



Frittage, propriétés mécaniques et fonctionnalisation de biocéramiques mono et biphasées

Emmanuelle Rguiti-Constantin

► To cite this version:

Emmanuelle Rguiti-Constantin. Frittage, propriétés mécaniques et fonctionnalisation de biocéramiques mono et biphasées. Génie mécanique [physics.class-ph]. Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis, 2011. Français. NNT : 2011VALE0032 . tel-03416182

HAL Id: tel-03416182

<https://uphf.hal.science/tel-03416182>

Submitted on 5 Nov 2021

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

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

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Discipline : Sciences et Technologie

Mention Mécanique Spécialité Energétique, Matériaux

FRITTAGE, PROPRIETES MECANIKES ET FONCTIONNALISATION DE BIOCERAMIQUES MONO ET BIPHASEES

Soutenue publiquement le 15 décembre 2011

Par

Emmanuelle RGUITI - CONSTANTIN

Composition du jury

Rapporteurs :

M. G. FANTOZZI INSA de Lyon

Mme V. LARDOT BCRC, Mons

Examineurs :

M. P. HARDOUIN Université du Littoral Côte d'Opale

M. S. HOCQUET BCRC, Mons

Mme A. LERICHE Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

M. M. DESCAMPS Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

Invités :

M. F. IMPELLIZERI Biotech International, Salon de Provence

M. J.C. HORNEZ Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Discipline : Sciences et Technologie

Mention Mécanique Spécialité Energétique, Matériaux

FRITTAGE, PROPRIETES MECANQUES ET FONCTIONNALISATION DE BIO-CERAMIQUES MONO ET BIPHASEES

Soutenue publiquement le 15 décembre 2011

Par

Emmanuelle RGUITI - CONSTANTIN

Composition du jury

Rapporteurs :

M. G. FANTOZZI INSA de Lyon

Mme V. LARDOT BCRC, Mons

Examineurs :

M. P. HARDOUIN Université du Littoral Côte d'Opale

M. S. HOCQUET BCRC, Mons

Mme A. LERICHE Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

M. M. DESCAMPS Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

Invités :

M. F. IMPELLIZERI Biotech International, Salon de Provence

M. J.C. HORNEZ Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis

Ce travail a été cofinancé et soutenu par la société Biocétis et par l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie dans le cadre :

- d'une convention CIFRE octroyée par l'ANRT et le ministère chargé de la recherche,
- d'un contrat d'ingénieur avec la société Biocétis.

J'exprime toute ma gratitude aux intervenants et responsables pour l'obtention de ces supports.

Je tiens, également, à remercier :

- le Belgian Ceramic Research Centre pour les essais de post-frittage par pressage isostatique à chaud et les essais mécaniques de flexion et de SEVNB,
- l'Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse (IS2M) pour l'évaluation de la morphologie et l'adhésion cellulaire,
- le Groupe de Recherche sur les Biomatériaux de Lille (GRB) pour les essais de viabilité et de prolifération cellulaire.

A toi, Mohamed

Merci pour ton soutien, ton aide, tes encouragements et ta patience sans lesquels ce travail n'aurait jamais abouti.

A toi, Shayma

Le cadeau le plus précieux que la vie m'a offert, merci pour tes sourires et ce petit grain de malice dans le regard qui font de chaque jour des jours inoubliables.

A mes parents

Merci de m'avoir donné la possibilité de faire des études et m'avoir encouragée à terminer ce travail. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

Merci à mon frère Pierre, ma famille et mes amis.

Remerciements

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisées au sein de l'Equipe Biomatériaux du Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Avancés (LMCPA) de l'Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis (UVHC) dans le cadre d'une convention CIFRE en partenariat avec la société Biocétis.

Je tiens à remercier Anne Leriche, Professeur de l'Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis et directrice du LMCPA, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie, également, Michel Descamps, Ingénieur de Recherche HDR de l'Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis, responsable de l'équipe Biocéramiques et directeur de ma thèse, de m'avoir proposée ce sujet de recherche, de m'avoir encadrée et de m'avoir guidée dans ce travail doctoral.

Je tiens à assurer de ma profonde gratitude à Jean-Christophe Hornez, Maître de Conférences de l'Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis et co-directeur de ma thèse, pour ses précieux conseils, pour la gentillesse dont il a toujours fait preuve à mon égard, pour sa franchise ainsi que et son soutien constant.

Je remercie Gilbert Fantozzi, Professeur à l'INSA de Lyon, et Véronique Lardot, Docteur d'état au Belgian Ceramic Research Center (BCRC) de Mons, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je les prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie, également, Pierre Hardouin, Professeur à l'Université du Littoral Côte d'Opale, d'avoir accepté d'être président du jury et Stéphane Hocquet, Docteur au Belgian Ceramic Research Center de Mons, d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Toute ma reconnaissance va à la société Biocétis pour m'avoir permis de réaliser cette thèse ainsi qu'à Frédéric Impellizeri, Ingénieur et Directeur Général Adjoint recherche et développement de la société Biotech International, de me faire l'honneur de participer au jury de soutenance.

Nombreuses sont les personnes qui ont participé à ce travail, je remercie ainsi :

- Francis Cambier, Directeur du BCRC, de m'avoir permis de réaliser les essais de post-HIP, de flexion et de SEVNB au sein de son laboratoire.

- Nabila Zebouchi, Docteur, pour son aide pour les essais de post-HIP.

- Fabrice Petit, Docteur au BCRC, pour la réalisation des essais mécaniques de flexion et de SEVNB.

- Karine Anselme, Chargée de Recherche au CNRS de l'Université de Mulhouse, et Mihaela Mattescu, Docteur à l'IS2M de Mulhouse, pour la réalisation des morphologie et adhésion cellulaires sur le TCP.

- Harmut F. Hildebrand, Directeur du GRB de Lille, de m'avoir permis de réaliser l'évaluation biologique de mes matériaux.

Je ne saurais oublier tous ceux qui par leur aide scientifique ou technique ont permis la réalisation de ce travail et je tiens à leur témoigner à tous ma plus vive reconnaissance : - Arnaud Tricoteaux pour son aide quant aux essais de microindentation et à leur interprétation.

- l'équipe Biomatériaux : Franck Bouchart et Edwige Meurice pour les tests d'efficacité antibactérienne et pour leur très grande sympathie, Gérard Moreau pour la réalisation des très nombreuses micrographies MEB qu'il a réalisé et Laurent Boilet.

- Carole Petit, pour sa disponibilité, sa gentillesse et son soutien.

- Eric Dupret pour son assistance informatique.

- Christian Courtois et Philippe Champagne pour leurs conseils et leur sympathie.

- Mélanie Louy, bibliothécaire, pour sa bonne humeur contagieuse et tous les bons moments que nous avons partagés.

Merci à tous mes collègues : Ahmed, Corinne, Christelle, Hilda, Matthieu et Sophie et à tous les membres du laboratoire.

Un énorme merci à Stéphanie Devémy pour son amitié, son écoute dans les moments difficiles et son soutien.

Une pensée toute particulière pour Francine Monchau, Maître de Conférences à l'Université d'Artois, pour ces excellents moments inoubliables que nous avons passés ensemble, pour ses conseils et sa bonne humeur, pour son amitié.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE -----	1
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE -----	4
1.1. Définition d'un biomatériau -----	5
1.2. Historique -----	5
1.3. Classement des biomatériaux -----	6
1.3.1. Origine humaine -----	6
1.3.2. Origine animale -----	6
1.3.2.1. Les xénogreffes -----	6
1.3.2.2. Le corail -----	6
1.3.2.3. La nacre -----	7
1.3.3. Origine synthétique -----	7
1.3.3.1. Les polymères -----	7
1.3.3.2. Les céramiques -----	8
1.4. Les phosphates de calcium -----	9
1.4.1. Intérêt des phosphates de calcium -----	9
1.4.2. L'hydroxyapatite -----	11
1.4.2.1. Généralités sur l'hydroxyapatite -----	11
1.4.2.2. Différents modes de synthèses de l'hydroxyapatite -----	12
1.4.2.3. Densification et propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite -----	14
1.4.3. Le phosphate tricalcique -----	18
1.4.3.1. Généralités sur le phosphate tricalcique -----	18
1.4.3.2. Différents modes de synthèses du phosphate tricalcique -----	18
1.4.3.3. Densification et propriétés mécaniques du β -TCP -----	20
1.4.4. Les phosphates de calcium biphasiques -----	22
1.5. Cytotoxicité et fonctionnalisation -----	25
1.5.1. Cytocompatibilité -----	25
1.5.2. Fonctionnalisation -----	27
2. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS DES POUDRES DE PHOSPHATE DE CALCIUM -----	29
2.1. Synthèse des poudres phosphocalciques -----	30
2.1.1. L'hydroxyapatite -----	30
2.1.2. Le phosphate tricalcique β et les phosphates de calcium biphasiques -----	33
2.1.2.1. Synthèse du β -TCP stœchiométrique -----	33
2.1.2.2. Synthèse des phosphates de calcium biphasés -----	38
2.2. Calcination des poudres phosphocalciques -----	42

2.3. Conclusion	45
3. DENSIFICATION DES PHOSPHATES DE CALCIUM MONO ET BIPHASES	46
3.1. Broyage	47
3.2. Mise en forme des poudres phosphocalciques	49
3.3. Frittage naturel des phosphates de calcium	51
3.4. Post-densification des phosphates de calcium	59
3.4.1. Détermination des températures de préfrittage	59
3.4.2. Post-densification par HIP	63
3.5. Conclusion	67
4. CARACTERISATIONS MECANQUES	68
4.1. Le module d'Young	69
4.1.1. Méthode	69
4.1.2. Résultats	71
4.1.3. Discussion	72
4.2. La dureté Vickers	73
4.2.1. Méthode	73
4.2.2. Résultats	74
4.2.3. Discussion	75
4.3. La ténacité	77
4.3.1. Méthode VIF (Vickers Indentation Fracture)	77
4.3.1.1. Présentation de la méthode	77
4.3.1.2. Détermination de la ténacité VIF pour le TCP	80
4.3.2. Essai SEVNB (Single Edge V-Notched Beam)	82
4.3.2.1. Méthode	82
4.3.2.2. Résultats	83
4.3.2.3. Discussion	84
4.4. La résistance à la flexion	87
4.4.1. Méthode	87
4.4.2. Résultats	88
4.4.3. Discussion	89
4.5. Conclusion	91

5. EVALUATION BIOLOGIQUE ET FONCTIONNALISATION-----92

5.1. Evaluation biologique-----93

5.1.1. Viabilité cellulaire : méthode du clonage -----	93
5.1.1.1. Préparation des échantillons -----	94
5.1.1.2. Culture cellulaire -----	94
5.1.1.3. Méthode expérimentale -----	94
5.1.1.4. Résultats des tests de cytotoxicité -----	96
5.1.1.5. Discussion -----	96
5.1.2. Prolifération cellulaire -----	97
5.1.2.1. Préparation des échantillons -----	97
5.1.2.2. Cellules MC3T3 E1 -----	97
5.1.2.3. Méthode -----	98
5.1.2.4. Résultats -----	98
5.1.3. Morphologie et adhésion cellulaires sur le TCP -----	99
5.1.3.1. Préparation des échantillons -----	99
5.1.3.2. Cellules SaOS-2 -----	100
5.1.3.3. L'immunomarquage -----	100
5.1.3.4. Morphologie du cytosquelette par marquage de l'actine -----	100
5.1.3.5. Adhésion cellulaire par immunomarquage de la vinculine -----	103

5.2. Fonctionnalisation du phosphate tricalcique ----- 105

5.2.1. La fonctionnalisation chimique : les antibiotiques -----	106
5.2.1.1. Echantillons -----	107
5.2.1.2. Relargage -----	107
5.2.1.3. Contact direct (antibiogramme par diffusion) -----	109
5.2.2. La fonctionnalisation par des agents biologiques : les phages -----	111
5.2.2.1. Phages -----	111
5.2.2.2. Méthode et résultats -----	113

5.3. Conclusion ----- 116

6. CONCLUSION ----- 117

7. BIBLIOGRAPHIE ----- 121

8. ANNEXES ----- 136

Annexe I : Fiche signalétique de l'hydrogénophosphate de diammonium----- 137

Annexe II : Fiche signalétique du nitrate de calcium tétrahydraté----- 138

Introduction générale

L'os est un tissu vivant de composition chimique et de nature complexes. Suite à un défaut osseux pouvant être d'origine tumorale, traumatique, ostéolytique, infectieuse ou inflammatoire, la reconstruction osseuse peut être déficiente et l'apport de matière extérieure devient, alors, nécessaire.

Ce matériau peut être de diverses origines : humaine, animale ou synthétique. Les biomatériaux d'origine synthétique présentent l'avantage de ne pas induire de réactions de rejet, inflammatoires ou infectieuses. De plus, ils présentent une bonne reproductibilité de leurs caractéristiques et sont disponibles en quantités non limitées. Parmi ces substituts artificiels, les biocéramiques sont utilisées dans de nombreuses applications médicales et se déclinent en deux catégories :

- les céramiques inertes telles que l'alumine et la zircone utilisées régulièrement dans les têtes de prothèses de hanche ou le cotyle.
- les céramiques bioactives qui interagissent favorablement avec le lieu d'implantation.

Le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP) et l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) possèdent des propriétés de compatibilité biologique vis-à-vis des tissus environnants, et, respectivement, un caractère résorbable et une activité biologique de surface, ce qui en fait des matériaux largement plébiscités.

Ces phosphates de calcium ne présentant pas la même vitesse de résorption en contact avec les fluides biologiques, la recherche s'est orientée ces dernières années sur le développement de matériaux biphasiques constitués d'un mélange de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite. L'ajustement des taux respectifs de TCP et d'HA va permettre d'établir un équilibre entre les cinétiques de biodégradation du substitut et la néoformation osseuse.

Cependant, l'élaboration de tels matériaux soulève un certain nombre de difficultés dont la principale concerne leur densification due à un comportement au frittage très distinct entre le TCP et l'HA. En effet, cette densification est entravée par la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ du TCP qui se produit à faible température. Cette modification de phase, nuisible aux propriétés du matériau, empêche l'utilisation de hautes températures pour la consolidation du biomatériau et minimise, par conséquent, les propriétés du substitut.

D'autre part, la tendance dans la recherche internationale n'est plus, de nos jours, dans le remplacement des organes par des biomatériaux inertes et biocompatibles mais à la recherche de dispositifs médicaux fonctionnalisés et adaptés aux sites de leur implantation. Ainsi, les systèmes de délivrance progressive de médicaments ainsi que les systèmes obtenus par l'association du substitut avec des agents biologiques actifs ou le dopage du matériau par

des agents chimiques sont de plus en plus étudiés afin de prévenir les infections au niveau du site d'implantation.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'aptitude au frittage et les propriétés mécaniques de biocéramiques mono et biphasées à base de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite. La fonctionnalisation de ces matériaux est également envisagée dans un souci de prophylaxie.

La synthèse bibliographique, décrite au premier chapitre, rappelle les différentes natures de biomatériaux utilisés. Une description des biocéramiques phosphocalciques mono et biphasées permet, ensuite, de préciser leurs caractéristiques physiques et d'exposer l'état de l'art quant à leur aptitude à la densification (par frittage naturel ou assisté) et à leurs propriétés mécaniques. Une dernière partie s'oriente, enfin, vers leur évaluation biologique et leur fonctionnalisation par des agents chimiques ou viraux.

Le second chapitre détaille la synthèse des poudres de phosphates de calcium (tels que le phosphate tricalcique, l'hydroxyapatite et les mélanges biphasiques de ces deux matériaux) ainsi que leurs caractérisations chimiques.

Le troisième chapitre se consacre, plus particulièrement, à la densification par frittage naturel et post-densification par HIP de ces biomatériaux mono et biphasés, densification précédée d'une étude sur le broyage et des conditions de mise en forme des poudres phosphocalciques.

Le quatrième chapitre a, comme objectif, la caractérisation mécanique du phosphate tricalcique, de l'hydroxyapatite et de leurs biphasiques par différentes techniques permettant de déterminer le module d'Young, la dureté Vickers, la ténacité et la résistance à la flexion.

Enfin, le dernier chapitre présente l'évaluation biologique du TCP et de l'HA ainsi que la fonctionnalisation du phosphate tricalcique par des agents chimiques (antibiotiques) et viraux (phages).

1. Etude bibliographique

1.1. Définition d'un biomatériau

La Société Européenne des Biomatériaux donne comme définition d'un biomatériau : "Matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical, prévu pour interagir avec les systèmes biologiques".

Un biomatériau est, donc, un matériau qui sera en contact étroit avec l'organisme vivant, il doit, dès lors, présenter une totale biocompatibilité.

1.2. Historique

L'idée de combler les lésions occasionnées au corps humain par des matériaux de comblement artificiel a traversé les âges, débutant dans l'Antiquité par le remplacement, par les dieux de l'Olympe, de l'épaule du fils de Tantale par un morceau d'ivoire. Elle a continué de se développer par le remplacement, par Cosme et Damien, d'une tumeur osseuse de la jambe par un os prélevé sur un homme décédé, au cours du 5^{ème} siècle. En 1668, en Hollande, la voûte crânienne d'un soldat a été comblée par un os de chien [MAI 90]. Puis, dès le début du 19^{ème} siècle, divers substituts d'origine non osseuse ont été testés, le plâtre de Paris donnant les résultats les plus intéressants. Les années 1920 et 1930 ont vu l'apparition des premiers essais de verres biocompatibles, des premières utilisations du phosphate tricalcique et la fabrication des premières prothèses en alliage métallique. Il faut attendre les années 1960 pour connaître de larges innovations avec l'apparition du Téflon[®], des polymères et des céramiques techniques. Les céramiques s'avèrent alors des plus intéressantes de part leur large diversité de propriétés capable de répondre aux attentes des chirurgiens. Se sont, alors, développés les phosphates de calcium et les premiers implants dentaires en 1971 [MON 71]. Depuis, ont été utilisés diverses vitrocéramiques, la porcelaine, le nitrure de silicium, les sialons, l'alumine ou la zircone yttrée. Cette diversité de matériaux a permis de susciter de plus en plus l'intérêt des chirurgiens pour ces biocéramiques. Mais face à une telle profusion de biomatériaux de comblement osseux, il faut établir un classement qui peut se faire selon l'origine ou selon la réactivité avec le milieu biologique.

1.3. Classement des biomatériaux

Un chirurgien dispose à l'heure actuelle de trois types de substituts osseux d'origine différente : humaine, animale ou synthétique.

1.3.1. Origine humaine

L'os humain est le biomatériau de comblement osseux le plus approprié. On distingue, selon la provenance :

- L'autogreffe : elle consiste en un prélèvement d'un fragment d'os du patient et sa transposition sur un autre site du même patient. Ce procédé est associé à une excellente sécurité vitale [RIC 98]. L'intérêt premier d'une autogreffe est une parfaite tolérance immunologique. Dans la majorité des cas, le prélèvement est réalisé au niveau de l'os iliaque mais la quantité de greffon qu'il est possible de prélever reste limitée.

- L'allogreffe : elle consiste en la greffe d'un fragment prélevé chez un autre donneur de la même espèce. Elle représente une alternative complémentaire à l'autogreffe car elle permet d'avoir des volumes de complements plus importants. Bien qu'étant d'origine humaine, ces allogreffes ne présentent pas les caractéristiques optimales en matière de sécurité infectieuse (HIV, hépatites, syphilis, toxoplasmose [RIC 98]).

1.3.2. Origine animale

1.3.2.1. Les xénogreffes

Elles consistent à greffer chez l'homme des tissus provenant d'une espèce animale. Les avantages de tels greffons sont une architecture et une composition proches de celles de l'os humain et une facilité d'approvisionnement. Ce sont majoritairement des greffons d'origine bovine qui ont subi des purifications permettant l'élimination des protéines animales (Surgibone[®]) ou permettant la conversion de la phase minérale en hydroxyapatite biologique (Pyrost[®], Endobon[®]). D'autres techniques de purification permettent d'éliminer les protéines animales sans dénaturer la partie collagénique (Bio-oss[®], Lubbock[®]).

L'origine bovine de ces substituts osseux soulève le problème du risque de la transmission à l'homme de l'encéphalite bovine spongiforme.

1.3.2.2. Le corail

Le corail poreux est issu de squelette d'animaux marins. Certains coraux ont une structure poreuse régulière proche de l'os spongieux (Porites, Goniopora, Acropora) ou

possèdent une enveloppe externe compacte d'architecture proche de l'os cortical (Favites, Lobophyllia). Ils sont constitués à 97% de carbonate de calcium. Comme pour les greffons d'origine bovine, une étape de purification est nécessaire afin d'obtenir une bonne biocompatibilité.

La variété des coraux induit une forte hétérogénéité d'architecture entraînant des différences de reproductibilités au niveau mécanique et biologique.

1.3.2.3. La nacre

La nacre est un carbonate de calcium issu du squelette d'un mollusque. Elle est rapidement bio-intégrée [LEF 95]. Ce biomatériau est composé d'aragonite et de matière organique. En implantologie, Bionacre® est utilisé sous forme de granules dans le cas de comblement osseux.

Malgré les multiples précautions (purifications), un risque de contamination et de pollution persiste par l'utilisation de ces produits d'origine animale.

1.3.3. Origine synthétique

Les multiples désavantages des greffes d'origine animale (contamination, virus) et les faibles quantités d'os disponibles dans le cas d'autogreffe ou d'allogreffe ont mené à la recherche de nouveaux substituts osseux et, en particulier, des produits synthétiques. Ces nouveaux produits ne présentent pas de risques infectieux, sont disponibles en quantités infinies et sont reproductibles au niveau de leur architecture et de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Divers types de matériaux ont été étudiés et sont utilisés en fonction des applications.

1.3.3.1. Les polymères

Les polymères ont une grande facilité à la mise en forme : ils peuvent être filés, tissés, se retrouver sous forme de films, de blocs, de granules,.... Ces différentes formes vont induire des résorptions différentes et des applications diverses. On distingue deux grandes classes de polymères :

- les polymères résorbables : ce sont des polymères à base d'acides polyglycoliques et polylactiques. Ils sont utilisés pour leur caractère résorbable lors de petits comblements osseux, pour les sutures et comme implants biodégradables. Cependant, ils sont bioinertes.

- les polymères non résorbables : ils sont fréquemment utilisés dans des ciments pour la fixation d'implants orthopédiques. Par exemple, le polyméthylméthacrylate (PMMA) est employé pour la réalisation de lentilles intraoculaires et le polytétrafluoroéthylène (PTFE) est surtout utilisé en chirurgie maxillo-faciale et pour des implants vasculaires.

1.3.3.2. Les céramiques

On distingue deux classes de céramiques en fonction de leur réactivité vis-à-vis du milieu physiologique [BER 93a].

- Les céramiques inertes : une céramique est dite inerte lorsqu'elle est stable dans le temps en milieu physiologique. Elle ne réagit pas avec l'organisme qui l'isole par une encapsulation fibreuse. Dans cette catégorie, les chirurgiens disposent de l'alumine et de la zircone qui ont, de plus, une bonne tenue mécanique.

- Les céramiques bioactives :

* Les céramiques actives : il se crée des réactions superficielles entre l'implant et les tissus de l'organisme dans un premier temps puis avec l'os dans un second temps. La recolonisation osseuse s'effectue bien souvent sans altération de l'implant.

* Les céramiques résorbables : le matériau présente une solubilité élevée dans l'organisme, il se dégrade donc rapidement.

Parmi les céramiques bioactives, se trouvent :

+ le plâtre de Paris qui se dégrade progressivement en milieu physiologique et qui est bien toléré par les tissus. Il présente cependant de faibles propriétés mécaniques qui en limitent l'utilisation.

+ les bioverres : Hench définit un bioverre comme étant *"un verre produit dans le but d'entraîner des réponses physiologiques spécifiques. Il possède une surface réactive contenant du calcium, de la silice et des ions phosphates, un pH alcalin à l'interface des tissus"* [HEN 88]. Le bioverre le plus connu est le 45S5-Bioglass, il présente une excellente biocompatibilité, une forte résorption en milieu physiologique mais également une grande fragilité mécanique. Ce type de matériaux est fréquemment employé pour les implants orthopédiques et dentaires.

+ les vitrocéramiques : elles ont été développées pour obtenir des propriétés mécaniques meilleures que celles des bioverres. Elles sont composées d'une dispersion de phases cristallines au sein d'une matrice vitreuse. Elles sont bioactives, semi-

résorbables et présentent une tenue mécanique comparable à celle de l'os cortical [VER 95]. Elles sont, le plus souvent, utilisées en chirurgie oto-laryngologique et odontologique.

+ les phosphates de calcium : ils sont utilisés depuis plusieurs décennies pour le comblement osseux de part leur composition chimique proche de celle de l'os et leur excellente biocompatibilité. Cette famille de biomatériaux a la particularité de présenter une bonne ostéoconduction vis-à-vis du tissu osseux. Parmi ces biomatériaux, on retrouve l'hydroxyapatite (active), le phosphate tricalcique β (résorbable) et les mélanges biphasiques d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique β en proportions variables. Les biocéramiques phosphocalciques sont aujourd'hui les biomatériaux synthétiques les plus adéquats et les plus utilisés lors d'une implantation intra-osseuse. Elles sont généralement macroporeuses afin de faciliter la recolonisation osseuse. Cependant, leurs faibles propriétés mécaniques dues à la macroporosité en limitent l'utilisation et requièrent une implantation de matériels d'ostéosynthèse qui supporteront les contraintes mécaniques mais qui devront être parfois explantés par la suite. Ces biocéramiques sont utilisées en chirurgie maxillo-faciale, odontologique, oto-laryngologique et orthopédique.

1.4. Les phosphates de calcium

1.4.1. Intérêt des phosphates de calcium

Les os et la partie minérale des tissus calcifiés sont composés de phosphate de calcium à structure apatitique. Les biocéramiques phosphocalciques sont, dès lors, tout à fait adaptées à une utilisation comme substituts osseux (*Tableau 1*).

Eléments	Email (%)	Dentine (%)	Os compact et cément (%)	HA (%)	β-TCP (%)
Calcium	36,1	35,0	35,5	39,89	38,76
Phosphore	17,3	17,1	17,1	18,499	19,97
Dioxyde de carbone	3,0	4,0	4,4		
Magnésium	0,5	1,2	0,9		
Sodium	0,2	0,2	1,1		
Potassium	0,3	0,07	0,1		
Chlore	0,3	0,03	0,1		
Fluor	0,016	0,017	0,015		
Soufre	0,1	0,2	0,6		
Zinc	0,016	0,018	-		
Silicium	0,03	-	0,04		
Rapport atomique Ca/P	1,620	1,590	1,610	1,667	1,5

Tableau 1 : Composition chimique (pourcentages massiques) du constituant minéral de différents tissus calcifiés [MON 80]

Le rapport Ca/P ainsi que le degré de solubilité vont jouer un rôle prépondérant sur les propriétés intrinsèques du biomatériau en milieu physiologique. Ces deux paramètres permettent de distinguer les différents phosphates de calcium (Tableau 2).

Nom	Symbole	Formule chimique	Rapport Ca/P	Produit de solubilité
Brushite (phosphate dicalcique dihydraté)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	$1,87 \times 10^{-7}$
Phosphate dicalcique anhydre	DCPA	CaHPO_4	1,00	$1,26 \times 10^{-7}$
Phosphate octacalcique	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	$5,01 \times 10^{-15}$
Phosphate tricalcique β	β-TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	$2,83 \times 10^{-30}$
Phosphate tricalcique α	α-TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	-
Hydroxyapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,667	$2,35 \times 10^{-59}$
Phosphate tétracalcique	TCPM	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_7$	2,00	-

Tableau 2 : Rapport Ca/P et produits de solubilité des différents phosphates de calcium [RAV 92]

A l'heure actuelle, l'HA, le β -TCP et les mélanges de ces deux phosphates de calcium sont les composés les plus utilisés dans la réalisation d'implants osseux.

1.4.2. L'hydroxyapatite

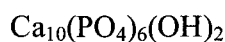
1.4.2.1. Généralités sur l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite fait partie de la famille des apatites dont la formule générale est la suivante :



où M est un cation bivalent, XO_4 un anion trivalent et Z un anion monovalent.

La formule de l'hydroxyapatite est :



De nombreuses substitutions sont possibles :

- Ca^{2+} peut être remplacé par d'autres cations tels que Sr^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , ...,
- PO_4^{3-} peut être substitué par AsO_4^{3-} , SiO_4^{3-} , CrO_4^{3-} , SO_4^{3-} , ...,
- et les ions OH^- peuvent être remplacés par F^- , Cl^- , Br^- , I^- ,

L'HA cristallise dans le système hexagonal, avec les paramètres de maille suivants : $a = 9,418 \text{ \AA}$ et $c = 6,884 \text{ \AA}$ (fiche International Centre for Diffraction Data n° 09-432 et 01-84-1998). Le groupe d'espace de l'hydroxyapatite est $P6_3/m$. La *Figure 1* représente une projection du réseau suivant le plan (001). La structure apatitique peut être vue comme une organisation des ions calcium en colonnes, parallèles à l'axe c, les anions hydroxydes se trouvant à l'intérieur de celles-ci. Les groupements ioniques PO_4^{3-} sont disposés en hexagones autour des colonnes formées par les ions calciums.

La masse volumique théorique de l'hydroxyapatite est $3,156 \text{ g.cm}^{-3}$. Le rapport atomique Ca/P de l'HA est de 1,667. Les proportions massiques en calcium et en phosphore sont respectivement 39,89 et 18,499 %.

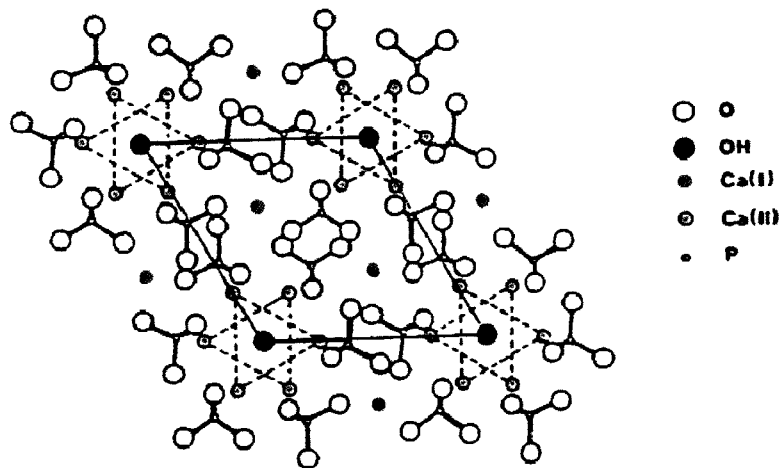


Figure 1 : Maille élémentaire de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, projection sur le plan (010) [MON 80]

1.4.2.2. Différents modes de synthèses de l'hydroxyapatite

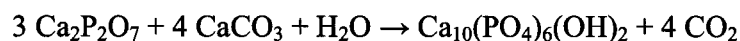
L'hydroxyapatite peut être synthétisée selon deux procédés principaux :

- la voie sèche,
- et la voie humide.

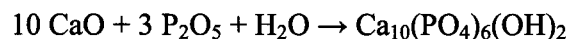
- Voie sèche

La synthèse en phase solide consiste à chauffer du phosphate tricalcique et du carbonate de calcium à 1030°C sous une pression de vapeur d'eau (150-230 mm Hg) et ce pendant 1 h. Cette technique permet d'obtenir des agglomérats d'HA de 10 à 30 mm.

Cette synthèse en voie sèche peut aussi consister en un mélange de pyrophosphate de calcium et de carbonate de calcium en composition stœchiométrique chauffé à 900°C pendant 24 heures sous vapeur d'eau (1,5 atm.) selon la réaction suivante :



L'HA peut, aussi, être synthétisé par le mélange de chaux et de pentoxyde de phosphore à 900°C sous vapeur d'eau selon la réaction :



Omori *et al.* [OMO 06] réalisent la réaction de la brushite avec l'hydroxyde de calcium à 500°C sous une pression de 670 MPa dans une enceinte de Spark Plasma Sintering (SPS).

- Voie humide

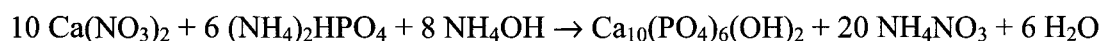
La synthèse de l'HA peut également être réalisée par voie humide selon différentes réactions chimiques. Ce sont des techniques qui permettent l'obtention de poudres fines et donc très réactives.

Une méthode consiste en un mélange d'acide phosphorique et d'une solution d'hydroxyde de calcium avec un contrôle du pH [CHE 09].

L'hydroxyapatite peut aussi être synthétisée en synthèse électrochimique à partir du mélange de solutions de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de NaH_2PO_4 et CaCl_2 et de l'application d'une densité de courant d'une centaine de mA.cm^{-2} [DJO 08].

La technique sol-gel est également employée pour synthétiser de l'HA par mélange d'une solution de nitrate de calcium et une solution d'acide phosphorique, toutes deux en solution dans du méthanol puis par évaporation du solvant après 4 à 5 h d'agitation [KHO 08].

Jarcho *et al.* [JAR 76] [JAR 79] ont utilisé la synthèse par précipitation à partir de nitrate de calcium et d'hydrogénophosphate de diammonium. La réaction qui a lieu est :



Les proportions initiales des réactifs, la température, le pH plus ou moins basique et le temps de maturation sont des paramètres influant sur la stœchiométrie de la poudre brute de synthèse, mais également sur sa granulométrie. Après réaction, la poudre est calcinée à 1000°C , une déficience en calcium conduit à la présence de phosphate tricalcique β dans l'HA alors qu'un excès en calcium génère la présence de chaux (*Figure 2*).

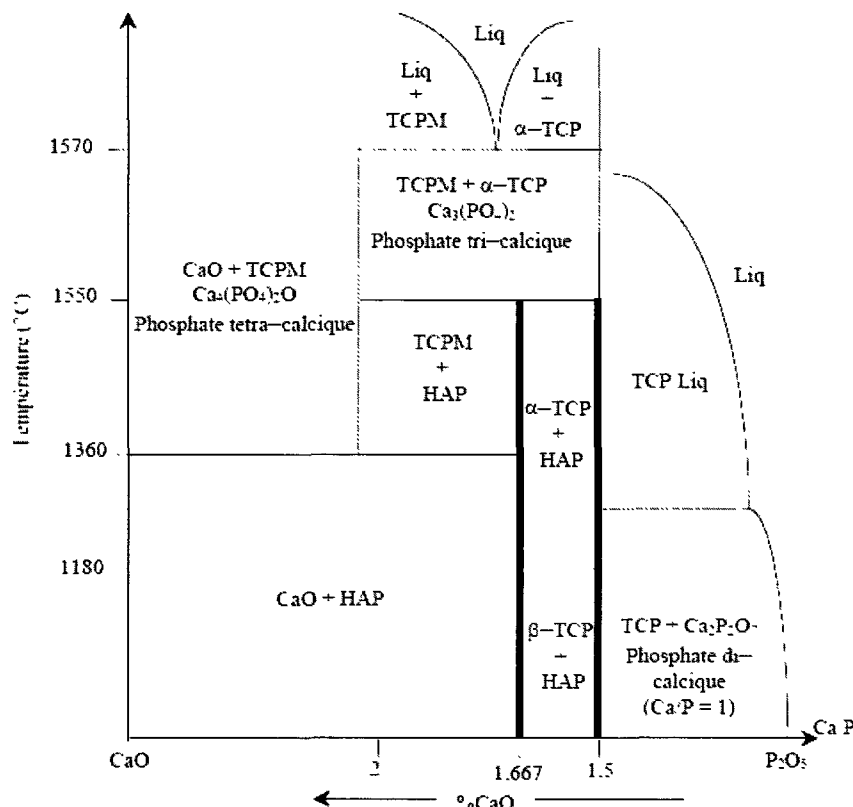
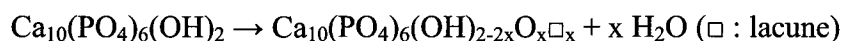


Figure 2 : Diagramme de phase partiel du système $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ [WEL 61]

1.4.2.3. Densification et propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite - Frittage

Le frittage naturel de l'hydroxyapatite s'effectue dans le domaine de température 1000°C - 1350°C [RAM 12] [LAN 00] [MUR 00]. A des températures supérieures, l'HA se décompose partiellement en phosphate tricalcique (β et α) et en phosphate tétracalcique. Cependant, la température exacte de décomposition reste incertaine. Muralithran *et al.* [MUR 00] ont montré que l'hydroxyapatite est stable sous air jusqu'à 1400°C , alors que Van Landuyt *et al.* [VAN 95] ont trouvé que la décomposition de l'HA intervient dès 1300°C pour un temps de palier de 8 heures. De plus, Raynaud [RAY 99] a montré, par analyse thermogravimétrique, que, dès 1000°C , intervient la déshydroxylation de l'hydroxyapatite en oxyhydroxyapatite, réaction au moins partiellement réversible :



De nombreux auteurs ont étudié l'influence majeure des caractéristiques granulaires de la poudre initiale sur le frittage, et notamment de la température de calcination qui provoque

une agglomération de l'élément pulvérulent. Des températures de calcination élevées seront, donc, néfastes à la densification du matériau [JUA 96] [JUA97].

L'hydroxyapatite présente, généralement, une bonne aptitude au frittage. Des densités importantes (98 - 99 %) ont été obtenues sur des poudres d'hydroxyapatite pressées uniaxialement pour des températures de frittage autour de 1200-1250°C [LAN 00] [RUY 95] [RAY 02a]. Pour améliorer cette densification, l'ajout de dopants a été testé par quelques auteurs. Suchanek *et al.* [SUC 97] ont montré, par exemple, que l'ajout de phosphates de sodium ou de β -NaCaPO₄ améliorerait la densification de l'HA.

Cependant, ces bons résultats de densification sont obtenus pour de hautes températures de frittage (> 1200°C). Or, à ces températures, les céramiques frittées présentent des tailles de grains moyennes importantes (> 2 μ m). Pour pallier ce problème, différentes techniques de frittage ont été expérimentées.

- Le pressage isostatique à chaud est appliqué à la densification de poudres d'hydroxyapatite encapsulées dans des capsules de verre Pyrex[®] depuis les années 80 par plusieurs équipes de chercheurs japonais et suédois [HIR 82], [UEM 89], [LI 90]. Uematsu *et al.* ont densifié à 100 % une poudre d'hydroxyapatite très pure, synthétisée à partir d'hydrogénophosphate de diammonium et de nitrate de calcium, avec une taille des grains de 100 nm après un frittage sous 100 MPa pendant 2 heures à 1000°C. J. Li et J. Hermansson ont, également, obtenu une densification de 100 % pour de la poudre d'HA mélangée à de la poudre d'os à la suite de traitements à 1225 et 1275°C sous 200 MPa. Les échantillons denses présentaient une taille des grains plus importante (quelques μ m) en raison de la température de frittage plus élevée. Dans ces deux études, les échantillons denses d'hydroxyapatite étaient transparents. Le seul article relatif à l'utilisation de la technique post-HIP est celui de Takikawa et Akao [TAK 96] qui densifient de la poudre d'HAP synthétisée à partir de Ca(OH)₂, en deux étapes : un premier frittage naturel à 1100°C pendant 2 heures qui conduit à un matériau dense à 97,6 % avec une taille des grains de 0,43 μ m suivi d'un traitement par post-HIP à 1100°C sous 200 MPa (Ar) pendant 1 heure qui permet d'augmenter le taux de densification à 99,6 % sans croissance des grains. Les échantillons sont transparents à plus de 60 % pour une longueur d'onde de 700 nm. Cette transparence diminue jusque 40 % après quatre semaines d'implantation sous-cutanée en raison d'une dissolution des joints de grains, ce qui permet une observation *in vivo* des cellules à travers l'implant.

- Notons que Dj.Veljović *et al.* [VEL 09] ont également obtenu la transparence pour des échantillons d'hydroxyapatite denses avec une taille des grains de l'ordre de 50 nm en utilisant la technique du pressage à chaud uniaxial (950 ou 1000°C sous 20 MPa). Par un

frittage sous charge à 1100°C, Raynaud [RAY 99] a obtenu de l'HA densifié à 97,8 %. Elle a, également, montré que la présence de 2 % de β -TCP dans l'hydroxyapatite améliorerait la densification, la densité relative étant, alors, de 99,8 % dans les mêmes conditions.

- Le frittage en deux étapes (TSS : Two-Step Sintering) développé par Chen et Wang [CHE 00] permet de densifier un matériau en minimisant l'augmentation de la taille de grains. Celui-ci est chauffé jusqu'à une température T_1 afin de débiter le processus de frittage. La température est, ensuite, rapidement diminuée jusqu'à une température T_2 afin de poursuivre la densification, sans augmentation de la taille de grains. Mazaheri *et al.* [MAZ 09] ont utilisé cette technique pour densifier l'hydroxyapatite : un début de frittage à 900°C suivi d'un palier durant 20 heures à 800°C a permis de densifier l'HA à 98,8 % avec une taille de grains moyenne inférieure à 200 nm.

- Un frittage micro-ondes, durant 15 minutes, a permis à Vijayan *et al.* [VIJ 02] de densifier de l'HA autour de 98 % avec une taille de grains raisonnable (500 - 600 nm).

- Eriksson *et al.* [ERI 11] ont densifié l'HA par frittage SPS (Spark Plasma Sintering). Un frittage de poudres nanométriques à 700°C durant 3 minutes, sous une pression de 400 MPa a permis d'obtenir une céramique densifiée à 99,9 % avec une taille de grains moyenne de 84 nm. Chaudhry *et al.* [CHA 11] ont, également, obtenu, par cette méthode, de l'HA de densité relative 100 % avec une faible taille de grains (< 200 nm) après un frittage à 950°C pendant 5 minutes sous une pression de 100 MPa.

- Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des biocéramiques de phosphate de calcium ont été très largement étudiées. Cependant, ces propriétés sont intimement liées à la microstructure du matériau qui, elle-même, dépend des conditions d'élaboration. Différents paramètres sont impliqués, incluant la nature des poudres de départ (stœchiométrie, granulométrie, ...) et les conditions de frittage qui conditionnent, généralement, les densités relatives et les tailles de grains finales.

La diversité des résultats de frittage montrée précédemment sur l'hydroxyapatite, diversité tant en termes de taille de grain que de taux de porosité, explique la dispersion des valeurs de propriétés mécaniques disponibles dans la littérature. Le *Tableau 3* donne un aperçu non exhaustif de données disponibles pour de l'hydroxyapatite densifiée au minimum à 95 %.

Ce tableau montre bien qu'il est très difficile de définir de façon précise les propriétés mécaniques intrinsèques de l'hydroxyapatite.

Référence	Conditions de frittage	Densité (%)	Taille de grain (μm)	Dureté Vickers (GPa)	Ténacité ($\text{MPa}\cdot\sqrt{\text{m}}$)	Résistance à la flexion (MPa)	Module d'Young (GPa)
[JAR 76]	1100°C FC	99,6	0,3	-	-	196 (3 points)	-
[AKA 84]	1200°C FC	97,2	0,7	-	0,95	102 (4 points)	92
[LI 90]	1225°C HIP	100		4,0	1,1	110 (3 points)	
[JUA 96]	1250°C FC	95,0	3,0	-	-	55 (4 points)	-
[ŚLÓ 99]	1250°C FC	98,5	-	-	-	-	109
[MUR 00]	1250°C FC	> 99	2,0	6,1	-	-	-
[YAS 00]	1200°C FC	96,2	0,85	-	-	88,5 (3 points)	-
[GU 02]	950°C SPS	99,6	4,6	-	1,25	-	108
[RAY 02b]	1100°C PC	97,8	0,2	-	1,0	75 (3 points)	-
[THA 02]	1100°C FC	97,0	2,3	6,3	0,88	60 (3 points)	-
[BEN 05]	1200°C FC	97,5	2,0	5,0	-	-	112
[HE 08]	1250°C FC	98,4	0,84	8,25	-	-	137
[MAZ 09]	900°C- 800°C TSS	98,8	0,19	7,8	1,92	-	-
[LAA 10]	1200°C FC	98,0	1,8	4,7	0,98	98 (4 points)	107
[CHA 11]	950°C SPS	100	0,16	-	-	137 (3 points)	-
[SON 11]	1200°C FC	96,0	1.5	5,1	1,24	106 (3 points)	-
[RAM 12]	1100°C FC	99,0	1,8	7	1	-	-

Tableau 3 : Synthèse bibliographique (non exhaustive) des propriétés mécaniques mesurées sur de l'hydroxyapatite stœchiométrique densifiée (FC : frittage conventionnel; PC : pressage à chaud; TSS : two step sintering; SPS : spark plasma sintering, HIP : pressage isostatique à chaud)

1.4.3. Le phosphate tricalcique

1.4.3.1. Généralités sur le phosphate tricalcique

Le phosphate tricalcique, de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, existe sous plusieurs formes allotropiques dont la stabilité dépend de la température.

A basse température, le phosphate tricalcique est amorphe mais, après traitement thermique à des températures supérieures à 700°C , il se transforme en β -TCP et est stable.

Au dessus de 1130°C , se forme le TCP α [JAR 81] [FAM 94] puis le TCP α' pour des températures supérieures à 1470°C . Le phosphate tricalcique α est stable entre 1130 et 1470°C mais est métastable à température ambiante, ce qui fait que ce matériau est rarement utilisé comme biomatériau. Il est plus résorbable que le β -TCP.

La transformation du β -TCP en α -TCP s'accompagne d'une augmentation du volume de la maille cristalline. En effet, les masses volumiques du β -TCP et du α -TCP sont, respectivement, $3,07$ et $2,86 \text{ g.cm}^{-3}$.

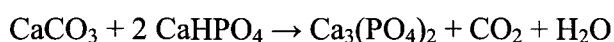
Le β -TCP cristallise dans le système rhomboédrique et appartient au groupe spatial R_{3c} avec les paramètres de maille suivants (paramètres hexagonaux) : $a = b = 10,429 \text{ \AA}$ et $c = 37,380 \text{ \AA}$ (fiches International Centre for Diffraction Data n° 09-0169 et 01-70-2065) [DIC 74]. Le rapport atomique Ca/P du β -TCP est 1,5. Les proportions massiques en calcium et en phosphore sont respectivement $38,76$ et $19,97 \%$.

1.4.3.2. Différents modes de synthèses du phosphate tricalcique

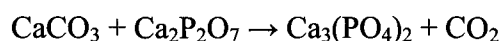
- Voie sèche

Le phosphate tricalcique β peut être obtenu par voie sèche de différentes manières :

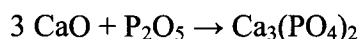
- par réaction du carbonate de calcium avec le phosphate dicalcique à 1000°C pendant 24 h [LIN 98] :



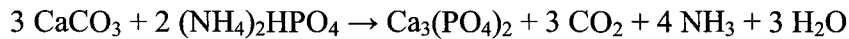
- par réaction du carbonate de calcium avec le pyrophosphate de calcium à 1100°C pendant 12 h [RYU 02] :



- par broyage mécanique très énergétique de chaux et de pentoxyde de phosphore pendant 16 h suivi d'un traitement thermique [CHO 07] [SER 01] :

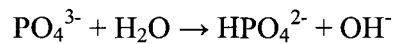


- par réaction du carbonate de calcium et de l'hydrogénophosphate de diammonium à 900°C [BEN 06] :

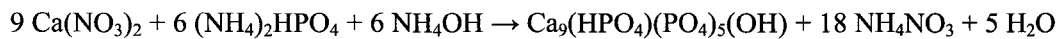


- *Voie humide*

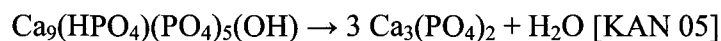
Comme pour l'hydroxyapatite, la méthode de synthèse en voie humide la plus répandue est la méthode par précipitation par mélange d'une solution de nitrate de calcium à laquelle est ajoutée, goutte à goutte, une solution d'hydrogénophosphate de diammonium. Le pH est contrôlé par un ajout continu d'ammoniaque. Après synthèse, est alors obtenu le phosphate tricalcique amorphe $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, \text{nH}_2\text{O}$. Les ions phosphates s'hydrolysent en ions hydrogénophosphates et hydroxydes selon l'équation :



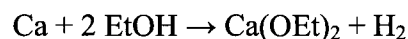
Après cette hydrolyse, on obtient le phosphate tricalcique apatitique [DES 03] selon l'équation suivante :



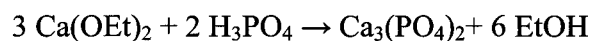
Après synthèse, le phosphate tricalcique apatitique est calciné à une température supérieure à 700°C afin de former le β -TCP cristallisé par perte d'une molécule d'eau :



Une autre méthode repose sur la technique sol-gel [FEL 09]. Le diéthoxyde de calcium est préparé en faisant réagir du calcium et de l'éthanol en atmosphère inerte et sous reflux.



Puis, une solution d'acide phosphorique et d'éthanol est ajoutée au diéthoxyde de calcium.



Une déficience en calcium conduit à la présence de pyrophosphate de calcium dans le β -TCP alors qu'un excès de calcium génère la présence d'HA (*Figure 2*).

1.4.3.3. Densification et propriétés mécaniques du β -TCP

- Frittage

De façon générale, le frittage naturel du β -TCP s'avère difficile. En effet, la phase β du TCP (densité 3,07) est stable jusqu'à une température proche de 1130°C. Au-delà, elle se transforme en phase α dont la densité est égale à 2,86. Cette transformation allotropique entraîne une microfissuration de l'échantillon et, donc, une diminution de la densité, ainsi que de ses propriétés mécaniques [RYU 02] [FAM 94]. Du fait de cette limitation en température, les densités relatives sont généralement peu satisfaisantes et dépassent, rarement, les 80 % par frittage naturel de poudres non optimisées [RAY 02a] [RYU 02].

De nombreux auteurs ont montré l'importance majeure de la granulométrie de la poudre de TCP initiale. Descamps *et al.* [DES 07] ont, notamment, mis en évidence l'influence de la surface spécifique initiale des poudres. A partir de poudres calcinées à 800°C (surface spécifique $\approx 6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$), des échantillons coulés en moule de plâtre puis frittés à 1100°C présentent des densités relatives de 98 %. Il est, également, possible d'améliorer la densification du TCP en utilisant des poudres nanométriques. Lin *et al.* [LIN 07] et Chen *et al.* [CHE 08] ont obtenu, après un frittage à 1100°C, des densités relatives égales, respectivement, à 99,5 et 97,4 %.

Un des moyens d'augmenter le taux de densification du TCP est d'utiliser des dopants. En effet, il a été montré par de nombreux auteurs que l'ajout d'additifs tels que MgO, MnO₂ ou NaF décale la transformation allotropique $\beta \rightarrow \alpha$ vers les plus hautes températures (autour de 1300°C) et permet, donc, un frittage à une température supérieure [FAM 94] [END 05] [CAC 11] [ACC 08] [SEE 08].

Ainsi, par l'utilisation de poudres nanométriques et un dopage combiné avec MgO et SrO, Banerjee *et al.* [BAN 10] ont densifié du β -TCP jusqu'à 97 % après un frittage à 1250°C sans transformation vers la phase α . De la même façon, Ryu *et al.* [RYU 02] ont montré que la présence de 0,5 % de pyrophosphate de calcium (Ca₂P₂O₇) permettait de densifier du TCP à plus de 95 % à 1200°C, sans apparition de la phase α .

Quelques auteurs ont, également, démontré qu'il était possible d'améliorer les densités finales en modifiant légèrement la stœchiométrie initiale des poudres. En effet, des poudres de TCP contenant environ 5 % d'hydroxyapatite ont été densifiées à plus de 99 % après un frittage à 1100°C [DOU 11] [DES 07].

Enfin, la densification du β -TCP a, également, été améliorée par l'utilisation de frittages sous contraintes. Par frittage SPS, Kawagoe *et al.* [KAW 04] ont obtenu des densités

relatives supérieures à 99 % après un frittage à 1000°C (pour une taille de grains moyenne de 1,5 µm).

I. Kondoh *et al.* du GIRI d'Osaka [KON 89] ont, également, appliqué la technique encapsulation-HIP au frittage du β -TCP. Ils ont aussi démontré la possibilité de diminuer la température de frittage du β -TCP de 1200°C à 1000°C en appliquant une pression de 100 MPa pendant 30 minutes. L'échantillon obtenu était transparent avec une taille de grains micronique et une densité de 99 %.

- Propriétés mécaniques

Du fait de la difficulté rencontrée par les différents auteurs à densifier le phosphate tricalcique, les résultats de propriétés mécaniques dans la littérature sont beaucoup moins répandus que pour l'hydroxyapatite (*Tableau 4*). Nous avons, volontairement, choisi de ne reporter dans ce tableau que les données mesurées pour du TCP non dopé et écarté tous les résultats qui semblaient douteux car obtenus après des frittages à des températures supérieures à 1150°C, donc impliquant probablement, au moins partiellement, la présence de la phase alpha du TCP.

Comme pour l'hydroxyapatite, on observe une dispersion importante dans les résultats (surtout concernant les valeurs de résistance à la flexion) du fait de conditions de frittage et, donc, de densités et tailles de grains finales différentes.

Référence	Conditions de frittage	Densité (%)	Taille de grain (µm)	Dureté Vickers (GPa)	Ténacité (MPa.√m)	Résistance à la flexion (MPa)	Module d'Young (GPa)
[AKA 84]	1150°C FC	98,6	1,1	-	-	133 (3 points)	87
[KON 89]	1000°C HIP	100	-	-	0,80	120 (3 points)	-
[KAW 04]	1000°C SPS	> 99	1,5	5,0	-	-	-
[LIN 07]	1100°C FC	99,5	0,3	5,2	-	199 (3 points)	69
[CHE 08]	1100°C FC	97,4	2,8	-	0,92	93 (3 points)	72

Tableau 4 : Synthèse bibliographique (non exhaustive) des propriétés mécaniques mesurées sur du phosphate tricalcique β stœchiométrique densifié (FC : frittage conventionnel; SPS : spark plasma sintering; HIP : pressage isostatique à chaud)

1.4.4. Les phosphates de calcium biphasiques

Actuellement, l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique β sont largement reconnus et utilisés comme matériaux pour des applications de substitution dans les domaines dentaires et orthopédiques du fait de leur similitude chimique avec la partie inorganique des os et des dents [ELL 94] [KLE 84]. La stabilité de ces deux matériaux vis-à-vis des fluides biologiques est très différente. Alors que le taux de solubilité de l'hydroxyapatite densifiée dans le tissu sous-cutané est très faible, le phosphate tricalcique est biodégradable et, après l'implantation, peut être complètement remplacé par de l'os nouvellement formé. Ainsi, pour parvenir à une résorption optimale, contrôlée et adaptée au site d'implantation, les phosphates de calcium biphasiques BCP, constitués d'un mélange de HAP et de β -TCP, ont été développés [DAC 89]. Le taux de dégradation du matériel implanté, lequel ne doit pas dépasser la vitesse de reconstruction et de croissance osseuse, est contrôlé par la valeur du rapport Ca/P du biomatériau [KWO 03] [NER 92] [YAM 97].

Ces phosphates de calcium biphasiques sont, également, considérés comme très intéressants du fait de leur capacité à favoriser la formation du tissu osseux néoformé au niveau du site d'implantation [LEG 03] [GAU 98] et à créer un lien direct et intense avec l'os hôte entraînant une interface forte.

La formation de cette interface dynamique résulte d'une séquence d'événements impliquant une interaction avec des cellules et la formation d'une couche d'apatite carbonatée par un processus de dissolution/précipitation à la surface de la biocéramique.

En effet, la biodégradation du phosphate de calcium biphasique au contact des fluides biologiques s'accompagne de la libération d'ions calcium et phosphate qui provoque un enrichissement ionique du micro-environnement. L'augmentation de la concentration en ions induit une sursaturation locale du milieu qui favorise la précipitation et la formation d'apatite carbonatée, similaire à l'apatite osseuse.

Les poudres biphasées peuvent être préparées par différentes méthodes telles que par mélange mécanique de poudres d'HA et de TCP [BOU 96] [RYU 04], par réaction à l'état solide [RAO 97] ou par co-précipitation d'hydroxyapatite déficiente en calcium [RAY 02a] [KWO 03].

La densification des phosphates de calcium biphasiques n'est pas aisée. Les comportements au frittage de l'HA et du β -TCP sont différents et nécessitent des températures de frittage élevées pour la consolidation du composite. Cependant, la transformation

allotropique du β -TCP vers le α -TCP à une température de l'ordre de 1130°C limite l'utilisation de hautes températures de densification.

Une solution pour résoudre ces difficultés de frittage est de stabiliser la phase β du TCP afin d'accroître la température de transformation de phase et permettre un frittage à plus haute température. Une autre possibilité est de décroître cette température de frittage en employant d'autres techniques de densification (micro-onde, pressage à chaud,...). Enfin, une optimisation du cycle de frittage permet d'améliorer la densification du matériau ou d'éviter la présence de la phase α .

La recherche bibliographique effectuée sur la densification des matériaux phosphocalciques biphasés a permis d'identifier un nombre restreint de travaux récents :

- Benaqqa [BEN 03] propose, après pressage uniaxial (20 MPa) et pressage isostatique (200 MPa), le frittage d'un biphasique 70 % d'HA – 30 % de TCP à 1200°C pendant 7 h avec un revenu à 850°C afin de transformer le TCP α formé à haute température en TCP β . Le module d'Young et la résistance à la flexion sont, respectivement, de 102 GPa et de 60 MPa avec une densité de 98 % et une taille de grains non précisée.

- Ryu *et al.* [RYU 04] montrent que l'addition de MgO, au sein d'une biocéramique de composition massique 50 % d'HA- 50 % de TCP, améliore significativement la densification et les propriétés mécaniques du composite sans en altérer les qualités biologiques. L'introduction de 1 % de MgO permet d'effectuer un frittage à 1300°C, sans l'apparition de la phase α du TCP et d'obtenir une densité du matériau de l'ordre de 99 % avec une distribution bimodale de grains (3-5 μm et 0,2-0,3 μm). Une résistance à la flexion de 100 MPa, une ténacité de 1,23 MPa. $\sqrt{\text{m}}$ et une dureté Vickers de 5,4 GPa sont évaluées sur ce matériau.

- Jun *et al.* [JUN 06] comparent la densification de poudres biphasées de composition 45 % d'HA et 55 % de TCP obtenues par différentes voies : une poudre synthétisée par co-précipitation, un mélange de poudres d'HA et TCP et un mélange commercial d'HA et TCP dopé au MgO. Les poudres sont mises en forme par un pressage isostatique à froid (200 MPa) puis traitées thermiquement à des températures maximales de 1200°C. Un frittage à 1100°C permet d'obtenir pour la poudre co-précipitée des densités de 95 % avec une taille de grains variant de 1 à 2 μm . Pour la poudre dopée au MgO, une densité du même ordre est mesurée mais à une température de frittage de 1200°C, la magnésie permettant de déplacer vers les plus hautes températures la transition $\beta \rightarrow \alpha$. Enfin, pour le mélange brut de poudres, une faible densification est obtenue (< 70 %) à 1100°C.

- Shiota *et al.* [SHI 08] densifient des poudres biphasées de compositions HA/TCP égales à 70/30 et 52/48, par frittage naturel à une température de 1150°C, après une mise en forme par pressage isostatique à 100 MPa. Des densités de l'ordre de 98 % sont obtenues sur ces matériaux avec une taille moyenne de grains de 0,8 μm . Les propriétés mécaniques les plus élevées sont relevées pour le composite à 70 % d'HA, en particulier, une résistance à la flexion de 171 MPa, une ténacité de 1,1 MPa. $\sqrt{\text{m}}$, une dureté Vickers de 5,5 GPa et un module de Young de 80 GPa.

- Kannan *et al.* [KAN 08] et Raynaud *et al.* [RAY 02b] étudient la densification des biphasiques de rapport Ca/P compris entre 1,44 et 1,71. Des densités inférieures à 90 % sont obtenues lorsque la teneur massique en TCP devient supérieure à 20 %, après un frittage naturel à 1250°C pour des échantillons pressés uniaxialement à 120 MPa. Pour surmonter ces difficultés, les auteurs utilisent le pressage à chaud pour densifier les matériaux. Après un chauffage à 1100°C sous une pression de 20 MPa, des densités égales ou supérieures à 99 % sont mesurées pour les biphasiques contenant jusqu'à 28 % de TCP. Pour des teneurs supérieures en TCP, une chute drastique de la densification est observée. La résistance à la rupture et la ténacité atteignent des valeurs maximales respectives de 150 MPa et 1,1 MPa. $\sqrt{\text{m}}$ pour la composition à 90 % d'HA et 10 % de TCP. Ces valeurs diminuent fortement pour les autres compositions.

- Veljović *et al.* [VEL 10] utilisent le frittage par micro-ondes afin de densifier un matériau biphasé de rapport Ca/P égal à 1,62 ($\approx$ 28 % de TCP). Des températures variant de 900 à 1200°C sont expérimentées avec une durée de traitement de 15 min. La densité maximale obtenue est égale à 2,60 (à 1000°C). La taille de grains de 0,1 μm à 900°C atteint 4,7 μm à 1200°C avec des ténacités respectives de 0,56 et 0,92 MPa. $\sqrt{\text{m}}$.

- Brown *et al.* [BRO 10] propose des frittages à de très hautes températures pour densifier trois composés biphasiques de compositions HA/TCP égales à 80/20, 50/50, 20/80. Les matériaux, préalablement mis en forme par un pressage isostatique à froid (10 MPa), sont, ensuite, frittés à 1250, 1275 et 1300°C. Lors du refroidissement, un palier à 900°C est réalisé afin d'éliminer la phase α présente en quantité importante. Les résultats obtenus indiquent qu'à 1275°C, cette phase a totalement disparu pour toutes les compositions. A 1300°C, de faibles quantités de phase α (3 à 11 %) sont détectées sur les échantillons de compositions HA/TCP 50/50 et 80/20. Les densités obtenues sur ces matériaux, après ce type de traitement ne sont pas précisées dans l'article.

- Lukić *et al.* [LUK 11] proposent une nouvelle technique de frittage, appelée "Two Step Sintering" ou TSS, pour densifier un biphasique de composition 85 % d'HA et

15 % de TCP. Le TSS privilégie une densification par un mécanisme de diffusion aux joints de grains plutôt que par migration des joints de grains, responsable de la croissance du grain. Les échantillons, après un pressage isostatique à une pression de 400 MPa, sont portés à 1100°C durant 30 min puis maintenus 20 h à 1050°C. Après ce traitement, le composite présente une densité relative de l'ordre de 97,5 % et une dimension de grains égale à 0,375 μm . La ténacité et la dureté Vickers sont, respectivement, égales à 1,1 MPa. $\sqrt{\text{m}}$ et 4,9 GPa.

1.5. Cytotoxicité et fonctionnalisation

La cytocompatibilité d'un matériau est évaluée par des techniques de cultures cellulaires *in vitro*. En effet, la culture cellulaire est la première étape permettant de déterminer la cytocompatibilité d'un élément de façon rapide et fiable. Les tests les plus répandus sont les tests de cytocompatibilité générale comme la viabilité, la prolifération, l'adhésion ou la morphologie cellulaires. Ces tests de cytocompatibilité sont décrits dans la norme ISO 10993-5/EN 30993-5 [NF 10993], ils apportent des informations complémentaires permettant de mieux appréhender la cytocompatibilité du matériau [HOR 02]. Les biomatériaux sont des matériaux métalliques, céramiques ou polymères actuellement en très forte évolution. Ils sont passés de bio inertes à bioactifs puis fonctionnels, en remplissant actuellement de véritables fonctions thérapeutiques grâce à leur fonctionnalisation.

1.5.1. Cytocompatibilité

Le test de viabilité cellulaire permet d'évaluer la cytotoxicité d'un matériau en mettant en contact des cellules sensibles aux substances toxiques avec des concentrations croissantes du matériau à évaluer. Ce test consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et, par conséquent, la concentration létale 50 % (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies [ZIA 88] [HIL 90]. Pour ce test, nous utilisons la lignée cellulaire L132. Ces cellules sont très sensibles aux substances toxiques et réagissent avec une reproductibilité très constante [HIL 96].

Le test de prolifération cellulaire permet, quant à lui, de vérifier si le support est favorable à la multiplication des cellules et la vitesse à laquelle s'effectue cette multiplication en établissant des courbes de croissance cellulaire en fonction du temps. Ce test peut être réduit à deux temps de mesure, un au début de la vitesse de croissance exponentielle (généralement 3 jours) et un autre choisi par l'expérimentateur (généralement 6 jours) avant la

confluence cellulaire. Les cellules peuvent être dénombrées de différentes façons, soit par comptage direct grâce à un compteur de particules ou par méthode indirecte telles que les méthodes MTT, XTT et Alamar Blue qui sont des tests colorimétriques. Cependant, des cellules comme les ostéoblastes ont besoin, pour proliférer, d'adhérer au support, c'est pourquoi il est nécessaire d'évaluer l'adhésion cellulaire.

Après une mise en contact avec un substrat vivant ou non-vivant, une cellule active commence à sécréter des protéines d'adhésion. Il a été montré [SCH 94] que la vitronectine est la première protéine du sérum à se déposer sur le verre permettant aux cellules d'adhérer. La fibronectine se dépose, elle aussi, quasiment instantanément [PEA 88]. Ces protéines s'adsorbent sur les surfaces et permettent l'adhésion des cellules par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires spécifiques (les intégrines) telle que la fibronectine. Il y a, alors, création de points d'ancrage entre la matrice extracellulaire et les intégrines membranaires, elles-mêmes reliées aux protéines intracellulaires du cytosquelette. Il est, alors, possible de détecter ces points d'encrage par immunomarquage de l'une des protéines d'adhésion (comme la vinculine) et de visualiser ces points focaux d'adhésion par microscopie confocale laser. L'adhésion cellulaire est, alors, mesurée quantitativement.

Il est à noter que, pour un type cellulaire donné, la topographie d'un matériau peut conditionner l'adhésion, la migration et la forme d'une cellule. *In vitro*, les ostéoblastes ne peuvent pas s'étaler sur des substrats trop rugueux, ils établissent dans ce cas des points d'ancrage pour se stabiliser sur cette topographie. Sur des surfaces de rugosité moyenne, les ostéoblastes prennent une forme cubique et sont d'avantage différenciés. Sur des surfaces très lisses, les ostéoblastes prolifèrent bien et se différencient moins rapidement, *in vivo* ils seraient en forte concurrence avec les fibroblastes qui affectionnent ce type de surface. En effet, *in vivo* la formation d'un nouveau tissu osseux est favorisée par des biomatériaux rugueux et poreux [GRO 92] alors que les surfaces lisses entraînent la formation d'une couche fibreuse à l'interface [BUS 91]. L'adhésion cellulaire n'est donc pas un facteur suffisant pour établir la cytocompatibilité d'un biomatériau. Un critère qualitatif comme la morphologie cellulaire est donc également à prendre en compte. En effet, il n'est pas rare que cette adhésion ne soit pas suivie d'étalement et de croissance cellulaire. L'étalement cellulaire apparaît ici comme un critère caractéristique de l'état cellulaire normal et contribue à évaluer la cytocompatibilité du biomatériau [HOR 02].

1.5.2. Fonctionnalisation

Les évolutions dans les usages des biomatériaux se traduisent par une complexification des cahiers des charges fonctionnels. On demande désormais aux matériaux d'être plus spécifiques et mieux adaptés à l'application pour laquelle ils sont prévus, l'objectif à terme étant de concevoir et produire des biomatériaux sur mesure. Les voies de fonctionnalisation des matériaux sont multiples : la fonctionnalisation peut être réalisée en surface, dans la masse ou par la réalisation d'assemblages avec les composites. La réalisation de céramiques microporeuses en phosphate de calcium semble donc bien adaptée pour permettre la fonctionnalisation de la biocéramique. En effet, il a été montré qu'il était possible de contrôler la microporosité de l'hydroxyapatite [HOR 07] et de fonctionnaliser la céramique microporeuse pour lui apporter une propriété anti bactérienne [CHA 07] par imprégnation d'antibiotique. Des ciments injectables ont également été réalisés par addition de gentamicine dans le ciment standard. La fonctionnalisation peut, donc, être apportées par dopage en agents chimiques dans la structure poreuse des céramiques : les agents pouvant être des antibiotiques, des anticancéreux (antimitotiques) ou des facteurs de croissance de façon à orienter la prolifération ou la différenciation cellulaire en fonction de l'application visée.

La fonctionnalisation peut, également, s'effectuer par des agents biologiques tels que des phages directement ciblés vers une bactérie définie ou en "cocktail" pour un traitement plus large et une meilleure efficacité. Le fait d'utiliser des phages lytiques modifiés génétiquement permet de cibler une bactérie et de la détruire sans engendrer de mutation génétique non souhaitée. La phagothérapie est, donc, une arme permettant de lutter contre les maladies nosocomiales, là où les antibiotiques montrent leurs limites. Cependant cette thérapie est encore peu utilisée en Occident.

La phagothérapie est née il y a plus de 80 ans. Après des succès prometteurs, elle a été abandonnée au profit de l'antibiothérapie. Les raisons de son abandon sont multiples :

- la méconnaissance initiale de sa nature qui n'a pas permis une compréhension claire de son mode d'action,
- l'usage initial sans méthodologie suffisamment rigoureuse a, dans nombreux cas, abouti à des échecs qui l'ont discréditée,
- l'apparition des antibiotiques qui a souligné l'étroite spécificité d'action des bactériophages qui ne permet pas de traiter des infections systémiques en urgence.

Ainsi, la phagothérapie confrontée à l'antibiothérapie est apparue d'un emploi plus restrictif, plus contraignant et moins universel. Il aura fallu les constats alarmistes concernant les antibiotiques pour que la recherche de nouvelles solutions conduise à réévaluer des

méthodes anciennes. Mais c'est avec toutes les possibilités modernes qu'il convient de le faire. D'une part, pour ne pas reproduire les erreurs du passé et, d'autre part, pour assurer toute la sécurité de la production et de la qualité des préparations qui doivent être strictement contrôlées [DUB 08].

2. Synthèse et caractérisations des poudres de phosphate de calcium

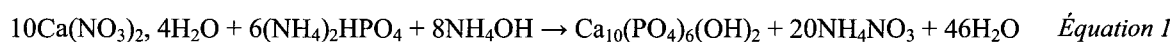
Ce chapitre porte sur la synthèse de poudres phosphocalciques mono et biphasées élaborées par précipitation en voie aqueuse, la caractérisation structurale et la quantification des différentes phases en présence ainsi que les traitements thermiques de calcination.

2.1. Synthèse des poudres phosphocalciques

2.1.1. L'hydroxyapatite

La poudre d'hydroxyapatite est préparée par la technique de précipitation en phase aqueuse par le mélange d'une solution de phosphate de diammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Carlo Erba, pureté = 98 %) (*Annexe I*) et d'une solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Honeywell, pureté > 98 %) (*Annexe II*).

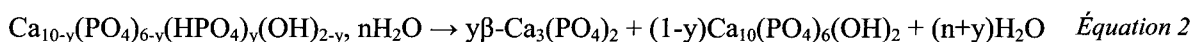
La formation de l'hydroxyapatite, pour un rapport $\text{Ca/P} = 1,667$, se produit selon la réaction suivante (*Équation 1*) :



Cependant, lorsque ce rapport est compris entre 1,5 (Ca/P du phosphate tricalcique) et 1,667, la synthèse permet la précipitation du phosphate tricalcique apatitique :



La calcination de ce composé conduit à sa décomposition en phosphate tricalcique et hydroxyapatite selon l'*Équation 2*.



Pour des compositions sur-stœchiométriques (excès de nitrate de calcium), il se forme, en complément de l'hydroxyapatite, de l'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ qui, se décompose en chaux (CaO) au cours de la calcination de la poudre.

La solution de nitrate de calcium (22 moles dissoutes dans 17 L d'eau) est introduite dans un réacteur de 25 L à double paroi (*Figure 3*) maintenu à 50°C par un bain thermostaté (Fisher Bioblock Scientific). La solution de phosphate de diammonium (13,2 moles dissoutes dans 4,6 L d'eau) est ajoutée goutte à goutte à un débit de 50 mL.min⁻¹ grâce à une pompe péristaltique (Cole-Palmer Instrument Company, Masterflex L/S). Le mélange est réalisé sous agitation mécanique (Heidolph RZR 2102 control) à 140 tr.min⁻¹ à l'aide d'une pale en Téflon®. Le rapport molaire calcium sur phosphore des réactifs est noté $(\text{Ca/P})_r$ et est égal à 1,667.



Figure 3 : Réacteur de synthèse des poudres phosphocalciques

Lors de la réaction, le pH de la suspension, mesuré à l'aide d'une électrode Schott H8381 HD, est ajusté à 8 par ajout continu d'ammoniaque (Carlo Erba, solution à 30 % massique) grâce à une pompe doseuse (Black Stone BL 7916). Une maturation de la suspension est effectuée pendant 24 h. La solution est, ensuite, filtrée sur Büchner et le précipité est rincé à l'éthanol et séché à 70°C.

Une poudre d'hydroxyapatite sur- ou sous-stœchiométrique contiendra, respectivement, de la chaux ou du β -TCP (*Figure 4*).

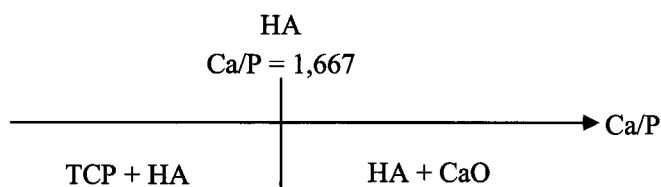


Figure 4 : Produits issus de la synthèse d'hydroxyapatite en fonction du rapport Ca/P

La diffraction des RX permet de détecter la présence de TCP et le test à la phénolphthaléine celle de chaux.

L'analyse DRX réalisée sur la poudre d'HA calcinée à 1000°C, a montré l'absence des raies de diffraction du TCP, en particulier la raie 0210 ($2\theta = 31,025^\circ$) d'intensité relative 100 % (Figure 5).

Lors de cette étude, le diffractogramme a été réalisé à l'aide d'un diffractomètre PANalytical X'Pert PRO avec une analyse 2θ (soit de 20 à 80°) et un temps d'acquisition de 200 secondes par pas de 0,02°. La longueur d'onde utilisée correspond à la longueur d'onde $K_{\alpha 1}$ du cuivre ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). Les pics de diffraction X sont enregistrés et affinés par traitement numérique (Logiciel X'Pert HighScore).

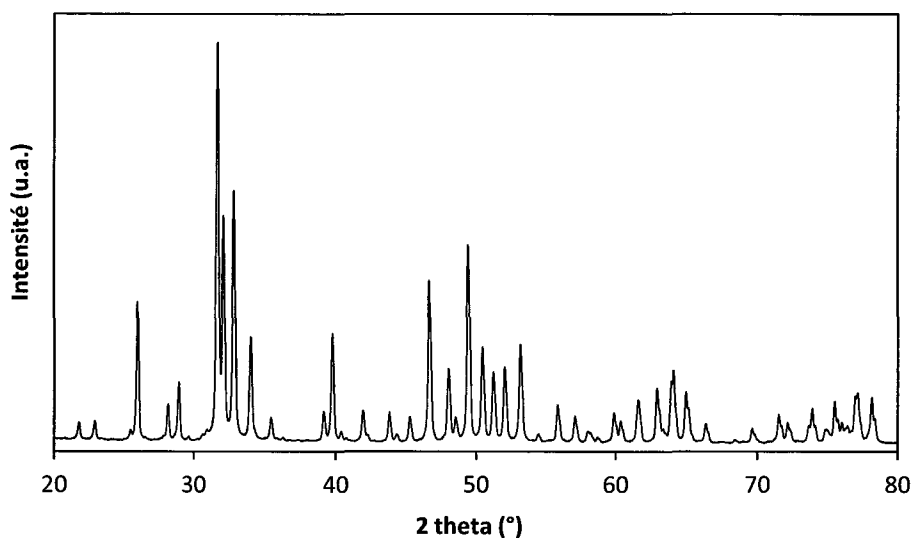


Figure 5 : Diffractogramme RX de la poudre d'hydroxyapatite

La présence de chaux est déterminée par le test à la phénolphthaléine. Ce test est une méthode qualitative qui permet la détection d'oxyde de calcium dans l'hydroxyapatite [NF 94-066]. La phénolphthaléine fait partie de la famille des phtaléines, c'est-à-dire les indicateurs colorés qui dérivent du triphénylméthane et qui possèdent un cycle lactone. Sous forme acide, la phénolphthaléine est incolore alors que sa forme basique est de couleur rose vif. Le virage de cet indicateur se fait en milieu basique, sa zone de virage étant située entre un pH de 8,2 et 10,0. L'expérimentation consiste, tout d'abord, en la préparation d'une solution aqueuse de phénolphthaléine en mélangeant 0,1 mL de phénolphthaléine à 0,2 % dans l'éthanol, dans 50 mL d'eau. La poudre brute de synthèse est ensuite calcinée à 1000°C pendant 15 h puis est projetée encore chaude dans la solution de phénolphthaléine.

L'absence de coloration rose pour notre poudre d'hydroxyapatite indique l'absence de chaux (Figure 6).



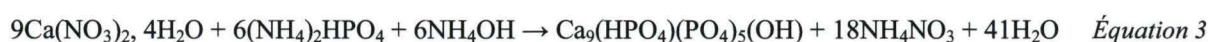
Figure 6 : Test à la phénolphtaléine montrant l'absence de chaux dans notre poudre d'hydroxyapatite (à gauche) et la présence de chaux en plus ou moins grande quantité (au milieu et à droite) dans des poudres stœchiométriques

Les différentes analyses effectuées sur la poudre issue de la synthèse d'HA mettent en évidence l'absence de TCP et de chaux au sein de cette poudre, confirmant ainsi sa stœchiométrie.

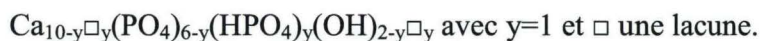
2.1.2. Le phosphate tricalcique β et les phosphates de calcium biphasiques

2.1.2.1. Synthèse du β -TCP stœchiométrique

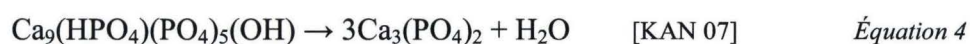
La poudre de phosphate tricalcique β est préparée à partir des mêmes réactifs que pour la synthèse de l'hydroxyapatite, à savoir le nitrate de calcium tétrahydraté et l'hydrogénophosphate de diammonium. Après filtration et séchage, le précipité obtenu est le phosphate tricalcique apatitique (Équation 3).



Lorsque le rapport Ca/P est égal à 1,5, cette phase apatitique correspond à l'hydroxyapatite non stœchiométrique déficitaire en calcium de formule :

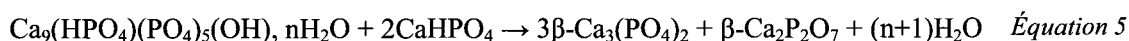


La calcination de cette phase apatitique permet de former le phosphate tricalcique β cristallisé (Équation 4).



Lorsque le rapport Ca/P est inférieur à 1,5, la poudre sèche est composée de phase apatitique et de phosphate dibasique anhydre. La calcination de ce mélange biphasé permet la

formation de phosphate tricalcique et de pyrophosphate de calcium ($\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ou CPP) (Équation 5).



De manière analogue, la calcination de l'hydroxyapatite déficitaire en calcium (avec $0 \leq y \leq 1$) et de rapport Ca/P compris entre 1,5 et 1,667 conduit à sa décomposition en phosphate tricalcique et hydroxyapatite selon l'Équation 2.

Ainsi, selon la valeur du rapport Ca/P, sont obtenues, après calcination, des poudres de phosphate tricalcique β stœchiométriques ou des poudres biphasées (Figure 7). Une poudre de β -TCP sur ou sous-stœchiométrique contiendra, respectivement, de l'hydroxyapatite ou du pyrophosphate de calcium.

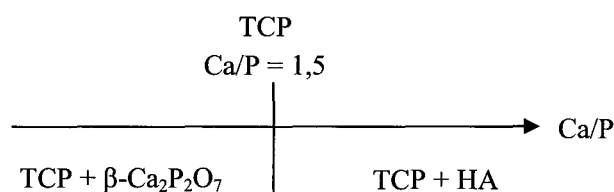


Figure 7 : Produits issus de la synthèse de phosphate tricalcique en fonction du rapport Ca/P

Dans le cadre de notre expérimentation, 39 moles de nitrate de calcium sont dissoutes dans 10 L d'eau et 26 moles d'hydrogénophosphate de diammonium sont dissoutes dans 8,8 L d'eau. La température de réaction a été fixée à 30°C et le pH régulé à 6,5. Après 24 h de maturation, la suspension est filtrée, séchée puis calcinée et caractérisée.

La diffraction des RX permet de détecter la présence d'HA et la spectrométrie IR celle de $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

L'analyse DRX réalisée sur la poudre de TCP a montré l'absence des raies de diffraction de l'HA, en particulier, la raie 211 ($2\theta = 31,772^\circ$) d'intensité relative 100 % (Figure 8).

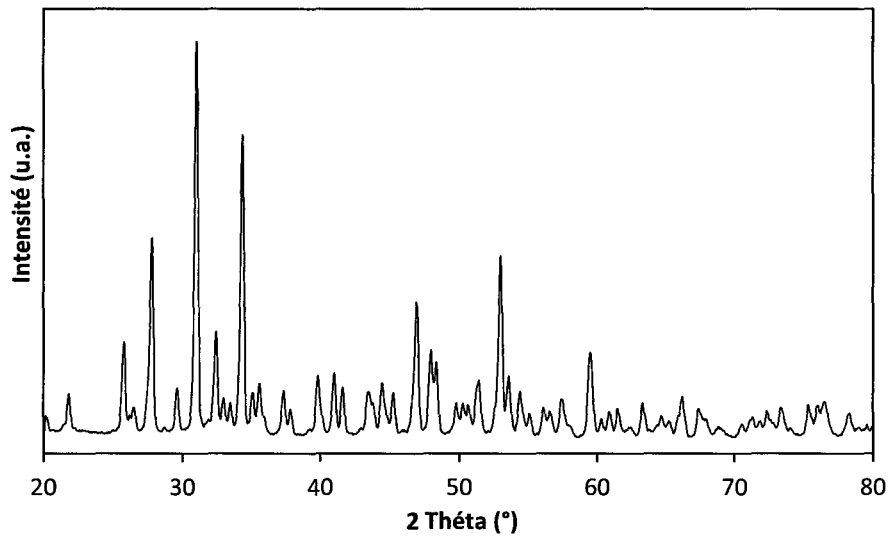


Figure 8 : Diffractogramme RX de la poudre de phosphate tricalcique β

Afin de conclure sur la parfaite stœchiométrie de la poudre de TCP, il faut vérifier la présence ou non de pyrophosphate de calcium. Destainville *et al.* [DES 03] ont mis en place une méthode de quantification du pyrophosphate de calcium par diffraction des rayons X par comparaison des intensités intégrées de raies caractéristiques du β -TCP et du β -CPP (Équation 6 et Équation 7).

$$R = \frac{I_{\beta CPP (203)}}{I_{\beta TCP (0210)}} \quad \text{Équation 6}$$

$$\% CPP = \frac{R}{3,32 \cdot 10^{-3}} \quad \text{Équation 7}$$

Destainville *et al.* utilisent la raie 203 du β -CPP qui est la raie la plus intense (intensité relative = 45 %, $2\theta = 28,869^\circ$) non superposée aux raies du β -TCP. Cependant, cette raie n'est pas observable si la teneur en pyrophosphate de calcium est inférieure à 4 %. Les essais de DRX réalisés sur des poudres précédemment synthétisées au laboratoire et de rapport Ca/P inférieur à 1,500 confirment que la raie 203 du β -CPP est très faible et donc inexploitable (Figure 9).

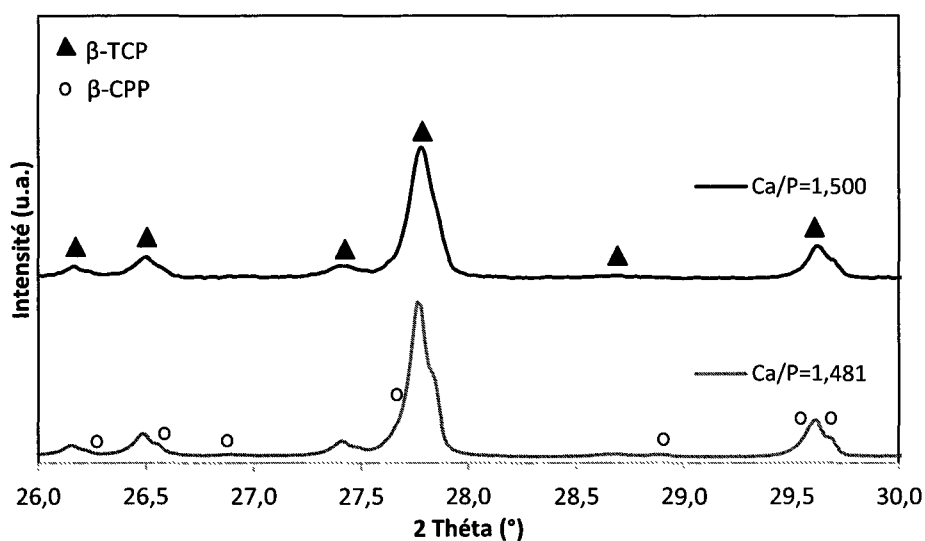


Figure 9 : Diffractogrammes RX de la poudre TCP et d'une poudre de Ca/P = 1,481 (3 % CPP) calcinées à 1000°C

En raison de cette limitation et afin de déterminer la présence de β -CPP dans le β -TCP, la spectrométrie infrarouge a été utilisée pour la détection de faibles quantités de pyrophosphate de calcium. Les bandes caractéristiques des modes de vibration des groupements ioniques des phosphates de calcium sont résumées dans le *Tableau 5*.

Bandes IR (cm ⁻¹)	Intensité	Désignation
460	Faible	Déformation symétrique P-O (ν_2) (groupes PO ₄)
550-600	Forte	Déformation antisymétrique P-O (ν_4) (groupes PO ₄)
630	Epaulement	O-H (groupes OH)
720	Large et faible	P-O-P (groupes P ₂ O ₇)
820	Faible	N-O (groupes NO ₃)
865-880	Faible	Elongation P-OH (groupes HPO ₄)
920	Faible	P-O-P (groupes P ₂ O ₇)
960-965	Moyenne	Elongation symétrique P-O (ν_1) (groupes PO ₄)
1020-1120	Forte	Elongation antisymétrique P-O (ν_3) (groupes PO ₄)
1200	Faible	P-O-P (groupes P ₂ O ₇)
1180-1200	Epaulement	P-OH (groupes HPO ₄)
1414-1454	Faible	C-O (groupes CO ₃)
1380-1400	Forte	N-O (groupes NO ₃)
1630	Moyenne	H ₂ O et CO ₂ adsorbés
3580	Epaulement	O-H (groupes OH)
3650	Faible	O-H (groupes Ca(OH) ₂)
3000-3700	Moyenne	H-O-H (groupes H ₂ O adsorbée)

Tableau 5 : Attribution des principales bandes IR caractéristiques des phosphates de calcium [HEU 77]

Les spectres IR des poudres sont enregistrés en transmission par un spectrophotomètre à transformée de Fourier (Jasco FT/IR-460 Plus) entre 400 et 4000 cm⁻¹ sur des pastilles contenant 300 mg de KBr pour 2 mg de poudre à analyser [NF 94-066].

La Figure 10 représente le spectre IR obtenu sur notre poudre de rapport (Ca/P)_r = 1,5. Il montre la présence des bandes caractéristiques des groupements ioniques PO₄³⁻ (à 550-600 cm⁻¹ et 1020-1120 cm⁻¹) de la structure apatitique.

L'absence des bandes à 720 et 1200 cm⁻¹, caractéristiques des groupements pyrophosphates, confirme la stœchiométrie de la poudre de TCP synthétisée.

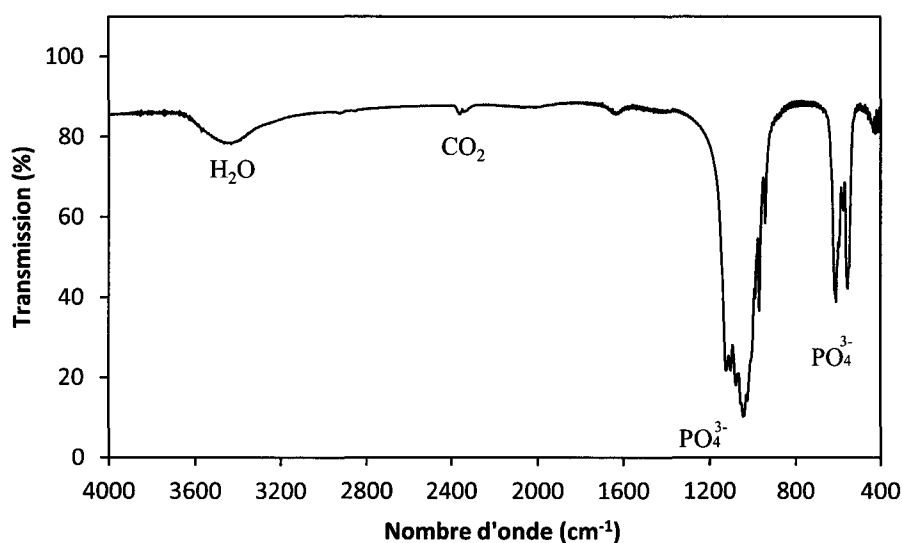


Figure 10 : Spectre IR de la poudre de $(Ca/P)_r = 1,5$ calcinée à $1000^{\circ}C$

Les différentes analyses effectuées sur la poudre issue de la synthèse de phosphate tricalcique mettent en évidence l'absence d'hydroxyapatite et de pyrophosphate de calcium au sein de cette poudre, validant ainsi sa stœchiométrie.

2.1.2.2. Synthèse des phosphates de calcium biphasés

Dans le but de synthétiser des matériaux biphasiques (TCP-HA), les conditions expérimentales établies pour la synthèse du β -TCP ont été préservées, c'est-à-dire une température de réaction et un pH respectivement égaux à $30^{\circ}C$ et 6,5. Cependant et afin d'obtenir des composés de concentrations croissantes en HA, la quantité de nitrate de calcium (n_{Ca}) est augmentée progressivement alors que celle de phosphore (n_P) est maintenue constante à 26 moles (Tableau 6). Ces réactifs sont dissous dans les mêmes volumes d'eau que pour la synthèse de TCP.

	$(Ca/P)_r$	n_{Ca} (mol)	n_P (mol)
TCP	1,500	39,00	26,00
BCP20	1,548	40,25	
BCP40	1,605	41,73	
BCP60	1,680	43,68	
BCP80	1,800	46,80	

Tableau 6 : Nombre de moles de calcium et de phosphore en fonction du rapport Ca/P en réactifs

Ces diverses synthèses ont permis d'obtenir des poudres de rapports Ca/P variables. L'étape suivante va consister à déterminer quantitativement les différentes phases constitutives de nos poudres.

L'analyse chimique élémentaire du phosphore et du calcium n'atteint pas une précision suffisante pour caractériser de manière précise les phosphates de calcium. La méthode physique proposée dans la norme NF 94-066, basée sur la diffraction des RX, est actuellement celle reconnue pour quantifier la composition de mélanges biphasiques β -TCP - HA.

Cette analyse nécessite, préalablement, une calcination des poudres à 1000°C durant 15 heures afin de cristalliser parfaitement les composés présents.

La comparaison des intensités intégrées de raies caractéristiques de l'hydroxyapatite et du phosphate tricalcique β du matériau à analyser permet l'évaluation quantitative de ces différentes phases.

Sur ces considérations, des abaques ont été réalisés avec des mélanges standards, obtenus à partir de poudres stœchiométriques et pures de β -TCP et d'HA.

La norme préconise l'utilisation des raies 210 de l'hydroxyapatite et 0210 du phosphate tricalcique β . Cependant, lorsque la teneur en hydroxyapatite des mélanges biphasiques TCP-HA est inférieure à 30 %, la raie 210 de l'HA est difficilement observable. Raynaud [RAY 01] suggère, alors, le recours à la raie 211 de l'hydroxyapatite qui reste décelable jusqu'à des teneurs de 0,5 % en HA.

Lors de cette étude, les abaques ont été réalisés selon les conditions expérimentales précédemment décrites. Les rapports d'intensités intégrées déterminés avec nos conditions expérimentales vérifient la modélisation de Raynaud [RAY 01] (Tableau 7).

Domaines de composition	Mélanges β -TCP/HA		
	% β -TCP > 80 %	20 % < % β -TCP < 80 %	% β -TCP < 20 %
Rapport d'intensités intégrées	$R_1 = \frac{I_{HA(211)}}{I_{TCP(0210)}}$	$R_2 = \frac{I_{TCP(0210)}}{I_{HA(210)}}$	
% massique en β -TCP	$\%TCP = 100 - \frac{R_1}{0,0111}$	$\%TCP = \frac{92,7R_2}{5,45 + R_2}$	$\%TCP = \frac{R_2}{0,085}$

Tableau 7 : Détermination du pourcentage massique de β -TCP dans des mélanges biphasés TCP - HA [RAY 01]

Le rapport molaire final Ca/P se calcule, alors, à partir des pourcentages massiques et des masses molaires du phosphate tricalcique β et de l'HA selon l'Équation 8.

$$\frac{Ca}{P} = \frac{\frac{3 \%TCP}{M_{TCP}} + \frac{10 \%HA}{M_{HA}}}{\frac{2 \%TCP}{M_{TCP}} + \frac{6 \%HA}{M_{HA}}} \quad \text{Équation 8}$$

Avec : $M_{TCP} = 310,0740 \text{ g.mol}^{-1}$
 $M_{HA} = 1004,6138 \text{ g.mol}^{-1}$

Les différentes synthèses de poudres phosphocalciques obtenues avec des rapports Ca/P initiaux variant de 1,500 à 1,800 (*Tableau 6*) ont été analysées par diffraction des rayons X afin d'en déduire les rapports d'intensités R_1 et R_2 , les proportions respectives en β -TCP et HA ainsi que les rapports Ca/P finaux.

Les diffractogrammes ainsi obtenus (*Figure 11*) révèlent la présence de β -TCP et d'HA en proportions variables. L'augmentation du rapport Ca/P provoque une intensification des raies de l'hydroxyapatite et une diminution de l'intensité des raies du β -TCP jusqu'à leur complète disparition.

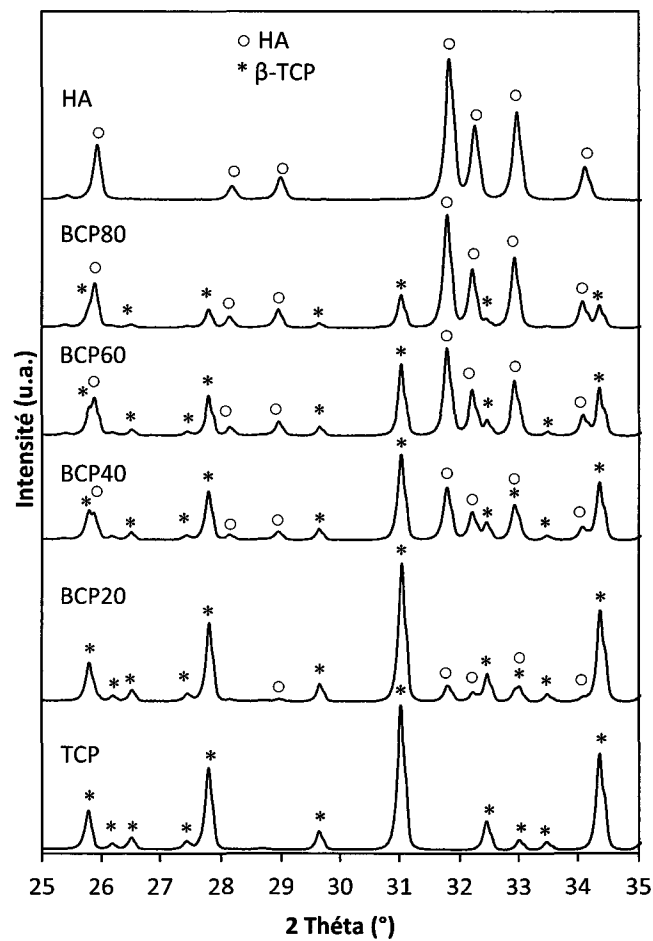


Figure 11 : Diffractogrammes RX des poudres calcinées à 1000°C

Ces analyses par DRX ont permis la détermination des fractions pondérales de phosphate tricalcique β et d'hydroxyapatite pour chaque poudre et, par conséquent, d'en déduire les rapports Ca/P finaux (*Équation 8 et Tableau 8*) dans le cas des mélanges biphasiques β -TCP - HA. Pour les composés biphasiques, la précision sur les proportions respectives d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique β est de 2 %.

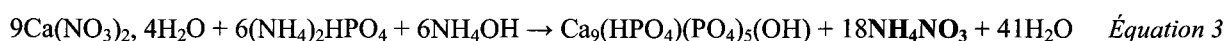
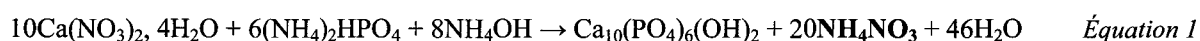
	T (°C)	pH	(Ca/P) _r	Ca/P après calcination	HA (% pds)	TCP (% pds)
TCP	30	6,5	1,500	1,500	n.d.	100
BCP20	30	6,5	1,548	1,534	20	80
BCP40	30	6,5	1,605	1,567	40	60
BCP60	30	6,5	1,680	1,600	60	40
BCP80	30	6,5	1,800	1,634	80	20
HA	50	8,0	1,667	1,667	100	n.d.

Tableau 8 : Paramètres de synthèse et compositions des poudres de TCP et d'HA stœchiométriques et des poudres biphasiques (n.d. : non décelé)

2.2. Calcination des poudres phosphocalciques

A l'issue des synthèses, les poudres de phosphates de calcium de différentes compositions chimiques ne sont pas exploitables en l'état pour trois raisons :

- La synthèse d'hydroxyapatite (*Équation 1*) et de phosphate tricalcique (*Équation 3*) génère la formation de nitrate d'ammonium NH_4NO_3 , résidu de synthèse qu'il faut éliminer thermiquement.



Des analyses thermogravimétriques ont montré qu'un traitement thermique à une température supérieure à 300°C permet d'éliminer totalement ce composé.

- Ces synthèses conduisent à l'obtention de poudres exhibant des surfaces spécifiques élevées, de l'ordre de 50 à 70 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Ces surfaces importantes rendent complexes la réalisation de suspension au comportement rhéologique adapté à la technique de mise en forme envisagée dans cette étude, soit le coulage aqueux en moule de plâtre. De ce fait, un traitement thermique effectué sur ces poudres doit permettre, par une coalescence des particules primaires, une réduction de cette surface et faciliter la mise en suspension de l'élément pulvérulent.

- Enfin, après la synthèse des poudres de β -TCP stœchiométrique et des poudres biphasiques TCP - HA, un traitement thermique est nécessaire afin de transformer les différentes phases brutes de synthèse en des composés cristallisés et stables (*Équation 2*,

Équation 4 et Équation 5). Afin de déterminer la température de transformation de la phase apatitique en phosphate tricalcique β , des calcinations à différentes températures (600 à 1000°C) et une caractérisation par diffraction RX ont été menées sur ces diverses poudres (Figure 12).

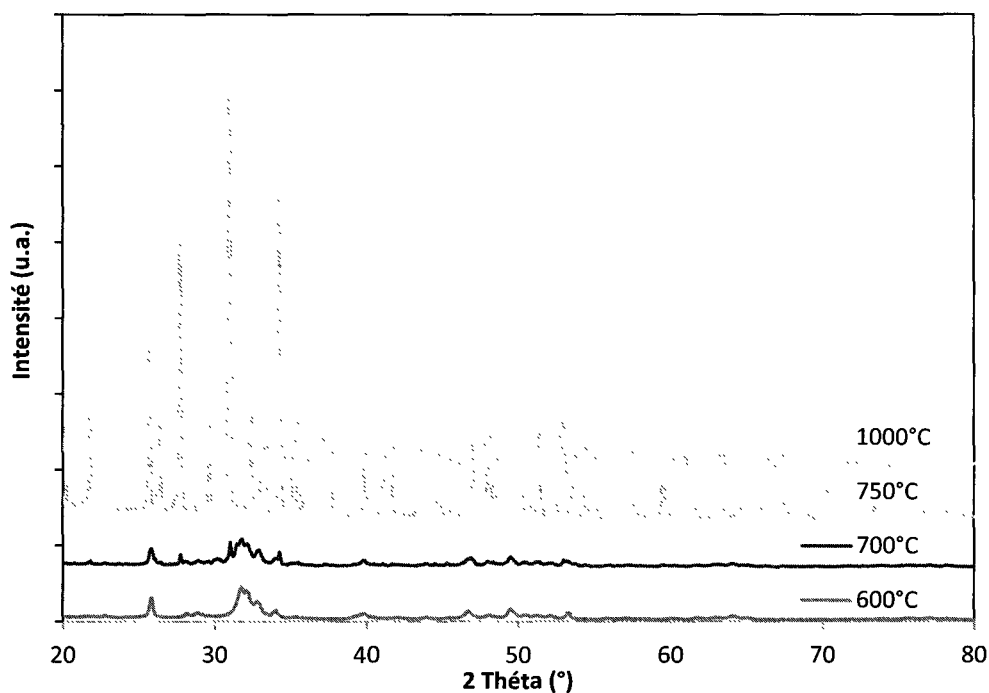


Figure 12 : Diffractogrammes d'une poudre de β -TCP stœchiométrique calcinée à différentes températures

Ces diffractogrammes montrent qu'après une calcination à 600°C, le composé est formé d'une seule phase : la phase apatitique $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ (ICDD n° 46-905). Une température de 700°C permet la formation de β -TCP. Cependant, persiste encore la phase apatitique. Pour des températures supérieures à 750°C, la biocéramique devient monophasée, contenant alors seulement du phosphate tricalcique β (Équation 4).

Ces résultats sont en accord avec ceux déterminés par Gibson *et al.* [GIB 00] qui ont montré que la transformation de la phase apatitique en phosphate tricalcique β s'effectue à des températures comprises entre 710 et 740°C.

Ainsi, un traitement thermique de calcination des poudres phosphocalciques va permettre d'éliminer les résidus de synthèse, de diminuer les surfaces spécifiques de nos poudres afin de faciliter la mise en forme du matériau et de transformer les phases intermédiaires brutes de synthèse en des composés cristallisés définitifs.

Une température minimale de 750°C qui permet une transformation totale du phosphate tricalcique apatitique en β -TCP cristallisé sera la température initialement choisie pour réaliser le traitement de calcination sur l'ensemble de nos poudres.

Le cycle de calcination mis en œuvre est illustré en *Figure 13*. L'élimination du nitrate d'ammonium, réalisée à 300°C, se fait lors d'un palier d'1 h.

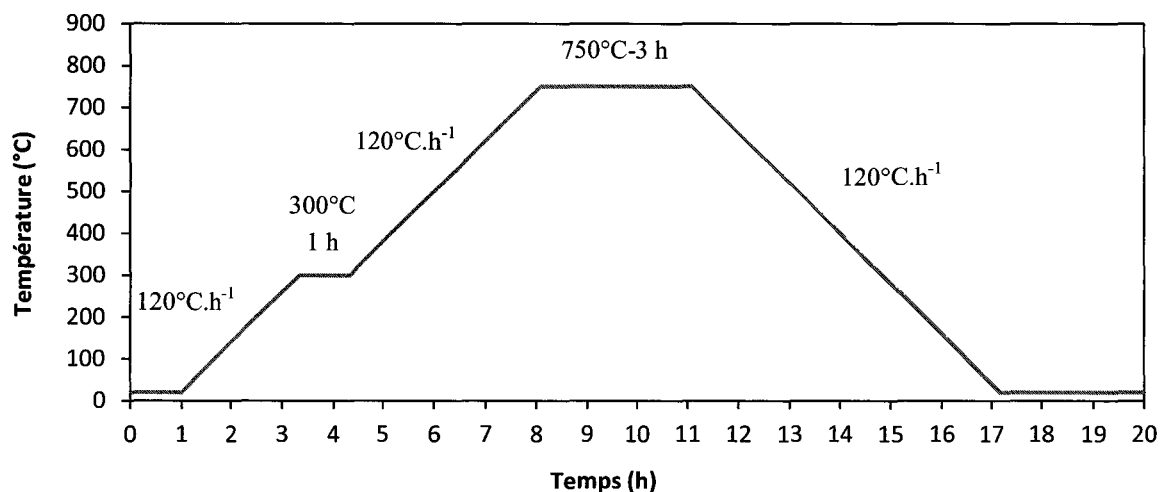


Figure 13 : Cycle de calcination des poudres phosphocalciques à 750°C

Les surfaces spécifiques de ces poudres ont été mesurées avant et après calcination (*Tableau 9*). La surface spécifique, définie par la surface développée par unité de masse, est un paramètre qui influe, non seulement, sur les conditions de mise en suspension mais également sur l'aptitude au frittage. Cette caractéristique est mesurée à l'aide d'un Flowsorb III (Micromeritics). La méthode B.E.T. est appliquée avec un mélange 30 % mol. azote – 70 % mol. hélium en contact avec la poudre.

		TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA calcinée 750°C	HA calcinée 800°C
Surfaces spécifiques (m ² .g ⁻¹)	Poudres brutes	51,0	71,0	66,0	66,0	58,0	52,0	
	Poudres calcénées	6,0	8,0	12,3	15,5	16,4	17,2	12,3

Tableau 9 : Surfaces spécifiques des poudres phosphocalciques mono et biphasées avant et après calcination

La calcination à 750°C des poudres phosphocalciques étudiées a permis de diminuer fortement les surfaces spécifiques. Cependant, une calcination à une température de 800°C a également été expérimentée sur la poudre d'hydroxyapatite. En effet, des essais préliminaires ont mis en évidence des difficultés de mise en suspension de cette poudre calcinée à 750°C. Ce comportement pourrait s'expliquer par une surface spécifique trop élevée après calcination à basse température.

2.3. Conclusion

Les différentes synthèses réalisées lors de ces travaux ont abouti à l'obtention de poudres phosphocalciques de compositions chimiques variées. Les caractérisations physico-chimiques effectuées sur ces poudres ont permis d'établir la stœchiométrie du β -TCP et de l'HA et de quantifier les différentes phases en présence dans les poudres biphasiques.

Ces poudres ont été réparties en deux catégories :

- les poudres de TCP et d'HA stœchiométriques,
- et les poudres biphasiques contenant 20, 40, 60 et 80 % d'hydroxyapatite.

Ces poudres brutes de synthèse ont, ensuite, subi un traitement thermique de calcination afin de permettre la formation des composés chimiques définitifs et de diminuer les surfaces spécifiques de manière à faciliter la mise en suspension de nos poudres.

Ces poudres calcinées vont, ensuite, être broyées, mises en forme puis densifiées par frittage naturel et par post-HIP (pressage isostatique à chaud).

3. Densification des phosphates de calcium mono et biphasés

L'objectif de cette étude est d'obtenir des biomatériaux phosphocalciques parfaitement denses présentant de bonnes propriétés mécaniques. Ce chapitre se consacre donc à l'optimisation de la densification par frittage naturel et par post-HIP (pressage isostatique à chaud) des poudres mono et biphasées, synthétisées au chapitre 2. Un frittage optimal est conditionné par les caractéristiques granulaires de la poudre. L'étape de densification est donc précédée d'un broyage de manière à disposer de poudres réactives et aptes à notre technique de mise en forme (le coulage en moule de plâtre).

3.1. Broyage

Suite au traitement thermique de calcination, les poudres doivent être broyées afin de rompre les agglomérats durs formés au cours de cette étape. La présence de ces agglomérats peut influencer la mise en suspension des poudres et la densification de la céramique. En effet, ce traitement de calcination peut générer une taille d'agglomérats élevée, ce qui va induire une forte taille de pores inter-agglomérats (*Figure 14*).

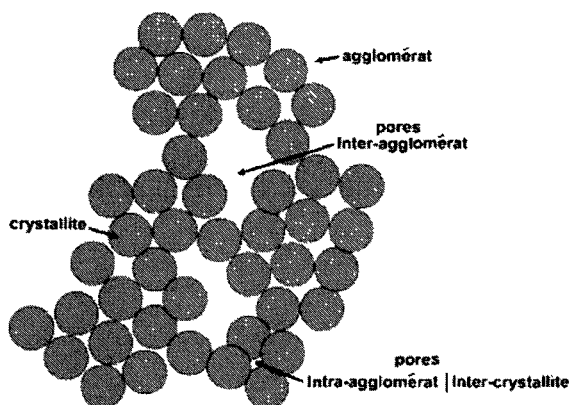


Figure 14 : Schéma d'une poudre agglomérée

Ce phénomène va augmenter la distance de diffusion et, par conséquent, diminuer la vitesse de densification. Ce comportement nécessite alors un frittage à plus haute température menant à des microstructures plus grossières [AZA 09].

D'autre part, l'eau emprisonnée dans les pores inter et intra-agglomérats ne participe plus au glissement entre particules et nuit aux propriétés rhéologiques de la suspension et, donc, à la mise en forme du matériau.

Le broyage est mené au tourne-jarre, en milieu aqueux, dans des jarres en polyéthylène très haute densité de capacité 0,6 L. Ce traitement de réduction des poudres est réalisé à l'aide de médias de broyage de type billes de zircone partiellement stabilisée avec 3 % mol. d'oxyde d'yttrium qui présentent une bonne résistance à l'usure, ce qui minimise la contamination de nos poudres. Afin d'optimiser cette opération de broyage, la charge totale de billes est prise égale à 1,1 kg. Des billes de diamètre 10, 15 et 20 mm sont utilisées en proportions massiques respectives 25, 50 et 25 %. Des suspensions à 30 % de matière sèche et des durées de broyage maximales de 72 h sont mises en œuvre lors de ce traitement.

Après broyage, la poudre est filtrée sur Büchner, rincée à l'éthanol puis séchée à 70°C pendant 24 h.

La surface spécifique est ensuite mesurée pour chaque composition chimique en fonction du temps de broyage et de la température de calcination pour l'hydroxyapatite (Figure 15).

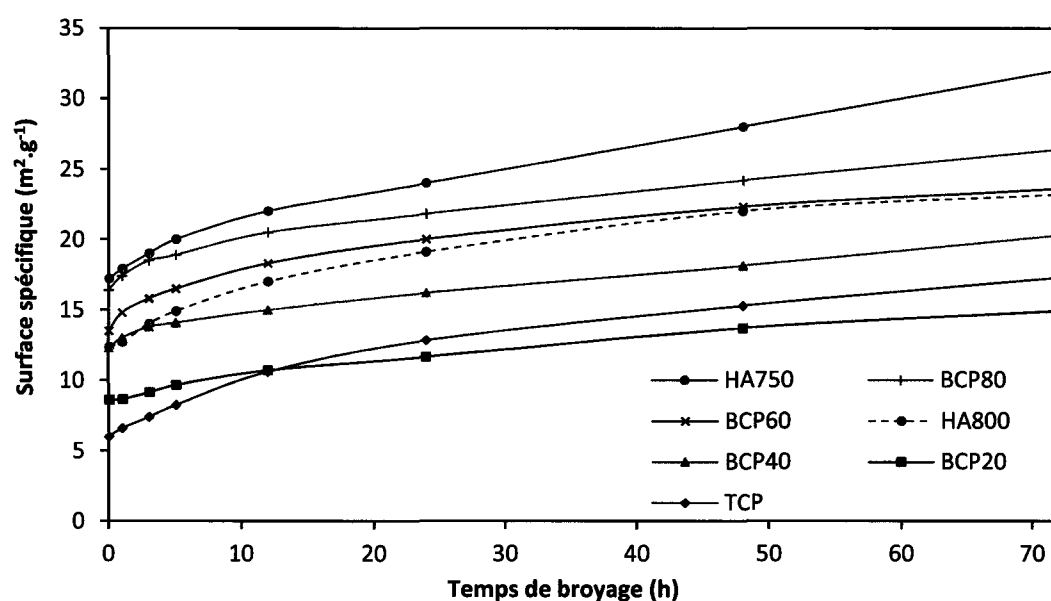


Figure 15 : Surface spécifique en fonction du temps de broyage pour chaque phosphate de calcium synthétisé

Pour l'ensemble des compositions, la surface spécifique augmente avec le temps de broyage. Cette évolution est plus sensible lors des premières heures de broyage ($t < 10$ h) et pourrait correspondre à la rupture mécanique des agglomérats les plus fragiles.

L'efficacité du broyage est plus importante pour le TCP stœchiométrique que pour le biphasique BCP20. Alors que le phosphate tricalcique exhibe une surface spécifique, après calcination, plus faible ($6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) que le BCP20 ($8 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$), ce comportement s'inverse, après

12 h de broyage, et aboutit à des surfaces spécifiques respectives pour le TCP et le BCP20 de 17,3 et 14,9 m².g⁻¹, après 72 h de broyage. La présence d'hydroxyapatite dans le TCP engendre d'une part, un affinement du grain [DES 07] caractérisé par une augmentation de la surface spécifique de la poudre (*Tableau 9*) et, d'autre part, la formation d'agglomérats plus difficiles à réduire lors du traitement mécanique de réduction des poudres.

Ces courbes montrent, également, l'impact de la température de calcination sur la surface spécifique de l'HA traité thermiquement à 750°C (HA750) et à 800°C (HA800). La surface de l'hydroxyapatite calcinée à 750°C (17,2 m².g⁻¹) est logiquement supérieure à celle de l'HA calcinée à 800°C (12,3 m².g⁻¹). Pour l'HA750 et l'HA800, le traitement de réduction des poudres mène respectivement, après 72 h de broyage, à des surfaces de 32,0 et 23,2 m².g⁻¹.

Le temps de broyage optimal pour chaque composition chimique sera déterminé ultérieurement.

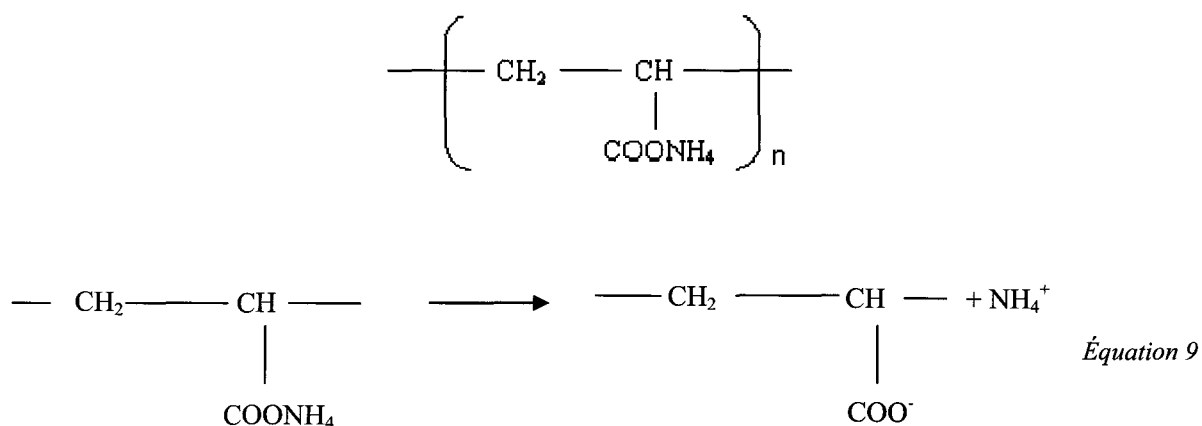
3.2. Mise en forme des poudres phosphocalciques

Les poudres phosphocalciques calcinées puis broyées sont, ensuite, mises sous forme de compacts en utilisant la technique de coulage en moule de plâtre (ou slip casting).

Ce procédé nécessite, dans un premier temps, la mise en suspension de la poudre dans un solvant puis le coulage de cette barbotine dans un moule de plâtre afin d'obtenir le matériau cru aux formes et dimensions désirées.

La suspension est réalisée en milieu aqueux. L'eau est, en effet, un solvant qui présente de nombreux avantages tels que son caractère non polluant, sa facilité d'utilisation et son faible coût. Cependant, l'emploi d'eau ne permet pas à elle seule l'obtention d'échantillons crus aux propriétés optimales. Il est, alors, impératif d'incorporer des additifs dans la suspension (tels que des dispersant et liant) afin d'obtenir, d'une part, un comportement rhéologique idéal (faible viscosité et haut taux de matière sèche) et, d'autre part, une tenue mécanique correcte permettant une manipulation aisée lors des opérations post-coulage [CHA 93].

Pour éviter l'agglomération des poudres de phosphates de calcium lors de leur mise en suspension, un électrolyte de type carboxylate, le polyacrylate d'ammonium (DarvanC[®], Vanderbilt) est introduit dans la barbotine. Ce dispersant se présente sous forme de sels basiques d'acide polyacrylique et se caractérise par une dissociation de ces groupements carboxyliques lorsque le pH de la solution s'accroît selon l'Équation 9 :



Pour des pH basiques (pH $\approx$ 10), se produit la complète dissociation des fonctions acides carboxyliques et le dispersant présente, alors, une conformation étendue en bouquets dans la suspension. Le mécanisme de stabilisation de la barbotine est de type électrostérique du fait de l'adsorption en surface des particules du dispersant anionique et de l'expansion des chaînes polymériques vers le solvant.

Après la dispersion, un liant organique est ajouté dans la barbotine afin d'assurer une bonne tenue mécanique des matériaux crus. Le liant utilisé est un latex de type acrylique présenté sous forme d'émulsion aqueuse à 55 % (Duramax B1001[®], Rohm et Haas). L'intérêt de cette émulsion est qu'elle ne provoque pas d'augmentation importante de la viscosité de la suspension.

La technique du coulage en moule de plâtre a été largement étudiée au laboratoire [DES 07], [DES 08a], [DES 08b]. Ces travaux nous ont permis d'utiliser une formulation de barbotine en milieu aqueux adaptée à nos poudres. Les concentrations des différents constituants sont ajustées en fonction des surfaces spécifiques des poudres phosphocalciques et varient dans les intervalles suivants (pour 100 g de barbotine) :

- 64 à 66 g de poudres phosphocalciques,
- de 1,5 à 3 % massique de dispersant par rapport à la poudre,
- 1 % massique de liant par rapport à la poudre,
- H₂O, complément à 100 g de suspension.

La dispersion de la suspension est préparée à l'aide d'un tourne-jarre. Après 1 h de dispersion, le mélange est versé dans un bécher où est ajoutée l'émulsion acrylique. L'homogénéisation de cette barbotine est obtenue par agitation magnétique pendant 30 min.

Après cette opération, la suspension est coulée dans un moule de plâtre. Les phénomènes de dépression capillaire générés par la porosité du plâtre vont assurer l'élimination de l'eau contenue dans la suspension et la mise en forme du matériau à l'état cru. Après démoulage, les échantillons sont placés dans une étuve à 40°C qui permet un séchage total du matériau.

La géométrie du moule de plâtre conditionne la forme finale des échantillons. Différentes formes ont été réalisées selon les besoins :

- des cylindres de 10 mm de diamètre et 20 mm de hauteur pour les mesures de densité et de taille de grains,
- des cylindres de 6 mm de diamètre et 30 mm de hauteur pour les essais mécaniques de flexion et de SEVNB,
- des pastilles de 25 mm de diamètre et 4 mm d'épaisseur pour les essais de micro-indentation et la caractérisation mécanique par la méthode ultrasonore
- et des pastilles de 6 et 15 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur pour les essais de cytotoxicité et de fonctionnalisation.

3.3. Frittage naturel des phosphates de calcium

Le comportement au frittage est étudié sur des échantillons élaborés à partir des poudres mono- et biphasées : TCP, BCP20, BCP40, BCP60, BCP80 et HA.

L'impact de la durée de broyage et, par conséquent, de la surface spécifique de ces poudres est évalué sur la densification de ces biomatériaux.

La température de frittage du phosphate tricalcique β et des composés biphasiques est limitée par la transition $\beta \rightarrow \alpha$ qui est néfaste à de fortes densifications puisqu'elle provoque la fissuration du matériau du fait de différences importantes entre les densités de ces deux composés ($d_{\beta\text{-TCP}} = 3,07$ et $d_{\alpha\text{-TCP}} = 2,86$). Ainsi, cette température de transformation allotropique doit être déterminée précisément de manière à établir un cycle de frittage optimisé.

Afin d'identifier cette température, des poudres de phosphate tricalcique β sont portées à des températures variant de 1120 à 1160°C puis sont analysées par diffraction des rayons X, après refroidissement (*Figure 16*).

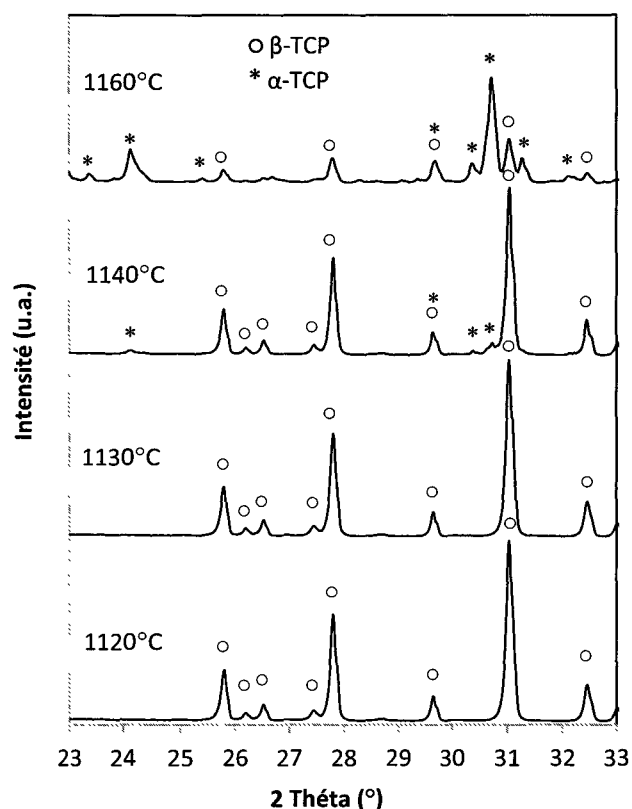


Figure 16 : Diffractogrammes des poudres de phosphate tricalcique β portées à des températures variant de 1120 à 1160°C (5h) puis refroidies à température ambiante

Les diffractogrammes obtenus indiquent que, pour des températures inférieures à 1130°C, les raies principales du β -TCP sont identifiées et la présence de α -TCP n'est pas décelée.

A des températures égales ou supérieures à 1140°C, apparaissent les raies caractéristiques de la phase cristalline α . Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Jarcho [JAR 81] et Famery *et al.* [FAM 94].

Afin de conserver l'intégrité de nos matériaux tout en les densifiant au maximum, la température de frittage sera fixée à 1130°C.

Le frittage est réalisé dans un four AET 25387 sous air, avec une cinétique de montée et de descente en température de 5°C.min⁻¹. Un palier de 5 h à la température de frittage de 1130°C est utilisé pour obtenir une densification maximale.

La Figure 17 représente l'évolution de la densité relative des matériaux en fonction de la surface spécifique des poudres utilisées pour l'élaboration des différents compacts.

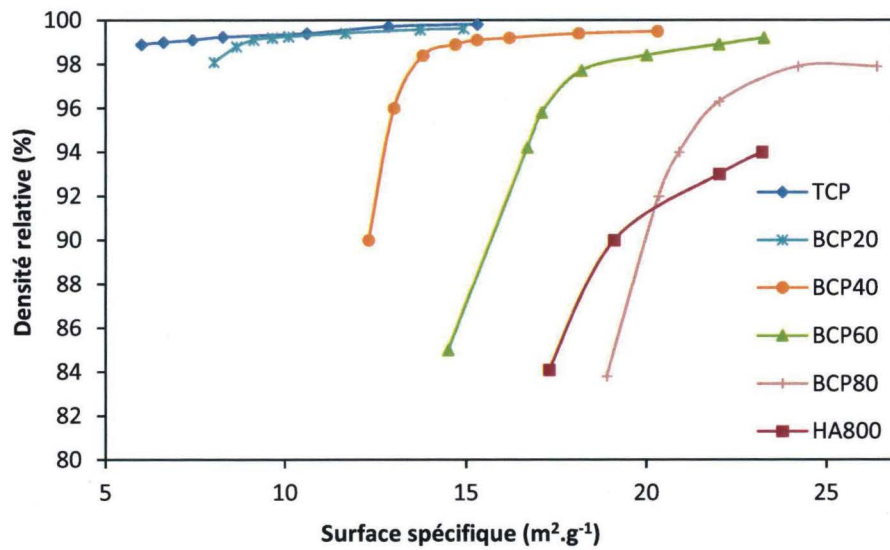


Figure 17 : Densités relatives en fonction de la surface spécifique et de la composition chimique des phosphates de calcium

Les densités sont mesurées par pesée hydrostatique et la densité relative d_r est obtenue par la relation suivante (Équation 10) :

$$d_r(\%) = \frac{d}{d_{théorique}} \times 100 \quad \text{Équation 10}$$

Pour les phosphates de calcium biphasés, les densités théoriques ont été calculées par une loi des mélanges à partir des densités théoriques des composés monophasés et des teneurs massiques de chaque phase (Tableau 10) :

Composé	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
Densité théorique	3,07	3,09	3,11	3,12	3,14	3,16

Tableau 10 : Densités théoriques des différents phosphates de calcium synthétisés

Ces courbes indiquent que des densités élevées sont obtenues pour l'ensemble des compositions biphasées et pour le phosphate tricalcique β stœchiométrique.

Pour des teneurs allant jusqu'à 60 % d'hydroxyapatite (BCP60), des taux de densification égaux ou supérieurs à 99 % sont atteints.

Le TCP stœchiométrique et le BCP20 montrent d'excellents comportements au frittage. Après 48 h de broyage, ils présentent, respectivement, des densités maximales de 99,8 et 99,6 % pour des surfaces spécifiques respectives de 15,3 et 13,7 m².g⁻¹. Des surfaces spécifiques relativement faibles, 6 m².g⁻¹ pour le TCP (sans broyage) et 8,6 m².g⁻¹ pour le BCP20 (1 h de broyage), permettent d'atteindre des densités de l'ordre de 99 %.

Pour le BCP40 et le BCP60, des densités élevées sont encore obtenues (> 99 %) mais nécessitent, cependant, des poudres de surfaces spécifiques élevées et, donc, des durées de broyage importantes.

Le taux de densification maximal obtenu pour le BCP80 est de 98 % pour une surface spécifique de 24,2 m².g⁻¹ (48 h de broyage).

Pour l'hydroxyapatite, la poudre calcinée à 800°C (HA800) a été utilisée pour la mise en forme du matériau. En effet, des difficultés sont apparues lors de la mise en suspension de la poudre calcinée à 750°C (viscosité trop importante, taux de matière sèche faible). Ce comportement a été imputé à des surfaces spécifiques trop élevées de la poudre calcinée à 750°C et broyée à différents temps. La faible température de frittage (1130°C), choisie pour empêcher la transformation du β -TCP en α -TCP, ne permet pas d'assurer une bonne consolidation de l'HA, même pour des durées de broyage de la poudre élevées. Pour cette biocéramique, une densité maximale de 94 % est mesurée après un broyage de 72 h correspondant à une surface spécifique de 23,2 m².g⁻¹.

Des essais dilatométriques réalisés sur le TCP et l'HA (*Figure 18*) mettent en exergue des comportements très différents de ces matériaux lors de leur frittage. Ces essais qui emploient un dilatomètre horizontal (DIL 402C, Netzsch) ont été réalisés sur des échantillons de TCP et d'HA issus respectivement de poudres broyées 48 h et 72 h. Un chauffage sous air à une température maximale de 1250°C ainsi que des cinétiques de chauffe de montée et descente en température égales à 5°C.min⁻¹ ont été utilisés lors de cette expérimentation.

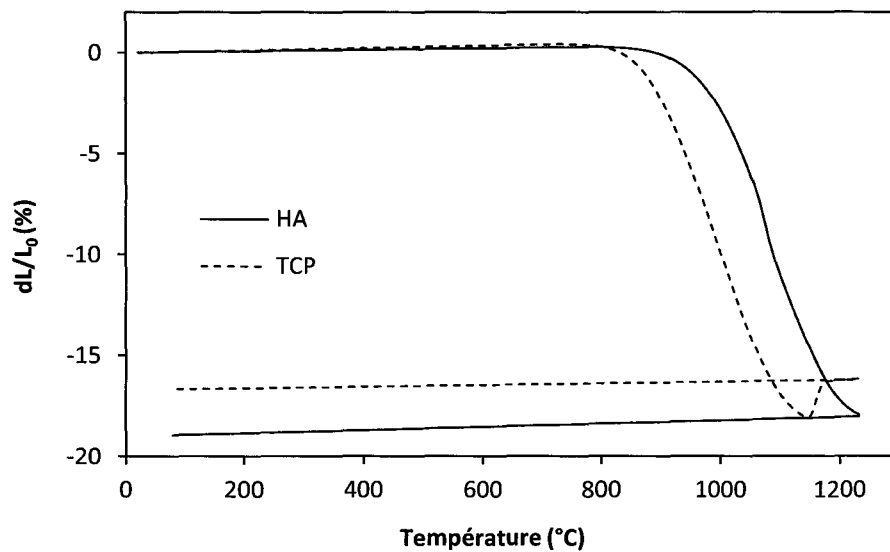


Figure 18 : Courbes de retrait du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite stœchiométriques

Les courbes obtenues montrent un début de densification vers 815°C pour le phosphate tricalcique et vers 880°C pour l'HA. De plus, la vitesse maximale de densification se situe à une température plus élevée pour l'hydroxyapatite (1080°C) comparée au TCP (980°C). Ainsi, la faible température utilisée pour le frittage de l'HA (1130°C) ne permet pas, d'une part, d'assurer une bonne densification du matériau même pour des temps de broyage élevés et explique, d'autre part, une densification des biphasiques d'autant plus difficile que la concentration en hydroxyapatite, au sein du matériau, est importante.

De ce fait, l'obtention de taux de densification élevés pour les biphasiques à haute teneur en hydroxyapatite nécessite des poudres plus réactives qui présentent donc des surfaces spécifiques élevées.

Une étude microstructurale a, également, été réalisée sur ces échantillons, frittés à 1130°C et présentant les meilleures densités, c'est-à-dire élaborés à partir de poudres broyées 48 h pour le TCP et les biphasés et 72 h pour l'HA.

La microstructure a été caractérisée en termes de taille moyenne de grains en utilisant un microscope électronique à balayage (Hitachi S-3500N). Avant analyse, les surfaces des échantillons sont polies jusqu'à la pâte diamantée 3 μm . Une attaque thermique permet la révélation des joints de grains selon le cycle suivant :

- montée en température à 7°C.min⁻¹,
- palier à 30°C en dessous de la température de frittage pendant 30 min,
- trempe à l'air.

Les échantillons de céramiques sont non-conducteurs. Pour leur observation au MEB, ils sont recouverts d'une fine couche d'or (1 μm) déposée sous vide (10^{-1} atm.). Les microstructures sont observées sous vide (< 1 Pa).

Les tailles moyennes des grains (*Tableau 11*) sont obtenues par la méthode des intersections [ASTM E112] sur les micrographies obtenues (*Figure 19*), moyenne réalisée sur environ 200 grains.

	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
Taille de grains (μm)	$1,83 \pm 0,12$	$1,51 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,15$	$0,73 \pm 0,10$	$0,79 \pm 0,11$
d_r (%)	99,8	99,6	99,5	99,2	98,0	94,0

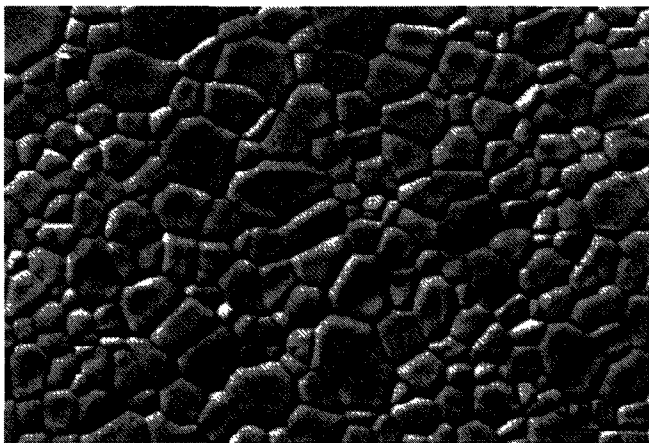
Tableau 11 : Tailles de grains et densités relatives des phosphates de calcium frittés à 1130°C

Le phosphate tricalcique présente une taille de grains de 1,8 μm . Cette forte taille de grains est due à une température de frittage élevée pour ce matériau; il est, cependant, possible de densifier correctement cette biocéramique à plus basse température et, donc, de minimiser cette dimension de grains.

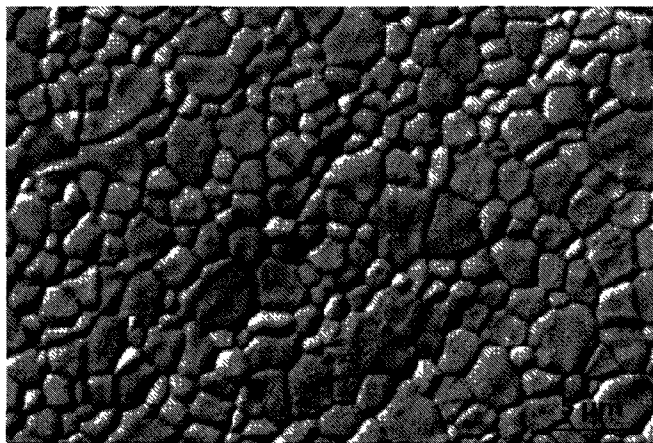
Pour l'HA et à la température de frittage utilisée, la dimension des grains est relativement faible, de 0,79 μm .

Les biphasiques présentent, quant à eux, des microstructures intermédiaires en taille allant de 1,51 à 0,73 μm , respectivement, pour le BCP20 et le BCP80. La présence d'hydroxyapatite tend, donc, à réduire la taille des grains.

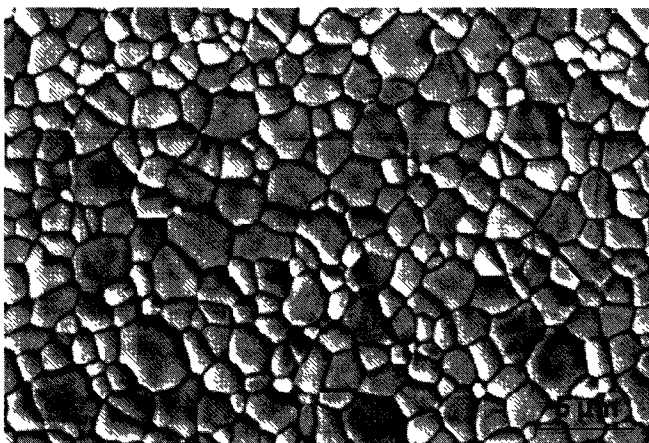
Pour des concentrations massiques en HA supérieures ou égales à 60 %, la taille de grains est faible et semble se stabiliser à une valeur de 0,73 μm , proche de celle de l'HA stœchiométrique. La présence d'une phase importante d'hydroxyapatite est un paramètre limitatif au grossissement de grains de ces biphasiques.



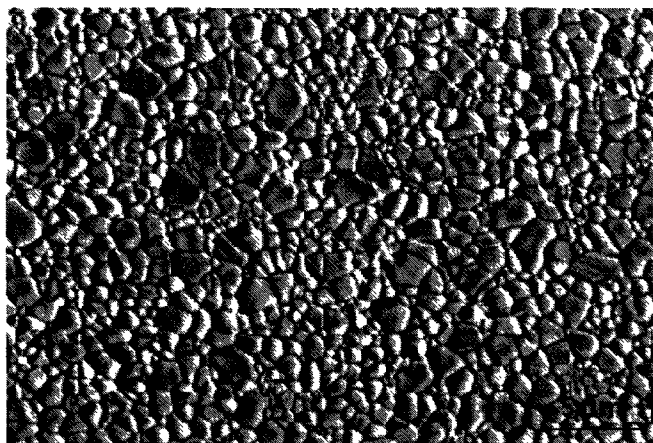
TCP



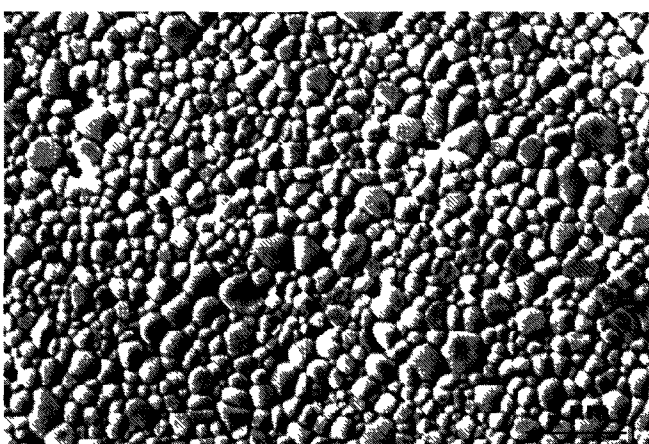
BCP20



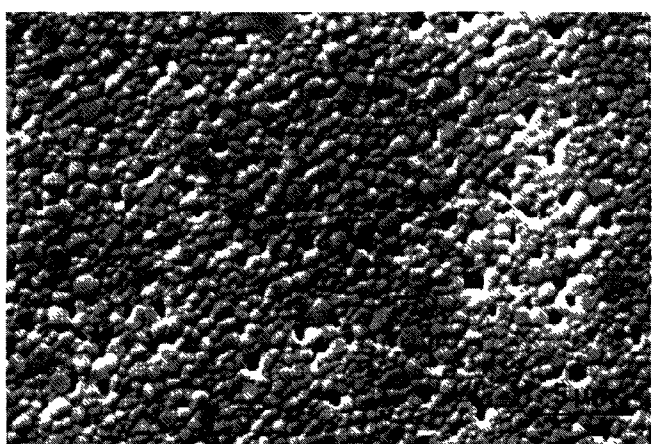
BCP40



BCP60



BCP80



HA800

Figure 19 : Micrographies après frittage à 1130°C de l'ensemble des compositions chimiques

Enfin, pour conclure ces travaux sur la densification des matériaux phosphocalciques, des températures de frittage complémentaires ont également été expérimentées pour l'ensemble des compositions étudiées. Les échantillons densifiés sont tous issus de poudres broyées 48 h pour le TCP et les biphasiques et broyées 72 h pour l'HA. Le *Tableau 12* regroupe les densités relatives obtenues en fonction des températures de frittage, des compositions chimiques et de la surface spécifique des poudres utilisées.

	Surface spécifique (m ² .g ⁻¹)	Température de frittage (°C)						
		1200	1130	1100	1070	1040	1010	980
TCP	15,3	-	99,8	99,4	99,2	98,7	96,4	90,7
BCP20	13,7	-	99,6	99,4	98,1	94,8	88,1	-
BCP40	18,1	-	99,5	99,2	97,7	91,5	82,1	-
BCP60	22,0	-	99,1	96,0	86,0	-	-	-
BCP80	24,2	-	98,0	93,7	82,0	-	-	-
HA800	23,4	97,5	94,0	88,0	-	-	-	-

Tableau 12 : Densités relatives en fonction de la température de frittage, de la composition chimique et de la surface spécifique

Ces résultats mènent aux remarques suivantes quant aux taux de densification et aux tailles de grains :

- pour le β -TCP, des densités élevées sont obtenues, même à basse température de frittage, une densité relative de l'ordre de 99 % est obtenue à 1040°C avec une taille de grains inférieure au micron,
- la densification demeure correcte pour les échantillons à faible taux d'hydroxyapatite (BCP20 et BCP40) pour des frittages jusqu'à 1070°C ($d_r \approx 98$ % et taille de grains $\approx 0,9 \mu\text{m}$),
- une chute rapide de la densité avec la température apparaît pour des concentrations élevées en HA (BCP60 et BCP80),
- enfin, une nette amélioration de la densité de l'hydroxyapatite survient avec l'élévation de la température ($d_r = 97,5$ % à 1200°C).

3.4. Post-densification des phosphates de calcium

L'étude précédente a montré que des caractéristiques granulaires adaptées des poudres permettent, par frittage naturel, d'atteindre des taux importants de densification de nos échantillons.

Cependant, le taux résiduel de porosité et des microstructures grossières, induits par des températures de frittage relativement élevées, sont néfastes à des propriétés mécaniques optimales. De ce fait et afin d'obtenir de très hautes densités associées à des microstructures fines, un post-HIP (Hot Isostatic Pressing) est mis en œuvre sur nos matériaux.

Ce traitement de post-HIP est réalisé sur des pièces préalablement densifiées afin d'obturer la porosité ouverte du matériau et ainsi assurer une application de la pression sur l'enveloppe externe de la pièce. Cette température de pré-densification sera choisie la plus basse possible afin de limiter la croissance granulaire.

En effet, la température utilisée lors du cycle de pressage isostatique à chaud est généralement inférieure voire égale à la température de préfrittage. Ainsi, la taille moyenne des grains obtenue lors du premier traitement thermique ne sera, en principe, pas modifiée par le cycle de post-HIP ultérieur.

La littérature indique qu'un matériau exempt de porosité ouverte est obtenu lorsque les densités relatives atteignent des valeurs de 92 à 94 % [BER 93b]. Dans notre étude, le taux sécurisé de 94 % est retenu comme taux minimal de densification.

3.4.1. Détermination des températures de préfrittage

L'étude de la variation de la densité des divers matériaux en fonction de la température de frittage (*Figure 20*) a permis d'identifier graphiquement les températures correspondant à ce taux de densification de 94 %.

Le temps de broyage a été fixé à 48 h pour toutes les poudres mono et biphasées à base de TCP et de 72 h pour l'HA. Cette durée permet d'atteindre des densités relativement élevées à basse température.

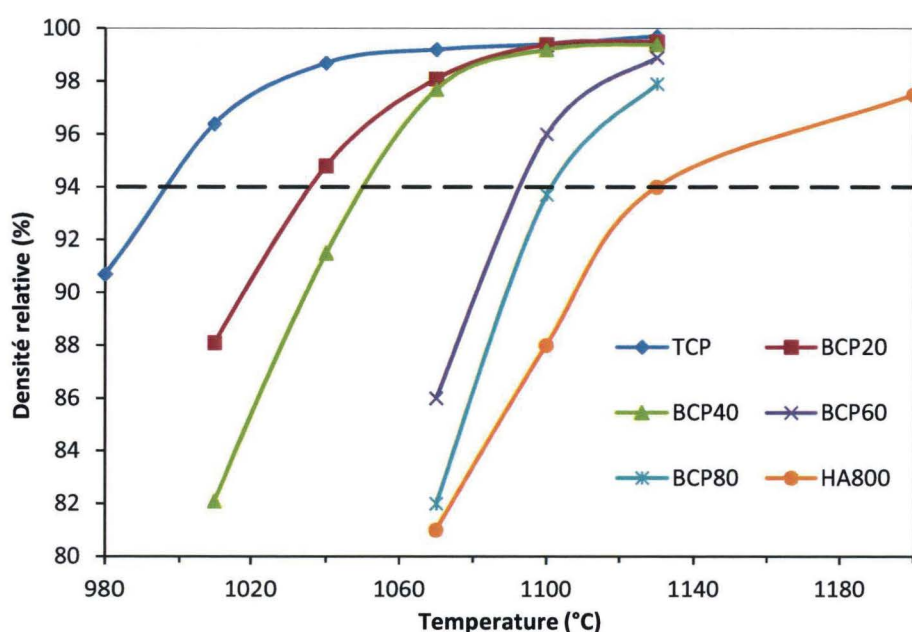


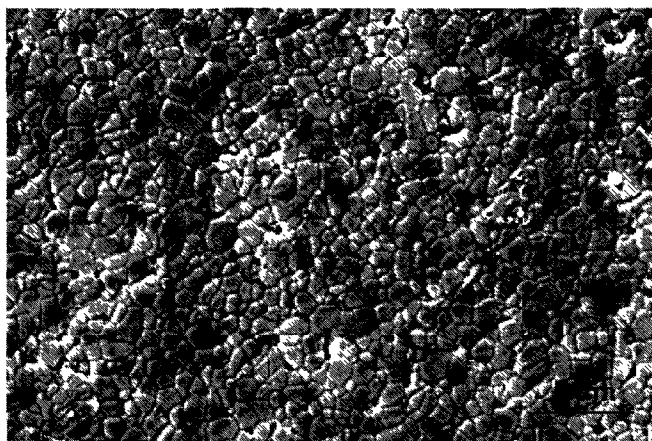
Figure 20 : Densités relatives en fonction de la température de préfrittage et de la composition chimique des phosphates de calcium

L'ensemble de nos biomatériaux a, donc, subi un traitement thermique de préfrittage à ces températures. Le *Tableau 13* présente les densités expérimentales obtenues et les tailles de grains mesurées à partir des micrographies MEB (*Figure 21*) des compositions chimiques préfritées. Ce tableau rappelle, également, les dimensions moyennes des grains après frittage naturel à 1130°C.

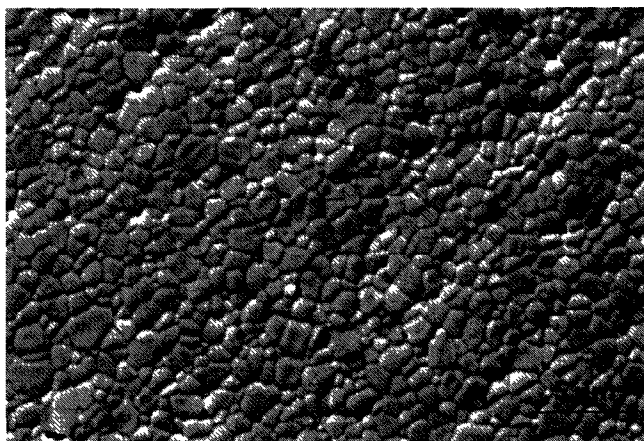
	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
$T_{\text{préfrittage}} (^{\circ}\text{C})$	1000	1040	1050	1100	1100	1130
d_r (%)	94,8	94,8	93,8	96,0	93,7	94
Taille de grains (μm)	$0,75 \pm 0,11$	$0,77 \pm 0,10$	$0,73 \pm 0,09$	$0,70 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,14$	$0,79 \pm 0,10$
Taille de grains après frittage à 1130°C (μm)	$1,83 \pm 0,12$	$1,51 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,15$	$0,73 \pm 0,10$	$0,79 \pm 0,11$

Tableau 13 : Densités relatives et tailles de grains à diverses températures de préfrittage

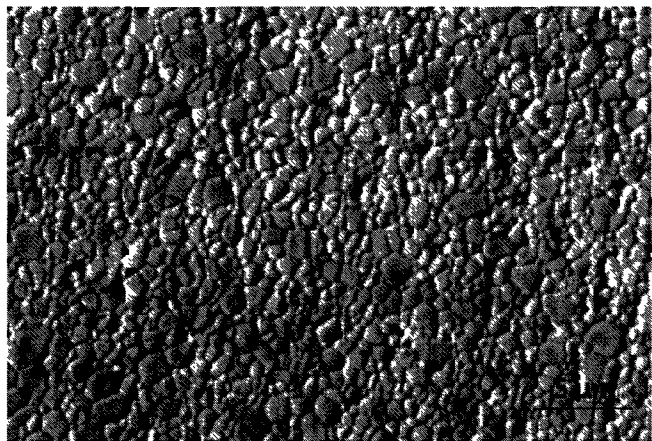
Les densités expérimentales sont proches de celles déterminées graphiquement sur la *Figure 20*. Les résultats de pesée hydrostatique confirment l'absence de porosité ouverte pour tous les échantillons. Enfin, les dimensions des grains mesurées sur les matériaux préfrittés sont, comparativement, plus faibles que celles identifiées lors d'un frittage à 1130°C. Ce comportement s'explique logiquement par des températures de traitement thermique plus faibles. Pour la totalité des compositions, la dimension du grain est inférieure au micron.



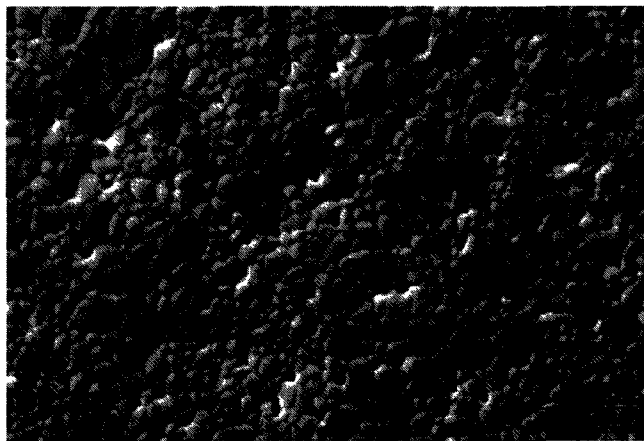
TCP 1000°C



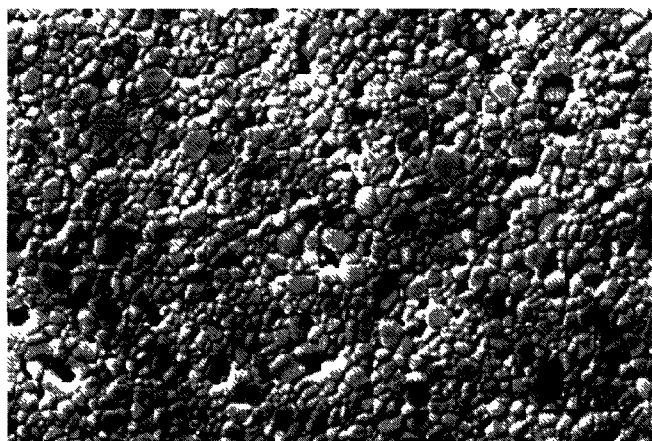
BCP20 1040°C



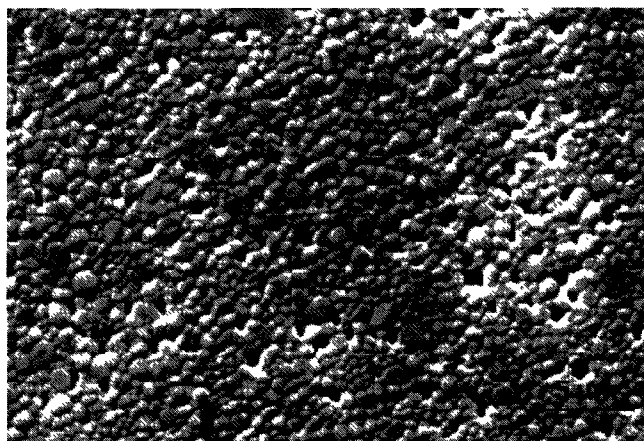
BCP40 1050°C



BCP60 1100°C



BCP80 1100°C



HA800 1130°C

Figure 21 : Micrographies MEB après préfrittage aux températures déterminées pour chaque composition chimique

3.4.2. Post-densification par HIP

Après le traitement de préfrittage, les différents échantillons subissent un cycle de post-HIP. L'appareil utilisé est une presse isostatique à chaud GPS (Vitek - Phi Technologies). Le four à résistance en platine supporte des pressions de 200 MPa et des températures de 1450°C en conditions maximales et sous atmosphère contrôlée.

Les post-densifications se font sous une pression de 150 MPa, sous atmosphère Ar - 20 % O₂ et sont réalisées à différentes températures :

- 1000°C pour le phosphate tricalcique β ,
- 1050°C pour les BCP20 et BCP40,
- et 1100°C pour les BCP60, BCP80 et l'HA.

Les montées et descentes en température se font à 5°C.min⁻¹ et le maintien en température et en pression se fait pendant 1 h.

Ces traitements de pressage isostatique à chaud ont conduit à l'obtention de matériaux transparents pour toutes les compositions étudiées. Uematsu et al. [UEM 89] et Li et al. [LI 90] ont, également, par encapsulation-HIP, densifié de l'hydroxyapatite et obtenu un aspect transparent de ce matériau. Un tel comportement n'a pas été trouvé en littérature sur le TCP ou les biphasiques de ces deux biocéramiques. La *Figure 22* montre l'aspect des échantillons hippés, après polissage des deux faces.

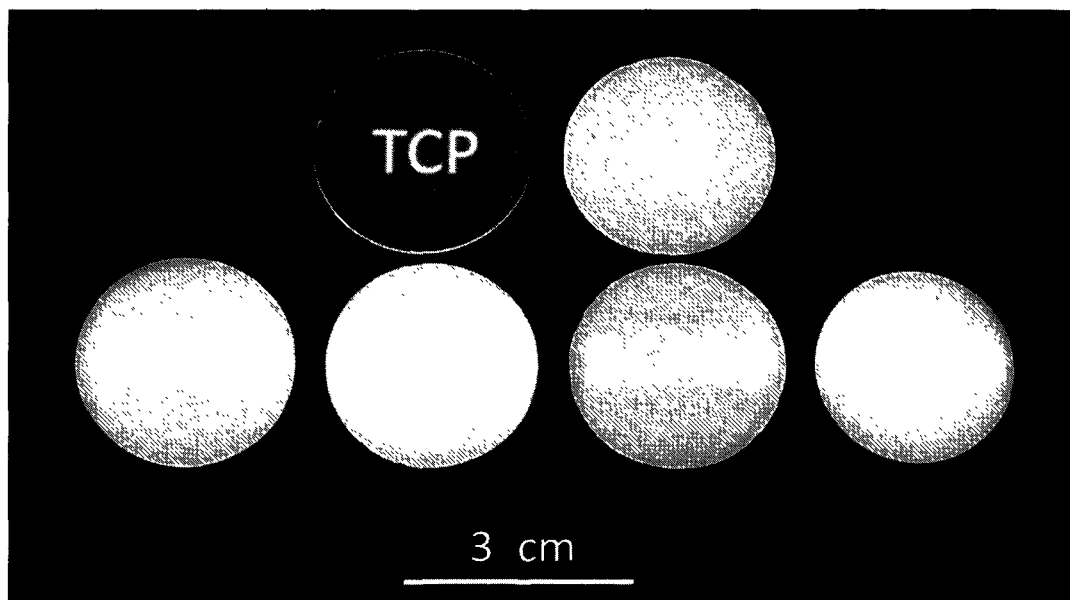


Figure 22 : Photographie après post-HIP de pastilles des différents phosphates de calcium synthétisés

La transparence de nos biocéramiques indique que ces matériaux transmettent la lumière sans absorption excessive. En effet, cette transparence est fortement affectée par les défauts intrinsèques ou extrinsèques du matériau. Ces défauts à l'origine de phénomènes de diffusion, de réflexion et d'absorption, entraînent des pertes de transmission optique. Cette dernière, égale au rapport du flux transmis I sur le flux incident I_0 , peut être décrite par l'équation suivante (*Équation 11*) :

$$\frac{I}{I_0} = \frac{(1 - r - S)^2 \exp(-\alpha x)}{1 - r^2(1 - S^2) \exp(-2\alpha x)} \quad \text{Équation 11}$$

avec : - r : la réflexion aux surfaces,

- S : la diffusion en surface,

- x : l'épaisseur du matériau (cm),

- α : le coefficient d'absorption (cm^{-1}) qui peut se mettre sous la forme (*Équation 12*) :

$$\alpha = \mu + S_{in} + S_{op} \quad \text{Équation 12}$$

avec : - μ l'absorption propre aux transitions électroniques,

- S_{op} la diffusion liée aux anisotropies optiques, en particulier, la biréfringence du matériau,

- et S_{in} la diffusion de la lumière générée par les hétérogénéités structurales.

Les principaux défauts structuraux qui affectent la transmittance de la céramique sont (*Figure 23*) :

- la rugosité des surfaces qui peut être atténuée par un polissage optique,

- les joints de grains et une croissance anormale des grains [KOI 76], [APE 03], [KRE 09],

- la présence de phases secondaires, d'impuretés ou la propreté inclusionnaire [XIO 06],

- et la porosité intra et intergranulaire [KOI 76], [MA 09], [KIM 07], [PRO 09].

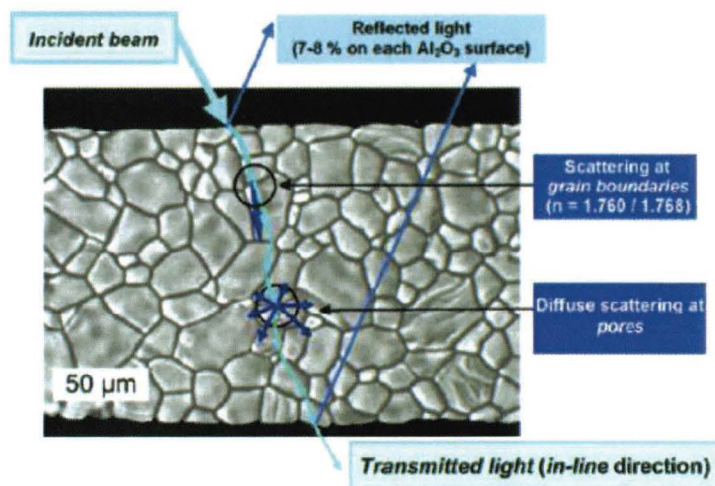
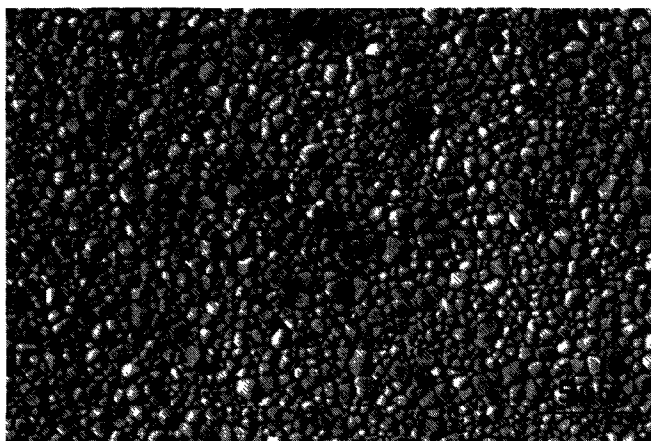


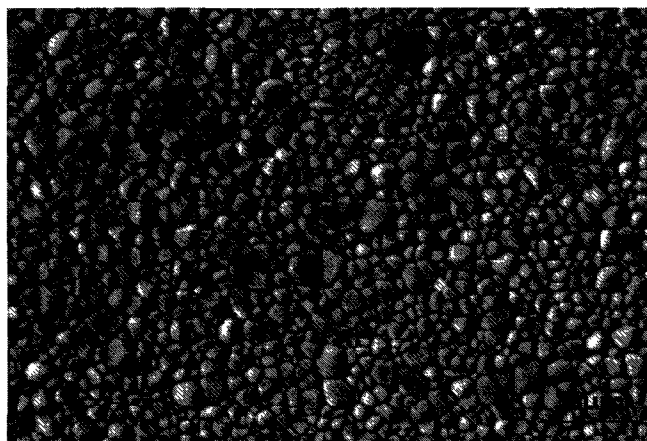
Figure 23 : Transmission de la lumière à travers une céramique polycristalline [KRE 09]

Parmi ces défauts, la présence d'une porosité résiduelle très faible ($< 0,1 \%$) [APE 03] est néfaste à la transparence du matériau. Ces considérations et l'aspect de nos céramiques indiquent un état de densification proche de 100 %. Ceci est confirmé par des mesures de densité par pesée hydrostatique qui mènent à des valeurs supérieures ou égales à 99,9 % pour l'ensemble des compositions.

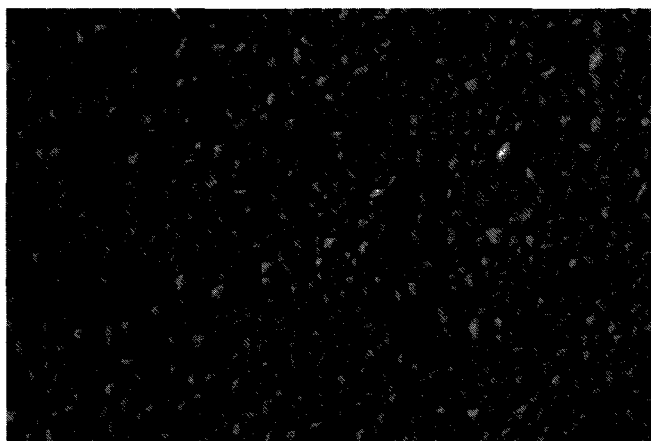
Une étude microstructurale menée sur les échantillons post-densifiés a permis d'évaluer la taille de grains des divers échantillons (Figure 24).



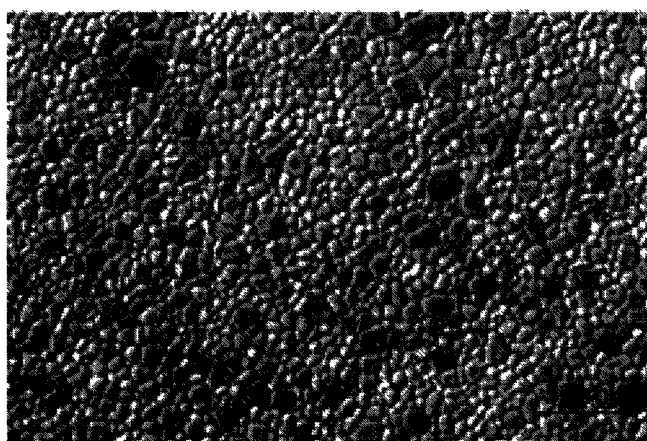
TCP



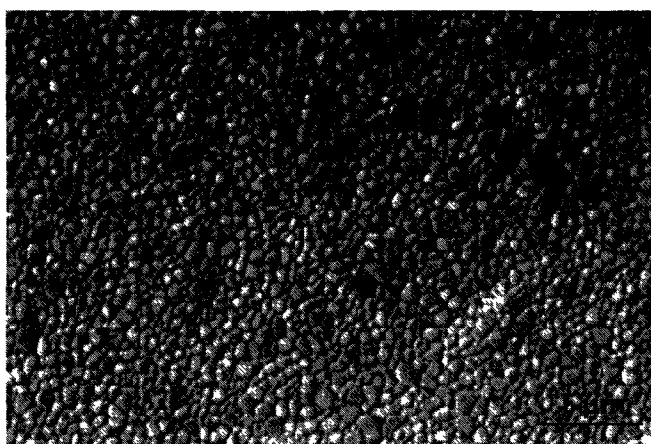
BCP20



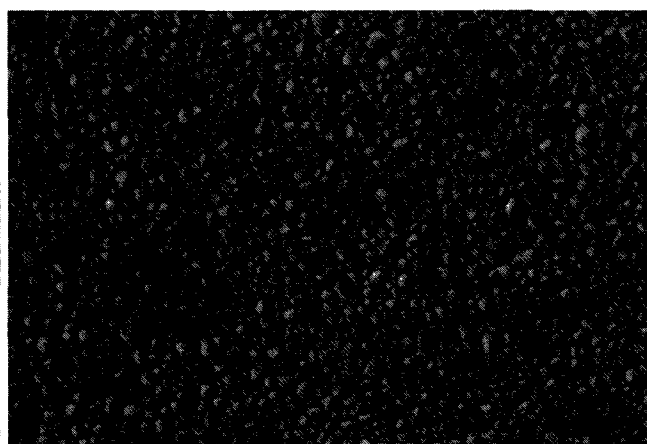
BCP40



BCP60



BCP80



HA800

Figure 24 : Micrographies MEB après post-densification pour chaque composition chimique

Cette analyse met en exergue l'invariance de ce paramètre avant et après le traitement de post-HIP du matériau (taille de grains = $0,7 - 0,8 \mu\text{m}$) mais, par contre, montre une diminution importante de la taille du grain entre les matériaux hippés et ceux frittés conventionnellement à 1130°C (*Tableau 13*).

Le cycle de post-HIP a, donc, permis une densification totale de nos céramiques phosphocalciques tout en préservant une microstructure relativement fine.

3.5. Conclusion

Dans les conditions de broyage optimales, le frittage naturel des phosphates de calcium étudiés à une température maximale de 1130°C a permis de densifier :

- le phosphate tricalcique, le BCP20, le BCP40 et le BCP60 à plus de 99 %,
- le BCP80 à près de 98 %,
- et l'hydroxyapatite à 94 %.

Cependant, ces frittages à haute température ont conduit à des microstructures non optimisées qui ne sont pas idéales à de bonnes propriétés mécaniques.

En appliquant un procédé en deux étapes : une prédensification par frittage naturel afin d'obtenir la porosité ouverte suivie d'une post-densification sous pression isostatique à chaud, nous avons obtenu des phosphates de calcium mono et biphasés denses à plus de 99,9 % et présentant un aspect transparent. Ces matériaux ont également l'avantage de présenter une microstructure fine dont l'effet sur les propriétés mécaniques sera étudié au chapitre suivant.

4. Caractérisations mécaniques

En utilisant la technique du post-frittage par pressage isostatique à chaud, nous avons réussi à élaborer des biocéramiques phosphocalciques mono et biphasées présentant des densités proches de leurs densités théoriques ($d_r > 99,9 \%$) et exhibant des dimensions de grains similaires, de l'ordre de 0,7 à 0,8 μm . De plus, les traitements de préfrittage et de post-frittage, réalisés à des températures inférieures à la transition de phase $\beta \rightarrow \alpha$ du TCP (1140°C), ont permis, en évitant l'apparition de la phase α , d'obtenir des matériaux présentant une phase cristallographique β unique favorable pour les propriétés mécaniques.

L'étude suivante va consister à évaluer les propriétés mécaniques de ces diverses compositions de biomatériaux et, en particulier, le module d'Young, la dureté Vickers, la ténacité et la résistance à la flexion.

Les caractérisations mécaniques de ces échantillons de caractéristiques physiques et microstructurales similaires vont permettre d'identifier les propriétés mécaniques intrinsèques de ces matériaux et de montrer, par une analyse comparative, l'impact réel de la composition chimique sur les caractéristiques de ces biomatériaux.

4.1. Le module d'Young

Le module d'Young (ou module d'élasticité) est une constante élastique qui, pour un matériau homogène isotrope, lie la contrainte à la déformation. Ce coefficient caractérise la rigidité du matériau.

4.1.1. Méthode

Le module d'Young a été déterminé par une technique ultrasonore non destructive qui répond à la norme NF EN 843-2 [NF 843-2]. Cet essai est réalisé sur des pastilles de 17 mm de diamètre et de 3 à 4 mm d'épaisseur. Dix mesures sont réalisées pour chaque composition chimique. Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de propagation d'ondes ultrasonores transversale et longitudinale afin de déterminer les caractéristiques mécaniques telles que le module d'Young E .

Une impulsion électrique d'amplitude élevée mais de courte durée excite par choc un transducteur piézoélectrique. Les vibrations émises constituent un train d'ondes ultrasonores amorties qui est réfléchi sur la face opposée de l'échantillon (*Figure 25*). L'utilisation d'un couplant (un liquide pour les ondes longitudinales et une pâte pour les ondes transversales) est nécessaire afin de permettre la propagation des ondes ultrasonores entre le transducteur et le

matériau étudié. Après propagation dans le matériau, les échos ultrasonores sont transformés en signal électrique qui est visualisé sur un oscilloscope.

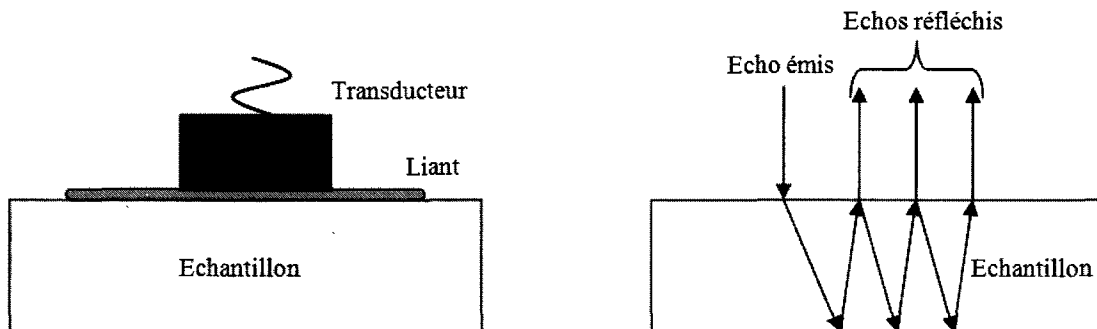


Figure 25 : Schéma du principe de mesure ultrasonique

Deux types de transducteurs sont utilisés :

- * un pour la mesure de la vitesse longitudinale V_L ,
- * un pour la mesure de la vitesse transversale V_T .

Les vitesses des ondes longitudinale et transversale sont calculées à partir de la mesure du temps Δt qui correspond au temps mis par les ultrasons pour traverser le matériau d'épaisseur e et revenir sur le transducteur. On peut, donc, écrire la relation suivante (Équation 13) :

$$2e = V \times \Delta t \quad \text{Équation 13}$$

La détermination des vitesses longitudinale V_L et transversale V_T permet le calcul du module d'Young E (Équation 14) [ASM 01].

$$E = \rho \times V_T^2 \times \frac{4V_T^2 - 3V_L^2}{V_T^2 - V_L^2} \quad \text{Équation 14}$$

- où :
- ρ la masse volumique,
 - V_T la vitesse des ondes transversales,
 - et V_L la vitesse des ondes longitudinales.

4.1.2. Résultats

Les valeurs du module d'Young mesuré par ultrasons sont présentées dans le *Tableau 14*. La *Figure 26* représente l'évolution de E en fonction de la teneur en hydroxyapatite.

	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
E (GPa)	105,6 ± 4,3	105,9 ± 4,3	110,8 ± 4,1	115,3 ± 4,6	119,7 ± 4,6	122,3 ± 4,7

Tableau 14 : Module d'Young pour les différentes teneurs en hydroxyapatite

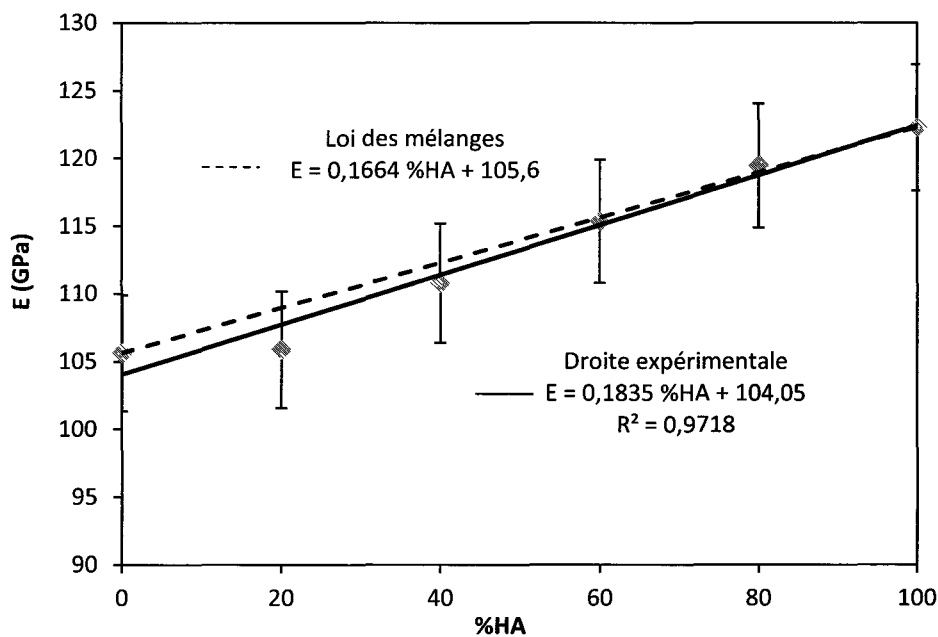


Figure 26 : Module d'Young en fonction de la teneur en hydroxyapatite

Les modules d'Young intrinsèques du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite sont, respectivement, de $105,6 \pm 4,3$ et de $122,3 \pm 4,7$ GPa. Le module d'Young des biphasiques varie entre les valeurs intrinsèques du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite de manière linéaire. Le module d'Young de nos céramiques phosphocalciques suit une loi des mélanges. En effet, la courbe de tendance expérimentale (*Équation 15*) présente un coefficient directeur de 0,1835 qui est proche de celui de la loi des mélanges (*Équation 16*) déterminée à partir des modules d'Young du TCP et de l'HA.

$$\text{Droite expérimentale} \quad E \text{ (GPa)} = 0,1835 \%HA + 104,05 \quad \text{Équation 15}$$

$$\text{Loi des mélanges} \quad E \text{ (GPa)} = 0,1664 \%HA + 105,6 \quad \text{Équation 16}$$

4.1.3. Discussion

Les modules d'Young obtenus en littérature pour le TCP et l'HA sont présentés dans le *Tableau 15*.

Matériau	Référence	Conditions d'élaboration	Conditions de frittage	d _r (%)	Module d'Young (GPa)
TCP	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC et post-HIP 1000°C	> 99,9	105,6
	[LIN 07]	Pressage uniaxial 200 MPa	1100°C FC	99,6	69
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1180°C FC	98	100
	[CHE 08]	Gel casting	1100°C FC	97,4	72
	[VIS 08]		1200°C		120 Monocristaux de 50 à 75 µm
HA	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC 1130°C et post-HIP 1100°C	> 99,9	122,3
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1200°C FC	97,5	112
	[ŚLÓ 99]	Pressage isostatique 350 MPa	1250°C FC	98,5	109
	[GU 02]		950°C SPS	99,6	108
	[SAB 09]				143-150 Monocristaux naturels

Tableau 15 : Comparaison du module d'Young avec la littérature (FC : frittage conventionnel; HIP : pressage isostatique à chaud; SPS :spark plasma sintering)

Les valeurs que nous avons obtenues sur nos matériaux denses sont plus élevées que toutes les valeurs que l'on retrouve dans la littérature. Seules les valeurs déterminées par Viswanath *et al.* [VIS 08] et Saber-Samandari *et al.* [SAB 09], respectivement, sur le TCP et l'HA monocristallins sont supérieures aux valeurs que nous avons déterminées. Les monocristaux peuvent être considérés comme références. Les conditions d'élaboration que nous avons mises en œuvre nous ont conduits à l'obtention de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite denses à plus de 99,9 %, permettant, ainsi, à nos matériaux de servir de références.

Peu de références bibliographiques existent en ce qui concerne la caractérisation des matériaux biphasiques présentant de forts taux de densification. Cependant, Benaqqa [BEN 03] a obtenu par pressage isostatique (200 MPa) suivi d'un frittage à 1200°C (pendant 7 h) un biphasique 30 % TCP – 70 % HA dense à 98 % et présentant un module d'Young de 102 GPa. Dans notre cas, nous obtiendrions un module d'Young proche de 117 GPa pour un biphasique à 70 % d'HA dense.

4.2. La dureté Vickers

4.2.1. Méthode

La dureté d'un matériau qualifie la capacité de celui-ci à résister à la déformation.

Cet essai est réalisé sur des pastilles (diamètre = 17 mm et épaisseur = 3 mm) dont les surfaces sont polies à la pâte diamantée 3 µm. L'essai de microindentation est réalisé sur une machine d'essais Future-Tech Corp. (LOAD-CELL FLC-50V). Un indenteur Vickers (*Figure 27* et *Figure 28*) et une charge de 500 g appliquée pendant 15 s sont utilisés pour cet essai. Dix mesures sont réalisées sur chaque échantillon.

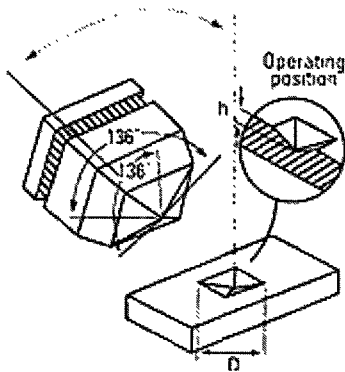


Figure 27 : Indenteur Vickers

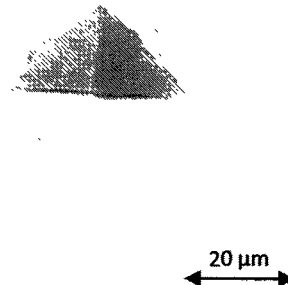


Figure 28 : Empreinte Vickers après indentation sur une pastille de TCP sous une charge de 500 g

La dureté Vickers H_V est calculée au moyen de la relation suivante (*Équation 17*) :

$$H_V = \frac{1,8544 \times P}{d^2} \quad \text{Équation 17}$$

- où :
- H_V la dureté Vickers (MPa),
 - P la force appliquée (N),
 - d la moyenne des deux diagonales de l'empreinte (mm).

4.2.2. Résultats

La dureté Vickers (convertie en unité GPa) de nos matériaux a été mesurée pour les différentes teneurs en hydroxyapatite (*Tableau 16 et Figure 29*).

	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
H _V (GPa)	5,3 ± 0,1	4,8 ± 0,1	5,4 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,5 ± 0,1	6,3 ± 0,1

Tableau 16 : Dureté Vickers pour les différentes teneurs en hydroxyapatite

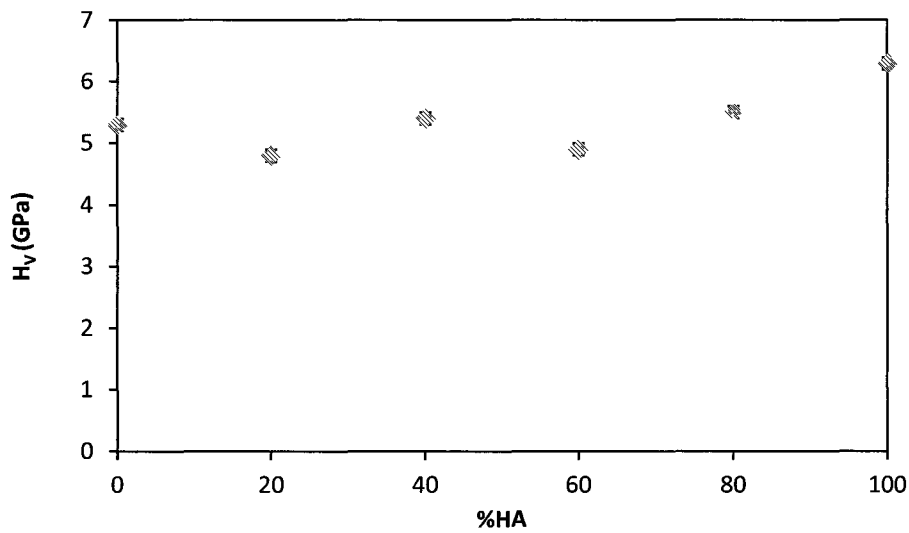


Figure 29 : Dureté Vickers en fonction de la teneur en hydroxyapatite

Les duretés Vickers intrinsèques du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite sont, respectivement, $5,3 \pm 0,1$ et $6,3 \pm 0,1$ GPa. Aucune évolution spécifique de la dureté Vickers n'est mise en évidence en fonction du pourcentage croissant en hydroxyapatite.

4.2.3. Discussion

La dureté d'un matériau est fonction de ses propriétés intrinsèques telles que :

* la taille des grains : la loi de Hall-Petch (*Équation 18*) [HAL 51] [PET 53] traduit l'augmentation de la limite élastique conjointement à une réduction de taille de grains. De plus, la limite élastique est reliée à la dureté par l'*Équation 19* [TAB 51]. Pour l'ensemble de nos matériaux, la taille de grains est constante de l'ordre de 0,7 - 0,8 μm .

$$R_{e0,2} = \sigma_0 + kd^{-1/2} \quad \text{Équation 18}$$

$$H_V = 3R_e \quad \text{Équation 19}$$

Avec - $R_{e0,2}$ la limite conventionnelle d'élasticité à 0,2 %,

- d la taille moyenne des grains,

- k un coefficient qui dépend du matériau.

* la composition chimique qui varie avec le taux d'HA,

* la porosité qui est nulle dans notre étude,

* et la présence de contraintes résiduelles, qui pourraient apparaître en la présence de la phase α du TCP, cependant, seule la phase β a été décelée dans nos matériaux.

Malgré des densités et tailles de grains constantes pour nos matériaux, les mesures de dureté ne montrent pas une évolution de cette caractéristique avec la composition chimique.

Les duretés Vickers obtenues en littérature pour le TCP et l'HA sont présentées dans le *Tableau 17*.

Matériau	Référence	Conditions d'élaboration	Conditions de frittage	d _r (%)	Taille de grains (μm)	Dureté Vickers (GPa)
TCP	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC et post-HIP 1000°C	> 99,9	0,75	5,3
	[LIN 07]	Pressage uniaxial 200 MPa	1100°C FC	99,5	0,3	5,2
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1180°C FC	98	7	6,8
	[KAW 04]		1000°C SPS	> 99	1,5	5,0
	[VIS 08]		1200°C		Monocristaux de 50 à 75 μm	7,68
HA	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC 1130°C et post-HIP 1100°C	> 99,9	0,62	6,3
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1200°C FC	98	2	4,9
	[VEL 10]	Pressage uniaxial 100 MPa	1200°C Micro-ondes	94,3	1,59	4,85
	[MUR 00]	Pressage isostatique 200 MPa	1250°C FC	> 99	2	6,08
	[SAB 09]				Monocristaux naturels	6,4-7,1

Tableau 17 : Comparaison de la dureté Vickers avec la littérature (FC : frittage conventionnel; HIP : pressage isostatique à chaud; SPS : spark plasma sintering)

Il n'est pas aisé de comparer nos valeurs avec celles de la bibliographie. En effet, la dureté Vickers est fonction de la taille de grains et de la porosité mais, également, du processus de mesure telle que la vitesse de chargement ou la charge appliquée. Ces paramètres sont identiques pour l'ensemble de nos matériaux mono ou biphasés. Cependant,

les auteurs dont les duretés sont citées dans le *Tableau 17*, ne procèdent pas tous selon le même mode opératoire, ce qui peut induire des différences de duretés.

Cependant, nous constatons que la dureté obtenue sur notre phosphate tricalcique β est proche des données de la littérature [LIN 07] [KAW 04].

Les valeurs que nous avons déterminées sur l'hydroxyapatite sont supérieures aux valeurs recueillies en bibliographie et très proches de celles obtenues sur des matériaux monocristallins [SAB 09].

Peu de résultats sur les biphasiques existent dans la littérature, seuls, Veljović *et al.* [VEL 10] ont obtenu une dureté Vickers de 4,28 GPa pour un biphasique 30 % TCP - 70 % HA présentant une taille de grains de 0,480 μm et une densité de 83 %.

4.3. La ténacité

Ce paramètre a, tout d'abord, été déterminé par la méthode VIF (Vickers Indentation Fracture). C'est une méthode facile à mettre en œuvre de part la géométrie simple des échantillons (pastilles). Elle donne une première approche de la valeur de ténacité mais n'est pas normalisée. Cependant, cette méthode a été utilisée sur le phosphate tricalcique stœchiométrique et comparée aux valeurs obtenues par essai SEVNB. La ténacité a, ensuite, été mesurée, sur l'ensemble des autres compositions chimiques, par un essai SEVNB (Single Edge V-Notched Beam), test normalisé correspondant à un essai de flexion 3-points sur une éprouvette entaillée.

4.3.1. Méthode VIF (Vickers Indentation Fracture)

4.3.1.1. Présentation de la méthode

Les méthodes classiques de mesures de ténacité des céramiques reposent sur des essais de flexion d'éprouvettes préalablement entaillées type SENB (*Single Edge Notched Beam*). Ces essais présentent l'avantage de faire l'objet de normes, mais nécessitent de fabriquer des éprouvettes de formes très particulières et de réaliser une préfissuration de l'éprouvette. Des méthodes par indentation permettent, également, de caractériser la ténacité des céramiques avec, comme avantage, de ne nécessiter aucune préparation particulière de l'échantillon, si ce n'est un polissage aussi soigneux que possible. On peut, par ailleurs, accéder, par les méthodes d'indentation, à des mesures locales, ce qui est particulièrement intéressant si le matériau est hétérogène ou présente des défauts qui fausseraient les mesures par méthode

SENB. Par contre, ces méthodes ne font pas l'objet de normes et il faut, donc, rester prudent lorsqu'on annonce des valeurs de ténacités. Il est préférable de parler de ténacité VIF (*Vickers Indentation Fracture*) K_{IC} et non de ténacité en mode I, soit K_{IC} .

Le principe de mesure de la ténacité par indentation Vickers consiste à enfoncer dans le matériau un indenteur Vickers de manière à générer des fissures dans le matériau aux quatre coins de celui-ci. La forme pyramidale de l'indenteur Vickers lui permet d'agir comme un coin qui écarte les lèvres de la fissure au fur et à mesure de son enfoncement dans le matériau et, donc, de l'augmentation de la charge. La mesure des longueurs de fissures permet de remonter à la ténacité VIF.

On admet couramment que deux types de fissures peuvent se développer au voisinage et sous l'indenteur, le type Radial-Médian et le type Palmqvist (*Figure 30*).

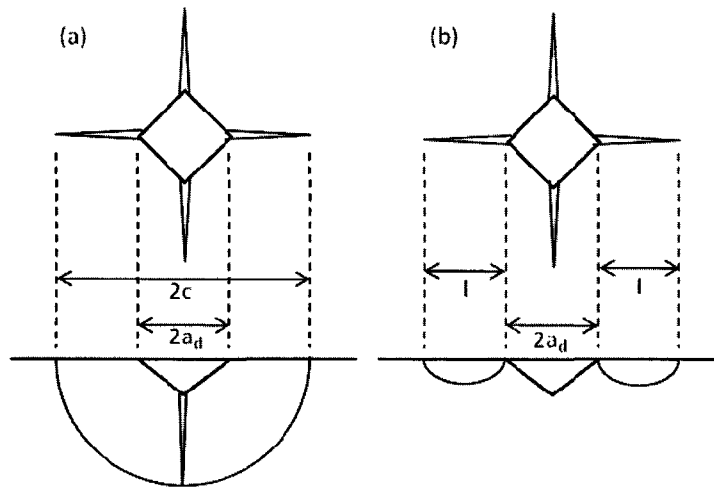


Figure 30 : Représentation des modes de fissurations type Radial-Médian (a) et type Palmqvist (b)

Il existe, dans la littérature, de nombreuses lois empiriques qui permettent de calculer la ténacité à partir des longueurs des fissures qui se développent. Ponton et Rawlings [PON 89] ont collecté plus de vingt expressions différentes selon le mode de fissuration. On peut regrouper l'ensemble de ces expressions en deux groupes en relation avec le type de fissuration. On obtient les expressions générales suivantes :

$$K_{C(R-M)} = \Pi \frac{P}{c^{3/2}} \quad \text{Équation 20} \quad \text{index (R-M) pour Radial-Médian}$$

$$K_{C(P)} = \Pi \frac{P}{a_d l^{1/2}} \quad \text{Équation 21} \quad \text{index (P) pour Palmqvist}$$

avec $\Pi = p \left(\frac{E}{H_V} \right)^r$ où E est le module d'Young, H_V la dureté Vickers, p et r sont des constantes qui prennent différentes valeurs suivant les auteurs.

L'étude de ces relations en fonction du rapport E/H_V (arbitrairement compris entre 0 et 50) permet de définir deux relations représentatives des valeurs moyennes de la ténacité :

$$K_{C(R-M)} = 0,0154 \left(\frac{E}{H_V} \right)^{1/2} \frac{P}{c^{3/2}} \quad \text{Équation 22}$$

$$K_{C(P)} = 0,0089 \left(\frac{E}{H_V} \right)^{2/5} \frac{P}{a_d l^{1/2}} \quad \text{Équation 23}$$

Le rapport E/H_V ainsi que K_C sont des valeurs intrinsèques du matériau étudié, donc les rapports $P/c^{3/2}$ et $P/a_d l^{1/2}$ sont des constantes. Par ailleurs, l'Équation 23 est liée à la longueur de la demi diagonale d'empreinte a_d . On peut, alors, introduire la relation de Meyer (Équation 24) dans l'Équation 23. La relation de Meyer exprime la relation entre a_d et la charge P . On obtient, alors, deux relations de proportionnalité qui dépendent du mode de fissuration (Équation 25 et Équation 26).

$$P = A d^n \quad \text{Équation 24}$$

$$c \propto P^{2/3} \quad \text{Équation 25} \quad \text{Pour les fissures de type Radial-Median}$$

$$l \propto P^{2(1-\frac{1}{n})} \quad \text{Équation 26} \quad \text{Pour les fissures de type Palmqvist}$$

A partir de ces deux équations, il est, alors, aisé d'identifier le type de fissuration si on représente $\ln(c)$ et $\ln(l)$ en fonction de $\ln(P)$ pour les différentes valeurs expérimentales. Si la fissuration est de type Radial-Médian, la droite obtenue aura pour pente 0,66, et, si la fissuration est de type Palmqvist, la droite obtenue aura pour pente $2(1 - 1/n)$, n étant l'indice de Meyer qui est de l'ordre de 2 (Figure 31).

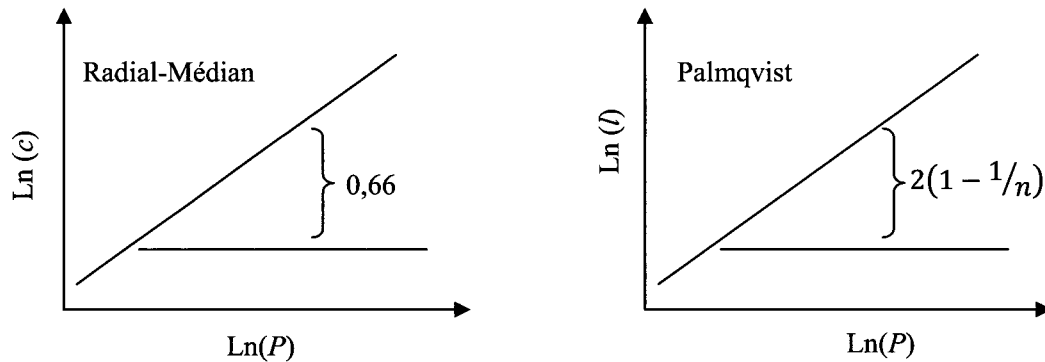


Figure 31 : Identification du mode de fissuration type Radial-Médian ou Palmqvist

4.3.1.2. Détermination de la ténacité VIF pour le TCP

Les essais d'indentation Vickers ont été réalisés sous huit charges (de 50 g à 1000 g) pendant 15 s, à raison de trois essais par charge. Les empreintes laissées par l'indenteur sont observées par microscopie optique et les fissures sont mesurées par analyse d'images.

4.3.1.2.1. Détermination de l'indice de Meyer n

L'Équation 24 nous permet de déterminer l'indice de Meyer à partir de la pente de la droite $\ln P = f(\ln d)$ (Figure 32).

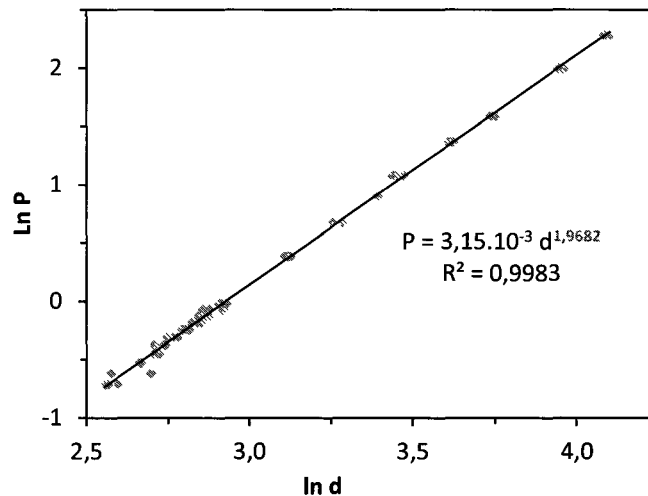


Figure 32 : Détermination de l'indice de Meyer

Sur cette figure, on remarque que les points s'alignent sur une droite de pente 1,9682 qui correspond à l'indice de Meyer.

4.3.1.2.2. Identification du mode de fissuration

Les pentes des droites $\ln c = f(\ln P)$ et $\ln a = f(\ln P)$ permettent d'identifier les modes de fissuration de type Radial-Median ou Palmqvist.

La Figure 33 montre que le mode de fissuration n'est pas de type Radial-Median car la pente de la droite $\ln c = f(\ln P)$ est égale à 0,7982 donc très différente de la valeur théorique de 0,66 pour ce mode. La pente de la droite $\ln a = f(\ln P)$ est égale à 1. Or, le calcul de la pente théorique pour un mode de fissuration de type Palmqvist est égale à $2(1 - 1/n) = 0,9838$. Les deux valeurs sont très proches, on en conclut, donc, que le mode de fissuration est de type Palmqvist (Tableau 18).

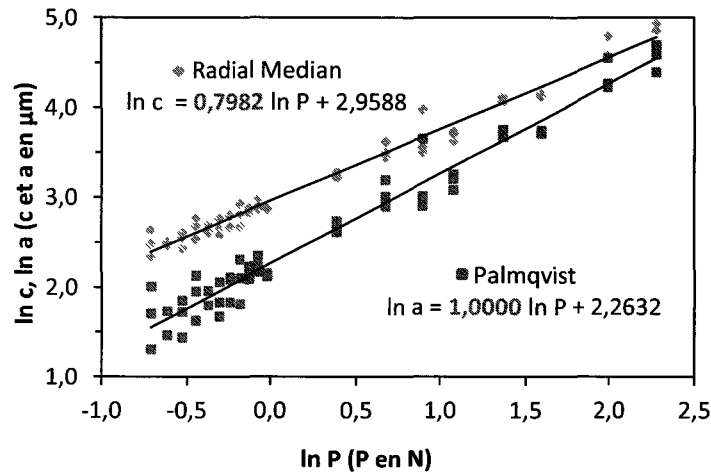


Figure 33 : Détermination du mode de fissuration

Valeurs expérimentales des pentes	Conditions sur la pente	Type de fissuration
$\text{pente} (\ln c = f(\ln P)) = 0,7982$	$\text{pente} (\ln c = f(\ln P)) = \frac{2}{3}$	Radial-Median
$\text{pente} (\ln a = f(\ln P)) = 1,0000$	$\text{pente} (\ln a = f(\ln P)) = 2 \times \left(1 - \frac{1}{n}\right) = 0,9838$	Palmqvist

Tableau 18 : Identification du type de fissuration selon la valeur des pentes

4.3.1.2.3. Calcul de la ténacité VIF

Pour une fissuration de type Palmqvist, la ténacité VIF est calculée au moyen de l'équation suivante (Équation 23) :

$$K_{C(P)} = 0,0089 \left(\frac{E}{H_V} \right)^{2/5} \frac{P}{a_d l^{1/2}} \quad \text{Équation 23}$$

Dans cette expression, on prend les valeurs du module d'Young et de la dureté Vickers déterminées précédemment :

$$E = 105,6 \text{ GPa} \quad \text{et} \quad H_V = 5,3 \text{ GPa.}$$

La valeur moyenne et l'écart-type de K_C pour l'ensemble des essais d'indentation sont :

$$K_C (\text{VIF}) = 1,03 \pm 0,09 \text{ MPa} \cdot \sqrt{\text{m}}$$

4.3.2. Essai SEVNB (Single Edge V-Notched Beam)

4.3.2.1. Méthode

Ce test normalisé [NF 14425] consiste en un essai de flexion 3-points sur une éprouvette parallélépipédique de dimensions $3 \times 4 \times 25 \text{ mm}^3$ présentant une entaille d'une profondeur mesurée d'environ $0,5 - 0,6 \text{ mm}$. Cette entaille est réalisée à la scie diamantée puis est accentuée à l'aide d'une lame de rasoir (Figure 34).

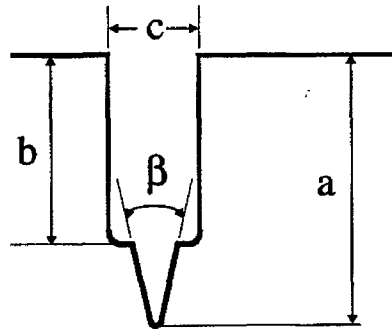


Figure 34 : Schéma de l'entaille réalisée pour les essais SEVNB ($a = 0,8 - 1,2 \text{ mm}$, $b = 0,5 - 0,6 \text{ mm}$, $c \geq \text{épaisseur de la lame de rasoir}$, $a - b \geq c$, $\beta \approx 30^\circ$ ou aussi petit que possible)

Les défauts sont, ensuite, corrigés à la pâte diamantée $6 \text{ puis } 3 \text{ }\mu\text{m}$. La vitesse de chargement est de $0,5 \text{ mm.s}^{-1}$. L'entraxe est fixé à 15 mm .

La ténacité K_{IC} est mesurée sur 10 éprouvettes pour chaque type d'échantillon. Elle est calculée par les relations suivantes (Équation 27, Équation 28 et Équation 29) [KÜB 99] :

$$K_{IC} = \frac{3 \times F \times S \times \sqrt{\alpha}}{2 \times B \times W^{1,5}} \times Y^* \quad \text{Équation 27}$$

avec :

$$Y^* = 1,964 - 2,837\alpha + 13,71\alpha^2 - 23,25\alpha^3 + 24,13\alpha^4 \quad \text{Équation 28}$$

$$\alpha = \frac{a}{W} \quad \text{Équation 29}$$

- et :
- K_{IC} la ténacité ($\text{MPa} \cdot \sqrt{\text{m}}$),
 - F la force appliquée à la rupture (MN),
 - S l'entraxe (m),
 - B et W respectivement l'épaisseur (m) et la largeur (m) de l'éprouvette,
 - et a la longueur moyenne de l'entaille (m).

4.3.2.2. Résultats

Les valeurs de ténacité de nos matériaux sont présentées dans le *Tableau 19*. Sur la *Figure 35*, l'évolution de la ténacité est représentée en fonction de la teneur en hydroxyapatite.

	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
K_{IC} (MPa. $\sqrt{m}$)	$1,03 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,02$	$1,40 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,07$	$0,92 \pm 0,02$

Tableau 19 : Ténacité pour différentes teneurs en hydroxyapatite

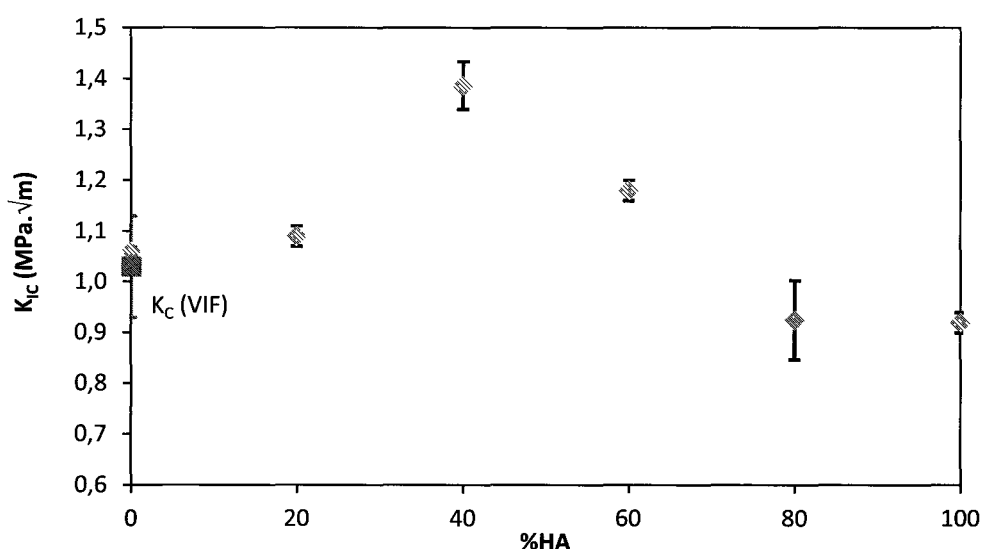


Figure 35 : Ténacité en fonction de la teneur en hydroxyapatite

Les ténacités intrinsèques du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite stœchiométriques purs sont, respectivement, de $1,03 \pm 0,09$ et $0,92 \pm 0,02$ MPa. $\sqrt{m}$. Il est à noter que la valeur obtenue par SEVNB sur le TCP est identique à la ténacité VIF mesurée à partir des essais d'indentation Vickers.

La ténacité ne suit pas une loi des mélanges, elle augmente avec la teneur en HA jusqu'à atteindre un maximum pour le BCP40 (1,40MPa. $\sqrt{m}$) puis cette propriété mécanique diminue jusqu'à une valeur minimale de 0,92 MPa. $\sqrt{m}$ pour l'hydroxyapatite.

4.3.2.3. Discussion

Raynaud [RAY 99] explique ce phénomène par l'apparition de contraintes résiduelles au voisinage de l'interface matrice-renfort au cours du refroidissement après frittage. Ces contraintes sont engendrées par la différence de coefficient de dilatation $\Delta\alpha = \alpha_{\text{matrice}} - \alpha_{\text{renfort}}$ entre ces deux phases. Selon que $\Delta\alpha$ est positif ou négatif, le comportement d'une fissure au voisinage du renfort particulaire sera modifié.

Les coefficients de dilatation du TCP et de l'HA sont différents selon la direction cristallographique (*Tableau 20*).

Axe	TCP [NAK 90]		HA [FIS 83]	
	a	c	a	c
Coefficient de dilatation α ($\cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$)	7	25	13	22

Tableau 20 : Coefficients de dilatation thermique du TCP et de l'HA selon les directions cristallographiques

Le calcul de $\Delta\alpha$ permet d'envisager un mécanisme de renfort de type composite à dispersoïdes. Lorsque la teneur en hydroxyapatite est inférieure ou égale à 40 %, le composite, ainsi formé, correspond à une matrice de TCP renforcée par des particules d'HA. Dans ce cas, $\Delta\alpha$ est majoritairement négatif (*Figure 36b*). A l'interface, la matrice est en compression et la particule en traction. Il y a, alors, renforcement du TCP par un mécanisme de déviation de fissures.

A l'inverse, lorsque le composite est une matrice d'hydroxyapatite renforcée par des particules de TCP (à une teneur inférieure ou égale à 40 %), $\Delta\alpha$ est, dans ce cas, majoritairement positif (*Figure 36a*). A l'interface matrice-dispersoïde, l'HA est en traction et le TCP en compression. Autour des particules de TCP, se créent, alors, des microfissurations qui vont engendrer la dispersion d'énergie d'une fissure se propageant dans le matériau.

Ces deux effets sont minimisés du fait d'une orientation aléatoire des grains de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite et des coefficients de dilatation thermique différents selon les directions.

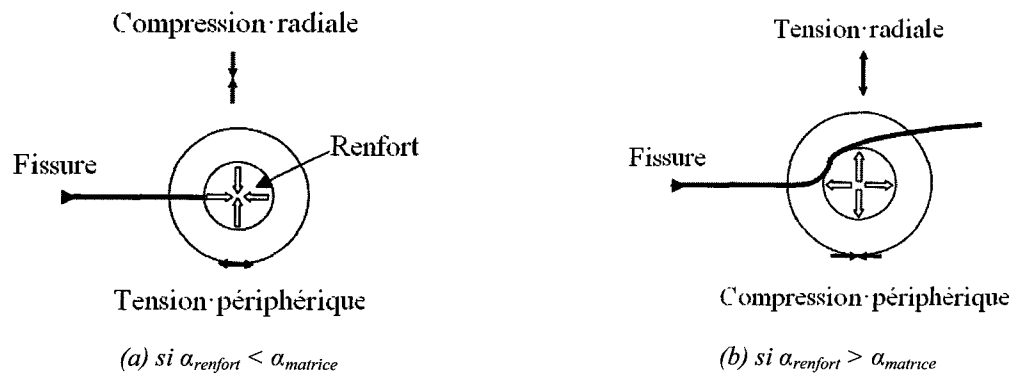


Figure 36 : Contraintes au voisinage du renfort [RAY 99]

Benaqqa [BEN 03] a, également, obtenu, pour un biphasique 30 %TCP – 70 %HA, une ténacité de 1,3 MPa. $\sqrt{m}$ plus élevée que pour le TCP (1,2 MPa. $\sqrt{m}$) et l'HA (0,95 MPa. $\sqrt{m}$), ce qui fait penser à un phénomène de renforcement par mise sous contrainte de la matrice.

Les ténacités obtenues en littérature pour le TCP et l'HA sont présentées dans le *Tableau 21*.

Matériau	Référence	Conditions d'élaboration	Conditions de frittage	d _r (%)	Taille de grains (μm)	Ténacité (MPa.√m)
TCP	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC et post-HIP 1000°C	> 99,9	0,75	1,03
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1180°C FC	98	7	1,2
	[CHE 08]	Gel casting	1100°C FC	97,4	2,8	0,92
	[VIS 08]		1200°C		Monocristaux de 50 à 75 μm	0,41-1,15
HA	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC 1130°C et post-HIP 1100°C	> 99,9	0,62	0,92
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1200°C FC	98	2	0,95
	[RAY 02b]	Pressage à chaud 20 MPa	1200°C HP	98,9	0,2	0,7
	[GU 02]		950°C SPS	99,6	4,5	1,25
	[VEL 10]	Pressage uniaxial 100 MPa	1200°C Micro-ondes	94,3	1,59	0,8
	[SAB 09]				Monocristaux naturels	0,35-0,45

Tableau 21 : Comparaison de la ténacité avec la littérature (FC : frittage conventionnel; HIP : pressage isostatique à chaud; SPS : spark plasma sintering)

Il est peu aisé de comparer les ténacités avec les valeurs données dans la littérature du fait de tailles de grains et de taux de porosités différents. Cependant, nos résultats sont en accord avec les valeurs déterminées par Benaqqa [BEN 03].

4.4. La résistance à la flexion

4.4.1. Méthode

L'essai de flexion 3-points est réalisé sur des éprouvettes parallélépipédiques de dimensions 3x4x25 mm³ selon la norme NF EN 843-1 [NF 843-1]. Ces éprouvettes ont été obtenues par coulage de cylindres en moule de plâtre suivi d'une densification par frittage naturel et post-HIP. Ces cylindres ont ensuite subi une rectification plane à la meule D 90. Les chanfreins sont réalisés manuellement sur papier SiC, il s'ensuit un polissage des 4 faces principales sur papier SiC grade 220, 400, 800 et 1200. Le polissage se termine à la pâte diamantée 12 µm, 6 µm, 3 µm, 1 µm et 0,1 µm. Les côtes des éprouvettes sont systématiquement contrôlées avant essai.

L'essai de flexion (*Figure 37*) est réalisé sur une machine d'essais mécaniques universelle ZWICK Z100 équipée d'une cellule traction/compression de 10 kN.

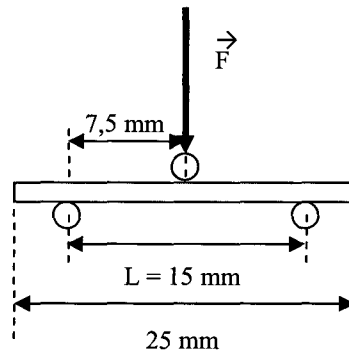


Figure 37 : Essai de flexion 3-points

La déformation de l'éprouvette pendant l'essai se fait par déplacement de la traverse avec une vitesse de 0,5 mm.s⁻¹ avec un entraxe de 15 mm. Cinq mesures sont réalisées pour chaque composition chimique.

La résistance à la flexion est calculée par la relation suivante (*Équation 30*) :

$$\sigma_f = \frac{3 \times L \times F}{2 \times b \times h^2} \quad \text{Équation 30}$$

où :

- σ_f est la résistance à la flexion (MPa),
- L l'entraxe (mm),
- F la force appliquée à la rupture (N),
- b la base,
- et h la hauteur.

4.4.2. Résultats

Les valeurs de résistance à la flexion de nos matériaux sont présentées dans le *Tableau 22*. La *Figure 38* présente l'évolution de la résistance à la flexion en fonction de la teneur en hydroxyapatite.

	TCP	BCP20	BCP40	BCP60	BCP80	HA
σ_f (MPa)	173 ± 14	198 ± 14	189 ± 12	170 ± 10	145 ± 8	110 ± 9

Tableau 22 : Résistance à la flexion pour différentes teneurs en hydroxyapatite

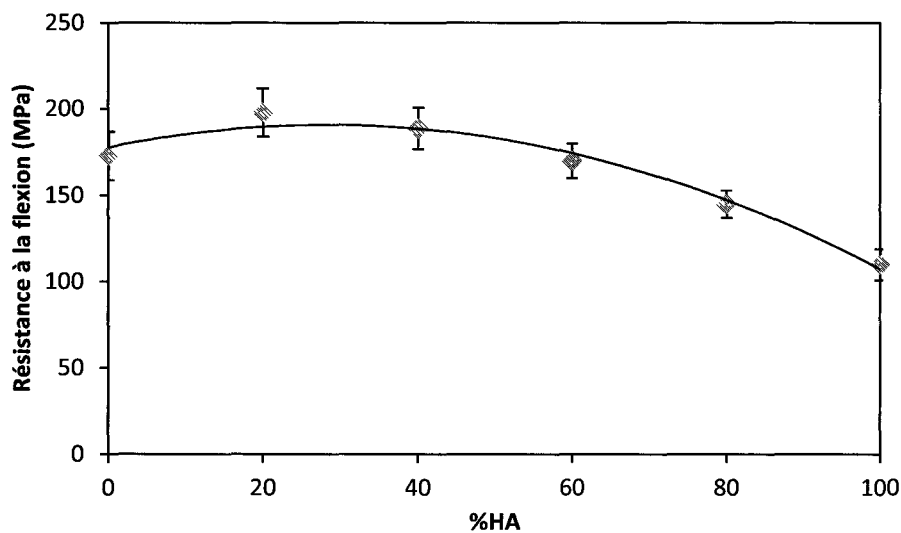


Figure 38 : Résistance à la flexion en fonction de la teneur en hydroxyapatite

Les résistances à la flexion intrinsèques du phosphate tricalcique et de l'hydroxyapatite stœchiométriques sont, respectivement, de 173 ± 14 et 110 ± 9 MPa.

La résistance à la flexion présente un maximum comme pour la ténacité en fonction de la composition chimique. En effet, la résistance à la flexion atteint un maximum (198 MPa) pour une teneur de 20 % en hydroxyapatite puis la résistance à la flexion diminue jusqu'à atteindre son minimum pour l'hydroxyapatite.

4.4.3. Discussion

La résistance à la flexion correspond à la contrainte maximale que peut subir un matériau lorsqu'il se retrouve soumis à une flexion. Dès que cette contrainte est atteinte, la rupture de l'échantillon survient par une fissuration brutale dans la zone la plus en tension, c'est-à-dire au milieu de l'éprouvette sur la face inférieure de celle-ci. Cette rupture est, alors, liée à la ténacité par la relation suivante (*Equation 31*) [HAU 05] :

$$K_{IC} = \sigma_f \sqrt{\pi a_c} \quad \text{Equation 31}$$

où :
- K_{IC} est la ténacité,
- σ_f la contrainte de rupture (ou résistance à la flexion),
- et $2a_c$ la taille du défaut critique.

L'évolution quasi conjointe de la résistance à la flexion et de la ténacité est expliquée par une taille de défaut critique constante (de l'ordre de $16 \pm 3 \mu\text{m}$), ce qui révèle une bonne maîtrise de l'élaboration de nos biocéramiques phosphocalciques.

Les résistances à la flexion obtenues dans la littérature pour le TCP et l'HA sont présentées dans le *Tableau 23*.

Matériau	Référence	Conditions d'élaboration	Conditions de frittage	d _r (%)	Taille de grains (µm)	Résistance à la flexion (MPa)
TCP	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC et post-HIP 1000°C	> 99,9	0,75	173
	[LIN 07]	Pressage uniaxial 200 MPa	1100°C FC	99,5	0,3	199
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1180°C FC	98	7	55
	[CHE 08]	Gel casting	1100°C FC	97,4	2,8	93
HA	Notre étude	Coulage en moule de plâtre	FC 1130°C et post-HIP 1100°C	> 99,9	0,62	110
	[BEN 03]	Pressage isostatique 200 MPa	1200°C FC	98	2	52
	[RAY 99]	Pressage à chaud 20 MPa	1200°C HP	98,9	0,2	95
	[YAS 00]	Coulage en moule de plâtre	1200°C FC	96	0,85	88,5

Tableau 23 : Comparaison de la résistance à la flexion avec la littérature (FC : frittage conventionnel; HIP : pressage isostatique à chaud; HP : pressage à chaud)

Peu de références indiquent des valeurs de résistances à la flexion pour des matériaux biphasiques denses à près de 100 %. Cependant, nous pouvons noter que Benaqqa [BEN 03] a obtenu une résistance de 60 MPa pour un biphasique 30 % TCP – 70 % HA.

4.5. Conclusion

La caractérisation mécanique du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite purs, stœchiométriques et denses à près de 100 % a conduit à l'obtention de valeurs intrinsèques pouvant servir de références car ces matériaux ne présentent pas de porosité.

Les modules d'Young du TCP et de l'HA sont, respectivement, de 105,6 et de 122,3 GPa. Cette caractéristique varie de manière linéaire entre les valeurs intrinsèques du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite et suit une loi des mélanges.

Le phosphate tricalcique présente une dureté Vickers de 5,3 GPa alors que celle de l'HA est de 6,3 GPa. Il n'y a pas d'évolution notable de ce paramètre avec la composition chimique de nos biphasiques.

Les mesures de ténacité ont conduit à la détermination des K_{IC} de 1,03 et 0,92 MPa. $\sqrt{m}$ respectivement, pour le TCP et l'hydroxyapatite, l'évolution de ce paramètre présentant un maximum de 1,40 MPa. $\sqrt{m}$ pour une teneur de 40 % en HA.

Enfin, la détermination des résistances à la flexion du phosphate tricalcique et de l'HA ont mis en exergue des valeurs, respectives, de 173 et 110 MPa. La résistance à la flexion présente un maximum de 198 MPa pour un taux d'hydroxyapatite de 20 %.

Cependant, il faut rester prudent car l'analyse des résultats bibliographiques montre une grande dépendance des caractéristiques avec les tailles de grains.

5. Evaluation biologique et fonctionnalisation

A l'issue des traitements de densification, des essais de cytocompatibilité ont été réalisés afin de vérifier l'innocuité de ces matériaux après traitements thermiques. Ces tests ont été effectués en collaboration avec l'Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse (IS2M) et le Groupe de Recherche sur les Biomatériaux de Lille (GRB).

Une fonctionnalisation de nos biocéramiques a, également, été mise en œuvre avec pour objectif la réalisation d'une céramique antibactérienne. Pour ce faire, les céramiques ont été rendues microporeuses de façon à permettre l'imprégnation de diverses substances antibactériennes. Les substances étudiées sont des molécules organiques comme des antibiotiques ou des vecteurs biologiques comme des virus (phagothérapie).

5.1. Evaluation biologique

Le matériau idéal doit être biocompatible : c'est-à-dire que le matériau et ses produits de dégradation ne doivent pas provoquer de réactions inflammatoires, allergiques ou immunitaires et qu'ils doivent être non toxiques, non mutagènes et non carcinogènes.

Beaucoup d'expériences en rapport avec les implants céramiques et leur potentiel ostéogénique ne peuvent être comparées avec fiabilité car les diverses méthodes de fabrication induisent des réactivités chimiques différentes en surface du matériau. Les matériaux ayant des compositions chimiques similaires n'ont pas forcément les mêmes effets biologiques [KIR 90]. Toute évaluation d'un nouveau biomatériau doit inclure des tests de biocompatibilité. Les techniques de biologie cellulaire sont intéressantes car elles sont simples à mettre en œuvre et surtout reproductibles.

Les tests de cytocompatibilité consistent à déterminer l'influence d'un matériau sur la viabilité cellulaire et sont appliqués en respectant les normes et directives européennes : "Biological evaluation of medical devices - Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods" [NF 10993].

Ces tests permettent d'évaluer le comportement de cultures de cellules (correspondant à l'implantation du dispositif médical) par diverses analyses telles que la prolifération, l'adhésion ou la morphologie cellulaires.

5.1.1. Viabilité cellulaire : méthode du clonage

Les tests de cytotoxicité consistent à déterminer l'influence d'un matériau sur la viabilité cellulaire. La survie cellulaire a été étudiée à partir de cellules épithéliales L132 reconnues pour leur aptitude à cloner et couramment utilisées pour ce test. Cette étude de

cytocompatibilité a été réalisée sur les poudres de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite stœchiométriques.

5.1.1.1. Préparation des échantillons

A l'issue de la synthèse, les poudres de TCP et d'HA sont calcinées, respectivement, à 750 et 800°C puis broyées, respectivement, 48 et 72 h. Les poudres sont, ensuite, stérilisées par exposition aux rayons ultra-violets pendant 1h30.

5.1.1.2. Culture cellulaire

Les tests biologiques sont réalisés suivant la norme ISO 10993-5/EN 30993-5 [NF 10993]. Pour améliorer la reproductibilité des mesures, les cellules de la lignée d'origine sont initialement congelées dans cinq tubes cryogéniques. Les cellules L132 (ATCC-CCL 5, cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain) sont utilisées pour le test de cytotoxicité, elles sont cultivées et subissent des repiquages réguliers dans le milieu Eagles (MEM, n° 2011, Eurobio) supplémenté avec 5 % vol. de sérum de veau fœtal (SVF).

Les colonies formées par les cellules épithéliales L132 sont denses et très bien délimitées (*Figure 39*).

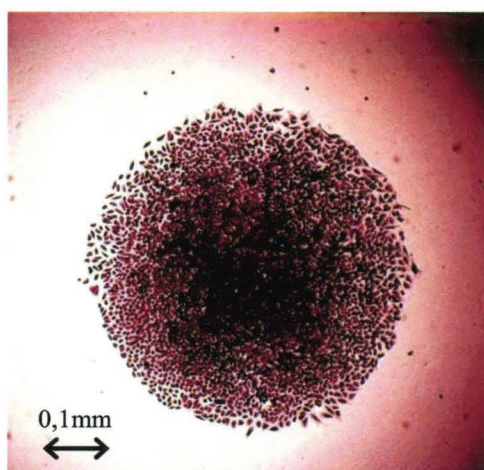


Figure 39 : Aspect d'une colonie de cellules épithéliales L132 formée à 10 jours

5.1.1.3. Méthode expérimentale

Ce test consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et, par conséquent, la concentration létale 50 % (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies [HIL 90], [PUC 55], [ZIA 88].

Nous utilisons la lignée cellulaire L132, ce sont des cellules embryonnaires d'épithélium pulmonaire humain. Elles sont très sensibles aux substances toxiques et réagissent avec une reproductibilité très constante [HIL 96].

Le témoin négatif est le polytétrafluoroéthylène (PTFE) (Goodfellow FP3060010) avec une taille moyenne des particules de 6 à 9 µm. Le témoin positif est le nickel pur en poudre.

Les cellules poussent dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, Costar) à la densité initiale de 300 à 800 cellules/boîte de façon à obtenir, en fin d'expérience, en moyenne 100 colonies par boîtes. Les cellules sont incubées pendant 12 jours dans une étuve à 5 % de CO₂ à 37°C dans 5 mL de milieu MEM supplémenté par 10 % vol. de SVF. L'exposition est continue et les concentrations sont variables, allant de 25 à 400 µg.mL⁻¹ pour les poudres de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite et de 5 à 80 µg.mL⁻¹ pour le Ni. Au moins 6 expériences ont été réalisées pour chaque concentration. Le milieu de culture n'est pas renouvelé pendant toute la durée de l'expérience. Chaque expérience comporte 3 boîtes pour chaque concentration. En fin d'expérience, les cellules sont fixées et colorées avec le Cristal Violet. La survie des cellules exposées est calculée par rapport aux cultures témoins (100 %). Ceci permet d'établir la concentration létale 50 %, un critère précis pour la comparaison de l'effet cytotoxique de différentes substances [HIL 90]. Une classification par ordre de cytotoxicité en résulte.

L'effet relatif de clonage (ERC) est calculé selon les formules suivantes (*Équation 32 et Équation 33*) et exprimé en % par rapport à la culture contrôle (concentration = 0 µg.mL⁻¹) (*Équation 34*).

Culture contrôle C	$X_C(\%) = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Nombre de cellules ensemencées}} \times 100$	<i>Équation 32</i>
-----------------------	--	--------------------

Culture exposée E	$X_E(\%) = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Nombre de cellules ensemencées}} \times 100$	<i>Équation 33</i>
----------------------	--	--------------------

Effet relatif de clonage	$ERC(\%) = \frac{X_E}{X_C} \times 100$	<i>Équation 34</i>
-----------------------------	--	--------------------

5.1.1.4. Résultats des tests de cytotoxicité

Les courbes de viabilité (*Figure 40*) ont été tracées pour le phosphate tricalcique et l'hydroxyapatite et comparées au nickel pris comme témoin positif.

Pour le TCP et l'HA, il n'est pas possible de déterminer la LC50 puisque le taux de survie cellulaire reste supérieur à 80 % même pour de très fortes concentrations de poudre, allant jusque 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

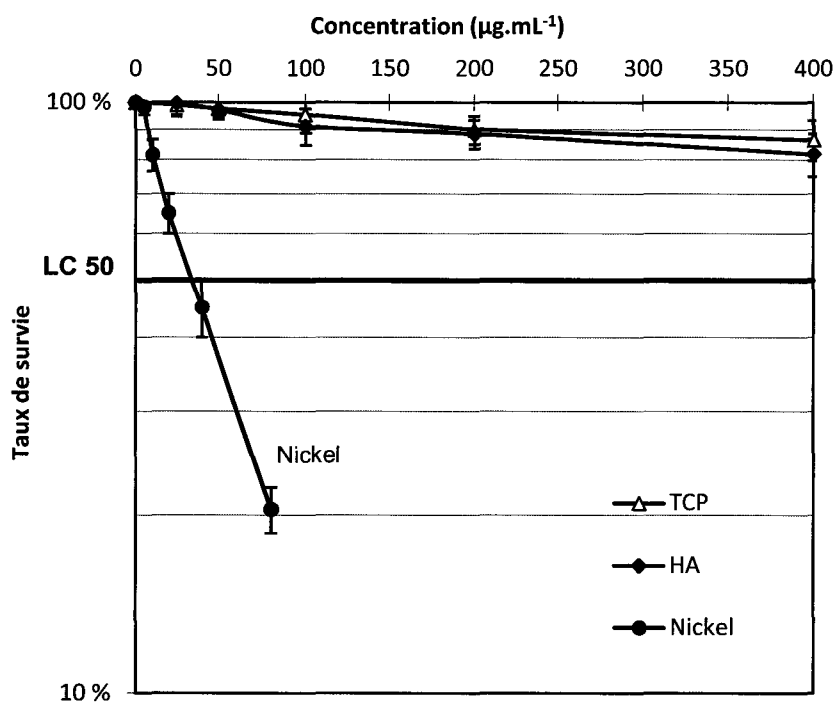


Figure 40 : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre de TCP et d'HA

5.1.1.5. Discussion

Le principal atout de ce test est de fournir des résultats spécifiques de la cytotoxicité du produit testé sans dépendre de l'architecture ou de l'état de surface des échantillons. En effet, la poudre fine n'induit pas une rugosité ou d'autres facteurs pouvant interférer sur le comportement cellulaire. De plus, la taille des poudres est inférieure à 50 μm , comme il est recommandé dans la norme ISO 10993-5/EN 30993-5 [NF 10993], ce qui permet :

- de présenter une surface spécifique plus importante et, par conséquent, de rendre la poudre plus réactive,
- de travailler avec des grains de taille inférieure à 50 μm , susceptibles d'être phagocytés par les cellules autorisant, ainsi, l'accès à une évaluation intracellulaire de la toxicité du matériau,

- de déterminer, dans le cas de substances toxiques, la concentration qui provoque la mort de 50 % des cellules exposées (LC50).

Les poudres de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite montrent une parfaite cytocompatibilité, avec une survie cellulaire supérieure à 80% même pour de très fortes concentrations de poudre ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Le nickel, quant à lui, montre une cytotoxicité notable avec une LC50 de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, en utilisant les cellules épithéliales.

Ces premiers essais, très encourageants sur le TCP et l'HA pulvérulents synthétisés au laboratoire, nous ont permis d'envisager une étude plus approfondie sur ces biocéramiques. Les composés synthétisés n'étant pas cytotoxiques, nous avons pu envisager de mettre en contact direct le matériau massif avec les cellules cibles : les ostéoblastes.

5.1.2. Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire permet de suivre la croissance cellulaire. Elle a été étudiée par contact direct des cellules MC3T3-E1 avec les échantillons de TCP et l'HA densifiés naturellement.

5.1.2.1. Préparation des échantillons

Les pastilles de TCP et d'HA (diamètre = 15 mm) sont obtenues par coulage en moule de plâtre. Les deux faces de ces pastilles sont rectifiées afin d'obtenir des surfaces rigoureusement planes. Ces échantillons sont, ensuite, densifiés, respectivement, à 1070 et 1200°C permettant de les densifier à 98 % sans porosité ouverte. Une stérilisation à chaud (stérilisateur Poupinel) est, enfin, réalisée à 180°C pendant 2 h.

Ces biomatériaux sont essentiellement utilisés en chirurgie maxillo-faciale, odontologique, oto-laryngologique et orthopédique, c'est pourquoi, il nous a paru indispensable d'utiliser des ostéoblastes comme cellules cibles.

5.1.2.2. Cellules MC3T3 E1

Les cellules MC3T3-E1 subclones 14 (ATCC-CRL 2594) sont des cellules pré-ostéoblastiques embryonnaires de souris. Cette lignée cellulaire est maintenue en survie par des repiquages réguliers dans un mélange de milieux de culture :

- 50 % vol. MEM Alpha Médium avec Glutamax 1 (Gibco) (500 mL) à 10 % vol. de sérum de veau fœtal (Eurobio) décomplémenté (30 minutes à 56°C),
- 50 % vol. DMEM modifié par Dulbecco avec Glutamax 1 (Gibco) (500 mL) à 10 % vol. de sérum de veau nouveau-né (Eurobio) décomplémenté (30 minutes à 56°C).

5.1.2.3. Méthode

Les tests de prolifération sont réalisés dans des boîtes de culture à 24 puits de 15 mm de diamètre (Costar). Les boîtes sont en polystyrène et correspondent aux standards internationaux et européens [NF 10993]. Toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Trois échantillons de chaque matériau sont disposés au fond des puits. L'essai comprend, également, trois témoins positifs constitués par des pastilles de nickel pur et trois témoins négatifs représentés par le fond du puits en polystyrène de la boîte de culture.

Afin d'inoculer, sur nos échantillons, des cellules en phase exponentielle de croissance, nous effectuons un repiquage 48 heures avant le test.

Les cellules sont placées sur les échantillons à une densité de $5700 \text{ cellules.cm}^{-2}$ dans 1 mL de milieu de culture. Elles sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % vol. de CO_2 pendant 3 et 6 jours.

A la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours), les cellules sont détachées des échantillons avec 0,3 mL de trypsine dans la solution de Hank's sans Ca^{2+} et sans Mg^{2+} . Le détachage s'effectue à 37°C pendant 5 min.

Les échantillons sont douchés à l'aide de 0,7 mL d'EDTA (1/5000) pour bien détacher les cellules du matériau. La suspension de 1 mL, ainsi obtenue, est homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur par des opérations aspiration/rejet répétées.

La suspension cellulaire est, alors, comptée dans 8mL d'Isoton à l'aide d'un compteur cellulaire Coulter Z1 (Coultronics). Chaque suspension cellulaire est comptée 3 fois.

5.1.2.4. Résultats

La prolifération cellulaire se caractérise par l'augmentation du nombre et de la taille des cellules. Cette méthode est basée sur le comptage du nombre de cellules après culture directement sur les échantillons testés, ce qui permet d'établir, par rapport aux témoins négatifs, une relative cytotoxicité du matériau étudié.

Les échantillons de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite ont été testés par la méthode de prolifération ou croissance cellulaire en contact direct, à deux temps d'exposition différents : 3 et 6 jours (*Figure 41*). Les témoins négatifs utilisés sont les fonds de boîte. Le taux de prolifération relative obtenu pour les différents échantillons est exprimé en % par rapport au témoin négatif.

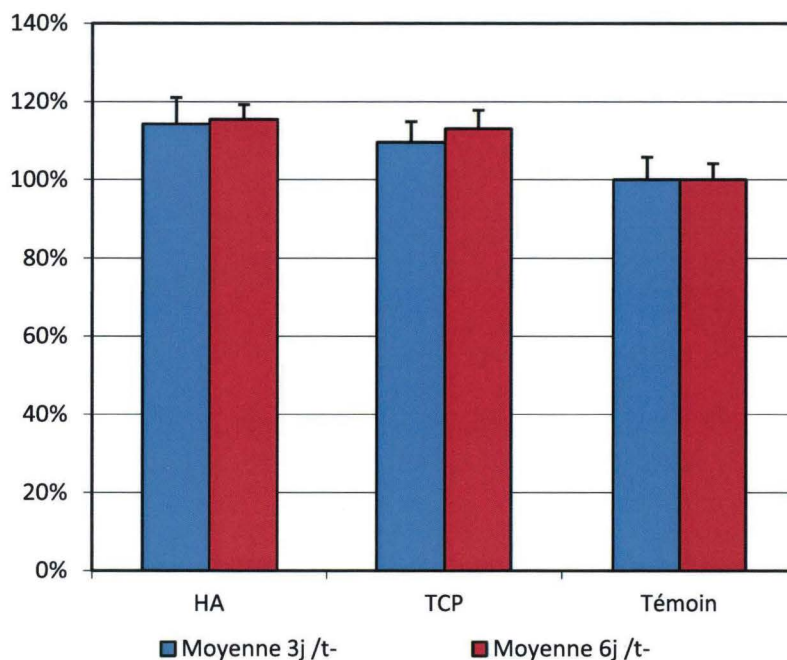


Figure 41 : Prolifération relative de cellules MC3T3-E1 en contact direct avec les pastilles de TCP et d'HA

Les résultats de proliférations cellulaires montrent une parfaite cytocompatibilité, avec des valeurs de proliférations pour l'HA et le TCP supérieures au témoin, ce qui témoigne d'une très grande affinité cellulaire vis-à-vis de ces supports en phosphate de calcium. De plus, la prolifération à 6 jours est supérieure à celle à 3 jours, ce qui indique une stimulation cellulaire par les biocéramiques synthétisées.

5.1.3. Morphologie et adhésion cellulaires sur le TCP

La morphologie et l'adhésion cellulaires de cellules SaOS-2 ont été étudiées sur du phosphate tricalcique post-densifié ou non afin de vérifier l'innocuité de la HIP. Ces caractéristiques cellulaires sont observées par immunomarquage.

5.1.3.1. Préparation des échantillons

Les deux faces des pastilles de TCP (diamètre = 15 mm), obtenues par coulage en moule de plâtre, sont rectifiées afin d'obtenir des surfaces rigoureusement planes. Deux séries d'échantillons sont densifiées. La première série par frittage naturel à 1070°C, la densité obtenue est de 99,2 %, cette série est notée TCP99, la deuxième série par préfrittage à 1000°C puis post-HIP à 1000°C, cette série présente une densité supérieure ou égale à 99,9 %, elle est

notée TCP100. Ces deux séries sont exemptes de porosités ouvertes. Une stérilisation à chaud (stérilisateur Poupinel) est, enfin, réalisée à 180°C pendant 2 h.

5.1.3.2. Cellules SaOS-2

Dans cette étude, la lignée cellulaire SaOS-2, cellules issues d'un ostéosarcome humain, a été utilisée. Les cellules sont mises en culture dans le milieu McCoy's (Eurobio, France) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (Eurobio, France), 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine (Eurobio, France). Les cellules sont maintenues à 37°C sous une atmosphère humide composée de 95 % d'air et de 5 % de CO₂. Dès confluence, les cellules sont détachées par trypsinisation avec 0,25 % de trypsine et 0,02 % d'EDTA, pH 7,2. Après trypsinisation, 4.10⁴ cellules SaOS-2 ont étéensemencées sur chaque échantillon dans une plaque 24 puits.

5.1.3.3. L'immunomarquage

En immunofluorescence, les antigènes sont détectés en utilisant des anticorps marqués avec des fluorochromes. La méthode choisie pour traiter la préparation cellulaire est fonction des caractéristiques de l'antigène étudié et de sa localisation, en surface ou à l'intérieur de la cellule. L'immunofluorescence est une technique couramment utilisée qui, en plus de sa forte sensibilité, est rapide et simple. La détection d'un antigène intracellulaire exige que l'antigène soit accessible à l'anticorps. Ceci est possible soit en sectionnant la cellule, soit en endommageant la membrane par fixation ou séchage.

La fluorescéine émet dans le jaune-vert et la rhodamine envoie une émission dans le rouge, ces deux fluorochromes sont les plus utilisés. Les structures cellulaires ayant fixé ces anticorps fluorescents sont, ainsi, détectables et ont l'aspect de taches brillantes, colorées en vert ou en rouge, le fond de la préparation étant noir.

5.1.3.4. Morphologie du cytosquelette par marquage de l'actine

Les fibres d'actine sont les filaments constitutifs du cytosquelette des cellules osseuses. Elles s'organisent en fibres de stress qui donnent la forme allongée à la cellule. Ces filaments sont observés par microscopie par marquage fluorescent à la phalloïdine fluorescéine isothiocyanate (phalloïdine-FITC). Leur forme permet de déterminer l'étalement de la cellule sur le substrat et, ainsi, caractériser la souffrance ou la bonne santé d'une cellule.

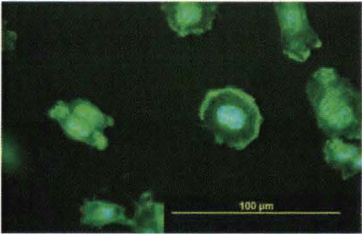
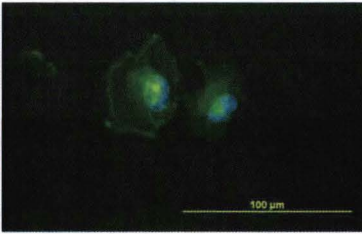
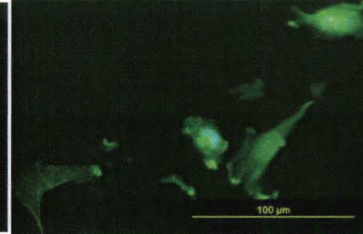
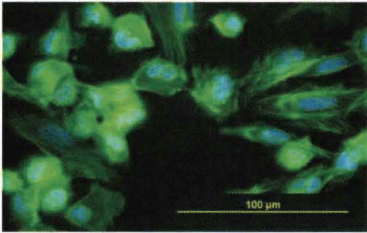
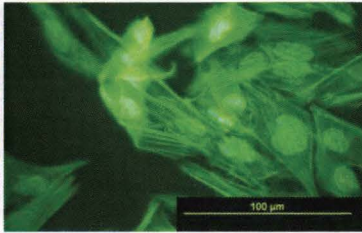
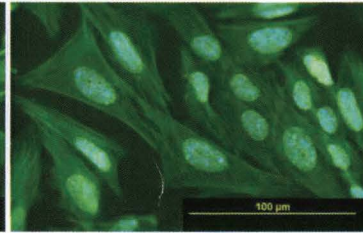
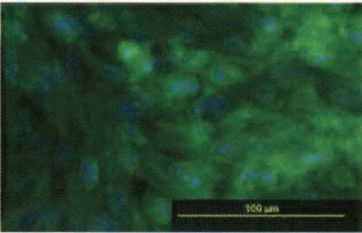
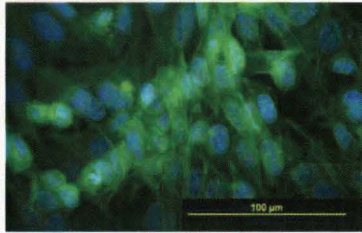
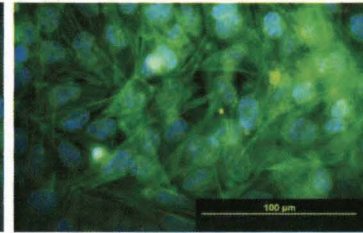
- Méthode

Les cellules sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 2 % (Sigma, France) à température ambiante pendant 30 minutes. Après plusieurs lavages au PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, France), les membranes cellulaires sont perméabilisées dans une solution de PBS - Triton à 0,2 % (Sigma), pendant 15 minutes. Après rinçage, la préparation est incubée pendant 20 minutes dans une solution de PBS - BSA à 1 % (Sérum Albumine Bovine, fraction V, Sigma) afin de neutraliser certains sites antigéniques non spécifiques puis les échantillons sont rincés à nouveau dans du PBS.

Après ces étapes, les cellules sont incubées avec les marqueurs fluorescents FITC-phalloïdine ($0,4 \text{ pg.mL}^{-1}$, Sigma, France) pendant 1 h à température ambiante. Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées avec une solution DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole) à 100 ng.mL^{-1} pendant 20 minutes à température ambiante. Le DAPI est une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN permettant ainsi de détecter le noyau. Les échantillons sont, ensuite, observés à l'aide d'un microscope Olympus BX 51 à fluorescence (Olympus, France).

- Résultats

Les fibres d'actine ont été observées, par microscopie optique, 15 h, 4 jours et 7 jours après ensemencement sur le verre (témoin) ainsi que sur les phosphates tricalciques β denses à 99 et près de 100 % (*Tableau 24*).

Temps après ensemencement	Verre	TCP 99	TCP 100
15 h			
4 jours			
7 jours			

*Tableau 24 : Observation des fibres d'actine sur le verre et sur les phosphates tricalciques denses à 99 % et à près de 100 %
15 h, 4 jours et 7 jours après ensemencement*

Après 15 h de culture, les cellules SaOS-2 semblent avoir un développement identique quelque soit le support TCP 99 ou TCP 100. 4 jours après ensemencement, les fibres d'actine présentent une organisation différente sur les deux céramiques par rapport au témoin. Elles sont plus étalées. A 7 jours, il y a confluence des cellules SaOS-2 en surface des phosphates tricalciques.

De manière générale, les fibres d'actine sont mieux organisées sur les échantillons TCP 99 et TCP 100 que sur le témoin.

Le phosphate tricalcique synthétisé au laboratoire permet aux fibres d'actine de s'organiser sur le support. Le traitement thermique de post-densification ne semble pas avoir eu d'impact sur l'organisation de ces fibres.

5.1.3.5. Adhésion cellulaire par immunomarquage de la vinculine

L'évaluation de l'adhésion cellulaire a été réalisée par immunomarquage de la vinculine, une des protéines composant les points focaux. Du côté intracellulaire, les intégrines (dimères $\alpha\beta$), protéines transmembranaires, attachées à la matrice extracellulaire, sont connectées indirectement aux fibres d'actine *via* un système complexe de protéines, parmi lesquelles on peut signaler la taline, la vinculine et l' α -actinine. Ces protéines relient ainsi les signaux de l'extérieur de la cellule vers le noyau qui, à son tour, initie l'expression des différents gènes qui représentent la réponse cellulaire pouvant alors être négative (forme cellulaire ronde, faible adhérence ou détachement cellulaire, pas ou peu de synthèse de matrice extracellulaire, mort cellulaire) ou positive (étalement cellulaire, bonne adhérence au substrat, synthèse de la matrice extracellulaire). Toutes ces protéines sont particulièrement concentrées dans les zones d'ancrage au substrat appelées points focaux (Figure 42) [CAL 05]. C'est à leur niveau que s'accrochent les fibres d'actine qui maintiennent la forme aplatie de la cellule.

La vinculine est un composant clé des points focaux qui peut être facilement visualisé à l'aide d'un immunomarquage en utilisant le marqueur vinculine-TRITC (tétraméthyl-rhodamine isothiocyanate). Il a été démontré qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la vinculine et l'étalement cellulaire.

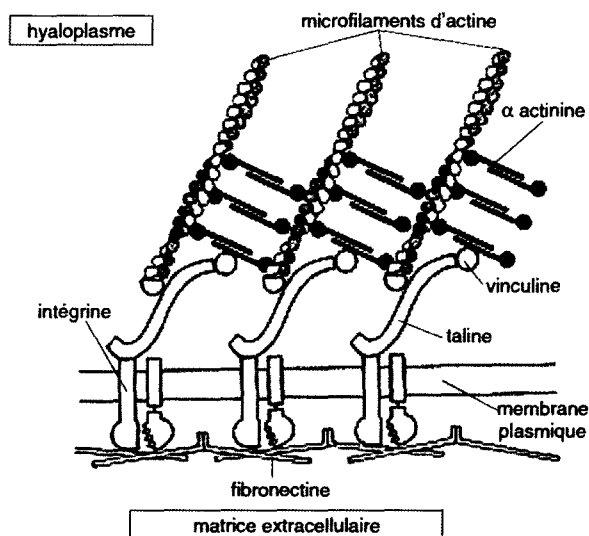


Figure 42 : Organisation des points focaux [CAL 05]

- Méthode

Les cellules sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde à 2 % (Sigma, France) à température ambiante pendant 30 minutes. Après plusieurs lavages au PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, France), les membranes cellulaires sont perméabilisées dans une solution de PBS - Triton à 0,2 % (Sigma), pendant 15 minutes. Après rinçage, la préparation est incubée pendant 20 minutes dans une solution de PBS - BSA à 1 % (Sérum Albumine Bovine, fraction V, Sigma) afin de neutraliser certains sites antigéniques non spécifiques puis, les échantillons sont rincés à nouveau dans du PBS. L'anticorps anti-vinculine (anticorps

monoclonal anti-vinculine de poulet produit chez la souris, Sigma) dilué au 1/50^{ème} marqué au TRITC est déposé, les cellules sont, ensuite, mises à incuber pendant 1 heure à température ambiante. Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées avec une solution DAPI à 100 ng.mL⁻¹ pendant 20 minutes à température ambiante. Les échantillons sont, ensuite, observés par microscopie à fluorescence.

- Résultats

L'expression de la vinculine a été observée sur le TCP 99, le TCP100 et sur le verre (témoin) en fonction du temps après ensemencement afin de quantifier les points focaux et, ainsi d'apprécier l'étalement cellulaire (*Tableau 25*).

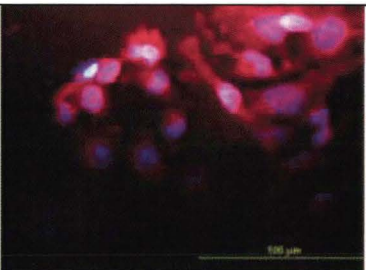
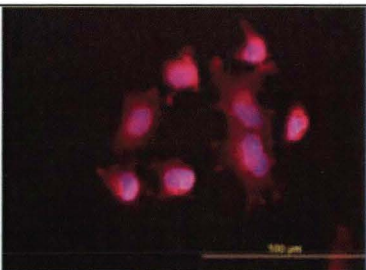
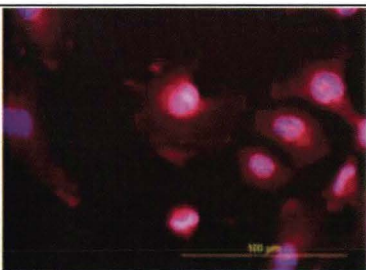
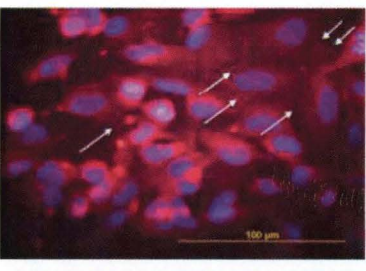
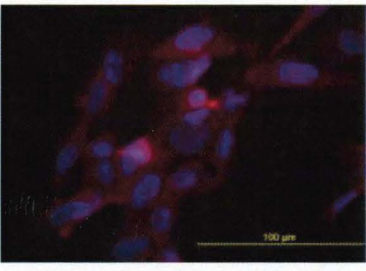
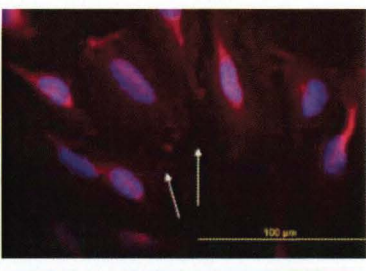
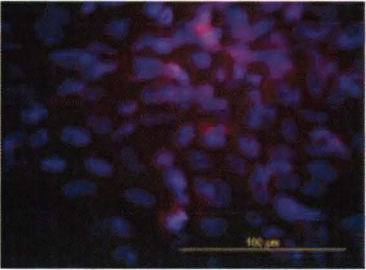
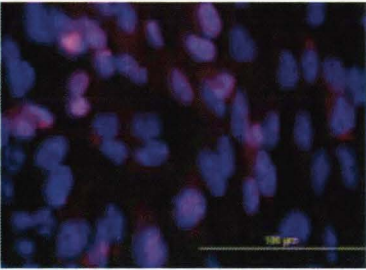
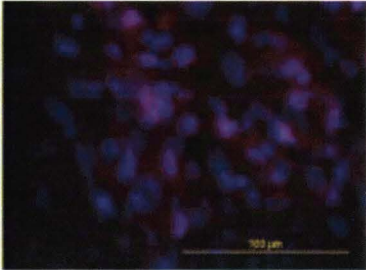
Temps après ensemencement	Verre	TCP 99	TCP 100
15 h			
4 jours			
7 jours			

Tableau 25 : Expression de la vinculine sur le verre et sur les phosphates tricalques denses à 99 % et à près de 100 % 15 h, 4 jours et 7 jours après ensemencement

Après 15 h, les points focaux sont présents mais peu nombreux sur les deux phosphates tricalciques étudiés. 4 jours après ensemencement, l'expression de la vinculine est plus prononcée et les points focaux se distinguent nettement et sont plus nombreux qu'après 15 h. A 7 jours, les points focaux sont difficilement observables car il y a confluence et le nombre croissant de noyaux masque les attaches focales. Il n'apparaît pas de différences notables d'adhésion cellulaire selon que le phosphate tricalcique ait été densifié naturellement ou par post-HIP.

Nos biocéramiques étant non cytotoxiques, leur fonctionnalisation a, ainsi, pu être mise en œuvre par différentes voies.

5.2. Fonctionnalisation du phosphate tricalcique

Les travaux réalisés sur la synthèse des poudres de phosphates de calcium, sur la mise en forme et la densification nous permettent une parfaite maîtrise du matériau quant à sa fonctionnalisation.

Au niveau curatif, les phosphates de calcium sont utilisés en comblement osseux. Cependant, en cas d'infection ou d'attaque bactérienne après la greffe chez un patient, les traitements par voie orale ou par injection présentent une efficacité réduite car l'os est peu vascularisé.

La fonctionnalisation des phosphates de calcium se fait, donc, dans un objectif de prophylaxie, c'est-à-dire afin de prévenir les infections et les attaques bactériennes.

Dans notre étude, nous avons suivi deux axes de fonctionnalisation de nos matériaux :

- soit par dopage en agents chimiques de la structure microporeuse des céramiques : les agents pouvant être des antibiotiques, des anticancéreux (antimitotiques) ou des facteurs de croissance de façon à orienter la prolifération ou la différenciation cellulaire en fonction de l'application visée.

- soit par dopage en agents biologiques tels que les phages directement ciblés vers une bactérie définie ou en "cocktail" pour un traitement plus large et une meilleure efficacité. Le fait d'utiliser des phages lytiques modifiés génétiquement permet de cibler une bactérie et de la détruire sans engendrer de mutation génétique non souhaitée. La phagothérapie est, donc, une arme permettant de lutter contre les maladies nosocomiales, là où les antibiotiques montrent leurs limites. Cependant cette thérapie est encore peu utilisée en Occident.

5.2.1. La fonctionnalisation chimique : les antibiotiques

La fonctionnalisation par des antibiotiques permet de disposer de biomatériaux capables d'induire une réponse antibactérienne après implantation du substitut osseux dans le corps humain.

La gentamicine (*Figure 43*) est un antibiotique de la famille des aminoglycosides utilisé pour traiter divers types d'infections bactériennes, en particulier celles provoquées par des bactéries à Gram-négatif. Cette molécule est utilisée régulièrement en prophylaxie des infections post-opératoires et en prophylaxie médicale. La gentamicine agit en se liant à l'ARN ribosomique au site A du ribosome bactérien, qui est le site de décodage des codons de l'ARN messager. La fixation de la gentamicine augmente fortement le taux d'erreur de lecture par le ribosome, ce qui provoque la synthèse de protéines anormales, dont l'accumulation est létale pour la cellule.

La gentamicine est encore très efficace en antibiothérapie chez l'homme.

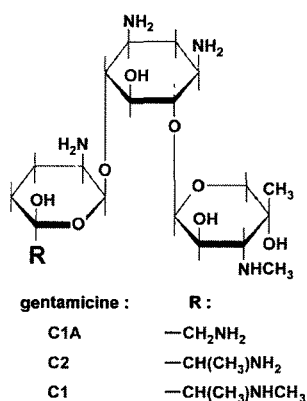


Figure 43 : Molécule de gentamicine

<http://www.123bio.net>

Lors de l'implantation de biomatériaux tels que le phosphate tricalcique dans le corps humain et dans un objectif de prophylaxie, il serait intéressant, pour un chirurgien, de disposer d'un implant fonctionnalisé avec un antibiotique à large spectre afin que l'action de cette molécule soit mieux ciblée.

Le principe de notre étude est, donc, d'imprégner de gentamicine du phosphate tricalcique présentant des taux variables de microporosité et d'évaluer, par spectroscopie UV-visible, le relargage de cet antibiotique au cours du temps en fonction de la porosité et du milieu de relargage.

5.2.1.1. Echantillons

La fonctionnalisation par la gentamicine est réalisée sur du phosphate tricalcique stœchiométrique en fonction de la porosité ouverte de ce dernier. Le TCP se présente sous forme de pastilles de 15 mm de diamètre obtenues par coulage en moule de plâtre. Les deux faces de ces pastilles sont rectifiées afin d'obtenir des surfaces rigoureusement planes. Des variations de la température de frittage de cette biocéramique (*Tableau 26*) ont permis de disposer d'une gamme de matériaux présentant des taux de porosité ouverte PO variant de 0 à 31 %.

Echantillons	T _{frittage} (°C)	d _r (%)	PO (%)
TCP 0	1100	99,4	0,0
TCP 10	980	90,7	9,6
TCP 20	950	80,8	18,8
TCP 30	900	68,9	31,1

Tableau 26 : Taux de porosité ouverte du phosphate tricalcique en fonction du traitement thermique appliqué

Une stérilisation à chaud (stérilisateur Poupinel) des échantillons est, enfin, réalisée à 180°C pendant 2 h. Le relargage est étudié dans trois milieux d'immersion : l'eau, le SBF (Simulated Body Fluid) réalisé selon le protocole de Kokubo [KOK 06] et le PBS (Sigma).

5.2.1.2. Relargage

Dans un premier temps, les pastilles de TCP sont imprégnées de gentamicine. L'imprégnation se fait, naturellement, à l'aide d'une solution de gentamicine Panpharma (présentée en ampoule de 2 mL fermée à la flamme) à une concentration $C_{\text{gentamicine}}$ de 40 mg.mL⁻¹ pendant 30 min. Les pastilles, ainsi imprégnées, sont rincées à l'eau puis placées dans 50 mL d'eau à 37°C. L'absorbance variant proportionnellement avec la concentration en gentamicine, le relargage de cette dernière et, donc sa concentration dans le milieu d'étude, est suivi, en fonction du temps, par spectroscopie UV-visible (spectrophotomètre SHIMADZU UV-2500 PC) à une longueur d'onde de 255 nm (l'absorbance étant relevée à l'aide du logiciel UV-Prob 2.21).

A cette longueur d'onde, une droite d'étalonnage reliant l'absorbance et la concentration en antibiotique (en solution dans l'eau) a été tracée (*Figure 44*).

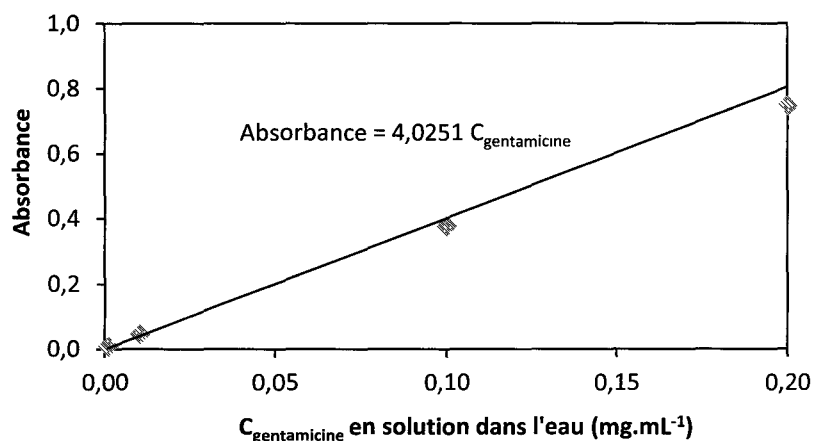


Figure 44 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en gentamicine en solution dans l'eau

Le relargage de la gentamicine ainsi que l'étalonnage ont, également, été étudiés dans le SBF et le PBS afin de vérifier l'influence de la nature du milieu. La Figure 45 présente le relargage de la gentamicine dans l'eau pour du phosphate tricalcique exhibant des taux de porosités ouvertes variant de 0 à 31 %.

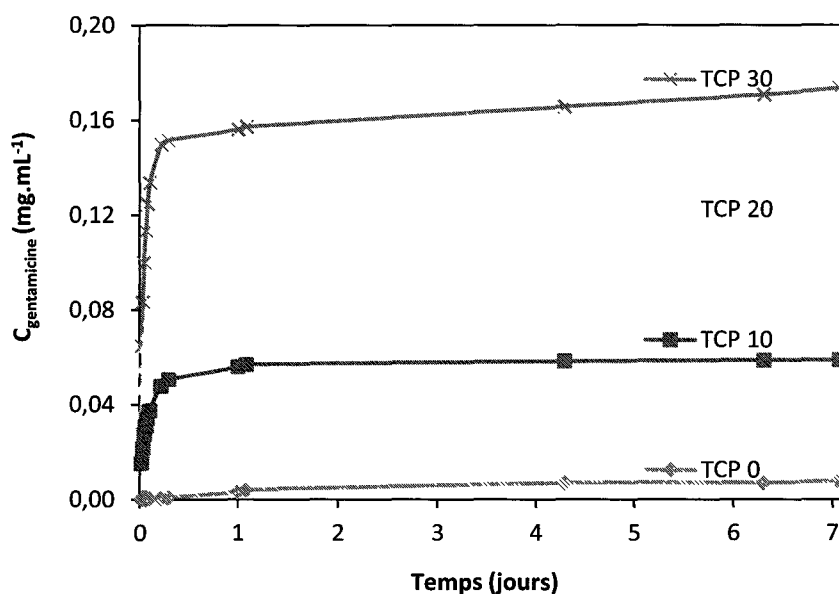


Figure 45 : Relargage de la gentamicine dans l'eau pour du TCP présentant différents taux de porosités ouvertes

La Figure 46 illustre l'évolution du relargage de la gentamicine pour du TCP à 30 % de porosité ouverte pour différents milieux d'étude : eau, PBS et SBF.

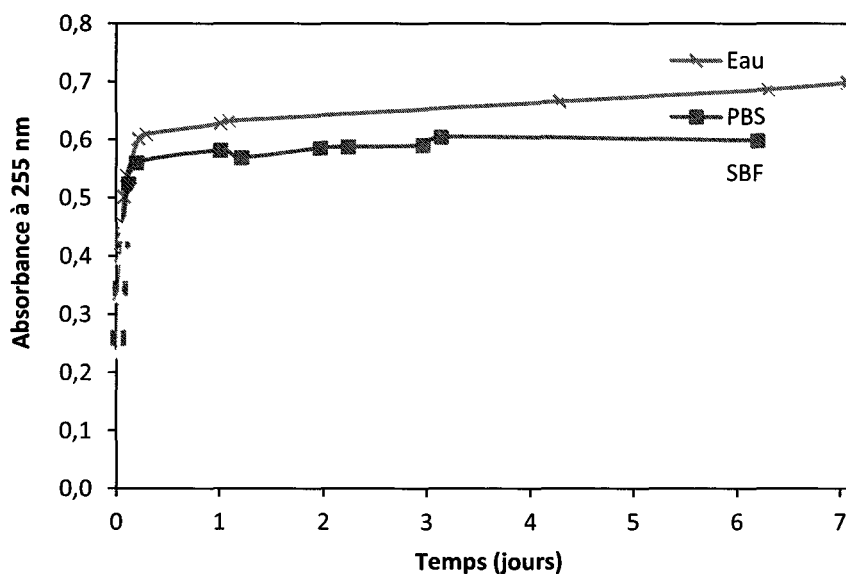


Figure 46 : Relargage de la gentamicine pour du TCP 30 dans différents milieux d'étude

Nous constatons (Figure 45) que la quantité de gentamicine augmente avec le taux de porosité. Le taux de porosité sera, donc, un paramètre permettant de contrôler la charge d'antibiotique à délivrer chez le patient. De plus, il est à noter (Figure 46) que la nature du milieu influence la cinétique de relargage en fonction de la force ionique de la solution.

En effet, Liu *et al.* [LIU 09] ont constaté ce même phénomène en étudiant le relargage de la gentamicine dans le PBS sur des échantillons de silicate de calcium. Ils expliquent que la présence d'ions phosphate dans le PBS induit la formation d'une couche d'apatite en surface du silicate de calcium formant une barrière physique qui ralentit le relargage de la gentamicine dans le milieu. Par contre, l'eau ne contenant pas d'ions phosphate, la couche d'apatite ne se forme pas en surface des céramiques. Le taux de relargage de la gentamicine dans le PBS (et le SBF contenant également des ions phosphate) est plus faible dans les milieux phosphatés que dans l'eau.

5.2.1.3. Contact direct (antibiogramme par diffusion)

La réalisation d'un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un antibiotique. Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence de l'antibiotique et d'observer les conséquences sur le développement et la survie de celles-ci. On peut, par exemple, placer plusieurs pastilles imbibées d'antibiotique sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri. On évalue l'efficacité de l'antibiotique selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique.

Nous utiliserons cette technique pour vérifier l'efficacité de la fonctionnalisation par antibiotique dans la structure poreuse de la céramique.

Comme cette méthode est utilisée pour les mycobactéries à croissance rapide, nous avons choisi pour ce test une bactérie non pathogène : *Escherichia Coli* K12 A324 (thi, pro) cultivée en milieu liquide sous agitation à 160 rpm et à 37°C.

La préparation des boîtes de culture est réalisée avec le milieu Luria Bertani (LB) de composition : Bactotryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, QSP 1 L H₂O, Agar 15 g.L⁻¹.

Après coulage et séchage des milieux dans les boîtes de culture, l'ensemencement des bactéries sur toute la surface des boîtes de culture est réalisé. On laisse reposer quelques instants puis les pastilles sont déposées à la surface du milieu de culture. Les boîtes sont mises en étuve (Binder, Modèle : APT line C150) à 37°C pendant 24 h.

Chaque pastille diffuse l'antibiotique dans la gélose et génère un gradient de concentrations autour de la pastille. La zone d'inhibition observée après incubation est proportionnelle à la concentration initiale qu'il y avait dans la pastille. Lors de la lecture, on relève, alors, les diamètres des zones d'inhibitions.

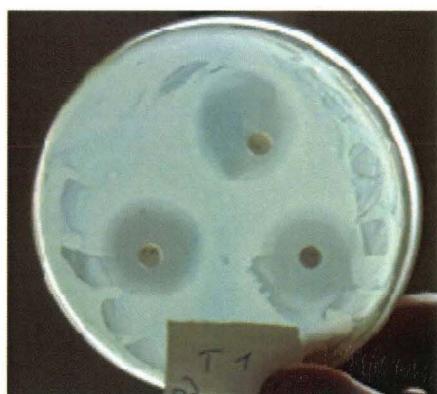


Figure 47 : Antibiogramme avec des pastilles TCP 30
rincées pendant 1 jour

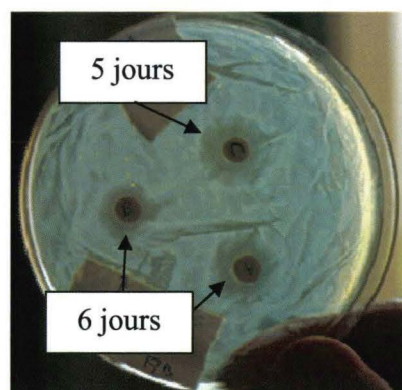


Figure 48 : Antibiogramme avec des pastilles TCP 30
rincées pendant 5 et 6 jours

Nous pouvons constater l'efficacité de cette fonctionnalisation sur des pastilles à 30 % de porosité ayant subi des temps de rinçage d'un jour (Figure 47) puis 5 et 6 jours (Figure 48).

5.2.2. La fonctionnalisation par des agents biologiques : les phages

5.2.2.1. Phages

Les phages (ou bactériophages) sont des virus n'infectant que des bactéries. On les appelle également virus bactériens. Les bactériophages sont présents dans l'ensemble de la biosphère mais en quantité plus importante dans les excréments, les sols et les eaux.

Les phages (*Figure 49*) sont constitués d'une enveloppe protéique externe (appelée capside) protégeant le matériel génétique (ADN ou ARN). Pour plus de 95 % des phages connus, ce matériel est une molécule d'ADN double-brin et leur taille varie de 24 à 200 nm.

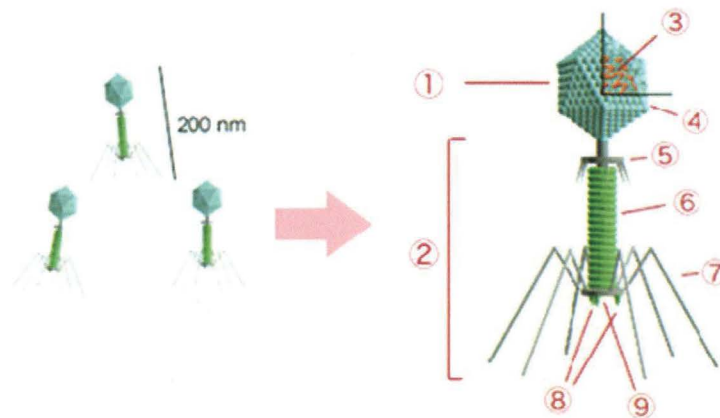


Figure 49 : Structure d'un bactériophage (1 : tête, 2 : queue, 3 : acide nucléique, 4 : capside, 5 : col, 6 : enveloppe, 7 : queue de fibres, 8 : pointes, 9 : base)

Les phages sont, en général, très spécifiques et ne peuvent infecter qu'une seule espèce de bactérie. Ceci est lié à leur mécanisme de pénétration dans la cellule bactérienne : les phages reconnaissent une protéine spécifique de la surface bactérienne, leur récepteur leur permet de s'accrocher et d'injecter leur matériel génétique. Ce récepteur varie d'un phage à l'autre et dépend de l'espèce bactérienne ciblée. Le cycle de réplication des phages dans la cellule peut suivre plusieurs schémas :

- certains phages sont virulents ou lytiques : dès l'infection de la cellule, la réplication démarre et de nouveaux virions sont assemblés et produits. Dans un court laps de temps, des protéines virales provoquent la lyse de la cellule hôte et la libération de nombreux nouveaux phages,

- d'autres phages (appelés phages tempérés) peuvent demeurer dans un état quiescent en intégrant leur matériel génétique à l'ADN de la bactérie. On parle, alors, de provirus ou de prophage, c'est-à-dire un virus dont le matériel génétique est intégré au génome de l'hôte. Ces phages endogènes sont copiés à chaque division cellulaire avec

l'ensemble de l'ADN de la bactérie. Pendant cette phase de latence, l'expression des gènes codés par le génome du phage est, en général, réprimée par une protéine répresseur. Dans certaines conditions, en particulier en cas de carence ou de stress, le prophage sort de son état quiescent et active son cycle répliatif. Il s'excise du génome de l'hôte et entre dans un cycle lytique, comme décrit ci-dessus,

- enfin, d'autres phages ne provoquent pas la lyse de la cellule infectée, mais bourgeonnent à la membrane bactérienne, sans la rompre. C'est le cas des phages filamenteux comme M13 ou *φ1* d'*Escherichia Coli*. La cellule infectée devient, alors, une usine à produire du phage de manière continue.

La phagothérapie est l'utilisation de phages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Ce traitement a été, largement, utilisé dans le monde avant la découverte des antibiotiques. Bien qu'elle ait été progressivement abandonnée par les pays occidentaux séduits par les avantages de l'antibiothérapie, la phagothérapie traditionnelle est toujours employée et développée dans les pays de l'ancienne Union Soviétique. Mais, depuis environ une décennie, l'utilisation des bactériophages est reconsidérée dans de nombreux pays devant le double constat du développement inquiétant des infections nosocomiales à bactéries multirésistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces. Aujourd'hui, des applications sont envisagées, non seulement, dans le domaine médical mais, aussi, dentaire, vétérinaire, agricole ou environnemental [DUB 09].

Les bactériophages ont été, largement, utilisés par le passé pour lutter contre les bactéries pathogènes dans de très nombreuses infections. Il n'a jamais été signalé d'effets secondaires graves, ce qui n'est pas le cas avec beaucoup d'antibiotiques (allergie aux pénicillines, toxicité des aminosides, ...).

La phagothérapie a une action rapide, quasi immédiate, dès que la bactérie exacte est identifiée et que les phages sont administrés. De plus, les bactériophages sont souvent très spécifiques, ne s'adressant qu'à une seule ou qu'à quelques souches de bactéries. Les phages sont choisis de façon à ne pas nuire aux bactéries utiles comme celles qui sont normalement présentes dans la flore intestinale, sur les muqueuses ou sur la peau, réduisant ainsi les probabilités d'infections opportunistes qui se développent après la sélection de certaines bactéries minoritaires au cours d'une antibiothérapie. Les antibiotiques traditionnels ont, habituellement, un effet plus général, détruisant aussi bien les bactéries nuisibles que les bactéries utiles comme celles qui facilitent la digestion des aliments, ce qui n'est pas sans effet sur le transit intestinal.

La charge de nos biocéramiques phosphocalciques par des phages est, donc, réalisée dans un souci de prophylaxie après implantation dans le corps humain.

Cette fonctionnalisation par des phages est réalisée sur des pastilles de TCP de 6 et 15 mm de diamètre qui sont élaborées selon le même mode opératoire que pour la fonctionnalisation chimique.

5.2.2.2. Méthode et résultats

Escherichia coli K12 (A324) sensible aux phages λ est la souche bactérienne qui est utilisée dans cette étude. Les bactéries ont été cultivées à 37°C sous agitation à 170 rpm dans le milieu Luria Bertani (LB) de composition : Bactotryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, QSP 1 Litre H₂O, Agar 15 g.L⁻¹.

Le phage λ vir est un phage lytique génétiquement modifié dont les solutions mères sont préparées par infection de la bactérie *E. coli* [JAC 54]. Les pastilles de TCP sont incubées pendant 24 h dans 5 mL de solution mère de phage λ vir puis sont, rapidement, rincées une fois dans le milieu LB afin de retirer l'excès de la solution de phages.

L'efficacité antibactérienne de ces matériaux, ainsi chargés par des virus, est vérifiée par deux techniques : en voie solide et en voie liquide.

Pour les tests solides, les pastilles de TCP de différentes porosités chargées en phage λ sont rincées dans 30 mL de milieu LB à 37°C sous agitation (170 rpm). Le milieu LB est renouvelé à 3, 6, 18, 24 et 48 h. Les bactéries *E. coli* K12 sont étalées, de manière homogène avec 3 mL de R-Top medium sur des boîtes de Pétri contenant une gélose d'agar dans le milieu LB (Bactotrypton 10 g.L⁻¹, Yeast extract 1 g.L⁻¹, NaCl 8 g.L⁻¹ et Agar 8 g.L⁻¹). Afin de faciliter la diffusion des phages λ , les pastilles de TCP chargées en phages λ (pastilles de 6 mm de diamètre) sont déposées dans les boîtes d'agar avant solidification du milieu R-Top. La lyse des bactéries est mesurée selon la méthode standard en mesurant le disque de diffusion [BIE 97]. Après 48 h d'incubation à 37°C, les plages de lyse sont mesurées et définies comme le diamètre total de plage de lyse incluant l'échantillon.

La *Figure 50* montre les plages de lyse formées autour des pastilles de TCP imprégnées de phages λ .

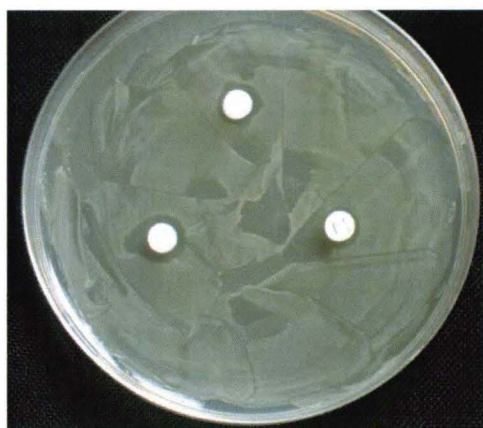


Figure 50 : Plages de lyse autour du TCP chargé en phages λ après 48h de rinçage

La Figure 51 montre la capacité de relargage des échantillons de TCP chargés en phages, en fonction de leur microporosité et du temps de rinçage. Pour tous les échantillons, la libération de phages est quasi constante pour les 6 premières heures en temps de rinçage. A 18 heures et jusqu'à 48 heures de temps de rinçage, le diamètre de lyse diminue régulièrement jusqu'à 50 % pour chaque échantillon. Ces résultats suggèrent que les échantillons de TCP sont capables de retenir les phages et de les relarguer après plusieurs jours, et ce même si la céramique est totalement dense.

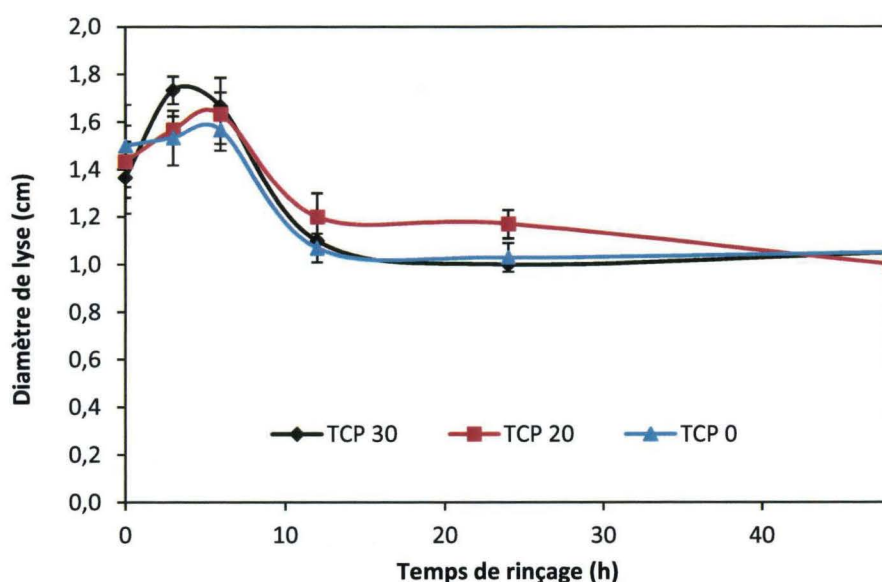


Figure 51 : Diamètre des plages de lyses en fonction du temps de rinçage et du taux de porosité du TCP

Pour les tests liquides, les bactéries sont mises en culture dans le LB à 37°C. La croissance bactérienne est mesurée par densité optique à 620 nm. *E. coli* K12 (A324) est mise en culture dans 30 mL de milieu LB à 37°C sous agitation avec une densité optique de 0,03. Les pastilles de TCP (de 15 mm de diamètre) imprégnées de phages λ sont ajoutées dans les tubes de culture lorsque la densité optique atteint 0,12. La croissance bactérienne est suivie jusqu'à la lyse complète des bactéries ou jusqu'à l'apparition d'une phase stationnaire.

La Figure 52 représente l'efficacité des pastilles imprégnées de phages λ sur la lyse bactérienne en fonction de la microporosité des échantillons. Les témoins sont notés T TCP et sont des pastilles, non imprégnées par des phages, de TCP de microporosité donnée.

Les pastilles imprégnées par les phages λ sont ajoutées après le temps nécessaire à la formation de deux générations de bactéries et la lyse bactérienne débute environ 2h30 plus tard.

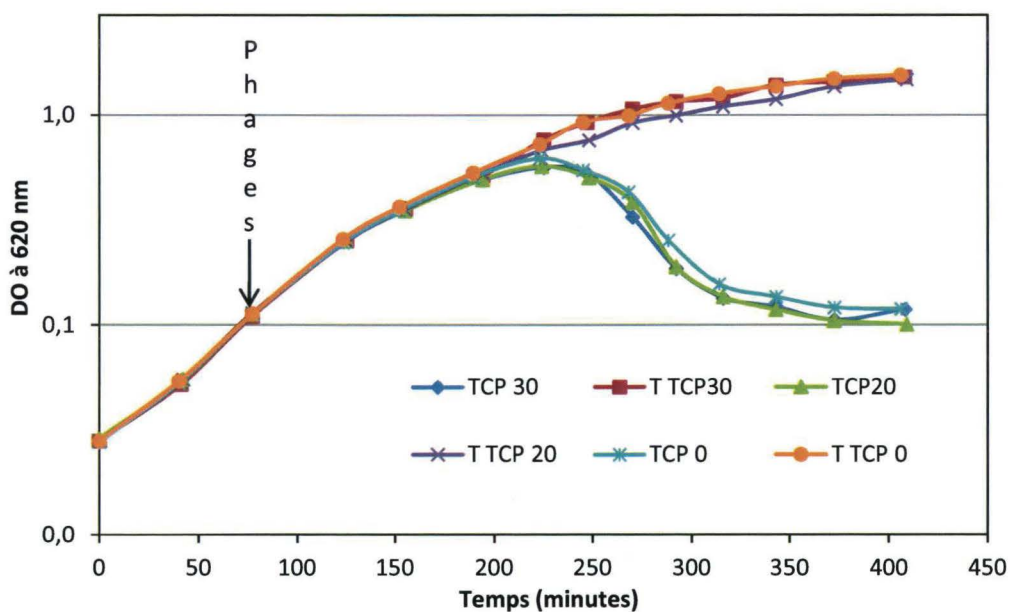


Figure 52 : Cinétiques de croissance bactérienne mesurées par densité optique à 620 nm en fonction du taux de porosité du TCP chargé en phages

En début d'essai, la densité optique augmente du fait de la prolifération bactérienne. A une DO de 0,12, les pastilles de TCP imprégnées de phages λ vir sont introduites dans le milieu, cependant, la prolifération ne diminue pas instantanément. Ce n'est qu'à partir d'environ 220 min, que la densité optique diminue en raison de la lyse bactérienne par les phages. En effet, les phages lytiques infectent la bactérie dont ils sont spécifiques, provoquent l'implosion de la cellule hôte et la libération de nouveaux phages.

5.3. Conclusion

L'évaluation biologique de nos matériaux a permis de constater que :

- nos poudres de phosphate tricalcique et d'hydroxyapatite présentent, toutes deux, une parfaite cytocompatibilité démontrée par une survie cellulaire en présence d'une concentration élevée ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) en céramiques pulvérulentes,
- les tests de prolifération cellulaire sur l'HA et sur le TCP denses à 98 % indiquent une très bonne cytocompatibilité avec une stimulation des cellules MC3T3-E1 par les supports phosphocalciques,
- le traitement de post-HIP a peu ou pas d'impact notable sur le développement des ostéoblastes en surfaces des matériaux. En effet, la prolifération des cellules SaOS-2 est peu modifiée sur le TCP 100 par rapport au TCP 99, les fibres d'actine s'organisent de manière identique quelque soit le taux de densification du TCP et l'adhésion cellulaire caractérisée par le marquage des points focaux n'est pas modifiée par le post-traitement.

La fonctionnalisation du phosphate tricalcique permet de disposer de matériels apportant une prophylaxie post-opératoire. Cette fonctionnalisation a suivi deux voies :

- la fonctionnalisation chimique par la gentamicine : l'imprégnation de phosphate tricalcique microporeux par cet antibiotique a montré une action antibactérienne en contact direct ainsi qu'un relargage de cette molécule avec le temps en fonction du milieu d'étude,
- la fonctionnalisation virale par des phages : bien que l'emploi de tels virus modifiés génétiquement ne soit pas très répandu en Occident, les phages ont, ici, montré toute leur efficacité que ce soit en contact direct ou en solution. Cette méthode ouvre, donc, la possibilité d'un traitement contre les maladies nosocomiales et n'engendre aucune résistance bactérienne, les phages utilisés étant trop virulents pour permettre à la bactérie de survivre à son attaque.

6. Conclusion

Cette étude a permis une approche des biocéramiques de phosphates de calcium mono et biphasées dans sa globalité et, en particulier :

- la synthèse, les caractérisations physico-chimiques et l'élaboration (calcination et broyage) de poudres de phosphate tricalcique β , d'hydroxyapatite et de biphasiques TCP-HA,
- la densification par frittage naturel et post-frittage à l'aide du pressage isostatique à chaud,
- la caractérisation mécanique du biomatériau en fonction de sa composition chimique,
- l'évaluation biologique et la fonctionnalisation par des agents chimiques et viraux.

La synthèse des poudres phosphocalciques a été réalisée par précipitation en voie aqueuse. Le contrôle des réactifs, plus particulièrement du rapport Ca/P, a permis de synthétiser les poudres de phosphate tricalcique, d'hydroxyapatite et de composés biphasés TCP-HA en proportions désirées (20, 40, 60 et 80 % d'HA). La maîtrise et la reproductibilité de la synthèse ont permis de couvrir toute une gamme de matériaux biphasiques allant du phosphate tricalcique à l'hydroxyapatite. Ces poudres brutes de synthèse ont été portées à haute température (750-800°C) afin de permettre la formation des composés chimiques définitifs et la réduction des surfaces spécifiques de manière à faciliter la mise en suspension de nos poudres.

Le broyage des poudres, après calcination, a été optimisé pour chaque composition chimique afin d'obtenir des poudres très réactives. Ce traitement a autorisé l'obtention de taux de densification, par frittage naturel à 1130°C, de 99 % pour le TCP et les biphasiques contenant jusqu'à 60 % d'hydroxyapatite et de 98 % pour le biphasique à 80 % d'HA. Cette température de 1130°C est la température de frittage maximale qui évite la transformation de la phase β du TCP vers la phase α . Cette étude a permis de densifier le phosphate tricalcique à basse température, en effet, un frittage mené à 1070°C conduit à l'obtention d'une densité de 99,2 %.

Un post-frittage de nos matériaux mono et biphasés par la technique du pressage isostatique à chaud a conduit à leur densification quasi-totale ($d_r \geq 99,9$ %) et à une modification de leur aspect initial opaque vers un aspect transparent. Cette technique de post-frittage présente, également, l'avantage de favoriser la densification au détriment de la

croissance granulaire. Les densités quasi-parfaites, ainsi obtenues, sont supérieures aux taux de densification rencontrés en littérature.

La caractérisation mécanique du phosphate tricalcique β et de l'hydroxyapatite purs, stœchiométriques et denses à près de 100% et présentant une taille de grains d'environ 0,7 μm a conduit à l'obtention de valeurs intrinsèques pouvant servir de références car ces matériaux ne présentent pas de porosité. Pour le TCP, ces valeurs intrinsèques sont un module d'Young de 105,6 GPa, une dureté Vickers de 5,3 GPa, une ténacité de 1,03 $\text{MPa}\cdot\sqrt{\text{m}}$ et une résistance à la flexion de 173 MPa. Un module d'Young de 122,3 GPa, une dureté Vickers de 6,3 GPa, une ténacité de 0,92 $\text{MPa}\cdot\sqrt{\text{m}}$ et une résistance à la flexion de 110 MPa ont été mesurés sur l'hydroxyapatite. Les compositions entre 20 et 40 % d'hydroxyapatite semblent très prometteuses, elles présentent respectivement une résistance à la flexion (198 MPa) et une ténacité (1,40 $\text{MPa}\cdot\sqrt{\text{m}}$) maximales.

L'évaluation biologique du TCP et de l'HA a démontré leur parfaite cytocompatibilité ainsi que l'innocuité du traitement de post-HIP sur le développement d'ostéoblastes.

Dans un objectif de prophylaxie, le phosphate tricalcique, présentant différents taux de microporosité obtenus par variation de la température de frittage, a été fonctionnalisé avec des agents de type chimique tel qu'un antibiotique (gentamicine) et de type viral tels que des phages lytiques. Le TCP imprégné d'antibiotique présente une propriété antibactérienne et le relargage de la gentamicine est fonction du taux de microporosité du substrat et du milieu de environnement. Une fonctionnalisation par d'autres antibiotiques ainsi que par des antimétabolites peut être envisagée. En effet, le relargage d'une molécule anticancéreuse au plus près d'une tumeur (cancer des os) permettrait de cibler localement l'action du produit qui est toxique pour l'organisme.

Les phages imprégnant le phosphate tricalcique, également, microporeux occasionnent la lyse d'*Escherichia Coli*. Ces virus modifiés génétiquement ont montré toute leur efficacité et semblent ouvrir des voies intéressantes pour la lutte bactérienne.

Il est envisagé de réaliser une fonctionnalisation par des cocktails de phages afin de cibler un grand nombre de bactéries, ces bactéries seront des bactéries pathogènes multirésistantes comme le staphylocoque doré ainsi que les maladies nosocomiales.

La fonctionnalisation de l'hydroxyapatite et des biphasiques sera, également, à considérer. Des essais d'imprégnation – relargage d'antibiotiques et de phages sur l'hydroxyapatite donnent des résultats similaires à ceux obtenus sur le phosphate tricalcique.

Parallèlement aux effets bactéricides des antibiotiques et des phages, il est envisagé, en perspective de ces travaux, de fonctionnaliser nos biocéramiques par des ions métalliques spécifiques. En effet, le cuivre, le zinc et l'argent sont connus pour leurs propriétés bactéricides. Utilisés comme dopants, ils présentent des effets prophylactiques significatifs, après implantation du biomatériau.

Les premières synthèses de TCP dopé à l'argent ont été réalisées et sont en cours de caractérisation. La suite de l'étude va consister à élaborer des massifs à partir de ces poudres et d'évaluer, par des tests biologiques, l'impact bactéricide de ces biocéramiques dopées.

7. Bibliographie

A

- [ACC 08] : W. ACCHAR, E.G. RAMALHO,
"Effect of MnO₂ addition on sintering behavior of tricalcium phosphate: Preliminary results",
 Materials Science and Engineering, C 28, 2008, pp. 248-252.
- [AKA 84] : M. AKAO, N. MIURA, H. AOKI,
"Fracture toughness of sintered hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate",
 Yogyo-Kyokai-Shi, 92, 1984, pp. 672-674.
- [APE 03] : R. APETZ, M.P.B. VAN BRUGGEN,
"Transparent alumina: a light-scattering model",
 Journal of the American Ceramic Society, 86, 2003, pp. 480-486.
- [ASM 01] : M. ASMANI, C. KERMEL, A. LERICHE, M. OURAK,
"Influence of porosity on Young's modulus and Poisson's ratio in alumina ceramics",
 Journal of the European Ceramic Society, 21, 2001, pp. 1081-1086.
- [AZA 09] : M. AZAR,
"Mise en forme et frittage des poudres de céramiques nanostructurées : Cas d'une alumine de transition",
 Thèse de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 2009.

B

- [BAN 10] : S.S. BANERJEE, S. TARAFDER, N.M. DAVIES, A. BANDYOPADHYAY, S. BOSE,
"Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics",
 Acta Biomaterialia, 6, 2010, pp. 4167-4174.
- [BEN 03] : C. BENAQQA,
"Etude de la propagation sous critique de fissures dans les phosphates de calcium : Cas de l'hydroxyapatite et du phosphate tri-calcique",
 Thèse de l'INSA, Lyon, 2003.
- [BEN 05] : C. BENAQQA, J. CHEVALIER, M. SAËDAOUI, G. FANTOZZI,
"Slow crack growth behavior of hydroxyapatite ceramics"
 Biomaterials, 26, 2005, pp. 6106-6112.
- [BEN 06] : F. BEN AYED, K. CHAARI, J. BOUAZIZ, K. BOUZOUTA,
"Frittage du phosphate tricalcique",
 Comptes Rendus Physique, 7, 2006, pp. 825-835.
- [BER 93a] : D. BERNACHE-ASSOLLANT,
"Les biocéramiques : élaborations et propriétés",
 L'Industrie Céramique et Verrière, n°883, 6/93, pp. 421-436.
- [BER 93b] : D. BERNACHE-ASSOLLANT,
"Chimie-physique du frittage",
 Forceram, Paris, 1993.

- [BOU 96] : J.M. BOULER, M. TRECANT, J. DELECRIN, J. ROYER, N. PASSUTI, G. DACLUSI,
"Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength",
 Journal of Biomedical Materials Research, 32, 1996, pp. 603-609.
- [BRO 10] : O. BROWN, M. MC AFEE, S. CLARKE, F. BUCHANAN,
"Sintering of biphasic calcium phosphates",
 Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21, 2010, pp. 2271-2279.
- [BUS 91] : D. BUSER, R.K. SCHENK, S. STEINEMANN, J.P. FIORELLINI, C.H. FOX, H. STICH,
"Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs",
 Journal of Biomedical Materials Research, 25, 1991, pp. 889-902.

C

- [CAC 11] : I. CACCIOTTI, A. BIANCO,
"High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation",
 Ceramics International, 37, 2011, pp. 127-137.
- [CAL 05] : J.C. CALLEN,
"Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes",
 Editions Dunod, 2005.
- [CHA 93] : T. CHARTIER, A. BRUNEAU,
"Aqueous tape casting of alumina substrates",
 Journal of the European Ceramic Society, 12, 1993, pp. 243-247.
- [CHA 07] : F. CHAI, J.C. HORNEZ, C. NEUT, N. BLANCHEMAIN, M. DESCAMPS, H.F. HILDEBRAND,
"Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics",
 Biomolecular Engineering, 24, 2007, pp. 510-514.
- [CHA 11] : A. CHAUDHRY, H. YAN, K. GONG, F. INAM, G. VIOLA, M.J. REECE, J.B.M. GOODALL, I.U. REHMAN, F.K. MCNEIL-WATSON, J.C.W. CORBETT, J.C. KNOWLES, J.A. DARR,
"High-strength nanograined and translucent hydroxyapatite monoliths via continuous hydrothermal synthesis and optimized spark plasma sintering",
 Acta Biomaterialia, 7, 2011, pp. 791-799.
- [CHE 00] : I.W. CHEN, X.H. WANG,
"Sintering dense nanocrystalline ceramics without final-stage grain growth",
 Nature, 404, 2000, pp. 168-171.
- [CHE 08] : B. CHEN, Z. ZHANG, J. ZHANG, Q. LIN, D. JIANG,
"Fabrication and mechanical properties of β -TCP pieces by gel-casting method",
 Materials Science and Engineering, C 28, 2008, pp. 1052-1056.

- [CHE 09] : B.H. CHEN, K.I. CHEN, M.L. HO, H.N. CHEN, W.C. CHEN, C.K. WANG,
"Synthesis of calcium phosphates and porous hydroxyapatite beads prepared by emulsion method",
 Materials Chemistry and Physics, 113, 2009, pp. 365-371.
- [CHO 07] : D. CHOI, P. KUMTA,
"Mechano-chemical synthesis and characterization of nanostructured β -TCP powder",
 Materials Science and Engineering C, 27, 2007, pp. 377-381.

D

- [DAC 89] : G. DACULSI, R. Z. LEGEROS, E. NERY, K. LYNCH, B. KEREBEL,
"Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: Ultrastructural and physicochemical characterization",
 Journal of Biomedical Materials Research, 23, 1989, pp. 883-894.
- [DES 03] : A. DESTAINVILLE, E. CHAMPION, D. BERNACHE-ASSOLLANT, E. LABORDE,
"Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate",
 Materials Chemistry and Physics, 80, 2003, pp. 269-277.
- [DES 07] : M. DESCAMPS, J.C. HORNEZ, A. LERICHE,
"Effects of powder stoichiometry on the sintering of β -tricalcium phosphate",
 Journal of the European Ceramic Society, 27, 2007, pp. 2401-2406.
- [DES 08a] : M. DESCAMPS, O. RICHART, P. HARDOUIN, J.C. HORNEZ, A. LERICHE,
"Synthesis of macroporous β -tricalcium phosphate with controlled porous architectural",
 Ceramics International, 34, 2008, pp. 1131-1137.
- [DES 08b] : M. DESCAMPS, T. DUHOO, F. MONCHAU, J. LU, P. HARDOUIN, J.C. HORNEZ, A. LERICHE,
"Manufacture of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramics",
 Journal of the European Ceramic Society, 28, 2008, pp. 149-157.
- [DIC 74] : B. DICKENS, L.W. SCHROEDER, W.E. BROWN,
"Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. I. The crystal structure of pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ",
 Journal of Solid State Chemistry, 10, 1974, pp. 232-248.
- [DJO 08] : M.S. DJOŠIĆ, V.B. MIŠKOVIĆ-STANKOVIĆ, S. MILONJIĆ, Z.M. KAČAREVIĆ-POPOVIĆ, N. BIBIĆ, J. STOJANOVIĆ,
"Electrochemical synthesis and characterization of hydroxyapatite powders",
 Materials Chemistry and Physics, 111, 2008, pp. 137-142.
- [DOU 11] : N. DOUARD, R. DETSCH, R. CHOTARD-GHODSNIA, C. DAMIA, U. DEISINGER, E. CHAMPION,
"Processing, physic-chemical characterization and in-vitro evaluation of silicon containing β -tricalcium phosphate ceramics",
 Materials Science and Engineering C, 31, 2011, pp. 531-539.
- [DUB 08] : A. DUBLANCHET, E. FRUCIANO,
"A short history of phage therapy"
 Médecine et maladies infectieuses, 38, 2008, pp. 415-420.

- [DUB 09] : A. DUBLANCHET,
"Des virus pour combattre les infections - La phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques",
Editions Favre, 2009.

E

- [ELL 94] : J.C. ELLIOTT
"Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates",
Elsevier, 1994.
- [END 05] : R. ENDERLE, F. GÖTZ-NEUNHOEFFER, M. GÖBBELS, F.A. MÜLLER, P. GREIL,
"Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of β -TCP ceramics examined by Rietveld refinement",
Biomaterials, 26, 2005, pp. 3379-3384.
- [ERI 11] : M. ERIKSSON, Y. LIU, J. HU, L. GAO, M. NYGREN, Z. SHEN,
"Transparent hydroxyapatite ceramics with nanograin structure prepared by high pressure spark plasma sintering at the minimized sintering temperature",
Journal of the European Ceramic Society, 31, 2011, pp. 1533-1540.

F

- [FAM 94] : R. FAMERY, N. RICHARD, P. BOCH,
"Preparation of α and β -TCP ceramics with and without magnesium addition",
Ceramics International, 20, 1994, pp. 327-336.
- [FEL 09] : B.H. FELLAH, P. LAYROLLE,
"Sol-gel synthesis and characterization of macroporous calcium phosphate bioceramics containing microporosity",
Acta Biomaterialia, 5, 2009, pp. 735-742.
- [FIS 83] : G.R. FISCHER, P. BARDHAN, J.E. GEIGER,
"The lattice thermal expansion of hydroxyapatite",
Journal of Materials Science Letters, 2, 1983, pp. 577-578.

G

- [GAL 98] : A. GALLUR,
"Etude comparative de deux procédés d'élaboration des biocéramiques phosphocalciques macroporeuses",
Thèse de l'Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis, 1998.
- [GAU 98] : O. GAUTHIER, J.M. BOULER, E. AGUADO, P. PILET, G. DACULSI,
"Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth",
Biomaterials, 19, 1998, pp. 133-139.

- [GIB 00] : I.R. GIBSON, I. REHMAN, S.M. BEST, W. BONFIELD,
"Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate",
 Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 11, 2000, pp. 533-539.
- [GRO 92] : B. GROESSNER-SCHREIBER , R. TUAN,
"Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro",
 Journal of Cell Science, 101, 1992, pp. 209-217.
- [GU 02] : Y.W. GU, N.H. LOH, K.A. KHOR, S.B. TOR, P. CHEANG,
"Spark plasma sintering of hydroxyapatite powders",
 Biomaterials, 23, 2002, pp. 37-43.

H

- [HAL 51] : E.O. HALL,
 Proceedings of the Royal Society, B 64, 1951, pp. 474.
- [HAU 05] : J.M. HAUSONNE, J.L. BARTON, P. BOWEN, C.P. CARRY,
"Céramiques et verre",
 Presse polytechniques et universitaires romandes, 2005.
- [HE 08] : L.H. HE, O. STANDARD, T. HUANG, B. LATELLA, M. SWAIN,
"Mechanical behavior of porous hydroxyapatite",
 Acta Biomaterialia, 4, 2008, pp. 577-586.
- [HEN 88] : L. L. HENCH,
"Bioactive materials: The potential for tissue regeneration",
 Society for Biomaterials 24th Annual Meeting, San Diego, April 22-26, 1988, pp. 511-517.
- [HEU 77] : J.C. HEUGHEBAERT,
"Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques",
 Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 1977.
- [HIL 90] : H.F. HILDEBRAND, M. COLLYN-D'HOOGHE, P. SHIRALI, C. BAILLY, J.P. KERCKAERT,
"Uptake and biological transformation of β NiS and α Ni₃S₂ by human embryonic pulmonary epithelial cells (L132) in culture",
 Carcinogenesis, 11, 1990, pp. 1943-1950.
- [HIL 96] : H.F. HILDEBRAND, I. FLOQUET, A. LEFEVRE, C. VERON,
"Biological and hepatotoxic effects of palladium. An overview on experimental investigations and personal studies",
 The International Journal of Risk and Safety in Medicine, 8, 1996, pp. 149-167.
- [HIR 82] : K. HIROTA, Y.T. HASEGAWA, H. MONMA,
"Densification of hydroxyapatite by hot isostatic pressing",
 Yogyo Kyokaishi, 90, 1982, pp. 680-682.

- [HOR 02] : J.C. HORNEZ, A. LEFEVRE, D. JOLY, H.F. HILDEBRAND,
"Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals",
 Biomolecular Engineering, 19, 2002, pp. 103-118.
- [HOR 07] : J.C. HORNEZ, F. CHAI, F. MONCHAU, N. BLANCHEMAIN, M. DESCAMPS,
 H.F. HILDEBRAND.
"Biological and physico-chemical assessment of hydroxyapatite (HA) with different porosity",
 Biomolecular Engineering, 24, 2007, pp. 505-509.

J

- [JAC 54] : F. JACOB, E.L. WOLLMAN,
"Induction spontanée du développement du bacteriophage λ au cours de la recombinaison génétique, chez E. coli K-12",
 Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 239, 1954, pp. 317-319.
- [JAR 76] : M. JARCHO, C.H. BOLEN, M.B. THOMAS, J. BOBICK, J.F. KAY, R.H. DOREMUS,
"Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form",
 Journal of Materials Science, 11, 1976, pp. 2027-2035.
- [JAR 79] : M. JARCHO, R.L. SALSBUURY, M.B. THOMAS, R.H. DOREMUS,
"Synthesis and fabrication of β -tricalcium phosphate (whitlockite) ceramics for potential prosthetic applications",
 Journal of Materials Science, 14, 1979, pp. 142-150.
- [JAR 81] : M. JARCHO,
"Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics",
 Clinical Orthopaedics and Related Research, 157, 1981, pp. 259-278.
- [JUA 96] : H.Y. JUANG, M.H. HON,
"Effect of calcination on sintering of hydroxyapatite",
 Biomaterials, 17, 1996, pp. 2059-2064.
- [JUA 97] : H.Y. JUANG, M.H. HON,
"The effect of calcinations temperature on the behavior of HA powder for injection moulding",
 Ceramics International, 23, 1997, pp. 383-387.
- [JUN 06] : Y.K. JUN, S.H. HONG,
"Effect of co-precipitation on the low-temperature sintering of biphasic calcium phosphate",
 Journal of the American Ceramic Society, 89, 2006, pp. 2295-2297.

K

- [KAN 05] : S. KANNAN, J.H.G. ROCHA, J.M.G. VENTURA, A.F. LEMOS, J.M.F. FERREIRA,
"Effect of Ca/P ratio of precursors on the formation of different calcium apatitic ceramics - An X-ray diffraction study",
 Scripta Materialia, 53, 2005, pp. 1259-1262.

- [KAN 07] : S. KANNAN, J.M. VENTURA, J.M.F. FERREIRA,
"Aqueous precipitation method for the formation of Mg-stabilized β -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction study",
 Ceramics International, 33, 2007, pp. 637-641.
- [KAN 08] : S. KANNAN, J.M.G. VENTURA, A.F. LAMOS, A. BARBA, J.M.F. FERREIRA,
"Effect of sodium addition on the preparation of hydroxyapatites and biphasic ceramics",
 Ceramics International, 34, 2008, pp. 7-13.
- [KAW 04] : D. KAWAGOE, K. IOKU, H. FUJIMORI, S. GOTO,
"Transparent β -tricalcium phosphate ceramics prepared by spark plasma sintering",
 Journal of the Ceramic Society of Japan, 112, 2004, pp. 462-463.
- [KHO 08] : J.K. KHONGWAR, K.R. KANNAN, G. BUVANESWARI,
"Synthesis and characterization of bulk and coatings of hydroxyapatite using methanol precursor",
 Materials Research Bulletin, 43, 2008, pp. 418-424.
- [KIM 07] : D.S. KIM, J.H. LEE, R.J. SUNG, S.W. KIM, H.S. KIM, J.S. PARK,
"Improvement of translucency in Al_2O_3 ceramics by two-step sintering technique",
 Journal of the European Ceramic Society, 27, 2007, pp. 3629-3632.
- [KIR 90] : C.J. KIRKPATRICK, C. MITTERMAYER,
"Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro",
 Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1, 1990, pp. 9-13.
- [KLE 84] : C.P.A.T. KLEIN,
"Interaction of bio-degradable β -whitlockite ceramics with bone tissue. An in-vivo tissue",
 Journal of Biomedical Materials Research, 18, 1984, pp. 845-859.
- [KON 89] : I. KONDOH, N. TAMARI, M. KINOSHITA,
"Sintering of tricalcium phosphate by HIP",
 Journal of the Ceramic Society of Japan, 97, 1989, pp. 965-967.
- [KOI 76] : M. KOIZUMI, K. KODAIRA, Y. ISHITOBI, M. SHIMADA, F. KANAMARU,
"Fabrication of translucent ceramics by isostatic hot-pressing",
 Ceramurgia International, 2, 1976, pp. 67-71.
- [KOK 06] : T. KOKUBO, H. TAKADAMA,
"How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?",
 Biomaterials, 27, 2006, pp. 2907-2915.
- [KRE 09] : A. KRELL, T. HUTZLER, J. KIMKLE,
"Transmission physics and consequences for materials selection, manufacturing, and applications",
 Journal of the European Ceramic Society, 29, 2009, pp. 207-221.
- [KÜB 99] : J. KÜBLER,
"Fracture toughness of Ceramics using the SEVNB Method: Round Robin",
 Vamas Report n°37, 1999.

- [KWO 03] : S.H. KWON, Y.K. JUN, S.H. HONG, H.E. KIM,
"Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders",
 Journal of the European Ceramic Society, 23, 2003, pp. 1039-1045.

L

- [LAA 10] : S. LAASRI, M. TAHA, A. LAGHZIZIL, E.K. HLIL, J. CHEVALIER,
"The affect of densification and deshydroxylation on the mechanical properties of stoichiometric hydroxyapatite bioceramics",
 Material Research Bulletin, 45, 2010, pp. 1433-1437.
- [LAN 00] : E. LANDI, A. TAMPIERI, G. CELOTTI, S. SPRIO,
"Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxyapatites",
 Journal of the European Ceramic Society, 20, 2000, pp. 2377-2387.
- [LEF 95] : A. LE FAOU, S. BERLAND, F. LALLIER, E. LOPEZ,
"Osteoinductive effects induced by nacre implanted in subcutaneous pouches in rat",
 Calcified Tissue International, 56 (suppl. A), 1995, pp. 461.
- [LEG 03] : R.Z. LEGEROS, S. LIN, R. ROHANIZADEH, D. MIJARES, J.P. LEGEROS,
"Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications",
 Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 14, 2003, pp. 201-209.
- [LI 90] : J. LI, L. HERMANSSON,
"Mechanical evaluation of hot isostatically pressed hydroxylapatite"
 Interceram, 39, 1990, pp. 13-15.
- [LIN 98] : F.H. LIN, C.J. LIAO, K.S. CHEN, J.S. SUN,
"Preparation of high-temperature stabilized β -tricalcium phosphate by heating deficient hydroxyapatite with $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ addition",
 Biomaterials, 19, 1998, pp. 1101-1107.
- [LIN 07] : K. LIN, J. CHANG, J. LU, W. WU, Y. ZENG,
"Properties of β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bioceramics prepared using nano-size powders",
 Ceramics International, 33, 2007, pp. 979-985.
- [LIU 09] : W. LIU, J. CHANG,
"In vitro evaluation of gentamicin release from a bioactive tricalcium silicate bone cement",
 Materials Science and Engineering C, 29, 2009, pp. 2486-2492.
- [LUK 11] : M. LUKIĆ, Z. STOJANOVIĆ, S.D. ŠKAPIN, M. MAČEK-KRŽMANC, M. MITRIĆ, S. MARKOVIĆ, D. USKOKOVIĆ,
"Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering",
 Journal of the European Ceramic Society, 31, 2011, pp. 19-27.

M

- [MA 09] : S. MA, W.Q. QUEK, Q.F. LI, Y.F. ZHANG, J.Y.H. FUH, L. LU,
"Sintering of translucent alumina",
 Journal of Materials Processing Technology, 209, 2009, pp. 4711-4715.

- [MAI 90] : D. MAINARD, J.P. DELAGOUTTE, G. WEPIERRE,
"Les substituts de l'os : possibilités actuelles",
 Actualités en biomatériaux, vol. 1, 1990, éd. Romillat.
- [MAZ 09] : M. MAZAHERI, M. HAGHIGHATZADEH, A.M. ZAHEDI, S.K. SADRNEZHAAD,
"Effect of a novel sintering process on mechanical properties of hydroxyapatites ceramics",
 Journal of Alloys and Compounds, 471, 2009, pp. 180-184.
- [MON 71] : E.A. MONROE, W. VOTAVA, D.B. BASS, J. MC MULLEN,
"New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants",
 Journal of Dental Research, 50, 1971, pp. 860-861.
- [MON 80] : G. MONTEL, G. BONEL, J.C. TROMBE, J.C. HEUGHEBAERT, C. REY,
"Progrès dans le domaine de la chimie des composés phosphores solides à structure d'apatite. Application à la biologie et au traitement des minerais",
 Pure and Applied Chemistry, 52, 1980, pp. 973-987.
- [MUR 00] : G. MURALITHRAN, S. RAMESH,
"The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite",
 Ceramics International, 20, 2000, pp. 221-230.

N

- [NAK 90] : S. NAKAMURA, R. OTSUKA, H. OAKI, M. AKAO, N. MIURA,
"Thermal expansion of hydroxyapatite- β -tricalcium phosphate ceramics",
 Thermochimica Acta, 165, 1990, pp. 57-72.
- [NER 92] : E.B. NERY, R.Z. LEGEROS, K.L. LYNCH, K. LEE,
"Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects",
 Journal of Periodontology, 63, 1992, pp. 729-735.

O

- [OMO 06] : M. OMORI, T. ONOKI, T. HASHIDA, A. OKUBO, Y. MURAKAMI,
"Low temperature synthesis of hydroxyapatite from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ based on effect of the spark plasma system (SPS)",
 Ceramics International, 32, 2006, pp. 617-621.

P

- [PEA 88] : B.S. PEARSON, R.J. KLEBE, B.D. BOYAN, D. MOSKOWICZ,
"Comments on clinical application of fibronectin in dentistry",
 Journal of Dental Research, 67, 1988, pp. 515-517.
- [PET 53] : N.J. PETCH,
"The cleavage strength of polycrystals"
 The Journal of the Iron and Steel Institute, 174, 1953, pp. 25-28.

- [PON 89] : C.B. PONTON, D.R. RAWLINGS,
"Vickers indentation fracture toughness test Part 1 Review of literature and formulation of standardized indentation toughness equations",
 Materials Science and Technology, 5, 1989, pp. 865-872.
- [PRO 09] : C. PROMDEJ, V. PAVARAJARN, S. WADA, T. WASANAPIARNPONG, T. CHARINPANITKUL,
"Effect of hot isostatically pressed sintering on microstructure of translucent alumina compact",
 Current Applied Physics, 9, 2009, pp. 960-966.
- [PUC 55] : T.T. PUCK, P.I. MARKUS,
"A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X irradiated cells to supply conditioning factors ",
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 41, 1955, pp. 432-437.

R

- [RAM 12] : S. RAMESH, C.Y. TAN, R. TOLOUEI, M. AMIRIYAN, J. PURBOLAKSONO, I. SOPYAN, W.D. TENG,
"Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes",
 Materials and Design, 34, 2012, pp. 148-154.
- [RAO 97] : R.R. RAO, H.N. ROOPA, T.S. KANNAN,
"Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP- β -TCP composite ceramic powders",
 Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 8, 1997, pp. 511-518.
- [RAV 92] : A. RAVAGLIOLI, A. KRAJEWSKI,
"Bioceramics materials properties applications",
 Chapman and Hall, London, 1992.
- [RAY 99] : S. RAYNAUD,
"Synthèse frittage et propriétés mécaniques de phosphates de calcium dans le système hydroxyapatite - phosphate tricalcique",
 Thèse de l'Université de Limoges, 1999.
- [RAY 01] : S. RAYNAUD, E. CHAMPION, D. BERNACHE-ASSOLLANT, J. LAVAL,
"Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry",
 Journal of the American Ceramic Society, 84, 2001, pp 355-366.
- [RAY 02a] : S. RAYNAUD, E. CHAMPION, D. BERNACHE-ASSOLLANT,
"Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering",
 Biomaterials, 23, 2002, pp. 1073-1080.
- [RAY 02b] : S. RAYNAUD, E. CHAMPION, J.P. LAFON, D. BERNACHE-ASSOLLANT,
"Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio III. Mechanical properties and degradation in solution of hot pressed ceramics",
 Biomaterials, 23, 2002, pp. 1081-1089.

- [RIC 98] : O. RICHART,
"Les substituts osseux en hydroxyapatite : nouveau procédé de fabrication de pièces macroporeuses à gradient de porosité",
 Thèse de l'Université de Valenciennes, 1998.
- [RUY 95] : A.J. RUYS, M. WEY, C.C. SORRELL, M.R. DICKSON, A. BRANDWOOD, B. K. MILTHORPE,
"Sintering effects on the strength of hydroxyapatite",
 Biomaterials, 16, 1995, pp. 409-415.
- [RYU 02] : H.S. RYU, H.J. YOUN, K.S. HONG, B.S. CHANG, C.K. LEE, S.S. CHUNG,
"An improvement in sintering property of β -tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate",
 Biomaterials, 23, 2002, pp. 909-914.
- [RYU 04] : H.S. RYU, K.S. HONG, J.K. LEE, D.J. KIM, J.H. LEE, B.S. CHANG, D.H. LEE, C.K. LEE, S.S. CHUNG,
"Magnesia-doped HA/ β -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility",
 Biomaterials, 25, 2004, pp. 393-401.

S

- [SAB 09] : S. SABER-SAMANDARI, K.A. GROSS,
"Micromechanical properties of single crystal hydroxyapatite by nanoindentation",
 Acta Biomaterialia, 5, 2009, pp. 2206-2212.
- [SCH 94] : G. SCHNEIDER, K. BURRIDGE,
"Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrat",
 Experimental Cell Research, 214, 1994, pp. 264-269.
- [SEE 08] : Z. SEELEY, A. BANDYOPADHYAY, S. BOSE,
"Tricalcium phosphate based resorbable ceramics : influence of NaF and Cao additions",
 Materials Science and Engineering C, 28, 2008, pp. 11-17.
- [SER 01] : S. SERRAJ, P. BOUDEVILLE, B. PAUVERT, A. TEROL,
"Effect on composition of dry mechanical grinding of calcium phosphate mixtures",
 Journal of Biomedical Materials Research, 55, 2001, pp. 566-575.
- [SHI 08] : T. SHIOTA, M. SHIBATA, K. YASUDA, Y. MATSUO,
"Influence of β -tricalcium phosphate dispersion on mechanical properties of hydroxyapatite ceramics",
 Journal of the Ceramic Society of Japan, 116, 2008, pp. 1002-1005.
- [ŚLÓ 99] : A. ŚLÓŚARCZYK, J. PIEKARCZYK,
"Ceramic materials on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate",
 Ceramics International, 25, 1999, pp. 561-565.
- [SON 11] : J. SONG, Y. LIU, Y. ZHANG, L. JIAO,
"Mechanical properties of hydroxyapatite ceramics sintered from powders with different morphologies",
 Materials Science and Engineering A, 528, 2011, pp. 5421-5427.

- [SUC 97] : W. SUCHANEK, M. YASHIMA, M. KAKIHANA et al,
"Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives",
Biomaterials, 18, 1997, pp. 923-933.

T

- [TAB 51] : D. TABOR,
"Hardness of metals",
Oxford University Press, 1951.
- [TAK 96] : K. TAKIKAWA, M. AKAO,
"Fabrication of transparent hydroxyapatite and application to bone marrow derived cell/hydroxyapatite interaction observation in-vivo",
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 7, 1996, pp. 439-445.
- [THA 02] : N. THANGAMANI, K. CHINNAKALI, F.D. GNANAM,
"The effect of powder processing on densification, microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite",
Ceramics International, 28, 2002, pp. 355-362.

U

- [UEM 89] : K. UEMATSU, M. TAKAGI, T. HONDA, N. UCHIDA, K. SAITO,
"Transparent hydroxyapatite prepared by hot isostatic pressing of filter cake",
Journal of the American Ceramic Society, 72, 1989, pp. 1476-1478.

V

- [VAN 95] : P. VAN LANDUYT, F. LI, J.P. KEUSTERMANS et al,
"The influence of high sintering temperatures on the mechanical properties of hydroxyapatite",
Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 6, 1995, pp. 8-13.
- [VEL 09] : D. VELJOVIĆ, B. JOKIĆ, R. PETROVIĆ, E. PALCEVSKIS, A. DINDUNE, I.N. MIHAILESCU, D. JANAČKOVIĆ,
"Processing of dense nanostructured HAP ceramics by sintering and hot pressing",
Ceramics International, 35, 2009, pp. 1407-1413.
- [VEL 10] : D. VELJOVIĆ, I. ZALITE, E. PALCEVSKIS, I. SMICIKLAS, R. PETROVIĆ, D. JANAČKOVIĆ,
"Microwave sintering of fine grained HAP and HAP/TCP bioceramics",
Ceramics International, 36, 2010, pp. 595-603.
- [VER 95] : C. VERON, M. CHANAVAZ, J. FERRI, M. DONAZZAN, H. F. HILDEBRAND,
"A panorama of current materials for osseous application in maxillofacial surgery and oral implantology",
Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale, 96, 1995, pp. 274-281.
- [VIJ 02] : S. VIJAYAN, H. VARMA,
"Microwave sintering of nanosized hydroxyapatite powder compacts",
Materials Letters, 56, 2002, pp. 827-831.

- [VIS 08] : B. VISWANATH, R. RAGHAVAN, N.P. GURAO, U. RAMAMURTY, N. RAVISHANKAR,
"Mechanical properties of tricalcium phosphate single crystals grown by molten salt synthesis",
Acta Biomaterialia, 4, 2008, pp. 1448-1454.

W

- [WEL 61] : J.H. WELCH, W. GUTT,
"High-temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide",
Journal of the Chemical Society, 1961, pp. 4442-4444.

X

- [XIO 06] : Y. XIONG, Z.Y. FU, H. WANG,
"Microstructural effects on the transmittance of translucent AlN ceramics by SPS",
Materials Science and Engineering, B 128, 2006, pp. 7-10.

Y

- [YAM 97] : S. YAMADA, D. HEYMANN, J.M. BOULER, G. DACULSI,
"Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios",
Biomaterials, 18, 1997, pp. 1037-1041.
- [YAS 00] : H.Y. YASUDA, S. MAHARA, Y. UMAKOCHI, S. IMAZATO, S. EBISU,
"Microstructure and mechanical property of synthesized hydroxyapatite prepared by colloidal process",
Biomaterials, 21, 2000, pp. 2045-2049.

Z

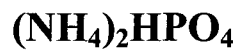
- [ZIA 88] : N.P. ZIATS, K.M. MILLER, J.M. ANDERSON,
"In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials",
Biomaterials, 9, 1988, pp. 5-13.

NORMES

- [NF 94-066] : Norme NF S 94-066,
"Matériaux pour implants chirurgicaux. Détermination quantitative du rapport Ca/P de phosphates de calcium",
Mai 1998.
- [NF 843-1] : Norme NF EN 843-1,
"Céramiques techniques avancées - Propriétés mécaniques des céramiques monolithiques à température ambiante - Partie 1 : détermination de la résistance à la flexion",
Septembre 2007.
- [NF 843-2] : Norme NF EN 843-2,
"Céramiques techniques avancées - Propriétés mécaniques des céramiques monolithiques à température ambiante - Partie 2 : détermination du module de Young, du module de cisaillement et du coefficient de Poisson",
Septembre 2007.
- [NF 10993] : Norme NF EN ISO 10993-5,
"Évaluation biologique des dispositifs médicaux - Partie 5 : essais concernant la cytotoxicité in vitro",
Juillet 2010
- [NF 14425] : Norme NF EN 14425-3,
"Céramiques techniques avancées - Méthode d'essai de détermination de la ténacité à la rupture des céramiques monolithiques - Partie 3 : méthode de l'éprouvette à entaille en chevron",
Août 2010.
- [ASTM E112] : Norme ASTM E112-10,
"Standard Test Methods for Determining Average Grain Size",
Novembre 2010.

8. Annexes

Annexe I : Fiche signalétique de l'hydrogénophosphate de diammonium



DONNEES FOURNISSEUR : CARLO ERBA

N° CAS : 7783-28-0

Masse moléculaire : 132,06 g.mol⁻¹

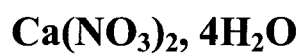
Pureté : 98 %

Impuretés :

Impuretés	Teneur maximale (ppm)
Cl ⁻	10
SO ₄ ²⁻	100
Insolubles dans l'eau	50
Métaux lourds (Pb)	10
NO ₃ ⁻	30
Fer	10
K ⁺	10
Na ⁺	50
Ca ²⁺	10
Mg ²⁺	5

pH (5 %, 25°C) = 7,7 - 8,1

Annexe II : Fiche signalétique du nitrate de calcium tétrahydraté



DONNEES FOURNISSEUR : BRENNTAG

N° CAS : 13477.34-4

Aspect visuel : cristaux blancs

Teneur en nitrate de calcium : min. 98 %

pH (5 %, 20°C) = 4 - 7

Impuretés :

Impuretés	Fe	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	Métaux lourds (Pb)
Teneur maximale (%)	0,001	0,01	0,005	0,002