



**HAL**  
open science

# **Biocéramiques dopées multi-éléments structurées par PIM pour la régénération des grands défauts osseux**

Alice Szmytko

► **To cite this version:**

Alice Szmytko. Biocéramiques dopées multi-éléments structurées par PIM pour la régénération des grands défauts osseux. Matériaux. Université Clermont Auvergne, 2025. Français. ⟨NNT : 2025UCFA0123⟩. ⟨tel-05613739⟩

**HAL Id: tel-05613739**

**<https://theses.hal.science/tel-05613739v1>**

Submitted on 6 May 2026

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.



HAL Authorization

Université Clermont Auvergne  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES POUR L'INGENIEUR

## Thèse de doctorat

Présentée à l'Université Clermont Auvergne par

**Alice SZMYTKO**

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : **Ingénierie des Matériaux**

# **Biocéramiques dopées multi-éléments structurées par PIM pour la régénération des grands défauts osseux**

Soutenue publiquement le 7 novembre 2025 devant le jury composé de :

<b>Christine Taviot-Gueho</b>	ICCF, Université Clermont-Auvergne	Présidente
<b>Christèle Combes</b>	ENSIACET, Toulouse INP	Rapporteuse
<b>Vadim Kessler</b>	University of Agricultural Sciences	Rapporteur
<b>Frédéric Velard</b>	BIOS, Université de Reims Champagne Ardenne	Rapporteur
<b>Jean-Marie Nedelec</b>	ICCF, Clermont Auvergne INP	Directeur de thèse
<b>Stéphane Decamps</b>	ICCF, Université Clermont-Auvergne, CHU Clermont-Ferrand	Co-directeur de thèse
<b>Charlotte Vichery</b>	ICCF, Clermont Auvergne INP	Co-encadrante de thèse



# Remerciements

---

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, et en particulier Christèle Combes, Vadim Kessler et Frédéric Velard pour avoir accepté la responsabilité d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Christine Taviot-Gueho d'avoir accepté la présidence du jury, ainsi que pour son rôle au sein du comité de suivi de thèse durant ces trois années. Je leur suis reconnaissante pour les échanges et les retours constructifs apportés dans le cadre de ce travail.

Je souhaite remercier Jean-Marie Nedelec et Stéphane Descamps pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein de l'équipe « Matériaux pour la Santé » de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand. Je remercie également Charlotte Vichery pour les échanges que nous avons pu partager et pour le regard éclairé qu'elle a apporté à ce travail, même si les occasions d'échanger ont été trop peu nombreuses.

Je remercie les anciens doctorants de l'équipe présents à mon arrivée, même s'ils ne m'ont pas tout dit sur la charge et la difficulté d'une thèse... Merci à Florestan Vergnaud, parti trop vite à mon goût vers de nouvelles aventures. Merci également à Florian Biotteau pour son accueil, ses conseils, sa formation sur les appareils et nos moments partagés, notamment les parties de Mario Kart. J'espère que tu y joues toujours autant en Belgique !

Je voudrais remercier une personne qui a été là du tout début jusqu'à la toute fin et franchement, quelle fin ! Quand on s'est retrouvées toutes les deux dans l'équipe... Au moins, on avait un grand bureau rien que pour nous. Un énorme merci à Margot Muratet-Maraval. Merci pour nos petits-déj' sur des assiettes en papier, et pour nos sessions « stock du labo » en musique de Noël, ça, on ne l'oubliera jamais. Pour avoir râlé avec moi encore et encore. Ces moments-là font clairement partie des meilleurs souvenirs de cette thèse. Merci d'avoir été là, tout simplement. Je te souhaite vraiment le meilleur pour la suite !

Je remercie Mathilde Domaison pour son aide durant son stage. Ce n'était peut-être pas le plus formateur pour elle, mais j'y ai rencontré quelqu'un de franc, gentil, un peu brutus et maladroit, comme moi, tout en avançant plus vite sur certaines manipulations !

Je voudrais remercier du fond du cœur mes parents et ma sœur. Merci pour votre soutien, vos encouragements, qui m'ont portée tout au long de ces années. Merci d'avoir cru en moi même quand moi je n'y arrivais plus, d'avoir supporté mes moments de stress, de fatigue, de doute, et de m'avoir rappelé, encore et encore, que j'étais capable d'aller au bout.

Merci aussi à mon Bibou, pour sa présence, son soutien et sa patience durant cette thèse. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir rassurée, fait rire, et rappelé que j'étais capable d'aller au bout. Ta présence a tout changé.

Un grand merci à l'ensemble de mes amis proches, certains qui sont là depuis longtemps et d'autres depuis moins longtemps. Merci à Mélanight, Quentin, Théo, Eve, Cécé, Alex, Matthieu, Margaux, Clara, Lyly, et bien d'autres... Ne m'en voulez pas de ne pas vous avoir tous cités.

À mes collègues de repas à Vessière, sans qui les midis auraient été bien fades : Alexandra, Élodie, Fanny et Jean-Philippe. On se retrouvera volontiers autour d'un café avec un carré de chocolat.

Enfin, je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai croisées, de près ou de loin, au cours de mon parcours scolaire et universitaire, ainsi que les étudiants que j'ai eu l'occasion d'accompagner. Chacun d'entre vous, par vos conseils, vos échanges ou simplement votre présence, a contribué à mon apprentissage, m'a fait grandir et a laissé une empreinte dans ce parcours. Merci à vous toutes et tous.

La recherche, c'est dialoguer avec le silence en espérant qu'il finisse  
par répondre.”

— *Anonyme*



# Table des matières

---

<b>Introduction générale.....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre 1. Synthèse bibliographique et objet d'étude.....</b>	<b>13</b>
1.1 Petite histoire des biomatériaux.....	14
1.2 Substituts osseux.....	17
1.3 Le tissu osseux.....	21
1.4 Pertes de substance osseuse et risques liés à la chirurgie.....	25
1.5 Les biocéramiques.....	30
1.6 Objectifs de la thèse.....	41
<b>Chapitre 2. Elaboration des matériaux d'intérêt.....</b>	<b>43</b>
2.1 Dopage de l'hydroxyapatite .....	44
2.2 Synthèses des phosphates calciques biphasiques.....	48
2.3 Lavage des échantillons.....	54
2.4 Traitements thermiques des échantillons .....	55
2.5 Techniques de caractérisation des matériaux.....	59
<b>Chapitre 3. Propriété physico-chimique.....</b>	<b>65</b>
3.1 Analyse chimique des compositions finales.....	66
3.2 Caractérisations structurales.....	70
3.3 Caractérisation par spectroscopie Infrarouge.....	82
3.4 Morphologie et composition locale .....	84
3.5 Surface spécifique et porosité.....	91
3.6 Conclusion.....	92
<b>Chapitre 4. Etude de la cytotoxicité des matériaux.....</b>	<b>93</b>
4.1 Relargage en milieu biologique simulé.....	94
4.2 Évaluation de la cytotoxicité des matériaux.....	98
4.3 Conclusion des analyses.....	106
<b>Chapitre 5. Mise en forme par procédé PIM et caractérisation des pièces.....</b>	<b>109</b>
5.1 Procédé PIM - Powder Injection Molding.....	110
5.2 Céramiques conçues pour le PIM.....	113
5.3 Mise en forme et caractérisations.....	117
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>127</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>129</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>139</b>



## Introduction générale

---

Grâce aux approches d'ingénierie, la reconstruction des tissus humains devient une réalité, mais des problèmes restent à résoudre pour les tissus durs comme les os. L'un d'eux est la nécessité d'un support adéquat capable de soutenir, de favoriser et de stimuler la croissance tissulaire. Aujourd'hui, les personnes touchées par des traumatismes osseux doivent faire face à certaines difficultés de récupération des fonctions tissulaires, ce qui entraîne des séjours hospitaliers prolongés et des coûts importants pour les systèmes de santé.

Un contrôle efficace de la cicatrisation osseuse est un paramètre essentiel à prendre en compte pour la régénération osseuse afin de restaurer des fonctions affaiblies comme la marche, dans un délai aussi court que possible. Cela sera bénéfique pour les patients, ainsi que pour l'ensemble de la société. Il y a une augmentation constante des besoins de matériaux de comblement osseux afin de traiter les défauts osseux critiques qui surviennent après une arthroplastie, un traumatisme, une infection ou une résection tumorale. Dans chaque cas, la régénération tissulaire spontanée est difficile, voire impossible. La méthode de référence pour induire une régénération osseuse consiste en une greffe osseuse autologue, ce qui implique un deuxième site chirurgical augmentant la morbidité et la douleur pour les patients, en plus d'un manque de biodisponibilité. D'autres matériaux de comblement osseux sont soit des allogreffes (tissus osseux humains provenant d'une autre personne), soit des xélogreffes (os ou tissus minéralisés provenant d'espèces animales non humaines), tous deux présentant des risques d'infection et de transmission de maladies qui ne peuvent être ignorés. Les matériaux synthétiques sont apparus comme une alternative prometteuse, notamment en raison de conditions de synthèse parfaitement contrôlées. Mais malgré des avancées majeures dans la synthèse

---

## Introduction générale

des biomatériaux, l'objectif de biomatériaux structurés idéaux n'a pas encore été atteint. Plusieurs biomatériaux à base de phosphate de calcium (CaP) comme l'hydroxyapatite, le phosphate tricalcique  $\beta$  ou les céramiques biphasiques sont disponibles sur le marché des dispositifs médicaux et actuellement utilisés en clinique comme dispositifs médicaux de comblement en raison de leurs propriétés ostéoconductrices. De plus, outre leur bioactivité élevée, certains inconvénients surviennent compte tenu de leurs capacités de résorption. En effet, la régénération osseuse est un processus très lent qui prend des semaines à des mois selon le défaut initial.

De plus, pour éviter l'invasion des tissus mous, les matériaux de comblement doivent avoir une géométrie adaptée afin de maximiser une surface d'occupation constante à l'intérieur de la cavité osseuse, ce qui permet aux cellules d'entrer en contact direct avec le matériau pour favoriser sa biodégradation et la nouvelle synthèse osseuse. Nécessaire à une régénération tissulaire adéquate, l'inflammation peut être un autre problème à considérer, car une réaction inflammatoire incontrôlée déclenchée par les biomatériaux peut entraîner une perte osseuse au niveau du site d'implantation. Une fois en contact avec les particules de matériau, les cellules liées à l'immunité peuvent être suractivées. De plus les matériaux à base de phosphates de calcium disponibles sur le marché ne sont pas adaptés pour contrôler le risque d'infection bactérienne. L'ajout de cations métalliques dans la structure des céramiques phosphocalciques semble être une solution. Plusieurs dopants ont déjà été étudiés : le cuivre, reconnu pour ses effets antibactériens, le zinc, pour ses effets anti-inflammatoires, ou encore le strontium, favorisant l'ostéoconduction. Ainsi, notre hypothèse est que les substitutions ioniques ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ) dans les structures CaP peuvent contrôler l'inflammation, la croissance bactérienne et l'activité des cellules osseuses. Il est connu que pour les défauts critiques osseux, une approche spécifique au patient et au site osseux est nécessaire. Cela signifie une combinaison finement ajustée des propriétés chimiques et architecturales des échafaudages de CaP, basée sur la capacité du réseau

## Introduction générale

crystallin d'apatite à accueillir de nombreux ions différents. Cela signifie également l'utilisation de nouveaux développements en ingénierie combinant l'injection plastique et la synthèse contrôlée de poudres, à savoir le moulage par injection de poudre (PIM), offrant à la fois des avantages de production rentables et l'accès à des géométries de formes complexes.

C'est donc dans cette perspective que s'inscrit le projet PIMyBone. Il vise à développer de nouveaux biomatériaux phosphocalciques multi-dopés, mis en forme par procédé PIM. Cette thèse s'est donc déroulée en plusieurs étapes : d'abord la synthèse des céramiques phosphocalciques dopées, ensuite leurs caractérisations physico-chimiques, puis l'étude de leur réponse biologique, et enfin leur mise en forme par le procédé PIM.



# ✻ Chapitre 1 ✻

---

## Synthèse bibliographique et objet d'étude

<b>1.1</b>	<b>Petite histoire des biomatériaux .....</b>	<b>14</b>
1.1.1	Débuts difficiles .....	14
1.1.2	Essors des biomatériaux .....	15
1.1.3	Nouvelles générations .....	15
<b>1.2</b>	<b>Substitut osseux .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>Le tissu osseux .....</b>	<b>21</b>
1.3.1	Les composantes minérales et organiques .....	22
1.3.2	Le remodelage osseux .....	23
<b>1.4</b>	<b>Perte de substance osseuse et risques lié à la chirurgie .....</b>	<b>25</b>
1.4.1	Perte de substance osseuse.....	25
1.4.2	Risques liés à la chirurgie.....	29
<b>1.5</b>	<b>Les biocéramiques.....</b>	<b>30</b>
1.5.1	Classification des biocéramiques .....	30
1.5.2	Céramiques bio-inertes .....	31
1.5.3	Biocéramiques bioactives.....	33
<b>1.6</b>	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>41</b>

## 1.1 Petite histoire des biomatériaux

Le corps humain est en perpétuel renouvellement, il possède une grande capacité à se régénérer grâce, notamment, à ses cellules souches [1]. Malheureusement il arrive que dans certain cas la régénération soit impossible (organes défaillants, amputation ou bien cancers). Pour pallier ce problème, l'homme a cherché à trouver des solutions et l'une d'entre elles est l'utilisation de matériaux pour remplacer les tissus humains. Les biomatériaux, comme leur nom l'indique, sont des matériaux conçus pour interagir avec les systèmes biologiques. Leur histoire remonte à l'Antiquité, lorsque les civilisations anciennes ont commencé à explorer l'utilisation de matériaux naturels pour des applications médicales.

### 1.1.1 Débuts difficiles

Les premiers cas d'utilisation de corps étrangers pour « réparer » l'Homme datent de 3000 ans avant notre ère, durant l'Égypte Ancienne, avec l'utilisation d'ivoire et de bois comme remplacement dentaire [2]. Des métaux comme de l'or ou l'argent pouvaient également être utilisés comme fils pour attacher des dents entre elles, ancêtre du bridge dentaire, ou bien comme plaque pour corriger un défaut crânien [2], [3]. Ces premières tentatives, bien que rudimentaires, montrent l'ingéniosité des cultures anciennes à résoudre les problèmes médicaux en utilisant les matériaux disponibles.

L'utilisation de métaux à l'intérieur du corps commence à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, avec les grandes avancées de la médecine de cette époque : découverte des rayons X, utilisation généralisée de l'anesthésie et opérations dans des conditions stériles. Malheureusement par manque de recul, l'utilisation des métaux provoque plus de dommages qu'elle n'en résout. Les problèmes rencontrés sont surtout liés au manque de résistance mécanique des matériaux et à la corrosion du métal [4].

### 1.1.2 Essors des biomatériaux

La Seconde Guerre mondiale marque le début des recherches et innovations dans le domaine des biomatériaux grâce à l'émergence d'alliages métalliques (base titane, acier inoxydable) et de céramiques à hautes performances utilisés pour la guerre, et au développement des matériaux polymères (polyéthylène à ultra haut poids moléculaire). Dans les années qui suivent, de nombreux succès de chirurgies sur l'homme ont lieu, comme la première prothèse de hanche (1946), les premières lentilles intraoculaires (1949) et le premier cœur artificiel (1969) [5]. Malgré les nombreux scientifiques travaillant dans le domaine, il faut attendre 1986 lors de la conférence du consensus de la Société européenne pour les biomatériaux pour converger vers une définition commune d'un biomatériau comme étant « un matériau non vivant d'origine naturelle ou synthétique utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques » [6].

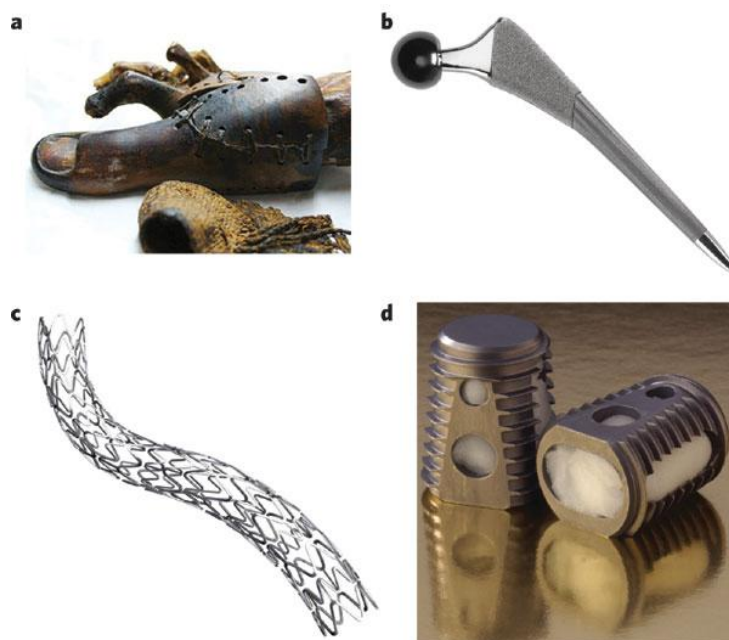
### 1.1.3 Nouvelles générations

Un autre aspect essentiel de l'histoire des biomatériaux est la recherche sur les matériaux pour la régénération des tissus. Les greffes de tissus sont une pratique ancienne, mais les progrès récents dans les biomatériaux ont ouvert la voie à la création de matériaux qui peuvent encourager la régénération des tissus endommagés. Les matrices de collagène, les hydrogels et les polymères biodégradables sont utilisés pour créer des environnements favorables à la croissance cellulaire et à la régénération des tissus. Ces matériaux sont utilisés dans des applications allant de la réparation de cartilage et d'os à la régénération du tissu cardiaque [7].

L'émergence des nanomatériaux a aussi ouvert des possibilités pour l'ingénierie tissulaire et la lutte contre les cancers. Les nanomatériaux pouvant être conçus pour cibler des cellules spécifiques, ces avancées ont le potentiel de transformer la médecine en permettant des traitements précis et plus efficaces [8].

L'histoire des biomatériaux s'étend sur des millénaires, de l'utilisation de matériaux naturels par les anciennes civilisations à l'ère moderne de la science des matériaux et de la médecine de pointe. Les biomatériaux ont révolutionné la médecine en permettant des avancées médicales majeures, de la création d'implants chirurgicaux aux prothèses. Cette évolution comme domaine et industrie est illustrée dans la **Figure 1-1** où nous pouvons voir en premier lieu un orteil en bois, daté de vers 1065-740 avant J.-C. et identifié lors d'une fouille anthropologique dans les tombes de Thèbes Ouest, en Égypte. Le bois est l'un des premiers biomatériaux et a ici été utilisé comme prothèse pour remplacer un orteil amputé. L'implant de hanche SYNERGY est un exemple de prothèse de pointe qui utilise des matériaux synthétiques fabriqués et conçus pour répondre à des exigences de performance. Ensuite sont présentés des produits combinés disponibles dans le commerce, avec des composants synthétiques et une activité biologique. Le stent TAXUS Express2 Atom, un stent métallique dans lequel le paclitaxel est élué dans de petits vaisseaux coronaires pour prévenir la resténose (rétrécissement des vaisseaux à médiation cellulaire). Et *in fine* le dispositif INFUSE Bone Graft, un produit combiné qui utilise à la fois des composants prothétiques traditionnels (une cage en acier) et une approche d'ingénierie tissulaire (une éponge de collagène bovin de type I à partir de laquelle la protéine morphogénétique osseuse humaine recombinante 2 est éluée) pour assurer la stabilité pendant que les tissus de la colonne vertébrale sont en cours de régénération [9].

La recherche continue dans le domaine des biomatériaux ouvre la voie à des innovations encore plus impressionnantes, telles que la régénération des tissus et les matériaux "intelligents". Ces avancées promettent d'améliorer la qualité de vie des patients et de rendre la médecine plus précise et efficace.



**Figure 1-1** Evolution des biomatériaux, a. Orteil en bois, b. Implant de hanche, c. Stent, d. Dispositif INFUSE Bone Graft [9].

## 1.2 Substituts osseux

Bien que de nombreux biomatériaux aient été évoqués précédemment, ce chapitre et les suivants vont se focaliser sur les substituts osseux. Ces matériaux, conçus pour remplacer ou soutenir les tissus osseux endommagés, jouent un rôle essentiel dans les domaines de la réparation et de la régénération osseuse.

Les substituts osseux représentent un marché en pleine croissance porté par une demande accrue dans les interventions orthopédiques, notamment pour les populations vieillissantes, et par les avancées technologiques dans le domaine biomédical. Ce marché devrait avoir un taux de croissance annuel moyen de 7% au cours de la période 2022 - 2029 [10].

La Société française de recherche orthopédique et traumatologique (SOFROT) définit le substitut osseux comme tout biomatériau, qu'il soit d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique, répondant aux critères suivants : destiné à être implanté chez l'homme, visant à restaurer le tissu

## Substituts osseux

osseux, et conçu pour renforcer une structure osseuse ou combler une perte de substance osseuse due à un traumatisme ou à une intervention orthopédique.

La Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé (CNEDiMTS) distingue deux grandes catégories de substituts osseux : les substituts osseux synthétiques ne comportant aucun dérivé ou tissu d'origine biologique ou n'étant pas issus de tels dérivés, et les substituts osseux issus de dérivés, de tissus d'origine animale non viables ou en comportant [11]. Ils sont implantés dans le corps *via* une greffe, c'est-à-dire une opération chirurgicale qui consiste à remplacer un organe vital défaillant par un organe sain [12]. Le **Tableau 1-1** synthétise et compare les différents types de greffes.

**Tableau 1-1** Différents types de greffe osseuse avec leurs avantages et inconvénients [11], [13], [14], [15], [16], [17], [18].

Type de greffe	Autogreffe	Allogreffe	Xéno greffe	Greffe synthétique
<b>Principe</b>	Proviens du même individu	Même espèce, mais génétiquement différente	Espèce biologique du donneur différente de celle du receveur	Dérivé de matériaux non biologiques
<b>Avantages</b>	Histocompatibilité totale, Ostéogénique, Ostéoconducteur, Ostéoinducteur, Propriétés mécaniques satisfaisantes ;	Ostéogénique, Ostéoinducteur, Ostéoconducteur, Propriétés mécaniques satisfaisantes ; Faible coût	Disponibilité infinie, Ostéoinducteur, Ostéoconducteur	Disponibilité infinie, Ostéoconducteur, Biorésorbable, Forme modulable à l'infini
<b>Inconvénients</b>	Quantité limitée, Deuxième site de chirurgie	Quantité limitée, Problèmes de conservation	Risque de transmission de maladies, Réponse immunitaire, Question éthique	Propriétés dépendant de la région anatomique
<b>Exemples de greffons</b>	Os spongieux, Os cortical (vascularisé et non vascularisé)	Os spongieux (congelé ou lyophilisé), Os cortical (congelé ou lyophilisé)	Collagène bovin et porcin, Carbonate de calcium d'origine corallienne, Hydroxyapatite d'origine bovine	Céramiques (TCP <sup>1</sup> , HAp <sup>2</sup> ), Polymères (PMMA <sup>3</sup> ), Bioverres, Implants métalliques (titane)

<sup>1</sup> TCP : phosphate tricalcique

<sup>2</sup> HAp : Hydroxyapatite

<sup>3</sup> PMMA : polyméthacrylate de méthyle

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique et objet d'étude

Un biomatériau doit, comme tout matériau, répondre à un cahier des charges afin de garantir la conformité aux exigences techniques et aux normes de qualité. Dans le cas particulier des biomatériaux, il spécifie les exigences précises que ces matériaux doivent remplir pour assurer leur efficacité, leur compatibilité biologique et leur sécurité.

Pour les applications en ingénierie tissulaire, le cahier des charges peut par exemple définir les propriétés de surface, la porosité, la perméabilité et d'autres caractéristiques importantes comme la dégradation et l'élimination du matériau dans le corps.

Le substitut osseux idéal dans le cas d'une greffe osseuse est : biocompatible, biorésorbable, facile à utiliser et économique.

L'une des propriétés intrinsèques à un biomatériau est la biocompatibilité, sans laquelle le matériau ne serait pas viable sur le long terme et néfaste pour le patient. La norme ISO 10993-1:2018 définit la biocompatibilité comme « la capacité d'un dispositif médical (instrument, appareil, équipement, machine, dispositif, implant, réactif pour utilisation in vitro, logiciel, matériau ou autre article similaire ou associé, dont le fabricant prévoit qu'il soit utilisé, seul ou en association, chez l'être humain) ou d'un matériau (polymère naturel ou synthétique, métal ou alliage, céramique ou bien composite, y compris les tissus rendus non viables, utilisé comme dispositif médical ou partie de dispositif médical) à produire une réponse hôte appropriée dans une application spécifique» [19].

Les tests devant être réalisés sur les implants osseux sont, pour les plus courants, des tests de cytotoxicité et de sensibilisation. Ces derniers sont nécessaires pour l'ensemble des dispositifs médicaux en contact avec le corps humain. Il peut-être aussi demandé de réaliser des tests de génotoxicité et d'irritation ou réactivité intradermique. Tous les tests peuvent être réalisés sur différentes périodes allant de moins de 24h à plus de 30 jours [20].

## Substituts osseux

Les matériaux synthétiques destinés à la réparation et au remplacement des os doivent présenter des propriétés physiques et/ou biologiques adaptées pour interagir étroitement avec les tissus vivants. Cependant, ils montrent généralement une faible affinité avec les tissus de l'hôte [21]. La bioactivité correspond à la propriété particulière que possède un matériau d'engendrer, par une succession de réactions de surface, une liaison intime à l'interface avec les tissus hôtes.

Dans le cas particulier des substituts osseux, la bioactivité se traduit par la formation d'une couche de phosphate de calcium à la surface de l'implant. Cette couche a une composition similaire à la phase minérale de l'os, soit une hydroxyapatite carbonatée de formule  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{HPO}_4)_x(\text{CO}_3)_y(\text{OH})_{2-2y}$  mal cristallisée [22].

La résorbabilité d'un biomatériau désigne sa capacité à se dégrader progressivement dans le corps après avoir rempli sa fonction. C'est une propriété essentielle pour les matériaux utilisés en tant qu'implants ou substituts osseux, car elle permet au matériau de laisser place à du tissu biologique (comme de l'os) qui le remplace au fur et à mesure qu'il se résorbe. Il est donc important de prendre en compte le taux de dégradation de l'implant afin de faire correspondre ce dernier avec le taux de croissance du nouveau tissu.

La vitesse de dégradation de l'hydroxyapatite non substituée est très lente, voire quasiment nulle [23], [24]. Une des approches envisagées afin d'augmenter cette dernière est d'imiter la composition et la microstructure de l'apatite biologique, en réduisant la taille des particules, en augmentant la porosité et en introduisant des dopants *via* des substitutions ioniques. Cette méthode est limitante, car la vitesse de dégradation est toujours inférieure à la vitesse de formation de l'os et les propriétés physiques ne sont plus satisfaisantes. Une autre méthode consiste à associer à l'hydroxyapatite (HAp) pure des composés de calcium plus facilement résorbables, comme les

phosphates tricalcique ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ou dicalcique ( $\text{CaHPO}_4$ ), ou encore des composés comme les sulfates et les carbonates [23].

À la biocompatibilité et la résorbabilité, on peut ajouter celles de l'ostéoconduction, de l'ostéoinduction et de l'ostéogenèse. L'ostéoconduction est une propriété passive d'un matériau qui permet la repousse osseuse grâce à l'invasion vasculaire et cellulaire depuis le tissu receveur en contact direct. L'ostéoinduction correspond à un processus de stimulation, *via* des protéines spécifiques, qui favorisent la prolifération et/ou la différenciation de cellules souches en matrice osseuse minéralisable. Enfin, l'ostéogenèse désigne la formation de la matrice osseuse, sans préciser l'origine cellulaire, qu'elle provienne de la greffe ou de l'hôte [11].

### 1.3 Le tissu osseux

L'os est un tissu conjonctif essentiel pour les vertébrés jouant un double rôle : garantir l'intégrité mécanique nécessaire à la locomotion et à la protection, tout en participant aux processus métaboliques liés à l'équilibre des minéraux comme le calcium et le phosphore et la production de cellules sanguines grâce à la moelle osseuse [25]. Environ 99% du calcium, soit 2% de la masse corps [26], et 85% du phosphore [27] dans le corps humain sont stockés dans les os et les dents.

Le corps humain possède 206 os, se répartissant dans 4 catégories différentes : les os longs, qui agissent comme levier et aide au déplacement (tibia, radius), les os courts offrant du soutien et de la mobilité (os du poignet et des chevilles), les os plats protégeant les organes (os du crâne, du sternum et les côtes) et enfin les os sésamoïdes ou irréguliers n'entrant pas dans les autres catégories (vertèbres et les os du bassin). Ils sont principalement constitués de tissu osseux (os cortical et os spongieux) mais contiennent également des vaisseaux sanguins et des nerfs comme illustrés en **Figure 1-2**.

### ❖ L'os cortical

L'os cortical, également appelé os compact, forme la couche extérieure dense et dure de l'os et représente environ 85% de la masse osseuse totale. Il est constitué de cellules osseuses (ostéocytes) enfermées dans une matrice extracellulaire solide composée de minéraux, principalement de l'hydroxyapatite, de canaux de Havers et de Volkmann. La structure de cet os est constituée de couches concentriques (ostéons), ce qui confère à l'os sa résistance et sa rigidité [28].

### ❖ L'os spongieux

L'os spongieux autrement appelé os trabéculaire est quant à lui situé dans la partie plus centrale de l'os a une structure moins dense. Il représente environ 15% de la masse osseuse totale. Il est constitué de trabécules qui forment un réseau de fines lamelles osseuses, ce qui le rend plus léger tout en maintenant sa résistance [28]. L'os spongieux est essentiel pour la distribution des forces à l'intérieur de l'os.

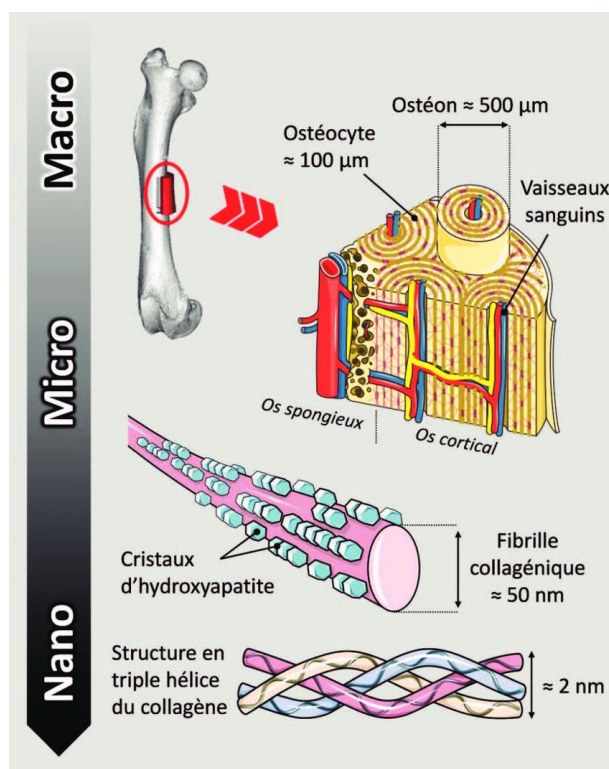
### 1.3.1 Les composantes minérales et organiques

#### ❖ La composante organique

La composante organique du tissu osseux, qui représente 30% de la masse totale du tissu [29] est majoritairement constituée de collagène (de type I) et d'une moindre fraction de molécules dites non-collagéniques, principalement des glycoprotéines. Le collagène est présent dans le corps, on le retrouve comme constituant majeur des tendons, ligaments, du cartilage, de la cornée et de la dentine, ainsi qu'en fraction plus faible dans la peau, les artères, etc. La partie organique de l'os lui attribue une certaine souplesse, ce qui lui permet d'absorber les chocs [30].

### ❖ La composante minérale

La phase minérale de l'os, qui elle représente la majorité du tissu (70%) [29] est une forme nanocristalline et fortement substituée d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Cette hydroxyapatite peut être substituée par des carbonates, du magnésium ainsi que d'autres éléments, dont la teneur dépend de l'alimentation et de l'environnement [31]. La composition moyenne d'un os humain d'adulte est généralement représentée par la formule chimique suivante  $\text{Ca}_{8,1}\text{Mg}_{0,2}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_{1,2}(\text{OH})_{0,3}$  [32]. Les cristaux d'apatite du tissu osseux se présente sous la forme de plaquettes irrégulières.



**Figure 1-2** Schéma des différentes composantes de l'os naturel à différentes échelles [33].

### 1.3.2 Le remodelage osseux

Le squelette est constamment remodelé dans le cadre d'un processus dynamique qui oppose deux types de cellules : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoclastes sont les cellules qui résorbent l'os ancien après

une phase d'activation. Lorsqu'une lacune est formée, les ostéoclastes sont remplacés par les ostéoblastes, c'est la phase d'inversion. Ces derniers vont combler la lacune avec une nouvelle matrice osseuse, en formant dans un premier temps des fibres de collagène qui sont par la suite minéralisées. Le processus est détaillé ci-dessous et dans la [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#) La durée moyenne d'une séquence de remodelage est de 3 à 4 mois [28], [34].

**Etape 1 :** Les ostéoblastes détectent les microfissures et sécrètent l'activateur du récepteur du facteur nucléaire  $\kappa\beta$  (RANKL)<sup>4</sup>.

**Etape 2 :** Les RANKL se lient aux cellules réceptrices de monocytes (RANK), ce qui provoque leur fusion et forme des cellules ostéoclastes multinucléées.

**Etape 3 :** Les ostéoclastes sécrètent des enzymes lysosomales (principalement la collagénase) qui digèrent les protéines de collagène de la matrice osseuse, ce qui crée des trous en surface (lacunes de Howship) et de l'acide chlorhydrique, qui ensuite dissout l'hydroxyapatite et mène au relargage d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  dans le flux sanguin. Il existe également une dispersion d'ostéocytes, piégés dans la matrice osseuse. Lorsque ces derniers sont libérés par la dissolution de l'os, ils sont phagocytés par les ostéoclastes.

**Etape 4 :** Les ostéoblastes sécrètent de l'ostéoprotégérine qui se lie au RANKL et l'empêche d'activer les récepteurs du RANK, ce qui ralentit l'activation des ostéoclastes. Enfin, une fois que les ostéoclastes ont terminé leur travail, ils se suicident par apoptose. Après la résorption osseuse, les ostéoblastes commencent à sécréter du filon ostéoïde, une substance principalement composée de collagène, pour combler les lacunes créées par les ostéoclastes.

---

<sup>4</sup>Groupe de protéines contribuant à contrôler de nombreuses fonctions cellulaires, notamment la croissance et la survie des cellules. Ces protéines contrôlent également les réponses immunitaires et inflammatoires de l'organisme [123].

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique et objet d'étude

**Etape 5 :** Le calcium et le phosphate commencent à se déposer, formant de l'hydroxyapatite.

**Etape 6 :** Par ailleurs, comme les ostéoblastes continuent à produire de la nouvelle matière osseuse, nombre d'entre eux se retrouvent piégés dans de minuscules lacunes de la matrice osseuse et se transforment en ostéocytes.

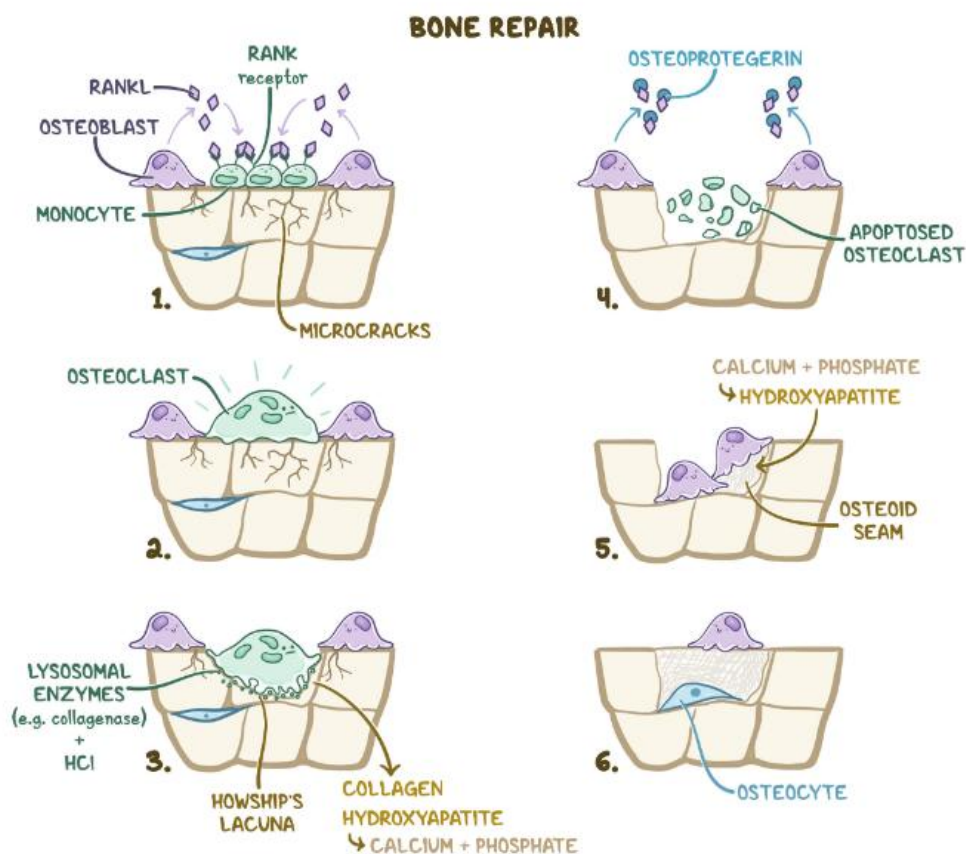


Figure 1-3 Illustration du cycle de remodelage osseux [35]

### 1.4 Pertes de substance osseuse et risques liés à la chirurgie

#### 1.4.1 Pertes de substance osseuse

Au cours de la vie, divers facteurs physiologiques, pathologiques ou environnementaux peuvent perturber le processus de remodelage osseux. L'ostéoporose est la pathologie la plus fréquente, entraînant une fragilité osseuse accrue et un risque de fractures. Par ailleurs, dans le cadre de traumatismes sévères ou de certaines pathologies comme les cancers osseux

## Pertes de substance osseuse et risques liés à la chirurgie

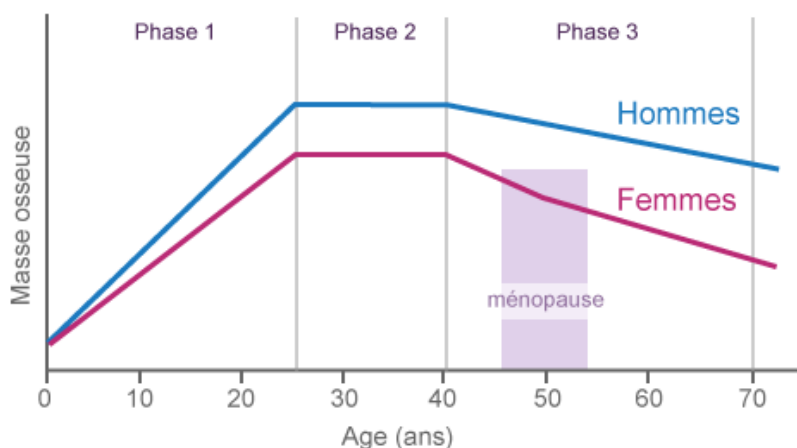
primaires (ostéosarcomes) ou les métastases osseuses (notamment celles du sein ou de la prostate), il est souvent nécessaire de retirer une partie de l'os. Cette perte osseuse peut alors créer un défaut critique, c'est-à-dire une lésion de taille trop importante pour se régénérer spontanément, nécessitant ainsi une prise en charge spécifique, notamment par des greffes ou des biomatériaux.

### ❖ L'ostéoporose

La masse osseuse augmente progressivement jusqu'à environ 25 ans, âge auquel elle atteint son niveau maximal, connu sous le nom de « pic de masse osseuse » ou « densité minérale osseuse » maximale [36]. Elle se maintient ensuite pendant un certain temps, avant que la résorption ne prenne le dessus sur la formation. La masse diminue de 0,5 à 1 % par an chez l'homme, alors que chez la femme la décroissance de la masse osseuse commence quelques années avant la ménopause et se poursuit au rythme de 1 à 2 % par an durant 8 à 10 ans, puis ralentit jusqu'à ce que son rythme soit le même que chez l'homme [37] (**Figure 1-4**). La majorité des cas d'ostéoporose chez l'homme et la femme sont dit primitifs, c'est-à-dire sans cause sous-jacente identifiable. Toutefois, certaines pathologies peuvent aggraver la perte osseuse en cas d'ostéoporose primitive. L'insuffisance gonadique<sup>5</sup> constitue un facteur clé chez les deux sexes, tandis que d'autres éléments, tels qu'un apport insuffisant en calcium, une carence en vitamine D, certains traitements médicamenteux et l'hyperparathyroïdie, peuvent également contribuer à l'aggravation de la maladie [38].

---

<sup>5</sup> Ils correspondent à un défaut de la fonction gonadique (ovaires et testicules) dont l'origine est un défaut d'activation de l'hypothalamus et/ou de l'hypophyse [124].



**Figure 1-4** Schéma des variations du capital osseux en fonction du temps [39].

L'ostéoporose causée par une maladie, une condition médicale ou un traitement est qualifiée de secondaire [40]. L'ostéoporose secondaire est responsable de < 5% des cas d'ostéoporose chez la femme et d'environ 20% chez l'homme [38].

Des solutions existent pour lutter contre cette perte de matière osseuse. La prise en charge des patients atteints dépend de divers facteurs de risque clinique. Le dénosumab, un anticorps monoclonal anti-RANK-Ligand, est un puissant inhibiteur de la résorption osseuse. Une supplémentation quotidienne de vitamine D et de calcium a démontré des effets antifracturaires. La tibolone (Livial®) réduit le risque de fractures vertébrales, mais augmente celui des accidents vasculaires cérébraux. Le ranélate de strontium (Protélos®) prévient les fractures sur cinq ans, y compris chez les patientes de plus de 80 ans [41].

### ❖ Pertes osseuses liées à un cancer

Les cancers osseux, bien que rares, englobent plusieurs types de tumeurs malignes affectant le tissu osseux. Parmi les plus courants, on trouve l'ostéosarcome, le chondrosarcome et le sarcome d'Ewing. L'ostéosarcome est le type le plus fréquent des cancers primitifs chez les enfants et les jeunes adultes et touche environ 100 à 150 nouveaux patients par an en France. Il se

## Pertes de substance osseuse et risques liés à la chirurgie

développe généralement dans les os longs de la jambe autour du genou. Le chondrosarcome touche principalement les adultes (30-50 ans). Il s'agit une tumeur maligne des cartilages. Le sarcome d'Ewing est une tumeur agressive rare qui survient surtout chez les enfants et se manifeste dans les os ou les tissus mous des membres ou du bassin [42].

Les symptômes des cancers osseux sont des douleurs persistantes, un gonflement ou la formation d'une masse palpable sur l'os affecté. Les conséquences peuvent être une fragilité accrue de l'os, ce qui augmente le risque de fractures spontanées ou à la suite de traumatismes mineurs. Le diagnostic repose sur des examens d'imagerie, tels que la radiographie, l'IRM ou le scanner, complétés par une biopsie pour confirmer la nature maligne de la tumeur [43].

Plusieurs solutions existent afin de traiter le cancer, le plus souvent une combinaison de plusieurs est utilisée. Le plan de traitement dépendra du type de cancer des os, de l'os dans lequel il a commencé, de son stade et d'autres facteurs.

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants pour cibler spécifiquement et endommager l'ADN des cellules cancéreuses, compromettant ainsi leur capacité à se reproduire et à survivre [44].

La chimiothérapie utilise des médicaments pour détruire les cellules cancéreuses ou empêcher leur multiplication. Contrairement à la radiothérapie, qui cible une zone précise, la chimiothérapie agit sur l'ensemble du corps, ce qui permet de traiter les cellules cancéreuses même lorsqu'elles se sont propagées à d'autres parties de l'organisme [45].

La chirurgie peut être pratiquée dans deux cas : le premier pour réaliser une biopsie et le second afin de retirer la tumeur. L'objectif principal de la chirurgie est d'éliminer entièrement le cancer. Si même une petite quantité de cancer est laissée, elle pourrait se développer, former une nouvelle tumeur et éventuellement se propager à d'autres parties du corps. Afin de retirer

l'entièreté de la tumeur, le chirurgien peut faire une chirurgie de préservation du membre, c'est-à-dire le retrait du cancer et d'une partie des tissus sains environnants tout en conservant essentiellement le membre intact, ou amputer le membre entier. C'est dans le cas de la chirurgie de préservation du membre qu'une greffe osseuse est nécessaire.

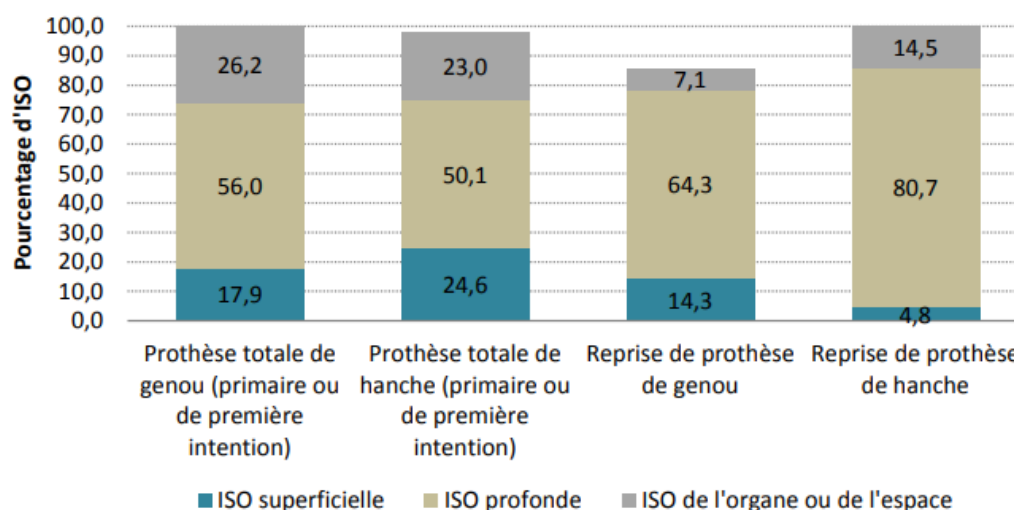
### ❖ Pertes osseuses d'origine traumatique

Après les cancers, les accidents représentent une cause majeure de perte de substance osseuse. Les traumatismes sévères, tels que les fractures complexes, les accidents de la route, les chutes de grande hauteur ou les blessures par armes à feu, peuvent entraîner des dommages irréversibles à l'os. Lorsque la perte est importante, la régénération osseuse naturelle est souvent insuffisante [46], nécessitant des interventions spécifiques comme les greffes osseuses, l'utilisation de biomatériaux ou de substituts synthétiques [47].

#### 1.4.2 Risques liés à la chirurgie

Lors de sa dernière enquête en 2022, le RéPIAS (Réseau de Prévention des Infections et de l'Antibiorésistance), a noté une augmentation des cas d'infection nosocomiale depuis 2017. En 2022, la prévalence de patients infectés était de 5,71% contre 4,98% en 2017. Cette hausse est en partie expliquée par la prise en compte des cas de COVID-19 nosocomiaux. Si on enlève cette catégorie de contamination, la prévalence est de 5,35% [48]. Parmi ces infections nosocomiales, on trouve les infections des sites opératoires qui sont un des risques encourus par les patients subissant une chirurgie orthopédique. Le taux d'incidence des infections des sites opératoires en chirurgie orthopédique était de 1,37% en 2017 et 83,7% des infections ont nécessité une reprise chirurgicale [49]. Parmi les 351 souches isolées, 72,6% étaient des cocci à Gram+ avec en majorité (60,5%) une infection de *Staphylococcus aureus* et 20,2% étaient des entérobactéries avec en majorité (36,6%) une infection d'*Escherichia coli* [49] (Figure 1-5).

## Les biocéramiques



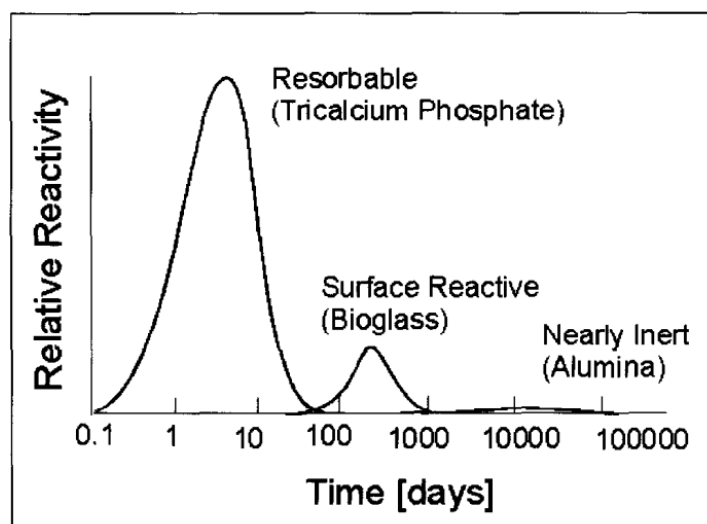
*Figure 1-5 Répartition des infections des sites opératoire selon le site infectieux et le type d'intervention pour la chirurgie [49].*

### 1.5 Les biocéramiques

Nous allons, dans cette section, nous concentrer uniquement sur les biocéramiques en tant que substituts osseux, bien que les polymères, les métaux et les composites aient également été mentionnés au début du chapitre. Ces matériaux se distinguent par des propriétés particulièrement intéressantes comme leur excellente résistance à la compression et à la température, leur faible coefficient de dilation thermique et leur vulnérabilité au cisaillement et à la traction [50].

#### 1.5.1 Classification des biocéramiques

Les biocéramiques se distinguent par leur grande diversité, permettant de répondre à des besoins variés dans les applications biomédicales. On peut les classer en deux catégories selon leur interaction avec les tissus biologiques : les biocéramiques bio-inertes et les céramiques bioactives [51] (Figure 1-6).



*Figure 1-6 Les trois sous-groupes de biocéramiques utilisées dans les applications médicales et classées en fonction de leur réactivité [52].*

### 1.5.2 Céramiques bio-inertes

Les biocéramiques bio-inertes, telles que l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) et la zircone ( $\text{ZrO}_2$ ), sont caractérisées par leur stabilité physicochimique et leur bonne biocompatibilité. L'utilisation majoritaire de ces biocéramiques est dans le domaine des prothèses et en particulier des prothèses totales de hanche et de genou [51].

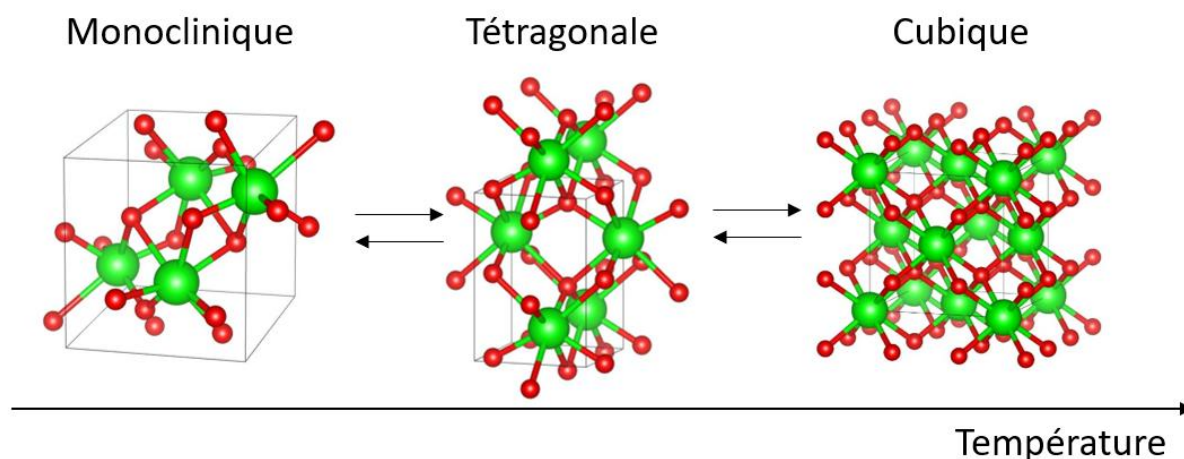
Introduite en orthopédie en 1965 par le Docteur Pierre Boutin, l'alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) est couramment employée dans les prothèses de hanche, pour la réalisation de couples de frottement dans les prothèses de hanche (tête fémorale et cupule). Ses propriétés de dureté, de module d'Young élevé et une bonne résistance à la rupture en font un matériau de choix pour les surfaces de frottement, réduisant ainsi l'usure et augmentant la durabilité des implants [53]. La forme cristalline de l'alumine utilisée dans le domaine des biomatériaux est l' $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (ou corindon), qui est la forme thermodynamiquement stable de l'alumine. Elle est obtenue par chauffage au-dessus de  $1200^\circ\text{C}$  des alumines hydratées. La structure cristalline correspond à un empilement hexagonal compact d'anions oxygène dans lequel les cations  $\text{Al}^{3+}$  occupent les 2/3 des sites octaédriques [54]. Bien que l'alumine soit bio-

## Les biocéramiques

inerte, A. Ignatius [55] a montré que la présence d'un revêtement à base de matériaux bioactifs, comme des verres bioactifs, peut améliorer son intégration osseuse.

En plus de l'alumine mentionnée précédemment, la zircone ( $ZrO_2$ ) est également utilisée pour les têtes fémorales dans les arthroplasties totales de la hanche. Cela s'explique par ses bonnes propriétés mécaniques, notamment sa résistance et sa ténacité à la fracture, qui surpassent celles des céramiques d'alumine.

La zircone non dopée présente les transitions de phase suivantes sous conditions ambiantes au cours d'un cycle thermique [56] (**Figure 1-7**) :



**Figure 1-7** Changements de phases cristallographiques de  $ZrO_2$  en fonction de la variation de température [57], [58].

Les phases quadratique et cubique de la zircone pure peuvent être stabilisées à température ambiante par l'ajout d'oxydes appropriés, tels que  $CaO$ ,  $MgO$ ,  $Y_2O_3$ ,  $CeO_2$  [57]. Si l'oxyde dopant présente des cations de faible taille ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), ceux-ci forment une solution solide d'insertion dans le réseau de zircone. Pour les plus gros cations ( $Y^{3+}$ ,  $Ce^{4+}$ ), ces derniers forment des solutions solides de substitution. La formation de ces solutions solides modifie la stœchiométrie de l'oxyde. L'augmentation du nombre de lacunes anioniques réduit les contraintes au sein du réseau cristallin, favorisant la transformation de la zircone monoclinique en zircone quadratique, voire

cubique [59]. La transformation quadratique-monoclinique est une transformation de type martensitique, il s'agit donc d'une transformation rapide, qui s'accompagne d'un grossissement de la maille de 4,5% [56], [59].

La zircone stabilisée à température ambiante par l'ajout de 3% molaire d'oxyde d'yttrium [60] est connue sous le nom de zircone polycristalline tétragonale (TZP) et est actuellement la combinaison la plus étudiée [61]. La zircone quadratique étant métastable à température ambiante, lorsqu'une contrainte mécanique (comme la propagation d'une fissure) est appliquée, certaines régions de la zircone quadratique se transforment en phase monoclinique. Comme évoqué plus tôt, cette transformation s'accompagne d'une augmentation du volume localisé, ce qui génère une compression qui agit comme une barrière à la propagation de la fissure. Ce mécanisme améliore significativement la ténacité du matériau [56].

Les matériaux bio-inertes sont idéaux pour les prothèses, mais dans le domaine de l'ingénierie tissulaire et des comblements osseux il est essentiel d'utiliser des matériaux capables de développer une affinité et de se lier aux tissus environnants.

### 1.5.3 Biocéramiques bioactives

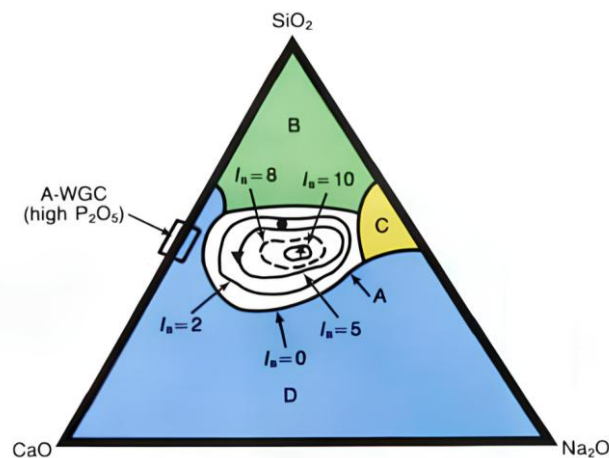
À l'inverse des bio-inertes, les biocéramiques bioactives comme l'hydroxyapatite et les verres bioactifs interagissent activement avec les tissus environnants. Ces matériaux sont capables de former une liaison chimique avec les os ou d'autres tissus biologiques, favorisant ainsi leur intégration. Grâce à cette propriété, elles sont couramment utilisées pour la régénération osseuse ou comme revêtements sur des implants métalliques afin de stimuler l'ostéointégration.

❖ Verres bioactifs

Les verres bioactifs ont été imaginés par Larry L. Hench en 1969 sous l'hypothèse suivante « Le corps humain rejette les matériaux métalliques et polymères synthétiques en formant du tissu cicatriciel, car les tissus vivants ne sont pas composés de tels matériaux. Le minéral osseux étant un phosphate de calcium de type apatitique, si un matériau est capable de former une couche de HAp *in vivo*, il peut ne pas être rejeté par le corps. »

Le premier verre bioactif nommé Bioglass® ou «45S5» a la composition suivante : 45 % SiO<sub>2</sub>, 24,5 % Na<sub>2</sub>O, 24,5 % CaO, 6 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> les pourcentages massiques ont été sélectionnés à l'aide du diagramme ternaire présenté en **Figure 1-8**, dans le but de fournir une grande quantité de CaO avec un peu de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dans une matrice Na<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub> [62].

Dans ce diagramme quaternaire projeté dans le plan %P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>=6% se trouvent toutes les compositions possibles. La zone A (blanche) est la zone de bioactivité, la zone B (verte) est la zone bio-inerte, la zone C (jaune) est la zone où les verres seront biorésorbables et disparaîtront entre 10 et 30 jours après l'implantation, et enfin la zone D (bleue) est une zone dans laquelle l'obtention d'un verre homogène n'est pas possible, car il y aura cristallisation ou séparation de phases [22], [63].



**Figure 1-8** Dépendance de la composition des verres bioactifs et des vitrocéramiques sur leur liaison aux tissus osseux et aux tissus mous [63].

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique et objet d'étude

Une fois implanté dans le corps, le verre bioactif peut réagir aux fluides physiologiques et former une liaison chimique forte avec les os. Sa bioactivité est associée à la formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2x}$  à sa surface, semblable au minéral osseux [64]. Les lignes  $I_B=n$  de la **Figure 1-8** sont des courbes d'isobioactivité, dépendantes du temps nécessaire pour que la moitié de la surface du verre soit liée aux tissus ( $t_{1/2}$ , en jours). La formule les liants est la suivante :

$$I_B = \frac{100}{t_{1/2}}$$

Le verre bioactif original développé par L. L. Hench a été préparé par un processus classique de fusion à haute température, c'est-à-dire par la fusion d'oxydes mélangés à haute température suivie d'une étape de trempe [62]. Bien que ce processus ne permette pas l'obtention systématique de nanoparticules, la méthode de Spray Pyrolyse en Flamme [65], reposant sur l'évaporation flash d'une solution contenant des précurseurs dissous dans un solvant combustible, permet de collecter des nanoparticules (20-80 nm)[65] sur un filtre au-dessus de la flamme [66]. Une autre méthode développée dans les années 90 semble aujourd'hui faire l'unanimité : la méthode sol-gel. Cette dernière proposée par R. Li, A.E. Clark, et L. L. Hench en 1991 [67], utilise du tétraéthoxysilane (TEOS), du phosphate de triéthyle ( $\text{OP}(\text{OEt})_3$ ) et du nitrate de calcium ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) comme précurseurs.

### ❖ Céramiques phosphocalciques

Il existe une autre catégorie de céramiques bioactives en plus des verres bioactifs : les céramiques phosphocalciques. Ces dernières sont composées en majorité de calcium et de phosphore. La famille des phosphates de calcium comprend de nombreux membres qui diffèrent par leur formule chimique et leur rapport calcium sur phosphate Ca/P. La majorité d'entre eux ont des compositions strictement définies. Une liste des principales céramiques phosphocalciques est dressée dans le **Tableau 1-2**.

## Les biocéramiques

**Tableau 1-2** Liste de certaines céramiques phosphocalciques d'après [68], [69], [70].

Nom	Abréviation	Formule chimique	Ratio Ca/P	Utilisation
<b>Phosphate dicalcique anhydre</b>	DCPA monétite	$\text{CaHPO}_4$	1	Ciments minéraux, revêtements, dentifrice, additif alimentaire, agent anti-agglomérant, précurseur de BCP
<b>Phosphate dicalcique dihydraté</b>	DCPD Brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	Ciments minéraux, revêtements, dentifrice, additif alimentaire, agent anti-agglomérant, précurseur de BCP
<b>Phosphate octocalcique</b>	OCP	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Précurseur de HAp, substitut osseux
<b>Phosphate tricalcique</b>	TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	Substitut osseux, complément alimentaire
<b>Hydroxyapatite</b>	HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Substitut osseux, dentifrice, catalyseur en chimie organique
<b>Phosphate tétracalcique</b>	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2	Précurseur d'HAp

### ❖ *L'hydroxyapatite*

Nous avons déjà mentionné l'hydroxyapatite comme constituant principal de la matrice minérale de l'os. Intéressons-nous à présent à la chimie de l'hydroxyapatite stœchiométrique. Sa formule chimique

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique et objet d'étude

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , provient de la structure apatitique qui a pour formule générique :  $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ , avec Me un cation métallique,  $\text{XO}_4$  un groupement anionique, et Y un anion ou un groupement anionique [71]. Le ratio Ca/P vaut dans ce cas 1,66. Le système cristallin est un système hexagonal avec le groupe d'espace  $\text{P6}_3/\text{m}$  et comme paramètres de maille  $a = b = 9,424 \text{ \AA}$  et  $c = 6,879 \text{ \AA}$ , et les angles  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ . Le volume de la maille est de  $529,09 \text{ \AA}^3$  pour l'HAp stœchiométrique [72]. La structure de l'hydroxyapatite résulte d'un agencement tridimensionnel de tétraèdres ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) dont la cohésion est assurée par les cations  $\text{Ca}^{2+}$ . En tenant compte des différentes positions occupées par les atomes de calcium et d'oxygène dans ce groupe d'espace, la formule de l'unité cristalline  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  peut être réécrite sous la forme (les couleurs dans l'écriture correspondent aux couleurs du schéma de la **Figure 1-9**) :



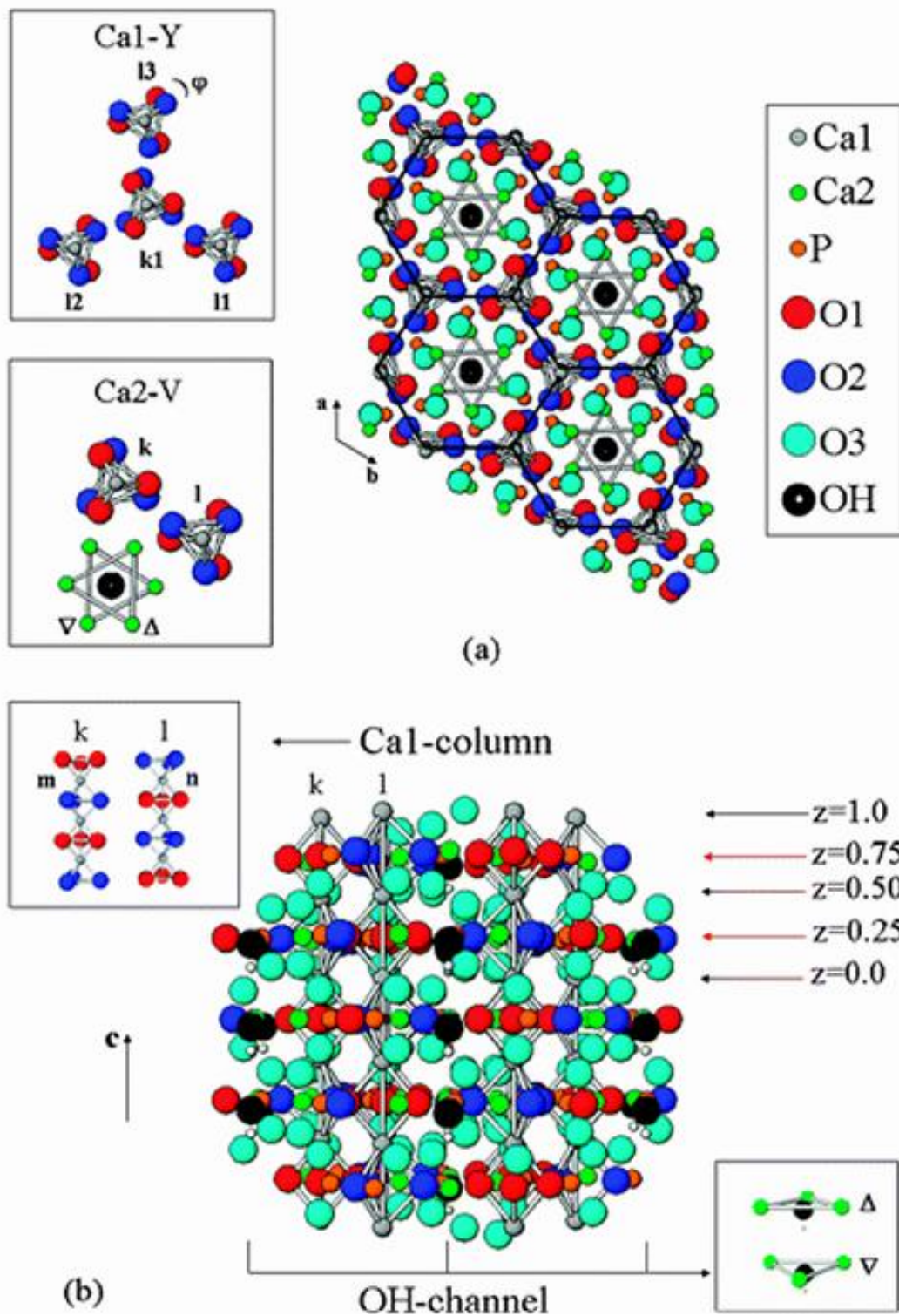
Les tétraèdres phosphates  $\text{PO}_4$  forment les unités structurales de base, tandis que les environnements de coordination distincts autour des sites Ca définissent un métaprisme pour Ca1, coordonné à O1 et O2 et un polyèdre déformé pour Ca2, coordonné à O1, O2, O3 et  $\text{OH}^-$ .

Les ions Ca2 sont donc coordonnés aux groupements hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ). Comme le montre la **Figure 1-9**, les Ca2 sont perpendiculaires à l'axe c et centrés sur cet axe. La répétition de ce motif le long de l'axe c crée un canal  $\text{OH}^-$ , dont l'unité de base est composée de deux polyèdres, chacun ayant une base triangulaire occupée par trois Ca2, et un  $\text{OH}^-$  au sommet, les deux étant tournés de  $60^\circ$  l'un par rapport à l'autre.

Les groupements hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) et les atomes Ca1 sont alignés en colonnes parallèles à l'axe c, dans un rapport de 1/2 sur toute la structure. Cette disposition forme une structure en nid d'abeille centrée sur les colonnes d' $\text{OH}^-$ , avec des sommets formés alternativement par des triangles O1 et O2 centrés sur les colonnes de Ca1.

## Les biocéramiques

Les ions Ca<sub>2</sub>, O<sub>1</sub> et O<sub>2</sub> se trouvent dans le même plan cristallographique (**Figure 1-9**), et leur disposition géométrique implique que les Ca<sub>2</sub> sont liés à deux colonnes voisines de Ca<sub>1</sub> (appelées k et l dans la figure), ce type de liaison est désigné Ca<sub>2</sub>-V dans la **Figure 1-9**. Par ailleurs, la structure en nid d'abeille implique que chaque colonne de Ca<sub>1</sub> participe à trois arêtes de cette structure (identifiées comme l<sub>1</sub>, l<sub>2</sub> et l<sub>3</sub>), ce qui est désigné Ca<sub>1</sub>-Y [73].



**Figure 1-9** Structure calculée de l'hydroxyapatite pure : (a) vue de dessus ;(b) vue de face. Les flèches colorées en (b) indiquent la position fractionnaire le long de l'axe  $c$  de Ca1 (en noir), Ca2, P, O1, O2 (en rouge) ; les positions fractionnaires en  $z$  de O3 et OH ne sont pas représentées. Des vues agrandies des arrangements Ca1-Y et Ca2-V, tels que définis dans le texte, ainsi que des colonnes voisines de Ca1 ( $k$ ,  $l$ ) et des triangles voisins de Ca2 ( $\Delta$ ,  $\nabla$ ), sont également montrées.

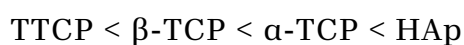
## Les biocéramiques

L'hydroxyapatite a une solubilité fortement influencée par le pH du milieu environnant. En milieu acide, la dissolution est favorisée, entraînant la libération d'ions calcium et phosphate en solution [74]. À l'inverse, en milieu neutre ou basique, elle reste relativement stable, ce qui explique sa présence dans les tissus osseux. Sur le plan thermique, l'hydroxyapatite se décompose au-delà de 1300°C, conduisant à la formation de phosphate tricalcique  $\beta$  ( $\beta$ -TCP) [75].

### ❖ Les phosphates tricalciques

Le phosphate tricalcique de formule  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (TCP) est un matériau de substitution osseuse ayant un ratio calcium sur phosphore Ca/P de 1,5. Le TCP existe sous trois formes cristallines. La variété  $\beta$ , analogue à la Whitlockite, est stable à température ambiante jusqu'à 1125°C [76] et cristallise dans le système rhomboédrique  $R_3C$  ayant pour paramètres de maille :  $a = b = 10,429 \text{ \AA}$ ,  $c = 37,380 \text{ \AA}$  d'après la fiche JCPDS 09-0169. Entre 1125 °C et 1430 °C, le  $\beta$ -TCP subit une transformation en phase  $\alpha$ -TCP, qui peut rester métastable à température ambiante selon la composition initiale et les conditions de refroidissement [76]. L' $\alpha$ -TCP cristallise dans le système orthorhombique d'après la fiche JCPDS 09-0348 et dans le système monoclinique  $P2_1/a$  d'après la fiche ICSD 923. Entre 1430 °C et 1765 °C, la phase stable est l' $\alpha'$ -TCP, mais lors du refroidissement, cette phase devient instable et se transforme presque instantanément en  $\alpha$ -TCP en dessous de la température de transition, nous ne la rencontrerons donc jamais lors de nos expériences [76].

Les phosphates tricalciques ont tous le même comportement [77], toutefois leurs solubilités sont différentes. En effet elles peuvent être classées selon l'ordre suivant [78]:



### 1.6 Objectifs de la thèse

Depuis de très nombreuses années, la conception d'implants destinés à la régénération de défauts critiques osseux à base de phosphate calcique est étudiée. Elle comporte de nombreux défis qui dépendent des limitations technologiques associées à l'élaboration de ces biocéramiques (contrôle des phases de synthèse, mise en forme et frittage) afin de donner des propriétés spécifiques à ces matériaux comme posséder la capacité à stimuler la formation de néo-tissu, à limiter les risques infectieux et réduire l'inflammation autour de l'implant.

Le  $\beta$ -TCP est particulièrement attractif en raison de sa résorbabilité élevée, bien que sa dégradation rapide puisse compromettre le processus de reconstruction osseuse. Il est essentiel que la résorption du matériau se fasse à un rythme compatible avec la régénération osseuse afin de garantir la stabilité mécanique de l'ensemble implant-site receveur. C'est pourquoi un mélange Hydroxyapatite/ $\beta$ -TCP semble être une solution afin de garantir un soutien de l'implant tout au long du processus de régénération, en alliant deux cinétiques de dégradation différentes.

Les objectifs de cette thèse sont centrés sur le développement et l'évaluation de biocéramiques phosphocalciques dopées multi-éléments. Plus précisément, il s'agit de synthétiser des phosphates calciques biphasiques (mélange d'hydroxyapatite et de  $\beta$ -tricalcium phosphate) dopés avec du cuivre, du zinc et du strontium, en explorant différentes combinaisons multi-éléments. Une fois synthétisées, ces biocéramiques seront caractérisées afin de déterminer leur structure cristalline, leur composition chimique et leur morphologie. Par ailleurs, leur cytotoxicité sera évaluée pour garantir leur biocompatibilité. Enfin, les poudres seront mises en forme par powder injection molding (PIM) afin de produire de premiers échantillons pour de potentiels essais *in vivo*.

## Objectifs de la thèse

La thèse s'est structurée en plusieurs parties, présentées dans ce manuscrit sous forme de différents chapitres :

**Chapitre 2** : Il porte sur l'élaboration des matériaux d'intérêt à travers l'étude de la synthèse de BCP dopé, aussi bien en mono- qu'en multi-éléments. L'ensemble des synthèses a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand.

**Chapitre 3** : Ce chapitre rassemble les caractérisations physico-chimiques des matériaux synthétisés présentés dans le chapitre 2. Toutes les analyses ont été menées au sein de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand.

**Chapitre 4** : Nous nous sommes ensuite intéressés au comportement des céramiques en milieu biologique, notamment à travers l'analyse des cinétiques de relargage et l'étude de la cytotoxicité des matériaux tridopés. Les tests de cytotoxicité ont été réalisés par l'équipe BIOS de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

**Chapitre 5** : Dans la continuité du projet PIMyBone, dont l'objectif est la mise en forme de céramiques phosphocalciques multi-dopées, les matériaux ont été mis en forme par le procédé PIM, puis une pièce finale a été caractérisée. La mise en forme a été effectuée par le CRITT Matériaux Innovation de Charleville-Mézières, tandis que les caractérisations ont été réalisées à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand.

## ✻ Chapitre 2 ✻

---

### Elaboration des matériaux d'intérêt

<b>2.1 Dopage de l'hydroxyapatite .....</b>	<b>44</b>
2.1.1 Ions dopants .....	44
2.1.2 Mécanisme.....	45
<b>2.2 Synthèses des phosphates calciques biphasiques.....</b>	<b>48</b>
2.2.1 Synthèse par voie solide.....	48
2.2.2 Synthèse par voie hydrothermale .....	49
2.2.3 Synthèse par voie sol-gel.....	49
2.2.4 Synthèse micro-onde .....	50
2.2.5 Synthèse par coprécipitation.....	50
2.2.6 Synthèses réalisées au laboratoire .....	51
<b>2.3 Traitements thermiques des échantillons .....</b>	<b>54</b>
2.3.1 Formation d'un phosphate biphasique .....	56
2.3.2 Élimination des résidus de synthèse .....	57
2.3.3 Granulométrie .....	58
<b>2.4 Caractérisation des matériaux .....</b>	<b>59</b>
2.4.1 Analyse qualitative par diffraction des rayons X.....	59
2.4.2 Analyse quantitative des diffractogramme de rayons X .....	60
2.4.3 Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier .....	61
2.4.4 Analyse Chimique .....	62
2.4.5 Imagerie.....	62
2.4.6 Mesure de surface spécifique .....	63

### 2.1 Dopage de l'hydroxyapatite

Malgré les protocoles rigoureux mis en place lors des interventions chirurgicales, le risque d'infection post-opératoire demeure une préoccupation majeure. Afin de limiter ces complications, la recherche se tourne vers des solutions antibactériennes compatibles avec l'utilisation de biomatériaux. Parmi les stratégies largement explorées aujourd'hui, le dopage ionique par des métaux de transitions semble prometteur. De plus, les substituts osseux synthétiques disponibles présentent une faible capacité à induire la formation de néo-tissu et peuvent même provoquer une réaction inflammatoire néfaste à long terme.

#### 2.1.1 Ions dopants

Comme évoqué dans le Chapitre 1 une apatite est de la forme  $M_{10}(XO_4)_6(Y)_2$ , où M est un cation divalent,  $XO_4$  est un groupement anionique et Y est un groupement anionique. Une des caractéristiques de l'HAp est que chacun de ses groupements ioniques peut être substitué par un autre de même valence, ou même de valence différente. Dans la composition de l'HAp l'ion  $Ca^{2+}$  peut être remplacé totalement ou partiellement par des cations bivalents, mais aussi monovalents et trivalents comme  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ce^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Y^{3+}$ . Les sites  $PO_4^{3-}$  peuvent être substitués par des groupements divalents comme  $SO_4^{2-}$  et  $CO_3^{2-}$ , ou tétravalents comme  $SiO_4^{4-}$  ou  $VO_4^{3-}$ . Enfin le groupement  $OH^-$  peut être substitué par des halogénures comme  $F^-$ ,  $Br^-$  et  $Cl^-$  [71], [79], [80]. Les propriétés thérapeutiques de certains cations ont été étudiées et résumées dans le **Tableau 2-1** complété à partir de [22], [81], [82].

**Tableau 2-1** Cations utilisés comme dopants de l'hydroxyapatite et leurs effets associés

Ions dopants	Effets biologiques
$\text{Cu}^{2+}$	Stimule la production de cellules endothéliales, favorise l'angiogenèse, inhibe la croissance bactérienne et la formation de biofilm, améliore la biocompatibilité
$\text{Zn}^{2+}$	Améliore la bioactivité, stimule l'activité ostéogénique, inhibe la prolifération bactérienne, favorise la prolifération des fibroblastes, réduit l'inflammation
$\text{Sr}^{2+}$	Réduit la cytotoxicité, améliore l'absorption des bioprotéines, favorise l'ostéoconduction
$\text{Mg}^{2+}$	Favorise la croissance osseuse et la prolifération cellulaire, améliore la bioactivité, réduit l'inflammation
$\text{Ag}^+$	Effet antibactérien et antifongique
$\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$	Antioxydant, réduit l'inflammation
$\text{Co}^{2+}$	Stimule l'angiogenèse
$\text{F}^-$	Renforce la minéralisation de l'os

Le projet ANR PIMyBone, finançant la thèse a choisi comme éléments de dopage le cuivre, le zinc et le strontium afin d'allier des propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et de permettre une meilleure intégration grâce à une meilleure vascularisation.

### 2.1.2 Mécanismes

Dans cette section, seuls les mécanismes d'incorporation du strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ ), du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et du zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) dans la structure de l'hydroxyapatite seront abordés. Ces éléments peuvent être introduits dans le réseau cristallin par substitution ionique ou par insertion interstitielle.

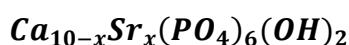
#### ❖ Strontium

Le strontium est incorporé dans l'hydroxyapatite par substitution du calcium au sein du réseau cristallin. Grâce à un rayon ionique (1,18 Å)

## Dopage de l'hydroxyapatite

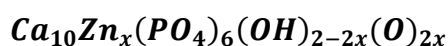
légèrement supérieur à celui du calcium (1,00 Å), le  $\text{Sr}^{2+}$  peut se substituer préférentiellement sur les sites Ca2, moins denses, appartenant au tunnel II (**Figure 2-1**) de l'hydroxyapatite. Cette substitution provoque une augmentation des paramètres de maille. En effet le site Ca1 à une coordination 9 alors que Ca2 une coordination de 7, c'est un polyèdre plus ouvert et donc moins dense. Énergétiquement il est donc plus favorable que le strontium se substitue dans le site Ca2. Malgré cela les deux sites sont tout de même substitués [73].

Les taux de substitutions existants vont de 0 à 100% de substitution par rapport au calcium [83]. La formule chimique de l'hydroxyapatite substituée par le strontium est la suivante :



### ❖ Zinc

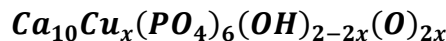
Le zinc, possède un rayon ionique réduit (0,74 Å) et va s'insérer dans la maille dans le site de Wyckoff 2b. Bien que les publications parlent de substitution avec le calcium, comme dans le cas du strontium, le taux semble extrêmement limité  $10^{-2}$  mol% [84]. De plus le taux maximal d'insertion défini par la théorie est que les sites 2b ne peuvent être qu'à moitié remplis. De plus le zinc s'insérant dans la maille, un équilibre de charge doit avoir lieu : ce sont alors les hydroxydes qui se déprotonent afin de conserver une charge totale neutre [85] . La formule générale de l'hydroxyapatite dopée en zinc est :



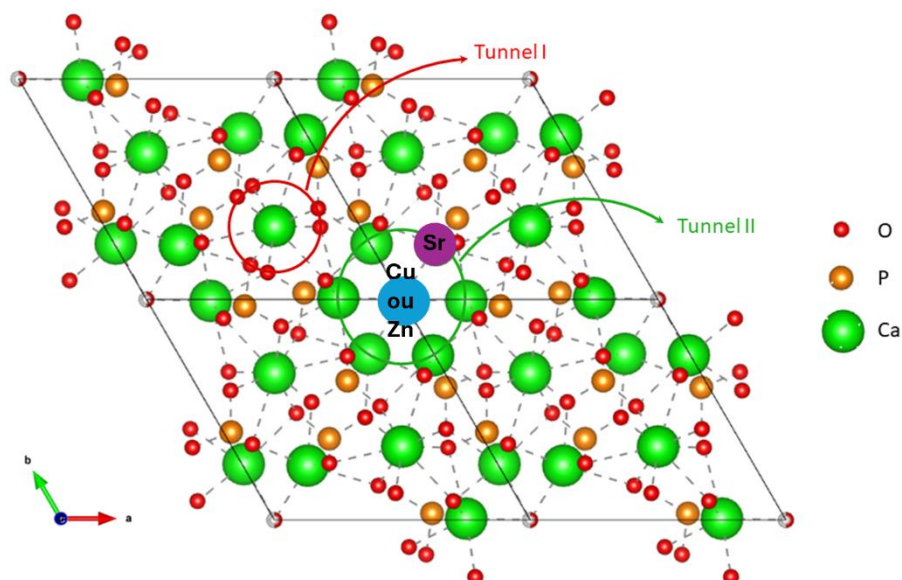
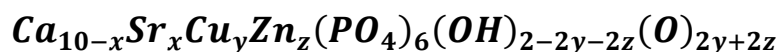
### ❖ Cuivre

Le cuivre, comme le zinc, est incorporé dans la structure de l'hydroxyapatite par l'insertion interstitielle dans les sites de Wyckoff 2b. Lorsque la concentration en cuivre dépasse les capacités d'insertion du réseau, que les conditions de synthèse sont peu favorables (pH acide, température modérée), la création de phases secondaires comme CuO ou bien

l'apparition de deux hydroxyapatites (une pauvre et une riche en cuivre) sont observées [86]. La formule chimique de l'hydroxyapatite dopée par du cuivre est la suivante :



Nous pouvons alors déduire la formule de l'hydroxyapatite dopée multi-éléments :



**Figure 2-1** Structure cristalline de l'hydroxyapatite avec les emplacements des ions dopants.

Les teneurs en dopants choisis dans ce travail se situent dans les intervalles couramment rapportés dans la littérature pour les substitutions cationiques dans l'hydroxyapatite. En effet, plusieurs études montrent que des taux de dopage compris entre 1 et 2 % atomique permettent d'obtenir une incorporation efficace des ions, d'éviter la formation de phases secondaires et d'obtenir des effets biologiques satisfaisants [87]. Par exemple, pour l'hydroxyapatite dopée au zinc, l'étude de Pajchel *et al.* [88] montre qu'à des

## Synthèses des phosphates calciques biphasiques

niveaux de substitution compris entre 0 et 0,6 mol % en  $Zn^{2+}$ , le matériau reste cytocompatible. Au-delà, notamment pour 1,0 mol % ou 1,8 mol % des effets cytotoxiques ont été observés lors de test MTT. Pour ces mêmes matériaux, bien que le relargage global de  $Zn^{2+}$  sur plusieurs semaines soit faible, une libération rapide sur les premiers jours a été mise en évidence. C'est aussi l'observation faite par Höppel *et al.* [89] qui étudie des hydroxyapatites dopées au cuivre. Cette étude montre que seules les cellules exposées à des échantillons dopés à des concentrations inférieures à 1 % en masse présentent une activité métabolique légèrement inférieure à celle des témoins, mais néanmoins supérieure à celle des cellules en contact avec des matériaux contenant des concentrations plus élevées de dopant, pour lesquelles l'activité métabolique est trop faible pour être mesurée. Les études sur les hydroxyapatites dopées au strontium ne mettent pas en évidence une cytotoxicité due aux ions  $Sr^{2+}$  quel que soit le taux de dopage [90].

Ainsi, afin d'éviter la formation de phases secondaires et de garantir des matériaux biocompatibles, nous avons travaillé avec des taux de dopage de 1 et 2 % pour le cuivre et le zinc, et de 2 % pour le strontium.

## 2.2 Synthèses des phosphates calciques biphasiques

La synthèse de céramiques phosphocalciques biphasiques repose sur différentes approches, chacune présentant des spécificités en matière de cristallinité, de morphologie et de contrôle de la phase.

Dans cette section, nous explorerons en détail les principales méthodes de synthèse des BCP, en mettant en évidence leurs avantages, leurs inconvénients et leurs applications potentielles, et enfin les synthèses réalisées au laboratoire pour la suite de l'étude seront présentées.

### 2.2.1 Synthèse par voie solide

La synthèse à l'état solide, aussi appelée mécano-chimie, est considérée comme une méthode simple dans laquelle les précurseurs

## Chapitre 2 : Elaboration des matériaux d'intérêt

chimiques contenant du calcium et du phosphate sont broyés et calcinés pour obtenir l'HAp. Le mécanisme de cette méthode repose sur la diffusion solide des ions à partir des précurseurs chimiques (calcium et phosphate dans ce cas-là), suivie d'un processus à haute température pour initier la réaction. Les températures de réactions peuvent être comprises entre 1000 et 1250°C. Ce procédé implique un long broyage à billes, suivi de phases de séchage, de compression et de frittage. Il peut être nécessaire de répéter certaines étapes afin d'améliorer la cristallinité du produit final et de réduire la taille des particules. Toutefois, la réaction est lente et difficile à être complète, ce qui conduit souvent à l'obtention d'un produit à phases mixtes. De plus, la reproductibilité du procédé est relativement faible [91].

### 2.2.2 Synthèse par voie hydrothermale

La synthèse d'hydroxyapatite par voie hydrothermale consiste à préparer un mélange de précurseurs de calcium ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) et de phosphate ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ), dans un solvant aqueux, puis à soumettre ce mélange à des conditions de température modérée (150-250°C) et de haute pression dans un autoclave. Ces conditions favorisent la formation de cristaux d'hydroxyapatite à température relativement basse, permettant de contrôler la taille, la morphologie et la pureté des particules. Ce procédé a l'avantage de former de l'hydroxyapatite nanocristalline [91].

### 2.2.3 Synthèse par voie sol-gel

La synthèse par voie sol-gel est la synthèse historiquement utilisée au laboratoire, elle a l'avantage de recourir à des températures de maturation plus faible que les méthodes indiquées précédemment (température inférieure à 100°C), mais cette méthode a elle aussi un temps de maturation long. Ce procédé commence par la préparation d'une solution contenant les précurseurs de calcium ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) et de phosphate ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) dissous dans un solvant, souvent de l'eau ou de l'alcool. Par hydrolyse et condensation, les précurseurs forment un réseau tridimensionnel, créant un gel qui est ensuite

## Synthèses des phosphates calciques biphasiques

séché et calciné pour obtenir l'hydroxyapatite cristalline. Le procédé sol-gel permet un contrôle précis de la composition et de la structure des matériaux [86], [92].

### 2.2.4 Synthèse micro-onde

La méthode d'irradiation par micro-ondes est une variante des approches classiques, utilisant principalement les mêmes précurseurs, tels que le nitrate de calcium et le phosphate d'ammonium. Comparée à une synthèse traditionnelle en autoclave, elle permet de réduire significativement le temps de réaction et la température requise [93]. Toutefois, cette technique modifie les propriétés, la texture et la morphologie des matériaux obtenus par rapport à une synthèse hydrothermale conventionnelle.

### 2.2.5 Synthèse par coprécipitation

La coprécipitation est une méthode de synthèse largement utilisée pour l'obtention de matériaux homogènes. Elle consiste à précipiter simultanément les ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ion phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ , par le biais de précurseurs nitrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) et d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ) en solution, en ajustant des paramètres tels que le pH, la température et la concentration des réactifs [94]. Cette technique permet un bon contrôle de la stœchiométrie et une distribution uniforme des éléments, ce qui est particulièrement avantageux pour l'élaboration de matériaux dopés. De plus, elle s'effectue à température ambiante ou modérée, entre 40 et 90°C. Cependant, la taille et la morphologie des particules obtenues dépendent fortement des conditions de précipitation, et des traitements post-synthèse, comme le lavage et la calcination. Le **Tableau 2-2** synthétise les principes, ainsi que les avantages et les inconvénients des différentes méthodes de synthèses.

**Tableau 2-2 Comparaisons des différentes méthodes de synthèse [65], [86], [91], [94], [95].**

Méthode	Principe	Temps (h)	Température (°C)	Avantages	Inconvénients
<b>Voie solide</b>	Co-broyer les précurseurs pour induire des réactions chimiques ou créer des mélanges homogènes à l'échelle nanométrique	>24	1000-1200	Peu d'investissements, absence de solvant	Impact du temps de broyage, difficulté à maîtriser le produit final (taille, nature des particules), long
<b>Voie hydrothermale</b>	Précurseurs en solution aqueuse sous pression et à haute température dans un autoclave	≈ 24	100-300	Permet d'obtenir des phases bien définies avec une structure contrôlée, permet la synthèse de nanopoudres	Équipements spécifiques coûteux et nécessitant des précautions de sécurité en raison de la pression élevée
<b>Voie sol-gel</b>	Précurseurs en solution qui subissent une hydrolyse et une condensation pour former un gel	>24	37-85	Homogénéité chimique élevée, surface spécifique élevée, synthèse à basse température	Précurseurs sensibles à l'humidité, pas de grande quantité produite
<b>Irradiation par micro-onde</b>	Utilisation d'un micro-ondes pour chauffer rapidement un milieu réactionnel	<1	Puissance du micro-onde 200-400 W	Chauffage rapide et homogène, gain de temps, efficacité énergétique, obtention de particules nanométriques	Difficulté de mise en œuvre à grande échelle, risques de surchauffe locale, coût des équipements
<b>Voie par coprécipitation</b>	Précipitation simultanée de plusieurs éléments à partir d'une solution aqueuse en ajustant le pH	1-24	40-90	Bonne homogénéité chimique, Faible coût, synthèse à basse température, applicable à grande échelle	Nécessité d'un contrôle précis du pH, nécessite un lavage intensif, nécessité d'un post-traitement thermique

### 2.2.6 Synthèses réalisées au laboratoire

Les synthèses des différentes poudres d'hydroxyapatite (HAp, HApCu, HapZn, HapSr et HApCuZnSr) ont été réalisées par co-précipitation en voie aqueuse au laboratoire. Le choix de la synthèse par coprécipitation a été fait afin de s'affranchir de la limitation en quantité de matière produite : l'objectif étant de réaliser des implants par procédé PIM, une grande quantité de matière était nécessaire.

## Synthèses des phosphates calciques biphasiques

Ces synthèses consistent à ajouter une solution contenant des ions phosphate dans une solution contenant des ions calcium, avec une température et un pH contrôlés. Les précurseurs utilisés lors de ces synthèses sont le nitrate de calcium tétrahydrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 99 %, Sigma Aldrich) et le phosphate d'ammonium dibasique ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich). Chaque précurseur est mis en solution en milieu aqueux. Pour les hydroxyapatites dopées, les précurseurs sont également sous forme de nitrates : le nitrate de cuivre trihydrate ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99-104 %, Sigma Aldrich), le nitrate de zinc hexahydrate ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich), et enfin le nitrate de strontium ( $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ), 99.995 %, Sigma Aldrich). Ils sont préalablement dissous avec le nitrate de calcium tétrahydrate.

Les quantités de matière utilisées pour préparer  $2 \cdot 10^{-2}$  mol de produit final ainsi que les ratios molaires des réactifs sont regroupés dans le **Tableau 2-3**. La composition nominale a été calculée en supposant l'insertion de cations  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  dans le site cristallographique interstitiel 2b de l'hydroxyapatite et la substitution de  $\text{Ca}^{2+}$  par  $\text{Sr}^{2+}$ . Pour chaque formulation, deux synthèses ont été réalisées.

Les compositions chimiques visées sont :

- ❖ Une hydroxyapatite stœchiométrique notée HAp de formule cible  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .
- ❖ Cinq hydroxyapatites monodopées notées HApCu1, HApZn1, HApCu2, HApZn2, HApSr2 de formules théoriques respectives :  
 $\text{Ca}_{10}\text{Cu}_{0,1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,8}(\text{O})_{0,2}$ ,  $\text{Ca}_{10}\text{Zn}_{0,1}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,8}(\text{O})_{0,2}$ ,  
 $\text{Ca}_{10}\text{Cu}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,6}(\text{O})_{0,4}$ ,  $\text{Ca}_{10}\text{Zn}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,6}(\text{O})_{0,4}$ ,  
 $\text{Ca}_{9,8}\text{Sr}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .
- ❖ Deux hydroxyapatites multidopées notées HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub> et HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> de formules théoriques respectives :  
 $\text{Ca}_{10}\text{Cu}_{0,1}\text{Zn}_{0,1}\text{Sr}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,6}(\text{O})_{0,4}$ ,  
 $\text{Ca}_{10}\text{Cu}_{0,2}\text{Zn}_{0,2}\text{Sr}_{0,2}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{1,2}(\text{O})_{0,8}$ .

**Tableau 2-3** Quantités de matière afin d'obtenir 20 grammes de produit final.

Échantillon	Formule théorique de l'hydroxyapatite visée	n <sub>Ca</sub> (mol)	n <sub>P</sub> (mol)	n <sub>Cu</sub> (mol)	n <sub>Zn</sub> (mol)	n <sub>Sr</sub> (mol)	Cu /Ca	Zn /Ca	(Ca+Sr) /P
HAp	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0,2	0,12	-	-	-	-	-	1,667
HApCu <sub>1</sub>	Ca <sub>10</sub> Cu <sub>0,1</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>1,8</sub> (O) <sub>0,2</sub>	0,2	0,12	0,002	-	-	0,01	-	1,667
HApZn <sub>1</sub>	Ca <sub>10</sub> Zn <sub>0,1</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>1,8</sub> (O) <sub>0,2</sub>	0,2	0,12	-	0,002	-	-	0,01	1,667
HApCu <sub>2</sub>	Ca <sub>10</sub> Cu <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>1,6</sub> (O) <sub>0,4</sub>	0,2	0,12	0,004	-	-	0,02	-	1,667
HApZn <sub>2</sub>	Ca <sub>10</sub> Zn <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>1,6</sub> (O) <sub>0,4</sub>	0,2	0,12	-	0,004	-	-	0,02	1,667
HApSr <sub>2</sub>	Ca <sub>9,8</sub> Sr <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	0,196	0,12	-	-	0,004	-	-	1,667
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	Ca <sub>10</sub> Cu <sub>0,1</sub> Zn <sub>0,1</sub> Sr <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>1,6</sub> (O) <sub>0,4</sub>	0,196	0,12	0,002	0,002	0,004	0,01	0,01	1,667
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	Ca <sub>10</sub> Cu <sub>0,2</sub> Zn <sub>0,2</sub> Sr <sub>0,2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>1,2</sub> (O) <sub>0,8</sub>	0,196	0,12	0,004	0,004	0,004	0,02	0,02	1,667

Le protocole utilisé est le suivant pour la synthèse d'une hydroxyapatite non dopée (cf. **Figure 2-2**):

- Dans un erlenmeyer, dissoudre 47,01 g de Ca(NO<sub>3</sub>)·4H<sub>2</sub>O (CAS No :13477-34-4) dans de l'eau distillée, sous agitation magnétique.
- Dans un autre erlenmeyer, dissoudre 15,77 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (CAS No :7783-28-0 ) dans de l'eau distillée, sous agitation magnétique.
- Après dissolution, verser le contenu des erlenmeyers dans un ballon et porter à reflux (90°C), le pH doit être fixé à 9 à l'aide de NH<sub>4</sub>OH 28% (ajout goutte à goutte pendant les 3h de réaction, et sous agitation à 500 tr.min<sup>-1</sup>).
- Filtrer sur verre fritté (P4).
- Placer la pâte obtenue au congélateur pendant 10h, puis la lyophiliser pendant 24h.
- Broyer manuellement la poudre avant de la placer au four pendant 15h à 800°C avec une montée en température de 4°C/min (Nabertherm LH 30/13)

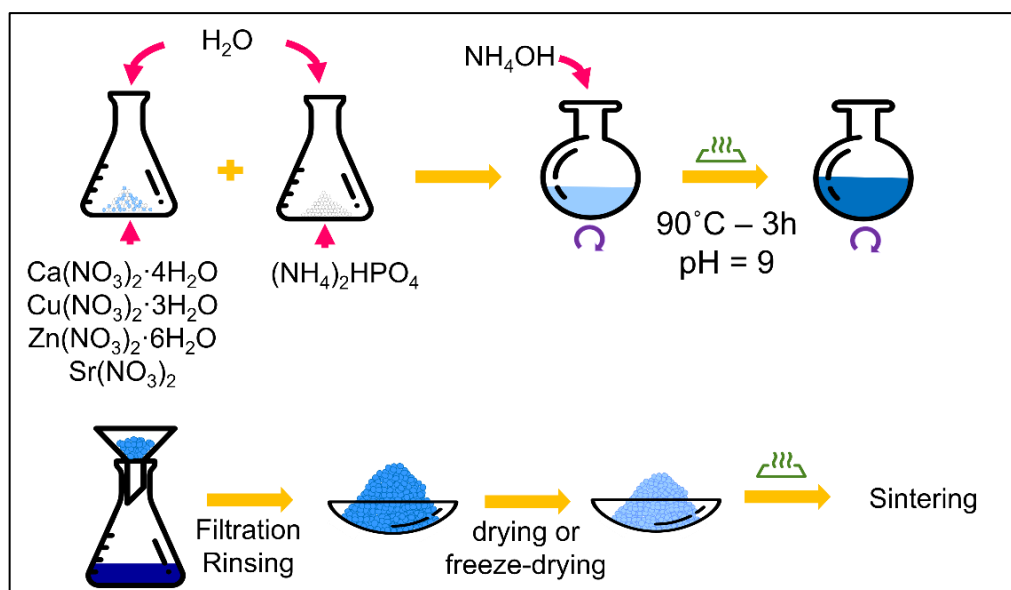


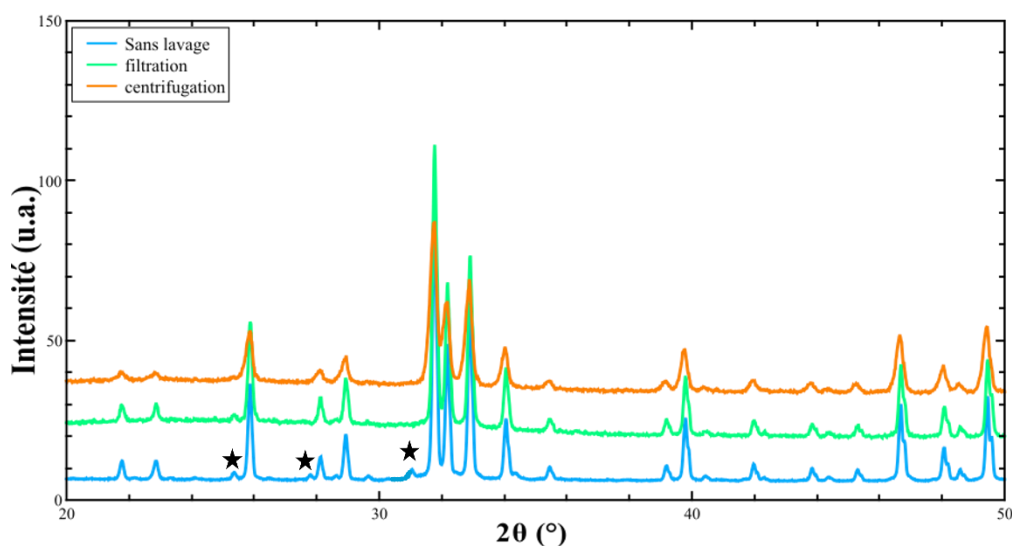
Figure 2-2 Protocole de synthèse des HAP dopées.

### 2.3 Lavage des échantillons

Nous avons dans un premier temps investigué l'éventuelle utilité de laver nos échantillons après synthèse, et cela par deux méthodes de lavage : filtration sous Büchner et séparation par centrifugation. Dans le premier cas, la poudre d'intérêt a tout d'abord été recueillie par filtration, puis lavée 3 fois sous Büchner avec de l'eau à  $80^\circ\text{C}$  avant d'être séchée. Dans le deuxième cas, la poudre recueillie par filtration lors d'une deuxième synthèse a été lavée comme suit : une suspension de 1 g de poudre dans 10 mL d'eau distillée à température ambiante a été centrifugée à 7800 rpm (soit 6461g) pendant 5 min, le surnageant a été retiré, la poudre remise en suspension et le cycle a été répété 3 fois. Enfin une troisième synthèse a été réalisée et la poudre résultante n'a pas été lavée.

Une analyse par diffraction des rayons X a été réalisée sur les 3 poudres après traitement thermique à  $1000^\circ\text{C}$ , afin d'évaluer l'impact des différentes méthodes de lavage sur la cristallinité et la nature des phases formées. La **Figure 2-3** présente les diffractogrammes obtenus pour les poudres lavées sous Büchner, lavées par centrifugation et non lavées. On observe que les échantillons lavés sous Büchner et par centrifugation présentent des

diffractogrammes comparables, caractérisés uniquement par les pics attribuables à la phase hydroxyapatite. De plus l'échantillon lavé par centrifugation montre des pics plus larges et moins intenses, suggérant une cristallinité plus faible (présence de défauts ou cristallites de plus petite taille). L'échantillon n'ayant pas subi de lavage présente des pics issus du phosphate biphasique  $\beta$ -TCP en plus de ceux de l'hydroxyapatite. Au vu de ces analyses, nous avons donc fait le choix de ne pas réaliser de lavage pour la suite des synthèses, afin d'obtenir un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate calcique.



**Figure 2-3** Comparaison des diffractogrammes de rayons X des poudres traitées à 1000 °C, lavées sous Büchner (vert), lavées par centrifugation (orange) et non lavées (bleu). Les pics repérés par une étoile correspondent à la phase cristalline  $\beta$ -TCP (PDF n° 09-0169), tandis que les autres pics sont attribués à la phase cristalline HAp (PDF n° 09-0432).

### 2.4 Traitements thermiques des échantillons

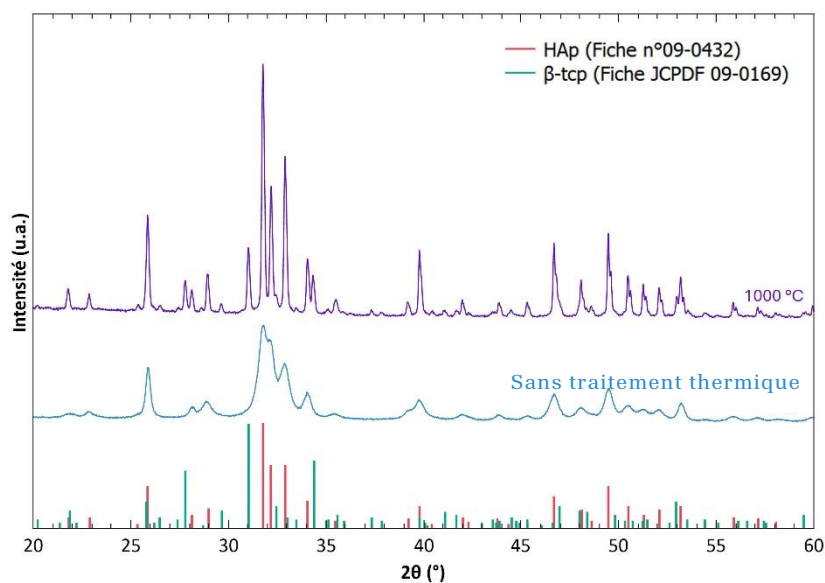
Les poudres synthétisées doivent subir un traitement thermique pour différentes raisons : obtenir une poudre de phosphate biphasique, éliminer les impuretés et résidus de synthèses encore présents et qui donc n'ont pas été éliminés par lavage.

## Traitements thermiques des échantillons

Plusieurs traitements thermiques ont été réalisés dans des fours à moufles avec une montée en température de 5°C/min. Nous avons appliqué des températures allant de 600°C à 1200°C afin d'observer l'apparition des différentes phases et l'influence de la température de traitement sur la morphologie des poudres, dans le but d'anticiper les phases pouvant apparaître lors de la mise en forme par procédé PIM.

### 2.4.1 Formation d'un phosphate biphasique

Lors de la synthèse, une hydroxyapatite déficiente en calcium de formule  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$  avec  $0 < x < 1$  est formée, et ce malgré des quantités initiales de précurseurs introduites dans le réacteur devant mener à une hydroxyapatite stœchiométrique.



**Figure 2-4** Diffractogramme des rayons X d'un échantillon d'hydroxyapatite déficiente en calcium non dopé sans traitement thermique et après recuit à 1000°C.

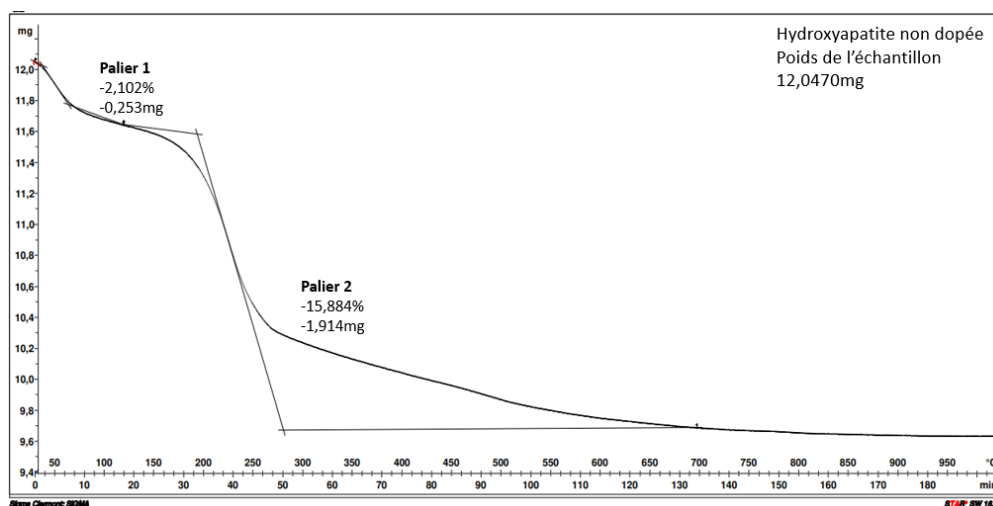
Afin d'obtenir un mélange biphasique d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique, nous faisons subir aux poudres des traitements thermiques. Sur la **Figure 2-4**, le diffractogramme bleu est celui de l'hydroxyapatite déficiente en calcium. On remarque que les pics de diffraction sont larges et peu intenses, ce qui montre une mauvaise cristallinité du système et/ou une faible

taille des cristallites. En revanche les pics identifiables correspondent tous à la fiche de l'hydroxyapatite (pics rouges, fiche JCPDF n°09-0432). Après traitement thermique à 1000°C pendant 15h nous obtenons le diffractogramme violet qui lui présente des pics étroits et intenses assimilés à l'hydroxyapatite (pics rouges, fiche JCPDF n°09-0432), mais aussi des pics fins, mais moins intenses de phosphate tricalcique  $\beta$  (pics verts, fiche JCPDF n°09-0169). Cette figure permet d'illustrer la décomposition de l'hydroxyapatite déficiente en calcium en un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique. Il y a donc formation de phosphate biphasique.

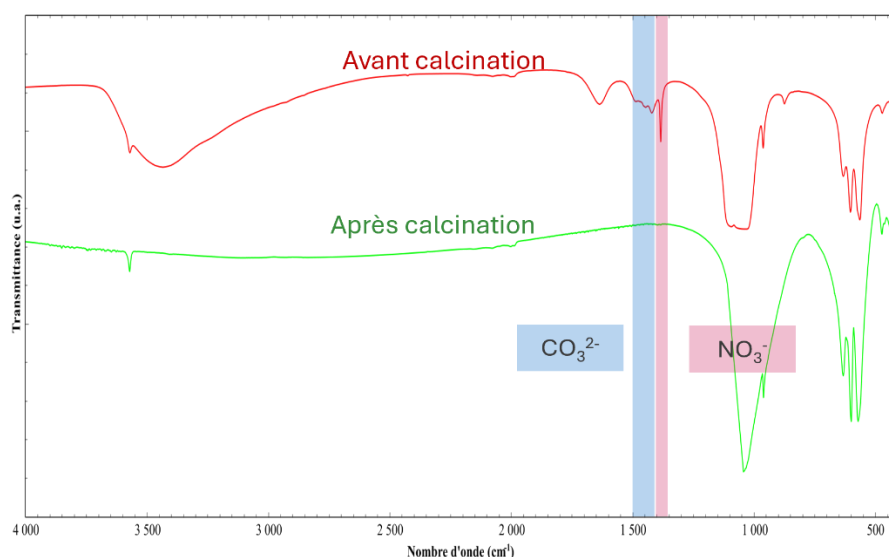
### 2.4.2 Élimination des résidus de synthèse

Les traitements thermiques ont aussi un intérêt pour éliminer des résidus de synthèse comme les nitrates, qui se décomposent entre 200 et 500°C [96]. La **Figure 2-5** est le thermogramme ATG d'un échantillon d'hydroxyapatite déficiente en calcium non dopée subissant une chauffe de 5°C/min sous air, de 25°C à 1000°C. Un premier palier est observé après environ 2% de perte de masse et est attribué à la perte d'eau adsorbée à la surface de l'échantillon. La deuxième perte de masse, d'environ 16%, peut être attribuée à l'élimination de nitrates et de carbonates, comme prouvé par spectroscopie IR d'un échantillon d'hydroxyapatite déficiente en calcium non dopée, avant et après calcination (**Figure 2-6**). En effet, avant calcination, on observe les bandes caractéristiques des nitrates (en bleu) et des carbonates (en rouge) résiduels issus de la synthèse. La présence de nitrates, contre-ions des réactifs, s'explique par l'absence de lavage de la poudre, et celle des carbonates par une synthèse faite sous air, sans dégazage au préalable des solvants. Après calcination, ces bandes disparaissent complètement, indiquant l'élimination des impuretés.

## Traitements thermiques des échantillons



**Figure 2-5** Analyse thermogravimétrique d'un échantillon d'hydroxyapatite déficiente en calcium non dopée, montée en température de 25°C à 1000°C à une vitesse de 5°C/min, sous air.



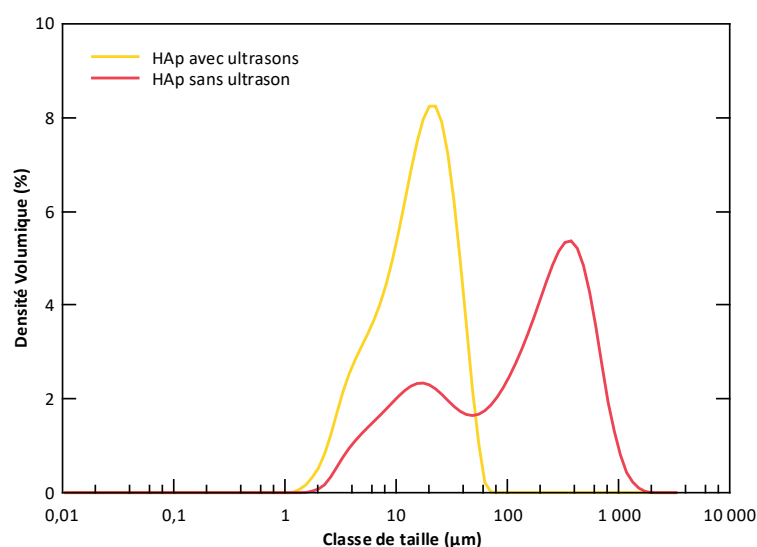
**Figure 2-6** Spectre IR d'un échantillon d'hydroxyapatite déficiente en calcium non dopée (en rouge), du même échantillon calciné à 1000°C.

### 2.4.3 Granulométrie

La granulométrie des échantillons a été analysée à l'aide d'un granulomètre laser Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical), en voie humide. Une étape de broyage a été réalisée en amont de l'analyse afin de contrôler la granulométrie des échantillons. Pour cela nous avons utilisé un broyeur planétaire à bille Retsch PM400, avec des billes de 2 mm de diamètre en zircone. En effet, le cahier des charges de la poudre utilisable pour la mise en

forme par PIM spécifique que la taille moyenne des particules doit être d'environ 20  $\mu\text{m}$  afin de pouvoir réaliser la mise en forme par PIM, d'où la nécessité d'une étape de broyage.

Les mesures ont été effectuées avec et sans application d'ultrasons en amont de la mesure. Comme le montre la **Figure 2-7**, un traitement ultrasonique modifie significativement la courbe de distribution. Sans ultrasons, la distribution présente deux pics dont un centré autour de 200-300  $\mu\text{m}$  et l'utilisation des ultrasons fait disparaître ce dernier. Cela suggère une désagglomération des particules, dont la taille réelle correspondrait au premier pic. Cette étape de dispersion est donc essentielle pour obtenir une représentation plus fidèle de la taille réelle des particules par granulométrie laser.



*Figure 2-7 Distributions volumiques de la taille de particules d'hydroxyapatite, avec et sans l'application d'ultrasons en amont de la mesure.*

## 2.5 Techniques de caractérisation des matériaux

### 2.5.1 Analyse qualitative par diffraction des rayons X

L'analyse des phases cristallines présentes au sein des poudres est réalisée par Diffraction des Rayons X (DRX) à l'aide d'un diffractomètre

Brüker D2 PHASER utilisant la radiation  $K_{\alpha}$  du cuivre ( $CuK_{\alpha}$  1,54056 Å). Les diffractogrammes sont enregistrés dans l'intervalle  $5^{\circ}$ - $120^{\circ}$  en  $2\theta$ , avec un pas de  $0,1^{\circ}$  et un temps de comptage de 1s par pas. Les phases en présence sont identifiées par comparaison des fiches références du fichier International Center for Diffraction Data-Powder Diffraction Files (ICDD-PDF) sur le logiciel DIFFRACT.EVA. Les fiches de références utilisées sont les suivantes : PDF n°09-0432 pour l'hydroxyapatite, PDF n°09-0169 pour le phosphate tricalcique  $\beta$  et enfin PDF n°09-0348 pour Phosphate tricalcique  $\alpha$ .

### 2.5.2 Analyse quantitative des diffractogrammes de rayons X

L'analyse quantitative des diffractogrammes des rayons X, afin de quantifier les différentes phases et affiner leurs paramètres de maille, est réalisée par un affinement de Rietveld à l'aide du logiciel WinPLOTR *via* la suite de programmes FullProf. J'ai réalisé l'ensemble des affinements moi-même, en utilisant la méthode des moindres carrés pour ajuster un modèle théorique de la structure cristalline, en minimisant la différence entre les diffractogrammes expérimental et simulé. En modifiant des paramètres comme les positions atomiques et les paramètres de maille, il permet de déterminer précisément la structure d'un matériau polycristallin et d'extraire des informations sur ses propriétés cristallines [97].

Les paramètres structuraux initiaux pour les deux phases majoritaires sont détaillés dans le **Tableau 2-4** [98], [99]. L'hydroxyapatite cristallise sous le groupe d'espace  $P6_3/m$  et a comme paramètres de maille  $a = b = 9,4218$  Å et  $c = 6,8813$  Å. Il existe 8 positions atomiques indépendantes (2 sites Ca, 1 site P, sites O et 1 site H). La position O4 (combiné avec H4) qui décrit l'anion hydroxyde a un taux d'occupation de  $\frac{1}{2}$  sur le site de Wyckoff 4e et  $Z=2$ , où  $Z$  correspond au nombre de formules unitaires présentes par maille. Le  $\beta$ -TCP cristallise dans le groupe d'espace  $R3c$ ,  $Z = 21$ ,  $a = b = 10,4352$  Å et  $c = 37,4029$  Å. Il y a 18 positions atomiques indépendantes (5 sites Ca, 3 sites P, et 10 sites O). Le site Ca5 présente un taux d'occupation de  $\frac{1}{2}$  afin de vérifier la stœchiométrie du composé. Au fur et à mesure de cycles d'affinement, les

## Chapitre 2 : Elaboration des matériaux d'intérêt

différents paramètres sont libérés. La séquence d'affinement est la suivante : 1. Paramètres de mailles, 2. Décalage du zéro et paramètres de profils, 3. Paramètres atomiques (coordonnées, agitation thermique et taux d'occupation).

*Tableau 2-4 Fiches utilisées comme bases pour les affinements de Rietveld.*

Nom	Formules chimiques	Collection code	Paramètres de mailles (Å ; °)	Volume de la maille (Å <sup>3</sup> )	Groupe d'espace	Références
Hydroxyapatite	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	99358	9,4218(5) 9,4218(5) 6,8813(3) ; 90/90/120	529,02	P 63m	[98]
Phosphate tricalcique β	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	97500	10,4352(2) 10,4352(2) 37,4029(5) ; 90/90/120	3527,26	R 3 c H	[95]
Phosphate tricalcique α	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	923	12,887(2) 12,887(2) 15,219(1) ; 90/126,20(1)/90	4317,52	P 1 21/a 1	[100]

### 2.5.3 Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres infrarouges des poudres sont enregistrés en transmission à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier Perkin Elmer, Spectrum Two. Les analyses dans la gamme de longueur d'onde allant de 4000 à 400 cm<sup>-1</sup>, une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> avec une accumulation de 32 scans. Pour réaliser le spectre FT-IR l'échantillon est préparé en le diluant à 1% massique dans du Bromure de potassium (KBr, IR grade). Les pastilles pèsent 200mg et sont réalisées à l'aide d'un moule à pastille de 13 mm de diamètre.

### 2.5.4 Analyse Chimique

L'analyse chimique élémentaire des échantillons ainsi que le dosage des ions relargués dans le milieu de culture sont réalisés par MP-AES (Microwave Plasma – Atomic Emission Spectroscopy) avec un appareil Agilent 4200. Les longueurs d'onde de travail pour le calcium, le phosphore, le cuivre, le zinc et le strontium sont respectivement de 616,217 nm, 214,915 nm, 324,754 nm, 213,857 nm et 407,771 nm.

#### ❖ Analyse des poudres

Les échantillons sous forme de poudres sont analysés par dissolution de 16,2 mg d'échantillon dans 100 mL de solution d'acide nitrique à 5% massique. Une gamme étalon est réalisée à partir de solutions normadosées d'ions calcium, phosphore, cuivre, zinc et strontium à 1000 µg/mL (Agilent Technologies) diluées dans la même solution d'acide nitrique que celle des échantillons.

#### ❖ Analyses des ions relargués

La mesure de la concentration des ions cuivre, zinc et strontium est réalisée à partir de solutions de milieu de culture diluées au 1/3 dans une solution d'acide nitrique à 5% massique. La gamme étalon est réalisée à partir de solutions normadosées d'ions cuivre, zinc, strontium à 1000 µg/mL diluées dans une solution de milieu de culture dilué au 1/3 dans une solution d'HNO<sub>3</sub> à 5%.

### 2.5.5 Imagerie

La morphologie et la texture des poudres et échantillons mis en forme sont mises en évidence par microscopie électronique à balayage (MEB) et tomographie à rayon X.

### ❖ Microscopie électronique à balayage

L'appareil utilisé est un MEB Hirox SH-3500MB. Les échantillons sont préparés de la façon suivante : de la poudre libre est déposée sur un morceau d'adhésif à base de carbone, lui-même collé sur un porte-échantillon métallique. Les échantillons sont ensuite métallisés durant 30 secondes par pulvérisation cathodique d'or. L'imagerie est réalisée à plusieurs grossissements, avec une tension de 10kV.

Couplée à l'imagerie du MEB, une analyse semi-quantitative des éléments est réalisée grâce à une sonde EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). Les quantifications ainsi que les cartographies sont réalisées *via* le logiciel ESPRIT (Bruckers). Les quantifications sont faites après une accumulation de 100 000 coups, et les cartographies après une accumulation de 10 min. Bien que les échantillons aient été métallisés en amont de l'analyse, la couche d'or n'est pas prise en compte dans le traitement des résultats EDS.

### ❖ Tomographie à rayon X

Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'un tomographe modèle Easytom Nano (RX-Solutions). La source à rayon X est une cathode en hexaborure de lanthane ( $\text{LaB}_6$ ) et la cible est en tungstène. Une tension à la cathode de 100 kV et un courant de cible de 50  $\mu\text{A}$  sont utilisés. Une acquisition représente l'accumulation de 1120 images acquises sur une rotation complète de l'échantillon (soit une image tous les  $0.32^\circ$ ), avec une résolution de 4,0 micromètres par pixel. La reconstruction des images est effectuée à l'aide du logiciel du constructeur du tomographe XAct. Les données sont traitées avec le logiciel IPSDK (Reactiv'IP) pour le traitement du bruit et les mesures de volumes, et Tomviz pour la représentation en 3 dimensions.

#### 2.5.6 Mesures de surface spécifique

La surface spécifique des poudres est déterminée par sorptométrie d'azote (micrométrics Tristar II PLUS) après dégazage sous vide à  $200^\circ\text{C}$

pendant 12h. L'isotherme représentant le volume de  $N_2$  adsorbé en fonction de la pression relative  $P/P^0$  permet de retrouver la valeur de surface spécifique  $S_{BET}$  par la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET).

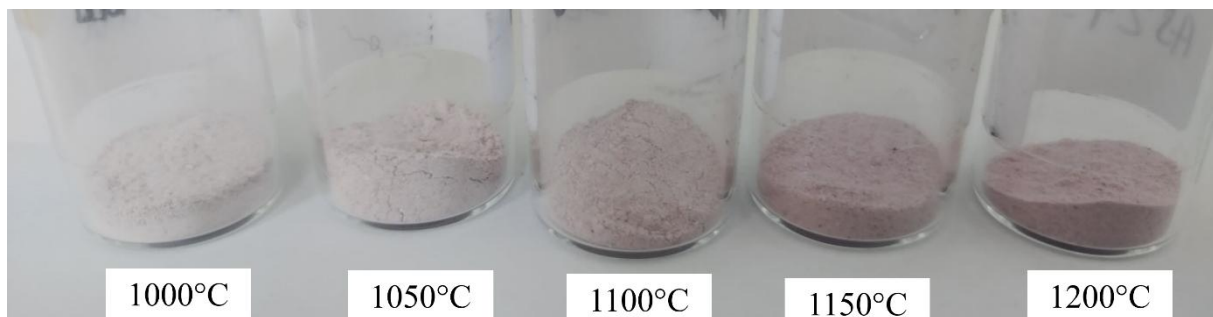
## ✻ Chapitre 3 ✻

---

### Propriétés physico-chimiques des céramiques

<b>3.1</b>	<b>Analyse chimique des compositions finales .....</b>	<b>66</b>
<b>3.2</b>	<b>Caractérisations structurales.....</b>	<b>70</b>
3.2.1	Diffraction des rayons X .....	70
3.2.2	Caractérisation par spectroscopie Infrarouge .....	82
<b>3.3</b>	<b>Morphologie et composition locale .....</b>	<b>84</b>
3.3.1	Microscopie électronique à balayage .....	85
3.3.2	Analyse EDS - cartographie chimique .....	87
<b>3.4</b>	<b>Surface spécifique et porosité .....</b>	<b>91</b>
<b>3.5</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>92</b>

La synthèse des différentes céramiques a été réalisée suivant le protocole énoncé dans le \* Chapitre 2 \* et calcinées aux différentes températures citées. Nous pouvons observer les différentes teintes de l'échantillon  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$  à différents traitements thermiques sur la **Figure 3-1**. La couleur des céramiques est liée au dopage en cuivre (rouge), en effet les autres éléments maintiennent la couleur originale des phosphates biphasiques soit le blanc. Cette couleur rouge/rose, plutôt que la teinte bleue attendue pour des espèces contenant du cuivre, pourrait suggérer la présence potentielle d'oxyde de cuivre (I) ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), connu pour ses nuances rouges à brun rosé [101], Toutefois, les caractérisations réalisées dans la suite du chapitre n'ont mis en évidence aucune phase secondaire en lien avec cette coloration, et aucune conclusion ne peut être tirée à ce stade. Cette observation reste donc hypothétique et mériterait des investigations complémentaires ciblées afin d'en préciser l'origine.



**Figure 3-1** Poudres de phosphates de calcium dopés au cuivre, zinc et strontium ayant subi différents traitements thermiques ;  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$ -T.

### 3.1 Analyse chimique des compositions finales

L'analyse chimique élémentaire des échantillons est réalisée par spectroscopie d'émission atomique. Dans notre cas, ce n'est pas vraiment la concentration de chaque élément que nous souhaitons connaître, mais le rapport élément dopant sur calcium. Les échantillons analysés sont les échantillons traités à 1000°C.

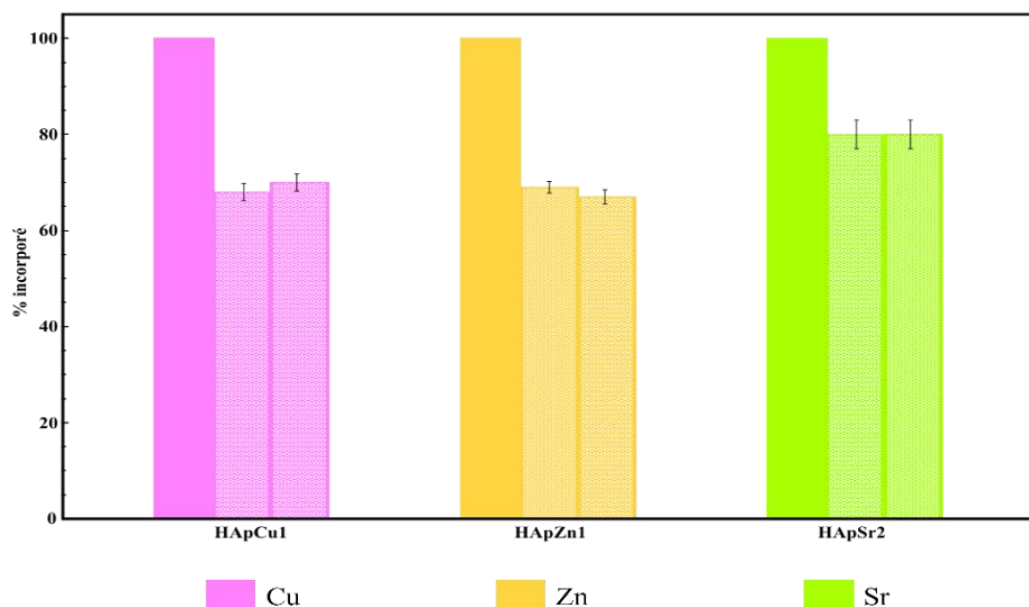
**Tableau 3-1** Ratio nominal et mesuré entre les dopants et le calcium pour différents échantillons de céramique mono- et multi-dopés, mesurés par MP-AES.

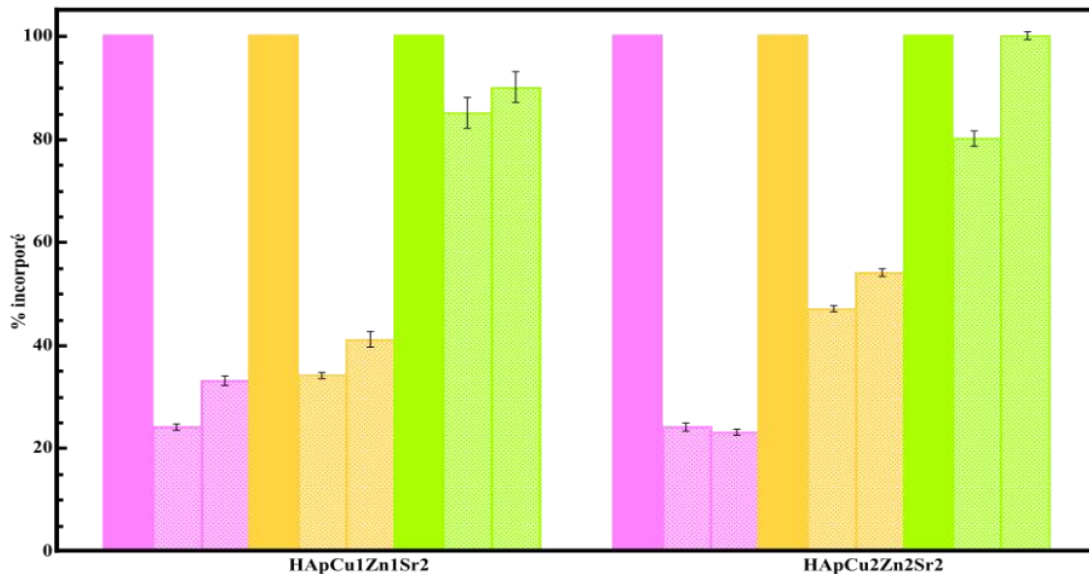
	Cu/Ca nominal	Zn/Ca nominal	Sr/Ca nominal	Cu/Ca mesuré	Zn/Ca mesuré	Sr/Ca Mesuré
HApCu <sub>1</sub>	0,01			0,0068 ± 0,0006		
HApZn <sub>1</sub>		0,01			0,0069 ± 0,0004	
HApCu <sub>2</sub>	0,02			0,014 ± 0,001		
HApZn <sub>2</sub>		0,02			0,0097 ± 0,0011	
HApSr <sub>2</sub>			0,02			0,016 ± 0,001
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	0,01	0,01	0,02	0,0024 ± 0,0002	0,0034 ± 0,0002	0,017 ± 0,001
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	0,02	0,02	0,02	0,0048 ± 0,0003	0,0094 ± 0,0004	0,016 ± 0,001

Le comparatif entre les rapports atomiques Cu/Ca, Zn/Ca et Sr/Ca attendus (nominaux) et ceux obtenus expérimentalement (mesurés) (**Tableau 3-1**) révèle une sous-incorporation systématique des éléments dopants dans les matériaux synthétisés. Pour les échantillons monodopés en cuivre, les rapports Cu/Ca mesurés sont inférieurs aux valeurs nominales : 0,0068 ± 0,0006 pour HApCu<sub>1</sub>-1000 contre 0,01 attendu, et 0,014 ± 0,001 pour HApCu<sub>2</sub>-1000 contre 0,02, soit environ 70% d'incorporation. Une tendance similaire est observée pour le zinc, avec des valeurs mesurées de 0,0069 ± 0,0004 pour HApZn<sub>1</sub> et 0,0097 ± 0,0011 pour HApZn<sub>2</sub>-1000, qui correspondent à 70% et 50% des valeurs nominales de 0,01 et 0,02 respectivement. Pour le strontium, le rapport mesuré dans HApSr<sub>2</sub>-1000 de 0,016 ± 0,001 reste légèrement en dessous de la valeur cible de 0,02. Malgré tout, cela représente 80% d'incorporation. Dans les échantillons multidopés, cette sous-incorporation est encore plus marquée. Dans HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1000, les rapports mesurés sont de 0,0024 ± 0,0002 et 0,0034 ± 0,0002, soit 14% et 34% d'incorporation pour le cuivre et zinc respectivement. L'échantillon HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1000 présente une situation similaire avec des valeurs mesurées de 0,0048 ± 0,0003 et 0,0094 ± 0,0004, soit 25% et 50% pour les mêmes éléments. Seul le strontium ne présente aucun changement lors des synthèses de dopage multiéléments comparativement au monodopage.

Plusieurs synthèses avec les mêmes taux de dopage ont été réalisées afin de connaître et vérifier la reproductibilité de ces résultats. C'est le cas des céramiques HApCu<sub>1</sub>-1000, HApZn<sub>1</sub>-1000, HApSr<sub>2</sub>-1000, HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1000 et HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1000. En effet, même lorsque les conditions expérimentales sont contrôlées, des variations peuvent survenir au niveau de la composition chimique finale, et dans notre cas en particulier, lors de l'incorporation des éléments dopants. Ces écarts peuvent avoir un impact significatif sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des céramiques obtenues. Il est donc crucial de vérifier que notre procédé de synthèse permet d'obtenir des matériaux présentant une composition chimique stable, particulièrement dans une perspective d'optimisation et de mise à l'échelle du procédé.

La comparaison des résultats est présentée dans la **Figure 3-2**. De manière générale, les deux répliquats montrent des valeurs très proches, et ce dans toutes les synthèses. Bien que le nombre de répliquats soit limité à deux dans le cas de la thèse, les résultats montrent une bonne cohérence entre les échantillons, suggérant une bonne reproductibilité de la synthèse. On remarque toutefois une reproductibilité un peu moindre dans le cas des composés multidopés.





*Figure 3-2 Comparaisons des rapports molaires visés (couleurs vives) et des valeurs mesurées pour deux répliquats indépendants (couleurs claires) de différentes céramiques dopées.*

Ces résultats confirment la présence des éléments dopant dans nos échantillons mais reste inférieure aux valeurs nominales, en particulier pour le cuivre et le zinc dans les systèmes multidopés. Cette sous-incorporation peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'introduction de cations substituants nécessite des ajustements dans le réseau pour maintenir la neutralité électrique, réduisant ainsi la quantité totale d'ions incorporés [85]. De plus dans les systèmes multidopés, des effets compétitifs peuvent également se produire : l'incorporation simultanée de  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  dans les mêmes sites interstitiels de l'hydroxyapatite peut diminuer la quantité totale d'ions incorporés [102]. Enfin, les conditions de synthèse influencent également l'incorporation, par exemple lorsque les ions  $\text{Cu}^{2+}$  interagissent avec l'ammoniaque pour former un complexe, l'ion tetrammine cuivre (II) ( $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ ), limitant leur intégration dans le réseau apatite.

L'analyse chimique a permis de confirmer une incorporation des éléments dopants dans les différentes céramiques, tout en montrant une relativement bonne reproductibilité entre les synthèses. Toutefois, la seule composition chimique ne permet pas de prédire les éventuelles modifications

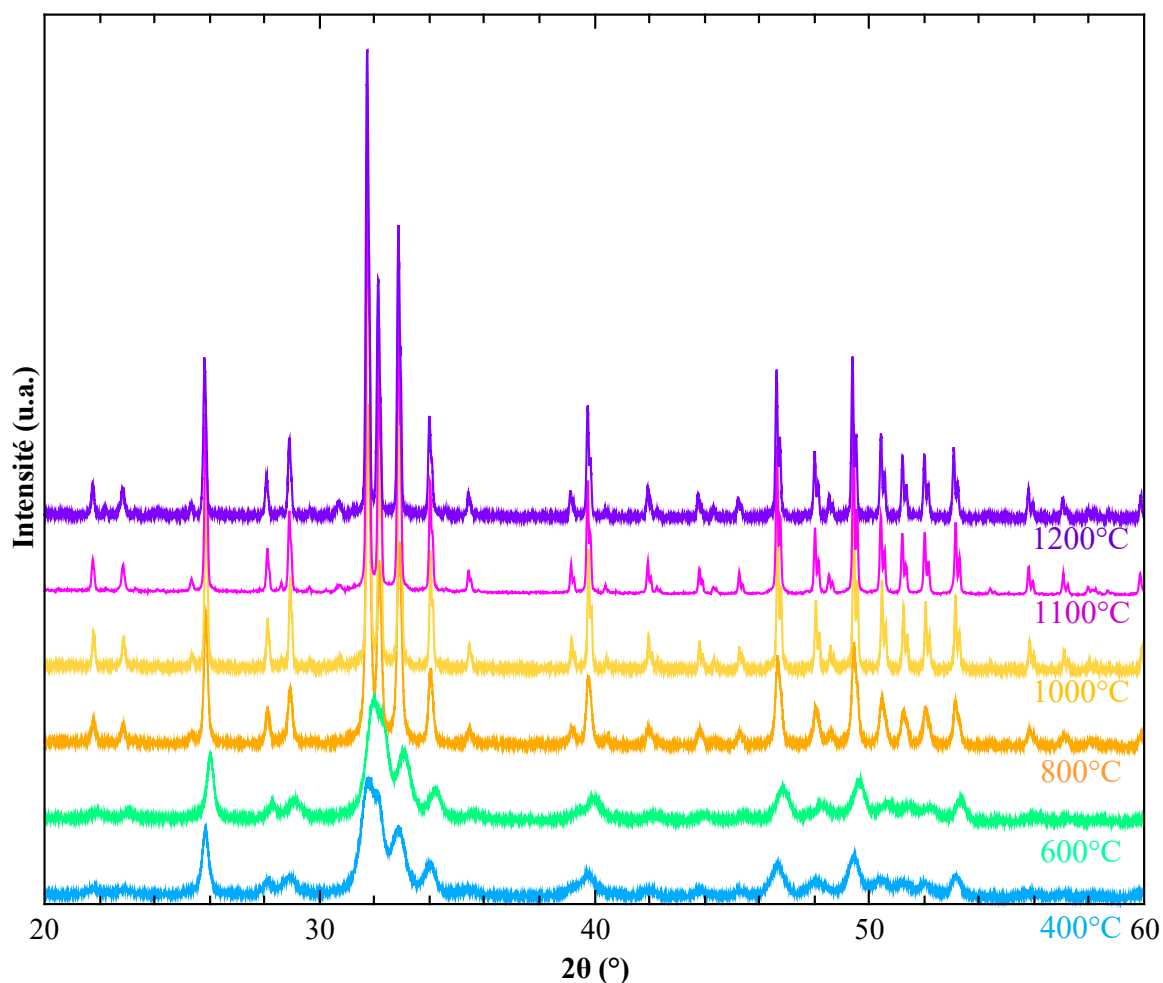
structurales induites par le dopage. Ainsi, une caractérisation structurale approfondie s'avère nécessaire afin d'identifier les phases cristallines formées, d'évaluer la stabilité du réseau apatite, et de mieux comprendre l'influence des conditions de traitement thermique sur la formation de phases secondaires.

## 3.2 Caractérisations structurales

### 3.2.1 Diffraction des rayons X

#### ❖ Évolution de la cristallinité des céramiques

L'analyse des diffractogrammes de rayons X a été réalisée pour chaque céramique traitée à différentes températures. En superposant différents diffractogrammes, on observe une évolution de la cristallinité des échantillons. En effet, plus on augmente la température de recuit, plus les pics de diffraction deviennent fins et intenses. Cette évolution traduit un meilleur ordre à grande distance dans le matériau. À basse température, les pics sont plus larges et moins marqués, ce qui reflète une cristallisation partielle associée à des cristallites de faible dimension et la présence probable de contraintes internes [103]. La phase observable à faible température dans le cas de l'étude est une hydroxyapatite sous-stœchiométrique de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_2$ . L'augmentation de la température favorise la diffusion des éléments et le relâchement des contraintes, conduisant à une meilleure organisation à l'échelle atomique.



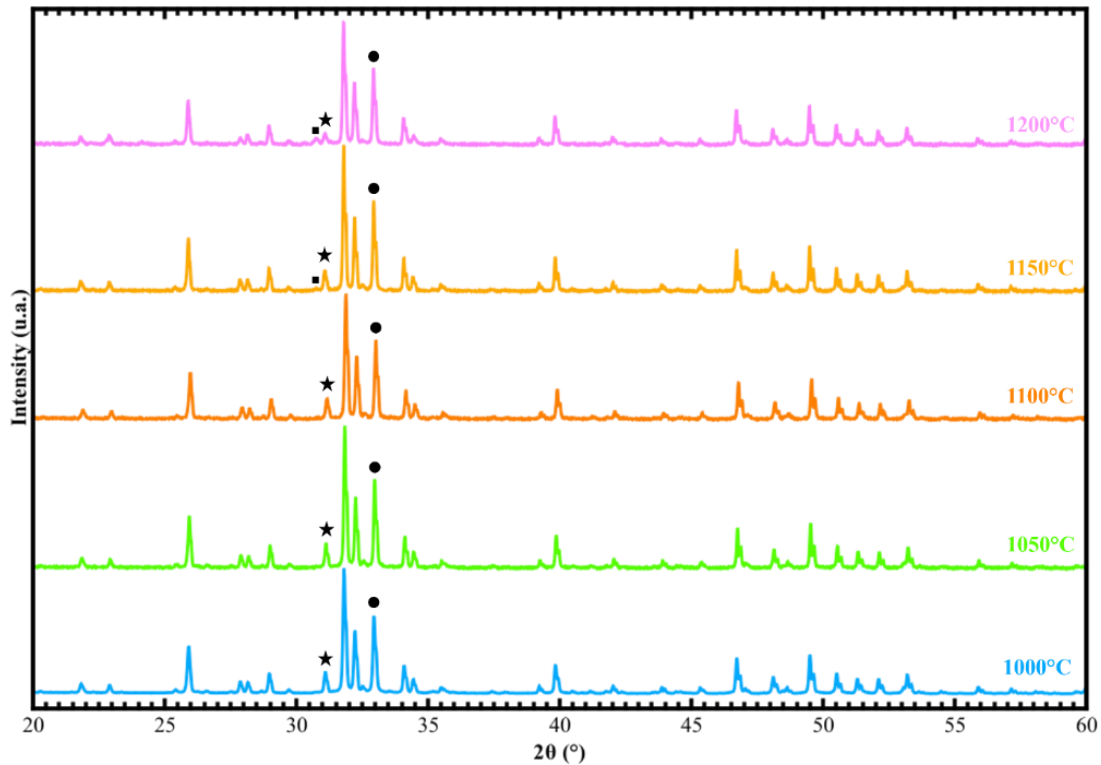
**Figure 3-3** Évolutions de la cristallinité de l'échantillon HApCu1Zn1Sr2 en fonction de la température de recuit.

❖ Analyse des différentes phases

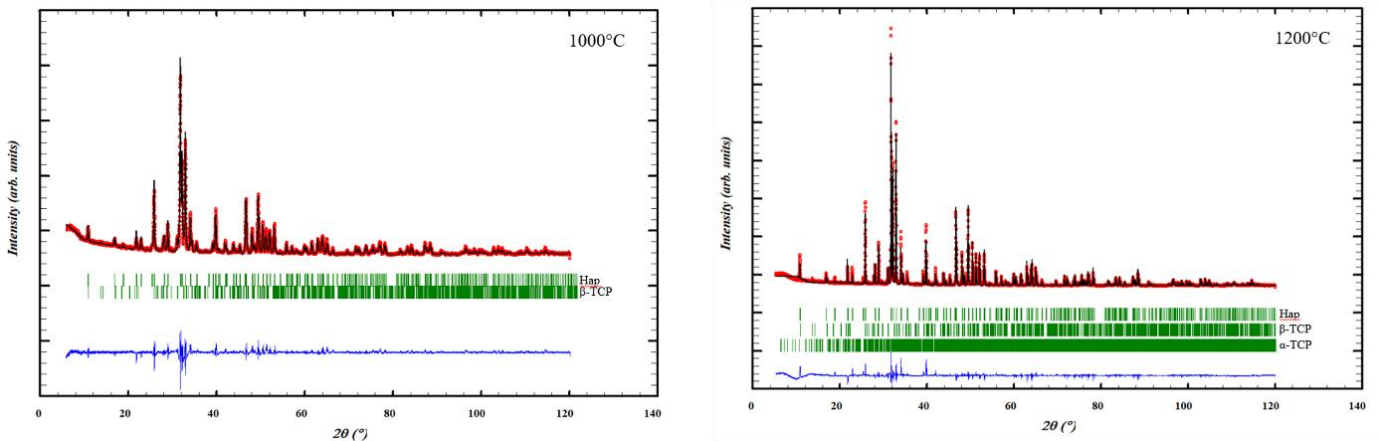
À la suite de l'étude de l'évolution de la cristallinité des matériaux, une étude thermique comparative des phases a été menée, afin de déterminer l'influence de la température de frittage sur la formation des différentes phases cristallines. La plage de température étudiée est de 1000°C à 1200°C par palier de 50°C. Le comportement des céramiques est identique, quel que

soit le dopage. La **Figure 3-4** permet d'identifier les phases cristallines présentes dans l'échantillon  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$  à titre d'exemple.

a.



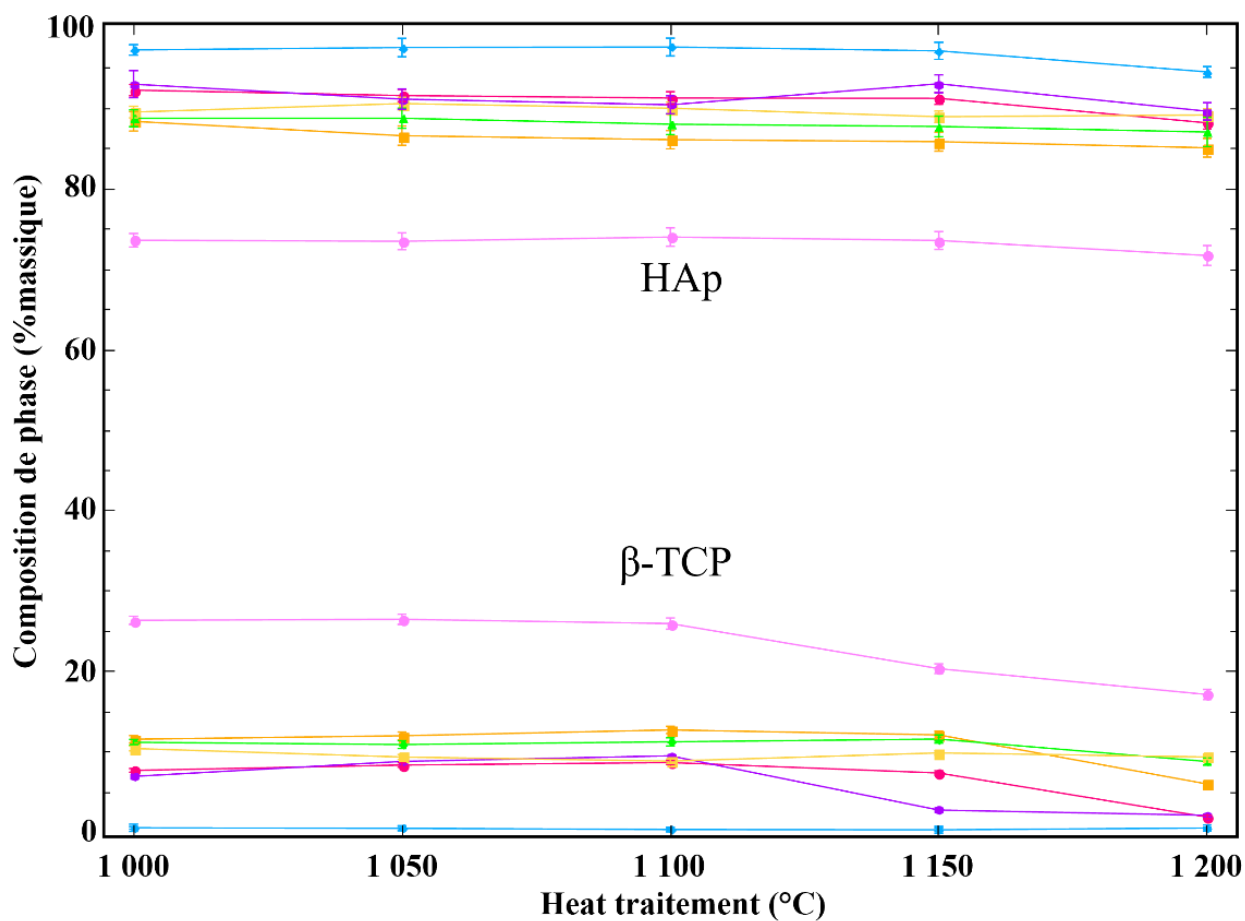
b.



**Figure 3-4 a.** Diffractogrammes des échantillons de  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$  aux différentes températures de frittage et identification des phases cristallines présentes. Les pics les plus intenses des phases en présence sont indiqués : HAp (•),  $\beta$ -TCP (★) et  $\alpha$ -TCP (■). **b.** Affinements Rietveld des matériaux calcinés à 1000°C et 1200°C. Les points rouges représentent les données expérimentales, les lignes noires correspondent aux diffractogrammes simulés, les lignes bleues traduisent la courbe de différence entre l'expérimentation et la modélisation, et les traits verts indiquent les positions des pics de diffraction des différentes phases présentes.

Les échantillons sont principalement composés d'hydroxyapatite, mais ne sont jamais monophasés. On note la présence de  $\beta$ -TCP à toutes des températures, et ce pour chaque échantillon, bien que sa proportion varie en fonction de l'échantillon. À partir de 1100°C sa proportion a tendance à diminuer et nous observons l'apparition de  $\alpha$ -TCP. Nous supposons donc que la phase  $\beta$  du tricalcium phosphate se transforme en phase  $\alpha$ . Il est important de noter qu'aucune phase calcique secondaire indésirable telle que l'oxyde de calcium (CaO) ou le carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) n'a été observée, pas plus que de phases distinctes à base de cuivre, de zinc ou de strontium, ce qui suppose, si on exclut la possibilité de phases amorphes, que l'ensemble des ions dopants présents dans les échantillons se trouve dans les phosphates de calcium.

L'analyse quantitative, réalisée par affinement Rietveld sur l'ensemble des échantillons, donnant les proportions de phases de chaque échantillon, est présentée dans la **Figure 3-5** et dans le **Tableau 3-2**. Elle révèle que l'hydroxyapatite reste prédominante dans tous les échantillons, représentant 70 % de la composition cristalline pour l'échantillon HApCu<sub>1</sub> et plus de 85% dans les autres. Le  $\beta$ -TCP est visible à toutes les températures, sauf dans l'échantillon HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub> où il est tout de même présent à une teneur très faible (< 1%). La phase  $\alpha$ -TCP apparaît à des températures variables : dès 1050 °C pour HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>, et à partir de 1100 °C pour la majorité des autres compositions.



**Figure 3-5** Proportion des deux phases majoritaires (HAp et  $\beta$ -TCP) en fonction de la température de calcination de l'ensemble des céramiques mono- et multi-dopées. HApCu<sub>1</sub>(ronds rose clair), HApCu<sub>2</sub>(ronds rose foncé), HApZn<sub>1</sub>(carrés jaunes), HApZn<sub>2</sub>(carrés oranges), HApSr<sub>2</sub>(triangles verts), HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>(losanges bleus) et HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>(hexagones violets).

**Tableau 3-2 Résultats de l'analyse quantitative (%massique) extraits des affinements Rietveld des échantillons des céramiques mono- et multi-dopées. L'écart-type est indiqué entre parenthèses.**

Echantillon	Composition (wt%)						Rf-factor HAp/ $\beta$ -TCP/ $\alpha$ -TCP
	HAp		$\beta$ -TCP		$\alpha$ -TCP		
<b>HapCu<sub>1</sub>-1000</b>	73,6	(0,84)	26,4	(0,51)	-	-	5,65 / 7,12 / -
<b>HapCu<sub>1</sub>-1050</b>	73,5	(1,05)	26,5	(0,63)	-	-	4,54, / 6,84 / -
<b>HapCu<sub>1</sub>-1100</b>	74	(1,14)	26	(0,69)	-	-	6,89 / 11 / -
<b>HapCu<sub>1</sub>-1150</b>	73,6	(1,11)	20,4	(0,6)	6,04	(0,51)	4,22 / 5,78 / 8,61
<b>HapCu<sub>1</sub>-1200</b>	71,7	(1,23)	17,1	(0,63)	11,1	(0,88)	4,46 / 6,52 / 8,51
<b>HapZn<sub>1</sub>-1000</b>	88,4	(1,2)	11,6	(0,45)	-	-	3,84 / 6,77 / -
<b>HapZn<sub>1</sub>-1050</b>	86,6	(1,2)	12	(0,48)	1,36	(0,42)	4,37 / 9,35 / 16,5
<b>HapZn<sub>1</sub>-1100</b>	86,2	(1,14)	12,7	(0,45)	1,12	(0,39)	4,28 / 8,42 / 16,3
<b>HapZn<sub>1</sub>-1150</b>	85,9	(1,17)	12,1	(0,48)	2	(0,36)	4,23 / 9,51 / 16,2
<b>HapZn<sub>1</sub>-1200</b>	85,1	(1,17)	6	(0,39)	8,86	(0,51)	4,15 / 8,65 / 10,2
<b>HapCu<sub>2</sub>-1000</b>	92,3	(0,69)	7,69	(0,24)	-	-	5,16 / 13,7 / -
<b>HapCu<sub>2</sub>-1050</b>	91,6	(0,75)	8,36	(0,27)	-	-	5,70 / 14, 5 / -
<b>HapCu<sub>2</sub>-1100</b>	91,3	(0,78)	8,67	(0,27)	-	-	5,66 / 17,5 / -
<b>HapCu<sub>2</sub>-1150</b>	91,3	0,79)	7,37	(0,27)	1,34	(0,27)	5,18 / 11,3 / 18,4
<b>HapCu<sub>2</sub>-1200</b>	88,2	(0,78)	1,89	(0,21)	9,87	(0,36)	5,59 / 13,1 / 13,4
<b>HapZn<sub>2</sub>-1000</b>	89,6	(0,72)	10,4	(0,3)	-	-	4,21 / 7,00 / -
<b>HapZn<sub>2</sub>-1050</b>	90,6	(0,78)	9,36	(0,3)	-	-	5,19 / 12,6 / -
<b>HapZn<sub>2</sub>-1100</b>	90,1	(0,75)	8,85	(0,27)	1,09	(0,3)	6,14 / 12,6 / 20,4
<b>HapZn<sub>2</sub>-1150</b>	89	(0,72)	9,87	(0,27)	1,13	(0,3)	4,83 / 9,04 / 15,2
<b>HapZn<sub>2</sub>-1200</b>	89,2	(0,78)	9,36	(0,3)	1,41	(0,33)	4,88 / 10,1 / 15,2
<b>HapSr<sub>2</sub>-1000</b>	88,8	(1,05)	11,2	(0,36)	-	-	4,95 / 10,3 / -
<b>HapSr<sub>2</sub>-1050</b>	88,8	(1,26)	10,9	(0,48)	0,67	(0,45)	5,05 / 10,3 / 19,4
<b>HapSr<sub>2</sub>-1100</b>	88,1	(1,29)	11,3	(0,51)	0,69	(0,48)	4,90 / 10,3 / 20,1
<b>HapSr<sub>2</sub>-1150</b>	87,8	(1,29)	11,6	(0,51)	0,62	(0,48)	4,67 / 9,97 / 18,6
<b>HapSr<sub>2</sub>-1200</b>	87,1	(1,83)	8,8	(0,45)	4,1	0,48)	4,74 / 9, 81 / 14,5
<b>HapCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1000</b>	97,3	(0,66)	0,56	(0,15)	2,14	(0,21)	4,66 / 22 / 21,5
<b>HapCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1050</b>	97,6	(1,14)	0,49	(0,24)	1,9	(0,39)	13,3 / 18,1 / 27,5
<b>HapCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1100</b>	97,7	(1,11)	0,34	(0,21)	1,98	(0,39)	5,48 / 12,9 / 26,3
<b>HapCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1150</b>	97,2	(1,05)	0,3	(0,21)	2,5	(0,3)	7,07 / 13,8 / 29,2
<b>HapCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>-1200</b>	94,6	(0,66)	0,53	(0,15)	4,89	(0,24)	4,75 / 16,2 / 16,2
<b>HapCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1000</b>	93,1	(1,68)	6,95	(0,45)	-	-	4,43 / 7,70 / -
<b>HapCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1050</b>	91,2	(1,26)	8,81	(0,33)	-	-	8,92 / 22,1 / -
<b>HapCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1100</b>	90,5	(1,11)	9,51	(0,3)	-	-	5,73 / 14,4 / -
<b>HapCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1150</b>	93,1	(1,11)	2,76	(0,42)	2,76	(0,42)	5,97 / 20,2 / 24,1
<b>HapCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>-1200</b>	89,7	(1,08)	2,11	(0,39)	2,21	(0,45)	7,66 / 18,7 / 27,8

Les valeurs de Rf-factor obtenues lors de l'affinement Rietveld montrent un bon ajustement pour la phase majoritaire HAp, avec des Rf faibles (~ 5 %), indiquant que le modèle structural de cette phase reproduit correctement les

intensités diffractées. En revanche, les phases minoritaires  $\beta$ -TCP et  $\alpha$ -TCP présentent des Rf plus élevés mais inférieur à 30% tout de même. Cette augmentation s'explique principalement par la faible contribution de ces phases au signal diffracté et par le chevauchement des pics avec la phase majoritaire HAp, qui rend la séparation des intensités plus difficile. Bien que les Rf de ces phases soient plus élevés, les fractions massiques et la structure globale restent fiables.

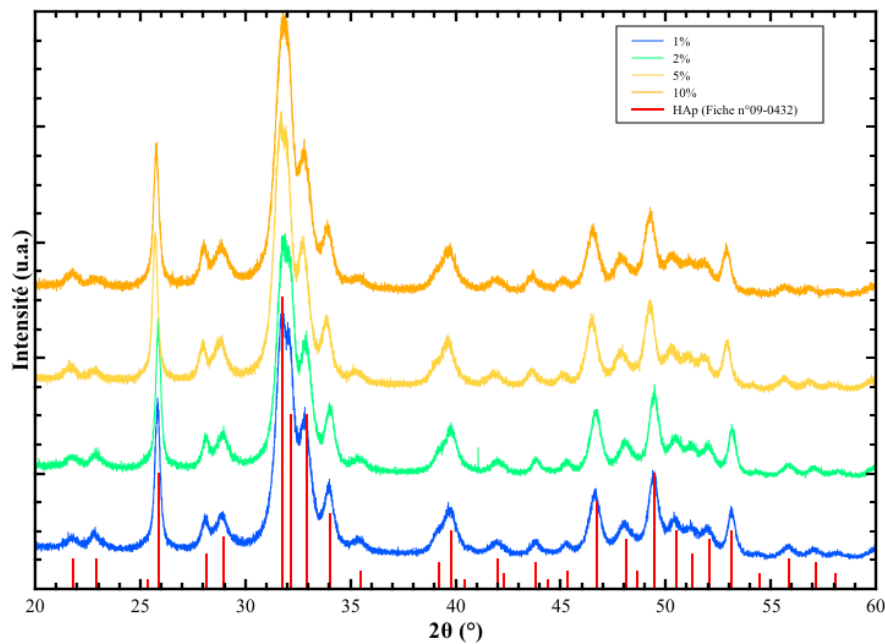
La présence de phases secondaires telles que le  $\beta$ -TCP ou l' $\alpha$ -TCP, bien que minoritaires, peut avoir un impact significatif sur les propriétés biologiques des céramiques. Loin d'être nocives, ces phases peuvent au contraire s'avérer bénéfiques. En particulier, le  $\beta$ -TCP est connu pour sa résorbabilité plus rapide que celle de l'hydroxyapatite [78], favorisant ainsi la libération d'ions calcium et phosphate *in situ*, ce qui permettrait de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques. Par ailleurs, si des ions dopants sont intégrés dans le réseau cristallin du  $\beta$ -TCP, leur libération en milieu biologique pourrait être accélérée, renforçant ainsi les effets biologiques recherchés.

De plus, la formation progressive de la phase  $\alpha$ -TCP à plus haute température est cohérente avec les transitions de phase classiques observées dans les systèmes à base de phosphates de calcium. Bien que l' $\alpha$ -TCP soit thermodynamiquement moins stable à température ambiante, elle présente une cinétique de dissolution encore plus rapide que celle du  $\beta$ -TCP. Or, une dissolution trop rapide n'est pas toujours souhaitable, car elle peut compromettre la stabilité du matériau dans le temps. Il est donc préférable de limiter la formation de cette phase lors du traitement thermique.

#### ❖ Modification du paramètre de maille – loi de Vegard

Lors de l'étude du dopage de l'hydroxyapatite, plusieurs synthèses ont été réalisées avec des taux de substitution en strontium de 1 %, 2 %, 5 % et 10 %, dans le but d'évaluer l'application éventuelle de la loi de Vegard. Le

strontium se substituant aux atomes de calcium, il va donc se créer une solution solide de substitution, qui suit la loi de Vegard qui est une relation empirique qui décrit comment la paramètre de maille d'un cristal varie en fonction de sa composition chimique lorsqu'on forme une solution solide entre deux composés.

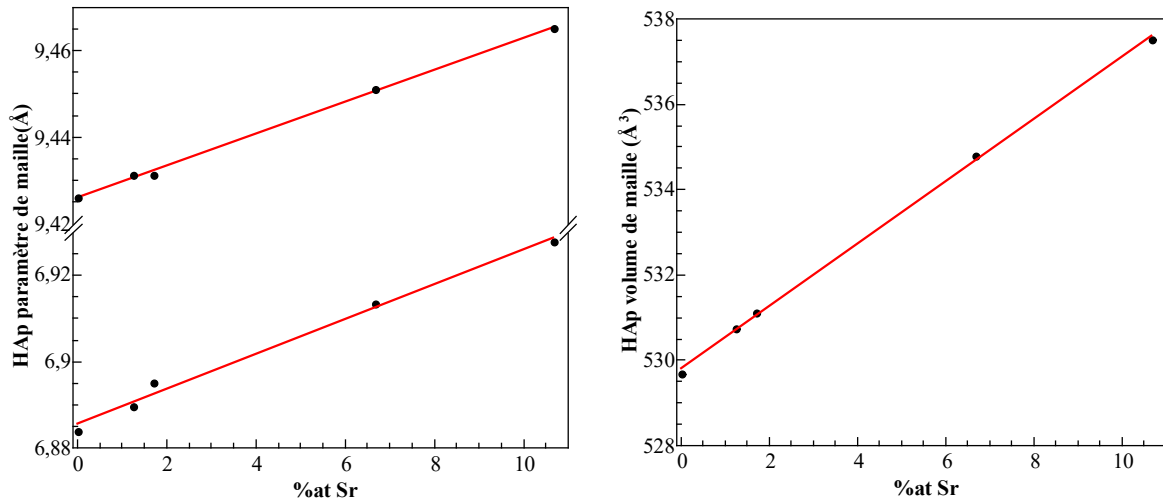


*Figure 3-6* Diffractogramme des rayons X des échantillons dopés au strontium, traité à 800°C

Les affinements de Rietveld ont été effectués pour les échantillons calcinés à 800 °C, composés uniquement d'hydroxyapatite déficiente. Ainsi, il est possible de considérer que la totalité des ions strontium soient présents dans la phase apatitique, et de relier le taux de dopage aux paramètres de maille ainsi qu'au volume unitaire de la maille déterminés avec l'affinement.

Les paramètres de maille de chaque échantillon est tracé sur la **Figure 3-7** et ont été tracés en fonction des teneurs réelles en strontium (%at Sr) déterminées par MP-AES, et non selon les proportions théoriquement introduites. Une augmentation progressive et linéaire des paramètres de maille  $a$  et  $c$ , ainsi que du volume unitaire sont observés en fonction de la teneur en Sr. Cette dilatation du réseau cristallin est cohérente avec le

remplacement de  $\text{Ca}^{2+}$  par un cation de plus grand rayon ionique,  $\text{Sr}^{2+}$  ( $r(\text{Ca}^{2+}) = 100 \text{ pm} < r(\text{Sr}^{2+}) = 119 \text{ pm}$ ). Le caractère linéaire de cette évolution suggère une incorporation homogène et régulière du  $\text{Sr}^{2+}$  dans la structure cristalline via une solution solide, en accord avec la loi de Vegard.



**Figure 3-7** Évolution linéaire des paramètres de maille de la phase HAp : a. Evolution des paramètres a et c, et b. Evolution du volume de maille.

❖ Localisation du strontium dans la structure de l'HAp

Dans le \* Chapitre 2 \*, nous avons parlé le site de substitution du strontium par rapport au calcium. En effet le site cristallographique Ca2 est celui présentant le plus d'espace, c'est donc préférentiellement dans ce dernier que la substitution aura lieu [73]. Le **Tableau 3-3** regroupe l'ensemble des données (ratio Sr/Ca obtenue par spectroscopie d'émission atomique, par affinement de Rietveld ainsi que les taux d'occupation des sites de Wyckoff 4f et 6h) sur les échantillons contenant du strontium, traités à différentes températures. La **Figure 3-8** illustre l'évolution des pourcentages d'occupation des sites cristallographiques Ca1 et Ca2, attribués respectivement aux positions de Wyckoff 4f et 6h, pour les différentes compositions, en fonction de la température de recuit.

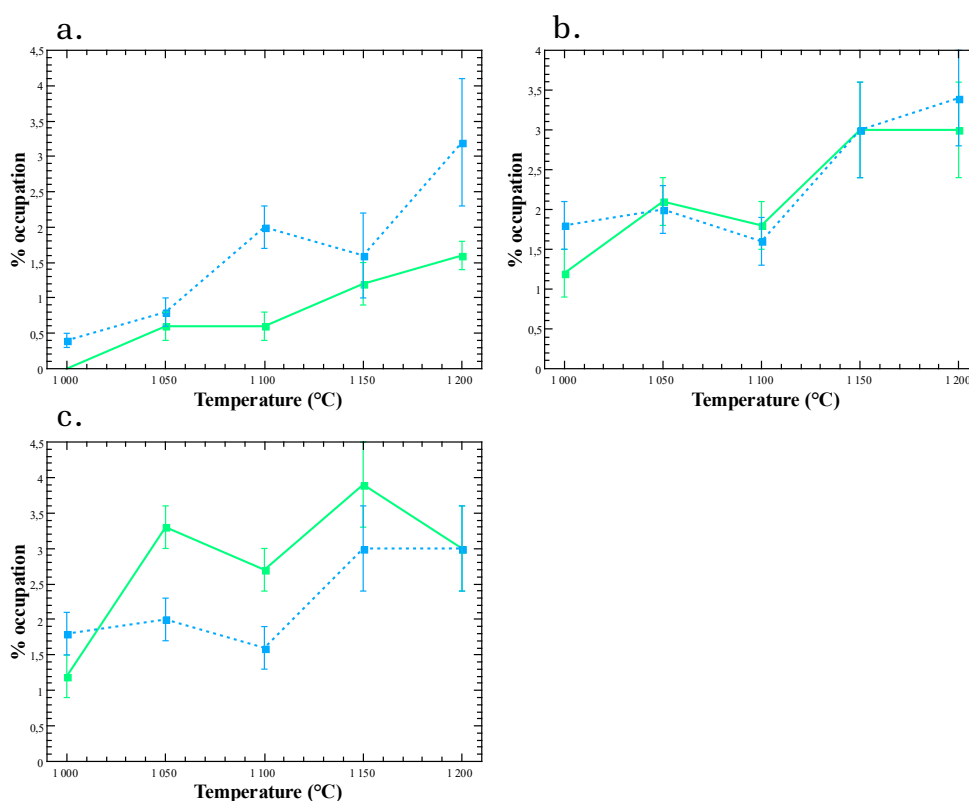
Pour l'échantillon HApSr<sub>2</sub>, nous observons que les données obtenues sont cohérentes avec ce qui a été largement rapporté dans la littérature. La courbe bleue en ligne pointillée, correspondant au site Ca<sub>2</sub>, reste systématiquement au-dessus de celle du site Ca<sub>1</sub> sur l'ensemble de la gamme de température. Cela indique que la position Ca<sub>2</sub> est préférentiellement substituée dans ce système.

Dans le cas de HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>, les courbes associées à Ca<sub>1</sub> et Ca<sub>2</sub> présentent des profils similaires, avec des valeurs d'occupation proches pour l'ensemble des températures de recuit étudiées. Cette observation suggère une répartition plus homogène des substituants entre les deux sites cristallographiques. Cela pourrait s'expliquer par la co-incorporation des ions Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> sur le site de Wyckoff 2b, positionné au centre du tunnel formé par les ions Ca<sup>2+</sup> occupant le site 6h (Ca<sub>2</sub>) [85], [104], qui induit une réorganisation de l'environnement local. En effet, l'introduction simultanée de ces deux cations, aux rayons ioniques et aux préférences de coordination distincts [105], perturberait la géométrie du tunnel et modifierait les interactions au sein du réseau, contribuant ainsi à une égale répartition des ions strontium dans les 2 sites du calcium de la maille d'hydroxyapatite.

À l'inverse, la composition HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> présente un comportement totalement différent. Ici, la courbe verte en ligne pleine représentant Ca<sub>1</sub> se situe au-dessus de la courbe bleue associée à Ca<sub>2</sub>, indiquant une préférence marquée pour la substitution au niveau du site Ca<sub>1</sub>. Cette inversion de préférence de site pourrait résulter d'une concentration globale en éléments dopants plus élevée, et, comme pour l'échantillon HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>, de perturbations locales liées aux variations de taille ionique, de coordination et aux interactions compétitives entre les cations incorporés.

**Tableau 3-3** Comparaison des rapports Sr/Ca mesurés et affinés, ainsi que la distribution des ions strontium sur les deux sites du calcium dans la maille d'hydroxyapatite. L'écart-type est indiqué entre parenthèses.

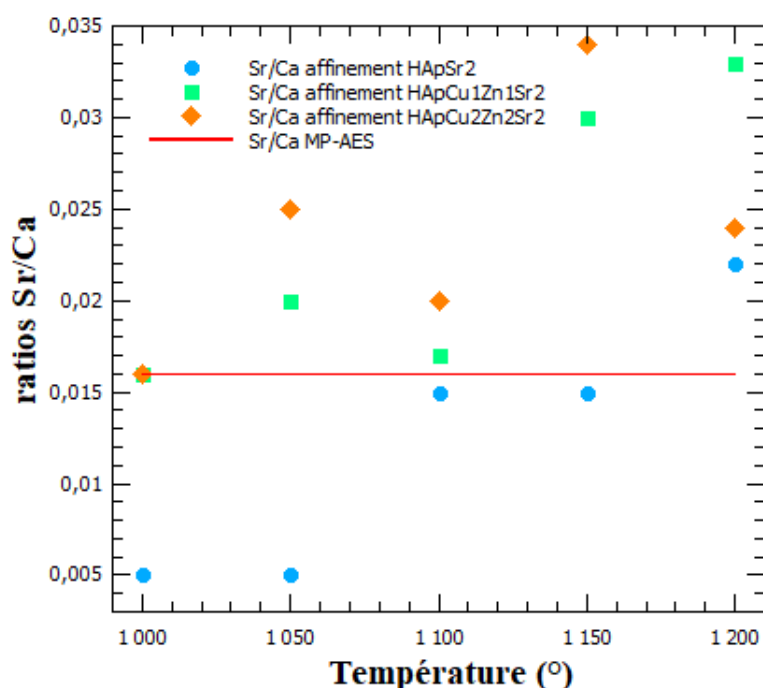
Échantillon	Sr/Ca MP-AES	Sr/Ca Affinement	Distribution	
			Ca1	Ca2
HApSr <sub>2</sub> -1000		0,005	0	<b>0,4 (0,1)</b>
HApSr <sub>2</sub> -1050		0,005	0,6 (0,2)	<b>0,8 (0,2)</b>
HApSr <sub>2</sub> -1100	0,016	0,015	0,6 (0,2)	<b>2,0 (0,3)</b>
HApSr <sub>2</sub> -1150		0,015	1,2 (0,3)	<b>1,6 (0,6)</b>
HApSr <sub>2</sub> -1200		0,022	0,6 (0,2)	<b>3,2 (0,9)</b>
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub> -1000		0,016	1,2 (0,3)	<b>1,8 (0,3)</b>
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub> -1050		0,02	2,1 (0,3)	<b>2 (0,3)</b>
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub> -1100	0,017	0,017	1,8 (0,3)	<b>1,6 (0,3)</b>
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub> -1150		0,03	3 (0,6)	<b>3 (0,6)</b>
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub> -1200		0,33	3 (0,6)	<b>3,4 (0,6)</b>
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> -1000		0,016	1,2 (0,3)	<b>1,8 (0,3)</b>
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> -1050		0,025	<b>3,3 (0,3)</b>	2,0 (0,3)
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> -1100	0,017	0,02	<b>2,7 (0,3)</b>	1,6 (0,3)
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> -1150		0,034	<b>3,9 (0,6)</b>	3,0 (0,6)
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> -1200		0,024	<b>3,0 (0,6)</b>	3,0 (0,6)



**Figure 3-8** Variations thermiques des taux d'occupation du calcium dans l'HAp pour le site Ca1 attribué au site de Wyckoff 4f (en vert) et pour le site Ca2

attribué au site de Wyckoff 6h (en bleu) : a.  $\text{HApSr}_2$ , b.  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$  et c.  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$ .

Le **Tableau 3-3** présente également le taux de strontium mesuré par MP-AES, déterminé pour les échantillons calcinés à 1000°C, et rendant compte des éléments présents dans l'échantillon en sa globalité. Il est important de mentionner qu'avec cette analyse, il est impossible de savoir dans quelle phase les ions strontium se trouvent et s'ils sont adsorbés en surface ou insérés dans les mailles cristallines. L'affinement de Rietveld quant à lui permet de quantifier les différents ions et déterminer leurs emplacements. On va donc comparer les résultats obtenus par les deux méthodes (**Figure 3-9**).



**Figure 3-9** Ratios Sr/Ca de différents échantillons obtenus par affinement de Rietveld, en fonction de leur température de recuit, et ratio mesuré par spectroscopie d'émission atomique

Pour l'échantillon  $\text{HApSr}_2$  (cercles bleus), le rapport Sr/Ca reste inférieur à la valeur mesurée par MP-AES (trait rouge) pour la plupart des températures, bien qu'une augmentation soit observée lorsque la température augmente, ce qui suggère une incorporation progressive du strontium au sein de l'hydroxyapatite.

En revanche, les deux échantillons multidopés présentent des comportements différents. Les compositions HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub> (carrés verts) et HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> (losanges orange) ont des rapports Sr/Ca supérieurs à la valeur de référence obtenue par MP-AES, et ce même aux températures les plus basses. Cela pourrait s'expliquer, au moins en partie, par la présence d'une phase secondaire riche en calcium non dopée.

### 3.3 Caractérisation par spectroscopie Infrarouge

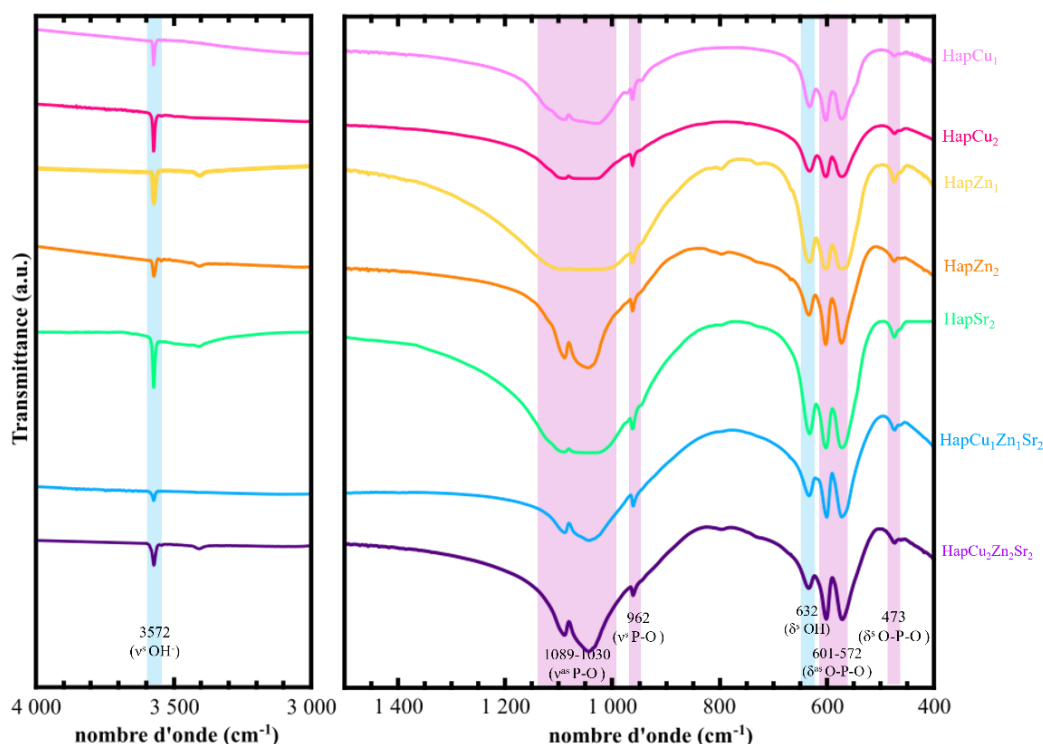
Afin de compléter l'analyse structurale des poudres synthétisées, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été réalisée. Cette technique permet d'identifier les principales fonctions chimiques présentes au sein du matériau, notamment les groupes phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) et hydroxyde (OH<sup>-</sup>), mais aussi vérifier l'absence de groupements nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), comme précurseurs ou réaction parasite de la synthèse.

Les nombres d'onde des pics observés dans les spectres FT-IR des échantillons sont rapportés dans le **Tableau 3-4**, ainsi que l'attribution aux modes de vibrations correspondants. Les spectres FT-IR montrent les pics caractéristiques de l'hydroxyapatite dans la **Figure 3-10**. La plage 3000–1500 cm<sup>-1</sup> n'est pas présentée, car aucun pic n'y a été observé. La bande vers 3572 cm<sup>-1</sup> attribuable aux ions hydroxydes (OH<sup>-</sup>) structuraux correspond à la vibration d'élongation symétrique (ν<sup>s</sup>) des OH<sup>-</sup>, tandis que la bande autour de 631 cm<sup>-1</sup> est assignée à leur vibration de déformation (δ). Ces pics confirment la présence des groupes hydroxydes intégrés au réseau cristallin de l'HAp. Pour les groupements phosphate (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), plusieurs bandes sont observées : les vibrations d'élongation antisymétrique (ν<sup>as</sup>) apparaissent entre 1089 et 1030 cm<sup>-1</sup>, alors que la vibration d'élongation symétrique (ν<sup>s</sup>) est détectée vers 962 cm<sup>-1</sup>. Les bandes situées à 601 cm<sup>-1</sup> et 572 cm<sup>-1</sup> sont liées aux vibrations de déformation antisymétrique (δ<sup>as</sup>) des liaisons O–P–O, et celle autour de

473  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration de déformation symétrique ( $\delta^s$ ) de ce même groupement.

**Tableau 3-4** Nombres d'onde FT-IR et attributions des bandes observées dans les différents échantillons mono- et multi-dopés [104], [106], [107], [108].

Assignment	Bandes observées							Définition
	HApCu1	HApCu2	HApZn1	HApZn2	HApSr2	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	
$\nu^s$ OH <sup>-</sup>	3572	3572	3570	3572	3572	3572	3571	Élongation symétrique des ions OH <sup>-</sup> structuraux
$\nu^{as}$ P-O	1089, 1030	1089, 1039	1090, 1030	1089, 1046	1089, 1030	1089	1089, 1044	Élongation antisymétrique du groupement PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\nu^s$ P-O	962	962	962	962	962	961	961	Élongation symétrique du groupement PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
$\delta^s$ OH	631	632	632	633	632	632	633	Déformation des ions OH <sup>-</sup> structuraux
$\delta^{as}$ O-P-O	601, 572	601, 572	601, 572	601, 572	601, 572	600, 571	601, 571	Déformation antisymétrique du groupement O-P-O
$\delta^s$ O-P-O	473	473	473	474	473	473	473	Déformation symétrique du groupement O-P-O



**Figure 3-10** Spectres FT-IR des céramiques dopées et non dopées (en bleu les bandes correspondant aux OH<sup>-</sup> et en violet les bandes correspondant aux groupements PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

L'analyse des spectres infrarouges montre que l'ensemble des échantillons, qu'ils soient mono- ou multi-dopés, présentent des bandes de vibration localisées aux mêmes nombres d'ondes, traduisant une conservation des modes vibrationnels caractéristiques de l'hydroxyapatite. Aucune nouvelle bande ni déplacement significatif n'a été observé. On note l'absence de pics aux nombres d'onde 820-1380  $\text{cm}^{-1}$  montrant l'absence de nitrates résiduels et à 1640-1530  $\text{cm}^{-1}$  montrant l'absence de carbonate. Seules des variations d'intensité des pics sont observées, ce qui peut s'expliquer par des différences de concentration ou d'environnement local des groupements fonctionnels. Cette stabilité spectrale est en accord avec le mode d'incorporation des cations  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , qui entrent dans la structure sur un site interstitiel. Concernant le strontium, bien qu'il se substitue au calcium, cela ne modifie pas le spectre infrarouge.

### **3.4 Morphologie et composition locale**

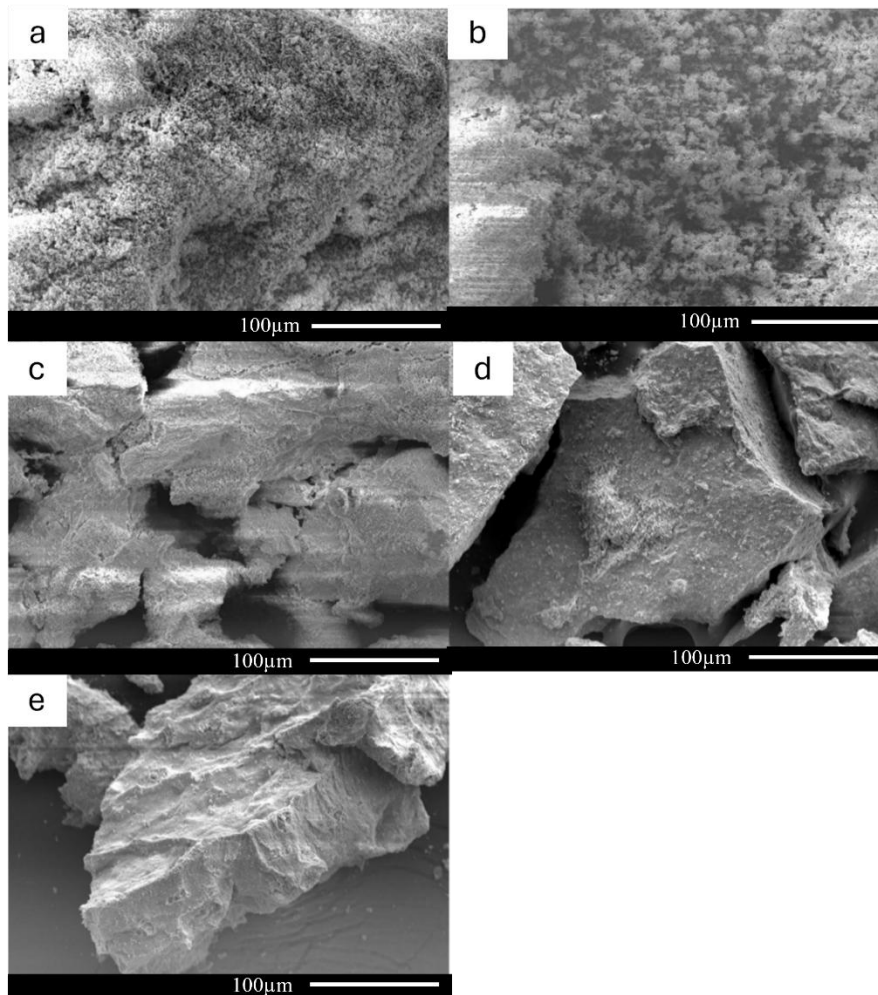
La morphologie des poudres d'hydroxyapatite dopées a été étudiée par microscopie électronique à balayage (MEB). Cette analyse permet d'observer la taille, la forme et l'état d'agglomération des particules issues de la précipitation et après différents traitements thermiques. Il est important de noter que les observations MEB présentées ci-après concernent des poudres libres, non mises en forme. Par conséquent, la morphologie observée n'a pas d'incidence directe sur les propriétés mécaniques ou structurales des matériaux finaux. Toutefois, elle peut influencer des aspects tels que la surface spécifique ou la réactivité en milieu biologique, notamment pour les essais de relargage ionique ou de cytotoxicité, qui sont eux aussi réalisés sur des poudres libres. Des analyses complémentaires sur des poudres mises en forme seront présentées dans une autre partie de ce manuscrit.

Des analyses par spectroscopie à dispersion d'énergie des rayons X (EDS) ont aussi été réalisées afin de confirmer la présence et la distribution locale des éléments dopants dans les différents échantillons.

### 3.4.1 Microscopie électronique à balayage

#### ❖ Échantillons mono-dopés

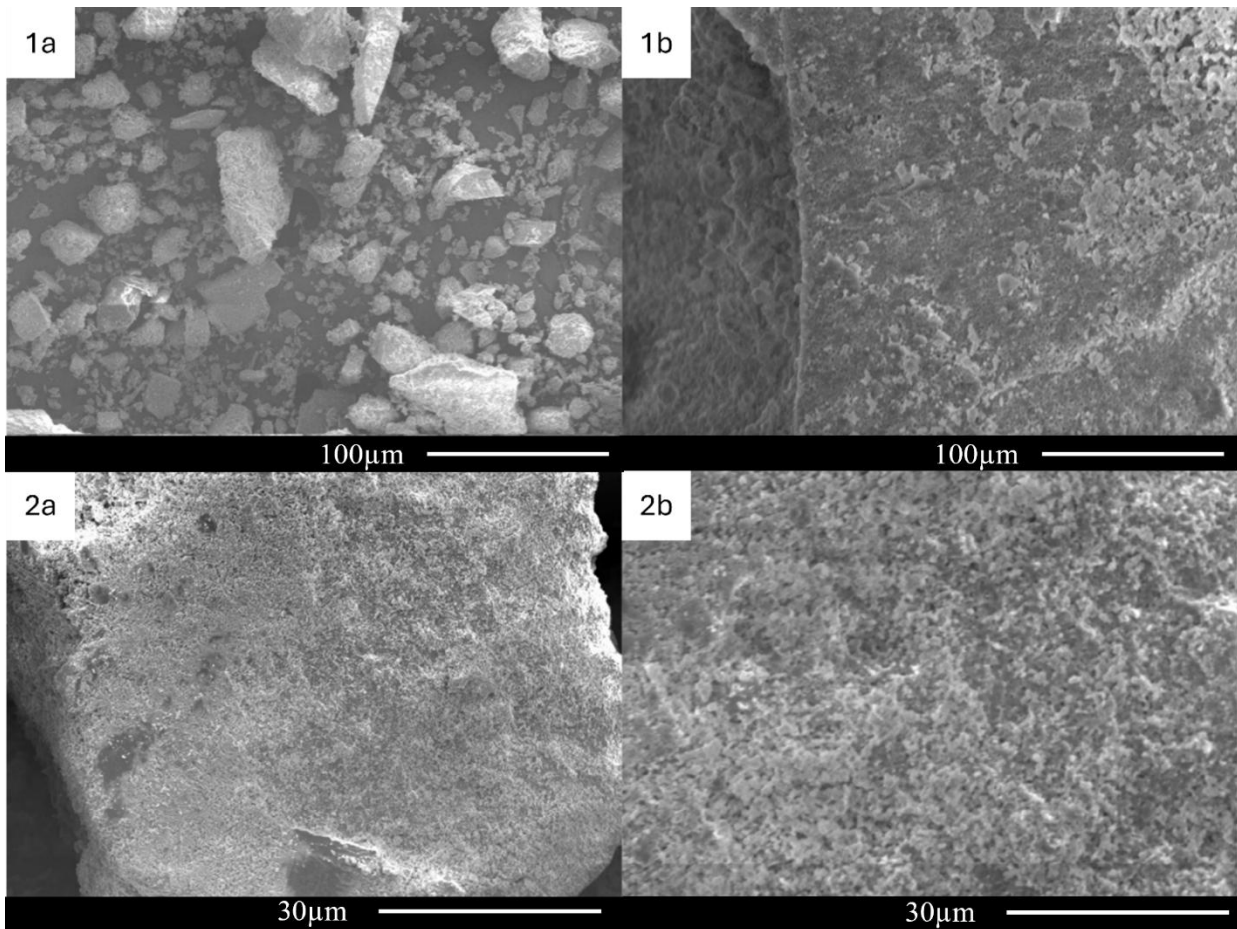
Les images MEB des poudres mono-dopées (**Figure 3-11**), réalisées à un grossissement de 500, révèlent des différences morphologiques en fonction de la nature et de la concentration du dopant introduit. Les échantillons HApCu<sub>1</sub>-1000 et HApZn<sub>1</sub>-1000 présentent une morphologie fine et cotonneuse, caractérisée par de petites particules faiblement agglomérées. À l'inverse, les échantillons HApCu<sub>2</sub>-1000, HApZn<sub>2</sub>-1000 et HApSr<sub>2</sub>-1000 montrent une morphologie plus dense, constituée de gros agglomérats.



**Figure 3-11** Images MEB des poudres d'hydroxyapatite monodopées calcinées à 1000°C pendant 15h. a. HApCu<sub>1</sub>-1000, b. HApZn<sub>1</sub>-1000, c. HApCu<sub>2</sub>-1000, d. HApZn<sub>2</sub>-1000, e. HApSr<sub>2</sub>-1000, observés à un grossissement de ×500.

❖ Échantillons multi-dopés

Les images MEB des échantillons multi-dopés, ( $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2-1000$  et  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2-1000$ ), observés à un grossissement  $\times 500$  (gauche) et  $\times 2000$  (droite) montrent une morphologie similaire à celle observée pour les poudres mono-dopées à 2 % ( $\text{HApCu}_2-1000$ ,  $\text{HApZn}_2-1000$ ,  $\text{HApSr}_2-1000$ ). Les particules forment des agglomérats compacts, présentant une structure dense. On observe aussi une faible porosité de surface.



**Figure 3-12** Images MEB des poudres d'hydroxyapatite multidopées calcinées à  $1000^\circ\text{C}$  pendant 15h. 1a  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2-1000$  ( $\times 500$ ), 1b  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2-1000$  ( $\times 2000$ ), 2a  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2-1000$  ( $\times 500$ ), 2b  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2-1000$  ( $\times 2000$ ).

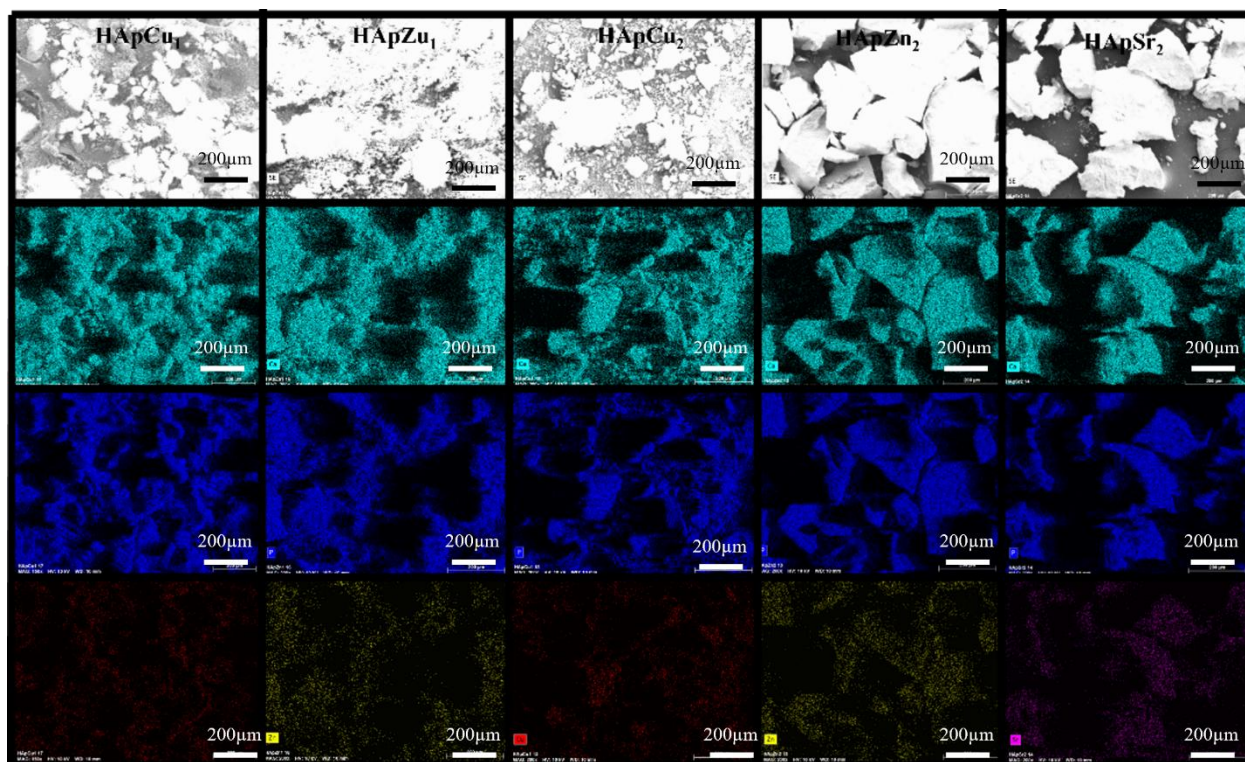
L'introduction simultanée de plusieurs dopants ne semble pas modifier significativement la morphologie des poudres par rapport aux échantillons fortement mono-dopés. Cette similitude suggère que c'est principalement la

concentration totale en dopants, plus que leur combinaison, qui influence la morphologie.

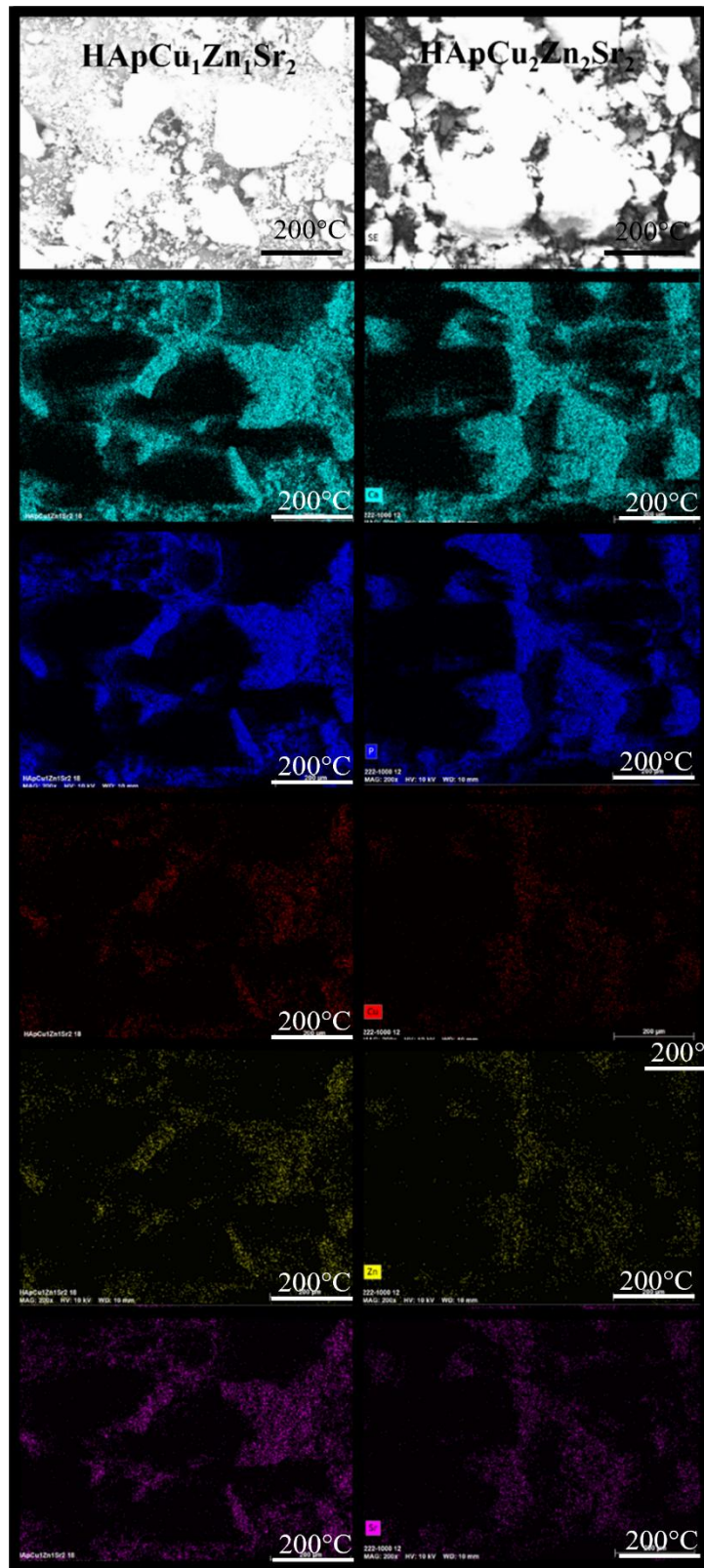
### 3.4.2 Analyse EDS - cartographie chimique

Afin de compléter les observations morphologiques, une analyse par spectroscopie dispersive en énergie (EDS) a été réalisée sur les mêmes échantillons, dans le but d'évaluer leur composition élémentaire locale et de confirmer la présence des éléments dopants incorporés lors de la synthèse.

Les cartographies EDS réalisées sur les échantillons calcinés à 1000°C pendant 15h, qu'ils soient mono- ou multi-dopés (**Figure 3-13** et **Figure 3-14**) confirment la présence des éléments dopants attendus, soit le cuivre, le zinc et le strontium. Dans tous les cas, les éléments sont bien détectés et montrent une distribution homogène à la surface des particules. En effet les éléments détectés sont représentés sur les cartographies par des points de couleurs : bleu clair : calcium, bleu foncé : phosphore, rouge : cuivre, jaune : zinc et rose : strontium. Aucune accumulation localisée ni phase riche en dopant n'a été observée, ce qui suggère une incorporation uniforme des éléments au sein de la matrice d'hydroxyapatite. En revanche, bien que les éléments dopants soient clairement détectés et répartis de manière homogène, les cartographies EDS ne permettent pas de distinguer visuellement les différences de concentration entre les échantillons, notamment entre les dopages à 1 % et 2 %. Une analyse quantitative par EDS des échantillons multi-dopés est donnée dans le **Tableau 3-5**.



*Figure 3-13 Cartographies EDS des échantillons mono-dopés, en blanc la zone cartographiée (images MEB). Les taches de couleurs représentent la localisation des différents éléments ; bleu clair : calcium, bleu foncé : phosphore, rouge : cuivre, jaune : zinc et rose : strontium.*



*Figure 3-14 Cartographies EDS des échantillons multidopés, en blanc la zone cartographiée (images MEB). Les taches de couleurs représentent la localisation des différents éléments ; bleu clair : calcium, bleu foncé : phosphore, rouge : cuivre, jaune : zinc et rose : strontium.*

**Tableau 3-5** Résultats de l'analyse EDS : composition chimique élémentaire et rapports Cu/Ca, Zn/Ca et Sr/Ca.

Echantillon		% <sub>massique</sub>	% <sub>molaire</sub>	Cu/Ca	Zn/Ca	Sr/Ca
HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	P	27,04	32,81			
	Ca	70,26	65,90			
	Cu	0,22	0,13	0,0020 ± 0,0006		
	Zn	0,60	0,34		0,0052 ± 0,0006	
	Sr	1,89	0,81			0,0123 ± 0,0012
HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	P	28,01	33,95			
	Ca	68,85	64,49			
	Cu	0,48	0,28	0,0043 ± 0,0009		
	Zn	0,99	0,57		0,0088 ± 0,0009	
	Sr	1,68	0,72			0,00112 ± 0,0012

Les analyses EDS offrent une estimation complémentaire de l'analyse réalisée dans la partie 3.1 par spectroscopie d'émission atomique. La comparaison entre les deux techniques permet de vérifier la cohérence des résultats (**Tableau 3-6**).

**Tableau 3-6** Comparaison des quantifications des éléments dopants par MP-AES et EDS.

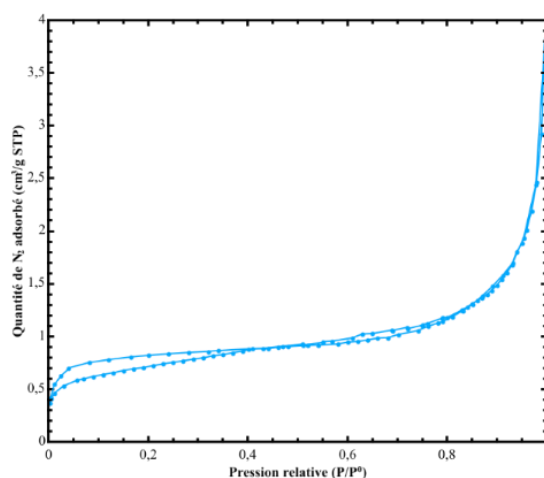
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub> -1000			HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub> -1000		
	MP-AES	EDS	Écart relatif	MP-AES	EDS	Écart relatif
<b>Cu/Ca</b>	0,0024	0,002	16,67%	0,0048	0,0044	8,33%
<b>Zn/Ca</b>	0,0034	0,0052	52,94%	0,0094	0,0088	6,38%
<b>Sr/Ca</b>	0,017	0,0123	27,65%	0,016	0,0112	30,00%

Les écarts relatifs entre les résultats obtenus par spectroscopie d'émission atomique et par spectroscopie de rayons X en dispersion d'énergie sont faibles (inférieur à 10%) pour le matériau HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> pour les éléments cuivre et zinc. Le taux de strontium relevé lors des deux analyses est proche pour les deux échantillons, mais avec tout de même un écart de 30% entre les deux techniques. Nous avons évoqué dans la partie 3.2.1 la possibilité que le strontium ne soit pas réparti de manière homogène dans le matériau. Il est important de mentionner que l'analyse réalisée par MP-AES mesure la quantité totale de strontium présent dans l'échantillon, ce qui n'est

pas le cas de l'analyse EDS avec une analyse plus locale. Les écarts relevés pour le cuivre et le zinc dans le matériau  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$  sont de 16,67% et 52,94% ce qui est nettement supérieur à l'autre biocéramique. On peut justifier ces écarts par le fait que la quantité d'éléments présents dans le matériau est faible et que l'analyse EDS reste une analyse semi-quantitative.

### 3.5 Surface spécifique et porosité

L'ensemble des échantillons a été caractérisé par sorptométrie d'azote. Cette analyse montre des valeurs de surface spécifique très faibles, comprises entre 0,5 et 5  $\text{m}^2/\text{g}$ , cohérentes avec des phases bien cristallisées et des particules de taille élevées. Aucune différence notable de surface spécifique n'est observée entre les différents types de dopage, donc l'incorporation des ions n'a pas d'influence significative sur la texture des matériaux. La **Figure 3-15** représente l'isotherme d'adsorption de diazote de l'échantillon  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$ , qui est une isotherme de type II, typique des solides non poreux ou macroporeux. Elle est représentative des isothermes des différents échantillons. Ces résultats confirment que les poudres obtenues présentent une morphologie dense, comme celle observée au MEB. Cette faible surface spécifique peut avoir un impact direct sur la réactivité biologique du matériau. Un matériau ayant une faible surface spécifique présentera moins de surface d'interaction avec le milieu biologique ou les cellules.



**Figure 3-15** Isotherme d'adsorption ( $\text{N}_2$ ) de l'échantillon  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$ -1000.

### 3.6 Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif de caractériser les propriétés des différents matériaux en faisant un lien entre la composition chimique, la structure cristalline, la morphologie et la porosité des céramiques. L'étude systématique d'échantillons mono-dopés et multi-dopés a été faite afin de faire la comparaison et l'observation de modifications éventuelles entre les deux types de dopages.

L'analyse chimique a mis en évidence une sous-incorporation de chaque élément dopant (Cu, Zn, Sr), plus marquée dans les échantillons multi-dopés, mais avec une bonne reproductibilité entre les synthèses. Les études structurales ont révélé que l'hydroxyapatite reste la phase prédominante dans l'ensemble des échantillons, mais la présence de phases secondaires telles que le  $\beta$ -TCP et l' $\alpha$ -TCP a également été observée, en particulier à haute température. Ces phases peuvent jouer un rôle déterminant dans les propriétés biologiques des céramiques, notamment en termes de résorbabilité et de libération ionique. Les résultats FT-IR corroborent la présence des groupements caractéristiques de l'hydroxyapatite, sans modification majeure liée au dopage, à l'exception d'une atténuation de la bande  $\text{OH}^-$  en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Les observations morphologiques montrent des agglomérats compacts à faible porosité, avec une distribution homogène des dopants au sein de la matrice, confirmés par les analyses EDS. Enfin, la surface spécifique très faible des poudres témoigne d'une faible porosité.

Ces résultats structuraux, chimiques et morphologiques constituent une base pour comprendre l'influence des dopants et des conditions de traitements thermiques sur les propriétés des biocéramiques. Ils serviront à mieux comprendre les résultats des tests biologiques qui seront abordés dans le chapitre suivant.

## ✻ Chapitre 4 ✻

---

### Etude de la cytotoxicité des matériaux

<b>I.1</b>	<b>Relargage en milieu biologique simulé .....</b>	<b>94</b>
I.1.1	Méthode d'analyse .....	95
I.1.2	Résultats expérimentaux.....	96
<b>I.2</b>	<b>Évaluation de la cytotoxicité des matériaux .....</b>	<b>98</b>
I.2.1	Préparation des échantillons cellulaires .....	99
I.2.2	Méthodes d'analyse biologique.....	99
I.2.3	Résultats expérimentaux.....	100
<b>I.3</b>	<b>Conclusion des analyses.....</b>	<b>106</b>

## Relargage en milieu biologique simulé

Dans le cadre du projet, l'étude biologique des céramiques biphasiques phosphocalciques a été réalisée en collaboration avec l'Université de Reims Champagne-Ardenne, plus particulièrement l'équipe Biomatériaux et inflammation en site osseux (BIOS). Le travail a été de tester la biocompatibilité et la cytotoxicité des différents matériaux. Dans un premier temps, nous étudierons le relargage ionique des éléments dopants dans un milieu biologique simulé, puis dans un second temps les résultats des essais de cytotoxicité et biocompatibilité seront présentés.

### 4.1 Relargage en milieu biologique simulé

Il existe différents liquides simulant les fluides biologiques, par exemple le Simulated Body Fluid (SBF) développé par Kokubo [109], dont la composition en ions inorganiques est proche de celle du plasma sanguin. Ce type de liquide peut être utilisé afin de prédire la bioactivité *in vivo* des matériaux. Nous avons pour notre étude utilisé un milieu plus complexe, le DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium), qui est un milieu de culture dont les concentrations en ions minéraux sont proches de celle du SBF, mais qui contient par ailleurs des vitamines et acides aminés indispensables à la culture cellulaire (**Tableau 4-1**). Le choix de ce milieu est justifié par notre volonté de reproduire un environnement proche de celui utilisé lors des tests biologiques *in vitro*.

**Tableau 4-1** Composition du DMEM.

DMEM low Glucose		mg/L
Acides aminés	Glycine	30
	L-Arginine hydrochlorate	84
	L-Cystine 2HCl	62,6
	L-Glutamine	-
	L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	42
	L-Isoleucine	105
	L-Leucine	105
	L-Lysine hydrochlorate	146
	L-Methionine	30
	L-Phenylalanine	66
	L-Serine	42
	L-Threonine	95
	L-Tryptophane	16
	L-Tyrosine disodium salt dihydrate	103,79
L-Valine	94	

Sels Inorganiques	Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> ) anhydre	-
	Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> ) dihydrate	265
	Nitrate de fer(III) (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	0,1
	Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> ) anhydre	97,67
	Chlorure de potassium (KCl)	400
	Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	3700
	Chlorure de sodium (NaCl)	6400
	Phosphate de sodium monobasique (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	125

Autres composants	D-Glucose (Dextrose)	1000
	Rouge de Phénol	15,9
	Pyruvate de sodium	110
	HEPES	-

Vitamines	Chlorure de choline	4
	D-pantothénate de calcium	4
	Acide folique	4
	Nicotinamide	4
	Chlorhydrate de pyridoxine	4
	Riboflavine	0,4
	Chlorhydrate de thiamine	4
	myo-Inositol	7,2

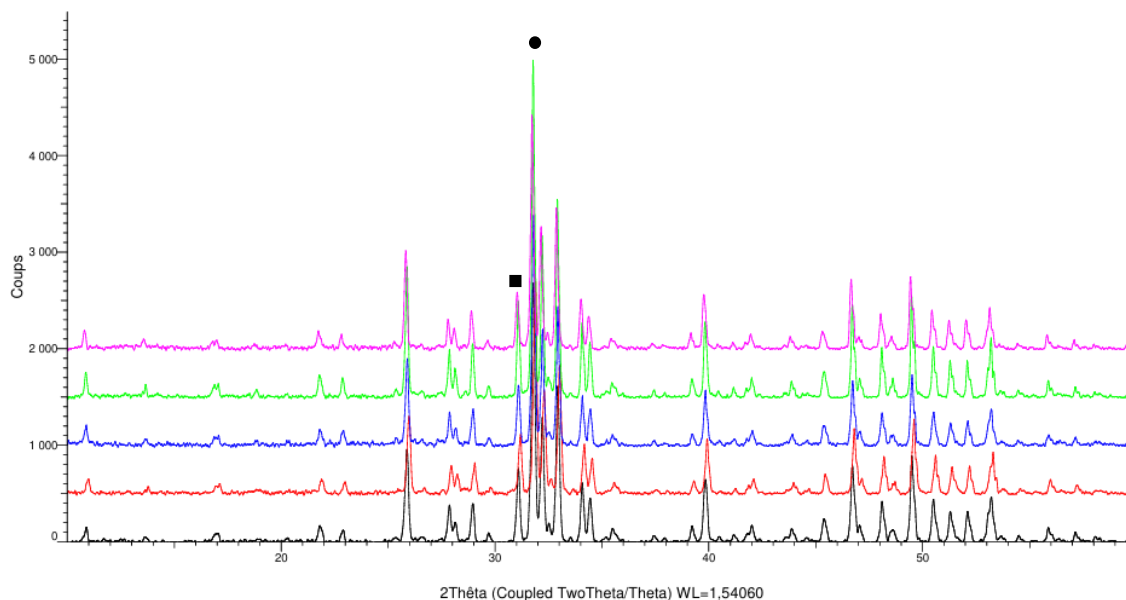
#### 4.1.1 Méthode d'analyse

Les interactions entre les céramiques et le milieu DMEM ont été étudiées par immersion des poudres dans le liquide à 37 °C, sous agitation à 120 rpm. Ces immersions ont été réalisées pour différentes durées (1, 2, 3, 7 et 10 jours) afin de reconstituer les cinétiques de relargage ionique. Le rapport masse/volume a été fixé à 10 mg/mL. À l'issue de chaque période d'incubation, le surnageant a été récupéré et analysé par spectrométrie d'émission atomique (MP-AES) pour déterminer l'évolution des concentrations en

## Relargage en milieu biologique simulé

calcium, phosphore, strontium, cuivre et zinc. Les poudres résiduelles ont quant à elles été récupérées en vue d'analyses structurales complémentaires.

Au global, nous ne constatons pas de modifications structurales visibles après analyse par diffraction des rayons X.



*Figure 4-1* Diffractogramme des rayons X de l'échantillon  $HApCu_1$  après différents temps d'incubation dans le DMEM. Deux phases sont observées : l'hydroxyapatite ● (PDF 09-0432) et le  $\beta$ -TCP ■ (PDF 09-0169), identifiées par leurs pics majoritaires.

Les céramiques testées incluent trois matériaux mono-dopés ( $HApCu_1$ ,  $HApZn_1$  et  $HApSr_2$ ) ainsi que les deux formulations multi-dopées ( $HApCu_1Zn_1Sr_2$  et  $HApCu_2Zn_2Sr_2$ ). L'analyse par MP-AES n'a pas permis d'identifier la présence de zinc en solution, indiquant une absence de relargage détectable pour cet élément, quelle que soit la formulation considérée.

### 4.1.2 Résultats expérimentaux

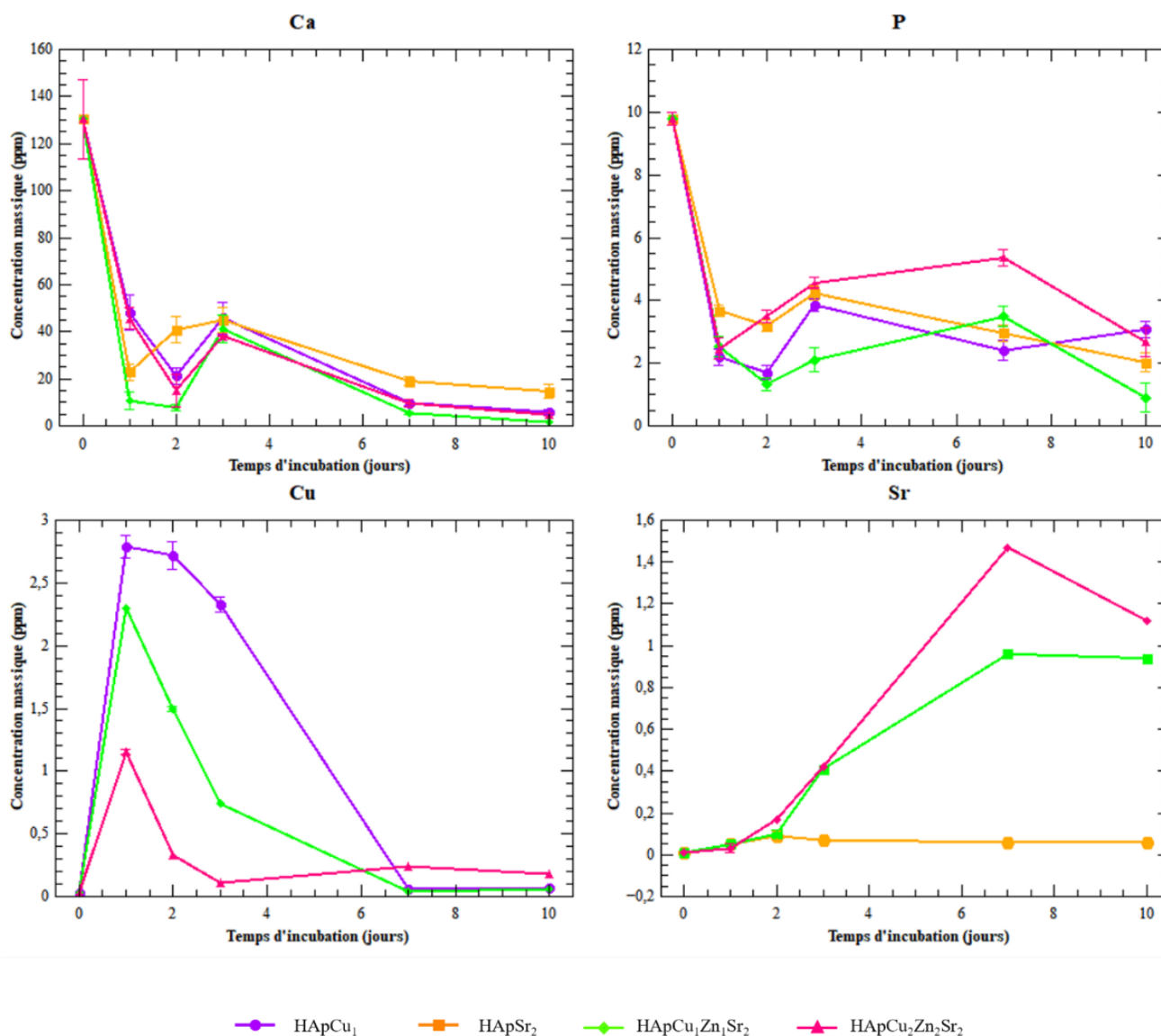
L'étude du relargage ionique est exposée dans la **Figure 4-2**. Les mesures effectuées au jour 0, correspondant au milieu seul sans contact avec les matériaux, servant de référence pour estimer les contributions spécifiques de

## Chapitre 4 : Etude de la cytotoxicité des matériaux

chaque matériau. Pour les éléments calcium et phosphore, on observe une forte chute de la concentration au premier jour, suivie d'une faible augmentation au jour 3, et enfin une diminution progressive jusqu'au jour 10. Cette variation peut être attribuée à un relargage des éléments en surface des matériaux ou à une dissolution surfacique des poudres, suivie d'une précipitation. Le comportement du cuivre est différent : les concentrations maximales sont atteintes au jour 1, puis décroissent rapidement jusqu'à devenir quasi nulles au jour 10. Cela suggère la présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  en surface, facilement relargables. La concentration faible des jours 7 et 10 peut être attribuée à l'insertion/sorption du cuivre dans la céramique. On peut aussi mettre en lien la diminution au jour 7 et 10 du taux de calcium et phosphore et celle du cuivre en faisant l'hypothèse d'une précipitation d'une phase phosphocalcique dopée en cuivre, probablement amorphe, car n'étant pas visible par les autres analyses effectuées. À l'inverse de l'élément cuivre, le strontium montre une libération progressive dans le temps, atteignant un maximum entre les jours 7 et 10, surtout pour les échantillons multi-dopés. Ce profil traduit une incorporation plus homogène du Sr dans la matrice apatite, avec un relargage plus lent et contrôlé.

Les profils de relargage observés en milieu DMEM mettent en évidence des comportements distincts selon les éléments dopants, révélant un mode d'incorporation différent sein de la matrice. Le relargage rapide du cuivre, particulièrement au jour 1, suggère que le cuivre disponible est majoritairement présent à la surface du matériau. Ce comportement est cohérent avec d'autres études ayant montré que le cuivre tend à se localiser en surface, favorisant un relargage rapide mais de courte durée, potentiellement bénéfique pour une activité biologique [110]. À l'inverse, le strontium présente une cinétique de relargage plus progressive, atteignant un maximum vers le jour 7 ou 10. Cette libération soutenue est caractéristique d'une substitution plus profonde et stable dans le réseau cristallin et pourrait favoriser une stimulation prolongée de l'activité ostéoblastique [111].

## Évaluation de la cytotoxicité des matériaux



**Figure 4-2** Évolution des concentrations en calcium, phosphore, cuivre, et strontium des échantillons après immersion durant 0, 1, 2, 3, 7 et 10 jours dans le milieu biologique DMEM.

D'autres mesures de relargage ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les tests *in vitro* de la partie 4.2, c'est-à-dire à 2 mg/mL. L'analyse spectrométrique réalisée sur ces échantillons n'a pas permis de quantifier ni même de mettre en évidence la présence de cuivre ni de strontium dans le milieu de culture.

### 4.2 Évaluation de la cytotoxicité des matériaux

L'évaluation de la cytotoxicité a été réalisée uniquement sur trois « nuances » de matériaux, une hydroxyapatite non dopée (HApCu<sub>0</sub>Zn<sub>0</sub>Sr<sub>0</sub>) et

## Chapitre 4 : Etude de la cytotoxicité des matériaux

les hydroxyapatites multi-dopées HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub> et HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>. Ce choix permet de comparer directement l'effet de l'incorporation d'ions dopants sur le comportement et la viabilité des cellules. Les tests permettant d'évaluer *in vitro* la viabilité des matériaux sont : l'analyse de l'activité mitochondriale cellulaire par le test WST-1, l'analyse de la prolifération cellulaire par dosage de l'ADN et enfin l'analyse de la cytotoxicité par test LDH.

### 4.2.1 Préparation des échantillons cellulaires

Des ostéoblastes primaires humains (n=2) ont été obtenus à partir de plateaux tibiaux de patients du service d'orthopédie et de traumatologie du CHU de Reims. Les échantillons ont été collectés après obtention du consentement éclairé écrit des donneurs, conformément aux réglementations éthiques et légales (Article R1243-57), et selon l'autorisation et le numéro d'enregistrement DC-2014-2262 délivrés par le Ministère français de la Santé à l'UR BIOS de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Les explants ont été découpés en petits morceaux, lavés quatre fois pendant 5 minutes dans du DPBS (Gibco), puis digérés dans une solution contenant 0,5 % de trypsine, 5,3 mM d'EDTA (Gibco), puis dans de la collagénase de type II (1,4 mg/mL, Thermo Fisher Scientific). Les fragments obtenus ont ensuite été placés dans des flacons de culture de 25 cm<sup>2</sup> contenant du DMEM supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS, PAN Biotech) et 1 % de pénicilline-streptomycine (Thermo Fisher Scientific), puis incubés à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été amplifiées pendant quatre passages.

### 4.2.2 Méthodes d'analyse biologique

Les ostéoblastes primaires ont étéensemencés à raison de 20000 cellules par puits dans du DMEM supplémenté avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline/streptomycine, puis incubés à 37 °C dans un environnement humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 h pour permettre leur adhésion. Le lendemain, 2 mg de matériau brut ou désorbé pendant 24h dans du DMEM

## Évaluation de la cytotoxicité des matériaux

supplémenté avec 10 % de FBS et 1 % de pénicilline/streptomycine ont été ajoutés dans les conditions *ad hoc*. Le milieu de culture a été remplacé par le surnageant de désorption des matériaux pour les conditions dédiées. Les ostéoblastes ont ensuite été incubés pendant 3 et 7 jours supplémentaires.

À la fin du temps de culture, l'activité mitochondriale cellulaire a été évaluée par un test WST-1 (Merck). Les cellules ont été incubées avec le réactif (100  $\mu\text{L}$  dans 500  $\mu\text{L}$  de milieu de culture) pendant 1,5 h dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de  $\text{CO}_2$  à 37 °C.

Le milieu a été collecté et transféré dans des plaques à 96 puits, après quoi l'absorbance a été mesurée à 440 nm et corrigée à 700 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech). Chaque condition a été mesurée en triplicat.

La prolifération cellulaire a été évaluée par dosage de quantité d'ADN. L'ADN total a été extrait des cultures selon le protocole fourni dans le kit de purification d'ADN MasterPure™ (Lucigen). La concentration en ADN a été mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop®, Thermo Scientific) à 260 nm ( $A_{260} = 1$ , équivaut à une concentration en ADN de 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ).

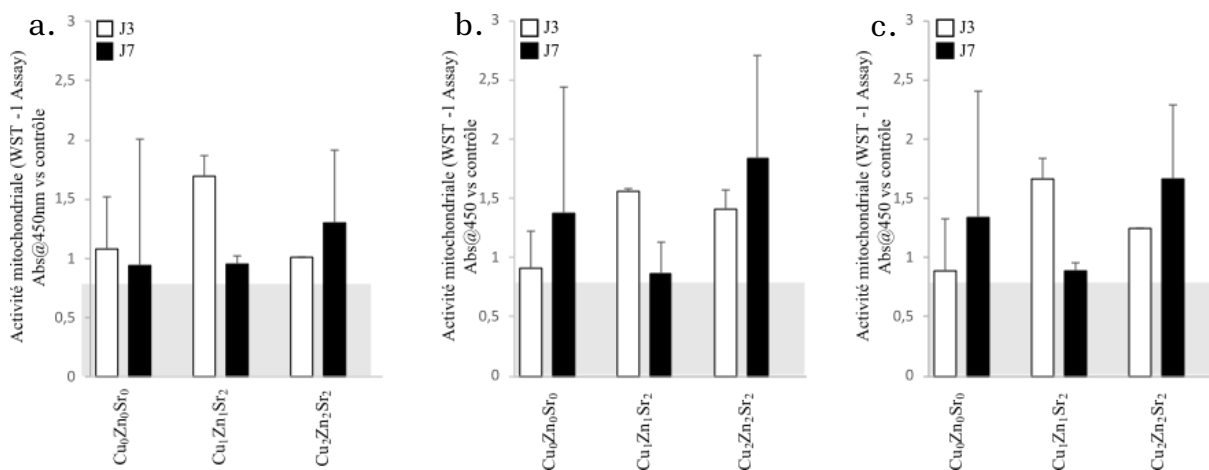
La mortalité cellulaire a été déterminée par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture en fin de culture, selon le protocole du fabricant (LDH cytotoxicity assay kit, Merck). L'absorbance a été lue à 492 nm et corrigée à 700 nm (Fluostar Omega, BMG Labtech).

### 4.2.3 Résultats expérimentaux

Les résultats présentés comparent et mettent en relation les résultats des analyses sur les matériaux bruts, les matériaux préalablement désorbés et enfin le surnageant de désorption, afin d'observer les éventuelles modifications et quel est l'élément favorisant ou non la survie cellulaire.

#### ❖ Étude de l'activité mitochondriale cellulaire

L'étude de l'activité mitochondriale cellulaire permet d'évaluer l'état énergétique et métabolique des cellules. Les mitochondries jouent principalement le rôle de "centrales énergétiques" cellulaires [112]. Ainsi, analyser leur activité revient à vérifier la compatibilité biologique des matériaux et s'assurer qu'ils n'induisent pas d'effets toxiques.



**Figure 4-3** *Activité mitochondriale cellulaire obtenue après 3 (blanc) et 7 (noir) jours de culture avec des céramiques ayant différents taux de dopage et différents modes de contact. a. surnageant de désorption (2 mg/mL, 1 mL, 24h), b. matériaux désorbés (2 mg/mL, 1 mL, 24h) et c. matériaux bruts (2 mg/mL, 1 mL). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur n=3 réplicats de 2 donneurs indépendants.*

Les résultats obtenus par le test WST-1 sont présentés dans la **Figure 4-3** et les valeurs correspondantes sont listées dans le **Tableau 4-2**. Le contrôle correspond à l'activité cellulaire sans surnageant ni matériaux (qui équivaut à 1). La zone grisée correspond à 70% de l'activité métabolique du contrôle, valeur en deçà de laquelle un effet cytotoxique est considéré. Au jour 3, les activités métaboliques de tous les échantillons étaient supérieures à 90 %, sauf pour l'échantillon en contact avec la poudre brute de  $\text{HApCu}_0\text{Zn}_0\text{Sr}_0$  qui présente une activité de 89,2%. Au jour 7, toutes les valeurs d'activité métabolique étaient supérieures à 90 %, sauf pour les deux échantillons en contact avec les poudres  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$  brute et désorbée, présentant respectivement 88,77% et 86,34%. On remarque une augmentation de l'activité mitochondriale cellulaire entre J3 et J7 pour les deux cas où des

## Évaluation de la cytotoxicité des matériaux

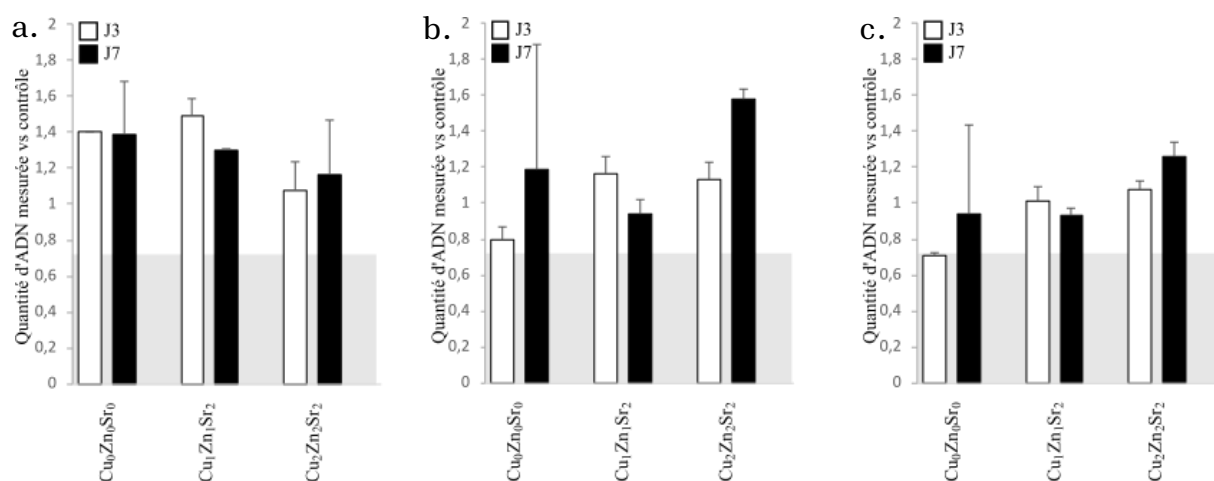
poudres étaient présentes, sauf pour le matériau HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>. De plus, les échantillons en contact avec le matériau HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> présentent, dans chaque condition (surnageant de désorption, matériau désorbé et matériau brut), une augmentation de l'activité mitochondriale cellulaire entre le J3 et le J7, ce qui suggère une meilleure viabilité des cellules au cours du temps.

**Tableau 4-2** Variation de l'activité mitochondriale cellulaire par rapport aux contrôles obtenues après 3 et 7 jours de culture avec des céramiques ayant différents taux de dopage et différents modes de contact. Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart-type sur n=3 répliques de 2 donneurs indépendants.

Échantillons		Activité mitochondriale cellulaire	
		J3	J7
Surnageant de désorption	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	1,08 $\pm$ 0,51	0,95 $\pm$ 0,24
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,69 $\pm$ 0,62	0,95 $\pm$ 0,18
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,66 $\pm$ 0,18	1,30 $\pm$ 0,63
Matériaux désorbés	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	0,91 $\pm$ 0,31	1,38 $\pm$ 1,06
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,56 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,26
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,41 $\pm$ 0,15	1,83 $\pm$ 0,86
Matériaux bruts	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	0,89 $\pm$ 0,44	1,34 $\pm$ 1,06
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,66 $\pm$ 0,17	0,89 $\pm$ 0,07
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,25 $\pm$ 0,01	1,67 $\pm$ 0,62

### ❖ Étude de la prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire est un paramètre important pour évaluer la biocompatibilité d'un matériau. La méthode choisie dans cette partie est le dosage de l'ADN, en effet la quantité d'ADN est proportionnelle au nombre de cellules présentes. L'objectif de cette analyse est de déterminer si les cellules prolifèrent quand elles sont au contact des matériaux ou du surnageant de désorption et d'évaluer les éventuels effets promoteurs ou inhibiteurs de ces derniers.



**Figure 4-4** Quantités d'ADN obtenues après 3 (blanc) et 7 (noir) jours de culture avec des céramiques ayant différents taux de dopage et différents modes de contact. a. surnageant de désorption (2 mg/mL, 1 mL, 24h), b. matériaux désorbés (2 mg/mL, 1 mL, 24h) et c. matériaux bruts (2 mg/mL, 1 mL). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur n=2 donneurs indépendants.

Les résultats de l'analyse de la prolifération cellulaire par dosage de l'ADN sont présentés dans la **Figure 4-4** et les valeurs correspondantes sont listées dans le **Tableau 4-3**. La zone grisée correspond à 70% de la condition de contrôle sans surnageant ni matériaux. Au jour 3 et au jour 7, les valeurs mesurées pour les échantillons en contact avec le surnageant de désorption étaient toutes supérieures à 100 % du contrôle. Pour les échantillons en contact avec les poudres dopées, au jour 3, les résultats étaient également supérieurs à 100 % du contrôle, tandis que pour les échantillons en contact avec le matériau non dopé, les valeurs dépassaient les 70 %. Toutefois, l'échantillon en contact avec la poudre désorbée de HApCu<sub>0</sub>Zn<sub>0</sub>Sr<sub>0</sub> présente une valeur de 70,8 %, correspondant à la valeur limite. Au jour 7, tous les échantillons en contact avec le surnageant de désorption affichaient des résultats supérieurs à 100 % du contrôle, tandis que l'ensemble des échantillons en contact direct avec les matériaux présentaient des valeurs supérieures à 90 % du contrôle. Ces résultats indiquent que l'ensemble des conditions testées ne présente pas d'effet délétère sur la prolifération cellulaire. Au contraire, la majorité des échantillons, en particulier ceux en contact avec les poudres dopées, ainsi qu'avec les surnageants de désorption,

## Évaluation de la cytotoxicité des matériaux

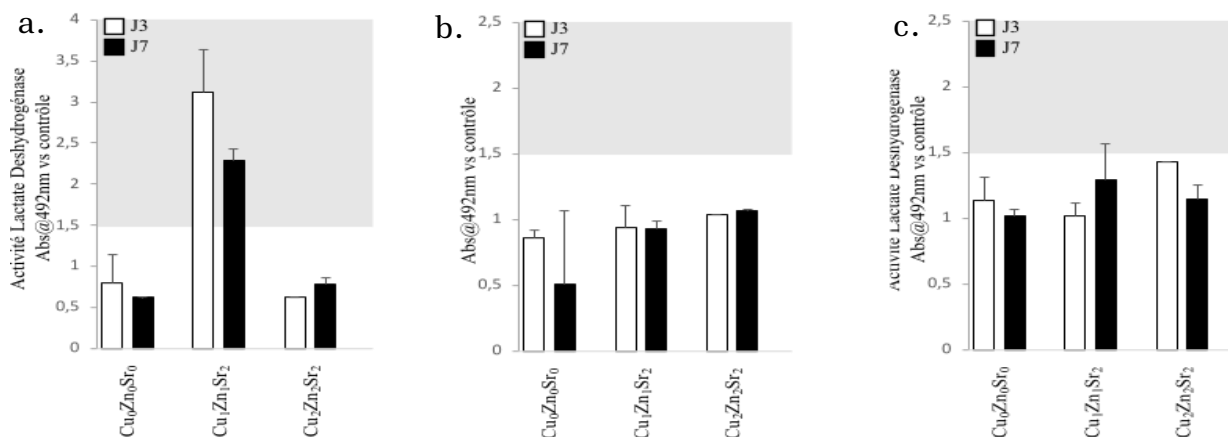
induisent des valeurs égales ou supérieures au contrôle. Seuls les échantillons en contact avec le matériau non dopé montrent une tendance plus faible, mais restant globalement proche de la limite de viabilité cellulaire. L'ajout d'ions dopant dans les matériaux semble donc bénéfique.

**Tableau 4-3** Quantités d'ADN obtenues après 3 et 7 jours de culture avec des céramiques ayant différents taux de dopage et différents modes de contact. Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  écart-type sur  $n=2$  donneurs les résultats sans réplicats sont dus aux échecs des essais.

Échantillons		Quantité d'ADN	
		J3	J7
Surnageant de désorption	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	1,4045	1,389 $\pm$ 0,294
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,488 $\pm$ 0,098	1,296 $\pm$ 0,877
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,079 $\pm$ 0,156	1,161 $\pm$ 0,308
Matériaux désorbés	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	0,797 $\pm$ 0,074	1,191 $\pm$ 0,688
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,166 $\pm$ 0,094	0,937 $\pm$ 0,084
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,132 $\pm$ 0,093	1,577 $\pm$ 0,061
Matériaux bruts	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	0,7086 $\pm$ 0,019	0,938 $\pm$ 0,500
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,079 $\pm$ 0,045	0,929 $\pm$ 0,042
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,079 $\pm$ 0,045	1,261 $\pm$ 0,081

### ❖ Étude de la mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire a été évaluée par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) relâchée dans le surnageant de culture. En effet, cette enzyme cytoplasmique est libérée lorsque la cellule se désagrège, ce qui en fait un marqueur fiable de cytotoxicité [113].



**Figure 4-5** Quantités de LDH obtenues après 3 (blanc) et 7 (noir) jours de culture avec des céramiques ayant différents taux de dopage et différents modes de contact. a. surnageant de désorption (2 mg/mL, 1 mL, 24h), b. matériaux désorbés (2 mg/mL, 1 mL, 24h) et c. matériaux brut (2 mg/mL, 1 mL). Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur n=2 réplicas de deux donneurs indépendants.

Les résultats de l'analyse de l'activité de la lactate déshydrogénase sont présentés dans la **Figure 4-5** et les valeurs correspondantes sont listées dans le **Tableau 4-4**. La zone grisée correspond à une augmentation de 50% de la LDH qui représente le seuil de toxicité. On remarque que les cellules mises en contact avec le surnageant de désorption des matériaux présentent une mortalité nettement supérieure pour l'échantillon HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>. En effet, une quantité de LDH 1,5 fois supérieure à la condition de contrôle sans surnageant est relevée, tandis que les échantillons HApCu<sub>0</sub>Zn<sub>0</sub>Sr<sub>0</sub> et HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> présentent une valeur inférieure à 1 aux jours 3 et 7. L'étude avec les cellules en contact avec les matériaux montre un taux de LDH plus faible, autour de 1, pour l'ensemble des échantillons. Le contact direct des cellules avec les matériaux ne montre pas de toxicité significative (taux de LDH comparables au contrôle).

**Tableau 4-4** Quantités de LDH obtenues après 3 et 7 jours de culture avec des céramiques ayant différents taux de dopage et différents modes de contact. Les données sont présentées comme moyenne ± écart-type sur n=2 réplicas de 2

donneurs indépendants, les résultats sans réplicats sont dus aux échecs des essais.

Échantillons		Quantité de LDH	
		J3	J7
Surnageant de désorption	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	0,795 ± 0,344	0,615 ± 0,004
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	3,118 ± 0,523	2,289 ± 0,14
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	0,617	0,617
Matériaux désorbés	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	0,859 ± 0,06	0,51 ± 0,05
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	0,942 ± 0,166	0,926 ± 0,061
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,036	1,036
Matériaux bruts	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	1,132 ± 0,178	1,019 ± 0,043
	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	1,013 ± 0,099	1,289 ± 0,276
	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>	1,432	1,432

### 4.3 Conclusion des analyses

L'ensemble des résultats obtenus à partir des tests de l'activité mitochondriale cellulaire (WST-1), de prolifération cellulaire (dosage ADN) et de cytotoxicité (LDH) indiquent que les matériaux étudiés n'induisent pas d'effet délétère majeur sur les cellules. Le **Tableau 4-5** Tableau récapitulatif des essais compare les différents résultats des différents tests pour chaque matériau. Les activités métaboliques et la prolifération cellulaire restent globalement supérieures aux seuils de toxicité, avec des valeurs proches ou supérieures au contrôle dans la majorité des cas, en particulier pour les poudres dopées et les surnageants de désorption. Seul le matériau HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub> présente une activité métabolique légèrement réduite et une augmentation de la LDH, suggérant une sensibilité plus marquée de ce matériau. À l'inverse, HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> montre une tendance favorable avec une amélioration de l'activité mitochondriale au cours du temps et des taux de cytotoxicité faibles.

**Tableau 4-5** Tableau récapitulatif des essais de cytotoxicité.

	HApCu <sub>0</sub> Zn <sub>0</sub> Sr <sub>0</sub>	HApCu <sub>1</sub> Zn <sub>1</sub> Sr <sub>2</sub>	HApCu <sub>2</sub> Zn <sub>2</sub> Sr <sub>2</sub>
<b>Activité mitochondriale</b>	~	X	✓
<b>Prolifération cellulaire</b>	X	✓	✓
<b>Mortalité cellulaire</b>	✓	X	✓

Ces observations suggèrent que l'ajout d'ions dopants contribue dans l'ensemble à améliorer la viabilité et la prolifération cellulaire, tout en limitant la toxicité des matériaux.

Ce comportement peut être mis en relation avec les résultats de relargage ionique réalisés dans la partie 4.1. Le zinc n'étant pas présent ou en quantité indétectable, seuls le cuivre et le strontium ont pu être dosés. Ils présentaient de faibles quantités dans les conditions expérimentales (10 mg/mL, soit une concentration plus élevée que celle utilisée pour les tests *in vitro*, 2 mg/mL). On peut donc supposer que les quantités d'ions effectivement disponibles dans les tests biologiques sont encore plus faibles. Néanmoins, le matériau HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub> présente un relargage en cuivre nettement plus important que HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>, ce qui pourrait expliquer le moins bon résultat observé pour cet échantillon.

À l'aide de l'ensemble des analyses menées depuis le début du projet, le matériau HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> a été retenu pour les étapes de mise en forme et pour la réalisation des premiers tests *in vivo*, puisqu'il présente la combinaison la plus favorable de résultats biologiques. La prochaine partie sera donc consacrée à la mise en forme de ces céramiques.



## ✻ Chapitre 5 ✻

---

### Mise en forme par procédé PIM et caractérisation des pièces

<b>5.1</b>	<b>Procédé PIM - Powder Injection Molding.....</b>	<b>110</b>
5.1.1	Principe .....	110
5.1.2	Avantages et inconvénients du procédé .....	112
<b>5.2</b>	<b>Céramiques conçues pour le PIM .....</b>	<b>113</b>
5.2.1	Composition des échantillons.....	114
5.2.2	Granulométrie .....	115
<b>5.3</b>	<b>Mise en forme et caractérisations .....</b>	<b>117</b>
5.3.1	Mise en forme par PIM.....	117
5.3.2	Propriétés physico-chimiques après mise en forme .....	119

## Procédé PIM - Powder Injection Molding

Suite à la caractérisation des poudres céramiques élaborées au laboratoire, il est nécessaire de les mettre en forme afin d'obtenir des pièces adaptées à de futures études *in vivo*. La mise en forme permet d'évaluer non seulement la faisabilité du procédé choisit, dans le cadre du projet : le procédé PIM, mais également les propriétés physico-chimiques des biocéramiques après mise en forme. La stratégie adoptée s'est donc articulée en trois temps : la production des poudres en quantité suffisante par l'équipe MPS-RIT de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, leur mise en forme par le procédé PIM au CRITT Matériaux Innovation et enfin les essais biologiques *in vivo* des biocéramiques mises en forme par l'équipe BIOS de l'université de Reims Champagne Ardenne.

Ce chapitre portera uniquement sur les deux premières parties, soit la production en quantité des biocéramiques et leur mise en forme, en étudiant certaines propriétés physico-chimiques des matériaux finaux.

### 5.1 Procédé PIM - Powder Injection Molding

Le procédé de moulage par injection de poudres (en anglais : Powder Injection Molding, PIM) est une technique de mise en forme des matériaux. Il permet l'élaboration de pièces à partir de poudres céramiques ou métalliques fines.

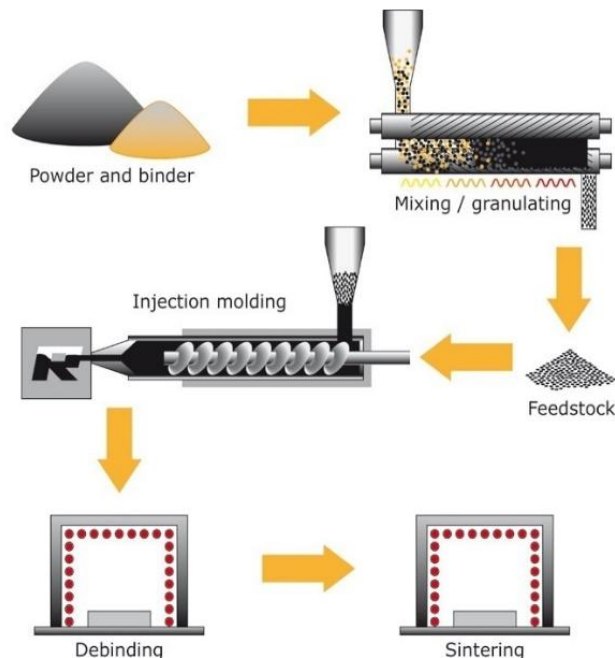
#### 5.1.1 Principe

Le procédé repose sur plusieurs étapes successives. Tout d'abord, les poudres sont mélangées à un liant organique, généralement constitué de polymères thermoplastiques, de cires et d'additifs, afin d'obtenir un « feedstock » homogène présentant une bonne fluidité lors de l'injection. Cette étape de formulation est déterminante pour la suite du procédé. En effet, la répartition uniforme des particules dans la matrice organique conditionne la qualité finale de la pièce [114].

## Chapitre 5 : Mise en forme par procédé PIM et caractérisation des pièces

Le feedstock est ensuite introduit dans une presse d'injection, où il est chauffé puis injecté sous pression dans un moule métallique. Cette étape permet d'obtenir une « pièce verte », dont la géométrie est très proche de la pièce finale mais qui contient encore une fraction importante de liant organique. Afin de densifier le matériau, la pièce verte subit un déliantage, destiné à éliminer le liant sans altérer l'intégrité mécanique de la pièce. Selon la nature du liant, le déliantage peut être thermique, catalytique ou réalisé par extraction au solvant [114], [115].

La dernière étape est le frittage, ayant pour objectif la densification et solidification de la pièce. Le frittage peut être défini comme la transformation thermique de matériaux massifs en solides compacts à des températures inférieures à leur point de fusion. Le principal phénomène est la diffusion en phase solide, qui se produit le long des différentes interfaces des grains et à travers les lacunes. Il faut noter que lors de cette étape un retrait volumique est observé [116].



*Figure 5-1 Illustration du principe du procédé PIM.*

### 5.1.2 Avantages et inconvénients du procédé

Le procédé de moulage par injection de poudres présente de nombreux atouts, mais il comporte également certaines contraintes qui doivent être prises en compte lors de sa mise en œuvre. Il offre la possibilité de réaliser des pièces de géométrie complexe, intégrant des détails fins et des formes difficiles à obtenir par d'autres procédés. Cette méthode est aussi bien adaptée à la production en série, grâce à une excellente répétabilité et à un contrôle précis des dimensions. Les pièces obtenues présentent généralement une surface finale de bonne qualité, limitant ainsi les opérations d'usinage ou de finition. On note que l'un des principaux avantages est la grande flexibilité en termes de matériaux utilisables. Elle permet de mettre en forme aussi bien des métaux que des céramiques. Enfin, la densification importante lors du frittage conduit à des propriétés mécaniques élevées, proches de celles des matériaux massifs [115], [117]. Malgré ses nombreux atouts, le procédé PIM présente également certaines limitations qu'il convient de prendre en considération. L'un des principaux freins est lié aux investissements initiaux nécessaires : la mise en œuvre requiert en effet un équipement spécialisé comprenant un mélangeur, une extrudeuse, une presse à injection et plusieurs fours dédiés au déliantage et au frittage, ce qui représente un coût important pour les laboratoires ou les petites productions industrielles. De plus, le procédé est intrinsèquement associé à un retrait volumique significatif lors du frittage, pouvant atteindre 15 à 20 % du volume initial. Ce phénomène impose une conception très précise des moules et une anticipation des dimensions afin de garantir la géométrie finale de la pièce. Par ailleurs, l'étape de déliantage demeure particulièrement délicate : une élimination trop rapide ou mal contrôlée du liant peut engendrer des fissurations, des déformations, voire la rupture de la pièce [118].

## 5.2 Céramiques conçues pour le PIM

Il a été décidé à la suite des premiers essais biologiques de cytotoxicité (présentés dans le ✱ Chapitre 4 ✱), que les biocéramiques candidates pour les essais biologiques *in vivo* seraient HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub> et une céramique non dopée, afin d'évaluer les potentiels effets du dopage.

Afin de réaliser un nombre suffisant de pièces cylindriques pour les essais, il a été nécessaire de produire environ 100 g de chaque matériau. Le cahier des charges de la poudre qui sera envoyée pour la mise en forme est un pré-traitement thermique à 800°C afin d'éliminer tout résidu de synthèse, et une granulométrie de 20 µm maximum.

Pour obtenir environ 100 g de matériau, deux approches étaient envisageables : utiliser un réacteur de grande capacité, ou bien réaliser plusieurs synthèses à petite échelle puis regrouper les poudres obtenues. La seconde option a été retenue, car les protocoles de synthèse à petite échelle étaient déjà bien maîtrisés.

Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans le ✱ Chapitre 2 ✱, adapté afin de produire 35 g de produit final et reproduit 3 fois :

- Dans un erlenmeyer dissoudre 77,95 g de Ca(NO<sub>3</sub>)·4H<sub>2</sub>O (CAS No :13477-34-4, pureté 99%), 1,63 g de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (CAS No : 10031-43-3 pureté 99-104%), 1,43 g de Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (CAS No:10042-76-9, pureté 99,995% ) et 2,00 g de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (CAS No :10196-18-6 pureté ≥99%) pour la céramique dopée, ou uniquement 79,54 g de Ca(NO<sub>3</sub>)·4H<sub>2</sub>O (CAS No :13477-34-4, pureté 99%) pour la céramique non dopée, dans de l'eau distillée, sous agitation magnétique.
- Dans un autre erlenmeyer, dissoudre 26,69 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (CAS No :7783-28-0 pureté ≥99%) dans de l'eau distillée, sous agitation magnétique.

## Céramiques conçues pour le PIM

- Après dissolution, verser le contenu des erlenmeyers dans un ballon et porter à reflux (90°C), le pH doit être fixé à 9 à l'aide de NH<sub>4</sub>OH 28% pendant 3h à 500 tr.min<sup>-1</sup>.
- Filtrer sur verre fritté (P4).
- Placer la pâte obtenue au congélateur pendant 10h, puis la lyophiliser pendant 24h.
- Broyer manuellement la poudre avant de la placer au four pendant 15h à 800°C avec une montée en température de 4°C/min (Nabertherm LH 30/13)

Les poudres ainsi obtenues, au nombre de 6 (N1, N2 et N3 pour les poudres non dopées et R1, R2 et R3 pour les poudres dopées à 2% en cuivre, zinc et strontium), sont ensuite analysées par spectroscopie d'émission atomique, par diffraction des rayons X et par granulométrie laser.

### 5.2.1 Composition des échantillons

La composition des échantillons a été analysée par spectroscopie d'émission atomique (Agilent 4200 MP-AES). Les longueurs d'onde de travail pour le calcium, le phosphore, le cuivre, le zinc et le strontium sont respectivement de 616,217 nm, 214,915 nm, 324,754 nm, 213,857 nm et 407,771 nm. Les échantillons en poudres sont analysés par dissolution de 16,2 mg d'échantillon dans 100mL de solution d'acide nitrique à 5% massique. Une gamme étalon est réalisée à partir de solutions normadosées d'ions calcium, phosphore, cuivre, zinc et strontium à 1000 µg/mL (Agilent Technologies) diluées dans la même solution d'acide nitrique que celle des échantillons.

L'analyse a permis de déterminer les taux de dopage des céramiques dopées. Elle a montré que ceux-ci sont proches pour l'ensemble des échantillons et comparables aux valeurs obtenues lors des premières synthèses. En moyenne, les taux mesurés sont de 0,48 % pour le cuivre, 1 %

pour le zinc et 2 % pour le strontium. À titre de comparaison, les valeurs cibles fixées pour chaque élément étaient de 2 %.

### 5.2.2 Granulométrie

À la suite de l'étape de calcination, la taille des particules est mesurée par granulométrie laser (laser Mastersizer 3000 Malvern Panalytical), en voie humide. Par ailleurs, un broyage planétaire (10 minutes à 600 tr/min, en utilisant des billes en alumine de 10 mm de diamètre) a été effectué en amont de l'analyse afin de moduler la granulométrie des poudres et d'ajuster leur finesse afin d'obtenir des poudres de taille inférieure à 20  $\mu\text{m}$ . Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 5-2** et les caractéristiques granulométriques des échantillons sont listées dans le **Tableau 5-1**. Les valeurs  $D[4,3]$  correspondent au diamètre moyen en volume, reflétant la taille des particules majoritaires en volume. Les paramètres  $D_n(10)$ ,  $D_n(50)$  et  $D_n(90)$  désignent respectivement les diamètres en dessous desquels 10 %, 50 % et 90 % du nombre total de particules se trouvent. De même, les valeurs  $D_v(10)$ ,  $D_v(50)$  et  $D_v(90)$  représentent les diamètres en dessous desquels 10 %, 50 % et 90 % du volume cumulé des particules sont situés, permettant ainsi de caractériser la distribution en volume des poudres.

Les analyses granulométriques révèlent quelques différences entre les échantillons, mais un profil similaire. Pour la série des céramiques non dopées, les valeurs de  $D_v(50)$  sont comprises entre 13 et 20,2  $\mu\text{m}$ . Il est à souligner que 90 % des particules présentent une taille inférieure à 40,2  $\mu\text{m}$  ; bien que cette valeur soit environ deux fois supérieure à la valeur souhaitée, elle ne concerne qu'une minorité de particules, en effet le  $D_n(90)$  maximum sur l'ensemble des échantillons est de 8,48  $\mu\text{m}$ . Le profil de distribution des céramiques dopées apparaît globalement similaire, suivant une loi log-normale pour les distributions en nombre, avec un diamètre médian compris entre 8,46 et 22,4  $\mu\text{m}$ . Nous pouvons noter la présence de 2 populations de tailles différentes, une première autour de 2  $\mu\text{m}$  et la seconde autour de 20  $\mu\text{m}$ , elles sont plus ou moins marquées en fonction des échantillons.

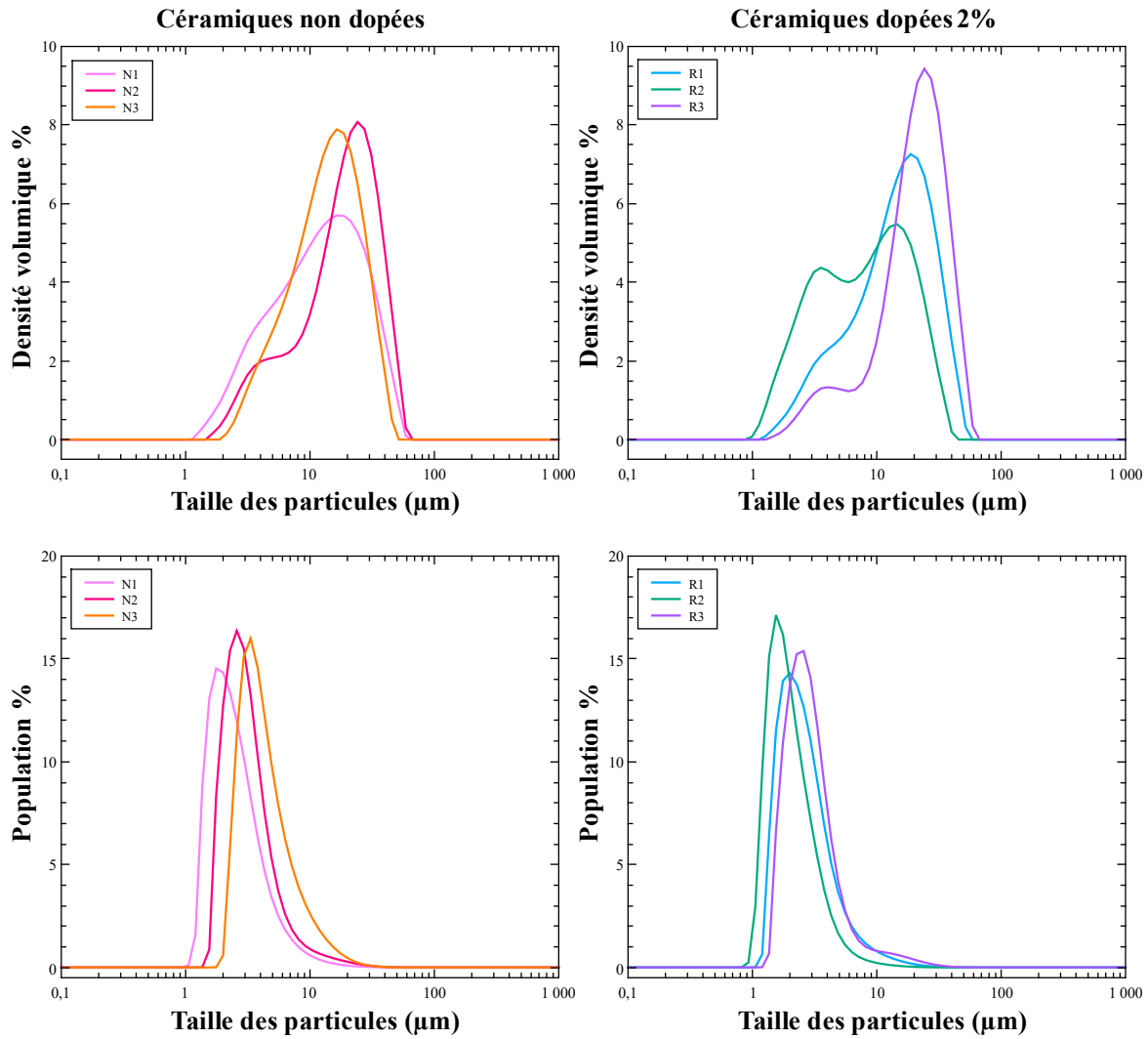


Figure 5-2 Distribution des tailles des particules en volume (haut) et en nombre (bas) pour l'ensemble des séries de synthèse en vue de la mise en forme par PIM.

Tableau 5-1 Diamètre moyen volumique, diamètres médians en volume et en nombre des différents échantillons.

Echantillons	D [4;3]	Dn(10)	Dn(50)	Dn(90)	Dv(10)	Dv(50)	Dv(90)
N1	16,2	1,5	2,3	4,7	3,6	13,0	33,9
N2	21,7	1,9	2,9	5,6	4,6	20,2	40,2
N3	16,6	2,6	3,9	8,5	5,5	14,9	30,5
R1	17,4	1,3	1,9	3,5	4,2	15,5	33,5
R2	28,7	1,3	1,9	3,5	2,4	8,4	23,2
R3	23,6	1,8	2,7	5,4	6,5	22,4	41,1

A la suite de ces analyses, les trois échantillons de chaque céramique sont mélangés manuellement et conditionnés dans deux flacons différents et envoyé au CRITT Matériaux Innovation.

### 5.3 Mise en forme et caractérisations

#### 5.3.1 Mise en forme par PIM

La mise en forme par PIM n'est pas réalisée directement à l'ICCF, il s'agit du CRITT Matériaux Innovation de Charleville-Mézières qui a la charge de cela. L'équipe du CRITT possède déjà en amont du projet toute l'expertise nécessaire à la mise en forme par procédé PIM ainsi que les infrastructures.

Le procédé de mise en forme est le suivant : les feedstocks sont préparés en sous-traitance à partir d'un liant polymère hydrosoluble à base de polyoléfine, auquel sont incorporées les charges céramiques (dopées ou non dopées) ainsi que des particules de NaCl (CRIBLOR, calibrées entre 200 et 400  $\mu\text{m}$ ) utilisées comme espaceurs pour générer la macroporosité. Le mélange est réalisé par extrusion au Centro de Tecnologia e Inovação au Portugal, avec une proportion de 60 % massique de sel par rapport à la charge totale. Le feedstock obtenu est ensuite injecté dans un moule usiné en aluminium (cylindre de 4,4 mm de diamètre et 4,2 mm de hauteur) à l'aide d'une presse manuelle Holimaker, chauffée à 140 °C. Un premier déliantage aqueux permet d'éliminer une partie du liant polymère ainsi que le sel, par immersion dans l'eau déminéralisée pendant 40h à 60 °C. Un déliantage thermique est ensuite réalisé dans un four adapté, pendant 4h à 450 °C. Enfin, les pièces ainsi débarrassées du liant sont frittées sous atmosphère ambiante, avec une montée en température de 4h suivie d'un palier de 1h à 1050 °C. Les cylindres obtenus sont présentés en **Figure 5-3** : les cylindres blancs correspondent au lot de HAp non dopée (nommés HAp) et les cylindres bruns correspondent au lot de céramique dopée à 2% en cuivre, zinc et strontium (nommés HAp dopée). La macroporosité est visible à l'œil nu.



**Figure 5-3** Photo des cylindres de céramiques phosphocalciques mises en forme par PIM, à gauche une céramique non dopée et à droite une céramique dopée à 2% en cuivre, zinc et strontium.

Les caractéristiques des cylindres obtenus après frittage sont présentées dans le **Tableau 5-2**.

**Tableau 5-2** Caractéristiques des cylindres HAp et HAp dopée, moyennes obtenues à partir de 8 échantillons.

Cylindres	Masse (g)	Diamètre (mm)	Longueur (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )	Masse volumique (g.cm <sup>-3</sup> )	Volume de pore (%)
<b>HAp</b>	0,03873 ± 0,00095	3,91 ± 0,09	4,03 ± 0,02	48,4 ± 2,2	0,80 ± 0,40	74,6 ± 1,3
<b>HAp dopée</b>	0,03814 ± 0,00066	3,69 ± 0,10	3,74 ± 0,02	40,0 ± 2,2	0,95 ± 0,40	69,7 ± 1,7

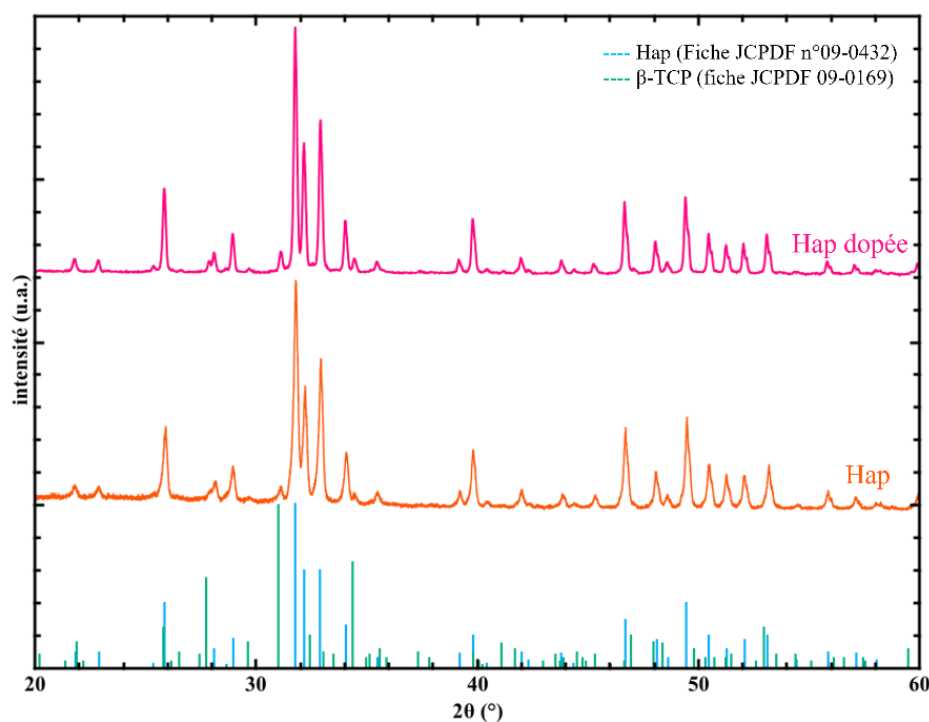
A partir des données précédentes, nous avons pu estimer la porosité des cylindres en nous basant sur leur masse volumique apparente et la masse volumique théorique des deux céramiques ( $\rho_{\text{HAp}} = 3,16 \text{ g.cm}^{-3}$  et  $\rho_{\beta\text{-TCP}} = 3,07 \text{ g.cm}^{-3}$ ) [119], [120]. Le cylindre non dopé, présente une masse volumique apparente de  $0,8 \text{ g.cm}^{-3}$  et un volume total de  $48,4 \text{ mm}^3$ , montrant une porosité élevée d'environ 75 %, correspondant à un volume de pores de  $36 \text{ mm}^3$ . Le cylindre dopé présente une masse volumique apparente de  $0,95 \text{ g.cm}^{-3}$  et un volume total de  $40 \text{ mm}^3$ , la porosité est donc légèrement inférieure, elle est

d'environ 70 %, ce qui correspond à un volume de pores de  $27,9 \text{ mm}^3$ . Ces valeurs confirment que, malgré la porosité macroscopique importante, la consolidation des grains reste efficace et cohérente avec les observations MEB.

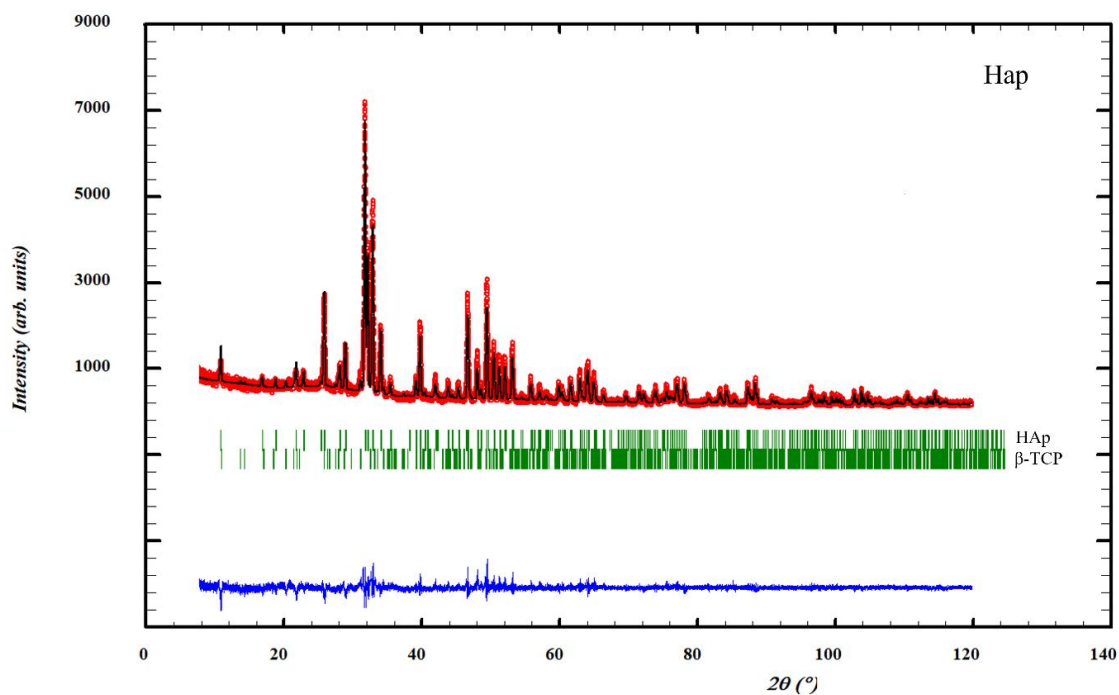
### 5.3.2 Propriétés physico-chimiques après mise en forme

#### ❖ Caractérisation minéralogique des cylindres frittés

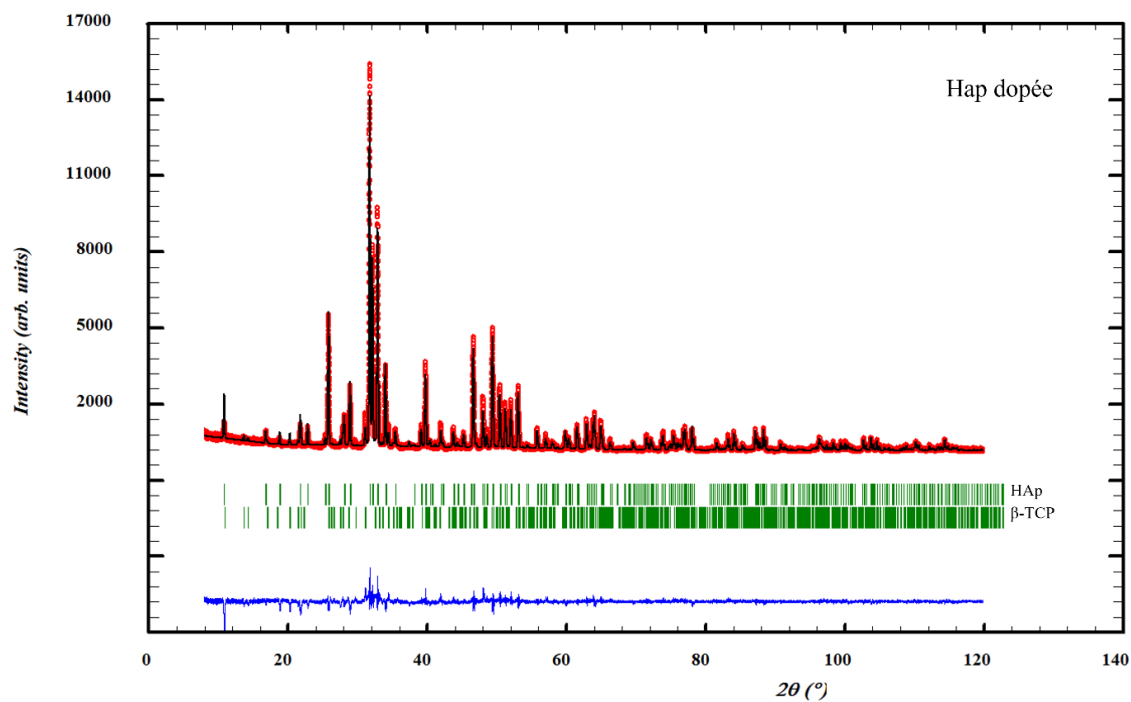
Les échantillons obtenus ont été caractérisés par DRX (sur un cylindre réduit en poudre) suivi d'un affinement Rietveld. La **Figure 5-4** présente les diffractogrammes des deux types d'échantillons. Pour les cylindres non dopés, le résultat de l'affinement est présenté dans la **Figure 5-5**, tandis que pour les cylindres dopés le résultat de l'affinement est présenté dans la **Figure 5-6**.



**Figure 5-4** Diffractogrammes des rayons X des cylindres réduits en poudre.



**Figure 5-5** Affinement de Rietveld des cylindres HAp et identification de phases HAp et  $\beta$ -TCP.



**Figure 5-6** Affinement de Rietveld des cylindres HAp dopée et identification des phases HAp et  $\beta$ -TCP.

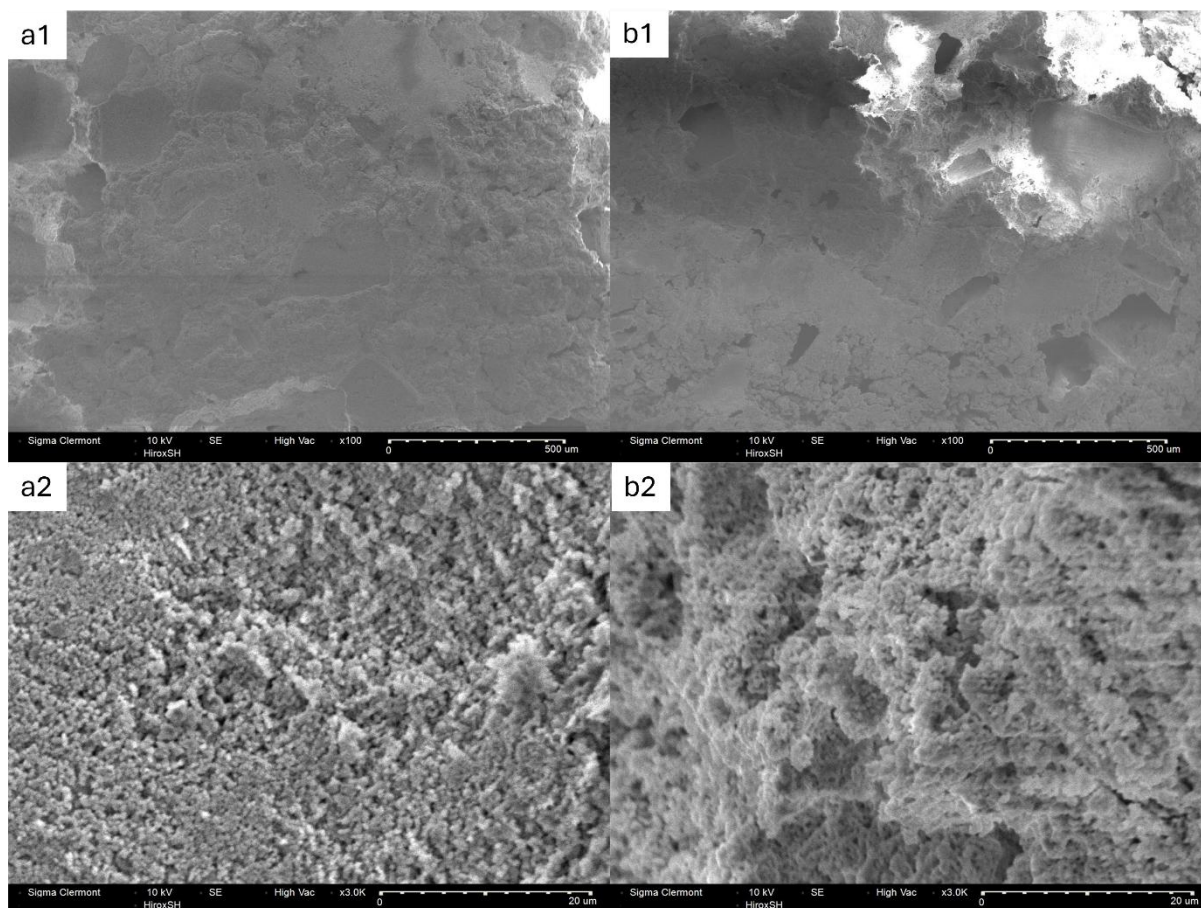
Les deux types de cylindres (dopé et non dopé) ont une composition très proche avec environ 90% d'hydroxyapatite et 10% de  $\beta$ -TCP. On notera l'absence de la phase  $\alpha$ -TCP pour les deux types de cylindres. Cette absence est souhaitée et le traitement thermique a été réalisé de façon à limiter sa présence (cycle de chauffe court). La présence d'éléments dopants ou non étant la seule différence entre ces deux matériaux, ils peuvent donc parfaitement être utilisés pour évaluer les effets biologiques des éléments dopants en utilisant les cylindres non dopés comme références.

**Tableau 5-3** Composition minéralogique des cylindres HAp et HAp dopée.

Echantillon	HAp (%)	$\beta$ -TCP (%)
HAp	92,3 $\pm$ 1.1	7,8 $\pm$ 0.5
HAp dopée	90,2 $\pm$ 0.9	9,8 $\pm$ 0.3

### ❖ Imagerie

Afin de caractériser la morphologie des échantillons, des observations par microscopie électronique à balayage (**Figure 5-7**) ainsi que des images de tomographie à rayon X ont été réalisées sur les cylindres. On peut ainsi observer la macroporosité et l'aspect de la céramique.



**Figure 5-7** Images MEB des différents cylindres (a) cylindre dopé et (b) cylindre non dopé à différents grossissements (1)  $\times 100$  et (2)  $\times 3000$ .

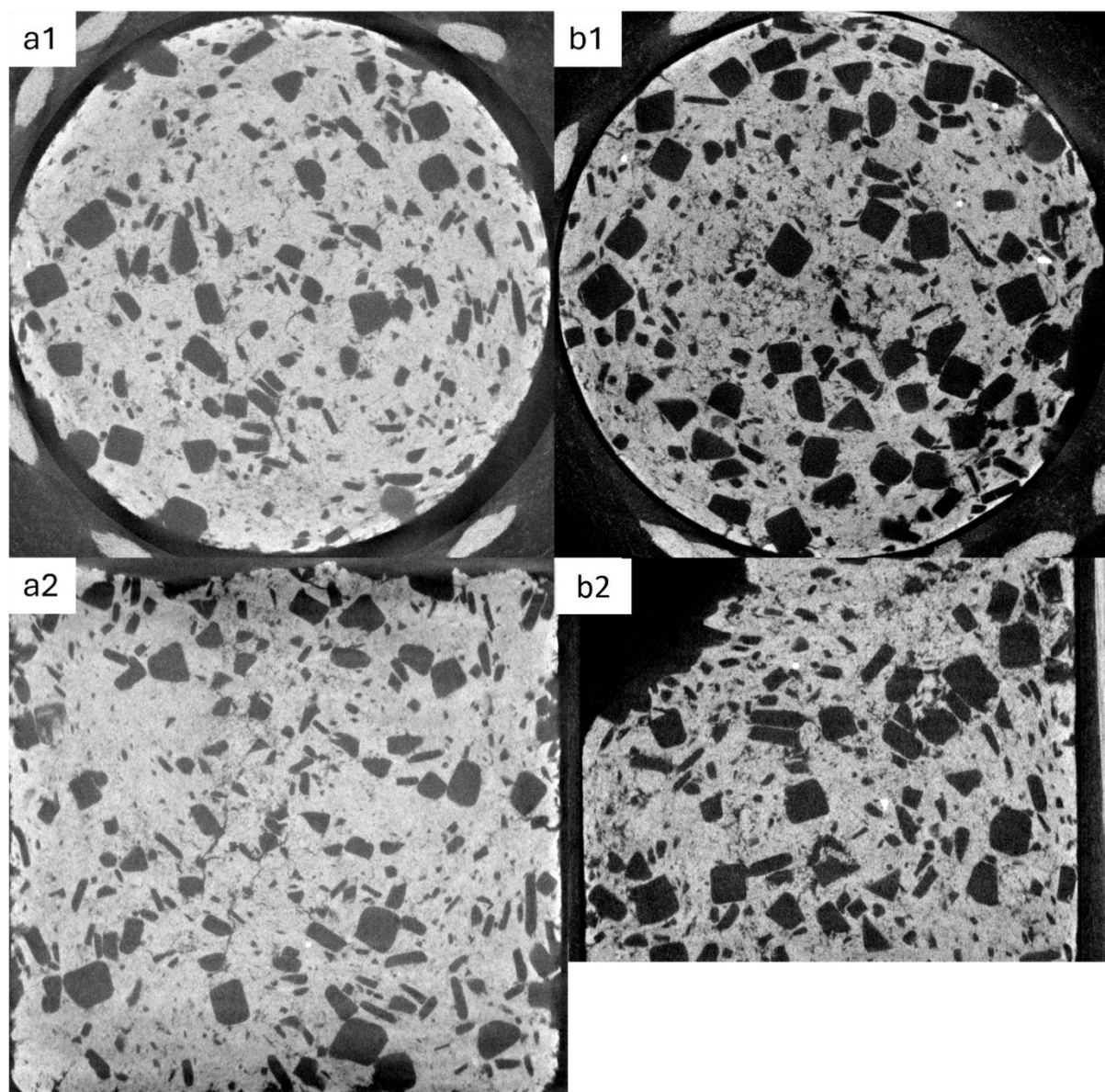
Au grossissement  $\times 100$ , nous pouvons distinguer la surface globale du cylindre. On observe clairement la présence de macropores, provenant de la dissolution des cristaux de sel utilisés lors de la production du feedstock. Ces pores apparaissent majoritairement fermés et non communicants. De plus, les résultats des volumes poreux des cylindres déterminés précédemment et des images de la **Figure 5-7** permettent d'avancer que la structure interne est similaire à celle de la surface, c'est-à-dire présentant de nombreuses cavités.

En augmentant le grossissement, il devient possible d'observer plus finement la microstructure du matériau. On distingue alors les grains de céramique frittés entre eux, avec une bonne cohésion de l'ensemble. La surface présente un aspect « cotonneux », caractéristique déjà observée sur les poudres libres avant mise en forme. Cela confirme que le procédé de

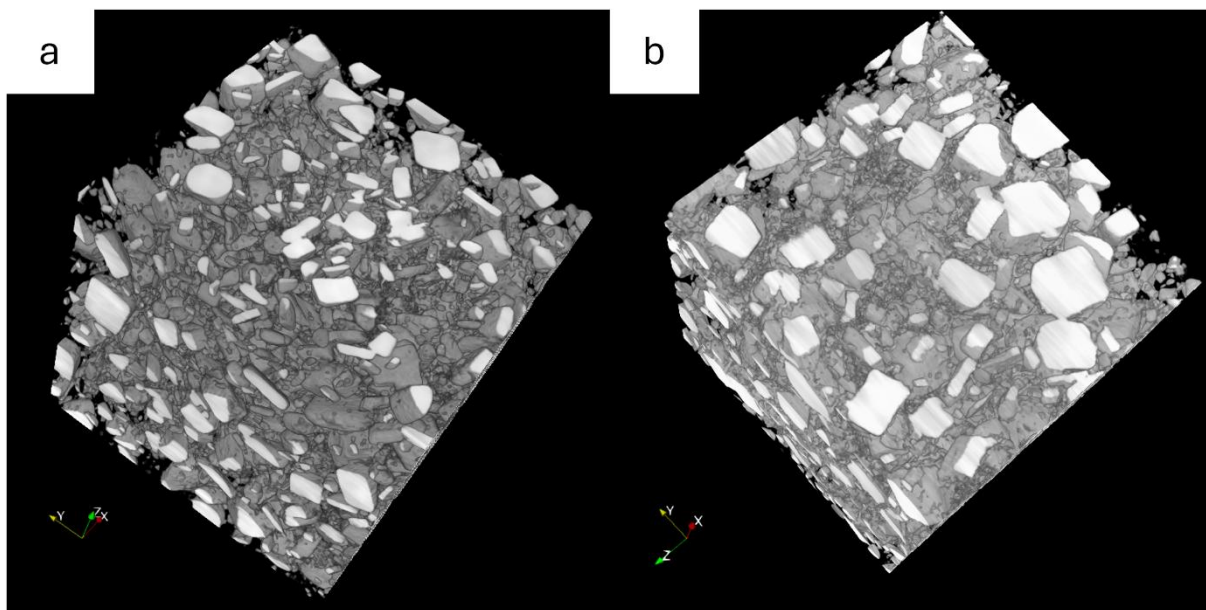
frittage n'a pas totalement modifié la morphologie initiale des particules, mais a permis leur consolidation.

L'imagerie par tomographie X (**Figure 5-8**) a permis d'analyser en détail la porosité interne des échantillons et de mettre en évidence la connectivité des pores, par analyse d'image à l'aide du logiciel IPSDK (Reactiv'IP). Dans les deux cas, on observe une porosité interconnectée principale représentant environ 30 % du volume total de l'échantillon. Cette observation démontre l'interconnexion des pores de grande taille, contrairement aux premières observations que nous avons pu réaliser par microscopie électronique à balayage. Cette interconnexion est directement liée à l'ajout des cristaux de sel. La morphologie des pores présente une géométrie cubique, en accord avec l'habitus des cristaux de NaCl utilisés. Par ailleurs, ces pores sont interconnectés par de fines microfissures visibles sur les images.

Afin de faciliter la visualisation des pores, une reconstruction 3D d'un parallélépipède rectangle extrait de l'intérieur de l'échantillon a été réalisée. Pour améliorer la lisibilité, les pores sont représentés en solide tandis que la matrice est rendue transparente (**Figure 5-9**).



*Figure 5-8 Coupes transversale et longitudinale de l'image réalisée en tomographie à rayon X, les images se situent environ au milieu de l'échantillon, a : échantillon dopé et b : échantillon non dopé sous différents angles 1 : coupe vue du dessus et 2 : coupe vue de face.*



*Figure 5-9 Reconstruction 3D par tomographie X d'un parallélépipède rectangle extrait de l'intérieur des deux échantillons : (a) échantillon dopé et (b) échantillon non dopé. Les pores sont représentés en solide tandis que la matrice est rendue transparente.*

#### ❖ Conclusion

L'analyse des cylindres, à la fois non dopés et dopés, montre que la microstructure est fortement influencée par le procédé de fabrication. Les observations réalisées au MEB et en tomographie à rayon X révèlent une surface avec des grains de céramique frittés et un aspect cotonneux similaire à celui des poudres libres, confirmant la conservation de la morphologie initiale des particules après frittage. De plus les proportions de phases finales sont proches de celles obtenues au laboratoire, ce qui permet de confirmer que la mise en forme modifie uniquement la macrostructure des céramiques et n'influence pas la composition chimique ni l'arrangement des phases à l'échelle microscopique.

Ces caractéristiques physico-chimiques constituent une première étape essentielle pour évaluer le potentiel biomédical des matériaux. Afin de compléter cette étude, il serait désormais intéressant d'explorer les propriétés mécaniques des cylindres, comme leur résistance à la compression. Ces tests permettront de mieux identifier le potentiel effet du

Mise en forme et caractérisations

dopage sur la cohésion du matériau et sur son comportement face à des sollicitations proches de celles rencontrées *in vivo*.

## Conclusion générale et perspectives

---

Cette thèse s'inscrit dans le projet ANR PIMyBone, qui avait pour objectif le développement, la caractérisation physico-chimique et mécanique, et l'évaluation biologique (*in vitro* et *in vivo*) de solutions cliniques *via* des structures macroporeuses, soit céramiques, soit hybrides céramiques/polymère à mémoire de forme. Le travail de cette thèse a porté sur la partie céramique du projet par le développement, la caractérisation physico-chimique, l'évaluation de la cytotoxicité des matériaux et les premières caractérisations physico-chimiques des pièces mises en forme.

La première partie a été consacrée à la synthèse de poudres d'hydroxyapatite dopées multiéléments. La synthèse de céramiques dopées par un seul élément a également été réalisée afin de comparer et d'identifier l'influence du dopage multiélément par rapport à un dopage simple. Les différents protocoles mis en œuvre ont permis d'obtenir des matériaux homogènes composés de deux phases : de l'hydroxyapatite en majorité et du phosphate tricalcique. L'analyse de la composition chimique a mis en évidence une sous-incorporation des différents éléments : seulement 25% et 50% du cuivre et du zinc respectivement s'insèrent, contre 80% pour le strontium. Dans l'ensemble, les éléments dopants ne modifient pas fortement les propriétés de la matrice.

Des essais de cytotoxicité *in vitro* ont ensuite été réalisés par l'équipe BIOS de l'Université Champagne-Ardenne sur les céramiques dopées multiéléments. Dans l'ensemble aucune toxicité majeure n'a été relevée, mais aussi aucun effet réellement bénéfique n'est identifié. Le candidat qui a obtenu les meilleurs résultats lors de ces tests est l'échantillon ayant le taux de dopage le plus élevé, soit l'échantillon HApCu<sub>2</sub>Zn<sub>2</sub>Sr<sub>2</sub>. Cet échantillon a donc été sélectionné pour la suite du projet. La mise en forme des matériaux a été réalisée au CRITT Matériaux Innovation sur une céramique non dopée et

une céramique dopée 2% en chaque élément. Des petits cylindres (4 mm de diamètre et 4 mm de hauteur) ont été fabriqués pour la réalisation d'essais *in vivo* sur les échantillons. Les cylindres présentent une macroporosité de l'ordre de 200-400  $\mu\text{m}$ , due à l'utilisation d'un agent porogène (NaCl) lors de la mise en forme, confirmée par mesure de densité et imagée par tomographie à rayons X.

Les travaux réalisés ouvrent de nombreuses perspectives de recherche. Il serait premièrement intéressant d'approfondir l'étude des mécanismes d'incorporation des ions, notamment étudier le potentiel dopage des deux autres phases présente dans les matériaux synthétisés ( $\beta$ -TCP et  $\alpha$ -TCP). Sur le plan biologique, des analyses *in vivo* menées par l'équipe BIOS de l'université de Reims Champagne Ardenne sont en cours avec les échantillons mis en forme par PIM (échantillons  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$  et  $\text{HApCu}_0\text{Zn}_0\text{Sr}_0$ ) afin d'examiner leur intégration osseuse, leur biocompatibilité et leur potentiel de régénération tissulaire. Par ailleurs, la fabrication de structures tridimensionnelles présentant des géométries plus complexes et des niveaux de porosité multiples, pourrait aussi être un axe d'étude, afin de permettre une utilisation dans diverses indications thérapeutiques, indépendamment de la géométrie du défaut osseux. Enfin la fabrication de composites avec ces matériaux reste à investiguer, par exemple *via* l'intégration des biocéramiques dopées dans des polymères à mémoire de forme. De tels composites seraient très intéressants pour le développement d'implants osseux fonctionnels. En effet, les biocéramiques apporteraient leur propriété de bioactivité, favorisant la régénération osseuse et, pour certains dopants, des propriétés antimicrobiennes, tandis que les polymères à mémoire de forme offriraient la capacité de retrouver une forme prédéfinie après déformation. Cette combinaison permettrait de concevoir des implants capables de se conformer précisément à des défauts osseux irréguliers, tout en assurant une libération contrôlée des ions stimulants pour les cellules. Ainsi, ces composites seraient très prometteurs pour la fabrication d'implants bioactifs, adaptables et multifonctionnels.

## Références bibliographiques

---

- [1] I. L. Weissman, “Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 157–168, 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
- [2] O. O. Ige, L. E. Umoru, and S. Aribo, “Natural Products: A Minefield of Biomaterials,” *ISRN Materials Science*, vol. 2012, pp. 1–20, May 2012, doi: 10.5402/2012/983062.
- [3] E. Marin, F. Boschetto, and G. Pezzotti, “Biomaterials and biocompatibility: An historical overview,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 108, no. 8, pp. 1617–1633, 2020, doi: 10.1002/jbm.a.36930.
- [4] M. Vallet-Regí, “Evolution of Biomaterials,” *Front Mater*, vol. 9, Mar. 2022, doi: 10.3389/fmats.2022.864016.
- [5] J. L. Gilbert, *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine*. 2020.
- [6] C. Richard, “Corrosion et traitements de surface des biomatériaux,” *Techniques de l'ingénieur*, vol. cor140, no. 0, pp. 1–20, Dec. 2010.
- [7] Z. Li and J. Guan, “Hydrogels for cardiac tissue engineering,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 2, pp. 740–761, Apr. 2011, doi: 10.3390/polym3020740.
- [8] F. Vergnaud, “De l’élaboration et de l’étude d’hétérostructures nanométriques , magnétiques et bioactives , destinées au traitement des cancers osseux,” Université Clermont Auvergne, 2023.
- [9] N. Huebsch and D. J. Mooney, “Inspiration and application in the evolution of biomaterials,” *Nature*, vol. 462, no. 7272, pp. 426–432, 2009, doi: 10.1038/nature08601.
- [10] S. Pawar, “Marché mondial des substituts osseux – Tendances et prévisions de l’industrie jusqu’en 2029,” Nov. 2022.
- [11] D. Mainard, “Substituts osseux,” *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, vol. 93, no. 7, pp. 22–23, 2007, doi: 10.1016/s0035-1040(07)79365-0.
- [12] L. P. Pierre Marquet, Antoine Durrbach, “Transplantation d’organes / Greffe.” [Online]. Available: [https://www.inserm.fr/dossier/transplantation-organes-greffe/#:~:text=Une transplantation \(ou greffe\) est,rejet de l’organe greffé.](https://www.inserm.fr/dossier/transplantation-organes-greffe/#:~:text=Une%20transplantation%20(ou%20greffe)%20est,rejet%20de%20l'organe%20greff%C3%A9.)
- [13] A. W. Plum and S. A. Tatum, “A comparison between autograft alone, bone cement, and demineralized bone matrix in cranioplasty,” *Laryngoscope*, vol. 125, no. 6, pp. 1322–1327, 2015, doi: 10.1002/lary.25158.
- [14] C. J. Haggerty, C. T. Vogel, and G. R. Fisher, “Simple Bone Augmentation for Alveolar Ridge Defects,” *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, vol. 27, no. 2, pp. 203–226, 2015, doi: 10.1016/j.coms.2015.01.011.

## Références bibliographiques

- [15] J. H. Yang, J. D. Glaeser, L. E. A. Kanim, C. Y. Battles, S. Bondre, and H. W. Bae, “Bone Grafts and Bone Graft Substitutes,” *Handbook of Spine Technology*, pp. 197–273, 2021, doi: 10.1007/978-3-319-44424-6\_36.
- [16] H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, and G. Perale, “Bone grafts: which is the ideal biomaterial?,” *J Clin Periodontol*, vol. 46, no. S21, pp. 92–102, 2019, doi: 10.1111/jcpe.13058.
- [17] H. C. Pape, A. Evans, and P. Kobbe, “Autologous bone graft: Properties and techniques,” *J Orthop Trauma*, vol. 24, no. SUPPL. 1, pp. 36–40, 2010, doi: 10.1097/BOT.0b013e3181cec4a1.
- [18] V. K. Panchbhavi, “Synthetic Bone Grafting in Foot and Ankle Surgery,” *Foot Ankle Clin*, vol. 15, no. 4, pp. 559–576, 2010, doi: 10.1016/j.fcl.2010.07.004.
- [19] ISO 10993-1, “Évaluation biologique des dispositifs médicaux,” 2018.
- [20] S. Ramakrishna, L. Tian, C. Wang, S. Liao, and W. E. Teo, “Safety testing of a new medical device,” *Medical Devices*, pp. 137–153, 2015, doi: 10.1016/b978-0-08-100289-6.00006-5.
- [21] K. Y. Lee *et al.*, “Ceramic bioactivity: Progresses, challenges and perspectives,” *Biomedical Materials*, vol. 1, no. 2, 2006, doi: 10.1088/1748-6041/1/2/R01.
- [22] J. LAO and J.-M. NEDELEC, “Verres bioactifs,” *Verres et céramiques*, vol. 33, no. 0, 2014, doi: 10.51257/a-v1-n4955.
- [23] V. M. Wu and V. Uskoković, “Is there a relationship between solubility and resorbability of different calcium phosphate phases in vitro?,” *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1860, no. 10, pp. 2157–2168, 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.05.022.
- [24] T. Okuda *et al.*, “The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 18, pp. 2719–2728, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.028.
- [25] A. P. Ng and W. S. Alexander, “Haematopoietic stem cells: Past, present and future,” *Cell Death Discov*, vol. 3, no. December 2016, pp. 2–5, 2017, doi: 10.1038/cddiscovery.2017.2.
- [26] Ż. Ciosek, K. Kot, D. Kosik-Bogacka, N. Łanocha-Arendarczyk, and I. Rotter, “The effects of calcium, magnesium, phosphorus, fluoride, and lead on bone tissue,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 4, 2021, doi: 10.3390/biom11040506.
- [27] N. J. Gal and W. J. Dahl, “Facts about Phosphorus,” *Edis*, vol. 2014, no. 1, pp. 13–15, 2014, doi: 10.32473/edis-fs237-2013.
- [28] M. BERT, *Implantologie Bases fondamentales Conséquences cliniques*. 2021.
- [29] F. Jordana, C. Le Visage, and P. Weiss, “Substituts osseux,” *Medecine/Sciences*, vol. 33, no. 1, pp. 60–65, 2017, doi: 10.1051/medsci/20173301010.

## Références bibliographiques

- [30] A. Gourrier and I. Reiche, “Chapitre 3 L’os: morphologie , structure et composition chimique,” *Editions des Archives Contemporaines*, no. Sciences Archéologiques, pp. 23–37, 2015, doi: 9782813001641.
- [31] A. L. Boskey and P. G. Robey, “The composition of bone,” *American Society for Bone and Mineral Research*, pp. 84–92, 2013, doi: 10.1002/9781119266594.ch11.
- [32] C. Drouet, D. Grossin, C. Combes, S. Sarda, S. Cazalbou, and C. Rey, “Apatites biomimétiques - Des biominéraux aux analogues de synthèse pour le biomédical,” *techniques de l’ingénieur*, vol. 33, no. 0, Jun. 2018, doi: 10.51257/a-v1-in227.
- [33] B. Charbonnier, “Développement de procédés de mise en forme et de caractérisation pour l’élaboration de biocéramiques en apatites phosphocalciques carbonatées,” Université de Lyon, 2016. doi: 2016LYSEM031.
- [34] M. Vernejoul and P. Marie, “Cellules osseuses et remodelage osseux.,” *Médecine/Sciences*, vol. 9, no. 11, p. 1192, 1993, doi: 10.4267/10608/2832.
- [35] M. Evode Iradufasha, W. Wei, M. Pedron, E. Debevec-McKenney, Ms. Ursula Florjanczyk, and C. Elizabeth Nixon-Shapiro, MSMI, “Bone remodeling and repair.” [Online]. Available: [https://www.osmosis.org/learn/Bone\\_remodeling\\_and\\_repair](https://www.osmosis.org/learn/Bone_remodeling_and_repair)
- [36] C. Collet and R. Chapurlat, “Ostéoporose Des os fragilisés à risque de fracture.” Accessed: Dec. 16, 2024. [Online]. Available: <https://www.inserm.fr/dossier/osteoporose/#:~:text=L’ostéoporose est une maladie,considérablement le risque de fractures.>
- [37] Has, “Prévention , diagnostic et traitement de l ’ ostéoporose,” *Osteoporosis International*, pp. 1–19, 2006.
- [38] M. B. Bolster, “Ostéoporose,” Le manuel du MSD. Accessed: Feb. 04, 2025. [Online]. Available: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/troubles-musculosquelettiques-et-du-tissu-conjonctif/ostéoporose/ostéoporose>
- [39] Société Française de Rhumatologie, “Capital osseux au cours de la vie.” Accessed: Feb. 04, 2025. [Online]. Available: <https://public.larhumatologie.fr/capital-osseux-au-cours-de-la-vie>
- [40] Ostéoporose Canada, “L’Ostéoporose secondaire,” 2025, Accessed: Feb. 05, 2025. [Online]. Available: <https://osteoporosecanada.ca/osteoporose-secondaire/>
- [41] B. Uebelhart and R. Rizzoli, “Traitement de l’ostéoporose,” pp. 150–153, 2007.
- [42] Ligue contre le cancer, “Cancer des os.” Accessed: Feb. 05, 2025. [Online]. Available: <https://www.ligue-cancer.net/questce-que-le-cancer/les-types-de-cancer/cancer-des-os>
- [43] D. Heymann and G. François, “Sarcomes osseux : les symptômes et le diagnostic,” 2025.

## Références bibliographiques

- [44] D. Schaeue and W. H. McBride, “Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 12, no. 9, pp. 527–540, 2015, doi: 10.1038/nrclinonc.2015.120.
- [45] “La chimiothérapie”, Accessed: Feb. 10, 2025. [Online]. Available: <https://www.gustaveroussy.fr/fr/chimiotherapie#:~:text=La%20chimioth%C3%A9rapie%20d%C3%A9signe%20les%20traitements,d'autres%20plus...>
- [46] D. W. Sanders *et al.*, “Critical-sized defect in the Tibia: Is it critical? Results from the SPRINT trial,” *J Orthop Trauma*, vol. 28, no. 11, pp. 632–635, 2014, doi: 10.1097/BOT.000000000000194.
- [47] G. Arealis and V. S. Nikolaou, “Bone printing: New frontiers in the treatment of bone defects,” *Injury*, vol. 46, pp. S20–S22, 2015, doi: 10.1016/S0020-1383(15)30050-4.
- [48] S. France, “Principaux résultats de l’enquête nationale de prévalence 2022 des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé,” 2022.
- [49] Réseau ISO-Raisin, “Surveillance des infections du site opératoire dans les établissements de santé français,” Feb. 2019.
- [50] D. Michel, “Matériaux céramiques Structure et propriétés,” vol. 91, pp. 181–195, 1997.
- [51] Y. Yang, Y. Kang, M. Sen, and S. Park, “Bioceramics in Tissue Engineering,” *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends*, pp. 179–207, 2011, doi: 10.1007/978-3-7091-0385-2.
- [52] A. Marti, “Inert bioceramics (Al<sub>3</sub>O<sub>3</sub>,ZrO<sub>2</sub>) for medical application,” *Injury*, vol. 31, no. SUPPL. 4, pp. 33–36, 2000, doi: 10.1016/S0020-1383(00)80021-2.
- [53] L. Gremillard and J. Chevalier, “Matériaux céramiques pour les prothèses orthopédiques Matériaux céramiques pour les prothèses orthopédiques,” vol. 33, no. 0, 2016.
- [54] J.-L. Vignes, “Alumine alpha.” [Online]. Available: <https://lelementarium.fr/product/alumine-alpha/#:~:text=L'alumine alpha ou corindon,pour une utilisation comme abrasif.>
- [55] A. Ignatius *et al.*, “Osseointegration of alumina with a bioactive coating under load-bearing and unloaded conditions,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2325–2332, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.029.
- [56] X. J. Jin, “Martensitic transformation in zirconia containing ceramics and its applications,” *Curr Opin Solid State Mater Sci*, vol. 9, no. 6, pp. 313–318, 2005, doi: 10.1016/j.cossms.2006.02.012.
- [57] D. Wang, Y. Guo, K. Liang, and K. Tao, “Crystal structure of zirconia by Rietveld refinement,” *Sci China Ser A Math Phys Astron*, vol. 42, no. 1, pp. 80–86, 1999, doi: 10.1007/BF02872053.
- [58] P. Bouvier, E. Djurado, G. Lucazeau, and T. Le Bihan, “High-pressure structural evolution of undoped tetragonal nanocrystalline zirconia,” *Phys Rev*

## Références bibliographiques

- B Condens Matter Mater Phys*, vol. 62, no. 13, pp. 8731–8737, 2000, doi: 10.1103/PhysRevB.62.8731.
- [59] G. Moulin, J. Favergeon, and G. Beranger, “Zircone - Céramique fonctionnelle,” *technique de l'ingénieur*, vol. 33, no. 0, Oct. 2008.
- [60] E. N. S. de Araújo-Júnior *et al.*, “Ultra-translucent zirconia processing and aging effect on microstructural, optical, and mechanical properties,” *Dental Materials*, vol. 38, no. 4, pp. 587–600, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.DENTAL.2022.02.016.
- [61] P. F. Manicone, P. Rossi Iommetti, and L. Raffaelli, “An overview of zirconia ceramics: Basic properties and clinical applications,” *J Dent*, vol. 35, no. 11, pp. 819–826, Nov. 2007, doi: 10.1016/J.JDENT.2007.07.008.
- [62] L. L. Hench, “The story of Bioglass®,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, 2006, doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [63] L. L. Hench, “Bioceramics: From Concept to Clinic,” *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 74, no. 7, 1991, doi: 10.1201/9781003258353-11.
- [64] S. M. Rabiee, N. Nazparvar, M. Azizian, D. Vashaei, and L. Tayebi, “Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review,” *Ceram Int*, vol. 41, no. 6, pp. 7241–7251, 2015, doi: 10.1016/j.ceramint.2015.02.140.
- [65] C. Vichery and J. M. Nedelec, “Bioactive glass nanoparticles: From synthesis to materials design for biomedical applications,” *Materials*, vol. 9, no. 4, 2016, doi: 10.3390/ma9040288.
- [66] I. CEA-IRAMIS, “Synthèse avancée: Spray Pyrolyse en Flamme (FSP) pour la synthèse de nanomatériaux.” Accessed: Mar. 10, 2025. [Online]. Available: <https://iramis.cea.fr/nimbe/leel/advanced-synthesis/>
- [67] R. Li, A. E. Clark, and L. L. Hench, “An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing,” *Journal of Applied Biomaterials*, 1991.
- [68] C. COMBES and C. REY, “Biomatériaux à base de phosphates de calcium,” *Verres et céramiques*, vol. 33, no. 0, 2013, doi: 10.51257/a-v1-n4950.
- [69] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, and D. Grossin, *Bioactive ceramics: Physical chemistry*, vol. 1. Elsevier Ltd., 2011. doi: 10.1016/b978-0-08-055294-1.00178-1.
- [70] O. Suzuki, Y. Shiwaku, and R. Hamai, “Octacalcium phosphate bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials,” *Dent Mater J*, vol. 39, no. 2, pp. 187–199, 2020, doi: 10.4012/dmj.2020-001.
- [71] M. Bertolus and M. Defranceschi, “Les apatites : des phosphates naturels,” *Technologies biomédicales*, vol. 33, no. 0, pp. 0–9, 2004, doi: 10.51257/a-v1-af6610.
- [72] K. Sudarsanan and R. A. Young, “Significant precision in crystal structural details. Holly Springs hydroxyapatite,” *Acta Crystallogr B*, vol. 25, no. 8, pp. 1534–1543, 1969, doi: 10.1107/s0567740869004298.

## Références bibliographiques

- [73] J. Terra, E. R. Dourado, J. G. Eon, D. E. Ellis, G. Gonzalez, and A. M. Rossi, “The structure of strontium-doped hydroxyapatite: An experimental and theoretical study,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 11, no. 3, pp. 568–577, 2009, doi: 10.1039/b802841a.
- [74] S. V Dorozhkin, “Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature,” *World J Methodol*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2012, doi: 10.5662/wjm.v2.i1.1.
- [75] K. Tõnsuaadu, K. A. Gross, L. Pluduma, and M. Veiderma, “A review on the thermal stability of calcium apatites,” *J Therm Anal Calorim*, vol. 110, no. 2, pp. 647–659, 2012, doi: 10.1007/s10973-011-1877-y.
- [76] D. Brazete, P. M. C. Torres, J. C. C. Abrantes, and J. M. F. Ferreira, “Influence of the Ca/P ratio and cooling rate on the allotropic  $\alpha \leftrightarrow \beta$ -tricalcium phosphate phase transformations,” *Ceram Int*, vol. 44, no. 7, pp. 8249–8256, 2018, doi: 10.1016/j.ceramint.2018.02.005.
- [77] C. P. A. T. Klein, J. M. A. de Blicck-Hogemrst, J. G. C. Wolket, and K. de Groot, “Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro,” *Biomaterials*, vol. 11, no. 7, pp. 509–512, 1990, doi: 10.1016/0142-9612(90)90067-Z.
- [78] H. Rojbani, M. Nyan, K. Ohya, and S. Kasugai, “Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 98 A, no. 4, pp. 488–498, 2011, doi: 10.1002/jbm.a.33117.
- [79] Z. Evis and T. J. Webster, “Nanosize hydroxyapatite: Doping with various ions,” Jul. 2011. doi: 10.1179/1743676110Y.0000000005.
- [80] A. Bigi, E. Boanini, and M. Gazzano, “Ion Substitution in Biological and Synthetic Apatites,” in *Biomineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications*, Elsevier Inc., 2016, pp. 235–266. doi: 10.1016/B978-1-78242-338-6.00008-9.
- [81] A. Jacobs, “Dopage et mise en forme de biocéramiques apatitiques pour applications en ingénierie tissulaire osseuse,” Université Clermont Auvergne, 2020.
- [82] Z. Kubiak-Mihkelsoo *et al.*, “Ionic Doping of Hydroxyapatite for Bone Regeneration: Advances in Structure and Properties over Two Decades—A Narrative Review,” Feb. 01, 2025, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/app15031108.
- [83] Z. Zhou, Q. Wang, X. Ge, and Z. Li, “Strontium Doped Hydroxyapatite Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Simulation,” *Wuji Cailiao Xuebao/Journal of Inorganic Materials*, vol. 35, no. 11, pp. 1283–1289, Nov. 2020, doi: 10.15541/jim20190439.
- [84] K. Matsunaga, H. Murata, T. Mizoguchi, and Atsushi Nakahira, “Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite,” *Acta Biomater*, vol. 6, no. 6, pp. 2289–2293, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2009.11.029.

## Références bibliographiques

- [85] S. Gomes, J. M. Nedelec, E. Jallot, D. Sheptyakov, and G. Renaudin, “Unexpected mechanism of Zn<sup>2+</sup> insertion in calcium phosphate bioceramics,” *Chemistry of Materials*, vol. 23, no. 12, pp. 3072–3085, Jun. 2011, doi: 10.1021/cm200537v.
- [86] S. Gomes *et al.*, “Cu-doping of calcium phosphate bioceramics: From mechanism to the control of cytotoxicity,” *Acta Biomater*, vol. 65, pp. 462–474, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2017.10.028.
- [87] T. Tite *et al.*, “Cationic substitutions in hydroxyapatite: Current status of the derived biofunctional effects and their in vitro interrogation methods,” Oct. 24, 2018, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ma11112081.
- [88] Ł. Pajchel, M. Budnicka, M. Wawryniuk, R. Grygoruk, E. Bednarczyk, and J. Kolmas, “Revisiting Physicochemical and Biological Properties of Zn<sup>2+</sup> - Enriched Hydroxyapatite,” *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 18, pp. 515–530, 2025, doi: 10.2147/NSA.S545378.
- [89] A. Hoppel *et al.*, “Cu-doped calcium phosphate supraparticles for bone tissue regeneration,” *RSC Adv*, vol. 14, no. 45, pp. 32839–32851, Oct. 2024, doi: 10.1039/d4ra04769a.
- [90] Y. Fu and D. CHEN, “Influence of Sr<sup>2+</sup> on strontium Substituted Hydroxyapatite’s (Sr-HA) Cytotoxicity,” *Oral Tissue Engin*, 2005.
- [91] P. Arokiasamy *et al.*, “Synthesis methods of hydroxyapatite from natural sources: A review,” Jun. 01, 2022, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.ceramint.2022.03.064.
- [92] D. M. Liu, T. Troczynski, and W. J. Tseng, “Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: Process development,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 13, pp. 1721–1730, 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00332-X.
- [93] M. Akram, A. Z. Alshemary, Y. F. Goh, W. A. Wan Ibrahim, H. O. Lintang, and R. Hussain, “Continuous microwave flow synthesis of mesoporous hydroxyapatite,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 56, pp. 356–362, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.06.040.
- [94] D. Marchat *et al.*, “Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route,” *Acta Biomater*, vol. 9, no. 6, pp. 6992–7004, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.011.
- [95] J. L. Niu, “Hydrothermal Synthesis of Nano-Crystalline Hydroxyapatite,” *Key Eng Mater*, vol. 330–332, no. 3, pp. 247–250, 2007, doi: 10.4028/www.scientific.net/kem.330-332.247.
- [96] B. Małecka, A. Łącz, E. Drozd, and A. Małecki, “Thermal decomposition of d-metal nitrates supported on alumina,” *J Therm Anal Calorim*, vol. 119, no. 2, pp. 1053–1061, 2015, doi: 10.1007/s10973-014-4262-9.
- [97] J.-M. Joubert, “Contribution of the Rietveld Method to Non-Stoichiometric Phase Modeling. Part I: generalities,” 2002. [Online]. Available: [www.ccpl4.ac.uk](http://www.ccpl4.ac.uk)

## Références bibliographiques

- [98] L. M. Rodríguez-Lorenzo, J. N. Hart, and K. A. Gross, “Structural and chemical analysis of well-crystallized hydroxyfluorapatites,” *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 33, pp. 8316–8320, 2003, doi: 10.1021/jp027556o.
- [99] M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, and A. Hoshikawa, “Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction,” *J Solid State Chem*, vol. 175, no. 2, pp. 272–277, 2003, doi: 10.1016/S0022-4596(03)00279-2.
- [100] M. Mathew, L. W. Schroeder, B. Dickens, and W. E. Brown, “The crystal structure of  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,” *Acta Crystallogr B*, vol. 33, no. 5, pp. 1325–1333, 1977, doi: 10.1107/s0567740877006037.
- [101] Material properties, “Oxyde de cuivre.” Accessed: Nov. 22, 2025. [Online]. Available: Oxyde de cuivre
- [102] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj, and H. Ivanković, “Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review,” *Open Ceramics*, vol. 6, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.oceram.2021.100122.
- [103] M. Harkat, S. Alleg, R. Chemam, S. Azzaza, M. Mokhtari, and E. Dhahri, “Synthesis and characterization of thermally stable hydroxyapatite,” *Annales de Chimie: Science des Matériaux*, vol. 45, no. 1, pp. 43–50, Feb. 2021, doi: 10.18280/acsm.450106.
- [104] A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant, and E. Laborde, “Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate,” *Mater Chem Phys*, vol. 80, no. 1, pp. 269–277, 2003, doi: 10.1016/S0254-0584(02)00466-2.
- [105] R. D. Shannon, “Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides,” *Acta Crystallographica Section A*, vol. 32, no. 5, pp. 751–767, 1976, doi: 10.1107/S0567739476001551.
- [106] N. Somers *et al.*, “Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup> co-doped  $\beta$ -tricalcium phosphate: improved thermal stability, mechanical and biological properties,” *Journal of the American Ceramic Society*, Jul. 2023, doi: 10.1111/jace.19093.
- [107] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, and P. Thomas, “Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1065–1072, 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00218-6.
- [108] H. Gheisari, E. Karamian, and M. Abdollahi, “A novel hydroxyapatite - Hardystonite nanocomposite ceramic,” *Ceram Int*, vol. 41, no. 4, pp. 5967–5975, May 2015, doi: 10.1016/j.ceramint.2015.01.033.
- [109] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [110] A. Noori *et al.*, “Exploring the various effects of Cu doping in hydroxyapatite nanoparticle,” *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-53704-x.

## Références bibliographiques

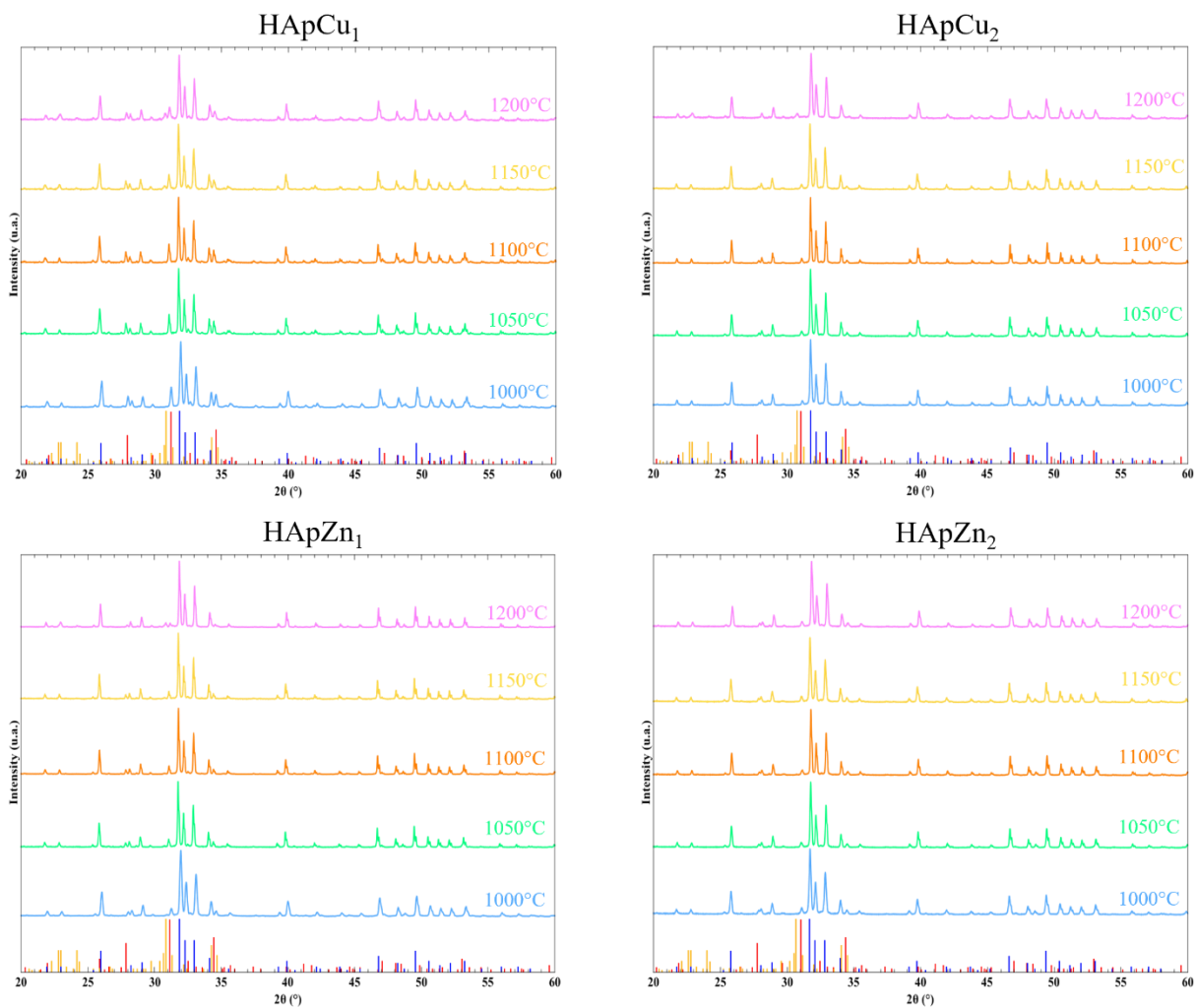
- [111] J. Li, X. Liu, S. Park, A. L. Miller, A. Terzic, and L. Lu, “Strontium-substituted hydroxyapatite stimulates osteogenesis on poly(propylene fumarate) nanocomposite scaffolds,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 107, no. 3, pp. 631–642, Mar. 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36579.
- [112] H. M. McBride, M. Neuspiel, and S. Wasiak, “Mitochondria: More Than Just a Powerhouse,” Jul. 25, 2006. doi: 10.1016/j.cub.2006.06.054.
- [113] C. Korzeniewski and D. M. Callewaert, “An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity 1,” 1983.
- [114] D. Moinard and C. Rigollet, “Procédés de frittage PIM,” Jun. 2011.
- [115] D. Acharya, “Moulage par injection de poudre PIM : processus, types et utilisations.” Accessed: May 20, 2025. [Online]. Available: <https://proleantech.com/fr/powder-injection-molding-details/>
- [116] H. Ou, M. Sahli, J. C. Gelin, and T. Barrière, “Experimental analysis and finite element simulation of the co-sintering of bi-material components,” Dec. 01, 2014, *Elsevier B. V.* doi: 10.1016/j.powtec.2014.08.023.
- [117] ARBURG, “Powder injection molding (PIM).” Accessed: May 20, 2025. [Online]. Available: <https://www.arburg.com/en/us/solutions/by-technology/powder-injection-moulding/>
- [118] V. Momeni *et al.*, “Research Progress on Low-Pressure Powder Injection Molding,” Jan. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/ma16010379.
- [119] M. Bohner, B. L. G. Santoni, and N. Döbelin, “ $\beta$ -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties,” Sep. 01, 2020, *Acta Materialia Inc.* doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.022.
- [120] T. V. Safronova, M. A. Shekhirev, V. I. Putlyaev, and Y. D. Tret'yakov, “Hydroxyapatite-based ceramic materials prepared using solutions of different concentrations,” *Inorganic Materials*, vol. 43, no. 8, pp. 901–909, Aug. 2007, doi: 10.1134/S0020168507080158.
- [121] B. Charbonnier, C. Laurent, and D. Marchat, “Porous hydroxyapatite bioceramics produced by impregnation of 3D-printed wax mold: Slurry feature optimization,” *J Eur Ceram Soc*, vol. 36, no. 16, pp. 4269–4279, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2016.06.005.
- [122] T. S. B. Narasaraju and D. E. Phebe, “Review Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite,” 1996.
- [123] U.S. Department of Health and Human Services, “nuclear factor-kappa B.”
- [124] Illouz Frédéric, “Pathologie de l’axe gonadique.” [Online]. Available: <https://www.maladies-endocriniennes.fr/pathologies/pathologie-de-laxe-gonadique/#:~:text=Que sont les déficits gonadotropes,%2Fou de l’hypophyse.>

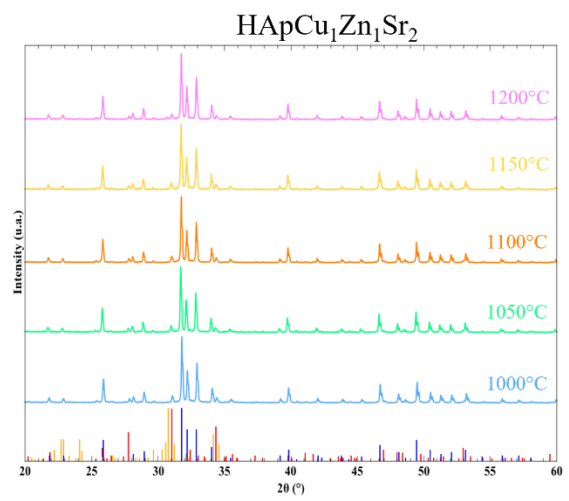
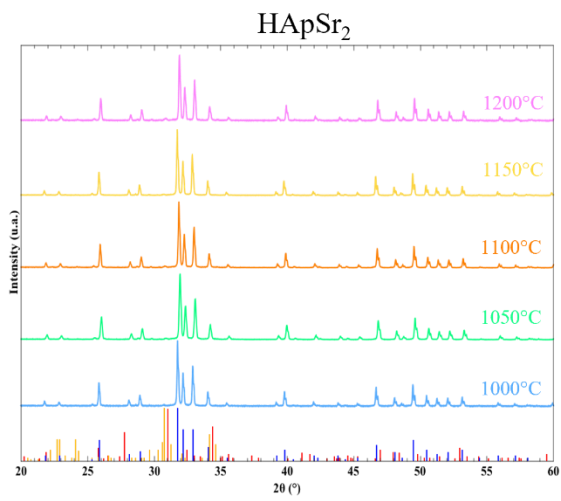


# Annexes

## DRX de l'ensemble des échantillons

Les phases hydroxyapatite, phosphate tricalique  $\beta$  et  $\alpha$  sont représentés par des barres bleues, rouges et oranges respectivement, d'après les différentes fiches PDF 09-0432, PDF 09-0169 et PDF 09-0348.

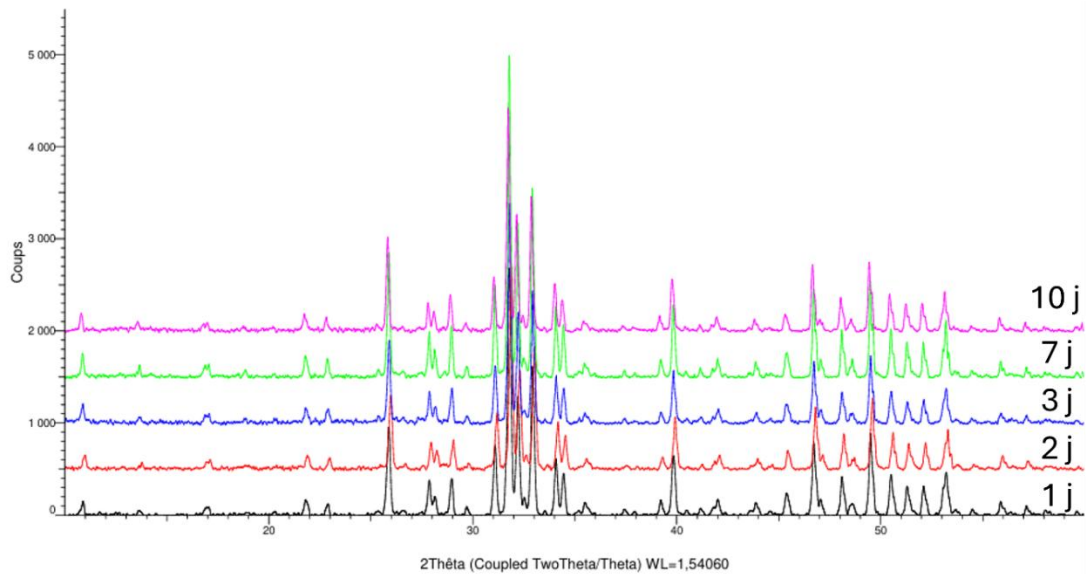




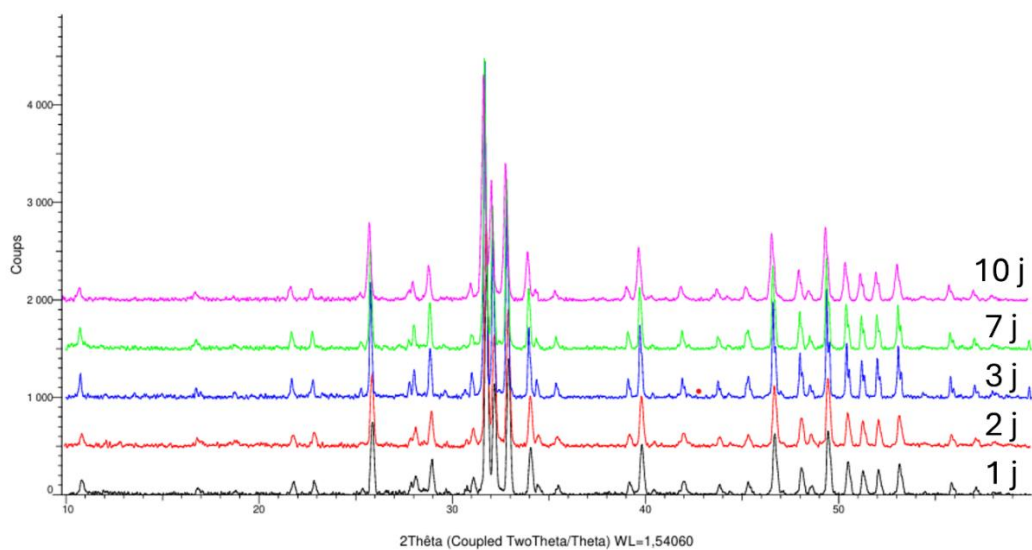
## DRX des échantillons après relargage

Les diffractogrammes sont tracé de bas en haut en fonction de leurs temps d'immersion. Noir : 1jour, rouge : 2 jours, bleu : 3 jours, vert : 7 jours et rose : 10 jours. Les deux phases présentes sont l'hydroxyapatite (PDF 09-0432) et  $\beta$ -TCP (PDF 09-0169)

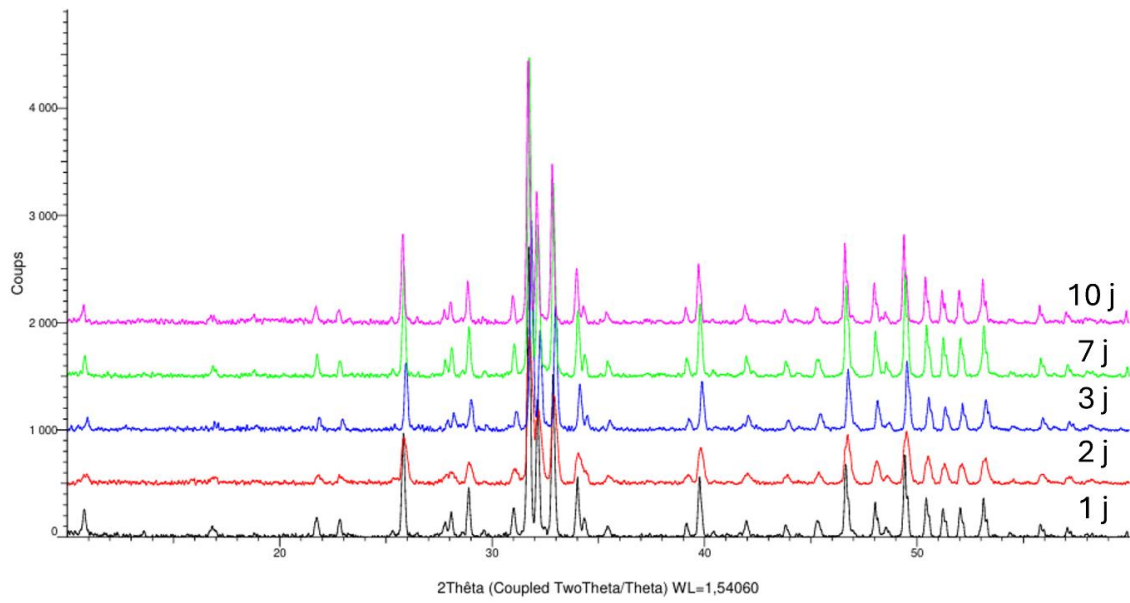
### HApCu<sub>1</sub>



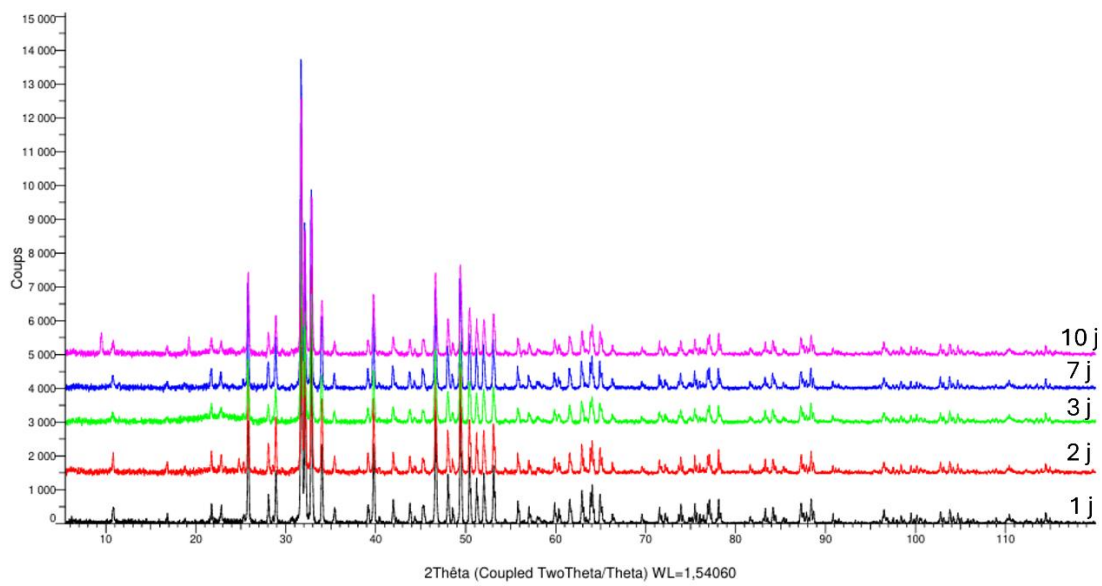
### HApZn<sub>1</sub>



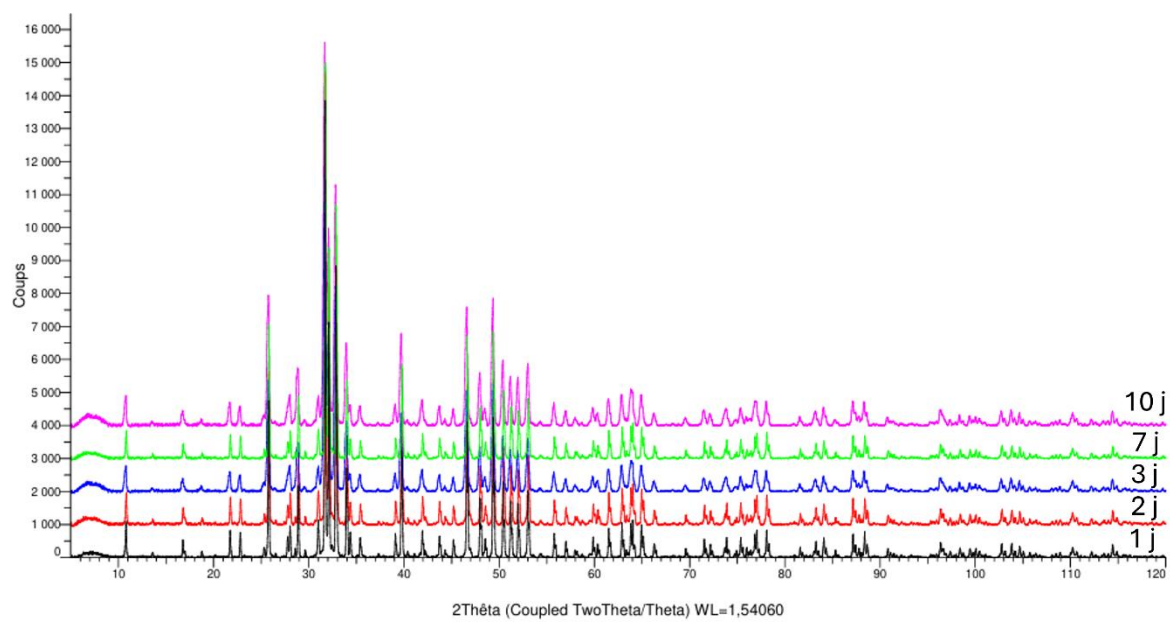
## HApSr<sub>2</sub>



## HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>



HApCu<sub>1</sub>Zn<sub>1</sub>Sr<sub>2</sub>



# Exemples de synthèse ayant été réalisées afin d'optimiser la synthèse des BCP dopés multi-éléments

## Synthèse 1 (adaptation de B. Charbonier *et al.* [121] )

Quantité de BCP (en g)	4
Quantité de BCP (en mol)	3,98E-03

	Quantité de matière en mole	Concentration (en mol/L)	Volume H <sub>2</sub> O (en L)	Masse à prélever (en g)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,39E-02	3,73E-01	0,06	3,15
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3,98E-02	8,29E-01	0,05	9,40
Ratio Ca/P	1,67			

### Préparation des solutions mères :

- SOL A : peser 3,15 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et les dissoudre dans 100 mL d'eau distillée
- SOL B : peser 9,40 g de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O et les dissoudre dans 100 mL d'eau distillée

### Mélange des solutions :

- Placer SOL B dans un ballon, mettre le ballon au reflux à 50°C.
- Ajouter SOL A goutte à goutte
- Ajuster le pH à 9 à l'aide d'ammoniaque à 28%

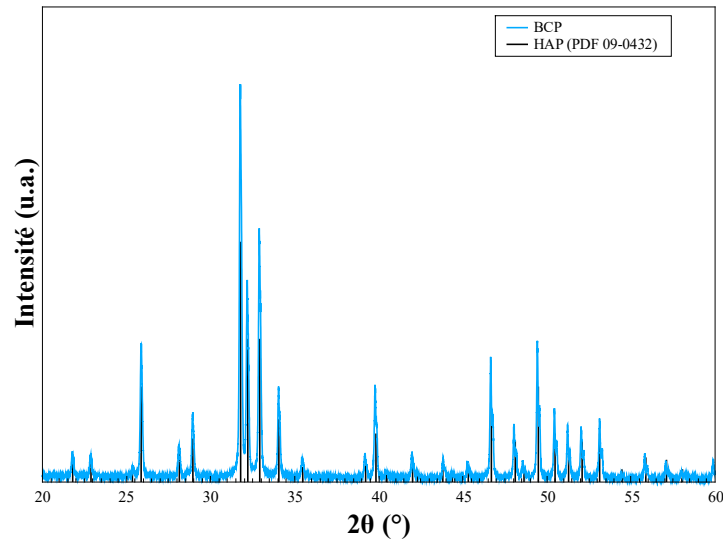
Laisser la solution mûrir pendant 20h en ajustant le pH régulièrement.

### Post-traitement :

La solution est filtrée sous vide à l'aide d'un verre fritté, le précipité est placé à l'étude à 80°C pendant une nuit.

La poudre obtenue est ensuite broyée à la main dans un mortier en agate, elle est ensuite placée dans un creuset en alumine et soumise au traitement thermique suivant : 2h à 400°C, puis 1000°C pendant 15h.

Analyse DRX :



*Figure annexe-1 DRX de la synthèse 1*

Nous observons uniquement la présence de la phase hydroxyapatite, or nous souhaitons un mélange de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite.

**Synthèse 2 :**

Quantité de BCP (en g)	<b>4</b>
Quantité de BCP (en mol)	3,98E-03

	Quantité de matière en mole	Concentration (en mol/L)	Volume H <sub>2</sub> O (en L)	Masse à prélever (en g)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,39E-02	3,73E-01	0,06	<b>3,15</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3,98E-02	8,29E-01	0,05	<b>9,40</b>
<b>Ratio Ca/P</b>	<b>1,67</b>			

Préparation des solutions mères :

- SOL A : peser 3,15 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et les dissoudre dans 60 mL\* d'eau distillée
- SOL B : peser 9,40 g de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O et les dissoudre dans 50 mL\* d'eau distillée

\*volume utilisé d'après la revue de T. S. B. Narasaraju, D. E. Phebe [122]

Mélange des solutions :

- Placer SOL B dans un ballon de 250 mL, mettre le ballon au reflux à 65°C.
- Ajouter SOL A goutte à goutte
- Ajuster le pH à 9 à l'aide d'ammoniaque à 28%

Laisser la solution mûrir pendant 20h en ajustant le pH régulièrement.

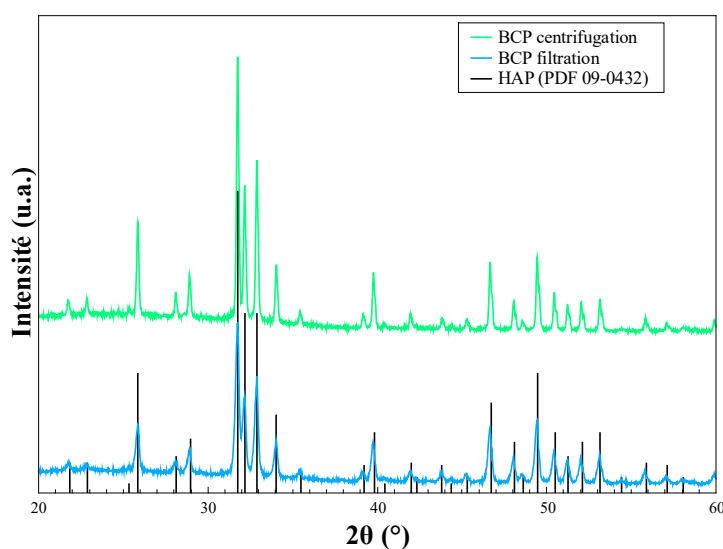
#### Post-traitement :

La solution contenant le BCP est séparée en deux parties égales :

- 1<sup>ère</sup> partie est filtrée sous vide à l'aide d'un verre fritté, la pâte obtenue est placée à l'étuve à 80°C pendant une nuit
- 2<sup>ème</sup> partie est centrifugée à 7800 rpm (6461 g) pendant 5 min, le surnageant est éliminé et le culot est mis à l'étude à 80°C pendant une nuit

Les poudres obtenues sont ensuite broyées manuellement dans un mortier en agate puis placées dans un creuset en alumine afin d'être calcinées à 1000°C pendant 15h.

#### Analyses DRX :



*Figure annexe-2 DRX de la synthèse 2 comparant la récupération de la poudre par filtration et par centrifugation*

Nous remarquons uniquement la présence de la phase hydroxyapatite et cela pour les deux modes de récupération, or un mélange de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite est souhaité.

### Tableau de différentes synthèses par voie aqueuse répertoriées dans la littérature

**Tableau 4 :** Tableau regroupant différentes synthèses par voie aqueuse dans la littérature qui ont servies de base pour réaliser les synthèses présentées dans le manuscrit.

Références	[121]	Rapport de stage – Mathilde Prudent	Rapport de stage – Loréline Gasnier		[107]	[123]	
Synthèse	Type de synthèse	aqueuse	aqueuse hydrolyse brushite	aqueuse co-précipitation	aqueuse hydrolyse brushite	aqueuse co-précipitation	
	Réactif Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O Cm=319g/L
	Réactifs P	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Cm=36g/L
	Base	ammoniac 28%	ammoniac 28%	ammoniac 28%	ammoniac 28%	ammoniac 28%	ammoniac 28%
	pH solution	9	7	7,95	7	8	12
	T solution	45°C	40°C	65°C	40°C	95°C	21°C
	Temps de maturation	17h	3h (brushite) 24h	20-24h	48h	30min	
	Autre	Sous flux d'argon (0,1L/min) agitation continue	flux argon 400 rpm ajout à 100mL/min agitation continue	flux argon ajout de P à 80 mL/min sous agitation	flux argon ajout de P à 100 mL/min sous agitation	sous argon ratio Ca/P initial=1,667	Ratio Ca/P=1,67 Sous agitation
Traitement	pré-traitement	Filtration Broyage (1-10µm) pré-calcination 400°C 2h	Centrifugation (3min - 4700rpm) lyophilisation	Centrifugation (3min - 4000rpm) lyophilisation	Centrifugation (3min - 4700rpm) lyophilisation	Séchage 100°C	Congelé à -23°C (stopper la réaction)
	T calcination	795°C 915°C 1020°C	600 700 800 900 1000 1050 1075 1150 1200	400°C 1000°C	1000°C	1000°C	
	Temps calcination	2h		3h 15h	15h	15h	
	autre		sous vapeur d'eau à pression partielle de 7KPa Sous azote (150mL/min)				





**Résumé :** L'ingénierie tissulaire osseuse connaît un essor important, poussé par la disponibilité limitée en greffes osseuses. L'hydroxyapatite (HAp), en tant que substitut osseux, est une bonne candidate pour réaliser des greffes, car c'est un des composants principaux du tissu osseux. Malheureusement, elle présente des limites, que le dopage ionique par des métaux de transition et alcalino-terreux ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ) peut compenser en améliorant les propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et ostéoconductrices. Le projet PIMyBone vise à élaborer des matériaux multi-dopés et à les mettre en forme par Powder Injection Molding. Des poudres d'hydroxyapatite mono- et multi-dopées ont été synthétisées et caractérisées. Les échantillons mono-dopés à 1 % et 2 % atomique par rapport au calcium ont été synthétisés, ainsi que des échantillons multi-dopés ( $\text{HApCu}_1$ ,  $\text{HApCu}_2$ ,  $\text{HApZn}_1$ ,  $\text{HApZn}_2$ ,  $\text{HApSr}_2$ ) avec 1 % de dopage en cuivre et en zinc et 2 % en strontium, et 2 % en chaque élément ( $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$ ,  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$ ). Chaque poudre a subi un traitement thermique allant de 1000 °C à 1200 °C par palier de 50 °C. Les poudres ainsi obtenues ont été broyées afin d'obtenir une granulométrie d'environ 20  $\mu\text{m}$ . L'analyse structurale révèle un mélange biphasique hydroxyapatite/phosphate tricalcique (BCP), avec en moyenne 90 % de HAp et 10 % de  $\beta$ -TCP. On note l'apparition de la phase  $\alpha$ -TCP après des températures de traitement à 1100 °C, tandis que la morphologie des particules reste globalement stable entre chaque échantillon. La mesure par MP-AES montre une sous-incorporation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (14–34 % pour  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$  et 25–50 % pour  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$ ), tandis que le  $\text{Sr}^{2+}$  est incorporé à environ 80 % dans les deux cas. L'étude biologique révèle que l'échantillon  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$  induit une légère augmentation de la prolifération cellulaire, une activité mitochondriale positive et un faible taux de mortalité cellulaire, suggérant une bonne cytocompatibilité. Les poudres ont ensuite été mises en forme par Powder Injection Molding, conduisant à la fabrication de petits cylindres (4×4 mm) ayant pour constituant un phosphate de calcium biphasé, soit un mélange 90/10 de HAp/ $\beta$ -TCP, sans apparition d' $\alpha$ -TCP, et présentant une macroporosité interconnectée en surface et en profondeur. Ce travail a permis de mettre en évidence le potentiel des biocéramiques multi-dopées dans des applications en ingénierie tissulaire osseuse.

**Mots-clés :** ingénierie tissulaire, biocéramiques, hydroxyapatite, dopage, moulage par injection de poudre

**Abstract:** Bone tissue engineering is experiencing significant growth, driven by the limited availability of bone grafts. Hydroxyapatite (HAp), as a bone substitute, is a promising candidate for grafting, since it is one of the main components of bone tissue. Unfortunately, it has limitations, which can be overcome by ionic doping with transition and alkaline-earth metals ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ), enhancing its antibacterial, anti-inflammatory, and osteoconductive properties. The PIMyBone project aims to develop multi-doped materials and shape them using Powder Injection Molding. Mono- and multi-doped hydroxyapatite powders were synthesized and characterized. Mono-doped samples at 1% and 2% atomic ratios relative to calcium were prepared, as well as multi-doped samples ( $\text{HApCu}_1$ ,  $\text{HApCu}_2$ ,  $\text{HApZn}_1$ ,  $\text{HApZn}_2$ ,  $\text{HApSr}_2$ ) with 1% copper and zinc doping and 2% strontium, and 2% for each element ( $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$ ,  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$ ). Each powder underwent heat treatment from 1000 °C to 1200 °C in 50 °C increments. The resulting powders were ground to achieve a particle size of approximately 20  $\mu\text{m}$ . Structural analysis revealed a biphasic hydroxyapatite/tricalcium phosphate (BCP) mixture, with an average of 90% HAp and 10%  $\beta$ -TCP. The  $\alpha$ -TCP phase appeared after treatment at 1100 °C, while the particle morphology remained generally stable across all samples. MP-AES measurements showed under-incorporation of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions (14–34% for  $\text{HApCu}_1\text{Zn}_1\text{Sr}_2$  and 25–50% for  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$ ), whereas  $\text{Sr}^{2+}$  was incorporated at approximately 80% in both cases. Biological studies indicated that the  $\text{HApCu}_2\text{Zn}_2\text{Sr}_2$  sample induced a slight increase in cell proliferation, a positive mitochondrial activity, and a low cell mortality, suggesting good cytocompatibility. The powders were then shaped *via* Powder Injection Molding, resulting in small cylinders (4×4 mm) composed of a biphasic calcium phosphate (90/10 HAp/ $\beta$ -TCP), without the appearance of  $\alpha$ -TCP, and exhibiting interconnected macroporosity both on the surface and in depth. This work highlights the potential of multi-doped bioceramics for applications in bone tissue engineering.

**Keywords:** tissue engineering, bioceramics, hydroxyapatite, doping, powder injection molding