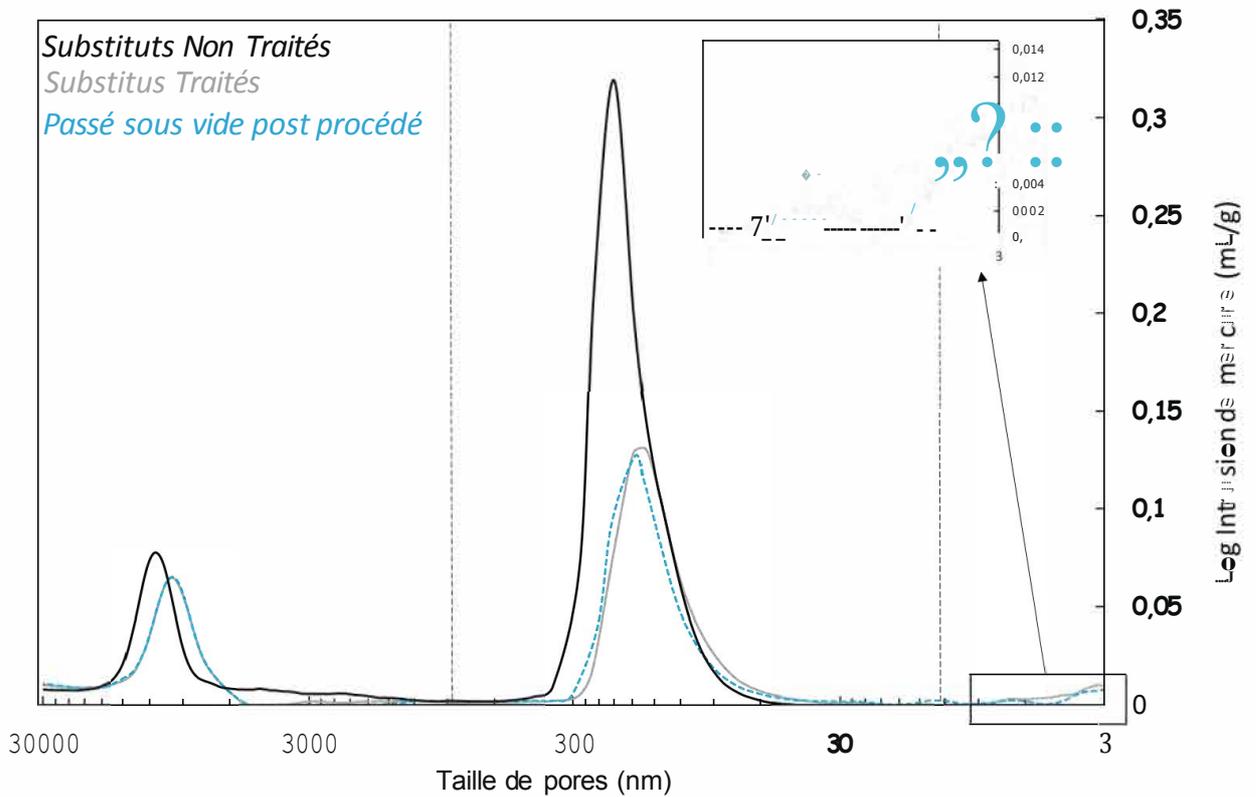


Figure 77 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substitut céramique BCP Non Traités, et Traités avec le protocole de référence puis passés sous-vide.

Cela pourrait s'apparenter à un début de nucléation de phase phosphocalcique menant aux revêtements visibles obtenus sur les surfaces des pores extérieurs. Certains grains seulement sont recouverts par ces petites aspérités. Il est probable que ce soit de manière préférentielle les grains d'HA, moins solubles que le β TCP. Plus stables, ils offriraient une surface plus propice à la précipitation.

L'aspect des plaquettes recouvrant les pores extérieurs est légèrement modifié lorsque l'échantillon a été mis sous vide. Cela pourrait provenir de l'agitation du milieu lors de la mise sous-vide, ayant pour conséquence de « brasser » et ainsi déstabiliser le milieu.

Des mesures de porosimétrie à Mercure ont ici aussi permis d'observer la distribution des tailles de pores (Figure 78).



D'igure 78 Porogrammes des substituents Non Traités et Traités avec le protocole de référence et passés sous vide post procédé.

Les analyses réalisées ne montrent pas de différences significatives liées à la l'étape supplémentaire de mise sous vide post-procédé à l'exception de l'apparition d'une population de pores supplémentaire autour des 10nm.

Ces résultats confirment l'hypothèse que le renouvellement de la solution contenue dans le réseau poreux du cube permet la pénétration des ions nécessaires à la formation du revêtement interne. Il faut noter que malgré la faible quantité de phase nouvelle formée en interne, l'augmentation de la surface recouverte ainsi que l'apparition de la porosité supplémentaire engendre une augmentation de la surface spécifique.

3.2.10 Influence de la nature du milieu (eau/SBF)

Basé sur le fait que les modifications de surface sont induites par des phénomènes de dissolution-reprécipitation qui dépendent à la fois du pH et de la présence en quantité suffisante d'espèces ioniques, l'influence de la nature du milieu environnant sur les modifications du matériau a été étudiée. A noter que dans ses travaux, F. Barrere avait réalisé une étude quasi-similaire en utilisant une solution saturée de SBF dont le pH était contrôlé via du CO₂. Dans son étude, le SBF utilisé possédait une concentration nettement supérieure à la concentration de référence (x5) rendant la solution très instable. Le CO₂ était alors utilisé pour stabiliser la solution en réduisant le pH et en éloignant ainsi le système de son état métastable. La précipitation de nanoparticules biomimétiques à la surface de l'objet immergé était alors assurée en repositionnant progressivement le système dans son état métastable. En effet, la diminution progressive de la quantité de CO₂ dissout dans la solution saturée *via* un dégazage, fait augmenter le pH jusqu'à placer le système dans un état permettant d'amorcer la précipitation.

Dans les essais que nous avons souhaité mener, une solution légèrement sous saturée de SBF a été utilisée à la place du simple milieu aqueux habituel : SBF*0,9. Les paramètres du protocole de référence ont été appliqués.

Les céramiques BCP traitées en présence de SBF semblent partiellement dissoutes et recouvertes d'un début de revêtement, typique des revêtements obtenus par immersion dans une solution saturée (Figure 79).

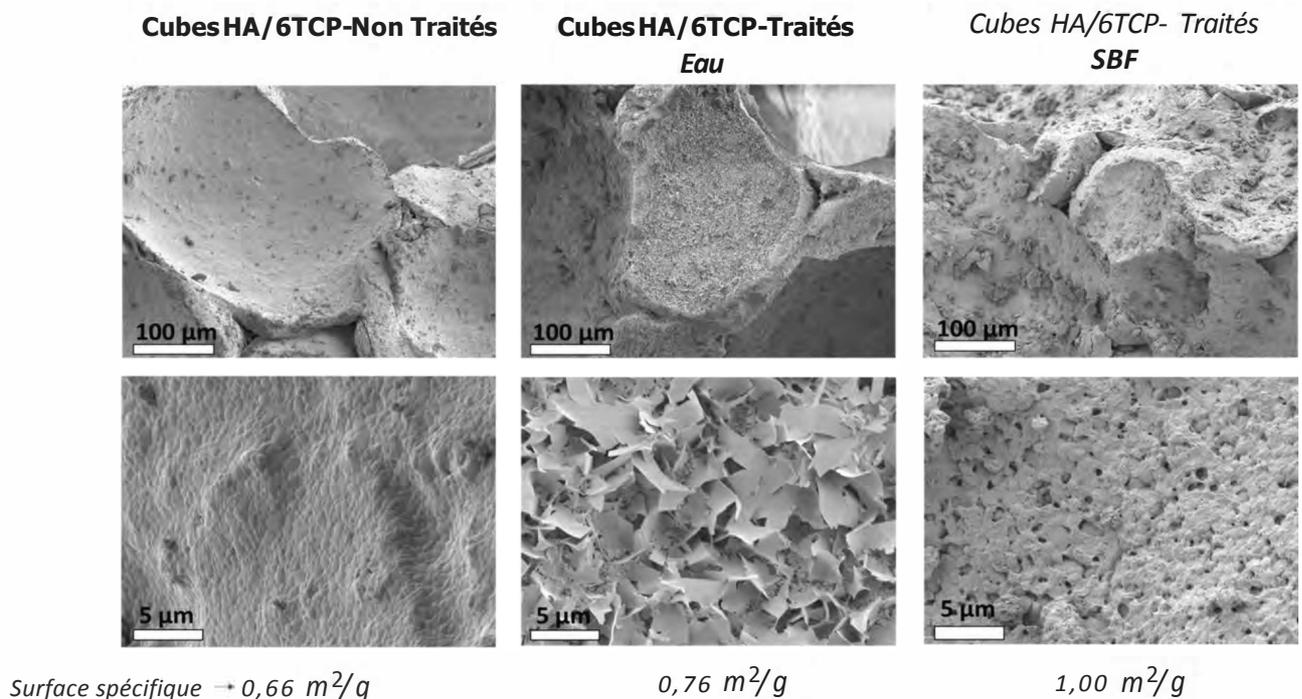


Figure 79 Images MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substituts Non Traités, et Traités avec le protocole de référence en Eau ou SBF

La dissolution est visible sous le précipité. Ce dernier est présent en quantité moins importante et semble de morphologie différente de celui obtenu lorsque le traitement est effectué dans l'eau. Malgré cela, la surface spécifique est supérieure à celle mesurée sur les cubes de céramiques BCP traités dans l'eau. Cette différence est liée à la quantité mais surtout aux caractéristiques des phases déposées, notamment à leur surface spécifique (liée à la taille et à la morphologie des cristaux déposés). Ainsi, les revêtements obtenus dans le SBF sont constitués de nanoparticules nettement plus petites et de surface spécifique supérieure à celles qui constituent le revêtement obtenu dans l'eau.

Les analyses de porosité réalisées sur les cubes de céramiques BCP traités dans le SBF montrent un décalage moins important de la population se trouvant entre 1000-30000nm comparé aux céramiques traitées avec le protocole de référence (Figure 80)

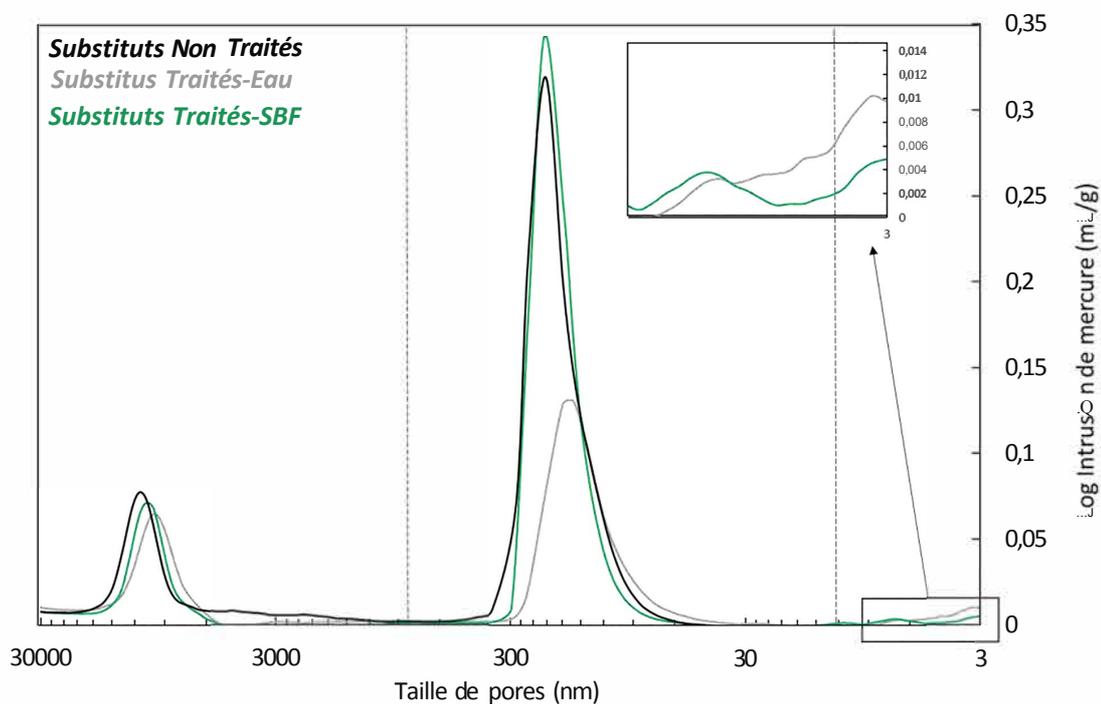


Figure 80 Porogrammes des substituts Non Traités, Traités avec protocole de référence dans l'eau et le SBF

De plus, la quantité de nanoporosités comprises dans la zone 3-100nm est moins importante que celle obtenue lorsque le traitement est effectué dans l'eau. Le décalage moindre des populations de pores à 1000-30000 et 10-1000nm pourrait s'expliquer d'une part par une quantité moins importante de cristaux déposés mais surtout par leur taille nanométrique qui n'engendre pas de réduction du canal poreux.

D'autre part, le SBF permettant de mettre une quantité plus importante de calcium et de phosphate en présence de la céramique lors du procédé et d'atteindre plus rapidement la saturation, il était attendu qu'une quantité de précipité plus importante se forme. Or le revêtement est ici moins couvrant.

Il est possible que de trop nombreuses espèces ioniques viennent perturber à la fois la dissolution surfacique de la céramique et la précipitation des nouvelles phases. Il a en effet été montré lors d'essais de précipitation phosphocalcique sur du titane grâce à du SBF sursaturé que la force ionique ralentit la cinétique de précipitation des phosphates de calcium en diminuant notamment le nombre de site de nucléation⁰⁰. Or le SBF, bien que dilué, est un mélange riche en espèces ioniques (2.2.10). D'autre part, le pH est un élément clé qui influence la précipitation de phases phosphocalciques. Ce dernier est conditionné par la quantité de CO₂ dissout dans le milieu. Or cette quantité évolue différemment lors de la décompression selon la valeur de la force ionique de la solution. La vitesse de dégazage du milieu, commençant pendant la décompression et continuant durant une heure de repos, étant plus lente dans ce cas, la nucléation doit l'être également. La solubilité du CO₂ dans ce type de milieu pourrait également être modifiée et leur pH à saturation serait alors moins acide, mais cela ne peut pas être vérifié expérimentalement.

Parallèlement aux paramètres cités précédemment, qui modifient la cinétique et le taux de reprécipitation, il est important de considérer le fait que la solution saturée traitée au CO₂ haute pression engendre une précipitation au sein de l'ensemble de la solution de nanoparticules au sein de l'ensemble de la solution elle-même, les bulles formées au cours du dégazage agissant comme germes capables de favoriser la précipitation. Ainsi, le matériau n'est plus la seule surface disponible pour servir de support de précipitation/germination et la précipitation au sein de la solution engendre une diminution rapide de la concentration en calcium et phosphate globale entravant ainsi la formation d'un revêtement important en surface des cubes de céramique. Encore une fois, il ne s'agit ici que d'hypothèses difficilement vérifiables.

Conclusion :

L'étude de l'influence des paramètres de procédé sur le revêtement a permis de préciser quelques éléments concernant les mécanismes mis en œuvre lors de ce traitement, mais aussi de mettre en évidence certains paramètres critiques. Cependant, ce ne sont souvent que des hypothèses qui peuvent être formulées car, compte tenu des difficultés expérimentales liées à l'utilisation de CO₂ sous pression, les caractérisations à chaque étape du procédé n'ont pas été possibles.

Concernant les mécanismes mis en jeu dans le procédé de manière générale, les expériences menées ici ont permis d'affiner les hypothèses sur les mécanismes de dissolution précipitation. Grâce à l'étude sur les différents temps de repos, il a été montré qu'à la sortie du réacteur, suite au dégazage et avant l'heure de repos, un revêtement était déjà présent. Il y a donc une nucléation avant l'heure de repos.

De manière générale, quelques conclusions peuvent être dressées concernant l'influence de chaque paramètre sur la présence et l'homogénéité du revêtement.

Des températures basses, semblent favoriser la dissolution, les Ca/P ayant une solubilité inversement proportionnelle à ce paramètre. De plus, l'augmentation de la dissolution de surface engendre une augmentation locale de la concentration en espèces susceptibles de précipiter et favorise ainsi la formation d'un revêtement.

La pression pourrait principalement influencer la quantité de CO₂ dans l'espace confiné du réacteur. La quantité de CO₂ dissoute dans l'eau ainsi que la solubilité des espèces augmente assez peu avec l'augmentation de pression entre 60 et 100 bar, ce qui influe assez peu sur le pH de la solution initiale. Ce paramètre semble cependant avoir un impact important sur le revêtement formé.

Le temps de traitement a lui aussi montré son influence. Les temps plus longs pourraient permettre une dissolution plus importante et ainsi modifier le Ca/P disponible pour la précipitation des nouvelles phases mais aussi potentiellement permettre une précipitation plus tôt dans le procédé et un temps de maturation par conséquent plus long.

Le rapport L/S a montré l'importance de la quantité de liquide utilisée pour effectuer le traitement. Si elle est trop importante, la dissolution a bien lieu mais la concentration en espèces susceptibles de précipiter n'est pas suffisante pour permettre une précipitation. Ainsi une quantité d'eau minimale doit être utilisée pour aboutir à la saturation à la surface du matériau et à la formation d'un revêtement.

L'influence du temps de repos a elle aussi été mise en évidence. Malgré un temps de repos nul, un précipité est présent. En revanche, en faisant varier le temps de repos, nous avons constaté son évolution avec le temps. De larges plaquettes similaires à l'OCP semblent d'abord grandir puis évoluer en ce qui pourrait être une PCCA. Cette évolution est à rapprocher de celles observées sur les *Poudres Surface* obtenues après modification de la poudre HA/amTCP (3.1.3). Ce paramètre permet donc de laisser ou non évoluer les phases en présence et ainsi moduler leur évolution.

La vitesse de dépressurisation aurait elle aussi de l'influence dans le sens où elle régule la vitesse de remontée du pH. Ainsi, la vitesse de changement de pH étant différente, les phénomènes précipitations pourraient l'être également. Enfin, le passage sous vide post procédé à lui permis l'amorce d'une précipitation dans les porosités les plus à cœur des substituts.

L'utilisation de RMN du solide « en routine » pourrait permettre l'identification des phases précipitées de manière plus systématique et ainsi permettre d'affiner la réflexion quant aux mécanismes mis en jeu. Des mesures de tomographie aux rayons X pourraient, elles, permettre de visualiser le gradient d'intrusion du précipité dans le réseau poreux.

Le procédé CO₂ haute pression développé a donc en effet permis une modification de la surface des cubes de céramiques poreux HA/ β TCP. La précipitation de nanocristaux biomimétiques, précurseur de la phase apatitique ou directement sous forme apatitique, sur les céramiques pourrait être d'intérêt à plusieurs niveaux :

- La formation de nanocristaux biomimétiques de composition similaire à la phase minérale de l'os devrait permettre de favoriser l'attraction des cellules osseuses et la précipitation d'os néoformés composés des espèces présentes dans le revêtement ² .
- La création de porosités de l'ordre de quelques nanomètres permettrait d'améliorer l'adhésion et la prolifération cellulaire d'une part en favorisant l'absorption de protéines et nutriments et en servant de réservoir et d'autre part en améliorant la mouillabilité des cubes favorisant ainsi la pénétration des fluides biologiques ³¹⁷ .

Les premiers essais en présence de SBF ont permis d'aborder la modification de substituts en présence d'autres espèces. La suite du travail de thèse a consisté à inclure différentes espèces ioniques, choisies pour leurs propriétés biologiques, dans le milieu aqueux sous CO₂ haute pression, afin d'intégrer ces espèces aux céramiques, tout en modifiant ces dernières comme décrit dans cette Partie 3.

Partie 4 : Elaboration de céramiques dopées

Dans cette partie sont décrits les résultats obtenus avec les céramiques sous différentes formes (sous forme de poudre et sous forme de cubes) traitées avec le procédé CO₂ haute pression dans des solutions riches en cations bioactifs. Quatre éléments dopants ont été choisis pour leurs propriétés : l'argent et le cuivre pour leurs propriétés antibactériennes, le zinc pour son activité anti-inflammatoire et le strontium pour ses propriétés stimulantes sur la régénération osseuse.

Pour chaque agent dopant deux études différentes ont été menées. La première, similaire à celle réalisée sur les poudres non dopées et présentée dans la Partie précédente a été effectuée à partir de poudres non traitées thermiquement (HA/amTCP, 65/35). Comme décrit dans le protocole (2.2.1.b), l'espèce active est intégrée sous forme d'acétate métallique dans le milieu aqueux utilisé pour le traitement. Trois concentrations d'acétate métallique, identiques pour chaque espèce, ont été choisies. Elles seront désignées dans ce manuscrit *Maximum*, *Intermédiaire* et *Minimum*. Contrairement à l'étude menée précédemment concernant la modification de poudres de céramiques simples *via* le procédé CO₂, la quantité trop faible de poudre surface récupérée n'a pas permis sa caractérisation. Les deux poudres (poudre surface et poudre fond) ont été séchées ensemble et caractérisées dans leur globalité par DRX, FTIR, RAMAN, et MEB. La mise en œuvre de ces méthodes de caractérisation a permis d'étudier l'apparition éventuelle de nouvelles phases propres aux éléments dopants introduits mais aussi l'apparition de nouvelles phases de phosphates de calcium. L'effet de la concentration initiale en espèce active dans le milieu a également pu être évalué.

Dans un deuxième temps, le dopage a été réalisé sur les cubes commerciaux Ceraform® (HA/βTCP, 65/35). Une fois dopés grâce au protocole précédemment décrit, les cubes ont subi différents types d'analyses : des analyses MEB, BET et de porosimétrie à mercure ont été réalisées afin d'évaluer les modifications de surface induites par le procédé. L'ICP-AES a été utilisée afin de déterminer la quantité d'ions actifs déposée ou incluse à la surface des cubes. Cette technique a également permis d'étudier la cinétique de libération des ions bioactifs introduits au cours du traitement. Ces dernières analyses ont été effectuées dans un milieu similaire au plasma humain dilué (SBF*0,9).

Enfin, afin d'aller plus loin dans la démarche de développement de ces matériaux pour le vivant, des tests antibactériens ont été réalisés ainsi que des tests d'activité et de viabilité cellulaire.

Chacun des quatre éléments utilisés pour le dopage (Zn, Ag, Cu et Sr) fait l'objet d'un paragraphe indépendant regroupant les résultats obtenus à la fois sur la poudre puis sur les cubes poreux.

4.1 Zinc

Le zinc a été choisi principalement pour ses propriétés anti-inflammatoires³¹⁸. Il est également l'un des éléments métalliques les moins toxiques pour le corps humain. Comme d'écrit dans la Partie 1, de nombreuses études ont déjà été menées sur son intégration à différents phosphates de calcium *via* plusieurs techniques pendant ou post-synthèse^{188,105,319-321}.

Ici une solution d'acétate de zinc a été utilisée en tant que milieu réactionnel dans le procédé C02 haute pression précédemment développé. Trois concentrations différentes d'acétate de zinc ont été utilisées tout au long de l'étude. Elles seront nommées : *Zinc Minimum*, *Zinc Intermédiaire* et *Zinc Maximum* (Tableau 7, 2.2.1.b).

Au regard des travaux présentés dans la Partie précédente, mais aussi de la littérature concernant la dissolution et la synthèse des phosphates de calcium, le pH est un facteur clé du procédé. Des simulations de pH ont donc été réalisées sur les milieux utilisés dans cette étude. Le logiciel de simulation PHREEQC a ici permis d'établir les pH des solutions d'acétate de zinc une fois saturées en C02 (Tableau 13). A noter que les pH ont été calculés sans tenir compte de la présence de céramiques dans le milieu.

Tableau 13 pH des solutions d'acétate de zinc dans l'eau à pression atmosphérique et saturée en C02.

Concentration en acetate (g/L)	pH de la solution initiale mesuré	pH de la solution saturée en CO ₂ simulé*
Eau	6,80	3,10
Zinc Minimum	6,30	3,60
Zinc Intermédiaire	6,40	3,83
Zinc Maximum	6,50	4,05

*simulations réalisées à partir d'eau à pH 7

Les résultats montrent que plus la concentration en acétate de zinc est importante dans le milieu, moins le pH est acide, et il est plus élevé que celui de l'eau saturée en C02. Ainsi, dans le cadre de notre procédé, en tenant uniquement compte des modifications de pH engendrées par l'ajout d'acétate de zinc, il est possible d'envisager un ralentissement des phénomènes de dissolution lorsque la concentration en ions dopants est importante. A noter que ces données restent à titre indicatif, les valeurs de pH local impactant les céramiques pendant les différentes étapes du traitement étant très différentes et variables en raison des processus de dissolution/précipitation qui s'y déroulent.

Dans un premier temps et afin de pouvoir identifier les éventuelles nouvelles phases en présence, un mélange de poudre (HA/amTCP, 65/35 % en masse) a été traité en utilisant

le protocole de référence et en présence d'acétate de zinc. Une fois traitées, les poudres ont été caractérisées en utilisant les méthodes classiques utilisées dans les Parties précédentes : MEB, DRX, FTIR.

4.1.1 Poudres

Lors des essais réalisés sur les poudres biphasiques de CaP dopées avec le zinc, comme sur les essais réalisés sur les poudres traitées dans l'eau, la présence d'une nouvelle phase déposée à la surface de la solution (*Poudre Surface*) a pu être constatée. Cette phase était d'autant plus visible que la quantité d'acétate de zinc était faible dans la solution de traitement, cela confirme l'effet inhibiteur du zinc sur les phénomènes de précipitation^{3 20,3 22}. Malheureusement, quelle que soit la concentration utilisée, la quantité trop faible de *Poudre Surface* n'a pas permis son prélèvement et sa caractérisation. Le peu de phase en surface a donc été conservée dans la solution au cours du séchage et mélangée à la *Poudre Fond*, en fin de séchage. Ainsi dans cette partie du travail, les analyses effectuées sur le mélange de poudres (poudre fond + une petite quantité de poudre surface) sont présentées.

Dans un premier temps, une analyse DRX a permis d'identifier les phases en présence en fonction de la concentration de la solution de traitement en zinc (Figure 81).

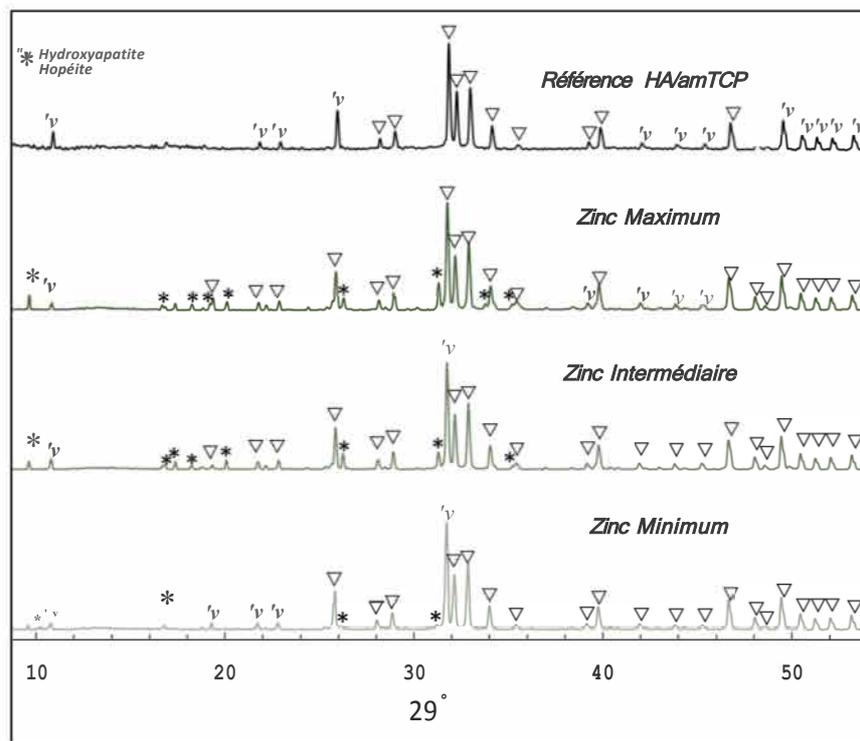


Figure 81 DRX Référence HA/amTCP, Zinc Maximum, Zinc Intermédiaire, Zinc Minimum

Les poudres modifiées correspondent toutes à un mélange d'hydroxyapatite et d'une nouvelle phase. Ce nouveau composé a été identifié comme étant de l'hopéite, un

phosphate de zinc hydraté ($Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$, JCPDS 00-033-1474). Bien que la quantification par DRX n'ait pas été effectuée, il semble néanmoins que plus la concentration initiale en acétate de zinc dans la solution est importante plus la quantité d'hopéite dans le mélange de poudre final est élevée. Cela est particulièrement visible sur le pic (2 4 1) à $31,3 2\theta^\circ$. Sa présence pourrait être, entre autre accrue du fait du pH moins acide et de la concentration plus importante en zinc de la solution de traitement. On peut noter que durant le traitement, le milieu aqueux est acide et riche en zinc ainsi qu'en phosphate grâce à la dissolution de la poudre initiale. Or ce seraient des conditions idéales pour la précipitation de cette phase d'hopéite généralement précipitée à des température autour de $40-50^\circ C$ et pH 5,8 ³²³.

Des analyses FTIR sont venues compléter les précédentes analyses afin d'identifier au mieux les phases en présence.

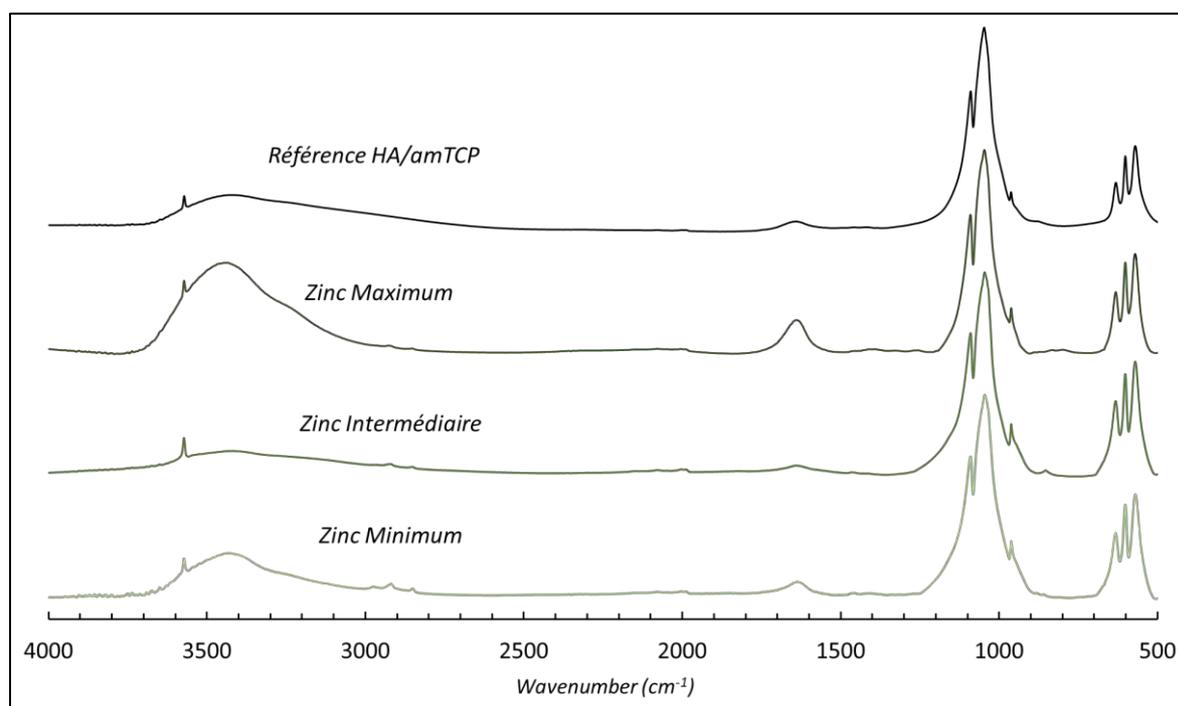


Figure 82 Spectroscopie FTIR des poudres de référence et Traitées en présence d'acétate de zinc aux 3 concentrations Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum

Les analyses FTIR des poudres traitées présentées sur la Figure 82 ne montrent pas de différences significatives. Les bandes caractéristiques de l'hopéite sont : $-OH$ à $3542, 3473, 3338$ et $3149 cm^{-1}$; $\nu_3 PO_4$ à $1137, 1096, 1059, 1019$ et $995 cm^{-1}$; $\nu_1 PO_4$ à $945, 922 cm^{-1}$. Ces bandes sont donc confondues avec celles de l'hydroxyapatite déjà détaillées dans la Partie précédente (3.1.1). Néanmoins, il est possible de noter un élargissement des bandes phosphates ainsi qu'une légère diminution de la bande correspondant aux PO_4 (autour de $962 cm^{-1}$) en rapport avec la concentration en zinc utilisée dans la solution.

Les poudres ont ensuite été observées au MEB afin d'identifier d'éventuelles modifications de surface liées au traitement effectué en présence de zinc (Figure 83).

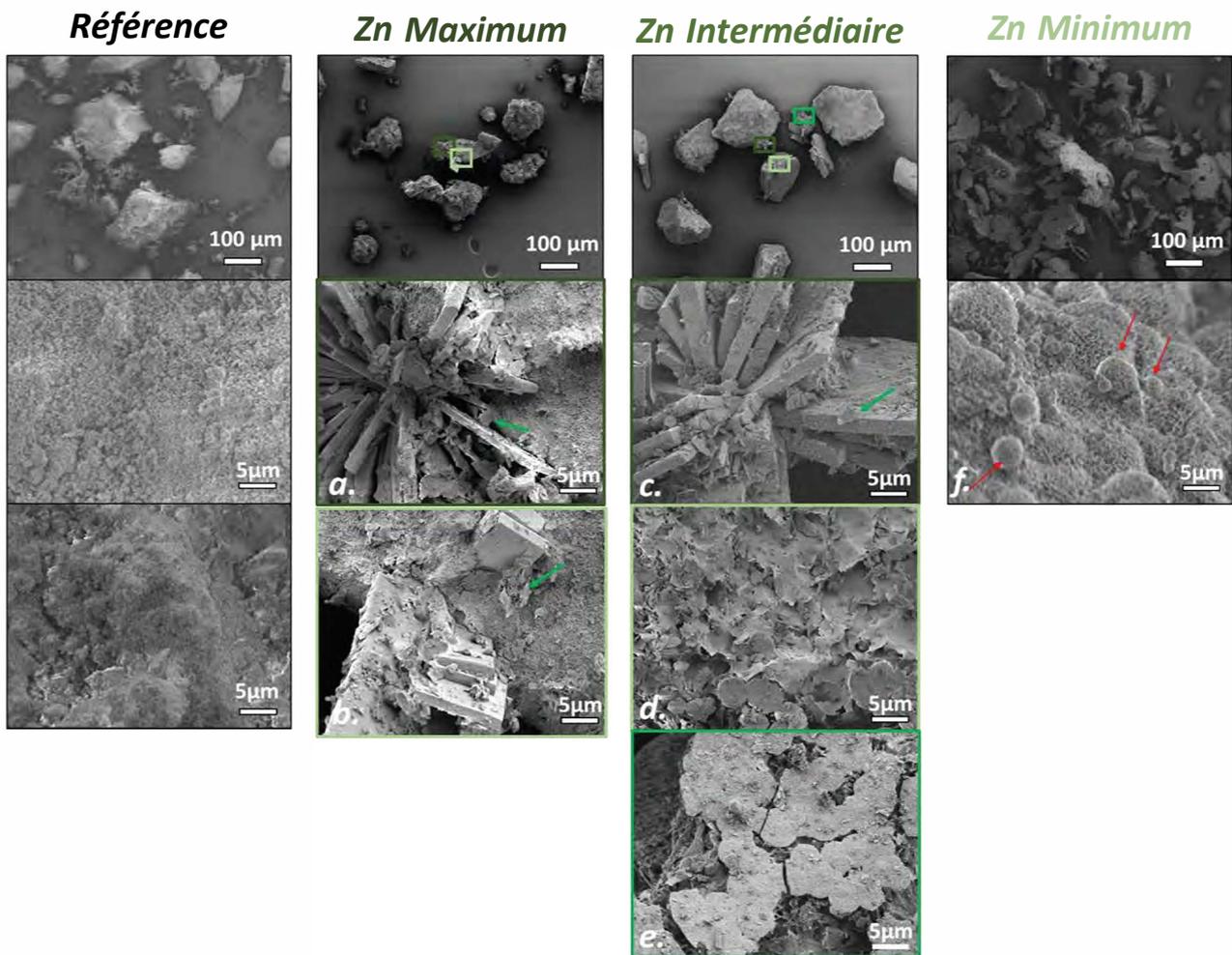


Figure 83 MEB Poudres Référence, dopées avec Zinc (Maximum, Intermédiaire et Minimum)

Les images des poudres traitées avec les solutions de Zinc Intermédiaire et Zinc Maximum montrent clairement l'apparition d'une nouvelle phase sous forme de larges plaques épaisses parallélépipédiques plus ou moins organisées (a., b., c. Figure 83). Ces morphologies plaquettaires n'ont jamais été observées auparavant dans ce travail et pourraient correspondre à l'hopéite identifiée en DRX.

De plus petits feuillettes de quelques nanomètres semblent précipités à la fois sur une partie des grains (d. Figure 83) et sur les parallélépipèdes, indiqués par des flèches vertes sur les images a., b., c. de la Figure 83. De plus, de rares plaques semblent provenir de la *Poudre Surface*: sont visibles sur les deux poudres comme illustré par l'image e. Figure 83.

La poudre obtenue avec la concentration Zinc Minimum (Figure 83) est très modifiée. Bien que quelques grains de taille importante soient encore visibles, une partie de la poudre est composée de plaques similaires à celles observées lors de la modification des poudres sans espèces ioniques et alors appelée *Poudre Surface* (3.1.3). Sur la surface

rugueuse de la plaque, de petites sphères de quelque micromètre de diamètre sont visibles, indiquées sur l'image c. de la Figure 83 par des flèches rouges.

Afin de mieux visualiser la répartition du zinc à la surface des poudres modifiées, des cartographies EDX ont été réalisées (Figure 84).

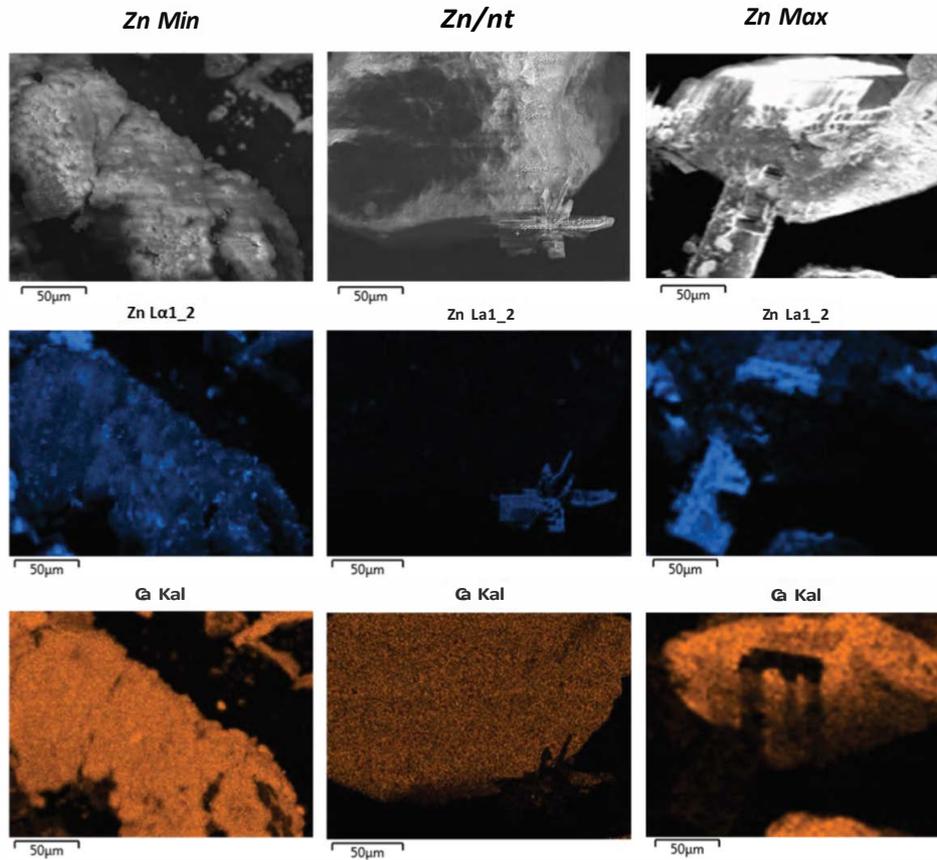


Figure 84 EDX des poudres modifiées Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum

Ces cartographies EDX permettent de confirmer la présence de zinc dans les formes parallélépipèdes des poudres correspondant aux concentrations *Maximum* et *Intermédiaire*. En revanche, les cristaux semblent exempts de calcium, cela pourrait confirmer le fait qu'il s'agisse de l'hopéite.

Les larges plaques évoquant la *Poudre Surface* sur le *Zinc Minimum* contiennent elles aussi du zinc. Les structures sphériques se dégagent également et seraient plus riches en zinc.

Les analyses DRX et FTIR ont permis de donner des informations générales sur les poudres. Les observations MEB et EDX ont montré différents cristaux contenant plus ou moins de zinc. Afin de d'identifier la nature des cristaux observés au MEB, une série de mesures RAL\IAK couplées à un microscope optique a été menée (Figure 85). Cette technique permet de cibler les différentes morphologies identifiées au MEB comme étant

issus plutôt de la *Poudre Fond* ou de la *Poudre Surface* bien que ces dernières soient mélangées.

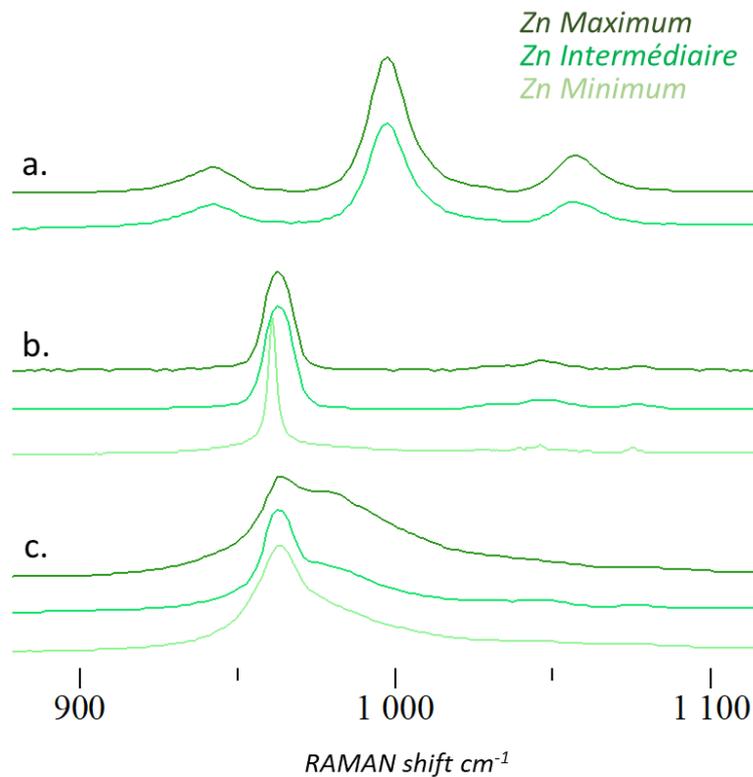


Figure 85 Spectroscopie RAMAN des poudres modifiées Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum sur a. les parallélépipèdes, b. les grains, c. Précipités identifiés comme pouvant être des Poudres Surface

Les spectres RAMAN réalisés sur les formes parallélépipédiques présentes pour *Zinc Maximum* et *Intermédiaire* ont permis de confirmer la présence d'hopéite grâce aux bandes $\nu_1 \text{PO}_4$ à 940 cm^{-1} et $\nu_3 \text{PO}_4$ à $1150, 1059, 1000$ et 995 cm^{-1} ³²⁴ (a. Figure 85). Ces spectres permettent d'affirmer avec certitude que les particules de morphologie parallélépipédique correspondent bien à la phase hopéite.

D'autre part, les trois spectres acquis sur les larges grains sur lesquels a nucléé l'hopéite (b. Figure 85) valident la présence d'une HA bien cristallisée notamment grâce à la bande principale 961 cm^{-1} des $\nu_1 \text{PO}_4$, le décalage de 1 cm^{-1} sur le *Minimum* n'étant pas significatif. La synthèse d'une HA bien cristallisée n'étant pas possible dans les conditions mises en œuvre dans le procédé, elle correspond à l'HA initiale non dissoute. Cependant les spectres obtenus sur le *Maximum* et l'*Intermédiaire* voient leur pic principal élargi. Cela pourrait être le témoin d'une phase apatitique moins bien cristallisée précipitée à la surface des grains. Cela est à relier avec l'observation de feuillets de quelques nanomètres sur les grains d'HA comme indiqué par les flèches vertes sur les images a., b., c. ainsi que sur l'image d. Figure 83.

Les plaques provenant *a priori* de la poudre précipitée en surface (*Poudre Surface*) ont également été observées et analysées (e., f. Figure 83). Ces plaques étant à proximité ou

déposées sur les grains non dissouts, les spectres RAMAN font apparaitre principalement de l'HA bien cristallisée attribuable à la poudre de départ non dissoute ainsi qu'une phase apatitique mal cristallisée mise en évidence par l'élargissement de la bande à 961 cm^{-1} . D'autres phases sont visibles et directement liées à la composition des plaques issues de la précipitation en surface. Ainsi, la bande à 980 cm^{-1} ne correspond à aucun CaP connu et pourrait correspondre à une phase de CaP dopée en zinc. Son intensité augmente d'ailleurs avec la quantité de zinc introduite dans la solution de traitement. De plus, la présence d'une bande à 950 cm^{-1} caractérise la présence d'une phase amorphe. Son intensité croit en rapport avec la concentration en zinc confirmant le caractère inhibiteur de celui-ci sur les phénomènes de cristallisation^{20,25}. Les phases précipitées en surface seraient donc un mélange d'apatite mal cristallisée, d'une phase amorphe et d'une phase phosphatée non identifiée riche en zinc.

Conclusion :

Ainsi, le traitement des poudres de CaP en présence de zinc a permis de montrer des différences significatives par rapport aux poudres simplement traitées dans l'eau.

Il est important de rappeler que comparativement aux expériences menées dans l'eau, les cinétiques de variation de pH pourraient ici être modifiées de par la présence d'acétate dans le milieu. Ce dernier pourrait influencer le temps de saturation du milieu. Il a de plus été montré que la solubilité du CO₂ s'en trouvait modifiée et par conséquent le pH à saturation et ce d'autant plus que la concentration en zinc est importante.

Les résultats présentés ici ont permis de montrer que l'augmentation de la concentration en zinc dans la solution de traitement induit une augmentation de la quantité d'hopéite précipitée sur les grains et une diminution de la quantité de poudre surface formée. Cette dernière, bien qu'en quantité moindre sera plus riche en phase amorphe et en phase CaP non identifiée riche en zinc.

Dans le cadre de la régénération osseuse, l'hopéite pourrait être un phosphate d'intérêt. En effet, des recherches ont récemment été menées montrant sa biocompatibilité et potentiellement son effet stimulant sur la régénération osseuse^{326, 28}.

4.1.2 Cubes de céramiques

Suite à l'étude précédente réalisée sur les poudres qui a permis la caractérisation des phases en présence et de mettre en avant l'influence de la concentration initiale en acétate de zinc dans le procédé, des cubes de céramiques ont été modifiés grâce au protocole préalablement utilisé dans la première partie de ce travail (2.2.1.b). Les concentrations en acétate de zinc et nommées *Zinc Maximum*, *Intermédiaire* et *Minimum* sont les mêmes que celles utilisées pour la modification des poudres. En revanche, les mesures de DRX, spectroscopie FTIR et RAMAN étant impossibles à réaliser sur ce genre de matériaux modifiés, d'autres techniques ont été mises en œuvre pour les caractériser (EDX, ICP, test de libération...).

a. Caractérisation

Dans un premier temps, des images MEB ont été analysées (Figure 86) et les surfaces spécifiques des cubes traités mesurées.

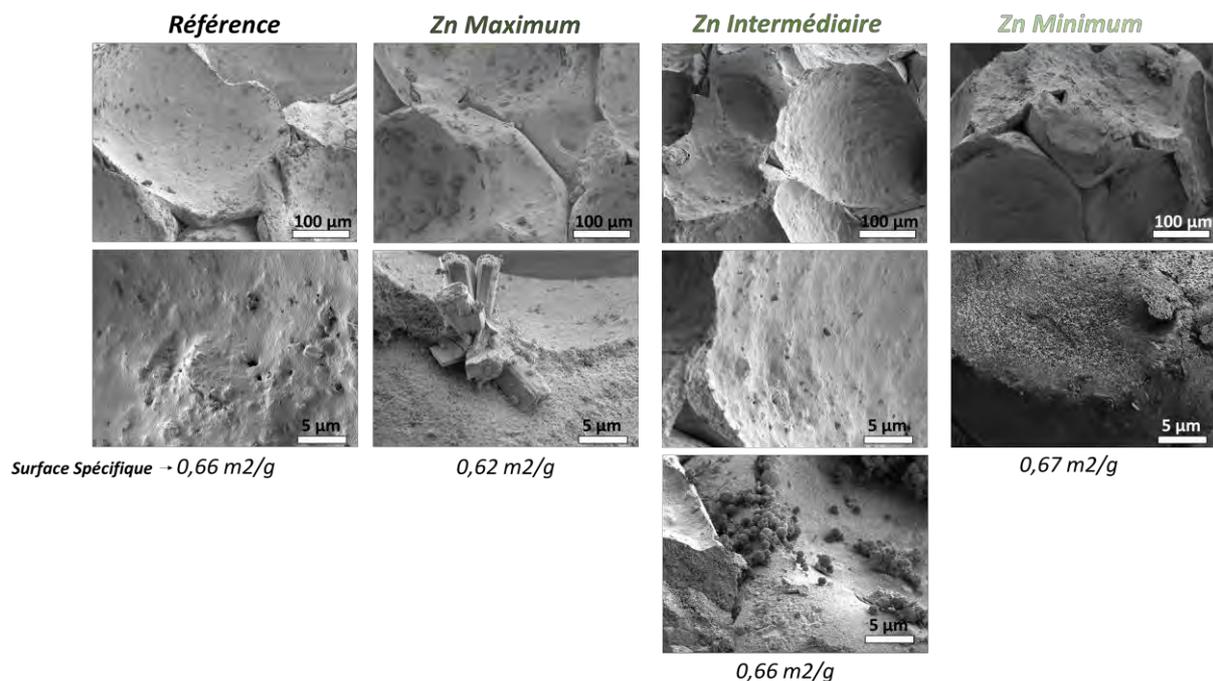


Figure 86 MEB Cubes Références, Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum

Les substituts modifiés en présence de la concentration *Maximum* de zinc montrent une surface très peu modifiée. Peu de dissolution est visible, contrairement à ce qui a été observé sur les cubes traités dans les mêmes conditions de traitement dans l'eau (3.2.2). En revanche de larges cristaux sont présents à certains endroits sur la surface. Bien que de taille légèrement inférieure à ceux observés sur les poudres *Zinc Maximum* et *Intermédiaire*, la présence de ces cristaux confirme l'apparition d'une nouvelle phase.

Cette phase pourrait, ici aussi, correspondre à de l'hopéite, comme précédemment constaté à forte concentration sur les poudres modifiées en présence de zinc.

Une très faible dissolution est également observable sur les cubes obtenus dans le milieu *Zn Intermédiaire*. Quelques formes sphériques ont été observées à certains endroits en surface mais elles restent rares. Ces dernières sont de taille inférieure aux sphères observées sur la poudre *Zn Minimum* bien que d'apparence semblable.

Enfin les cubes de céramiques ayant subi un traitement *Zn Maximum* montrent des zones couvertes de précipité. Cette morphologie est similaire à celle observée sur les substituts modifiés en l'absence d'autres espèces.

Les surfaces spécifiques sont du même ordre de grandeur quelle que soit la concentration en zinc utilisée. Ces mesures ayant une précision de $0,03 \text{ m}^2/\text{g}$ elles ne montrent pas de modifications importantes par rapport aux cubes des références (cubes *Non Traités*).

Les trois concentrations influencent de manière différente la modification de surface observées sur les substituts. Bien que la surface spécifique ne soit pas modifiée de manière significative, des mesures de porosimétrie à mercure ont ici aussi été réalisées afin d'appréhender au mieux la morphologie de surface des cubes traités.

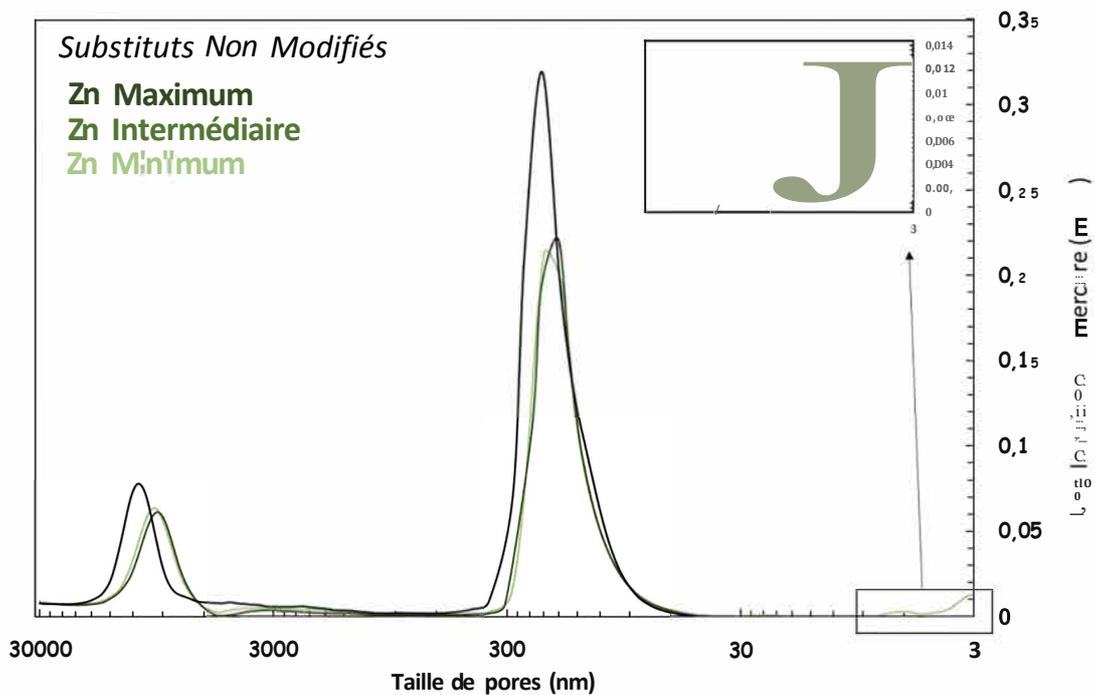


Figure 87 Porogramme des cubes modifiés zinc : maximum, Intermédiaire, Minimum

Les porogrammes (Figure 87) montrent des modifications de porosité du même ordre de grandeur que celles observées précédemment sur les céramiques modifiées sans espèces ioniques dans le milieu (3.2.2). La population 1000-30000 nm est décalée vers la droite, traduisant une diminution du diamètre des pores. Concernant la gamme 10-1000nm, les pores au-delà de 250nm de diamètre environ semblent avoir disparu et le volume poreux correspondant à la population restante semble plus réduit.

Enfin, l'apparition d'une porosité de quelques nanomètres est visible sur les substituts modifiés avec la concentration *Minimum* de zinc. Cette porosité est en accord avec les observations faites sur l'image f Figure 86.

Il y a donc bien une dissolution ainsi qu'une précipitation, dépendantes de la concentration en zinc et différentes de celles observées dans la Partie précédente. Afin de localiser le zinc sur les substituts, une série de mesures EDX a d'abord été menée.

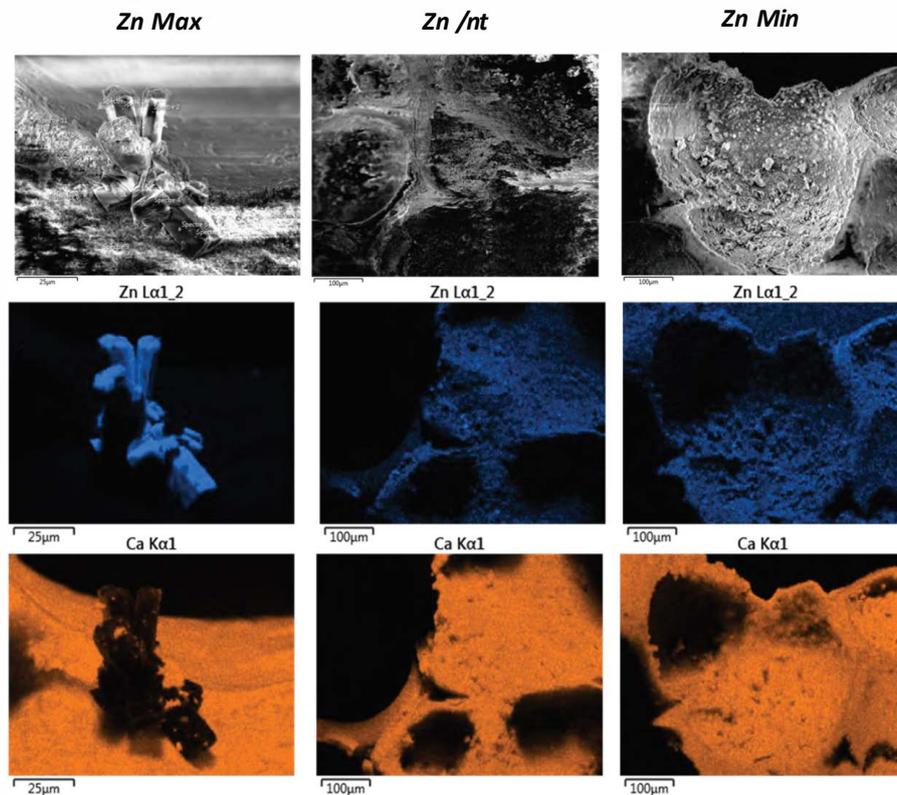


Figure 88 EDX des substituts poreux traités avec les 3 concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum

Les analyses EDX présentées sur la Figure 88 ont ici aussi permis de constater une forte concentration en zinc dans les structures observées au MEB sur les substituts *Zinc Maximum*. Il est probable que ces structures soient également de l'hopéite, comme constaté sur les poudres modifiées avec des concentrations importantes de zinc. Sa présence signifie que la dissolution de la céramique a été suffisamment importante pour mettre en solution des phosphates permettant la précipitation d'hopéite. En revanche dans ces conditions de température, pH et concentrations, la précipitation de cette phase semble favorisée par rapport à celle d'un CaP. Le reste de la surface des pores n'aurait pas intégré de zinc en quantité suffisante pour être visible grâce à cette technique. Concernant les substituts traités avec les concentrations *Zinc Intermédiaire* et *Minimum*, du zinc est visible de manière uniforme sur la surface des pores.

L'EDX a ainsi permis d'identifier les cristaux probables d'hopéite. Afin de quantifier la proportion de zinc incluse dans les substituts, des mesures par ICP ont été réalisées.

b. Quantification des espèces incluses :

Pour déterminer la quantité de zinc incluse dans les substituts, des dosages par ICP ont été réalisés sur le milieu utilisé pour le traitement pré et post-procédé (Figure 89). Il est alors possible de déduire que la quantité manquante de zinc dans la solution post-procédé, par rapport à la solution initiale, est intégrée aux céramiques. Le calcium a également été dosé dans la solution post-procédé, ce dernier étant en partie le marqueur de la dissolution de la céramique.

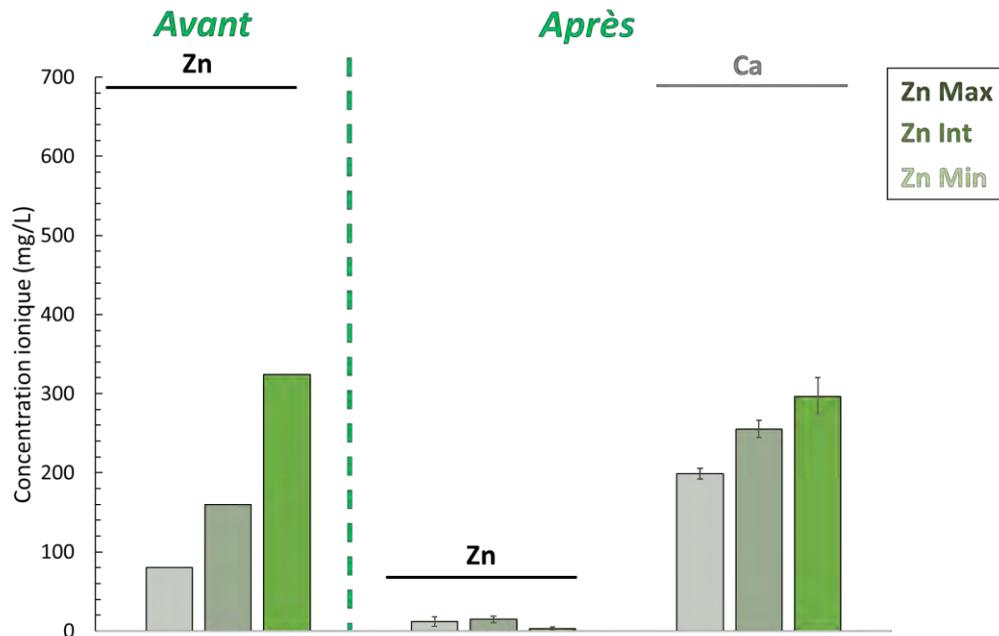


Figure 89 ICP du milieu aqueux utilisé lors du procédé pour Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum

Ces mesures montrent une forte diminution de la quantité de zinc au sein de la solution de traitement suite au procédé de traitement effectué avec les trois concentrations. Il y a une diminution plus importante sur le *Zinc Maximum*. Cela pourrait être en rapport avec l'apparition de la nouvelle phase d'hopéite.

De plus, l'apparition dans la solution post-traitement d'ions calcium est la preuve que des phénomènes de dissolution ont lieu au cours du traitement CO_2 . La diminution en ions Ca^{2+} enregistrée dans la solution post-procédé en lien avec la diminution de la concentration en zinc de la solution de traitement, pourrait être un témoin de l'effet inhibiteur du zinc sur la précipitation des CaP. Ainsi, pour une même quantité de calcium libérée par dissolution de la céramique au cours du traitement, l'augmentation de la concentration en zinc, favorise la précipitation d'hopéite ou de phases riches en zinc au détriment de phases consommatrices de calcium comme l'hydroxyapatite et/ou ses dérivés.

De plus, les concentrations en espèces dopantes intégrées aux céramiques (sous forme d'hopéite, ou intégrées aux phases apatitiques fraîchement précipitées) ont pu être définies pour chacune des concentrations, montrant que l'intégration de zinc est bien proportionnelle à la concentration initialement imposée dans le milieu :

- $127,2 \pm 5,8$ $\mu\text{g/g}$ de céramique pour *Zinc Minimum*
- $244,1 \pm 21,7$ $\mu\text{g/g}$ de céramique pour *Zinc Intermédiaire*
- $500,5 \pm 96,7$ $\mu\text{g/g}$ de céramique pour *Zinc Maximum*

c. Test de libération

La vitesse de libération est un paramètre primordial dans l'effet biologique recherché. Une quantité d'actif libérée trop rapidement en trop grande quantité peut avoir un effet néfaste alors qu'une libération prolongée à dose adaptée peut permettre un effet à long terme. Des tests de libération ont donc été mis en place avec les substituts modifiés pour chaque concentration (Figure 90).

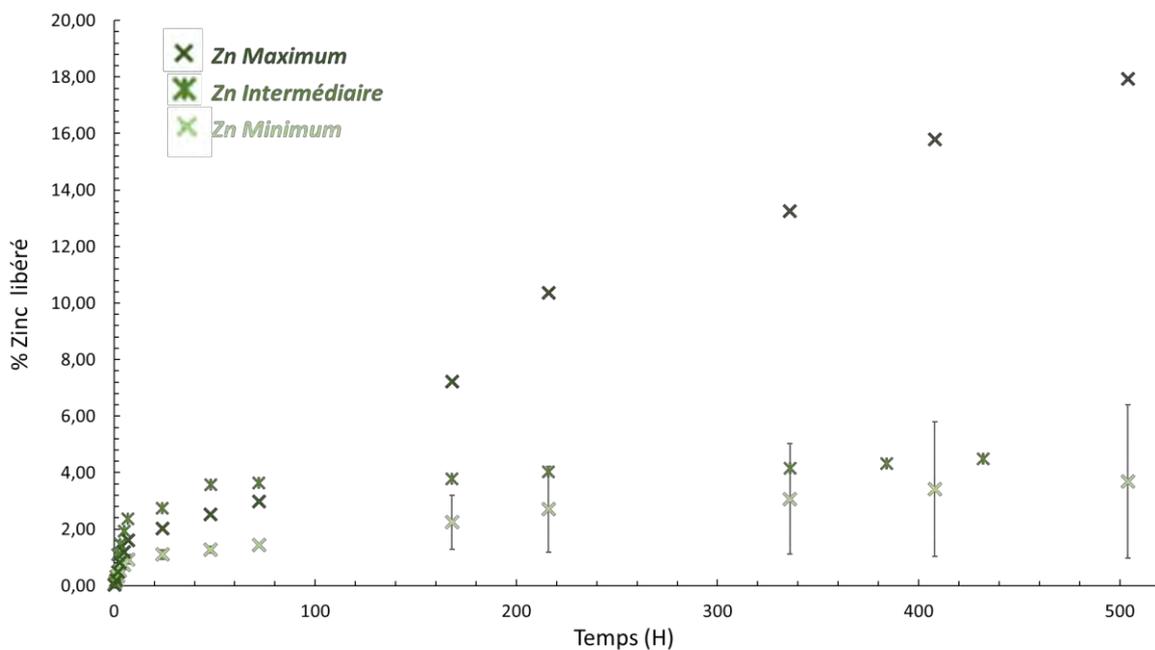


Figure 90 Test de libération dans SBF 0.9 sur 3 semaines Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum

Ces tests ont été effectués dans une solution de SBF sous saturée ($\text{SBF} \cdot 0,9$) afin de ne pas engendrer la précipitation en surface d'un CaP supplémentaire susceptible de perturber la libération des espèces ioniques dopantes.

S'il est très difficile d'affirmer avec certitude les mécanismes mis en jeu au cours de la libération des espèces, de par l'addition de mécanismes concomitants le manque d'information sur les vitesses de dissolution des phases riches en zinc, les phénomènes de diffusion au sein des réseaux poreux et notamment du réseau nanoporeux, il est néanmoins possible d'avancer certaines hypothèses.

Ainsi, quelle que soit la concentration de zinc, une libération importante de zinc a lieu dans les premières heures. Cette phase de libération pourrait être imputée à des phénomènes d'échanges ioniques entre les ions Zn^{2+} contenus dans la phase labile des nanocristaux apatitiques nouvellement formés et la solution de SBF riche en ions Ca^{2+} . Parallèlement à ces mécanismes d'échanges ioniques, la présence d'hopéite, sous forme de cristaux de taille importante à forte concentration en zinc ou sous forme non décelable (simples nucléis) à faible concentration, laisse penser qu'un second mécanisme de libération pourrait impliquer cette nouvelle phase : soit par des phénomènes d'échanges ioniques similaires à ceux observés avec les phases apatitiques soit par dissolution progressive des cristaux. Ainsi, dans les premiers instants de la libération sont cumulés les mécanismes d'échanges ioniques entre le zinc contenu dans les nouvelles phases formées au cours du traitement et le calcium contenu dans le milieu de libération^{329,330} et les mécanismes de dissolution des phases solubles riches en zinc.

La vitesse de libération du zinc dans la seconde partie de la cinétique est donc liée à la quantité d'hopéite présente. Ainsi, pour les cubes traités dans les solutions *Zinc Intermédiaire* et *Zinc Minimum*, une libération plus lente est observée dans les 48H jusqu'à atteindre un plateau pour *Zn intermédiaire*. Ce plateau n'atteint que quelques pourcents de la quantité introduite : 5% pour le *Zinc Intermédiaire* et 3,7 % pour le *Zinc Minimum*. Concernant la concentration *Maximum* de zinc, bien qu'une libération très rapide ait également lieu dans les premières heures, la deuxième phase de libération n'atteint ici pas de plateau et dépasse les 18% de zinc libéré à 3 semaines.

A noter que pour le *Zinc Minimum*, les revêtements similaires aux précipités remarqués sur les cubes céramiques modifiés dans l'eau seule, identifiés comme étant un mélange d'OCP, de PCA ou encore de PCCA pourraient inclure une partie du zinc dans cette dernière. Il a en effet été démontré que les apatites dites biomimétiques, peuvent intégrer de 5 à 17% de zinc au sein de leur structure selon les paramètres de synthèse⁴⁹. L'espèce active pourrait être incluse à la fois au cœur de la structure apatitique mais également dans la couche dite hydratée de cette dernière. Le zinc inclus dans cette couche serait alors très facilement échangeable avec son environnement. En revanche, le zinc au sein de la structure apatitique ne pourrait être libéré que *via* l'activité des ostéoclastes.

Ces substituts étant destinés à être implantés, des tests biologiques préliminaires ont été initiés, à la fois pour évaluer les aspects antibactériens ainsi que leur comportement face aux cellules de l'os : les ostéoblastes.

d. Tests biologiques

Dans un premier temps, des tests antibactériens ont été réalisés afin d'évaluer les capacités antibactériennes des substituts sur deux types de bactéries : *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) et *Escherichia coli* (*E. coli*).

Les Figure 91 et Figure 92 montrent le taux d'inhibition des substituts traités en présence de zinc mis en présence d'*E. coli* et *B. subtilis*.

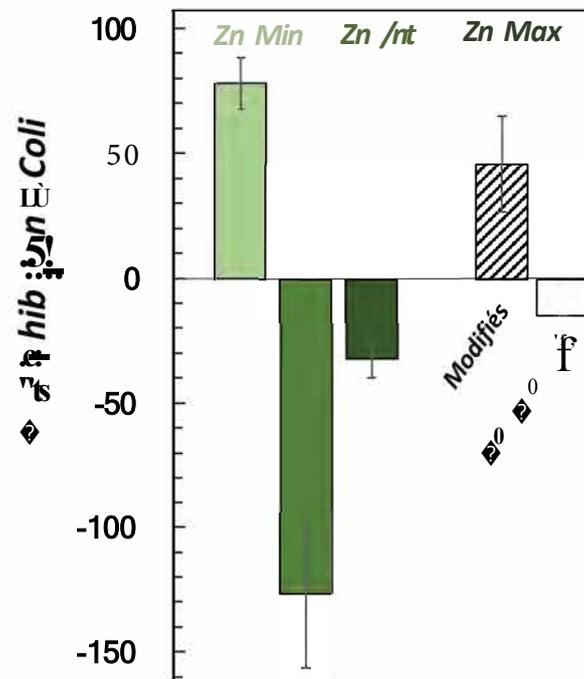


Figure 91 Tests antibactériens *E. coli* effectués sur les échantillons traités avec les concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum ainsi que les substituts traités au CO' en milieux aqueux et les cubes traités

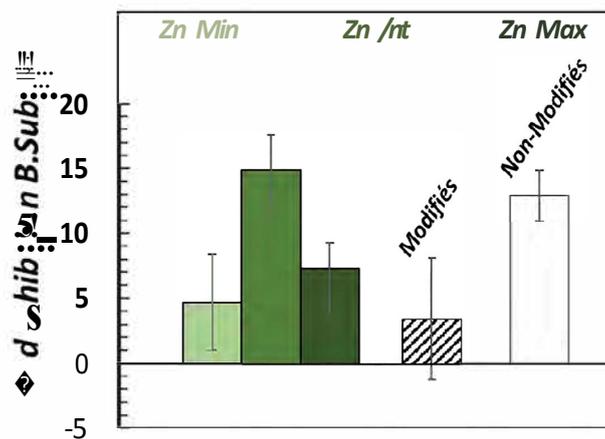


Figure 92 Tests antibactériens *B. subtilis* effectués sur les échantillons traités avec les concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum ainsi que les substituts traités au CO' en milieux aqueux et les cubes non traités

Les taux d'inhibition ont été calculés en fonction d'un puit de référence où les bactéries n'ont pas été mises en contact avec les cubes. Un taux d'inhibition positif indiquera le pouvoir antibactérien du substitut, alors qu'une valeur négative signifiera au contraire la promotion de la croissance bactérienne.

Concernant *E. coli*, les échantillons Zinc Minimum semblent avoir une activité antibactérienne, contrairement aux autres substituts dopés en zinc, qui, à l'inverse,

stimuleraient la croissance bactérienne. L'activité antibactérienne correspondant à la concentration maximale est ici supérieure à celle obtenue avec les substituts traités (*Modifiés*) en présence d'eau pure saturée en Ca²⁺

Pour *B. subtilis*, l'activité antibactérienne est observée pour chacun des substituts. Cependant, seule la concentration de Zinc Intermédiaire montre une activité légèrement supérieure à celle des cubes *Non Modifiés*.

Alors que dans la littérature, le zinc est présenté comme ayant une activité antibactérienne forte; cela ne semble pas être le cas ici.

Enfin, des ostéoblastes ont été utilisés afin d'évaluer leur viabilité et de quantifier un des marqueurs de leurs activités qu'est l'ALP une fois mises en contact avec les substituts modifiés en présence de Ca²⁺ (Figure 93).

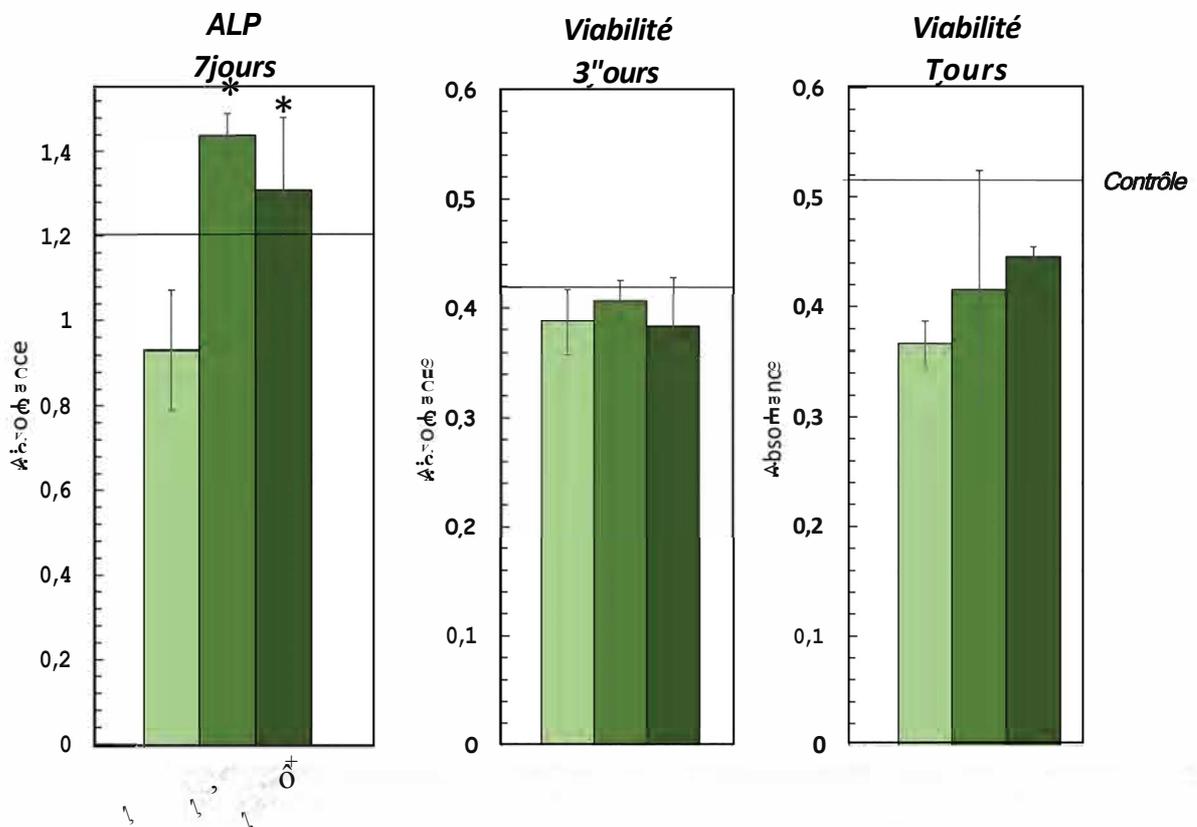


Figure 93 Tests cellulaires réalisés sur les céramiques traitées avec les concentrations Zinc : Maximale, Intermédiaire et Minimum, respectivement les crèmes standards et *, montrent des différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au Contrôle

Les viabilités cellulaires à 3 et 7 jours n'ont pas montré de différence significative avec le contrôle, il n'y aurait donc pas de cytotoxicité marquée. A 7 jours, cependant, une tendance est visible montrant une viabilité croissante avec la concentration en zinc. Concernant les mesures d'ALP, elles sont significativement supérieures au contrôle pour les concentrations *Intermédiaire* et *Maximale*. Cette dernière est un marqueur de

l'activité cellulaire, soulignant ainsi leur capacité à précipiter la matrice organique osseuse et à minéraliser cette dernière.

Conclusion :

L'étude sur les poudres dopées au zinc a permis de montrer la possibilité de modifier la surface des céramiques en utilisant le procédé CO₂ haute pression. Bien que toutes les phases précipitées n'aient pas pu être identifiées (Figure 85), les résultats obtenus ont permis de montrer l'influence de la concentration en zinc du milieu de traitement sur les modifications de surface et sur les phases précipitées post-traitement.

A concentration en *Zinc Minimum*, la formation de cristaux en surface du liquide pendant l'heure de repos évoque des mécanismes similaires à ceux observés sur les poudres modifiées en simple milieu aqueux : il y a bien dissolution puis nucléation en surface d'une nouvelle phase qui intégrerait en partie le zinc. Les concentrations importantes voient apparaître de larges cristaux de phosphate de zinc hydraté (Hopéite) et les DRX permettent d'en voir également l'amorce pour la concentration *Minimum*, bien qu'elle ne soit pas clairement visible sur les observations MEB. Ainsi une quantité importante de zinc pourrait favoriser, en présence de phosphate en milieu aqueux, la précipitation d'une autre phase que les CaP jusqu'à présent observés. Enfin, bien que les pH mis en jeu ne soient pas identiques, une dissolution a bien lieu puisque des phases nouvelles précipitées de CaP sont visibles sur les trois expériences malgré le fait que l'action inhibitrice de la cristallisation du zinc ait été vérifiée.

Les modifications des cubes de céramique ont permis de montrer des différences significatives comparées aux observations faites avec les cubes traités dans l'eau pure saturée en CO₂.

Tout d'abord, il semble bien y avoir incorporation de zinc et ce de manière proportionnelle à la concentration imposée. Ici aussi, des mécanismes différents ont été identifiés selon la concentration. La nouvelle phase identifiée comme étant de l'hopéite n'est visible que pour la concentration maximale en Zinc. Les dosages effectués par ICP dans le milieu environnant ont permis de valider une libération de calcium, donc un processus de dissolution. Les différences de concentration en calcium pourraient à la fois être dues à une dissolution moindre pour les concentrations plus élevées de zinc mais aussi à une précipitation plus importante pour les concentrations faibles. Dans tous les cas, les revêtements formés sont moins réguliers qu'en absence d'espèce ionique. Il est possible de noter la différence de pH initial entre les solutions de zinc et le milieu aqueux précédemment utilisé, comme vérifié en simulation. Cette différence de solubilité pourrait être à l'origine d'une dissolution moins importante de céramique pour *Zn Maximum*. Une plus petite concentration de calcium dans le milieu ne permettrait alors pas de dépasser la concentration C₀ menant à la précipitation d'une nouvelle phase phosphocalcique, contenant du zinc ou non.

Les substituts ainsi obtenus ont montré des activités antibactériennes limitées mais des améliorations notables de l'activité cellulaire. Il semblerait intéressant de trouver un compromis entre la création d'un revêtement homogène grâce à des concentrations

moindres et une concentration optimale permettant d'augmenter l'activité cellulaire. Les travaux présentés en première partie ont montré l'importance de différents paramètres tels que le temps de repos, sur la maturation de cristaux précipités. Il pourrait être intéressant d'évaluer leur influence sur l'incorporation du zinc et les éventuels différents niveaux de relargage qui en découlent.

Le Tableau 14 permet de résumer les informations essentielles tirées de l'étude de la modification des poudres et des cubes en présence de zinc grâce au procédé CO₂ haute pression :

Tableau 14 Tableau résumé des expériences en présence de Zinc. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence.

			<i>Précipitation</i>	<i>Autre phase de dopant</i>	<i>Activité antibactérienne</i>		<i>Tests cellulaires</i>	
					Gram + (B.Sub)	Gram- (E.Coli)	Viabilité	ALP
Zinc	Poudre	Fond	Quantité faible, + présente aux concentrations fortes (Zn Max, Int : PCCA)	Oui, + concentrations fortes (Hopéite)				
		Surface	Quantité faible, + présente sur concentration faible (PCCA, amorphe)	Oui + concentrations fortes (phase non identifiée)				
	Cubes		Faible + à concentration faible	Oui A concentration forte (Zn Max)	~	~	=	+

4.2 Argent

L'argent a été évoqué dans la littérature comme étant un métal d'intérêt dans le domaine des substituts osseux. Il empêcherait la formation de biofilm, la prolifération bactérienne et serait également antiviral ^{113,117,121}.

Des études ont montré la possibilité de l'intégrer à des CaP tel que l'apatite. Son degré d'intégration dans ce genre de phases est cependant limité⁴⁹.

Dans cette partie, seront présentés les résultats obtenus à partir des poudres minérales puis des cubes de céramiques traités grâce au procédé CO₂ haute pression en présence d'argent.

De la même manière que pour l'étude présentée sur le zinc, l'argent sera introduit dans le milieu réactionnel grâce à l'ajout d'acétate d'argent. Ici aussi trois concentrations identiques à celles présentées précédemment, en termes de concentration massique en espèce active, seront utilisées et appelées *Argent Maximum*, *Intermédiaire* et *Minimum* (Tableau 7, 2.2.1.b). Des simulations PHREEQC ont ici aussi été réalisées afin d'évaluer les modifications de pH induites par l'ajout d'acétate d'argent sur la solution initiale et sur la solution saturée en CO₂ durant le traitement. (Tableau 15).

Tableau 15 pH des solutions d'acétate d'argent dans l'eau à pression atmosphérique et saturée en CO₂ d'après les simulations PHREEQC

<i>Concentration en acétate d'argent (g/L)</i>	pH de la solution initiale mesuré	pH de la solution saturée en CO₂ calculé *
<i>Eau</i>	6,80	3,10
<i>Argent Minimum</i>	5,83	3,29
<i>Argent Intermédiaire</i>	5,84	3,44
<i>Argent Maximum</i>	5,90	3,65

* simulations réalisées à partir d'eau à pH 7

Dans des conditions normales avant saturation, les pH des solutions riches en ions argent semblent plus acides que l'eau mais ne semblent pas dépendre de manière significative de la concentration en ions argent. A saturation en CO₂, le pH des solutions riches en argent est légèrement moins bas que celui de l'eau pure saturée de CO₂ (3,10) et celui-ci semble dépendre de la concentration de la solution considérée. Il est d'autant plus élevé que la concentration en acétate d'argent est importante dans la solution.

D'après l'étude précédente, ce paramètre est primordial et les pH pourraient intervenir et modifier les mécanismes de dissolution/précipitation.

Afin de pouvoir caractériser les modifications apportées à la céramique lors du traitement, ici aussi, des poudres d'HA/amTCP ont d'abord été utilisées.

4.2.1 Poudres

Cette étude a pour but d'identifier les modifications induites par l'ajout d'acétate d'argent sur le revêtement obtenu après traitement en CO₂ à haute pression.

Ici aussi, contrairement aux expériences menées dans l'eau, la quantité de poudre se formant en surface durant l'heure de repos n'a pas été suffisante pour être analysée de façon indépendante, et ce, quelle que soit la concentration d'acétate d'argent utilisée. Les deux poudres, *Poudre Surface* et *Poudre Fond* ont donc été mélangées et caractérisées de façon globale. La présence d'une *poudre surface* est cependant visible quelle que soit la concentration en argent initiale contrairement au cas du zinc où elle n'était visible que pour la concentration *Minimum*. Des techniques identiques à celles précédemment mises en œuvre pour l'étude des poudres modifiées en présence d'acétate de zinc ont été utilisées pour caractériser celles obtenues en présence d'acétate d'argent.

La DRX a tout d'abord permis d'identifier les phases cristallines en présence (Figure 94).

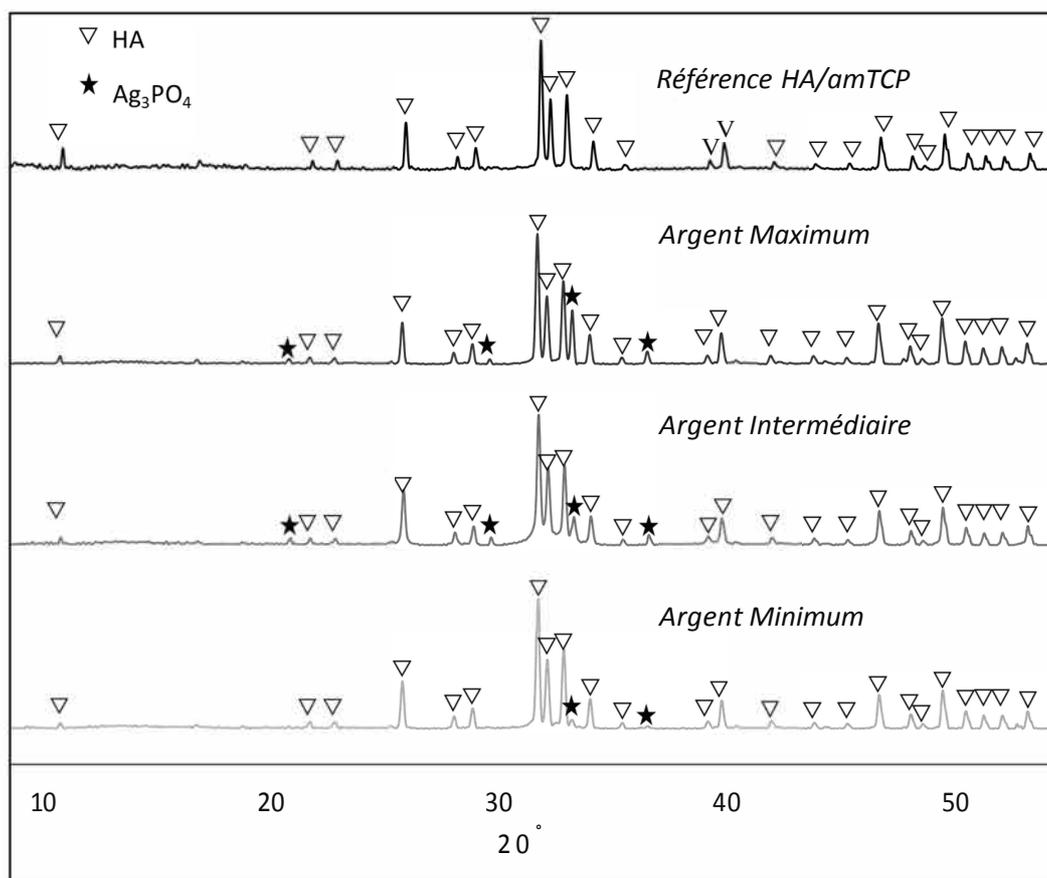


Figure 94 DRX Référence HA/amTCP, Argent Maximum, Argent Intermédiaire, Argent Minimum

Une phase d'HA bien cristallisée est toujours aussi visible quelle que soit la concentration d'argent utilisée et on remarque la présence d'une phase supplémentaire. Celle-ci est un phosphate d'argent (Ag_3PO_4 JCPDS : 00-006-0505), qui semble, de la même manière que l'hopéite dans le cas des poudres modifiées au zinc, d'autant plus présent que la concentration initiale en ions argent dans la solution de traitement est importante. La présence de cette nouvelle phase, riche en phosphate est ici aussi une confirmation de la dissolution de la céramique durant le traitement.

Les spectres FTIR obtenus pour les poudres traitées en présence d'argent présentent des modifications notables comparées au spectre obtenu avec la référence (Figure 95).

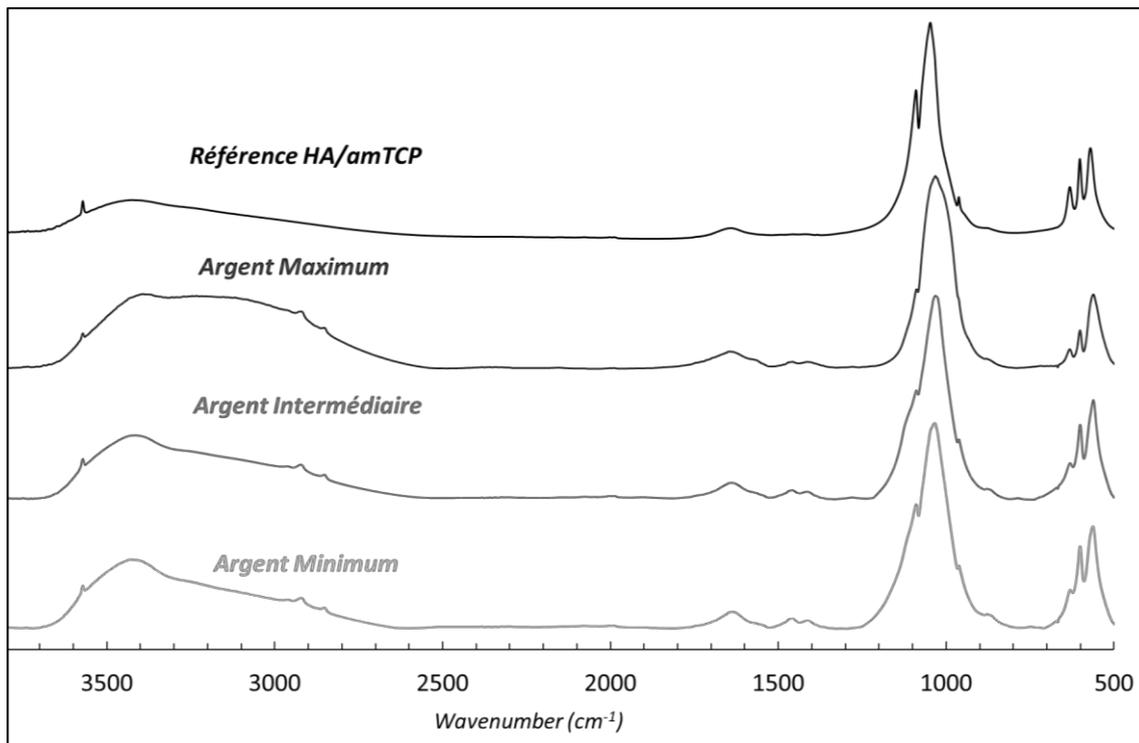


Figure 95 Spectroscopie FTIR des poudres Non Traitées et Traitées avec les concentrations Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum

En premier lieu, une augmentation des différents types de carbonates est visible dans le domaine des $\nu_3 \text{CO}_3$ ($1500\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$) sur chacun des spectres. De telles modifications avaient déjà été observées sur les poudres traitées en l'absence d'ion dopant et avaient été attribuées à la précipitation au cours ou après le traitement, de PCCA (3.1.3).

De plus, une modification des bandes $\nu_3 \text{PO}_4$ peut être observée. Cette modification se traduit par un épaulement autour de 1100cm^{-1} particulièrement présent pour l'*Argent Intermédiaire* et *Minimum*. Une large bande supplémentaire est visible principalement sur l'*Argent Maximum* autour de 990 cm^{-1} . Ces bandes pourraient être le témoin des phosphates d'argent observés en DRX, ces derniers ayant des bandes caractéristiques à

1087, 987, 864 cm^{-1} . Un élargissement de ce type peut également être relié à une présence accrue d'apatite mal cristallisée (PCA ou PCCA).

Ces deux types d'analyses ont permis d'identifier les phases en présence. Alors que les DRX montrent, de la même manière que dans le cas du zinc, une présence de phosphates liée à l'espèce dopante, d'autant plus importante que la concentration augmente, les mesures FTIR sont différentes de celles constatées sur le zinc. La présence d'autres phosphates de calcium (OCP, PCCA) pourrait également participer à ces modifications constatées sur les spectres FTIR. Afin d'aller plus loin, une observation MEB a permis d'observer les poudres traitées en présence d'argent et a été complétée par des mesures EDX permettant de mettre en évidence les structures contenant de l'argent. L'ensemble des résultats est présenté sur la Figure 96.

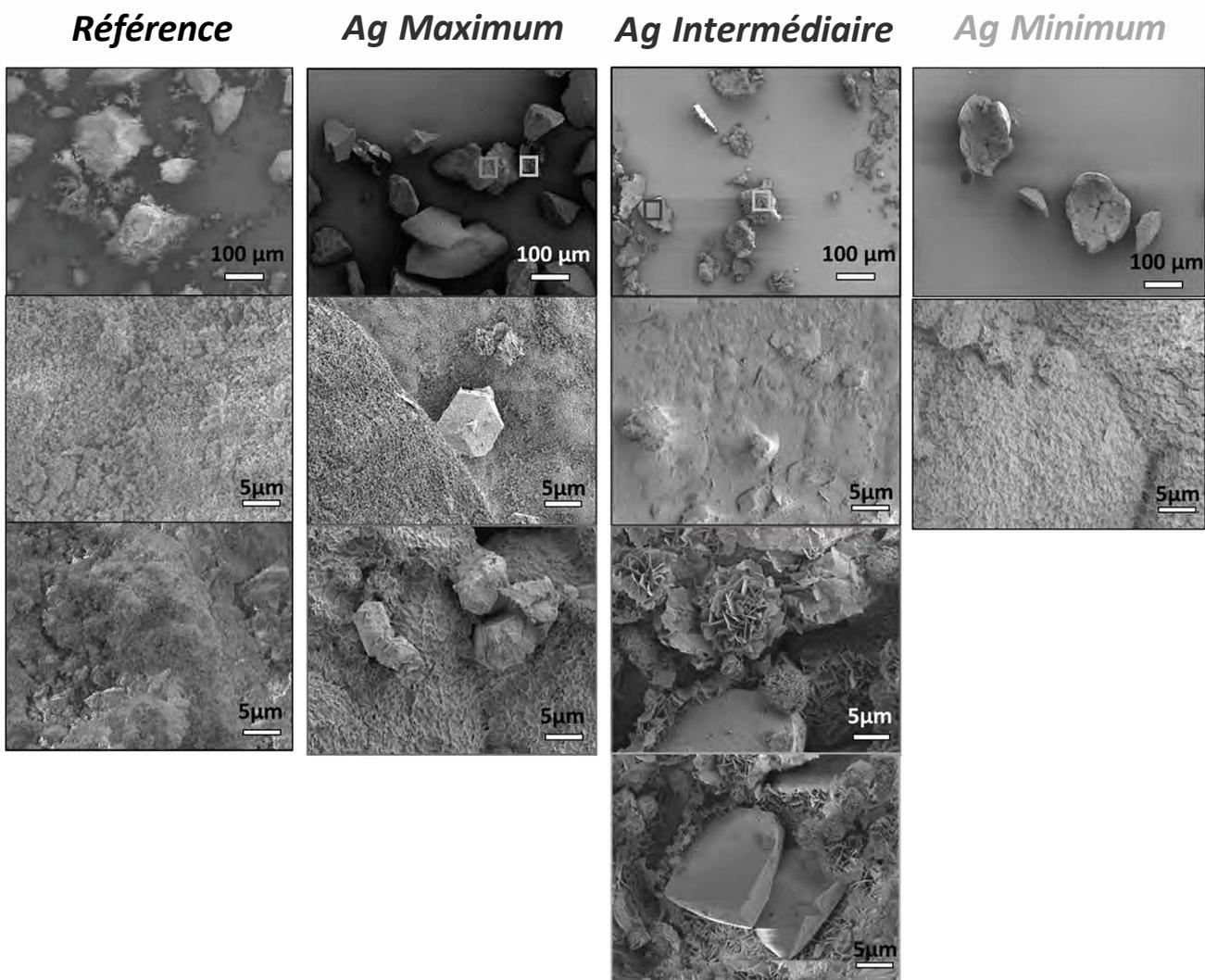


Figure 96 MEB de la Poudre de Référence, et des poudres dopées avec de l'Argent

Quelle que soit la concentration initiale en argent utilisée dans la solution de traitement, nous constatons après traitement une disparition des plus petites particules observées sur la référence et identifiées alors comme étant de l'arnTCP (Figure 96). Cette disparition

du TCP prouverait la dissolution préférentielle de cette phase conformément à ce qui a déjà été discuté en 3.2.1. Des grains de taille conséquente, plusieurs dizaines de μm , sont encore visibles après traitement CO_2 et pourraient correspondre aux grains d'HA initiaux. Ils sont parfois partiellement recouverts d'un précipité constitué de nanoparticules avec dans certains cas apparition de cristaux cubiques; particulièrement pour les poudres traitées avec les concentrations Argent Ma:ûrrmm et Intermédiaire. Ces cubes n'ont jamais été observés jusqu'à présent dans ce travail; et sont donc très probablement liés à la présence d'argent. Ils pourraient correspondre aux phosphates d'argent identifiés en DRX. De telles morphologies cubiques de phosphates d'argent ont déjà été observées dans la littérature lors de leur synthèse en milieu aqueux à des pH nelltresi;:i:i;:4 .

De larges plaques similaires au précipité de la l'ldre Surface obtenue lors de la modification des mêmes poudres en milieu aqueux saturé en CO_2 sont également présentes dans le cas des trois concentrations mises en ccuvre, bien qu'en quantité plus importante pour les faibles concentrations en ions argent.

La poudre récupérée après traitement avec la concentration Argent ltfarirnm a une morphologie analogue à celle observée sur les plaques de Poudre Surface ltfaforécs considérées dans la Partie précédente (3.1.3.a). Elles ont à la fois une face lisse et une face rugueuse et sont constituées de plaques plus petites ayant fusionné. Les précédentes expériences ont montré dans cc cas la pr{.sence cruce PCCA. Les poudres formées en surface n;étant ici pas prélevées elles passent plus de temps dans le milieu aqueux et auraient le temps de mûrir. De nombreux cristaux cubiques <tenviron 5 μm de côté y sont inclus rappelant ceux précédemment constatés sur les grains non dissout d'HA.

Les plaques visibles sur la concentration Intermédiaire sont globalement semblables à celles considérées sur le Alal:irrm. Les cristaux cubiques sont cependant plus larges (101nn) et leur proximité est entourée de sphères à la morphologie « rose des sables » comme observé sur les Pcmdres Smfaces d'HA/amTCP (3.1.:3). Ces morphologies avaient alors été reliées à une précipitation d'OCP. Elles seraient témoin œune néo-cristallisation de phases phosphocalciques alors que les PCCA seraient le fruit de l'hydrolyse de cette phase.

Enfin, les plaques obtenues sur les poudres après traitement avec la concentration Minirv:m sont analogues aux prôchlentes avec une face lisse et une rugueuse rappelant la Powlre Surface Maturée. Aucun cube n;est ici visible. De plus petites sphères de quelques nanomètres, éparées en surface, sont aussi visibles.

D\lprès les observations IVIEB; EDX et de spectroscopie FTIR, la poudre a bien été modifiée et des phosphates d'argents ont été précipités. Des mécanismes potentiellement proches de ceux observés sur les poudres traitées sans espèce dopante pourraient en être à l'origine. En effet, un précipité formé de plus petites plaques coalescés apparait dans les trois cas avec un aspect déjà observé comme typique de PCCA formé suite à une maturation en milieu aqueux.

Afin de déterminer la répartition de l'argent dans les structures observées, des cartographies EDX ont été réalisées (Figure 97).

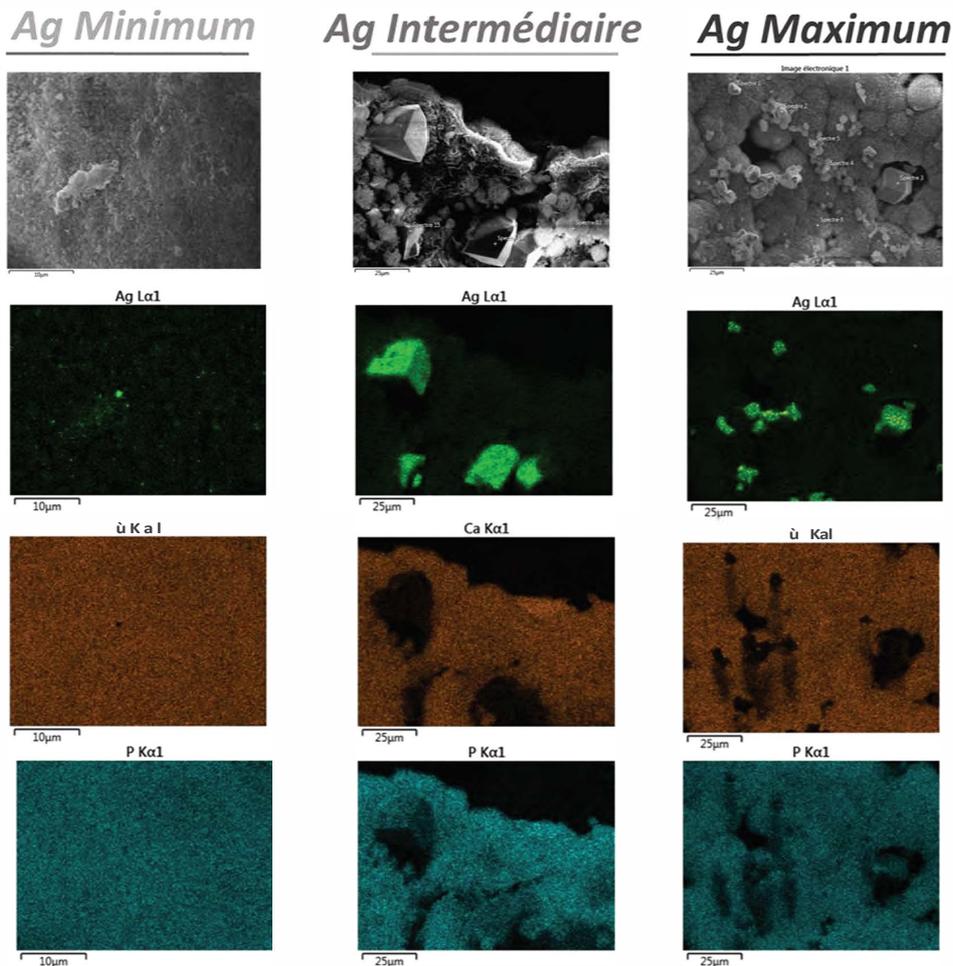


Figure 97 EDX des poudres modifiées Argent Maximum. Inclinatoire de minimum

Alors que l'échantillon traité avec la concentration Argent Minimum, ne montre que quelques points isolés d'argent pouvant être des nucléis de phases contenant de l'argent, voire de l'argent intégré à la nouvelle phase (certainement de CaP), les cristaux cubiques observés sur l'Argent Intermédiaire et Maximum sont clairement identifiables comme étant des phases riches en ion argent et phosphore. En revanche, ils ne contiennent pas de calcium, ce qui conduirait bien à les identifier comme étant les phosphates d'argent constatés précédemment en DRX.

Les mesures DRX et FTIR ont permis de donner des informations générales sur les poudres et l'EDX et le SEM ont montré des structures hétérogènes. Afin d'identifier au mieux les phases correspondantes aux morphologies présentes, des mesures de spectroscopie Raman, ponctuelles, ont été effectuées sur les formes cubiques, les grains identifiés comme pouvant être ceux d'HA non dissouts ainsi que sur les plaques qui peuvent être identifiées comme étant de la poudre surface précipitée (Figure 98).

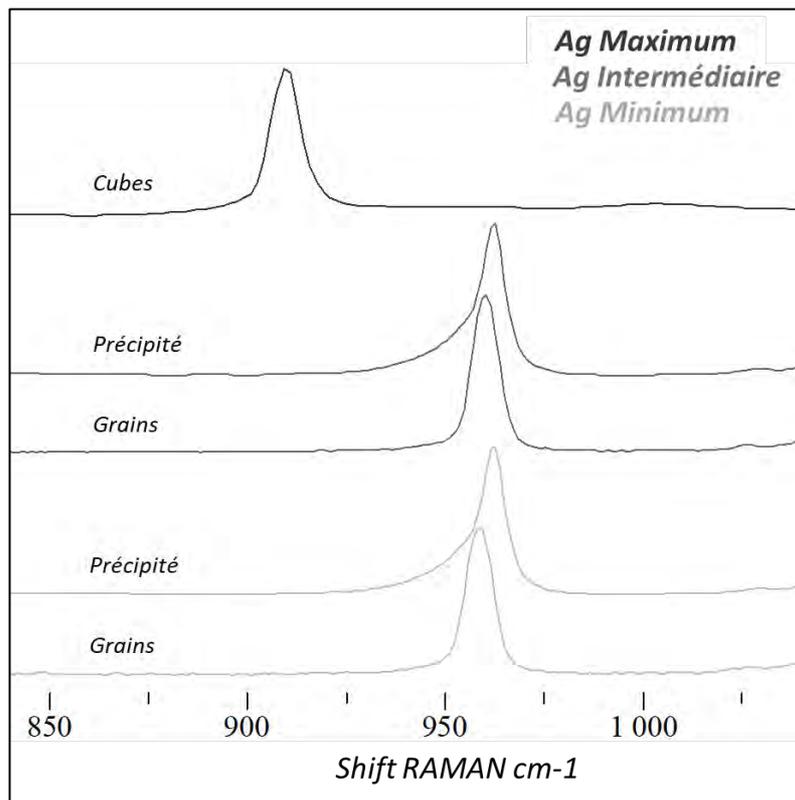


Figure 98 Spectres RAMAN des poudres traitées en présence d'Argent

Les mesures réalisées sur les formes cubiques observées en grande quantité sur les échantillons *Argent Maximum* sont présentées Figure 98. Elles confirment la présence d' Ag_3PO_4 grâce à sa bande principale des $\nu_1 \text{PO}_4$ identifiée à 914 cm^{-1} ³³⁵.

Les mesures faites sur les *plaques surface* de précipités de l'*Argent Intermédiaire* et *Minimum* montrent un mélange de phase. Un mélange d'apatite ($\nu_1 \text{PO}_4$: 961 cm^{-1}), de d'OCP ($\nu_1 \text{PO}_4$: 958 et 966 cm^{-1}) ainsi qu'une phase d'ACP ($\nu_1 \text{PO}_4$: 950 cm^{-1}) pourrait expliquer la bande élargie visible. Un décalage de la bande apatitique pourrait évoquer une présence d'argent. Cela serait cohérent avec les observations MEB qui montrent des plaques précipitées en surface rappelant celles obtenues précédemment en l'absence d'ions dopants.

Les spectres obtenus sur les larges grains initiaux, *Intermédiaire* et *Minimum* sont ceux d'une HA ($\nu_1 \text{PO}_4$: 961 cm^{-1}) avec une possible modification de la cristallinité. La cristallinité est évaluable *via* l'élargissement de la bande, son élargissement pouvant ainsi être la preuve de la précipitation en surface d'une apatite moins bien cristallisée. L'argent n'a cependant pas, jusqu'à présent, été identifié dans la littérature ¹²⁵ comme influençant la cristallinité des phases apatitiques ou comme inhibiteur de précipitation et de croissance cristalline.

Conclusion :

Les résultats obtenus sur les poudres traitées en présence d'argent par le procédé CO₂ haute pression ont permis de montrer la modification des poudres d'HA/amTCP avec intégration de l'ion bioactif argent. Les modifications de pH, de concentrations en ions calcium, phosphore et argent présents dans le milieu semblent induire la précipitation de plusieurs phases en proportions variables en fonction de la concentration initiale en ions argent dans le milieu de traitement.

D'après les observations faites, un précipité se forme en surface du liquide suite à l'heure de repos dans chacun des cas, témoin d'une dissolution de la phase céramique, et est composé de Ca et P. Les observations MEB ont permis de discerner ces plaques et d'y déceler la présence plus ou moins importante de phosphate d'argent en fonction de la concentration initiale en argent utilisée. Ils ont aussi été observés sur les larges grains non dissouts dans le cas de *l'Argent Maximum*.

La présence de cristaux cubiques de phosphate d'argent a déjà été observée dans la littérature lors de synthèses réalisées à pH neutre et à température ambiante³⁶. Ainsi, dans les expériences réalisées en présence de CO₂ haute pression, ces composés précipiteraient de manière préférentielle lors de la remontée en pH et pendant l'heure de repos ou très localement grâce aux remontées de pH dues à la dissolution des phases phosphates qui composent la céramique durant le procédé. Ces phosphates d'argent pourraient avoir un intérêt dans l'activité antibactérienne envisagée³⁶.

Grâce aux mesures RAMAN il est possible de supposer que la formation des plaques en surface subirait les mêmes étapes de précipitation et de maturation que celles observées sur les *Poudres Surface* obtenues en l'absence d'argent (3.1.3). Cette hypothèse est renforcée par la présence de carbonates sur les FTIR permettant d'identifier du PCCA, produit de la maturation des plaques précipitées en surface. La carbonatation pourrait se faire grâce au milieu riche en CO₂, lors de la remontée en pH.

Des phases d'ACP sont cependant visibles. La présence d'argent et notamment la précipitation de phosphate d'argent pourrait influencer les différents mécanismes de précipitation, notamment en consommant des phosphates et en modifiant ainsi la concentration disponible pour la précipitation de CaP (OCP, PCCA...).

Suite à ces observations, des cubes de céramiques poreux ont été modifiés en utilisant le même protocole et les mêmes solutions que celles utilisées précédemment. Cela pourrait permettre de conférer des activités supplémentaires à ces cubes en plus de modifier leur surface.

4.2.2 Cubes de céramique

Les cubes poreux d'HA/ β TCP précédemment utilisés ont été modifiés *via* le procédé CO₂ haute pression en présence d'acétate d'argent.

a. Caractérisation

Comme mentionné lors de l'étude sur le zinc, les techniques de caractérisation utilisées sur les poudres ne peuvent pas être mises en œuvre dans le cas des cubes. C'est pourquoi des observations MEB, EDX mais aussi des mesures BET Krypton et par porosimètre à Mercure ont été menées. Les images obtenues au MEB montrent des modifications importantes avec remaniement de la surface des pores extérieurs quelle que soit la concentration en argent du milieu de traitement (Figure 99).

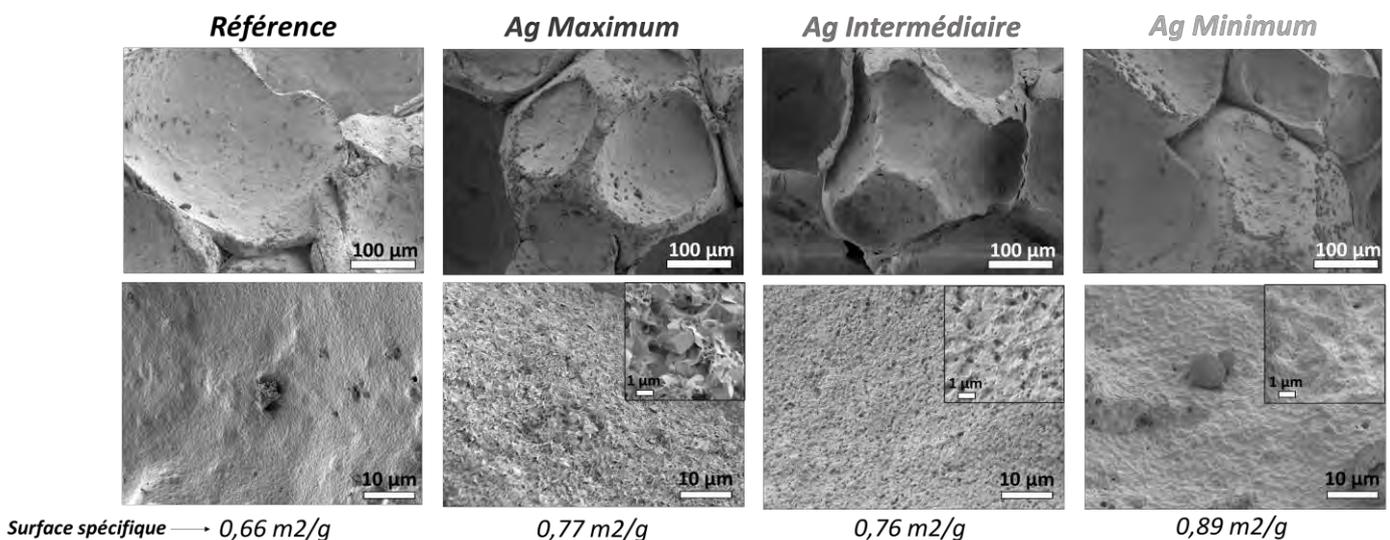


Figure 99 MEB Cubes Références, Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum

L'*Ag Maximum* montre un revêtement constitué de feuillets d'un à deux micromètres (valeur mesurée grâce au logiciel Imagej) (Figure 99). Ils évoquent le revêtement observé sur les cubes modifiés en l'absence d'argent (3.2.2). Ces revêtements ont préalablement été identifiés en spectroscopie RAMAN, comme étant de l'OCP, sur les poudres traitées avec les concentrations *Intermédiaire* et *Minimum*. Des cristaux cubiques sont visibles au cœur de la nouvelle phase précipitée en surface. Ils ont une taille identique (quelques μm) à ceux observés sur la poudre *Ag Intermédiaire*.

Les céramiques *Argent Intermédiaire* sont également recouvertes mais le revêtement, bien qu'homogène sur la surface, n'a pas le même aspect. Il ne présente pas de feuillet et aucune particule cubique n'est visible. Ce type de précipité est similaire à celui observé sur les surfaces immergées dans le SBF³¹⁶.

Enfin la surface des cubes de céramique traités avec la *concentration Minimum* est également modifiée avec un revêtement d'apparence dense en surface. Il pourrait rappeler

une nouvelle phase apatitique moins bien cristallisée, mais également les *Poudres Surfaces Maforées* modifiées sans espèces dopantes (3.1.3.a), comme évoqué suite aux essais sur les poudres dopées à l'argent. De rares sphères sont également visibles en surface.

Les surfaces spécifiques des trois types de cubes modifiés sont légèrement plus importantes et de l'ordre de celles observées lors de la modification des cubes en présence d'eau pure saturée en CO₂. Cette légère augmentation pourrait être due à la nouvelle phase précipitée en surface. Les échantillons traités avec la concentration *Minimum*, ont une surface spécifique plus élevée qui pourrait être due au revêtement très dense observé sur ces échantillons ainsi qu'à la présence des structures sphériques.

Des mesures de porosimétrie mercure ont également été réalisées afin d'évaluer l'évolution de morphologie des cubes (Figure 100).

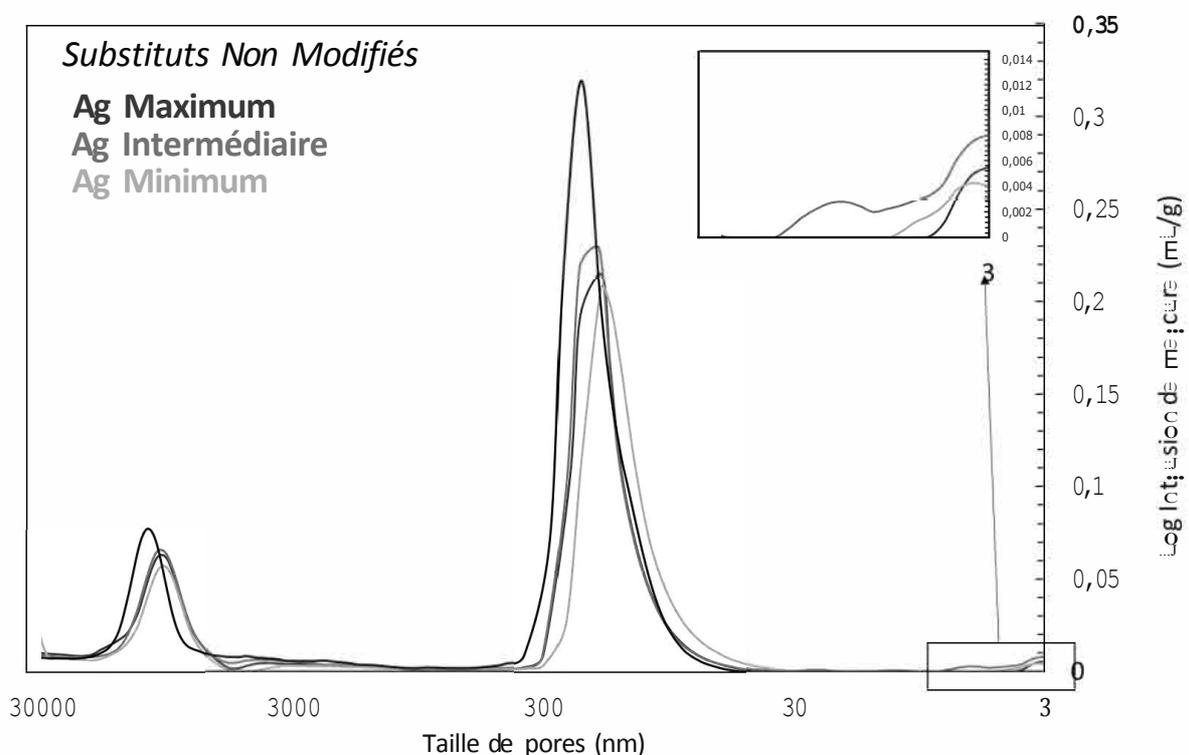


Figure 100 Porogrammes des cubes non traités et traités en présence d'Argent.

Les porogrammes obtenus sur les substituts traités sont différents de celui obtenu avec la référence non traitée. Les porosités entre 1000-30000nm sont légèrement décalées vers la droite, leur diamètre est donc diminué notamment pour l'Argent *Minimum*. La gamme de pores de 10-1000nm est diminuée dans les trois cas. L'Argent *Maximum* voit également la création d'une nouvelle porosité, décalant le pic les diamètres de pores inférieurs. Enfin des porosités inférieures à 10nm sont créées dans tous les cas, certainement en raison de l'apparition du nouveau précipité dense en surface.

Les observations MEB ainsi que les mesures BET et de porosimétrie ont permis de confirmer une modification de surface des cubes quelle que soit la concentration en ions argent. Le revêtement est différent selon la concentration utilisée. Des structures supplémentaires, préalablement identifiées lors du travail réalisé sur les poudres comme des phosphates d'argent, sont visibles sur les cubes traités avec la concentration d'argent la plus élevée.

Afin de déterminer plus finement où se situe l'argent, une cartographie EDX a été réalisée sur les échantillons traités avec la solution *Argent Maximum*. Les EDX des céramiques traitées en présence de solution Argent Minimum et Intermédiaire sont présentes en Annexe (3)

Ag Maximum

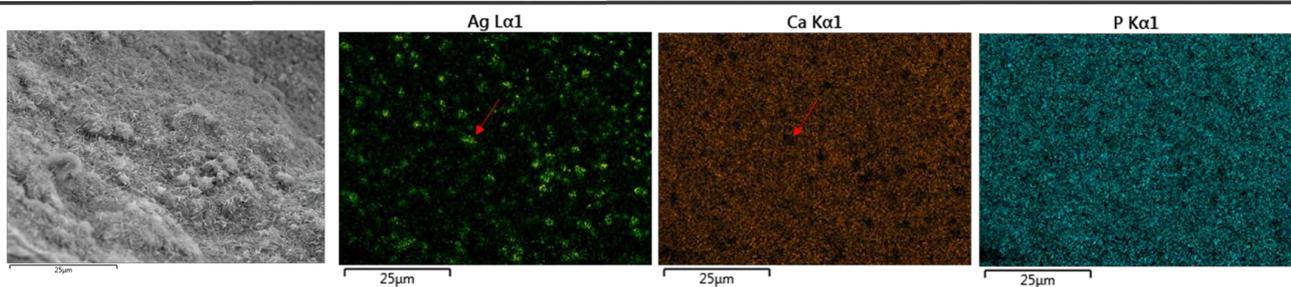


Figure 101 EDX des substituts poreux traités en présence de la solution Ag Maximum

Les mesures EDX ne permettent de constater la présence de phases riches en argent de taille significative que sur l'échantillon *Ag Maximum* (Figure 101). Alors que l'argent est visible sur l'ensemble de la surface, des zones très riches se dégagent. Elles sont également riches en phosphore mais contiendraient moins voire pas de calcium (flèches rouges sur la Figure 101). Ces cubes seraient donc bien des phosphates d'argent comme supposé d'après les essais préliminaires sur les poudres.

De la même manière que pour le zinc, afin de déterminer la concentration en argent des substituts, une méthode indirecte a été appliquée.

b. Quantification

Des mesures par ICP ont été réalisées sur le milieu utilisé avant et après traitement au CO₂ afin de quantifier la présence de calcium et d'argent dans cette solution. (Figure 102)

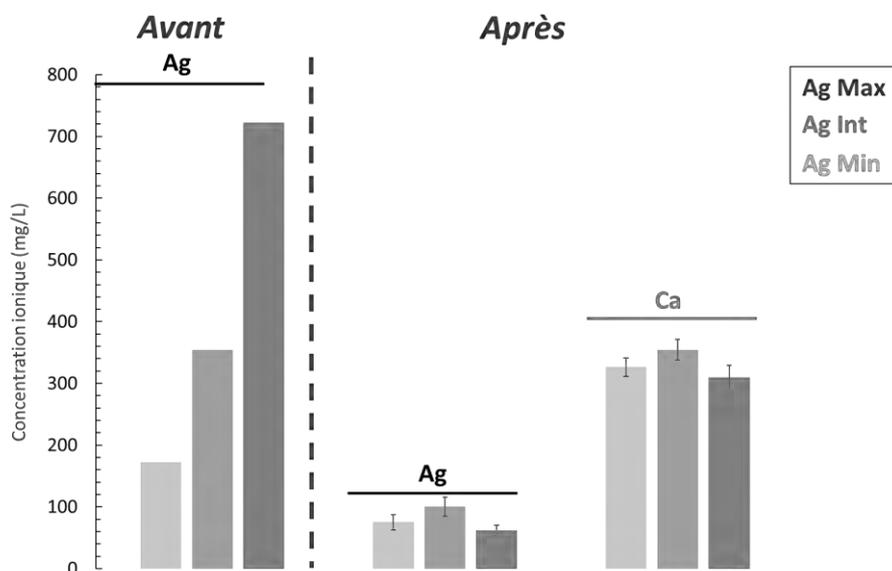


Figure 102 ICP du milieu aqueux utilisé avant traitement et après traitement avec les trois concentrations d'argent.

Une diminution importante de la concentration en argent est mesurée dans la solution de traitement après traitement au CO₂ haute pression. La diminution très importante de la concentration en argent post-procédé sur l'*Argent Maximum* pourrait être due à l'apparition de la phase supplémentaire de phosphate d'argent. Ici comme pour le zinc, du calcium est présent dans le milieu de traitement post-procédé, témoin de la dissolution de la céramique. La concentration initiale en argent ne semble ici pas avoir d'effet sur la concentration finale de calcium.

La quantité d'argent incluse dans les substituts a ainsi été déterminée à :

- 122,72±43,7 µg/g de céramique dans le cas d'*Argent Minimum*
- 436,36±75,95 µg/g de céramique dans le cas d'*Argent Intermédiaire*
- 1144,52±181,58 µg/g de céramique dans le cas d'*Argent Maximum*.

Les quantités incluses ici sont plus importantes que celles incluses dans le cas du Zinc, avec des valeurs doubles dans le cas des concentrations *Intermédiaire* et *Maximum*.

Des quantités très différentes d'argent ont ainsi pu être intégrées aux cubes de céramique en fonction de la concentration imposée au départ. Une étude de libération a de plus été menée afin de déterminer la quantité libérable.

c. Tests de libération

Les tests de libération ont été menés dans un milieu de type SBF dilué (SBF*0,9) (Figure 103). Ce test a uniquement été réalisé sur les échantillons traités avec la concentration *Minimum*.

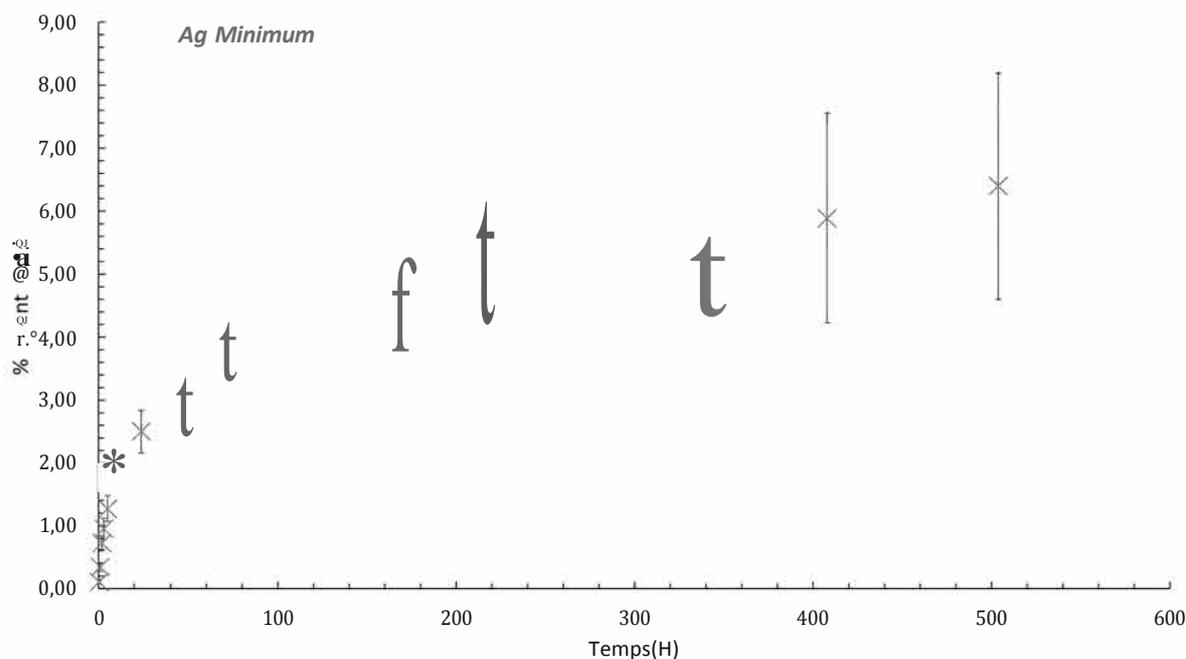


Figure 103 Test de libération dans SRP < 0,9 sur 3 semaines Argent Minimum

Bien que l'erreur soit importante pour les dernières valeurs en raison du protocole expérimental, une tendance se dégage. On constate tout d'abord qu'une libération très rapide d'argent a lieu dès les premières minutes du test de relargage. L'argent libéré au cours de cette phase, peut provenir de l'argent contenu dans la phase labile des nanocristaux biomimétiques de PCCA qui constituent le revêtement et qui seraient libérés par simple échange ionique avec les ions calcium contenus dans le milieu de libération. Il est possible qu'un mécanisme identique puisse aussi impliquer les phases de phosphate d'argent. Les quantités libérées par la suite proviennent très probablement de la dissolution progressive de nucléis de phosphate d'argent pouvant être présents à la surface du revêtement. A cela, nous devons ajouter les phénomènes de diffusion à travers les réseaux poreux (réseau nanoporeux de surfaces et réseau «macroporeux» constitué par le squelette céramique).

En fin de cinétique, après 3 semaines, seulement 6,5% de la totalité de l'argent inclus dans les céramiques est libéré. Le faible pourcentage d'argent libéré peut être expliqué par le fait qu'une partie des ions argent ont pu intégrer la phase cristallisée de la phase apatitique et seraient donc non échangeables par simples échanges ioniques et par le fait qu'une partie des ions argent libérés pourraient réagir avec les anions chlorure contenus dans la solution diluée de libération pour précipiter sous forme de chlorures d'argent insolubles dans ces conditions de pH.

Pour compléter cette étude et comme précédemment dans le cas des substituts dopés au zinc, des tests préliminaires antibactériens et sur des cellules osseuses (ostéoblastes) ont été faits sur les substituts dopés à l'argent.

d. Tests biologiques

Les tests antibactériens ont été réalisés sur les deux types de bactéries (gram + et -) préalablement employées dans cette étude : *E. coli* et *B. subtilis* (Figure 104, Figure 105).

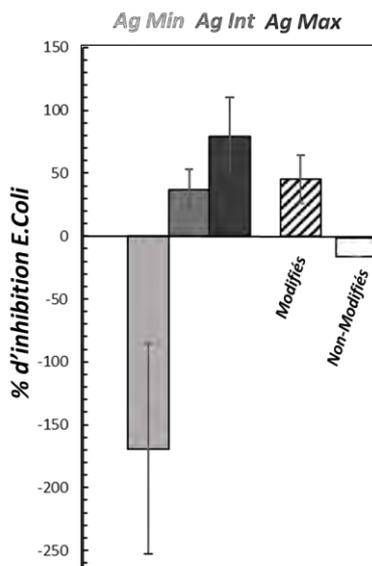


Figure 104 Tests antibactériens *E. coli* effectués sur Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum

L'argent est présenté dans la littérature comme possédant une activité antibactérienne notamment sur les bactéries *E. coli*³³⁷. Ces tests préliminaires ont ici permis de déterminer des tendances (Figure 104).

Les essais réalisés avec *E. coli* montrent des effets antibactériens qui dépendent de la concentration en ion argent. Ainsi, pour la concentration d'*Argent Minimum*, il semble que les matériaux n'inhibent pas la prolifération bactérienne mais au contraire aient tendance à l'augmenter. Des essais complémentaires et notamment de reproductibilité nécessitent d'être réalisés sur ce type de matériau. En revanche, pour les cubes traités avec argent intermédiaire et argent maximum, le pouvoir antibactérien augmente avec la concentration en argent contenu dans les céramiques traitées.

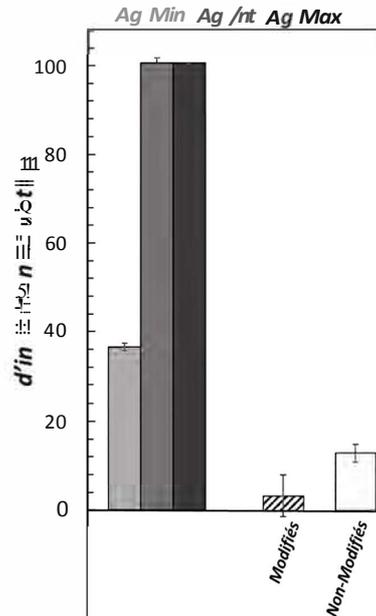


Figure 105 Tests antibactériens *B. subtilis* effectué sur le substitut non traité et Traités avec les 3 concentrations d'Argent.

Les essais menés sur *B. subtilis* (Figure 14) ont montré une activité antibactérienne nettement supérieure à celle observée précédemment avec *E. coli*. L'activité antibactérienne sur *B. subtilis* semble augmenter en rapport avec la concentration en argent incluse dans les substituts.

Les substituts traités obtenus ont ensuite été utilisés pour évaluer la viabilité et l'activité cellulaire des ostéoblastes (Figure 106). Leur viabilité a été mesurée à 3 et 7 jours. Le taux d'ALP exprimé, un des marqueurs de l'activité; a lui aussi été mesuré à 7 jours.

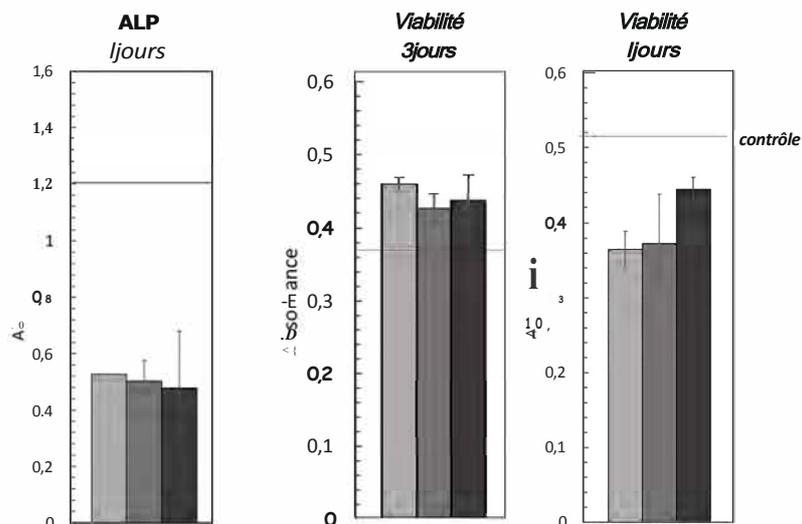


Figure 106 Tests cellulaires sur les ostéoblastes en présence d'Argent,

Si l'on compare les résultats obtenus avec les échantillons du contrôle, il semble que l'argent améliore la viabilité cellulaire à 3 jours indépendamment de la concentration en argent présente dans les cubes traités, alors qu'à 7 jours la viabilité des ostéoblastes semble inférieure à celle obtenue avec les cubes de céramique de référence traités à l'eau. Cependant, bien que des tendances soient observées, ces mesures n'ont pas montré de différences significatives d'après les essais statistiques de type ANOVA avec $p=0.05$. L'argent semble aussi impacter la quantité d'ALP exprimée. Elle est moins importante que dans le cas du contrôle. Cette baisse ne semble pas favorable à l'activité des ostéoblastes concernés. La concentration serait alors un facteur important pour ajuster les effets souhaités comme évoqué dans la littérature [10].

Si la viabilité et l'activité des ostéoblastes sont dépendants de la concentration, il serait souhaitable d'ajuster la concentration d'argent afin d'allier les effets antibactériens sur les bactéries gram + comme sur les bactéries gram -, et éviter toute diminution de la santé cellulaire.

Conclusion :

Cette étude a permis d'observer des modifications de surface induites par le traitement, indépendantes de la concentration en ions argent en présence. Cet élément ne semble pas perturber de manière significative (inhiber ou ralentir) la formation d'un revêtement lié à la précipitation de phases *a priori* phosphocalciques à la surface des substituts.

Des états de surface différents ont néanmoins été observés en fonction de la concentration initiale en acétate d'argent. Les mécanismes de dissolution/précipitation pourraient ainsi être similaires à ceux déjà discutés dans la Partie 3 (3.2.2). En effet, des morphologies très similaires à celles observées lors des traitements effectués à l'eau saturée de CO₂ ont été observées au MEB. Alors que des feuilletts rappelant l'OCP sont visibles sur les échantillons traités en présence d'*Argent Maximum*, une couche similaire à la PCCA des *Poudres Surfaces Maturées* (3.1.3.a) sont présentes sur l'*Argent Minimum*. En revanche, une phase supplémentaire de phosphate d'argent a clairement été observée pour les cubes traités dans la solution *Argent Maximum*. Cette phase est reconnaissable grâce à la forme cubique de ses cristaux (Figure 99). La concentration en argent élevée favoriserait en partie la précipitation de ces phases grâce au phosphore provenant des céramiques. Une fois de plus, le manque d'accès aux évolutions de pH et aux concentrations locales pendant le procédé est un frein à la compréhension des phénomènes de dissolution et précipitation qui ont lieu pendant les différentes étapes du procédé.

Des morphologies différentes ayant été observées, il pourrait être intéressant d'essayer de déterminer la nature de ces revêtements grâce à des mesures RMN du solide mais aussi d'échanges ioniques.

Enfin, l'activité antibactérienne a été mise en avant particulièrement pour les fortes concentrations. Cela ne semblant pas avoir d'effet notable sur les ostéoblastes, l'argent semble d'intérêt dans le cadre de notre étude, permettant à la fois un revêtement et une propriété antibactérienne importante.

Le tableau ci-dessous permet de résumer les informations essentielles tirées de l'étude de la modification des poudres et des cubes en présence d'argent grâce au procédé CO₂ haute pression :

Tableau 16 Tableau résumé des expériences en présence d'Argent. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence

			<i>Précipitation</i>	<i>Autre phase de dopant</i>	<i>Activité antibactérienne</i>		<i>Tests cellulaires</i>	
					Gram + (B.Sub)	Gram- (E.Coli)	Viabilité	ALP
Argent	Poudre	Fond	Faible (PCA)	Oui + concentration fortes (Ag Max, Int: Phosphate d'argent)				
		Surface	Forte (PCCA, OCP, ACP)	Oui Potentiellement intégré aux CaP précipités				
	Cube		Forte toutes concentrations	Oui (Ag Max)	++	~	=	-

4.3 Cuivre

Il est établi dans la littérature que le cuivre est un élément intéressant dans le domaine de la régénération osseuse. Il serait en effet, antibactérien, stimulant de l'angiogenèse et permettrait l'augmentation de la quantité d'ostéoblastes^{1,2,1,5}.

Le cuivre a ici été introduit sous forme d'acétate de cuivre dans la solution de traitement des poudres (HA/amTCP) dans un premier temps puis des cubes de céramique poreux. Trois concentrations : *Cuivre Minimum*, *Intermédiaire* et *Maximum* (Tableau 7, 2.2.1.b) ont été utilisées dans les deux cas et correspondent aux mêmes concentrations massiques d'espèces actives que dans le cas des autres éléments.

Afin de tenir compte des valeurs de pH des solutions utilisées, des mesures ont été réalisées sur les 3 solutions d'acétates non saturées en CO₂. Des simulations en utilisant PHREEQC ont également été faites pour déterminer le pH des solutions saturées en CO₂ utilisées pour le traitement à haute pression. Les valeurs sont représentées dans le Tableau 17.

Tableau 17 pH mesurés des solutions d'acétate de cuivre à différentes concentrations et pH calculés des mêmes solutions saturées en CO₂ à 40 °C et 80 bar

<i>Concentration en acetate (g/L)</i>	pH de la solution initiale mesuré	pH de la solution saturée en CO₂ calculé*
<i>Eau désionisée</i>	6,80	3,10
<i>Cuivre Minimum</i>	6,17	3,61
<i>Cuivre Intermédiaire</i>	6,24	3,84
<i>Cuivre Maximum</i>	6,14	4,06

* simulations réalisées à partir d'eau à pH 7

La simulation permet de constater une augmentation du pH de la solution saturée en CO₂ en rapport avec l'augmentation de la concentration en cuivre dans le milieu. Cette augmentation du pH pourrait induire un retard et une diminution des phénomènes de dissolution de la céramique au cours du traitement lorsque la concentration en acétate de cuivre augmente dans la solution de traitement. Ce paramètre sera à prendre en considération dans l'analyse des résultats autant sur les poudres que sur les substituts.

Comme avec les autres espèces, une première étude a été menée sur les céramiques sous forme de poudres.

4.3.1 Poudres

De la même manière que pour les espèces précédentes, la possibilité de modifier un mélange de poudre HA/amTCP a d'abord été étudiée. Les quantités de *Poudre Surface*, observées après traitement à la surface de la solution de traitement sont ici aussi faibles et impossibles à prélever. Cette quantité de *Poudre Surface* n'étant ici non plus pas assez importante pour être prélevée, une seule poudre récoltée après séchage (correspondant à un mélange *Poudre Fond* et *Poudre Surface*) a été analysée.

Les trois poudres *Cuivre Maximum*, *Intermédiaire* et *Minimum*, ont été caractérisées avec plusieurs techniques permettant d'identifier des similarités ou non avec les expériences précédemment menées sur les poudres modifiées en présence d'eau seule, de zinc ou encore d'argent.

Des analyses DRX ont d'abord été réalisées (Figure 107).

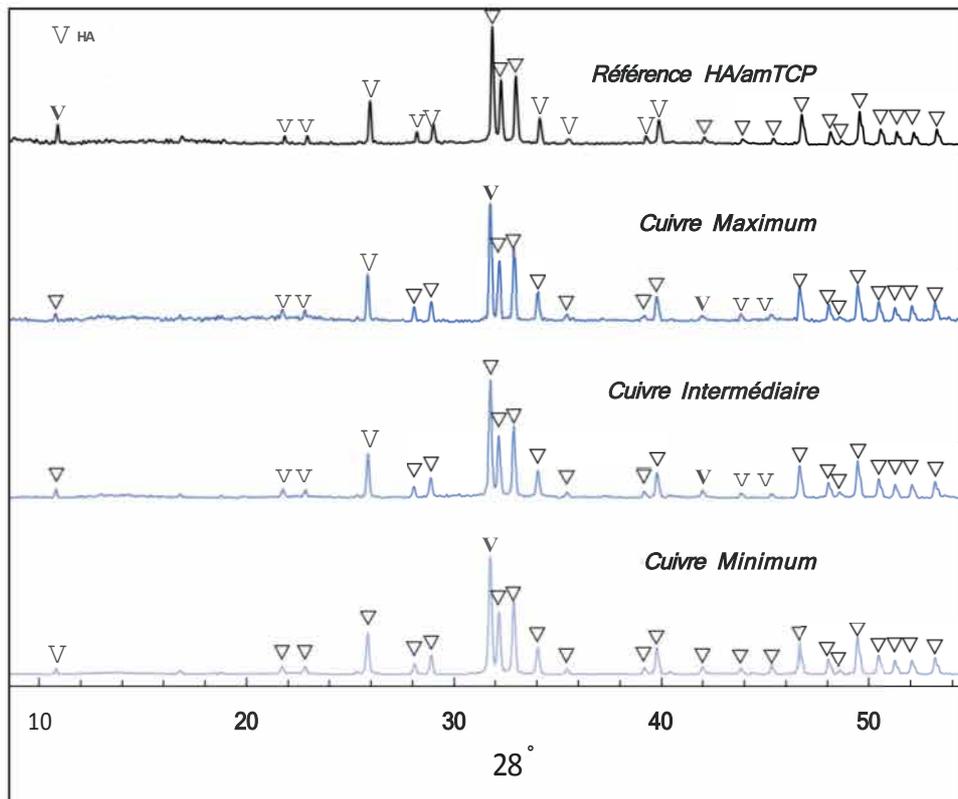


Figure 107 DRX Référence HA/amTCP et poudres traitées avec les trois concentrations de Cuivre.

Comme déjà observé précédemment, la référence étant un mélange d'HA/amTCP, seule la phase HA bien cristallisée présente dans ce mélange est visible sur les diagrammes de diffraction des RX.

Quelle que soit la concentration d'acétate de cuivre utilisée pour le traitement, aucune nouvelle phase n'est détectée. Si l'absence de nouveaux pics en DRX ne signifie pas forcément l'absence totale de nouvelle phase, cela signifie au moins que l'éventuelle phase annexe est en trop faible quantité pour être détectée ou dans un état cristallin (mal cristallisé ou amorphe) qui ne favorise pas sa détection.

Les spectres FTIR sont présentés sur la Figure 108.

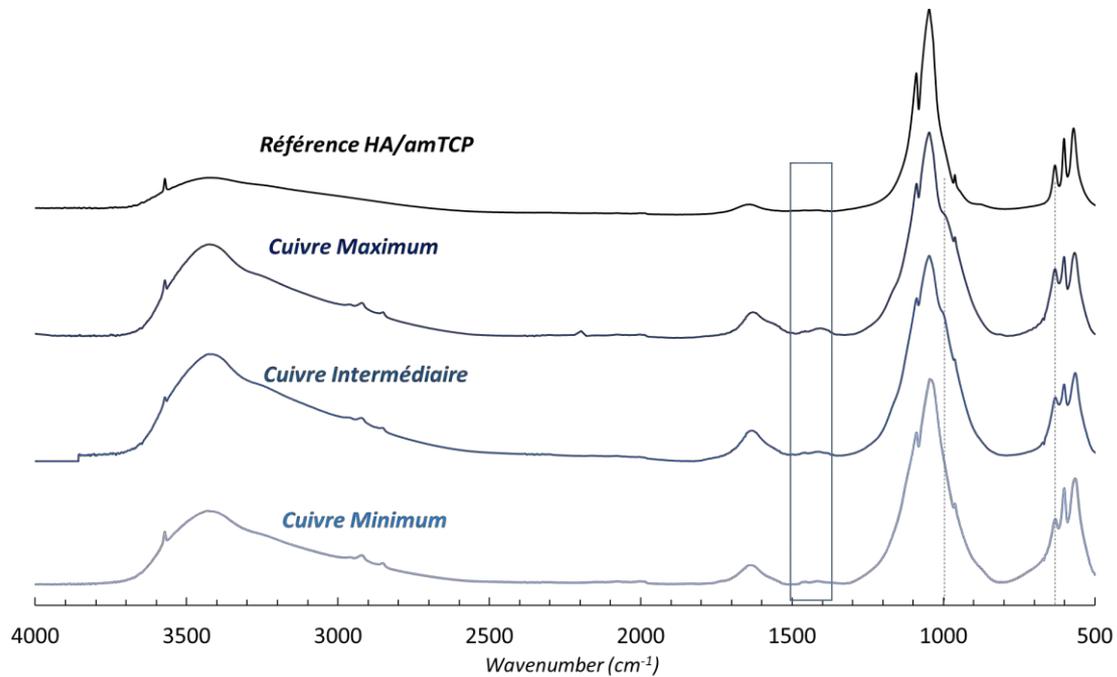


Figure 108 Spectres FTIR des poudres Non Traitées et Traitées en présence de Cuivre.

Conformément à ce qui a déjà été observé précédemment, en raison de l'état amorphe de la phase TCP, le spectre du mélange non traité est caractéristique de celui obtenu pour une hydroxyapatite. En revanche, les spectres des échantillons obtenus en présence des concentrations *Maximum*, *Intermédiaire* et *Minimum* montrent quelques différences. Ainsi, un relief notable est visible dans la zone des $\nu_3 \text{CO}_3$ (1500-1400 cm^{-1}) correspondant aux bandes caractéristiques des carbonates de type A et B déjà discutées lors des traitements effectués sur les poudres dans l'eau saturée par du CO_2 . Ces bandes avaient déjà été attribuées à la précipitation de PCCA après traitement (3.1.3). L'élargissement des bandes $\nu_3 \text{PO}_4$ pourrait également être le signe de la présence d'une phase apatitique mal cristallisée.

De plus, une bande supplémentaire dans la zone des $\nu_1 \text{PO}_4$ de l'hydroxyapatite autour de 1000 cm^{-1} est également visible. Cette bande est d'autant plus importante que la concentration de cuivre initiale est élevée. Une déformation de la zone des $\nu_4 \text{PO}_4$, (700-500 cm^{-1}) est aussi présente sur les trois spectres. Cette modification apparaîtrait également comme dépendante de la concentration initiale en cuivre.

Il est possible qu'une phase riche en phosphate et en cuivre ait précipité en quantité insuffisante ou dans un état cristallin qui ne permet pas sa visualisation par DRX. La présence d'une phase de phosphate de cuivre supplémentaire comme de la Libethenite, $\text{Cu}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})$ aux bandes caractéristiques : 941, 951, 1049 cm^{-1} et 634 et 615 cm^{-1} n'est pas à exclure⁹.

Ces poudres ont par la suite été observées au JEI3. Les images sont présentées sur la Figure 109.

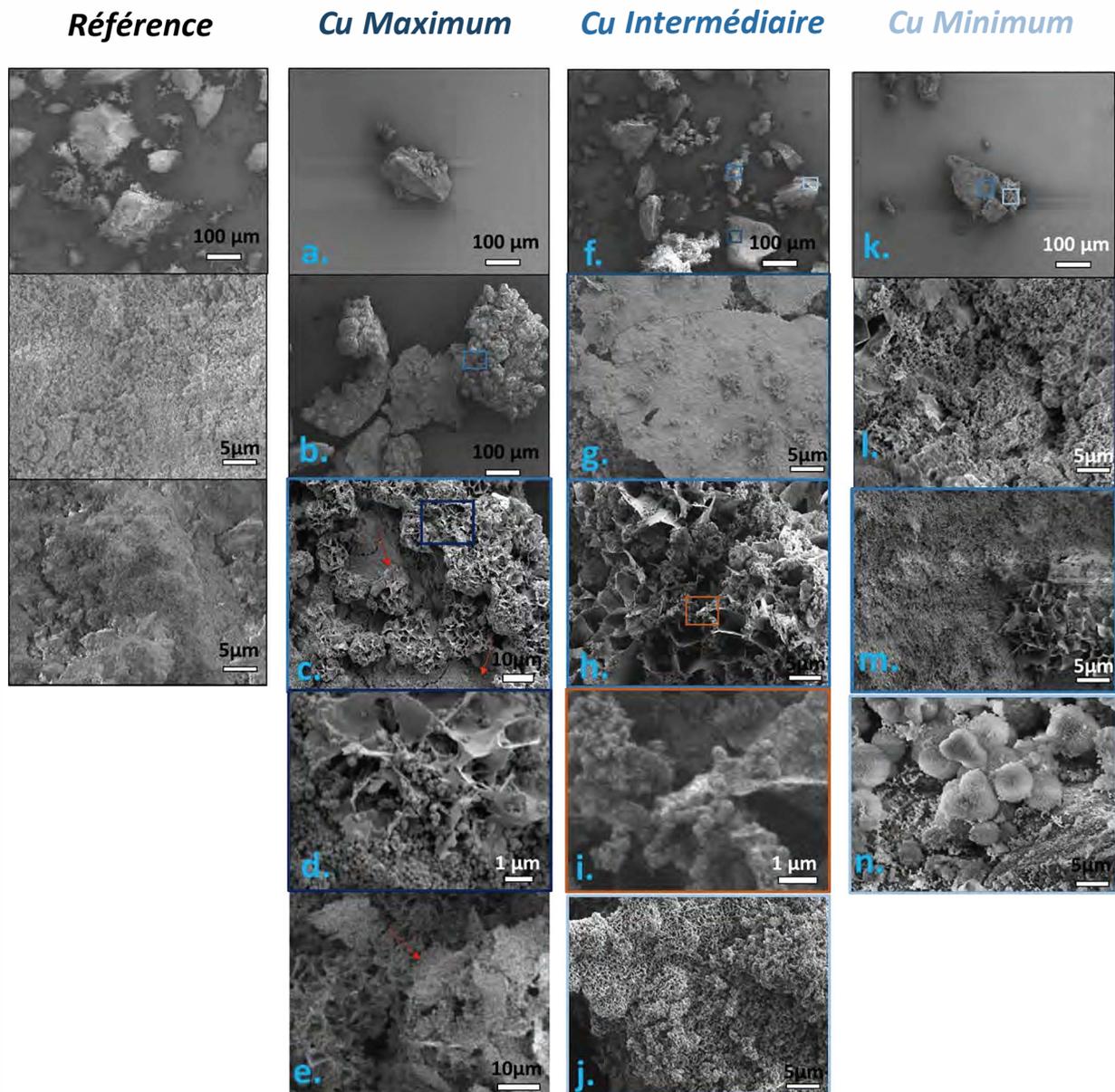


Figure 109 Images SEM de la poudre de référence et des poudres dopées au Cuivre

Les images SEM des poudres modifiées montrent des structures similaires quelle que soit la concentration en cuivre utilisée durant le traitement.

Des grains de taille et d'aspect identiques à l'HA initiale sont visibles (a., e., j. Figure 109). Des structures en « roses des sables » sont parfois visibles à leur surface (j. Figure 109). Ces formes ont été identifiées dans la littérature comme pouvant être des phosphates de cuivre $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$. Elles se formeraient à pH proche de 7. Cela pourrait être en cohérence avec l'élargissement des bandes phosphates observé sur les spectres FTIR.

De plus, des plaques ayant à la fois une face lisse et une face rugueuse sont également présentes à chaque concentration (b., c., f., g., h. Figure 109). La face rugueuse de ces plaques semble provenir d'une coalescence des structures en « roses des sables » identiques à celles présentes de manière éparse sur les grains d'HA. La formation de plaques par coalescence de structures éparées a déjà été observée sur la *Poudre Surface* des poudres traitées à l'eau saturée de CO_2 . On peut noter que ces plaques sont plus importantes à faibles concentrations qu'à forte concentration de cuivre dans le milieu mais que les sphères composant ces plaques sont plus visibles, mieux définies et plus nombreuses qu'à concentration moindre.

Enfin, des sphères de quelques centaines de nanomètres (environ $0,3 \mu\text{m}$) sont visibles un peu partout sur les différentes morphologies observées, notamment sur les « roses des sables » (d.; i. Figure 109), allant parfois jusqu'à les recouvrir (flèche orange; d. Figure 109).

Afin de localiser le cuivre au sein de ces poudres, une cartographie EDX a été réalisée (Figure 110).

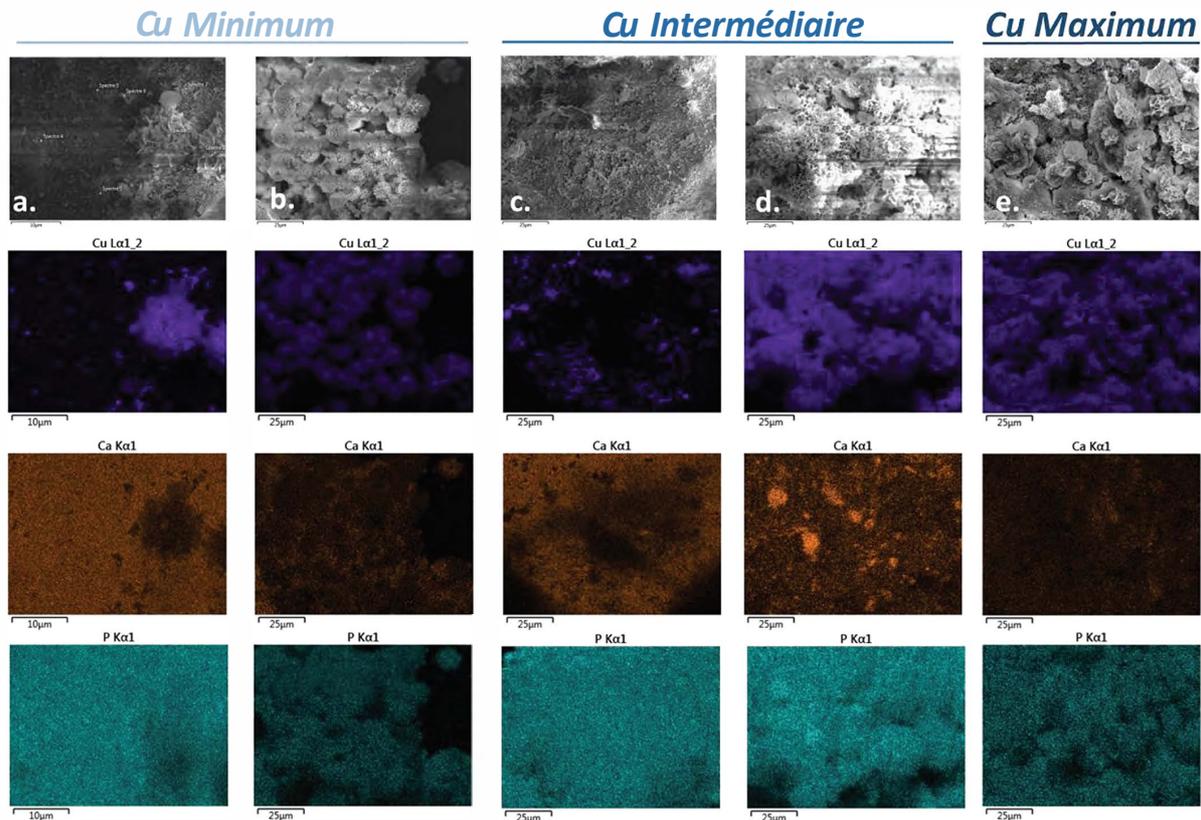


Figure 110 Cartographie EDX des poudres modifiées Cuivre : maximum (e. plaques précipitées), Intermédiaire (c. grains avec des petites sphères, d. plaques précipitées) et Minimum (a. grains avec roses des sables, b. plaques précipitées)

Les cartographies EDX permettent de confirmer la présence de cuivre sur les poudres traitées. Les structures identifiées comme des « roses des sables » sur les trois types de poudre sont en effet riches en cuivre (a., b., c., d., e. Figure 110). Les roses des sables identifiées au MEE contiennent moins de calcium que les grains sur lesquels elles reposent (a., c. Figure 110). Les plaques précipitées correspondant à des *Poudres Surface* sont riches en cuivre et des nuances de concentration en calcium sont ici aussi visibles. Les roses des sables en contiendraient moins, mais certaines phases pouvant être phosphocalciques ressortent également (d. Figure 110)

Les analyses EDX ont, comme sur les poudres dopées au zinc et à l'argent, permis d'identifier des structures riches en cuivre, potentiellement des phosphates, que ce soit des cristaux de petite taille à la surface des grains initiaux ou sous forme de « roses des sables ». Les analyses DRX n'ont, elles, pas montré la présence d'autres phases bien cristallisées particulières alors que les analyses par spectroscopie FTIR ont souligné la potentielle présence de PCCA mais aussi celle d'autres phases phosphatées (de calcium ou de cuivre). Des analyses Raman permettant de cibler les différentes structures identifiées grâce au MEB comme pouvant être plutôt issu de la *Poudre Fond* ou de la *Poudre Surface*, ont été réalisées afin d'analyser plus finement les différentes phases présentes (Figure 111).

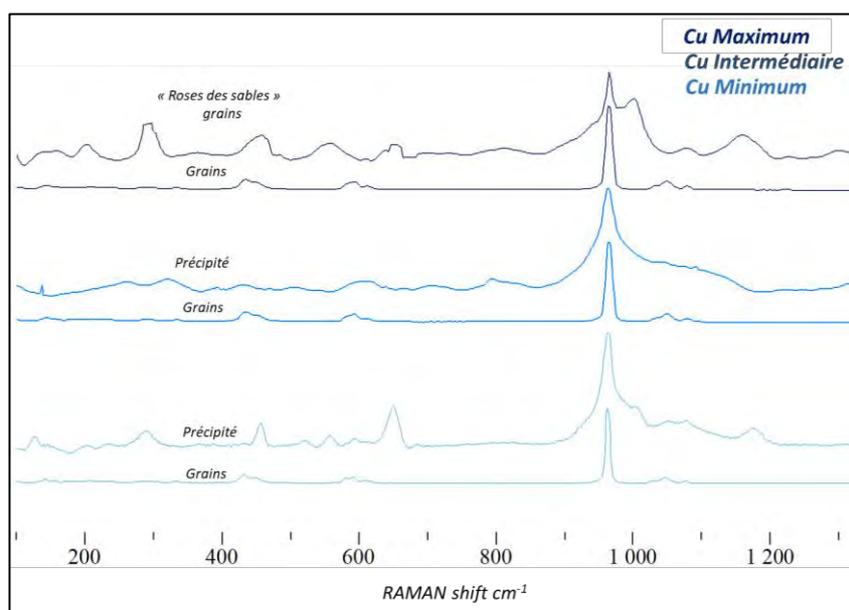


Figure 111 Spectres RAMAN de la partie « précipitée » des poudres traitées en présence de cuivre.

Les analyses RAMAN effectuées sur les larges grains observés pour tous les échantillons traités ont permis de confirmer qu'il s'agit bien de la phase HA bien cristallisée initiale non dissoute. Les analyses effectuées sur les plaques de précipité font apparaître, quelle que soit la concentration en cuivre utilisée, un mélange entre une phase apatitique (identifiable grâce à la bande ν_1 PO_4 à 961 cm^{-1}) et des phases riches en cuivre.

Des mesures sur les plaques identifiées comme provenant des *Poudres Surface* ont permis de constater l'apparition de phases cuivrées.

Une phase supplémentaire de phosphate de cuivre hydroxylée est visible sur les précipités dans le cas des expériences réalisées aux concentrations *Maximum*, *Intermédiaire* ainsi que *Minimum* via un élargissement important de la bande l'apatite à 961 cm^{-1} ainsi que l'apparition de bandes très larges autour de $1050\text{-}1020 \text{ cm}^{-1}$ dont l'intensité augmente lorsque la concentration en cuivre augmente. Ce phosphate de cuivre pourrait être de la libethenite ($\text{Cu}_2\text{PO}_4\text{OH}$) aux bandes caractéristiques suivantes : ν_3 1050 et 1019 cm^{-1} , ν_1 975 cm^{-1} , ν_4 $645, 626, 582, 556$, ν_2 450 cm^{-1} et des bandes non assignées telles que $862, 815 \text{ cm}^{-1}$ ou un phosphate de cuivre hydraté du type ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}$) caractérisé par les bandes (994 cm^{-1} ν_1 PO_4 , $646\text{-}553 \text{ cm}^{-1}$ ν_4 PO_4 , 450 cm^{-1} ν_3 PO_4). Ces derniers ont montré dans la littérature des morphologies en rose des sables similaires à celles observées ici³⁴¹. Une bande à 950 cm^{-1} qui diminue lorsque la concentration en cuivre augmente évoque également la présence d'une phase d'ACP.

Les faibles décalages RAMAN sur les roses des sables *Maximum* et *Précipité Intermédiaire* pourraient montrer la présence d'oxydes de cuivres : la cuprite, Cu_2O ($218, 195, 186 \text{ cm}^{-1}$) et la tenorite CuO ($294, 334 \text{ cm}^{-1}$). Ces phases se formeraient à des pH proches de 7³⁴². Dans le système présent, ils pourraient se former lors de la remontée en pH ou grâce à des changements de pH locaux, par exemple grâce à la dissolution de

la céramique. D'après la littérature, ces phases pourraient être reliées à la morphologie sphérique de quelques nanomètres observée ici ³⁴³ .

Conclusion :

L'étude menée sur les poudres traitées en présence de cuivre a montré la possibilité d'obtenir une modification de ces poudres ainsi que de précipiter de nouvelles phases riches en cuivre. La concentration de la solution de traitement semble avoir un effet, notamment sur la présence d'ACP.

Malgré l'absence de nouvelle phase identifiable par DRX, et d'après les données recueillies dans la littérature et les cartographies réalisées en EDX, il est très probable que les structures en « roses des sables » correspondent à une phase de libethenite (phosphate de cuivre). Par ailleurs, sa quantité augmente en rapport avec la concentration en cuivre utilisée pour réaliser le traitement.

Dans la littérature, la libethenite, a été détectée lors de l'étude de la synthèse d'hydroxyapatite dopée au cuivre synthétisée par double décomposition. Au-delà d'une certaine concentration en cuivre dans la solution de synthèse, l'apparition de cette phase a été observée ¹⁴ⁱ .

Les nouvelles phases constatées pourraient être d'intérêt compte tenu de leur activité antibactérienne , la libethenine ayant notamment montré son efficacité sur les bactéries de gram négatif comme *Escherichia Coli*¹⁴⁴. En revanche la présence d'oxydes en trop grande quantité pourrait avoir un aspect inflammatoire et porter atteinte à l'intégrité des cellules environnantes dans le cas d'implantation ³⁴⁵.

4.3.2 Cubes de céramique

De la même manière que pour les espèces précédentes, le but de l'étude étant de doper des substituts céramiques tout en modifiant leur surface, des essais sur des cubes d'HA/ β TCP ont été réalisés en présence de cuivre aux trois concentrations précédemment utilisées. Ici aussi, des images MEB ainsi que des mesures de surface spécifique et de porosimétrie à mercure ont d'abord été menées afin de constater d'éventuelles différences de morphologies.

a. Caractérisation

Les images MEB permettent de mettre en évidence des modifications qui dépendent de la concentration en cuivre utilisée (Figure 112).

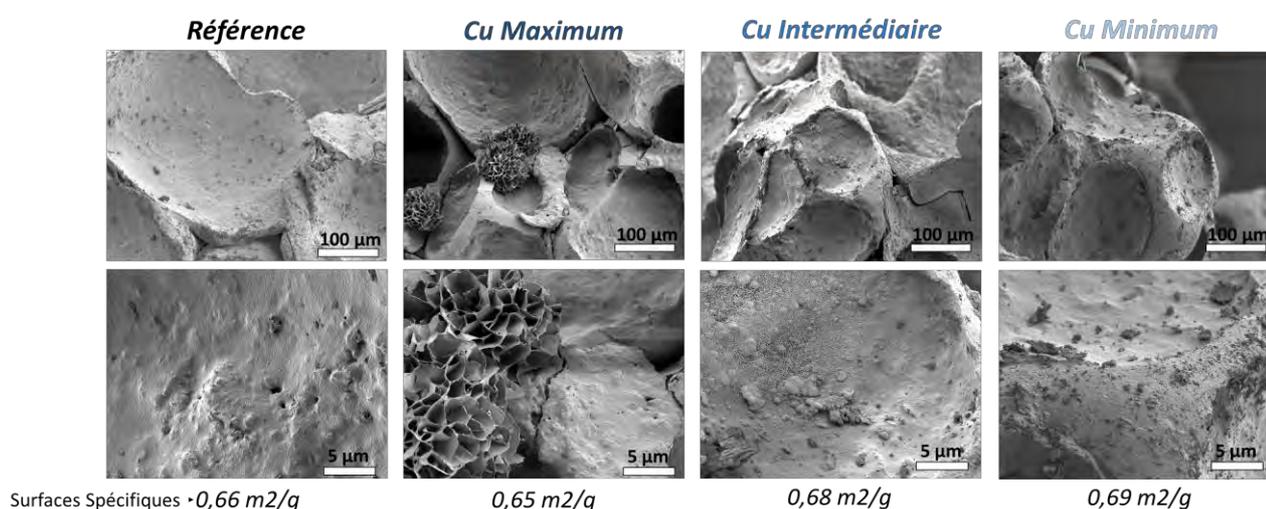


Figure 112 Images MEB des Cubes de référence et des cubes traités en présence de cuivre aux trois concentrations.

Les échantillons obtenus après traitement dans la solution de *Cuivre Maximum* ne montrent pas des phénomènes importants de dissolution. En revanche des structures en « roses des sables » de taille importante et précédemment identifiées comme correspondant à du phosphate de cuivre sont dispersées un peu partout à la surface du substitut.

Les cubes traités dans la solution de concentration *Intermédiaire* montrent certaines zones couvertes d'un précipité très similaire à celui vu précédemment sur les substituts modifiés sans espèces actives (3.2.2). Néanmoins, ce revêtement ne recouvre pas la surface externe des cubes.

Les substituts traités dans la solution de concentration *Minimum* sont partiellement dissous en surface et malgré la présence de précipité, le revêtement semble épars comparé aux observations faites en l'absence de cuivre.

Les surfaces spécifiques des céramiques modifiées ne sont pas significativement différentes.

Des mesures de porosimétrie à mercure (Figure 113) ont permis de compléter l'analyse morphologique des substitués.

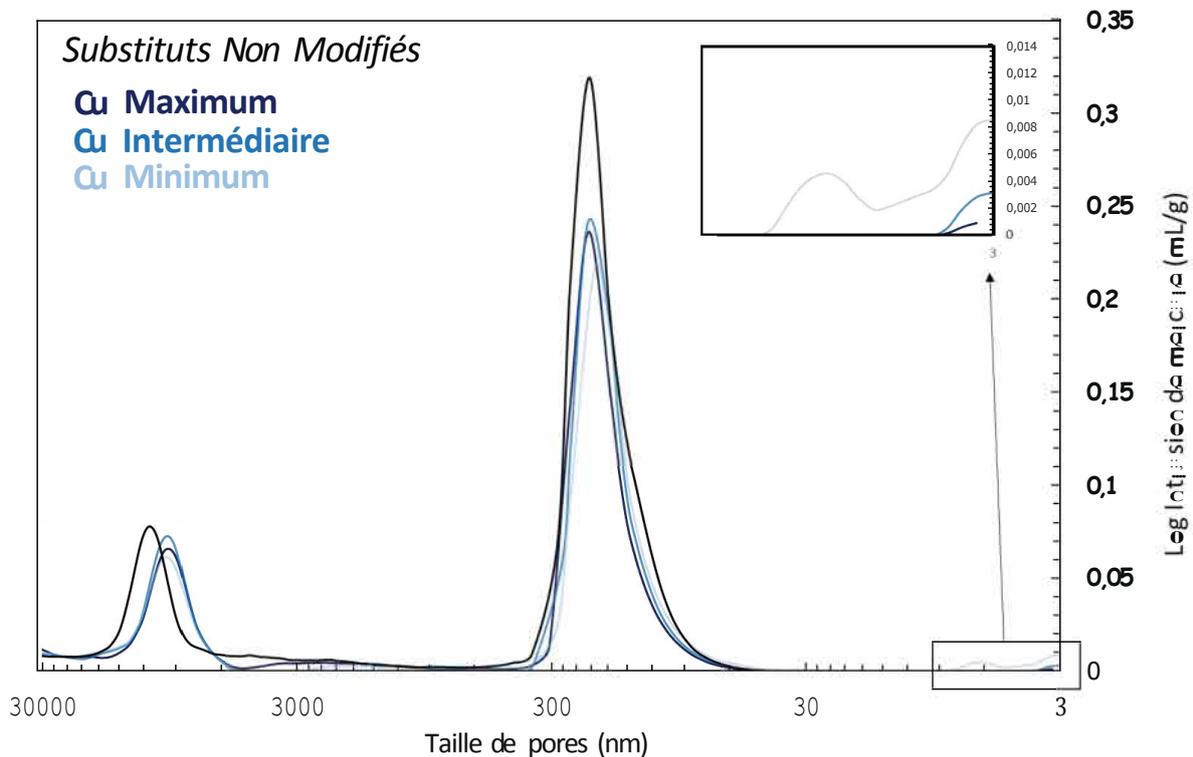


Figure 113 Porogrammes des cubes non traités et traités en présence de cuivre aux trois concentrations.

La porosité sur la zone 1000-10000 nm est décalée vers des diamètres de pores inférieurs pour les substitués traités. En revanche, pour les porosités comprises entre 10-10000nm, seule la bande correspondant aux échantillons traités en présence de la concentration *Minimum* est décalée vers des diamètres de pores plus petits, indiquant une diminution de leur diamètre suite au traitement effectué.

De plus, seul cet échantillon fait apparaître la création marquée d'une nanoporosité dont les diamètres sont inférieurs à 10nm. En effet, les échantillons traités avec des concentrations *Intermédiaire* et *Maximum* présentent la création d'un réseau nanoporeux extrêmement faible qui diminue lorsque la concentration en cuivre augmente.

Cette dernière observation permettrait de confirmer le caractère inhibiteur du cuivre qui inhibe la formation d'un revêtement nanoporeux lorsque la quantité de cuivre augmente.

Des cartographies EDX ont permis, ici aussi, d'identifier les structures riches en cuivre (Figure 114).

Cu Maximum

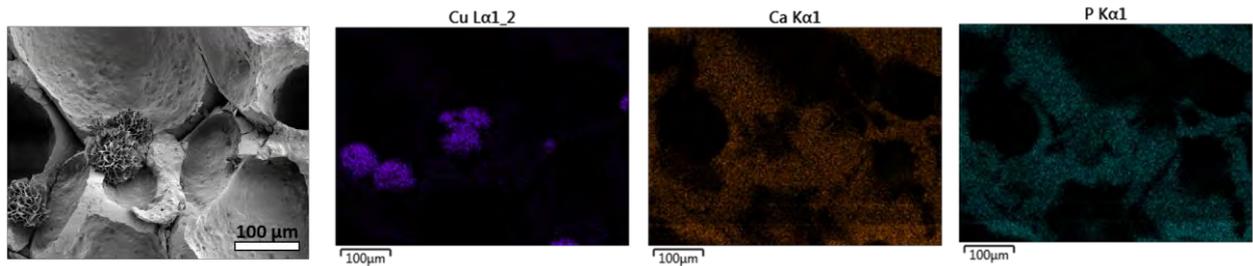


Figure 114 EDX des substituts poreux modifiés avec la concentration Cuivre Maximum

Alors que les échantillons issus des expériences *Cuivre Intermédiaire* et *Minimum* ne présentent pas de quantité de cuivre détectables à l'EDX (Annexe 0), le *Cuivre Maximum* montre des structures très visibles, riches en cuivre : ce sont les structures présentées sous forme de « roses des sables », déjà observées au MEB. Ces dernières sont principalement composées de cuivre et de phosphore et paraissent déficientes en calcium. Il est probable que ce soient des phosphates de cuivre comme identifiées lors du travail réalisé sur les poudres traitées en présence de cuivre.

Afin d'établir un lien entre les concentrations imposées initialement en cuivre et les quantités finalement intégrées, des mesures ont été réalisées.

b. Quantification

De la même manière que pour les autres espèces utilisées, des dosages du cuivre et du calcium ont été réalisés par ICP sur les solutions de traitement avant et après avoir effectué la modification des cubes (Figure 115).

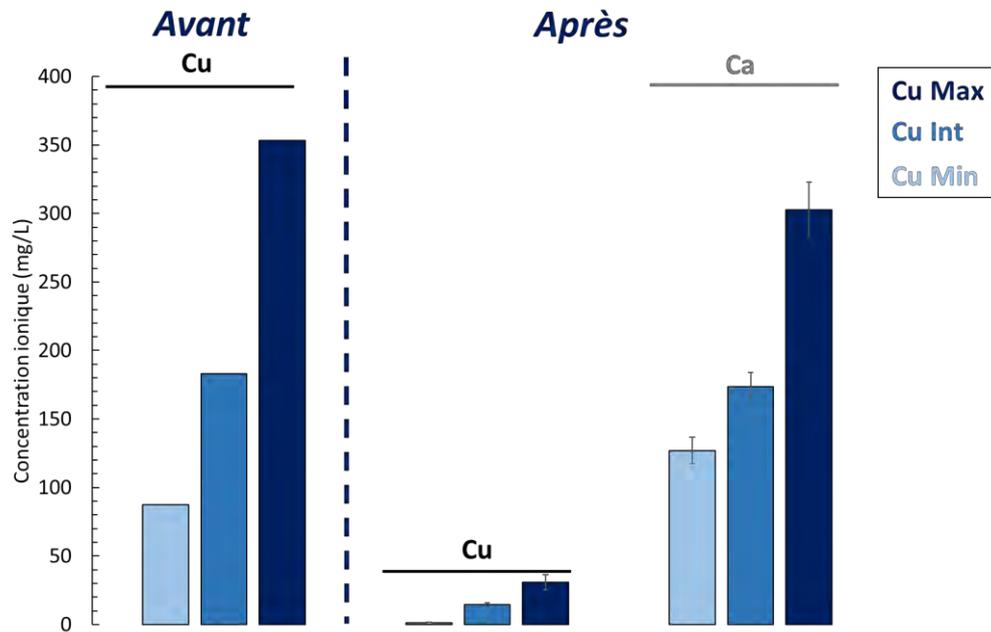


Figure 115 Dosages par ICP du milieu aqueux utilisé lors du procédé pour les trois concentrations en cuivre.

Ces mesures montrent bien une diminution importante de la concentration du milieu en cuivre après le procédé CO_2 haute pression. Plus la solution de traitement est riche en cuivre, plus la quantité incluse dans la céramique est importante.

Cette forte diminution du cuivre post-traitement est à mettre en regard avec l'augmentation du calcium libéré dans le milieu. La présence globale de calcium dans le milieu post procédé témoigne en partie de la dissolution des céramiques. Il est cependant impossible d'évaluer la quantité dissoute étant donné que des phases, *a priori* phosphocalciques, précipitent également. Néanmoins, si la quantité de cuivre consommée au cours du traitement est liée à la précipitation de phosphates de cuivre, il semble qu'une grande quantité de calcium reste disponible dans la solution post-traitement et par conséquent soit non-consommée par la précipitation de nouveaux revêtements phosphocalciques.

Grâce à des quantifications ICP répétées lors de la fin des expériences de libération, la quantité de cuivre insérée dans les cubes a été déterminée précisément :

- $157,17 \pm 3,73$ $\mu\text{g/g}$ de céramique pour la concentration *Cuivre Minimum*
- $346,52 \pm 9,61$ $\mu\text{g/g}$ de céramique pour la concentration *Cuivre Intermédiaire*
- $563,51 \pm 8,98$ $\mu\text{g/g}$ de céramique pour la concentration *Cuivre Maximum*

Ces valeurs confirment que plus la quantité de cuivre imposée en début de procédé est importante, plus la quantité de cuivre incluse au sein des substituts est grande.

Une inclusion de cuivre a donc bien été observée suite au traitement des céramiques par le procédé CO₂ haute pression. Afin de déterminer la cinétique de libération du cuivre inclus à la surface des céramiques, une étude de libération a été réalisée.

c. Test de libération

La libération a été réalisée dans un milieu dilué de SBF et les quantités de cuivre libérées dans le milieu ont été dosées par ICP. Ces études ont été réalisées uniquement sur les échantillons traités dans la solution *Cuivre minimum* (Figure 116).

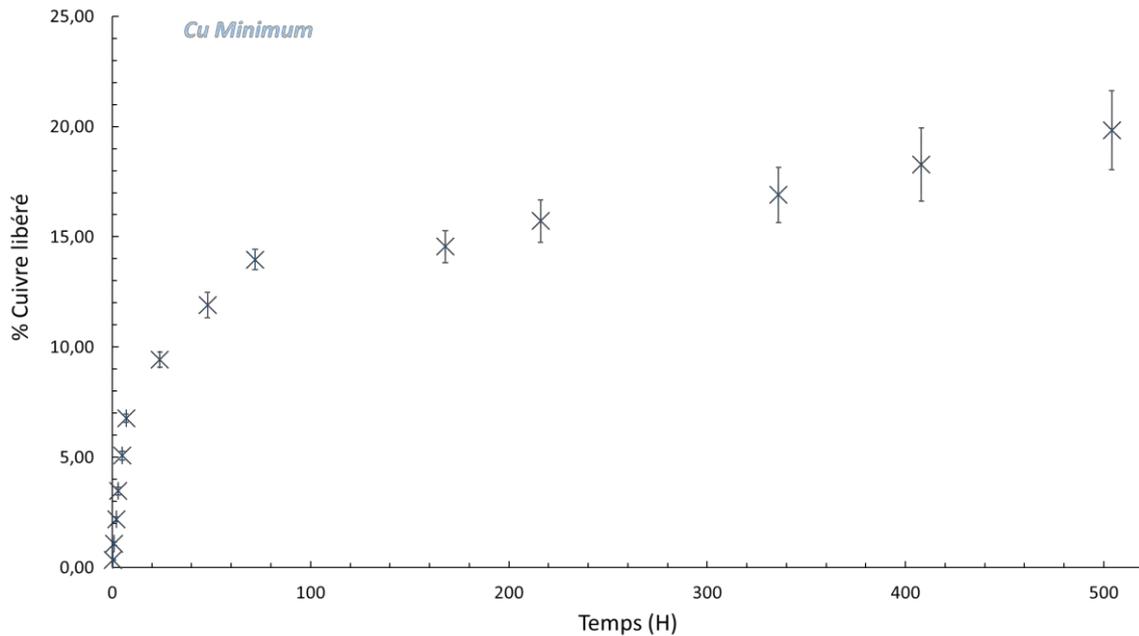


Figure 116 Test de libération dans SBF 0,9 sur 3 semaines Cuivre Minimum

Le profil de libération des échantillons contenant la plus faible quantité de cuivre (*Cuivre Minimum*) montre, comme dans le cas des autres espèces, différentes phases de libération. Une libération très rapide semble se produire dans les premières heures, puis elle semble plus lente jusqu'à 72H où elle ralentit de nouveau sans pour autant atteindre un plateau. Jusqu'à 20% du cuivre inclus dans les substituts est libéré au bout de trois semaines. Ceci est plus important que les espèces *Minimum* étudiées jusqu'à présent (zinc et argent).

Ces différents niveaux de libération pourraient être le reflet d'inclusions à différents niveaux du cuivre dans le substitut.

Le précipité présent sur le *Cuivre Minimum* rappelant celui constaté sur les substituts modifiés sans espèces ioniques, pourrait être de nature apatitique. Ainsi la libération rapide de cuivre observée dès les premières heures serait liée à des phénomènes d'échanges cationiques entre le cuivre contenu dans la couche labile des phases apatitiques fraîchement formées et le calcium contenu dans la solution de SBF. Le cuivre introduit

dans la structure cristallisée de l'apatite serait alors inaccessible aux échanges mais sera libéré *in vivo* par l'action des ostéoblastes. En plus de ces possibles échanges cationiques, il est possible que cette libération très rapide dans les premières heures soit l'expression de la dissolution de phases moins bien cristallisées, comme des cristaux de phosphates ou oxydes de cuivre.

La libération plus lente du cuivre observée par la suite ne peut être expliquée que par des phénomènes de dissolutions progressives des phases phosphatées riches en cuivre. La vitesse de libération du cuivre étant alors en rapport avec la solubilité des phases présentes. Ces mécanismes restent néanmoins purement hypothétiques puisque les phases riches en cuivre n'ont pu être clairement identifiées et par voie de conséquence leur solubilité dans le milieu de libération reste inconnue. A ces phénomènes doivent s'ajouter des mécanismes de diffusion des espèces ioniques libérées, dans les réseaux nanoporeux comme dans les réseaux « macroporeux » des céramiques, ces espèces ayant une cinétique de libération plus lente.

d. Activités biologiques

Différents types de tests biologiques ont été effectués sur les cubes dopés au cuivre. Les résultats sont présentés sur la Figure 117, Figure 118 et Figure 119.

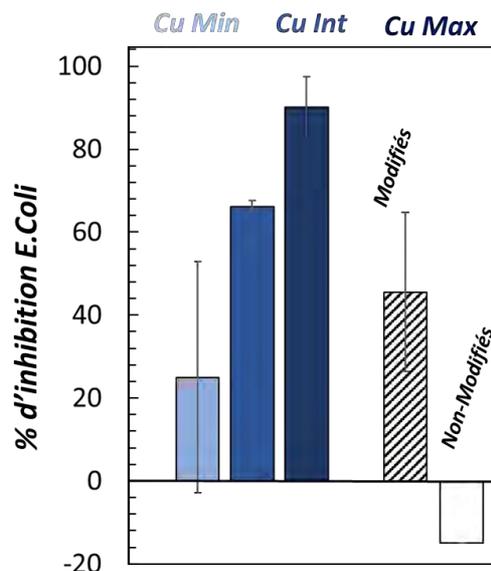


Figure 117 Tests antibactériens sur *E. coli* effectués avec les cubes traités avec les trois concentrations de cuivre.

Quelle que soit la concentration en cuivre, les substituts montrent un taux d'inhibition positif sur *E. coli* (Figure 117). La capacité antibactérienne semble liée à la concentration en cuivre de ces derniers : elle est d'autant plus importante que la concentration en cuivre augmente. Le *Cuivre Minimum* possède néanmoins une activité antibactérienne qui semble inférieure à celle observée sur les cubes traités dans l'eau saturée en CO₂.

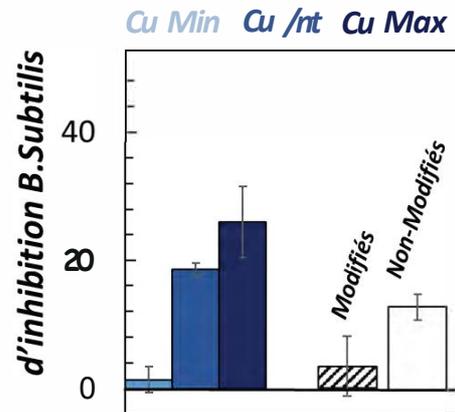


Figure 118 Tests antibactériens sur *B. subtilis* effectués avec les cubes traités avec les trois concentrations de cuivre.

Dans le cas de *B. subtilis*, les cubes traités dans la solution de concentration *Minimum* ainsi que les cubes traités dans l'eau saturée en CO₂ montrent une activité moins importante que les cubes non traités. En revanche pour les cubes traités aux autres concentrations en cuivre, l'activité antibactérienne croît avec la concentration.

Les échantillons dopés au cuivre montrent un taux d'inhibition moins élevé sur *B. subtilis*, bactérie à gram + que sur *E. coli*. Ici aussi la concentration initiale en cuivre aurait un impact. Plus cette dernière est importante, plus l'activité est marquée. Le *Cuivre Minimum* a cependant une activité moins importante que les substituts non *Modifiés*. Ces tests ont permis de dégager des tendances qui seront à confirmer par des tests supplémentaires.

Finalement, des tests de viabilité cellulaire, et d'évaluation du marqueur de leur activité ont été réalisés (Figure 119).

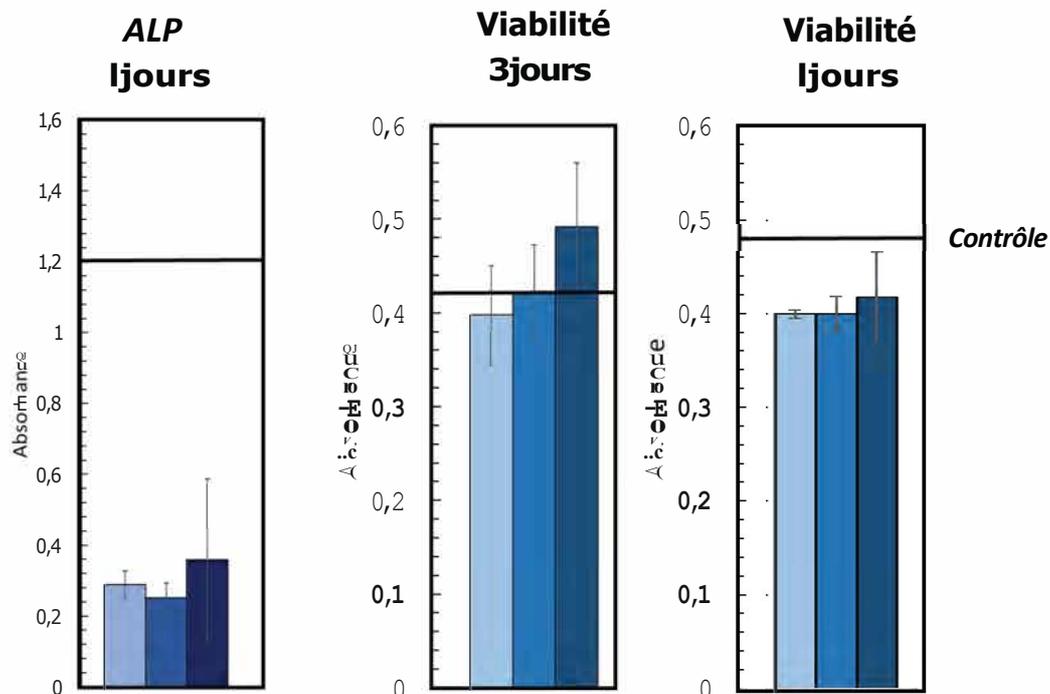


Figure 119 Tests cellulaires sur les céramiques traitées avec les trois concentrations de cuivre.

Les résultats des tests cellulaires montrent des variabilités importantes (Figure 119). Alors que la viabilité cellulaire des échantillons à 3 jours semble augmenter avec la concentration en cuivre, à 7 jours la viabilité des ostéoblastes apparaît comme étant indépendante de la concentration en cuivre et dans tous les cas, moins bonne que celle observée sur le contrôle. Il est possible que, la libération continuant après 3 jours, la concentration en cuivre à 7 jours, plus importante, soit trop forte et en devienne létale pour les cellules. Cependant, il faut noter que les tendances observées n'ont pas été confirmées *via* les tests statistiques, ne montrant aucune différence significative avec le contrôle quant à leur viabilité.

La quantité d'ALP serait inférieure de celle exprimée par le contrôle. Ce marqueur permet de supposer que le cuivre présente un caractère inhibiteur de l'activité ostéoblastique.

Conclusion :

Le procédé CO₂ haute pression a montré sa capacité à modifier les substituts en y intégrant du cuivre. Cette espèce se comporterait de la même manière que le zinc étudié précédemment.

La concentration initiale de cuivre semble jouer un rôle important. Comme décrit lors de l'étude des poudres, les différences de solubilité du CO₂ dans la solution selon la quantité d'acétate pourraient donner lieu à une dissolution de céramique plus faible pour les concentrations importantes. Au-delà d'une certaine concentration C avec $C_{\text{Intermédiaire}} < C < C_{\text{Maximum}}$, il n'y aurait plus de précipité de type CaP comme déjà observé pour les substituts traités sans autre espèce, mais seulement des structures en forme de roses des sables, similaires à des phosphates de cuivre.

La présence du cuivre semble, de plus, largement impacter la précipitation de CaP. Ainsi, le revêtement de précipité ne couvre pas la totalité de la surface extérieure. Le cuivre serait donc, à l'image du zinc, inhibiteur de cristallisation^{134,137,146}.

Il est possible que les concentrations en Ca, P et Cu favorisent alors des phases différentes : des phosphates de cuivre aux phosphates de calcium, substitués ou non.

Montrant une activité antibactérienne, les substituts dopés au cuivre pourraient être d'intérêt. En revanche, l'inhibition de l'activité des ostéoblastes semble constituer un problème majeur à son utilisation dans le domaine de la réparation/régénération osseuse.

Le Tableau 18 permet de résumer les informations essentielles tirées de l'étude de la modification des poudres et des cubes en présence de cuivre grâce au procédé CO₂ haute pression :

Tableau 18 Tableau résumé des expériences le cuivre. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence

			<i>Précipitation</i>	<i>Autre phase de dopant</i>	<i>Activité antibactérienne</i>		<i>Tests cellulaires</i>	
					Gram + (B.Sub)	Gram- (E.Coli)	Viabilité	ALP
					Cuivre	Poudre	Fond	Faible + concentration forte (Cu Max, Int)
Surface	Moyen + concentration faible (PCA, amorphe)	Oui (Phosphates et oxydes de cuivre)						
Cube		Faible (Cu Int, Min)	Faible (Cu Max)	+		++	=	-

4.4 Strontium

De nombreuses études ont porté sur l'utilisation du strontium dans le domaine de la régénération osseuse^{38,163,168,346}. En effet cet élément aurait certaines propriétés favorables au remodelage osseux : il améliorerait l'activité ostéoblastique et inhiberait l'activité ostéoclastique. Il participerait également à la synthèse du collagène osseux.

C'est pourquoi nous avons choisi de mener une étude d'intégration de cette espèce au sein des substituts céramiques étudiés *via* le procédé développé.

De la même manière que pour les espèces précédemment étudiées, un mélange de poudre HA/amTCP sera utilisé en premier lieu afin d'identifier les phases en présence en fin de traitement, puis la possibilité de modifier les substituts poreux d'HA/ β TCP sera envisagée. Ici aussi, le strontium a été introduit sous forme d'acétate de strontium dans la solution aqueuse de traitement. Trois concentrations différentes ont été utilisées de sorte à utiliser les mêmes concentrations massiques de Strontium que celles des espèces décrites précédemment. Ces concentrations sont indiquées dans la Partie 2.

Dans cette partie encore, une attention particulière a été portée sur les pH du milieu de modification. Afin de déterminer le pH de la solution de traitement au cours du procédé, des simulations PHREEQC ont été réalisées en tenant compte des concentrations en Sr des solutions de traitement et de la saturation en CO₂ au cours du procédé haute pression (Tableau 19).

Tableau 19 pH mesurés des solutions d'acétate de Strontium à différentes concentrations et pH calculés des mêmes solutions saturées en CO₂ à 40°C et 80 bar

Concentration en acetate (g/L)	pH de la solution initiale mesuré	pH de la solution saturée en CO ₂ calculé *
<i>Eau</i>	6,8	3,10
<i>Strontium Minimum</i>	7,80	3,51
<i>Strontium Intermédiaire</i>	7,93	3,74
<i>Strontium Maximum</i>	7,97	3,98

* simulations réalisées à partir d'eau à pH 7

Une faible mais significative augmentation du pH simulé des solutions saturées en CO₂ est observée en lien avec la concentration en strontium introduite.

4.4.1 Poudres

Trois expériences ont été réalisées avec le protocole de référence des poudres et en présence des concentrations différentes de strontium qui seront, de la même manière que pour les autres espèces précédemment étudiées, nommées *Minimum*, *Intermédiaire* et *Maximum* (Tableau 7, 2.2.1.b). Ici aussi, en raison de sa faible proportion, la *Poudre Surface* n'a pu être prélevée et une seule poudre traitée sera étudiée par concentration. Les observations après le traitement ont cependant permis de remarquer l'apparition de nouvelles phases en surface quelle que soit la concentration en strontium initiale.

Différentes techniques de caractérisation ont ici aussi permis d'appréhender les phases en présence MEB, DRX, FTIR, RAMAN...

Des analyses par DRX ont d'abord été réalisées sur chacune des poudres obtenues (Figure 120).

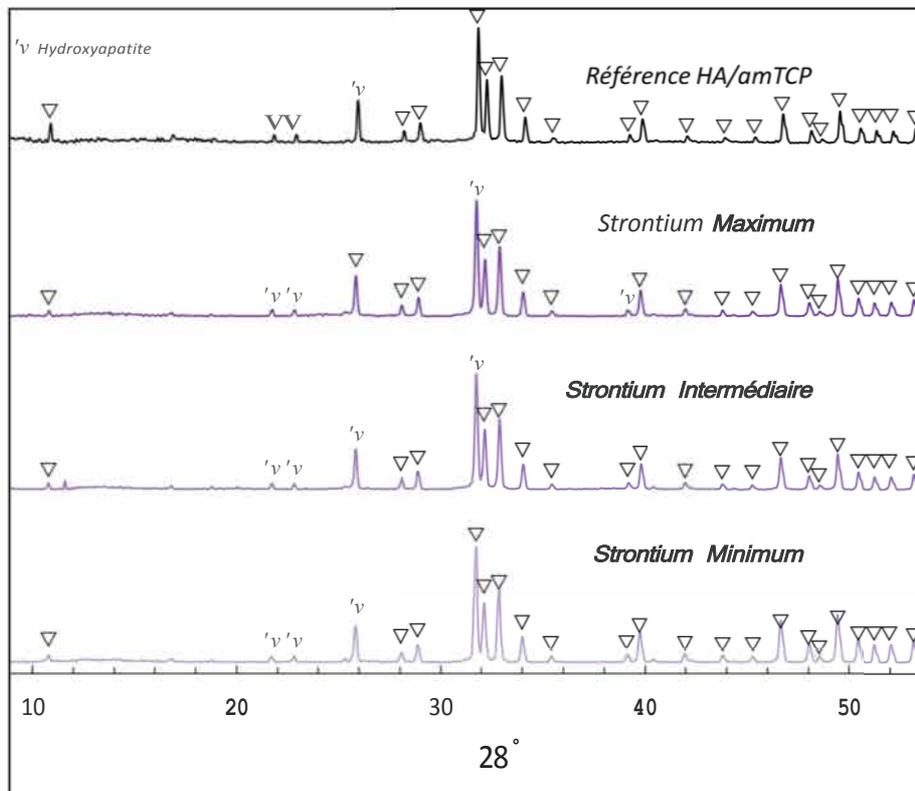


Figure 120 Diffractogrammes RX de la poudre de référence HA/amTCP et de la poudre traitée en présence de strontium

Quelle que soit la concentration en strontium de la solution de traitement, aucune phase supplémentaire n'est visible par DRX, seule l'HA bien cristallisée est présente. Comme précédemment, l'absence de la phase TCP est liée à sa structure amorphe très difficilement visible par DRX lorsque celle-ci est mélangée à une phase bien cristallisée comme HA. Cependant, l'absence d'une nouvelle phase par DRX ne signifie pas nécessairement son absence totale mais peut simplement signifier que celle-ci est en

quantité insuffisante ou ne possède pas une structure suffisamment cristallisée pour être décelée par DRX.

Des analyses par spectroscopie FTIR sont venues compléter les précédentes analyses effectuées en DRX afin d'identifier au mieux les phases en présence (Figure 121).

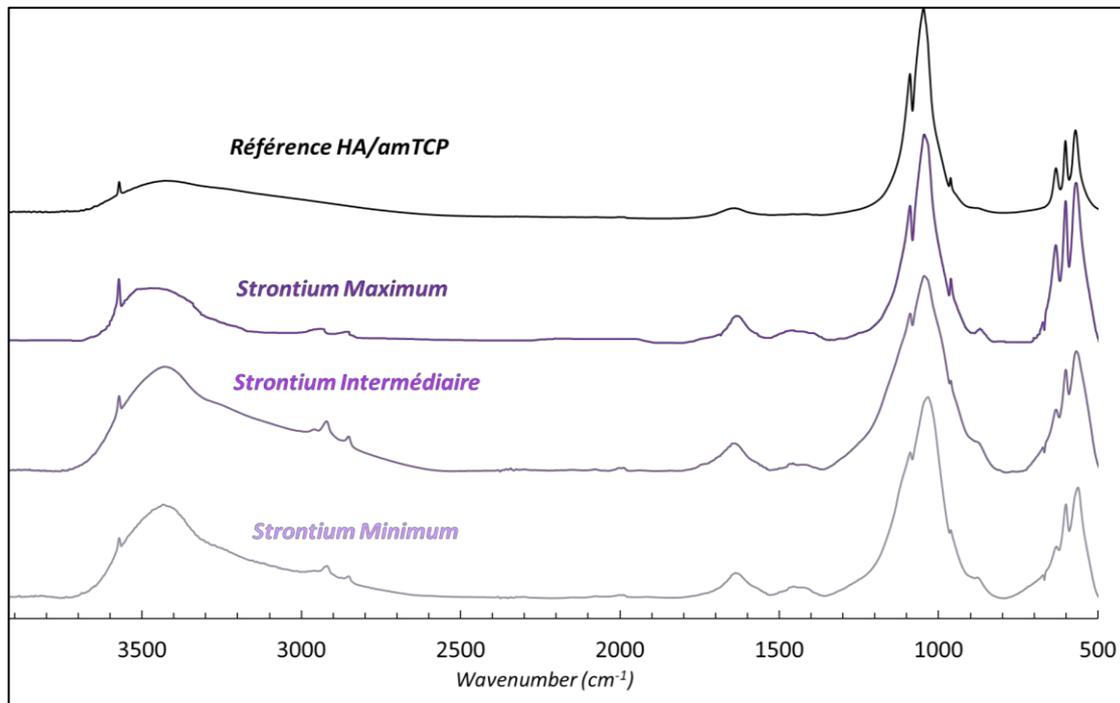


Figure 121 Spectres FTIR des poudres non traitée et traitées en présence de Strontium

Les poudres traitées sont différentes de la référence HA/amTCP. Un élargissement des bandes ν_3 PO_4 pourrait indiquer la présence d'autres espèces contenant des phosphates. Ces dernières n'ayant pas été constatées en DRX, il est possible qu'un tel élargissement soit dû à une phase amorphe ou mal cristallisée ou présente en trop faible quantité (<2% massique). Au vu du système étudié et des résultats obtenus sur les précédentes poudres traitées, ce pourrait être à la fois une phase phosphatée de strontium ou de calcium. Ces bandes élargies rappellent cependant les apatites mal cristallisées³⁴⁷.

Une différence est également notable au niveau du domaine des ν_3 des carbonates (1500-1300 cm^{-1}). Alors que la référence n'en contient pas, chaque poudre issue des expériences en présence de strontium montre une augmentation importante des carbonates de type A, B et des carbonates labiles. Cette augmentation a précédemment été identifiée, dans le système similaire sans strontium, comme étant due à la présence de PCCA. Cette dernière se serait dans ce cas formée suite à l'hydrolyse de l'OCP, précipitée en surface lors de l'heure de repos (3.2.2.a).

Des mécanismes semblables ont été présumés sur les poudres traitées en présence d'argent et pourraient également avoir lieu en présence du strontium. Il est à noter que d'après la littérature, cet élément serait un inhibiteur de la conversion de l'OCP vers l'apatite¹⁷¹. Les poudres ont été observées au MEB (Figure 122).

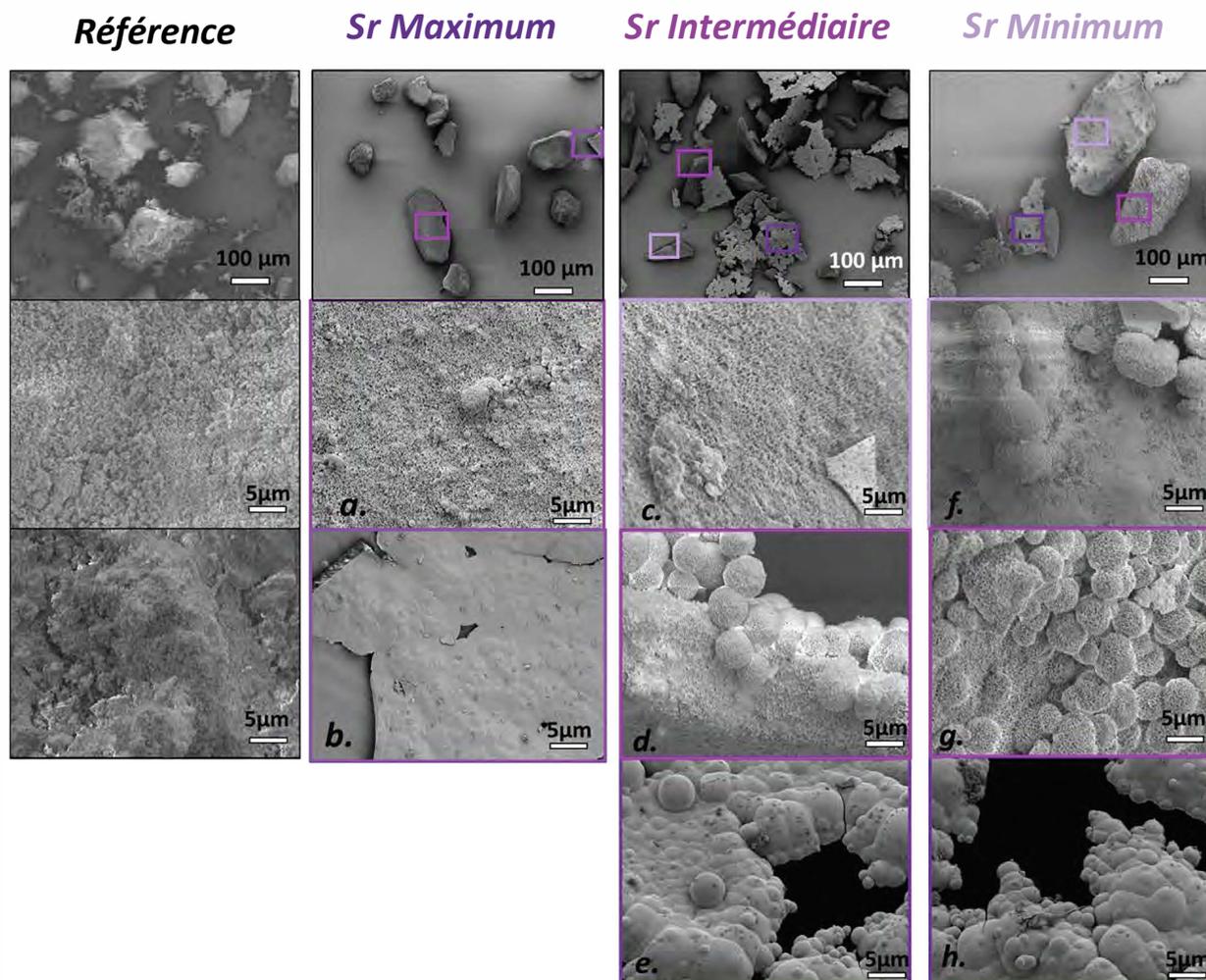


Figure 122 Images IIEB des Poudres non traités et traités en présence de Strontium Minimum, Intermédiaire et Maximum

Comme on peut l'observer sur la Figure 122, les trois poudres traitées subissent des modifications. Les grains de petite taille présents sur le mélange de référence ne sont plus visibles après traitement. Leur disparition au cours du traitement est due à la dissolution de la phase TCP qui s'effectue à pH acide au détriment de la phase HA.

De larges grains, présumés comme étant de l'HA sont toujours visibles après le traitement. En revanche et ce pour les trois concentrations, leur surface est modifiée. Un précipité est formé, semblable à celui constaté sur certains cubes modifiés (a., c. et f. Figure 122), notamment à basse pression ou pour un temps de contact long (3.2.4, 3.2.5). Il rappelle le précipité formé lors de l'immersion de certains substrats dans le SBF²⁰⁰. Des sphères de moins d'un micromètre de diamètre sont aléatoirement disposées sur ces larges grains (d. et g. Figure 122). Ces sphères poreuses identiques aux sphères observées lors des essais de modification CO haute pression de la poudre d'amTCP (3.1.2), sont visibles en surface de ces larges grains. De telles morphologies ont déjà été observées dans la littérature. Comme décrit lors de la discussion à propos des modifications similaires de l'amTCP seul, ces sphères pourraient provenir d'une forme de « templating » de bulles

de CO₂ Jouru. Ces dernières pouvant se former lors du dégazage pourraient permettre une sursaturation locale qui provoquerait l'apparition de sphères. Elles pourraient alors grandir radialement comme observé dans d'autres travaux montrant la croissance de sphères identiques dans des solutions de Ca et P⁹.

Enfin, des plaques semblant issues de plusieurs petites plaques/sphères ayant fusionné évoquent le précipité de surface observé lors des traitements des poudres à l'exception des fortes concentration de Sr (b., e., h. Figure 122). La présence de ces structures suggère ici aussi des mécanismes similaires à ceux déjà énoncés concernant la nucléation surfacique des nouvelles phases liées à une sursaturation locale lors de l'évaporation du milieu, de la remontée en pH et de l'évolution des concentrations ioniques. En revanche, elles sont lisses, sans porosité apparente en surface contrairement aux plaques obtenues jusqu'à présent.

Ces images EDS ont permis d'observer pour la première fois une modification des grains supposés d'HA après le traitement. Cela témoigne d'une précipitation à leur surface jamais observée jusqu'à présent. Ainsi, le strontium pourrait-il faciliter la précipitation de nouvelles phases.

De plus, le strontium permettrait, d'après la littérature, de ralentir la maturation des CaP, notamment de l'OCP à l'apatite¹⁷¹.

Des cartographies réalisées en EDX ont permis de confirmer la présence de strontium à la surface des poudres modifiées (Figure 123).

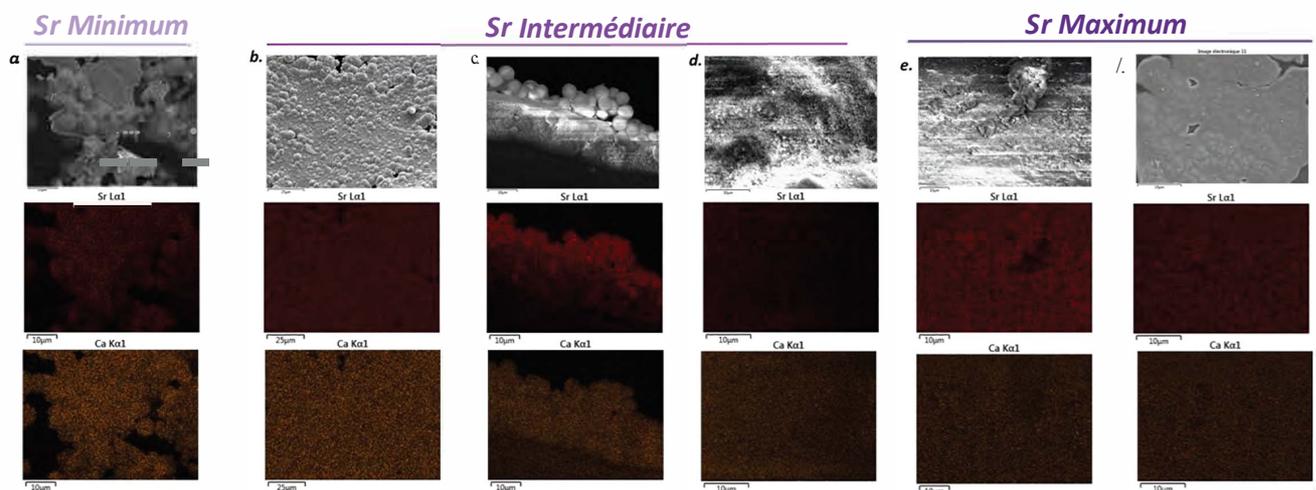


Figure 123 Cartographie EDX des poudres modifiées Strontium : maximum (e. précipité sur grains et f plaques surface), Intermédiaire (b. plaque surface, c. sphères sur larges grains et d précipité sur grains) et minimum (a. plaque surface)

Bien que légèrement moins présent sur le précipité en surface des larges grains (d., e. Figure 123), le strontium ressort sur chacune des poudres et fait clairement partie des

plaques se formant en surface (a., b., f. Figure 123). Les sphères poreuses montrent également la présence de strontium (a., c., e. Figure 123).

Des analyses par spectroscopie RAMAN ont été réalisées sur les différentes poudres obtenues en différenciant les grains (*Poudre Fond*) et les parties correspondant à la poudre identifiée comme précipité (*Poudre Surface*).

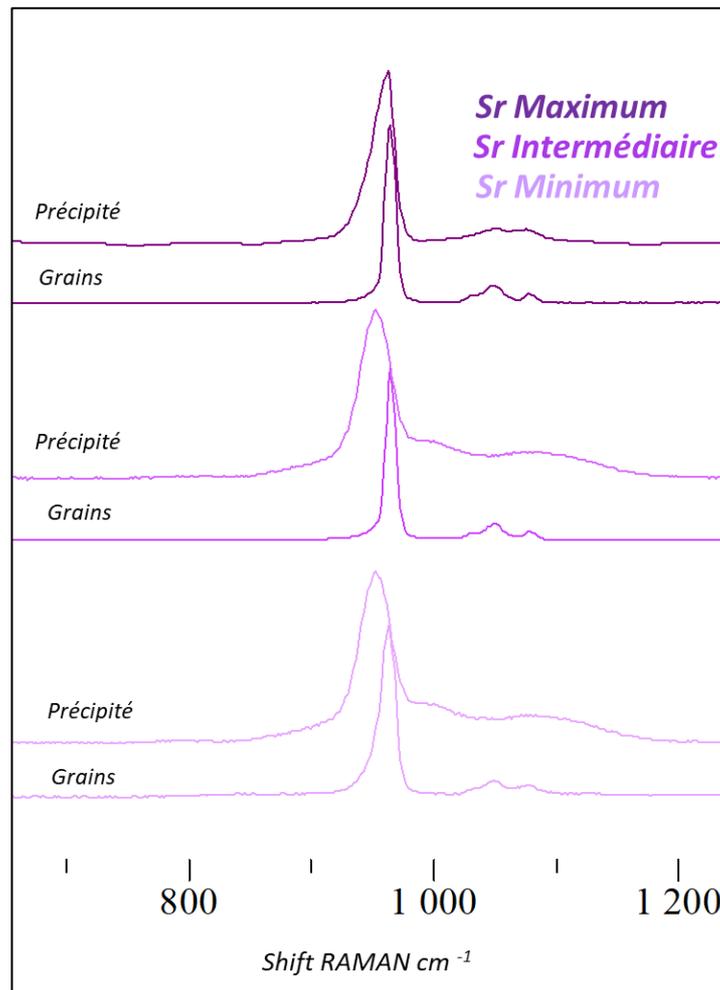


Figure 124 Spectres RAMAN des différents éléments présents dans les poudres traitées en présence de strontium

Les spectres réalisés sur les larges grains sont composés d'une HA bien cristallisée, visible grâce à une bande $\nu_3 \text{PO}_4$ à 961 cm^{-1} . Cette bande principale est cependant élargie par rapport à la phase HA bien cristallisée non traitée et pourrait correspondre à la présence de PCCA. Cette observation est à relier avec l'observation MEB du revêtement des grains formés d'un revêtement très couvrant ainsi que de sphères poreuses (Figure 122). Concernant les mesures faites sur les plaques issues des expériences en présence des concentrations en strontium *Intermédiaire* et *Minimum*, elles présentent les caractéristiques de l'ACP ($\nu_3 \text{PO}_4$: $1118, 1050 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_1 \text{PO}_4$: 952 cm^{-1} , $\nu_4 \text{PO}_4$: 594 cm^{-1} ...) notamment grâce à une bande très large à 952 cm^{-1} . Une large bande autour de 1000 cm^{-1} pourrait être le témoin d'une phase amorphe de phosphate de strontium. Le spectre Précipité, qui correspondrait aux Poudres Surface, du *Strontium Maximum* présente un

pic à 961 cm^{-1} , caractéristique de la $\nu_3\text{ PO}_4$ de l'HA. Ce pic pourrait simplement être dû à la proximité d'un grain d'HA non dissoute, l'HA stœchiométrique aussi bien définie ne pouvant précipiter dans ces conditions.

L'ACP a pu être observée dans cette étude réalisée en présence de cations bioactifs, pouvant signifier une cristallisation moindre ainsi qu'un ratio Ca/P potentiellement différent. Le strontium n'a pas été décrit comme inhibiteur de la cristallisation phosphocalcique dans la littérature.

Conclusion :

Une modification des poudres en présence de strontium a été mise en évidence grâce au procédé CO_2 haute pression. Là encore, le TCP serait dissout dans le milieu au cours du traitement et permettrait la précipitation de nouvelles phases. Cependant, les grains initiaux d'HA ne sont pas complètement dissous mais remaniés en surface. Cela rappelle les modifications surfaciques observées sur les cubes et pourrait être attribué à une PCCA. Le strontium pourrait alors s'inclure au sein de la couche hydratée de cette phase. En effet, des études précédemment réalisées ont permis de montrer que le strontium intègre à la fois la couche labile des PCCA et la structure cristallisée au cours des phénomènes de précipitation ou de maturation ³⁸.

De nombreuses sphères poreuses sont également visibles principalement sur les grains initiaux recouverts évoquant alors la modification d'amTCP en milieux aqueux simplement saturé en CO_2 . Cette hypothèse est renforcée par la présence de précipité très conséquent sur les grains d'HA, jamais observé jusqu'à présent.

En revanche la cartographie EDX a montré une forte inclusion de strontium dans l'ensemble des structures, en particulier dans ces plaques, sans pour autant que de nouvelles phases se distinguent. Au regard des résultats obtenus par spectroscopies FTIR et RAMAN et confirmés par l'EDX, ces plaques seraient composées d'un mélange principalement d'ACP et peut-être d'une phase amorphe d'un phosphate de strontium. Le strontium pourrait également affecter le temps de cristallisation de phases phosphocalciques ¹⁷¹. Cela pourrait en partie expliquer la présence importante d'ACP, phase jamais observée précédemment.

Lors de ces essais de modification de poudre HA/amTCP en présence de strontium, des modifications importantes ont été constatées. Une précipitation directement sur les grains initiaux d'HA ainsi que des structures sphériques poreuses rappellent celles précédemment observées dans le cas du traitement de poudre d'amTCP (3.1.2). Le strontium permet la formation d'un important revêtement des grains initiaux et est inclus au sein même des structures néoformées et ce pour la première fois et de manière importante parmi les essais menés jusqu'à présent dans cette étude.

Afin de déterminer si une modification semblable est possible sur les substituts de céramiques poreux, des essais ont été réalisés sur ces derniers.

4.4.2 Cubes de céramique

Les cubes de céramiques ont, comme pour les précédentes espèces dopantes, été modifiés avec le protocole de référence en présence d'acétate de strontium aux trois concentrations préalablement définies (Tableau 7, 2.2.1.b).

a. Caractérisation

Les observations MEB des substituts ainsi modifiés ont tous montré des modifications similaires (Figure 125).

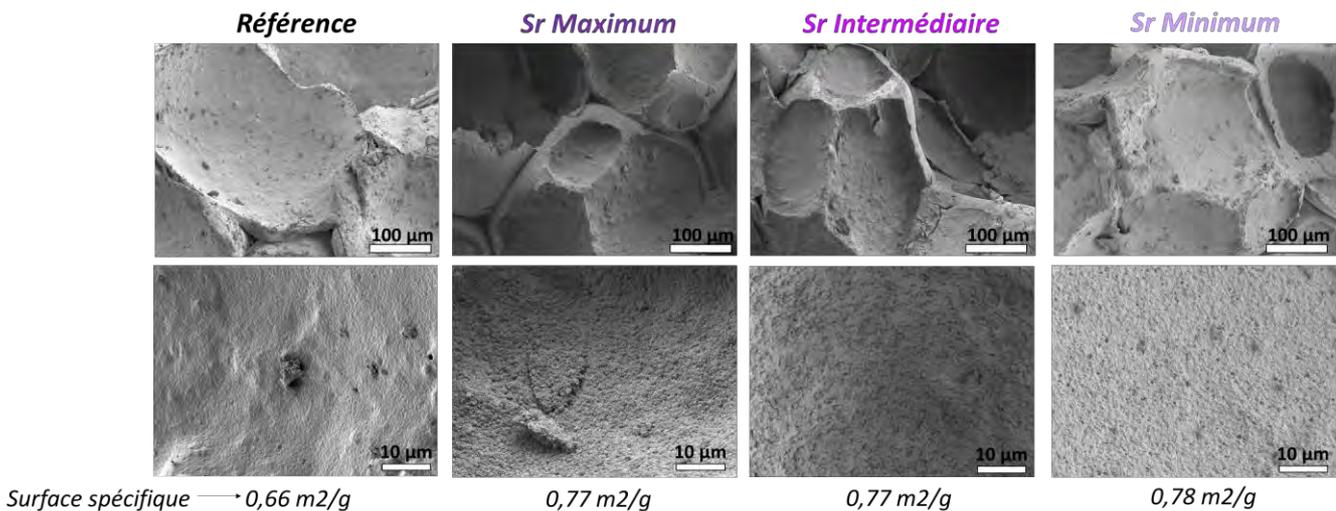


Figure 125 Images MEB des Cubes de référence et traités en présence de Strontium aux trois concentrations

En effet les cubes traités aux trois concentrations en strontium présentent tous un précipité homogène en surface des pores extérieurs. Il est légèrement moins important sur les substituts *Strontium Intermédiaire*. Le revêtement est similaire à celui observé sur les objets immergés dans le SBF.

Les surfaces spécifiques des trois substituts sont significativement plus importantes que celle des cubes non traités et reste du même ordre de grandeur que celle des cubes traités en milieu aqueux saturé de CO₂ (0,76 cm²/g).

Des mesures de porosimétrie à mercure ont permis de constater l'impact du procédé sur le diamètre des pores (Figure 126) et ainsi de mieux cerner les différences morphologiques.

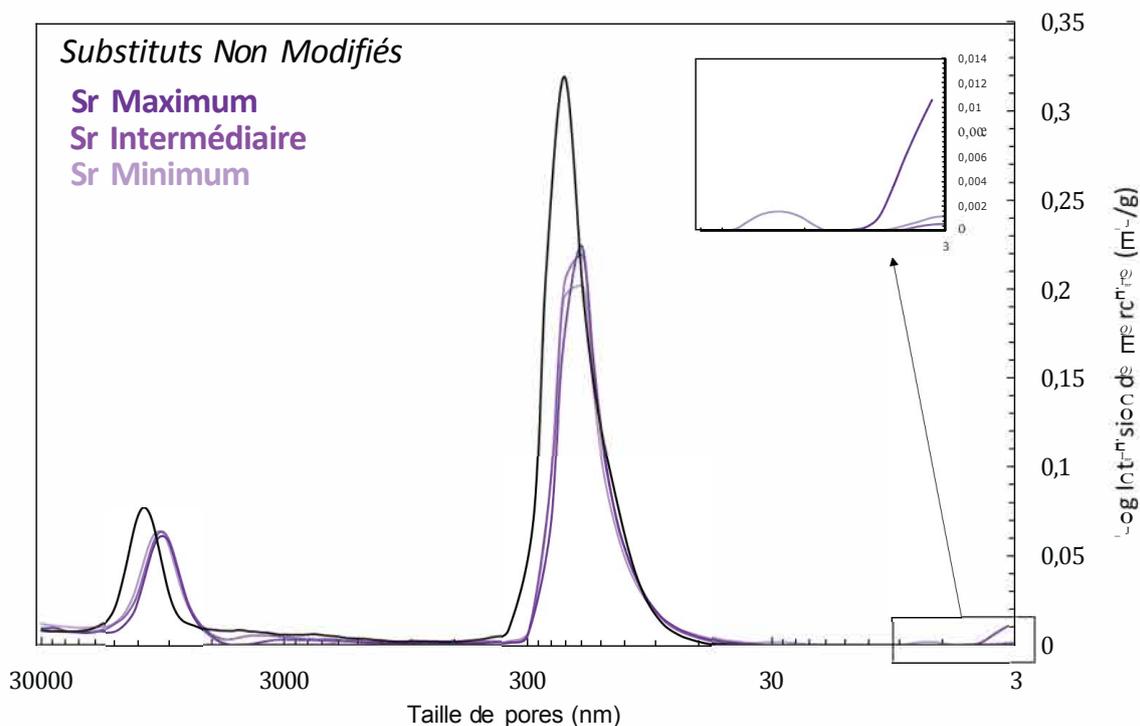


Figure 126 Porogrammes des cubes non traités et traités en présence de Strontium aux trois concentrations.

Les trois profils des substituts modifiés sont semblables. Un décalage de la gamme 1000-30000nm est visible indiquant une réduction du diamètre de ces pores. Ils sont également moins nombreux. Concernant la gamme de pores inférieurs de 10-1000 nm, elle montre une disparition des pores les plus larges et une diminution de cette population de pores. Enfin des porosités inférieures à 10nm apparaissent après traitement avec présence d'un réseau nanoporeux nettement plus important obtenu pour la concentration *Maximum*. Ces différences à l'échelle nanométrique ont déjà dans le cadre de ce travail été reliées au précipité formé en surface, qui est ici en accord avec les images MEB (Figure 125) : il y en a sur les trois concentrations.

La cartographie EDX a permis d'établir la présence ou non de strontium sur les cubes modifiés (Figure 127).

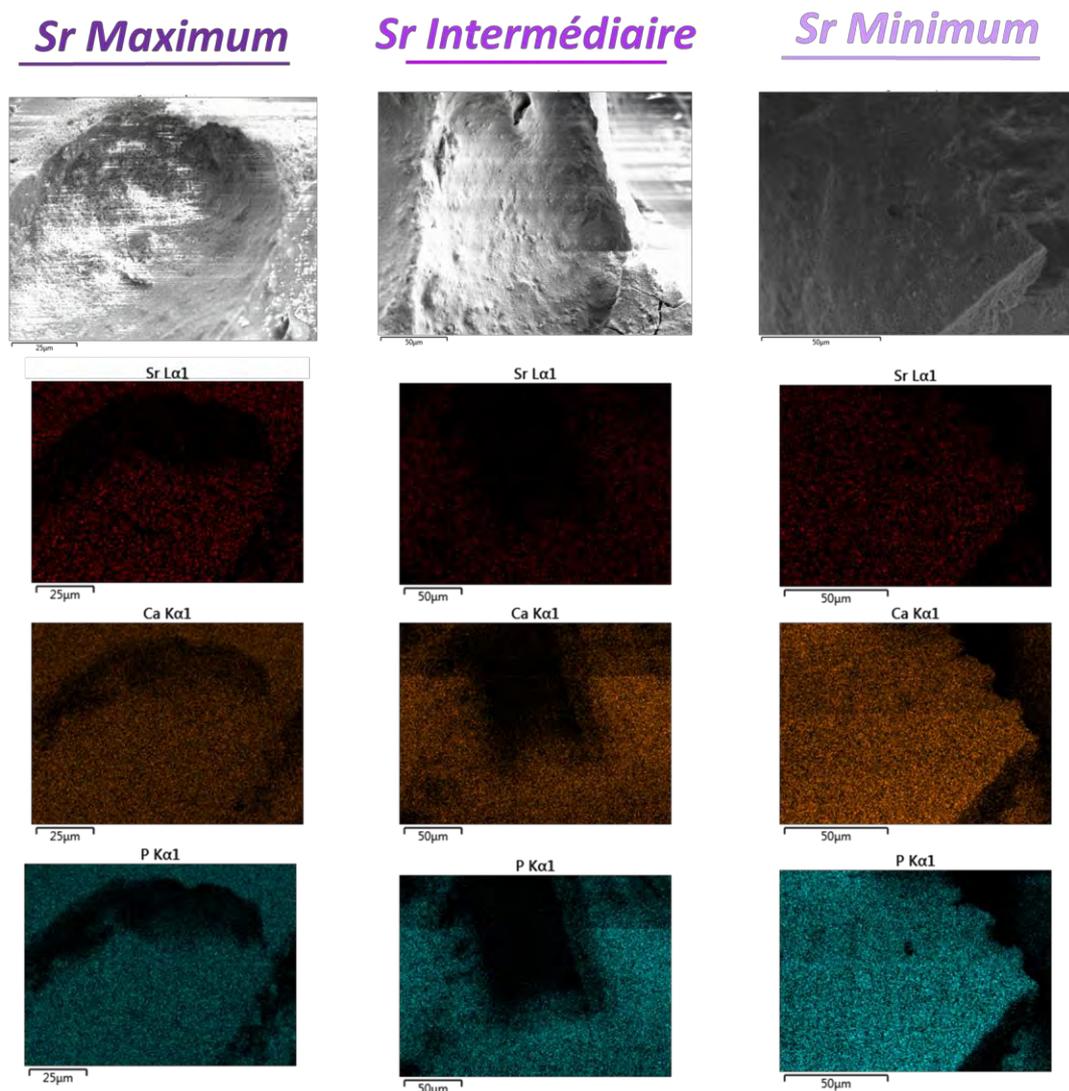


Figure 127 EDX des cubes traités en présence de strontium aux trois concentrations

La cartographie EDX a permis de détecter, bien que faiblement, du strontium sur les trois types d'échantillons produits. Cela n'est malgré tout pas suffisant pour quantifier l'intégration de cette espèce aux cubes de céramiques.

b. Quantification

Comme décrit dans les études des dopants présentés jusqu'à présent, des analyses par ICP sur le milieu utilisé pour le traitement avant et après procédé ont permis de quantifier le strontium inclus dans les céramiques (Figure 128).

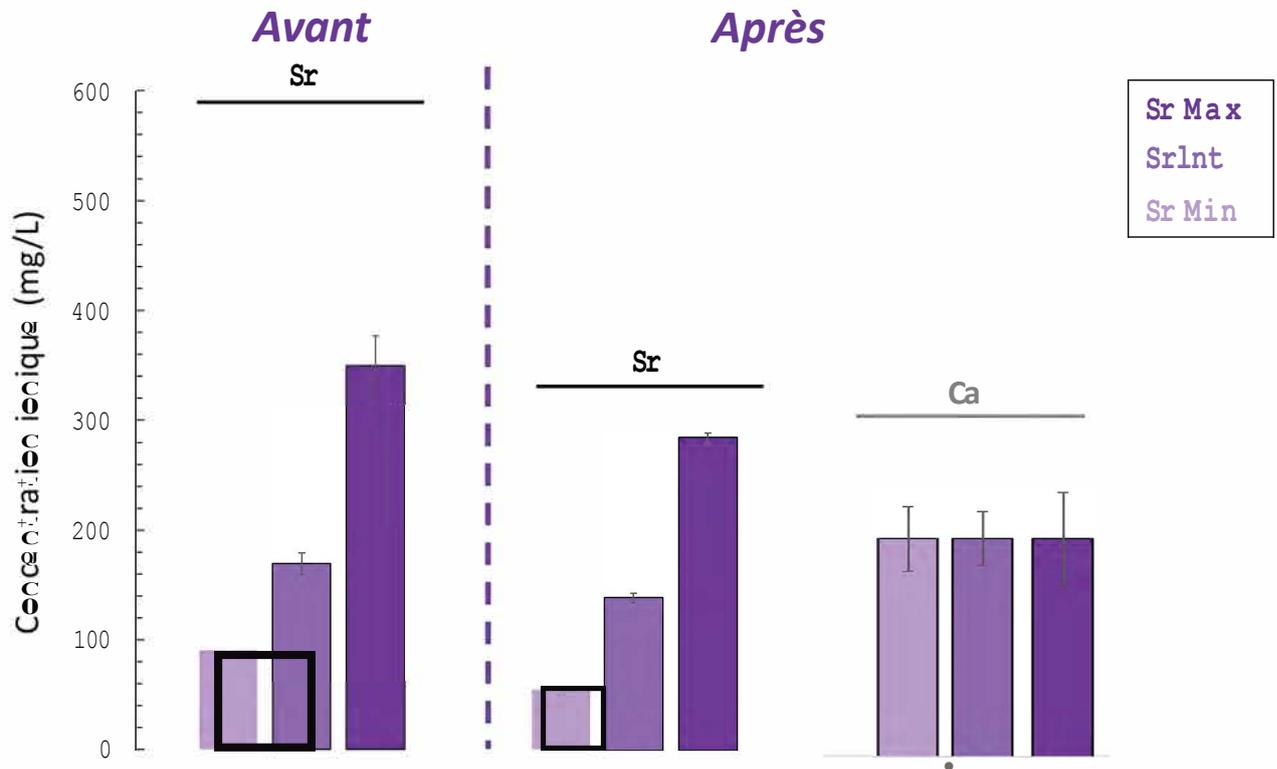


Figure 128 Analyses ICP du milieu aqueux utilisé lors du procédé pour les trois concentrations en Strontium

Les résultats ICP montrent dans un premier temps une diminution de la quantité de strontium présent dans le milieu aqueux post-procédé. Il y a donc bien une intégration de l'élément au sein du substitut comme observé avec les autres espèces. Là encore, la solution post-traitement fait apparaître du calcium libéré et non consommé au cours du procédé. La concentration en calcium est la même quelle que soit la concentration en strontium imposée. Sachant que tous les substituts ont été recouverts de manière homogène, il est possible que la quantité précipitée ait dans tous les cas consommé une quantité d'espèces (strontium, calcium et phosphate) telle que les quantités restant disponibles ne sont plus suffisantes pour permettre la précipitation d'une nouvelle phase. On peut rappeler qu'en effet, ce phénomène repose sur les changements de pH et les concentrations disponibles en Ca, Sr et P. N'ayant pas accès à ces informations *in situ* il est difficile ici d'aller plus avant dans l'interprétation.

Les concentrations en espèces actives au sein des cubes ont été déterminées comme étant égales à :

- $57,89 \pm 19,29$ 11g/g de céramique dans le cas de *Strontium Minimum*,
- $49,55 \pm 16,82$ µg/g de céramique dans le cas de *Strontium Intermédfo'ire*,
- 250 µg/g \pm $118,9$ 11g/g de céramique dans le cas de *Strontium Maximum*

Cette espèce se serait donc incluse dans les céramiques en plus faibles quantités que les autres espèces étudiées précédemment alors qu'elle est la seule clairement visible sur les phases γ compris phosphocalciques nouvellement précipitées.

c. Test de libération

Des tests de libération ont été réalisés à partir des cubes traités dans la solution de faible concentration (*Minimum*) afin de déterminer la cinétique de libération du strontium dans un milieu SBF dilué (Figure 129).

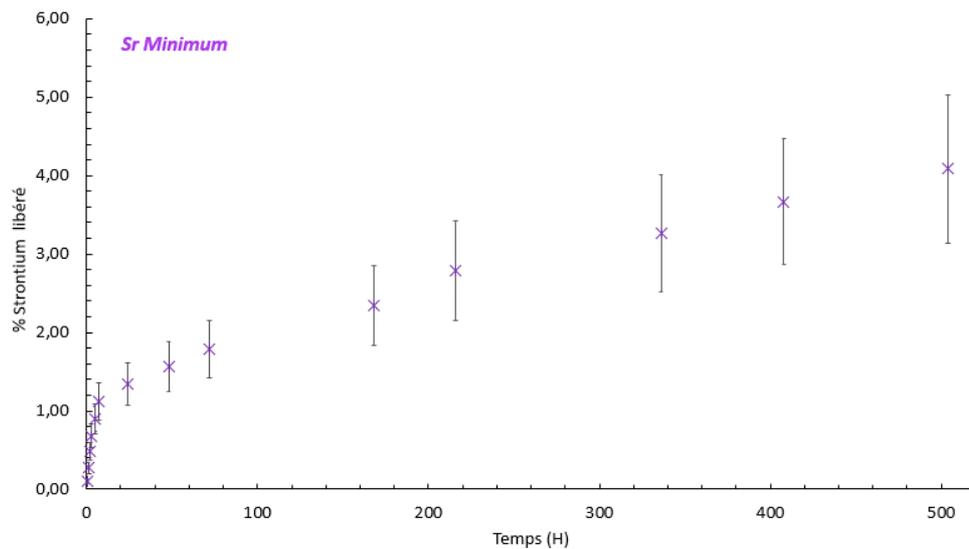


Figure 129 Test de libération dans SBF 0,9 sur 3 semaines du Strontium Minimum

Ce test a permis d'observer un profil de libération du strontium similaire à celui des espèces précédemment étudiées. Dans les premières heures, une libération rapide a lieu, pouvant être à la fois liée à des phénomènes d'échanges ioniques entre les ions Sr^{2+} contenus dans la couche labile du PCCA et les ions Ca^{2+} contenus dans la solution de libération. Elle ralentit dès les premières 24H pour ralentir encore par la suite. A la fin des 3 semaines, un taux de libération d'en moyenne seulement 4% de la totalité incluse est obtenu, sans que le plateau de libération soit atteint.

La plupart du strontium serait alors peu disponible, mais est libéré dans le milieu de manière régulière. Ce comportement pourrait être intéressant car il montre la possibilité d'une libération prolongée comme souhaitée pour le type d'application visée ici. Bien que le strontium semble inclus de manière différente de celle des autres espèces, ici aussi le taux de libération final est peu élevé par rapport à la quantité incluse.

d. Tests biologiques

Des tests biologiques ont été menés sur les cubes de céramique traités. Dans un premier temps, le comportement des cubes dopés a été évalué face à différents types de bactéries, ces mesures ayant été réalisées sur tous les cubes modifiés en présence de dopant bien que le strontium ne soit pas reconnu pour ses propriétés anti bactérienne (Figure 130, Figure 131).

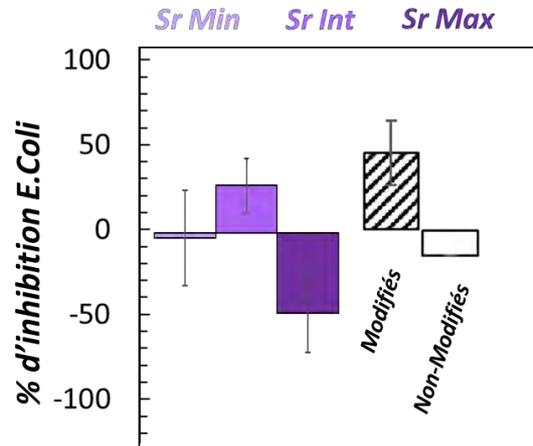


Figure 130 Tests antibactériens *E. coli* effectués sur les cubes traités en présence de strontium et comparés aux cubes non traités et traités dans l'eau saturée de CO₂

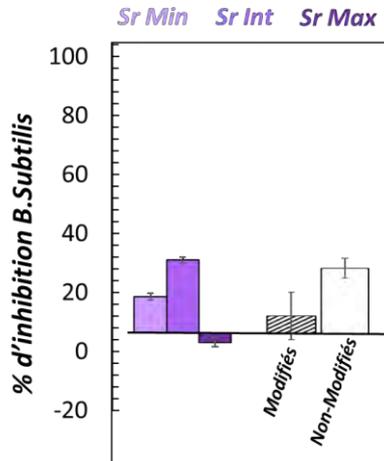


Figure 131 Tests antibactériens *B. subtilis* effectués sur les cubes traités en présence de strontium et comparés aux cubes non traités et traités dans l'eau saturée de CO₂

Comme attendu, quelles que soient les bactéries employées, les substituts dopés au strontium ne sont pas d'intérêt pour une application antibactérienne. Elles auraient même tendance, notamment pour *E. coli* avec le *Strontium Maximum*, à parfois favoriser la prolifération bactérienne (visible grâce à des taux d'inhibition négatifs).

En revanche, son activité sur les ostéoblastes est reconnue ¹⁶⁷⁻¹⁶. La viabilité des ostéoblastes ainsi que la quantité d'ALP exprimée a été mesurée à 3 et 7 jours (Figure 132).

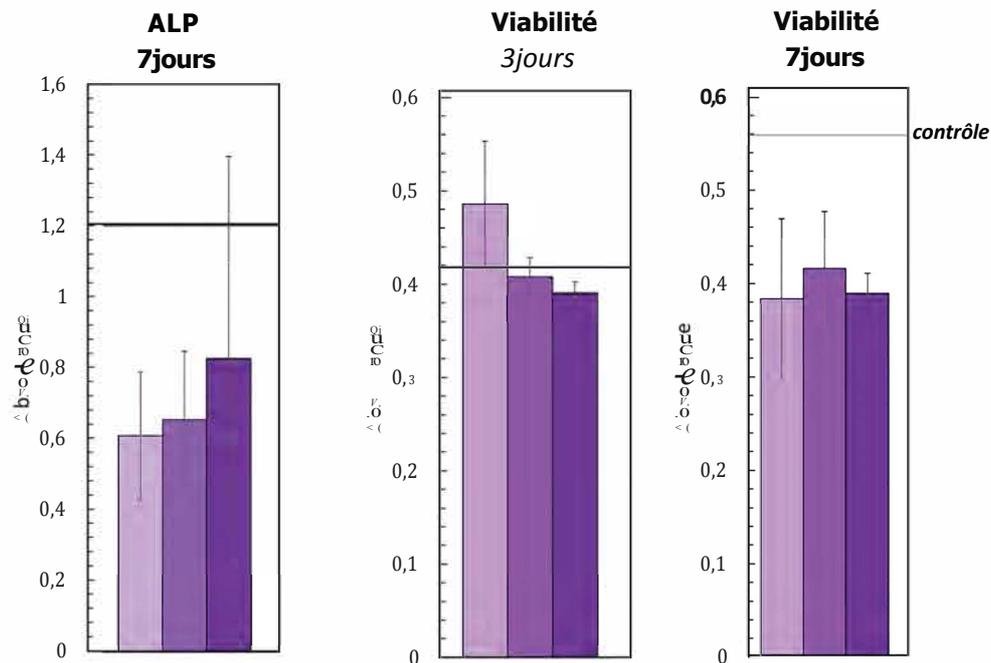


Figure 132 Tests cellulaires effectués sur les céramiques traitées en présence de strontium aux trois concentrations.

Les mesures de viabilité: proches voire au-dessus du contrôle à 3 jours sont inférieures à 7 jours. La tendance visible indiquant une meilleure viabilité cellulaire à 3 jours lorsque la concentration est importante, n'est pas vérifiée à 7 jours. Le strontium ne participerait donc pas à la longévité cellulaire. De plus, les mesures d'ALP, un des marqueurs de l'activité cellulaire, ne montrent pas d'augmentation significative. L'écart type reste cependant très important.

La concentration intégrée n'est probablement pas favorable au développement des ostéoblastes. Il pourrait être intéressant de tester des concentrations en strontium différentes.

Conclusion :

L'utilisation de strontium dans l'environnement employé lors du procédé CO₂ haute pression s'est montrée intéressante et permet de la même manière que pour l'argent, une précipitation importante en surface des pores extérieurs.

La formation d'un revêtement, *a priori* phosphocalcique, est homogène et sans espèces additionnelles. Le strontium a montré sa capacité à s'intégrer aux substituts sans pour autant créer de nouvelles phases bien cristallisées comme observé précédemment. Il est probable que le strontium s'intègre à la phase phosphocalcique précipitée en surface. Si cette dernière contient une phase PCCA, comme identifié sur les poudres modifiées dans l'eau saturée en CO₂ (3.1.3), le strontium pourrait être inclus en grande partie dans la couche hydratée mais aussi plus à cœur. Une étude en RMN du solide pourrait permettre l'identification précise de ces phases et d'observer si l'impact du strontium sur la cristallisation des phases en présence est similaire à celui observé sur les poudres.

Bien que les tests biologiques préliminaires n'aient pas montré de résultats significativement positifs, il serait intéressant de les reproduire ainsi que de tester des concentrations plus importantes en strontium.

Le Tableau 20 permet de résumer les informations essentielles tirées de l'étude de la modification des poudres et des cubes en présence de strontium grâce au procédé CO₂ haute pression :

Tableau 20 Tableau résumé des expériences le cuivre. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence

		Précipitation	Autre phase de dopant	Activité antibactérienne		Tests cellulaires	
				Gram + (B.Sub)	Gram- (E.Coli)	Viabilité	ALP
Strontium	Poudre	Fond	Forte (PPCA)	Oui (Inclus dans précipité)			
		Surface	Forte (ACP)	Oui (Inclus dans précipité, Phosphate de strontium mal cristallisé)			
	Cube		Forte	Indéetectable	-	~	=

4.5 Bilan

Les essais de dopage de céramiques avec différentes espèces ioniques bioactives ont montré des mécanismes et degrés d'intégration des espèces dans la structure différents. L'ensemble des résultats ont été rassemblés dans les Tableau 21 et Tableau 22.

Tableau 21 Concentrations des espèces dopantes incluses dans les céramiques en fonction des différentes concentrations initiales utilisées

	<i>Concentration $\mu\text{g/g}$ de céramique</i>			
	<i>Zinc</i>	<i>Argent</i>	<i>Cuivre</i>	<i>Strontium</i>
<i>Maximum</i>	500,5	1144,5	563,5	250
<i>Intermédiaire</i>	244,1	436,4	346,5	49,5
<i>Minimum</i>	127,2	122,7	157,2	57,9

Tableau 22 Récapitulatif des résultats de l'étude du traitement CO₂ haute pression en présence d'espères dopantes

			<i>Précipitation</i>	<i>Autre phase de dopant</i>	<i>Activité antibactérienne</i>		<i>Tests cellulaires</i>	
					Gram + (B.Sub)	Gram- (E.Coli)	Viabilité	ALP
Zinc	Poudre	<i>Fond</i>	Faible + présente aux concentrations fortes (Zn Max, Int : PCCA)	Oui + concentrations fortes (Hopéite)				
		<i>Surface</i>	Faible + présente sur concentration faible (PCCA, amorphe)	Oui + concentrations fortes (phase non identifiée)				
	Cubes			Faible + à concentration faible	Oui à concentration forte (Zn Max)	~	~	=
Argent	Poudre	<i>Fond</i>	Faible (PCA)	Oui + concentration fortes (Ag Max, Int: Phosphate d'argent)				
		<i>Surface</i>	Faible (PCCA, OCP, ACP)	Oui Potentiellement intégré aux CaP précipités				
	Cube		Forte toutes concentrations	Oui (Ag Max)	++	~	=	-
Cuivre	Poudre	<i>Fond</i>	Faible + concentration forte (Cu Max, Int)	Oui (Phosphate de cuivre)				
		<i>Surface</i>	Moyen + concentration faible (PCA, amorphe)	Oui (Phosphates et oxydes de cuivre)				
	Cube		Faible (Cu Int, Min)	Faible (Cu Max)	+	++	=	-
Strontium	Poudre	<i>Fond</i>	Forte (PPCA)	Oui (Inclus dans précipité)				
		<i>Surface</i>	Forte (ACP)	Oui (Inclus dans précipité, Phosphate de strontium mal cristallisé)				
	Cube		Forte	Indéetectable	-	~	=	-

Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude, nous ont permis de montrer que les quantités en espèces actives introduites au cours du traitement dépendent de plusieurs facteurs.

D'une part, la précipitation de phases phosphates directement liée à la présence de l'espèce ionique bioactive utilisée au cours du traitement augmente considérablement les quantités d'espèces dopantes introduites, celles-ci étant alors directement liées au type de phosphate précipité (notamment, au rapport, X/P, X correspondant à l'ion bioactif considéré) et à la quantité précipitée.

D'autre part, les ions bioactifs peuvent être introduits dans les phases apatitiques présentes, sous formes de cristaux épars dispersés à la surface des céramiques ou sous forme d'un revêtement structuré et nanoporeux. Ils sont alors introduits dans la structure cristallisée et dans la couche labile de l'apatite nouvellement formée.

La voie d'insertion des espèces dopantes dépend alors des espèces considérées et de leur concentration, les deux voies d'insertion pouvant co-exister.

Ainsi, les espèces comme le cuivre et le zinc, qui sont considérées comme des espèces inhibitrices de la précipitation de phosphates de calcium¹², induisent la formation de très peu de précipité apatitique même lorsqu'elles sont utilisées à faible concentration (concentration Minimum) (Tableau 22). L'intégration d'espèces dopantes à la surface des céramiques sera alors principalement liée à la quantité de phosphate de cuivre ou phosphate de zinc formée à la surface des matériaux au cours du traitement. Les quantités introduites pour ces deux espèces sont d'ailleurs du même ordre de grandeur (Tableau 22, Figure 133).

En revanche l'utilisation d'argent et de strontium au cours du traitement conduit à la formation d'un revêtement constitué de nanoparticules qui pourraient, d'après les résultats obtenus sur les poudres traitées dans les mêmes conditions, correspondre à des nanoparticules de phosphates de calcium apatitiques.

La précipitation de ces phases apatitiques se produisant en présence d'argent ou de strontium, une partie des ions dopants se substitueraient aux ions calcium pour former des nanocristaux apatitiques riches en ions argent ou en ions strontium. Une partie d'entre eux ayant intégré la structure cristallisée au cours de la maturation dans le liquide de traitement tandis que l'autre partie resterait dans la couche superficielle labile. Si le strontium ne semble pas induire de précipitation de phases annexes même lorsque ce dernier est utilisé à concentration élevée, l'argent lui, conduit à la formation d'une phase supplémentaire, probablement, attribuable à du phosphate d'argent. Ainsi, les quantités de strontium introduites au cours du traitement pourraient-elles être attribuées uniquement à la phase nanocristalline précipitée à la surface des céramiques, celle-ci étant riche en ions strontium (dans la structure cristallisée ou dans la phase labile). En revanche, les quantités d'argent introduites dépendent à la fois de la quantité de revêtement déposé au cours du traitement, du taux d'ions argent qu'il contient et de la quantité de phase annexe déposée lorsque la concentration en argent croît. Celle-ci étant très probablement attribuable, d'après les résultats obtenus sur les poudres, à un

phosphate d'argent. Ces différences majeures illustrent les résultats référencés sur la Figure 134.

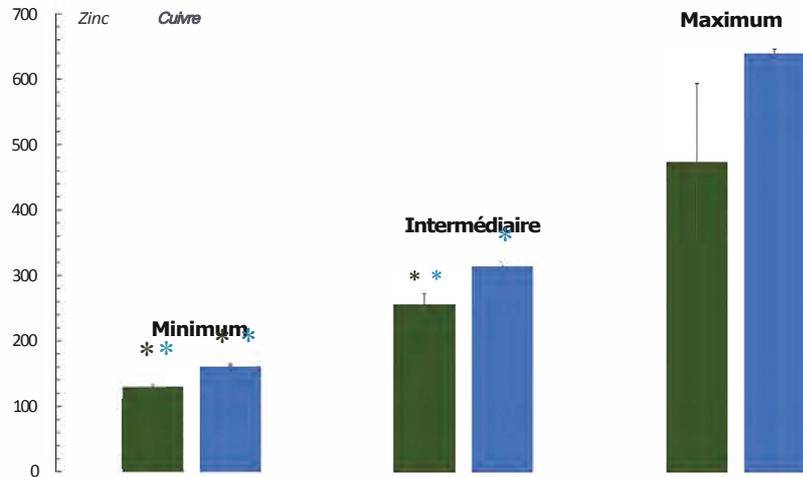


Figure 133 Concentrations massiques d'espèces ioniques introduites (11g)/g de céramique, * (vert.) montrent des différences significatives; avec Zinc Max et * (bleu) avec Cu Max, évalué grâce à un test AKOVA à $p < 0,05$ avec n le nombre de réplicats : $3 < n < 5$

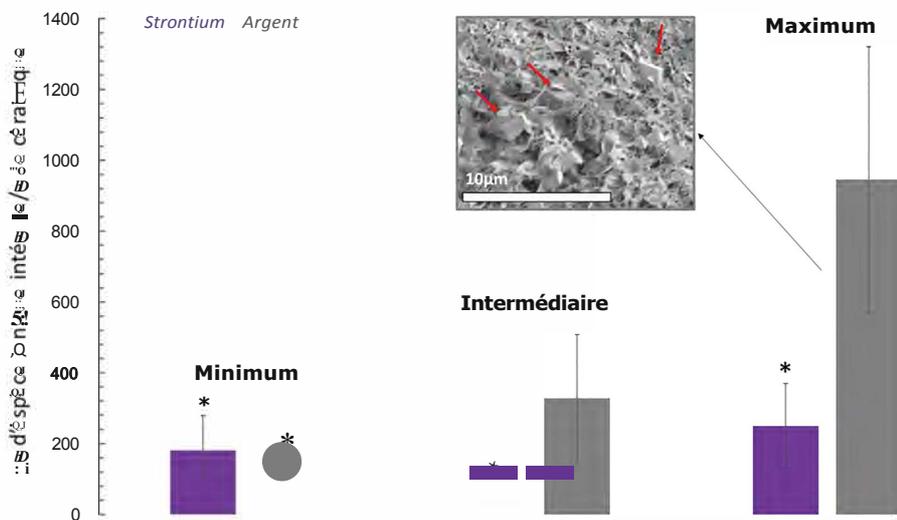


Figure 134 Concentrations massiques d'espèces ioniques introduites (pg)/g de céramique, * montrent grâce à un test statistique de type AKOVA des différences significatives avec l'Ag Max à $p < 0,05$ avec n nombre de réplicats : $1 < n < 5$

L'étude de cinétique de libération réalisée avec les cubes dopés en milieu SBF dilué, a permis là encore de montrer des différences significatives en fonction des espèces utilisées au cours du traitement. Nous avons choisi de présenter uniquement les profils obtenus

avec les concentrations minimum en ions dopants dans la solution de traitement (Figure 135).

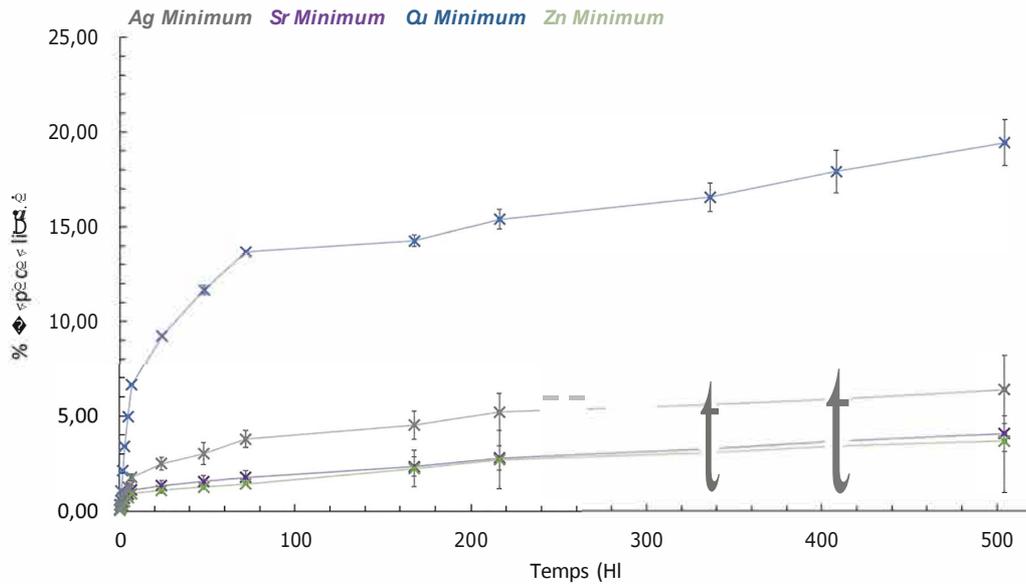


Figure 133 .Profils de libérations dans du S13F 0.9 du :linc .\laximum, Inlcrmécliairc cl .\Minimum ainsi que Argent, Strontium et Cuivre .\Minimum

Là encore, les deux principaux paramètres à prendre en compte sont la présence de revêtement nanoparticulaire phosphocalcique et ses caractéristiques (porosité, étendue...) et la présence éventuelle d'autres phases riches en phosphates et en ions dopants.

Les études réalisées sur les poudres à différentes concentrations en ions bioactifs nous ont permis d'identifier ces phases dites annexes, caractéristiques de la présence en ions dopants bioactifs. Sur les cubes, les limites imposées par les techniques de caractérisation utilisées ont permis quelque fois de confirmer la présence de ces phases mais leur absence sur les clichés :VIEB ou sur les cartographies EDX ne signifie pas nécessairement qu'elles ne sont pas présentes sous formes de cristaux dispersés à la surface, à l'intérieur ou en-dessous du revêtement de nanocristaux.

Ainsi, la quantité des phases citées ci-dessus et leur comportement vis-à-vis de la libération d'espèces ioniques conditionne la quantité d'espèces ioniques finalement libérée. Un autre paramètre qu'il est important de considérer concerne la porosité des systèmes étudiés. En effet, aux mécanismes de libération (par échange ionique ou par dissolution) s'ajoutent les mécanismes de diffusion des espèces à l'intérieur des réseaux poreux constitués par le nouveau revêtement (réseau nanoporeux) et celui constitué par le squelette de la céramique (réseau dit macroporeux).

Ainsi, pour effectuer l'analyse complète des profils de libération présentés sur la Figure 135, il est nécessaire de considérer tous ces paramètres et de garder à l'esprit que tous ces mécanismes influencent de manière différente chacun des profils de libération et le plus souvent de manière concomitante.

Ainsi, il est difficile de comparer *stricto sensu* les profils obtenus pour chacune des espèces et d'en déduire un enchaînement des différents mécanismes mis en jeu. Néanmoins, il est possible d'en faire une analyse « macroscopique ».

L'analyse de la Figure 135 nous permet d'affirmer que les profils de libération obtenus pour chacune des espèces confirment une libération continue, avec des quantités maximum libérées à 21 jours (3 semaines) qui diffèrent selon les espèces. La quantité importante d'espèces actives libérées dès les premiers instants de la cinétique peut être attribuée à des mécanismes de libération par simples échanges ioniques entre les espèces actives contenues dans la phase labile des nanocristaux apatitiques nouvellement formés et la solution de SDF riche en ions Ca^{2+} . Ces mêmes échanges peuvent éventuellement impliquer les autres phases annexes mal cristallisées (phosphate de zinc, phosphate de cuivre, phosphate d'argent). Parallèlement aux mécanismes d'échanges ioniques, se produisent des mécanismes de dissolution simple des phases riches en éléments bioactifs. La longueur et l'importance de cette étape dépend à la fois de la quantité de phase annexe présente et de ses caractéristiques physico-chimiques et biopharmaceutiques (solubilité, vitesse de dissolution...). Comme précédemment évoqué, il est important de considérer la localisation de chacune de ces phases à l'intérieur du matériau qui influence directement son accessibilité par le milieu de dissolution et les phénomènes de diffusion.

Des mécanismes de dissolution/précipitation et d'intégration différents selon les espèces ayant été soulignés, des tests biologiques préliminaires ont été réalisés afin de comparer les substituts dopés obtenus. Cependant, les résultats préliminaires de cultures d'ostéoblastes n'ont pas été discriminants.

D'après les mesures d'ALP, un des marqueurs de l'activité cellulaire, seul le zinc semble stimuler significativement l'activité des ostéoblastes (Figure 136).

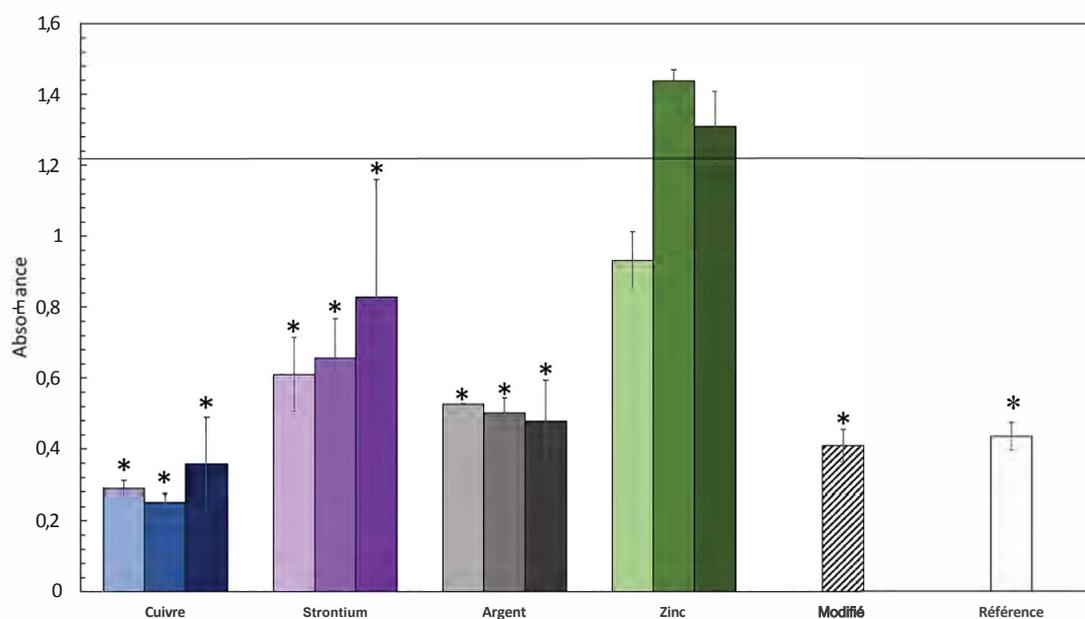


Figure 136 Mesure d'ALP à 7 jours, * montrent des différences significatives évaluées grâce à un test A-JOVA avec le Zinc Intermédiaire à $p < 0.05$ avec n le nombre de répliques : n=3

Pour cette espèce, c'est la concentration intermédiaire qui a exprimé une quantité d'ALP plus élevée, et ce de manière significative. Bien que d'intérêt dans ce cas, ces substituts n'ont pourtant pas montré de précipité uniforme. L'augmentation d'ALP grâce à une supplémentation en zinc a cependant déjà été observée dans la littérature ¹⁸.

Concernant les essais antibactériens préliminaires, les deux espèces attendues, le cuivre et l'argent, ont montré une activité plus importante quel que soit le type de bactéries employées (Figure 137).

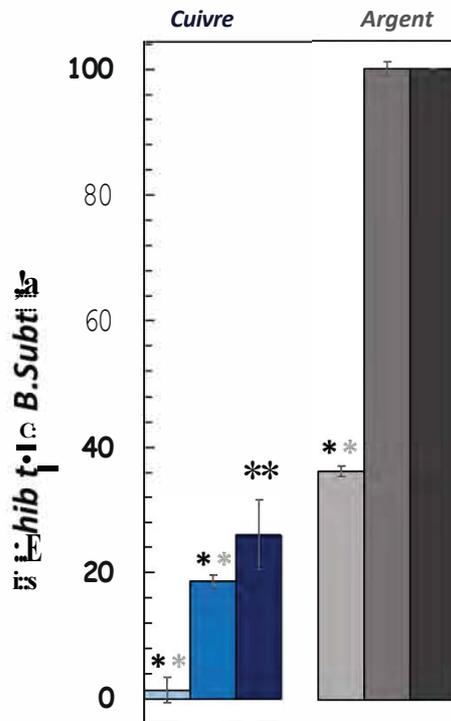


Figure 137 Pourcentage d'inhibition de *H. subtilis*, * (noir) montrent des différences significatives avec l'Argent maximum et * (gris) avec l'Intermédiaire à $p < 0,05$ avec n le nombre de réplicats : n=3

Concernant *E. coli*, bien que des tendances aient été observées, aucune différence significative n'a été détectée. En revanche, la comparaison entre le cuivre et l'argent sur les résultats relatifs à l'inhibition de *B. subtilis* a permis de distinguer une activité significativement plus importante de l'argent à forte concentration par rapport aux autres concentrations (Figure 137).

En conclusion, l'argent et le strontium semblent être les seuls éléments permettant d'obtenir un revêtement de surface homogène identique à celui obtenu grâce au procédé CO₂ haute pression en l'absence d'espèce active, soit dans l'eau saturée de CO₂ à 80 bar et 40 °C. Les fortes concentrations d'argent seraient très efficaces contre la prolifération bactérienne. En revanche la concentration de strontium pourrait être à ajuster afin d'obtenir une activité pro-ostéoblastique des substituts.

Conclusion générale et Perspectives

Dans ce travail de thèse, un procédé en phase aqueuse assisté par du CO₂ à haute pression a été utilisé pour modifier des céramiques HA/TCP en vue d'améliorer leurs propriétés de surface et d'introduire des éléments bioactifs susceptibles de favoriser la formation osseuse et/ou de réduire les risques liés à l'intervention chirurgicale.

Grâce à un grand nombre d'observations et de mesures qualitatives, cette étude exploratoire a d'abord permis de mettre en évidence les principaux phénomènes impliqués pendant les différentes étapes du procédé. L'étude de certaines propriétés d'usages des matériaux dopés obtenus par ce procédé a permis de compléter cette étude qualitative et de dresser les bases du développement de nouveaux biomatériaux actifs.

La première partie du travail s'est attachée à observer les modifications de céramiques seules en milieu aqueux saturé de CO₂ sous pression à 80 bar et 40°C. Un premier volet fondamental a porté sur la mise en évidence des transformations subies par les céramiques sous forme de poudres phosphocalciques réactives. La mise en œuvre de ce procédé a conduit à l'apparition de nouvelles phases de type OCP ou PCCA. L'influence de la nature de la poudre de départ a été étudiée (HA, amTCP et HA/amTCP). Des solubilités différentes selon la nature de la céramique sous forme de poudre utilisée influencent les phénomènes de dissolution et par voie de conséquence le pH du milieu réactionnel. Ainsi, l'utilisation d'amTCP, particulièrement soluble dans l'eau à pH acide, conduit à un remaniement total de la poudre initialement introduite dans le milieu et à la précipitation de nouvelles phases. Une étude approfondie du mélange HA/amTCP a permis d'élaborer un certain nombre d'hypothèses concernant les mécanismes de formation des nouvelles phases précipitées. Ainsi, grâce à des changements de pH et des phénomènes de sur-concentrations locaux, une phase d'OCP pourrait se former et partiellement s'hydrolyser en PCCA. Quelles que soient les poudres de départ introduites, l'utilisation du procédé a conduit, soit à la précipitation directe de phases apatitiques biomimétiques, soit à la précipitation de phases phosphocalciques qui évoluent progressivement en apatite biomimétique au cours des phénomènes de maturation, permis pendant le temps de repos à pression atmosphérique.

La modification de poudres réactives ayant été observée, des essais sur des dispositifs poreux de céramiques BCP frittées (HA/ β TCP) ont ensuite été menés dans le même milieu constitué d'eau saturée par du CO₂ sous pression à des pressions comprises entre 60 et 100 bar. Les résultats obtenus ont permis de montrer que ce procédé permettait un remaniement de la surface des dispositifs étudiés. En effet, des phases d'OCP et de PCA ont été précipitées à la surface des pores extérieurs. Les techniques de caractérisation utilisées n'ont pas permis d'établir une éventuelle carbonatation de la phase PCA précipitée dans ce cas. En revanche les conditions utilisées n'ont pas permis d'observer

la précipitation de dépôt à l'intérieur du réseau poreux constitué par le squelette céramique. La morphologie des structures BCP est malgré tout modifiée avec création d'un réseau poreux de taille nanométrique additionnel.

Cette étude s'est poursuivie par l'évaluation de l'influence de différents paramètres opératoires (température, pression, temps de repos dans le milieu post procédé, vitesse de dépressurisation...) du procédé sur le revêtement obtenu. Ce travail a notamment permis de déterminer qu'une précipitation avait lieu avant l'heure de repos imposée dans le protocole de réalisation. Cette dernière pourrait alors avoir lieu au sein même du réacteur dans l'atmosphère pressurisée ou de manière plus vraisemblable lors de la phase de décompression, pendant laquelle le pH du milieu réactionnel remonte pour atteindre la neutralité. Le rapport L/S est un critère critique. Les phénomènes de précipitation nécessitant de dépasser un certain seuil de concentration au-delà duquel la nucléation est possible, des rapports L/S faibles seraient favorables. D'autres critères ont été déterminés comme influençant les mécanismes de dissolution/précipitation. Cependant, devant la complexité des phénomènes impliqués et, en raison des difficultés technologiques n'ayant pas permis de mesurer les évolutions de pH ou concentrations in situ, il est difficile à ce stade de dégager plus que de simples tendances.

Dans une seconde partie de l'étude, des solutions riches en ions bioactifs (Zn^{2+} , Ag^+ , Sr^{2+} , Cl^{2+}) ont été ajoutées au milieu réactionnel, avec pour objectif d'orienter l'activité biologique du matériau traité, en introduisant à sa surface des espèces actives capables d'être libérées progressivement dans le corps humain en vue de leur application visée dans le domaine de la régénération osseuse. Pour cette étude, nous avons choisi de réaliser des expériences de dopage avec trois niveaux de concentration pour chaque espèce active. Ces tests ont mis en évidence, d'une part, des différences par rapport au cas de référence (sans espèce active) en ce qui concerne le revêtement formé, et, d'autre part, pour certaines espèces, la précipitation de phases annexes riches en phosphates et caractéristiques de l'ion dopant introduit dans le milieu.

Le zinc et cuivre ont confirmé leur caractère inhibiteur de la précipitation et croissance cristalline des phosphates de calcium. Ainsi de fortes concentrations de ces espèces ne créent pas un milieu réactionnel favorable à la précipitation de nouvelles phases phosphocalciques mais conduisent plutôt à l'apparition de phosphates supplémentaires caractéristiques de ces espèces (phosphates de zinc, phosphates de cuivre). En revanche, l'argent et le strontium n'empêchent pas la formation du revêtement. Des tests de libération ont permis de montrer que différents mécanismes pourraient être impliqués dans la libération des espèces ioniques bioactives en lien avec la localisation de ces dernières : dans la structure cristalline ou dans la couche labile des phosphates de calcium précipités mais aussi dans d'autres phases. Enfin, des tests biologiques préliminaires ont mis en avant l'impact du zinc sur l'expression d'un marqueur de viabilité cellulaire (ALP) mais aussi les fortes propriétés antibactériennes du cuivre et encore plus de l'argent.

Si, dans son ensemble, ce travail a permis d'explorer un grand nombre d'aspects relatifs aux phénomènes de dissolution et précipitation des phosphates de calcium en milieu aqueux assisté par CO₂ sous pression, il ne nous permet pas à ce stade, de connaître les paramètres du procédé optimum à mettre en œuvre pour produire de façon maîtrisée un dispositif qui possède un revêtement homogène en surface capable de libérer de manière contrôlée un élément bioactif en quantité suffisante pour induire une réponse biologique. De nombreuses perspectives, à la fois sur le plan fondamental pour progresser dans la compréhension des phénomènes impliqués, et sur le plan applicatif pour avancer sur la définition du matériau cible, peuvent à ce stade être envisagées.

Sur le plan fondamental, il apparaît important d'être en mesure, d'une part, de mieux comprendre et maîtriser les phénomènes de dissolution et précipitation ayant lieu lors de la mise en contact des matériaux céramiques avec le milieu aqueux acidifié par du CO₂, puis lors de la phase de retour en conditions atmosphériques et enfin pendant la phase de repos. L'établissement des différentes cinétiques de ces phénomènes offrirait en effet un moyen de contrôle des propriétés physico-chimiques des matériaux obtenus. Dans cet objectif, il semblerait intéressant de modifier le dispositif et le protocole expérimental de sorte à pouvoir prélever et analyser (par exemple par ICP) au cours du temps le milieu réactionnel (phase aqueuse). Ce moyen permettrait un suivi des espèces présentes en solution au cours du temps. Il conviendrait cependant de prélever une faible quantité de solution et éventuellement de compenser le volume prélevé par une injection d'eau afin de limiter les perturbations du système. Bien entendu, le suivi de l'évolution du matériau solide serait également riche d'informations. D'un point de vue technique ce suivi serait plus difficile à mettre en œuvre, et idéalement, il serait intéressant d'avoir accès à des techniques de caractérisation *in situ*. Cependant, il est difficilement envisageable d'être en mesure de suivre les évolutions de phases sur le matériau solide, sans extraire le matériau du milieu réactionnel, et donc sans revenir aux conditions atmosphériques, ce qui ne permettrait pas tout à fait d'avoir accès à l'état du matériau dans les conditions de procédé. En ce qui concerne la caractérisation des matériaux céramiques, à l'aune des analyses effectuées pendant ce travail de thèse, il semble qu'une utilisation plus systématique de la R_{IN} du solide pourrait permettre une meilleure détermination des phases phosphocalciques en présence.

De plus, la tomographie aux rayons X, notamment *in situ*, c'est-à-dire en utilisant un tomographe permettant d'analyser le matériau dans son milieu réactionnel, serait à envisager afin de mieux comprendre et améliorer les phénomènes de diffusion au cœur des porosités du matériau. A cet effet, des matériaux céramiques mis en forme dans des structures modèles (réduction de tortuosités, taille des pores contrôlée) pourraient avantageusement être utilisés.

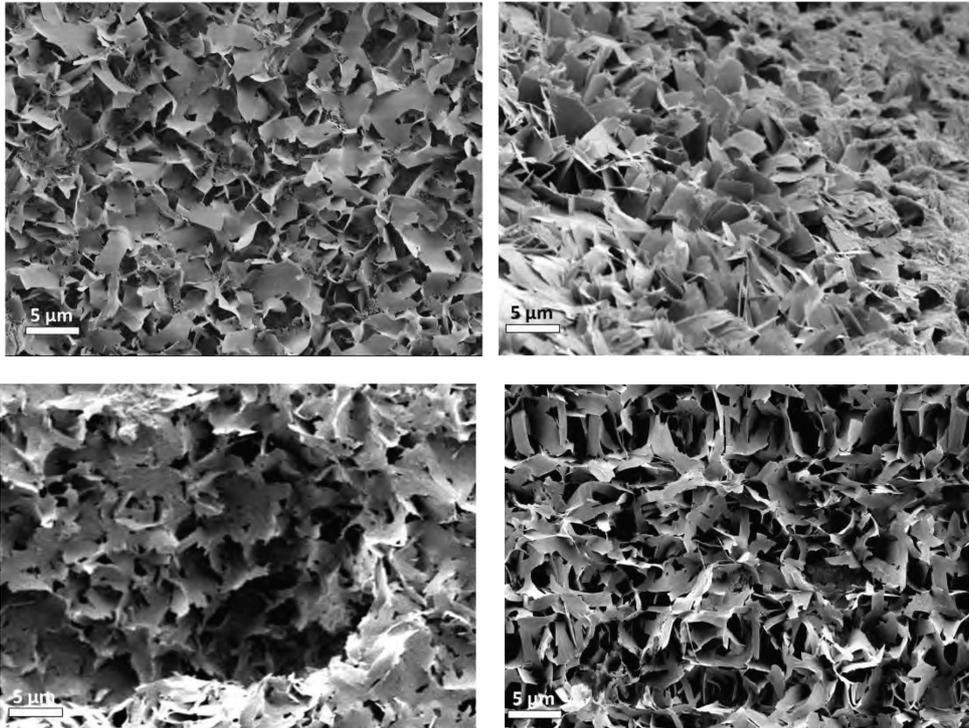
En ce qui concerne l'insertion par co-précipitation d'espèces actives dans la structure des céramiques poreuses, nous avons pu voir dans ce travail que les phénomènes, quantités incluses et comportements de relargages pouvaient être très différents en fonction des espèces. Le « balayage » réalisé ici nous conduit à penser que les dispositifs dopés à

l'argent et au strontium présentent *a priori* un plus grand intérêt. L'emploi du procédé eau/CO₂ développé ici nous semble donc particulièrement pertinent et il conviendrait maintenant de travailler, d'une part sur la définition d'un biomatériau dopé à partir de ces éléments, seuls ou en combinaison, et d'autre part, d'approfondir l'étude sur ces espèces afin de mieux relier les propriétés d'usages visées aux conditions de procédé. A cet effet, les conditions de précipitation des espèces pourraient être étudiées indépendamment, d'abord en l'absence de céramique, pour évaluer l'impact des conditions opératoires (pH, concentration, durée de traitement). L'usage d'outils de simulations des équilibres géochimiques tels que PHREEQC pourrait ici être particulièrement intéressant en complément d'un travail expérimental. Dans un second temps, une étude similaire en présence des matériaux céramiques pourrait être conduite.

Annexes

Annexe 1 : Clichés MEB

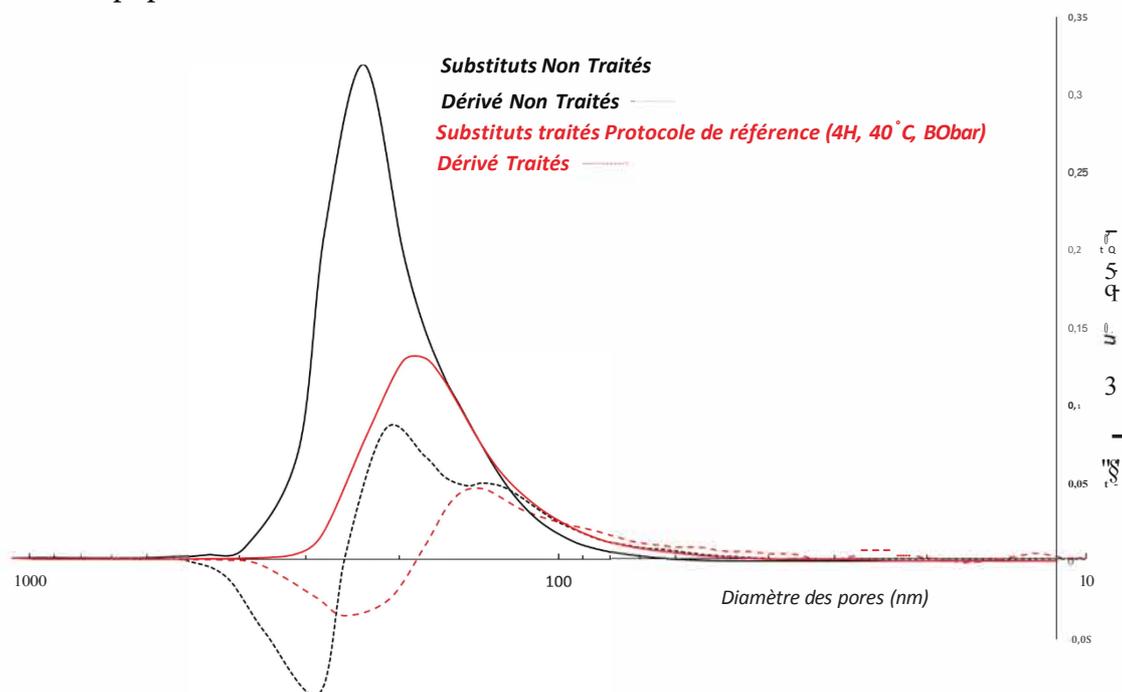
Les images MEB présentées dans cette annexe concerne les cubes de céramiques poreux BCP traités avec le protocole de référence (4H, 40 °C, 80bar, DP30min, 1H repos). Bien qu'une image MEB représentative ait été choisie pour illustrer les résultats dans ce manuscrit, le protocole de référence a été répété et des images MEB de plusieurs échantillons produits avec ce même protocole ont confirmé des morphologies similaires en surface des pores extérieurs.



Annexe 2 : Porogrammes

Afin d'appréhender au mieux l'influence du traitement CO₂ haute pression, des mesures de porosimétrie à Mercure ont été faites.

Une diminution des pores dans la gamme 10-1000nm a été observée ainsi qu'une redistribution de la taille des pores. La dérivée de la courbe donnant la distribution de tailles des pores a permis d'observer plusieurs points d'inflexions et d'ainsi discerner différentes populations.



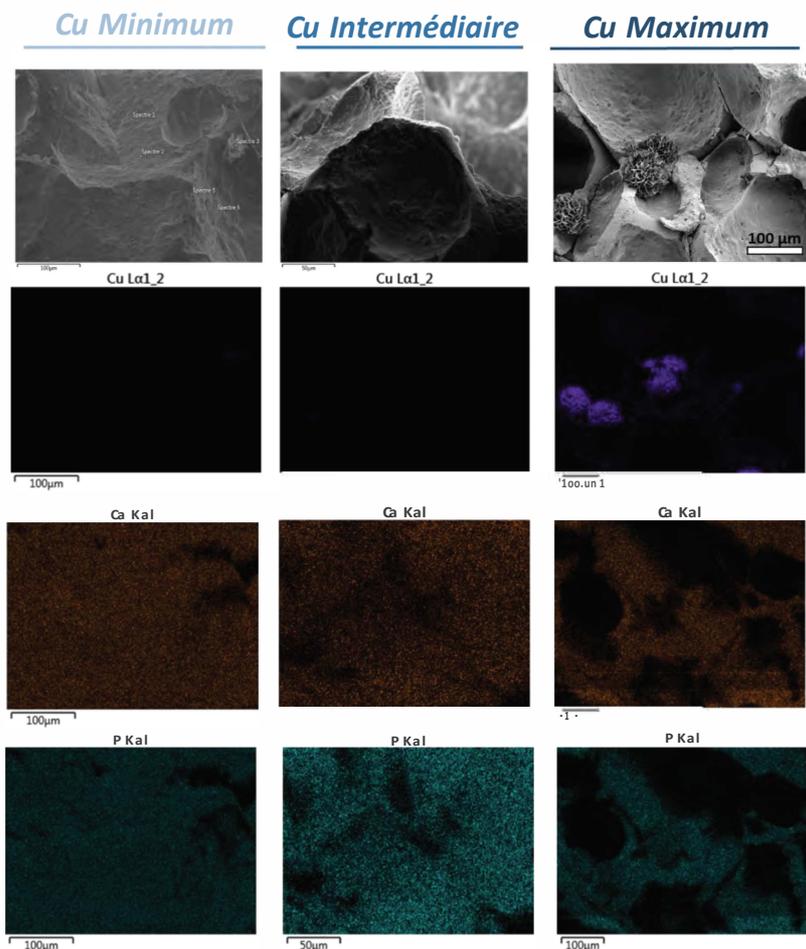
Ces dérivées mettent en valeur une redistribution des pores due au traitement en plus d'une diminution du volume poreux. La population à 212 nm notamment n'est plus présente sur les substituts modifiés.

Un décalage de population est visible, le maximum passant de 150 à 138 nm. De plus, des pores apparaissent à 85 nm sur les substituts traités.

Annexe 3. Cartographies EDX des cubes

La Partie 4 a porté sur l'incorporation d'espèces actives au sein des céramiques. Les EDX ont permis d'évaluer la présence ou non de ces espèces au sein des cubes de céramiques une fois traitées.

Les résultats présentés sur les concentrations Minimum et Intermédiaire du Cuivre n'ayant pas montré de présence significative d'espèce dopante, elles n'ont pas été présentées dans le corps du manuscrit.

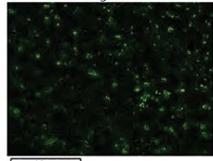


Les cubes ayant été traités avec des concentrations faibles de cuivre ne présentent aucune trace de cuivre détectable grâce à cette technique en surface de leurs pores. De même les cubes BCP traités à différentes concentrations ne montrent de l'argent de manière claire à l'EDX que sur *l'Argent Maximum* :

Ag Maximum



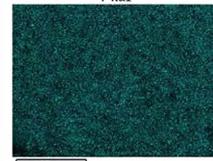
Ag Lα1



Ca Kα1



P Kα1



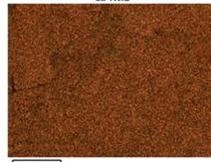
Ag Intermédiaire



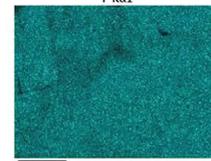
Ag Lα1



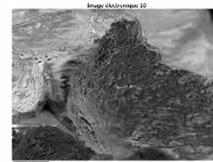
Ca Kα1



P Kα1



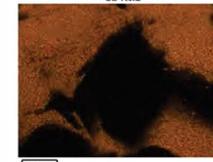
Ag Minimum



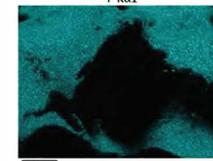
Ag Lα1



Ca Kα1



P Kα1



Bibliographie

1. Abe, Y., Kokubo, T. & Yamamuro, T. Apatite coating on ceramics , metals and polymers utilizing a biological process: *Journal of materials science: Materials in medicine*, 233-238 (1990).
2. Autefage, Hélène. *Rôle ostéoinducteur d'un revêtement d'apatite carbonatée nanocristalline sur des céramiques de phosphate de calcium biphasique*. Diss. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, (2009).
3. O'Neill, E., Awale, G., Daneshmandi, L., Umerah, O. & Lo, K. W.-H. The roles of ions on bone regeneration. *Drug Discov. Today* 23, 879-890 (2018).
4. W. F. deJong. Substance minérale dans les os. *Rec. Trav. Chim.* 45, 445-448 (1926).
5. LeGeros, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.* 108, 4742-4753 (2008).
6. Fourman, P., Royer, P., Morgan, D. & Levell, M. *Calcium et le tissu osseux: biologie et pathologie. Trad. de la seconde ed. mise à jour en 1969*. (Flammarion),(1970).
7. Ramé, A. & Théron, S. *Anatomie et physiologie*. (Elsevier Masson, 2006).
8. Giudicelli, J. & Souberbielle, J. C. Le remodelage osseux et l'exploration de l'ostéoporose. *Rev. l'ACOMEN* 4, (1998).
9. Vernejoul, M.-C. de & Marie, P. Cellules osseuses et remodelage osseux. (1993).
10. Sabokbar, A., Millett, P. J., Myer, B. & Rushton, N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* 27, 57-67 (1994).
11. Deschepper, M., Paquet, J., Moya, A., Manassero, M., Bensidhoum, M., Petite, H. Des biomatériaux à l'ingénierie tissulaire : perspectives en réparation osseuse. *Tech. l'ingénieur Biomateriaux biomécanique base docum*, (2015).
12. Zapanta LeGeros, R. Apatites in biological systems. *Prog. Cryst. Growth Charact.* 4, 1-45 (1981).

13. Weiner, S. & Wagner, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **28**, 271–298 (1998).
14. Euv, S. Von. Biomineralisation osseuse: de la caractérisation structurale du mineral a son organisation 3D. (2015).
15. Currey, J. D. The structure of bone tissue. *Bones Struct. Mech.* 3–26 (2002).
16. Rey, C., Combes, C., Drouet, C. & Glimcher, M. J. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos. Int.* **20**, 1013–1021 (2009).
17. LU, Xiong et LENG, Yang. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials*, vol. 26, no 10, p. 1097-1108 (2005).
18. Legros, R., Balmain, N. & Bonel, G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif. Tissue Int.* **41**, 137–144 (1987).
19. Mechay, Abderrahmen. *Elaboration des biomatériaux apatitiques nanostructurés en milieux polyols: caractérisations physico-chimiques et études mécaniques après compaction par spark plasma sintering*. Diss. Paris 13 (2014).
20. Vallet-Regí, M. & González-Calbet, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. solid state Chem.* **32**, 1–31 (2004).
21. Glimcher, M. J. Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation. *Rev. Mineral. Geochemistry* **64**, 223–282 (2006).
22. Dorozhkin, V. S. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials* **2**, (2009).
23. Grunenwald, Anne. *Etude de l'interaction entre ADN et apatite analogue au minéral osseux et dentaire: implications pour la préservation de l'ADN ancien, son extraction, son analyse*. Diss. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier (2014).
24. Cazalbou, S., Eichert, D., Drouet, C., Combes, C. & Rey, C. Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. *Comptes Rendus Palevol* **3**, 563–572 (2004).
25. Tofighi, A. Nanocrystalline apatites for orthopedic biomaterials. *Mater. Clin. Appl.*

- Adv. Sei. Technol.* 28 77-84 (1999).
26. Cho, G., Vu, Y. & Ackerman, J. L. Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State ³¹P NMR Spectroscopy. *Science* (80-). 300, 1123-1127 (2003).
 27. Eichert, D., Drouet, C., Sfihi, H., Rey, C. & Combes, C. Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization. *Biomater. Res. Adv.* 9:3-143 (2007).
 28. Termine, J. D. & Posner, A. S. Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. *Science* (80-). 153, 1523-1525 (1966).
 29. Vopenka, B. & Pasteris, J. D. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater. Sci. Eng. C* 25, 131-143 (2005).
 30. Drouet, C., Aufray, M., Rollin-Sartinet, S., Vandecastelle, J., Grossin, D., Rossignol, F., Champion, E., Navrotsky, A. & Rey, C. Nanocrystalline apatites: The fundamental role of water. *Am. Mineral.* 103, 550-564 (2018).
 31. Drouet, C., Carayon, M.-T., Combes, C. & Rey, C. Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg²⁺ and Sr²⁺: A preamble to the activation of bone repair materials. *Mater. Sci. Eng. C* 28, 1544-1550 (2008).
 32. Elliott, J. C. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. 18, Elsevier (1994).
 33. Hughes, J. M. & Rakovan, J. The crystal structure of apatite, Ca₅(PO₄)₃(F, OH, Cl). *Rev. Mineral. geochemistry* 48, 1-12 (2002).
 34. Combes, C. & Rey, C. Biomimétisme et biocéramiques. *Acta Chim.* 16 26 (2003).
 35. Pastcris, J. D., Vopenka, D. & Valsami-Jones, E. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements* 4, 97-104 (2008).
 36. Rollin-Sartinet, S., Navrotsky, A., Champion, E., Grossin, D. & Drouet, C. Thermodynamic basis for evolution of apatite in calcified tissues. *Am. Mineral.* 98, 2037-2045 (2013).
 37. Vandecastelle, N., Rey, C. & Drouet, C. Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters. *J. Mater. Sci.*

- Mater. Med.* 23, 2593-2606 (2012).
38. Cazalbou, Sophie. *Échanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux*. Diss. Toulouse, INPT, (2000).
 39. Cazalbou, S., Combes, C., Eichert, D. & Rey, C. Adaptive physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. *J. Mater. Chem.* 14, 2148-2153 (2004).
 40. Hina, Ali. *Étude de la réactivité en milieu aqueux, d'apatites phosphocalciques d'intérêt biologique*. Diss. Toulouse, INPT (1996).
 41. Anderson, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 266-280 (1995).
 42. Golub, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* 1790, 1592-1598 (2009).
 43. Landis, W. J., Silver, F. H. & Freeman, J. W. Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues. *J. Mater. Chem.* 16, 1495-1503 (2006).
 44. Dorozhkin, Sergey V. "Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine." *Materials* 2.2, : 399-498 (2009).
 45. Mainard, D. Substituts osseux. *EMC - Appar. locomoteur* 8, 14-15 (2013).
 46. Park, Joon, and Roderic S. Lakes. *Biomaterials: an introduction*. Springer Science & Business Media, (2007).
 47. Anderson, James M. "Biocompatibility and bioresponse to biomaterials." *Principles of Regenerative Medicine*. Academic Press, 675-694 (2019).
 48. Jacquart, Sylvaine. *Substitut osseux injectable, antibactérien et résorbable: études physico-chimiques et biologiques d'un ciment composite à base d'apatite*. Diss. (2013).
 49. Vandecandelaere, Nicolas. *Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées*. Diss. 2012.
 50. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 74, 1487-1510 (1991).
 51. Mauffrey, C., Seligson, D., Lichte, P., Pape, H. C. & Al-Rayyan, M. Bone graft

- substitutes for articular support and metaphyseal comminution: What are the options? *Injury* 42, S35-S39 (2011).
52. Anselme, K. "Osteoblast adhesion on biomaterials." *Biomaterials* 21.7, 667-681 (2000).
 53. Castner, D. G. & Ratner, B. D. *Biomedical surface science: Foundations to frontiers. Surface Science* 500, (2002).
 54. Takahashi, H., Wang, Y. & Grainger, D. W. Device-based local delivery of siRNA against mammalian target of rapamycin (mTOR) in a murine subcutaneous implant model to inhibit fibrous encapsulation. *J. Control. Release* 147, 400-407 (2010).
 55. Karadjian, M. Essers, C., Tsitlakidis, S., Reible, B., Moghaddam, A., Boccaccini, A. R., & Westhauser, F. Biological properties of calcium phosphate bioactive glass composite bone substitutes: Current experimental evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1-22 (2019).
 56. Legeros, R. Z. Variability of HAP/b-TCP ratios in sintered apatites. *Journal of Dental Research*. 1619 DUKE ST, ALEXANDRIA, VA 22314 : AMER ASSOC DENTAL RESEARCH, p. 292-292 (1986).
 57. Lobo, S. E. & Arinzeh, T. L. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. 3, 815-826 (2010).
 58. Legeros, R. Z., Garrido, C. A., Lobo, S. E. & Turíbio, F. M. Biphasic calcium phosphate bioceramics for orthopaedic reconstructions: Clinical outcomes. *Int. J. Biomater.* 2011, 16-18 (2011).
 59. Misch, C. M. Autogenous Bone: Is It Still the Gold Standard? *Implant Dent.* 19, 361 (2010).
 60. Becker, W. , Urist, M., Becker, B. E., Jackson, W., Party, D. A., Bartold, M., ... & Niederwanger, M. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. *J. Periodontol.* 67, 1025-1033 (1996).
 61. Leunig, M. Demhartner, T. J., Sckell, A., Fraitzl, C. R., Gries, N., Sehenk, R. K., & Ganz, R. Quantitative assessment of angiogenesis and osteogenesis after transplantation of bone. Comparison of isograft and allograft bone in mice. *Acta*

- Orthop. Scand.* 70, 374-380 (1999).
62. De Groot, K., Geesink, R., Klein, C. & Serekian, P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 21, 1375-1381 (1987).
 63. Besra, L. & Liu, M. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). *Prog. Mater. Sci.* 52, 1-61 (2007).
 64. Boccaccini, A. R., Keim, S., Ma, R., Li, Y. & Zhitomirsky, I. Electrophoretic deposition of biomaterials. *J. R. Soc. Interface* 7, S581-S613 (2010).
 65. Kuo, M. C. & Yen, S. K. The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature. *Mater. Sci. Eng. C* 20, 153-160 (2002).
 66. Hulbert, S. F. The use of alumina and zirconia in surgical implants. *Adv. Ser. Ceram.* 1, 25-40 (1993).
 67. Yoon, B. H., Choi, W. Y., Kim, H. E., Kim, J. H. & Koh, Y. H. Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering. *Ser. Mater.* 58, 537-540 (2008).
 68. Miao, X., Hu, Y., Liu, J. & Huang, X. Hydroxyapatite coating on porous zirconia. *Mater. Sci. Eng. C* 27, 257-261 (2007).
 69. Jones, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 9, 4457-4486 (2013).
 70. Lefebvre, Leila. *Développement de bioverres poreux pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire*. Diss. Lyon, INSA, 2007.
 71. Carmo, Francisco Luis Araujo do. *Study on production methods of Bioglass Porous Structures for Bone Tissue Engineering*. Diss. 2018.
 72. Marin, E, Adachi, T., Boschetto, F., Zanocco, M., Rondinella, A., Zhu, W., & Pezzotti, G. Biological response of human osteosarcoma cells to Si₃N₄-doped Bioglasses. *Mater. Des.* 159, 79-89 (2018).
 73. Li, L., Hu, H., Zhu, Y., Zhu, M. & Liu, Z. 3D-printed ternary SiO₂-CaO-PO₅ bioglass-ceramic scaffolds with tunable compositions and properties for bone regeneration. *Ceram. Int.* 45, 10997-11005 (2019).

74. Ruys, A. J. Wei, M., Sorrell, C. C., Dickson, M. R., Brandwood, A., & Milthorpe, B. K. Sintering effects on the strength of hydroxyapatite. *Biomaterials* **16**, 409–415 (1995).
75. Ducheyne, P., Radin, S., Heughebaert, M. & Heughebaert, J. C. Calcium phosphate ceramic coatings on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution. *Biomaterials* **11**, 244–254 (1990).
76. Porter, A. E., Patel, N., Skepper, J. N., Best, S. M. & Bonfield, W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials* **24**, 4609–4620 (2003).
77. Gregory, T. M., Moreno, E. C. & Brown, W. E. Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37.5° C. *J. Res. natn. Bur. Stand.* **74**, 461–475 (1970).
78. McDowell, H., Gregory, T. M. & Brown, W. E. Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37 C. *J. Res. Natl. Bur. Stand., Sect. A* **81**, 273–281 (1977).
79. Tung, M. S., Eidelman, N., Sieck, B. & Brown, W. E. Octacalcium phosphate solubility product from 4 to 37 C. *J Res Nat Bur Stand* **93**, 613–624 (1988).
80. Gregory, T. M. Solubility of $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37°C. *J Res Natl Bur Std* **78**, 667–674 (1974).
81. Fowler, B. O. & Kuroda, S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility. *Calcif. Tissue Int.* **38**, 197–208 (1986).
82. Matsuya, S., Takagi, S. & Chow, L. C. Hydrolysis of tetracalcium phosphate in H_3PO_4 and KH_2PO_4 . *J. Mater. Sci.* **31**, 3263–3269 (1996).
83. Destainville, A., Champion, E., Bernache-Assollant, D. & Laborde, E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Mater. Chem. Phys.* **80**, 269–277 (2003).
84. Chaair, H., Labjar, H. & Britel, O. Synthèse du phosphate tricalcique- β . *Morphologie* **101**, 120–124 (2017).
85. O’Neill, R. McCarthy, H. O., Montufar, E. B., Ginebra, M. P., Wilson, D. I.,

- Lennon, A., & Dunne, N. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater.* **50**, 1–19 (2017).
86. Bouler, J. M., Pilet, P., Gauthier, O. & Verron, E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater.* **53**, 1–12 (2017).
87. Gallo, M., Tadier, S., Meille, S. & Chevalier, J. Resorption of calcium phosphate materials: Considerations on the in vitro evaluation. *J. Eur. Ceram. Soc.* **38**, 899–914 (2018).
88. Ben-nissan, B. *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials.* **2**, (2014).
89. Suzuki, O. Octacalcium phosphate (OCP) -based bone substitute materials. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **49**, 58–71 (2013).
90. Kay, Me I., R. A. Young, and A. S. Posner. "Crystal structure of hydroxyapatite." *Nature* 204.4963 1050-1052 (1964).
91. Bernard, L., Freche, M., Lacout, J. L. & Biscans, B. Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature - Influence of purity of the raw material. *Powder Technol.* **103**, 19–25 (1999).
92. Tonino, A. J., Van Der Wal, B. C. H., Heyligers, I. C. & Grimm, B. Bone remodeling and hydroxyapatite resorption in coated primary hip prostheses. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **467**, 478–484 (2009).
93. Daculsi, G., LeGeros, R. Z., Nery, E., Lynch, K. & Kerebel, B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* **23**, 883–894 (1989).
94. Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J.-M. & Daculsi, G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* **18**, 1037–1041 (1997).
95. Gauthier, O. Bouler, J. M., Aguado, E., Legeros, R. Z., Pilet, P., & Daculsi, G. Elaboration conditions influence physicochemical properties and in vivo bioactivity of macroporous biphasic calcium phosphate ceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **10**, 199–204 (1999).
96. Kim, D.-H. , Kim, K. L., Chun, H. H., Kim, T. W., Park, H. C., & Yoon, S. Y. In vitro biodegradable and mechanical performance of biphasic calcium phosphate

- porous scaffolds with unidirectional macro-pore structure. *Ceram. Int.* 40, 8293-8300 (2014).
97. Drouet, C., Grossin, D., Sarda, S. & Ca:zalbou, S. Apatites biomimétiques Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical. *Tech. l'ingénierie, Biomécanique* 33, (2018).
 98. Rey, C., Shimizu, J., Collins, B. & Glimcher, M. J. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the PO₄ domain. *Calcif Tissue Int.* 46, 384-394 (1990).
 99. MacKintosh, E. E., Patel, J. D., Marchant, R. E. & Anderson, J. M. Effects of biomaterial surface chemistry on the adhesion and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 78, 836-842 (2006).
 100. Teughels, L., Van Assche, G., Sliepen, L. & Quirynen, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* 17, 68-81 (2006).
 101. Khan, S. N., Cammisia Jr, F. P., Sandhu, H. S., Diwan, A. D., Girardi, F. P., & Lane, J. M. The biology of bone grafting. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 13, 77-86 (2005).
 102. Ghanaati, S., Ungert, R. E., Wehner, M. J., Barbeck, J., Orth, C., Kirkpatrick, J. A. & Kirkpatrick, C. J. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials* 32, 8150-8160 (2011).
 103. Fernandez de Grado, G., Keller, L., Lecloux-Gillet, Y., Vagner, Q., Lusset, A., Benkirane-Jessel, K., & Offner, D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J. Tissue Eng.* 9, (2018).
 104. Chida, K., Sugo, K., Takajima, T., Kakawaki, D., Takano, S., Nagura, G., ... & Craibe, K. In Vivo Release of Vancomycin from Calcium Phosphate Cement. *Biomater. Res. Int.* 2018, 1-6 (2018).
 105. Masri, B. A., Duncan, C. P., & Beauchamp, C. P. Long-term Elution of Antibiotics from Bone-Cement. *J. Arthroplasty* 13, 331-338 (1998).

106. Barroug, A. Noukrati, H., Errassifi, F., Sarda, S., Cazalbou, S., Combes, C., & Glimcher, M. J. Controlled adsorption and release onto calcium phosphates materials and drug delivery applications. (2013).
107. Silverman, L. D., Lukashova, L., Herman, O. T., Lane, J. M. & Boskey, A. L. Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. *J. Orthop. Res.* 25, 23-29 (2007).
108. Chai, F. Hornez, J. C., Blanchemain, N., Neut, C., Descamps, M., & Hildebrand, H. F. Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics. *Biomol. Eng.* 24, 510-514 (2007).
109. Leprêtre, S. Chai, F., Hornez, J. C., Vermet, G., Neut, C., Descamps, M., ... & Martel, B. Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. *Biomaterials* 30, 6086-6093 (2009).
110. Coignard, B. Antibiorésistance: la situation en France et dans le monde. *Bull. Acad. Natl. Med.* (2019).
111. Vuolteenaho, K., Moilanen, T. & Moilanen, E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 10-14 (2008).
112. Ginebra, M. P., Traykova, T. & Planell, J. A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J. Control. Release* 113, 102-110 (2006).
113. Sheng, Z. & Liu, Y. Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* 45, 6039-6050 (2011).
114. Ertem, E. Gutt, B., Zuber, F., Allegri, S., Le Ouay, B., Mefti, S., & Ren, Q. Core-Shell Silver Nanoparticles in Endodontic Disinfection Solutions Enable Long-Term Antimicrobial Effect on Oral Biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 34762-34772 (2017).
115. Grün, A. Y., App, C. B., Breidenbach, A., Meier, J., Metreveli, G., Schaumann, G. E., & Manz, W. Effects of low dose silver nanoparticle treatment on the structure and community composition of bacterial freshwater biofilms. *PLoS one*,13,6, p. e0199132 (2018).
116. Fabrega, J., Renshaw, J. C. & Lead, J. R. Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Sei. Technol.* 43, 9004-9009 (2009).

117. Shi, C. Gao, J., Wang, L., Fu, J., Wang, D., & Zhu, Y. Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. *Mater. Sei. Eng. C* 55, 497-505 (2015).
118. Riaz, M. Zia, R., Ijaz, A., Hussain, T., Iqbal, M., & Iqbal, A. Synthesis of monophasic Ag doped hydroxyapatite and evaluation of antibacterial activity. *Mater. Sei. Eng. C* 90, 308-313 (2018).
119. Peetsch, A. Greulich, C., Braun, D., Stroetges, C., Rehage, H., Siebers, B., & Epple, M. Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 102, 724-729 (2013).
120. Ciohanu, C. S., Konaru, S. L., Coustumer, P. Le, Constantin, L. V. & Prdoi, D. Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. 1-9 (2012).
121. Galdiero, S. Falanga, A., Vitiello, V., Cantisani, D., Larra, V., & Galdiero, A. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules* 16, 8894-8918 (2011).
122. Alt, V. Bechert, T., Steinrücke, P., Wägener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., ... & Schnettler, R. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25, 4383-4391 (2004).
123. Bai, X., Sandukas, S., Applford, M., Ong, J. L. & Rabici, A. Antibacterial effect and cytotoxicity of Ag-doped functionally graded hydroxyapatite coatings. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 100, 553-561 (2012).
124. Chambers, C. W., Proctor, C. L. & Kahler, P. W. Bactericidal effect of low concentrations of silver. *Journal-American Water Works Assac.* 54, 208-216 (1962).
125. Percival, S. L., Bowler, P. G. & Russell, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60, 1-7 (2005).
126. Hwang, K.-S., Hwangbo, S. & Kim, J.-T. Silver-doped calcium phosphate nanopowders prepared by electrostatic spraying. *J. Nanopartic Res.* 10, 1337-1341 (2008).
127. Chung, R. Hsieh, M. F., Huang, C. W., Perng, L. H., Yen, H. W., & Chin, T. S.

- Antimicrobial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* **76**, 169–178 (2006).
128. Lim, P. N., Tay, B. Y., Chan, C. M. & Thian, E. S. Synthesis and characterization of silver/silicon-cosubstituted nanohydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **100**, 285–291 (2012).
129. Arredondo, M. & Núñez, M. T. Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* **26**, 313–327 (2005).
130. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. in *Methods in enzymology* **186**, 1–85, Elsevier, (1990).
131. Fernane, F., Mecherri, M. O., Sharrock, P., Hadioui, M., Lounici, H., & Fedoroff, M. Sorption of cadmium and copper ions on natural and synthetic hydroxylapatite particles. *Mater. Charact.* **59**, 554–559 (2008).
132. Barralet, J., Gbureck, U., Habibovic, P., Vorndran, E., Gerard, C., & Doillon, C. J. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. *Tissue Eng. Part A* **15**, 1601–1609 (2009).
133. Sahithi, K. Swetha, M., Prabakaran, M., Moorthi, A., Saranya, N., Ramasamy, K., & Selvamurugan, N. Synthesis and characterization of nanoscale-hydroxyapatite-copper for antimicrobial activity towards bone tissue engineering applications. *J. Biomed. Nanotechnol.* **6**, 333–339 (2010).
134. Gomes, S. Vichery, C., Descamps, S., Martinez, H., Kaur, A., Jacobs, A., & Renaudin, G. Acta Biomaterialia Cu-doping of calcium phosphate bioceramics: From mechanism to the control of cytotoxicity. *Acta Biomater.* **65**, 462–474 (2018).
135. Borkow, G. & Gabbay, J. Copper as a biocidal tool. *Curr. Med. Chem.* **12**, 2163–2175 (2005).
136. Ohsumi, Y., Kitamoto, K. & Anraku, Y. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.* **170**, 2676–2682 (1988).
137. Stanić, Vojislav, Dimitrijević, S., Antić-Stanković, J., Mitrić, M., Jokić, B., Plečaš,

- I. B., & Raicević, S. "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders." *Applied Surface Science* 256.20: 6083-6089 (2010).
138. Ueda, K., Morita, J., Yamashita, K. & Komano, T. Inactivation of bacteriophage 0X174 by mitomycin C in the presence of sodium hydrosulfite and cupric ions. *Chem. Biol. Internet.* 29, 145-158 (1980).
139. Yang, L. Perez-Amodio, S., Barrère-de Groot, F. Y., Everts, V., van Blitterswijk, C. A., & Habibovic, P. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts. *Biomaterials* 31, 2976-2989 (2010).
140. Yamamoto, A., Honma, R., Tanaka, A. & Sumita, M. Generic tendency of metal salt cytotoxicity for six cell lines. 1-2 (1999).
141. Karpov, A. S., Nuss, J., Jansen, M., Kazin, P. E. & Tretyakov, Y. D. Synthesis, crystal structure and properties of calcium and barium hydroxyapatites containing copper ions in hexagonal channels. *Solid state Sei.* 5, 1277-1283 (2003).
142. Sutter, B., Ming, D. W., Clearfield, A. & Hossner, L. R. Mineralogical and chemical characterization of iron-, manganese-, and copper-containing synthetic hydroxyapatites. *Sail Sei. Soc. Am. J.* 67, 1935-1942 (2003).
143. Bruckner, S., Lusvardi, G., Menabue, L. & Saladini, M. Effect of Cu²⁺ ion on the structural stability of synthetic hydroxyapatite. *J. Mater. Chem.* 3, 715-719 (1993).
144. Li, X. Sogo, Y., Ito, A., Mutsuzaki, H., Ochiai, N., Kobayashi, T., & LeGeros, R. Z. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo. *Mater. Sei. Eng. C* 29, 969-975 (2009).
145. Li, J. D. Li, Y. B., Zuo, Y., Lv, G. Y., Yang, W. H., & Tian, Z. Y. Antibacterial effect and security evaluation on nano-hydroxyapatite bearing Cu²⁺ and Zn²⁺. in *Materials science forum* 510, 890-893 (Trans Tech Publ) (2006).
146. Shanmugam, S. & Buvanewari Gopal. Copper substituted hydroxyapatite and fluorapatite: Synthesis, characterization and antimicrobial properties. *Ceram. Int.* 40 15655-15662 (2014).
147. Ikeuchi, M. Ito, A., Dohi, Y., Ohgushi, H., Shimaoka, H., Yonemasu, K., & Tateishi, T. Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J. Biomed.*

- Mater. Res. A* **67**, 1115–22 (2003).
148. Moonga, B. S. & Dempster, D. W. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 453–457 (1995).
 149. Ito, A. Kawamura, H., Otsuka, M., Ikeuchi, M., Ohgushi, H., Ishikawa, K., & Ichinose, N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mater. Sci. Eng. C* **22**, 21–25 (2002).
 150. Phan, T., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, J. D. & Marquis, R. E. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 31–38 (2004).
 151. Atmaca, S., Kadri, G. Ü. L. & Cicek, R. The effect of zinc on microbial growth. *Turkish J. Med. Sci.* **28**, 595–598 (1998).
 152. Kasahara, M. & Anraku, Y. Inhibition of the respiratory chain of *Escherichia coli* by zinc ions. *J. Biochem.* **72**, 777–781 (1972).
 153. Gomes, S., Nedelec, J.-M., Jallot, E., Sheptyakov, D. & Renaudin, G. Unexpected mechanism of Zn²⁺ insertion in calcium phosphate bioceramics. *Chem. Mater.* **23**, 3072–3085 (2011).
 154. Li, J., Li, Y., Zhang, L. & Zuo, Y. Composition of calcium deficient Na-containing carbonate hydroxyapatite modified with Cu (II) and Zn (II) ions. *Appl. Surf. Sci.* **254**, 2844–2850 (2008).
 155. Ma, X. & Ellis, D. E. Initial stages of hydration and Zn substitution/occupation on hydroxyapatite (0 0 0 1) surfaces. *Biomaterials* **29**, 257–265 (2008).
 156. Matsuya, S. Lin, X., Udoh, K. I., Nakagawa, M., Shimogoryo, R., Terada, Y., & Ishikawa, K. Fabrication of porous low crystalline calcite block by carbonation of calcium hydroxide compact. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1361–1367 (2007).
 157. Tang, Y., Chappell, H. F., Dove, M. T., Reeder, R. J. & Lee, Y. J. Zinc incorporation into hydroxylapatite. *Biomaterials* **30**, 2864–2872 (2009).
 158. Thian, E. S. Konishi, T., Kawanobe, Y., Lim, P. N., Choong, C., Ho, B., & Aizawa, M. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties. 437–445 (2013).

159. Myon, L.; Ferri, J.; Chai, F.; Blanchemain, J. & Raoul, G. Oro-maxillofacial bone tissue engineering combining biomaterials, stem cells, and gene therapy. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* 112, 201-211 (2011).
160. Petite, H. La bio-ingénierie de la régénération osseuse. *Medecine/Sciences* 18, 995-1002 (2002).
161. Loebel, C. & Burdick, J. A. Engineering Stem and Stromal Cell Therapies for Musculoskeletal Tissue Repair. *Cell Stem Cell* 22, 325-339 (2018).
162. Kolk, A.; Boskov, M.; Haidari, S.; Tischler, T.; van Griensven, W.; Bissinger, O.; & Plank, C. Comparative analysis of bone regeneration behavior using recombinant human BMP-2 versus plasmid DNA of BMP-2. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 107; 163-173 (2019).
163. Marie, P. J., Ammann, P., Boivin, G. & Rey, C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif. Tissue Int.* 69, 121-129 (2001).
164. S. Cazalbou, C. Combes and C. Rey Publications, T. & Berlin, F. U. Biomimetic Approach for Strontium-Containing Ca-P Bioceramics with Enhanced Biological Activity. 195, 147-150 (2001).
165. Okayama, S.; Akao, M.; Jakarnura, S.; Shin, Y.; Higashikata, M.; & Aoki, H. The mechanical properties and solubility of strontium-substituted hydroxyapatite. *Biomed. Mater. Eng.* 1, 11-17 (1991).
166. Bonnelye, E.; Chabadel, A.; Saltel, F. & Jurdic, P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* 42, 129-138 (2008).
167. Pina, S.; Vieira, S. I.; Pereira, P.; Torres, P. M. C.; da Cruz e Silva, O. A. B.; da Cruz e Silva, E. F.; & Ferreira, J. M. F. Biological responses of brushite-forming Zn- and ZnSr-substituted beta-tricalcium phosphate bone cements. *Eur. Cell. Mater.* 20; 162-77 (2010).
168. Boivin, G.; Deloffre, P.; Ferrat, B.; Pancier, G.; Boudeulle, M.; Mauras, Y.; & Meunier, P. J. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J. Bone Miner. Res.* 11, 1302-1311 (1996).
169. Rakovan, J. F. & Hughes, J. M. Strontium in the apatite structure: strontian fluorapatite and belovite-(Ce). *Can. Mineral.* 38, 839-845 (2000).

170. Koutsoukos, P. G. & ancollas, G. H. Influence of strontium ion on the crystallization of hydroxyapatite from aqueous solution. *J Phys. Chem.* 85, 2403-2408 (1981).
171. Rokidi, S. & Koutsoukos, P. G. Crystal growth of calcium phosphates from aqueous solutions in the presence of strontium. *Chem. Eng. Sci.* 77, 157-164 (2012).
172. Cazalhou, S., Combes, C. & Rey, C. Biomimetic approach for strontium-containing Ca-P bioceramics with enhanced biological activity. in *Key Engineering Materials* 192, 147-150 (2001).
173. Pan, H. B. Li, Z. Y., Lam, W. M., Wong, J. C., Darvell, B. W., Luk, K. D. K., & Lu, W. W. Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration. *Acta Biomater.* 5, 1678-1685 (2009).
174. Saris, L., Viirvaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. & Levenstam, A. Magnesium, An update on physiological, clinical and analytical aspects. 294, 1-26 (2000).
175. Revell, P. A., Damien, E., Zhang, X. S., Evans, P. & Hamlett, C. R. The Effect of Magnesium Ions on Bone Bonding to Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy Implants. *Key Eng. Mater.* 254-256, 447-450 (2003).
176. Zrciqat, H. Howlett, C. R., Zannettino, A., Evans, P., Schulz-Tanzil, G., Knäuper, C., & Shakibaei, M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 175-184 (2002).
177. Yarnasaki, Y., Yoshida, Y., Okazaki, M., Shirai, A., Uchida, T., Kubo, T., Matsuda, K. Synthesis of functionally graded CaCO_3 apatite accelerating osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* 62, 99-105 (2002).
178. Staiger, M. P., Pietak, A. M., Huadmai, J. & Dias, G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials* 27, 1728-1734 (2006).
179. Tampieri, A., Celotti, G. C., Landi, E. & Sandri, M. Magnesium Doped Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization. *Key Eng. Mater.* 264-268, 2051-2054 (2004).
180. Martens, C. S. & Harriss, R. C. Inhibition of apatite precipitation in the marine

- environment by magnesium ions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 34, 621-625 (1970).
181. Reddy M., M. & Karin Wang, K. Crystallization of calcium carbonate in the presence of metal ions. *J. Cryst. Growth* 50, 470-480 (1980).
 182. Kanzaki, N., Onuma, K., Treboux, G., Tsutsumi, S. & Ito, A. Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face. *J. Phys. Chem. B* 104, 4189-4194 (2002).
 183. Habibovic, P. & Barralet, J. E. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomater.* 7, 3013-3026 (2011).
 184. Vallet-Regí, Maria, and Antonio J. Salinas. "Ceramics as bone repair materials." *Bone repair biomaterials*. Woodhead publishing, 141-178 (2019).
 185. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474-5491 (2005).
 186. Hulbert, S. F., Morrison, S. J. & Klawitter, J. J. Compatibility of porous ceramics with soft tissue; application to tracheal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 5, 269-279 (1971).
 187. Lu, J. X., Flautre, B., Anselme, K., Hardouin, P., Gallur, A., Descamps, M., & Thierry, B. Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10, 111-120 (1999).
 188. Collin, Isabelle. *Contribution à l'optimisation de céramiques phosphocalciques macroporeuses pour le comblement de défauts osseux: élaboration et caractérisation mécanique et architecturale; étude de la fonctionnalité in vivo*. Diss. Nantes, (2006).
 189. Habibovic, P., Kruyt, M. C., Juhl, M. V., Clyens, S., Martinetti, R., Dolcini, L., ... & van Blitterswijk, C. A. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J. Orthop. Res.* 26, 1363-1370 (2008).
 190. Daculsi, G. & LeGeros, R. Biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics: Chemical, physical and biological properties. *Encycl. Biomater. Biomed. Eng.* 1 (2006).
 191. Le Nihouannen, D., Daculsi, G., Saffarzadeh, A., Gauthier, O., Delplace, S., Pilet, P., & Layrolle, P. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles. *Bone* 36, 1086-1093 (2005).

192. Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. & Bizios, R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* 51, 475-483 (2000).
193. Habibovic, P., Yuan, H., van der Valk, C. M., Meijer, G., van Blitterswijk, C. A., & de Groot, K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26, 3565-3575 (2005).
194. Moura, J., Teixeira, L. N., Ravagnani, C., Peitl, O., Zanotto, E. D., Beloti, M. M., ... & de Oliveira, P. T. "In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®)." *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 82.3, 545-557 (2007).
195. Li, X., van Blitterswijk, C.A., Feng, Q., Cui, F. & Watari, F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials* 29, 3306-3316 (2008).
196. Papat, K. C., Chatvanichkul, K. I., Barnes, G. L., Latempa Jr, T. J., Grimes, C. A., & Desai, T. A. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells cultured on nanoporous alumina surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 80, 955-964 (2007).
197. Annaz, B., Ring, K. A., Kayser, M., Buckland, T., & Silvio, L. D. "Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: a scanning electron microscopy study." *Journal of Microscopy* 215.1, 100-110 (2004).
198. Bai, H., Wang, D., Delattre, B., Gao, W., De Coninck, J., Li, S., & Tomsia, A. P. Biomimetic gradient scaffold from ice-templating for self-seeding of cells with capillary effect. *Acta Biomater.* 20, 113-119 (2015).
199. Polak, S. J., Rustom, L. E., Genin, G. M., Talcott, M. & Wagoner Johnson, A. J. A mechanism for effective cell-seeding in rigid, microporous substrates. *Acta Biomater.* 9, 7977-7986 (2013).
200. Boyde, A., Corsi, A., Quarto, R., Cancedda, R. & Bianco, P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone* 24, 579-89 (1999).
201. Draenert, M., Draenert, A. & Draenert, K. Osseointegration of hydroxyapatite and

- remodeling-resorption of tricalciumphosphate ceramics. *Microsc. Res. Tech.* **76**, 370–380 (2013).
202. Bohner, M., Baroud, G., Bernstein, A., Döbelin, N., Galea, L., Hesse, B., ... & Sague, J. Characterization and distribution of mechanically competent mineralized tissue in micropores of β -tricalcium phosphate bone substitutes. *Mater. Today* **20**, 106–115 (2017).
203. Malmström, J., Slotte, C., Adolfsson, E., Norderyd, O. & Thomsen, P. Bone response to free form-fabricated hydroxyapatite and zirconia scaffolds: A histological study in the human maxilla. *Clin. Oral Implants Res.* **20**, 379–385 (2009).
204. Liu, R., Xu, T. & Wang, C. an. A review of fabrication strategies and applications of porous ceramics prepared by freeze-casting method. *Ceram. Int.* **42**, 2907–2925 (2016).
205. Kim, H. J., Park, I. K., Kim, J. H., Cho, C. S. & Kim, M. S. Gas foaming fabrication of porous biphasic calcium phosphate for bone regeneration. *Tissue Eng. Regen. Med.* **9**, 63–68 (2012).
206. Novotna, L., Kucera, L., Hampl, A., Drdlik, D. & Cihlar, J. Biphasic calcium phosphate scaffolds with controlled pore size distribution prepared by in-situ foaming. *Mater. Sci. Eng. C* **95**, 363–370 (2019).
207. Darus, F., Isa, R. M., Mamat, N. & Jaafar, M. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional bioceramic scaffolds: Effect on pores size, porosity and compressive strength. *Ceram. Int.* **44**, 18400–18407 (2018).
208. Miranda, P., Pajares, A., Saiz, E., Tomsia, A. P., & Guiberteau, F. "Mechanical properties of calcium phosphate scaffolds fabricated by robocasting." *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **85.1**: 218-227 (2008).
209. Durual, Stéphane. "Impression 3D et régénération osseuse: un mariage plein d'avenir." *Biomatériaux cliniques* **1.2**: 56-59 (2016).
210. Ferrage, L., Bertrand, G., Lenormand, P., Grossin, D., & Ben-Nissan, B. "A review of the additive manufacturing (3DP) of bioceramics: alumina, zirconia (PSZ) and hydroxyapatite." *Journal of the Australian Ceramic Society* **53.1**: 11-20 (2017).

211. Descamps, M., Duhoo, T., Monchau, F., Lu, J., Hardouin, P., Hornez, J. C., & Leriche, A. Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramics. *J. Eur. Ceram. Soc.* **28**, 149–157 (2008).
212. Klein, S., Nurjadi, D., Eigenbrod, T. & Bode, K. A. Evaluation of antibiotic resistance to orally administrable antibiotics in staphylococcal bone and joint infections in one of the largest university hospitals in Germany: Is there a role for fusidic acid? *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 155–157 (2016).
213. Kergourlay, E., Grossin, D., Cinca, N., Josse, C., Dosta, S., Bertrand, G., ... & Rey, C. First Cold Spraying of Carbonated Biomimetic Nanocrystalline Apatite on Ti6Al4V: Physical-Chemical, Microstructural, and Preliminary Mechanical Characterizations. *Adv. Eng. Mater.* **18**, 496–500 (2016).
214. Habibovic, P., Barrère, F., Blitterswijk, C. A. Groot, K. & Layrolle, P. Biomimetic Hydroxyapatite Coating on Metal Implants. *J. Am. Ceram. Soc.* **85**, 517–522 (2004).
215. F. Barrère, P. Layrolle, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot. *Biomimetic Calcium Phosphate Coatings on Ti6Al4V: A Crystal Growth Study of Octacalcium Phosphate and Inhibition by Mg21 and HCO₃²⁻*. (1999).
216. Taguchi, T., Muraoka, Y., Matsuyama, H., Kishida, A. & Akashi, M. Apatite coating on hydrophilic polymer-grafted poly (ethylene) films using an alternate soaking process. *Biomaterials* **22**, 53–58 (2000).
217. Strange, D. G. T. & Oyen, M. L. Biomimetic bone-like composites fabricated through an automated alternate soaking process. *Acta Biomater.* **7**, 3586–3594 (2011).
218. Izawa, H. Nishino, S., Maeda, H., Morita, K., Ifuku, S., Morimoto, H., Saimoto Kadokawa, J. I. Mineralization of hydroxyapatite upon a unique xanthan gum hydrogel by an alternate soaking process. *Carbohydr. Polym.* **102**, 846–851 (2014).
219. Pierre, Camille. *Elaboration, caractérisation et étude des propriétés de revêtements bioactifs à la surface d'implants dentaires*. Diss. 2018.
220. Malakauskaite-Petruleviciene, M., Stankeviciute, Z., Beganskiene, A., & Kareiva, A. "Sol-gel synthesis of calcium hydroxyapatite thin films on quartz substrate using dip-coating and spin-coating techniques." *Journal of sol-gel science and technology* **71.3**: 437-446 (2014).

221. Brinker, C. J., Frye, G. C., Hurd, A. J., & Ashley, C. S. Fundamentals of sol-gel dip coating. 201, 97-108 (1991).
222. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27, 2907-15 (2006).
223. Gamble, J. L. *Chemical anatomy, physiology, and pathology of extracellular fluid*. 74, (LWW), (1952).
224. Arce, H., Montera, M. L., Saenz, A., & Castano, V. M. "Hydroxyapatite coatings on metals from calcium-EDTA-phosphate homogeneous solutions." *International Journal of Materials and Product Technology* 30.4: 408-418 (2007).
225. Miyazaki, H., Maeda, H., Yoshida, S., Suzuki, H., & Ota, T. "Deposition of hydroxyapatite thin films from saturated calcium phosphate solution by controlling the substrate temperature." *Journal of the Ceramic Society of Japan* 122.1429: 835-837 (2014).
226. Barrere, F., van Blitterswijk, C., de Groot, K. & Layrolle, P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. *Biomaterials* 23, 1921-1930 (2002).
227. Duarte, A. R. C., Mano, J. F. & Reis, R. L. Supercritical fluids in biomedical and tissue engineering applications: a review. *Int. Mater. Rev.* 54, 214-222 (2009).
228. Pasquali, I., Bettini, R. & Giordano, F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 299-310 (2006).
229. Darani, K. K. & Mozafari, M. R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: a review. *J. Biochem. Technol.* 2, 144-152 (2009).
230. Ganan, N., Morchain, J., Camy, S. & Condoret, J.-S. Rate-based simulation of a high pressure counter-current packed column for supercritical CO₂ extraction of alcohol from dilute aqueous mixtures. *J. Supercrit. Fluids* 135, 168-179 (2018).
231. Camy, S. & Condoret, J.-S. Modelling and experimental study of separators for co-solvent recovery in a supercritical extraction process. *J. Supercrit. Fluids* 38, 51-61 (2006).
232. Obeid, S., Beaufils, N., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., & Pontalier, P. Y. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried

- microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Algal Res.* 34, 49-56 (2018).
233. Labauze, H., Camy, S., Floquet, P., Benjelloun-Mlayah, B. & Condoret, J.-S. Kinetic study of 5-Hydroxymethylfurfural synthesis from fructose in high pressure CO₂-Water two-phase system. *Ind. Eng. Chem. Res.* 58, 92-100 (2018).
234. Xu, Y., Yan, Y., He, T., Zhan, K., Yang, J., Zhao, B., ... & Xia, B. Y Supercritical CO₂-Assisted synthesis of NiFe₂O₄/vertically-aligned carbon nanotube arrays hybrid as a bifunctional electrocatalyst for efficient overall water splitting. *Carbon N. Y.* 145, 201-208 (2019).
235. Kondrat, S. A., Smith, P. J., Lu, L., Bartley, J. K., Taylor, S. H., Spencer, M. S., ... & Hutchings, G. J. Preparation of a highly active ternary Cu-Zn-Al oxide methanol synthesis catalyst by supercritical CO₂ anti-solvent precipitation. *Catal. Today* 317, 12-20 (2018).
236. Santana, Â. L., Santos, D. T. & Meireles, M. A. A. Perspectives on small-scale integrated biorefineries using supercritical CO₂ as a green solvent. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* (2018).
237. Safi, C., Camy, S., Frances, C., Varela, M. M., Badia, E. C., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. Extraction of lipids and pigments of *Chlorella vulgaris* by supercritical carbon dioxide: influence of bead milling on extraction performance. *J. Appl. Phycol.* 26, 1711-1718 (2014).
238. Perrut, M. Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review). *J. Supercrit. Fluids* 66, 359-371 (2012).
239. Khosravi-Darani, K., and M. R. Mozafari. "Supercritical fluid application in food and bioprocess technology." *Mass Transfer-Advanced Aspects*. Intechüpen, 2011.
240. Cardea, S., Sessa, M. & Reverchon, E. The Journal of Supercritical Fluids Supercritical CO₂ assisted formation of poly (vinylidene fluoride) aerogels containing amoxicillin , used as controlled release device. *J. Supercrit. Fluids* 59, 149-156 (2011).
241. Masmoudi, Y., Azzouk, L. Ben, Forzano, O., Andre, J.-M. & Badens, E. Supercritical impregnation of intraocular lenses. *J. Supercrit. Fluids* 60, 98-105 (2011).
242. Champeau, M., Thomassin, J. M., Tassaing, T. & Jérôme, C. Drug loading of

253. Bernhardt, A., Wehrl, M., Paul, B., Hochmuth, T., Schumacher, M., Schütz, K., & Gelinsky, M. Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. *PLoS One* 10,6, e0129205 (2015).
254. Soares, G. C., Learmonth, D. A., Vallejo, M. C., Davila, S. P., Gonzalez, P., Sousa, R. A., & Oliveira, A. L. Supercritical CO₂ technology: The next standard sterilization technique? *Mater. Sci. Eng. C* 99, 520-540 (2019).
255. Ehman, E. C. Mechanism of Bacillus subtilis Spore Inactivation by and Resistance to Supercritical CO₂ plus Peracetic Acid. *HHS Public Access* 46, 1247-1262 (2017).
256. Kamihira, M., Taniguchi, M., Kobayashi, T. Sterilization of Microorganisms with Supercritical Carbon Dioxide(Food & Nutrition). *Agric. Biol. Chem.* 51, 407-412 (1987).
257. Christensen, T. W., Burns, D. C., White, A. L., Ganem, B. & Eisenhut, A. R. Sterilization methods and apparatus which employ additive-containing supercritical carbon dioxide sterilant. *U.S Patent*, 7, 108,832 (2006).
258. Lackner, K. S. A guide to CO₂ sequestration. *Science*. 300, 1677-1678 (2003).
259. C Peng, JP Crawshaw, G. M. The pH of CO₂-saturated water at temperatures between 308 K and 423 K at pressures up to 15 MPa. *J. Supercrit. Fluids* 82, 129-137 (2013).
260. Barrere, F., Van Blitterswijk, C.A., De Groot, K. & Layrolle, P. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx5 solution. *Biomaterials* 23, 1921-1930 (2002).
261. Fujihara, K., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* 26, 4139-4147 (2005).
262. Hanna, R. G. & Muir, G. L. Red sea corals as biomonitors of trace metal pollution. *Environ. Monit. Assess.* 14, 211-222 (1990).
263. Arbatan, T., Fang, X. & Shen, W. Superhydrophobic and oleophilic calcium carbonate powder as a selective oil sorbent with potential use in oil spill clean-ups. *Chem. Eng. J.* 166, 787-791 (2011).
264. Tateno, Atsushi, and Kimio Mashiko. "Filter for tobacco smoking." *U.S. Patent*

- 4,889,144. 26 Dec. (1989).
265. Camargo, I. M. C., Saiki, M., Vasconcellos, M. B. A. & Avila, D. M. Abrasiveness evaluation of silica and calcium carbonate used in the production of dentifrices. *J. Cosmet. Sei.* 52, 163-168 (2001).
 266. Cantin, H. Anhydrous hydrophobic cosmetic composition in the form of a compact powder. *U.S. Patent* 6,395,301. 28 May (2002).
 267. Oohashi, Shihoka, and Yukiko Hiruma. "Makeup cosmetic." *U.S. Patent* 15,545,126. (2018).
 268. Qi, C., Zhu, Y. J., Lu, B. Q., Zhao, X. Y., Zhao, J., Chen, F., & Wu, J. Atp-stabilized amorphous calcium carbonate nanospheres and their application in protein adsorption. *Small* 10, 2047-2056 (2014).
 269. Wang, C., Chen, S., Yu, Q., Hu, F. & Yuan, H. Taking advantage of the disadvantage: employing the high aqueous instability of amorphous calcium carbonate to realize burst drug release within cancer cells. *J. Mater. Chem. B* 5, 2068-2073 (2017).
 270. Combes, Christèle, Reine Bareille, and Christian Rey. "Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cernent compositions for bone reconstruction." *J Biomed Mater Res* 79.2, 318-328 (2006).
 271. Gu, W., Bousfield, D. W. & Tripp, C. P. Formation of calcium carbonate particles by direct contact of Ca(OH)₂ powders with supercritical CO₂. *J. Mater. Chem.* 16, 3312-3317 (2006).
 272. Watanabe, H., Mizuno, Y., Endo, T., Wang, X., Fuji, M., & Takahashi, M. Effect of initial pH on formation of hollow calcium carbonate particles by continuous CO₂ gas bubbling into CaCb aqueous solution. *Adv. Powder Technol.* 20, 89-93 (2009).
 273. Han, Y. S., Hadiko, G., Fuji, M. & Takahashi, M. Effect of flow rate and CO₂ content on the phase and morphology of CaCQ₃ prepared by bubbling method. *J. Cryst. Growth* 276, 541-548 (2005).
 274. Ferrentino, G., Barletta, D., Balaban, M. O., Ferrari, G. & Poletto, M. Measurement and prediction of CO₂ solubility in sodium phosphate monobasic solutions for food treatment with high pressure carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 52, 142-150 (2010).

275. Papadakis, V. G., Vayenas, C. G. & Fardis, M. N. Fundamental modeling and experimental investigation of concrete carbonation. *Mater. J.* 88, 363-373 (1991).
276. Wallaey, R. Study of carbonate apatite obtained by solid-state synthesis. *Silicon, Sulfur, Phosphates* 183-190 (1954).
277. Tateishi, T., Tsutsumi, S., Ito, A., Maekawa, K. & Ikazaki, F. Solubility product of OH-carbonated hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 36, 522-528 (2002).
278. Nordström, E. G. & Karlsson, K. H. Carbonate-doped hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.* 1, 182-184 (1990).
279. Vignoles, M., Bonel, G. & Young, R. A. Occurrence of nitrogenous species in precipitated B-type carbonated hydroxyapatites. *Calcif. Tissue Int.* 40, 64-70 (1987).
280. Bonfield, W. & Gibson, I. R. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 59, 697-708 (2002).
281. Barralet, Jake. *Processing and sintering of carbonate hydroxyapatite*. Diss. Queen Mary University of London, (1995).
282. Heughebaert, Jean-Claude. *Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques*. Diss. (1977).
283. Kokubo, T., Miyaji, F., Kim, H. M., & Nakamura, T. "Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals." *Journal of the American Ceramic Society* 79.4: 1127-1129(1996).
284. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284, 143-147 (1999).
285. Beuvier, T., Calvignac, B., Delcroix, G. J. R., Tran, M. K., Kodjikian, S., Delorme, N., ... & Boury, Synthesis of hollow vaterite CaCO₃ microspheres in supercritical carbon dioxide medium. *J. Mater. Chem.* 21, 9757 (2011).
286. Peng, D.-Y. & Robinson, D. B. A new two-constant equation of state. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 15, 59-64 (1976).
287. Helgeson, H. C. Thermodynamics of hydrothermal systems at elevated

- temperatures and pressures. *Am. J. Sci.* **267**, 729–804 (1969).
288. Rey, C., Lian, J., Grynpas, M., Shapiro, F., Zylberberg, L., & Glimcher, M. J. Non-apatitic environments in bone mineral: FT-IR detection, biological properties and changes in several disease states. *Connect. Tissue Res.* **21**, 267–273 (1989).
289. Drouet, C., Gómez-Morales, J., Sarda, S., Delgado-López, J. M. & Iafisco, M. Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **59**, 1–46 (2012).
290. Iijima, M. & Onuma, K. Octacalcium Phosphate Overgrowth on β -Tricalcium Phosphate Substrate in Metastable Calcium Phosphate Solution. in *Biom mineralization* 267–272 (Springer, 2018).
291. Mullin, J. W. Crystallization Butterworth. (1993).
292. Sugarman, B. Zinc and infection. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 137–147 (1983).
293. Li, Z., Wen, T., Su, Y., Wei, X., He, C., & Wang, D. Hollow hydroxyapatite spheres fabrication with three-dimensional hydrogel template. *CrystEngComm* **16**, 4202–4209 (2014).
294. Gou, Z., Yang, X., Gao, X., Zhang, X., Ting, K., Wu, B. M., & Gao, C. Octacalcium phosphate microscopic superstructure self-assembly and evolution by dual-mediating combination. *CrystEngComm* **11**, 1585–1590 (2009).
295. Tung, Ming S. "Calcium phosphates: structure, composition, solubility, and stability." *Calcium phosphates in biological and industrial systems*. Springer, Boston, MA. 1-19 (1998).
296. Shamrai, V. F., Karpikhin, A. E., Fedotov, A. Y., Sirotinkin, V. P., Barinov, S. M., & Komlev, V. S. Structural changes during the hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate to octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Inorg. Mater.* **51**, 355–361 (2015).
297. Eliaz, N. & Eliyahu, M. Electrochemical processes of nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium supported by real-time electrochemical atomic force microscopy. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **80**, 621–634 (2007).
298. Eliaz, N. Electrocrystallization of Calcium Phosphates. *Isr. J. Chem.* **48**, 159–168 (2009).

299. Qi, Y. C., Shen, J., Jiang, Q. Y., Jin, B., Chen, J. W., Zhang, X., & Su, J. L. "Hierarchical porous hydroxyapatite microspheres: synthesis and application in water treatment." *J. Mater. Sci.* **51.5**: 2598-2607 (2016).
300. Liu, Y., Shelton, R. M. & Barralet, J. E. Homogeneous Octacalcium Phosphate Precipitation: Effect of Temperature and pH. *Key Eng. Mater.* **254–256**, 79–82 (2004).
301. Cheng, X., He, Q., Li, J., Huang, Z. & Chi, R. A. Control of pore size of the bubble-template porous carbonated hydroxyapatite microsphere by adjustable pressure. *Cryst. Growth Des.* **9**, 2770–2775 (2009).
302. Cheng, X., Huang, Z., Li, J., Liu, Y., Chen, C., Chi, R. A., & Hu, Y. Self-assembled growth and pore size control of the bubble-template porous carbonated hydroxyapatite microsphere. *Cryst. Growth Des.* **10.3**: 1180-1188 (2010).
303. He, Q. J. & Huang, Z. L. Controlled growth and kinetics of porous hydroxyapatite spheres by a template-directed method. *J. Cryst. Growth* **300**, 460–466 (2007).
304. Rubini, K., Boanini, E. & Bigi, A. Role of Aspartic and Polyaspartic Acid on the Synthesis and Hydrolysis of Brushite. *J. Funct. Biomater.* **10**, 11 (2019).
305. Puel, F., Veessler, S., Mangin, D. Cristallisation - Aspects théoriques ,*Tech. l'ingénieur* J2710 V2 (2015).
306. Natsuko, I. Hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite from octacalcium phosphate. *J. Ceram. Soc. Japan* (2010).
307. Nývlt, J. The Ostwald rule of stages. *Cryst. Res. Technol.* **30**, 443–449 (1995).
308. Heughebaert, J. C. & Nancollas, G. H. Kinetics of crystallization of octacalcium phosphate. *J. Phys. Chem.* **88**, 2478–2481 (1984).
309. Natsuko, I., Masanobu, K., Setsuaki, M., Noriaki, W. & Koji, O. Hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite from octacalcium phosphate. *J. cera* **118.1380** : 762-766 (2010).
310. Brown, W. E. Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* **196**, 1050–1055 (1962).
311. Cheng, P. Formation of Octacalcium Phosphate and Subsequent Transformation to Hydroxyapatite at Low Supersaturation: A Model for Cartilage Calcification.

312. Klein, C., Wolke, J. G. C., de Blicq-Hogervorst, J. M. A. & De Groot, K. Features of calcium phosphate plasma-sprayed coatings: An in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 961–967 (1994).
313. Miquel, J. L., Facchini, L., Legrand, A. P., Rey, C. & Lemaitre, J. Solid state NMR to study calcium phosphate ceramics. *Colloids and surfaces* **45**, 427–433 (1990).
314. Pourpoint, F., Gervais, C., Bonhomme-Coury, L., Azais, T., Coelho, C., Mauri, F., ... & Bonhomme, C. Calcium phosphates and hydroxyapatite: Solid-state NMR experiments and first-principles calculations. *Appl. Magn. Reson.* **32**, 435–457 (2007).
315. Grigg, A. T., Mee, M., Mallinson, P. M., Fong, S. K., Gan, Z., Dupree, R., & Holland, D. Cation substitution in β -tricalcium phosphate investigated using multi-nuclear, solid-state NMR. *J. Solid State Chem.* **212**, 227–236 (2014).
316. Juhasz, J. A., Best, S. M., Auffret, A. D. & Bonfield, W. Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1823–1829 (2008).
317. Lecomte, A., Gautier, H., Bouler, J. M., Gouyette, A., Pegon, Y., Daculsi, G., & Merle, C. Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **84**, 1–6 (2008).
318. Prasad, Ananda S. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental gerontology* **43.5**: 370-377 (2008).
319. Velard, F., Laurent-Maquin, D., Braux, J., Guillaume, C., Bouthors, S., Jallot, E., ... & Laquerriere, P. Biomaterials The effect of zinc on hydroxyapatite-mediated activation of human polymorphonuclear neutrophils and bone implant-associated acute inflammation. *Biomaterials* **31**, 2001–2009 (2010).
320. Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M. & Roveri, N. Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization. *J. Inorg. Biochem.* **58**, 49–58 (1995).
321. Cruz, R., Calasans-Maia, J., Sartoretto, S., Moraschini, V., Rossi, A. M., Louro, R. S., ... & Calasans-Maia, M. D. Does the incorporation of zinc into calcium phosphate improve bone repair? A systematic review. *Ceram. Int.* **44**, 1240–1249

- (2018).
322. Moonga, B. S. & Dempster, D. W. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone-resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 10, 453-457 (1995).
 323. Ferez, L. & Nancollas, G. H. The kinetics of crystallization of hopeite. *J. Cryst. Growth* 66, 412-418 (1984).
 324. Frost, R. L. An infrared and Raman spectroscopic study of natural zinc phosphates. 60, 1439-1445 (2004).
 325. Kanzaki, N., Onuma, K., Treboux, G., Tsutsumi, S. & Ito, A. Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (0001) face. *J. Phys. Chem. B* 104, 4189-4194 (2000).
 326. Zhao, X., Xiao, G., Zhang, X., Wang, H. & Lu, Y. Ultrasonic induced rapid formation and crystal refinement of chemical converted hopeite coating on titanium. *J. Phys. Chem. C* 118, 1910-1918 (2014).
 327. Herschke, L., Rottstegge, J., Lieberwirth, I. & Wegner, G. Zinc phosphate as versatile material for potential biomedical applications Part 1. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17, 81-94 (2006).
 328. Das, A. & Shukla, M. Pulsed laser-deposited hopeite coatings on titanium alloy for orthopaedic implant applications: surface characterization, antibacterial and bioactivity studies. *J. Brazilian Soc. Mech. Sci. Eng.* 41, 214 (2019).
 329. Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., ... & Libert, M. F. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 2265-2284 (2005).
 330. Panfili, Frédéric. *Etude de l'évolution de la spéciation du zinc dans la phase solide d'un sédiment de curage contaminé, induit par phytostabilisation*. Diss. 2004.
 331. Grenho, L., Salgado, C. L., Fernandes, M. H., Monteiro, F. J. & Ferraz, M. P. Antibacterial activity and biocompatibility of three-dimensional nanostructured porous granules of hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles-An in vitro and in vivo study *Nanotechnology* 26.31: 315101 (2015).
 332. Ma, J., Li, L., Zou, J., Kong, Y. & Komarneni, S. Highly efficient visible light

- degradation of Rhodamine B by nanophasic Ag₃PO₄ dispersed on SBA-15. *Microporous Mesoporous Mater.* 193, 154-159 (2014).
333. Menezes, P. W., Indra, A., Schwarze, M., Schuster, F. & Driess, M. Morphology-Dependent Activities of Silver Phosphates: Visible-Light Water Oxidation and Dye Degradation. *Chempluschem* 81, 1068-1074 (2016).
334. Yan, X., Gao, Q., Qin, J., Yang, X., Li, Y., & Tang, H. Morphology-controlled synthesis of Ag₃PO₄ microcubes with enhanced visible-light-driven photocatalytic activity. *Cernm Int.* 39, 9715-9720 (2013).
335. Mroczkowska, M., Nowinski, J. L., Zukowska, G. Z., Mroczkowska, A., Garbarczyk, J. E., & Wasiucione, M. Micro Raman, FT-IR/PAS, XRD and SEM studies on glassy and partly crystalline silver phosphate ionic conductors. *J. Power Sources* 173, 729-733 (2007).
336. Wu, A., Tian, C., Chang, W., Hong, Y., Zhang, Q., Qu, Y., & Fu, H. Morphology-controlled synthesis of Ag₃PO₄ nano/microcrystals and their antibacterial properties. *Mater. Res. Bull.* 48, 3043-3048 (2013).
337. Yoon, K., Byeon, J. H., Park, J. & Hwang, J. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* 373, 572-575 (2007).
338. Pauksch, L., Hartmann, S., Rohnke, M., Szalay, G., Alt, V., Schnettler, R., & Lips, K. S. Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomater.* 10, 439-449 (2014).
339. Majzlan, J., Zittlau, A. H., Grevel, K. D., Schliesser, J., Woodfield, B. F., Dachs, E., ... & Milovskâ, S. Thermodynamic properties and phase equilibria of the secondary copper minerals libethenite, olivenite, pseudomalachite, krohnkite, cyanochroite, and devilline. *Can. Minernl.* 53, 937-960 (2015).
340. Altinkaynak, C., Yilmaz, I., Koksâl, Z., Ôzdemir, H., Ocsoy, I., & Ôzdemir, N. Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 84, 402-409 (2016).
341. Luo, Y.-K., Song, F., Wang, X.-1. & Wang, Y.-Z. Pure copper phosphate nanostructures with controlled growth: a versatile support for enzyme immobilization. *CrystEngComm* 19, 2996-3002 (2017).

342. Palmer, D. A., Bénézeth, P. & Simonson, J. M. Solubility of copper oxides in water and steam. *14th International Conference on the Properties of Water and Steam in Kyoto* 491–496 (2004).
343. Singh, J., Kaur, G. & Rawat, M. A brief review on synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles and its applications. *J. Bioelectron. Nanotechnol* **1**, (2016).
344. Zhang, H., Tang, P., Li, D. & Tang, Y. Photocatalytic and antibacterial properties of copper hydroxyphosphate with hierarchical superstructures synthesized by a hydrothermal method. *Mater. Chem. Phys.* **206**, 130–135 (2018).
345. Piret, J. P., Jacques, D., Audinot, J. N., Mejia, J., Boilan, E., Noël, F., ... & Toussaint, O. Copper (II) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response. *Nanoscale* **4**, 7168–7184 (2012).
346. Tadier, S., Bareille, R., Siadous, R., Marsan, O., Charvillat, C., Cazalbou, S., ... & Combes, C. Strontium-loaded mineral bone cements as sustained release systems : Compositions , release properties , and effects on human osteoprogenitor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **100.2**: 378-390 (2012).
347. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Sfihi, H. & Barroug, A. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 198–205 (2007).
348. Peretz, A., Papadopoulos, T., Willems, D., Hotimsky, A., Michiels, N., Siderova, V., ... & Neve, J. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. *J. trace Elem. Med. Biol.* **15**, 175–178 (2001).

Table des tableaux

Tableau 1 Composition chimique de l'os, la dentine et l'émail d'un individu d'un âge indéterminé et d'une apatite stœchiométrique de synthèse, obtenue par analyse chimique élémentaire ²²	21
Tableau 2 Récapitulatif des Phosphates de Calcium utilisés dans le domaine des biomatériaux	31
Tableau 3 Tableau d'assignation de la Brushite pour différentes techniques de caractérisation ⁸⁸	34
Tableau 4 Tableau d'assignation de l'OCP pour différentes techniques de caractérisation ⁶⁵	35
Tableau 5 Tableau d'assignation de l'HA avec différentes techniques de caractérisation ⁸⁸	37
Tableau 6 Concentrations ioniques du Simulated Body Fluid ^{222,223}	51
Tableau 7 : Détails des solutions dopantes d'acétates d'ions métalliques utilisées dans ce travail.	72
Tableau 8 : Détails des paramètres du procédé pour les différentes expériences réalisées sur les cubes céramiques	74
Tableau 9 : Composition du SBF à 90% d'après Kokubo ²⁸³	79
Tableau 10 Résumé des différents échantillons produits et des techniques employées pour les analyser.	83
Tableau 11 Tableau des attributions des bandes carbonates en spectroscopie FTIR	95
Tableau 12 %massique des phases HA et β TCP dans les poudres de céramiques BCP	122
Tableau 13 pH des solutions d'acétate de zinc dans l'eau à pression atmosphérique et saturée en CO ₂ .	162
Tableau 14 Tableau résumé des expériences en présence de Zinc. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence.	179
Tableau 15 pH des solutions d'acétate d'argent dans l'eau à pression atmosphérique et saturée en CO ₂ d'après les simulations PHREEQC	180
Tableau 16 Tableau résumé des expériences en présence d'Argent. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence	197
Tableau 17 pH mesurés des solutions d'acétate de cuivre à différentes concentrations et pH calculés des mêmes solutions saturées en CO ₂ à 40°C et 80 bar	198
Tableau 18 Tableau résumé des expériences le cuivre. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence	214
Tableau 19 pH mesurés des solutions d'acétate de Strontium à différentes concentrations et pH calculés des mêmes solutions saturées en CO ₂ à 40°C et 80 bar	215
Tableau 20 Tableau résumé des expériences le cuivre. Les remarques, notamment de viabilité, sont faites par rapport aux cubes de référence	229

Tableau 21 Concentrations des espèces dopantes incluses dans les céramiques en fonction des différentes concentrations initiales utilisées _____ 230

Tableau 22 Récapitulatif des résultats de l'étude du traitement CO₂ haute pression en présence d'espères dopantes _____ 231

Table des figures :

Figure 1 Composition massique moyenne de l'os long humain proposée d'après Legeros ¹² par Euw ¹⁴	19
Figure 2 Structure cristallographique de l'hydroxyapatite ¹⁹	20
Figure 3 : Schéma représentant une apatite biomimétique avec le domaine apatitique à gauche, la couche labile l'alimentant et les échanges ioniques facilités avec le fluide l'entourant. ²⁹	22
Figure 4 Isothermes de solubilité des différents phosphates de calcium dans le système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à 37 °C calculés avec le programme RAMESES ³²	32
Figure 5 Projection (001) de la structure cristalline de l'hydroxyapatite ⁹⁰	36
Figure 6 Procédé d'imprégnation de mousse polyuréthane	49
Figure 7 Précipité d'apatite sur du Titane grâce à immersion dans le SBF ²²²	52
Figure 8 Diagramme de phase, le point critique du CO_2 est 304,25 K et 72,9 atm ²²⁷	54
Figure 9 Tête fémorale avant, pendant et après le procédé de nettoyage supercritique Supercrit [®] de l'entreprise Biobank	56
Figure 10 Effet de la pression de saturation sur la morphologie de la mousse de PLA a. 150 bar; 5.1°C/s; 12.1 bar/s; b. 242 bar; 4.4°C/s; 13.3 bar/s ²⁴⁸	57
Figure 11 Domaine de prédominance du CO_2 dans l'eau	59
Figure 12 Valeurs expérimentales de pH de l'eau à différentes températures en fonction de la pression ²⁵⁹	59
Figure 13 Particules de CaCO_3 produite à des pH initiaux de a. 10 et b. 9.7 ²⁷²	61
Figure 14 Images MEB et surfaces spécifiques (BET Krypton) des poudres utilisées dans ce travail.	66
Figure 15 Diffractogrammes des poudres brutes obtenus par DRX	66
Figure 16 Spectres FTIR des poudres brutes	67
Figure 17 Caractérisation des cubes de Ceraform a. Surface spécifique (BET Krypton), b. micrographies MEB, c. Porogramme (Porosimètre à Mercure).	68
Figure 18 Schéma du sécheur à CO_2 supercritique appliqué aux cubes de céramiques immergés dans une solution aqueuse	69
Figure 19 Photo du sécheur CO_2 supercritique	69
Figure 20 Paramètres (température et pression) mis en œuvre au cours des différentes étapes du traitement des poudres au CO_2 supercritique [1- Pressurisation, 2-4 h de traitement, 3- Décompression, 4- Précipitation, 5-Début de la phase de séchage 24 h]	70

Figure 21 : Schéma du protocole de modification des poudres à l'aide du sécheur à CO ₂ supercritique _____	71
Figure 22 : Schéma du protocole de traitement des cubes macroporeux de céramiques _____	73
Figure 23 : Les grandes étapes du protocole des essais antibactériens _____	81
Figure 24 : Exemple de résultats obtenus lors des essais antibactériens, ici la bactérie E. Coli avec l'échantillon dopé au Sr Intermédiaire _____	81
Figure 25 Données expérimentales de mesure de pH d'un milieu aqueux à différentes pression de CO ₂ et différentes températures ²⁵⁹ _____	88
Figure 26 Paramètres (température et pression) définis au cours des étapes du processus [1- Pressurisation, 2- 4 h de traitement, 3- Décompression, 4- Précipitation d'une nouvelle phase en surface, 5- Début de l'étape de séchage de 24 h] _____	89
Figure 27 Evolution théorique du nombre de moles de céramiques sous forme solide et du pH de l'eau lors de l'ajout de céramique (HA et β TCP) dans 10 mL d'eau en présence de CO ₂ à 80 bar et 40°C (calculs PHREEQC) _____	90
Figure 28 Images de la poudre HA/amTCP immergée dans une solution eau, bleu de bromophénol (virage du bleu au jaune à 3-4.6) _____	91
Figure 29 Photo de Poudre Surface d'HA/amTCP en formation _____	92
Figure 30 DRX de poudre d'HA, référence, Poudre Fond et Poudre Surface _____	93
Figure 31 Spectre FTIR normalisé sur la ν_3 des PO ₄ de la poudre d'HA référence, Poudre Fond, Poudre Surface, a. Domaine 400-3900 cm ⁻¹ , b. Domaine 1380-1580cm ⁻¹ _____	94
Figure 32 Images MEB des poudres de référence (a , b) et modifiées : Poudre Fond (c , d) et Poudre Surface (e , f , g) d'HA, h. dessin de a Poudre Surface _____	96
Figure 33 DRX de Poudre de TCP, Référence et modifiées : Poudre Fond et Poudre Surface _____	99
Figure 34 Spectre FTIR normalisé sur la ν_3 des PO ₄ de la poudre de TCP Référence, Poudre Fond et Poudre Surface, a. Domaine 400-3900 cm ⁻¹ , b. Domaine 1380-1580cm ⁻¹ _____	100
Figure 35 Images MEB des poudres, références (a , b) et modifiées : Poudre fond (c , d.) et Poudre Surface(e , f.) d'amTCP _____	101
Figure 36 Etapes du procédé utilisé pour l'analyse de la Poudre fond d'amTCP _____	104
Figure 37 DRX de la Poudre d'amTCP, de référence, Poudre Fond non maturée et maturée, Poudre Surface _____	104
Figure 38 Spectres FTIR normalisés sur la ν_3 des PO ₄ de poudre d'amTCP de référence, Poudre Fond non maturée et maturée, Poudre Surface, a. Domaine 400-3900 cm ⁻¹ , b. Domaine 1380-1580cm ⁻¹ _____	105
Figure 39 Images MEB des poudres, références (a , b) et modifiées : Poudre Fond Non Maturée (c , d.) et Maturée(e , f.) et Poudre surface (g , h.) d'amTCP _____	106
Figure 40 DRX de la Poudre d'HA/TCP, de référence, Poudre Fond, Poudre Surface _____	108

<i>Figure 41 Spectres FTIR normalisés sur la ν_3 des PO_4 de la poudre d'HA/TCP référence, Poudre Fond, Poudre Surface, a. Zone 3900-400 cm^{-1}, b. Domaine 1580-1380cm^{-1}, c. Domaine 700-450cm^{-1} décomposé</i>	109
<i>Figure 42 Images MEB d'HA/TCP Référence (a, b, c), Poudre Fond (d, e) et Poudre Surface (f, g, h)</i>	110
<i>Figure 43 a. Images MEB de la Poudre Surface HA/TCP : b. face lisse et c. face recouverte de feuillets</i>	112
<i>Figure 44 spectre RAMAN de la Poudre Surface d'HA/TCP (z=0μm étant la surface recouvert de plaquettes et z=10μm la surface lisse)</i>	113
<i>Figure 45 Cartographie 3D de la Poudre Surface d' HA/TCP et les ratios $\nu_3 PO_4(OCP)/\Sigma \nu_1 PO_4$ en z (.a) et en y (.b)</i>	114
<i>Figure 46 DRX d'HA/TCP, de Référence, Poudre Fond, Poudre Surface et Poudre Surface Maturée 1 semaine</i>	116
<i>Figure 47 Spectre FTIR normalisé sur la ν_3 des PO_4 de la poudre d'HA/TCP de Référence, Poudre Fond, Poudre Surface et Poudre Surface maturée 1 semaine, a. Domaine 3900-400 cm^{-1}, b. Domaine 1580-1380cm^{-1}</i>	117
<i>Figure 48 Spectre RAMAN a. HA/TCP Poudre Surface Maturée 1 semaine à z=0μm face recouverte de feuillet et z=10μm, face lisse b. HA/TCP Poudre Surface et Poudre Surface Maturée à z=0μm, face lisse</i>	118
<i>Figure 49 Images MEB de la Poudre Surface et Poudre Surface Maturée 1 semaine HA/amTCP</i>	119
<i>Figure 50 Schéma illustrant les mécanismes de germination-croissance cristalline lors de la phase de repos du procédé . Les flèches rouges représentent le sens de développement des plaques et les bleus, présentes sur le schéma de la phase intermédiaire en surface, l'hydrolyse de l'OCP vers la PCCA</i>	120
<i>Figure 51 DRX de la Poudre de BCP Non Traitée et Traitée au CO_2 haute pression</i>	122
<i>Figure 52 Spectre FTIR de la Poudre de BCP broyés Non Traitée et Traitée CO_2</i>	123
<i>Figure 53 Images MEB des poudres de substituts broyées, Non Traitées et Traitées CO_2</i>	124
<i>Figure 54 Images MEB de cubes poreux HA/βTCP de Référence et traités 4H, 40°C 80bar et surface spécifique correspondante (BET Krypton)</i>	125
<i>Figure 55 Porogramme des cubes BCP de référence et des cubes BCP traités avec le protocole de référence et a.,b. MEB des substituts Non Traités</i>	126
<i>Figure 56 Spectre RMN ^{31}P simple impulsion des substituts BCP Non Traités</i>	127
<i>Figure 57 Spectre RMN ^{31}P simple impulsion du substitut BCP Traités CO_2</i>	128
<i>Figure 58 Spectres RMN ^{31}P en polarisation croisée $^1H \rightarrow ^{31}P$ des BCP Non Traités</i>	128
<i>Figure 59 Spectres RMN ^{31}P en polarisation croisée $^1H \rightarrow ^{31}P$ de céramiques BCP Traités CO_2</i>	129
<i>Figure 60 2D RMN ($^{31}P, ^1H$) de substituts BCP Traités au CO_2</i>	130

Figure 61 Projections ^{31}P de la mesure 2D RMN ($^{31}\text{P},^1\text{H}$) de substituts BCP Traités CO_2	131
Figure 62 Teneur moyenne en ions Mg^{2+} des échantillons traités ou non au CO_2 supercritique (protocole standard) et après immersion dans une solution d'ions Mg^{2+} (1 mol/L, température ambiante). Les données obtenues sur des cubes initiaux, non immergés, sont aussi reportées.	133
Figure 63 Evolutions du pH initial de l'eau et des solubilités (en g/L) de HA et βTCP dans l'eau en contact avec du CO_2 en fonction de la température à 80 bar.	136
Figure 64 Clichés MEB et mesures de surface spécifique des substituts céramiques BCP Non Traités, Traités à 40°C, 50°C et 80°C	137
Figure 65 Porogrammes des substituts BCP non traités, traités à 40°C, 50°C et 80°C	138
Figure 66 Evolutions du pH initial de l'eau et des solubilités (en g/L) de HA et βTCP dans l'eau en contact avec du CO_2 en fonction de la pression à 40°C.	139
Figure 67 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) des substituts céramiques BCP Non Traités et Traités 60bar, 80bar et 100bar	140
Figure 68 Porogrammes des substituts BCP Non Traités et Traités à 60, 80 et 100 bar	141
Figure 69 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substituts céramiques BCP Non Traités, et Traités pendant 4H et 100H	143
Figure 70 Porogramme des substituts BCP Non Traités, et Traités pendant 4H et 100H	144
Figure 71 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substituts céramiques BCP Non Traités, Traités avec un rapport L/S =2 et L/S=20	146
Figure 72 Porogrammes des substituts BCP Non Traités et Traités avec L/S=2 et L/S=20	147
Figure 73 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substitut céramiques BCP Non Traités et Traités sans temps de repos ou avec 1h et 24H de repos	148
Figure 74 Porogrammes des substituts BCP Non Traités et Traités avec des temps de repos 0H, 1H et 24H	149
Figure 75 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substitut céramiques BCP Non Traités, et Traités avec un temps de décompression de 2min, 30min et 24H.	150
Figure 76 Porogrammes des substituts BCP Non Traités, et Traités avec une durée de décompression de 2min, 30min et 24H ainsi que des substituts dépressurisés 2min mais ayant reposé dans le milieu 24H.	151
Figure 77 Clichés MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substitut céramique BCP Non Traités, et Traités avec le protocole de référence puis passés sous-vide.	153
Figure 78 Porogrammes des substituts Non Traités et Traités avec le protocole de référence et passés sous vide post procédé.	154
Figure 79 Images MEB et mesures de surface spécifique (BET Krypton) de substituts Non Traités, et Traités avec le protocole de référence en Eau ou SBF	155

<i>Figure 80</i> Porogrammes des substituts Non Traités, Traités avec protocole de référence dans l'eau et le SBF	156
<i>Figure 81</i> DRX Référence HA/amTCP, Zinc Maximum, Zinc Intermédiaire, Zinc Minimum	163
<i>Figure 82</i> Spectroscopie FTIR des poudres de référence et Traitées en présence d'acétate de zinc aux 3 concentrations Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum	164
<i>Figure 83</i> MEB Poudres Référence, dopées avec Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum	165
<i>Figure 84</i> EDX des poudres modifiées Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum	166
<i>Figure 85</i> Spectroscopie RAMAN des poudres modifiées Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum sur a. les parallélépipèdes, b. les grains, c. Précipités identifiés comme pouvant être des Poudres Surface	167
<i>Figure 86</i> MEB Cubes Références, Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum	169
<i>Figure 87</i> Porogramme des cubes modifiés Zinc Maximum, Intermédiaire, Minimum	170
<i>Figure 88</i> EDX des substituts poreux traités avec les 3 concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum	171
<i>Figure 89</i> ICP du milieu aqueux utilisé lors du procédé pour Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum	172
<i>Figure 90</i> Test de libération dans SBF 0.9 sur 3 semaines Zn Maximum, Intermédiaire et Minimum	173
<i>Figure 91</i> Tests antibactériens E. coli effectués sur les échantillons traités avec les concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum ainsi que les substituts traités au CO ₂ en milieux aqueux et les cubes non traités	175
<i>Figure 92</i> Tests antibactériens B. subtilis effectués sur les échantillons traités avec les concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum ainsi que les substituts traités au CO ₂ en milieux aqueux et les cubes non traités	175
<i>Figure 93</i> Tests cellulaires réalisés sur les céramiques traitées avec les concentrations Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum, représentés avec les erreurs standards et *, montrant des différences significatives ($p < 0.05$) par rapport au Contrôle	176
<i>Figure 94</i> DRX Référence HA/amTCP, Argent Maximum, Argent Intermédiaire, Argent Minimum	181
<i>Figure 95</i> Spectroscopie FTIR des poudres Non Traitées et Traitées avec les concentrations Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum	182
<i>Figure 96</i> MEB de la Poudre de Référence, et des poudres dopées avec de l'Argent	183
<i>Figure 97</i> EDX des poudres modifiées Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum	185
<i>Figure 98</i> Spectres RAMAN des poudres traitées en présence d'Argent	186
<i>Figure 99</i> MEB Cubes Références, Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum	188
<i>Figure 100</i> Porogrammes des cubes non traités et traités en présence d'Argent.	189

<i>Figure 101 EDX des substituts poreux traités en présence de la solution Ag Maximum</i>	190
<i>Figure 102 ICP du milieu aqueux utilisé avant traitement et après traitement avec les trois concentrations d'argent.</i>	191
<i>Figure 103 Test de libération dans SBF 0,9 sur 3 semaines Argent Minimum</i>	192
<i>Figure 104 Tests antibactériens E. coli effectués sur Argent Maximum, Intermédiaire et Minimum</i>	193
<i>Figure 105 Tests antibactériens B. subtilis effectués sur les substituts Non traités et Traités avec les 3 concentrations d'Argent.</i>	194
<i>Figure 106 Tests cellulaires sur les céramiques traitées en présence d'Argent</i>	194
<i>Figure 107 DRX Référence HA/amTCP et poudres traitées avec les trois concentrations de Cuivre.</i>	199
<i>Figure 108 Spectres FTIR des poudres Non Traitées et Traitées en présence de Cuivre.</i>	200
<i>Figure 109 Images MEB de la poudre de références et des poudres dopées au Cuivre</i>	201
<i>Figure 110 Cartographie EDX des poudres modifiées Cuivre Maximum (e. plaques précipitées), Intermédiaire (c. grains avec des petites sphères, d. plaques précipitées) et Minimum (a. grains avec roses des sables, b. plaques précipitées)</i>	203
<i>Figure 111 Spectres RAMAN de la partie « précipitée » des poudres traitées en présence de cuivre.</i>	204
<i>Figure 112 Images MEB des Cubes de référence et des cubes traités en présence de cuivre aux trois concentrations.</i>	206
<i>Figure 113 Porogrammes des cubes non traité et traités en présence de cuivre aux trois concentrations.</i>	207
<i>Figure 114 EDX des substituts poreux modifiés avec la concentration Cuivre Maximum</i>	208
<i>Figure 115 Dosages par ICP du milieu aqueux utilisé lors du procédé pour les trois concentrations en cuivre.</i>	209
<i>Figure 116 Test de libération dans SBF 0,9 sur 3 semaines Cuivre Minimum</i>	210
<i>Figure 117 Tests antibactériens sur E. coli effectués avec les cubes traités avec les trois concentrations de cuivre.</i>	211
<i>Figure 118 Tests antibactériens sur B. subtilis effectués avec les cubes traités avec les trois concentrations de cuivre.</i>	212
<i>Figure 119 Tests cellulaires sur les céramiques traitées avec les trois concentrations de cuivre.</i>	213
<i>Figure 120 Diffractogrammes RX de la poudre de référence HA/amTCP et de la poudre traitée en présence de strontium</i>	216
<i>Figure 121 Spectres FTIR des poudres non traitée et traitées en présence de Strontium</i>	217

<i>Figure 122 Images MEB des Poudres non traitée et traitées en présence de Strontium Minimum, Intermédiaire et Maximum</i>	218
<i>Figure 123 Cartographie EDX des poudres modifiées Strontium Maximum (e. précipité sur grains et f. plaques surface), Intermédiaire (b. plaque surface, c. sphères sur larges grains et d. précipité sur grains) et Minimum (a. plaque surface)</i>	219
<i>Figure 124 Spectres RAMAN des différents éléments présents dans les poudres traitées en présence de strontium</i>	220
<i>Figure 125 Images MEB des Cubes de référence et traitées en présence de Strontium aux trois concentrations</i>	222
<i>Figure 126 Porogrammes des cubes non traités et traités en présence de Strontium aux trois concentrations.</i>	223
<i>Figure 127 EDX des cubes traités en présence de strontium aux trois concentrations</i>	224
<i>Figure 128 Analyses ICP du milieu aqueux utilisé lors du procédé pour les trois concentrations en Strontium</i>	225
<i>Figure 129 Test de libération dans SBF 0,9 sur 3 semaines du Strontium Minimum</i>	226
<i>Figure 130 Tests antibactériens E. coli effectués sur les cubes traités en présence de strontium et comparés aux cubes non traités et traités dans l'eau saturée de CO₂</i>	227
<i>Figure 131 Tests antibactériens B. subtilis effectués sur les cubes traités en présence de strontium et comparés aux cubes non traités et traités dans l'eau saturée de CO₂</i>	227
<i>Figure 132 Tests cellulaires effectués sur les céramiques traitées en présence de strontium aux trois concentrations.</i>	228
<i>Figure 133 Concentrations massiques d'espèces ioniques introduites (µg)/g de céramique, * (vert) montrent des différences significatives avec Zinc Max et * (bleu) avec Cu Max, évalué grâce à un test ANOVA à p<0,05 avec n le nombre de réplicats : 3<n<5</i>	233
<i>Figure 134 Concentrations massiques d'espèces ioniques introduites (µg)/g de céramique, * montrent grâce à un test statistique de type ANOVA des différences significatives avec l'Ag Max à p<0,05 avec n le nombre de réplicats : 3<n<5</i>	233
<i>Figure 135 Profils de libérations dans du SBF 0.9 du Zinc Maximum, Intermédiaire et Minimum ainsi que Argent, Strontium et Cuivre Minimum</i>	234
<i>Figure 136 Mesure d'ALP à 7 jours, * montrent des différences significatives évaluées grâce à un test ANOVA avec le Zinc Intermédiaire à p<0,05 avec n le nombre de réplicats : n=3</i>	235
<i>Figure 137 Pourcentage d'inhibition de B. subtilis, * (noir) montrent des différences significatives avec l'Argent Maximum et * (gris) avec l'Intermédiaire à p<0,05 avec n le nombre de réplicats : n=3</i>	236

Résumé du projet de thèse

Les substituts poreux d'HA/ β TCP sont des substituts osseux largement utilisés aujourd'hui. Cependant ces matériaux céramiques, obtenus à haute température, présentent une surface lisse et peu réactive qui limite leur bioactivité. Le travail présenté se propose de modifier les substituts poreux classiquement utilisés afin d'en améliorer la bioactivité par un remaniement chimique et structural de surface grâce à un procédé utilisant un milieu aqueux acidifié par du CO₂ porté à haute pression. L'objectif est ici d'évaluer l'intérêt de ce procédé pour produire un revêtement d'une nouvelle phase de phosphate de calcium (CaP) dont la composition chimique est plus proche de celle de la phase minérale de l'os comme de l'apatite carbonatée mal cristallisée déficiente en ions calcium ou d'autres phases intermédiaires d'intérêt. Dans un second temps, la possibilité d'utiliser ce même procédé pour intégrer des éléments actifs au sein des phases nouvellement créées a été évaluée. Le travail a été réalisé à partir de phosphates de calcium sous forme de poudres d'une part (HA, amTCP et un mélange massique d'HA/amTCP) et de cubes poreux d'autre part (Ceraform[®], HA/ β TCP 65/35). Différentes techniques de caractérisation ont été utilisées ici afin d'identifier les phases en présence et évaluer les différences morphologiques induites par le traitement : DRX, spectroscopies FTIR et RAMAN, MEB, porosimétrie à Mercure et mesures de surface spécifique (BET Krypton). Les tests réalisés à partir de poudres ont permis de mettre en évidence que ce procédé induit un phénomène de dissolution, principalement de l'amTCP lorsqu'il est présent, et la précipitation de nouvelles phases correspondant à un mélange de phosphate octacalcique (OCP) et d'une apatite carbonatée mal cristallisée (PCCA) incluant un processus de maturation de l'OCP en PCCA. Les tests effectués sur substituts céramiques poreux ont mis en évidence la formation, dans certaines conditions de pression, température, durée de traitement et rapport liquide/solide, d'un revêtement homogène créant une nano-porosité de surface. La possibilité d'intégrer des éléments connus pour leur activité biologique tels que le Zinc, le l'Argent, le Cuivre et le Strontium au sein du revêtement, pendant sa formation, a ensuite été examinée. Des techniques de caractérisation similaires ont été mises en œuvre et ont été complétées par des mesures EDX, ICP ainsi que de tests de libération. L'influence de la nature de l'espèce ionique choisie sur l'intégrité et la morphologie du revêtement a été considérée. Ainsi le zinc et le cuivre ont montré une tendance à inhiber la précipitation de nanocristaux. D'autre part des tests de libération ont permis de montrer que différents mécanismes pourraient être impliqués dans le relargage des espèces ioniques bioactives en lien avec la localisation de ces dernières : dans la structure cristalline ou dans la couche labile des phosphates de calcium précipités mais aussi dans d'autres phases. L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montre que ce procédé de traitement original, en une seule étape, et compatible avec les applications biomédicales, se montre prometteur pour modifier et fonctionnaliser des substituts osseux constitués de céramique poreuse en vue d'augmenter leur bioactivité.

Abstract :

Nowadays, HA / β TCP porous scaffolds are widely used as bone substitutes. However, the smooth and unreactive surface of these ceramic materials obtained by high temperature sintering, limits their bioactivity. The target of the present study is to propose a process involving an aqueous medium acidified by high pressure CO₂ in order to modify such commercial porous scaffolds by improving their bioactivity, through chemical and structural surface modifications. The objective is firstly to investigate in what extent this process is able to produce a coating made of a new phase of calcium phosphate (CaP), whose chemical composition is closer to that of the mineral phase of natural bone, as well as of a poorly calcium ions deficient crystallized carbonate apatite or other intermediate phases of interest. In a second step, the possibility of using this same process to integrate active elements within the newly created phases has

been evaluated. The work was carried out using powders of calcium phosphates on one hand (HA, amTCP and a HA/amTCP mixture) and porous cubic scaffolds on the other hand (Ceraform®, HA/ β TCP 65/35 %w/w). Various characterization techniques have been used for new phases identification and evaluation of morphological differences induced by the treatment: XRD, FTIR and RAMAN spectroscopy, SEM, Mercury porosimetry and specific surface measurements (BET Krypton). Experiments from powders made it possible to demonstrate that this process induces a phenomenon of dissolution, mainly of amTCP when it is present in the raw material, and precipitation of new phases corresponding to a mixture of octacalcic phosphate (OCP) and a poorly crystallized carbonate apatite (PCCA), including a process of OCP maturation into PCCA. Experiments carried out on porous ceramic scaffolds evidenced the presence, at the end of the process, and depending on pressure, temperature, treatment time and liquid / solid ratio conditions, of a homogeneous nano-porous surface coating. The possibility of co-integration into the coating of biologically active elements such as Zinc, Silver, Copper and Strontium, was then examined. The same methods were used to characterize the materials, with EDX, ICP analyses and release assays as supplementary characterization tools. Influence of the nature of active elements on the coating integrity and morphology was considered. Thus, the precipitation of nanocrystals has been shown to be partially inhibited by zinc and copper. On the other hand, release tests of bioactive species have evidenced several mechanisms that could be related to their localization into the material: crystalline structure, labile layer of precipitated calcium phosphates, or other new phases. Results obtained in this study show that this original, one-step treatment process, compatible with biomedical applications, is a promising way to modify and increase bioactivity of porous ceramic scaffolds.

Productions scientifiques

Posters :

Journée chimie santé 2017-Stratégie innovante pour la mise en forme de nouveaux matériaux composites biomimétiques à visée thérapeutique : Modification de céramiques

CNano 2017-New strategy to modify surface chemistry and morphology of bone filling bioceramics: elaboration of active nanocrystals using supercritical CO₂

Bioceramic 2018-New strategy for introducing bioactive species in modified porous biphasic ceramic scaffold- **Obtention de prix du meilleur poster**

Présentations orales :

BIOMAT 2017-Développement d'une nouvelle stratégie de dopage de céramiques phosphocalciques pour la régénération osseuse Etude du Zinc

Bioceramic 2017-Innovative strategy for the shaping of new biomimetic composite materials with therapeutic purpose

Journée CO₂ Supercritique 2018-Développement d'une nouvelle stratégie de dopage de céramiques phosphocalciques pour la régénération osseuse Etude du Zinc

Article:

Journal of Materials Science: Bioceramic powders for bone regeneration modified by high pressure CO₂ process