UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE ÉNERGIE, MATÉRIAUX, SCIENCES de la TERRE et de l'UNIVERS

LABORATOIRE CNRS-CEMHTI

THÈSE présentée par :

Ophélie VERNAY

soutenue le : **29 Mars 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline : Sciences des Matériaux

Apport de la RMN Haute Résolution Solide pour la caractérisation de verres biocompatibles

THÈSE dirigée par :

Dominique MASSIOT	Directeur de recherche, CNRS-CEMHTI (Orléans)
Franck FAYON (co-encadrant)	Chargé de recherche, CNRS-CEMHTI (Orléans)

RAPPORTEURS :

Christian BONHOMME	Professeur, Université Pierre et Marie Curie
Hassane OUDADESSE	Professeur, Université de Rennes I

JURY :

Jean-Michel BOULER	Professeur, Université de Nantes - **Président du jury**
Christian BONHOMME	Professeur, Université Pierre et Marie Curie
Hassane OUDADESSE	Professeur, Université de Rennes I
Laurent DELEVOYE	Chargé de recherche, CNRS-UCCS (Lille)
Franck FAYON	Chargé de recherche, CNRS-CEMHTI (Orléans)
Dominique MASSIOT	Directeur de recherche, CNRS-CEMHTI (Orléans)

A mes parents,

A mes frères et sœur,

A Olivier&Anita et leur petite merveille, Laora, ma nièce,

A mes deux grands-mères,

Pour votre amour et votre présence

« Le combat spirituel est aussi brutal que la bataille d'hommes »

Arthur Rimbaud

« Me voici ! »

... ; Gn 22,1; Ex 3,4 ; 1 Sm 3,6 ; Is 6,8 ; Lc 1,38 ;...

Remerciements

Pour commencer … voici le monde de la recherche …

Je tiens à remercier chaleureusement, en tout premier lieu, **Franck Fayon** qui m'a encadrée lors de cette thèse : pour sa confiance, sa bienveillance, son humanité et son investissement constant. Je remercie, de la même façon, le ch'ti-post-doc-fanfaron-spécialiste-du-45S5-et-du-SBF en la personne de **Cédric Duée**, pour son soutien, son investissement personnel et pour sa jovialité qui redonne du courage dans les moments difficiles. Un grand Merci à vous deux, grâce à vous cette thèse a pu aller jusqu'au bout !

Merci à **Dominique Massiot** pour son accueil au sein du Laboratoire CEMHTI pour ce travail de thèse et pour son attention humaine.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce long travail de 3 ans : **Jean-Michel Bouler** qui a accepté la tâche de Président du Jury, **Christian Bonhomme** et **Hassane Oudadesse** qui ont accepté d'être rapporteurs de mon travail ainsi que **Laurent Delevoye** qui m'a fait la joie d'être un de mes examinateurs. Merci à chacun de vous !

Je voudrais remercier tout le personnel du laboratoire CEMHTI : pour votre accueil, votre disponibilité et vos compétences ! Un merci particulier à **Sandra Ory** qui a accueilli avec joie mes pauvres petits creusets platine fissurés par le phosphore ☺ et mes questions, à **Emmanuel Véron** pour le MEB et la DRX, à **Mathieu Allix** pour le MET, à **Domingos de Sousa Meneses** pour les analyses infrarouges. Merci à l'équipe RMN en particulier : à **Vincent Sarou-Kanian**, **Aydar Rakhmatullin** et **Pierre Florian** (la team Ingénieurs), à **Catherine Bessada**, **Sylvian Cadars**, **Michaël Deschamps**, **Valérie Montouillout** et **Nadia Pellerin**.

Merci également à **François Vivet**, **Florent Poupard**, **Anne-Marie Guédon**, **Marie-France Rouillier**, **Ludovic Brutinot**, **Raphaëlle Dhenin**, **Nicole Raimboux** et **Philippe Melin** pour leur disponibilité pour toutes questions informatiques, administratives ou technique !

Je tiens à remercier ***Mohammed Malki** pour son attention et à lui dire que je continuerai à siffler toute la musique que je veux même s'il n'est pas d'accord ☺ ! ***Patrick Echegut** pour son dynamisme, son caractère et sa disponibilité ! * Jean-Marc (connu aussi sous le nom de **Ramzi**) pour sa présence et son humour ! ***Marina Licheron** pour sa présence et sa précieuse aide de prof de chimie ! ***Isidro** du site Cyclo pour la lutte menée ensemble (avec Nadia et Cédric aussi) pour faire marcher l'ICP en liquide : j'espère qu'un jour vous vaincrez ! Je crois en vous ! ***Rachelle** du site Cyclo, pour son approvisionnement régulier en eau ultra pure (c'est d'la pure !). Je remercie **François-Xavier Lefevre**, du laboratoire CRISMAT à Caen, pour son accueil et pour les magnifiques clichés MEB-FEG du verre 45S5 lixivié !

Je veux dire un grand merci aux Nantais, **Jean-Michel Bouler**, **Charlotte Mellier**, **Verena Schnitzler**, **Bruno Bujoli**, **Pascal Janvier**, **Carole La**, **Thierry Rouillon** et **Ariane**, pour votre accueil pour les quelques fois où je suis venue à Nantes dans vos laboratoires respectifs (LIOAD et CEISAM), pour tous les restos, les pauses déjeuner, la convivialité, le soleil de Nantes (mais si, on y croit !), pour votre passion, pour vos compétences et votre savoir-faire dont vous avez su me faire profiter ! Un grand merci !!

Je viens maintenant remercier **Julien Lambert**, **Antonine Poitevin** (Docteur Girafe), **Myriam Eckes** et **Benjamin Bouvry** (dit le Soldat …) du laboratoire CEMHTI :
Merci pour cette amitié qui s'est tissée tout au long des pauses café, des difficultés communes et personnelles, des questions existentielles, des .déj 11.30 ?, des enthousiasmes, des remises en question, des moments de folie, des moments de découragement et d'encouragement, des sorties ensemble, des projets, des questions de vocabulaire, des minutes sciences à table (top chrono !), des PUUUUUUUUUUUUUC ! >_< en nombre inimaginable + le bon vieux J'NMR ;) ! Merci pour le LARVÆ RPOJECT, ce défi que nous avons relevé avec panache un certain 8 Mai 2012 ! Que cette date reste dans votre mémoire à jamais comme THE jour où nous nous sommes immergés ensemble en Terre du Milieu, suivant Frodon dans ses difficultés et désirant avec hâte qu'enfin Le Précieux soit détruit … la même hâte que nous avions nous-mêmes, chacun, que notre _ _ _ _ _ (ce-dont-on-ne-doit-pas-prononcer-le-nom) soit enfin terminée ! Nous avons passé l'épreuve maintenant, (bon sauf le Soldat Ben', mais ça va venir ! Vie longue et prospère / Force et Robustesse = avec toi de tout cœur !), nous avons survécu, vaincu : nous sommes Docteurs ! Mais surtout nous avons FINI notre THÈSE ! Et nous pouvons enfin en parler au passé ! D'autres combats nous attendent bien sûr et déjà ils se font sentir ! Mais n'oublions pas deux choses : 1$^{\text{èrement}}$ l'union fait la force face à toute adversité (extérieure comme intérieure) et 2$^{\text{èmement}}$ on a réussi à finir nos thèses, et ce n'est pas rien, alors courage ! Merci pour les personnes que vous êtes, chacun et merci pour votre amitié ! Je vous souhaite une bonne route et je vous assure de mon amitié !
Je remercie également **Stéphanie Touchefeu** pour tous les moments passés ensemble, les papotages qui redonnent du courage, les mini-pauses café-express, les post-its et autres dessins (ce n'est pas moi !) et son amour pour les chats. Je t'embrasse depuis la France ! ☺
Je remercie la guilde des doctorants et post-doctorants qui forment le groupe des « djeune's » du labo CEMHTI, merci pour les soirées, les restaurants, les cinémas, les pots de thèse, la richesse qu'apporte les différentes nationalités et la folie et la joie de chacun ! Merci à **Zalfa**, **Mounesha** (dodooooo), **Mohamed**, **Thomas** (the Ski-Saint-Nectaire-Michelin's Man, merci

pour ton attention !), **Romain**, **Laura**, **Georges** (le libanais), **Kholoud** (c'est bientôt ton tour Kholoud :p), **Rudy**, **Judit**, **Sébastien**, **Estelle**, **Gaëlle**, **Olivier**, (tous les trois from CEA), **Tan-Vu** (You're Mad Tan-Vu ! o_O Coffee Addicted Boy !) et **Cédric**, Ah non ! pardon je l'ai déjà cité :p … Bon je le re-cite, il le mérite pas mais c'est mon jour de bonté … :p ! Donc Merci Cédric, continue à faire des blagues pourries :p !!!

Il y a une personne que je n'ai pas encore cité dans cette liste c'est **Louis Maksoud** que je tiens à remercier chaleureusement pour toute la personne qu'il est. Merci pour ton attention aux autres, pour ton espérance, pour ton amour de la musique, pour ton goût à être au service des autres (que cela passe par l'organisation de resto ! miam ! ou pour avoir accepté la lourde tâche d'être notre représentant au CDL …), merci pour tout ! On est frère et sœur en + ;) , je suis de tout cœur avec toi pour la fin de ta thèse et pour la suite ! Merci !

… et voici le monde de l'enseignement … tadaaaaaaa ….« la Fac … un monde à part ☺ »…

Je tiens à remercier également mes collègues de la fac : Merci pour votre accueil chaleureux dans le service des TP de Chimie, pour votre écoute et votre réponse inlassable à toutes mes questions, de tout ordre (c'est juste un exploit !! :D), pour toutes les bulles fractionnées lors du TP d'isoténiscope, pour votre accueil des étudiants, pour votre disponibilité, pour les mots croisés avec Coco et Eric (au crayon à papier la prochaine fois …), pour la joie d'enseigner que j'ai pu me découvrir aussi à votre contact et grâce à vous, … Merci donc à **Fabienne** (qui a accepté de me donner des heures, au départ, sans me connaître … ! et je pense aussi à toutes ces heures de correction de copies …), à **Sandra**, à **Coco**, à **Flo**, à **Eric**, à **Fatou**, à **Alain** et **Dominique**. Je tiens également à remercier **Zohra** et **Walid** pour leur accueil dans les affres administratives de la fac, ainsi qu'à mes collègues-DCACE et ATER : **Amin**, **Maria**, **Florent**, **Damien**, **Joffrey** et **Ali**.

Après les collègues, les étudiants … oui parce qu'on ne peut prendre goût à l'enseignement que si, en face, on a des étudiants, et des étudiants qui en veulent ! Alors je remercie tous les étudiants que j'ai eu la chance de rencontrer pendant mes 4 années d'enseignement, merci pour vos questions (je rappelle qu'il n'y a pas de question bête !), pour votre joie de faire des TP de Chimie, pour vos mines réjouies et votre soif d'apprendre. Merci à **Alan Obled**, **Arnaud Mboly Fatran**, **Sophie Monpu**, **Guillaume Belot**, **Stéphanie Ludomir**, **Maïkandanie**, **Alexandre Dabert**, **Axel Arnault** et **Alexis Menneguerre**, **Ayoub** et **Loren**, la team PACES **Constance Poullin**, **Younès Bounaaja**, **Fatiha Bousarghin**, **Estelle Barison**, **Idriss Saadallah** (bonne route !)… et à tous les autres !

Je profite de parler de la fac pour dire un grand merci à mes professeurs durant ma propre scolarité ! Et oui, parce qu'un professeur bien dans sa peau, bien dans sa matière, ça vous donne envie d'apprendre, de découvrir toujours plus loin et qui sait … un jour peut-être … d'enseigner à votre tour ! ☺ Alors un grand merci à **Mme Charlet**, ma prof de Sciences Physiques de 5è et de 4è qui m'a accompagnée jusqu'à aujourd'hui par ses lettres et ses appels téléphoniques, Merci à **Mme Filippini**, ma prof d'Italien de collège/lycée, qui ne m'a pas lâchée « tant que t'auras pas fini de rédiger et tant que t'auras pas soutenu ta thèse ! », Merci à **M. Roche**, mon prof de Chinois au lycée, qui m'a montrée la qualité de mon travail et qui ne m'a pas lâchée non plus « je ne m'inquiète pas pour toi, tu t'en sortiras ! », Merci à mes professeurs de classe préparatoire en Physique-Chimie pour leur exigence, leurs encouragements et leur bienveillance qui pousse à donner le meilleur de soi-même, Merci à mes professeurs d'Ecole d'Ingénieur (Ecole de Céramique industrielle, Limoges) qui m'ont montré la richesse des sciences appliquées au concret de notre vie quotidienne.

<u>… enfin voici ma famille et mes amis.</u>

Merci à **ma famille** et à **mes parents** qui m'ont toujours poussée pour aller plus loin. Ils ne sont pas étrangers à la réussite de cette thèse ! Merci pour la Musique ! Merci pour les après-midis passés à La Cité des Sciences à Paris ou au Palais de la Découverte. Merci pour la ténacité et la persévérance ! Merci pour votre amour, votre présence, votre exigence et votre esprit d'ouverture ! Merci à mes **frères et sœur, Olivier, Aliénor et Jocelyn**, pour les jeux, les chamailleries et les bêtises partagés ensemble, c'es aussi grâce à vous que je me suis construite au fur et à mesure de ma vie : Merci ! Bienvenue à **Anita** la compagne de mon grand-frère dans notre cercle familial un peu fou ☺ et bienvenue à leur petite merveille **Laora**, qui est née le Jeudi 20 Septembre 2013 : alors que j'étais en pleine tempête de la fin de la rédaction de thèse, tu as été un petite brise qui ragaillardi et un rayon de soleil ! Merci d'être là parmi nous avec ta petite bouille et tes yeux qui découvrent le monde ! Je vous embrasse tous et je vous aime !

Et voici le temps de remercier mes amis ! Merci à mes amis de lycée/classe prépa d'être là encore aujourd'hui, même si nos routes diverses et variées nous ont un peu séparé. Merci à mon ange violet **Esther** et à son mari **Wei**, pour votre accueil de chaque instant et votre amitié. Merci à **Christelle** pour ton amitié et ton esprit d'artiste ! Merci à **Thibaut** et sa future épouse **Cyrielle**, à **Carine** et son époux **Olivier**, à **Jawad**, compagnon de route du primaire … à la prépa ! …

Je viens dire merci aux amis que j'ai laissés à Limoges pour partir à Orléans : Merci à **Jean-Baptiste**, mon parrain, au **Père Bernard** (dit Padre), aumônier des étudiants, qui m'a baptisée, à **Laure-lyne** et toute sa famille, ma marraine, à **Cathy**, ma petite sœur en +, à **Amélie** et **Guillaume**, à **Lucas** et **Bérénice**, à **Gabriel**, mon fillot, à **Arnold** mon petit-fillot, à **Emeline, Julie** et **Jérémy, à Armelle** …

Et mes amis d'Orléans, vous qui me supportez depuis bientôt 4 ans ! ☺ Je remercie en premier lieu le **Père Raymond** (MSC et j'en profite pour remercier tous ses frères qui m'ont accueillis à leur table si souvent !) qui m'accompagne depuis que je suis arrivée, qui m'écoute et me supporte autant qu'il peut ☺ puis **Edith** et son mari **Michel**, ma marraine de confirmation, Merci à **Malie** et à **Camille**. Merci à **Cécile Doisy**, à **Laetitia**, à **Marie-Cécile** et à tout le groupe **JAVA** et **Taizé Rome** pour votre folie et votre présence. Ensuite je remercie de façon incontournable **les filles de la maison Saint Paul** qui ont constitué pour moi un rempart durant cette thèse contre toute sorte de dépression, blues, cafard et autres bestioles des coins sombres ! Merci d'avoir été là à chaque moment et d'être encore là ! Merci de me supporter avec ma folie, avec mes complots-surprises inattendus (bon mais maintenant vous êtes habituées ;)), Merci de votre écoute, de votre accueil, de vos rires et de vos folies à vous (oui parce qu'ont dit que c'est moi, mais en fait, je suis pas la seule ! :p) Merci à **Armance-Marie** (qui me supporte depuis 3 ans ! O_O l'exploit !), à **Perrine** (Oh ! les beaux petits pois ! :p Etendaaaaaard …), à **Françoise** (:D), à **Gwenaëlle** et à **Judit** !

J'ai encore quelques personnes à remercier pour leur accueil : le **Père Évêque Jacques Blaquart** pour la qualité de son accueil de chaque personne qu'il rencontre, pour tous les moments qu'il a pris pour moi et pour son soutien inconditionnel ; le Père **Jean-Marc** pour son humour et sa joie ! le **Père Karl-Aymeric** pour toutes ses idées (et après c'est à nous de mettre en pratique … :p !) … Merci à toutes celles et ceux qui m'ont entourée de leurs prières.

Le dernier mot est un Merci au **Cœur de mon Cœur** qui est toujours là pour moi, sans jamais me lâcher : Merci d'avoir vécu tout cela avec Toi ! et Merci à Toi d'être là à mes côtés et de m'aimer de façon inconditionnelle ! ☺ ☺ ☺

<u>Merci aux « officiels » :</u>

Au **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche** pour m'avoir permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions de travail et de vie. Et aux **urgences de l'Hôpital d'Orléans** qui m'ont fait attendre 6 heures avant de voir un médecin un certain Mardi 23 Octobre 2012 : j'ai eu le temps de visiter tout le service … !

Cette thèse porte le label

« Sans Café »

Je tiens à préciser que cette thèse a été commencée, menée et terminée sans la moindre goutte de café, en ne fonctionnant qu'à la vitamine C (les oranges et les citrons sont mes amis ☺) : c'est donc possible !!!

Sommaire

Abréviations 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE 5

PARTIE 1 : OS, OSTÉOPOROSE ET BIOMATÉRIAUX : GÉNÉRALITÉS 11

I. L'os 13

I.A. Structure et composition de l'os 13

I.B. Le remodelage osseux 14

II. Les maladies et les traumatismes de l'os 16

II.A. L'ostéoporose 16

II.B. Cancer des os 17

II.C. Remplacement de la chaîne des osselets de l'oreille interne 18

III. Les biomatériaux 18

III.A. Définitions 19

III.B. Biomatériaux pour la réparation osseuse 21

III.B.1. Substituts osseux phosphocalciques 22

III.B.2. Substituts osseux non phosphocalciques 26

III.B.3. Autres substituts 27

IV. Traitement de l'ostéoporose 27

IV.A. Les Bisphosphonates (BP) 28

IV.A.1. Présentation de la structure des BP 28

IV.A.2. Affinité des BP avec les phosphates de calcium 28

IV.A.3. Activité antiresorptive 29

IV.A.4. Applications, voies d'administration et inconvénients des BP 29

IV.A.5. Nouveaux biomatériaux pour la vectorisations de BP 30

PARTIE 2 : LES VERRES DE MÉTAPHOSPHATES DE CALCIUM DOPÉS AVEC DU GALLIUM 33

I. Revue bibliographique sur les verres de phosphates de calcium et sur l'élément gallium 36

I.A. Les verres de phosphates de calcium 36

I.A.1. Généralités sur les matériaux vitreux 36
I.A.2. Structure des verres de phosphates 36
I.A.3. Applications en tant que biomatériaux 39
I.B. Le gallium : un agent d'intérêt thérapeutique 40
I.B.1. Comportement en solution du gallium 41
I.B.2. Activités et applications thérapeutiques du gallium 43
I.B.3. Vectorisation du gallium 45
II. Etude de la structure des verres de métaphosphates de calcium dopés avec du gallium. 47
II.A. Synthèse et analyses préliminaires 47
II.B. Caractérisation structurale par RMN du ^{31}P et du ^{71}Ga 51
II.B.1. RMN du ^{31}P 51
II.B.2. Etude par RMN du ^{71}Ga 59
III. Etude de l'altération des verres en solution 67
III.A. Protocole de lixiviation 68
III.B. Conditions d'analyses des solutions et des verres altérés 69
III.B.1. Solutions 69
III.B.2. Verres altérés 69
III.C. Résultats 70
III.C.1. Analyses des solutions 70
III.C.2. Étude des verres altérés 73
IV. Conclusion 81
PARTIE 3 : ÉTUDE DU BIOVERRE DE RÉFÉRENCE : LE BIOGLASS® 45S5 83
I. Revue bibliographique sur le bioverre Bioglass® 45S5 87
I.A. Verres du système SiO_2-Na_2O-CaO + P_2O_5 87
I.B. Le verre 45S5 88
I.B.1. Structure du verre 45S5 88
I.C. Comportement en milieu physiologique 92

I.C.1. Réactivité des bioverres 93
I.C.2. Le Simulated Body Fluid (SBF) 96
I.C.3. Propriétés biologiques 97
I.C.4. La réaction 45S5/SBF 97
II. Structure du verre 45S5 : approche par RMN haute résolution 99
II.A. Synthèse du Bioglass® 99
II.B. Caractérisation structurale du verre 45S5 par RMN 101
II.B.1. Conditions expérimentales 101
II.B.2. Résultats 101
III. Modifications structurales du verre 45S5 induites par l'immersion dans le SBF 111
III.A. Protocoles expérimentaux 111
III.A.1. Préparation du SBF et protocole de lixiviation 111
III.A.2. Techniques d'analyses 112
III.B. Résultats 114
III.B.1. Evolution du pH des solutions 114
III.B.2. Analyse par DRX des poudres lixiviées 115
III.B.3. Analyse par spectroscopie FTIR 118
III.B.4. Analyse par microscopies MEB-FEG et MET 119
III.B.5. Etude par RMN multi-nucléaire 127
IV. Conclusion 138
CONCLUSION GÉNÉRALE 141
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 147
ANNEXES 169

Abréviations

HA : Hydroxyapatite

OC : Ostéoclastes

OB : Ostéoblastes

α- ou β-TCP : Tricalcium phosphate de phase α ou β

MCPM : Monocalcium phosphate monohydrate

TTCP : Tétracalcium phosphate

DCPD : Dicalcium phosphate dihydrate

OCP : Octacalcium phosphate

CDA : Apatite déficiente en calcium

CPC : Ciment phosphocalcique

HAC : Hydroxyapatite Carbonatée

PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle)

BP : Bisphosphonates

BO : Oxygènes pontants (Bridging Oxygen)

NBO : Oxygènes non-pontants (Non-Bridging Oxygen)

O_{NB} : Nombre d'atomes d'oxygène non-pontants

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy

Technique également nommée ICP-OES (Optical Emission Spectroscopy)

LQ : Limite de quantification en ICP-AES

TRIS et T : Trishydroxyméthylaminométhane ($C_4H_{11}NO_3$)

P : Solution de phosphate

E : Eau ultra pure (18MΩ)

Bioglass® 45S5 : Bioverre de référence

CaP : Phase phosphocalcique

SBF : Fuide physiologique simulé (Simulated Body Fluid)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

MAS : Rotation à l'angle Magique (Magic Angle Spinning)

TOP : Processus d'acquisition RMN (Two dimensional one pulse spectroscopy)

CPMAS : Expérience par transfert de polarisation (Cross-Polarization Magic Angle Spinning)

HETCOR : Expérience de corrélation hétéronucléaire (Heteronuclear Correlation)

FWMH : Largeur à mi-hauteur d'une raie de résonance

DMfit : Logiciel de simulation des spectres RMN

GIM : Modèle de simulation des noyaux quadripolaires (Gaussian Isotropic Model)

TMS : Tétraméthylsilane

DRX : Diffraction des Rayons X

MEB-FEG : Microscopie Electronique à Balayage couplée à un canon d'émission de champ (Field Emission Gun)

EDX : Energy Dispersive X-ray spectroscopy

MET : Microscopie Electronique en Transmission

FTIR : Spectroscopie InfraRouge (Fourier Transform InfraRed)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Cette thèse s'inscrit dans le contexte du développement de biomatériaux synthétiques pour la réparation ou la reconstruction osseuse. En comparaison avec les autogreffes ou les allogreffes, utilisées en chirurgie réparatrice osseuse, les dispositifs synthétiques présentent l'intérêt de pouvoir être produits en grande quantité, d'être facilement adaptables en termes de composition et de forme, et d'être, éventuellement, fonctionnalisables avec un agent thérapeutique selon l'application visée. Dans ces travaux, nous nous sommes intéressés à deux types de biomatériaux de composition chimique très différente : les verres de phosphates de calcium dopés avec du gallium et le verre Bioglass® 45S5.

Les verres de phosphates de calcium présentent l'intérêt d'être biocompatibles et de posséder de bonnes propriétés de dissolution. De plus, leur composition est facilement modulable ce qui permet l'incorporation d'éléments chimiques ayant des propriétés spécifiques. De ce fait, il nous a semblé intéressant de doper ces verres de phosphates de calcium avec l'élément gallium qui possède des propriétés bactéricides [1] et qui est connu pour être un agent inhibiteur efficace de la résorption osseuse [2]. Les verres obtenus peuvent être potentiellement considérés comme un nouveau dispositif de livraison de principe actif pour traiter l'ostéoporose (maladie caractérisée par une suractivité de la résorption osseuse).
Dans ce travail, nous avons donc synthétisé des verres de métaphosphates de calcium contenant une proportion croissante de gallium. La structure de ces verres a été caractérisée par Résonance Magnétique Nucléaire haute résolution, ce qui nous a permis de sonder sélectivement les variations des environnements chimiques du phosphore et du gallium lors de l'ajout progressif de Ga^{3+} dans la composition du verre. Ces matériaux étant destinés à être implantés dans l'organisme (*via* l'incorporation dans un ciment médical, par exemple), l'étude du comportement de ces verres en solution est nécessaire. Nous avons donc étudié la dissolution de ces verres dans différentes solutions.

Le verre Bioglass® 45S5 (appartenant au système SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5) est le bioverre de référence utilisé, aujourd'hui, dans différentes situations cliniques en chirurgie réparatrice osseuse (comblement des défauts osseux de la mâchoire, remplacement des osselets de

l'oreille interne) [3-4]. La structure de ce verre a été largement étudiée par différentes techniques (Raman, FTIR, DRX, RMN, …) mais certains aspects structuraux restent encore débattus dans la littérature [5] (type de distribution des cations autour des groupements phosphates, existence de liaisons Si-O-P). Nous avons donc, dans un premier temps, effectué une caractérisation structurale approfondie par RMN, en mettant en œuvre des expériences de simple et double résonance. Ces expériences permettent d'étudier les environnements chimiques locaux du ^{31}P et du ^{29}Si, d'une part, et de sonder les proximités spatiales Na-P et Si-P, d'autre part. La bioactivité du Bioglass® 45S5 se traduit par sa capacité à former une couche d'apatite, très similaire à celle rencontrée dans l'os naturel, lorsqu'il est implanté dans l'organisme [6]. Cette couche d'apatite permet l'établissement de liaisons fortes entre le Bioglass® et le tissu osseux [7]. L'étude des réactions qui ont lieu entre le bioverre et le milieu biologique a été menée très tôt dans un milieu physiologique simulé (*Simulated Body Fluid SBF*, en anglais) pour limiter le nombre d'expérimentations sur modèle animal, comme cela était effectué précédemment. Cinq réactions successives aboutissent à la formation, à la surface du bioverre, de la couche d'apatite. Cependant, il n'y a, à notre connaissance, aucune étude décrivant un suivi quantitatif des étapes de la réaction 45S5/SBF. Dans notre travail nous avons donc utilisé la RMN pour effectuer un tel suivi. Nous avons également employé d'autres techniques de caractérisation pour étudier les transformations du verre 45S5 en fonction du temps d'immersion en SBF

Ce manuscrit est découpé en trois parties :

La première partie réunie des notions générales concernant l'os, les traumatismes et les maladies auxquels il peut être soumis – et en particulier, l'ostéoporose – les différents types de biomatériaux et leur utilisation.

La deuxième partie traite de la synthèse et de la caractérisation par RMN haute résolution solide de verres de métaphosphates de calcium dopés avec du gallium. Dans un premier temps, nous présenterons des informations générales sur la structure de ce type de verre et sur ce qui est connu sur le gallium en termes d'activités antirésorptive et thérapeutique. On décrira également quelques notions concernant le comportement en solution de ce type de verre et du gallium. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats obtenus.
- En ce qui concerne les verres initiaux, la RMN des noyaux ^{31}P et ^{71}Ga permet d'étudier, d'une part, la modification de l'environnement du phosphore par la présence du gallium, et

d'autre part, les différentes formes sous lesquelles ce dopant s'insère dans le réseau phosphate.

- Après immersion des verres dans trois types de solution, la caractérisation par ICP-AES des lixiviats donne accès aux concentrations relarguées pour chaque élément, et permet d'amorcer une discussion sur le mécanisme de dissolution auxquels sont soumis les verres. En parallèle, l'étude RMN du ^{31}P des échantillons immergés permet de suivre l'évolution des espèces initiales du verre et des espèces formées au contact avec la solution, et d'apporter des éléments de réflexions pour compléter les observations faites par ICP-AES concernant la dissolution.

La troisième et dernière partie présente la synthèse et la caractérisation par RMN du Bioglass® 45S5 et l'étude de la réaction 45S5/SBF. Dans un premier temps, nous présenterons des données générales concernant ce type de verres en termes de structure et en termes de réactivité par rapport à un fluide physiologique simulé. Puis, dans un second temps, nous exposerons les résultats obtenus.

- La caractérisation par RMN MAS du ^{29}Si et ^{31}P de la structure initiale du verre permet d'étudier l'impact de l'insertion de P_2O_5 dans le réseau silicate ainsi que la nature des unités phosphates présentes dans ce réseau. Nous présenterons, en particulier, les expériences RMN REDOR ^{31}P-^{23}Na et ^{31}P-^{29}Si.

- Le suivi de la réaction 45S5/SBF réalisé par RMN, couplée à d'autres techniques de caractérisation, permet d'étudier de façon fine et quantitative : l'évolution de la structure au cœur et à la surface du verre, ainsi que la structure des différentes couches qui se forment à la surface du verre, et notamment de l'hydroxyapatite, qui confère au Bioglass® 45S5 sa propriété de bioactivité.

PARTIE 1 :

OS, OSTÉOPOROSE ET BIOMATÉRIAUX : GÉNÉRALITÉS

I. L'os

Le squelette joue plusieurs rôles dans le corps. Tout d'abord, il en est l'architecture : il a donc un rôle de support mécanique, il permet au corps de se déplacer. Il vient aussi protéger les organes, par exemple, la cage thoracique pour les poumons et le cœur. Il joue également un rôle important dans le métabolisme des sels minéraux, et en particulier celui du calcium et du phosphore [8].

I.A. Structure et composition de l'os

L'os est composé de deux types de matrice : d'une part, la matrice organique qui représente 25 % de la masse osseuse et qui est majoritairement composée de collagène (protéines) ; et d'autre part, la phase inorganique (65 % en masse) dont le composant principal est une apatite phosphocalcique carbonatée poly-substituée dont la composition chimique reste proche de l'hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (notée HA) [9]. La formule proposée pour cette phase est :

$$Ca_{8,3}\,\square_{1,7}(PO_4)_{4,3}(CO_3)_{1,0}(HPO_4)_{0,7}(CO_3,OH)_{0,3}\,\square_{1,7}$$

La présence d'ions carbonates dans la structure apatitique, se situant soit dans les sites occupés habituellement par les ions hydroxyles, soit dans les sites occupés par les ions phosphates, engendre nécessairement des lacunes dans les sites cationiques (Ca^{2+}) et anioniques (HO^-) notées $\square$. Ces deux types de substitution par les ions carbonates dans la structure de l'HA sont décrits ci-dessous :

$$\text{Substitution de type A : } HO^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + \square_{HO}^- \qquad (1)$$

$$\text{Substitution de type B : } PO_4^{3-} \leftrightarrow CO_3^{2-} + \square_{HO}^- + \square_{Ca}^{2+} \qquad (2)$$

D'autres éléments peuvent entrer dans la composition de cette apatite phosphocalcique poly-substituée, Na^+, K^+, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Cl^-, F^-,… selon le tissu considéré (dentine, os émail, …) [10].

La structure de l'os est composée de deux architectures différentes : l'os spongieux et l'os cortical (cf *Figure 1*). L'os spongieux (ou os trabéculaire) possède une structure poreuse alvéolaire alors que l'os cortical est formé d'une couche dense de tissus calcifiés. Le corps des os longs est constitué d'os cortical alors que leurs extrémités sont faites d'os spongieux. Les os courts et les os plats sont formés d'un noyau d'os spongieux entouré d'os compact.

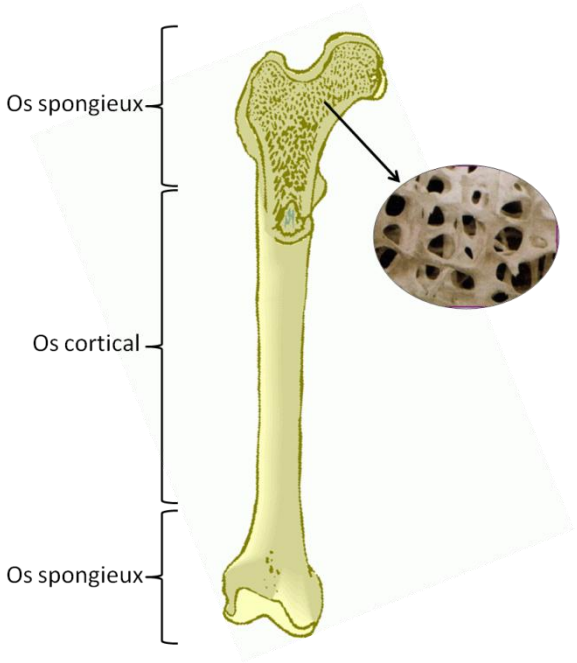


Figure 1 : *Schéma de l'os*

I.B. Le remodelage osseux

L'os n'est pas un matériau inerte et figé. En effet, il accompagne la croissance du corps de l'enfant jusqu'à l'âge adulte. De plus, lorsqu'un os est fracturé, il se ressoude naturellement, sauf maladies et complications. C'est donc un matériau vivant grâce au phénomène de « remodelage osseux » qui se produit pendant toute la vie. Ce processus met en jeu deux types de cellules osseuses : les ostéoblastes (« οστεο » = os ; « βλαστοσ » = bourgeon), responsables de la formation du nouvel os, et les ostéoclastes (« χλαο » = destruction), responsables de la résorption osseuse. Le remodelage se déroule de façon cyclique selon les quatre étapes suivantes [11] (cf *Figure 2*) :

- Activation des cellules ostéoclastes (OC) : elles sont activées et se dirigent vers la surface osseuse à résorber

- Résorption : les OC résorbent le tissu osseux cible par dissolution de la phase minérale en laissant une lacune osseuse

- Inversion : les OC meurent par apoptose (= autodestruction) puis les ostéoblastes (OB) sont activées et viennent à la surface de la lacune à combler

- Formation osseuse : les OB comblent la cavité en apposant une nouvelle matrice collagénique (collagène = famille de protéines) et la minéralisent. Ces cellules sont alors éliminées par apoptose.

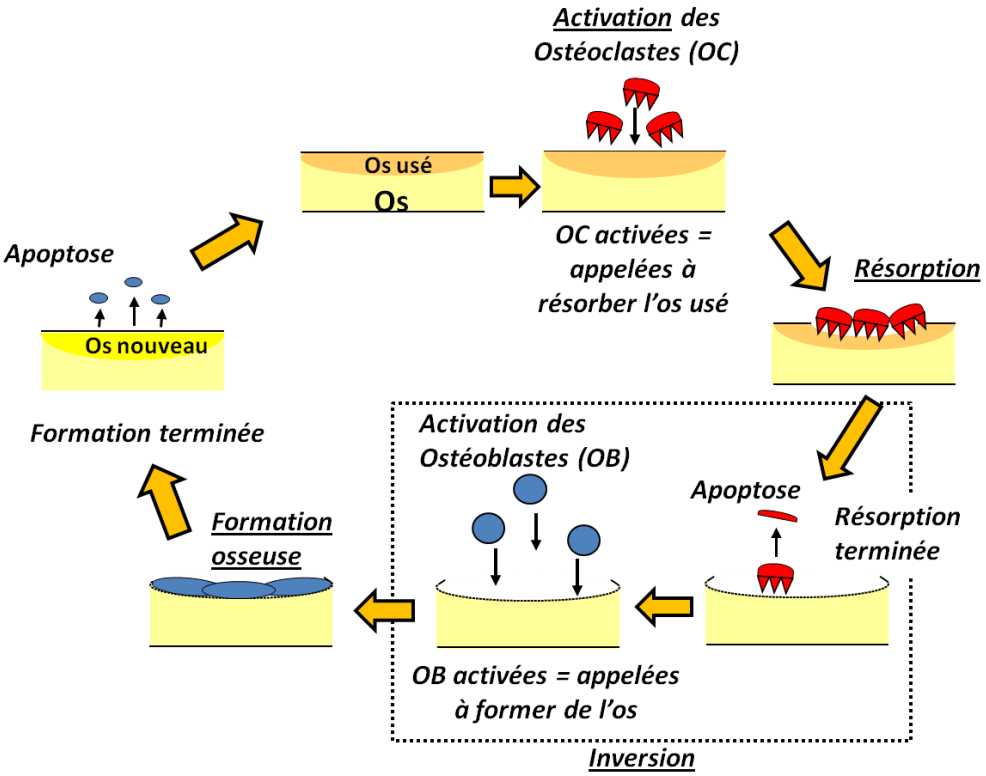


Figure 2 : *Cycle du remodelage osseux*

L'équilibre entre les OB et les OC assure le maintien de la masse osseuse. Idéalement, le renouvellement osseux devrait se faire toujours de la même manière. Or le fonctionnement et le renouvellement de l'os évoluent au cours de la vie [12]. La masse osseuse évolue selon trois étapes (cf *Figure 3*).

- De la naissance à environ 20 ans la masse osseuse augmente et atteint sa teneur maximale. Des facteurs, tels que l'activité physique régulière, la consommation de produits laitiers (apport de calcium), l'alcoolisme et le tabagisme, influent sur la teneur maximale obtenue. En effet, plus ce pic de masse osseuse sera important moins les risques d'ostéoporose seront grands.

- De 20 à 30 ans la masse osseuse reste à peu près constante. Après l'âge de 30 ans, une perte de masse osseuse, causée par la déminéralisation de la matrice extracellulaire, commence à s'amorcer puis s'accélère lorsque les concentrations sanguines en stéroïdes sexuels diminuent.

- Puis, après 50 ans, la masse osseuse diminue constamment. Cette dernière période est différente chez l'homme et chez la femme. La masse osseuse de l'homme subit une diminution de 0,5 % par an. Chez la femme, après la ménopause, la masse osseuse décroît de 3 à 5 % pendant 2 à 3 ans environ, puis de 1 à 2% pendant les 5 à 10 années suivantes : c'est

la perte osseuse « post-ménopausique ». Cette évolution de la masse osseuse chez la femme est due à un déséquilibre du remodelage osseux, les OC prenant le pas sur les OB, en rapport direct avec la baisse du taux sanguin d'œstrogènes (baisse due à la ménopause). La femme va donc perdre 30 à 50 % de sa masse osseuse au cours de la vie. La *Figure 3* donne l'évolution de la masse osseuse chez l'homme et la femme.

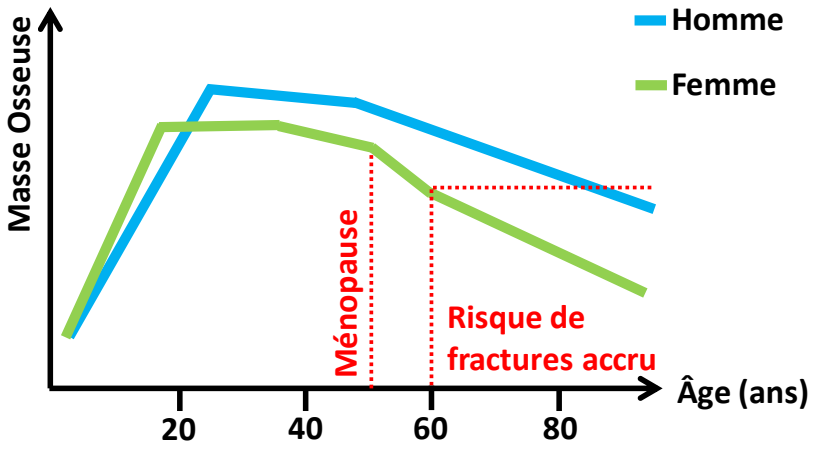


Figure 3 : *Evolution de la masse osseuse durant la vie* [12]

II. Les maladies et les traumatismes de l'os

Les os sont des tissus qui ont souvent besoin de régénération, notamment à la suite de traumatismes ou de tumorectomie, ou plus communément à cause des maladies qui apparaissent avec l'âge comme l'ostéoporose et l'ostéoarthrite [4].

II.A. L'ostéoporose

L'ostéoporose est *« une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et la détérioration micro-architecturale du tissu osseux, une fragilité osseuse et, par suite, une augmentation du risque de fracture »* [13]. Dans ce cadre général, plusieurs définitions basées sur des mesures de la densité minérale osseuse ont été proposées. L'ostéoporose est une maladie diffuse du squelette, c'est-à-dire que, lorsqu'elle est présente, elle agit dans toutes les parties du squelette. Cette maladie est due à un dérèglement du renouvellement osseux dont la cause principale est la ménopause chez la femme. Elle peut être également liée à des pathologies endocriniennes ou nutritionnelles [14]. Le risque d'ostéoporose dépend de la densité osseuse initiale, de la vitesse et du taux de perte osseuse. La *Figure 4* donne un aperçu de l'impact de cette maladie sur l'architecture de l'os.

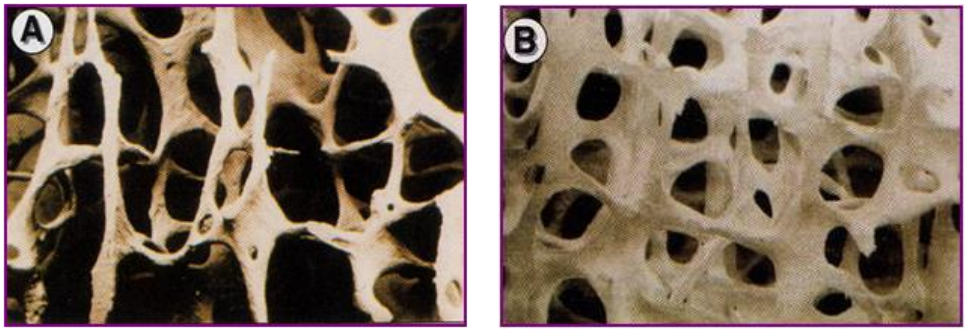


Figure 4 : *Photographies d'un os ostéoporotique (A) et sain (B)* [15]

L'os ostéoporotique, photo A, est beaucoup moins dense que l'os sain, photo B. Les qualités mécaniques de l'os sont altérées : sa résistance aux contraintes qui lui sont appliquées est diminuée. Le risque de fractures est donc augmenté. C'est souvent à la suite d'une fracture que la personne découvre qu'elle a de l'ostéoporose. Le risque d'une deuxième fracture est alors multiplié par deux (ou même trois) [16].

Les fractures dues à l'ostéoporose surviennent le plus fréquemment de façon localisée au niveau des poignets, des vertèbres (rachis) et de la hanche. La fracture de la hanche, ou couramment appelée « fracture du col du fémur », a pour conséquence une opération chirurgicale lourde suivie d'un long temps d'immobilité pour la guérison. Pour les personnes âgées, cela implique une perte d'autonomie effective, et cela peut conduire à son décès [17].

Avec l'augmentation de l'espérance de vie, l'ostéoporose constitue déjà, et devient de plus en plus, un problème majeur de santé publique. Après 50 ans, 1 femme sur 3 et 1 homme sur 5 sont touchés par l'ostéoporose. Dans le monde, l'ostéoporose engendre une fracture toutes les 3 secondes et, en particulier, une fracture de vertèbres toutes les 22 secondes [18]. Les frais liés au traitement de ces fractures s'élevaient à 36 milliards d'euros en Europe en 1990 et devraient atteindre 76,8 milliards d'euros en 2050 avec le vieillissement de la population [19].

II.B. Cancer des os

Les cancers des os (appelés métastases osseuses ou myélomes) attaquent les deux structures principales de l'os (spongieuse et corticale) et les détruisent partiellement (ostéolyse), ce qui les fragilise et explique les tassements vertébraux et les fractures des os longs. En plus d'une fragilisation des os touchés et de fortes douleurs, les cancers osseux conduisent à un excès de calcium dans le sang (hypercalcémie), les cellules cancéreuses provoquant une libération

d'ions calcium initialement stockés dans l'os [20]. Pour remédier à ce cancer, il est souvent nécessaire d'enlever la partie de l'os qui est atteinte (tumorectomie), ce qui entraine des défauts osseux importants qu'il s'agit de combler.

II.C. Remplacement de la chaîne des osselets de l'oreille interne

Les osselets de l'oreille interne, qui sont les plus petits os du corps humain, peuvent être endommagés par des traumatismes, des otites chroniques ou d'autres maladies. Cette chaîne d'os relie le tympan à la cochlée et permet ainsi, en temps normal, la transmission du son (cf *Figure 5*). Il est donc nécessaire de les remplacer pour que le patient entende de nouveau correctement [21].

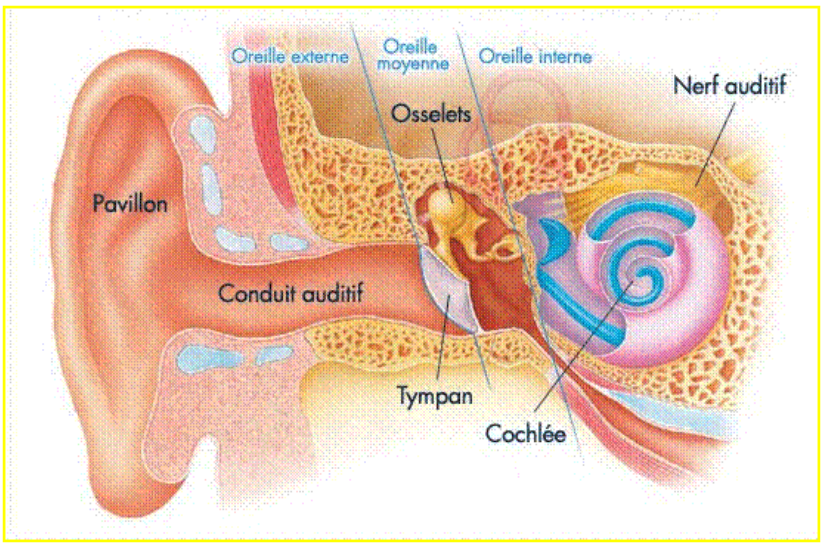


Figure 5 : *Schéma de l'oreille interne* [22]

III. Les biomatériaux

Les biomatériaux mettent en relation deux domaines scientifiques : la biologie médicale et la science des matériaux. En ce qui concerne la biologie médicale, le développement de biomatériaux adaptés a permis de faire progresser les soins de diverses pathologies. Les champs médicaux concernés vont, entre autres, de l'odontologie et de la chirurgie orthopédique à l'urologie et la chirurgie cardiaque. Les matériaux utilisés sont les métaux et leurs alliages, les céramiques, les polymères et les matériaux d'origine naturelle et synthétique.

III.A. Définitions

La notion de biomatériau

Selon la définition du consensus de Chester (1992) [23], les biomatériaux sont des *matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical visant à remplacer ou traiter un tissu, un organe ou une fonction. Ils sont destinés à interagir avec les systèmes biologiques.*
Ils sont donc destinés à être en contact avec les tissus vivants et / ou les fluides biologiques pour traiter et modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps.

Les biomatériaux ont vocation à être implantés dans l'organisme de façon temporaire ou permanente. Il y a donc la notion forte d'interface matériau / tissu. Un biomatériau doit donc valider des conditions physico-chimiques spécifiques au site d'implantation. Il doit également respecter d'autres conditions telles qu'un comportement mécanique particulier (par exemple prothèse de hanche), et être biocompatible.

La notion de biocompatibilité est directement rattachée à la notion de biomatériau : un matériau qui est biocompatible est un biomatériau. Cependant, on peut trouver différentes formulations pour définir avec précision la propriété d'un matériau à être biocompatible :
- *La capacité d'un matériau à agir dans une situation spécifique en obtenant de la part du tissu avec lequel il est en interaction une réponse appropriée.* [24]
- *La capacité à ne pas provoquer d'effets toxiques ou néfastes sur les tissus biologiques avec lesquels le matériau est en contact.* [25-26]

De plus, le matériau implanté est parfois composé de plusieurs matériaux, il faut donc également prendre en compte les différentes interactions matériau / tissu. La notion de biocompatibilité varie donc avec le matériau implanté et le tissu (et tous ses composants en termes de partie organique, inorganique, cellulaire, enzymatique, …).

Parmi les matériaux biocompatibles, on distingue les matériaux bioinertes, les matériaux ostéoconducteurs et/ou ostéoinducteurs.
Un matériau bioinerte est un matériau qui ne provoque aucune réaction (ni de formation osseuse, ni d'effets néfastes) lorsqu'il est en contact avec l'organisme (le site osseux et les fluides environnants). Par exemple, les céramiques non phosphocalciques, de type Al_2O_3 sont des matériaux bioinertes.

Un matériau ostéoconducteur autorise la formation de l'os à sa surface. L'ostéoconduction est définie comme la capacité du matériau à servir de support passif à la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur qui se trouve en contact avec le matériau [27-28].

Un matériau est ostéoinducteur quand il contient des éléments capables d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable. Ce matériau stimule la formation de l'os [28]. La notion d'ostéoconduction est à ne pas confondre avec celle d'ostéoinduction. Par exemple, les céramiques phosphocalciques sont ostéoconductrices mais pas ostéoinductrices. Les bioverres de type Bioglass® 45S5 sont ostéoconducteurs et ostéoinducteurs.

La biorésorbabilité (ou biodégradation ou dissolution en milieu biologique) est la capacité d'un matériau à se dégrader complètement et à être assimilé par le milieu biologique. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, le but est de développer des matériaux destinés à être introduits dans le corps. Certains de ces matériaux doivent pouvoir rester intact pendant un très long laps de temps car il remplace une (des) fonction(s) essentielle(s) du corps. Ils ne doivent donc pas se résorber. Dans cette catégorie on peut prendre comme exemple les prothèses de hanche (Alliages métalliques et céramiques non phosphocalciques comme l'Al_2O_3). Dans d'autres cas, il est préférable que les substituts osseux permettent au corps de recoloniser le défaut de tissu osseux. Ils doivent donc être résorbables. La biorésorbabilité est en lien directe avec la solubilité (c'est-à-dire la capacité de dissolution, la durabilité chimique, représentée par le pKs) du matériau.

Par exemple, les phosphates de calcium cristallins ont, en général, de bonnes propriétés de dissolution. La plupart d'entre eux (Ca/P < 1,67) ont une bonne biorésorbabilité, par exemple le β-TCP (Ca/P = 1,5, pKs = 28,9). Par contre, l'HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), avec un Ca/P de 1,67 et un pKs de 116,8 ; n'a pas une bonne biorésorbabilité. [29] Les ciments de phosphates de calcium ont également de bonnes propriétés de biorésorbabilité selon leur composition [30]. Les verres de phosphates de calcium ($0 < Ca/P \leq 0,9$) sont eux aussi biorésorbables [1, 31]. En revanche les bioverres, qui appartiennent à la famille des verres silicatés calciques ou sodo-calciques, ne sont pas complètement biorésorbables [32].

La bioactivité a été introduite spécifiquement par L.L. Hench comme qualificatif des bioverres. Selon lui, un matériau bioactif est un matériau qui développe une fixation bioactive avec son environnement. Une fixation bioactive est définie comme *une liaison à l'interface d'un implant et d'un tissu par la formation, sur la surface de l'implant, d'une couche d'Hydroxyapatite biologiquement active*. [27, 33-34] Un matériau bioactif est donc nécessairement ostéoconducteur. Lorsqu'un matériau est bioactif, il apparait donc, quelques temps après l'implantation, une interface qui permet, grâce à des processus physico-chimiques, d'avoir une continuité entre l'os et l'implant. Par exemple, les bioverres de type Bioglass® 45S5 sont des matériaux fortement bioactifs. Ils peuvent devenir également ostéoinducteurs s'ils sont associés à des facteurs de croissances ou à des substances actives.

III.B. Biomatériaux pour la réparation osseuse

Les biomatériaux osseux ont pour vocation de venir, soit remplacer sur le long terme une partie osseuse défectueuse, soit aider l'organisme à s'auto-réparer. Le type de matériau à utiliser varie selon la localisation du défaut osseux et les caractéristiques de l'os à remplacer. De manière générale, on peut distinguer deux types d'approches basées soit sur l'utilisation de *greffes osseuses,* soit sur l'utilisation de *matériaux synthétiques*.

Les greffes osseuses présentent un certain nombre d'avantages mais également d'inconvénients. En effet, les autogreffes [35] présentent un faible risque de transmission de maladie et, étant déjà colonisées par les cellules et les protéines, elles sont donc très bien acceptées par le corps. Cependant, elles impliquent une double intervention chirurgicale (prélèvement et implantation) et peuvent conduire à des complications et des douleurs aigües au niveau du site explanté. Les allogreffes (tissu osseux prélevé chez une autre personne que le patient traité [35]) permettent d'éviter ces complications et représentent un coût moindre en termes d'opération chirurgicale. Bien que les allogreffes soient désinfectées, stérilisées et congelées, elles présentent tout de même un risque potentiel de transmission de maladie et, ne contenant pas de cellules osseuses vivantes, elles peuvent être rejetées par l'organisme. Dans le cas des autogreffes et allogreffes, la quantité prélevée est faible, ce qui est limitant dans certains cas. Enfin, elles ont rarement les mêmes propriétés mécaniques que le site cible.

Etant donné les inconvénients relevés des autogreffes et allogreffes, les recherches se sont tournées vers le développement de matériaux synthétiques qui pourraient être implantés sur différents sites cibles [35-37]. Les substituts osseux synthétiques présentent différents avantages dont la reproductibilité, l'adaptabilité aux besoins médicaux et un coût plus faible que les

autogreffes/allogreffes traditionnelles [38-39]. Les différents types de biomatériaux synthétiques les plus couramment utilisés sont décrits par la suite.

III.B.1. Substituts osseux phosphocalciques

III.B.1.a. Les orthophosphates de calcium

Les orthophosphates de calcium entrent dans la partie inorganique de la majorité des tissus calcifiés naturels (os, dents, …) et pathologiques (*i.e.* dus à des maladies) des mammifères. Par exemple, les calcifications naturelles et pathologiques sont des cristallisations *in vivo* d'orthophosphates de calcium. De même, les caries dentaires et l'ostéoporose peuvent être considérées comme des dissolutions *in vivo* d'orthophosphates de calcium [40].

Les matériaux synthétiques à base d'orthophosphates de calcium sont donc utilisés pour faire du comblement osseux. Ils tolèrent la colonisation de leur structure par les cellules osseuses et permettent donc la formation d'une nouvelle architecture osseuse par leur propriété d'ostéoconduction. De plus, la plupart des orthophosphates de calcium synthétiques présentent une bonne solubilité dans l'eau, propriété cruciale car elle détermine les phénomènes de dissolution / précipitation qui se produisent *in vivo*. La dissolution *in vivo* de différents orthophosphates de calcium synthétiques est répertoriée dans la littérature dans l'ordre suivant : MCPM > TTCP ~ α–TCP > DCPD > DCPA > OCP > β–TCP > CDA > HA. Dans la pratique cet ordre est cependant relativement peu vérifié expérimentalement [41-42].

Le *Tableau 1* regroupe les phosphates de calcium les plus courants et leur utilisation comme biomatériaux.

Ca/P	Nom	Formule chimique	Acronyme	Application	Solubilité à 25°C, pKs
2,0	Tétracalcium phosphate	$Ca_4O(PO_4)_2$	TTCP	Ciments	38-44
1,67	Hydroxyapatite	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	HA	Céramiques	116,8 très peu soluble
≤ 1,67	Hydroxyapatite carbonatée	$Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-y}(CO_3)_z$	HAC	Ciments	
1,5-1,67	Hydroxyapatite Déficiente en Calcium	$Ca_{10-x}\square_x(PO_4)_{6-y}(HPO_4)_y(OH)_{2-z}$	CDA PHA	Ciments	~85
1,5	β-Tricalcium phosphate	$Ca_3(PO_4)_2$	β–TCP	Céramiques Ciments	28,9
1,5	α-Tricalcium phosphate	$Ca_3(PO_4)_2$	α–TCP	Ciments	25,5
1,33	Octacalcium phosphate	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_{4\cdot5}H_2O$	OCP		96,6
1,0	Dicalcium phosphate Dihydrate (Brushite)	$CaHPO_4.2H_2O$	DCPD	Ciments	6,59
1,0	Dicalcium phosphate Anhydre	$CaHPO_4$	DCP DCPA	Ciments	6,9
0,5	Monocalcium phosphate Monohydrate	$Ca(HPO_4)_2.H_2O$	MCPM	Ciments	1,14 très soluble

Tableau 1: *Les différents Orthophosphates de Calcium et leurs applications dans le domaine médical* [9, 36, 40-41, 43-45]

III.B.1.b. Les céramiques de phosphates de calcium

Les céramiques phosphocalciques sont utilisées sous la forme de granules, de blocs, de suspensions injectables (cf *Figure 6*) ou comme revêtements de prothèses métalliques [46-47].

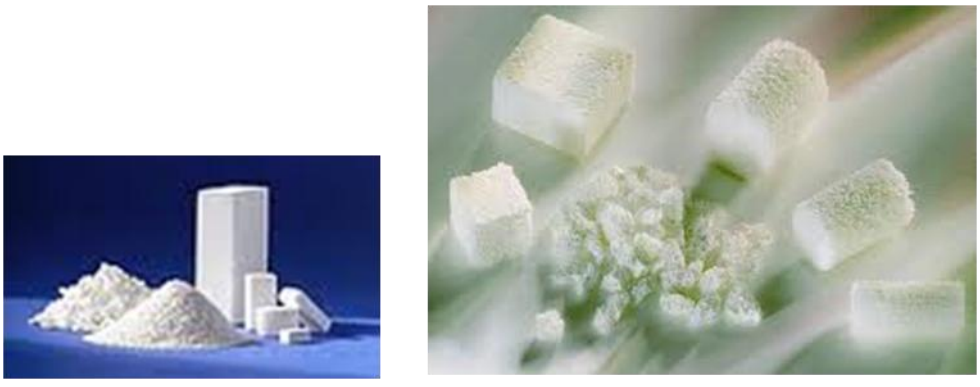


Figure 6 : *Céramiques Phosphocalciques sous forme de blocs à usage médical* [48-49]

L'HA, qui fait partie de cette famille de matériau, est très utilisée comme biomatériau. Elle présente l'avantage d'avoir la composition la plus proche de celle de l'os par rapport aux autres biomatériaux de phosphates de calcium :

Composition de l'os : Apatite Phosphocalcique Carbonatée Poly-substituée

$Ca_{8,3}\square_{1,7}(PO_4)_{4,3}(CO_3)_{1,0}(HPO_4)_{0,7}(CO_3,OH)_{0,3}\square_{1,7}$

Formule de l'HA : $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$

L'HA présente un double avantage : elle est biocompatible et ostéoconductrice. Elle est peu soluble et se dégrade en quelques années en milieu biologique. Elle peut être utilisée seule, combinée avec du β-TCP, et elle peut être dopée avec différents ions (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Cl^-, F^-) pour améliorer ses propriétés physico-chimiques et sa bioactivité [46].

La combinaison de l'HA et du β–TCP, donnant lieu à un matériau céramique biphasique (Biphasic Calcium Phosphate), permet d'allier les propriétés des deux phases : la bonne solubilité du β–TCP [30, 50-51] et la bonne bioactivité de l'HA, permettant la précipitation d'apatite biologique à la surface [52].

Les céramiques phosphocalciques ont de nombreux atouts : leur très bonne biocompatibilité, leur capacité d'ostéoconduction et leur porosité aisément adaptable aux besoins médicaux. Néanmoins elles possèdent aussi des inconvénients, notamment leurs faibles propriétés mécaniques ne permettant pas de les utiliser pour des sites qui nécessitent une résistance mécanique élevée [53-54].

III.B.1.c. Les ciments phosphocalciques : CPC « Calcium Phosphate Cement »

Dans les années 80, Legeros *et al.* [55] ainsi que Brown et Chow [56-57] ont développé des substituts osseux injectables (cf *Figure 7*) : les ciments phosphocalciques (CPC). Ces ciments sont implantés par injection micro-invasive, et permettent ainsi d'éviter des opérations chirurgicales lourdes. Le ciment est administré lors d'un traitement local : il vient combler le défaut osseux tout en permettant à l'os de se reformer dans un laps de temps contrôlable.

Depuis les premières découvertes et utilisations, les études sur des ciments ont augmenté significativement. Beaucoup de ces ciments sont déjà sur le marché (par exemple : α–BSM (ETEX), BoneSource (Stryker-Leibinger Corp.), Eurobone (Kasios), HBS (Graftys), …) [58].

Figure 7 : *Ciment phosphocalcique* [59]

Un CPC est le résultat de l'addition d'une solution aqueuse à un phosphate de calcium, ou à une combinaison de phosphates de calcium. On obtient alors une pâte qui durcit en quelques minutes suite à la réaction de prise (cf *Figure 7*) [38-41, 43, 46, 57-58, 60]. Il est ainsi facile d'imaginer comment le ciment, injecté dans le site cible, prend la forme du site à combler, puis durcit et permet ainsi de combler et de remplacer la partie osseuse manquante (cf *Figure 8*).

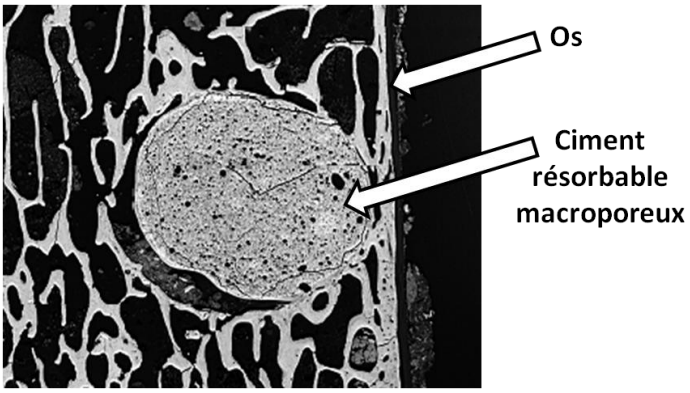


Figure 8 : *Ciment implanté dans un défaut osseux* [15]

Les ciments phosphocalciques ont des atouts tels que leur excellente biocompatibilité, leur ostéoconduction [61] et l'adaptabilité de leur forme (inhérente à leur nature de ciment) au site cible. Leurs propriétés mécaniques et leur surface spécifique sont souvent supérieures à celles des céramiques de phosphates de calcium [46]. Leurs propriétés de biorésorbabilité sont fluctuantes selon la composition du ciment et peuvent donc être adaptées aux problématiques spécifiques des sites à traiter [30].

III.B.2. Substituts osseux non phosphocalciques

III.B.2.a. Les céramiques

Les céramiques, comme l'alumine Al_2O_3 et la zircone ZrO_2, sont classées dans les matériaux bioinertes. Elles ne sont pas dissoutes par les fluides, ni dégradées par les cellules et ne sont pas toxiques pour l'environnement qui les accueille [46, 62].

L'alumine et la zircone sont très utilisées dans la fabrication des têtes de prothèses de hanche.

III.B.2.b. Les verres bioactifs

Les verres développés par Hench *et al.* [27] sont des matériaux appartenant majoritairement au système SiO_2-CaO-Na_2O, avec un ajout de P_2O_5 en faibles quantités. Ils sont biocompatibles, partiellement biorésorbables et ostéoconducteurs. Parmi ces verres, certains possèdent également la propriété particulière d'ostéoinduction, s'ils sont associés à des facteurs de croissances ou à des substances actives : c'est par exemple le cas du bioverre de référence appelé « Bioglass® 45S5 ». La propriété de bioactivité de ces verres est liée à la formation d'une couche, constituée de petits cristaux (40-100 nm) d'Hydroxyapatite Carbonatée (HAC), à la surface du verre lorsqu'ils sont immergés dans un milieu physiologique. Cette couche constitue une interface stable permettant la formation de liaisons chimiques avec l'implant osseux et donc une bonne intégration (stable et durable) à l'environnement biologique. Ces bioverres présentent des propriétés de dissolution qui sont inférieures à celles des céramiques phosphocalciques, mais qui peuvent être modulées en fonction de la composition chimique. En effet, la souplesse du réseau vitreux autorise l'introduction de dopants (Mg^{2+}, K^{+}, Al^{3+}, B^{3+}, Sr^{2+}, …) qui permettent de contrôler les propriétés de dissolution et de moduler les propriétés de bioactivité selon les besoins médicaux [63]. Les bioverres mis au point sont commercialisés et sont utilisés dans des applications comme la reconstruction cranio-maxillo-faciale [4], la reconstruction des osselets de l'oreille interne [3] et la chirurgie dentaire [64].

Suite aux travaux pionniers de L.L. Hench, il a été montré que d'autres verres, de compositions chimiques plus complexes, sont également bioactifs. On peut citer, par exemple, des verres du système Na_2O-CaO-B_2O_3-Al_2O_3-SiO_2-P_2O_5 qui forment à leur surface une liaison avec l'os dans des conditions *in vivo* [65]. Il est important de souligner qu'actuellement seuls les verres (massifs, poudres) obtenus par trempe du liquide de haute température sont utilisés en tant qu'implants chez l'homme. Parallèlement, un grand nombre de travaux portent sur le développement de « verres » macroporeux issus des procédés sol-gel [46]. Néanmoins, ces matériaux ne sont pas encore utilisés pour des applications cliniques.

III.B.3. Autres substituts

III.B.3.a. Les métaux et alliages

Les métaux purs utilisés comme biomatériaux sont l'or (dentaire), le titane (prothèse de hanche, dentaire), le tantale, … Les alliages relativement répandus sont les alliages de titane, ceux de cobalt-chrome (dentaire, prothèse de hanche), les aciers inoxydables, … L'intérêt de ces métaux est leur résistance à la corrosion. Ils ont également de bonnes propriétés mécaniques. Ce sont des matériaux inertes vis-à-vis de l'organisme [66-68]. En ce qui concerne les prothèses de hanche, un revêtement d'hydroxyapatite peut être déposé sur la partie métallique pour favoriser une bonne liaison avec l'os.

III.B.3.b. Les polymères

Il existe également des polymères utilisables comme substituts osseux. L'avantage est qu'ils sont moulables et durcissables *in vivo :* ils s'adaptent donc à la forme du site à traiter. Le polymère le plus couramment cité est le PMMA, très utilisé dans la dentisterie et pour les ciments médicaux.

Les polymères sont des matériaux tolérés par le corps : il y a formation d'une couche de tissu fibreux qui sépare l'os naturel de l'implant. Il n'y a donc pas une réelle bioactivité. Ils ne sont pas biorésorbables, et, quand ils sont dégradés par usure ou frottement, les monomères qu'ils libèrent sont potentiellement toxiques pour le corps.

Certains polymères sont néanmoins biocompatibles, comme le Chitosan, utilisé communément dans la réparation des tissus mous [69]. On peut également citer une étude de Bui *et al.* et Oudadesse *et al.* [70-71] qui ont couplé ce polymère à un bioverre en montrant qu'ils obtiennent de bons résultats de bioactivité.

IV. Traitement de l'ostéoporose

Dans le cadre de l'ostéoporose, les principaux traitements indiqués par la Haute Autorité de Santé sont les bisphosphonates (notés BP) (Alendronate, Risedronate, Ibandronate, Etidronate, …), le ranélate de strontium (Protelos®), les SERMs (modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes, par exemple, le raloxifène) et les parathormones [72]. Dans cette étude, nous décrirons uniquement les BP qui sont les plus communément employés dans le monde.

IV.A. Les Bisphosphonates (BP)

IV.A.1. Présentation de la structure des BP

Les bisphosphonates (BP) présentent la structure moléculaire générale donnée en *Figure 9*.

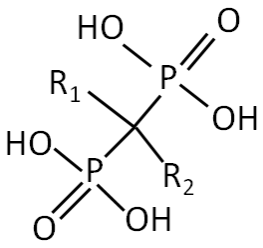


Figure 9 : *Représentation de la structure moléculaire des BP*

Le carbone central confère à ces molécules une certaine stabilité vis-à-vis des dégradations biologiques. Ce carbone relie deux fonctions $PO(OH)_2$ qui sont responsables de deux propriétés cruciales de ces molécules [73-74] :

- former une liaison avec la partie minérale de l'os
- gérer l'activité antirésorptive des cellules

Les deux radicaux R_1 et R_2 peuvent être différents types de groupements. Ils sont responsables de la grande diversité de propriétés actives chez les différents types de BP. Sur la *Figure 10* quelques exemples de BP, avec divers groupements R_1 et R_2, sont présentés.

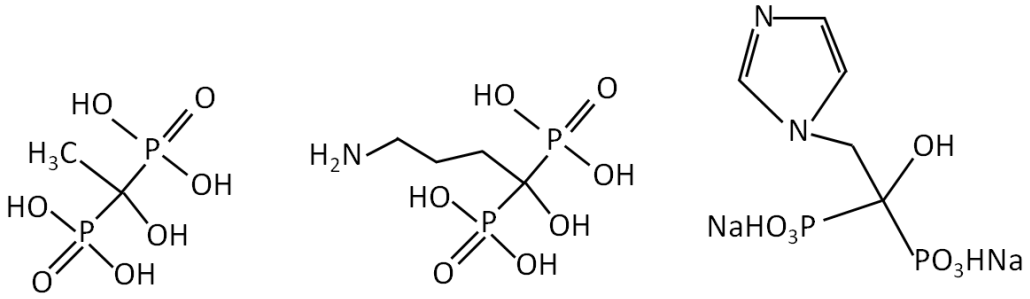


Figure 10 : *Représentation des BP Etidronate, Alendronate et Zoledronate sodique*

IV.A.2. Affinité des BP avec les phosphates de calcium

Il a été montré que les BP inhibent la précipitation et la dissolution des phosphates de calcium, et notamment inhibent l'agrégation des cristaux d'HA [75]. Cette affinité pour l'HA prédit la formation d'une liaison de ces BP avec l'os. Des études ont démontré qu'effectivement, les BP s'adsorbent à la surface de la partie minérale de l'os, soit en formant

un complexe avec des ions calcium, soit par un échange chimique entre groupement PO_3 et PO_4 [75-77]. Tous les BP possèdent cette affinité avec l'os mais à des degrés différents. Les BP qui portent un groupement hydroxyle–OH en position R_1 ont une affinité avec l'HA et avec l'os très supérieure aux autres BP [78-79].

IV.A.3. Activité antiresorptive

La constatation que les BP inhibent la dissolution des cristaux d'HA a conduit à démontrer qu'ils ont également un effet inhibiteur sur la résorption osseuse [78-81]. Effectivement, comme les BP se lient à la partie minérale de l'os par adsorption, ils sont dans le milieu qui contient les ostéoclastes. Beaucoup d'études ont été menées pour élucider le mode d'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes par les BP [82]. Le mode d'action majoritaire des BP est de provoquer l'apoptose (c'est-à-dire l'autodestruction) des OC en agissant comme inhibiteurs cellulaires métaboliques [83].

IV.A.4. Applications, voies d'administration et inconvénients des BP

Les BP sont utilisés dans le traitement de l'ostéoporose [81], mais aussi pour traiter certains cancers. Ils sont administrés par voie orale et par voie intraveineuse. L'administration orale peut provoquer des effets secondaires au niveau de l'appareil digestif (ulcères, œsophagites, ….) et présente une faible biodisponibilité (*i.e.* il n'y a qu'une petite proportion du principe actif qui atteint le site à traiter). L'autre mode d'administration est l'injection intraveineuse. Les effets secondaires de ce mode d'administration sont des symptômes grippaux (fièvre, douleur osseuse, maux de tête) le jour suivant l'injection. Chez certains patients soumis à des injections de bisphosphonates, des cas d'ostéonécrose de la mâchoire ont été constatés et des études ont montré le rapport direct avec ce type de traitement [75, 84-85]. De plus, on constate chez les patients ostéoporotiques des problèmes d'observances du traitement [86-87], ce qui limite l'efficacité sur le long terme des traitements prescrits.

Etant donné les différents inconvénients, il semble nécessaire d'étudier de nouvelles pistes pour traiter l'ostéoporose. Une solution envisagée concerne le développement de supports qui permettent la vectorisation des BP, au niveau des tissus osseux, afin de leur conférer une action locale ciblée, d'augmenter la biodisponibilité et d'éviter leurs effets secondaires.

IV.A.5. Nouveaux biomatériaux pour la vectorisations de BP

Comme les BP possèdent une grande affinité avec les phosphates de calcium, différents types de phosphates de calcium, utilisés comme implants osseux, ont été envisagés comme support de vectorisation ; ces nouveaux biomatériaux fonctionnalisés pouvant être utilisés pour une implantation en site osseux ostéoporotique avant fracture ou bien en chirurgie réparatrice après fracture.

Josse *et al.* [88] ont synthétisé des CDA (Apatites Déficientes en Calcium, qui se rapprochent de la composition de l'os) surfacées avec un BP, le Zolédronate, qui possède de très bonnes propriétés de résorption (dont la structure est présentée sur la *Figure 10*). Sur la base d'études par RMN de ^{31}P, ainsi que des mesures d'adsorption/désorption du BP sur la CDA, il a été clairement montré que le Zolédronate se lie au support de CDA par chimisorption via un échange chimique entre unités PO_3 du BP et PO_4 de la CDA. Ce processus est réversible et le relargage du BP en solution est piloté par la concentration en ions phosphates dans le milieu. Les tests biologiques ont montré qu'il y a bien une forte inhibition de l'activité de résorption des OC par une CDA surfacée avec du Zolédronate. Les études [88-89] sur ce matériau fonctionnalisé ont également montré que les cinétiques de relargage sont compatibles avec l'inhibition de la résorption osseuse, et qu'elles peuvent être contrôlées. Ces résultats suggèrent que ce type de matériau composite pourrait être adapté pour des applications pratiques comme dispositif local de livraison du Zolédronate.

Les biocéramiques biphasiques (BCP), largement utilisées cliniquement, contiennent une proportion importante de β–TCP. De ce fait, Roussière *et al.* [90] ont également étudié l'interaction entre le Zolédronate et le β–TCP. Dans ce cas, il a été montré que la réaction entre une solution de BP et des particules de β–TCP, conduit à une dissolution partielle du β–TCP puis à la précipitation d'un complexe cristallin sodo-calcique de Zolédronate à la surface des particules. Néanmoins, il a été observé *in vitro* que la propriété antiresorptive du BP est conservée par ce complexe.

Plus récemment, des biociments phosphocalciques, intégrant des BP comme agents inhibiteurs de la résorption osseuse, ont également été développés [91]. Comme les BP ont un effet retardateur sur la prise des ciments, Schnitzler *et al.* [91] ont étudié plusieurs modes d'introduction de l'Alendronate dans la composition d'un ciment apatitique : dissolution du BP dans la phase liquide, ajout de la poudre de BP dans la phase solide, et combinaison chimique du BP avec un des composants de la phase solide (α–TCP, CDA, DCPD ou MCPM). Afin de conserver des propriétés d'injectabilité et de prise du ciment compatibles

avec une application clinique, il a montré que la meilleure méthode est de combiner la CDA et l'Alendronate (qui se lie par chimisorption, comme pour le Zolédronate). Des études de l'activité biologique *in vivo* de ce ciment fonctionnalisé, conduites sur des brebis ostéoporotiques (implantation au niveau du col du fémur), ont été concluantes. Elles montrent un fort renforcement des travées osseuses [92].

D'autres travaux ont porté sur le greffage du Zolédronate à la surface d'HA, servant de revêtement aux implants métalliques (prothèses de hanche) et il a été démontré (cf *Figure 11*) *in vivo* que la fonctionnalisation de la surface de ces implants composites par le Zolédronate conduit à une repousse osseuse plus importante que dans la situation sans BP [93]. Cette étude réalisée sur des sites non ostéoporotiques a été complétée par des tests sur des sites ostéoporotiques qui ont montré des résultats similaires [94].
Dans la même optique, Yoshinari *et al.* [95] ont également développé des implants en titane surfacés par de l'HA et de l'Alendronate (autre BP).

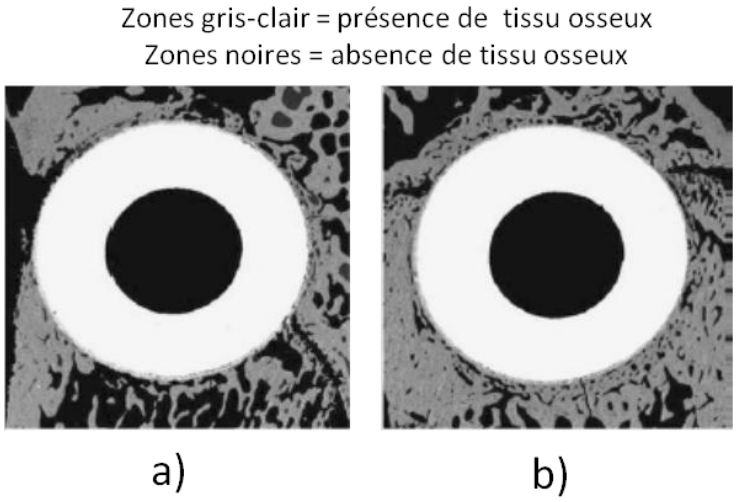


Figure 11 : *Images SEM de deux condyles au sein desquels a été implantée une prothèse métallique (alliage Titane TA6V) revêtue d'HA. Image a) l'HA ne contient pas de Zolédronate Image b) l'HA contient 2 µg de Zolédronate* [93]

Nous avons vu que pour traiter l'ostéoporose ce sont les BP qui sont le plus utilisés. Cependant, il est possible d'utiliser d'autres éléments pour éviter les effets secondaires provoqués par les BP (ulcères, œsophagites, ostéonécrose de la mâchoire, …). Parmi ces éléments on peut citer le gallium qui est connu pour être un agent inhibiteur de la résorption osseuse et un antibactérien. Il semble donc avoir un potentiel médical qui le rend particulièrement attractif dans le développement de nouveaux traitements de l'ostéoporose.

PARTIE 2 :

LES VERRES DE MÉTAPHOSPHATES DE CALCIUM DOPÉS AVEC DU GALLIUM

Les phosphates de calcium cristallins, très répandus sous différentes formes comme biomatériaux dans le domaine de la chirurgie réparatrice osseuse, présentent l'avantage d'avoir une bonne biocompatibilité et, selon leur composition, des propriétés de dissolution variées ainsi que de bonnes propriétés d'ostéoconduction (cf *Partie 1 III.A Définitions*). Ces différents atouts ont permis d'envisager de les utiliser comme dispositif de livraison de principe actif, notamment dans le cadre du traitement de l'ostéoporose. L'ostéoporose est une maladie provoquant une dégénérescence de l'architecture des os par une résorption osseuse anormalement élevée. Les principes actifs utilisés actuellement dans le traitement de cette maladie sont les bisphosphonates. De nos jours, ils sont administrés par voie orale ou par voie intraveineuse, ce qui implique une faible biodisponibilité. De plus, ils présentent des effets secondaires non négligeables. Il est donc nécessaire, d'une part, de développer de nouvelles voies de vectorisation des bisphosphonates, ce qui est, par exemple, l'objet des travaux de Bujoli et de ses collaborateurs [88-91, 96], et, d'autre part, de trouver de nouveaux principes actifs tout en mettant au point des dispositifs capables de les délivrer localement dans l'organisme. L'étude présentée dans cette partie explore une piste, parmi tant d'autres, dans ce domaine de recherche. En termes de vectorisation, nous avons fait le choix d'utiliser une matrice de phosphates de calcium, pour conserver le bénéfice de la biocompatibilité et de l'ostéoconduction, tout en envisageant un matériau vitreux plutôt que cristallin. Les réseaux vitreux, en général, présentent l'avantage d'être souple chimiquement, c'est-à-dire qu'il est aisé de les doper avec différents cations. L'avantage d'un tel procédé est double : d'une part certains de ces cations peuvent permettre de modifier les propriétés de dissolution du verre, il est alors possible, selon le choix du cation, de contrôler la dissolution du verre, et, d'autre part, l'un de ces cations peut être un principe actif adéquate pour traiter telle ou telle maladie. La dissolution du verre dans l'organisme, que l'on peut maîtriser selon les cations introduits, permet alors un relargage contrôlé du cation-principe actif au niveau du site cible. Dans ce cadre, le cation Ga^{3+} est connu pour être inhibiteur de la résorption osseuse. Il est donc un bon candidat pour jouer le rôle de principe actif dans le cadre de l'ostéoporose. Pour implanter ce type de matériau de façon localisée dans l'organisme, il est possible d'utiliser des ciments médicaux déjà très répandus dans le domaine de la chirurgie réparatrice osseuse.

Cette partie décrit la synthèse et la caractérisation structurale de verres de phosphates de calcium dopés avec du gallium, d'une part, dans leur forme initiale, et, d'autre part, après avoir été soumis à un protocole de lixiviation. La caractérisation a été menée, principalement,

par la technique de la RMN, qui permet d'obtenir une description de l'environnement chimique local du matériau étudié tout en donnant la possibilité de quantifier les espèces présentes.

I. Revue bibliographique sur les verres de phosphates de calcium et sur l'élément gallium

I.A. Les verres de phosphates de calcium

I.A.1. Généralités sur les matériaux vitreux

Un matériau dans l'état vitreux est défini comme étant *un solide non cristallin présentant le phénomène de transition vitreuse*.[97] Sa structure est désordonnée et ne présente pas de périodicité tridimensionnelle (au contraire des phases cristallines). Le verre est généralement obtenu par refroidissement rapide (trempe) d'un liquide surfondu. En effet, lorsque la vitesse de refroidissement est supérieure à la vitesse de nucléation, la cristallisation du matériau est évitée et le système est « figé » dans un état métastable : c'est ce qu'on appelle le « verre ».
Le réseau des verres d'oxydes est constitué de tétraèdres AO_4 et/ou de triangles AO_3 [98]. Les oxydes participant à la formation d'un réseau vitreux polymérisé sont appelés « *formateurs de réseau* » et sont principalement SiO_2, P_2O_5, et B_2O_3 [98]. Les oxydes ne participant pas à la formation du réseau vitreux sont appelés « modificateurs de réseau ». L'ajout de ces oxydes conduit à une dépolymérisation du réseau. En effet, lorsque les cations correspondants s'insèrent dans la structure vitreuse, ils cassent les liaisons pontantes A-O-A, créant ainsi des atomes d'oxygènes non-pontants [98]. Les oxydes modificateurs sont typiquement Na_2O, K_2O, CaO, SrO, … Les oxydes « intermédiaires » peuvent jouer un rôle de formateur ou de modificateur de réseau en fonction de la composition chimique du verre [98]. On peut citer les oxydes d'aluminium, de fer et de titane dans cette catégorie.

I.A.2. Structure des verres de phosphates

L'unité de base constituant le réseau des verres de phosphates est le tétraèdre PO_4. Ces tétraèdres sont liés entre eux par des liaisons covalentes P-O-P. En fonction de la composition chimique des verres de phosphates (teneur en oxydes modificateurs), on distingue différents types de tétraèdres en fonction de leurs connectivités, c'est-à-dire en fonction de leur nombre d'atomes d'oxygènes pontants. La classification des tétraèdres se fait *via* la notation Q^n, où n

représente le nombre d'oxygènes pontants par tétraèdre PO_4. Les différents types de tétraèdres Q^n rencontrés dans les phosphates cristallins ou vitreux sont répertoriés dans le *Tableau 2*. On définit cinq domaines de composition pour lesquels il existe généralement des composés cristallins définis [99] :

- Les ultraphosphates ($0 < MO/P_2O_5 < 1$) sont constitués d'unités Q^3 et Q^2 formant un réseau tridimensionnel.
- Les métaphosphates ($MO/P_2O_5 = 1$) sont constitués d'unités Q^2 qui forment des chaînes ou des cycles.
- Les polyphosphates ($1 < MO/P_2O_5 < 2$) dont le réseau est formé d'unités Q^2 et Q^1.
- Les pyrophosphates ($MO/P_2O_5 = 2$) sont constitués d'unités Q^1 qui s'associent pour former des dimères P_2O_7.
- Les orthophosphates ($MO/P_2O_5 \geq 3$) dont la structure est constituée d'unités Q^0.

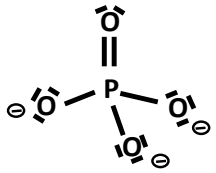
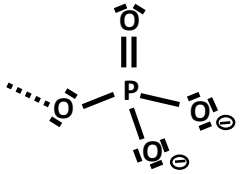
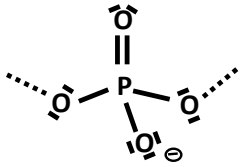
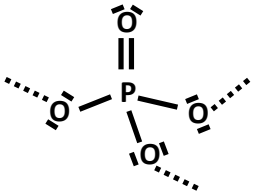
Domaine de composition	Type d'unités structurales	Représentation	Notation
Orthophosphate	Monomères		Q^0
Pyrophosphate	Dimères Unités de fin de chaînes		Q^1
Metaphosphate	Unités de milieu de chaînes		Q^2
Ultraphosphate	Unités de branchement		Q^3

Tableau 2 : *Les différents phosphates et leur géométrie selon la classification Q^n*

À titre d'exemple, le diagramme de phase du système binaire $CaO\text{-}P_2O_5$, indiquant les différents composés cristallins définis de ce système, est présenté par la *Figure 12* [100]. Dans ces phases cristallines, la distribution des unités Q^n est binaire et est fixée par la composition

chimique ; c'est-à-dire que le réseau phosphate est constitué au plus de deux types d'unités Q^n différentes dont les proportions relatives sont liées au rapport MO/P_2O_5. Les structures de l'orthophosphate $Ca_3(PO_4)_2$ (noté C_3P), du pyrophosphate $Ca_2P_2O_7$ (C2P) et du métaphosphate $Ca(PO_3)_2$ (CP) sont donc respectivement constituées uniquement d'espèces Q^0, Q^1 et Q^2. Quant au réseau de l'ultraphosphate CaP_4O_{11} (CP2), il contient 50 % d'unités Q^3 et 50 % d'unités Q^2.

Dans les phosphates vitreux, la distribution des unités Q^n s'écarte d'une loi binaire [99]. Ceci est dû aux réactions de dissociation de type $2Q^n \leftrightarrow Q^{n+1} + Q^{n-1}$ qui ont lieu dans le liquide de haute température et dont la structure est « figée » par trempe. Les constantes d'équilibre k^n de ces réactions dépendent du cation modificateur associé au réseau phosphate [99].

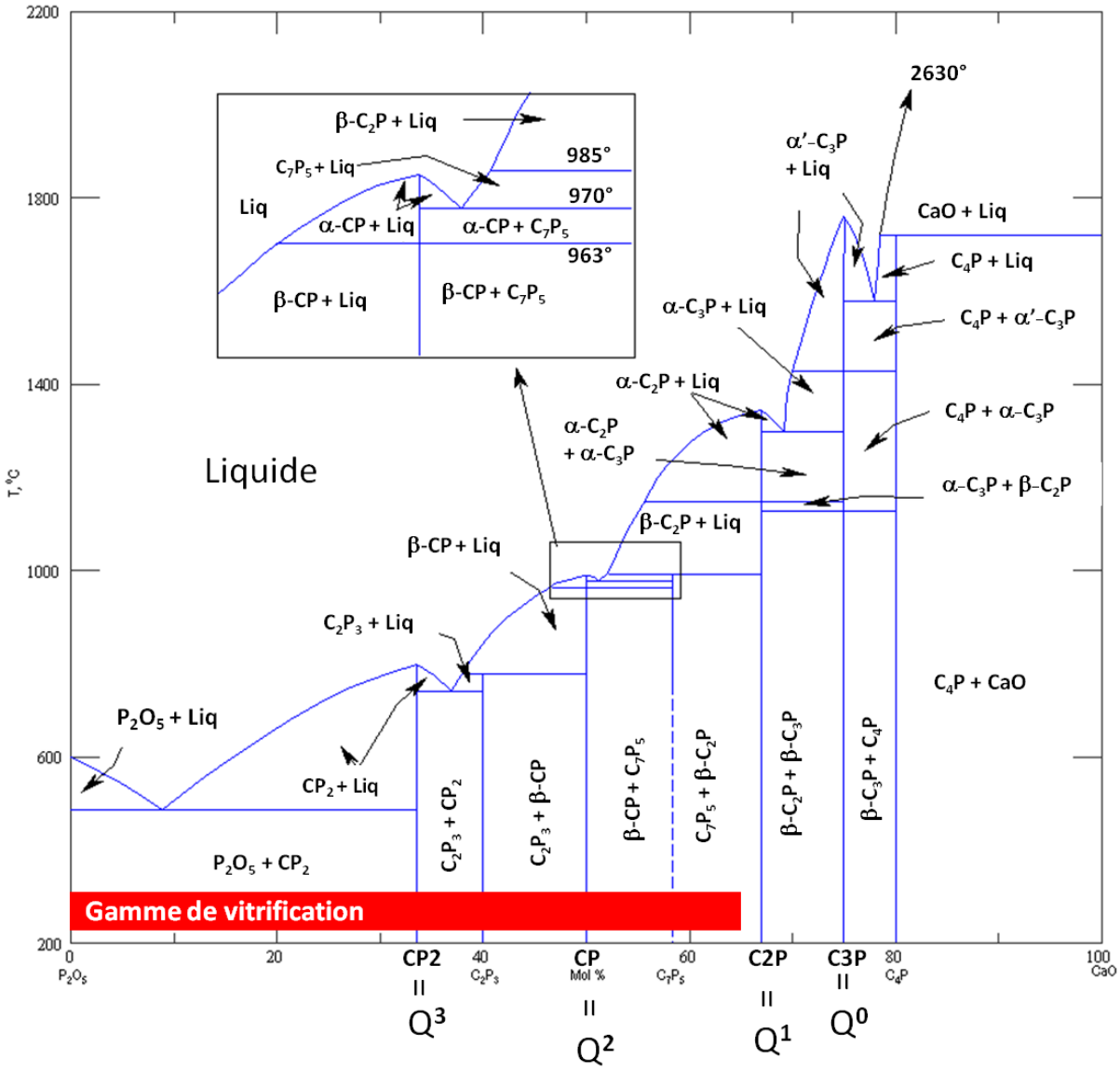


Figure 12 : *Diagramme de phase CaO-P_2O_5 : C = CaO et P = P_2O_5* [100]

Les gammes de vitrification (pour des vitesses de refroidissement de l'ordre de 50-200 K/s) des phosphates binaires dépendent également du type de cations modificateurs. Par exemple, pour les phosphates d'alcalins, le domaine de composition vitrifiable s'étend environ de 0 à 62 %mol de M_2O [99, 101]. Les domaines de vitrification sont plus étendus pour les phosphates de zinc [102] ou de plomb [103]. En ce qui concerne les phosphates de calcium la gamme de vitrification se situe entre 0 et 63 %mol de CaO [104].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à des verres de métaphosphates de calcium, relativement accessibles en termes de conditions d'obtention (température de liquidus de 1100°C) et dont la durabilité chimique est bien meilleure que celle des verres d'ultraphophates qui sont relativement hygroscopiques [99].

I.A.3. Applications en tant que biomatériaux

L'intérêt des métaphosphates de calcium en tant que biomatériaux pour la réparation osseuse a d'abord été démontré dans le cas des systèmes cristallins. En effet, selon L.L. Hench *et al.* [27], les métaphosphates de calcium sont des matériaux capables d'avoir une réponse biologique spécifique à l'interface avec l'organisme, dont il résulte la formation d'une liaison forte entre le tissu osseux et le matériau, tout comme l'hydroxyapatite synthétique et la phase béta du phosphate tricalcique. Park *et al.* [105] ont montré que les métaphosphates de calcium ne provoquent pas de réaction cytotoxique pour l'organisme et suggèrent qu'ils favorisent la différenciation et la croissance des ostéoblastes. Néanmoins, la propriété d'ostéoinduction de ces matériaux n'a pas été confirmée par d'autres travaux. Il a été proposé d'utiliser les métaphosphates de calcium sous forme de fibres [106], de barres poreuses [107], ou de blocs poreux [108] au sein desquels une croissance osseuse est bien observée (*in vitro* et *in vivo*). Lee *et al.* [109] proposent également d'utiliser des matrices poreuses de métaphosphates de calcium pour la différenciation, la formation et la prolifération des ostéoblastes.

Différentes études ont également démontré la biocompatibilité des verres de métaphosphates [110-111]. De plus ces phases vitreuses possèdent des propriétés de dissolution intéressantes, dissolution qui est modulable en jouant sur leurs compositions chimiques. En effet, les verres de phosphates sont connus pour avoir des durabilités chimiques en solution aqueuse plus faibles que celles des verres de silicates [112] mais un dopage de ces verres avec différents ions métalliques permet de contrôler leurs taux de dissolution [31, 113]. Ce dopage permet également d'apporter à l'organisme des ions nécessaires dans le cadre de différents traitements. Dans

cette optique, Gilchrist *et al.* [114] et Sheridan *et al.* [115] ont développé des verres de métaphosphates sodo-calciques dopés avec l'élément Ag, dont les propriétés biocidales lui confèrent une activité anti-infectieuse. Dans d'autres travaux, Valappil *et al.* [1] ont proposé d'utiliser des verres de phosphates dopés avec du gallium en tant qu'agent anti-infectieux et ils ont montré *in vitro* que ces verres inhibaient la prolifération de bactéries comme *Pseudonomas Aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (staphylocoque doré à l'origine de nombreuses infections nosocomiales).

Les verres de métaphosphates de calcium possèdent des propriétés de biocompatibilité et de dissolution intéressantes pour une utilisation en tant que biomatériaux. La capacité de contrôler la dissolution du verre, qui lui est conférée en modifiant sa composition par dopage avec certains cations, permet d'envisager celui-ci comme dispositif de livraison d'un principe actif. Le gallium est un agent inhibiteur de la résorption osseuse et antibactérien : il pourrait donc faire office de principe actif dans le cas de l'ostéoporose.

I.B. Le gallium : un agent d'intérêt thérapeutique

Dmitri Mendeleev prédit, en 1871, un élément analogue à l'aluminium qui serait placé juste en-dessous de celui-ci dans le tableau périodique [116]. Quatre ans plus tard, en 1875, le chimiste français Paul-Emile Lecoq de Boisbaudran découvre ce nouvel élément [117] par spectroscopie. Il le trouve comme élément trace dans un sulfure de zinc (la sphalérite) et non en association avec l'aluminium comme il s'y était attendu. Deux hypothèses sont suggérées pour expliquer le nom « gallium », dont il baptisa cet élément : une latinisation de son nom (le coq → *Gallus* en latin), ou bien, en l'honneur de son pays, une latinisation de « la France » (*Gallia* en latin).

Le gallium (Ga, numéro atomique 31) fait partie du groupe IIIa, période 4, bloc p et sa configuration électronique est [Ar] $3d^{10}$ $4s^2$ $4p^1$. Le gallium est sous forme liquide à température ambiante, comme le mercure, le césium et le rubidium, puisque sa température de fusion est de 29,8°C. Sa température d'ébullition est très élevée : 2403°C. La masse volumique de la phase solide à 29,6°C est de 5,904 g/cm^3. Le gallium à l'état pur ne se trouve pas dans la nature. Il est souvent lié à d'autres éléments. On le trouve par exemple dans le gallite $CuGaS_2$, dans la bauxite et la sphalérite (sulfure de zinc). La production de gallium se fait généralement à partir de la bauxite [118].

I.B.1. Comportement en solution du gallium

En solution aqueuse, le gallium adopte le degré d'oxydation + III [119]. Selon la classification établie par Pearson [120-121], il est considéré comme un acide fort, il se lie facilement avec les bases dures de la classification de Lewis, telles que HO^-, F^-, Cl^-, et forme souvent des chélates par liaisons avec l'oxygène. D'après Wood *et al.* [121-122], le comportement en solution et les propriétés de coordination du Ga^{3+} sont proches de ceux des ions Al^{3+}, In^{3+}, et surtout Fe^{3+}.

Les résultats expérimentaux sur l'hydrolyse du gallium sont relativement rares dans la littérature, par conséquent les données présentées ici sont à considérer avec recul. L'ion Ga^{3+} libre en solution va se coordonner avec six molécules d'eau [123-124], on est donc en présence de Ga^{3+},$(H_2O)_6$. Les molécules d'eau autour du Ga^{3+} sont progressivement remplacées par des groupements hydroxyles selon les équations de réaction :

$$Ga^{3+}, (H_2O)_6 + H_2O \leftrightarrow Ga(OH)^{2+}, (H_2O)_5 + H_3O^+ \quad (3)$$

$$Ga(OH)^{2+}, (H_2O)_5 + H_2O \leftrightarrow Ga(OH)_2{}^+, (H_2O)_4 + H_3O^+ \quad (4)$$

$$Ga(OH)_2{}^+, (H_2O)_4 + H_2O \leftrightarrow Ga(OH)_3, (H_2O)_3 + H_3O^+ \quad (5)$$

Lorsque les groupements hydroxyles remplacent les molécules d'eau il y a production d'ions hydroniums, ce qui provoque une diminution du pH. Lorsque le pH est proche de 2 et que la concentration du gallium dans le milieu est d'environ 10^{-2} M, une partie des unités $Ga(OH)_2{}^+$, $(H_2O)_4$ va précipiter sous la forme d'une phase amorphe proche en composition de $Ga(OH)_3$ [119]. La formation de cette phase amorphe est décrite par la réaction (5). Les autres formes $Ga(OH)_2{}^+$, $(H_2O)_4$ continuent, quant à elles, à être hydrolysées. Lorsqu'on neutralise la solution acide presque tout le gallium dissous en solution précipite sous la forme de cette phase amorphe. Dans ce milieu acide la réaction s'écrit [125]:

$$Ga(OH)_{3(amorphe)} \leftrightarrow Ga^{3+} + 3HO^- \quad (6)$$

Avec le temps, la phase amorphe $Ga(OH)_3$ se transforme en une phase cristalline, moins soluble (et donc plus stable) en milieu neutre, de formule GaO(OH). Cette phase cristalline est néanmoins très soluble en solution basique, au sein de laquelle elle se convertie en ions gallates $Ga(OH)_4^-$ selon la réaction [119, 126]:

$$GaO(OH)_{(cristallin)} + H_2O + HO^- \leftrightarrow Ga(OH)_4^- \quad (7)$$

L'hydrolyse du gallium, *i.e.* les formes sous lesquelles il se retrouve après hydrolyse, dépend donc du pH mais également de la température à laquelle on se place. Benezeth *et al.* [127] ont étudié la spéciation du gallium en solution aqueuse en fonction de la température et du pH. La

Figure 13 donne les diagrammes qu'ils ont établis pour des températures de 25°C et de 250°C.

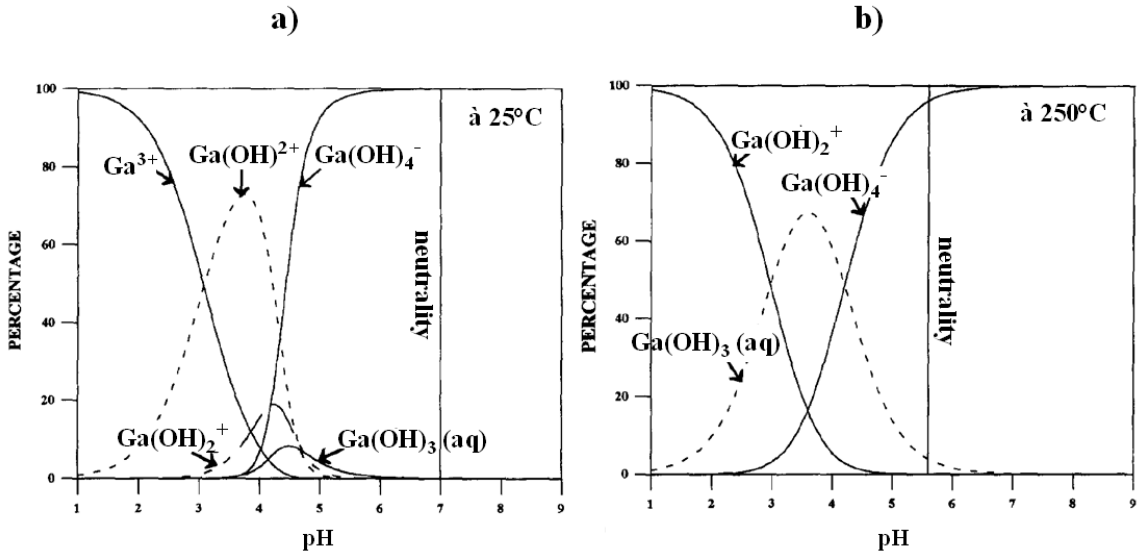


Figure 13 : *Distribution des espèces aqueuses du gallium selon le pH et la température a) à 25°C et b) à 250°C. Les pourcentages sont exprimés en activité d'unités et les lignes verticales représentent le pH neutre* [127].

Pour un pH neutre et une température de 25°C (cf *Figure 13* a), le gallium est majoritairement sous la forme d'ions gallates $Ga(OH)_4^-$. On notera également que les concentrations maximales des espèces les moins chargées, $Ga(OH)_2^+$ et $Ga(OH)_3(aq)$, augmentent avec la température. Ceci peut être expliqué par la décroissance de la constante diélectrique de l'eau lorsque la température du milieu augmente. Cela conduit, par association ionique, à la stabilisation d'espèces moins chargées. Avec l'augmentation de température il y a aussi un déplacement de la gamme de stabilité maximale des espèces hydrolysées vers des pH plus acides. Ce qui implique que les espèces $Ga(OH)_4^-$, $Ga(OH)_2^+$ et $Ga(OH)_3(aq)$ sont les seules présentes pour des pH supérieurs à 1 pour une température de 250°C.

Baes *et al.* [119] et Harris *et al.* [128] ont montré qu'à pH = 7,4 et à 25°C, le gallium est en équilibre avec le $Ga(OH)_4^-$ et a pour solubilité totale 1 µM. Le gallium en solution se répartit alors entre les espèces $Ga(OH)_4^-$ présentes à hauteur de 98,4 % et les espèces $Ga(OH)_3(aq)$ à hauteur de 1,6 %. Les espèces $Ga(OH)_3(aq)$ et GaO(OH) montrent le caractère amphotère du gallium, de façon similaire à l'aluminium, dont la solubilité croît pour des pH basiques et acides. Le minimum de solubilité se situe à $10^{-7,2}$ M pour un pH de 5,2. Pourtant, même à pH = 2, la solubilité totale de ces espèces est uniquement d'environ 10^{-2} M et ne diminue que faiblement ($10^{-3,3}$ M) quand on se trouve à pH = 10 [119]. En outre, le gallium forme également

des phosphates, de formule $GaPO_4$, très peu solubles (la solubilité correspondante est de 10^{-21} M) pour des pH neutres [129].

I.B.2. Activités et applications thérapeutiques du gallium

I.B.2.a. Similarité Ga^{3+}/Fe^{3+}

Selon Bernstein *et al.* [130], les propriétés physiologiques du gallium, et notamment ses interactions avec les protéines et les cellules, seraient dues à la similarité des ions Ga^{3+} et Fe^{3+}. Le tableau suivant (*Tableau 3*) permet de se rendre compte des différences et des similitudes entre le Ga^{3+} et le Fe^{3+} ainsi que quelques-uns des autres métaux du groupe IIIa.

Paramètre	Unités	Ga^{3+}	Fe^{3+}	Al^{3+}	In^{3+}	Références
Rayon ionique (octaédrique)	Å	0,620	0,645	0,535	0,800	[131]
Rayon ionique (tétraédrique)	Å	0,47	0,49	0,39	0,62	[131]
Tendance à la liaison ionique	Ø	7,7	7,2	10,5	6,3	[132-133]

Tableau 3 : *Comparaison des rayons ioniques et de la tendance à former des liaisons ioniques entre le gallium et différents cations*

Le Ga^{3+} et le Fe^{3+} sont très similaires sur deux points : les rayons ioniques et la tendance à créer des liaisons ioniques [134]. À côté de leurs équivalences, ils ont aussi des différences. Les différences biochimiques les plus importantes sont de deux ordres. En termes d'oxydoréduction, l'ion Fe^{3+} peut être réduit en Fe^{2+} alors que Ga^{3+} ne peut pas être réduit. Dans des conditions physiologiques, cette irréductibilité du Ga^{3+} fait qu'il ne s'associe pas aux molécules qui sont liées à un Fe^{2+} (comme les hèmes qui composent l'hémoglobine) [135] et qu'il ne participe pas aux réactions d'oxydoréduction.

De plus, l'ion Fe^{3+} non-lié n'existe pas dans des solutions aqueuses à pH neutre [136]. La possibilité que d'importantes concentrations en ions gallates ($Ga(OH_4^-)$) soient présentes dans le plasma [130] permet des transports et des réactions biochimiques qui ne sont pas possibles avec le Fe^{3+}, qui ne peut exister que lié à des protéines ou des chélates. Des études *in vivo* ont démontré que le gallium est présent dans le plasma grâce à la transferrine (protéine de transport du fer), [136-139] qui joue un rôle crucial dans la division cellulaire et la synthèse de l'ADN.

De manière générale, les cellules cancéreuses possèdent beaucoup de récepteurs à la transferrine. Par conséquent, le gallium entre en compétition avec le fer pour intégrer la

transferrine (même si l'affinité du fer est 400 fois plus importante) et entraine une déficience en fer. Bien que le mécanisme d'intégration du gallium à l'intérieur des cellules ne soit pas encore clairement élucidé, une accumulation de gallium pourrait bloquer la prolifération cellulaire et donc induire l'apoptose des cellules [130, 140].

I.B.2.b. Activité antimicrobienne

En 1931, Levaditi *et al.* [141] ont mis en évidence le potentiel thérapeutique du gallium en utilisant du tartrate de gallium pour traiter la syphilis chez le lapin. Ce potentiel thérapeutique a également été démontré *in vitro* dans le cas d'une autre maladie infectieuse bien connue, la tuberculose [142]. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'effet antibactérien du gallium a été également récemment illustré en mettant en contact des verres de phosphates contenant du gallium avec des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile* qui sont responsables d'infections nosocomiales [1].

I.B.2.c. Utilisation dans le traitement de certains cancers

Des études réalisées par Hart *et al.* [143-144] ont montré que parmi les métaux du groupe III du tableau périodique (aluminium, gallium, indium, thallium) le gallium, sous forme de nitrate de gallium, est le moins nocif et le plus efficace pour réduire la croissance tumorale. Le nitrate de gallium montre aussi une importante activité anti-tumeurs dans le traitement du carcinome urothélial (cancer de portée limitée au niveau de la vessie) et de la vessie [145-147] et de certains lymphomes [148-150]. En revanche, dans le cas de certains cancers comme le mélanome [151], les cancers de la prostate [152], du rein [153], et du sein [154-155], l'utilisation du gallium est controversée.

I.B.2.d. Activité du gallium sur le tissu osseux

Lors d'essais cliniques pour évaluer le gallium comme composé anticancéreux, Warrell *et al.*[2] ont constaté une hypocalcémie (taux de calcium dans le plasma très faible) chez 2/3 des patients. Après différentes études, ils ont découvert que le nitrate de gallium provoque cette hypocalcémie en réduisant la résorption du calcium de l'os. Ceci a ouvert la possibilité de se servir du gallium dans le traitement des hypercalcémies dues à certains cancers. Cela a également permit d'envisager d'utiliser cet élément comme inhibiteur de la résorption osseuse.

L'effet d'inhibition de la résorption osseuse par le gallium a effectivement été mis en évidence par différents travaux. Warrell *et al.* [156-157] ont constaté que le traitement par du nitrate de gallium de patients présentant des métastases osseuses permet de réduire l'ostéolyse. Des études réalisées sur des patients atteints de myélome, traités par chimiothérapie avec du gallium, ont montré une diminution de la perte osseuse [158-159]. On peut recenser plusieurs études portant sur l'inhibition de l'activité de résorption des ostéoclastes par le gallium [2, 160-162], notamment dans le cadre de la maladie de Paget (dysfonctionnement du remodelage osseux) [163-164]. L'étude de Donnelly *et al.* [165] indique que cet effet inhibiteur du gallium sur les ostéoclastes ne provoque ni la mort ni la détérioration de ces cellules. Ce point est appuyé par Blair *et al.* [166] et Hall *et al.* [162], qui montrent, en outre, que l'effet inhibiteur du gallium sur l'activité ostéoclastique dépend de sa concentration. Une étude récente, réalisée par Verron *et al.* [167], complète les travaux précédemment cités en indiquant que la viabilité des ostéo**c**lastes n'est pas menacée tant que la concentration en gallium est inférieure à 100 µM. Sur ce point, Blair *et al.*, font la différence entre cytotoxicité réversible et irréversible. Ils fixent la limite de cytotoxicité réversible à 50 µM [166]. Verron *et al.* [167] montrent également que le gallium n'a pas d'effets néfastes sur la viabilité des ostéo**b**lastes (cellules responsables de la formation osseuse). Dans le cadre de l'ostéoporose à proprement parler, des études *in vivo* sur un modèle petit animal (rat), réalisés par Ma *et al.* [168-169], ont montré que le gallium est efficace pour réguler l'hyperactivité ostéoclastique qui se produit au sein de cette maladie.

Cependant, le mécanisme d'accumulation du gallium dans la partie minérale de l'os n'est pas encore clairement élucidé, ni la forme chimique sous laquelle il se retrouve [161, 170-171].

I.B.3. Vectorisation du gallium

Aujourd'hui, le gallium est utilisé le plus couramment sous forme de nitrate de gallium. Les modes d'administration actuels présentent des inconvénients majeurs. D'une part, l'administration par voie orale implique une faible biodisponibilité de ce composé pour le site cible, et, d'autre part, l'administration de solution de nitrate de gallium par voie intraveineuse nécessite souvent d'être faite en continu sur des temps longs, ce qui peut provoquer, à terme, une toxicité pour l'organisme. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles voies de vectorisation du gallium permettant une action ciblée au sein des tissus osseux. Dans ce contexte, le développement de substituts osseux phosphocalciques intégrant du gallium

apparait prometteur. De plus, les différents phosphates de calcium biocompatibles (HA, β-TCP, DCPD), déjà largement utilisés, présentent une gamme de solubilité relativement large (pKs de 116,8 ; 28,9 et 6,59, respectivement, cf *Partie 1 III.B.1.a. Tableau 1*). Ces propriétés de solubilité pourront permettre de piloter le relargage du gallium (tant qu'il reste à des teneurs de dopant).

Dans la littérature, le développement de substituts osseux phosphocalciques dopés avec du gallium a, jusqu'à maintenant, fait l'objet d'un nombre restreint de travaux. Parmi ceux-ci, Korbas *et al.* [171] se sont intéressés à la substitution Ca/Ga dans de DCPD et l'HA. L'intérêt du DCPD est qu'il possède une solubilité élevée (pKs = 6,59), ce qui permet un relargage rapide du gallium. *A contrario*, l'HA est très peu soluble (pKs = 116,8) et peut donc permettre une livraison du gallium sur le long terme. Concernant l'HA dopée avec du gallium, Melnikov *et al.* [172] ont montré que l'insertion du gallium dans la structure de l'HA n'a pas d'effet négatif sur la compatibilité de ce matériau avec l'os naturel. Récemment, Mellier *et al.* [173] ont montré qu'il était également possible de substituer une partie des ions calcium par des ions gallium dans la structure du β-TCP.

Comme nous l'avons dit précédemment, la durabilité chimique des verres de phosphates de calcium peut être modulée par ajout d'autres cations. Cela offre la possibilité de développer un système contenant du gallium en tant qu'agent inhibiteur de la résorption osseuse, dont les propriétés de dissolution en phase aqueuse peuvent être ajustées aux besoins médicaux. Dans ce but, nous avons tout d'abord synthétisé des verres de métaphosphates de calcium avec des teneurs variables en gallium, puis nous avons caractérisé leurs structures et étudié les propriétés de relargage du gallium qu'ils présentent en solution.

II. Etude de la structure des verres de métaphosphates de calcium dopés avec du gallium

Comme tous les solides vitreux, les verres de phosphates ont une structure désordonnée. L'absence de périodicité et de contraintes de symétrie qui lui sont associées permet à leur structure d'accepter facilement l'insertion de différents cations. De ce fait, les verres de phosphates peuvent être considérés comme un dispositif de livraison de cations ayant des propriétés biologiques intéressantes. De plus, l'ajout de certains dopants dans le réseau vitreux permet de moduler la durabilité chimique du matériau. Les verres de métaphosphates de calcium, qui sont biocompatibles, apparaissent donc comme des matériaux à fort potentiel dans le cadre du développement de biomatériaux pour la vectorisation de principes actifs.

L'étude rapportée ici concerne des verres de métaphosphates de calcium dopés avec un agent inhibiteur de la résorption osseuse : le gallium. Dans une première partie nous détaillerons la synthèse et la caractérisation de ces verres, principalement réalisée par RMN. Dans un second temps, nous présenterons les résultats obtenus après immersion de ces matériaux dans différentes solutions.

II.A. Synthèse et analyses préliminaires

Les verres de métaphosphates mixtes calcium/gallium ont été synthétisés selon la méthode classique de fusion suivie d'une trempe d'un mélange de poudre. Les compositions chimiques des échantillons synthétisés s'écrivent $x[Ga(PO_3)_3]$ $(1-x)[Ca(PO_3)_2]$ avec x= 0 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,30.

Les composés utilisés pour réaliser les mélanges de poudre initiaux sont le dihydrogène phosphate d'ammonium $NH_4H_2PO_4$ (98,0 %), le carbonate de calcium $CaCO_3$ (≥99,0 %) et l'oxyde de gallium Ga_2O_3 (99,999 %). Les proportions relatives des différentes poudres sont ajustées par pesée en fonction de la composition chimique du verre synthétisé. Ces poudres sont broyées manuellement dans un mortier en agate, mélangées puis introduites dans un creuset Pt/10 %Rh. La synthèse comporte deux traitements thermiques. Un premier cycle thermique de dégazage (cf *Figure 14*) est appliqué avec une vitesse de montée en température de 5°C/min, puis, un palier de 3 h à 300°C est réalisé pour éliminer l'eau et l'ammonium selon la réaction :

$$2(NH_4H_2PO_4) \rightarrow 2NH_3 + 3H_2O + P_2O_5 \qquad (8)$$

Le mélange est ensuite refroidit (10°C/min) jusqu'à la température ambiante et un second broyage du mélange de poudre est effectué.

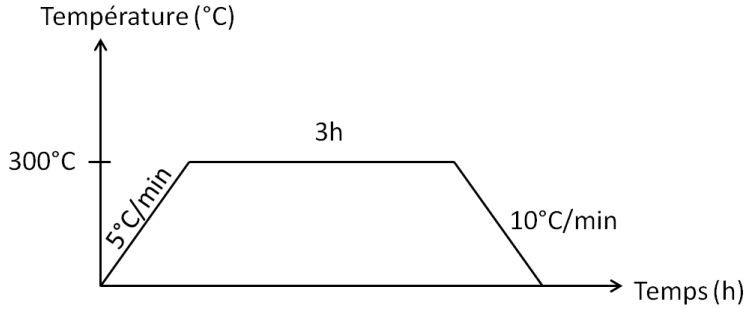


Figure 14 : *Cycle de dégazage*

Le deuxième cycle thermique consiste en une montée en température (5°C/min) de la température ambiante jusqu'à 1100°C. Durant ce second cycle, la décarbonatation se produit à 825°C. La fonte est maintenue pendant 20 minutes à 1100°C, puis, une trempe à l'eau de l'échantillon est effectuée. Le verre obtenu est démoulé, broyé et remis dans le creuset. Celui-ci est à nouveau introduit dans le four et est maintenu à 1100°C pendant 20 minutes. Une seconde trempe à l'eau est ensuite réalisée. Cette étape de broyage, effectuée entre deux cycles de fusion/trempe, permet une meilleure homogénéité chimique du verre. Les verres obtenus, selon ce protocole (cf *Figure 15*), sont stockés et manipulés en boîte à gants pour éviter toute contamination atmosphérique.

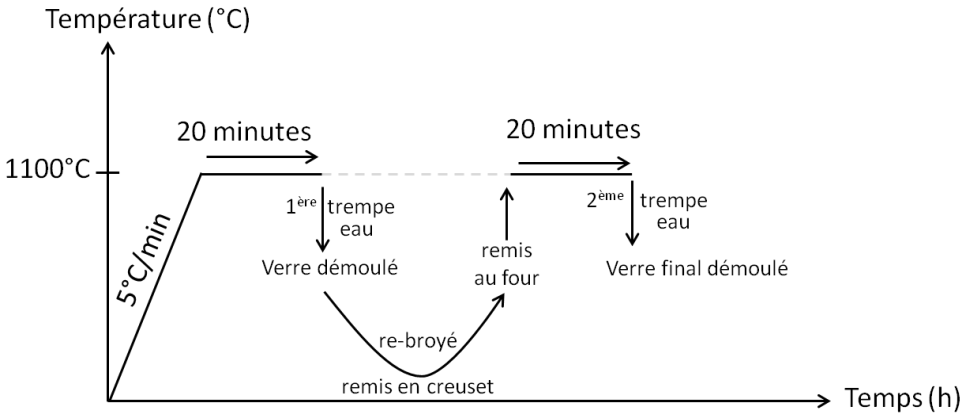


Figure 15 : *Cycle de trempe – deux trempes successives*

Les compositions nominales des verres x[$Ga(PO_3)_3$] (1-x)[$Ca(PO_3)_2$] synthétisés sont données par le *Tableau 4*.

x	$GaO_{1,5}$	CaO	P_2O_5	$GaO_{1,5}$	CaO	P_2O_5
	%molaires			%massiques		
0	0,00	50,00	50,00	0,00	28,28	71,72
0,01	0,50	49,38	50,12	0,94	27,72	71,35
0,02	1,00	48,76	50,25	1,86	27,16	70,98
0,05	2,47	46,91	50,62	4,50	25,56	69,93
0,10	4,88	43,90	51,22	8,59	23,09	68,32
0,15	7,23	40,96	51,81	12,31	20,84	66,84
0,20	9,52	38,10	52,38	15,72	18,79	65,50
0,25	11,76	35,29	52,94	18,85	16,89	64,26
0,30	13,95	32,56	53,49	21,73	15,15	63,12

Tableau 4 : *Compositions nominales des verres synthétisés*

Les compositions chimiques des différents verres synthétisés ont été déterminées par analyse EDX sur un Microscope Électronique à Balayage environnemental Philips XL 40 ESEM équipé d'un spectromètre Energy dispersive X-ray Kevex Quantum Delta. Après polissage puis métallisation des échantillons, une quantification des atomes de phosphore, de gallium et de calcium a été effectuée en utilisant comme étalon un échantillon cristallin de CaP_2O_6 de haute pureté.

Les résultats des analyses EDX sont donnés dans le *Tableau 5*, où l'écart à la composition nominale est exprimé par les rapports atomiques Ga/Ca et (Ca+Ga)/P.

Ce tableau indique également le nombre d'atomes d'oxygène non-pontants par tétraèdre PO_4 (O_{NB}), donné par la relation :

$$O_{NB} = \frac{(3[Ga] + 2[Ca])}{[P]} \quad (9)$$

Pour un verre de métaphosphate, le nombre d'atomes d'oxygène non-pontants par tétraèdre PO_4 doit être égal à 1. Cette quantité permet donc une lecture directe de l'écart à la stœchiométrie métaphosphate.

x nominal	x (EDX) ±0,006	(Ga+Ca)/P nominal	(Ga+Ca)/P (EDX) ±0,006	O_{NB} ±0,014
0	0,00	0,50	0,50	1,00
0,01	0,01	0,50	0,50	1,01
0,02	0,02	0,50	0,50	1,00
0,05	0,04	0,49	0,48	0,97
0,10	0,09	0,48	0,48	1,00
0,15	0,12	0,47	0,46	0,98
0,20	0,17	0,45	0,45	0,97
0,25	0,22	0,44	0,42	0,94
0,30	0,27	0,43	0,41	0,94

Tableau 5 : *Résultats obtenus par EDX*

Dans la suite de cette étude tous les verres seront notés à partir du x déterminé par EDX indiqués dans le *Tableau 5*. Les compositions chimiques des verres synthétisés sont positionnées sur le diagramme ternaire CaO-Ga_2O_3-P_2O_5 (cf *Figure 16*), sur lequel la ligne de composition métaphosphate (système binaire $Ca(PO_3)_2$-$Ga(PO_3)_3$) est représentée par le trait rouge.

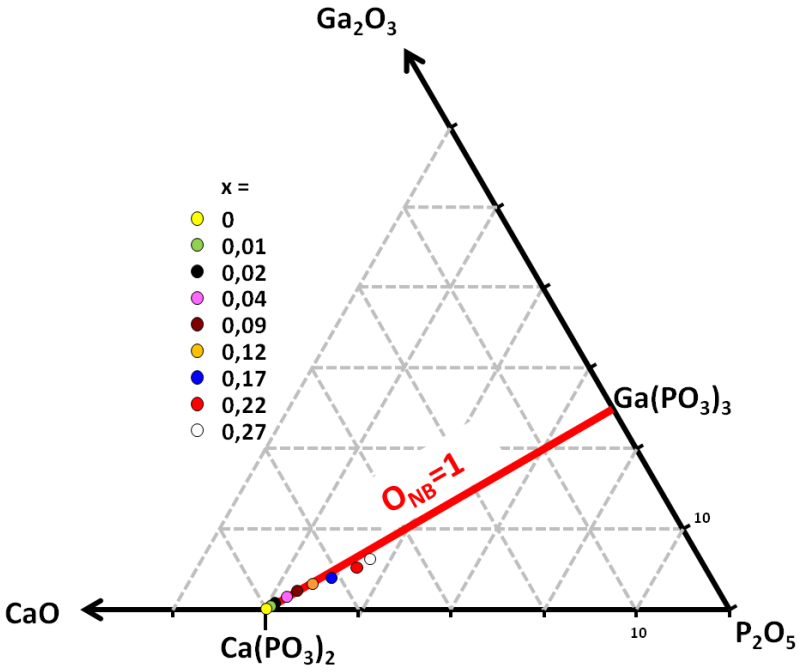


Figure 16 : *Diagramme Ternaire CaO-Ga_2O_3-P_2O_5 : position des verres synthétisés*

Les densités des verres synthétisés, mesurées par la méthode d'Archimède dans du Xylène, sont données par le *Tableau 6*.

Echantillon x_{th}	ρ ±0,03 g/cm^3
0	2,64
0,01	2,64
0,02	2,65
0,04	2,68
0,09	2,72
0,12	2,69
0,17	2,70
0,22	2,66
0,27	2,69

Tableau 6 : *Densités des verres étudiés*

II.B. Caractérisation structurale par RMN du ^{31}P et du ^{71}Ga

II.B.1. RMN du ^{31}P

II.B.1.a. Conditions expérimentales

L'*Annexe 1* présente la technique de la RMN ainsi que les principales expériences utilisées dans cette étude. Les spectres RMN en rotation à l'angle magique (MAS) des verres et des échantillons cristallins de référence ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance I dans un champ magnétique de 7,0 T, en utilisant une sonde double-résonance MAS Bruker et des rotors de diamètre 4 mm (volume d'échantillon de 0,18 mL).

Les spectres MAS du ^{31}P ont été acquis après une simple impulsion radiofréquence de 0,6 µs (correspondant à un angle de basculement de l'aimantation de 15°). La durée de l'expérience est de 6 secondes. Les temps de recyclage utilisés varient de 60 à 90 s en fonction du temps de relaxation longitudinal, et ont été choisis de manière à obtenir des spectres quantitatifs. Les spectres ont été enregistrés en utilisant différentes fréquences de rotation de l'échantillon afin d'identifier les raies de résonance isotropes et les bandes de rotation. Les déplacements chimiques du ^{31}P ont été référencés par rapport à la raie de résonance d'une solution de H_3PO_4 à 85 %.

II.B.1.b. Résultats

II.B.1.b.(i) Étude sur le verre de métaphosphates de calcium pur (x=0)

Dans un premier temps, nous présenterons les résultats obtenus par RMN du ^{31}P pour le verre de métaphosphates de calcium sans gallium. Les spectres RMN MAS du ^{31}P, enregistrés à différentes fréquences de rotation pour cet échantillon, sont représentés sur la *Figure 17*.

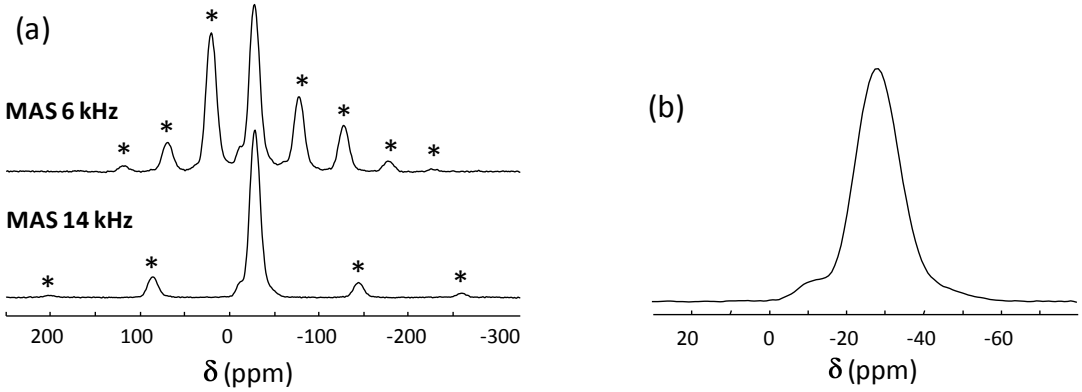


Figure 17 : *(a) Spectres RMN MAS du ^{31}P du verre de composition $Ca(PO_3)_2$ obtenus pour des fréquences de rotation de 6 et 14 kHz (B_0 = 7,0 T). Les astérisques indiquent les bandes de rotation (b) Zoom sur les raies isotropes*

Pour des fréquences de rotation de l'échantillon supérieures ou égales à 6 kHz, on observe une séparation nette entre les raies isotropes et les bandes de rotation sur les spectres MAS du ^{31}P, ce qui permet de voir que la partie isotrope du spectre contient trois contributions partiellement recouvrantes.

D'après leurs déplacements chimiques, les trois contributions peuvent être attribuées à différents types d'unités Q^n [174]:

- le pic de plus forte intensité avec un déplacement chimique isotrope moyen de -30 ppm est attribué aux espèces Q^2
- la raie dont le barycentre se situe vers -10 ppm correspond aux unités Q^1
- l'épaulement observé vers -45 ppm est attribué aux unités Q^3.

Cette attribution s'appuie sur une étude préliminaire qui nous a permis de préciser les gammes de déplacements chimiques isotropes des unités Q^n dans les phosphates de calcium cristallins, ainsi que sur les données de la littérature [175-177] (cf *Figure 18* et *Tableau 7*).

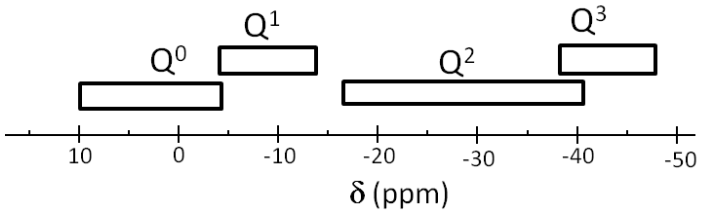


Figure 18 : *Gammes de déplacements chimiques isotropes des unités Q^n dans les phosphates de calcium cristallins*

Composé	Sites	Unités Q^n	δ_{iso} (ppm)
$Ca_2P_6O_{17}$ [176]	3 2 1	Q^3 Q^2 Q^2	-43,2 -40,6 -35,3
γ–$Ca(PO_3)_2$ [175]	1 2 3 4	Q^2 Q^2 Q^2 Q^2	-29,7 -26,3 -22,7 -17,2
β–$Ca(PO_3)_2$	1 2 3 4	Q^2 Q^2 Q^2 Q^2	-31,7 -30,1 -29,9 -27,3
β–$Ca_2P_2O_7$	1 2 3 4	Q^1 Q^1 Q^1 Q^1	-10,1 -8,6 -8,1 -7,1
α–$Ca_2P_2O_7$	1 2	Q^1 Q^1	-10,0 -7,7
α–$Ca_3(PO_4)$	1 à 12	Q^0	De 5 à -1
$Ca_4(PO_4)_2O$	1 2,3 4	Q^0 Q^0 Q^0	4,9 3,6 4,0

Tableau 7 : *Déplacements chimiques isotropes pour différents phosphates de calcium*

On notera également la présence de raies larges dans le verre par rapport à la phase cristalline (cf *Figure 19*). Ce fort élargissement des raies de résonance du ^{31}P dans la phase vitreuse, par rapport à celles observées pour des échantillons cristallins, témoigne du désordre structural qui règne dans la phase vitreuse. Ce désordre structural est dû aux variations des distances et des angles de liaison pour chaque type d'unités Q^n [174]. Il dépend également, selon la

contribution considérée, du type de tétraèdre qui est attribuée à cette contribution Q^n [103, 178-179].

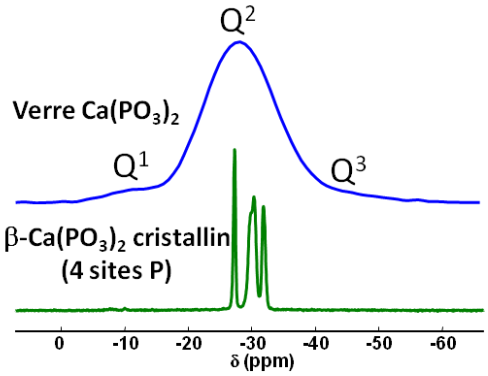


Figure 19 : *Spectres RMN MAS ^{31}P du verre $Ca(PO_3)_2$ et de la phase cristalline β–$Ca(PO_3)_2$*

Pour pouvoir quantifier la présence de chacune des espèces, il est nécessaire de prendre en compte l'aire sous chaque raie isotrope mais aussi l'aire sous chaque bande de rotation, ce qui peut être réalisé en simulant l'intégralité du spectre avec un jeu de raies gaussiennes, mais cela nécessite l'ajustement d'un grand nombre de paramètres. Une approche alternative consiste à reconstruire le spectre de vitesse infinie en utilisant le processing TOP [180] (*Two-dimensional One Pulse* spectroscopy [181-182]). Le spectre ainsi obtenu est débarrassé de toute bande de rotation, et l'aire sous les raies correspond à la totalité de l'intensité pour chaque espèce qu'elles représentent. On obtient ainsi le spectre de la *Figure 20*.

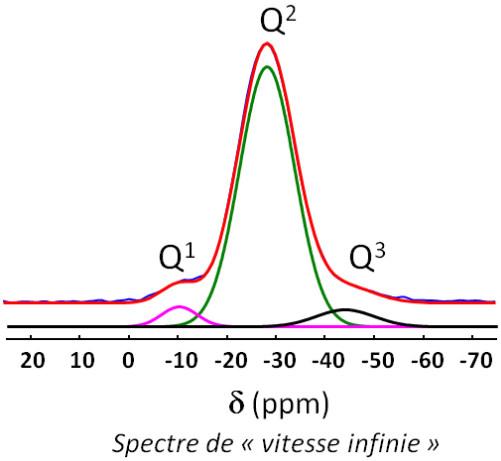


Figure 20 : *Spectre RMN MAS ^{31}P de vitesse infinie obtenu selon le processing TOP et sa simulation avec trois composantes correspondant aux unités Q^2, Q^1 et Q^3.*

Ce spectre de vitesse infinie peut être facilement simulé à l'aide de trois raies de formes gaussiennes (cf *Figure 20*) correspondant aux trois unités Q^1, Q^2 et Q^3 attribuées ci-avant. Il

est alors possible de quantifier la présence de chacune de ces espèces. Comme attendu pour un verre de métaphosphates, les unités Q^2 sont prépondérantes (89,7 %), alors que les unités Q^1 et Q^3 sont faiblement présentes (4,3 % et 6 %, respectivement). La présence de ces deux dernières unités dans le verre (alors qu'elles sont absentes dans la phase cristalline de même composition) est régie par un équilibre qui se produit dans le liquide de haute température avec les unités Q^2, et qui s'écrit [174]:

$$2Q^2 \leftrightarrow Q^1 + Q^3 \qquad (10)$$

Cette réaction de dissociation a une constante d'équilibre k^2 qui dépend de la nature du cation modificateur de réseau. La valeur de cette constante d'équilibre peut être calculée à partir de la quantification RMN de chaque espèce Q^n. Dans le cas présenté ici, sa valeur est de 3.10^{-3}.

II.B.1.b.(ii) Étude sur les différents verres de métaphosphates dopés avec du gallium

À la suite de cette étude sur le verre $Ca(PO_3)_2$ sans gallium, nous avons enregistré les spectres RMN MAS ^{31}P de chacun des verres dopés avec une teneur croissante en gallium. Nous avons systématiquement appliqué le processing TOP afin d'obtenir des spectres de vitesse infinie permettant une quantification plus directe. Les spectres MAS conventionnels (*Figure 21 a*) et ceux obtenus après l'application du processing TOP (cf *Figure 21 b*) sont montrés ci-dessous :

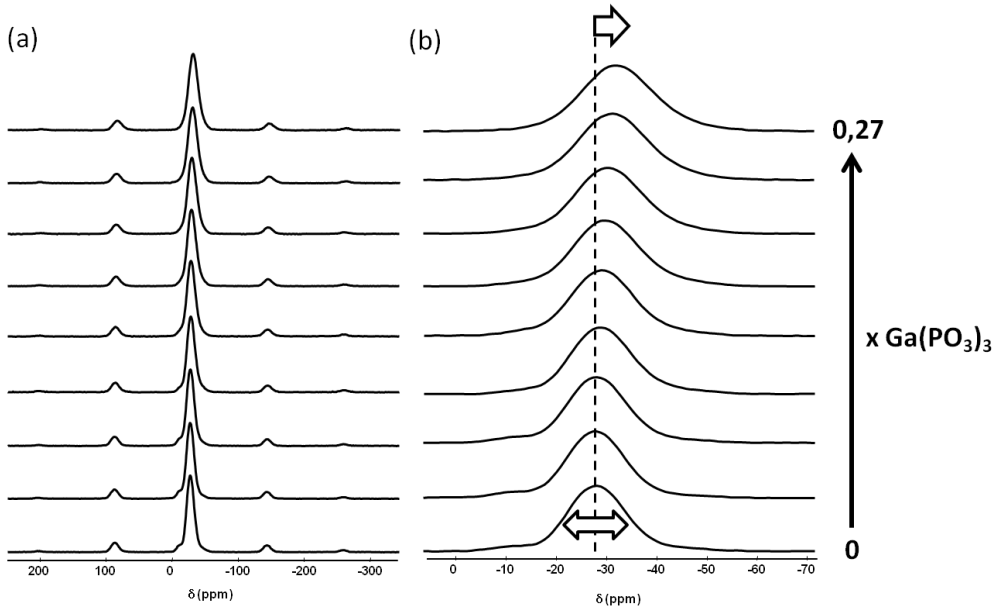


Figure 21 : *(a) Spectres RMN MAS ^{31}P des verres enregistrés à une fréquence de rotation de 14 kHz (b) Spectres de vitesse infinie correspondants obtenus par le processing TOP [180].*

Sur ces spectres, deux paramètres RMN témoignent des modifications qui se produisent au sein du matériau lorsque la teneur en gallium dans la composition du verre augmente.
Tout d'abord, on observe un décalage progressif des déplacements chimiques isotropes moyens vers des valeurs plus négatives comme le montre la *Figure 22* pour les unités Q^2.

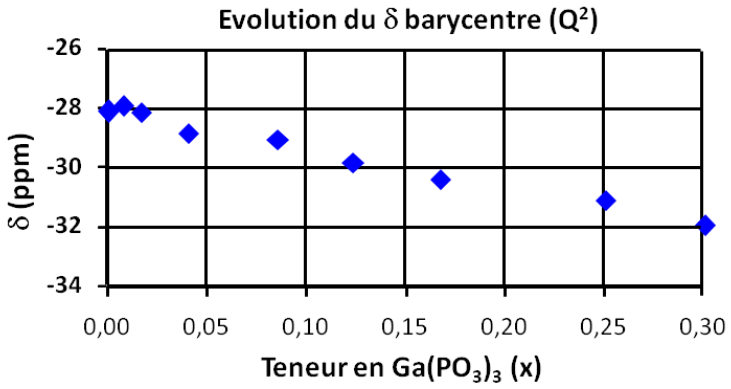


Figure 22 : *Evolution du barycentre des déplacements chimiques isotropes des unités Q^2 en fonction de la teneur en gallium dans le verre*

Ce décalage vers les basses fréquences témoigne d'une augmentation progressive du nombre de galliums en seconde sphère de coordinence du phosphore. Il est dû à la substitution du calcium par un cation dont le potentiel cationique est plus fort. Cet effet a déjà été reporté dans la littérature pour des verres de métaphosphates [101]. La *Figure 23* illustre clairement cet effet dans le cas de métaphosphates cristallins : plus le cation a un rayon ionique élevé et est peu chargé, plus les déplacements chimiques ^{31}P se trouvent à des valeurs positives. C'est le cas de la famille des métaphosphates de formule M^+PO_3. Dans le cas des cations ayant un rayon ionique faible et étant fortement chargé, comme c'est le cas du Ga^{3+} et de l'Al^{3+}, le déplacement chimique isotrope moyen du ^{31}P se situe à des valeurs beaucoup plus négatives. Sur cette figure, ainsi que sur la *Figure 24*, qui présente les spectres expérimentaux des $Ca(PO_3)_2$ et $Ga(PO_3)_3$ cristallins, on observe également que les déplacements chimiques du ^{31}P des quatre sites cristallographiques de $Ca(PO_3)_2$ se situent à des valeurs plus positives que les déplacements chimiques isotropes des différents sites phosphores du $Ga(PO_3)_3$.

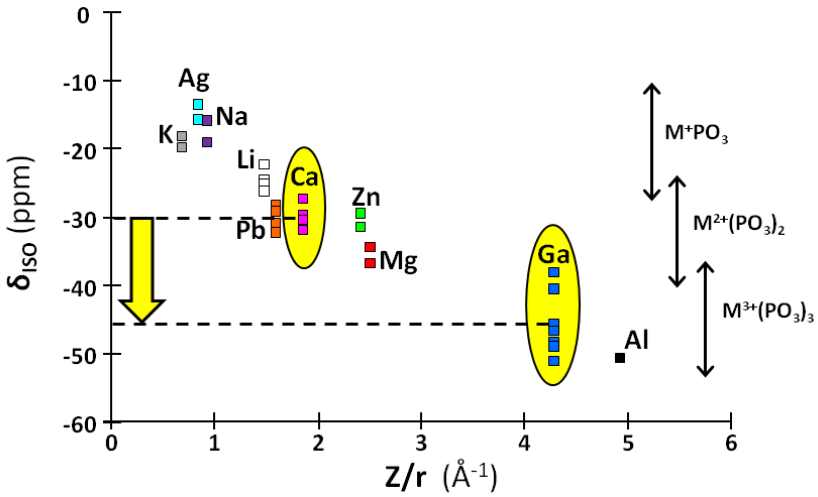


Figure 23 : *Evolution du déplacement chimique isotrope moyen de la forme métaphosphate cristalline en fonction du type de cation associé, représenté par le potentiel cationique Z/r (M^+ représentant le cation)*

Il est naturel de faire le lien direct entre le décalage constaté en comparant le barycentre du déplacement chimique isotrope du composé $Ca(PO_3)_2$ (4 inéquivalents cristallographiques) avec celui du composé $Ga(PO_3)_3$ (9 inéquivalents cristallographiques), dans leur forme cristalline (cf *Figure 24*), et ce même type de décalage qui se produit dans les verres étudiés ici. En effet, avec l'ajout de gallium dans la composition, il y a un remplacement progressif des espèces cations Ca^{2+} par des cations Ga^{3+} dans la seconde sphère de coordinence du phosphore. Le décalage progressif du déplacement chimique isotrope moyen des raies vers des valeurs plus négatives reflète cette insertion du gallium dans le réseau. Celle-ci se fait de façon de plus en plus marquée avec l'augmentation de la teneur en gallium du verre. Ce décalage traduit également la formation progressive d'environnements mixtes calcium/gallium pour les groupements phosphates. Il n'y a pas formation de domaines de phosphates de gallium dans une matrice de phosphates de calcium.

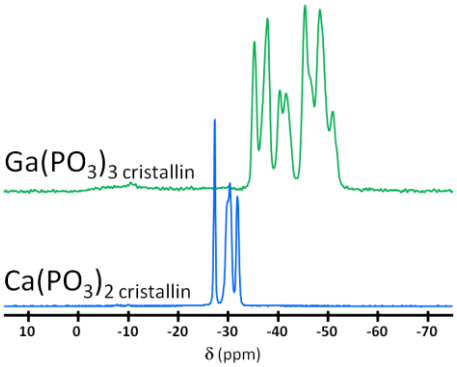


Figure 24 : *Spectres RMN MAS ^{31}P (7 T, 14 kHz) des phases cristallines $Ga(PO_3)_3$ et $Ca(PO_3)_2$.*

On observe également que la largeur des raies de résonance du ^{31}P augmente avec l'ajout de gallium, comme le montre la *Figure 25* pour les unités Q^2.

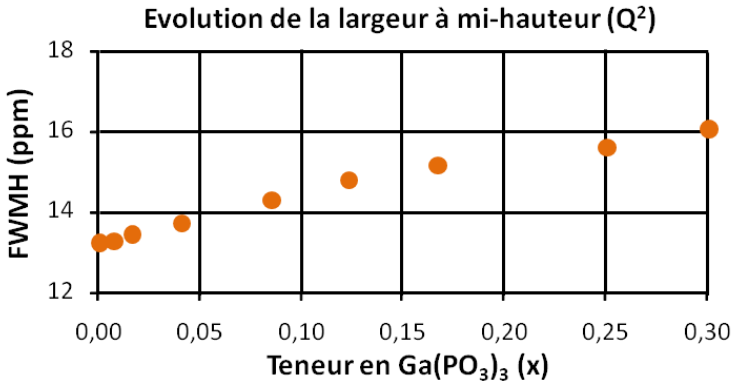


Figure 25 : *Evolution de la largeur à mi-hauteur de la raie des unités Q^2 en fonction de la teneur en gallium du verre*

Dans le cas du ^{31}P, la largeur des raies observées sur les spectres MAS est principalement due à une distribution de déplacement chimique qui reflète directement le désordre structural local. Si la largeur des raies augmente, cela signifie que le réseau est de plus en plus désordonné. En effet, lorsqu'un cation supplémentaire est inséré dans un réseau vitreux (insertion par substitution), il y a plus de possibilités d'associations cations/groupements phosphates, *i.e.* beaucoup d'environnements différents peuvent se former. De plus, lorsque le cation introduit possède un potentiel cationique plus fort que le cation initialement présent, comme c'est le cas du gallium par rapport au calcium, la géométrie (longueurs et angles des liaisons) des groupements est modifiée [101]. Ces différents changements aboutissent à un désordre structural plus élevé que celui qui régnait initialement, ce qui explique l'élargissement des raies observé ici.

Les études réalisées en RMN du ^{31}P ont permis de montrer que l'ajout de gallium provoque des modifications de l'environnement du phosphore dans les verres étudiés. Les évolutions des paramètres RMN du ^{31}P indiquent que le gallium s'insère dans le réseau des métaphosphates de calcium de manière homogène et qu'il n'y a pas formation de domaines phosphates de gallium dans une matrice phosphocalcique. Pour compléter la caractérisation des verres synthétisés par RMN MAS ^{31}P, nous avons également effectué des expériences RMN MAS sur le noyau ^{71}Ga.

II.B.2. Etude par RMN du ^{71}Ga

II.B.2.a. Conditions expérimentales

Les spectres ^{71}Ga RMN MAS des verres et des échantillons cristallins de référence ont été obtenus à l'aide de spectromètres Bruker Avance III utilisant des champs magnétiques de 17,6 et 20,0 T. Pour enregistrer les spectres MAS à des fréquences de rotation de 14 kHz, nous avons utilisé des sondes double-résonance Bruker avec des rotors de diamètre 4 mm. Pour enregistrer les spectres MAS à des fréquences de rotation plus élevées, allant de 60 à 65 kHz, nous avons utilisé des sondes double-résonance et triple-résonance Bruker avec des rotors de diamètre 1,3 mm (volume d'échantillon de 3,8 µL). Pour ces échantillons, le nombre de scans enregistrés varie de 10 256 à 53 248 en fonction de la teneur en gallium, ce qui correspond à des durées d'expérience allant de 3 heures à 15 heures.

Pour les composés cristallins de référence, les spectres MAS ont été obtenus en utilisant soit une simple impulsion radiofréquence de 1,2 µs, soit une séquence d'écho de Hahn avec des impulsions sélectives de la transition centrale du ^{71}Ga. Pour les verres, les spectres MAS ont été obtenus en utilisant systématiquement une séquence d'écho de Hahn avec des impulsions sélectives de la transition centrale du ^{71}Ga. Les temps de recyclage utilisés sont de 1 s et ont été choisis de manière à obtenir des spectres quantitatifs. Les déplacements chimiques du ^{71}Ga ont été référencés par rapport à la raie de résonance d'une solution aqueuse de $Ga(NO_3)_3$ à 1,1 mol/kg.

II.B.2.b. Résultats

Pour compléter les études RMN réalisées sur le noyau ^{31}P, présentées dans le paragraphe précédent, nous avons également caractérisé l'environnement local du gallium dans les verres de formule $x[Ga(PO_3)_3]$ $(1-x)[Ca(PO_3)_2]$ par RMN du ^{71}Ga. Les analyses ont été menées dans un premier temps à une fréquence de rotation de 14 kHz dans un champ magnétique de 17,6 T. Cependant, comme on peut le voir sur la *Figure 26*, les spectres RMN MAS du ^{71}Ga obtenus pour cette fréquence de rotation comportent beaucoup de bandes de rotation qui recouvrent les raies isotropes rendant impossible l'exploitation de ce spectre.

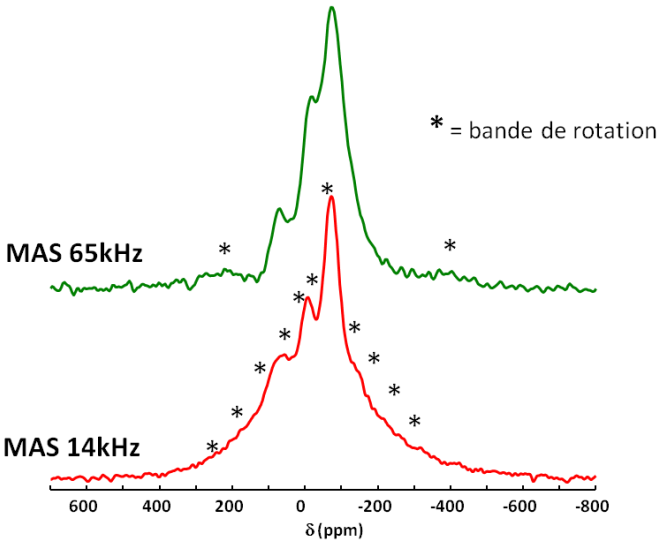


Figure 26 : *Spectres RMN MAS ^{71}Ga (17,6 T) enregistrés à des fréquences de rotation de 14 kHz et de 65 kHz pour le verre x = 0,17. Les astérisques indiquent les bandes de rotation.*

Le spectre enregistré à une fréquence de rotation beaucoup plus élevée (65 kHz, cf *Figure 26*) permet d'éviter le recouvrement entre bandes de rotation et raies isotropes. Ce spectre permet alors de mettre en évidence la présence de trois raies isotropes.

Afin d'attribuer ces contributions aux différents environnements locaux du gallium dans le verre, nous avons également enregistré les spectres du ^{71}Ga dans des composés cristallins de structures connues, $GaPO_4$ et $Ga(PO_3)_3$ (cf *Figure 27*). La structure du composé cristallin $GaPO_4$ contient un unique site cristallographique pour le gallium. Dans cette structure, le gallium est coordonné par 4 atomes d'oxygène sous la forme d'unités tétraédriques GaO_4 (cf *Figure 27 a*) et le spectre RMN du ^{71}Ga montre une unique raie de résonance avec un déplacement chimique isotrope de 117,4 ppm, une constante de couplage quadripolaire C_Q = 5,00 MHz et un paramètre d'asymétrie η_Q = 0,44. La structure du composé $Ga(PO_3)_3$ cristallin contient trois sites cristallographiques pour le gallium qui correspondent tous à des unités octaédriques GaO_6. Le spectre du ^{71}Ga de ce composé (cf *Figure 27 b*) montre trois contributions isotropes avec des déplacements chimiques isotropes de -64,0 (C_Q = 3,46 MHz, η_Q = 0,68), -64,4 (C_Q = 5,96 MHz, η_Q = 0,66) et -60,8 ppm (C_Q = 9,15 MHz, η_Q = 0,18).

Sur la base des déplacements chimiques isotropes des unités GaO_4 et GaO_6 dans ces composés de référence, il est possible d'attribuer sans ambiguïté les raies isotropes situées vers 72 et -70 ppm pour le verre x = 0,17 (cf *Figure 27 c*) à des unités GaO_4 et GaO_6, respectivement. Dans le cas de verres d'aluminosilicates et d'aluminophosphates, les spectres RMN MAS du ^{27}Al présentent très souvent trois contributions attribuées à l'aluminium en

coordinence 4 (AlO_4), 5 (AlO_5) et 6 (AlO_6). Ces trois espèces possèdent des gammes de déplacements chimiques comprises entre 30 et 90 ppm, 5 et 40 ppm et -20 et 20 ppm, respectivement [101, 183-185]. Par analogie, il semble tout à fait cohérent d'attribuer la composante située à une position intermédiaire, entre les raies des unités GaO_4 et GaO_6, au gallium en coordinence 5, GaO_5.

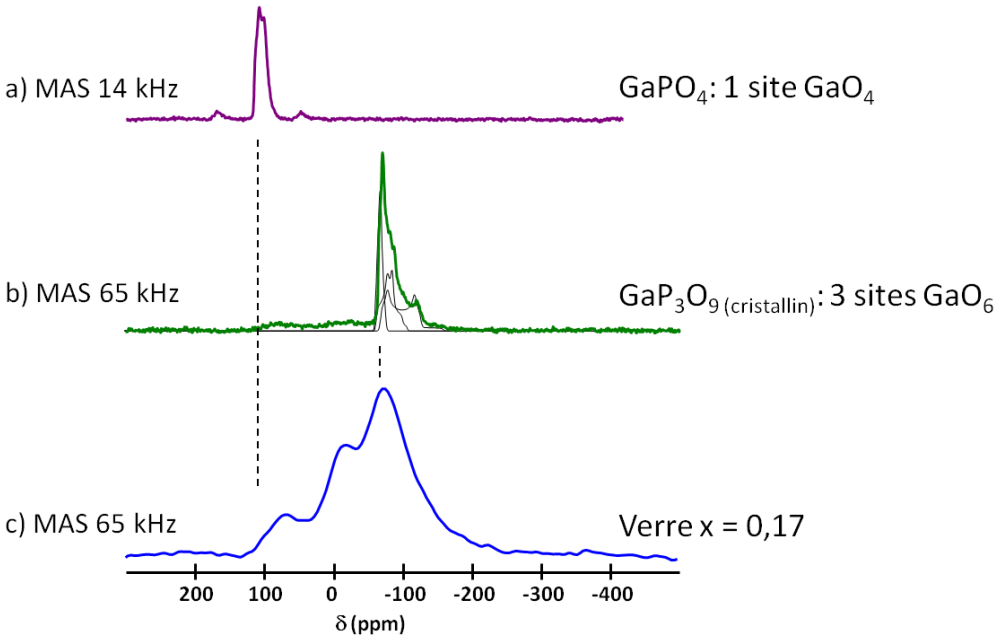


Figure 27 : *Comparaison des spectres RMN MAS ^{71}Ga (17,6 T) des composés a) $GaPO_4$ cristallin (14 kHz) et b) $Ga(PO_3)_3$ cristallin (65 kHz) avec c) le spectre du verre x= 0,17 (65 kHz)*

Après, avoir attribué les trois contributions observées sur nos spectres RMN expérimentaux du ^{71}Ga, nous avons voulu quantifier leurs proportions relatives. Cette étape nécessite une simulation complète des spectres enregistrés de telle manière qu'on puisse en faire une exploitation fiable. Comme nous l'avons vu précédemment dans le cas du ^{31}P (noyau de spin 1/2), les spectres RMN des verres sont constitués de raies larges dues à une distribution de déplacement chimique isotrope qui reflète le désordre structural. Etant donné le caractère quadripolaire du gallium (noyau de spin I = 3/2), la simulation des spectres des verres nécessitent dans ce cas la prise en compte, d'une part, d'une distribution de déplacement chimique, et, d'autre part, d'une distribution de l'interaction quadripolaire. Afin de rendre compte de ces deux distributions de paramètres RMN, nous avons utilisé le modèle GIM (*Gaussian Isotropic Model*) proposé par Czjzek [186], selon lequel la distribution du gradient de champ électrique est supposée correspondre à un désordre statistique [187-188]. Grâce à ce

modèle, il est possible de simuler le spectre (cf *Figure 28*) avec trois contributions ayant chacune une forme asymétrique caractéristique d'une distribution de couplage quadripolaire. Dans cette simulation, il est également nécessaire de prendre en compte la distribution de déplacement chimique isotrope du ^{71}Ga qui est simulée à l'aide d'un élargissement gaussien additionnel.

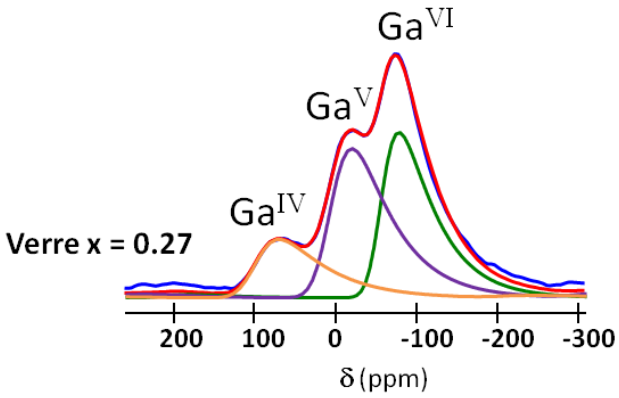


Figure 28 : *Spectre RMN ^{71}Ga (17,6 T, 65 kHz) du verre x = 0,27 et la simulation obtenue en considérant les trois contributions associées aux unités GaO_4, GaO_5 et GaO_6. La forme de raie de chacune de ces contributions est caractéristique d'une distribution des paramètres de l'interaction quadripolaire (Gaussian Isotropic Model).*

Il faut noter que, dans le cas de raies de résonance partiellement recouvrantes, la présence simultanée de ces deux types de distribution de paramètres (interaction quadripolaire et déplacement chimique) rend ambigüe la simulation des spectres obtenus à un seul champ magnétique. Il faut rappeler que le déplacement chimique est directement proportionnel au champ magnétique appliqué $\mathbf{B_0}$ tandis que les effets de second ordre de l'interaction quadripolaire sont inversement proportionnels à ce champ. Pour rendre compte avec fiabilité des contributions respectives de ces deux types d'interactions, il est donc nécessaire de simuler les spectres du même échantillon enregistrés à des champs magnétiques différents.
Pour l'ensemble des verres étudiés, nous avons donc enregistré les spectres RMN du ^{71}Ga à deux champs magnétiques. Les spectres obtenus expérimentalement à 17,6 et 20 T et les simulations de l'un des verres sont reportées sur la *Figure 29*.

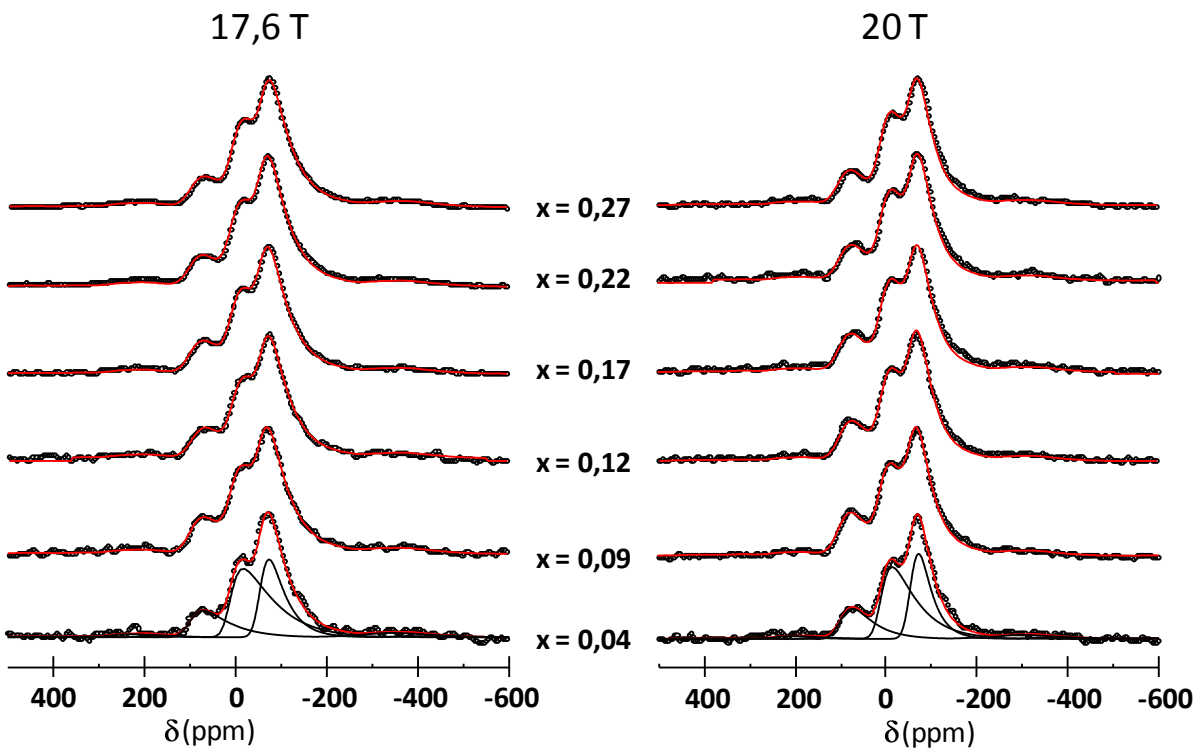


Figure 29 : *Spectres RMN ^{71}Ga 65 kHz pour les verres étudiés avec les champs magnétiques de 17,6 T et de 20 T*

La simulation des spectres a été faite à l'aide du logiciel DMfit qui permet de faire varier simultanément les différents paramètres des interactions sur les spectres enregistrés à différents champs magnétiques. Après ajustement, nous avons obtenu un très bon accord entre spectres expérimentaux et simulés, comme on peut le voir sur la *Figure 29* (le détail des trois contributions est montré dans le cas du verre x = 0,04). À partir de ces simulations, on peut directement quantifier les proportions relatives des trois contributions et décrire leurs variations en fonction de la teneur en gallium dans le verre. Comme indiqué précédemment, ces trois contributions correspondent :

- aux unités GaO_4 qui vont participer au réseau de tétraèdres
- aux unités GaO_6 qui renforcent les connections entre les chaînes de tétraèdres (par rapport aux polyèdres de coordination de Ca^{2+}, les liaisons Ga-O étant plus fortes que les liaisons Ca-O)
- aux unités GaO_5 dont le rôle structural n'est pas clairement élucidé (participation à la formation du réseau ou rôle similaire à celui des unités GaO_6).

La *Figure 30* montre l'évolution des quantités relatives de ces trois types d'unités structurales en fonction de la composition chimique du verre.

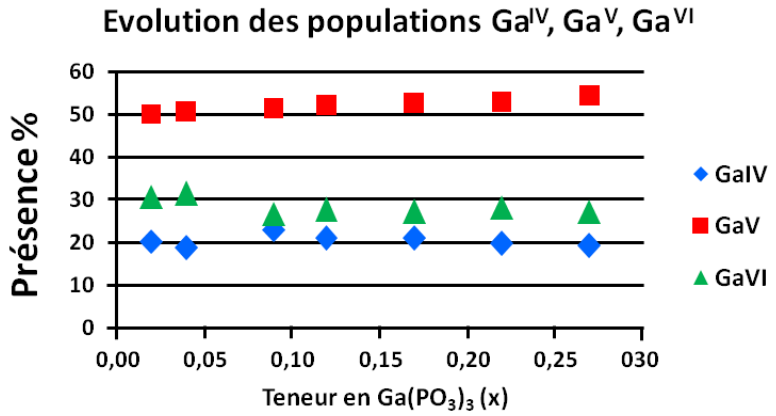


Figure 30 : *Evolution des intensités relatives des contributions GaO_4, GaO_5 et GaO_6.*

Nos résultats indiquent que le gallium en coordinence 5 est présent en majorité par rapport à sa forme en coordinence 4 et 6. On constate également que les pourcentages relatifs de ces trois espèces restent relativement constants en fonction de la teneur en gallium.

Le *Tableau 8* résume l'évolution du déplacement chimique isotrope moyen et du produit quadripolaire moyen P_Q de chaque unité. On observe globalement un déplacement des raies du gallium en coordinence 5 et 6 vers les basses fréquences (valeurs en ppm deviennent plus négatives) en augmentant la teneur en gallium. Une évolution similaire a été observée par Mellier *et al.* [189] dans le cas de la substitution Ca/Ga dans le β–TCP. En comparant nos résultats aux paramètres des composés de référence, on voit que les déplacements chimiques isotropes moyens des unités GaO_6 des verres étudiés ont tendance à se décaler vers des valeurs proches des déplacements des unités GaO_6 du composé de référence $Ga(PO_3)_3$. Ce décalage serait donc lié à l'impact de la substitution Ca/Ga dans l'environnement à moyenne distance du gallium (4ème sphère de coordinence).
La distribution du produit quadripolaire des unités GaO_6 dans nos verres (P_{Qmoyen} ~ 8,8 MHz) couvre l'ensemble des valeurs mesurées pour les trois sites cristallographiques de $Ga(PO_3)_3$ cristallins. On notera que les P_Q moyens des unités GaO_4 et GaO_5 sont du même ordre de grandeur et significativement plus grands que la valeur mesurée pour le site GaO_4 de la phase cristalline $GaPO_4$, indiquant une forte distorsion des tétraèdres GaO_4 dans nos verres.

	δ_{iso} moyen (± 0,5 ppm)			P_Q moyen (± 1 MHz)		
Verres						
x	**GaO_6**	**GaO_5**	**GaO_4**	**GaO_6**	**GaO_5**	**GaO_4**
0,04	-51,5	16,5	104,5	8,8	12,9	11,7
0,09	-50,5	17	105,5	8,8	12,9	11,7
0,12	-51,5	15	104,5	8,8	12,9	11,7
0,17	-52,5	15	105	8,8	12,9	11,7
0,22	-53	15	104,5	8,8	12,9	11,7
0,27	-54,8	14	104,5	8,8	12,9	11,7
Cristaux						
$GaPO_4$	/	/	117,4	/	/	5,16
$Ga(PO_3)_3$						
Site n°1	-64,0	/	/	3,72	/	/
2	-64,4	/	/	6,38	/	/
3	-60,8	/	/	9,20	/	/

Tableau 8 : *Déplacements chimiques isotropes moyens et produits quadripolaires P_Q moyens du ^{71}Ga pour les unités GaO_6, GaO_5 et GaO_4 dans les verres étudiés. Les déplacements chimiques isotropes et produits quadripolaires des différents sites gallium des composés cristallins $Ga(PO_3)_3$ et $GaPO_4$ sont également reportés. Le produit quadripolaire est défini comme* $P_Q = C_Q \sqrt{1 + \frac{\eta_Q^2}{3}}$ *, où C_Q est la constante de couplage quadripolaire et η_Q le paramètre d'asymétrie du tenseur de gradient de champ électrique.*

Nos résultats, obtenus par RMN du ^{71}Ga à très haut champ magnétique et à fréquence de rotation très élevée, indiquent que le gallium est très majoritairement présent sous la forme d'unités GaO_5 dans les verres de métaphosphates mixtes calcium/gallium. En ce sens, ils différent de ceux obtenus par Valappil *et al.* [1] pour des verres de phosphates sodocalciques $(P_2O_5)(CaO)_{0,35}(Na_2O)_{0,87-x}(Ga_2O_3)_x$ (avec x= 0,02 ; 0,07 et 0,11) dont les compositions sont proches des métaphosphates. En effet, sur la base d'expériences d'absorption des rayons X au seuil K du gallium [190] et de RMN du ^{71}Ga [1] (cf *Figure 31*), ces auteurs concluent que le gallium forme presque exclusivement des unités GaO_6. Ceci pourrait indiquer que la

coordinence du gallium dans les verres de phosphates dépend de la nature des cations modificateurs présents.

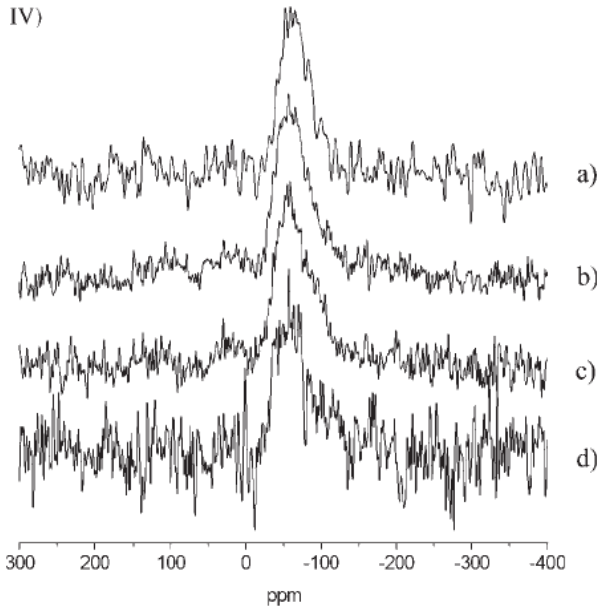


Figure 31: *Spectres RMN MAS du ^{71}Ga des verres $(P_2O_5)(CaO)_{0,35}(Na_2O)_{0,87-x}(Ga_2O_3)_x$. (a) x= 0,11, B_0 = 18,8 T, MAS 22 kHz ; (b) x= 0,11, B_0 = 14,1 T, MAS 18 kHz ; (c) x= 0,07, B_0 = 14,1 T, MAS 18 kHz ; (d) x= 0,02, B_0 = 14,1 T, MAS 18 kHz.* [1]

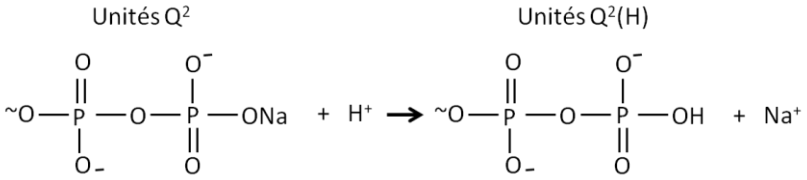
Cependant, il faut souligner que dans ces travaux, les spectres RMN MAS du ^{71}Ga ont été obtenus en utilisant un champ magnétique et des fréquences de rotation relativement modestes. C'est pourquoi les spectres obtenus présentent une très faible résolution. Dans ces conditions expérimentales, les résonances associées aux différentes coordinences de gallium ne sont pas clairement résolues, ce qui rend l'interprétation des spectres particulièrement délicate et ambigüe.

III. Etude de l'altération des verres en solution

Contrairement au cas des verres de silicates, l'altération en solution aqueuse des verres de phosphates a été relativement peu étudiée jusqu'à aujourd'hui, et les mécanismes conduisant à la dissolution de ces verres font toujours l'objet de débats dans la littérature [191-195].

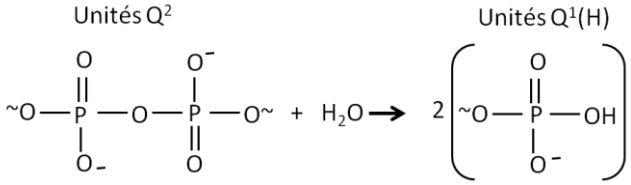
Les deux principales réactions chimiques, conduisant à la dissolution des verres de phosphate en solution aqueuse, sont :

- l'hydratation par échange chimique entre cations modificateurs de réseau (Na^+, Ca^{2+},…) et ions H^+ de la solution :



(11)

- l'hydrolyse des liaisons P-O-P :



(12)

Dans tous les travaux portant sur l'étude de l'altération des verres de phosphate, la dissolution de ces verres dans des solutions aqueuses de pH acide à neutre est décrite comme congruente [191-195]. Selon Bunker *et al.* [191], qui ont étudié la durabilité chimique de verres de phosphates sodocalciques, le mécanisme dominant la dissolution des verres de phosphates est l'hydratation : l'échange chimique qui a lieu (entre cations modificateurs et ions H^+) conduit, d'une part, à la formation de chaînes hydrogénophosphates à l'interface verre/solution et, d'autre part, à la dissolution de ces chaînes, celles-ci conservant la même longueur que les chaînes du réseau vitreux initial. Dans le cadre de ce modèle, des réactions d'hydrolyse peuvent également se produire dans un second temps, lorsque les chaînes hydrogénophosphates sont en solution. En revanche, selon Gao *et al.* [193] et Takebe *et al.* [194], le mécanisme dominant l'altération des verres de phosphates est l'hydrolyse des liaisons P-O-P conduisant au passage en solution de chaînes de phosphates de différentes longueurs.

Dans le cadre du développement des verres biocompatibles, permettant la vectorisation du gallium en tant qu'agent inhibiteur de la résorption osseuse, nous avons cherché à mieux comprendre la nature du mécanisme dominant la dissolution de nos verres de phosphates de

calcium dopés au gallium. Les verres synthétisés ont donc été introduits dans différentes solutions. Les concentrations des différents éléments présents dans la phase liquide ont été mesurées par ICP-AES. Deux approches peuvent être envisagées pour mettre en évidence la nature du mécanisme dominant la dissolution. La première consiste en une spéciation des environnements du phosphore en solution, effectuée aux premiers instants de la réaction afin d'éviter les phénomènes d'hydrolyse en solution. Ceci nécessite l'utilisation d'une technique très sensible puisque les concentrations des espèces en solution sont faibles aux premiers instants de la réaction. La seconde approche consiste à caractériser l'environnement du phosphore dans la couche d'altération à la surface du verre. C'est dans ce cadre que Takebe *et al.* [194] ont mis en évidence par spectroscopie Raman une dépolymérisation du réseau phosphate à la surface du verre, ce qui peut être interprétée comme la signature des réactions d'hydrolyse. Dans ce travail, nous avons suivi une démarche similaire et nous avons récupéré la fraction solide restante, correspondant au verre altéré, pour caractériser par RMN du ^{31}P la couche d'altération formée.

III.A. Protocole de lixiviation

Les expériences d'altération des verres ont été réalisées dans trois solutions différentes :
- une solution de Trishydroxyméthylaminométhane (TRIS, $C_4H_{11}NO_3$) de concentration 0,02 M. Le pH de la solution est ajusté avec du HCl pour qu'il soit compris entre 7,30 et 7,40. Le TRIS est la solution la plus simple pour simuler les fluides physiologiques humains. Cette solution est notée T.

- une solution de Phosphate obtenue par dilution de 61,1 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 0,02 M et de 38,9 mL d'une solution de NaH_2PO_4 à 0,02 M pour 1 L de solution totale (complétée avec 0,9 L d'eau ultra pure). Le pH de cette solution est alors compris entre 7,15 et 7,30. Cette solution est notée P.

- une solution d'eau ultrapure (18 MΩ) de pH initial égal à 6. Cette solution est notée E.

Les verres choisis pour les expériences de lixiviation sont les verres x = 0 ; x = 0,10 et x = 0,30 (formule chimique : $x[Ga(PO_3)_3]$ $(1-x)[Ca(PO_3)_2]$). Ils sont broyés en boîte à gants manuellement, et tamisés pour obtenir une poudre de granulométrie comprise entre 40 et 75 µm.

Nous avons choisi un rapport Solide/Liquide de 1, c'est-à-dire que 100 mg de poudre ont été introduits dans 100 mL de solution. À partir des densités mesurées pour les différents verres ($d_{moyenne}$ = 2,68), de la granulométrie choisie (valeur moyenne de 57,5 µm) et en supposant que les grains ont une forme sphérique, on peut estimer que le rapport [surface du solide] / [volume de liquide] a pour valeur moyenne 0,39 cm^{-1}.

Les échantillons sont immergés dans les solutions conditionnées dans des flacons en polypropylène qui sont placés dans une étuve à 37°C et sont soumis à une agitation de 100 tours par minute. L'eau utilisée pour le rinçage est de l'eau ultra pure (18 MΩ).
Pour chaque échantillon et chaque solution, les expériences ont été réalisées pour quatre temps de lixiviation : 6 heures, 24 heures, 48 heures, 5 jours (soit 120 heures).
Pour chaque expérience, lorsque la durée de lixiviation est atteinte, la fraction solide restante est récupérée par filtration (2,5 µm) sous vide à l'aide d'une trompe à eau. La fraction solide récupérée est ensuite séchée dans une enceinte sous vide à une température de 50°C. La solution de lixiviation est également récupérée et stockée dans les flacons en polypropylène.

III.B. Conditions d'analyses des solutions et des verres altérés

III.B.1. Solutions

Les mesures de pH des solutions ont été réalisées sur un appareil Hanna Instruments modèle HI 2210 préalablement calibré.
Les analyses ICP-AES/OES ont été faites à l'aide d'un appareil Horiba-Jobin Yvon modèle Ultima2. Les limites de quantification (LQ) des espèces sont de 0,5 ppm pour le calcium, de 1 ppm pour le gallium et de 0,05 ppm pour le phosphore. Les incertitudes sur les mesures sont de 20 % si la valeur détectée est comprise entre 0 et 6LQ, et de 10 % si la valeur détectée est supérieure à 6LQ. Le principe de cette technique de caractérisation est abordé succinctement en *Annexe 2*.

III.B.2. Verres altérés

La fraction de solide résiduel, correspondant au rapport entre la masse de poudre de verre initiale et la masse de poudre récupérée après filtration, a été déterminée par pesées à l'aide d'une balance Kern modèle ABT 220-4M.

Les spectres RMN du ^{31}P des verres altérés ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance I 300 MHz (champ magnétique de 7,0 T correspondant à une fréquence de Larmor de

121,5 MHz pour le ^{31}P) en utilisant une sonde double-résonance 4 mm. Les spectres quantitatifs RMN MAS ^{31}P ont été obtenus en utilisant une impulsion de 0,6 µs correspondant à un angle de basculement de 15° et une durée de recyclage employée de 60 s. La durée de l'expérience MAS est de 4 heures et 15 minutes. Les spectres de cross-polarisation (CP) ^{1}H-^{31}P MAS ont été acquis en utilisant un temps de transfert d'aimantation (temps de contact) de 5 ms. La durée de l'expérience CPMAS est de7 heures. Les déplacements chimiques de ^{31}P sont référencés par rapport à une solution de H_3PO_4 à 85 %.

Les spectres RMN MAS ^{1}H ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III 850 MHz (champ magnétique de 20,0 T correspondant à une fréquence de Larmor de 850 MHz pour le ^{1}H) en utilisant une sonde 1,3 mm. Les spectres quantitatifs ont été enregistrés avec un $t_{90°}$ = 1,81 µs et un temps de recyclage de 10 s. Les déplacements chimiques du ^{1}H sont référencés par rapport au Tétraméthylsilane (TMS).

Les simulations de tous les spectres ont été réalisées en utilisant le logiciel DMfit [196].

III.C. Résultats

III.C.1. Analyses des solutions

Les évolutions du pH des différentes solutions en fonction de la durée de lixiviation sont reportées sur la *Figure 32* pour les trois verres de différentes compositions :

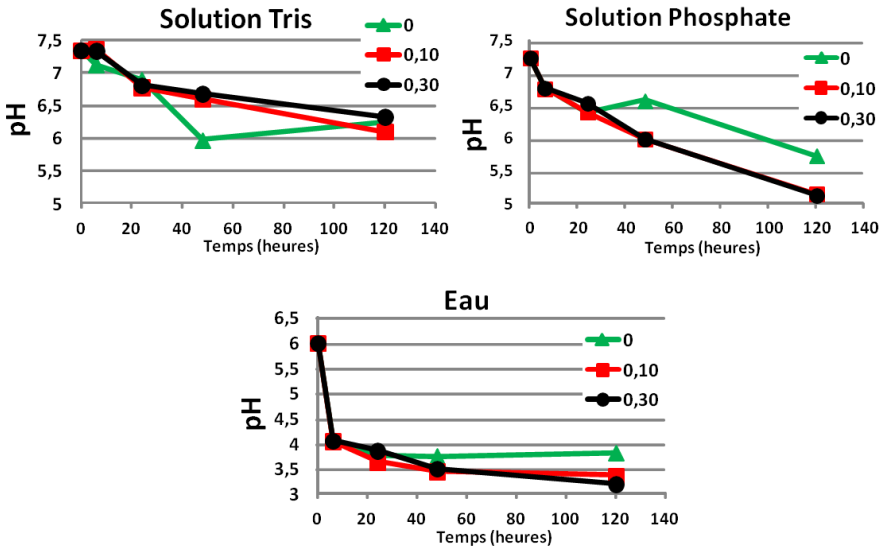


Figure 32: *Evolution du pH des trois solutions en fonction de la durée de lixiviation du verre*

Pour les trois solutions, la dissolution du verre de métaphosphates de calcium pur (x = 0) conduit à une nette diminution du pH. Pour les deux mécanismes de dissolution mentionnés précédemment, on attend une augmentation de pH pour l'hydratation et une diminution de pH pour l'hydrolyse. La diminution de pH constatée traduit donc des réactions d'hydrolyse des

liaisons P-O-P [194]. Il est cependant important de noter que les réactions d'hydrolyse, conduisant à une diminution du pH, peuvent avoir lieu soit à l'interface solide-liquide (hydrolyse des espèces de surface du verre), soit en solution, après hydratation/dissolution des chaînes de phosphates. De ce fait, les évolutions du pH observées ici ne permettent pas de préciser la nature du mécanisme conduisant à la dissolution des verres.

Si, dans le cas de la solution T, le pH de la solution semble peu affecté par les compositions chimiques des verres, on observe clairement que le pH des solutions P et E prend des valeurs encore plus faibles dans le cas de la dissolution des verres contenant davantage de gallium. Cet effet a déjà été constaté par Valappil *et al.* [1]. L'acidification plus marquée des solutions P et E pour les verres contenant du gallium, en fonction du temps de lixiviation, est un effet connu, caractéristique du comportement du gallium en solution, et lié à la formation des espèces $Ga(OH)_4^-$, $Ga(OH)_3$ et $Ga(OH)_2^+$ (cf *Figure 2, Partie 2 I.B.1 Comportement en solution*). [123-124, 127]

Les concentrations en ppm (1 ppm = 1 mg/L) des éléments phosphore, calcium et gallium, relargués en solution, ont été déterminées par ICP-AES. Les résultats obtenus pour les différentes solutions et les différents verres sont rassemblés sur la *Figure 33*.

Dans l'hypothèse d'une dissolution congruente des verres, on attend que le rapport P/(Ca+Ga) des concentrations en ppm soit de 1,55, 1,52 et 1,46 pour les verres x= 0 ; 0,1 et 0,3 ; respectivement. Les rapports P/(Ca+Ga) des concentrations mesurées expérimentalement pour les différentes solutions et les différents verres montrent en général un bon accord avec une dissolution congruente de ceux-ci. C'est clairement le cas pour les verres immergés dans la solution E. Néanmoins, c'est une conclusion à modérer dans le cas des verres immergés dans la solution T. Nos résultats confirment donc le caractère relativement congruent de la dissolution des verres de phosphates dans des solutions de pH neutre à acide [191-193, 195].

Dans le cas d'une dissolution totale des verres, les concentrations attendues des éléments phosphore, calcium et gallium en solution sont, respectivement, de 313,1 ; 202,0 et 0 ppm pour le verre x = 0, de 311,7 ; 172,3 et 33,3 ppm pour le verre x = 0,1 et de 309,2 ; 121,4 et 90,7 ppm pour le verre x = 0,3. Dans le cas du verre de métaphosphates de calcium pur (x = 0), les concentrations mesurées indiquent que la proportion de verre dissout s'élève à environ 90 % pour la solution E au bout de 5 jours, tandis que cette proportion, pour la même durée d'immersion, s'élève à 80 % pour la solution P et à 55 % pour la solution T. Cette variabilité de la quantité de verre dissout est directement reliée aux valeurs de pH des solutions utilisées, la dissolution des verres de phosphates étant plus forte à des pH plus acides [191].

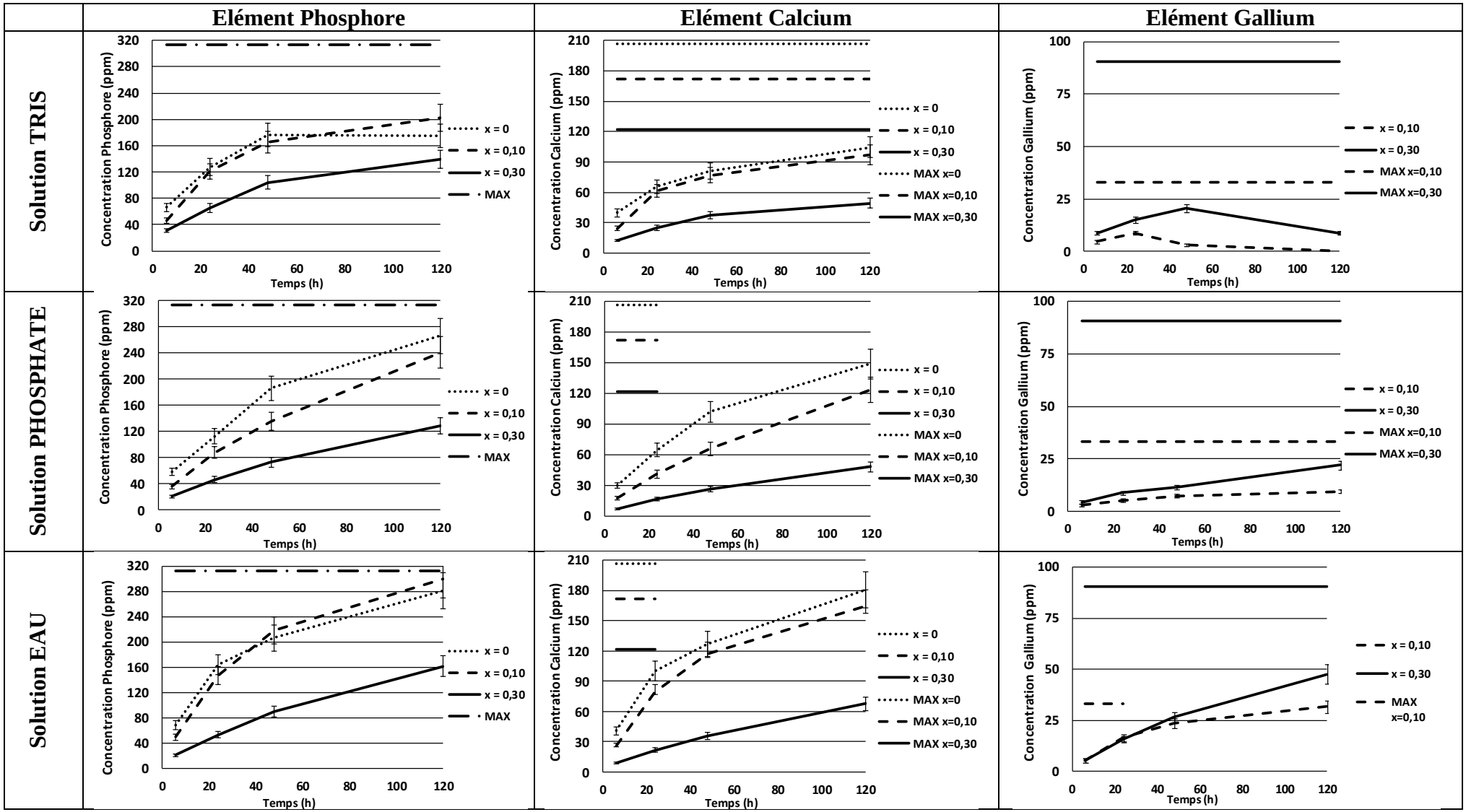


Figure 33 : *Evolutions en fonction du temps des concentrations des éléments P, Ca et Ga mesurées par ICP-AES pour les solutions T, P et E.*

En comparant les concentrations du phosphore dans les trois solutions étudiées, on observe clairement que la quantité de phosphore relarguée diminue avec l'augmentation de la teneur en gallium du verre. Ceci indique de façon évidente que la présence de gallium augmente la durabilité chimique du verre, *i.e.* sa résistance à la dissolution. De la même manière, la comparaison des concentrations de calcium et gallium en solution indique une augmentation de la durabilité chimique du verre avec l'augmentation de la teneur en gallium. Ces observations sont en bon accord avec les résultats obtenus par Valappil *et al.* [1]. Cette augmentation de la durabilité chimique des verres de métaphosphates, lorsque la teneur en gallium augmente, est certainement liée au fait que les liaisons Ga-O sont plus fortes que les liaisons Ca-O.

III.C.2. Étude des verres altérés

III.C.2.a. Rapports entre masse de poudre récupérée et masse de poudre introduite

Les rapports entre la masse de poudre récupérée par filtration et la masse de poudre introduite initialement dans le flacon, en fonction du type de verre et du temps d'agitation, sont reportés sur la *Figure 34*.

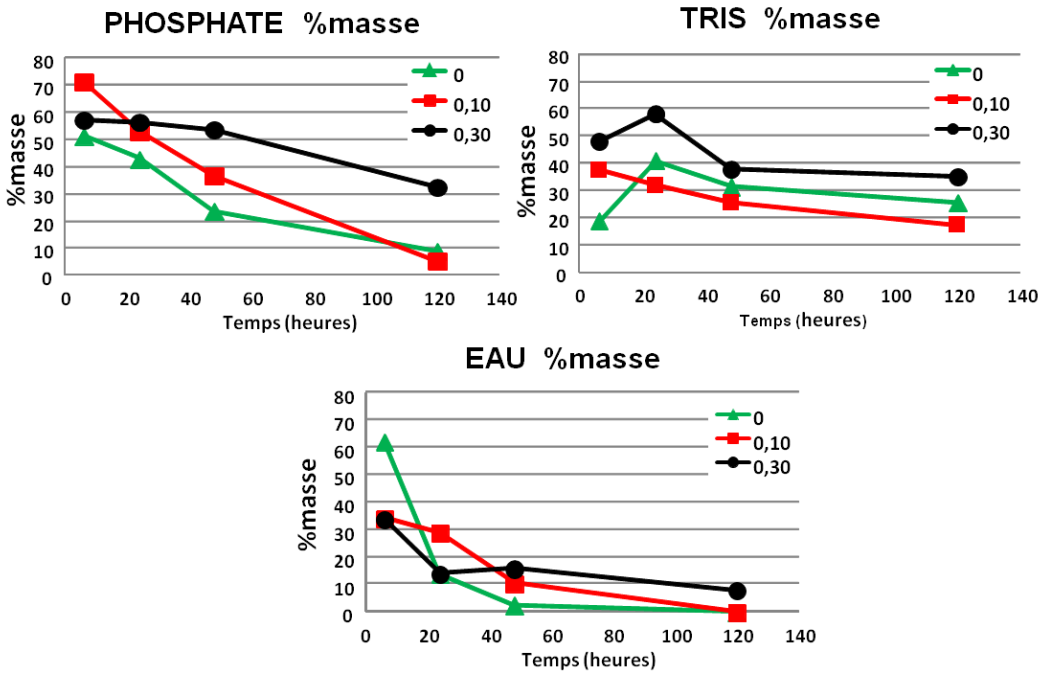


Figure 34 : *Rapport masse initiale/masse récupérée dans les trois solutions étudiées*

En premier lieu, on notera que ces rapports de masse, correspondant aux pourcentages de verre résiduel, sont plus faibles que la fraction non dissoute estimée à partir des analyses ICP-

AES. Ceci est relativement attendu car la fraction de solide résiduel, récupérée par filtration, va fortement dépendre du filtre utilisé (le type de filtre utilisé dans ce travail présente une maille de 2,5 µm). Dans le cas d'une expérience de lixiviation conduite sur des poudres, on s'attend à ce qu'il soit difficile de récupérer les particules de verre fortement altérées parce que leurs tailles doivent être faibles (et donc plus difficile à récupérer par filtration). De fait, le pourcentage de verre non-dissout, déterminé à partir de la masse de poudre récupérée par filtration, est nécessairement sous-estimé.

Néanmoins, les tendances des évolutions des rapports de masse en fonction de la durée de lixiviation et de la composition du verre sont en bon accord avec les évolutions des concentrations en solutions décrites précédemment. Par exemple, pour le verre de phosphates de calcium pur (x = 0), la fraction de solide résiduel au bout de 5 jours est plus importante pour la solution T que pour la solution P, et est plus importante pour la solution P que pour la solution E, témoignant à nouveau du rôle du pH de la solution. On notera également que dans toutes les solutions, la fraction de verre non dissout augmente avec la teneur en gallium, confirmant ainsi l'augmentation de la durabilité chimique du verre avec l'ajout de celui-ci. Cette diminution de la perte de masse du verre lors de l'augmentation de la concentration en gallium a également été observée par Valappil *et al.* [1].

III.C.2.b. RMN du ^{31}P

Comme mentionné précédemment, nous avons voulu caractériser la nature chimique de la couche d'altération formée à la surface des grains de verre, afin de mettre en évidence la nature des mécanismes (hydratation et/ou hydrolyse) conduisant à la dissolution du verre. Pour cela, la RMN du ^{31}P apparaît comme une méthode de choix puisque les unités PO_4 ont différents degrés de condensation : elles sont donc résolues sur les spectres MAS. Une modification de la longueur moyenne des chaînes de tétraèdres et l'apparition d'espèces moins polymérisées, liées à des réactions d'hydrolyse, devraient donc être facilement observables. D'autre part, l'hydratation des chaînes de tétraèdres par échange entre ions Ca^{2+} et H^+ doit également se traduire sur les spectres ^{31}P par une variation du déplacement chimique des unités Q^n.

La *Figure 35 a* présente l'évolution du spectre RMN MAS quantitatifs ^{31}P du verre x = 0 en fonction de la durée de lixiviation dans la solution T.

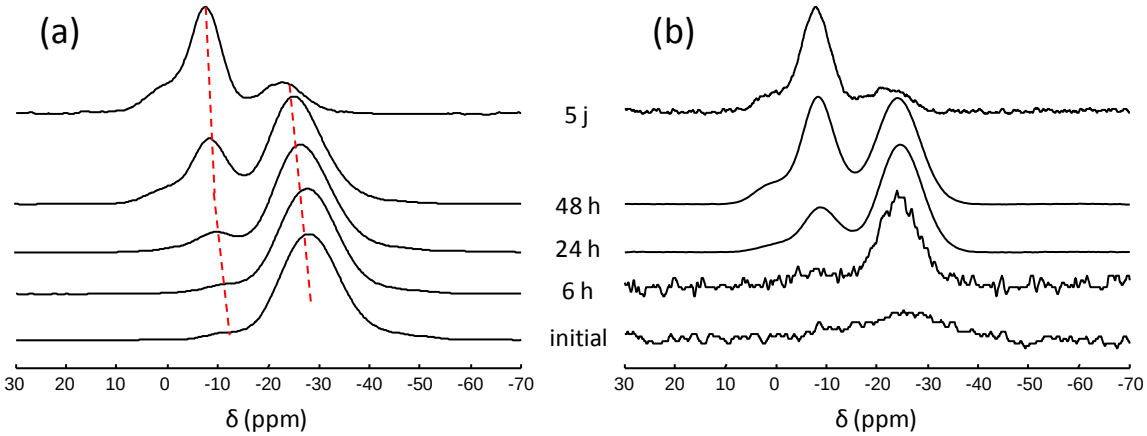


Figure 35 : *Evolution des spectres RMN ^{31}P (7T, 14kHz) (a) MAS quantitatifs et (b) CPMAS (temps de contact de 5 ms) du verre x = 0 en fonction de la durée de lixiviation dans la solution T.*

Sur le spectre du verre résiduel après 24 heures de lixiviation, on observe clairement l'apparition d'une contribution centrée vers -10 ppm qui est attribuée à des unités de type Q^1. Pour des durées de lixiviation comprises entre 24 heures et 48 heures, on note également la présence d'un autre pic, centré vers 0 ppm, caractéristique d'unités de type Q^0. La présence de ces espèces moins polymérisées que les unités Q^2, qui, pour leur part, constituent majoritairement la structure du verre initial, implique nécessairement la rupture de liaisons P-O-P par hydrolyse durant le processus d'altération. Les intensités relatives de ces deux contributions (associées à la couche de surface) augmentent continuellement en fonction de la durée de lixiviation au dépend de la composante principale du spectre du verre non altéré (associé au cœur du grain), ce qui reflète la dissolution progressive du verre. On notera également que le déplacement chimique des unités Q^2 du verre initial se décale vers des valeurs plus positives en fonction de la durée de lixiviation. Cette évolution du déplacement chimique reflète une modification de l'environnement chimique des unités Q^2 qui peut être due, d'une part, à un échange entre ions Ca^{2+} et H^+, et, d'autre part, à une variation du degré de condensation des tétraèdres auxquels elles sont liées [103, 179].

Afin de mieux identifier les espèces hydratées formées dans la couche de surface, nous avons employé une expérience de transfert d'aimantation des noyaux ^1H vers les noyaux ^{31}P par polarisation croisée en MAS (expérience notée CPMAS pour *« Cross-Polarization Magic Angle Spinning »*) [197-198]. Cette technique permet, d'une part, d'amplifier le signal des noyaux ^{31}P, et, d'autre part, d'observer sélectivement les atomes de phosphore qui se trouvent à proximité des protons, puisque le mécanisme pilotant le transfert d'aimantation est

l'interaction dipolaire hétéronucléaire (proportionnelle à $1/r^3$, r étant la distance interatomique entre le ^{31}P et le ^{1}H). Grâce à cette expérience, il est donc possible d'observer sélectivement les espèces hydratées formant la couche d'altération à la surface des grains de verre.

Il faut rappeler que cette expérience n'est pas directement quantitative. Néanmoins, elle permet de mesurer avec précision les valeurs des déplacements chimiques et des largeurs de raie de chaque espèce protonée. Ces valeurs peuvent être ensuite utilisées pour reconstruire le spectre quantitatif du verre lixivié, à partir duquel les quantités relatives de phosphore, présent dans la couche altérée et dans le cœur, peuvent être déterminées. Pour cela, nous avons considéré que la partie non altérée du grain de verre (cœur) pouvait être simulée avec les trois raies de résonance observées sur le spectre quantitatif du verre initial. Cette démarche est résumée sur la *Figure 36*.

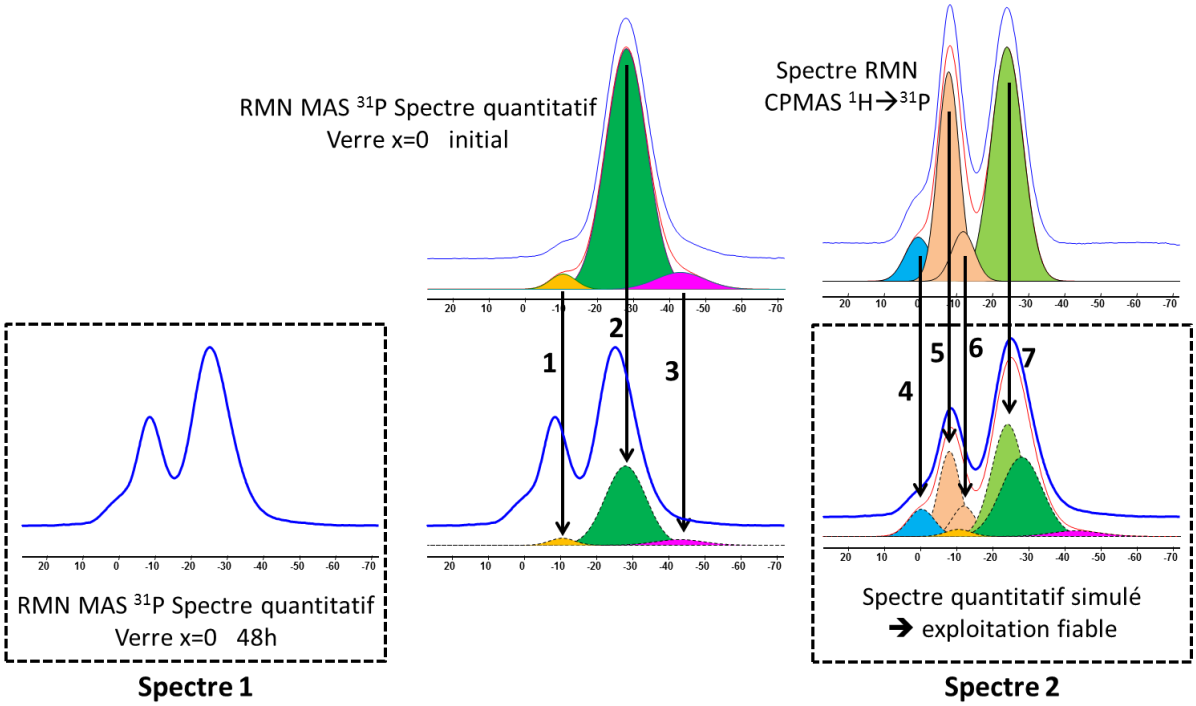


Figure 36 : *Démarche suivie pour la simulation des spectres ^{31}P quantitatif des verres altérés à l'aide des informations obtenues avec l'expérience CPMAS (7T, 14kHz)*

Ainsi, il est possible de simuler le spectre ^{31}P quantitatif avec les contributions des espèces initiales (indiquées par les numéros (1), (2) et (3)) et celles des espèces protonées (numéros (4), (5), (6) et (7)). Cette approche a été utilisée pour simuler tous les spectres quantitatifs enregistrés pour les différents verres altérés dans les trois solutions. La *Figure 37* montre les simulations réalisées pour le verre x = 0 dans la solution T.

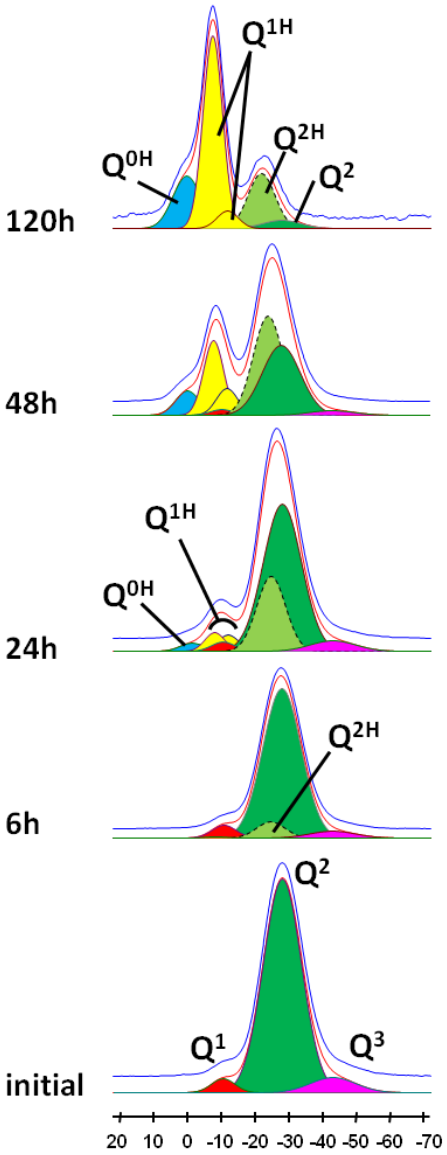


Figure 37 : *Evolution du spectre RMN MAS (7T, 14kHz) quantitatif ^{31}P du verre x = 0 en fonction de la durée de lixiviation dans la solution T avec déconvolution et attribution des différentes contributions.*

Ces simulations montrent clairement que lorsqu'on augmente le temps d'immersion, il se produit une élévation progressive du rapport entre les proportions de phosphore dans la couche de surface altérée et celles dans le cœur des grains de verre. Ceci reflète la dissolution progressive du verre. On notera également que la nature des espèces constituant majoritairement la couche d'altération évolue avec la durée de lixiviation. Dans le cas du verre x = 0 lixivié dans la solution T (présenté *Figure 37* et appuyé par la *Figure 35 b*), on voit que la couche de surface est faite principalement d'unité $Q^2(H)$ pour des temps de lixiviation courts (~6 h), alors qu'elle est formée majoritairement d'unités $Q^1(H)$ et $Q^0(H)$

pour des durées d'altération longues (observables à partir de 24 heures). Le seul mécanisme de dissolution qui aboutit à la formation d'unités $Q^2(H)$ est l'hydratation des chaînes de surface (cf *équation (11)*). Pour des temps courts, les résultats RMN indiquent donc que les espèces de surface du verre subissent une hydratation. La diminution de pH observée à temps court est donc liée à un mécanisme d'hydrolyse en solution (et non pas à la surface du verre).

Pour une durée d'immersion de 24 h, l'observation par RMN d'espèces $Q^1(H)$, en plus des $Q^2(H)$ (cf *Figure 37* et *Figure 35* b), indiquent que la dissolution du verre implique à la fois les mécanismes d'hydratation (espèces $Q^2(H)$) et d'hydrolyse de surface (unités $Q^1(H)$). La diminution de pH observée pour cette durée d'immersion peut s'expliquer à la fois par des réactions d'hydrolyse de surface et en solution. Pour des temps d'immersion plus longs, nous observons que les unités $Q^1(H)$ et $Q^0(H)$ deviennent prépondérantes, ce qui indique que le mécanisme d'hydrolyse prend le pas sur l'hydratation. Ce changement de mécanisme d'altération en fonction du temps d'immersion pourrait être dû à l'évolution du pH des solutions. En effet, un milieu acide est un environnement propice pour des réactions d'hydrolyse.

Les quantifications des espèces $Q^n(H)$ extraites des simulations des spectres quantitatifs, obtenus pour tous les verres lixiviés dans les solutions T et P, sont rassemblés dans le *Tableau 9*. Celui-ci décrit la spéciation des espèces phosphates formant la couche d'altération en surface des grains de verre.

Temps	**Unités**	**Solution TRIS**			**Solution PHOSPHATE**		
		x = 0	x = 0,10	x = 0,30	x = 0	x = 0,10	x = 0,30
6 h	$Q^0(H)$	0 %	1,1 %	0 %	1,29 %	0,78 %	0 %
	$Q^1(H)$	1,51 %	2,79 %	0 %	2,90 %	0,43 %	0 %
	$Q^2(H)$	8,99 %	6,72 %	0 %	12,94 %	0,82 %	0 %
24 h	$Q^0(H)$	2,03 %	0 %	0 %		2,54 %	0 %
	$Q^1(H)$	7,78 %	0,22 %	0 %		1,14 %	0 %
	$Q^2(H)$	22,79 %	0,52 %	0 %		6,24 %	0 %
48 h	$Q^0(H)$	6,9 %	2,45 %	0,91 %	4,44 %	6,37 %	2,27 %
	$Q^1(H)$	24,69 %	8,44 %	0,76 %	16,4 %	5,33 %	0,78 %
	$Q^2(H)$	32,83 %	9,63 %	1,33 %	32,29 %	13,05 %	0 %
120 h	$Q^0(H)$	17,66 %	10,42 %	1,79 %	16,30 %	6,61	2,85 %
	$Q^1(H)$	57,18 %	45,79 %	2,36 %	50,15 %	9,93 %	3,24 %
	$Q^2(H)$	21,72 %	18,52 %	0,3 %	30,12 %	9,98 %	2,89 %

Tableau 9 : *Intensités des espèces extraites de la quantification RMN - Spéciation des espèces protonées formant la couche d'altération des verres*

L'ensemble des spectres simulés et les intensités relatives des différentes contributions correspondantes à la couche altérée et au cœur des grains est donné dans l'*Annexe 3*. On notera que lorsque la concentration du verre en gallium augmente, la quantité relative d'espèces protonées diminue. Par exemple, dans la solution T, la quantité d'espèces $Q^2(H)$ devient significative au bout de 6 h dans le verre x = 0 et au bout de 48 h dans le verre x = 0,30. Sur la *Figure 38* et la *Figure 39*, nous avons reporté l'évolution des proportions relatives d'espèces protonées (couche de surface) et non-protonées (cœur des grains) en fonction de la durée de lixiviation des verres. On observe clairement que la quantité de phosphore dans la couche de surface augmente au détriment de la quantité de cet élément dans le cœur des grains. Ces évolutions traduisent donc une diminution progressive de la taille des grains lors du processus de dissolution.

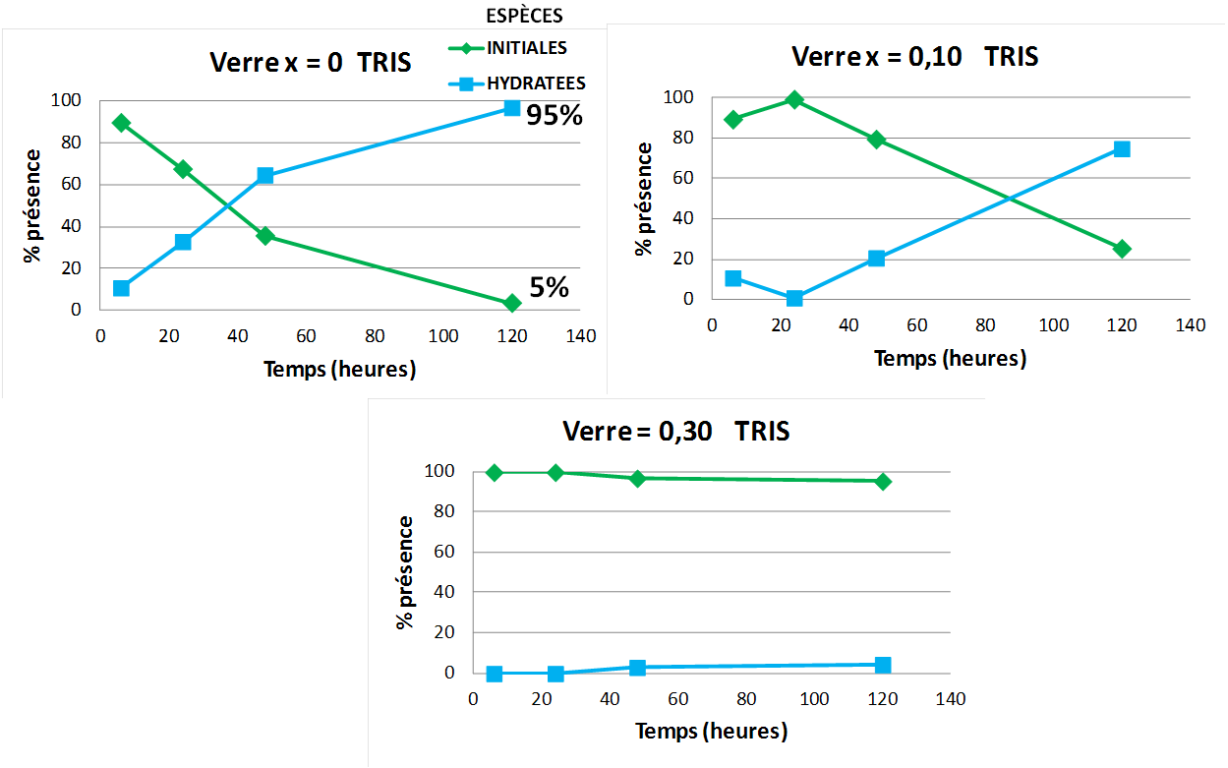


Figure 38 : *Evolution des pourcentages de phosphore dans la couche de surface et dans le cœur des grains pour les verres immergés dans la solution de T.*

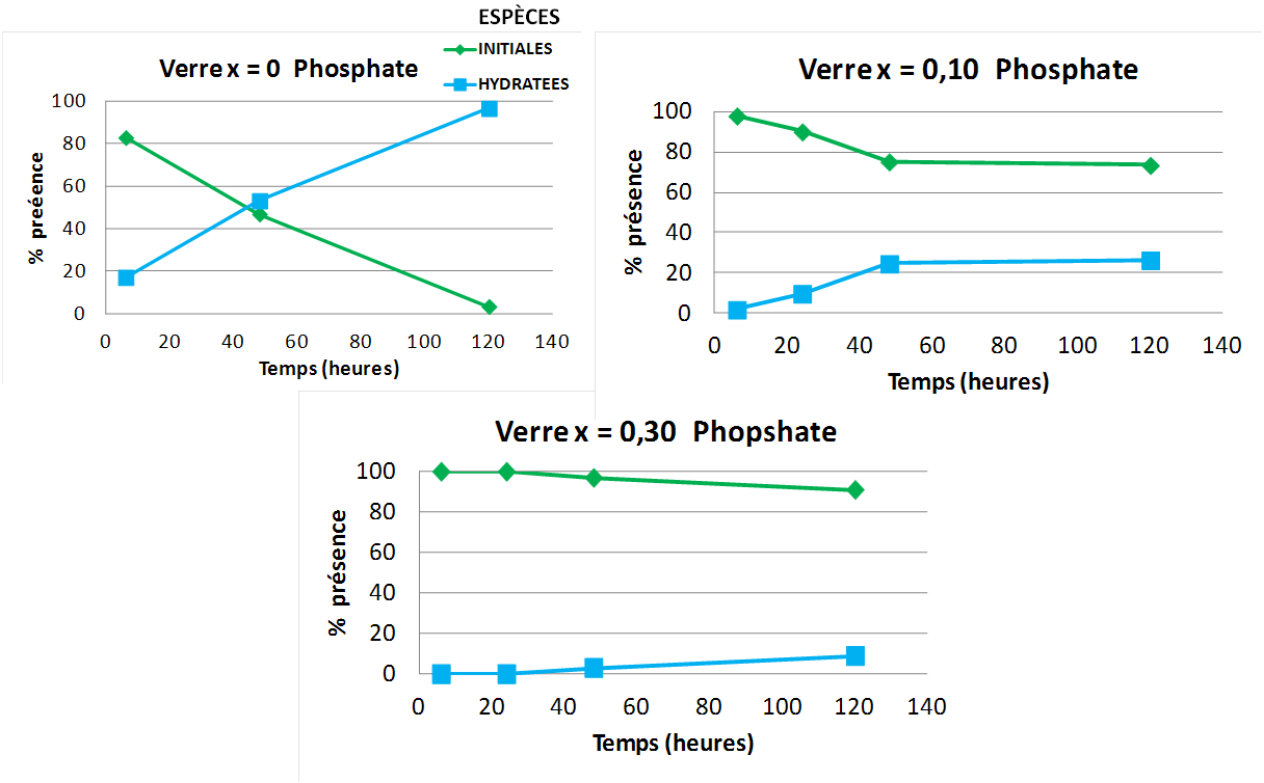


Figure 39 : *Evolution des pourcentages de phosphore dans la couche de surface et dans le cœur des grains pour les verres immergés dans la solution P.*

Cette analyse quantitative indique que la dissolution du verre est moindre quand le verre contient plus de gallium, et ce, dans les deux solutions présentées ici. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par dosage des ions en solution ainsi que par mesure de la perte de masse du verre et confirment que l'ajout de gallium permet de moduler la durabilité chimique du verre. En outre, les spectres RMN du ^{31}P permettent de caractériser la nature chimique de la couche d'altération formée à la surface du verre et son évolution en fonction du temps de lixiviation. L'évolution de la structure du verre après 5 jours d'immersion est représentée schématiquement sur la *Figure 40*.

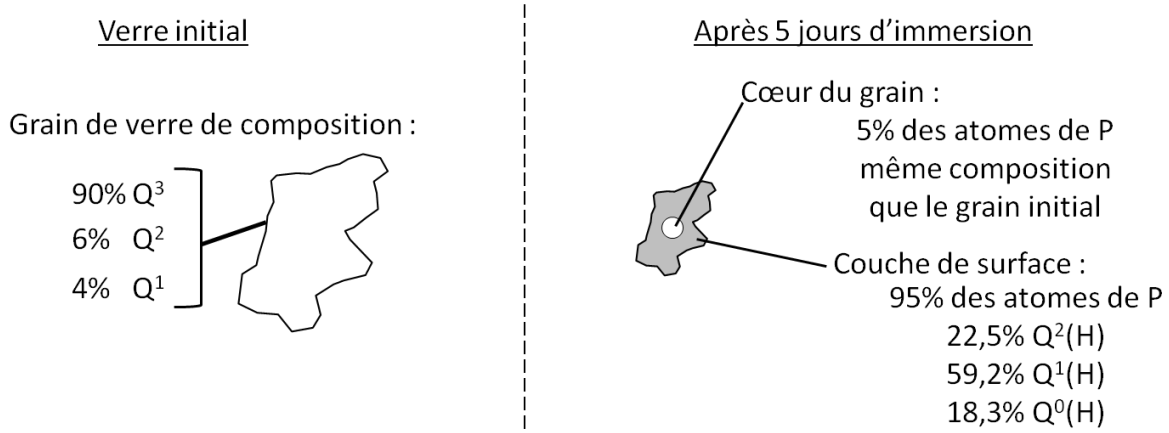


Figure 40 : *Représentation schématique de l'évolution de la composition d'un grain de verre après 5 jours d'immersion (les valeurs indiquées correspondent au verre x = 0 dans son état initial et après immersion pendant 5 jours dans la solution T).*

IV. Conclusion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux verres de métaphosphates de calcium qui, compte tenu de leur biocompatibilité et de leurs propriétés de dissolution, présentent un potentiel en tant que systèmes de livraison de principes actifs. Le gallium étant connu pour avoir des propriétés thérapeutiques comme agent antiostéoclastique, nous avons donc synthétisé différents verres dopés avec du gallium selon la formule chimique $x[Ga(PO_3)_3]$ $(1-x)[Ca(PO_3)_2]$ avec x [0 ; 0,30].

Nous avons étudié la structure de ces verres par RMN du ^{31}P et ^{71}Ga. Les spectres RMN MAS du ^{31}P indiquent que la distribution du calcium et du gallium au sein du réseau phosphate est homogène. Pour caractériser l'environnement local du cation Ga^{3+} dans ces verres par RMN MAS du ^{71}Ga, il est nécessaire d'utiliser de très hauts champs magnétiques (20,0 T) et des fréquences de rotation MAS très élevée (65 kHz). L'utilisation de telles conditions expérimentales nous a permis de montrer que le gallium intègre le réseau vitreux sous la forme d'unités GaO_5 majoritairement, mais également sous la forme d'unités GaO_4 et GaO_6. Pour les compositions étudiées, les proportions relatives de ces unités varient peu.

Pour étudier l'altération de ces verres, ceux-ci ont été immergés dans différents types de solutions avec des temps d'immersion compris entre 6 heures et 5 jours. Les évolutions des concentrations des espèces relarguées en solution, mesurées par ICP-AES/OES, indiquent que la dissolution de ces verres est congruente. Lorsque la teneur en gallium dans le verre augmente, les concentrations des espèces relarguées en solution, ainsi que la perte de masse

du solide, diminuent, indiquant clairement que l'ajout de gallium augmente la durabilité chimique des verres.

Afin de mettre en évidence la nature des mécanismes de dissolution, la couche de surface résultant de l'altération a été étudiée par RMN du ^{31}P. Dans les premiers temps d'immersion, les résultats obtenus indiquent que le mécanisme dominant est l'hydratation des chaînes de la surface du verre. Tandis que pour des temps d'immersion plus longs, une forte hydrolyse des liaisons P-O-P a lieu. L'évolution de la nature du mécanisme dominant pourrait être liée aux variations du pH de la solution.

PARTIE 3 :

ÉTUDE DU BIOVERRE DE RÉFÉRENCE : LE BIOGLASS® 45S5

Un peu d'histoire

En 1967[3], en se rendant en bus à un congrès de l'US Army Materials Research, Larry L. Hench discute avec un colonel de l'armée américaine et lui expose ses découvertes concernant des matériaux résistant à des radiations de très haute énergie. L'officier, intéressé, lui pose alors la question suivante : « Si vous êtes capables de fabriquer un matériau résistant aux radiations, pouvez-vous préparer un matériau qui survivra à l'introduction dans le corps humain ? ». Le Colonel, revenant de la Guerre du Vietnam, lui décrit les nombreuses amputations auxquelles il a assisté et explique que la chirurgie réparatrice a un besoin de nouveaux matériaux qui ne soient pas rejetés par le corps. L.L. Hench et ses collaborateurs se lancent alors dans cette aventure.

Les verres bioactifs, ou bioverres, sont des matériaux développés par L.L. Hench et ses collaborateurs dans les années 70 [3]. Ils présentent la particularité de développer à leur surface une interface qui se lie à l'os naturel lorsqu'ils sont immergés en milieu *in vivo*. Cet accrochage à l'os naturel se produit en onze étapes [3] : les cinq premières correspondent à la formation, à la surface du verre, d'une apatite de composition proche de l'hydroxyapatite biologique, et, durant les six étapes suivantes, il y a formation d'une liaison entre cette apatite et l'os. L.L. Hench a introduit le terme de « bioactivité » pour traduire cette propriété. Cette capacité à former une couche se liant à l'os, couplée à des propriétés de dissolution variables, a permis d'utiliser ces matériaux comme biomatériaux dans le domaine de la chirurgie réparatrice osseuse. Parmi ces bioverres, l'un d'eux, le bioverre de référence nommé Bioglass® 45S5, présente un intérêt particulier : il est bioactif (cf *Partie 1 III.A. Définitions*). Ce verre de référence, appartenant au système SiO_2-CaO-Na_2O, contenant une faible quantité de P_2O_5 (6 %massique), possède donc des propriétés qui font de lui un biomatériau efficace dans de nombreuses applications comme les implants dentaires, le remplacement des osselets de l'oreille interne, ou la reconstruction cranio-maxillo-faciale.

La structure du verre Bioglass® 45S5 a été largement étudiée en utilisant différentes techniques de caractérisation (Raman, FTIR, DRX, RMN, …) [199-207]. Cependant, certains aspects structuraux ne sont pas encore totalement élucidés, comme par exemple la nature de la distribution des cations autour des groupements phosphates et des groupements silicates ou l'existence ou non de liaisons Si-O-P au sein du réseau de tétraèdres. Dans la première partie de cette étude, nous avons utilisé la RMN haute résolution solide pour apporter des informations supplémentaires sur la structure de ce verre.

Pour étudier *in vitro* les propriétés bioactives de ce type de verres, il a été nécessaire de mettre au point une solution qui présente des conditions de composition et de pH proches de celles du plasma humain. Cette solution, appelée SBF (pour Simulated Body Fluid) [208-209], a permis de réaliser des expériences qui ont montré, dans la plupart des cas, une bonne capacité de prévoir la bioactivité *in vivo* du matériau étudié. La formation de la couche d'hydroxyapatite à la surface du verre a lieu en cinq étapes dans ce type de solution [3]. Un nombre important d'études ont été réalisées pour caractériser les réactions qui ont lieu et les produits intermédiaires formés avant l'apatite. Ces études ont été menées pour la plupart par spectroscopie Raman et FTIR, par DRX, par Microscopie couplée avec des techniques de quantification élémentaire EDX [210-218]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude par

RMN, qui permet un suivi quantitatif des étapes de la réaction 45S5/SBF, n'a été mené à ce jour. Dans la deuxième partie de cette étude, nous présenterons donc un suivi détaillé et quantitatif du verre 45S5 immergé dans du SBF en utilisant la RMN, en complément d'autres méthodes de caractérisation.

I. Revue bibliographique sur le bioverre Bioglass® 45S5

I.A. Verres du système SiO_2-Na_2O-CaO + P_2O_5

Sachant que l'os est principalement constitué d'hydroxyapatite (notée HA), Hench et ses collaborateurs émettent l'hypothèse que « *si un matériau est capable de former une couche d'HA* in vivo*, il pourrait ne pas être rejeté par le corps.* ». Ils synthétisent plusieurs verres du système ternaire SiO_2-Na_2O-CaO en ajoutant une faible quantité de P_2O_5. Pour chacune de ces compositions, ils réalisent des tests *in vitro* et *in vivo* de dissolution, de liaison avec l'os et avec les tissus mous environnants. Ces travaux leur permettent de mettre en évidence différents types de comportements qu'ils reportent sur le diagramme ternaire SiO_2-CaO-Na_2O + 6 %massique de P_2O_5 présenté sur la *Figure 41*.

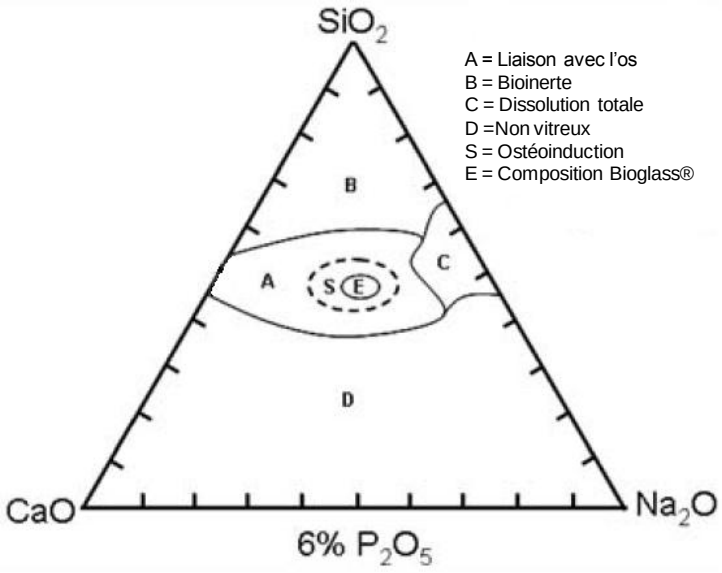


Figure 41 : *Domaines de bioactivité dans le système SiO_2-CaO-Na_2O + 6 %massique de P_2O_5 mis en évidence par Hench* [219].

L'influence de la composition chimique sur la bioactivité des verres est clairement illustrée sur ce diagramme, sur lequel on peut distinguer plusieurs domaines :

Les échantillons du domaine D cristallisent lors de leur préparation. Les échantillons de la région B (dont la composition contient plus de 60 %massiques de SiO_2) sont bioinertes, c'est-

à-dire qu'ils ne développent pas d'apatite. Ceux de la région C se dissolvent complètement *in vitro* et l'implant ne pourra pas s'accrocher à l'os. Le domaine A regroupe les verres et les vitrocéramiques capables de se lier à l'os (ostéoconducteurs). Parmi ces composés, on trouve un domaine nommé S qui réunit les matériaux qui sont également ostéoinducteurs. Le bioverre de référence, le Bioglass® 45S5, appartient à ce dernier domaine (Zone E).

I.B. Le verre 45S5

Le verre Bioglass® est le plus étudié et le plus utilisé des bioverres depuis sa découverte. Sa composition est présentée dans le *Tableau 10*.

	%molaire	**%massique**
SiO_2	46,1	45
CaO	26,9	24,5
Na_2O	24,4	24,5
P_2O_5	2,6	6

Tableau 10 : Composition molaire et massique du bioverre 45S5

L'appellation « 45S5 » est basée sur le code d'Ogino *et al.* [220] pour les biomatériaux :

- « S » indique que le formateur de réseau de ce verre est le SiO_2
- « 45 » correspond au pourcentage massique en SiO_2, formateur de réseau
- « 5 » vient du rapport molaire Ca/P (qui est de 5,17 au sein de ce verre)

I.B.1. Structure du verre 45S5

I.B.1.a. Réseau silicaté

Le verre 45S5 est un verre de silicate contenant deux cations modificateurs de réseau, le sodium et le calcium, et une faible quantité de P_2O_5. Le réseau vitreux est constitué de tétraèdres SiO_4 (cf *Figure 42*), reliés entre eux par des atomes d'oxygène pontants. Classiquement, on utilise la notation Q^n pour distinguer les différents types de tétraèdres SiO_4 en fonction de leur nombre n d'atomes d'oxygène pontants. Dans un réseau silicate, cinq types d'unités Q^n (représentées sur la *Figure 42*) peuvent être rencontrés en fonction de la teneur en cations modificateurs de réseau. L'unité Q^0 est un groupe isolé qui n'est liée à aucun autre tétraèdre ; l'unité Q^1 est liée à un seul autre tétraèdre par un oxygène pontant et correspond à une unité de fin de chaîne ; l'unité Q^2 qui possède deux liaisons Si-O-Si est une

unité de milieu de chaîne et les unités Q^3 et Q^4, qui sont liées respectivement à trois et quatre autres tétraèdres, sont des groupements de branchement de chaînes.

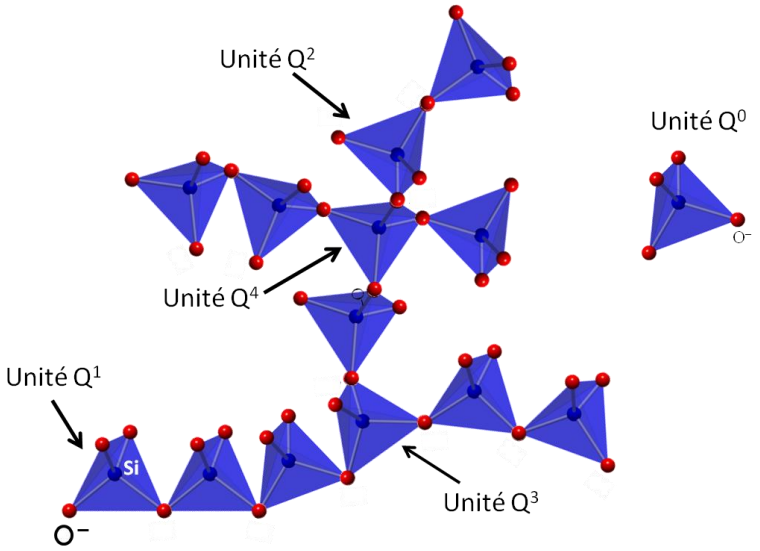


Figure 42 : *Réseau de tétraèdres – identification des cinq types d'unités silicates*

La charge des atomes d'oxygène non-pontants (NBO) des unités Q^n, avec $n < 4$, est compensée par les cations modificateurs de réseau (comme représenté schématiquement sur la *Figure 43*).

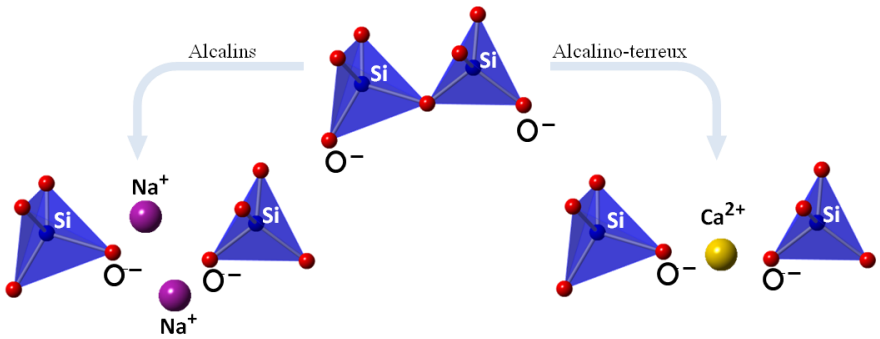


Figure 43 : *Compensation des charges négatives des oxygènes non-pontants par les différents cations modificateurs du réseau silicate du 45S5*

Le réseau de tétraèdre SiO_4 du verre 45S5 a été étudié par de multiples méthodes expérimentales comme la spectroscopie Infra-Rouge [199-200], la spectroscopie Raman [201], la Résonance Magnétique Nucléaire [202-205], la diffraction des rayons X [202] et également par des simulations numériques de Dynamique Moléculaire (MD) [204, 206-207]. Parmi tous ces travaux, les études par RMN du ^{29}Si ont permis de mettre en évidence et de quantifier les différents types d'unités Q^n constituant le réseau silicate. Même si l'interprétation des spectres du ^{29}Si varie suivant les auteurs (présence de deux ou trois types d'unités Q^n), il est clairement établi

que le réseau silicaté du Bioglass® est principalement composé d'unités Q^{2Si} formant des chaînes ou des cycles. Les quantifications des différentes unités Q^n déterminées par différents auteurs par déconvolution des spectres ^{29}Si du verre 45S5 sont regroupées dans le *Tableau 11*.

Auteurs	Méthode	Q^{1Si}		Q^{2Si}		Q^{3Si}	
		δ (ppm)	%	δ (ppm)	%	δ (ppm)	%
Linati [203]	RMN	-78	15	-82	67	-88	18
Pedone [204]	RMN	-71,1	10,5	-78	67,2	-85,3	22,3
	MD	-70,7	12,2	-79,5	54,5	-87	33,3
Angelopoulou [205, 221]	RMN	/	0	-79,5	36,5	-83,1	65,3
Fitzgerald [202]	RMN	/	0	-80,4	69	-88,1	31

Tableau 11 : *Déplacements chimiques RMN et pourcentages de présence des différentes unités silicates constituant le réseau silicate du bioverre 45S5 [202-205].*

I.B.1.b. Insertion du phosphore dans le réseau vitreux

L'incorporation du phosphore dans le réseau d'un verre de silicate a fait l'objet de nombreuses études. Le phosphore pouvant jouer le rôle de formateur de réseau, deux mécanismes peuvent être envisagés : la formation d'un réseau mixte de tétraèdres SiO_4 et PO_4, avec des liaisons Si-O-P, ou bien la formation de deux types de réseaux distincts sans liaisons P-O-Si. Les deux types d'environnement du phosphore attendus dans ces deux cas sont représentés sur la *Figure 44*.

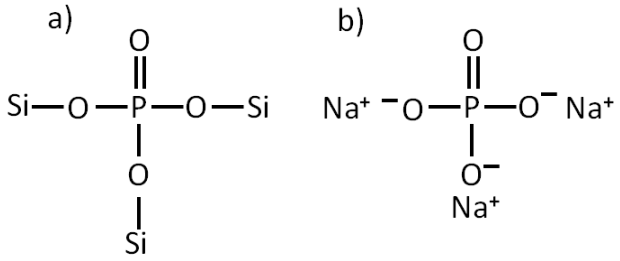


Figure 44 : *a) le rôle du phosphore comme co-formateur du réseau b) le phosphore dans sa structure orthophosphate*

Dans le cas des verres de silicates d'alcalins et d'alcalinoterreux, il a été montré que le second mécanisme est dominant et que l'ajout de P_2O_5 engendre une repolymérisation du réseau silicate en attirant les cations modificateurs pour former des unités orthophosphates et

pyrophosphates [203, 222-224]. Deux équations ont été proposées pour décrire la formation de ces unités phosphates [225] :

$$6\text{Si-O-M} + P_2O_5 \rightarrow 2M_3PO_4 + 3\text{Si-O-Si (orthophosphates du cation M)} \quad (13)$$

$$4\text{Si-O-M} + P_2O_5 \rightarrow M_4P_2O_7 + 2\text{Si-O-Si (pyrophosphates du cation M)} \quad (14)$$

Grussaute *et al.* [225] ont aussi proposé une réaction d'équilibre entre les unités phosphates et silicates :

$$2PO_4^{3-} + \text{Si-O-Si} \leftrightarrow P_2O_7^{4-} + 2\text{Si-O}^- \quad (15)$$

Cette équation indique que plus le réseau silicate est polymérisé, plus l'insertion de phosphore déplace l'équilibre vers la formation d'unités $P_2O_7^{4-}$.

S'il est communément admis que le phosphore forme très majoritairement des unités orthophosphates (Q^{0P}) ou pyrophosphates (Q^{1P}), la présence d'une faible quantité de liaisons Si-O-P, au sein du réseau vitreux, fait toujours l'objet de débats dans la littérature.
Nelson *et al.* [226] ont étudié, par spectroscopie Raman, des verres du système SiO_2-Na_2O-P_2O_5 contenant de 1 à 65 % massique de P_2O_5. Ces auteurs n'ont pas observé de bandes caractéristiques de la liaison Si-O-P, et ce, quelle que soit la teneur en P_2O_5. Ils en ont conclu que cette liaison n'existe pas dans le système étudié. Dans des verres du système SiO_2-K_2O contenant du P_2O_5, les travaux de Lockyer *et al.* [227], réalisés par RMN du ^{31}P, concluent également à l'absence de liaisons Si-O-P. Une étude par RMN du ^{31}P, réalisée par Grussaute *et al.* [225], balayant de grandes gammes de composition sur des systèmes SiO_2-CaO-Na_2O et SiO_2-TiO_2-Na_2O, dopés avec 0,4 à 2,5 %mol de P_2O_5, a également conclu que ce type de liaisons n'avaient pas lieu au sein de ces systèmes.
En revanche, les résultats de simulation par dynamique moléculaire de la structure des verres SiO_2-Na_2O-CaO, avec différentes teneurs en P_2O_5, mettent en évidence une faible quantité de liaisons Si-O-P [207, 228] et indiquent que la formation de ce type de liaisons serait favorisée par des pourcentages en P_2O_5 élevés (6,5 %mol) [203]. De manière similaire, dans le cas de « verres » mésoporeux CaO-SiO_2 contenant 5 %mol de P_2O_5, une raie de résonance de faible intensité, dont le déplacement chimique isotrope moyen se situe à ~6,0 ppm sur les spectres RMN MAS du ^{31}P, a été récemment interprétée comme la signature de liaisons Si-O-P [229].

Dans le cas du Bioglass® 45S5, les résultats concernant la spéciation des environnements locaux du phosphore obtenus, d'une part, par RMN du ^{31}P, et, d'autre part, via des simulations par dynamique moléculaire, sont regroupés dans le *Tableau 12*. L'ensemble de

ces résultats indique que le phosphore est très majoritairement présent sous la forme d'unités Q^{0P} (PO_4^{3-}) dans le verre. Il faut également noter que les simulations numériques de Tilocca *et al.* [207], Pedone *et al.* [204] et Linati *et al.* [203], suggèrent que le phosphore est aussi présent en moindre quantité sous forme d'unités pyrophosphates Q^{1P} (~33 %, 26,7 % et 29 %, respectivement). Cerruti *et al.* [199] mentionnent également la présence possible d'unités Q^{2P} en très faible quantité, espèces dont la présence est également indiquée dans les travaux de Tilocca *et al.* [207] (2 %, par simulation numérique) et par Linati *et al.* [203] (8 %, par simulation numérique, et 6 %, par RMN expérimentale). Dans tous ces travaux, la présence de liaisons Si-O-P est exclue.

Auteurs	**Méthodes**	**δ_{iso} Q^{0P} (ppm)**	**% Q^{0P}**
Pedone [204]	RMN	8,7	>99
	MD	non indiqué	73,3
Linati [203]	RMN	8,7	94
	MD	non indiqué	63
Tilocca [207]	MD	non indiqué	65
Fitzgerald [202]	RMN	8,1	>99

Tableau 12 : *Déplacements chimiques et intensités des unités orthophosphates établis par RMN ou par des méthodes de simulation numériques par différents auteurs pour le 45S5 [202-204, 207].*

A la vue de l'ensemble des travaux de la littérature concernant la spéciation de l'environnement du silicium ou du phosphore, la structure du Bioglass® 45S5 est encore sujette à discussion.

I.C. Comportement en milieu physiologique

Pour les échantillons de la zone A (et donc S et E) du diagramme ternaire, présenté en *Figure 41*, la liaison à l'os s'effectue par l'intermédiaire d'une couche d'hydroxyapatite qui se forme à la surface du biomatériau, comme Hench et ses collaborateurs en avaient fait l'hypothèse. Ceci a été confirmé par d'autres auteurs, qui ont aussi constaté la présence de cette couche à l'interface entre le matériau et l'os [230] (cf *Figure 45*).

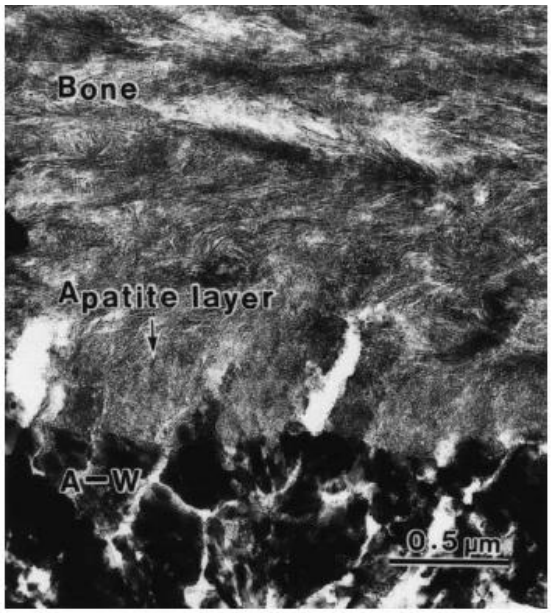


Figure 45 : *Image MET - Couche d'apatite formée à la surface d'une vitrocéramique (Glass Cermaic A-W), dans des conditions in vivo, qui relie celle-ci à l'os vivant* [230]

Après avoir observé l'accrochage de l'implant à l'os par cette couche d'apatite, deux questions se sont alors posées :

- Comment l'hydroxyapatite se forme-t-elle ?
- Comment l'implant peut-il s'accrocher à l'os ?

I.C.1. Réactivité des bioverres

Pour répondre à ces deux questions, Hench *et al.* ont proposé un mécanisme composé de onze étapes [27]. Les cinq premières conduisent à la formation de l'hydroxyapatite et les six autres correspondent au mécanisme d'accrochage de l'implant.

1 → Lors de la <u>première étape,</u> il se produit un échange des ions Ca^{2+} et Na^{+} avec les ions hydroniums H_3O^{+} du milieu environnant selon les réactions suivantes :

$$Si\text{-}O^{-}\ Na^{+}_{(\text{cœur verre})} + H_3O^{+}_{(SBF)} \rightarrow Si\text{-}OH_{(\text{surface verre})} + Na^{+}_{(SBF)} + H_2O \qquad (16)$$

$$Si\text{-}O^{-}\ Ca^{2+}\ {}^{-}O\text{-}Si_{(\text{cœur verre})} + 2H_3O^{+}_{(SBF)} \rightarrow 2Si\text{-}OH_{(\text{surface verre})} + Ca^{2+}_{(SBF)} + H_2O \qquad (17)$$

Il y a donc formation de groupements silanols (Si-OH), à la surface du verre. Dans le milieu environnant, la surface du verre devient moins alcaline. Le pH de la solution devient basique puisque les ions H^{+} qui étaient en solution ont été remplacés par les cations du verre.

2 → Lors de la deuxième étape, il se produit l'hydrolyse des liaisons Si-O inter-tétraèdres à la surface du verre, ce qui provoque l'apparition de nouveaux groupes silanols. Cette étape se produit selon la réaction-type suivante :

$$\text{Si-O-Si}_{(\text{surface verre})} + \text{H}^{+}\text{OH}^{-}{}_{(\text{SBF})} \rightarrow \text{Si-OH}_{(\text{surface verre})} + \text{HO-Si}_{(\text{SBF})} \qquad (18)$$

On remarque que cette réaction aboutit également à la formation de $\text{Si-OH}_{(\text{SBF})}$. En effet, lors de cette réaction, une partie de la silice se dissout dans le SBF sous forme de Si(OH)_4.

3 → Lors de la troisième étape, les silanols produits lors des deux étapes précédentes se condensent et repolymérisent pour créer un gel de silice à la surface du verre selon la réaction :

$$\text{-O-Si-OH}_{(\text{surface verre})} + \text{HO-Si-O-}_{(\text{surface verre})} \rightarrow \begin{array}{c} | \quad | \\ \text{O-Si-O-Si-O}_{(\text{surface verre})} \\ | \quad | \end{array} + \text{H}_2\text{O} \qquad (19)$$

4 → Durant la quatrième étape, des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-}, provenant du milieu environnant et/ou du verre, migrent progressivement vers la couche riche en silice. Ces ions forment sur cette couche silicatée un film riche en $CaO\text{-}P_2O_5$, appelé phosphate de calcium amorphe (noté ici et dans toute la suite CaP).

5 → Lors de la cinquième étape, la couche de CaP amorphe cristallise en incorporant des ions OH^- et CO_3^{2-} provenant du milieu environnant pour former une couche d'hydroxyapatite carbonatée (notée HAC). Celle-ci est similaire aux apatites biologiques de formule $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-y}(CO_3)_z$ [231]. La réaction correspondante est :

$$\text{Si-O-Si} + 2\text{OH}^{-} + \text{CO}_3^{2-} + 10\text{Ca}^{2+} + 6\text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y}(\text{CO}_3)_z \qquad (20)$$

Ces cinq étapes sont reportées schématiquement sur la *Figure 46*. Ce mécanisme est basé sur les mécanismes classiques de corrosion des verres silico-sodo-calciques, bien que cette corrosion soit plus rapide pour les bioverres.

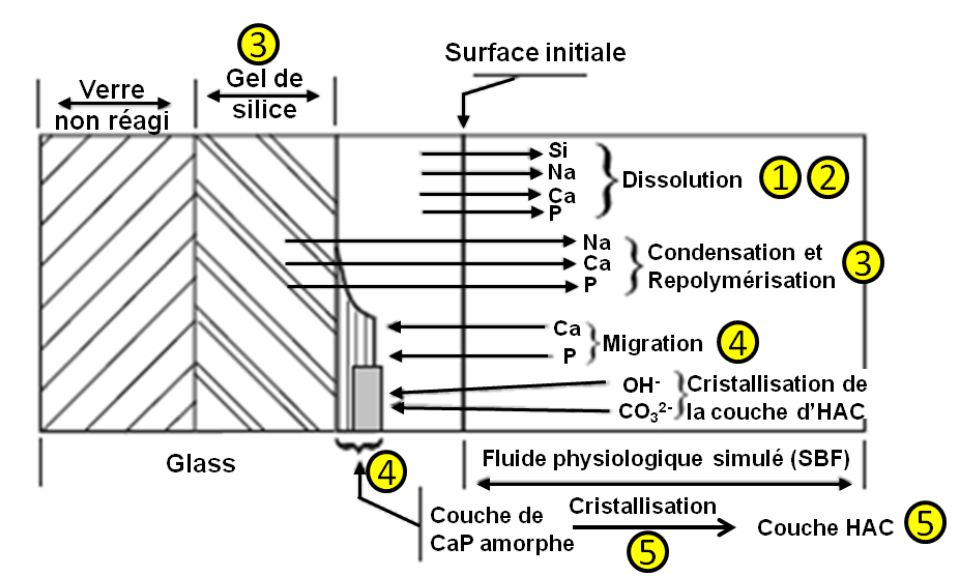


Figure 46 : *Représentation schématique des étapes 1 à 5 de la réaction d'un bioverre avec un fluide physiologique simulé* [211]

Les cinq étapes menant à la formation de l'HAC sont suivies de six étapes supplémentaires mettant en jeu le milieu organique pour aboutir à la liaison entre le verre et l'os :

6 → Adsorption/désorption biochimique des facteurs de croissance sur la couche d'HAC cristallisée

7 → Préparation du site par les macrophages pour la reconstruction osseuse

8 → Adhésion des cellules souches à l'HAC

9 → Formation, prolifération et différentiation des ostéocytes à partir de ces cellules souches

10 → Minéralisation et cristallisation de la matrice HAC-collagène

11 → Prolifération des ostéocytes qui forment alors les ostéoblastes, cellules responsables de la formation osseuse.

À la fin de ce mécanisme, le matériau est fixé à l'os par l'intermédiaire de la couche d'hydroxyapatite carbonatée (cf *Figure 45*). Un des facteurs limitant des essais *in vivo* est la nécessité d'avoir un grand nombre d'animaux à disposition. Afin de pouvoir réaliser des tests de bioactivité à grande échelle, il a donc fallu trouver un moyen de simuler la réaction ayant lieu dans le milieu biologique.

I.C.2. Le Simulated Body Fluid (SBF)

Dans un premier temps, Hench *et al.* ont constaté que la formation d'HAC pouvait être reproduite *in vitro*, dans une simple solution tampon de trishydroxyméthylaminométhane (notée TRIS) et d'acide chlorhydrique au pH physiologique de 7,4 [220]. Cette solution tampon est le premier fluide physiologique simulé à avoir été élaboré. En 1990, Kokubo *et al.* [208-209] ont développé et testé avec succès une solution capable de reproduire les changements structuraux à la surface de vitrocéramiques se produisant *in vivo*, solution qu'ils nomment alors Simulated Body Fluid (notée SBF). Cette solution réunit des conditions équivalentes à la partie minérale des fluides biologiques en termes de composition ionique et de pH (7,24-7,40 dans l'organisme par rapport à 7,25-7,42 dans le SBF). Ils ont montré, simultanément avec Filgueiras *et al.* [232-233], que lorsqu'il est immergé en SBF le bioverre de référence 45S5 développe une couche d'hydroxyapatite similaire à celle formée *in vivo*.

Afin de se rapprocher au maximum du plasma humain, plusieurs modifications ont été apportées au SBF originel, donnant naissance à de nombreuses versions de ce fluide simulé, regroupées dans le *Tableau 13*. Malgré les différences de concentration en ions Cl^- et HCO_3^- avec le plasma humain, le c-SBF est la solution la plus utilisée à ce jour. Les autres versions du SBF n'ont pas donné de meilleurs résultats ou sont plus compliquées à préparer [234-235].

Table 1
Ion concentrations of SBFs and human blood plasma

	Ion concentration (mM)							
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Human blood plasma [*]	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Original SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
Corrected SBF (c-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Revised SBF (r-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Newly improved SBF (n-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Tableau 13 : *Composition des différents SBF et du plasma humain [236] ([*] = [237])*

Plusieurs analyses détaillées ont montré que l'apatite formée à la surface d'un bioverre lorsqu'il est immergé dans du SBF est similaire à l'os minéral en termes de composition et de structure [208-209, 238]. À partir de ces résultats, il a été proposé que la condition essentielle pour qu'un matériau forme une liaison avec l'os est la formation à sa surface d'une apatite aussi similaire que possible à celle qui compose la partie minérale de l'os. La bioactivité *in vivo* d'un matériau peut donc être prédite en observant la formation de l'apatite à sa surface dans le SBF [239]. Néanmoins, si on voulait simuler au mieux les conditions biologiques, il faudrait ajouter à la solution des protéines et des cellules, travailler sous une pression de 0,05 atm de CO_2 [240] et mettre en place une circulation continue du fluide.

I.C.3. Propriétés biologiques

Actuellement, la formation à la surface du bioverre d'une couche d'HAC est considérée comme utile à la régénération osseuse mais pas comme l'étape la plus essentielle de ce processus. Les mécanismes cruciaux qui permettent d'améliorer la croissance d'un os nouveau sont liés au contrôle de la dissolution des ions, et spécialement du calcium et du silicium qui ont des rôles spécifiques dans la régénération osseuse [3, 241]. Des études récentes ont montré que les verres bioactifs partiellement résorbables et les produits de leur dissolution ionique améliorent l'ostéogenèse en régulant l'expression génétique, la prolifération et la différentiation des ostéoblastes [241-249]. Les bioverres se dissolvent presque totalement : il reste cependant un cœur composé de gel de silice [32]. Une étude réalisée par Wilson *et al.* [250] a mis en évidence la non-toxicité de différentes compositions de bioverres sur les tissus autres que l'os. Cette étude réunit de nombreux travaux *in vitro* et *in vivo* qui montrent que l'utilisation du Bioglass®, sous forme massive ou sous forme de particules, est non-toxique pour l'organisme. Enfin, des études ont montré que le silicium est éliminé sans danger par la voie urinaire [219].

I.C.4. La réaction 45S5/SBF

Le 45S5 est un verre bioactif, et comme tout verre bioactif, son immersion dans du SBF aboutit à la formation d'HAC à sa surface *via* la séquence de réactions présentée précédemment. Evidemment, cette suite de réactions a déjà été caractérisée de nombreuses fois pour différentes compositions de verres, dont le 45S5, à l'aide de nombreuses méthodes.

La formation du gel de silice qui apparait à la surface du verre (cf équations (4) à (7)) est détectée en spectroscopies vibrationnelles (FTIR et Raman) par les bandes caractéristiques des groupements silanols Si-OH et par celles des liaisons des tétraèdres Si-O-Si (Q^{4Si}), qui correspondent au réseau très polymérisé de ce gel [210-216]. Une étude réalisée par RMN de l'oxygène-17 montre que la repolymérisation des groupements Si-OH donne bien lieu à la formation de ce gel de silice [217]. Ce gel est repéré en DRX par un pic large situé à une valeur de 24° [213-214, 218]. La caractérisation par pH-métrie des milieux d'immersion montre qu'au tout début de la réaction le pH passe de sa valeur initiale (~ 7,4) à une valeur palier (8-9). Cette augmentation est due à l'échange entre les cations du verre et les protons du milieu selon les équations (16) et (17), le milieu devient donc plus basique. Le pH conserve alors cette valeur palier par la suite [210-211, 213, 215]. La couche de CaP amorphe est détectée par FTIR sous la forme d'une large bande caractéristique des liaisons P-O qui règnent dans cette phase

[210-213, 215]. Des études réalisées sur cette phase ont montré qu'elle a pour formule chimique $Ca_9(PO_4)_6$ [251]. Cette phase fait office de précurseur de l'hydroxyapatite cristallisée [252]. En effet, elle va progressivement relarguer une partie de ses ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} qui sont utilisés dans la nucléation de la phase cristallisée en formation [253-255]. La formation progressive d'HAC est détectée en spectroscopie FTIR par deux bandes caractéristiques situées entre 560 et 605 cm^{-1}. La DRX permet de mettre en évidence plusieurs pics fins correspondant à cette phase et d'indiquer que les cristallites d'HAC se développent préférentiellement dans le plan 001 [256-258], information appuyée par différentes techniques de microscopie [259-260]. Le caractère carbonaté de l'HA**C** est mis en lumière par une bande caractéristique, détectée par spectroscopie FTIR [210-211, 213, 261], de la liaison C-O qui règne dans ces ions. Quelques auteurs discutent du type de substitution sous laquelle s'insèrent les ions carbonates dans l'HAC : substitution de type A ($HO^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + \square_{HO}^-$) ou de type B ($PO_4^{3-} \leftrightarrow CO_3^{2-} + \square_{HO}^- + \square_{Ca}^{2+}$) (ou les deux simultanément) dans les apatites [262-264].

Si la spectroscopie RMN a été employée pour étudier les évolutions structurales de différents bioverres lorsqu'ils sont immergés dans différents fluides physiologiques simulés [259-260, 265-267], cette technique n'a pas été employée, à notre connaissance, pour caractériser en détail et de manière quantitative les évolutions de la structure du bioverre 45S5. La partie qui suit s'attache donc, d'une part, à caractériser par RMN la structure initiale du 45S5, puis, d'autre part, à présenter les résultats obtenus par cette même technique, détaillant le comportement de ce verre dans le SBF, notamment en termes de quantification des espèces participant à la formation des différentes couches observées.

II. Structure du verre 45S5 : approche par RMN haute résolution

Le Bioglass® 45S5, bien que relativement bien connu en termes d'utilisation, revêt des aspects structuraux qui ne sont pas encore totalement élucidés, notamment en ce qui concerne la présence ou l'absence de liaisons Si-O-P ou encore la répartition des cations dans le réseau. Une étude structurale apportant quelques éléments de réponse est proposée ici. Dans une deuxième partie, nous nous sommes attachés à effectuer un suivi des modifications structurales qui ont lieu lorsque le verre est immergé en fluide physiologique simulé (SBF), en utilisant différentes techniques de caractérisation et en particulier par RMN qui permet une étude quantitative de l'évolution des espèces en présence au cours des différentes étapes de réaction.

II.A. Synthèse du Bioglass®

Le bioverre 45S5, appartenant au système SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5, a été synthétisé par méthode classique de fusion/trempe. Son équivalent sans phosphore, nommé 45S5_0P, a également été synthétisé afin d'observer l'influence de l'ajout de phosphore sur le réseau vitreux. Les compositions de ces deux verres sont indiquées dans le *Tableau 14*.

	45S5		**45S5_0P**	
	%mol	**%wt**	**%mol**	**%wt**
SiO_2	46,1	45	47,3	47,8
CaO	26,9	24,5	27,6	26,1
Na_2O	24,4	24,5	25,1	26,1
P_2O_5	2,6	6	0	0

Tableau 14 : *Compositions molaires et massiques du Bioglass® et de son dérivé sans phosphore*

Les verres ont été synthétisés à partir d'un mélange stœchiométrique de poudres de SiO_2 (99,5 %), de Na_2CO_3 (99,0 %), de $CaCO_3$ (≥99,0 %) et de $NH_4H_2PO_4$ (98,0 %). Le mélange de poudre a été homogénéisé manuellement par broyage dans un mortier en agate, puis introduit dans un creuset Pt/10 %Rh. La synthèse comporte deux traitements thermiques. Un premier cycle de dégazage (cf *Figure 47*) à 300°C afin d'éliminer l'eau et l'ammonium (cf *Partie 2 II.A équation (8)*) suivie d'un palier de décarbonatation à 900°C.

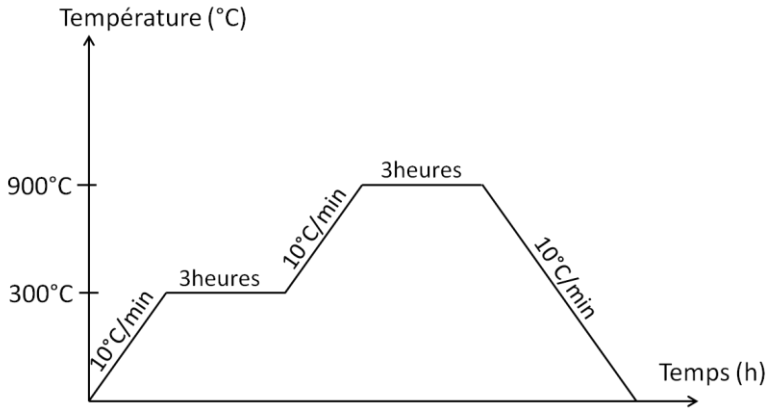


Figure 47 : *Cycle thermique de dégazage*

Le mélange est ensuite refroidi (10 °C/min) jusqu'à la température ambiante et il est broyé avant le second cycle thermique (cf *Figure 48*). Celui-ci consiste en une montée de la température ambiante jusqu'à 1400 °C à une vitesse de 30°C/min, puis, après un palier de 20 minutes à cette température le produit est trempé à l'eau. Le verre obtenu est broyé avant de subir à nouveau un cycle de fusion/trempe, ce qui permet une meilleure homogénéité chimique du verre. Les verres ainsi obtenus sont stockés et manipulés en boîte à gants pour éviter toute contamination atmosphérique.

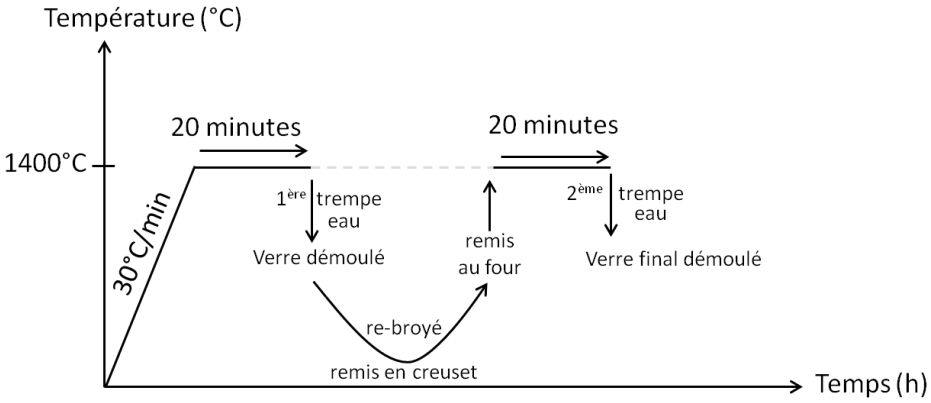


Figure 48 : *Cycle thermique de trempe*

Le caractère amorphe des verres a été vérifié par Diffraction des Rayons X et les compositions chimiques, déterminées par analyse EDX, sont similaires à celles désirées.

Deux compositions de Bioglass® 45S5 ont été préparées. La première, enrichie en ^{29}Si, est utilisée uniquement pour l'étude structurale initiale. La seconde, non enrichie, est celle utilisée pour l'immersion en fluide physiologique simulé.

II.B. Caractérisation structurale du verre 45S5 par RMN

II.B.1. Conditions expérimentales

Les spectres RMN en rotation à l'angle magique (MAS) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance I dans un champ magnétique de 9,4 T (400 MHz). Pour le verre 45S5, les spectres quantitatifs ^{29}Si et ^{31}P ont été acquis par simple impulsion radiofréquence à une fréquence de rotation de 24 kHz. Pour les deux noyaux, la durée d'impulsion était de 1 µs (angle de basculement de 30° pour le ^{29}Si et 15° pour le ^{31}P), le temps de recyclage était fixé à 60 s et 128 scans ont été accumulés. La durée de l'expérience MAS sur ce verre (pour les deux noyaux) est de 2 heures. Pour le verre 45S5_0P, les spectres quantitatifs ^{29}Si ont été acquis par simple impulsion radiofréquence à une fréquence de rotation de 14 kHz. La durée d'impulsion était de 1,9 µs (angle de basculement de 22,5° pour le ^{29}Si), le temps de recyclage était fixé à 60 s, 1088 scans ont été accumulés et la durée de l'expérience est de 18 heures. Les spectres MAS (fréquence de rotation de 24 kHz) du ^{23}Na ont été acquis après une simple impulsion radiofréquence sélective de la transition centrale. La durée d'impulsion était de 1,20 µs, le temps de recyclage était fixé à 1 s et 4092 scans ont été accumulés. La durée d'expérience est de 1 heure pour les deux verres étudiés.

Les expériences REDOR ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Avance Bruker I dans un champ magnétique de 9,4 T en utilisant une sonde triple-résonance Bruker avec des rotors de diamètre 3,2 mm (volume d'échantillon de 0,10 mL). Lors de l'expérience REDOR ^{31}P-^{23}Na, les durées des impulsions de 90° et de 180° étaient de 3,60 et 7,20 µs pour le noyau ^{31}P et la durée de l'impulsion de 180° sélective de la transition centrale de ^{23}Na était de 13,50 µs. Afin de réduire la durée de l'expérience (36 heures), un train de pulse de saturation suivi d'un temps de recyclage de 30 s a été employé. Lors de l'expérience REDOR ^{31}P-^{29}Si, les durées des impulsions de 90° et de 180° étaient de 4,35 et 8,7 µs pour le noyau ^{31}P. Pour le ^{29}Si, la durée de l'impulsion 180° était de 7,3 µs. Un train de pulse de saturation suivi d'un temps de recyclage de 15 s a été utilisé. Pour les deux contributions étudiées, la durée de l'expérience est de 20 heures et 30 minutes.

II.B.2. Résultats

II.B.2.a. RMN du ^{29}Si

En ce qui concerne les verres 45S5 et 45S5_0P, les spectres RMN MAS du ^{29}Si, présentés sur la *Figure 49*, peuvent être déconvolués avec trois contributions larges qui peuvent être attribuées à des unités Q^{2Si}, Q^{1Si} et Q^{3Si} en fonction de leur déplacement chimique isotrope

[202-204, 267-268]. Les déplacements chimiques isotropes, les largeurs de raies et les intensités relatives de ces trois composantes sont données dans le *Tableau 15*. On note que l'ajout de phosphore provoque une diminution de l'intensité relative des unités Q^{1Si} au profit des unités Q^{2Si} et Q^{3Si} plus polymérisées. Cette repolymérisation du réseau silicate avec l'ajout de P_2O_5 est un phénomène connu [223, 226-227] et est due au réarrangement des cations modificateurs de réseau qui s'associent aux groupements phosphates. Dans le cas du verre 45S5, les proportions relatives des différentes unités Q^{nSi} déterminées ici sont en très bon accord avec les résultats d'études précédentes par RMN du ^{29}Si [203-204].

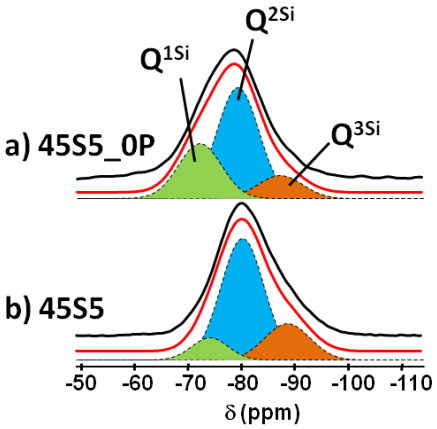


Figure 49 : *Spectres RMN ^{29}Si MAS (14 kHz ; 9,4 T) des verres a) 45S5_0P et b) 45S5*

Unités	Paramètres	45S5_0P	45S5
Q^{1Si}	**δ_{iso} (ppm)**	-72,8	-72,7
	FWHM (ppm)	8,3	8,3
	I (%)	29,3	10,1
Q^{2Si}	**δ_{iso} (ppm)**	-79,2	-79,6
	FWHM (ppm)	9,0	9,0
	I (%)	59,6	67,8
Q^{3Si}	**δ_{iso} (ppm)**	-87,5	-87,6
	FWHM (ppm)	9,9	9,9
	I (%)	11,1	22,1
O_{NB} RMN ^{29}Si		2,18	1,88
O_{NB} théorique		2,23	1,89

Tableau 15 : *Déplacement chimique isotrope, largeur de raie et intensité relative des raies de résonance des différentes unités Q^{nSi} dans les verres 45S5 et 45S5_0P. Nombre moyen d'atomes d'oxygène non-pontants par tétraèdre SiO_4 calculé à partir de la quantification des unités Q^{nSi} et à partir de la stœchiométrie (en faisant l'hypothèse que le phosphore est présent uniquement sous forme de groupements orthophosphates)*

À partir des proportions relatives des unités Q^{nSi} déterminées par RMN, on peut calculer le nombre d'oxygènes non-pontants (O_{NB}) moyen par tétraèdre SiO_4 selon la relation :

$$\sum_{n=0}^{4} (4-n) * [Q^{nSi}] = O_{NB\,RMN} \qquad (21)$$

Le nombre d'oxygènes non-pontants (O_{NB}) moyen par tétraèdre SiO_4 peut également être calculé à partir de la composition du verre (en faisant l'hypothèse que le phosphore se trouve uniquement sous forme de groupements orthophosphates) :

$$O_{NB\,th} = \frac{2[Ca^{2+}] + [Na^{+}] - 6[P_2O_5]}{[Si]} \qquad (22)$$

Dans le cas du verre 45S5_0P, les valeurs calculées à partir de la quantification RMN et à partir de la composition chimique sont similaires. De la même manière pour le verre 45S5, le nombre de O_{NB} moyen par tétraèdre SiO_4, déduit des proportions relatives des différentes unités Q^{nSi}, est très proche de celui calculé à partir de la composition en faisant l'hypothèse que le phosphore est présent uniquement sous la forme d'unités orthophosphates. Ceci suggère donc que le phosphore forme très majoritairement des groupements orthophosphates PO_4^{3-} dans le réseau vitreux.

II.B.2.b. RMN du ^{31}P

Les données de la littérature indiquent que les groupements phosphates s'insèrent majoritairement dans le réseau silicate sous la forme d'unités orthophosphates Q^{0P} [203, 222-224]. Cependant, dans certains travaux, la présence d'unités pyrophosphates Q^{1P} ou de groupements PO_4 liés au réseau de tétraèdres SiO_4 par des liaisons Si-O-P est également évoquée. Dans les deux cas, ces espèces ne seraient présentes qu'en très faibles quantités au sein du réseau vitreux [199-200]. Pour pouvoir déterminer la nature des différents types de groupements phosphates présents dans le verre synthétisé lors de cette étude, nous avons réalisé des expériences RMN du ^{31}P.

Comme on peut le voir sur la *Figure 50*, le spectre RMN MAS du ^{31}P dans le verre 45S5 (enregistré à une fréquence de rotation de 24 kHz) possède une forme asymétrique indiquant la présence de deux contributions. Les déplacements chimiques isotropes, les largeurs de raies et les intensités relatives de ces deux contributions, obtenues à partir de la simulation du spectre expérimental avec deux contributions de forme gaussienne, sont reportés dans le *Tableau 16*. Pour pouvoir les attribuer, il a été nécessaire de comparer les gammes de

déplacements chimiques de ces raies avec ceux des sites phosphore de quelques composés cristallins de référence.

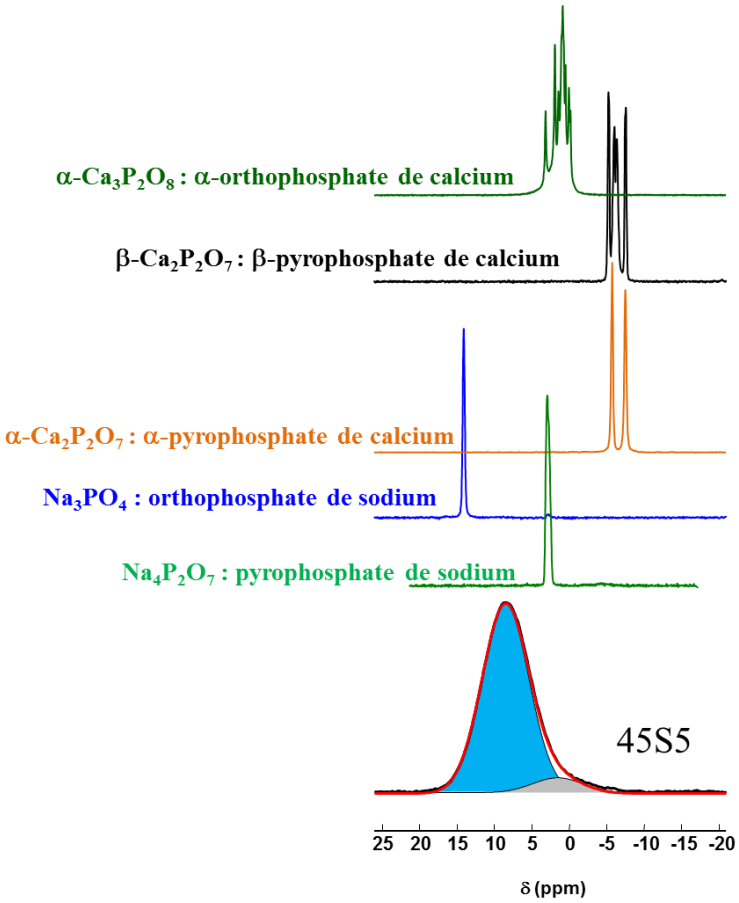


Figure 50 : *Spectres RMN ^{31}P MAS (24 kHz ; 9,4 T) du 45S5 et de composés phosphates de référence*

	δ_{iso} (ppm)	FWHM (ppm)	I (%)
Contribution 1	8,55	7,40	92,09
Contribution 2	1,53	7,90	7,91

Tableau 16 : *Déplacements chimiques isotropes, largeurs de raie et intensités relatives des deux contributions du spectre ^{31}P MAS du verre 45S5. Le paramètre FWHM indique la largeur à mi-hauteur de la raie de résonance.*

Le déplacement chimique isotrope moyen de la raie principale se situe à 8,55 ppm. Il se trouve donc compris entre les déplacements chimiques isotropes des orthophosphates de calcium (-2 à 5 ppm) [269], et celui de l'orthophosphate de sodium (15 ppm) [269]. Cette raie est donc attribuée à des unités orthophosphates Q^{0P} (PO_4^{3-}) dont la charge pourrait être compensée à la fois par des ions Ca^{2+} et Na^{+}. Cette interprétation est en bon accord avec la

littérature [228]. Pour confirmer cette attribution basée sur le déplacement chimique isotrope observé, il est possible de réaliser une expérience de double-résonance ^{31}P-^{23}Na qui sera présentée plus tard.

Il est plus ardu d'attribuer la deuxième contribution en se basant uniquement sur la valeur de son déplacement chimique isotrope moyen. Celui-ci, se situant à 1,53 ppm, se trouve entre la valeur du déplacement chimique isotrope moyen des unités orthophosphates Q^{0P} de calcium et celle des unités pyrophosphates Q^{1P} de calcium. Certains auteurs ont proposé d'attribuer cette raie à des unités Q^{0P} associées uniquement à des atomes de calcium [222], ou bien à des groupements pyrophosphates (Q^{1P}) [202, 204] ou encore à des groupements PO_4 possédant des liaisons Si-O-P [199-200, 202]. Pour mieux comprendre l'origine de cette raie, il est également possible d'utiliser une expérience de double résonance ^{31}P-^{29}Si, dont le protocole et les résultats sont présentés dans le paragraphe suivant.

II.B.2.c. Expérience de double-résonance

II.B.2.c.(i) Principe de l'expérience REDOR

L'expérience « *Rotational Echo Double Resonance* » a été mise en place par Gullion et Schaefer en 1988 [270]. Cette technique permet une mesure quantitative de la constante de couplage dipolaire D_{IS} entre deux noyaux différents (I et S) en RMN haute résolution solide sous rotation à l'angle magique. Le principe de cette expérience RMN est expliqué plus en détail dans l'*Annexe 1*.

II.B.2.c.(ii) REDOR ^{31}P-^{23}Na

Sur la base de son déplacement chimique isotrope, nous avons attribué la raie principale du spectre ^{31}P du verre 45S5 (cf *Figure 51*) à des unités Q^{0P} orthophosphates qui s'associent de façon mixte avec des calciums et des sodiums. Pour appuyer cela, nous avons mis en œuvre une expérience REDOR ^{31}P-^{23}Na qui permet de sonder les proximités entre le ^{31}P et les cations ^{23}Na.

Pour pouvoir interpréter les résultats obtenus dans le verre 45S5 étudié, il a été nécessaire d'effectuer la même expérience sur un composé de référence de structure connue : l'orthophosphate de sodium Na_3PO_4. Dans ce composé cristallin, la charge des groupements orthophosphates PO_4^{3-} est exclusivement compensée par les cations Na^+. Les courbes REDOR ^{31}P-^{23}Na obtenues pour le verre 45S5 et pour le composé Na_3PO_4 sont données par la *Figure*

51. Le *Tableau 17* rassemble les valeurs de M_2 obtenues à partir de la simulation des courbes REDOR en se limitant aux temps courts (courbure initiale). Il indique également les valeurs du second moment calculées pour différentes situations, (différents nombres de Na^+ avec des distances Na-P différentes). Etant donné que I(Na) > 1/2 et I(P) = 1/2, c'est la relation (28) qui permet de tracer les courbes présentées. Pour les conditions expérimentales utilisées, le facteur f est très proche de 0 et il sera donc négligé par la suite.

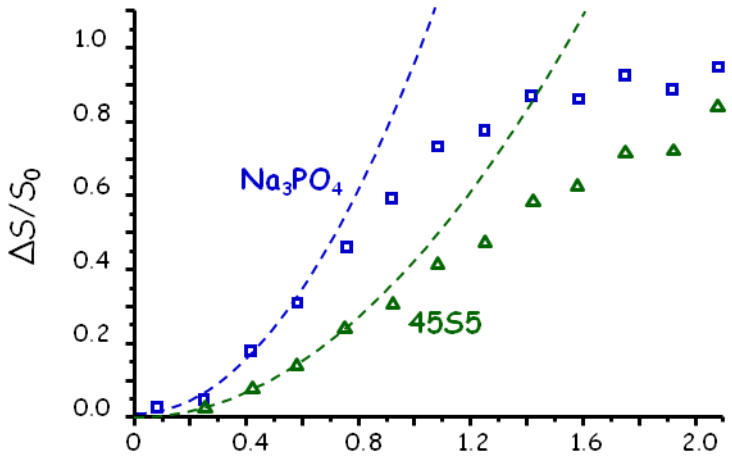


Figure 51 : *Courbes REDOR ^{31}P-^{23}Na expérimentales (24 kHz ; 9,4 T) pour la composante principale à 8,55 ppm du spectre ^{31}P MAS du verre 45S5 (triangles verts) et pour la raie de résonance ^{31}P du composé de référence Na_3PO_4 (carrés bleus).*

45S5	**Na_3PO_4**			
Exp.	Exp.	Calculé (à partir de la structure)		
(pour $\Delta S/S_0$<0.3) M_2 (10^6 $rad^2.s^{-2}$)	(pour $\Delta S/S_0$<0.3) M_2 (10^6 $rad^2.s^{-2}$)	pour r < 3,5 Å, M_2 (10^6 $rad^2.s^{-2}$)	pour r < 5,0 Å, M_2 (10^6 $rad^2.s^{-2}$)	pour r < 7,0 Å, M_2 (10^6 $rad^2.s^{-2}$)
31,40	71,81	56,67	70,54	74,46

Tableau 17 : *Seconds moments M_2 (^{31}P-^{23}Na) déterminés expérimentalement pour les deux composés étudiés. Valeurs du moment M_2 calculés à partir de la structure de Na_3PO_4 en considérant seulement les atomes de Na compris dans une sphère de rayon 3,5 ; 5 et 7 Å autour du phosphore.*

Dans le cas du composé Na_3PO_4, le second moment obtenu à partir de l'analyse de la courbure REDOR initiale est en bon accord avec les valeurs calculées à partir de la structure en considérant les atomes de sodium compris dans des sphères de rayon de 5,0 Å (14 plus proches voisins Na avec des distance Na-P variant de 2,9 à 4,3 Å) et 7,0 Å (44 plus proches

voisins Na avec des distance Na-P variant de 2,9 à 6,7 Å). Pour le verre 45S5, on obtient expérimentalement une valeur bien plus faible que pour le composé Na_3PO_4. Ceci est cohérent avec la présence d'unités PO_4^{3-} dont la charge est compensée à la fois par Na^+ et par Ca^{2+}, qui possèderont un nombre de sodiums dans leur seconde sphère de coordinence plus faible que dans le cas des sites phosphores du composé Na_3PO_4. Il est donc possible de conclure que la raie principale en RMN MAS du ^{31}P située à 8,55 ppm correspond bien à des groupements orthophosphates mixtes sodium-calcium dans la structure du verre 45S5, ce qui est en bon accord avec les études de Tilocca *et al.* [228] et de Mercier *et al.* [222].

II.B.2.c.(iii) REDOR ^{31}P-^{29}Si

Sur le spectre RMN MAS du ^{31}P, nous avions précédemment observé une contribution de faible intensité (< 8 %), dont le déplacement chimique isotrope moyen se situe à 1,53 ppm et qui avait été attribuée dans la littérature soit à des unités Q^{0P} associées à des atomes de calcium [222], ou bien à des unités Q^{1P} [202, 204] ou encore à des groupement PO_4 possédant des liaisons Si-O-P [199-200, 202]. L'expérience REDOR ^{31}P-^{29}Si, qui permet de sonder les proximités entre atomes de silicium et de phosphore, peut être utilisée pour distinguer ces différentes possibilités d'attribution.

La courbe REDOR ^{31}P-^{29}Si obtenue pour un verre 45S5 enrichi en ^{29}Si (99%) est présentée sur la *Figure 52*.

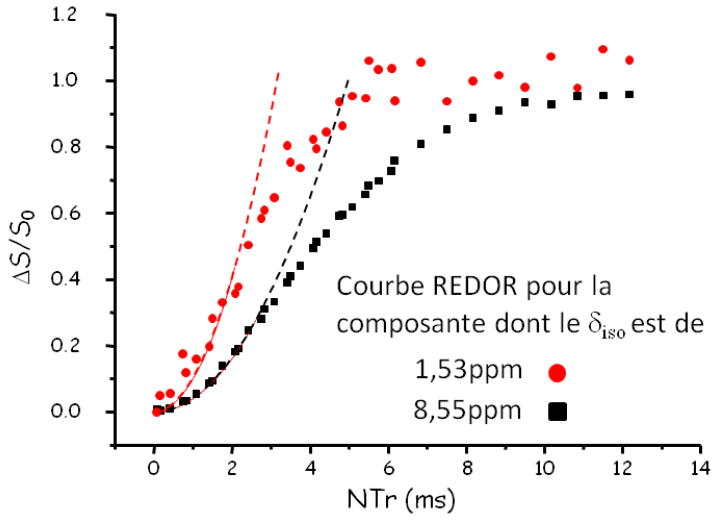


Figure 52 : *Courbes expérimentales REDOR ^{31}P-^{29}Si (12 et 24 kHz ; 9,4 T) des composantes situées à 8,55 ppm (carrés noirs) et 1,53 ppm (ronds rouges) du spectre ^{31}P MAS du verre 45S5 et simulations de la courbure initiale (lignes noire et rouge).*

Sur cette figure, on observe clairement un déphasage plus rapide pour la composante à 1,53 ppm que pour la raie principale à 8,55 ppm, indiquant la présence d'interactions dipolaires ^{31}P-^{29}Si plus fortes. Ce déphasage plus rapide se traduit par les valeurs des seconds moments déterminées à partir de la courbure initiale. La valeur de M_2 (7,45.10^5 rad^2.s^{-2}) pour la raie située à 1,53 ppm est très proche du second moment calculé (7,57.10^5 rad^2.s^{-2}) en considérant une paire de spin ^{31}P-^{29}Si avec une distance interatomique de 3,15 Å. Cette distance internucléaire Si-P est cohérente avec l'existence d'une liaison Si-O-P, pour laquelle la distance internucléaire est de 3,2 Å [271]. On en déduit donc que cette raie de résonance correspond à des unités PO_4 liées aux chaînes silicatées sous la forme de groupements de fin de chaînes (une seule liaison Si-O-P). La proportion des atomes de phosphore qui participent au réseau polymérique de tétraèdres SiO_4 est cependant relativement faible (< 8 %), ce qui pourrait expliquer les difficultés évoquées dans la littérature pour mettre en évidence ce type d'environnement. On notera que, selon Cerruti *et al.* [199-200], ce type de liaisons, est très labile et qu'elles peuvent donc être facilement détruites par l'humidité.

Grâce aux expériences REDOR ^{31}P-^{23}Na et ^{31}P-^{29}Si mises en œuvre dans cette étude, nous avons pu attribuer sans ambigüité les différentes contributions mises en évidence sur le spectre ^{31}P MAS. Ceci nous a permis de montrer que le phosphore est très majoritairement présent sous la forme de groupements orthophosphates Q^{0P}, associés de façon mixte aux cations Na^+ et Ca^{2+}, et qu'une très faible quantité d'atomes de phosphore participe au réseau silicate polymérisé sous la forme de groupements de fin de chaîne avec une liaison Si-O-P.

II.B.2.d. RMN du ^{23}Na : type d'insertion dans le réseau du 45S5

Pour compléter cette étude structurale, nous avons réalisé des analyses RMN sur le noyau ^{23}Na. Les spectres quantitatifs RMN MAS ^{23}Na (cf *Figure 53*) du verre 45S5 et du verre 45S5_0P sont constitués d'une raie de résonance unique qui présente une forme de raie caractéristique d'une distribution des interactions quadripolaire et de déplacement chimique. Afin d'extraire les paramètres de ces deux distributions, nous avons simulé le spectre expérimental avec le modèle GIM (*Gaussian Isotropic Model*) proposé par Czjzek [186], selon lequel la distribution du gradient de champ électrique est supposée correspondre à un désordre statistique [187-188]. Ces paramètres sont donnés dans le *Tableau 18*. On notera que les deux types d'environnements du sodium dans le verre 45S5 (pour les sodiums impliqués dans le réseau silicate et ceux associés aux groupements orthophosphates) ne donnent pas lieu à deux

contributions discernables sur le spectre MAS ^{23}Na et on observe uniquement une faible variation du déplacement chimique moyen entre le verre 45S5 et 45S5_0P. Pour ces deux verres, les distributions de déplacement chimique isotrope du ^{23}Na couvrent les gammes de déplacement chimique reportées pour des sites de coordinences de 5 à 7 dans des structures cristallines [272] ainsi que l'ensemble des déplacements chimiques calculés par DFT (Théorie de la Densité Fonctionnelle) pour des environnements NaO_5, NaO_6 et NaO_7 [204].

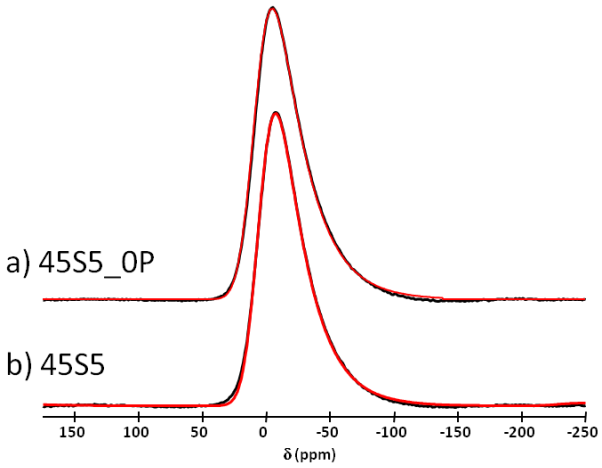


Figure 53 : *Spectres RMN MAS du ^{23}Na (9,4 T ; 24 kHz) dans les verres a) 45S5_0P et b) 45S5*

Verre	δ (ppm)	σ(δ) (ppm)	C_Q (ppm)	σ(C_Q) (ppm)
45S5_0P	7,5	22,7	3,12	1,56
45S5	10,6	22,7	3,25	1,62

Tableau 18 : *Valeurs moyennes (δ, C_Q) et largeurs ($\sigma(\delta)$, $\sigma(C_Q)$) des distributions de déplacement chimique isotrope et de couplage quadripolaire (paramètre d'asymétrie moyen η_Q = 0.61) du ^{23}Na dans les verres 45S5_0P et 45S5.*

Le spectre MAS ^{23}Na du verre 45S5 est très similaire à celui reporté par Pedone *et al.* [204]. En revanche, il diffère notablement de celui obtenu par Angelopoulou *et al.* [205] qui présente une seconde raie de résonance fine et de faible intensité. Nous avons pu observer que cette seconde contribution apparait lorsque le verre est exposé à l'atmosphère ambiante et il semble vraisemblable qu'elle corresponde à une contamination par l'humidité.

La caractérisation du verre 45S5, effectuées par différentes expériences RMN, permet de conclure que la structure du réseau silicate du verre 45S5 est constituée de chaînes de tétraèdres SiO_4 réticulées dans lequel le phosphore s'insère majoritairement sous forme d'orthophosphates Q^{0P}. La charge de ces groupements orthophosphates est compensée à la fois par des cations calcium et sodium et seulement une très faible proportion de phosphore est directement lié aux chaînes silicates par des liaisons Si-O-P. Enfin, les analyses RMN sur le noyau ^{23}Na ont montré que celui-ci se trouve dans le réseau du verre sous de multiples coordinences.

III. Modifications structurales du verre 45S5 induites par l'immersion dans le SBF

III.A. Protocoles expérimentaux

III.A.1. Préparation du SBF et protocole de lixiviation

Le protocole de préparation du SBF suivi dans nos travaux est celui mis au point par Kokubo *et al.* [236] (cf *Tableau 19*), à la différence près que nous avons utilisé du $NaHCO_3$ enrichi en carbone-13 afin de pouvoir enregistrer plus facilement des spectres RMN du ^{13}C. Nous verrons également que l'enrichissement en ^{13}C rend l'interprétation des spectres FTIR plus aisée Le pH de la solution SBF est ajusté à 7,40.

Ordre d'introduction	Composants	Pureté	Quantité
1	Eau ultra pure	18MΩ	500 mL
2	NaCl	≥ 99,5 %	8,035 g
3	$NaHCO_3$*	≥ 99,5 %	0,355 g
4	KCl	≥ 99,5 %	0,225 g
5	$K_2HPO_4.3H_2O$	≥ 99,0 %	0,231 g
6	$MgCl_2.6H_2O$	≥ 98,0 %	0,311 g
7	$CaCl_2$	≥ 95,0 %	0,292 g
8	Na_2SO_4	≥ 99,0 %	0,072 g
9	Tris $(CH_2OH)_3CNH_2$	≥ 99,9 %	6,118 g
10	HCl (1 M)	/	**

Tableau 19 : *Composants chimiques ainsi que leurs puretés respectives requises et les quantités à introduire pour préparer 1 L de SBF - * $NaHCO_3$ est enrichit en ^{13}C - ** HCl est utilisé pour ajuster le pH à une valeur très proche de 7,40* [236]

Le verre 45S5 a été broyé en boîte à gants manuellement, et tamisé pour obtenir une poudre de granulométrie comprise entre 40 et 75 µm. Les poudres sont immergées dans les solutions conditionnées dans des flacons en polypropylène qui sont placés dans une étuve à 37°C et qui sont soumis à une agitation de 100 tours par minute. Le rapport Solide / Liquide a été fixé à 1, et 250 mg de poudre ont été introduits dans 250 mL de solution. À partir de la densité

mesurée pour le verre étudié (d_{45S5} = 2,70), de la granulométrie choisie (valeur moyenne de 57,5 µm et en supposant que les grains ont une forme sphérique, on peut estimer que le rapport surface du solide / volume de liquide a pour valeur moyenne 0,39 cm^{-1}. L'eau utilisée pour le rinçage est de l'eau ultra pure (18 MΩ). Les temps d'immersion varient de 2 minutes à 2 mois.

Pour chaque expérience, lorsque la durée d'immersion est atteinte, la fraction solide restante est récupérée par filtration (filtre qui laisse passer des grains d'une granulométrie de 2,5 µm) sous vide à l'aide d'une trompe à eau. La fraction solide récupérée est ensuite séchée dans une enceinte sous vide. La solution de lixiviation est également récupérée et stockée dans les flacons en polypropylène.

III.A.2. Techniques d'analyses

III.A.2.a. Diffraction des Rayons X

Les diffractogrammes ont été enregistrés, à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 Advance de géométrie Bragg-Brentano équipé d'une une anticathode cuivre (λK_α = 1,54178 Å), sur une gamme angulaire de 10 à 100 , avec un pas de 0,08° et un temps d'acquisition par pas de 40 s et une ouverture de fente de 3°. Le principe de cette technique de caractérisation est abordé succinctement en *Annexe 4*.

III.A.2.b. Spectroscopie vibrationnelle FTIR

Les spectres FTIR en transmission (gamme spectrale 400-4000 cm^{-1}) ont été enregistrés sur des pastilles KBr/échantillon à l'aide d'un spectromètre Bruker IFS 113. Pour chaque échantillon, 128 scans ont été enregistrés avec une résolution de 1 cm^{-1}. Le principe de cette technique de caractérisation est abordé succinctement en *Annexe 5*.

III.A.2.c. Microscopies MEB-FEG et MET

Les images obtenues par Microscopie Électronique à Balayage ont été enregistrées sur un appareil Philips XL 30 FEG. Pour ces observations, les échantillons préalablement inclus en résine, ont été polis puis métallisés.

La Microscopie Électronique en Transmission a été effectuée sur un appareil Philips CM20, équipé d'un analyseur EDX Oxford. Les échantillons ont d'abord été broyés dans l'éthanol. Pour chaque échantillon, une goutte de solution contenant les particules broyées en suspension est déposée sur une membrane de cuivre avec revêtement carbone. Les images sont obtenues en focalisant le faisceau d'analyse sur le bord des particules.

III.A.2.d. Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres RMN des échantillons immergés en SBF ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance I, dans un champ magnétique de 7,0 T, en utilisant une sonde Bruker MAS double résonance et des rotors d'un diamètre de 4 mm (volume d'échantillon de 0,18 mL). Toutes les expériences MAS ont été réalisées à une fréquence de rotation de 14 kHz. Pour le noyau ^{29}Si, la durée d'impulsion était de 1,3 µs (angle de basculement de 22,5°), le temps de recyclage était fixé à 40 s, 4096 scans ont été accumulés et la durée de l'expérience est de 46 heures. Pour le noyau ^{31}P, la durée d'impulsion était de 0,6 µs (angle de basculement de 15°), le temps de recyclage était fixé à 30 s, 512 scans ont été accumulés et la durée de l'expérience est de 4 heures et 16 minutes. Pour le noyau ^{13}C, la durée d'impulsion était de 1,15 µs (angle de basculement de 22,5°), le temps de recyclage était fixé à 20 s, 2048 scans ont été accumulés et la durée de l'expérience est de 23 heures, pour les verres immergés de 2 à 6 heures, et de 11 heures et 30 minutes pour les verres immergés de 12 heures à 2 mois. Les spectres ^{29}Si, ^{31}P et ^{13}C ont été acquis avec découplage protonique. Les spectres MAS de ^{1}H ont été obtenus en utilisant une séquence d'écho de spin synchronisée avec la période de rotation. La durée d'impulsion était de 4 µs (angle de basculement de 90°), le temps de recyclage était fixé à 10 s, et 64 scans ont été accumulés t la durée de l'expérience est de 11 minutes.

Les expériences CPMAS de ^{29}Si, ^{31}P et ^{13}C ont été effectuées à une vitesse de rotation de 14 kHz. Pour certains échantillons, les spectres ont été obtenus en utilisant différents temps de contact variant de 0,5 à 12,5 ms. Les spectres CPMAS ^{29}Si et ^{31}P, présentés dans cette partie, ont tous été enregistrés avec un temps de contact de 5 ms. Pour les échantillons immergés moins de six heures, les nombres de scans étaient de 65536 et 4096 pour ^{29}Si et ^{31}P. Pour les échantillons immergés durant au moins six heures, les nombres de scans étaient de 32768 et 2048 pour ^{29}Si et ^{31}P. Le temps de recyclage a été fixé à 1 s. Pour le noyau ^{29}Si, la durée de l'expérience est de 18 heures et 40 minutes, tandis que pour le noyau ^{31}P (quel que soit le temps de contact) le temps d'expérience est de 35 minutes. Les spectres CPMAS de ^{13}C, présentés ici, ont été enregistrés avec un temps de contact de 12,5 ms, un nombre de scans de 16384 et un temps de recyclage fixé à 1 s. La durée de l'expérience est de 4 heures et 40 minutes, pour les verres immergés de 2 à 6 heures, et de 2 heures et 20 minutes pour les verres immergés de 12 heures à 2 mois.

Les spectres de corrélation hétéronucléaire (HETCOR) ont été enregistrés à une fréquence de rotation de 14 kHz. Pour l'HETCOR ^{29}Si-^{1}H, le temps de contact était de 5 ms et 128 incréments (de 71,43 µs), avec 2104 scans chacun, ont été enregistrés. Les spectres HETCOR

^{31}P-^{1}H ont été obtenus pour des temps de contact de 0,25 ; 5 ; et 12,5 ms. 320 incréments (de 71,43 µs) ont été enregistrés avec 512, 256 et 128 scans, respectivement. Quel que soit le temps de contact, la durée de l'expérience est de 10 heures et 30 minutes pour l'échantillon immergé 2 semaines, tandis que pour l'échantillon immergé 2 heures, la durée d'expérience est de 14 heures. Les spectres HETCOR ^{13}C-^{1}H ont été obtenus pour des temps de contact de 5 et 12,5 ms. 100 incréments (de 71,43 µs) ont été enregistrés avec 1436 scans. Pour toutes ces expériences, le temps de recyclage a été fixé à 1 s. La durée de l'expérience est de 48 heures.

III.B. Résultats

III.B.1. Evolution du pH des solutions

Selon Hench *et al.* [6], la première réaction qui se produit lorsque le Bioglass® 45S5 est mis en contact avec un SBF, est une hydratation des chaînes silicates de la surface, *i.e.* un échange ionique entre les cations modificateurs du réseau du verre et les ions hydronium de la solution selon les réactions (16) et (17).

Le départ des ions hydronium H_3O^+ de la solution vers la surface du verre entraîne une basification [210-213, 215]. Les mesures de pH, réalisées sur les filtrats grâce à un appareil Hanna Instruments modèle HI 2210 muni d'une électrode de verre, indiquent (cf *Figure 54*) une augmentation du pH cohérente avec les résultats trouvés dans la littérature.

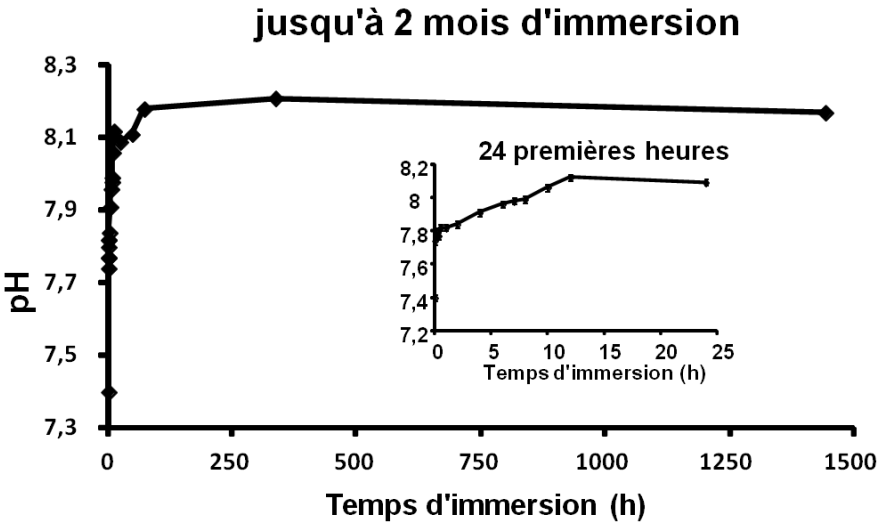


Figure 54 : *Evolution du pH en fonction du temps d'immersion*

III.B.2. Analyse par DRX des poudres lixiviées

L'analyse par DRX des poudres récupérées après filtration permet une première approche des évolutions structurales du matériau résultant de la lixiviation.

Les diffractogrammes des verres 45S5 immergés en SBF durant différents temps sont reportés sur la *Figure 55*. Le diffractogramme du verre 45S5 initial montre uniquement un pic très large situé à 32°, qui est caractéristique d'un solide amorphe. Pour les temps courts d'immersion en SBF (jusqu'à 4 h), on n'observe pas de modification significative des diffractogrammes et on note seulement une légère diminution en intensité de cette contribution large. Après 6 h d'immersion, le diffractogramme présente un pic de faible intensité vers 26°. La présence de ce pic est clairement confirmée sur les diffractogrammes obtenus pour des temps d'immersion plus longs. En consultant le diffractogramme de l'hydroxyapatite, présenté en *Figure 55*, ce pic est attribué à la bande 002 de l'HA (fiche *JCPDS-PDF 72-1243)*. Tous les pics observés pour des temps de lixiviation supérieurs à 6 h sont représentatifs de l'HA, sauf le pic large, vers 24°, qui est attribué au gel de silice [213-214].

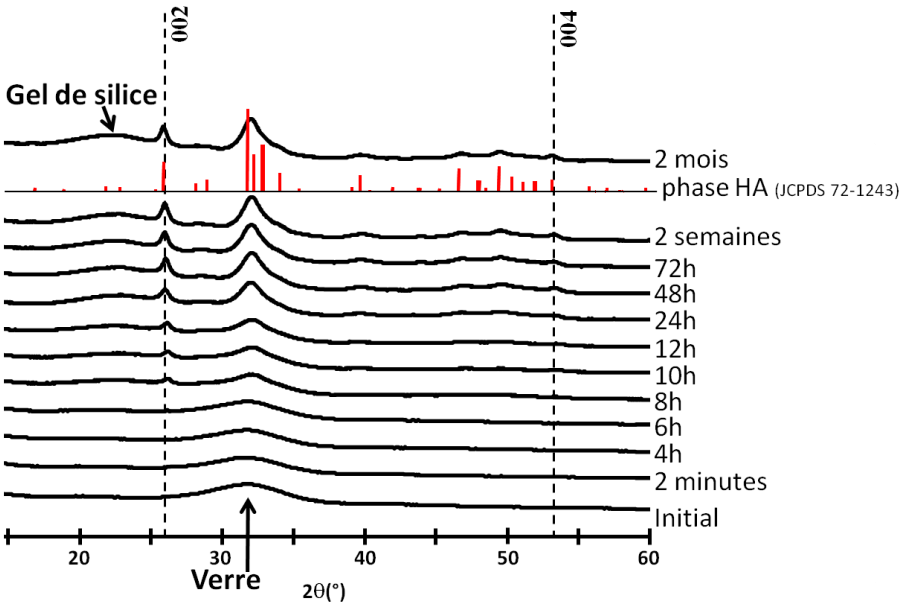


Figure 55: *Diffractogrammes obtenus par DRX des échantillons de verre 45S5 lixiviés selon des temps croissants*

On notera que les raies de diffraction observées, qui sont caractéristiques de l'HA, sont larges. Cet élargissement traduit la présence de cristaux d'HA de taille nanométrique (cf *Figure 56*).

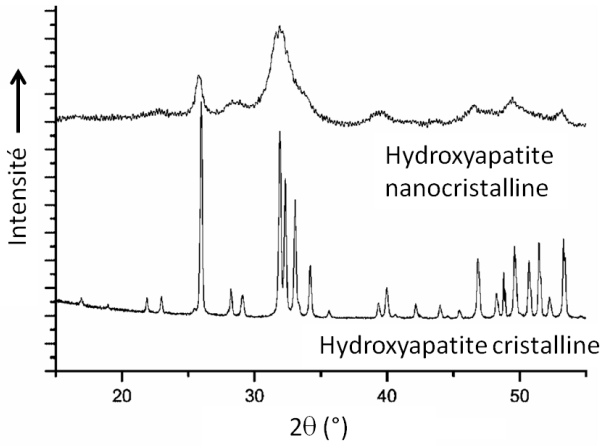


Figure 56 : *Diffractogrammes de l'hydroxyapatite cristalline et nanocristalline* [273]

On notera également que les raies 00k sont plus fines que les autres ce qui suggère un domaine de cohérence plus étendu selon l'axe c et donc une croissance préférentielle des nanocristaux selon cet axe. Pour pouvoir vérifier cette hypothèse, nous avons effectué un affinement Rietveld des diffractogrammes obtenus, ce qui permet d'obtenir plusieurs types d'informations en fonction du temps d'immersion : d'une part, l'évolution de la taille des cristallites et, d'autre part, l'évolution des paramètres de maille.

Dans un premier temps, nous présentons l'évolution de la taille des cristaux, dans le plan ab et selon l'axe c, en fonction du temps de lixiviation (cf *Figure 57*). On évalue ici une taille moyenne volumique, qui sera surestimée si des cristallites de grande taille sont présentes.

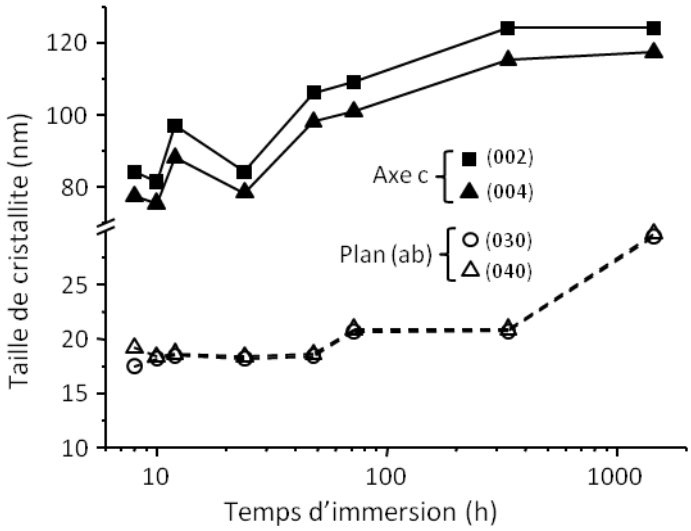


Figure 57 : *Evolution de la taille (sous forme de moyenne volumique) des cristaux pour le plan ab (axe de gauche - ligne pointillée) et selon l'axe c (axe de droite – ligne continue) en fonction du temps d'immersion.*

Dès 8 h de lixiviation, on observe une augmentation plus forte selon l'axe c par rapport à celle qui se produit dans le plan ab. Cela confirme le fait que les cristaux croissent préférentiellement selon l'axe c. Cette évolution montre une augmentation progressive de la taille des cristallites, puis, celle-ci tend vers une valeur palier (pour des temps de lixiviation à partir de 2 semaines). Cette constatation est cohérente avec la littérature [256].

L'affinement Rietveld des diffractogrammes permet également d'étudier l'évolution des paramètres de maille de cette couche d'HA. L'hydroxyapatite présente une maille hexagonale pour laquelle a = b ≠ c. L'évolution des paramètres de maille en fonction du temps d'immersion (cf *Figure 58*) indique qu'en augmentant la durée d'immersion la valeur du paramètre a diminue et celle du paramètre c augmente. Il se produit donc des modifications structurales au sein de la maille. Ces changements structuraux peuvent être dus à des substitutions des ions hydroxyles ou phosphates par des ions carbonates (substitution de type A ou B) La littérature indique qu'une substitution de type B et de type AB (simultanée) des carbonates entraîne une diminution de la valeur du paramètre de maille a et une augmentation de celle du paramètre c [274]. On peut donc supposer que nous sommes en présence soit uniquement d'une substitution des carbonates de type B dans l'HA, soit des deux types (A et B) de substitution de façon simultanée.

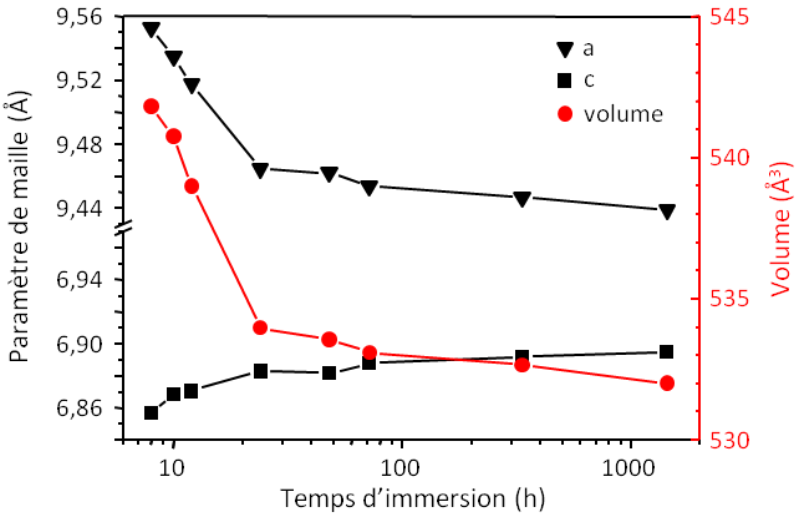


Figure 58 : *Evolution des paramètres et du volume de la maille des nanocristaux d'HA formés à la surface du bioverre selon différents temps de lixiviation.*

La DRX nous a permis ici de mettre en évidence la formation d'un gel de silice dès les premières heures de la réaction puis la formation de cristaux d'HA de taille nanométrique

pour des durées d'immersion supérieures ou égales à 8 heures. Les diffractogrammes indiquent que les cristallites d'HA se développent de façon préférentielle selon l'axe c. Les affinements Rietveld montrent que les groupements carbonates s'insèrent dans la structure de l'HA selon une substitution de type B ou de type AB simultanément.

III.B.3. Analyse par spectroscopie FTIR

Pour obtenir plus d'information sur le mécanisme d'insertion des ions carbonates dans la structure de l'HA, nous avons utilisé, dans un premier temps, la spectroscopie vibrationnelle FTIR. De ce fait, nous nous sommes intéressés uniquement à la gamme spectrale comprise entre 900 et 800 cm^{-1}. Les spectres IR enregistrés pour tous les échantillons sont présentés en *Annexe 5*.

La littérature indique que les bandes caractéristiques des ions carbonates et celle des ions hydrogénophosphates sont très proches et se situent vers 870 cm^{-1} [211, 232, 275], ce qui rend délicate une indentification précise. Cependant, en enrichissant les ions carbonates en ^{13}C (ce qui modifie leurs fréquences de vibration), il est possible d'améliorer la résolution spectrale dans la zone d'intérêt (900-800 cm^{-1}) et de distinguer les bandes caractéristiques des ions carbonates selon leur type de substitution dans l'HA. Cette région du spectre, enregistrée pour le verre immergé dans le SBF durant 2 semaines, est reportée sur la *Figure 59*.

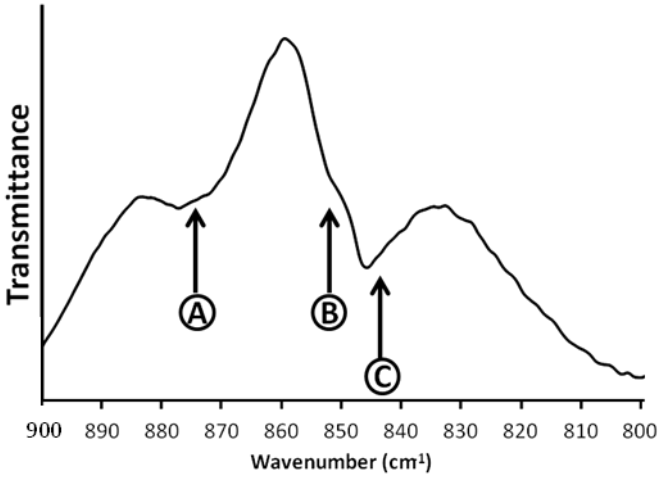


Figure 59 : *Détail de la région 900-800 cm^{-1} du spectre FTIR en transmittance du verre immergé pendant 2 semaines en SBF*

On observe trois bandes caractéristiques, qui peuvent être attribuées en s'appuyant sur la littérature de la façon suivante :

- bande A > 870 cm^{-1} correspond aux ions hydrogénophosphates HPO_4^{2-} dans une phase désordonnée [263]

- bande B à 852 cm^{-1} correspond aux ions $^{13}CO_3^{2-}$ en substitution de **Type A** [262]
- bande C à 846 cm^{-1} correspond aux ions $^{13}CO_3^{2-}$ en substitution de **Type B** [262]

Comme nous l'avons dit précédemment, les affinements Rietveld des diffractogrammes suggèrent qu'il se produirait soit une substitution de type B, soit une substitution de type AB. En considérant la faible proportion d'ions carbonates incorporés dans la structure de l'HA, la spectroscopie FTIR permet d'obtenir des informations plus précises que la DRX. Les fréquences des modes de vibrations observés dans la gamme 900-800 cm^{-1} indiquent la présence simultanée de substitution de types A et B. Afin de confirmer ce mécanisme, nous avons également employé la RMN du ^{13}C, dont les résultats seront présentés plus loin.

III.B.4. Analyse par microscopies MEB-FEG et MET

Dans ce paragraphe, nous avons choisi de présenter seulement une partie des images de microscopie obtenues pour différentes durées d'immersion du verre 45S5 en SBF. L'ensemble des résultats est présenté en *Annexe 6*.

Après une durée d'immersion de 5 minutes, on observe uniquement de très faibles modifications de la surface du verre (cf *Figure 60*). La zone indiquée par le cercle rouge semble correspondre à un début d'altération de la surface et on note la présence de quelques concrétions, telles que celle cerclée en noir, qui semblent être constituées de petites sphères (*cliché b*).

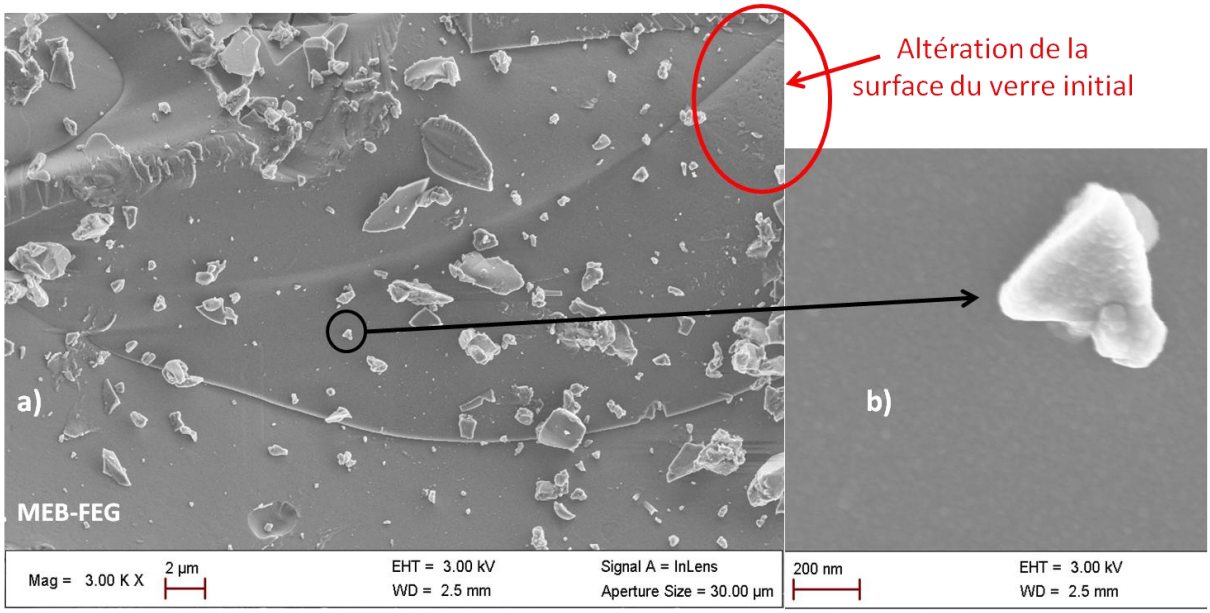


Figure 60 : *Images MEB-FEG a) Surface du verre lixivié pendant 5 minutes b) zoom sur une concrétion de surface*

Après 20 minutes d'immersion, les clichés de microscopie MEB-FEG révèlent que la surface du verre est en cours de modification. Dans le cadre du modèle établi par Hench *et al.* [3], il y a d'abord formation d'un gel de silice, puis, précipitation, sur celui-ci, d'une couche de phosphate de calcium amorphe. L'observation d'aspérités sombres (voir la *Figure 61 b*) témoigne d'une altération de la surface du verre associée à la formation du gel de silice et on note clairement la présence d'amas de particules de petite taille (cf *Figure 61 c*).
Les analyses élémentaires, effectuées sur des zones ayant des morphologies très similaires à celles évoquées ici (pour des échantillons dont les temps d'immersion sont plus longs), indiquent que les aspérités sombres correspondent effectivement à un gel de silice, tandis que les amas de particules correspondent à un phosphate de calcium qui est décrit dans la littérature comme une phase amorphe [253, 260, 276].

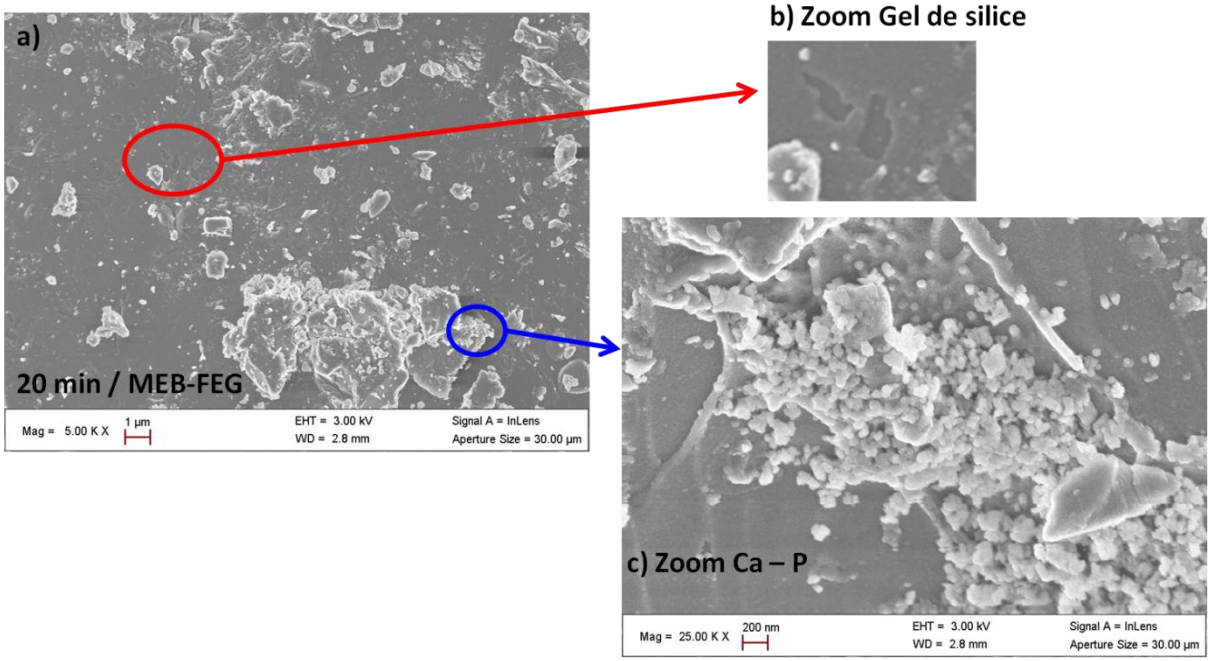


Figure 61 : *Images MEB-FEG a) Surface du verre lixivié 20 minutes b) détail de l'altération de surface témoin de la formation du gel de silice c) détail d'un amas de particules de phosphate de calcium.*

Après deux heures d'immersion en SBF, on observe clairement que la surface se couvre de particules de petite taille, isolées ou sous forme d'amas (cf *Figure 62 a*). L'absence de cercle de diffraction bien défini et l'observation exclusive d'un halo lumineux en diffraction électronique, indique la présence d'une phase amorphe (cf *Figure 62 b*). L'analyse élémentaire réalisée par EDX sur un amas isolé indique que ces particules sont très

majoritairement constituées de calcium et de phosphore. Les amas observés ici correspondent donc à un phosphate de calcium amorphe [276], en accord avec le mécanisme proposé par Hench *et al.* [3].

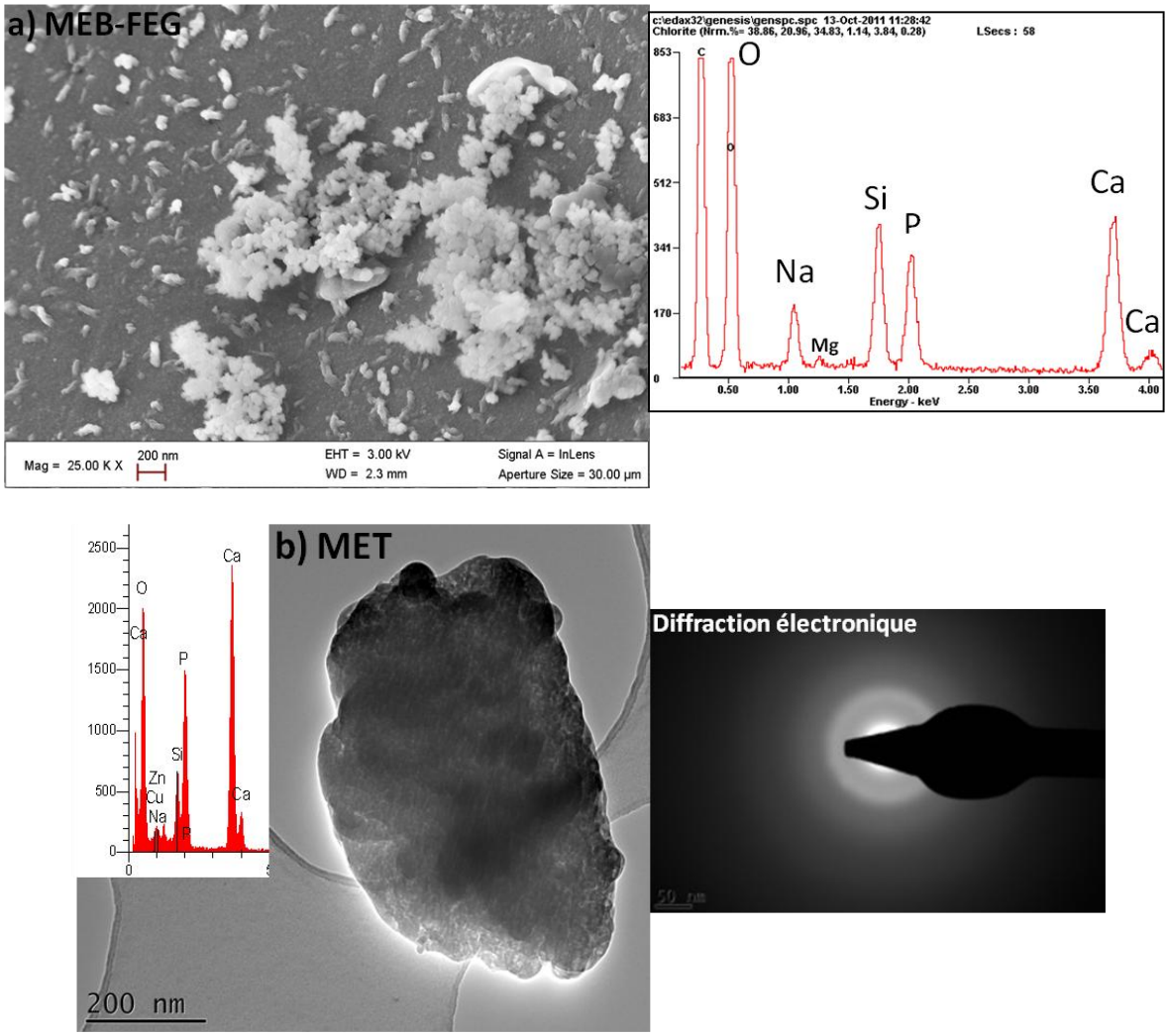


Figure 62 : *Verre immergé pendant 2 heures - Images a) MEB-FEG de la surface d'un grain de verre et son analyse élémentaire et b) MET d'un amas isolé, son analyse élémentaire et le cliché de diffraction électronique correspondant.*

Après 4 heures d'immersion dans le SBF, une nouvelle morphologie composée de filaments est observée en microscopie électronique en transmission (cf *Figure 63 a*). L'analyse EDX révèle que ces filaments sont principalement composés de calcium et de phosphore. Les cercles bien définis, visibles sur le cliché de diffraction électronique (cf *Figure 63 b*), sont caractéristiques de l'HA hexagonale. On note également que le premier cercle de diffraction est incomplet, ce qui indique une direction de croissance préférentielle. Ces observations

montrent clairement, pour un temps d'immersion de 4 heures, la présence d'HA résultant vraisemblablement de la cristallisation de la phase amorphe observée pour des temps plus courts.

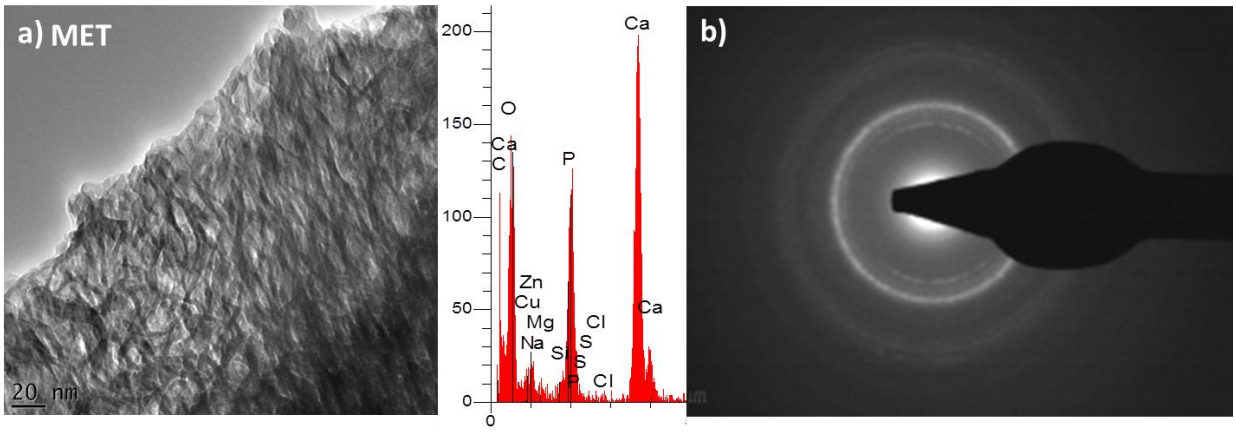


Figure 63 : *a) Image MET de la couche d'HA formée après 4 heures d'immersion et son analyse élémentaire. b) Cliché de diffraction électronique*

Les observations précédentes sont confirmées par les clichés MEB-FEG, obtenus après un temps d'immersion de 6 heures. Différentes zones sont clairement visibles sur la *Figure 64*. La zone a, qui est constituée principalement de silicium, correspond au gel de silice résultant de l'altération de la surface du verre. La zone b, qui est majoritairement constituée de calcium et de phosphore, correspond à la couche d'HA. On notera qu'une partie de la couche d'HA s'est vraisemblablement détachée de la surface du grain, permettant d'observer le gel de silice (zone a) et d'évaluer l'épaisseur de la couche d'HA à ~1,5 µm. En utilisant un grandissement plus élevé, il est possible de voir que cette couche est constituée d'amas dont la taille est comprise entre 30 et 50 nm.

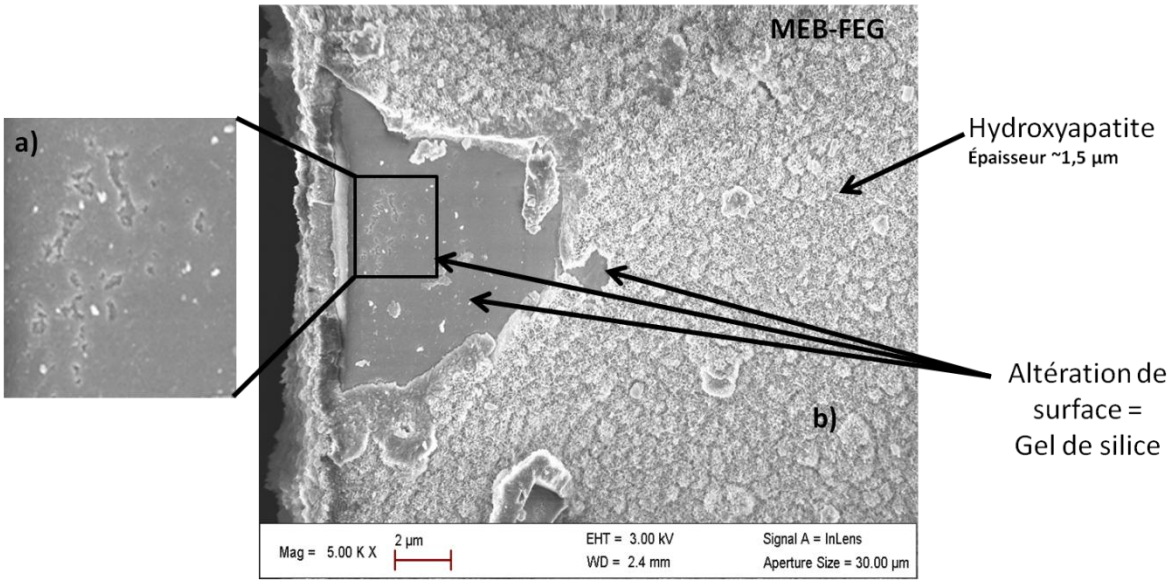


Figure 64 : *Image MEB-FEG de la surface d'un grain de verre après 6 heures d'immersion en SBF a) Détail de la couche de gel de silice b) Couche d'HA*

Les clichés de microscopie obtenus pour des durées d'immersion plus longues (de 24 heures à deux semaines) permettent d'appréhender avec plus de finesse la structure à l'échelle micrométrique de la couche d'HA. On voit sur la *Figure 65* que la phase apatitique forme un réseau poreux. Cette morphologie est particulièrement bien adaptée à une implantation dans l'organisme puisqu'elle permet une bonne circulation des protéines et des cellules et la colonisation de l'implant [260, 266, 277]. La texture à plus petite échelle de ce réseau poreux d'HA peut être également observée par MET. Sur la *Figure 66*, on voit que les nanocristaux d'HA, en forme de bâtonnets, sont assemblés entre eux pour donner des morphologies en filaments et plaquettaires. Les filaments sont indiqués par les flèches blanches sur la *Figure 66 b*. Les nanocristaux en forme de bâtonnets, constituant ces aiguilles, sont observés sur l'image en champ sombre présentée en *Figure 66 c*. À partir de ces clichés, la taille des nanocristaux d'HA est estimée à environ 5-10 nm. Le cliché de diffraction électronique, réalisé sur les aiguilles d'hydroxyapatite de la *Figure 66 a* ; est présenté sur la *Figure 67*. On observe de nombreux cercles de diffraction parmi lesquels certains sont incomplets (indiqués par les flèches),ce qui indique une croissance des nanocristaux selon un axe préférentiel. Le premier cercle incomplet (flèche 1) correspond au plan cristallographique 002 de la phase HA hexagonale et le deuxième cercle incomplet (flèche 2) correspond au plan 004. Ceci indique clairement une croissance préférentielle selon l'axe c de la structure hexagonale.

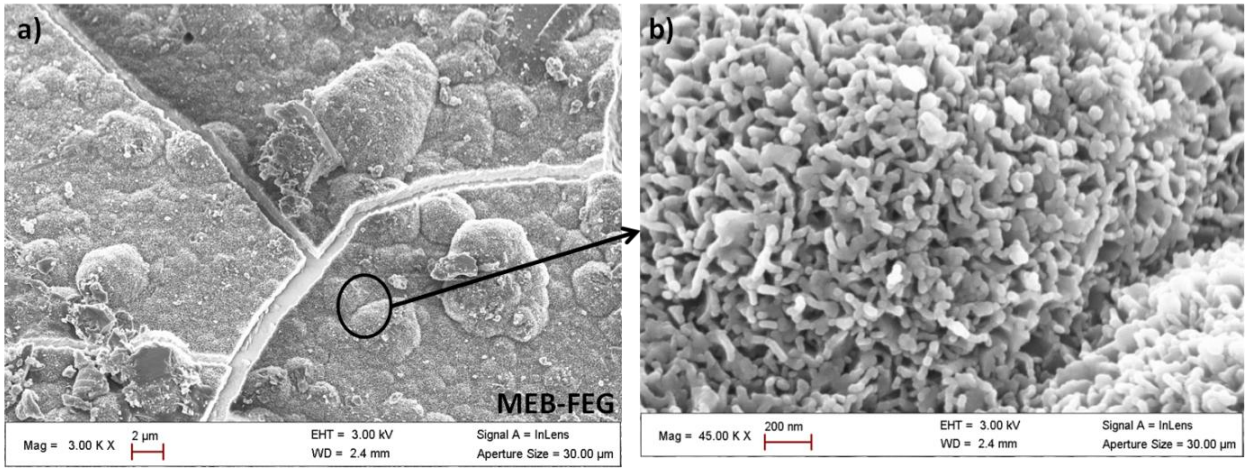


Figure 65 : *(a-b) Images MEB-FEG de la surface du verre après 24 heures d'immersion*

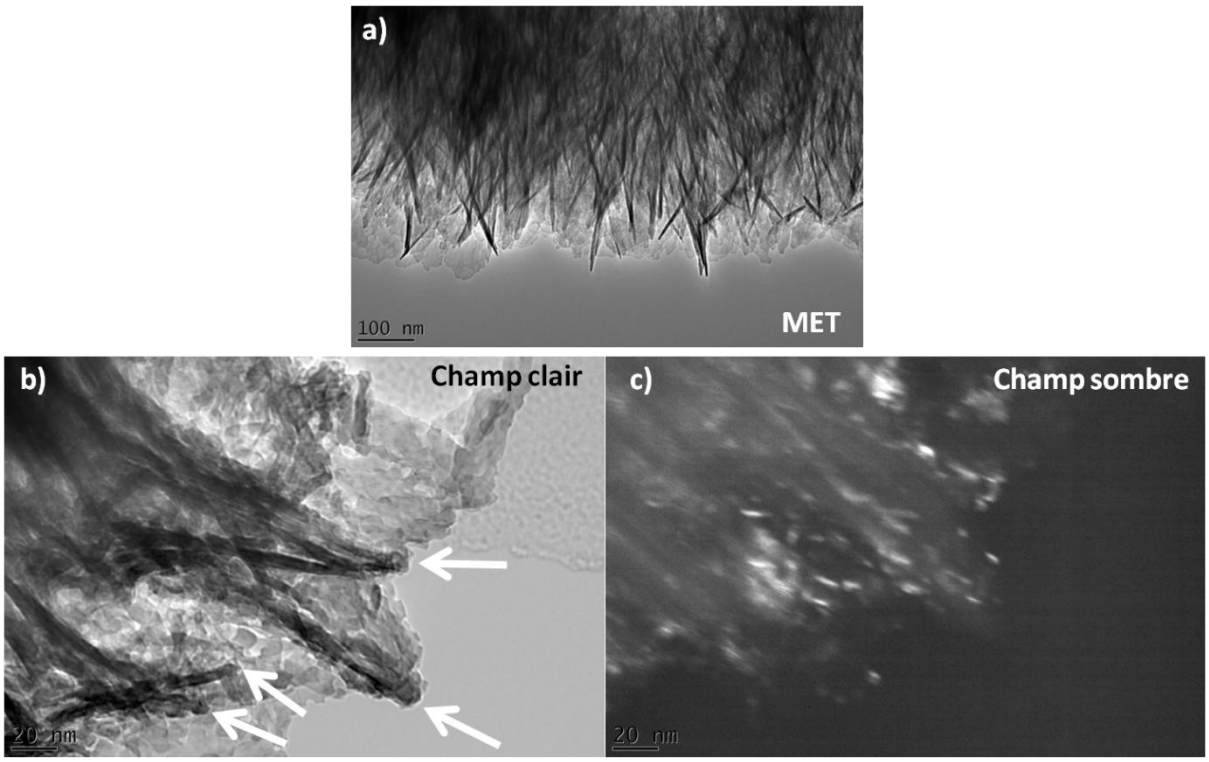


Figure 66 : *Images MET a) Région HA sur la surface du verre immergé pendant 2 semaines b) image en champ clair - zoom sur quelques filaments c) image en champ sombre correspondante à l'image en champ clair. L'image en champ sombre est un peu décalée par rapport à l'image en champ clair.*

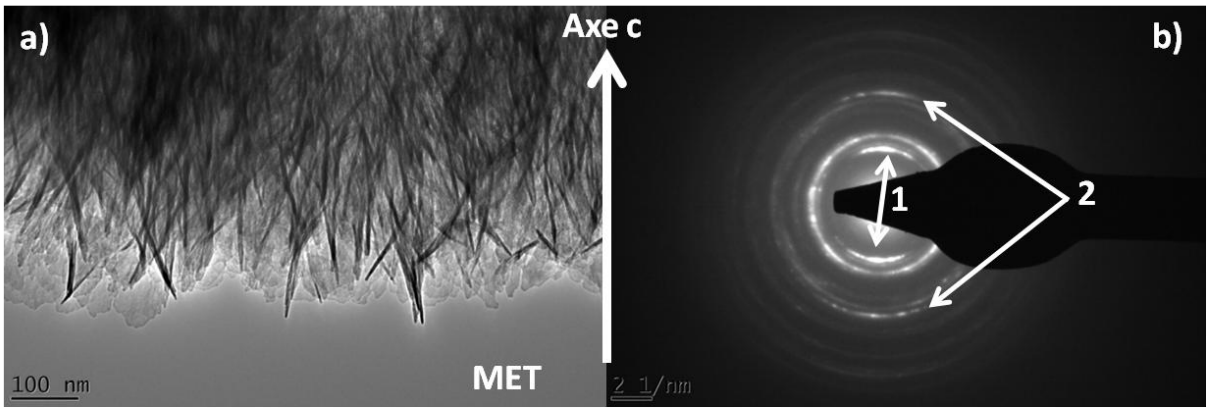


Figure 67 : *(a) Image MET de la surface d'un grain et (b) cliché de diffraction électronique correspondant (verre immergé 2 semaines). Flèche 1 : premier cercle incomplet correspondant au plan cristallographique 002 de la phase HA hexagonale. Flèche 2 : second cercle incomplet correspondant au plan 004 de cette même phase.*

III.B.4.a. Evolution du rapport Ca/P

Par le biais des analyses EDX, il est possible de suivre l'évolution du rapport Ca/P de la couche de surface des grains de verre en fonction du temps d'immersion en SBF. Cette évolution est reportée sur la *Figure 68*.

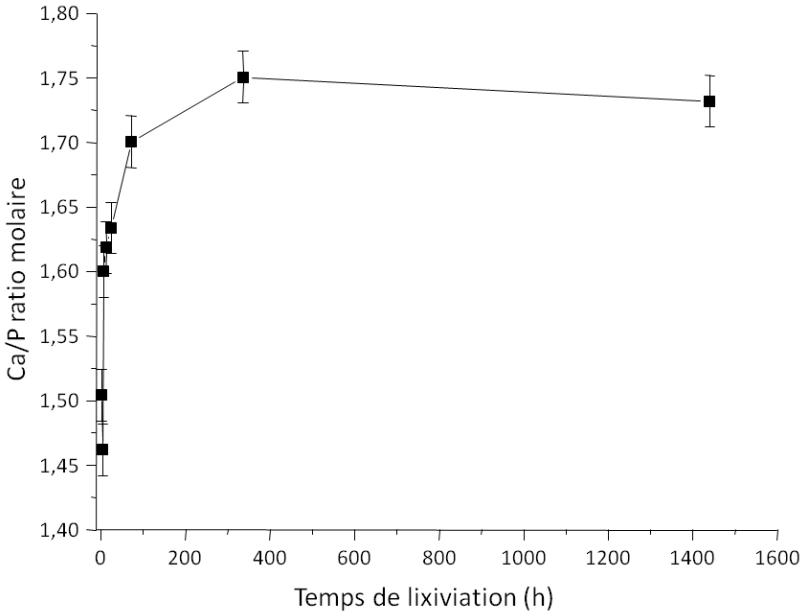


Figure 68 : *Evolution du rapport Ca/P molaire en fonction du temps de lixiviation*

D'après sa composition chimique, le verre 45S5 présente un rapport Ca/P 5,17. Au bout de 2 heures d'immersion, le rapport Ca/P de la couche de surface est d'environ 1,5, ce qui est typique de la phase amorphe de formule $Ca_9(PO_4)_6$ [251]. Puis de 4 heures à 2 semaines d'immersion ce rapport ne cesse d'augmenter jusqu'à la valeur de 1,75, il reste dans cet ordre de grandeur même après 2 mois d'immersion. Cette augmentation progressive correspond à la cristallisation de l'HA. Cependant, le rapport Ca/P final est différent de la valeur 1,667 attendue pour l'HA stœchiométrique ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Par conséquent, l'apatite formée à la surface du verre n'est pas stœchiométrique, mais plutôt, comme constaté par spectroscopie FTIR et par DRX, une hydroxyapatite carbonatée (HAC). Il est aussi possible que celle-ci ait incorporé d'autre éléments [278-279], comme par exemple le magnésium que nous avons détecté en faible quantité par EDX.

Les différentes techniques employées jusqu'ici nous ont permis de suivre l'évolution de la surface du verre 45S5 lorsqu'il est immergé en SBF et de mettre en évidence différentes étapes conduisant à la formation de la couche d'HA qui permet la liaison avec les tissus osseux. Il est à noter que ces techniques ont des sensibilités différentes. Par exemple, la microscopie MEB-FEG suggère l'apparition du gel de silice après seulement quelques minutes tandis que ce gel amorphe n'est observé par DRX qu'à partir de 6 heures d'immersion. De la même manière, les différentes techniques de microscopie révèlent la présence d'une phase CaP amorphe dès 20 minutes d'immersion alors qu'aucun pic large correspondant à cette phase amorphe n'est observé par DRX. La spectroscopie FTIR permet quant à elle d'observer l'apparition des phases amorphes ou cristallines mais une interprétation quantitative des spectres FTIR est délicate.
De ce fait, il nous a semblé judicieux d'utiliser la RMN afin de suivre de manière quantitative la formation des différentes phases amorphes et cristallines à la surface du verre. Cette technique permet en effet de décrire l'ensemble des espèces en présence (celles qui sont présentes initialement, et celles qui se forment au cours de la réaction), d'un point de vue sélectif en fonction des noyaux observés - ^{29}Si, ^{31}P, ^{1}H, ^{13}C – et d'effectuer un suivi quantitatif de celles-ci.

III.B.5. Etude par RMN multi-nucléaire

III.B.5.a. RMN ^{29}Si

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la structure du verre 45S5 est constituée d'un réseau de chaînes silicates réticulées. La RMN de ^{29}Si, qui permet d'identifier et de quantifier les différents types de tétraèdres SiO_4, est donc particulièrement bien adaptée pour suivre les transformations du réseau silicate en fonction du temps d'immersion en SBF. Ceci est clairement illustré par l'évolution des spectres RMN MAS du ^{29}Si (reportés en *Figure 69*) en fonction de la durée d'immersion. Comme mentionné auparavant, le spectre du verre 45S5 initial est constitué de trois contributions larges, dont les déplacements chimiques isotropes moyens sont situés à -79,6 ppm (67,8 %), -72,7 ppm (10,11 %) et -87,6 ppm (22,1 %), qui sont attribuées aux unités Q^{2Si}, Q^{1Si} et Q^{3Si}, respectivement. Après des temps d'immersion de quelques heures, on note l'apparition de nouvelles raies de résonances correspondant aux espèces qui se sont formées lors du processus de lixiviation.

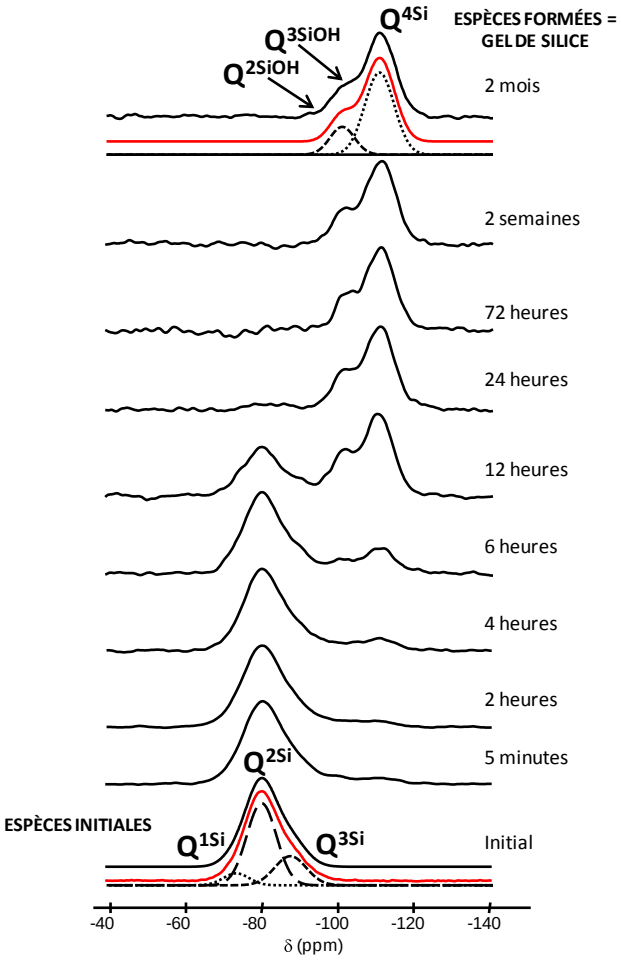


Figure 69 : *Spectres RMN ^{29}Si MAS des verres immergés en SBF (14 kHz ; 7 T)*

Pour déterminer de manière précise la nature de ces espèces formées, nous avons mis en œuvre des expériences de transfert de polarisation du ^{1}H vers ^{29}Si en MAS (CPMAS) [280]. Ces expériences permettent l'édition spectrale des noyaux de silicium au voisinage des protons et donc l'observation des espèces hydratées qui se forment à la surface du verre [281-282]. Cette expérience n'est pas quantitative mais l'évolution du transfert de polarisation en fonction du temps de contact permet de distinguer différents groupements protonés ayant des déplacements chimiques proches. Nous pouvons donc identifier trois nouvelles raies de résonances situées à -101, -95 et -111 ppm qui sont attribuées à des unités Q^{3SiOH}, Q^{2SiOH} et Q^{4Si} en fonction de leurs déplacements chimiques isotropes [265, 267, 283] et leurs dynamiques de transfert de polarisation [281-282] (cf *Figure 69*). Les unités Q^{3SiOH} correspondent à des groupements Q^{3Si}, dont le NBO est lié à un H^{+}, et les unités Q^{2SiOH} correspondent à des groupements Q^{2Si}, dont deux NBO sont liés chacun à un H^{+}. Ces espèces protonées (silanols) se forment dès lors que le verre est immergé en SBF, par des réactions d'échange ionique entre les cations Na^{+}-Ca^{2+} du verre et les protons de la solution, à l'interface verre/solution. Les réactions de condensation entre les groupements silanols conduisent à la création d'unités Q^{4Si} et à la formation d'un gel de silice polymérisé à la surface du verre.

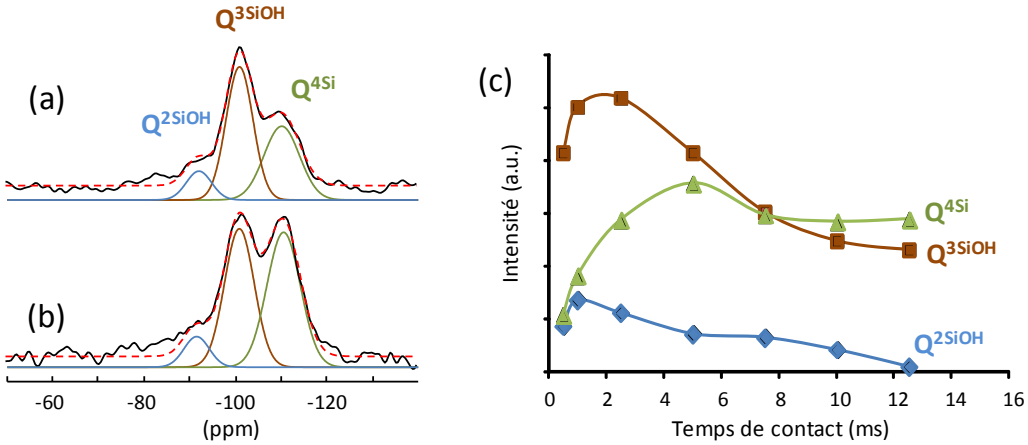


Figure 70: *Spectres CPMAS ^{1}H-^{29}Si du verre immergé en SBF pendant 72 h (14 kHz, 7 T) enregistrés avec un temps de contact de (a) 2,5 ms et (b) 7,5 ms. (c) Variation des intensités des trois résonances en fonction du temps de contact.*

En utilisant les positions et des largeurs de raies mesurées pour ces trois résonances sur les spectres CPMAS, nous avons simulé les spectres MAS quantitatifs afin de déterminer leurs proportions relatives en fonction du temps d'immersion. Ces simulations indiquent la formation d'un gel de silice dont le degré de polymérisation augmente fortement (Q^{4Si} majoritaires) après les premières heures d'immersion. Elles permettent également de

quantifier les proportions relatives de verre non-altéré / gel de silice en fonction du temps (cf. *Figure 71*).

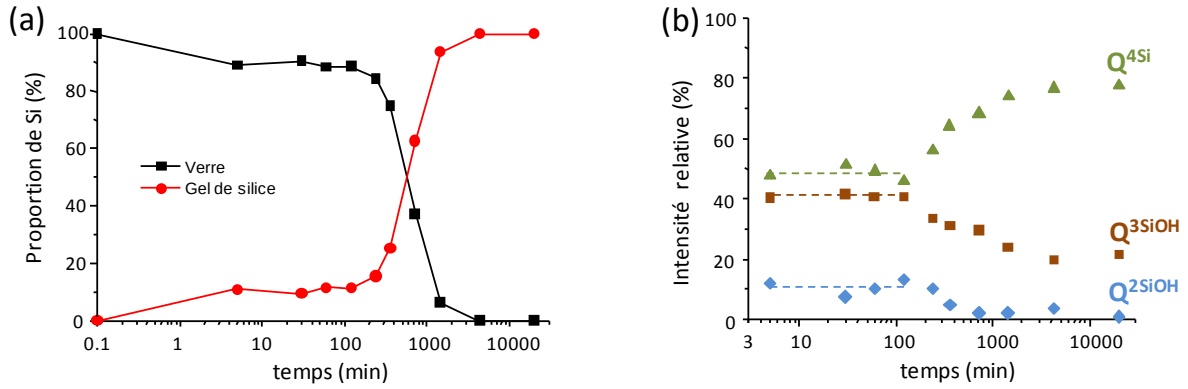


Figure 71: *(a) Proportions relatives de silicium dans le verre et dans le gel de silice en fonction du temps d'immersion. (b) Intensités relatives des unités Q^n du gel de silice en fonction du temps.*

D'après la quantification réalisée par RMN du ^{29}Si, on observe la formation d'un gel de silice à la surface des grains de verre dès les premières minutes d'immersion. Ce gel de silice est majoritairement constitué d'unités Q^{3SiOH} et Q^{4Si} et présente un degré de polymérisation élevé. De 5 minutes jusqu'à 2 heures d'immersion en SBF, nous n'observons plus d'évolution du système, les proportions de verre non altéré et de gel de silice restant constantes. Après 2 heures d'immersion, les réactions d'échanges ioniques reprennent, et on observe une transformation progressive du verre en gel de silice, ce qui reflète une diffusion de l'interface de réaction vers le cœur des grains de verre. Après 72 heures, les espèces initiales ont complètement disparu et le réseau silicate initial du verre a été totalement transformé en gel de silice. On note également une variation du degré de polymérisation du gel de silice qui augmente continument de 2 heures à 2 semaines. Au bout de 2 semaines, le gel est constitué de 80 % d'unités Q^{4Si} et 20 % d'unités Q^{3SiOH}.

Nous venons de voir que la RMN de ^{29}Si permet d'obtenir sélectivement des informations sur la structure du gel de silice formé lors du processus d'altération du verre en SBF. De manière complémentaire, il est également possible d'étudier sélectivement par RMN du ^{31}P la nature des phases CaP qui précipitent à la surface des grains, et qui sont responsables de la bioactivité du matériau.

III.B.5.b. RMN ^{31}P

L'évolution des spectres quantitatifs RMN MAS du ^{31}P des verres en fonction du temps d'immersion en SBF est reportée en *Figure 72 a*. Comme nous l'avons vu précédemment, le spectre MAS ^{31}P du verre 45S5 est constitué d'une raie de résonance large asymétrique, centrée à environ 8,4 ppm. Après immersion, on observe l'apparition d'une nouvelle résonance (située entre 3 et 4 ppm), dont l'intensité augmente en fonction du temps d'immersion. Cette contribution, correspondant à la couche de phosphate calcique formée en surface des grains de verre, est difficile à observer sur les spectres quantitatifs obtenus pour des temps d'immersion courts. Afin de mettre plus clairement en évidence cette contribution, nous avons réalisé des expériences CPMAS ^{1}H-^{31}P, permettant l'amplification du signal et l'observation sélective des groupements phosphates à proximité de protons. Les spectres CPMAS ^{31}P-^{1}H obtenus pour un temps de contact de 2,5 ms sont reportés sur la *Figure 72 b*.

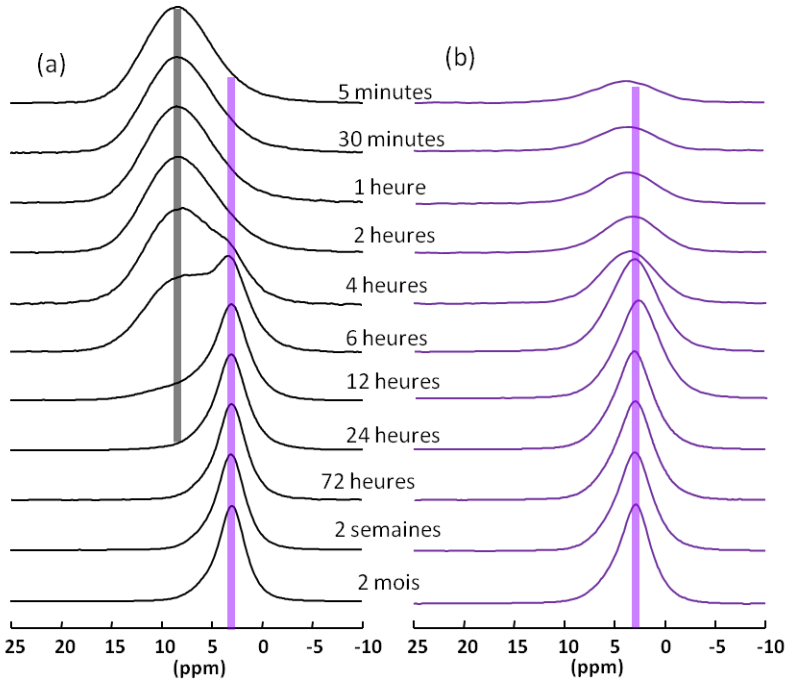


Figure 72 : *(a) Spectres RMN MAS quantitatifs du ^{31}P dans les échantillons en fonction du temps d'immersion en SBF (14 kHz, 7 T). (b) Spectres RMN CPMAS ^{31}P-^{1}H des échantillons (temps de contact de 2,5 ms) en fonction du temps d'immersion en SBF (14 kHz, 7 T).*

Pour des temps d'immersion courts (de 5 min à 2 h), on observe une contribution large, centrée à environ 4 ppm. Pour des temps d'immersion longs (de 24 h à 2 semaines), les spectres mettent en évidence une raie plus fine ayant un déplacement chimique isotrope moyen d'environ 3 ppm, qui est caractéristique d'une hydroxyapatite carbonatée [284]. Sur les spectres CPMAS enregistrés pour différents temps de contact (cf *Figure 73*), nous n'observons pas de variation significative de la contribution large. En revanche, la largeur de

raie de la contribution à 3 ppm, observée pour les temps d'immersion longs, varie en fonction du temps de contact. Ceci traduit la présence de deux composantes ayant des déplacements chimiques isotropes moyens très proches mais des largeurs de raie et des dynamiques de transfert de polarisation différentes. Cette variation a déjà été observée pour des hydroxyapatites déficientes en calcium (CDA) nanocristallines [273].

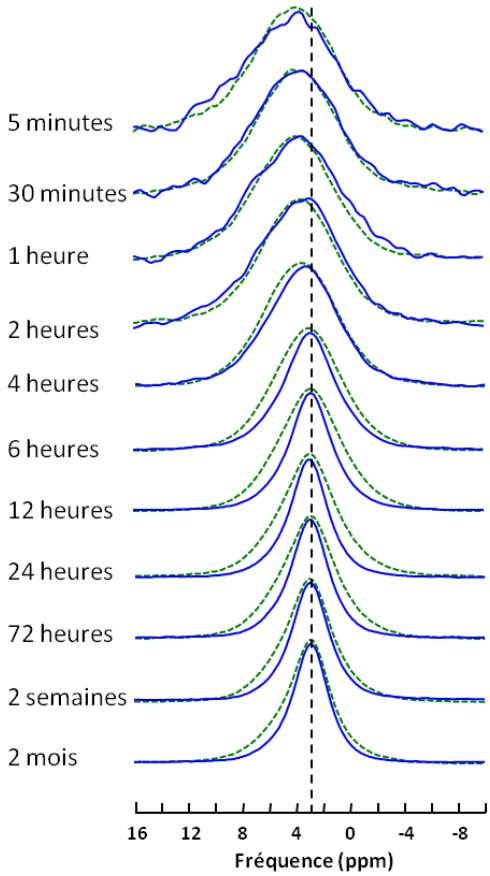


Figure 73 : *Comparaison des spectres RMN CPMAS ^{31}P-^{1}H (14 kHz, 7 T) enregistrés avec des temps de contact de 0,5 ms (vert - ligne pointillée) et 12,5 ms (bleu - ligne continue).*

Pour les échantillons immergés en SBF pendant 5 min jusqu'à 2 h, les spectres CPMAS obtenus à différents temps de contact ont donc été simulés avec une seule contribution. Pour les échantillons immergés pendant 4 h jusqu'à 2 mois, les spectres CPMAS enregistrés avec des temps de contact différents peuvent être simulés avec deux contributions, dont les intensités relatives varient en fonction du temps de contact. Afin de déterminer l'évolution des proportions relatives des atomes de phosphore appartenant au réseau vitreux, ou formant la couche de surface (cf *Figure 74*), nous avons modélisé les spectres ^{31}P MAS quantitatifs en utilisant les positions et les largeurs de raies des contributions caractéristiques de la couche de phosphate calcique, obtenues à partir des spectres CPMAS.

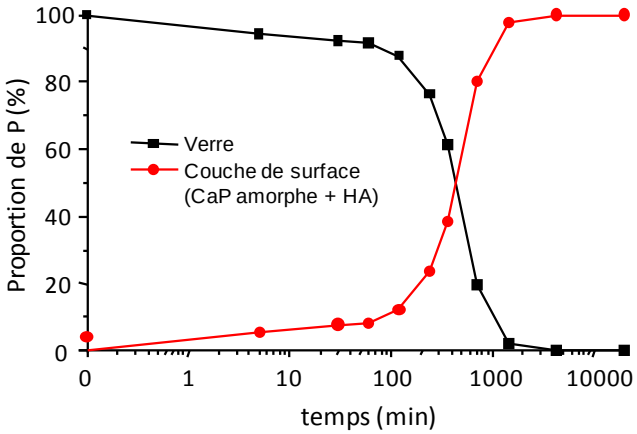


Figure 74 : *Proportions relatives de phosphore dans l'échantillon et dans la couche de surface de phosphate calcique (CaP amorphe + HA) en fonction du temps d'immersion.*

Il est à noter que les spectres CPMAS, présentés sur la *Figure 72 a*, révèlent également des variations de la nature de la couche phosphocalcique en fonction du temps d'immersion. En effet, les spectres des échantillons immergés plus de 24 h sont caractéristiques d'une hydroxyapatite carbonatée alors que les spectres des échantillons immergés moins de 4 h sont plutôt typiques d'un phosphate de calcium amorphe. Afin de décrire plus en détail ces deux phases, nous avons enregistré des spectres de corrélation hétéronucléaire (HETCOR) ^{31}P-^{1}H.
Le spectre HETCOR ^{31}P-^{1}H de l'échantillon immergé pendant deux semaines, enregistré avec un temps de contact de 0,5 ms, met clairement en évidence deux contributions ^{31}P distinctes (cf *Figure 75*) :

- une raie fine située à 3 ppm qui présente une corrélation avec le pic ^{1}H situé à 0 ppm, pic correspondant aux ions hydroxyles HO^- [285]

- une raie large également située à 3 ppm qui montre, quant à elle, des corrélations avec les résonances ^{1}H de déplacements chimiques isotropes de 4 à 16 ppm, résonances caractéristiques des molécules d'eau et des groupements HPO_4^{2-} [285-286].

Le spectre enregistré avec un temps de contact de 12,5 ms montre également une raie de corrélation intense entre la raie ^{31}P fine et le pic ^{1}H des ions HO^-, ainsi qu'une raie de corrélation de plus faible intensité entre la raie ^{31}P fine et la résonance des molécules d'eau. En revanche, ce spectre 2D ne contient plus la raie large ^{31}P. Ceci est dû au fait que les protons qui lui sont associés ont une relaxation rapide dans le champ radiofréquence [287]. Ces expériences suggèrent que les particules nanocristallines d'HA carbonatées (formées lorsque le temps d'immersion est long) sont constituées de deux parties :

- une partie bien organisée (correspondant à la raie ^{31}P fine), riche en groupements HO^- et contenant peu de défauts structuraux (molécules d'eau et groupements HPO_4^{2-})

- une partie plus désordonnée (correspondant à la raie ^{31}P large), déficitaire en ions HO^- et contenant un grand nombre de défauts structuraux (H_2O et HPO_4^{2-}).

La phase HA carbonatée, formée à la surface du gel de silice, possède donc une grande similitude avec les apatites nanocristallines d'origine biologique [288], mais aussi avec les particules de CDA (apatite déficiente en calcium) obtenues par co-précipitation [273], qui sont constituées d'un cœur apatite riche en ions hydroxyles et d'une couche de surface non-stœchiométrique plus désordonnée. On peut également citer Rey *et al.* qui ont mis en place un modèle de cœur de nanoapatite cristallisée entourée d'une couche phosphocalcique amorphe et hydratée.[263]

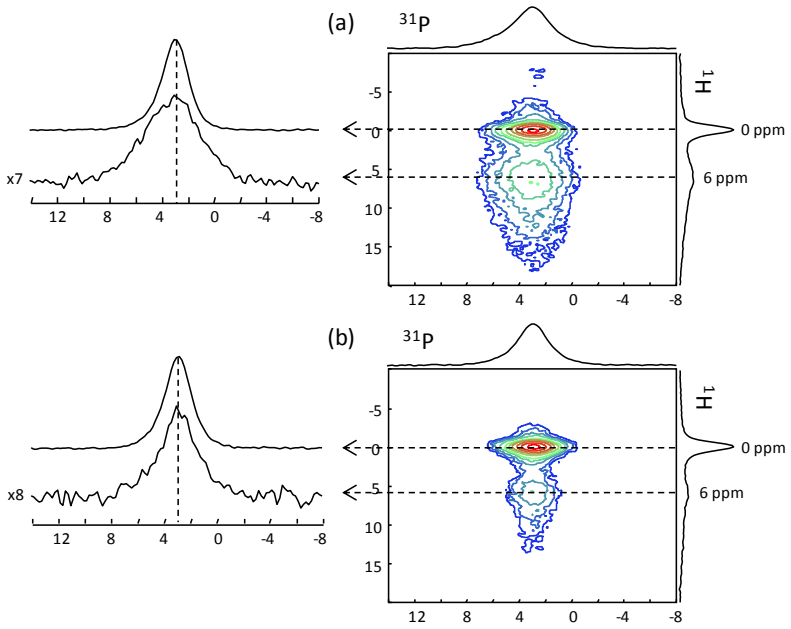


Figure 75: *Spectres HETCOR ^{31}P-^{1}H (14 kHz, 7 T) de l'échantillon immergé pendant 2 semaines, enregistrés avec des temps de contact de 0,5 ms (a) et 12,5 ms (b). Les spectres MAS ^{31}P correspondant aux fréquences de 0 et 6 ppm dans la dimension ^{1}H sont présentés à gauche des spectres 2D.*

Les spectres HETCOR ^{31}P-^{1}H de l'échantillon immergé pendant deux heures, enregistrés avec des temps de contact de 0,5 ms et 12,5 ms, sont présentés en *Figure 76.* Ces deux spectres sont très similaires et mettent en évidence une seule raie de corrélation entre la raie large ^{31}P (située à ~4 ppm) et la distribution de résonances ^{1}H des molécules d'eau et des groupements HPO_4^{2-}. Ces résultats suggèrent que la structure de la phase phosphocalcique amorphe, précurseur de l'HA carbonatée, est formée d'unités PO_4^{3-}, HPO_4^{2-} et de molécules d'eau, et qu'elle ne contient pas (ou très peu) d'ions HO^-.

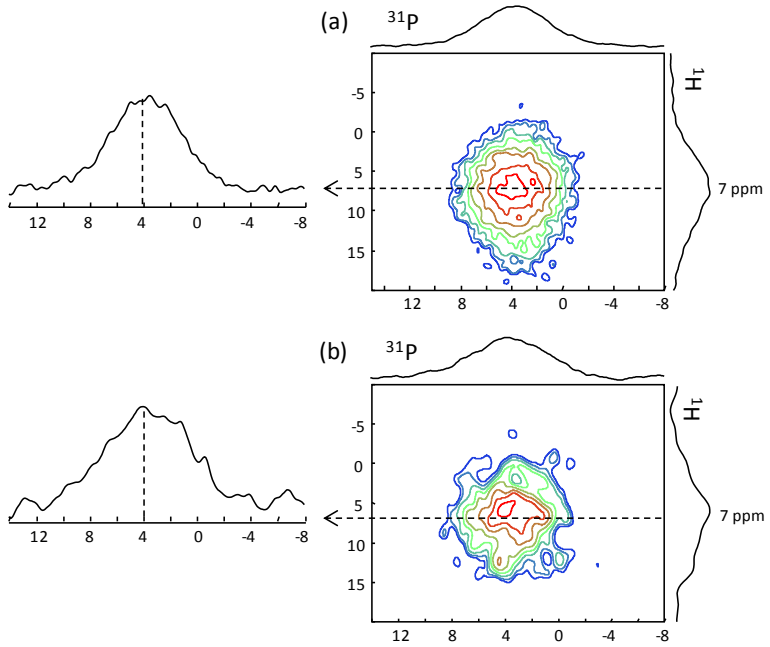


Figure 76: *Spectres HETCOR ^{31}P-^{1}H (14 kHz, 7 T) de l'échantillon immergé pendant 2 heures, enregistrés avec des temps de contact de 0,5 ms (a) et 12,5 ms (b). Les spectres MAS ^{31}P correspondant à une fréquence de 7 ppm dans la dimension ^{1}H sont présentés à gauche des spectres 2D.*

L'absence d'ions HO^- dans la phase amorphe, formée pour des temps d'immersion courts, est également confirmée par RMN de ^{1}H (cf *Figure 77*). En effet, les spectres MAS ^{1}H des échantillons immergés pendant 5 min jusqu'à 2 h, mettent en évidence uniquement les raies de résonance larges des molécules d'eau et des groupements HPO_4^{2-} (de 4 à 16 ppm), des groupements Si-OH du gel de silice (de 3 à 4,5 ppm) et deux raies de résonance fines à 0,85 et 1,25 ppm, que l'on peut peut-être attribuer à des molécules d'eau mobiles situées dans la couche de surface [273]. Cette attribution est en accord avec les spectres HETCOR ^{31}P-^{1}H décrits auparavant, ainsi que les spectres HETCOR ^{29}Si-^{1}H que nous avons enregistré pour nos échantillons. Pour des temps d'immersion plus longs (12 h et plus), on observe l'apparition d'une nouvelle résonance ^{1}H avec un déplacement chimique de 0 ppm, qui est caractéristique des protons des groupements hydroxyles de l'HA [285]. L'évolution de ces spectres RMN MAS ^{1}H, en fonction du temps d'immersion, révèle donc l'apparition progessive d'ions hydroxyles dans la structure des nanocristaux de phosphate de calcium consituant la couche de surface.

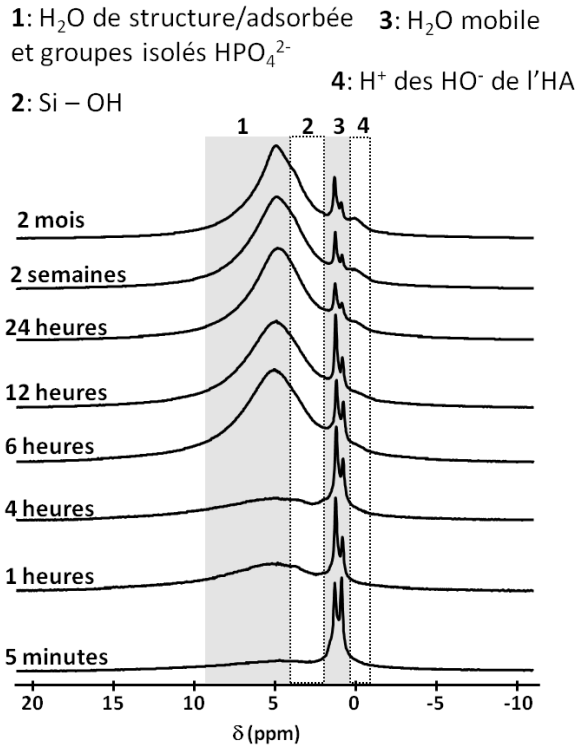


Figure 77: *Evolution des spectres RMN MAS ^{1}H des échantillons en fonction du temps d'immersion en SBF (14 kHz, 7 T).*

À ce stade, il faut souligner que l'analyse de nos échantillons par diffraction électronique révèle la formation d'une phase de structure apatitique à la surface des grains de verre pour des durées d'immersion en SBF de l'ordre de 4 h. Cette phase, qui représente une faible quantité de matière par rapport à la globalité de l'échantillon, n'est détectée par diffraction des RX que pour des temps d'immersion plus longs, de l'ordre de 8 h. Les spectres RMN MAS ^{1}H et HETCOR ^{31}P-^{1}H des mêmes échantillons ne montrent pas de signature typique des groupements HO^{-}. Les nanocristaux de structure apatitique, formés pour des temps d'immersion de 4 à 12 h, ne contiennent donc pas de groupements hydroxyles. Les largeurs de raie des spectres CPMAS ^{31}P-^{1}H correspondant suggèrent la présence d'un grand nombre de défauts structuraux.

D'après les résultats obtenus par RMN du ^{31}P et ^{1}H, il est possible de dire que la phase phosphocalcique formée à la surface des grains évolue de façon continue :

- aux premiers instants de la réaction entre le verre 45S5 et la solution de SBF, il y a formation en surface des grains de nanoparticules (ou de clusters) de CaP amorphe dont la structure est composée d'ions PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, Ca^{2+} et de molécules d'eau. Cette phase CaP désordonnée ne contient pas (ou très peu) d'ions hydroxyles.

- cette phase cristallise ensuite sous la forme d'hydroxyapatite carbonatée contenant de nombreux défauts structuraux (ions HPO_4^{2-} et molécules d'eau). Progressivement, le cœur de ces nanoparticules d'HAC s'ordonne en incorporant des ions HO^- et Ca^{2+} et sa composition évolue pour se rapprocher du rapport Ca/P de 1,67 (typique de l'HA stœchiométrique).
- au bout de deux mois d'immersion, la moitié des atomes de phosphore forment le cœur des nanocristaux d'HAC. Celui-ci est riche en groupements HO^- et contient peu de défauts structuraux. L'autre moitié des atomes de phosphore est mobilisée dans la couche de surface des nanoparticules. Cette couche de surface est désordonnée, déficitaire en ions HO^- et contient un grand nombre de défauts structuraux (H_2O et HPO_4^{2-}). Comme nous allons le voir dans la partie suivante, les ions carbonates sont présents à la fois dans le cœur et dans la couche de surface des nanocristaux d'HAC.

III.B.5.c. RMN ^{13}C

L'observation RMN du ^{13}C permet d'étudier l'incorporation des groupements carbonates dans la phase phosphocalcique formée à la surface des grains. Le spectre RMN MAS ^{13}C de l'échantillon immergé durant 2 heures montre que la phase CaP amorphe, formée initialement, contient des groupements carbonates. Pour cet échantillon, le spectre ^{13}C obtenu est constitué d'un pic large, vraisemblablement composé de plusieurs contributions (cf *Figure 78*). Pour des temps d'immersion plus longs (de 24 heures à 2 mois), les spectres RMN ^{13}C montrent une raie large asymétrique qui couvrent la gamme des déplacements chimiques attendus dans le cas de substitutions de type A ou B dans la structure apatitique [289]. Pour pouvoir déterminer les différentes contributions qui composent la raie large et étudier plus en détail le mode de substitution des carbonates, nous avons enregistré un spectre HETCOR ^{13}C-^{1}H pour l'échantillon immergé pendant deux mois. L'analyse détaillée de ce spectre 2D, présentée sur la *Figure 79*, permet de distinguer trois résonances ^{13}C (partiellement recouvrantes) montant une corrélation avec le pic ^{1}H caractéristique des ions HO^-. Ces trois contributions peuvent être attribuées selon leur déplacement chimique isotrope [289] : le pic situé à 166,5 ppm est attribué aux carbonates substitués aux groupements hydroxyles (substitution de type A) et les pics situés à 168,2 et 169,9 ppm sont attribués aux carbonates occupant les sites tétraédriques de la structure (substitution de type B). On observe également une raie de corrélation large entre les groupements carbonates et les protons des molécules d'eau et des unités HPO_4^{2-}. Cette contribution large, correspondant aux ions carbonates dans la couche désordonnée, est située à 169 ppm dans la dimension du ^{13}C. À partir des positions

et des largeurs de raie déterminées sur le spectre HETCOR, nous avons pu simuler les spectres ^{13}C quantitatifs. Pour l'échantillon immergé pendant deux mois, nos résultats montrent que les ions carbonates sont très majoritairement présents dans le cœur cristallin des nanoparticules d'HAC, à la fois en substitution de type A et B, en accord avec nos observations effectuées par FTIR.

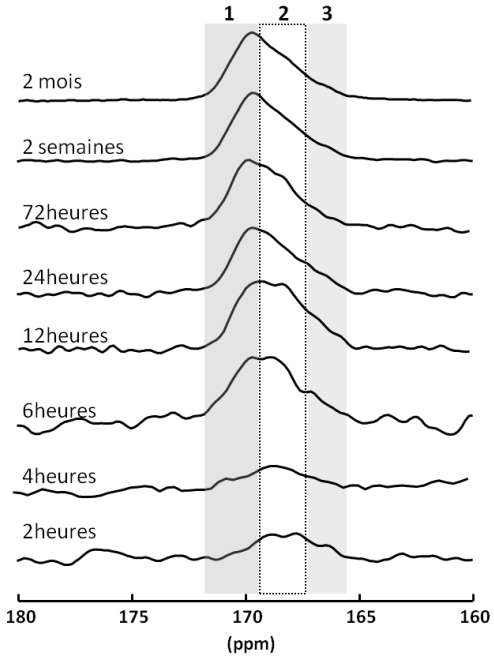


Figure 78: *Evolution des spectres RMN MAS ^{13}C des échantillons en fonction du temps d'immersion en SBF (14 kHz, 7 T).*

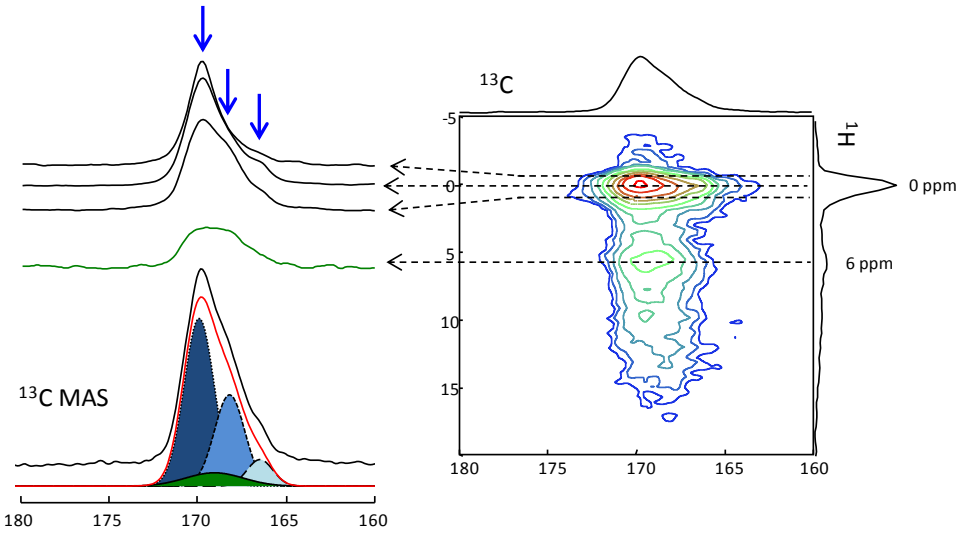


Figure 79: *Spectres HETCOR ^{13}C-^{1}H (14 kHz, 7 T) de l'échantillon immergé en SBF pendant deux mois. Les spectres ^{13}C correspondant aux fréquences de 0 et 6 ppm dans la dimension ^{1}H sont présentés sur la gauche. La simulation du spectre quantitatif MAS ^{13}C avec les quatre contributions ^{13}C observées sur le spectre 2D est également représentée.*

IV. Conclusion

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la structure du verre bioactif 45S5 (Bioglass®), qui aujourd'hui est couramment employé en chirurgie réparatrice osseuse. Nos résultats obtenus par RMN haute résolution du solide indiquent que la structure de ce verre est constituée d'un réseau polymérisé de chaînes silicates. Dans ce réseau de tétraèdres SiO_4, les expériences RMN de double résonance ^{31}P-^{23}Na et ^{31}P-^{29}Si montrent clairement que le phosphore est présent majoritairement sous la forme d'orthophosphates de calcium et de sodium et que seulement 8 % des atomes de phosphore sont associés aux chaînes silicates par des liaisons covalentes P-O-Si.

Dans un second temps, nous avons étudié les modifications structurales du verre 45S5 après immersion en SBF en utilisant différentes techniques de caractérisation (spectroscopie FTIR, Microscopie MEB-FEG et MET, diffraction des RX et électronique, et RMN). Aux premiers temps de la réaction entre le verre et la solution de SBF, le processus de lixiviation du verre conduit à la formation d'un gel de silice. Par RMN du ^{29}Si, nous avons pu à la fois quantifier les proportions relatives du verre résiduel non altéré et du gel formé à la surface des grains en fonction de la durée d'immersion, mais, également mesurer les variations du degré de polymérisation de ce gel au court du temps. Pour des temps d'immersion courts (inférieurs à 4 h), nos résultats obtenus par diffraction électronique et microscopie (MEB, MET) révèlent la formation de nanoparticules phosphocalciques amorphes à la surface du gel de silice. Les informations obtenues par RMN indiquent que la structure de cette phase amorphe est constituée d'ions PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, Ca^{2+} et de molécules d'eau, et qu'elle ne contient pas d'ions hydroxyles. Pour des temps d'immersion plus longs (de 4 h à 12 h), les techniques de diffraction (électronique et RX) montrent la présence de nanocristaux de structure apatitique (hexagonale) résultant de la cristallisation de cette phase amorphe. Ces nanocristaux présentent une croissance préférentielle selon l'axe c, qui donne lieu à une morphologie en bâtonnets (clairement mise en évidence par diffraction et microscopie), et s'agglomèrent sous la forme de plaquettes et de filaments. La RMN du ^{31}P et ^{1}H révèle la présence d'un grand nombre de défauts (HPO_4^{2-}, H_2O, lacunes de Ca^{2+} et d'ions HO^-) dans la structure apatitique de ces nanoparticules. En augmentant le temps d'immersion (de 12 h à 2 mois), les spectres RMN MAS ^{1}H témoignent de l'apparition de groupements hydroxyles dans la structure et de l'augmentation continue de leur taux avec la durée d'immersion. Les expériences HETCOR ^{31}P-^{1}H suggèrent que ces nanocristaux sont constitués d'un cœur bien organisé, riche en ions

HO^- et contenant peu de défauts structuraux de type HPO_4^{2-} et H_2O, ainsi que d'une couche de surface désordonnée contenant un grand nombre de groupements HPO_4^{2-}, de molécules d'eau et très peu de groupements hydroxyles. Nos résultats obtenus par RMN de ^{13}C indiquent que la majorité des ions carbonates est incorporée dans le cœur de cette apatite nanocristalline par substitution avec les ions phosphates et hydroxyles. Cette phase phosphocalcique, formée à la surface des grains du verre 45S5 lors de son immersion en SBF, et qui est responsable des propriétés de bioactivité de ce matériau, présente donc de grandes similitudes avec les apatites de calcium d'origine biologique.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les travaux décrits dans ce manuscrit concernent, d'une part, le développement et la caractérisation structurale de verres biocompatibles présentant un intérêt dans le cadre de la réparation ou reconstruction osseuse, et d'autre part, l'étude de leur dissolution dans différentes solutions. Pour caractériser la structure désordonnée de ces matériaux, nous avons principalement utilisé la Résonance Magnétique Nucléaire qui permet de sonder sélectivement l'environnement chimique local des atomes dans des systèmes cristallins ou amorphes. Dans ces travaux, nous nous sommes intéressés à deux types de biomatériaux de compositions chimiques très différentes : les verres de phosphates de calcium dopés avec du gallium et le verre Bioglass® 45S5.

Dans le cas des verres de métaphosphates de calcium dopés au gallium, de formule $x[Ga(PO_3)_3]$ $(1-x)[Ca(PO_3)_2]$ $(0 \leq x \leq 0{,}30)$, nous avons pu mettre en évidence, par RMN haute résolution du ^{31}P, que les groupements phosphates sont associés de façons mixte et homogène avec des cations Ca^{2+} et Ga^{3+}. L'utilisation, d'un très haut champ magnétique (20,0 T) et une fréquence de rotation très élevée (65 kHz), nous a permis d'accroître très significativement la résolution des spectres RMN MAS du ^{71}Ga. Les spectres obtenus montrent clairement que le gallium s'insère dans le réseau du verre majoritairement sous la forme d'unités GaO_5, et qu'il adopte, en plus faibles proportions, des coordinances octaédriques et tétraédriques. La quantification des espèces indique que la distribution des environnements du gallium est indépendante de la teneur en gallium introduite dans la composition du verre. Pour aller plus loin, il paraitrait intéressant d'étudier par RMN les corrélations internucléaires ^{31}P-^{71}Ga.

Lors de l'étude du comportement en solution, les résultats obtenus par ICP-AES montrent que la dissolution de ces verres est quasiment congruente et que la présence de gallium dans la composition entraîne une nette amélioration de la durabilité chimique du verre. Les analyses des poudres récupérées après lixiviation, effectuées par RMN du ^{31}P, ont permis de conclure qu'aux premiers temps d'immersion, le mécanisme de dissolution dominant est basé sur l'hydratation des chaînes phosphates, tandis qu'aux temps plus longs, c'est le mécanisme d'hydrolyse des liaisons P-O-P qui a lieu. Nous avons clairement observé que la teneur en gallium permet de moduler la vitesse de dissolution du verre et donc de contrôler le relargage de cet élément, qui joue le rôle de principe actif dans le traitement de l'ostéoporose. Il est également envisageable d'ajuster la durabilité chimique du verre en incorporant d'autres

cations dans la composition (comme Fe^{3+} ou Ti^{4+}, par exemple), pour ajuster plus finement la vitesse de relargage du gallium et la concentration de Ga^{3+} relarguée. En effet, contrôler la concentration de cet élément dans le milieu peut permettre d'éviter tout effet cytotoxique. Une étude du comportement en fluide physiologique simulé serait également importante à mener puisqu'à terme, ces verres sont destinés à être introduits dans l'organisme humain. Pour introduire ces verres dans l'organisme, il pourrait être envisagé de les incorporer sous forme de particules de petite taille dans des ciments médicaux.

L'étude de la structure du Bioglass® 45S5 par RMN haute résolution permet de décrire finement la nature des unités phosphates présentes dans le réseau silicaté désordonné. Des expériences RMN de double résonance (REDOR), effectuées sur les noyaux ^{31}P, ^{29}Si et ^{23}Na, ont permis de montrer que les groupements phosphates s'insèrent dans le réseau sous deux formes :

- des espèces orthophosphates Q^{0P} mixtes calcium/sodium, en majorité (92 %)
- des groupements phosphates liés de manière covalente (liaisons Si-O-P) aux chaînes silicatées, présents en faibles proportions (8 %).

Nos résultats expérimentaux mettent clairement en évidence l'existence de ces liaisons Si-O-P qui a été très débattue dans la littérature [202-204].

Une question reste cependant en suspens concernant la nature de la distribution des groupements orthophosphates au sein du réseau silicaté (distribution homogène ou clustering). Des expériences RMN multi-quanta du ^{31}P, que nous avons mis en œuvre très récemment, suggèrent qu'il est possible de distinguer expérimentalement ces deux types de distribution.

Nous avons effectué un suivi détaillé de la réaction 45S5/SBF en utilisant différentes techniques de caractérisation, et principalement la RMN. Nos résultats confirment qu'aux premiers temps de la réaction, le processus de lixiviation du verre conduit à la formation d'un gel de silice. Nous avons pu quantifier les proportions de verre résiduel et de gel formé à la surface des grains. Nous avons également mesurer les variations du degré de polymérisation du gel en fonction de la durée d'immersion. Pour des temps d'immersion courts, nous avons observé clairement la formation de nanoparticules phosphocalciques amorphes à la surface de ce gel. Cette phase amorphe est constituée d'ions PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, Ca^{2+} et de molécules d'eau mais ne contient pas d'ions HO^-. Pour des temps d'immersion plus longs, nous avons observé la formation de nanocristaux de structure apatitique, résultant de la cristallisation de cette phase amorphe. La RMN du ^{31}P et du ^{1}H révèle la présence d'un grand nombre de défauts

(HPO_4^{2-}, H_2O, lacunes de Ca^{2+} et d'HO^-) dans la structure apatitique de ces nanoparticules. Pour des temps d'immersion beaucoup plus longs, l'apparition croissante de groupements hydroxyles dans la structure est mise en évidence. La caractérisation par RMN des nanocristaux suggèrent qu'ils sont constitués d'un cœur bien organisé, riche en ions HO^- et en groupement carbonates, ainsi que d'une couche de surface désordonnée contenant beaucoup de groupements HPO_4^{2-}, de molécules d'eau et de très peu de groupements hydroxyles. La phase phosphocalcique formée à la surface du verre présente donc de grandes similitudes avec les apatites de calcium d'origine biologique. Pour décrire plus en détail la phase amorphe formée initialement et la couche de surface des nanocristaux d'apatite carbonatée, la RMN du ^{17}O présente un potentiel intéressant et il semble envisageable d'enrichir sélectivement ces phases en utilisant du SBF enrichi en ^{17}O.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Valappil, S. P.; Ready, D.; Abou Neel, E. A., *et al.*, *Antimicrobial gallium-doped phosphate-based glasses*. Advanced Functional Materials 2008, *18* (5), 732.

[2] Warrell, R. P.; Bockman, R. S.; Coonley, C. J., *et al.*, *Gallium nitrate inhibits calcium resorption from bone and is effective treatment for cancer-related hypercalcemia*. Journal of Clinical Investigation 1984, *73* (5), 1487.

[3] Hench, L. L., *The story of Bioglass®*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2006, *17* (11), 967.

[4] Jones, J. R.; Gentleman, E.; Polak, J., *Bioactive Glass Scaffolds for Bone Regeneration*. Elements 2007, *3*, 393.

[5] Jones, A. R.; Clare, A. G., *Bio-Glasses An Introduction*. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2012.

[6] Hench, L. L., *Bioceramics - From concept to Clinic*. Journal of the American Ceramic Society 1991, *74* (7), 1487.

[7] Hench, L. L.; Paschall, H. A., *Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle*. Journal of Biomedical Materials Research 1973, *7* (3), 25.

[8] Loveridge, N., *Bone: more than a stick*. J Anim Sci 1999, *77(Suppl2)*, 190.

[9] Dorozhkin, S., *Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates*. Angewandte Chemie-international Edition 2002, *41* (17), 3130.

[10] Elliott, J. C., *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier: Amsterdam [The Netherlands]; New York, 1994.

[11] American Society of Bone and Mineral Research, *Educational materials*. http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed/growth.html#remodel.

[12] Société Française de Rhumatologie, http://www.rhumatologie.asso.fr/04-Rhumatismes/grandes-maladies/0A-dossierosteoporose/B3_masse_osseuse.asp.

[13] Consensus development Conference, *Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis*. American Journal of Medicine 1991, *90*, 107.

[14] Organisation Mondiale de la Santé, *Evaluation du risque de fracture et son application au dépistage de l'ostéoporose post-ménopausique*. Rapports techniques 1994.

[15] Fayon, F.; Massiot, D.; Bujoli, B., *et al.*, *Biomatériaux pour la vectorisaiton d'agents anti-ostéoporétiques*. Rapport ANR MIADROS 2009.

[16] van Staa, T. P.; Leufkens, H. G. M.; Cooper, C., *Does a fracture at one site predict later fractures at other sites? - A British cohort study*. Osteoporosis Int. 2002, *13* (8), 624.

[17] International Osteoporosis Foundation, *Quality of life - Why prevent the first fracture?* Invest in your bones 2003.

[18] International Osteoporosis Foundation, http://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics #category-290.

[19] Kanis, J. A.; Adams, J.; Borgström, F., *et al.*, *The cost-effectiveness of alendronate in the management of osteoporosis*. Bone 2008, *42* (1), 4.

[20] Hoerni, B., *Dictionnaire des Cancers*. Ed. Frison-Roche 2006.

[21] Carré, E.; Elgoutini, T.; Truy, E., *Implants pour surdités de transmission*. Le moniteur hospitalier 2011.

[22] *Schéma de l'Oreille Interne*. http://recreavie.com/05-sciences-01-organitron-04-l27oreille.html.

[23] Williams, D. F.; Blacks, J.; Doherty, P. J., *Second Consensus Conference on definitions in biomaterials*. Elsevier, Chester 1992, *10*.

[24] Williams, D. F., *The Williams dictionnary of biomaterials*. Liverpool University Press 1999.

[25] Dorland, *Dorland's Medical Dictionary*. 1994.

[26] Wiley, J., *International Dictionary of Medicine and Biology*. 1986.

[27] Hench, L. L.; Wilson, J., *An Introduction to Bioceramics*. World Scientific, Singapore 1993, *Chap. 4&6*.

[28] Albrektsson, T.; Johansson, C., *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. European Spine Journal 2001, *10* (0), S96.

[29] Safronova, T.; Kuznetsov, A.; Korneychuk, S., *et al., Calcium phosphate powders synthesized from solutions with [Ca2+]/[PO43-]=1 for bioresorbable ceramics*. Central European Journal of Chemistry 2009, *7* (2), 184.

[30] LeGeros, R. Z., *Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics*. Clinical Materials 1993, *14* (1), 65.

[31] Knowles, J. C., *Phosphate based glasses for biomedical applications*. Journal of Materials Chemistry 2003, *13* (10), 2395.

[32] Oonishi, H.; Hench, L. L.; Wilson, J., *et al., Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass (R), A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite*. Journal of Biomedical Materials Research 2000, *51* (1), 37.

[33] Cao, W.; Hench, L. L., *Bioactive materials*. Ceramics International 1996, *22* (6), 493.

[34] Hench, L. L.; West, J. K., *Biological Applications of bioactive Glasses*. Life Chemistry Reports 1996, *13*, 187.

[35] North American Spine Society, www.spine.org/Documents/bone_grafts_2006.pdf , Bone graft alternatives 2006.

[36] Mainard, D., http://www.sofcot.fr/data/FlashConfs/2010/3552/swf/index.htm , Conférence de la SOFCOT 2010.

[37] Oh, S.; Oh, N.; Appleford, M., *et al., Bioceramics for Tissue Engineering Applications - A Review*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2006, *2* (23), 49.

[38] Fernández, E., *Bioactive Bone Cements*. In *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*,

[39] Ginebra, M. P.; Traykova, T.; Planell, J. A., *Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review*. Journal of Controlled Release 2006, *113* (2), 102.

[40] Dorozhkin, S., *Calcium orthophosphates*. 2007.

[41] Bohner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury 2000, *31, Supplement 4* (0), D37.

[42] Pan, H. B.; Darvell, B. W., *Calcium Phosphate Solubility: The Need for Re-Evaluation*. Crystal Growth & Design 2009, *9* (2), 639.

[43] Fernandez, E.; Gil, F. J.; Ginebra, M. P., *et al.*, *Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry*. Journal of materials science : materials in medicine 1999, *10* (3), 169.

[44] Schnitzler, V., *Système combiné Bisphosphonate / ciment apatitique : un matériau innovant actif contre les déréglements de la résorption osseuse*. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France 2009.

[45] McDowell, H.; Gregory, T. M.; Brown, W. E., *Solubility of $Ca_5(PO_4)_3OH$ in system $Ca(OH)_2$-H_3PO_4-H_2O at 5-degrees-C, 15-degrees-C, 25-degrees-C and 37-degrees-C*. Journal of Research of the National Bureau of Standards Section a-Physics and Chemistry 1977, *81* (2-3), 273.

[46] Vallet-Regí, M.; González-Calbet, J. M., *Calcium phosphates as substitution of bone tissues*. Progress in Solid State Chemistry 2004, *32* (1–2), 1.

[47] Cavagna, R.; Daculsi, G.; Bouler, J. M., *Macroporous calcium phosphate ceramic: A prospective study of 106 cases in lumbar spinal fusion*. Journal of Long-Term Effects of Medical Implants 1999, *9* (4), 403.

[48] Substituts Osseux Endobon®, http://www.biomet.fr/francais-med-home/fr-biomaterials/fr-bio-subtitutsosseaux/fr-endobon 2004.

[49] ATLANTIK Genta, http://www.medicalgroup.fr/MedicalBiomat/atlantikgenta.html.

[50] Nery, E. B.; Lynch, K. L.; Hirthe, W. M., *et al.*, *Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects*. Journal of Periodontology 1975, *46* (6), 328.

[51] Daculsi, G.; LeGeros, R.; Heughebaert, M., *et al.*, *Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics*. Calcified Tissue International 1990, *46* (1), 20.

[52] Daculsi, G.; Bouler, J. M.; LeGeros, R. Z., *Adaptive Crystal Formation in Normal and Pathological Calcifications in Synthetic Calcium Phosphate and Related Biomaterials*. Academic Press: 1997; Vol. Volume 172, p 129.

[53] Bouler, J. M.; Trecant, M.; Delecrin, J., *et al.*, *Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of five synthesis parameters on compressive strength*. Journal of Biomedical Materials Research 1996, *32* (4), 603.

[54] Perera, F. H.; Martínez-Vázquez, F. J.; Miranda, P., *et al.*, *Clarifying the effect of sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of β-tricalcium phosphate*. Ceramics International 2010, *36* (6), 1929.

[55] LeGeros, R. Z.; Chohayeb, A.; Shulman, A., *Apatitic Calcium Phosphates: possible dental restorative materials*. Journal of Dental Research 1982, *61*, 343.

[56] Brown, W. E.; Chow, L. C., *Dental restorative cements pastes*. 1985.

[57] Brown, W. E.; Chow, L. C., *A new calcium-phosphate setting cement*. Journal of Dental Research 1983, *62*, 672.

[58] Bohner, M.; Gbureck, U.; Barralet, J. E., *Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment*. Biomaterials 2005, *26* (33), 6423.

[59] Graftys®, *Développeurs de Ciments Phosphocalciques à visées médicales*. http://www.graftys.com/en/.

[60] Dorozhkin, S., *Bioceramics basics on calcium orthophosphates (review)*. 2007.

[61] LeGeros, R. Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates*. Clinical Orthopaedics and Related Research 2002, (395), 81.

[62] Chevalier, J.; Gremillard, L., *Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years*. Journal of the European Ceramic Society 2009, *29* (7), 1245.

[63] Oudadesse, H.; Dietrich, E.; Bui, X. V., *et al.*, *Enhancement of cells proliferation and control of bioactivity of strontium doped glass*. Applied Surface Science 2011, *257* (20), 8587.

[64] Hench, L. L. W., J.; Greenspan, D.C., *Bioglass(R) : A short history and bibliography*. Journal of Australian Ceramic Society 2004, *40* (1), 1.

[65] Andersson, Ö. H.; Karlsson, K. H., *On the bioactivity of silicate glass*. Journal of Non-Crystalline Solids 1991, *129* (1–3), 145.

[66] Gotman, I., *Characteristics of metals used in implants*. Journal of Endourology 1997, *11* (6), 383.

[67] Lemaître, J., *Biomatériaux - Introduction*. 2004.

[68] Witte, F.; Calliess, T.; Windhagen, H., *Biodegradable synthetic implant materials. Clinical applications and immunological aspects*. Orthopade 2008, *37* (2), 125.

[69] Boucard, N.; Viton, C.; Agay, D., *et al.*, *The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns*. Biomaterials 2007, *28* (24), 3478.

[70] Bui, X. V.; Oudadesse, H.; Le Gal, Y., *et al.*, *Bioactivity behaviour of biodegradable material comprising bioactive glass*. Korean J. Chem. Eng. 2012, *29* (2), 215.

[71] Oudadesse, H., *Elaboration de verres bioactifs pour des applications en tant que biomatériaux*. Conférence de l'USTV Rennes 2011 2011.

[72] Haute Autorité de Santé, *Comment prévenir les fractures dues à l'ostéoporose*. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/prevenir_fractures_osteoporose.pdf 2007.

[73] Ebetino, F. H.; Francis, M. D.; Rogers, M. J., *et al.*, *Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates*. Reviews in Contemporary Pharmacotherapy 1998, *9* (4), 233.

[74] Luckman, S. P.; Coxon, F. P.; Ebetino, F. H., *et al.*, *Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: Evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages*. Journal of Bone and Mineral Research 1998, *13* (11), 1668.

[75] Russell, R.; Watts, N.; Ebetino, F., *et al.*, *Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy*. Osteoporosis Int. 2008, *19* (6), 733.

[76] Mukherjee, S.; Huang, C. C.; Guerra, F., *et al.*, *Thermodynamics of Bisphosphonates Binding to Human Bone: A Two-Site Model*. Journal of the American Chemical Society 2009, *131* (24), 8374.

[77] Mukherjee, S.; Song, Y. C.; Oldfield, E., *NMR investigations of the static and dynamic structures of bisphosphonates on human bone: a molecular model*. Journal of the American Chemical Society 2008, *130* (4), 1264.

[78] van Beek, E. R.; Lowik, C.; Ebetino, F. H., *et al.*, *Binding and antiresorptive properties of heterocycle-containing bisphosphonate analogs: Structure-activity relationships*. Bone 1998, *23* (5), 437.

[79] Leu, C.-T.; Luegmayr, E.; Freedman, L. P., *et al.*, *Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy*. Bone 2006, *38* (5), 628.

[80] Fleisch, H., *Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient*. New York Academic Press, 4th edn 2000.

[81] Fleisch, H., *Bisphosphonates in osteoporosis*. European Spine Journal 2003, *12*, S142.

[82] Rogers, M. J., *New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Curr Pharm Des 2003, *9* (32), 2643.

[83] Frith, J. C.; Monkkonen, J.; Blackburn, G. M., *et al.*, *Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta,gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro*. Journal of Bone and Mineral Research 1997, *12* (9), 1358.

[84] Bartl, R.; Frisch, B.; von Tresckow, E., *et al.*, *Chapter 3 Bisphosphonates. In Bisphosphonates in Medical Practice Actions - Side Effects - Indications - Strategies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, 33.

[85] Ezra, A.; Golomb, G., *Administration routes and delivery systems of bisphosphonates for the treatment of bone resorption*. Advanced Drug Delivery Reviews 2000, *42* (3), 175.

[86] Cramer, J. A.; Gold, D. T.; Silverman, S. L., *et al.*, *A systematic review of persistence and compliance with bisphosphonates for osteoporosis*. Osteoporosis Int. 2007, *18* (8), 1023.

[87] Seeman, E.; Compston, J.; Adachi, J., *et al.*, *Non-compliance: the Achilles' heel of anti-fracture efficacy*. Osteoporosis Int. 2007, *18* (6), 711.

[88] Josse, S.; Faucheux, C.; Soueidan, A., *et al.*, *Novel biomaterials for bisphosphonate delivery*. Biomaterials 2005, *26*, 2073.

[89] Roussière, H.; Montavon, G.; Samia, L. B., *et al.*, *Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption disorders*. Journal of Materials Chemistry 2005, *15* (35-36), 3869.

[90] Roussière, H.; Fayon, F.; Alonso, B., *et al.*, *Reaction of zoledronate with beta-tricalcium phosphate for the design of potential drug device combined systems*. Chemistry of Materials 2008, *20* (1), 182.

[91] Schnitzler, V.; Fayon, F.; Despas, C., *et al.*, *Investigation of alendronate-doped apatitic cements as a potential technology for the prevention of osteoporotic hip fractures: Critical influence of the drug introduction mode on the in vitro cement properties*. Acta Biomaterialia 2011, *7* (2), 759.

[92] Parratte, S.; Amphoux, T.; Kolta, S., *et al.*, *Femoroplasty using an injectable and resobable bi-phosphonate laoded bone substitute to prevent contro-lateral hip fracture in the elderly : a cadaveric biomehcnical study* Osteoporosis Int. 2010, *21*, 346.

[93] Peter, B.; Pioletti, D. P.; Laïb, S., *et al.*, *Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration*. Bone 2005, *36* (1), 52.

[94] Peter, B.; Gauthier, O.; Laïb, S., *et al.*, *Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats*. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2006, *76A* (1), 133.

[95] Yoshinari, M.; Oda, Y.; Inoue, T., *et al.*, *Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants*. Biomaterials 2002, *23* (14), 2879.

[96] Josse, S.; Faucheux, C.; Soueidan, A., *et al.*, *Chemically modified calcium phosphates as novel materials for bisphosphonate delivery*. Advanced Materials 2004, *16* (16), 1423.

[97] Zarzycki, J., *Les verres et l'état vitreux*. Ed. Masson 1982.

[98] Scholze, H., *Le verre : Nature, structure et propriétés*. Institut du verre, Paris 1980.

[99] Brow, R. K., *Review: the structure of simple phosphate glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids 2000, *263–264* (0), 1.

[100] Kreidler, E. R.; Hummel, F. A., *Phase relationsships in system SrO-P_2O_5 and influecne of water vapor on formation of $Sr_4P_2O_9$* Inorg. Chem. 1967, *6* (5), 884.

[101] Kirkpatrick, R. J.; Brow, R. K., *Nuclear magnetic resonance investigation of the structures of phosphate and phosphate-containing glasses: a review*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 1995, *5* (1), 9.

[102] Brow, R. K.; Tallant, D. R.; Myers, S. T., *et al.*, *The short-range structure of zinc polyphosphate glass*. Journal of Non-Crystalline Solids 1995, *191* (1–2), 45.

[103] Fayon, F.; Bessada, C.; Coutures, J. P., *et al.*, *High-resolution double-quantum P-31 MAS NMR study of the intermediate-range order in crystalline and glass lead phosphates*. Inorg. Chem. 1999, *38* (23), 5212.

[104] Roiland, C.; Fayon, F.; Simon, P., *et al.*, *Characterization of the disordered phosphate network in CaO–P_2O_5 glasses by 31P solid-state NMR and Raman spectroscopies*. Journal of Non-Crystalline Solids 2011, *357* (7), 1636.

[105] Park, E. K.; Lee, Y. E.; Choi, J. Y., *et al.*, *Cellular biocompatibility and stimulatory effects of calcium metaphosphate on osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells*. Biomaterials 2004, *25* (3403-3411).

[106] Guo, W.; Kim, S.; Grynpas, M. D., *et al.*, *Calcium polyphosphates fibers for biodegradable composite biomaterials*. Transactions of the 26th International Biomaterials Symposium Minneapolis: Society of Biomaterials 1994, 163.

[107] Wells, J. D.; Grynpas, M. D.; Pilliar, R. M., *A novel porous bone substitute*. Transactions of the 5th World Biomaterials Congress Toronto: University of Toronto Press 1996, 53.

[108] Baksh, D.; Davies, J. E., *Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and in vivo*. Journal of Materials Science : Materials in Medicine 1998, *9*, 743.

[109] Lee, Y. M.; Seol, Y. J.; Lim, Y. T., *et al.*, *Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices*. Journal of Biomedical Materials Research 2001, *54* (2), 216.

[110] Abou Neel, E.; Knowles, J., *Physical and biocompatibility studies of novel titanium dioxide doped phosphate-based glasses for bone tissue engineering applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2008, *19* (1), 377.

[111] Abou Neel, E.; O'Dell, L.; Smith, M., *et al.*, *Processing, characterisation, and biocompatibility of zinc modified metaphosphate based glasses for biomedical applications*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2008, *19* (4), 1669.

[112] Ray, N. H., *Inorganic polymers*. Academic Press New York: 1978.

[113] Abou Neel, E. A.; Chrzanowski, W.; Valappil, S. P., *et al.*, *Doping of a high calcium oxide metaphosphate glass with titanium dioxide*. Journal of Non-Crystalline Solids 2009, *355* (16–17), 991.

[114] Gilchrist, T.; Healy, D. M.; Drake, C., *Controlled silver-releasing polymers and their potential for urinary-tract infection control*. Biomaterials 1991, *12* (1), 76.

[115] Sheridan, R.; Doherty, P. J.; Gilchrist, T., *et al.*, *The effect of antibacterial agents on the behaviour of cultured mammalian fibroblasts*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1995, *6* (12), 853.

[116] Mendeleïev, D., Zhurnal Russkoe Fiziko-Khimicheskoe Obshchestvo 1871, *3*, 25.

[117] Lecoq de Boisbaudran, P. E., Annales de Chimie, Série 5 1877, *10*, 100.

[118] Katrak, F. E.; Agarwal, J. C., *Gallium - long-run supply*. Journal of Metals 1981, *33* (9), 33.

[119] Baes, C. F.; Mesmer, R. E., *The Hydrolysis of Cations*. Edition John Wiley and sons, New York 1976.

[120] Pearson, R. G., *Hard and soft acids and bases*. Chemistry in Britain 1967, *3* (3), 103.

[121] Wood, S. A.; Samson, I. A., *Solubility of ore minerals and complexation of ore metals in hydrothermal solutions*. Techniques in Hydrothermal Ore Deposites. Reviews in Economic Geology J. Richard and P. Larson Editors 1998, 33.

[122] Wood, S. A.; Samson, I. M., *The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium*. Ore Geology Reviews 2006, *28* (1), 57.

[123] Fiat, D.; Connick, R. E., *Magnetic resonance studies of ion solvation. Coordination number of gallium (3) ions in aqueous solutions*. Journal of the American Chemical Society 1966, *88* (20), 4754.

[124] Lindqvist-Reis, P.; Munoz-Paez, A.; Diaz-Moreno, S., *et al.*, *The structure of the hydrated gallium(III), indium(III), and chromium(III) ions in aqueous solution. A large angle X-ray scattering and EXAFS study*. Inorg. Chem. 1998, *37* (26), 6675.

[125] Smith, R. M.; Martell, A. E., *Critical Stability Constants*. Plenum Press New York 1976, *4*.

[126] Diakonov, I. I.; Pokrovski, G. S.; Bénézeth, P., *et al.*, *Gallium speciation in aqueous solution. Experimental study and modelling: Part 1. Thermodynamic properties of Ga(OH)4− to 300°C*. Geochimica Et Cosmochimica Acta 1997, *61* (7), 1333.

[127] Bénézeth, P.; Diakonov, I. I.; Pokrovski, G. S., *et al.*, *Gallium speciation in aqueous solution. Experimental study and modelling: Part 2. Solubility of α-GaOOH in acidic solutions from 150 to 250°C and hydrolysis constants of gallium (III) to 300°C*. Geochimica et Cosmochimica Acta 1997, *61* (7), 1345.

[128] Harris, W. R.; Pecoraro, V. L., *Thermodynamic binding constants for gallium transferrin*. Biochemistry 1983, *22* (2), 292.

[129] Smith, M. E., *Application of Al-27 NMR techniques to structure determination in solids*. Applied Magnetic Resonance 1993, *4* (1-2), 1.

[130] Bernstein, L. R., *Mechanisms of therapeutic activity for gallium*. Pharmacological Reviews 1998, *50* (4), 665.

[131] Shannon, R., *Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomie Distances in Halides and Chaleogenides*. Acta Crystalline 1976.

[132] Pearson, R. G., *Absolute electronegativity and harness - Application to inorganic-chemistry*. Inorg. Chem. 1988, *27* (4), 734.

[133] Hancock, R. D.; Marsicano, F., *Parametric correlation of formation-constants in aqueous-solution .2. Ligands with large donor atoms*. Inorg. Chem. 1980, *19* (9), 2709.

[134] Martell, A. E.; Hancock, R. D., *Metal Complexes in Aqueous Solutions*. Plenum Press New York 1996.

[135] Logan, K. J.; Ng, P. K.; Turner, C. J., *et al., Comparative pharmacokinetics of 67Ga and 59Fe in humans*. International Journal of Nuclear Medicine and Biology 1981, *8* (4), 271.

[136] Weiner, R. E., *The mechanism of 67Ga localization in malignant disease*. Nuclear Medicine and Biology 1996, *23* (6), 745.

[137] Vallabhajosula, S. R.; Harwig, J. F.; Siemsen, J. K., *et al., Radiogallium localization in tumors - Blood binding and transport and the role of transferrin*. J. Nucl. Med. 1980, *21* (7), 650.

[138] Vallabhajosula, S. R.; Harwig, J. F.; Wolf, W., *The mechanism of tumor localization of gallium-67 citrate: Role of transferrin binding and effect of tumor pH*. International Journal of Nuclear Medicine and Biology 1981, *8* (4), 363.

[139] Chitambar, C. R.; Zivkovic, Z., *Uptake of gallium-67 by human leukemic cells: demosntration of transferrin receptor-dependant and transferrin-independent mechanisms*. Cancer Res 1987, *47* (15), 3929.

[140] Drobyski, W. R.; UlHaq, R.; Majewski, D., *et al., Modulation of in vitro and in vivo T-cell responses by Transferrin-gallium and gallium nitrate*. Blood 1996, *88* (8), 3056.

[141] Levaditi, C.; Bardet, J.; Tchakirian, A., *et al., Le gallium, propriétés thérapeutiquesdans la syphilis et les trypanosomiases expérimentales*. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Séries D Sci Nate 1931, *192*, 1142.

[142] Olakanmi, O.; Britigan, B. E.; Schlesinger, L. S., *Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages*. Infection and Immunity 2000, *68* (10), 5619.

[143] Hart, M. M.; Adamson, R. H., *Antitumor activity and toxicity of salts of inorganic group IIIA metals - Aluminium, Gallium, Indium, and Thallium - (Walker 256 Carcino/Sarcoma/Reticulum Cell Sarcoma/Lymphosarcoma/Mammary carinoma/Leukemia)* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1971, *68* (7), 1623.

[144] Hart, M. M.; Smith, C. F.; Yancey, S. T., *et al., Toxicity and antitumor activity of gallium nitrate and periodically related metals salts*. Journal of the National Cancer Institute 1971, *47* (5), 1121.

[145] Crawford, E. D.; Saiers, J. H.; Baker, L. H., *et al., Gallium nitrate in advanced bladdercarcinoma: Southwest oncology group study*. Urology 1991, *38* (4), 355.

[146] Seidman, A. D.; Scher, H. I.; Heinemann, M. H., *et al., Continuous infusion gallium nitrate for patients with advanced refractory urothelial tract tumors*. Cancer 1991, *68* (12), 2561.

[147] Einhorn, L. H.; Roth, B. J.; Ansari, R., *et al., Phase-II trial of Vinblastine, Ifosfamide, and Gallium combination chemotherapy in metastatic urothelial carcinoma*. Journal of Clinical Oncology 1994, *12* (11), 2271.

[148] Warrell, R. P.; Coonley, C. J.; Straus, D. J., *et al., Treatment of patients with advanced malignant-lymphomia using gallium nitrate administered as a 7-day continuous infusion*. Cancer 1983, *51* (11), 1982.

[149] Weick, J. K.; Stephens, R. L.; Baker, L. H., *et al., Gallium nitrate in malignant-lymphoma - A southwest oncology group-study*. Cancer Treatment Reports 1983, *67* (9), 823.

[150] Chitambar, C. R.; Zahir, S. A.; Ritch, P. S., *et al., Evaluation of continuous-infusion gallium nitrate and hydroxyurea in combination for the treatment of refractory non-Hodgkin's lymphoma*. American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials 1997, *20* (2), 173.

[151] Casper, E. S.; Stanton, G. F.; Sordillo, P. P., *et al., Phase -II trial of gallium nitrate in patients with advanced malignant-melanoma* Cancer Treatment Reports 1985, *69* (9), 1019.

[152] Scher, H. I.; Curley, T.; Geller, N., *et al., Gallium nitrate in prostatic-cancer - Evaluation of antitumor-activity and effects on bone turnover*. Cancer Treatment Reports 1987, *71* (10), 887.

[153] Schwartz, S.; Yagoda, A., *Phase-I- II Trial of gallium nitrate for advanced hypernephroma*. Anticancer Res. 1984, *4* (4-5), 317.

[154] Collery, P.; Keppler, B.; Madoulet, C., *et al., Gallium in cancer treatment*. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2002, *42* (3), 283.

[155] Jabboury, K.; Frye, D.; Holmes, F. A., *et al., Phase-II Evaluation of gallium nitrate by continuous infusion in breast-cancer*. Investigational New Drugs 1989, *7* (2-3), 225.

[156] Warrell, R. P.; Alcock, N. W.; Bockman, R. S., *Gallium nitrate inhibits accelerated bone turnover in patients with bone metastases*. Journal of Clinical Oncology 1987, *5* (2), 292.

[157] Warrell, R. P.; Lovett, D.; Dilmanian, F. A., *et al., Low-dose gallium nitrate for prevention of osteolysis in myeloma: results of a pilot randomized study*. Journal of Clinical Oncology 1993, *11* (12), 2443.

[158] Niesvizky, R., *Gallium nitrate in multiple myeloma: Prolonged survival in a cohort of patients with advanced-stage disease*. Seminars in Oncology 2003, *30* (2), 20.

[159] Chitambar, C. R., *Gallium nitrate revisited*. Seminars in Oncology 2003, *30* (2), 1.

[160] Bockman, R., *The effects of gallium nitrate on bone resorption*. Seminars in Oncology 2003, *30* (2), 5.

[161] Bockman, R. S.; Repo, M. A.; Warrell, R. P., *et al., Distribution of trace levels of therapeutic gallium in bone as mapped by synchrotron X-ray microscopy* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1990, *87* (11), 4149.

[162] Hall, T. J.; Chambers, T. J., *Gallium inhibits bone-resorption by a direct effect on osteoclasts*. Bone and Mineral 1990, *8* (3), 211.

[163] Matkovic, V.; Apseloff, G.; Shepard, D. R., *et al., Use of gallium to treat Paget's disease of bone: a pilot study*. The Lancet 1990, *335* (8681), 72.

[164] Warrell, R. P.; Bosco, B.; Weinerman, S., *et al., Gallium nitrate for advanced Paget disease of bone - effectiveness and dose-response anlysis*

Annals of Internal Medicine 1990, *113* (11), 847.

[165] Donnelly, R.; Bockman, R. S.; Doty, S. B., *et al., Bone particles from gallium-treated rats are resistant to resorption in vivo*. Bone and Mineral 1991, *12* (3), 167.

[166] Blair, H. C.; Teitelbaum, S. L.; Tan, H. L., *et al., Reversible inhibition of osteoclastic activity by bone-boung Gallium (III)*. Journal of Cellular Biochemistry 1992, *48* (4), 401.

[167] Verron, E.; Masson, M.; Khoshniat, S., *et al., Gallium modulates osteoclastic bone resorption in vitro without affecting ostoblasts*. British Journal of Pharmacology 2010.

[168] Ma, Z.; Fu, Q., *Comparison of the Therapeutic Effects of Yeast-incorporated Gallium with those of Inorganic Gallium on Ovariectomized Osteopenic Rats*. Biological Trace Element Research 2010, *134* (3), 280.

[169] Ma, Z.; Fu, Q., *Therapeutic Effect of Organic Gallium on Ovariectomized Osteopenic Rats by Decreased Serum Minerals and Increased Bone Mineral Content*. Biological Trace Element Research 2010, *133* (3), 342.

[170] Donnelly, R.; Boskey, A., *The effect of gallium on seeded hydroxyapatite growth*. Calcified Tissue International 1989, *44* (2), 138.

[171] Korbas, M.; Rokita, E.; Meyer-Klaucke, W., *et al., Bone tissue incorporates in vitro gallium with a local structure similar to gallium-doped brushite*. Journal of Biological Inorganic Chemistry 2004, *9* (1), 67.

[172] Melnikov, P.; Teixeira, A. R.; Malzac, A., *et al., Gallium-containing hydroxyapatite for potential use in orthopedics*. Materials Chemistry and Physics 2009, *117* (1), 86.

[173] Mellier, C.; Fayon, F.; Schnitzler, V., *et al., Characterization and Properties of Novel Gallium-Doped Calcium Phosphate Ceramics*. Inorg. Chem. 2011, *50* (17), 8252.

[174] Brow, R. K., *Review: the structure of simple phosphate glasses*. J. Non-Cryst. Solids 2000, *263* (1-4), 1.

[175] Pourpoint, F.; Gervais, C.; Bonhomme-Coury, L., *et al., Calcium phosphates: First-principles calculations vs. solid-state NMR experiments*. Comptes Rendus Chimie 2008, *11* (4–5), 398.

[176] Feike, M.; Graf, R.; Schnell, I., *et al., Structure of crystalline phosphates from P-31 double-quantum NMR spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society 1996, *118* (40), 9631.

[177] Losso, P.; Schnabel, B.; Jager, C., *et al., P-31 NMR investigations of binary alkaline-earth phosphate glasses of ultraphosphate composition*. Journal of Non-Crystalline Solids 1992, *143* (2-3), 265.

[178] Feike, M.; Jager, C.; Spiess, H. W., *Connectivities of coordination polyhedra in phosphate glasses from P-31 double-quantum NMR spectroscopy*. J. Non-Cryst. Solids 1998, *223* (3), 200.

[179] Fayon, F.; King, I. J.; Harris, R. K., *et al., Application of the through-bond correlation NMR experiment to the characterization of crystalline and disordered phosphates*. Comptes Rendus Chimie 2004, *7* (3-4), 351.

[180] Massiot, D.; Hiet, J.; Pellerin, N., *et al., Two-dimensional one pulse MAS of half-integer quadrupolar nuclei*. Journal of Magnetic Resonance 2006, *181* (2), 310.

[181] Blümich, B.; Blümler, P.; Jansen, J., *Presentation of sideband envelopes by two-dimensional one-pulse (TOP) spectroscopy*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 1992, *1* (2), 111.

[182] Blümler, P.; Jansen, J.; Blümich, B., *Two-dimensional one-pulse rotational echo spectra*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 1994, *3* (4), 237.

[183] Otero Arean, C.; Rodriduez Delgado, M.; Montouillout, V., *et al.*, *Synthesis and Characterization of spinel-type Gallia-Alumina Solid Solutions*. Zeitschrift fur anorganische und allgemeine Chemie 2005, *631*, 2121.

[184] Engelhardt, G.; Michel, D., *High Resolution Solid-State NMR of silicates and zeolites*. John Wiley & Son, Chicester 1987.

[185] Brow, R. K.; Kirkpatrick, R. J.; Turner, G. L., *Nature of Alumina in phosphate-glass. 2. Structure of Sodium Aluminophosphate glass*. Journal of the American Ceramic Society 1993, *76* (4), 919.

[186] Czjzek, G.; Fink, J.; Gotz, F., *et al.*, *Atomic coordination and the distribution of electric-field gradients in amorphous solids*. Physical Review B 1981, *23* (6), 2513.

[187] Le Caër, G.; Brand, R. A., *General models for the distributions of electric field gradients in disordered solids*. Journal of Physics: Condensed Matter 1998, *10* (47), 10715.

[188] Le Caër, G.; Bureau, B.; Massiot, D., *An extension of the Czjzek model for the distributions of electric field gradients in disordered solids and an application to NMR spectra of 71Ga in chalcogenide glasses*. J Phys Condens Matter 2010, *22* (6), 22.

[189] Mellier, C., *Synthèse et caractérisation de biomatériaux phosphocalciques multiphasés ou non avec des inhibiteurs de la résorption osseuse*. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, France 2011.

[190] Pickup, D. M.; Moss, R. M.; Qiu, D., *et al.*, *Structural characterization by x-ray methods of novel antimicrobial gallium-doped phosphate-based glasses*. Journal of Chemical Physics 2009, *130* (6).

[191] Bunker, B. C.; Arnold, G. W.; Wilder, J. A., *Phosphate glass dissolution in aqueous solutions*. Journal of Non-Crystalline Solids 1984, *64* (3), 291.

[192] Delahaye, F.; Montagne, L.; Palavit, G., *et al.*, *Acid dissolution of sodium-calcium metaphosphate glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids 1998, *242* (1), 25.

[193] Gao, H. S.; Tan, T. N.; Wang, D. H., *Effect of composition on the release kinetics of phosphate controlled release glasses in aqueous medium*. Journal of Controlled Release 2004, *96* (1), 21.

[194] Takebe, H.; Baba, Y.; Kuwabara, M., *Dissolution behavior of ZnO-P_2O_5 glasses in water*. Journal of Non-Crystalline Solids 2006, *352* (28-29), 3088.

[195] Vitale-Brovarone, C.; Novajra, G.; Milanese, D., *et al.*, *Novel phosphate glasses with different amounts of TiO_2 for biomedical applications: Dissolution tests and proof of concept of fibre drawing*. Materials Science and Engineering: C 2011, *31* (2), 434.

[196] Massiot, D.; Fayon, F.; Capron, M., *et al.*, *Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra*. Magnetic Resonance in Chemistry 2002, *40* (1), 70.

[197] Pines, A.; Waugh, J. S.; Gibby, M. G., *Proton-enhanced nuclear induction spectroscopy - Method for High-Resolution NMR of dilute spins in solids*. Journal of Chemical Physics 1972, *56* (4), 1776.

[198] Stejskal, E. O.; Schaefer, J.; Waugh, J. S., *Magic-Angle Spinning and polarization transfer in proton-enhanced*. Journal of Magnetic Resonance 1977, *28* (1), 105.

[199] Cerruti, M.; Magnacca, G.; Bolis, V., *et al., Characterization of sol-gel bioglasses with the use of simple model systems: a surface-chemistry approach*. Journal of Materials Chemistry 2003, *13* (6), 1279.

[200] Cerruti, M.; Bianchi, C. L.; Bonino, F., *et al., Surface modifications of bioglass immersed in TRIS-buffered solution. A multitechnical spectroscopic study*. Journal of Physical Chemistry B 2005, *109* (30), 14496.

[201] Lin, C.-C.; Huang, L.-C.; Shen, P., *$Na_2CaSi_2O_6$-P_2O_5 based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure*. Journal of Non-Crystalline Solids 2005, *351* (40-42), 3195.

[202] FitzGerald, V.; Pickup, D. M.; Greenspan, D., *et al., A neutron and X-ray diffraction study of bioglass with reverse Monte Carlo modelling*. Advanced Functional Materials 2007, *17* (18), 3746.

[203] Linati, L.; Lusvardi, G.; Malavasi, G., *et al., Medium-range order in phospho-silicate bioactive glasses: Insights from MAS-NMR spectra, chemical durability experiments and molecular dynamics simulations*. Journal of Non-Crystalline Solids 2008, *354* (2-9), 84.

[204] Pedone, A.; Charpentier, T.; Malavasi, G., *et al., New Insights into the Atomic Structure of 45S5 Bioglass by Means of Solid-State NMR Spectroscopy and Accurate First-Principles Simulations*. Chemistry of Materials 2010, *22* (19), 5644.

[205] Angelopoulou, A.; Montouillout, V.; Massiot, D., *et al., Study of the alkaline environment in mixed alkali compositions by multiple-quantum magic angle nuclear magnetic resonance (MQ–MAS NMR)*. Journal of Non-Crystalline Solids 2008, *354* (2–9), 333.

[206] Tilocca, A.; de Leeuw, N. H., *Ab initio molecular dynamics study of 45S5 bioactive silicate glass*. Journal of Physical Chemistry B 2006, *110* (51), 25810.

[207] Tilocca, A.; Cormack, A. N.; de Leeuw, N. H., *The structure of bioactive silicate glasses: New insight from molecular dynamics simulations*. Chemistry of Materials 2007, *19* (1), 95.

[208] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S., *et al., Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W*. J Biomed Mater Res 1990, *24* (6), 721.

[209] Kokubo, T.; Ito, S.; Huang, Z. T., *et al., Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W*. Journal of Biomedical Materials Research 1990, *24* (3), 331.

[210] Sepulveda, P.; Jones, J. R.; Hench, L. L., *In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses*. Journal of Biomedical Materials Research 2002, *61* (2), 301.

[211] Peitl O, Z. E., Hench LL, *Highly bioactive P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2 glass-ceramics*. Journal of Non-Crystalline Solids 2001, *292*, 115.

[212] Lebecq, I.; Desanglois, F.; Leriche, A., *et al., Compositional dependence on the in vitro bioactivity of invert or conventional bioglasses in the Si-Ca-Na-P system*. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2007, *83A* (1), 156.

[213] Aina, V.; Bertinetti, L.; Cerrato, G., *et al., On the dissolution/reaction of small-grain Bioglass® 45S5 and F-modified bioactive glasses in artificial saliva (AS)*. Applied Surface Science 2011, *257* (9), 4185.

[214] Pijarn, N.; Jaroenworaluck, A.; Sunsaneeyametha, W., *et al.*, *Synthesis and characterization of nanosized-silica gels formed under controlled conditions*. Powder Technology 2010, *203* (3), 462.

[215] Cerruti, M.; Greenspan, D.; Powers, K., *Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5*. Biomaterials 2005, *26* (14), 1665.

[216] Bellucci, D.; Bolelli, G.; Cannillo, V., *et al.*, *In situ Raman spectroscopy investigation of bioactive glass reactivity: Simulated body fluid solution vs TRIS-buffered solution*. Materials Characterization 2011, *62* (10), 1021.

[217] Skipper, L. J.; Sowrey, F. E.; Pickup, D. M., *et al.*, *The structure of a bioactive calcia-silica sol-gel glass*. Journal of Materials Chemistry 2005, *15* (24), 2369.

[218] Li, P.; Ohtsuki, C.; Kokubo, T., *et al.*, *Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 1993, *4* (2), 127.

[219] Jones, J. R., *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids*. Acta Biomaterialia 2013, *9* (1), 4457.

[220] Ogino, M.; Ohuchi, F.; Hench, L. L., *Compositional dependence of the formation calcium-phosphate films on bioglass* Journal of Biomedical Materials Research 1980, *14* (1), 55.

[221] Angelopoulou, A.; Montouillout, V.; Massiot, D., *et al.*, *Study of alkaline metal ions and glass-formers in glasses with advanced NMR methods and quantum mechanic calculations*. Journal of Non-Crystalline Solids 2010, *356* (4-5), 187.

[222] Mercier, C., Follet-Houttemane, C., Pardini, A., Revel, B., *Influence of P_2O_5 content on the structure of SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5 bioglasses by 29Si and 31P MAS-NMR*. Journal of Non-Crystalline Solids 2011.

[223] Dupree, R. H., D.; Mortuza, M. G., *The role of small amounts of P_2O_5 in the structure of alkali disilicate glasses*. Physics and Chemistry of glasses 1988, *188*, 207.

[224] Lockyer, M. W. G.; Holland, D.; Dupree, R., *NMR investigation of the structure of some bioactive and related glasses* Journal of Non-Crystalline Solids 1995, *188* (3), 207.

[225] Grussaute, H.; Montagne, L.; Palavit, G., *et al.*, *Phosphate speciation in Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2 and Na_2O-TiO_2-P_2O_5-SiO_2 glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids 2000, *263* (1-4), 312.

[226] Nelson, C.; Tallant, D. R., *Raman studies of sodium-silicate glasses with low phosphate contents*. Physics and Chemistry of glasses 1984, *25* (2), 31.

[227] Lockyer, M. W. G.; Holland, D.; Dupree, R., *The structure of $(5X)P_2O_5.(1-X)K_2O.4(1-X)SiO_2$ glasses*. Physics and Chemistry of glasses 1995, *36* (1), 22.

[228] Tilocca, A.; Cormack, A. N., *Structural effects of phosphorus inclusion in bioactive silicate glasses*. Journal of Physical Chemistry B 2007, *111* (51), 14256.

[229] Leonova, E.; Izquierdo-Barba, I.; Arcos, D., *et al.*, *Multinuclear solid-state NMR studies of ordered mesoporous bioactive glasses*. Journal of Physical Chemistry C 2008, *112* (14), 5552.

[230] Neo, M.; Kotani, S.; Nakamura, T., *et al.*, *A comparative-study of ultrastructures of the interfaces between 4 kinds of surface-reactive ceramics and bone*. Journal of Biomedical Materials Research 1992, *26* (11), 1419.

[231] Labarthe, J. C.; Bonel, G.; Montel, G., *Structure and properties of B-type phosphocalcium carbonated apatites*. Annales De Chimie France 1973, *8* (5), 289.

[232] Filgueiras, M. R.; Latorre, G.; Hench, L. L., *Solution effects on the surface-reactions of a bioactive glass*. Journal of Biomedical Materials Research 1993, *27* (4), 445.

[233] Filgueiras, M. R. T.; Latorre, G.; Hench, L. L., *Solution effects on the surface-reactions of 3 bioactive glass compositions*. Journal of Biomedical Materials Research 1993, *27* (12), 1485.

[234] Takadama, H. H., M.; Mizuno, M.; Kokubo, T., *Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials*. Phosphorus Research Bulletin 2004, *17*, 119.

[235] Oyane, A.; Kim, H. M.; Furuya, T., *et al.*, *Preparation and assessment of revised simulated body fluids*. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2003, *65A* (2), 188.

[236] Kokubo, T. T., H., *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity ?* Biomaterials 2006, *27*, 2907.

[237] Gamble, J. L., *Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid; a lecture syllabus*. Harvard Univ. Press: Cambridge, Mass., 1954.

[238] Ohtsuki, C.; Aoki, Y.; Kokubo, T., *et al.*, *Transmission electron-microscopic observation of glass-ceramic a-W and apatite layer formed on its surface in a simulated body-fluid*. Journal of the Ceramic Society of Japan 1995, *103* (5), 449.

[239] Kokubo, T., *Bioactive glass ceramics: properties and applications*. Biomaterials 1991, *12* (2), 155.

[240] Bohner, M.; Lemaitre, J., *Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?* Biomaterials 2009, *30* (12), 2175.

[241] Hench, L. L. X., I.D.; Edgar, A. J.; Buttery, L. D. K.; Polak, J. M.; Zhong, J. P.; Liu, X. Y., *Gene activating glasses*. Journal of Inorganic Materials 2002, *17*, 897.

[242] Xynos, I. D.; Edgar, A. J.; Buttery, L. D. K., *et al.*, *Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass (R) 45S5 dissolution*. Journal of Biomedical Materials Research 2001, *55* (2), 151.

[243] Xynos, I. D.; Hukkanen, M. V. J.; Batten, J. J., *et al.*, *Bioglass® 45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering*. Calcified Tissue International 2000, *67* (4), 321.

[244] Hench, L. L., *Genetic design of bioactive glass*. Journal of the European Ceramic Society 2009, *29* (7), 1257.

[245] Bielby, R. C.; Christodoulou, I. S.; Pryce, R. S., *et al.*, *Time- and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts*. Tissue Eng 2004, *10* (7-8), 1018.

[246] Xynos, I. D.; Edgar, A. J.; Buttery, L. D. K., *et al.*, *Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2000, *276* (2), 461.

[247] Sun, J. Y.; Yang, Y. S.; Zhong, J., *et al.*, *The effect of the ionic products of Bioglass dissolution on human osteoblasts growth cycle in vitro*. J Tissue Eng Regen Med 2007, *1* (4), 281.

[248] Jell, G.; Notingher, I.; Tsigkou, O., *et al.*, *Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study*. J Biomed Mater Res A 2008, *86* (1), 31.

[249] Jell, G.; Stevens, M., *Gene activation by bioactive glasses*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2006, *17* (11), 997.

[250] Wilson, J.; Pigott, G. H.; Schoen, F. J., *et al.*, *Toxicology and biocompatibility of bioglasses*. J Biomed Mater Res 1981, *15* (6), 805.

[251] Betts, F.; Posner, A. S., *X-ray radial Al-distribution study of amorphous calcium-phosphate*. Materials Research Bulletin 1974, *9* (3), 353.

[252] Martin, R. A.; Twyman, H.; Qiu, D., *et al.*, *A study of the formation of amorphous calcium phosphate and hydroxyapatite on melt quenched Bioglass(A (R)) using surface sensitive shallow angle X-ray diffraction*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2009, *20* (4), 883.

[253] Betts, F.; Blumenthal, N. C.; Posner, A. S., *Bone mineralization*. Journal of Crystal Growth 1981, *53* (1), 63.

[254] Newport, R. J.; Skipper, L. J.; Carta, D., *et al.*, *The use of advanced diffraction methods in the study of the structure of a bioactive calcia: silica sol-gel glass*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2006, *17* (11), 1003.

[255] Boskey, A. L.; Posner, A. S., *Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite - pH - dependent, solution-mediated, solid-solid conversion*. Journal of Physical Chemistry 1973, *77* (19), 2313.

[256] FitzGerald, V.; Pickup, D. M.; Greenspan, D., *et al.*, *An atomic scale comparison of the reaction of Bioglass(R) in two types of simulated body fluid*. Physics and Chemistry of Glasses-European Journal of Glass Science and Technology Part B 2009, *50* (3), 137.

[257] Rehman, I.; Knowles, J. C.; Bonfield, W., *Analysis of in vitro reaction layers formed on Bioglass (R) using thin-film X-ray diffraction and ATR-FTIR microspectroscopy*. Journal of Biomedical Materials Research 1998, *41* (1), 162.

[258] FitzGerald, V.; Martin, R. A.; Jones, J. R., *et al.*, *Bioactive glass sol-gel foam scaffolds: Evolution of nanoporosity during processing and in situ monitoring of apatite layer formation using small- and wide-angle X-ray scattering*. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2009, *91A* (1), 76.

[259] Mathew, R.; Gunawidjaja, P. N.; Izquierdo-Barba, I., *et al.*, *Solid-State 31P and 1H NMR Investigations of Amorphous and Crystalline Calcium Phosphates Grown Biomimetically From a Mesoporous Bioactive Glass*. The Journal of Physical Chemistry C 2011, *115* (42), 20572.

[260] Gunawidjaja, P. N.; Izquierdo-Barba, I.; Mathew, R., *et al.*, *Quantifying apatite formation and cation leaching from mesoporous bioactive glasses in vitro: a SEM, solid-state NMR and powder XRD study*. Journal of Materials Chemistry 2012, *22* (15), 7214.

[261] Radin, S.; Ducheyne, P.; Falaize, S., *et al.*, *In vitro transformation of bioactive glass granules into Ca-P shells*. Journal of Biomedical Materials Research 2000, *49* (2), 264.

[262] Mason, H. E.; Kozlowski, A.; Phillips, B. L., *Solid-state NMR study of the role of H and Na in AB-type carbonate hydroxylapatite*. Chemistry of Materials 2008, *20* (1), 294.

[263] Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T., *et al.*, *The carbonate environment in bone-mineral - A resolution-enhanced Fourier Transform InfraRed Spectroscopy study*. Calcified Tissue International 1989, *45* (3), 157.

[264] Bel Hadj Yahia, F.; Jemal, M., *Synthesis, structural analysis and thermochemistry of B-type carbonate apatites*. Thermochimica Acta 2010, *505* (1–2), 22.

[265] Gunawidjaja, P. N.; Lo, A. Y. H.; Izquierdo-Barba, I., *et al., Biomimetic Apatite Mineralization Mechanisms of Mesoporous Bioactive Glasses as Probed by Multinuclear P-31, Si-29, Na-23 and C-13 Solid-State NMR*. Journal of Physical Chemistry C 2010, *114* (45), 19345.

[266] Lin, K. S. K.; Tseng, Y. H.; Mou, Y., *et al., Mechanistic study of apatite formation on bioactive glass surface using P-31 solid-state NMR Spectroscopy*. Chemistry of Materials 2005, *17* (17), 4493.

[267] Dietrich, E.; Oudadesse, H.; Le Floch, M., *et al., In vitro Chemical Reactivity of Doped Bioactive Glasses: an Original Approach by Solid-State NMR Spectroscopy*. Advanced Engineering Materials 2009, *11* (8), B98.

[268] Hiet, J., *Motifs structuraux dans des verres modèles pour le stockage des actinides*. Thèse de Doctorat, Université d'Orléans, France 2009.

[269] Mudrakovskii, I. L.; Shmachkova, V. P.; Kotsarenko, N. S., *et al., 31P nmr study of I-IV group polycrystalline phosphates*. Journal of Physics and Chemistry of Solids 1986, *47* (4), 335.

[270] Gullion, T.; Schaefer, J., *Rotational-Echo Double-Resonance* Journal of Magnetic Resonance 1989, *81* (1), 196.

[271] Plotnichenko, V. G.; Sokolov, V. O.; Koltashev, V. V., *et al., On the structure of phosphosilicate glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids 2002, *306* (3), 209.

[272] Xue, X.; Stebbins, J. F., *23Na NMR chemical shifts and local Na coordination environments in silicate crystals, melts and glasses*. Phys Chem Minerals 1993, *20* (5), 297.

[273] Jäger, C.; Welzel, T.; Meyer-Zaika, W., *et al., A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite*. Magnetic Resonance in Chemistry 2006, *44* (6), 573.

[274] Peroos, S.; Du, Z. M.; de Leeuw, N. H., *A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite*. Biomaterials 2006, *27* (9), 2150.

[275] La Torre, G. H., L.L., *Characterization Methods for the Solid-Solution interface in Ceramics System*. American Ceramic Society Eds: Adair and Casey, Westerville, OH 1993.

[276] Kim, S.; Ryu, H. S.; Shin, H., *et al., In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions*. Materials Chemistry and Physics 2005, *91* (2-3), 500.

[277] Kokubo, T.; Kim, H. M.; Kawashita, M., *Novel bioactive materials with different mechanical properties*. Biomaterials 2003, *24* (13), 2161.

[278] Kolmas, J.; Jaklewicz, A.; Zima, A., *et al., Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite: The effect on physicochemical properties*. Journal of Molecular Structure 2011, *987* (1-3), 40.

[279] Laurencin, D.; Almora-Barrios, N.; de Leeuw, N. H., *et al., Magnesium incorporation into hydroxyapatite*. Biomaterials 2011, *32* (7), 1826.

[280] Pines, A.; Gibby, M. G.; Waugh, J. S., *Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids*. Journal of Chemical Physics 1973, *59* (2), 569.

[281] Maciel, G. E.; Sindorf, D. W., *Si-29 nuclear magnetic resonance study of the surface of silica-gel by cross polarization and magic angle spinning*. J. Am. Chem. Soc. 1980, *102* (25), 7606.

[282] Sindorf, D. W.; Maciel, G. E., *Si-29 NMR study of dehydrated rehydrated silica-gel using cross polarization and magic angle spinning*. J. Am. Chem. Soc. 1983, *105* (6), 1487.

[283] MacKenzie, K. J. D.; Smith, M. E., *Multinuclear Solid-State Nuclear Magnetic Resonance of Inorganic Materials*. Pergamon Materials Series: Cambridge, 2002; Vol. 6.

[284] Aue, W. P.; Roufosse, A. H.; Glimcher, M. J., *et al., Solid-state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of synthetic solid phases of calcium phosphate: potential models of bone mineral*. Biochemistry 1984, *23* (25), 6110.

[285] Yesinowski, J. P.; Eckert, H., *Hydrogen environments in calcium phosphates - H-1 MAS NMR high spinning speeds*. Journal of the American Chemical Society 1987, *109* (21), 6274.

[286] Pourpoint, F.; Gervais, C.; Bonhomme-Coury, L., *et al., Calcium Phosphates and Hydroxyapatite: Solid-State NMR Experiments and First-Principles Calculations*. Applied Magnetic Resonance 2007, *32* (4), 435.

[287] Kaflak, A.; Chmielewski, D.; Gorecki, A., *et al., Efficiency of H-1 -> P-31 NMR cross-polarization in bone apatite and its mineral standards*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 2006, *29* (4), 345.

[288] Cazalbou, S.; Combes, C.; Eichert, D., *et al., Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo*. Journal of Bone and Mineral Metabolism 2004, *22* (4), 310.

[289] Beshah, K.; Rey, C.; Glimcher, M. J., *et al., Solid-state C-13 and proton NMR-studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel*. Journal of Solid State Chemistry 1990, *84* (1), 71.

ANNEXES

ANNEXE 1 :
RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

Principe

Au milieu du XX^{ème} siècle, F. Bloch et E.M. Purcell effectuent, indépendamment l'un de l'autre, les premiers essais de magnétisme nucléaire par induction magnétique [1] , méthode qui donna naissance aux techniques de détection de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) connues à ce jour. La RMN connait à partir de ce moment-là un essor important dans le domaine de la caractérisation structurale, majoritairement dans le domaine de la chimie organique en phase liquide [2].

Au contraire des spectres RMN des molécules en solutions, présentant des raies très fines, la RMN des phases solides donne des spectres très larges, plus difficiles à exploiter. Beaucoup de développements ont néanmoins été faits en termes de technologies et de méthodologies pour maîtriser ces problèmes et accéder à des informations structurales précises sur ces matériaux.

La RMN haute résolution du solide permet de caractériser de nombreux types de matériaux solides (inorganiques, hybrides, organiques, …) cristallins ou désordonnés. Cette technique donne des informations sur l'environnement chimique local du noyau étudié : nature des voisins, coordinence des sites, géométrie, relations spatiales inter- et intramoléculaires, … Cette technique ne remplace pas les méthodes traditionnelles de caractérisation des solides, que sont les spectroscopies FTIR et Raman ou la DRX, mais elle vient les compléter dans l'étude fine des matériaux.

Principe d'une expérience

Les noyaux qui peuvent être étudiés en RMN ont un spin nucléaire I non nul et possèdent un moment magnétique. Mis dans un champ magnétique $\mathbf{B_0}$, les spins des noyaux effectuent une précession autour du champ magnétique à la fréquence de Larmor (définie par le rapport gyromagnétique propre au noyau) et s'orientent en moyenne de façon parallèle ou antiparallèle à ce champ. Il en résulte une aimantation nucléaire macroscopique $\mathbf{M_0}$ orientée selon l'axe z. L'expérience RMN (cf *Figure 80*) consiste à appliquer un champ radiofréquence $\mathbf{B_1}$ à la fréquence de Larmor pendant un temps court P_1 (impulsion) pour faire basculer cette aimantation d'un angle θ_1. Dans un référentiel tournant à la fréquence de Larmor, ce mouvement correspond à une précession autour d'un champ $\mathbf{B_1}$ statique situé dans le plan (x,y). Ceci provoque une variation des populations des différents niveaux d'énergie d'état de spin. L'aimantation revient ensuite à l'état initial en effectuant un mouvement de précession à la fréquence de Larmor du noyau autour de $\mathbf{B_0}$. Ce signal est détecté par la bobine ayant servi à appliquer le champ radiofréquence. Il est appelé signal de précession

libre (FID, *Free Induction Decay*). Après application de la transformée de Fourier de ce signal temporel, on obtient un spectre composé d'une ou plusieurs raies de résonance.

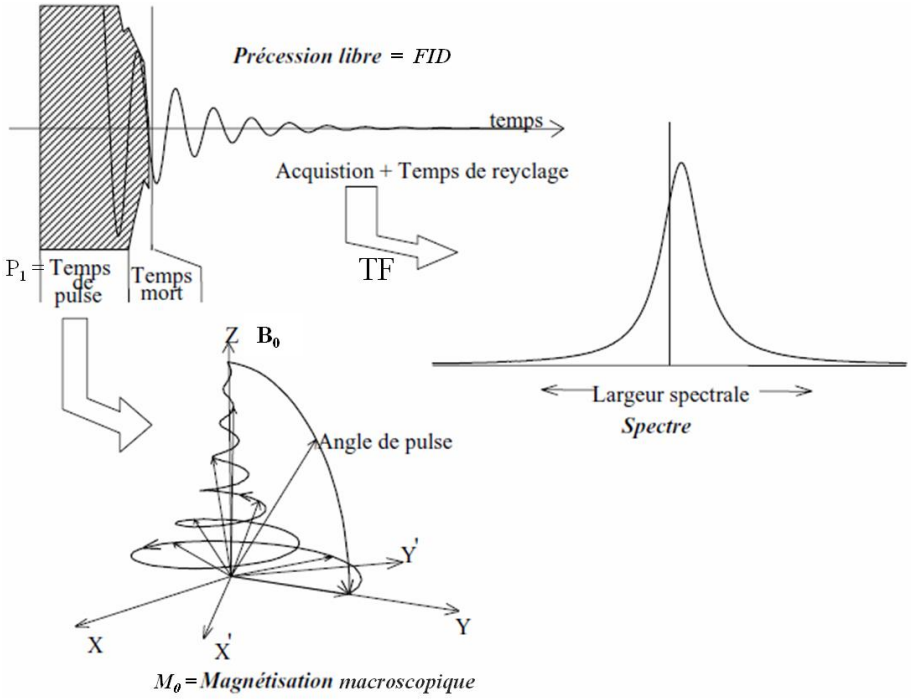


Figure 80 : *Principe d'une expérience RMN impulsionelle* [3]

Deux facteurs jouent sur l'intensité du signal détecté. Il y a d'une part, les caractéristiques du noyau lui-même : rapport gyromagnétique, abondance naturelle, … Les différences de population des différents niveaux d'énergie, et donc l'intensité du signal, dépendent de la fréquence de Larmor qui est directement liée au rapport gyromagnétique du noyau. L'abondance naturelle des isotopes actifs en RMN est très variable (99,9 % pour ^{1}H ; 100 % pour ^{31}P ; 4,7 % pour ^{29}Si ; 0,14 % pour ^{43}Ca) et pour certains noyaux, elle est tellement faible qu'il est parfois nécessaire d'enrichir les échantillons (comme c'est le cas par exemple pour le silicium-29 dans la *Partie 3 Etude du bioverre de référence : le Bioglass® 45S5* de ce mémoire de thèse).
Il y a d'autre part, les conditions expérimentales utilisées. La réceptivité du signal augmente avec le champ magnétique appliqué (augmentation de la fréquence de Larmor et des différences de population). La détection du signal est également améliorée en utilisant les techniques de haute résolution comme la rotation à l'angle magique (MAS) [4-5]. Celle-ci permet d'éliminer en grande partie les élargissements de raie et d'observer des pics fins. Les techniques de haute résolution peuvent être également combinées avec les méthodes de transfert d'aimantation comme la polarisation croisée (CPMAS, voir plus loin) [6-7]. Celle-ci permet d'amplifier le signal de noyaux peu abondants situés à proximité de noyaux de forte sensibilité.

Principales interactions en RMN du solide

Le phénomène de résonance dépend des interactions qui existent entre les noyaux et l'environnement. En RMN du solide, il y a quatre « interactions anisotropes » qui sont toutes considérées comme des perturbations de l'effet Zeeman. [8-9]. Ces interactions donnent des informations sur l'environnement local, l'arrangement et les proximités atomiques. Ces interactions se manifestent sur les spectres par des variations de la fréquence, de la forme et de l'élargissement des raies.

L'interaction de déplacement chimique

Dans la matière condensée, les noyaux sont entourés par des électrons qui interagissent avec le moment magnétique de spin. Ces interactions sont caractéristiques de l'environnement chimique local et leur découverte dans les années 1950 a révolutionné l'usage de la RMN en chimie [10]. Ces électrons agissent comme écran entre le noyau et le champ $\mathbf{B_0}$ appliqué. Le noyau est donc soumis à un champ différent de $\mathbf{B_0}$ noté $\mathbf{B} = \mathbf{B_0}(1-\sigma)$ où σ est la constante d'écran. Cette constante σ est l'expression directe d'une composante diamagnétique (contribution dominée par les électrons de cœur) et paramagnétique (contributions des électrons des couches p et des liaisons [11]). Par conséquent, l'interaction de déplacement chimique reflète directement l'environnement chimique local du noyau étudié.

Cette interaction entraîne une modification de la fréquence de Larmor qui devient :

$$\nu = \gamma.\mathbf{B_0}.(1-\sigma)/2\pi \qquad (23)$$

Etant donné que cette interaction dépend du champ statique $\mathbf{B_0}$ de l'aimant, le déplacement chimique s'exprime en partie par million (ppm) sous la notation δ par rapport à une fréquence de référence dont la valeur est enregistrée avant chaque expérience.

$$\delta_{iso} = (\nu-\nu_{réf}).10^6 / \nu \qquad (24)$$

Le déplacement chimique est communément décrit par sa valeur isotrope δ_{iso}. Cette dernière renseigne sur la nature des premiers voisins, la coordinence ou les longueurs des liaisons, alors que la composante anisotrope donne des informations sur la géométrie de l'environnement.

L'interaction quadripolaire

L'interaction quadripolaire concerne exclusivement les noyaux dont le spin I >1/2. C'est le cas du ^{71}Ga et du ^{23}Na étudiés dans nos travaux. Cette interaction provoque un décalage dans les 2I+1 niveaux d'énergie de Zeeman et modifie les fréquences de résonance. Elle est anisotrope et entraîne un élargissement des raies de résonance associées aux différentes transitions.

L'interaction de 1er ordre quadripolaire affecte les transitions satellites ($m \leftrightarrow m\pm1$) alors que la transition centrale ($< -1/2 \leftrightarrow +1/2 >$) n'est pas modifiée comme le montre la *Figure 81*.

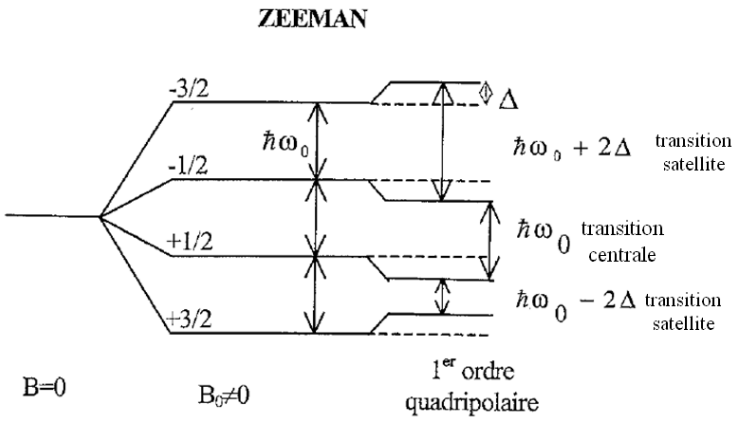


Figure 81 : *Niveaux d'énergie d'un noyau de spin 3/2 soumis à l'interaction Zeeman et à l'interaction quadripolaire de 1er ordre [12]*

Le spectre d'un noyau spin I demi-entier (comme le gallium), affecté par l'interaction quadripolaire de 1er ordre, sera donc constitué d'une raie fine centrée sur la fréquence de Larmor du noyau (transition centrale) et de raies larges caractéristiques de l'anisotropie de l'interaction quadripolaire (transitions satellites) (cf *Figure 82 a*). Les élargissements dépendent de la valeur du spin et du moment quadripolaire du noyau étudié, ainsi que du gradient du champ électrique perçu par le noyau. Lorsque le gradient de champ électrique devient fort, il faut continuer les calculs de perturbations jusqu'au 2nd ordre.
L'interaction quadripolaire de 2nd ordre affecte toutes les transitions, centrale et satellites. Le spectre (cf *Figure 82 b*) n'est plus centré sur le déplacement chimique isotrope mais il est décalé et la raie de résonance associée à la transition centrale subit un déplacement et une modification de forme.

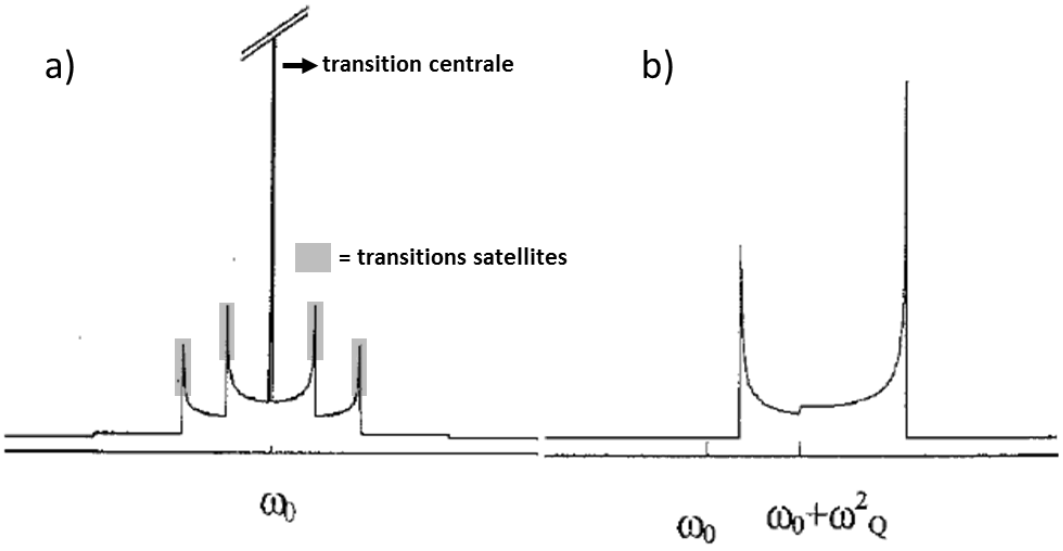


Figure 82 : *Spectre théorique de poudre pour un noyau de spin 5/2 soumis à l'interaction quadripolaire a) de 1er ordre b) de 2nd ordre [12]*

L'interaction dipolaire (directe)

L'interaction dipolaire directe se produit entre deux atomes qui sont proches spatialement et qui ont des spins non nuls équivalents ou non. Cette interaction dépend donc de la distance entre atomes et permet d'obtenir des informations sur les distances entre les différentes espèces chimiques présentes. Un grand nombre de séquence RMN de corrélation homonucléaire [13] ou hétéronucléaire (HETCOR) [14-15] utilisent cette interaction.

L'interaction de couplage J

Le couplage J ou couplage dipolaire indirect est une interaction entre spins nucléaires via les électrons impliqués dans les liaisons chimiques Ce couplage est généralement plus faible que les autres interactions rencontrées en RMN du solide. De ce fait, il est difficilement observable sur les spectres car il est souvent masqué par les contributions des autres interactions.

La RMN haute-résolution en phase solide

En conditions statiques (échantillon immobile), les parties anisotropes des différentes interactions provoquent l'élargissement des spectres de poudre des matériaux solides (cf *Figure 83*). De ce fait, il est difficile d'obtenir des informations structurales précises sur les spectres de poudre. Afin de supprimer ces élargissements de raies et d'améliorer la résolution spectrale, on utilise communément la technique de rotation à l'angle magique (MAS) [4-5].

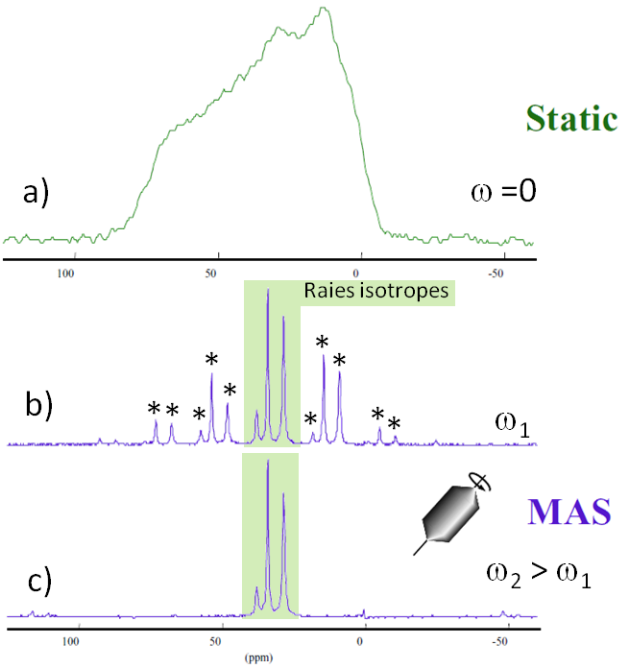


Figure 83 : *Spectres de poudre d'un noyau ^{31}P (I=1/2) : Spectres a) statique b) en rotation à l'angle magique à une fréquence ω_1 c) et en rotation à l'angle magique à une fréquence $\omega_2 > \omega_1$ (* = bandes de rotation)* [3]

La rotation à l'angle magique (MAS)

L'échantillon est incliné par rapport au champ magnétique principal $\mathbf{B_0}$ d'un angle $\theta = 54{,}74°$ et mis en rotation à une fréquence ω_r (cf *Figure 84*).

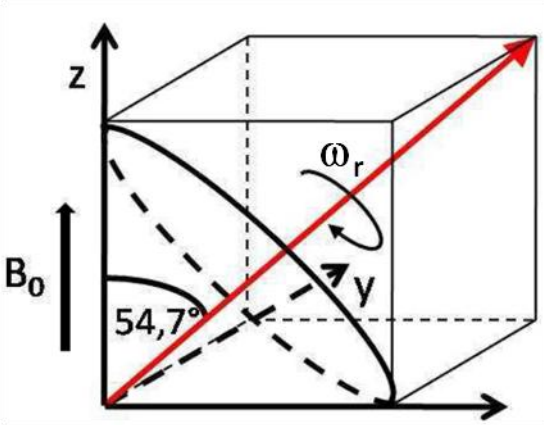


Figure 84 : *Rotation de l'échantillon à l'angle magique* [3]

La vitesse de rotation va de quelques kHz à des dizaines de kHz. Si elle est suffisamment élevée, elle va permettre de moyenner les interactions anisotropes de 1er ordre. Le spectre obtenu sera composé de raies plus fines que le spectre statique. Néanmoins, si cette vitesse est trop faible par rapport à la portée de l'interaction, il va y avoir apparition de nouvelles raies, appelées « bandes de rotation », espacées de la fréquence de rotation (ν_r) de part et d'autre des raies principales (cf *Figure 83 b*). L'amplitude, le nombre et la position des ces bandes de rotation dépendent directement de la portée de l'interaction et de la vitesse de rotation de l'échantillon.

Pour les noyaux quadripolaires, les composantes des interactions du 2nd ordre ne sont pas totalement éliminées par la rotation à l'angle magique. Néanmoins, cette technique réduit les élargissements de raies dus aux interactions de 2nd ordre et permet d'améliorer dans la plupart des cas la résolution des spectres des noyaux quadripolaires.

CPMAS : Cross-polarization Magic Angle Spinning

L'expérience de « *Cross-Polarization Magic Angle Spinning* » consiste à transférer l'aimantation d'un noyau très abondant, souvent le proton ^{1}H, vers un noyau moins abondant, par exemple le ^{29}Si ou le ^{13}C, en utilisant les couplages dipolaires résiduels en MAS [7, 16-17] (cf *Figure 85*). Ceci permet d'amplifier le signal du noyau peu abondant et de rendre compte des proximités spatiales qui existent entre les deux noyaux dans l'échantillon étudié. Les spectres CPMAS ne sont pas directement quantitatifs car l'efficacité du transfert de polarisation dépend des couplages dipolaires résiduels et du temps de relaxation (sous champ radiofréquence) du noyau abondant.

Cette technique est utilisée dans la *Partie 2 : Les verres de métaphosphates de calcium dopés avec du gallium (II.C.3.b)* et dans la *Partie 3 : Etude du bioverre de référence : le Bioglass® 45S5 (III.B.5).*

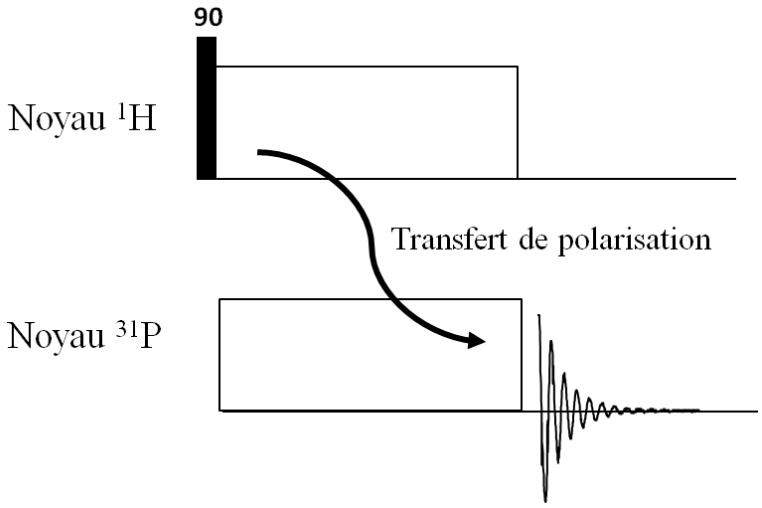


Figure 85 : *Schéma de l'expérience RMN CPMAS*

HETCOR : HETerogen CORrelation

L'expérience « *HETeronuclear CORrelation* » [14] utilise les couplages dipolaires résiduels en MAS [7, 16-17]. Elle découle directement de l'expérience CPMAS, vue dans le paragraphe précédent, et comporte simplement un temps de latence t_1 entre l'impulsion 90° et le début du transfert de polarisation du noyau abondant vers le noyau peu abondant (^{13}C, ^{31}P, ^{29}Si, …). L'expérience consiste à enregistrer des spectres CPMAS en fonction de ce temps de latence qui est incrémenté progressivement. Le signal du noyau peu abondant est donc modulé par l'évolution temporelle du signal du noyau abondant pendant le temps t_1. Après application de la transformée de Fourier, on obtient une carte 2D qui contient le spectre du noyau rare dans une dimension et le spectre du noyau abondant dans l'autre dimension. La carte 2D contient des pics de corrélations entre ces deux spectres qui traduisent les proximités spatiales entre les sites protons et les sites du noyau étudié. Comme pour le CPMAS, cette expérience n'est pas quantitative. Cette technique est utilisée dans la *Partie 3 : Etude du bioverre de référence : le Bioglass® 45S5 (III.B.5).*

REDOR : Rotational Echo Double Resonance

L'expérience « *Rotational Echo Double Resonance* » a été mise en place par Gullion et Schaefer en 1988 [18]. Cette technique permet une mesure quantitative de la constante de couplage dipolaire D_{IS} entre deux noyaux différents (I et S) en RMN haute résolution solide sous rotation à l'angle magique.

La séquence d'impulsion appliquée sur le noyau I étudié correspond à une expérience d'écho de spin synchronisée avec la fréquence de rotation (cf *Figure 86*). Simultanément, le noyau S est soumis à des impulsions de 180° synchronisées avec la demi-période de rotation de l'échantillon. Ce train d'impulsion permet de réintroduire le couplage dipolaire hétéronucléaire I-S.

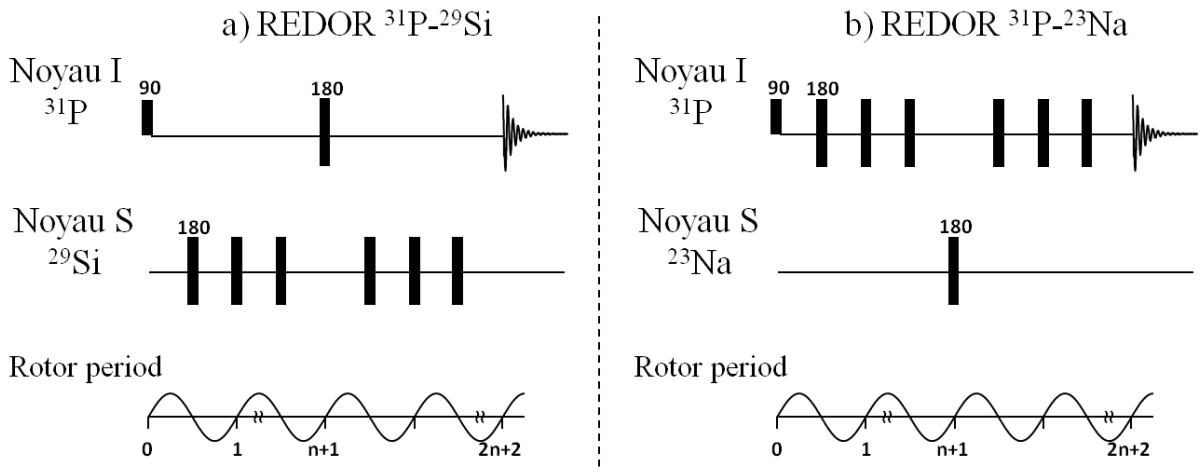


Figure 86 : *Schéma de l'expérience REDOR utilisant un train d'impulsions de 180° synchronisé avec la demi-période de rotation de l'échantillon - Séquences d'impulsions utilisées pour les expériences REDOR a) ^{31}P-^{29}Si et b) ^{31}P-^{23}Na.*

Les interactions homonucléaires I-I et S-S peuvent être négligées parce qu'elles sont moyennées par la rotation. Du fait de la présence d'interactions dipolaires, une partie de l'aimantation n'est pas refocalisée et on observe une diminution de l'intensité du signal d'écho de spin. La variation de l'intensité du signal en fonction de la durée d'application du train d'impulsion de recouplage (et donc du temps d'écho) permet de déterminer la constante de couplage dipolaire. Afin de s'affranchir des effets de relaxation, le signal obtenu avec recouplage dipolaire (S) est comparé au signal obtenu sans recouplage dipolaire (S_0) via la relation :

$$\Delta S/S_0 = (S_0\text{-}S)/S_0 \qquad (25)$$

Il est également possible de réaliser cette expérience en appliquant le train d'impulsions synchronisées avec la demi-période de rotation sur le noyau I. Dans ce cas, le train d'impulsions donne lieu à la formation d'un écho et il suffit d'une seule impulsion de 180° sur le noyau S, au milieu du train d'impulsions sur I, pour réintroduire le couplage dipolaire hétéronucléaire I-S. Nous avons employé cette variante de la séquence REDOR dans le cas où I est un noyau quadripolaire pour lequel on utilise des impulsions de 180° sélective de la transition centrale et de durée assez longue.

L'application de cette technique à des études structurales de systèmes amorphes pose de nombreux problèmes. D'une part, les courbes REDOR dépendent fortement de la géométrie locale qui est *a priori* inconnue dans un réseau désordonné. D'autre part, dans le cas de systèmes de spins abondants, il est nécessaire de tenir compte des interactions multi-spin, et les formules analytiques développées dans le cas d'une paire de spin ne sont plus valides.
Dans ces conditions, il est préférable de limiter l'analyse des données REDOR à la courbure initiale pour laquelle la valeur de $\Delta S/S_0$ est telle que $\Delta S/S_0 \leq 0{,}3$. Dans cette limite, où les temps d'évolution dipolaire sont courts, la courbe REDOR est indépendante de la géométrie du réseau et les interactions multi-spin peuvent être prises en compte globalement par le

second moment dipolaire M_2. Selon la valeur des spins des noyaux étudiés, la variation de $\Delta S/S_0$ aux temps courts est approximée par différentes équations.

Pour deux noyaux de spin I= 1/2 et S = 1/2, ou bien de spin I = 1/2 et S > 1/2, la relation s'écrit :

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{4}{3\pi^2} (NTr)^2 M_2 \quad (26)$$

Où Tr correspond à la période de rotation, N est le nombre de période et M_2 est le second moment dipolaire hétéronucléaire qui s'écrit :

$$M_2^{I\text{-}S} = \frac{4}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 .\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 S(S+1).\frac{1}{N_I} \sum_S \left(\frac{1}{r_{IS}}\right)^6 \quad (27)$$

Où γ_I et γ_S sont les rapports gyromagnétiques (grandeur intrinsèque au noyau) du noyau I et S, r_{IS} la distance entre les deux noyaux, h la constante de Planck et μ_0 la permittivité diélectrique du vide et N_I le nombre de noyaux I.

Dans le cas d'une paire de spin, la valeur de la constante de l'interaction dipolaire D_{IS} est directement liée au second moment M_2 ,et il est possible d'écrire la relation suivante [19] :

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{4}{3\pi^2} (NTr)^2 M_2 = \frac{16}{15} (NTr)^2 D_{IS}^2 \quad (28)$$

Où D_{IS} est la constante d'interaction dipolaire entre les noyaux I et S
La constante de couplage dipolaire D_{IS} est directement reliée à la distance internucléaire r_{IS} selon la relation :

$$D_{IS} = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r_{IS}^3} \frac{\mu_0}{4\pi} \quad (29)$$

On a donc accès, par la relation (7), à la valeur de la distance internucléaire qui existe entre les deux noyaux étudiés, ce qui donne des informations sur l'arrangement structural du matériau.

Dans le cas de deux noyaux de spin I > 1/2 et S = 1/2 ou bien de spin I > 1/2 et S > 1/2, il faut considérer l'ensemble des états d'énergie possibles (effet Zeeman) du noyau I pour lesquels les champs dipolaires sont de différentes intensités Dans cette situation, la variation de $\Delta S/S_0$ peut s'écrire :

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{1}{15\pi^2} (2+18f) (NTr)^2 M_2 \quad (30)$$

Où f est un facteur, tel que 0 < f < 1, qui permet de prendre en compte l'impact de l'extension du couplage dipolaire entre les deux noyaux dans leurs états d'énergie sur la courbe REDOR

De plus, par approximation [19], il est possible d'écrire, comme dans la relation (6) :

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{1}{15\pi^2}(2+18f)\,(NTr)^2 M_2 = \frac{16}{15}\,(NTr)^2 D_{IS}^2 \qquad (31)$$

Où D_{IS} est la constante d'interaction dipolaire entre les noyaux I et S

Dans le cas d'une paire de spin, la valeur de la constante de l'interaction dipolaire D_{IS} peut être déterminée à partir de la valeur du moment M_2. Comme nous l'avons vu précédemment, connaitre D_{IS} permet de déduire la distance internucléaire r_{Is} via la relation (7).

Cette technique est utilisée dans la *Partie 3 : Etude du bioverre de référence : le Bioglass® 45S5 (II.B.2.c.).*

Bibliographie

[1] Bloch, F.; Purcell, E. M., *Development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith*. Nobel Prize in Physics 1952 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1952/index.html 1952.

[2] Akitt, J. W., *NMR and Chemistry*. Chapman et Hall Ltd, USA, Science Paperbacks 1973.

[3] Massiot, D., *RMN Haute Résolution / Matériaux*. Enseignement Master Recherche 2009.

[4] Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G., *Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation* Nature 1959, *183* (4678), 1802.

[5] Lowe, I. J., *Free induction decays of rotating solids*. Physical Review Letters 1959, *2* (7), 285.

[6] Hartmann, S. R.; Hahn, E. L., *Nuclear Double Resonance Resonance in rotating frame*. Physical Review 1962, *128* (5), 2042.

[7] Pines, A.; Waugh, J. S.; Gibby, M. G., *Proton-enhanced nuclear induction spectroscopy - Method for High-Resolution NMR of dilute spins in solids*. Journal of Chemical Physics 1972, *56* (4), 1776.

[8] Abragam, A., *The principles of the nuclear Magnetism*. Clarendon Press Oxford 1961.

[9] Mehring, M., *High resolution NMR Spectroscopy in solids*. Springer-Verlag 1976.

[10] Callaghan, P. T., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*. Oxford Sciences publications 1993.

[11] Duer, M., *Solid-state NMR spectroscopy. Principles and applications*. Blackwell Science 2002, *Chapitre 3* (126).

[12] Grandjean, S.; Douy, A.; Fayon, F., *Etude de phases métastables dans les systèmes Al2O3-M2O (M=Na, K, Rb, Cs)*. Rapport de stage de DEA 1999.

[13] Meier, B. H.; Earl, W. L., *Excitation of multiple quantum transitions under magic angle spinning conditions: Adamantane*. Journal of Chemical Physics 1986, *85*, 4905.

[14] Fyfe, C. A.; Mueller, K. T.; Grondey, H., *et al.*, *Solid-state double-resonance NMR experiments involving quadrupolar and spin 1/2 nuclei*. The Journal of Physical Chemistry 1993, *97* (51), 13484.

[15] Fyfe, C. A.; Wong-Moon, K. C.; Huang, Y., *et al.*, *INEPT Experiments in Solid-State NMR*. Journal of the American Chemical Society 1995, *117* (41), 10397.

[16] Vega, A. J., *MAS NMR spin locking of half-integer quadrupolar nuclei*. Journal of Magnetic Resonance 1992, *96* (1), 50.

[17] Stejskal, E. O.; Schaefer, J.; Waugh, J. S., *Magic-Angle Spinning and polarization transfer in proton-enhanced*. Journal of Magnetic Resonance 1977, *28* (1), 105.

[18] Gullion, T.; Schaefer, J., *Rotational-Echo Double-Resonance* Journal of Magnetic Resonance 1989, *81* (1), 196.

[19] Bertmer, M.; Eckert, H., *Dephasing of spin echoes by multiple heteronuclear dipolar interactions in rotational echo double resonance NMR experiments*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 1999, *15* (3), 139.

ANNEXE 1-12

ANNEXE 2 :
SPECTROSCOPIE ICP-AES/OES

L'ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry / Optical Emission Spectroscopy*)) est une technique permettant de déterminer des concentrations des éléments présents dans un échantillon. Cette technique est basée sur l'usage d'une source plasma. Les plasmas présentent une température plus élevée que celle produite par les flammes ou les décharges électriques (arc/étincelle). Cette source de chaleur est donc plus efficace pour atteindre les chaleurs d'atomisation des molécules et les énergies d'ionisation et d'excitation des atomes.

Le plasma permet de casser les liaisons moléculaires, ce qui a pour résultat de produire des atomes et des ions libres et d'exciter ces particules. Cette excitation provoque des changements d'état d'énergie des atomes (passage d'un niveau supérieur à un niveau inférieur). À chaque transition électronique correspond l'émission d'une énergie sous la forme d'un rayonnement lumineux dont la fréquence est spécifique de l'élément étudié. L'intensité lumineuse mesurée étant proportionnelle à la concentration de l'élément, il est donc possible de quantifier la concentration de chaque élément : c'est la spectroscopie d'émission atomique (ICP-AES). C'est une méthode de forte sensibilité dont les seuils de détection sont de l'ordre du ppb.

Le principe de l'appareillage utilisé pour réaliser des dosages par ICP-AES est présenté sur la *Figure 87*. L'échantillon est introduit sous forme liquide dans le dispositif d'entrée (non représenté) puis il rencontre la source. Elle joue les rôles de nébulisation (projection du liquide sous la forme de fines gouttelettes), d'atomisation et d'excitation de l'échantillon, elle comprend un générateur, un nébuliseur et une torche plasma. Le rayonnement émis par l'échantillon est analysé par le dispositif dispersif (monochromateur et/ou polychromateur). Enfin, un dispositif électronique/informatique permet de gérer le spectromètre et d'exploiter les données [1].

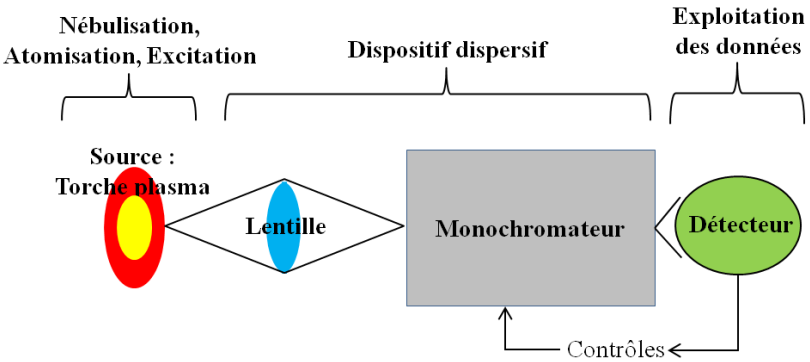


Figure 87 : *Schéma d'un appareillage d'analyse par émission : source/dispersion/détection* [1]

Bibliographie

[1] Moute, J., *Notes sur l'analyse par spectrométrie d'émission atomique à source plasma*. http://www.emse.fr/~moutte/ecole/chromato/IcpAesIntroduction.pdf Ecole des Mines de Saint Etienne.

ANNEXE 2-2

ANNEXE 3 :

Spectres RMN MAS ^{31}P (14 kHz, 7,0 T) et tableaux des intensités des différentes contributions pour les verres de métaphosphates de calcium dopés avec du gallium pour les solutions TRIS et PHOSPHATE (ces expériences n'ont pas été menées sur les échantillons immergés dans l'eau ultra pure).

Solution TRIS

Spectres RMN

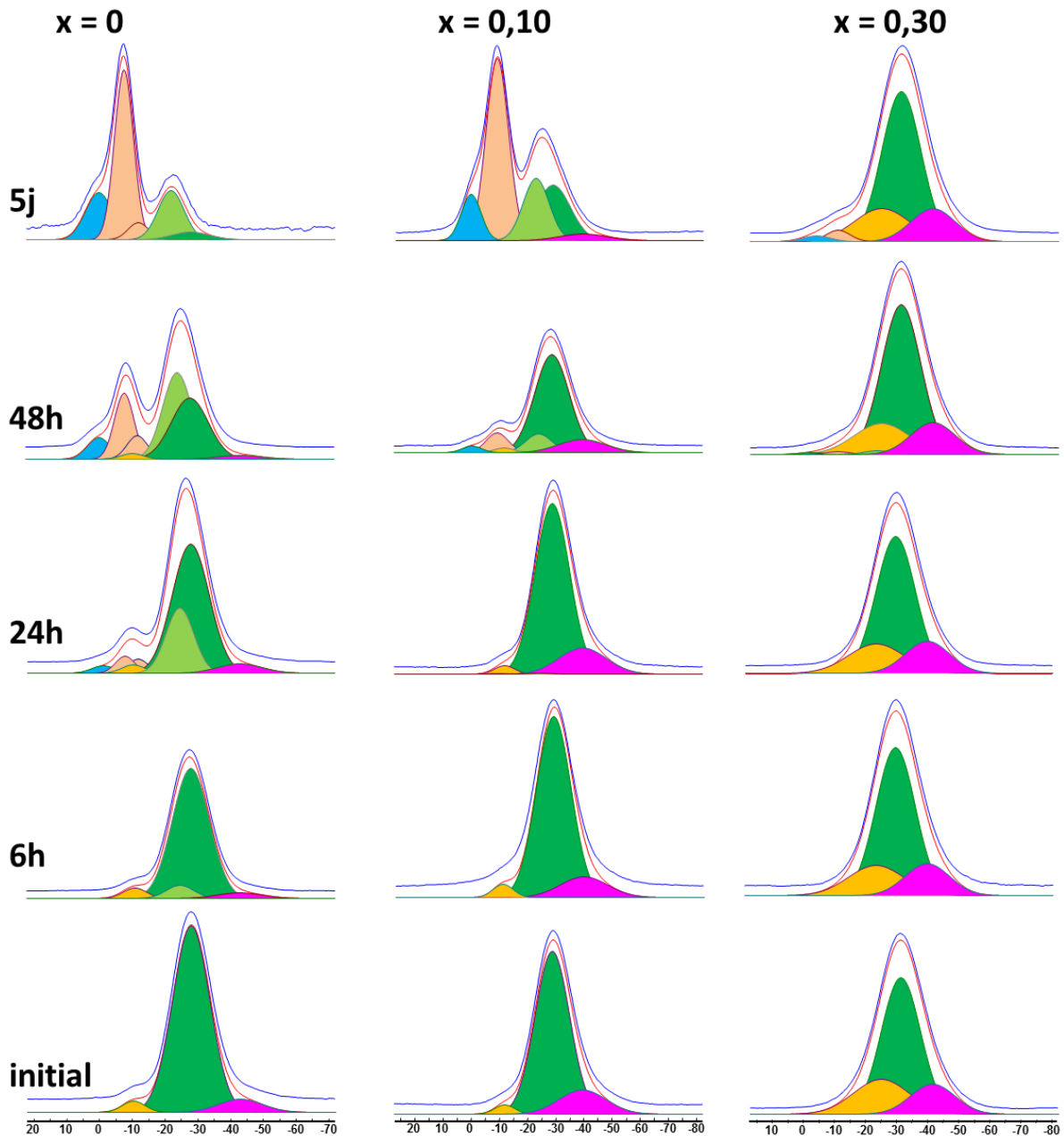


Tableau des intensités des espèces présentes :

Temps d'immersion	Unités présentes	Solution TRIS		
		x = 0	x = 0,10	x = 0,30
6 h	Q^0(H)	0 %	1,1 %	0 %
	Q^1(H)	1,51 %	2,79 %	0 %
	Q^2(H)	8,99 %	6,72 %	0 %
24 h	Q^0(H)	2,03 %	0 %	0 %
	Q^1(H)	7,78 %	0,22 %	0 %
	Q^2(H)	22,79 %	0,52 %	0 %
48 h	Q^0(H)	6,9 %	2,45 %	0,91 %
	Q^1(H)	24,69 %	8,44 %	0,76 %
	Q^2(H)	32,83 %	9,63 %	1,33 %
120 h	Q^0(H)	17,66 %	10,42 %	1,79 %
	Q^1(H)	57,18 %	45,79 %	2,36 %
	Q^2(H)	21,72 %	18,52 %	0,3 %

Solution PHOSPHATE

Spectres RMN

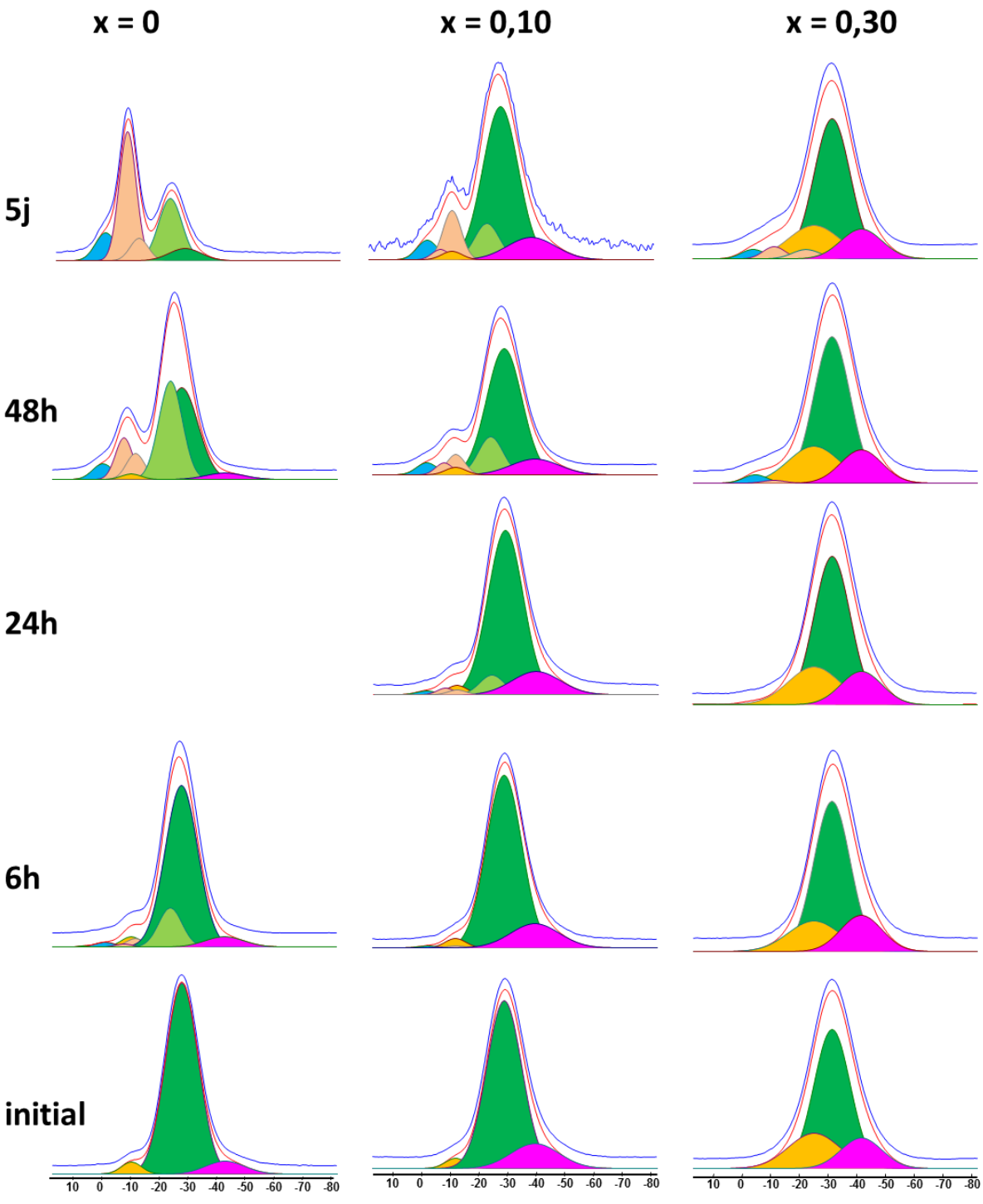


Tableau des intensités des espèces présentes :

Temps d'immersion	**Unités présentes**	**Solution PHOSPHATE**		
		x = 0	x = 0,10	x = 0,30
6 h	Q^0(H)	1,29 %	0,78 %	0 %
	Q^1(H)	2,90 %	0,43 %	0 %
	Q^2(H)	12,94 %	0,82 %	0 %
24 h	Q^0(H)		2,54 %	0 %
	Q^1(H)		1,14 %	0 %
	Q^2(H)		6,24 %	0 %
48 h	Q^0(H)	4,44 %	6,37 %	2,27 %
	Q^1(H)	16,4 %	5,33 %	0,78 %
	Q^2(H)	32,29 %	13,05 %	0 %
120 h	Q^0(H)	16,30 %	6,61	2,85 %
	Q^1(H)	50,15 %	9,93 %	3,24 %
	Q^2(H)	30,12 %	9,98 %	2,89 %

ANNEXE 4 :

DIFFRACTION DES RAYONS X

Cette technique de caractérisation permet d'identifier la nature et la structure des phases qui composent les matériaux cristallins. Cette méthode est effectivement limitée aux cristaux qui possèdent un réseau périodique sur de longues distances. Lors de l'irradiation de l'échantillon par les rayons X, il se produit une diffusion intense dans des directions particulières : c'est ce qu'on appelle la diffraction. La mesure de l'angle de diffraction θ permet alors de remonter aux distances inter réticulaires d_{hkl} caractéristiques du réseau cristallin pour une longueur d'onde λ donnée. Ceci est régi par la loi de Bragg qui s'écrit $\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$ (relation fondamentale de la DRX).

Le diffractomètre à disposition au laboratoire CEMHTI est un « Bruker D8 Advance » de géométrie Bragg-Brentano équipé d'une une anticathode cuivre (λK_α = 1,54178 Å) (cf *Figure 88*). L'échantillon, placé sur un support plan, est irradié par le faisceau de rayons X. De cette façon, le faisceau primaire est réfléchi par l'échantillon sur le détecteur à chaque fois que les conditions de Bragg sont vérifiées. Le faisceau de RX est diffracté par l'échantillon polycristallin lorsque la loi de Bragg est vérifiée.

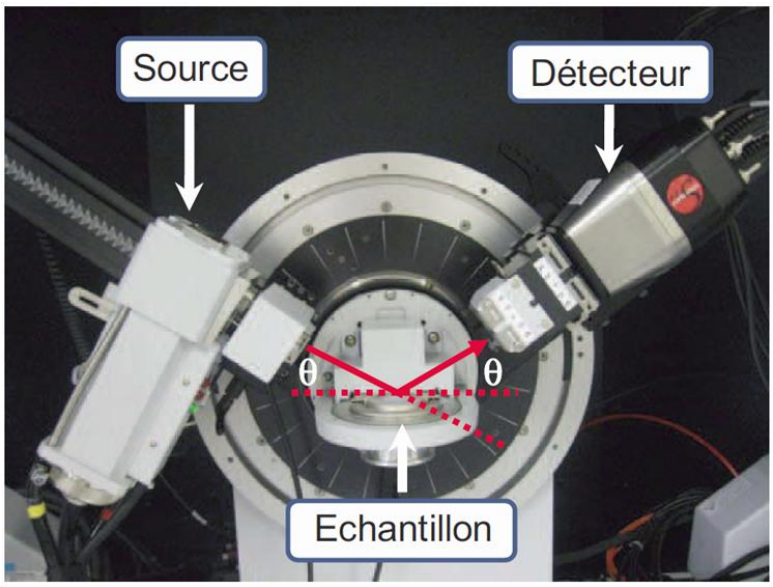


Figure 88 : *Diffractomètre sur poudre de géométrie Bragg-Brentano (θ–θ)* [1]

Les différentes phases cristallines qui composent l'échantillon se caractérisent par l'observation de raies sur le spectre, appelé diffractogramme (un exemple de diffractogramme est donnée en *Figure 89 a)*. Les positions des raies de diffraction dépendent des distances inter réticulaires et donc des paramètres de maille de la phase cristalline. La présence ou l'absence (extinction) de raie traduit la symétrie de la phase cristalline (groupe d'espace). Les intensités des raies de diffraction varient en fonction de la densité électronique et donc de la nature des atomes, alors que les largeurs des raies de diffraction dépendent du degré de

cristallinité de la phase et de la taille des cristallites. Chacune des phases cristallines présentes possède donc une signature caractéristique et ces différentes phases peuvent être directement identifiées en utilisant la base de données ICCD (fiches JCPDS).

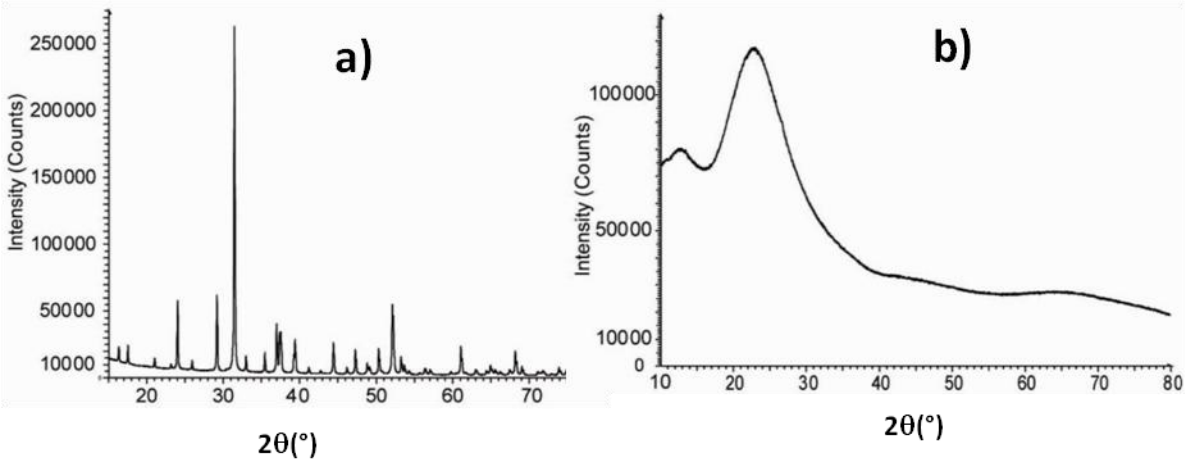


Figure 89 : *Diffractogramme du $CaAl_2SiO_7$ dans sa forme a) cristalline et b) amorphe* [2]

Dans le cas des matériaux amorphes, dont le réseau ne possède pas de périodicité à longue distance, il n'y a pas diffraction. Le diffractogramme (cf *Figure 89*) montre un fond continu caractéristique d'une diffusion et on observe seulement un pic très large.

Bibliographie

[1] Véron, E., *Synthèse et étude structurale de la gehlénite au bore Ca2Al2-xBxSiO7 : mécanisme de substitution B/Al et ordre local*. Thèse de Doctorat, Université d'Orléans, France 2011.

[2] Martel, L., *Etude de la séparation de phase dans des verres silicatés par Résonance Magnétique Nucléaire haute résolution solide et Microscopie Electronique*. Thèse de Doctorat, Université d'Orléans, France 2011.

ANNEXE 5 :
Spectroscopie Vibrationnelle InfraRouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Principe de la technique

Cette technique est basée sur l'analyse des différents mouvements que peut subir une molécule : translation, rotation et vibration. La spectroscopie infrarouge analyse les transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnels qui se produisent dans les molécules lors de ces différents mouvements. On parle donc de spectroscopie vibrationnelle.
Un spectre obtenu *via* cette technique est la représentation graphique de l'énergie de radiation infrarouge (qui s'exprime en nombre d'ondes) en fonction du pourcentage de lumière absorbée (dans le cas des mesures en absorbance, cm^{-1}), transmise (mesures en transmittance) ou réfléchie (mesures en réflectance). Le spectre de la molécule étudiée est composé de plusieurs raies qui sont appelées des bandes et qui sont caractéristiques des transitions vibrationnelles qui se produisent au sein de la molécule. Ces bandes caractéristiques donnent accès aux fréquences auxquelles ont lieu les vibrations. Pour qu'il y ait détection, il faut que le mouvement de vibration associé au mode vibrationnel de la molécule produise une modification du moment dipolaire de cette molécule.

Mesures sur un verre immergé dans du SBF classique – limitations :

La réaction entre un bioverre et le SBF est généralement suivie par spectroscopie FTIR. L'inconvénient est que certaines bandes de vibration peuvent se superposer, voire être cachées par des bandes beaucoup plus intenses. Par exemple, dans le cas qui nous intéresse ici, l'insertion des carbonates dans l'hydroxyapatite est généralement observée par l'apparition d'une bande de vibration vers 870 cm^{-1}. Or, cette région du spectre peut aussi correspondre à la bande caractéristique des groupements HPO_4^{2-} [1]. Il devient alors délicat de statuer sur l'insertion des carbonates dans la structure de l'apatite (cf *Figure 90*).

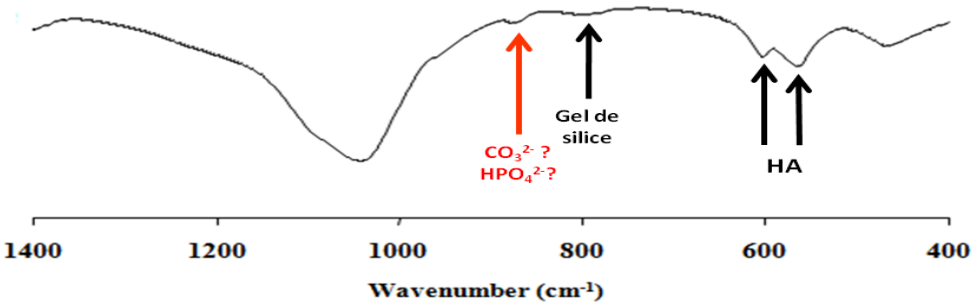


Figure 90 : *Spectre IR du 45S5 immergé dans du SBF classique pendant plusieurs heures*

Pour palier ce problème, il est possible de modifier le SBF en l'enrichissant en ^{13}C, ce qui permet de différencier d'une part, les ions CO_3^{2-} des ions HPO_4^{2-}, et, d'autre part, de

distinguer les différents types de substitution des carbonates dans l'HA qui ont lieu [1], comme on l'a vu dans le corps du manuscrit.

Spectres obtenus par FTIR pour tous les échantillons analysés

On peut ici trouver, pour consultation, les spectres enregistrés par FTIR pour tous les échantillons analysés (initial à 2 semaines). Pour les verres qui ont subit au moins 4 heures de lixiviation, il y a saturation du signal dans la zone > 1000 cm^{-1} (cf *Figure 91*). Les conclusions concernant les liaisons Si-O (BO) du réseau de tétraèdres (« Si-O 3-4BO ») et celle concernant la liaison Si-OH (groupes silanols) sont donc à relativiser fortement. Dans le corps du manuscrit nous nous sommes uniquement intéressés à la région d'intérêt 900-800 cm^{-1}.

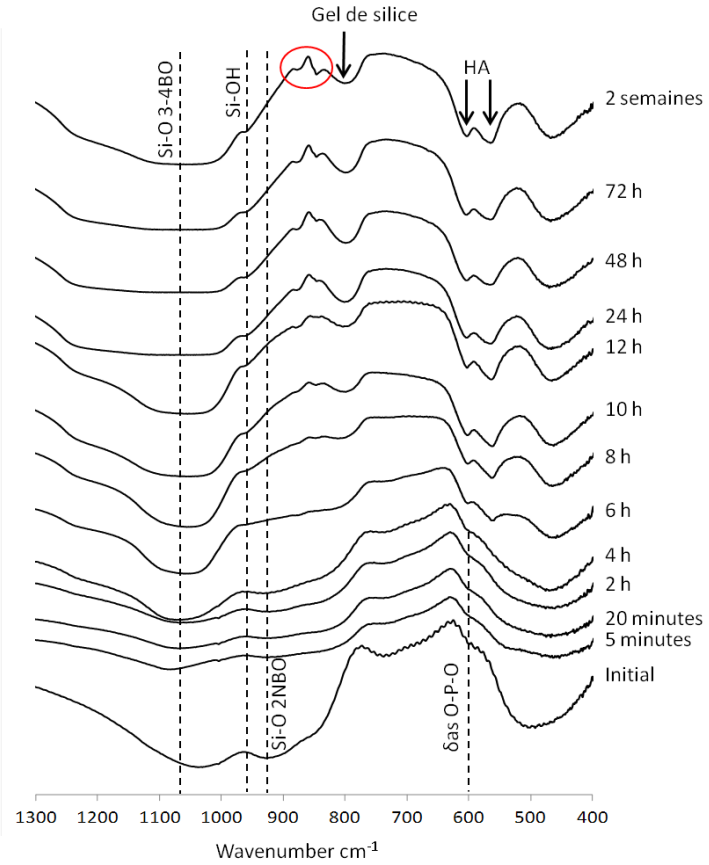


Figure 91 : *Spectres IR des verres immergés dans le SBF enrichit en ^{13}C*

Bibliographie

[1] Mason, H. E.; Kozlowski, A.; Phillips, B. L., *Solid-state NMR study of the role of H and Na in AB-type carbonate hydroxylapatite*. Chemistry of Materials 2008, *20* (1), 294.

ANNEXE 6 :

TECHNIQUES DE MICROSCOPIE

Principes des techniques de microscopie utilisées

Deux types de microscopie ont été utilisés dans ces travaux de thèse :
- la Microscopie Électronique en Transmission (notée MET)
- la Microscopie Électronique à Balayage avec canon à émission de champ (notée MEB-FEG)

Ces deux techniques de caractérisation sont basées les interactions entre des électrons et la matière présentées sur la *Figure 92*.

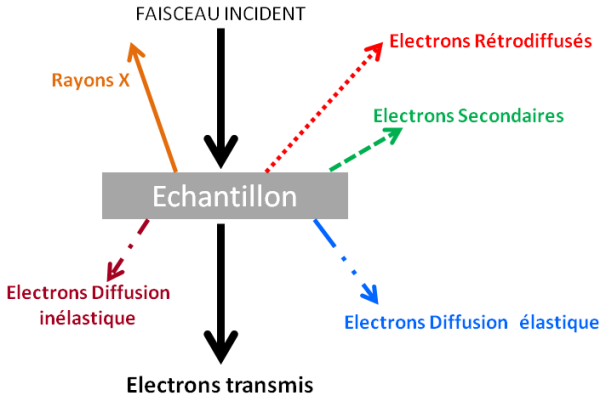


Figure 92 : *Interactions électrons-matière sous l'effet d'un faisceau incident*

Microscopie Electronique en Transmission

Dans le cas de la MET, seuls les électrons traversant l'échantillon sont analysés. La distinction entre les électrons transmis et les électrons diffusés permet de créer le contraste des images en MET. Cette technique permet de révéler la ou les textures du matériau observé de façon très fine. L'image obtenue (champ clair/champ sombre) varie selon l'épaisseur, la densité et la nature chimique de l'échantillon, et le faisceau électronique qui interagit avec le matériau étudié va révéler une image contrastée qui permettra d'observer la texture.

Il est également possible d'utiliser le faisceau d'électron pour obtenir des clichés de diffraction (Diffraction Électronique). Le principe repose sur le comportement ondulatoire des électrons. Lorsque l'échantillon est sous la forme d'une ou de plusieurs phases cristallines, le faisceau est diffracté en plusieurs petits faisceaux qui se recombinent ensuite, grâce au système optique, pour donner le cliché de diffraction (cf *Figure 93*).

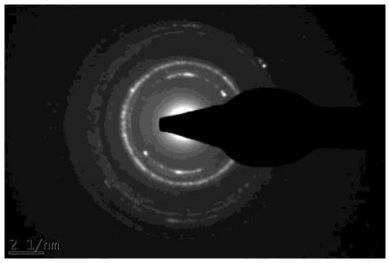


Figure 93 : *Cliché de diffraction électronique d'un bioverre lixivié 2 semaines, la phase cristalline observée est l'Hydroxyapatite*

Microscopie Electronique à Balayage

Dans le cas de la microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais, pour Scanning Electron Microscopy), les électrons rétrodiffusés permettent d'observer un contraste chimique car ils sont sensibles au numéro atomique des éléments irradiés. Les rayons X sont également utilisés dans cette microscopie. Ils permettent d'effectuer une quantification de la composition chimique de l'échantillon grâce à un spectromètre à dispersion d'énergie (*Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS) associé au dispositif MEB. La dénomination MEB-FEG indique un appareillage MEB associé à un canon d'émission de champ (*Field Emission Gun*, en anglais) qui permet d'améliorer ses capacités (cf *Figure 94*).

Figure 94 : *Appareillage MEB-FEG du laboratoire CRISMAT, Caen* [1]

Complément aux résultats de microscopie – Bioglass® 45S5

Verre initial

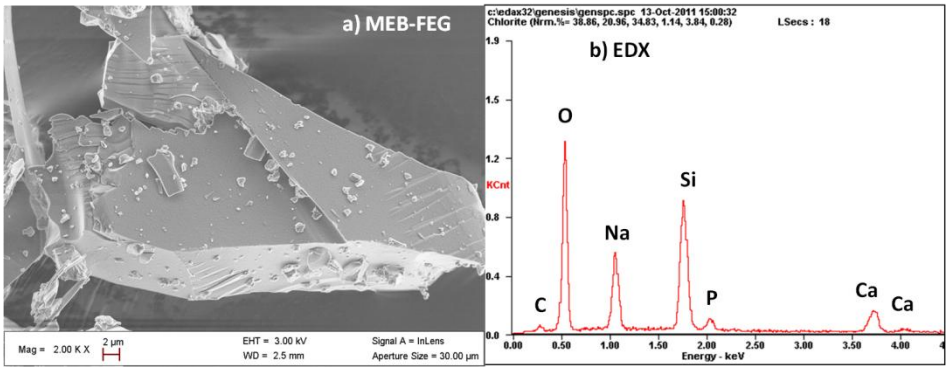


Figure 95 : *a) Image MEB-FEG du verre non lixivié b) Analyse élémentaire*

Surface du verre initial : L'analyse élémentaire met en évidence la présence du silicium, de l'oxygène et des cations (sodium, calcium, phosphore) qui se trouve dans le réseau du verre.

5 minutes

Observation de très faibles modifications de la surface du verre (cf *Figure 96*)
Cercle rouge : hypothèse du début d'une altération de surface
Cercle noir : concrétions qui semblent être constituées de petites sphères (cliché b)

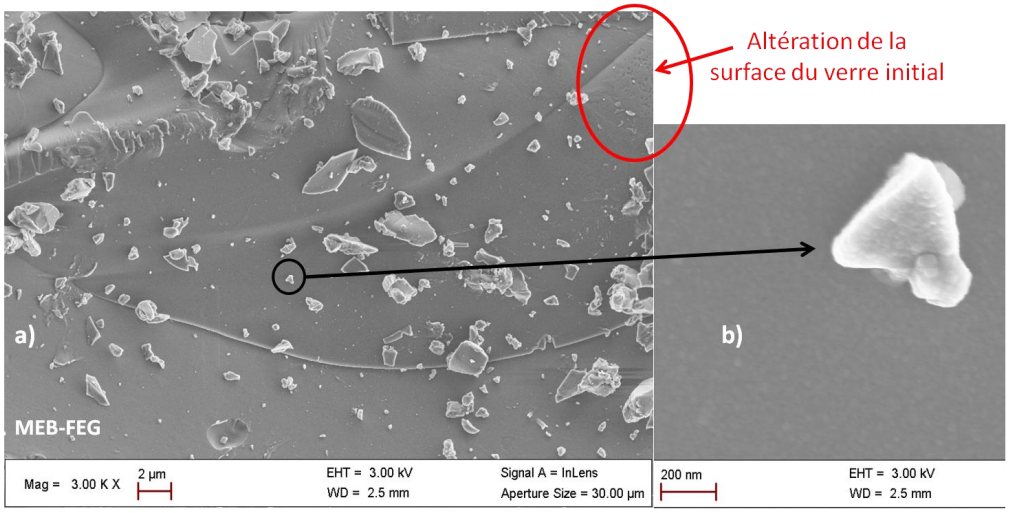


Figure 96: *Images MEB-FEG a) Surface du verre lixivié pendant 5 minutes b) zoom sur une concrétion de surface*

<u>20 minutes</u>

Observation MEB-FEG :

- les aspérités sombres (cf *Figure 97 b*) témoignent d'une altération de la surface du verre associée à la formation du gel de silice
- des amas de particules de petite taille sont présents (cf *Figure 97 c*)

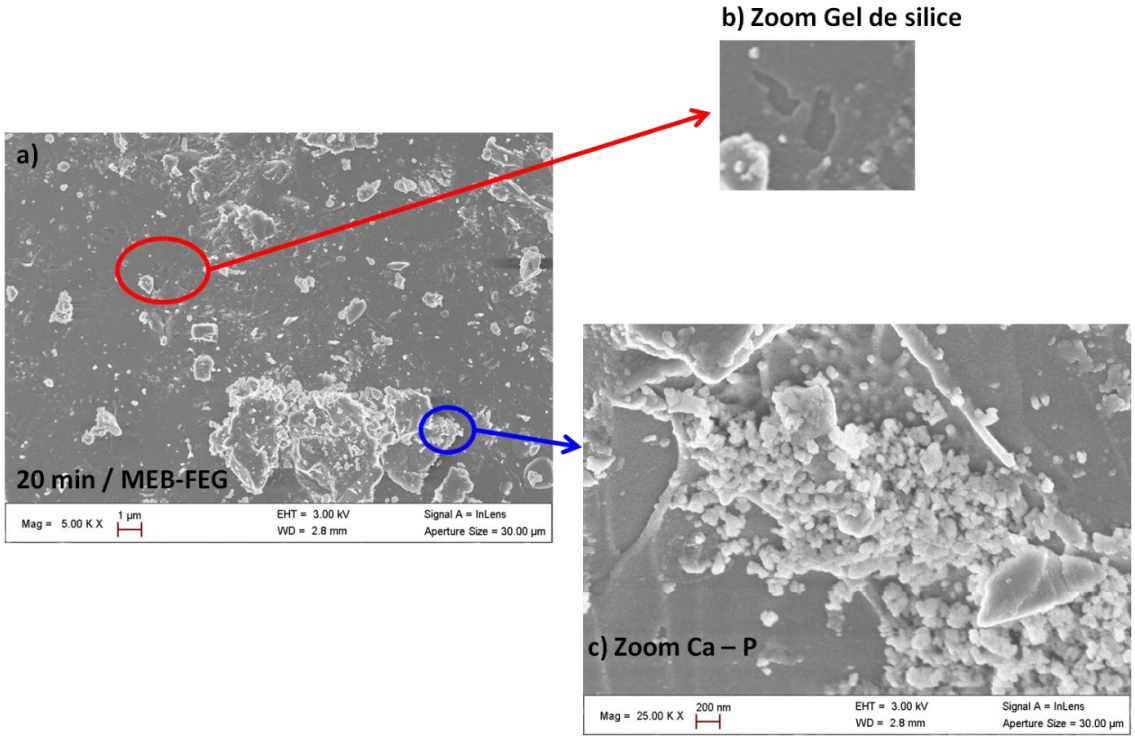


Figure 97 : *Images MEB-FEG a) Surface du verre lixivié 20 minutes b) détail de l'altération de surface témoin de la formation du gel de silice c) détail d'un amas de particules de phosphate de calcium.*

2 heures

Observation MEB-FEG : particules de petite taille (isolées ou sous forme d'amas) couvrant progressivement la surface (cf *Figure 98 a*). L'analyse EDX indique qu'elles sont composées majoritairement de calcium et de phosphore.

Observations par diffraction électronique : on constate un halo lumineux sans cercle de diffraction bien défini ce qui indique la présence d'une phase phosphocalcique amorphe (cf *Figure 98 b*).

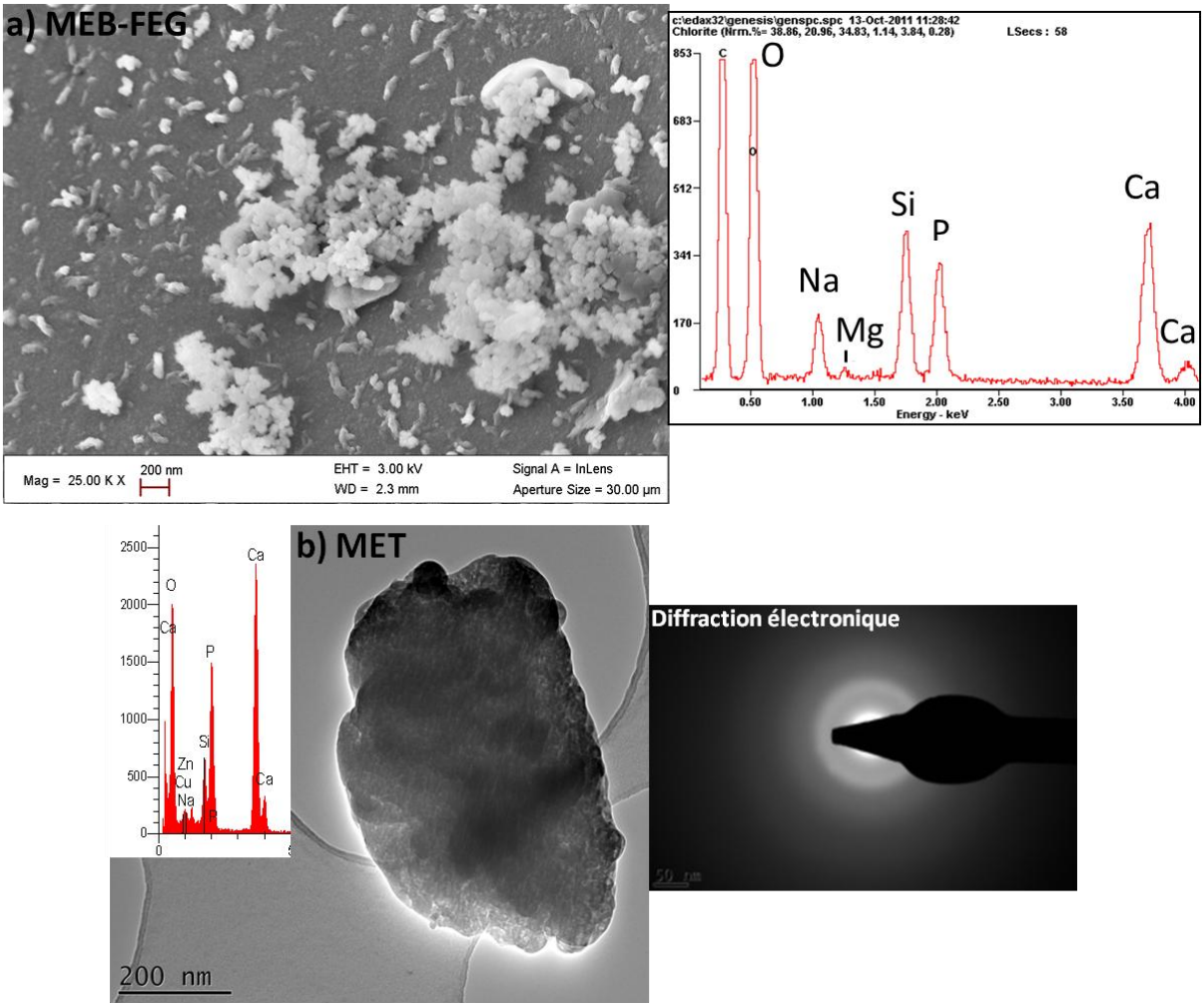


Figure 98 : *Verre immergé pendant 2 heures - Images a) MEB-FEG de la surface d'un grain de verre et son analyse élémentaire et b) MET d'un amas isolé, son analyse élémentaire et le cliché de diffraction électronique correspondant.*

4 heures

Apparition d'une nouvelle morphologie composée de nanocristaux arrangés en filaments (cf *Figure 99 a*). Analyse EDX : Ca et P.

Observation par diffraction électronique : cercles bien définis (cf *Figure 99 b*) qui sont caractéristiques de l'HA hexagonale. Le premier cercle est incomplet, indiquant une direction de croissance préférentielle.

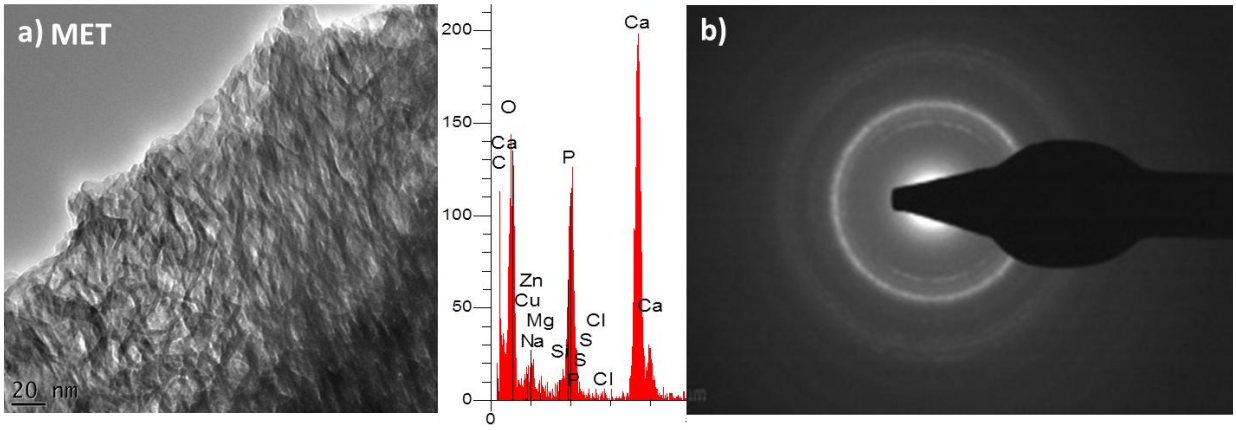


Figure 99 : *a) Image MET de la couche d'HA formée après 4 heures d'immersion et son analyse élémentaire. b) Cliché de diffraction électronique*

<u>6 heures</u>

Observation MEB-FEG (cf *Figure 100***Figure 64**) :

- zone a → gel de silice
- zone b → couche d'HA, épaisseur 1,5 µm

Cette couche d'HA est constituée d'amas dont la taille est comprise entre 30 et 50 nm.

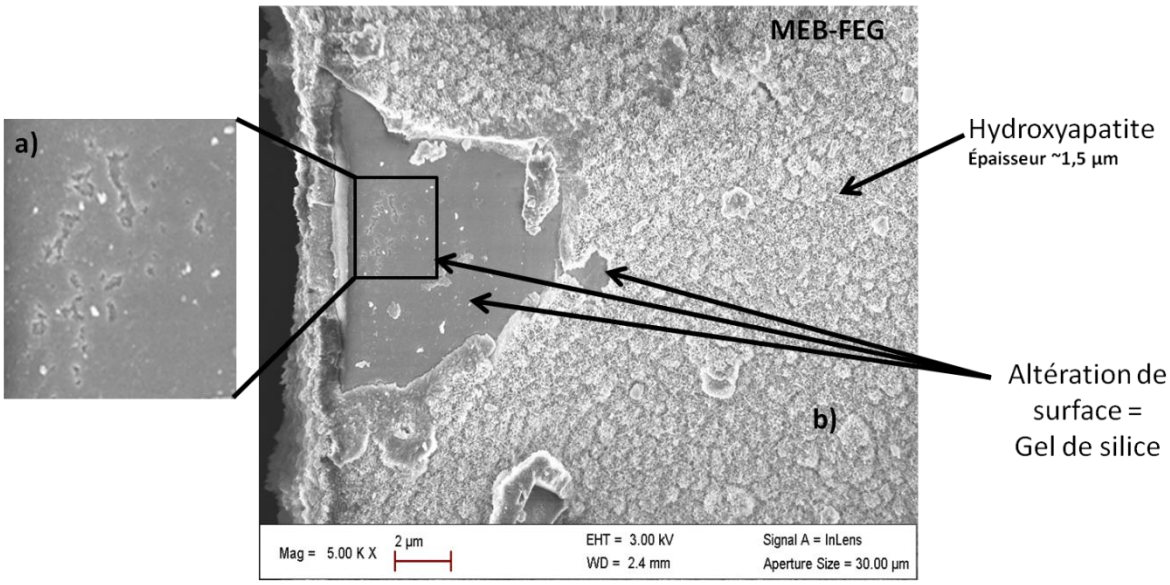


Figure 100 : *Image MEB-FEG de la surface d'un grain de verre après 6 heures d'immersion en SBF a) Détail de la couche de gel de silice b) Couche d'HA*

12 heures

On observe des grains totalement recouverts d'apatite, et d'autres totalement altérés (gel de silice) (cf *Figure 101*).

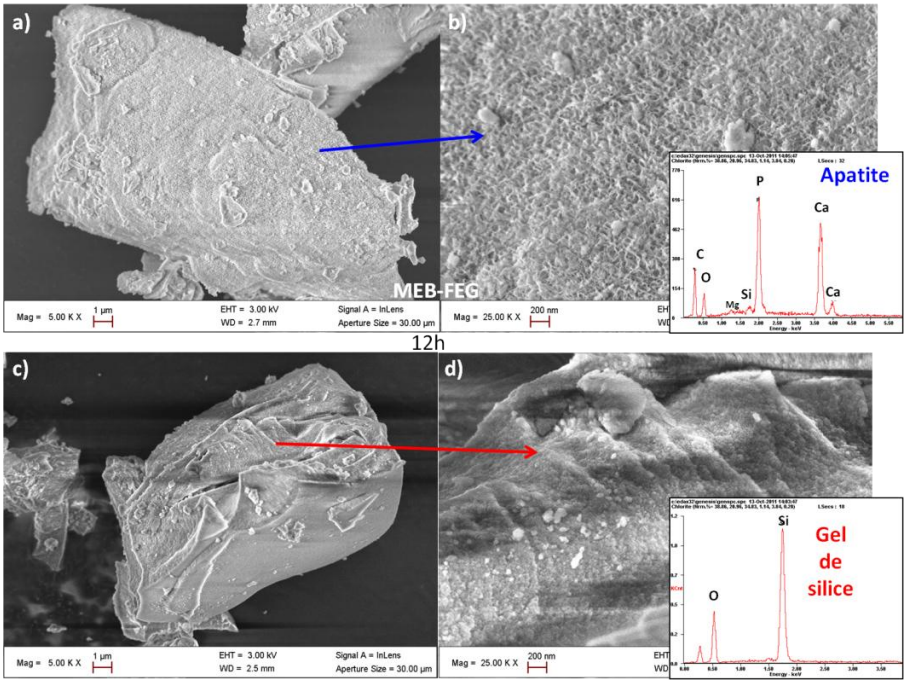


Figure 101 : *Images MEB-FEG de deux grains du verre lixivié pendant 12 heures a) Grain recouvert d'apatite b) Détail de la surface de ce grain + analyse élémentaire c) Grain recouvert de gel de silice d) Détail de la surface de ce grain + analyse élémentaire*

24 heures

Observation du développement la phase apatitique sous la forme d'un réseau poreux (cf *Figure 102*).

Observation MET de cette HA (cf *Figure 103*) : les nanocristaux s'assemblent pour donner des morphologies en filaments et plaquettaires (flèches blanches sur la *Figure 103 b,* observation en champ sombre sur la *Figure 103 c)*. La taille des nanocristaux d'HA est estimée à environ 5-10 nm.

Observation par diffraction électronique (cf *Figure 104*) : beaucoup de cercles bien définis dont certains sont incomplets (cf flèches), ce qui indique une croissance des nanocristaux selon un axe préférentiel. Le premier cercle incomplet (flèche 1) correspond au plan cristallographique 002 de la phase HA hexagonale et le deuxième cercle incomplet (flèche 2) correspond au plan 004. Ceci indique clairement une croissance préférentielle selon l'axe c de la structure hexagonale.

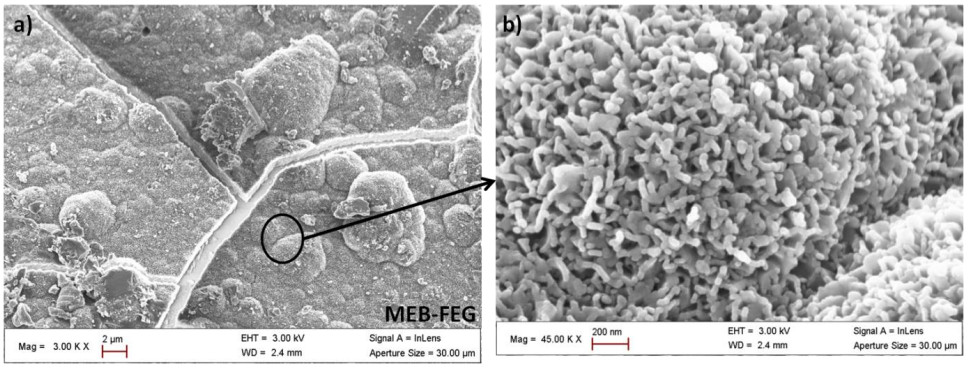


Figure 102 : *(a-b) Images MEB-FEG de la surface du verre après 24 heures d'immersion en SBF.*

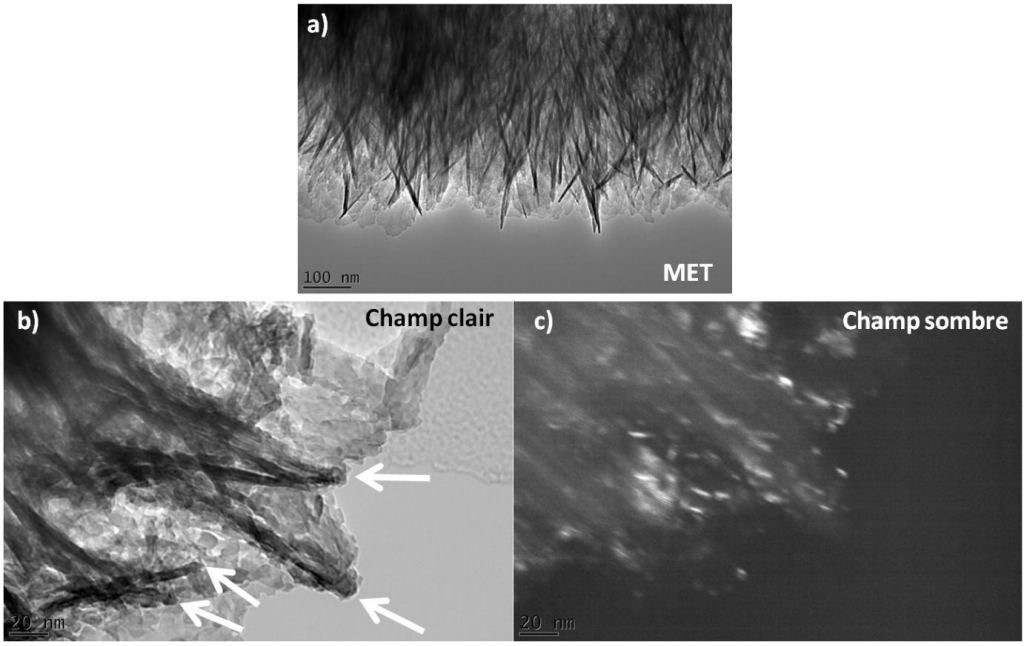


Figure 103 : *Images MET a) Région HA sur la surface du verre immergé pendant 2 semaines b) image en champ clair - zoom sur quelques filaments c) image en champ sombre correspondante à l'image en champ clair. L'image en champ sombre est un peu décalée par rapport à l'image en champ clair.*

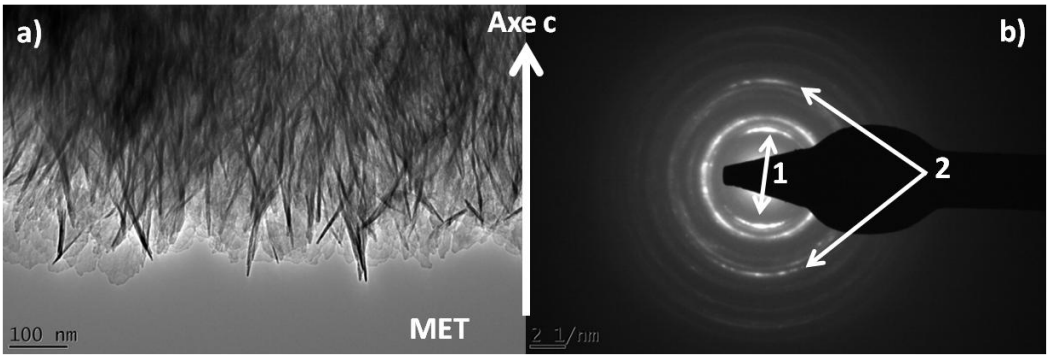


Figure 104 : *(a) Image MET de la surface d'un grain et (b) cliché de diffraction électronique correspondant (verre immergé 2 semaines). Flèche 1 : premier cercle incomplet correspondant au plan cristallographique 002 de la phase HA hexagonale. Flèche 2 : second cercle incomplet correspondant au plan 004 de cette même phase.*

72 heures : détail des différentes zones observées

A 72 heures (cf *Figure 105*), on peut distinguer trois architectures différentes qui correspondent :

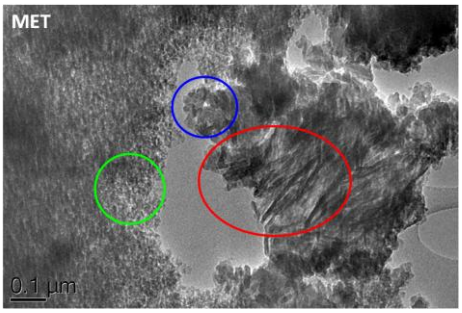


Figure 105 : *Image MET sur le verre lixivié 72 heures*

- à l'HA pour la zone cerclée en vert. La *Figure 106* indique que ce type de zone est composé de calcium et de phosphore majoritairement et la diffraction électronique indique qu'on est en présence d'une phase cristalline.

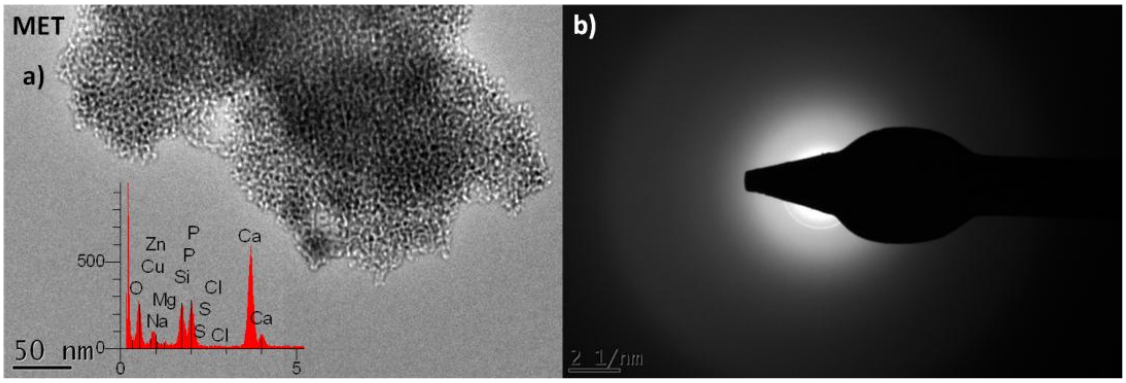


Figure 106 : *a) Image MET d'une région du verre lixivié pendant 72 heures et analyse EDX b) Diffraction électronique correspondante*

- au gel de silice pour la zone cerclée en bleue. L'analyse élémentaire de la *Figure 107* indique une présence majoritaire d'atomes de silicium.

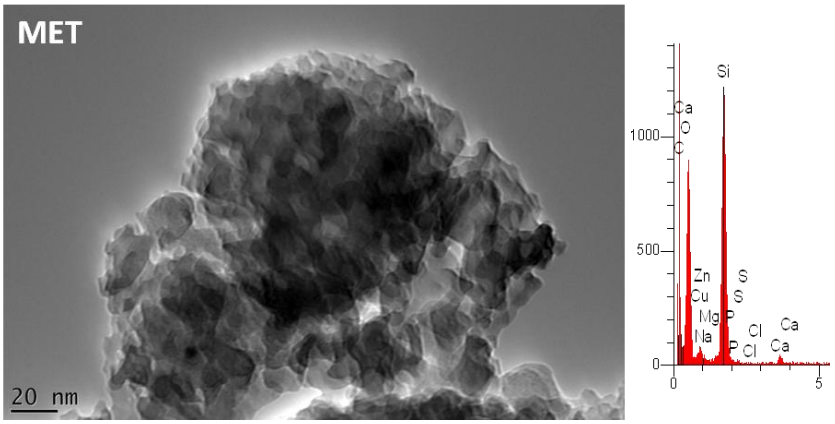


Figure 107 : *Image MET d'une région du verre lixivié pendant 72 heures et son analyse élémentaire*

- à l'HA sous la forme de filaments pour la zone cerclée en rouge. La *Figure 108 b* permet de voir qu'à l'emplacement des filaments se trouvent plusieurs nanocristaux qui apparaissent sur ce cliché sous la forme de points blancs. La diffraction électronique indique qu'on est en présence d'une phase cristalline et l'analyse élémentaire montre qu'il y a majoritairement du calcium et du phosphore.

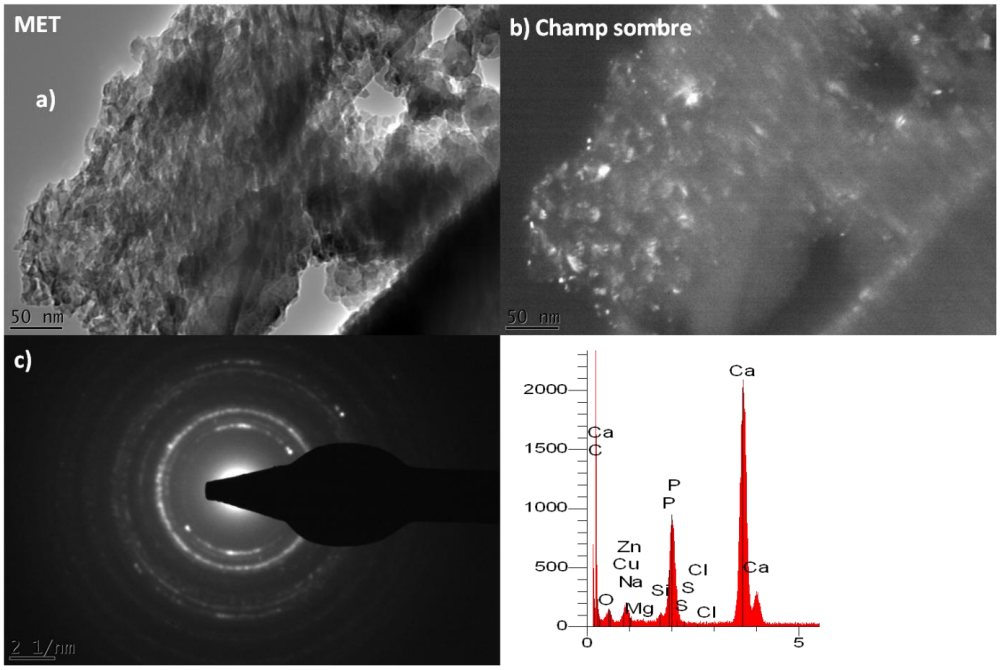


Figure 108 : *Images MET a) région du verre lixivié 72 heures b) image en champ sombre c) diffraction électronique et analyse EDX*

<u>2 semaines</u>

A 2 semaines, on observe deux types de zones :

- Gel de silice

L'analyse élémentaire indique que la zone montrée en *Figure 109* est composée majoritairement de silicium et d'oxygène.

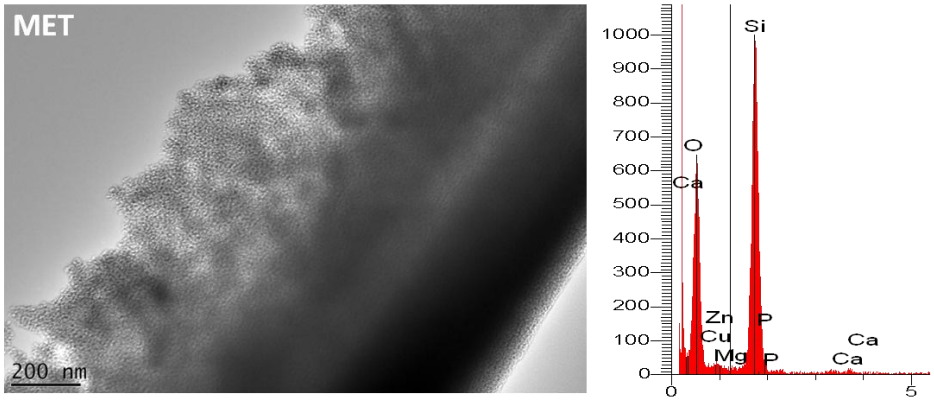


Figure 109 : *Image MET d'une région du verre lixivié 2 semaines et son analyse élémentaire*

- Hydroxyapatite

La morphologie notée par les flèches blanches (*Figure 66 b*) est sous la forme de filaments au sein desquels s'organisent les nanocristaux d'HA que l'on peut observer sur l'image en champ sombre (c) sous la forme de points blancs allongés de dimension 5-10 nm. Une analyse élémentaire (non montrée ici) indique que nous sommes majoritairement en présence de calcium et de phosphore. Cette morphologie correspond donc clairement aux cristallites d'HA.

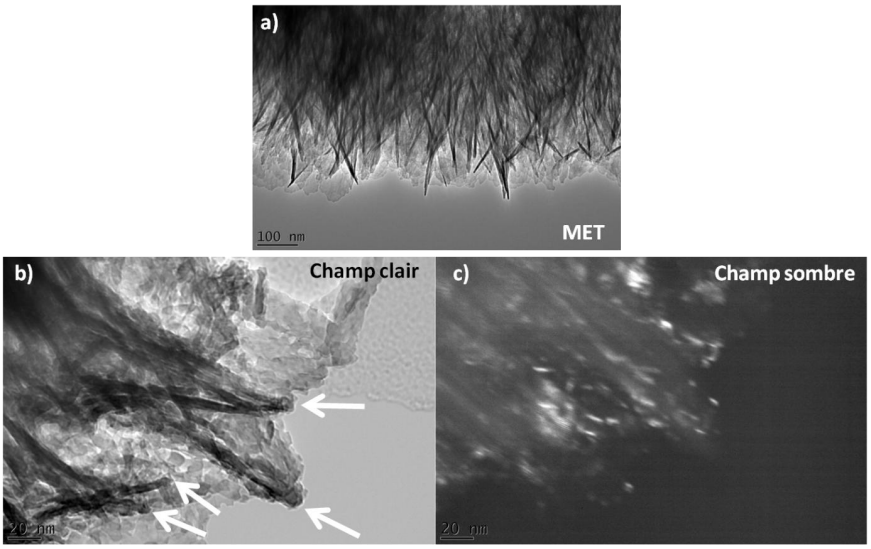


Figure 110 : *Images MET a) Région HA du verre lixivié 2 semaines b) image en champ clair - zoom sur quelques filaments c) image en champ sombre correspondante à l'image en champ clair. L'image en champ sombre est un peu décalée par rapport à l'image en champ clair.*

Le cliché de diffraction électronique, présenté sur la *Figure 67*, réalisé sur les aiguilles d'hydroxyapatite de la *Figure 66*, montre des cercles bien définis, confirmant le caractère nanocristallin de cette phase.

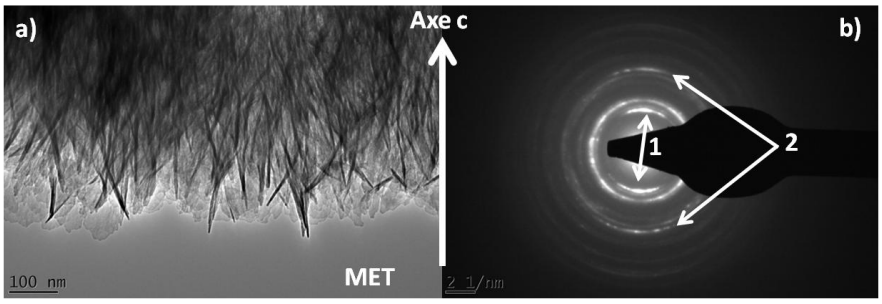


Figure 111 : *(a) Image MET (b) Diffraction électronique correspondante (verre lixivié 2 semaines)*

On note également la présence de cercles incomplets (flèches blanches 1 et 2) qui suggèrent une croissance des nanocristaux selon un axe préférentiel. D'après la loi de Bragg, il est possible de dire que l'axe en question est le c.

<u>2 mois</u>

A 2 mois, les images (cf *Figure 112*) montrent des situations similaires à celles déjà évoquées. Les deux phases présentes sont le gel de silice et l'HA.

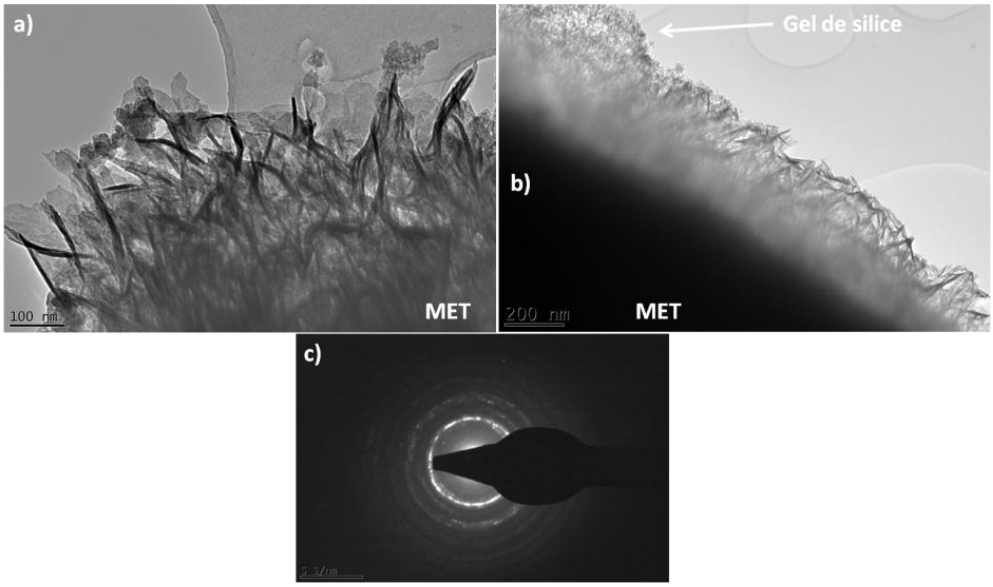


Figure 112 : *Images MET sur le verre lixivié durant 2 mois a) filaments d'HA b) gel de silice + filaments d'HA c) diffraction électronique sur les filaments de la photo a)*

Bibliographie

[1] Han, G.; Schreiber, K., *Microscope Electronique à Balayage à Effet de Champ Carl ZEISS SUPRA 55*. Site web du CRISMAT http://www.crismat.ensicaen.fr/spip.php?article144 2013.

ANNEXE 6-12

Ophélie VERNAY

Apport de la RMN Haute Résolution Solide pour la caractérisation de verres biocompatibles

Le développement de matériaux biocompatibles permettant la vectorisation de principes actifs est particulièrement souhaitable dans le cadre de la réparation osseuse liée à certaines pathologies. Dans la première partie de ce mémoire, nous décrivons la synthèse et la caractérisation de verres de phosphates de calcium dopés avec du gallium qui est un agent inhibiteur de la résorption osseuse. Les modifications du réseau phosphate sont étudiées par RMN du ^{31}P et les différents environnements locaux du Ga^{3+} sont mis en évidence par RMN du ^{71}Ga en utilisant des conditions expérimentales spécifiques (très haut champ magnétique de 20T et rotation de l'échantillon ultra-rapide). Le comportement en solution de ces verres a été étudié par RMN et par ICP-AES. Les résultats obtenus indiquent qu'ils sont soumis à une dissolution quasi-congruente et que l'ajout de Ga^{3+} augmente leur durabilité chimique.

La seconde partie de ce travail est dédiée à l'étude d'un verre bioactif utilisé en chirurgie réparatrice osseuse : le Bioglass® 45S5 (système SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5). L'utilisation d'expériences RMN de double résonance a permis d'apporter des éléments de réponse sur le type d'association entre les groupements phosphates et le réseau silicate. Après immersion de ce verre dans un fluide physiologique simulé (SBF), un suivi quantitatif des espèces, initiales et formées à la surface du verre, a été réalisé par RMN. Les résultats obtenus par RMN et par d'autres techniques de caractérisation montrent que l'hydroxyapatite carbonatée se formant en surface du verre présente de grandes similitudes avec les apatites biologiques.

Mots-clés : Verres, RMN Haute Résolution Solide, Phosphates de Calcium, Gallium, Bioglass® 45S5

High-Resolution Solid-State NMR contribution to the characterization of biocompatibles glasses

The development of biocompatible materials allowing the local delivery of specific drugs is of high interest to repair pathological bone defects. The first part of this manuscript describes the synthesis and the characterisation of calcium phosphates glasses doped with gallium, which is a bone resorption inhibitor. The nature of the phosphate network is probed by ^{31}P NMR and the Ga^{3+} local environments are studied ^{71}Ga NMR at very high magnetic field (20T) and ultra-fast spinning frequency. The leaching behaviour of these glasses is investigated by NMR and ICP-AES. The obtained results indicate that the glass dissolution is nearly congruent and that Ga^{3+} doping improves the chemical durability.

The second part of this work is dedicated to the study of the Bioglass® 45S5 which is a bioactive glass (SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 glassy system) used in bone repair surgery. Double-resonance NMR experiments are used to obtain information about the association between the phosphate units and the silicate network. NMR analyses are also used to characterize quantitatively the various species formed at the glass surface after immersion into a simulated body fluid for varying periods. Results obtained from NMR and other characterization methods revealed that the carbonated hydroxyapatite formed at glass surface shows strong similarities with biological apatites.

Key-words : Glasses, High-Resolution Solid-State NMR, Calcium Phosphates, Gallium, Bioglass® 45S5

CNRS-CEMHTI UPR3079
Conditions Extrêmes Matériaux : Hautes Températures et Irradiation
1D Avenue de la Recherche Scientifique
45071 Orléans Cedex 2