

ÉCOLE DOCTORALE
ENERGIE, MATERIAUX, SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

LABORATOIRE : Interface, Confinement, Matériaux et Nanostructures

THÈSE présentée par :
Quentin PICARD

soutenue le : **14 décembre 2015**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie des matériaux

**Biomatériaux hybrides : Tissu de fibres de
carbone / Phosphates de calcium**

Synthèse, Caractérisation et Biocompatibilité

JURY :

Sylvie BONNAMY
Sandrine DELPEUX-OULDRIANE
Jérôme CHANCOLON
Christophe DROUET
Juan M. D. TASCÓN
Franck FAYON
Sergey MIKHALOVSKY
Nathalie ROCHET

Directrice de Recherche, ICMN, Orléans
Ingénieure de Recherche, ICMN, Orléans
Maître de Conférences, ICMN, Orléans
Chargé de Recherche, CIRIMAT, Toulouse
Professeur de Recherche, CSIC, Oviedo (ES)
Directeur de Recherche, CEMHTI, Orléans
Professeur d'Université, SPBS, Brighton (GB)
Chargée de Recherche, iBV, Nice

Directrice de thèse
Co-encadrante
Co-encadrant
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice

Glossaire des abréviations

Phases phosphocalciques :

CaP	Phosphates de calcium
HAP	Hydroxyapatite
CaD-HAP	Hydroxyapatite déficitaire en calcium
OCP	Phosphate octocalcique
DCPD	Phosphate dicalcique dihydrate "Brushite"
β-TCP	Phosphate de calcium tricalcique β

Matériaux en carbone :

FC	Fibres de carbone
TFC	Tissus de fibres de carbone

Techniques de caractérisation :

MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
EDX	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
HR-MET	Imagerie à haute résolution
DEAS	Diffraction électronique à aire sélectionnée
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
DRX	Diffraction des rayons X
DTP	Désorption à température programmée
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X
RMN MAS	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire en rotation à l'angle magique
CP-MAS	RMN MAS par transfert de polarisation
HETCOR	RMN MAS de corrélation hétéronucléaire

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Chapitre I Revue bibliographique	9
1. Les orthophosphates de calcium comme substituts osseux	12
2. Généralités	12
1.1.1. Généralités sur les orthophosphates de calcium	12
1.1.2. Notions sur la structure et le remodelage osseux	15
1.2. Les céramiques phosphocalciques artificielles.....	19
1.2.1. Les hydroxyapatites	19
1.2.2. Utilisation des phosphates de calcium dans le domaine de la chirurgie orthopédique	26
2. Les revêtements phosphocalciques.....	27
2.1. Revêtement phosphocalcique sur des substrats conventionnels	27
2.1.1. Substrats métalliques.....	27
2.1.2. Méthodes de synthèse des revêtements phosphocalciques sur des substrats conventionnels.....	29
2.2. Revêtement phosphocalcique sur des tissus de fibres de carbone	30
2.2.1. Généralités sur les fibres et les tissus de fibres de carbone.....	31
2.2.2. Biocompatibilité et bioactivité	39
2.2.3. Méthodes de synthèse d'un revêtement phosphocalcique sur les fibres et les tissus de fibres de carbone	39
Références	42

Chapitre II Matériaux, méthodologie et techniques expérimentales d'analyse 53

1. Problématique	57
2. Démarche expérimentale.....	59
3. Matériaux et dispositif de synthèse	61
3.1. Tissus de fibres de carbone	61
3.2. Dispositif expérimental et synthèse du dépôt de CaP par sono- électrodéposition	61
3.2.1. Dispositif de la sono-électrodéposition	63
3.2.2. Principe général de la sono-électrodéposition	64
3.2.3. Paramètres expérimentaux étudiés	64
3.3. Electro-oxydation du TFC KIP1200.....	65
3.3.1. Dispositif expérimental.....	65
3.3.2. Principe général de l'oxydation électrochimique.....	65
3.3.3. Paramètres expérimentaux de l'oxydation électrochimique.....	66
4. Techniques et méthodologies de caractérisation.....	66
4.1. Détermination de la quantité de CaP déposée	66
4.2. Extraction du dépôt de CaP	66
4.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)	67
4.4. Microscopie électronique en transmission (MET)	67
4.4.1. Imagerie en fond clair contrasté	68
4.4.2. Imagerie à haute résolution (HR-MET)	68
4.4.3. 4.4.3. Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX).....	68
4.4.4. Diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS)	69
4.5. Analyse élémentaire	69
4.6. Désorption à température programmée.....	70
4.7. Spectroscopie de photoélectrons X	72

1.1. Dosages potentiométriques	73
1.2. pH de charge nulle.....	75
1.3. Porosimétrie mercure.....	75
1.4. Adsorption de gaz (N ₂ et CO ₂)	76
1.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	77
1.6. Diffraction des rayons X	78
1.7. Résonance magnétique nucléaire	79
1.8. Evaluation de la biocompatibilité des biomatériaux	80
1.8.1. Préparation de la solution d'HOST	80
1.9. Principe et méthodologie du test au XTT	80
1.9.1. Principe	80
1.9.2. Méthodologie	81
1.10. Principe et méthodologie du test de viabilité des HOST en fluorescence.....	82
1.10.1. Principe	82
1.10.2. Méthodologie	82
Références	83

Chapitre III Etude des matériaux hybrides CaP/Tissus de fibres de carbone. Dépôts de CaP obtenus par sono-électrodéposition 85

1. Caractérisation du substrat : le tissu de fibres de carbone KIP1200.....	89
1.1. Morphologie et architecture du tissu de fibres de carbone	89
1.2. Caractéristiques physico-chimiques	90
1.2.1. Composition chimique du TFC KIP1200	90
1.2.2. Caractéristiques texturales du KIP1200	95
1.2.3. Propriétés électriques des tissus de fibres de carbone activés	98
1.2.4. Bilan des caractéristiques du substrat au regard de la stratégie de synthèse des dépôts de Ca/P et de l'application visée Diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS)	99

1.1.	Modifications de la chimie de surface des tissus de fibres de carbone par oxydation électrochimique.....	99
1.1.1.	Influence du potentiel de polarisation sur la composition chimique de surface du KIP1200.....	100
1.1.2.	Influence du potentiel de polarisation sur la porosité du tissu KIP 1200	103
1.1.3.	Caractéristiques des tissus oxydés.....	103
2.	Dépôts de CaP obtenus par sono-électrodéposition.....	104
2.1.	Synthèse des dépôts	104
2.1.1.	Optimisation de la géométrie de la contre-électrode	104
2.1.2.	Influence du pH initial de l'électrolyte.....	107
2.1.3.	Influence de la durée de polarisation	109
2.1.4.	Optimisation de l'électrode de travail.....	111
2.1.5.	Conclusion : choix du dispositif expérimental et des conditions opératoires	112
2.2.	Influence de la densité de courant sur la quantité et la nature des dépôts ..	112
2.2.1.	Quantité et homogénéité des dépôts de CaP	112
2.2.2.	Morphologie des dépôts de CaP.....	115
2.3.	Caractérisation des dépôts par IRTF	117
2.3.1.	Signatures des CaP observés par spectroscopie infrarouge.....	117
2.3.2.	Composition chimique et nature des phases de CaP au sein des dépôts	121
2.4.	Caractérisation des dépôts par diffraction des rayons X	125
2.5.	Caractérisation des dépôts de CaP par MET	129
2.5.1.	Caractérisation de la microtexture des dépôts de CaP.....	129
2.5.2.	Détermination des rapports atomiques Ca/P par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX en MET).....	131
2.5.3.	Imagerie MET haute résolution et diffraction électronique des dépôts	132

1.1. Quantification des phases phosphocalciques et caractérisation de la structure des dépôts par Résonance Magnétique Nucléaire en Rotation à l'Angle Magique.....	136
1.1.1. RMN du ^{31}P	136
1.1.2. RMN du ^1H	141
1.1.3. Spectres 2D de corrélation hétéronucléaire ^{31}P - ^1H	142
1.1.4. Discussion et conclusion de l'étude par RMN	144
2. Tests de prolifération in vitro d'ostéoblastes humains primaires	145
2.1. Mesure de la viabilité et de la prolifération des HOST sur les biomatériaux hybrides TFC/CaP par la méthode au XTT	145
2.1.1. Détermination de la densité d'ensemencement optimale	146
2.1.2. Etalonnage de l'absorbance en fonction de la densité des cellules et du temps d'incubation.....	148
2.1.3. Résultats des tests de prolifération des HOST primaires sur les biomatériaux hybrides TFC / CaP	149
2.1.4. Impact de la nanotexture des TFC sur la prolifération des HOST	152
2.2. Test de viabilité des HOST en fluorescence	153
2.3. Conclusion sur les tests de viabilités cellulaires.....	156
Références	157

Chapitre IV Discussion générale 161

1. Caractéristiques comparées des dépôts de CaP	163
2. Les mécanismes réactionnels liés à la sono-électrodéposition	166
2.1. Mécanisme de formation du dépôt de CaP à régime d'électrolyse rapide...	169
2.2. Mécanisme de formation du dépôt de CaP à régime d'électrolyse lent	172
2.2.1. Electrolyse du milieu électrolytique	172
2.2.2. Précipitation de l'OCP	172
2.2.3. Hydrolyse de l'OCP en Cd-HAP	173

1.1. Régime d'électrolyse intermédiaire	175
1.2. Origine et influence des carbonates	175
2. Origine de la phase désordonnée	176
3. Comportement des TFC avec et sans un revêtement de CaP au cours de tests de viabilités cellulaires.....	179
4. Apport de la sono-électrodéposition sur le recouvrement de biomatériaux par un phosphate de calcium.....	181
Références.....	183

Chapitre V Perspectives..... 185

1. Etude des propriétés mécaniques des biomatériaux hybrides TFC / CaP	188
1.1. Principe général du test de flexion.....	188
1.2. Méthodologie du test de flexion.....	189
2. Elaboration de revêtements de CaP par pulvérisation thermique.....	191
2.1. Dispositif et principe de la technique « Spray Pyrolysis »	191
2.2. Résultats des expériences préliminaires	194
3. Incorporation du strontium dans le dépôt de CaP	196
3.1. Paramètres expérimentaux.....	197
3.2. Résultats	197
3.2.1. Influence de l'incorporation de strontium sur la morphologie des dépôts	197
3.2.2. Détermination des rapports atomiques Ca/P et Ca + Sr/P en fonction des densités de courant	198
Références.....	200

Conclusion générale..... 201

Annexes 207

Introduction générale

L'augmentation importante de la population mondiale (2,5 milliards d'habitants en 1950 et 7,2 milliards d'habitants en 2015 soit un taux de croissance d'environ 290 %) constitue un marqueur fort de la croissance des besoins futurs en biomatériaux. L'Europe, qui ne représentait que 10 % de la population mondiale en 2011, est le continent connaissant une croissance démographique moins forte (133 %) que celles de l'Asie (300 %) et de l'Afrique (400 %) (Source INSEE). De plus, en Europe, le fort vieillissement global de la population avec un âge médian passant de 35,4 ans en 1991 à 41,2 ans en 2011 (Source eurostat) indique que le développement du marché des biomatériaux portera sur la résolution des problèmes liés à l'âge des patients.

Une étude de marché sur les dispositifs médicaux implantés (DMI) datant de 2011 (Mathieu Cynober. *Le marché des dispositifs médicaux implantables*, aie, 2011, www.aiefc.org/etudessectoriell/le-march-des-dmi-etude.pdf) indique que si le marché global des DMI s'élevait à 57,4 milliards d'€ en 2010, il aurait atteint plus de 79 milliards d'€ en 2014. Ce marché se décompose en trois secteurs dont les deux principaux sont les implants orthopédiques, qui représentent 39 % du marché, et les implants cardio-vasculaires avec 37 % du marché. Le reste (24%) est occupé par d'autres DMI tels que les implants neurologiques et oncologiques.

En 2010, le marché des implants orthopédiques était évalué à 28,1 milliards d'€ avec une prédominance des Etats-Unis (60 %) suivi de l'Europe, du Moyen-Orient et de l'Afrique (24 %). Le reste est réparti entre le Japon (7 %), l'Asie, le Pacifique (6 %) et l'ensemble Canada et Amérique latine (3 %). La croissance la plus importante est pour la zone Asie / Pacifique avec un taux de croissance estimé à 12 %, loin devant les autres territoires dont le taux de croissance n'excède pas 5 %.

Les implants orthopédiques regroupent les implants articulaires (hanche, épaule, genou, cheville, doigt...) et d'autres implants tels que les implants tendineux, d'ostéosynthèse, les ligaments artificiels et les substituts osseux.

Inévitablement, les besoins en biomatériaux augmentent parallèlement au vieillissement de la population. Plus précisément, dans le domaine orthopédique, les prothèses et implants ont connu des avancées majeures au cours des deux dernières décennies et des matériaux performants existent déjà sur le marché. Aujourd'hui, les développements futurs attendus concernent plus particulièrement la chirurgie et la médecine liées au confort des patients. C'est dans cette direction que la croissance du marché des biomatériaux s'oriente et,

dans ce contexte, les matériaux hybrides apparaissent comme très prometteurs y compris en matière de régénération osseuse.

Il est à noter que la reconstruction osseuse et le traitement des infections osseuses restent les deux challenges majeurs pour les chirurgiens orthopédiques. Aujourd'hui, les traitements de choix en reconstruction osseuse sont assurés grâce aux techniques d'autogreffes, avec des prélèvements au niveau des crêtes iliaques des patients (os du bassin). Néanmoins, ces techniques s'accompagnent d'inconvénients majeurs dans plus de 30% des cas (infections, hématomes, pertes de sang et douleurs chroniques). C'est la raison pour laquelle de nombreux matériaux manufacturés et des biomatériaux synthétiques ont été développés pour substituer l'autogreffe. Seulement, aujourd'hui encore, aucun de ces matériaux synthétiques n'est capable d'atteindre les performances de l'autogreffe, particulièrement lorsque la zone osseuse endommagée est importante.

Dans ce cas, un autre challenge consiste à trouver un moyen d'envelopper la zone à traiter par un biomatériau flexible capable à la fois de maintenir en place et de délimiter l'espace où le comblement osseux pourra être effectué. Dans cette zone, la régénération osseuse pourra ainsi être stimulée par le biomatériau et les risques d'infections seront atténués.

C'est dans ce contexte socio-économique que nous proposons d'élaborer des biomatériaux hybrides constitués d'un substrat, un tissu de fibres de carbone, sur lequel est déposée une céramique phosphocalcique. Le but est d'obtenir un matériau biocompatible et flexible qui servira de support à la régénération osseuse, limitant les risques d'infections, accélérant l'ostéogénèse et permettant ainsi de diminuer les temps de convalescence suite à une fracture.

Cette étude a été initiée en 2012 au sein du programme européen « ABREM » Advanced Biomaterials for REgenerative Medicine (2012-2015) dont le coordinateur est le Professeur Sergey Mikhlovsky, avec la mise en place d'une collaboration entre la « School of Pharmacy and Biomolecular Sciences » de l'Université de Brighton au Royaume Uni et le laboratoire ICMN, Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ex-CRMD) au sein duquel ont été effectués les travaux de cette thèse. Ce programme a été déterminant pour la mise en place du projet au sein du laboratoire.

En 2014, avec la mise en place du projet « MatBioReOs » Matériaux Bio-actifs hybrides pour la Reconstruction Osseuse (2014-2016), financé par la Région Centre-Val de Loire, coordonné par l'ICMN, plusieurs partenaires, académiques (LMR, EA 2640, Tours) et industriels (société INEL, Artenay) sont venus s'associer au projet afin d'y apporter leurs compétences scientifiques et techniques.

Les différents acteurs, académiques et industriels de ces projets et des collaborations, qui ont permis de développer une synergie autour de l'étude présentée dans ce mémoire, sont :

- L'unité mixte de recherche ICMN (UMR 7374), CNRS/Université d'Orléans, qui est le porteur du projet régional et de l'étude présentée dans ce mémoire. Ce laboratoire propose des savoir-faire et une expertise scientifique et technique sur les matériaux, reconnue en particulier pour ceux à base de carbone, et les activités de recherche qui y sont menées s'appuient sur une vaste plateforme instrumentale d'élaboration et d'analyse des matériaux. C'est au sein du laboratoire qu'ont été élaborés et caractérisés les biomatériaux hybrides : tissu de fibres de carbone (TFC) / revêtement phosphocalcique (CaP) (sauf pour la caractérisation de spectroscopie RMN, réalisée au CEMHTI à Orléans).
- La société DACARB[®] d'Asnières sur Seine. Cette société est spécialisée dans la fourniture de charbons actifs et carbones activés, notamment pour le traitement de l'eau et des gaz. Son domaine d'expertise s'étendant aussi aux tissus de fibres de carbone, cette entreprise est le fournisseur des TFC utilisés au cours de cette étude.
- L'unité CNRS CEMHTI (Conditions Extrêmes des Matériaux : Haute Température et Irradiation), UPR 3079, Orléans, qui a apporté son expertise scientifique et technique pour la caractérisation des biomatériaux hybrides TFC / CaP au moyen de la spectroscopie RMN (RMN MAS) du ³¹P et de l'¹H.
- L'institut de Biologie Valrose (iBV), unité de recherche financée par le CNRS (UMR 7277), l'INSERM (U 1091), l'Université Nice Sophia Antipolis, le Centre Régional de lutte contre le cancer Antoine Lacassagne et l'Union Européenne. C'est au sein de ce laboratoire que sont effectués les tests biologiques de biocompatibilité des TFC et des biomatériaux hybrides TFC/CaP qui font l'objet de ce mémoire.
- La société INEL Instrumentation électronique, implantée à Artenay. Cette société est spécialisée dans le matériel de diffraction des rayons X (DRX), du système complet d'analyse au simple composant de mesure. Le rôle de cette entreprise a été de proposer et d'adapter l'équipement de DRX de l'ICMN, ainsi que le traitement des données, à la caractérisation des biomatériaux hybrides TFC/CaP. L'objectif de la collaboration, est, à plus long terme, d'établir une procédure pour la révision de la norme internationale ISO de caractérisation de l'hydroxyapatite pour l'adapter à la diversité

des différentes phases de phosphates de calcium rencontrées et à la diversité de leur degré de cristallinité.

- Le Laboratoire de Mécanique et Rhéologie (LMR) (E.A. 2640) de l'Université de Tours où sont mises en place et adaptées les techniques de caractérisation des propriétés mécaniques des biomatériaux hybrides TFC / CaP.

Ce manuscrit présente l'avancement des travaux portant sur l'élaboration et la caractérisation de biomatériaux hybrides TFC / CaP.

Le premier chapitre est consacré à définir le contexte scientifique, en apportant des notions sur la structure et le remodelage osseux, ainsi qu'à préciser les objectifs et les enjeux à travers un état de l'art sur les céramiques phosphocalciques, sur les différents types de substrats utilisés en orthopédie, ainsi que sur les techniques de synthèse et de caractérisation de revêtements de CaP à la surface de ces substrats.

Le deuxième chapitre présente la problématique, la méthodologie ainsi que les techniques de synthèse et de caractérisation utilisées au cours de cette étude. Il y est notamment détaillée la méthode de synthèse d'un revêtement phosphocalcique par sono-électrodéposition utilisée dans ce travail.

Le troisième chapitre regroupe l'ensemble des résultats sur les caractérisations physico-chimiques, microtexturales et structurales des TFC et des dépôts de CaP, ainsi que les résultats des tests biologiques sur les TFC et les biomatériaux hybrides TFC / CaP.

Le quatrième chapitre présente une synthèse des résultats et le fruit des réflexions menées sur la relation existant entre les caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts de CaP et les paramètres expérimentaux de la synthèse. La discussion porte également sur l'influence des caractéristiques physico-chimiques des TFC avec et sans dépôt sur la biocompatibilité de ces matériaux.

Le cinquième chapitre porte sur les perspectives de cette étude. Y sont notamment présentés les tests préliminaires sur les propriétés mécaniques des biomatériaux hybrides TFC / CaP ainsi que sur l'utilisation d'une technique alternative de dépôt de CaP, la « pyrolyse spray ». Une étude préliminaire sur l'incorporation d'ions d'intérêt biologique (ions strontium, gallium...) au sein du dépôt de CaP est également présentée.

Enfin, une conclusion générale synthétise l'ensemble des résultats et souligne les données nouvelles et pertinentes apportées par ce travail.

Chapitre I

Revue bibliographique

Sommaire du chapitre I

1.	Les orthophosphates de calcium comme substituts osseux.....	12
1.1.	Généralités.....	12
1.1.1.	Généralités sur les orthophosphates de calcium.....	12
1.1.2.	Notions sur la structure et le remodelage osseux.....	15
1.1.2.1.	Structure de l'os.....	15
1.1.2.2.	Remodelage osseux	17
1.2.	Les céramiques phosphocalciques artificielles.....	19
1.2.1.	Les hydroxyapatites.....	19
1.2.1.1.	HAP stoechiométrique	19
1.2.1.2.	HAP déficitaire en calcium	21
1.2.1.3.	HAP carbonatée	22
1.2.2.	Utilisation des phosphates de calcium dans le domaine de la chirurgie orthopédique	26
2.	Les revêtements phosphocalciques	27
2.1.	Revêtement phosphocalcique sur des substrats conventionnels	27
2.1.1.	Substrats métalliques	27
2.1.1.1.	Substrats polymériques.....	28
2.1.1.2.	Substrats composites	28
2.1.2.	Méthodes de synthèse des revêtements phosphocalciques sur des substrats conventionnels	29
2.1.2.1.	Différentes méthodes de synthèses	29
2.1.2.2.	La synthèse électrochimique.....	30
2.2.	Revêtement phosphocalcique sur des tissus de fibres de carbone	30
2.2.1.	Généralités sur les fibres et les tissus de fibres de carbone	31
2.2.1.1.	Fabrication des fibres et les tissus de fibres de carbone	31
2.2.1.1.1	Procédé d'obtention des fibres de carbone ex-polymère	31
2.2.1.1.2	Procédé d'obtention des tissus de fibres de carbone	34
2.2.1.2.	Structure, texture des FC et architecture des TFC	34
2.2.1.2.1	Le graphite	34

2.2.1.2.2	Les fibres de carbone.....	35
2.2.1.2.3	Architecture des tissus de fibres de carbone.....	38
2.2.2.	Biocompatibilité et bioactivité	39
2.2.3.	Méthodes de synthèse d'un revêtement phosphocalcique sur les fibres et les tissus de fibres de carbone	39
Références.....		42

En 1986 puis en 1991, suite à une série de conférences au Royaume-Uni, un consensus fut adopté sur la définition du terme biomatériau : « *matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle* » [1]. Les biomatériaux utilisés dans le domaine orthopédique sont nombreux. Les applications vont du comblement de déficit osseux aux prothèses totales d'articulations en passant par les broches de maintien et les implants dentaires. Ces applications exigent des matériaux de posséder des propriétés de biocompatibilité, de bioactivité, d'ostéointégration et mécaniques, adaptées aux rôles attendus des biomatériaux.

En raison de leur biomimétisme avec le tissu osseux, les céramiques phosphocalciques se révèlent être des candidates de choix en tant que substituts osseux ou revêtements améliorant les propriétés biologiques d'autres matériaux supports. Les matériaux à base de carbone, de par leurs bonnes propriétés mécaniques et de biocompatibilité, font l'objet de nombreuses études quant à leurs emplois en tant que renfort pour prothèses ou en tant que support à la régénération osseuse. Plus particulièrement, les fibres et les tissus de fibres de carbone présentent un intérêt certain pour ce type d'applications.

Ce premier chapitre présente dans un premier temps des généralités sur les orthophosphates de calcium utilisés comme substituts osseux ainsi que des notions sur la structure de l'os et sur le remodelage osseux. Il est détaillé ensuite les structures et les méthodes d'obtention des hydroxyapatites stœchiométriques et non-stœchiométriques.

Dans un second temps, l'état de l'art est établi sur les avantages et les méthodes de synthèses de revêtements phosphocalciques déposés d'une part sur des supports conventionnels (substrats métalliques, polymériques et composites) et d'autre part sur les tissus de fibres de carbone. Il y est en particulier détaillé les méthodes de synthèses des fibres et des tissus de fibres de carbone ainsi que l'impact de leurs caractéristiques physico-chimiques sur leurs biocompatibilité et bioactivité. Enfin, l'état de l'art porte également sur les procédés de synthèses d'un revêtement phosphocalcique sur les tissus de fibres de carbone.

1. Les orthophosphates de calcium comme substituts osseux

Cette partie présente, dans un premier temps, des généralités sur les céramiques phosphocalciques ainsi que sur la structure et le remodelage osseux. Dans un second temps, l'état de l'art est axé sur les structures, méthodes d'obtention et les utilisations des principales céramiques phosphocalciques artificielles employées en tant que biomatériaux.

1.1. Généralités

1.1.1. Généralités sur les orthophosphates de calcium

Les orthophosphates de calcium (CaP) sont des céramiques utilisées dans de nombreux domaines tels que l'industrie alimentaire comme additif (le phosphate tricalcique E341) [2], dans l'environnement, en tant que piège à métaux lourds pour la dépollution de l'eau [3, 4] ainsi que dans la dentisterie et la chirurgie orthopédique en tant qu'implants, prothèses ou matériaux de comblement [5–9].

La famille des CaP comprend de nombreuses variantes en termes de composition chimique, de structure cristallographique et de caractéristiques physico-chimiques dépendantes de la composition relative des quatre polymorphes issus de l'équilibre triprotique de l'acide orthophosphorique H_3PO_4 (Figure I-1).

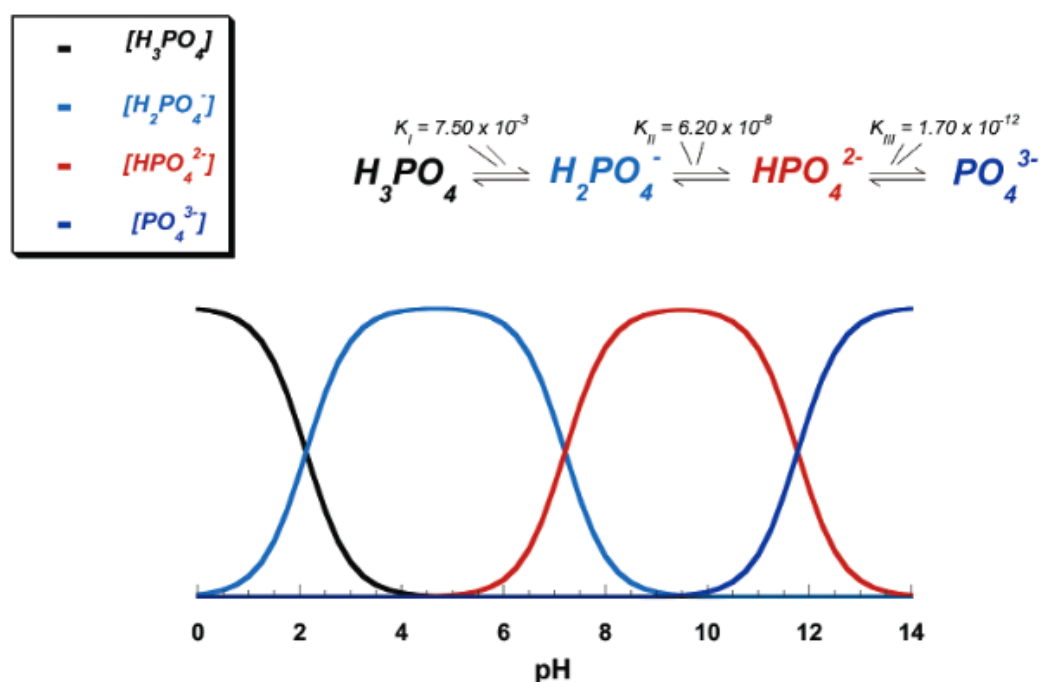


Figure I-1 : Variation du pH en fonction des concentrations ioniques en équilibre triprotique pour l'acide phosphorique en solution [10].

Tableau I-1 : Formules chimiques et rapports atomiques Ca/P de quelques orthophosphates de calcium.

Orthophosphate de calcium	Formule chimique	Rapport Ca/P
Phosphate de calcium monohydrate (MCPM) Phosphate de calcium anhydre (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4), \text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)$	0,5
Phosphate dicalcique dihydrate (DCPD) Phosphate dicalcique anhydre (DCPA)	$\text{Ca}(\text{HPO}_4), 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}(\text{HPO}_4)$	1
Phosphate octocalcique (OCP) Triclinique (OCPT) Apatitique (OCPa) Amorphe (OCPam)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4, 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{2,5}(\text{PO}_4)_{3,5}(\text{OH})_{0,5}$ $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4, n\text{H}_2\text{O}$	1,33
Phosphate tricalcique α - tricalcium phosphate (α -TCP) β - tricalcium phosphate (β -TCP) Apatitique Amorphe	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})$ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Hydroxyapatite déficitaire en calcium (CaD-HAP)	$\text{Ca}_{10-x}[\]_x(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{OH})_{2-z}$	1,5-1,67
Hydroxyapatite stœchiométrique (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Oxyapatite (OXA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67
Phosphate tétracalcique (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2

Le Tableau I-1 présente les formules chimiques ainsi que les rapports atomiques Ca/P de quelques orthophosphates de calcium. La nature chimique du CaP est dépendante de la méthode et des conditions de synthèse utilisées. Les céramiques avec des rapports atomiques $\text{Ca/P} < 1,67$, telles que le MCPM, le DCPD, le DCPA et l'OCP, sont obtenues en milieu aqueux [11–14]. Le ratio Ca/P initial, le pH ainsi que la température de la solution sont les paramètres déterminants sur la composition chimique du CaP. Le TCP, l'OXA et le TTCP possèdent un rapport $\text{Ca/P} > 1,67$ et sont obtenus par traitement thermique à haute

température de précurseurs de phosphates et de calcium [15–18]. Les TCP, bien que possédant un rapport CaP <1,67, sont aussi obtenus par traitement thermique. Dans ce cas, les paramètres déterminants sont le rapport Ca/P initial ainsi que la température du traitement thermique. L'HAP stœchiométrique, de ratio Ca/P = 1,67, peut être obtenue par les deux méthodes.

Les CaP sont aussi caractérisés par leurs solubilités. Le tableau I-2 présente les solubilités et les domaines de pH de stabilité en solution aqueuse des principaux CaP.

Tableau I-2 : Solubilité à 25°C de quelques orthophosphates de calcium [19] (* pas de données).

Orthophosphate de calcium	Solubilité à 25°C		Domaine de pH de stabilité en solution aqueuse à 25°C
	pKs	mg/L	
MCPM	1,14	≈ 1800	0,0-2,0
MCPA	1,14	≈ 1700	*
DCPD	6,59	≈ 88	2,0-6,0
DCPA	6,90	≈ 48	*
OCP	96,6	≈ 8,1	5,5-7,0
α-TCP	25,5	≈ 2,5	*
β-TCP	28,9	≈ 0,5	*
ACP	*	*	≈5-12
CaD-HAP	≈85,1	≈ 9,4	6,5-9,5
HAP	116,8	≈ 0,3	9,5-12
OXA	≈69	≈ 87	*
TTCP	38-44	≈ 0,7	*

Les céramiques phosphocalciques issues d'une précipitation en milieu aqueux présentent une plus grande solubilité que celles obtenues par traitement thermique. La structure cristallographique a aussi un impact sur la solubilité : par exemple, les TCP de type α (monoclinique) et β (trigonal) présentent des solubilités différentes pour un même rapport Ca/P [19].

1.1.2. Notions sur la structure et le remodelage osseux

1.1.2.1. Structure de l'os

L'os est un composite naturel possédant des structures hiérarchiques complexes observées à différentes échelles. C'est un tissu conjonctif spécialisé constitué d'une matrice osseuse et de quatre types de cellules : ostéoblastes, ostéoclastes, ostéocytes et les cellules ostéoprogénitrices. Ces dernières représentent environ 2 % de la masse totale de l'os. Il existe différents types d'os dont chacun a un rôle défini (Figure I-2). L'os spongieux, aussi appelé os trabéculaire, est une structure poreuse possédant une grande surface spécifique favorisant l'activité métabolique telle que les échanges des ions Ca^{2+} entre l'os et les fluides biologiques (sang). Il est entouré d'un os compact, aussi appelé os cortical ou haversien [20, 21].

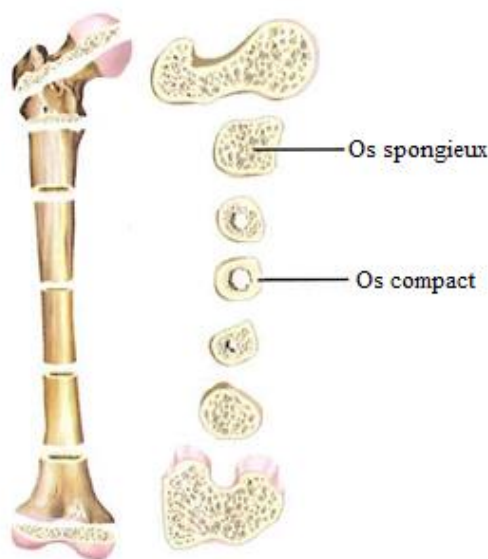


Figure I-2 : Structure anatomique d'un os long [20].

La matrice osseuse se compose de constituants inorganiques et organiques. La phase minérale regroupant les constituants inorganiques représente environ 70 % en masse du tissu osseux. Elle est constituée principalement de nano-plaquettes d'hydroxyapatite carbonatée déficiente en calcium. De plus, la phase minérale contient des ions Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- et F^- , qui bien que n'existant qu'à l'état de traces, s'avèrent d'une importance capitale pour les réactions

biochimiques associées au métabolisme osseux [22]. La phase organique représente environ 20 % de la masse du tissu osseux. Elle est constituée par les cellules osseuses et à 95 % en masse de collagène, principalement de type I, une protéine en forme de fibre. A la différence du collagène du même type trouvé dans les tissus mous (muscles etc.), le grand nombre de connections croisées intermoléculaires offre une combinaison unique entre flexibilité et résistance mécanique. Les 10 % restant sont de l'eau.

La Figure I-3 schématise la structure de l'os cortical. Il est constitué d'unités structurales, les ostéons, formées par des lamelles concentriques de tissu osseux. Ces lamelles sont une succession de particules minérales (CaD-HAP carbonaté) et de fibres de collagène orientées parallèlement les unes aux autres conférant ainsi une élasticité à l'os. Les ostéons possèdent un canal central permettant la vascularisation et l'innervation de l'os.

La Figure I-4 est la représentation histologique du tissu spongieux. L'unité anatomique primaire est appelée trabécule. Comme pour les ostéons, les trabécules sont formées par des lamelles concentriques de tissu osseux avec, à leurs surfaces, une couche d'ostéoblastes et de quelques ostéoclastes. L'os spongieux se situe principalement aux extrémités des os longs, à proximité des articulations et à l'intérieur des vertèbres. Il est hautement vascularisé et contient souvent la moelle osseuse siège de l'hématopoïèse, c'est-à-dire de la formation des cellules sanguines.

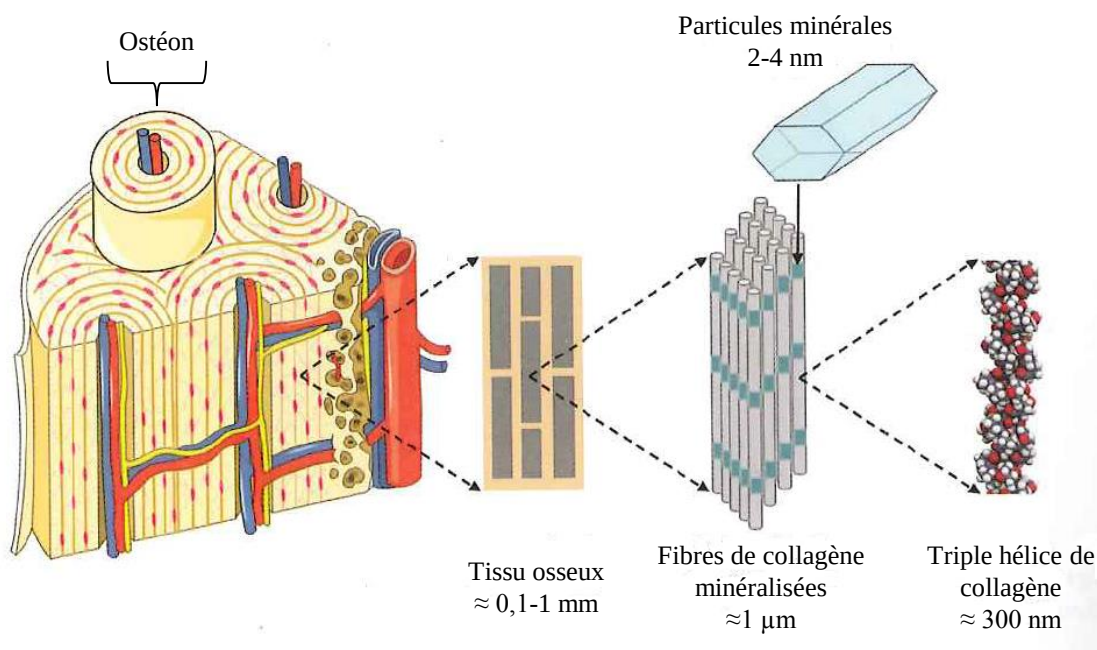


Figure I-3 : Structure composite hiérarchique de l'os cortical. Adapté de Chen et Thouas [20].

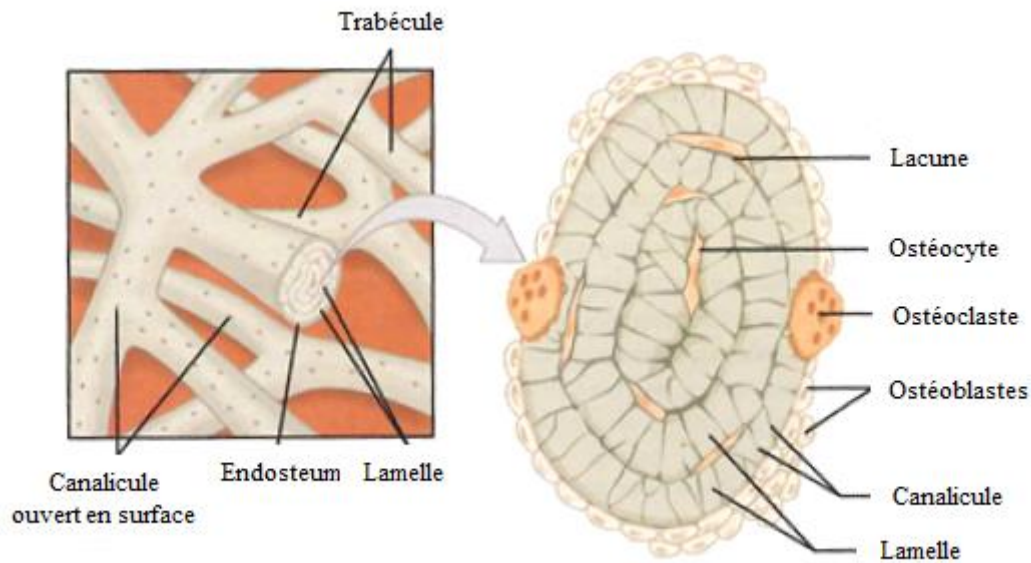


Figure I-4 : Représentation histologique de l'os spongieux. Adapté de Chen et Thouas [20].

1.1.2.2. Remodelage osseux

Le tissu osseux possède une fonction mécanique, soutenant le corps et protégeant les organes. Il possède aussi une fonction hématopoïétique (formation des cellules sanguines) et une fonction métabolique : le tissu osseux joue aussi un rôle dans l'équilibre biochimique de l'individu notamment dans le contrôle du métabolisme phosphocalcique. Les os subissent en permanence des phénomènes de résorption et croissance formant le processus du remodelage osseux. Ce dernier se déroule dans des unités fonctionnelles de remodelage en quatre phases [21] (Figure I-5) :

- Activation : sous l'action de facteurs ostéorésorbants (hormone parathyroïdienne ou PTH, vitamine D3 et prostaglandine Pg E2), les cellules bordantes (ostéoblastes au repos) se rétractent et libèrent l'accès aux ostéoclastes qui peuvent adhérer à la matrice osseuse. Les ostéoblastes vont contribuer à la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en pré-ostéoclastes puis en ostéoclastes actifs.
- Résorption osseuse : les ostéoclastes actifs vont se fixer sur la matrice osseuse à résorber. Cette phase se déroule en deux étapes : dans premier temps, l'acidification de la zone de résorption va dissoudre la phase minérale puis dans un second temps, la matrice organique est dégradée sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales.

- Inversion : une fois le tissu osseux résorbé, les ostéoclastes meurent par apoptose (mort programmée d'une cellule) et sont remplacés par des macrophages tapissant le fond de l'unité fonctionnelle de remodelage. Ces derniers vont nettoyer la zone en phagocytant les corps indésirables (cadavres de cellules, corps étrangers, etc.).
- Formation osseuse : les cellules ostéoprogénitrices vont se différencier en ostéoblastes sur la zone de résorption et ces derniers entament un processus de formation du tissu osseux en deux étapes : premièrement, les ostéoblastes sécrètent une matrice extra-cellulaire (MEC) qui consiste en un mélange de macromolécules (polysaccharides et protéines fibreuses) importantes pour les interactions entre les cellules elles-mêmes ainsi qu'avec la MEC. Deuxièmement, ils produisent une enzyme, la phosphatase alcaline, qui va éliminer par hydrolyse les esters phosphoriques qui sont des inhibiteurs de la croissance osseuse. Les ostéoblastes produisent aussi des vésicules matricielles servant de réservoir d'ions et de phosphatase alcaline nécessaire à la croissance osseuse. Il s'ensuit une minéralisation de la MEC et donc la formation du nouveau tissu osseux.

Le processus de remodelage terminé, les cellules entrent dans une phase de quiescence pour former une nouvelle couche de cellules bordantes au repos.

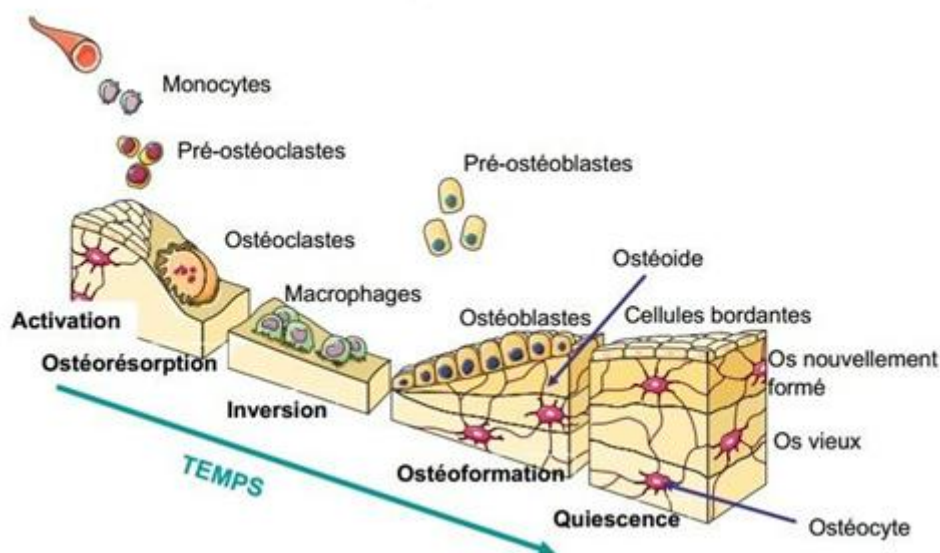


Figure I-5 : Cycle du remodelage osseux [23].

Outre le processus de remodelage osseux, il est nécessaire pour l'organisme, en cas de blessure entraînant une fracture et une hémorragie, de régénérer la lacune osseuse. Le processus de réparation est initié par des signaux chémo-attractant et d'angiogénèse qui vont

attirer les cellules utiles au processus. Les débris cellulaires sont d'abord éliminés par les macrophages et les granulocytes neutrophiles, puis les cellules mésenchymateuses et les capillaires sanguins vont coloniser la blessure pour permettre la formation du tissu conjonctif. Il s'ensuit la formation du tissu cartilagineux qui va combler la lacune en formant un cal. Ce dernier se calcifie et il est progressivement remplacé par du tissu ostéoïde fabriqué par les ostéoblastes. Ces derniers remodelent le cal osseux pour lui faire reprendre la forme initiale de l'os. Selon le type de fracture et avec une immobilisation des fragments (plâtres...), la durée de réparation de l'os varie normalement entre 6 et 12 semaines [21].

Cependant, en cas de fracture avec un large déficit osseux, la réparation naturelle n'est plus suffisante pour assurer la régénération de l'os. Les pertes osseuses suffisamment importantes pour empêcher une reconstruction par l'organisme seul sont appelées « défauts critiques » [24]. Il est nécessaire d'introduire des matériaux de comblement ou de remplacement du tissu osseux endommagé par des prothèses. Les matériaux les plus utilisés sont les alliages métalliques, les polymères, les bioverres et les céramiques [20]. Il existe une autre catégorie de matériaux qui présente un intérêt majeur de par leurs similitudes avec la partie minérale du tissu osseux pour la chirurgie orthopédique : les céramiques phosphocalciques.

1.2. Les céramiques phosphocalciques artificielles

Les céramiques phosphocalciques (CPC), en particulier le β -TCP et l'HAP, sont des matériaux couramment utilisés dans le domaine médical [25]. Ce paragraphe présente les structures et les méthodes de synthèse des HAP ainsi que les utilisations des CPC dans le domaine de la chirurgie orthopédique.

1.2.1. Les hydroxyapatites

De nombreux composés minéraux et inorganiques adoptent la structure de type apatitique de formule $A(1)_4A(2)_6(BO_4)_6X_2$, où A est un cation avec un grand rayon atomique (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ ...), B est un métal ou un métalloïde formant des oxydes tétraédriques (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , SO_4^{2-} ,...) et X est un halogène, un oxyanion ou une petite molécule polarisée (OH^- , F^- , Br^- , Cl^- , O^{2-} , H_2O ,...) [26]. Les apatites cristallisent dans le système hexagonal $P6_3/m$. Dans le cas des hydroxyapatites, A correspond principalement à des ions calcium, BO_4 à des ions phosphates et X à des ions hydroxyles. On distingue trois types d'hydroxyapatites : HAP stœchiométrique, HAP déficitaire en calcium et HAP substituée.

1.2.1.1. HAP stœchiométrique

- **Structure :**

La formule chimique de l'HAP stœchiométrique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ et possède un ratio atomique $\text{Ca/P} = 1,667$. L'HAP existe sous deux formes allotropiques : hexagonale et monoclinique avec les groupes d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$ et $\text{P2}_1/\text{b}$ respectivement. La transition de phase de la structure monoclinique vers la structure hexagonale se fait vers 250°C . Cependant, naturellement, l'HAP est partiellement substituée ce qui favorise la forme hexagonale à température ambiante [25]. Seule la structure cristallographique de l'HAP hexagonale est décrite ici (Figure I-6).

La maille élémentaire contient 10 ions Ca^{2+} , 6 tétraèdres PO_4^{3-} et 2 groupes OH^- . Les tétraèdres PO_4^{3-} forment le treillis en nid d'abeille qui fait apparaître deux tunnels :

Le premier tunnel, bordé par les PO_4^{3-} et correspondant à l'axe ternaire de la structure, est occupé par quatre ions Ca_I^{2+} en positions $c = 0$ et $c = \frac{1}{2}$.

Le second tunnel correspond à l'axe sénaire hélicoïdal au centre duquel se situent les ions hydroxyles. Six ions Ca_II^{2+} situés en position $c = \frac{1}{4}$ et $c = \frac{3}{4}$ ainsi que les oxygènes des tétraèdres PO_4^{3-} entourent les OH^- .

Les paramètres de la maille sont $a = b = 9,418 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$ et $\beta = 120^\circ$.

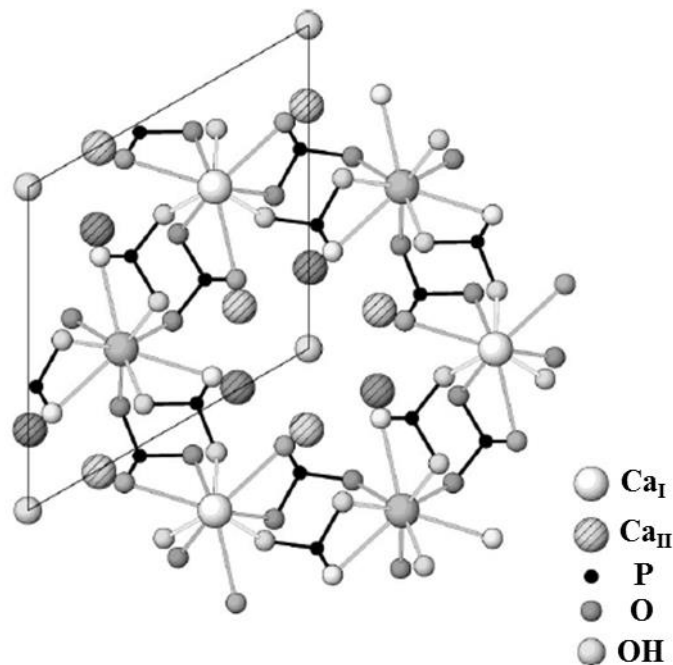


Figure I-6 : Structure cristalline de l'HAP. Projection sur le plan (0001). Adapté d'Ivanova *et al.* [27].

- **Obtention :**

L'HAP stœchiométrique peut être obtenue par différents procédés. La co-précipitation en milieu aqueux, par ajout d'une base des ions calcium et phosphates avec un rapport atomique Ca/P de 1,667, permet d'obtenir un précipité phosphocalcique qui sera filtré, séché puis traité thermiquement. La céramique obtenue consiste en un mélange d'HAP majoritaire plus une ou plusieurs phases minoritaires pouvant être du β -TCP ou du CaO [28, 29]. Une autre voie consiste en la réaction à l'état solide d'autres CaP (MCPM, DCPA, DCPD, OCP) avec du CaO, Ca(OH)_2 ou CaCO_3 à des températures supérieures à 1200°C [25].

La synthèse à l'état solide peut aussi se réaliser à partir de sels de calcium et phosphates tels que le nitrate de calcium et le phosphate d'ammonium dibasique [30].

L'HAP est aussi obtenue par voie sol-gel [31, 32] ou encore par synthèse hydrothermale [33].

1.2.1.2. HAP déficitaire en calcium

- **Structure :**

L'HAP déficitaire en calcium (CaD-HAP) de formule $\text{Ca}_{10-x}[\text{I}]_x(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{OH})_{2-z}$ possède certains tétraèdres PO_4^{3-} substitués par les ions HPO_4^{2-} en plus de lacunes au niveau des sites Ca^{2+} ([I]). Par conséquent, suivant le taux de substitution des ions PO_4^{3-} , le rapport atomique Ca/P compris entre 1,33 et 1,65 est plus faible que celui de l'HAP et les paramètres de maille sont modifiés. Il en résulte une plus grande solubilité du CaD-HAP par rapport à l'HAP [34].

- **Obtention :**

Il existe deux méthodes majeures de synthèse par chimie douce se déroulant à des températures inférieures à 100°C.

La première, telle qu'utilisée pour l'obtention de l'HAP stœchiométrique, consiste en la co-précipitation en phase aqueuse des précurseurs du calcium et des phosphates, mais sans traitement thermique post-synthèse. Le pH, la température, le rapport atomique Ca/P, la vitesse d'ajout de la base ainsi que la durée de synthèse sont des paramètres majeurs sur la nature de la CaD-HAP obtenue [26, 33].

La seconde méthode consiste en l'hydrolyse en phase aqueuse à $\text{pH} > 4,5$ d'un CaP (ACP, DCPD, OCP...) vers une CaD-HAP qui est thermodynamiquement plus stable dans ces conditions de synthèse [34, 35].

1.2.1.3. HAP carbonatée

Les apatites géologiques sont capables d'incorporer la moitié des éléments de la classification périodique [38]. Les ions hydroxyles peuvent être substitués par des ions fluor (fluoroapatite), des chlorures (chloroapatite) ou des carbonates. Les tétraèdres PO_4^{3-} peuvent être substitués partiellement par des complexes anioniques de même charge ou non tels que AsO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} ou SiO_4^{4-} . Dans le cas d'une substitution par SO_4^{2-} par exemple, la perte de charge négative est compensée par une création de lacunes au niveau des sites du calcium entraînant la création d'une HAP sulfatée déficitaire en calcium. Les ions calcium peuvent être substitués par un large nombre de cations métalliques tels que K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} et Y^{3+} , ainsi que par des ions trivalents des terres rares. Dans le domaine biologique, certains ions présentent un intérêt pour leurs rôles bénéfiques sur l'activité cellulaire ou l'intégration d'implants. C'est le cas de l'argent qui joue un rôle antiseptique permettant de limiter l'inflammation lors de la pose d'un implant [39, 40] ou encore du magnésium qui permet d'obtenir une morphologie biomimétique plaquettaire des cristaux d'apatite [41]. Dans la présente étude, les ions carbonates CO_3^{2-} ont retenu l'attention pour leurs propriétés biologiques.

La phase minérale de l'os est naturellement carbonatée [22, 38, 42]. De nombreuses études portent sur l'incorporation de CO_3^{2-} dans les HAP artificielles afin d'obtenir un matériau aux caractéristiques structurale et texturale proches de celles de l'os naturel. Une HAP carbonatée possède une plus grande solubilité que l'HAP stœchiométrique.

- **Structure :**

Les carbonates sont des ions planaires triangulaires possédant deux liaisons C-O et une liaison C=O. Ils peuvent se substituer aux ions hydroxyles, phosphates ou aux deux. L'HAP est alors carbonatée de type A, B ou AB respectivement. La structure cristallographique des HAP carbonatées est de nos jours encore sujette à discussion.

Pour les substitutions de type A, Suetsugu *et al.* [43] indiquent qu'il est généralement considéré que le paramètre de maille a augmente par rapport à celui de l'HAP stœchiométrique et que les ions hydroxyles peuvent être totalement substitués. De plus, les auteurs précisent que les plans triangulaires des ions carbonates sont parallèles à l'axe c de l'HAP avec une des liaisons C-O confondue à ce dernier et occupent aléatoirement six positions équivalentes autour de l'axe c . Fleet [26] a modélisé la substitution des ions OH^- par les ions CO_3^{2-} de géométrie idéale : un triangle équilatéral avec $L_{\text{O-O}} = 2,219 \text{ \AA}$ et $L_{\text{C-O}} =$

1,281 Å. Il en a déduit qu'il existe deux orientations différentes parallèlement à l'axe c , notées A1 et A2 et une normale à l'axe c (Figure I-7).

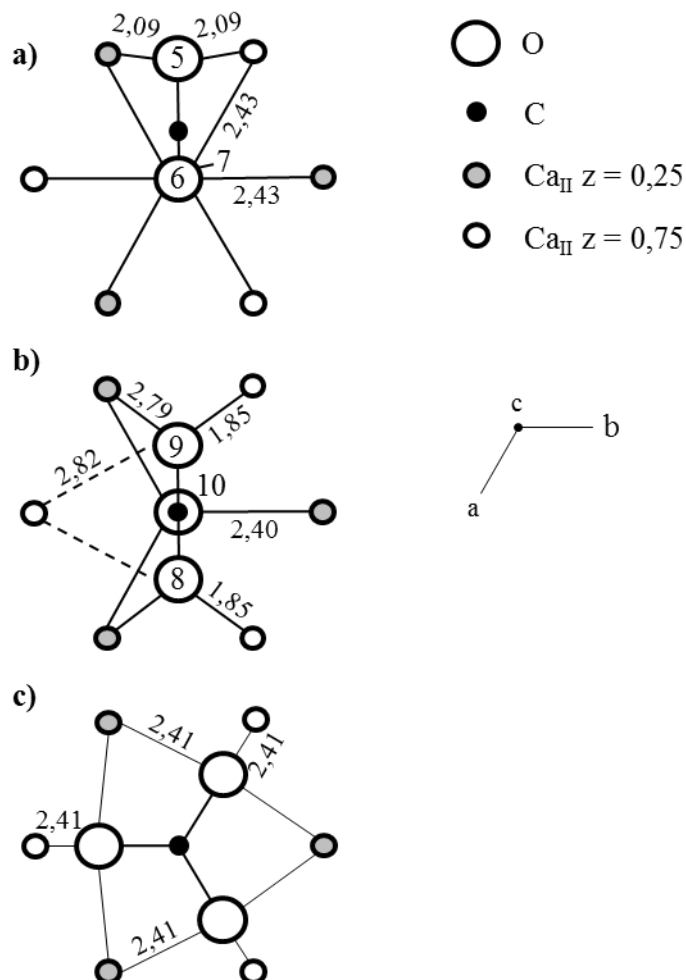


Figure I-7 : Modèles structuraux des tunnels apatitiques occupés par des ions carbonates avec des orientations de type A1 (a), A2 (b) et perpendiculairement à l'axe c (c). longueur des liaisons en Å. Adapté de Fleet [26].

Dans le premier cas (a), les atomes d'oxygène 6 et 7 sont situés au centre du tunnel apatitique sur l'axe c à des hauteurs de $z = 0,67$ et $z = 0,33$ respectivement. Le dernier atome d'oxygène (5) est placé à équidistance de deux ions calcium à une hauteur de $z = 0,5$. Enfin, l'atome de carbone est placé à proximité de l'axe c à une hauteur $z = 0,5$. Dans le deuxième cas (b), l'atome de carbone et l'atome d'oxygène 10 sont placés sur l'axe c avec une hauteur de $z = 0,5$ pour le premier. Les deux autres atomes d'oxygène (8 et 9) sont situés hors de l'axe c à une hauteur de $z = 0,593$. Dans le dernier cas, l'atome de carbone est placé sur l'axe c à une hauteur de $z = 0,436$. Les trois atomes d'oxygène sont situés sur le plan normal à l'axe c à équidistance des ions calcium. Cependant l'auteur [26] explique qu'il existe un écart entre la position réelle et la position idéale des ions carbonates dans le tunnel apatitique. Dans le cas A1, l'atome de carbone et deux des atomes d'oxygène sont proches de l'axe c tandis que le

dernier atome d'oxygène est pratiquement perpendiculaire à cet axe. Peeters *et al.* [44] ont obtenu par calculs *ab initio* que les ions carbonates sont orientés de 7° par rapport à l'axe c . Dans le cas des substitutions de type B, le paramètre de maille a diminue et le paramètre c augmente légèrement. Ce type de substitution ne peut être que partiel. Dans les sites vacants, les carbonates prennent la place d'une des quatre faces des tétraèdres formés par les phosphates substitués (Figure I-8).

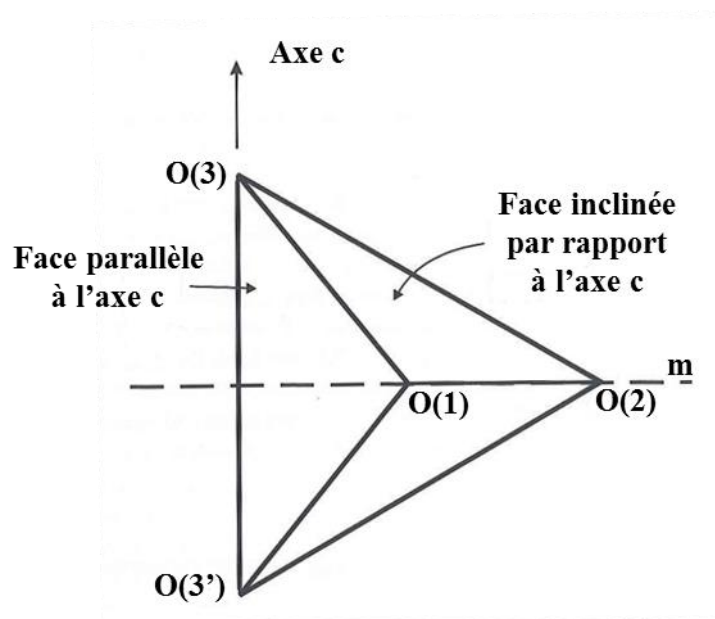
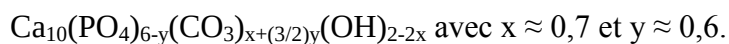


Figure I-8 : Tétraèdre idéal formé par les ions phosphates de la structure apatitique. Adapté de Fleet [26].

Selon Fleet [26] les carbonates occupent les faces inclinées de $35,26^\circ$ par rapport à l'axe c , les atomes d'oxygène occupant les positions O(1), O(2) et O(3) (ou O(3)'). En revanche, suite à l'étude par affinement Rietveld de la diffraction des rayons X sur poudre d'une CaD-HAP obtenue dans un autoclave à 250°C et sous une pression de 0,1 GPa effectuée par Ivanova *et al.* [27], les faces occupées sont celles parallèles à l'axe c , les atomes d'oxygène occupant alors les positions O(3), O(3)' et O(1) (ou O(2)). Enfin, Leventouri *et al.* [45] expliquent que les carbonates occupent le plan miroir des tétraèdres avec deux des atomes d'oxygène en position O(1) et O(2) et le dernier au milieu du segment [O(3) O(3)'] (intersection entre les axes m et c). Les auteurs concluent que la position des carbonates est dépendante de la température de synthèse de l'HAP carbonatée.

Dans le cas des substitutions de type AB, la localisation exacte des carbonates est difficile à déterminer. Fleet et Liu [46] ont synthétisé une HAP carbonatée de type AB au moyen d'un procédé hautes température et pression et en ont déterminé la formule chimique :



La Figure I-9 représente la projection sur le plan 001 de la structure cristallographique moyenne d'une HAP carbonatée de type AB. Les petits cercles et les petits points correspondent aux atomes d'oxygène des carbonates de types A1 et A2 respectivement. La zone en noir correspond à l'occupation d'une face d'un tétraèdre PO_4^{3-} vacant.

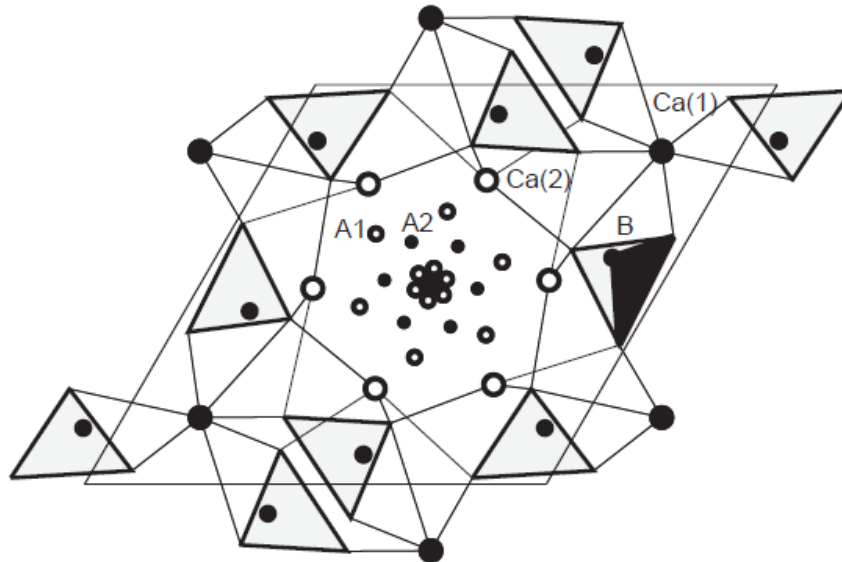


Figure I-9 : Projection sur le plan 001 de la structure cristallographique moyenne d'une HAP carbonatée de type AB [46].

- **Obtention :**

Les HAP carbonatées peuvent être obtenues par des procédés de chimie douce ou en température. Les synthèses par voie humide sont utilisées à des températures $<100^{\circ}\text{C}$ par :

- ajout de NaHCO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ dans la solution pour les synthèses par hydrolyse d'un phosphate de calcium tel que la monétite, la brushite, ou le phosphate octocalcique [26, 47] et par précipitation d'ions calcium et phosphates [26, 48].
- ajout de la calcite CaCO_3 à une solution contenant des phosphates dans les conditions d'une synthèse hydrothermale [26, 49, 50].

Les synthèses peuvent être réalisées par traitement thermique :

- à 900°C d'une HAP stœchiométrique sous un flux de CO_2 anhydre à pression atmosphérique [26].
- entre 800 et 1000°C d'un mélange de CaHPO_4 et de CaCO_3 sous atmosphère de CO_2 dont le taux d'humidité est contrôlé [26].

1.2.2. Utilisation des phosphates de calcium dans le domaine de la chirurgie orthopédique

Le choix de l'hydroxyapatite utilisée dans le domaine orthopédique dépend du rôle qui lui est attribué.

Dans le cas d'implants ou de prothèses dont les propriétés biologiques notamment l'ostéointégration sont importantes, l'utilisation d'une céramique biocompatible telle que l'HAP stœchiométrique est privilégiée [51–54]. L'HAP stœchiométrique étant fragile, elle est souvent combinée à un renfort tel que des fibres de carbone ou du collagène afin d'en améliorer les propriétés mécaniques et biologiques [55–60].

Dans le cas des matériaux de comblement, les HAP déficitaires en calcium et substituées peuvent être utilisées car elles possèdent une plus grande solubilité que l'HAP stœchiométrique ce qui améliore leur ostéointégration [61, 62]. Une autre voie est de combiner de l'HAP stœchiométrique avec un autre CaP plus soluble afin de contrôler la cinétique de dissolution pour optimiser l'intégration du matériau de comblement. Les phosphates de calcium biphasiques (BCP) qui consistent en un mélange de HAP stœchiométrique et de β -TCP sont couramment utilisés [63–66].

Une autre utilisation consiste à employer les HAP comme matériau de recouvrement des prothèses [67, 68]. Ces dernières sont essentiellement en alliage métallique tel que le TiAl6V et leur ostéointégration est limitée : dans certains cas, la tige fémorale pour le remplacement d'une tête de fémur peut finir par se désolidariser de l'os et entraîner des complications pour le patient. De plus, dans le cas de prothèses articulaires telles que les prothèses de hanches, les couples de frottement entre la tête fémorale et la cotyle provoquent une érosion et un relargage de particules métalliques pouvant entraîner une inflammation voire le rejet de la prothèse [69–71]. Le dépôt d'un phosphate de calcium sur une prothèse permet d'en améliorer l'ostéointégration et limite les phénomènes de rejet.

2. Les revêtements phosphocalciques

Il existe quatre grandes familles de biomatériaux : les céramiques, les métaux, les polymères ainsi que les composites. Ils possèdent des propriétés mécaniques et biologiques qui dépendent de la composition chimique, de la structure ainsi que de la texture des matériaux. Les implants et prothèses, autres qu'en céramique, servent souvent de support à un revêtement phosphocalcique afin d'en améliorer leurs biocompatibilité et ostéointégration. Il existe plusieurs techniques de dépôt qui dépendent de la nature du substrat prothétique ainsi que des propriétés finales des prothèses. Cette partie décrit dans un premier temps les substrats les plus couramment utilisés dans le domaine orthopédique ainsi que les techniques de synthèse des revêtements phosphocalciques les plus couramment utilisées. Dans un second temps, les propriétés structurale, texturale et biologique ainsi que les applications des fibres et des tissus de fibres de carbone (FC et TFC) dans le domaine biomédical sont détaillées. Enfin, les techniques de synthèse d'un revêtement phosphocalcique à la surface des FC et des TFC sont présentées.

2.1. Revêtement phosphocalcique sur des substrats conventionnels

2.1.1. Substrats métalliques

Cette famille de biomatériaux est subdivisée en trois groupes : les alliages à base de fer, de cobalt et de titane.

Les aciers inoxydables présentent une bonne résistance à la corrosion et à la fatigue à court terme et sont facilement usinables pour un faible coût. Cependant, ils ont tendance à se corroder à long terme et ils possèdent un haut module élastique induisant des sollicitations mécaniques qui entraînent une résorption du tissu osseux en contact de la prothèse pouvant provoquer un descellement de cette dernière. De plus, ces alliages contiennent du nickel et du chrome pour améliorer leur résistance à la corrosion mais pouvant induire des réactions inflammatoires chez les patients allergiques à ces éléments. Ces aciers sont employés pour des implants temporaires ou permanents.

Les alliages à base de cobalt présentent une bonne biocompatibilité, une bonne résistance à la corrosion à long terme ainsi que de bonnes résistances à la fatigue et à l'usure. Ces alliages possèdent les mêmes défauts que les aciers inoxydables quant aux problèmes imposés par le haut module élastique ainsi que par les risques d'allergies dus au cobalt et aux éléments d'alliages. Qui plus est, ces alliages sont difficiles et coûteux à produire. Ils sont employés pour les implants articulaires permanents.

Les alliages à base de titane ont les avantages en plus d'être légers, de posséder les meilleures résistances à la corrosion et biocompatibilité de la famille des substrats métalliques ainsi qu'un faible module élastique. En revanche, ils possèdent des faibles résistances au cisaillement et à l'usure et provoquent toujours, dans une moindre mesure, des phénomènes de résorption de l'os. Ces alliages sont utilisés pour les implants temporaires et permanents ainsi que pour les tiges des prothèses de hanche [20].

2.1.1.1. Substrats polymériques

Le polymère le plus utilisé pour les prothèses de hanche, genou, épaule et cheville est le polyéthylène à très haut poids moléculaire (UHMWPE). C'est un thermoplastique qui souffre aussi de problèmes de résistance à la friction et à l'usure. Dans les années 90, une nouvelle génération d'UHMWPE ayant subi des traitements thermiques et des irradiations par rayons gamma ou par faisceaux d'électrons possède une meilleure résistance à l'oxydation. L'emploi de ce matériau est courant pour les articulations sous charge (hanche, genou) [20].

2.1.1.2. Substrats composites

Un composite est constitué au minimum d'une matrice et d'un renfort. Le choix des matériaux à utiliser dépend des propriétés finales attendues. Le but principal est d'ajuster les propriétés mécaniques des implants et des prothèses afin d'en améliorer la biocompatibilité et l'intégration dans l'organisme. Les céramiques sont souvent renforcées par des polymères ou des fibres de carbone afin d'améliorer leur élasticité [72, 73]. Une matrice polymérique peut être renforcée par des particules de CaP [74, 75] ou des fibres de carbone [76, 77]. Les composites carbone/carbone peuvent posséder les mêmes résistances mécanique et élasticité que les os humains ce qui augmente la biocompatibilité [78].

Il est à noter que ces différents matériaux peuvent être combinés afin d'obtenir des prothèses alliant leurs avantages. C'est le cas des prothèses de hanche (Figure I-10), où la tête fémorale et le cotyle sont constitués de matériaux différents du reste de la prothèse. Ainsi, la formation de débris issus des frottements lors du mouvement de l'articulation qui peuvent entraîner une inflammation est limitée, améliorant de fait la biocompatibilité de la prothèse.

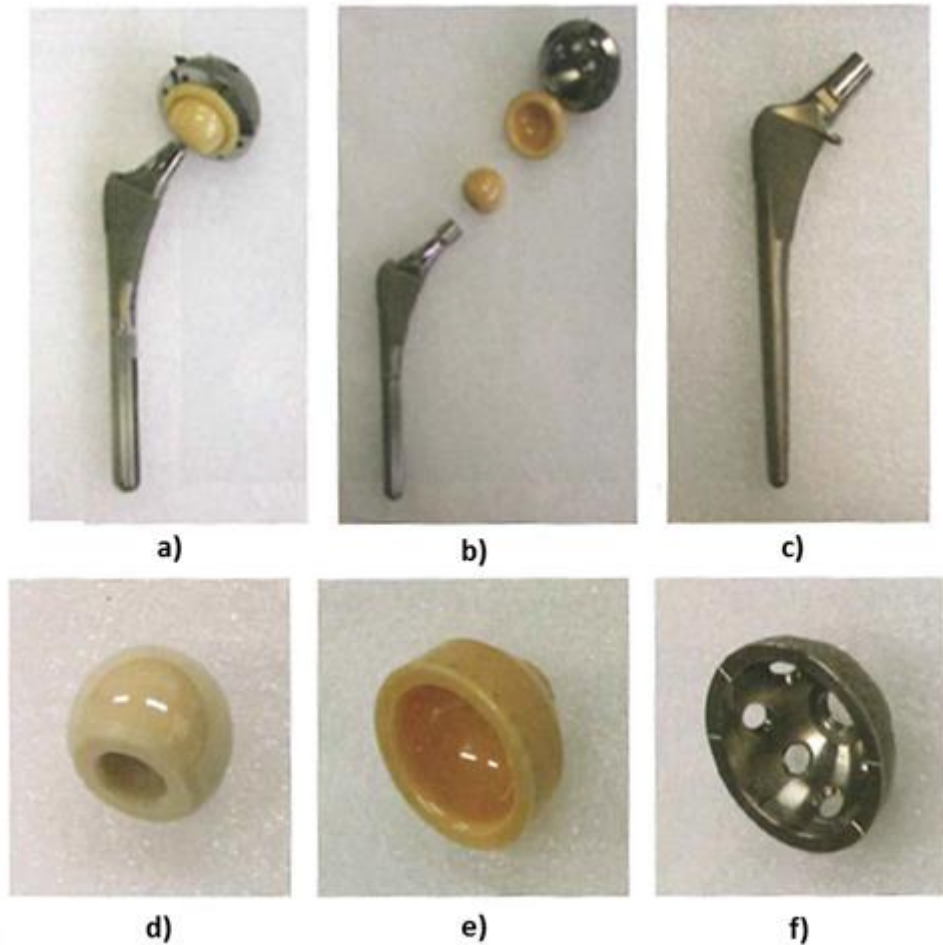


Figure I-10 : Structure d'une prothèse de hanche totale actuelle. a) Prothèse de hanche totale. b) Structure de la prothèse de hanche. c) Tige en alliage de Ti ou de CoCr. d) Tête en alumine ou en alliage CoCrMo. e) Cotyle en UHMPWE. f) Coupe en alliage de Ti [20].

2.1.2. Méthodes de synthèse des revêtements phosphocalciques sur des substrats conventionnels

2.1.2.1. Différentes méthodes de synthèse

De nombreux procédés permettent d'obtenir des revêtements de CaP sur différents types de substrats. La pulvérisation plasma est la méthode la plus utilisée commercialement [79]. C'est un procédé à haute température, de l'ordre de 1500°C, dont le revêtement obtenu consiste en un mélange d'HAP stœchiométrique avec d'autres phases de CaP et du CaO influençant la solubilité du dépôt [80, 81]. Il existe d'autres méthodes telles que la voie sol-gel [32, 82], l'ablation laser [83, 84] ou la bio-minéralisation [85]. Dans ce travail, nous nous intéressons à la voie de synthèse par procédé électrochimique.

2.1.2.2. La synthèse électrochimique

La sono-électrodéposition est un procédé de chimie douce se déroulant à des températures inférieures à 100°C qui consiste en un processus de co-précipitation d'ions calcium et phosphates à la surface d'une électrode. La condition *sine qua non* de l'usage de cette méthode de synthèse est la propriété de conducteur électrique du matériau à recouvrir. C'est pour cette raison que la sono-électrodéposition est utilisée essentiellement pour le recouvrement de substrats métalliques tels que l'acier inoxydable [86] et les alliages à base de titane [87, 88], de magnésium [89] ou de cobalt [71]. Cette méthode de synthèse peut aussi être employée afin de créer un dépôt de CaP à la surface de fibres de carbone [90–94]. Ce mode de synthèse est la principale méthode de dépôt de CaP utilisée lors de ce travail. La méthode de synthèse est détaillée dans le chapitre II de ce mémoire.

2.2. Revêtement phosphocalcique sur des tissus de fibres de carbone

Depuis plus de trente ans, en raison de leurs aspects prometteurs, les fibres de carbone (FC) sont développées pour de nombreuses applications notamment dans les domaines de l'aéronautique et de l'automobile. Cependant, la première utilisation reconnue des FC remonte au XIX^{ème} siècle au Royaume-Uni avec les dépôts d'un brevet provisoire par J.W. Swann en 1878 et d'un brevet par T.A. Edison en 1879 sur l'emploi de fibres de coton carbonisées en tant que filament pour ampoule incandescente. Dès lors, les méthodes de synthèse des FC sont améliorées et à partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, le développement des FC et des tissus de fibres de carbone (TFC) connaît un important essor en particulier aux Etats-Unis, au Japon et au Royaume-Uni [95]. La capacité mondiale de production des FC a été de 111785 tonnes en 2012. Elle atteindra 156845 tonnes en 2016 et 169300 tonnes en 2020 [96]. Les FC et les TFC sont principalement utilisés en tant que renforts pour des matériaux composites dans les domaines suivant [97] :

- Aéronautique : afin de d'améliorer les propriétés mécaniques des pièces des appareils. En 2015, la demande en FC de ce secteur est évaluée à 13000 tonnes.
- Automobile : afin de réduire la masse des véhicules et donc la consommation en carburant. C'est un secteur voué à utiliser les FC de manière massive dans les années à venir.
- Eolien : avec la plus forte croissance du marché prévue : 16 %/an d'ici 2020.

Les problématiques liées au domaine médical, en particulier orthopédique, nécessitent d'innover quant aux matériaux utilisés. Les FC et les TFC, de par leurs propriétés mécaniques et biologiques, se révèlent prometteurs. Les FC ont déjà été étudiées en tant que substituts des tendons ou pour la réparation de cornée [90]

Cette partie présente les généralités relatives à la fabrication des FC et des TFC et l'état de l'art de l'impact des paramètres physico-chimiques des FC sur leur biocompatibilité et leur bioactivité.

2.2.1. Généralités sur les fibres et les tissus de fibres de carbone

2.2.1.1. Fabrication des fibres et les tissus de fibres de carbone

De nombreux procédés de fabrication sont développés pour produire les FC et les TFC. Ils sont dépendants des précurseurs utilisés. Les précurseurs les plus souvent utilisés sont ceux à base de polyacrylonitrile, de brai et de cellulose. Dans cette présente étude, les TFC utilisés ont pour précurseur une résine phénolique. C'est un polymère dont le processus de transformation en FC ou TFC est similaire à celui du polyacrylonitrile. Cette partie décrit un procédé d'obtention des FC à précurseur polymère et le mode de fabrication des TFC.

2.2.1.1.1 Procédé d'obtention des fibres de carbone ex-polymère.

- **La chimie du polymère et son filage :**

La solution initiale consiste en un mélange entre un solvant dans lequel est solubilisé le précurseur (un monomère tel que l'acrylonitrile) et une solution coagulante dont le choix va déterminer la pureté du polymère et donc sa stabilité thermique. Le monomère est mélangé à des comonomères tels l'acrylate et le méthacrylate de méthyle afin de stabiliser les fibres polymériques et éviter la fusion des filaments lors de l'étape d'oxydation. Le mélange est passé dans une filière afin d'obtenir les fibres polymériques dont la forme et le diamètre dépendent de ceux de la filière et de la formulation du mélange. C'est au cours du filage que les chaînes moléculaires de la structure chimique du polymère sont orientées selon une direction moyenne qui est celle de l'axe de la fibre. En sortie de filière, les fibres sont étirées à chaud par passage sur des rouleaux chauffés dans le but de leur conférer une orientation axiale préférentielle. Au cours du filage, les fibres subissent un étirage de plusieurs fois leur longueur originelle. Les conditions de l'étirage (température, taux d'étirage et agents de filage) conditionnent les propriétés mécaniques ultérieures des fibres de carbone. Les fibres de précurseurs sont ensuite enroulées sur des bobines.

Par la suite, les fibres dites « telles que filées » (« as-spun fibers » en anglais) sont rassemblées en mèches puis subissent plusieurs étapes de traitement (Figure I-11).

- **L'oxydation :**

Cette étape consiste à oxyder thermiquement à l'air (sous tension mécanique pour empêcher tout rétrécissement de la fibre) les fibres polymériques pour les stabiliser par un

processus de cyclisation et réticulation du polymère. L'oxydation se passe sous air à des températures comprises entre 200 à 300 °C et des durées allant de 30 min à 5h [98]. Lors de l'oxydation, le rôle de l'oxygène est double : il agit comme initiateur à la formation des sites actifs pour la cyclisation et favorise la réorganisation des chaînes polymériques, et il inhibe la cyclisation ultérieure de ses sites actifs. Un traitement oxydant engendre la formation de doubles liaisons carbonées qui contribuent à la stabilité du polymère cyclique. Une fibre est dite stabilisée quand sa prise de masse en oxygène est supérieure à 6%. Les conditions d'oxydation des fibres ont un rôle important pour l'optimisation des propriétés mécaniques des fibres de carbone. Les fibres thermoplastiques d'une couleur initialement blanche deviennent à cette étape de couleur noire et dans un état infusible thermiquement stable.

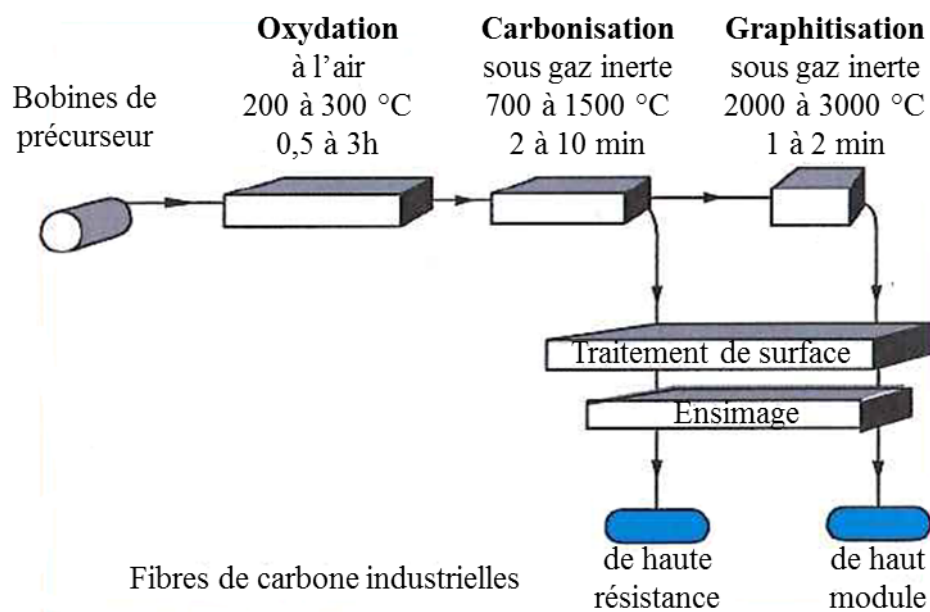


Figure I-11 : Principe du procédé de fabrication des fibres de carbone ex-polymère. Adapté de Dupupet [98].

- **La carbonisation :**

Au cours de cette étape, les fibres stabilisées vont être carbonisées à une vitesse de chauffe très lente (quelques degrés par minute), à des températures allant de 1200 °C à 1500°C, sous atmosphère inerte telle l'azote pendant une période de 2 à 10 min. Au cours des premiers stades de la pyrolyse, l'hydrogène est éliminé sous forme de CH₄ et la plupart des hétéroatomes sont éliminés sous forme de gaz tels que H₂O, CO₂, CO, HCN, N₂ et NH₃. La Figure I-12 présente les mécanismes de la condensation chimique en température d'une résine phénolique à base d'un polymère phénol-formaldéhyde. Au cours du processus, les fibres de polymère perdent environ 50 % de leur masse et les fibres carbonisées contiennent entre 90 et

97 % en masse de carbone, moins de 10 % d'azote, environ 1 % d'oxygène et moins d'1 % d'hydrogène. Les fibres possèdent des propriétés mécaniques qui dépendent également de la température de traitement.

Au cours des étapes d'oxydation et de carbonisation, pour pallier à leur désorientation due aux réarrangements structuraux, les fibres sont maintenues sous tension afin de conserver l'orientation axiale des fibres. Les fibres obtenues sont dites de haute résistance (HR) [98, 99].

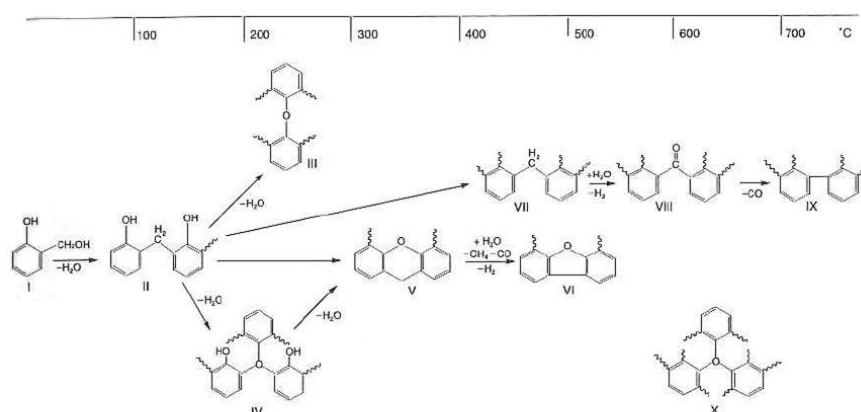


Figure I-12 : Schéma réactionnel de la pyrolyse du polymère phénol-formaldéhyde [95].

- **La graphitisation** (étape facultative) :

La graphitisation est le processus par lequel un matériau carboné peut atteindre un ordre cristallin tridimensionnel plus ou moins proche de celui du graphite.

A cette étape, les fibres carbonisées sont traitées thermiquement sous atmosphère inerte à des températures comprises entre 2000 à 3000 °C durant quelques minutes, avec ou sans tension mécanique. A cette étape, la fibre finale est constituée à 100% de carbone. Ce traitement thermique permet une croissance des feuillets aromatiques ainsi que leur alignement le long de l'axe de fibre. Les fibres de carbone perdent alors de la résistance à la traction mais gagnent en module élastique. Les fibres obtenues sont dites de haut module (HM) [98, 99].

- **Les traitements de surface :**

Dans un composite renforcé par des FC, l'état de surface des fibres est déterminant sur leur adhésion avec la matrice. La surface des fibres étant peu réactive, il est nécessaire de l'attaquer afin d'y créer des rugosités et des fonctions chimiques augmentant l'adhésion avec la matrice. Ces traitements sont des oxydations qui peuvent être chimiques [100, 101] (acide

nitrique concentré, traitement thermique, oxydation électrochimique) ou physiques [102] (plasma). Ces traitements servent aussi à activer les FC. Cela signifie que l'attaque de la surface des fibres permet d'accéder à leur porosité interne et ainsi d'augmenter leur surface spécifique. Ainsi, les FC activées présentent une grande capacité d'adsorption utile dans des applications telles que la dépollution de l'eau [98].

- **L'ensimage :**

C'est un traitement des fibres qui permet d'augmenter l'adhésion entre les filaments, d'augmenter la mouillabilité lors de l'imprégnation des fibres de carbone dans une matrice et qui sert de lubrifiant afin de faciliter les opérations de tissage. L'agent d'ensimage est un polymère tel que le polyhydroxyéther, l'isopropène ou encore le silicone dont le choix d'utilisation est déterminé par la nature de la matrice dans le cas des composites. L'ensimage peut s'effectuer par dépôt depuis une solution de polymère, par électrodéposition, par électropolymérisation ou par polymérisation plasma [95].

2.2.1.1.2 Procédé d'obtention des tissus de fibres de carbone

Dans le cadre de fabrications des matériaux composites, il est intéressant de pouvoir profiter des propriétés mécaniques des FC dans les différentes directions du matériau composite. Ainsi, il est nécessaire de fabriquer des structures en fibres de carbone dont les architectures vont leur conférer des propriétés mécaniques différentes.

La technologie pour produire les TFC est directement inspirée de celle pour l'industrie textile. L'étape de tissage se situe entre les étapes d'oxydation et de carbonisation ou après l'étape de carbonisation.

2.2.1.2. Structure, texture des FC et architecture des TFC

Il existe plusieurs formes allotropiques du carbone dont trois formes cristallines parfaitement ordonnées : le graphite, le diamant et les fullerènes. De plus, il existe une grande variété de structures plus ou moins ordonnées. C'est le cas du carbone de structure turbostratique qui compose les fibres de carbone. Dans le but de comprendre la structure des FC, celle du graphite est décrite dans un premier temps.

2.2.1.2.1 Le graphite

Le graphite cristallise dans un système hexagonal appartenant au groupe de symétrie C6/mmc, stable thermodynamiquement, avec un empilement des plans polyaromatiques d'atomes de carbone de type ABAB (Figure I-13) [103]. La maille élémentaire contient quatre

atomes de carbone aux coordonnées $(0 ; 0 ; \frac{1}{4})$, $(0 ; 0 ; \frac{3}{4})$, $(\frac{1}{3} ; \frac{2}{3} ; \frac{1}{4})$, $(\frac{2}{3} ; \frac{1}{3} ; \frac{3}{4})$ et les paramètres de la maille hexagonale sont $a = b = 2,461 \text{ \AA}$ et $c = 6,708 \text{ \AA}$.

Ces plans aussi appelés feuillets graphitiques ou graphènes, espacés de $3,354 \text{ \AA}$ sont liés entre eux par des interactions de type Van Der Waals avec une énergie de 7 kJ/mol . Au sein d'un même plan, les atomes de carbone sont 100% hybridés sp^2 et liés entre eux par des liaisons covalentes d'énergie 524 kJ/mol et de $1,42 \text{ \AA}$ de longueur.

L'arrangement anisotrope du graphite lui confère des propriétés de conductivité thermique et électrique beaucoup plus importantes dans les directions parallèles aux plans de graphènes que perpendiculaires. Les propriétés mécaniques sont aussi dépendantes de l'orientation des plans. On peut noter que les faibles forces d'interactions entre les plans permettent de les faire glisser les uns par rapport aux autres et confèrent une propriété de lubrifiant au graphite. Ces propriétés existent dans d'autres matériaux carbonés mais elles varient en fonction de la texture du matériau. C'est notamment le cas pour les FC et les TFC.

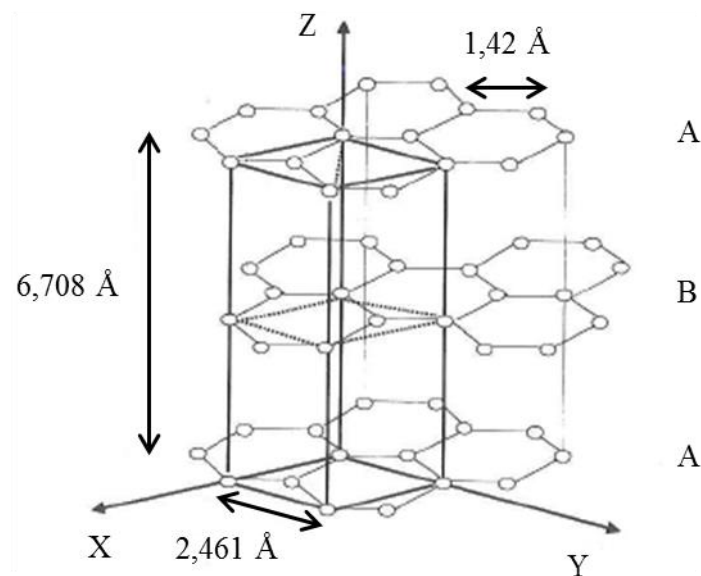


Figure I-13 : Structure du graphite hexagonal. Adapté de Bernal [103].

2.2.1.2.2 Les fibres de carbone

Toutes les fibres de carbone sont formées d'unités structurales de base (USB), associées bord à bord les unes aux autres. L'unité structurale de base est un empilement d'au moins deux feuillets aromatiques carbonés. Les petits feuillets aromatiques sont empilés parallèlement avec des rotations aléatoires dans leur plan, c'est un empilement dit de structure

turbostratique. Le diamètre des USB est d'environ 0,7 à 1 nm. Les USB sont reliées entre elles par des liaisons complexes constituant des zones de défauts qui peuvent être dus à la présence d'hétéroatomes et de carbones hybridés sp^3 . L'association des USB forme des nappes de longueur et d'épaisseur variables selon les fibres [104].

Précédemment, on a vu que l'on distingue deux types de FC : les fibres dites de haute résistance (HR) et les fibres dites de haut module élastique (HM) dont l'obtention dépend des conditions de synthèse. Le précurseur des FC joue aussi un rôle sur les caractéristiques et propriétés finales. Guigon *et al.* [104] décrivent les FC ex –PAN haute résistance comme un enchevêtrement de nappes (de diamètre $L_{a(OML)}$ et d'épaisseur L_c) formées d'USB (de diamètre $L_{a(USB)}$) comme schématisé sur la Figure I-14 et sur la Figure I-15 a).

La Figure I-15 a) montre que les nappes carbonées se regroupent pour former des volumes orientés parallèlement à l'axe de fibre (orientation moléculaire locale). Elles ménagent entre elles des pores, ce qui confère une compacité plus ou moins grande à la fibre.

Pour les FC ex –PAN haut module, schématisées sur la Figure I-15 b), du fait du traitement thermique à haute température, les zones de défauts entre les USB tendent à disparaître, il s'ensuit une évolution structurale qui se caractérise par le fait que le diamètre des USB croît, qui aboutit à une continuité des couches aromatiques. A 2800°C, les couches aromatiques sont continues et presque planes.

Pour les fibres de carbone de haute résistance (HR), la résistance en traction atteint une valeur maximum pour une température dépendante du précurseur. Typiquement, pour les fibres ex-PAN, la résistance à la rupture varie de 3,2 GPa (Toray 300) à 7 GPa (Toray 1000). Quant au module élastique, il augmente avec la température de traitement. Pour les fibres ex-PAN après traitement de carbonisation, la valeur du module de Young varie entre 230 et 300 GPa. A titre d'exemple, pour les fibres ex-PAN haut module (HM), la résistance à la rupture varie entre 1,6 et 4,5 GPa et le module de Young entre 350 et 600 GPa [99]. Il faut cependant noter que l'activation chimique ou physique des fibres de carbone entraîne une diminution de leur résistance en traction.

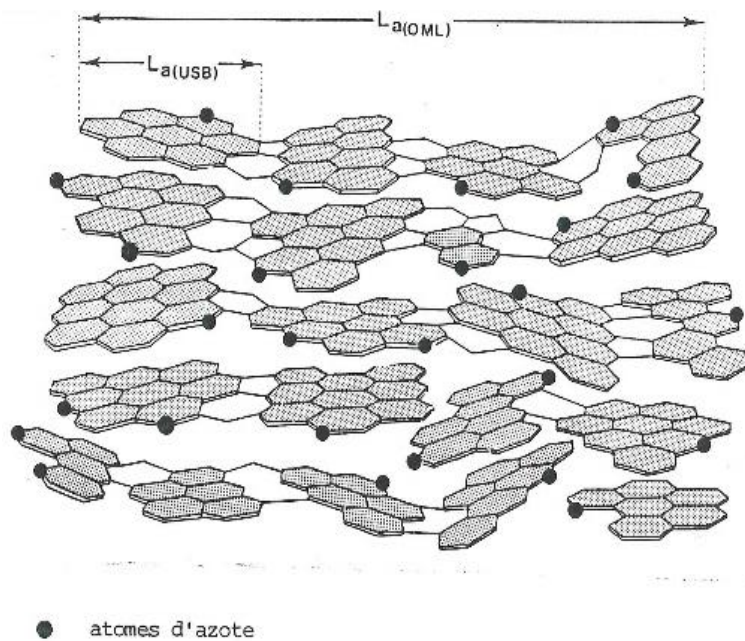


Figure I-14 : Relation entre les unités structurales de base (USB) et les orientations moléculaires locales (OML) dans une fibre de carbone haute résistance [99].

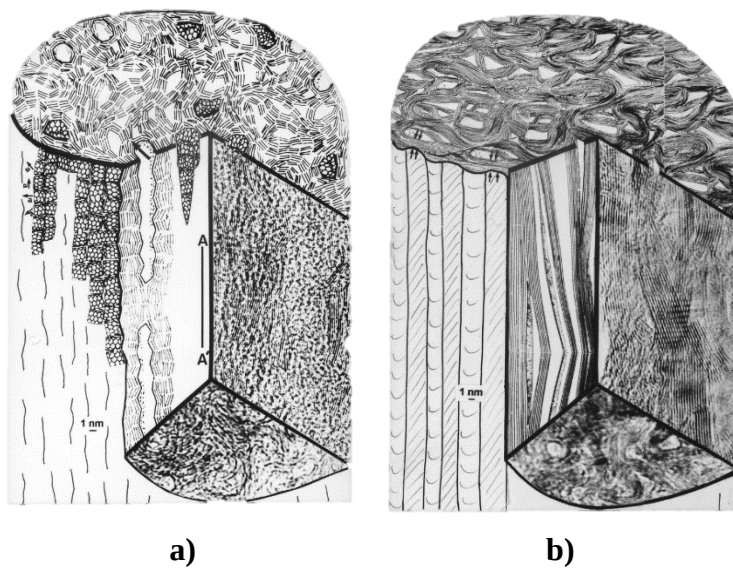


Figure I-15

Figure I-15 : Modèles structuraux pour des fibres de carbone ex-PAN de haute résistance (a) et de haut module (b). Adapté de Guigon et al. [104].

2.2.1.2.3 Architecture des tissus de fibres de carbone

Il existe quatre grandes familles d'architectures : non-tissée, unidirectionnelle, 2-D et 3-D. Chacune de ces familles possèdent plusieurs sous familles dont l'obtention dépend du procédé utilisé. Dans cette étude, il sera uniquement décrit les architectures 2-D. Elles sont subdivisées en trois catégories : les tissées, les tricotées et les tressées. Seules les deux premières catégories seront décrites dans ce chapitre.

- **Les architectures tissées :**

Ces architectures consistent en l'entrelacement de fibres orientées à 0° et 90° . Il existe plusieurs architectures tissées, appelées armures, dont les arrangements des fibres vont conférer des propriétés de densité, de flexibilité et de résistance à l'abrasion. La Figure I-16 donne deux exemples d'architectures tissées. L'armure toile (a) est le modèle le plus simple et le plus couramment utilisé. Il consiste en une alternance « dessus-dessous » de chaque fibre. L'armure nattée (b) suit le même principe que l'armure toile sauf que chaque fibre est doublée. Ceci lui confère une plus grande densité et une meilleure flexibilité que pour l'armure toile mais diminue sa résistance à l'abrasion.

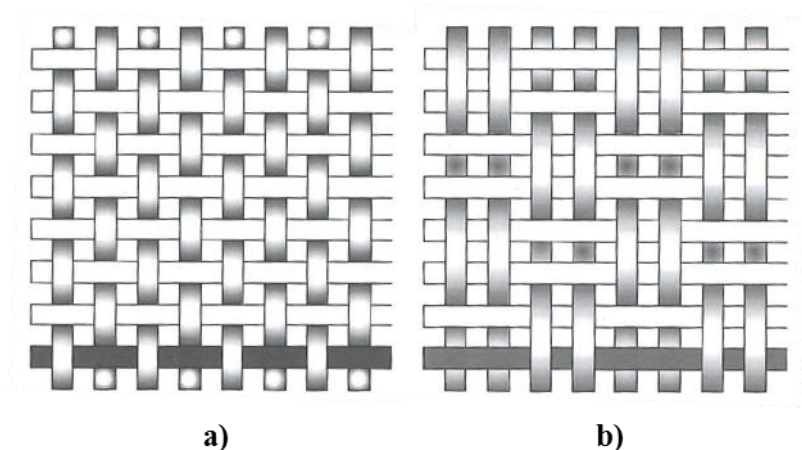


Figure I-16 : Schéma des architectures des tissus de types armure toile (a) et armure nattée (b). Adapté de Morgan [95].

- **Les architectures tricotées :**

Ces architectures consistent en un enchevêtrement de fils formant des boucles (appelées points) interpénétrées. Les tricots sont généralement plus résistants à la déchirure que les tissus. La Figure I-17 donne des exemples de tricots. Dans le cas du tricot de type maille, les points sont alignés en colonnes alors que dans le type chaîne, les points sont placés en « zig-zag » ce qui confère une meilleure résistance au délitement au niveau des bords de la pièce que pour un tricot de type maille.

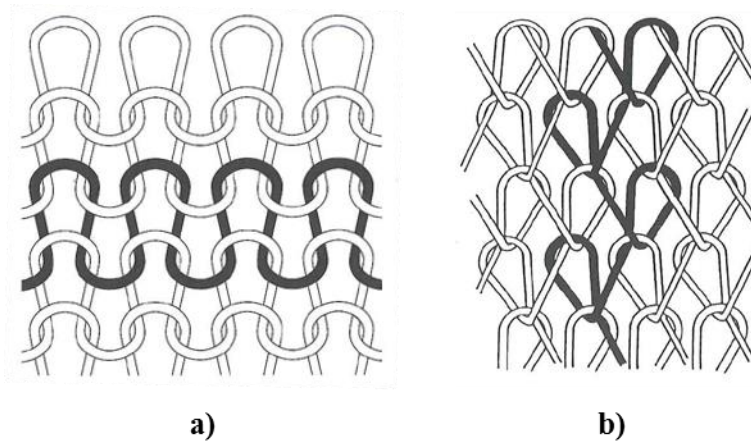


Figure I-17 : Schéma des architectures de tricots de types « maille » (a) et « chaîne » (b). Adapté de Morgan [95].

2.2.2. Biocompatibilité et bioactivité

La mouillabilité est le paramètre qui régit la capacité des FC à interagir avec le milieu environnant proche dont les cellules et les protéines. Moreno-Castilla *et al* [105] indiquent que les cellules vivantes s'attachent à la surface de carbones activés par des interactions électrostatiques et hydrophobiques. Il est possible de moduler la mouillabilité des FC par oxydation chimique [106,107] ou électrochimique [108, 109] et par des traitements thermiques [110] ou plasma [102, 111]. Blazewicz [112] montre que la présence de fonctions acide à la surface des fibres de carbone accélère la régénération des muscles, en plus de favoriser leur phagocytage et donc leur bio-résorption [107]. Cependant, ces fonctions tendent à inhiber la régénération osseuse [107]. En revanche, les fonctions basiques semblent profitables à la réparation du tissu osseux.

Nous avons vu précédemment que la porosité joue un rôle important pour la biocompatibilité et la bioactivité. C'est pourquoi les FC activées qui possèdent une grande surface spécifique ainsi qu'une large distribution en taille de pores ont une plus grande biocompatibilité que les FC non activées. Cette porosité permet de stocker et d'échanger des nutriments avec le milieu extérieur favorisant ainsi l'adhésion et la prolifération des cellules [112, 113].

2.2.3. Méthodes de synthèse d'un revêtement phosphocalcique sur les fibres et les tissus de fibres de carbone

Dans le but d'améliorer les propriétés mécaniques des prothèses et des implants en CaP, les FC sont utilisées en tant que renfort dans des composites synthétisés par pressage en température [56,57]. Comme nous l'avons vu précédemment, les FC et TFC peuvent être employés dans le domaine orthopédique pour leurs propriétés biologiques d'une part et de

souplesse d'autre part. Ainsi, afin de conserver cette dernière propriété tout en améliorant les propriétés de biocompatibilité et de bioactivité, il est nécessaire de pouvoir contrôler la composition chimique et l'épaisseur du dépôt de CaP.

De nombreuses méthodes sont utilisées afin de synthétiser un revêtement de CaP à la surface des FC et des TFC telles que la méthode sol-gel [114], l'ablation laser [115] ou encore la biominéralisation [116]. Les FC et TFC étant des conducteurs électriques, il est possible de les employer en tant qu'électrode lors de l'électrophorèse [117, 118] ou de l'électrodéposition de phosphates de calcium [91, 93, 94].

En excluant celles sur les composites C/C, peu d'études ont été réalisées sur l'électrodéposition de CaP sur des FC et des TFC. Le système utilisé est le même que pour l'électrodéposition sur des substrats métalliques à ceci près que la cathode est alors constituée de FC ou d'un TFC. L'électrolyte consiste en une solution aqueuse de nitrate de calcium et de phosphate d'ammonium monobasique.

Han *et al.* ont étudié l'influence des paramètres expérimentaux tels que la concentration de l'électrolyte [91] sur les propriétés du dépôt de CaP sur un TFC. Les auteurs montrent que pour une concentration en calcium supérieure à 16 mmol/L (avec un ratio Ca/P de 1,67 et une densité de courant constante), le dépôt consiste en un mélange de plaquettes, de sphères et d'aiguilles de CaP. En revanche, pour des concentrations inférieures, le dépôt obtenu est constitué uniquement d'aiguilles d'HAP. Ils en déduisent que pour les plus grandes concentrations, le mécanisme du dépôt consiste en une nucléation homogène du CaP dans l'électrolyte suivie de l'adsorption et la croissance des nuclei à la surface des FC. Pour les plus faibles concentrations, la nucléation hétérogène a lieu directement à la surface des FC et elle est suivie par la croissance des sites de nucléation. Les auteurs en concluent que les faibles concentrations ioniques favorisent la formation d'HAP à la surface des fibres de carbone.

Les auteurs ont aussi montré que la densité de courant va influencer la composition chimique du dépôt de CaP ainsi que la taille des cristallites [92]. Ces résultats seront discutés en détail au chapitre IV.

De plus, lors de ces différentes études, les auteurs [91, 93, 94] placent la cellule électrochimique dans un bain à ultrasons. Ces derniers, avec une intensité et une fréquence de 2,16W/cm² et 40 KHz respectivement, permettent d'obtenir un dépôt plus dense et plus divisé, en réduisant la taille des cristallites. Han *et al.* ont aussi étudié la viabilité cellulaire in vitro avec des ostéoblastes humains de la lignée MG-63. Les résultats indiquent que le dépôt de CaP sur le TFC augmente la viabilité cellulaire avec une meilleure accroche des cellules à la

surface du TFC [93]. De plus, les auteurs remarquent que l'application des ultrasons améliore encore la biocompatibilité du matériau [94].

La composition chimique de surface des FC est un facteur important en termes d'adhérence. Tao *et al.* [119] indiquent que l'oxydation par l'acide nitrique des FC permet l'introduction de fonctions acide, notamment de type carboxylique, servant de sites de nucléation du CaP. Lors de l'électrodéposition les fonctions COO^- vont attirer les Ca^{2+} de l'électrolyte par la force de Coulomb et ces derniers vont former des liaisons électrostatiques avec les carboxylates. Ceci permet de diminuer l'énergie d'activation de la nucléation en diminuant l'énergie interfaciale et augmente la supersaturation des ions près de la surface des FC. Récemment, Leilei *et al.* [120] ont utilisé des nanotubes de carbone greffés sur des FC. Les résultats indiquent que la taille des cristallites de HAP carbonatée est plus faible et la quantité de CaP déposée est plus importante que pour un dépôt sur des FC sans nanotubes de carbone. Cependant, les auteurs n'ont pas encore évalué la réponse biologique de ce type de matériau hybride.

Références

1. INSERM. *Biomatériaux*. <http://www.inserm.fr/thematiques/technologies-pour-la-sante/dossiers-d-information/biomateriaux>
2. U.E. *Règlement 889/2008 sur la production biologique, l'étiquetage et les contrôles*, Annexe VIII. 2013
<http://old.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2008R0889:20100701:FR:PDF>
3. Cho JH, Eom Y, Lee TG. *Pilot-test of the calcium sodium phosphate (CNP) process for the stabilization/solidification of various mercury-contaminated wastes*. Chemosphere. déc 2014;117(0):374-81.
4. Mobasherpour I, Salahi E, Pazouki M. *Comparative of the removal of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Ni^{2+} by nano crystallite hydroxyapatite from aqueous solutions: Adsorption isotherm study*. Arab J Chem. oct 2012;5(4):439-46.
5. Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa AR. *Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper*. Int J Adhes Adhes. janv 2014;48(0):238-57.
6. Zhang L, Li H, Li K, Zhang S, Lu J, Li W, et al. *Carbon foam/hydroxyapatite coating for carbon/carbon composites: Microstructure and biocompatibility*. Appl Surf Sci. 1 déc 2013;286(0):421-7.
7. Alghamdi HS, Bosco R, Both SK, Iafisco M, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA, et al. *Synergistic effects of bisphosphonate and calcium phosphate nanoparticles on peri-implant bone responses in osteoporotic rats*. Biomaterials. juill 2014;35(21):5482-90.
8. Arisan V, Anil A, Wolke JG, Özer K. *The effect of injectable calcium phosphate cement on bone anchorage of titanium implants: an experimental feasibility study in dogs*. Int J Oral Maxillofac Surg. mai 2010;39(5):463-8.
9. Bao Hong Zhao, Inho Han, Hai Lan Feng, Wei Bai, Cui F-Z, Lee I-S. *Histological and histomorphometrical study of connective tissue around calcium phosphate coated titanium dental implants in a canine model*. Proc Fifth Asian-Eur Int Conf Plasma Surf Eng. 26 févr 2007;201(9-11):5696-700.
10. Lynn AK, Bonfield W. *A Novel Method for the Simultaneous, Titrant-Free Control of pH and Calcium Phosphate Mass Yield*. Acc Chem Res. 1 mars 2005;38(3):202-7.
11. Ahmed MA, Mansour SF, El-dek SI, Abd-Elwahab SM, Ahmed MK. *Characterization and annealing performance of calcium phosphate nanoparticles synthesized by co-precipitation method*. Ceram Int. sept 2014;40(8, Part B):12807-20.

12. Medvecky L, Sopcak T, Girman V, Briancin J. *Amorphous calcium phosphates synthesized by precipitation from calcium D-gluconate solutions*. Colloids Surf Physicochem Eng Asp. 20 janv 2013;417(0):191-200.
13. Carlsson H, Aspegren H, Lee N, Hilmer A. *Calcium phosphate precipitation in biological phosphorus removal systems*. Water Res. mai 1997;31(5):1047-55.
14. Park Y, Kim SH, Matalon S, Wang N-HL, Franses EI. *Effect of phosphate salts concentrations, supporting electrolytes, and calcium phosphate salt precipitation on the pH of phosphate buffer solutions*. Fluid Phase Equilibria. 15 avr 2009;278(1-2):76-84.
15. Champion E. *Sintering of calcium phosphate bioceramics*. Acta Biomater. avr 2013;9(4):5855-75.
16. Lukić M, Stojanović Z, Škapin SD, Maček-Kržmanc M, Mitrić M, Marković S, et al. *Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering*. J Eur Ceram Soc. janv 2011;31(1-2):19-27.
17. Mouthuy P-A, Crossley A, Ye H. *Fabrication of calcium phosphate fibres through electrospinning and sintering of hydroxyapatite nanoparticles*. Mater Lett. 1 sept 2013;106(0):145-50.
18. Zhang F, Lin K, Chang J, Lu J, Ning C. *Spark plasma sintering of macroporous calcium phosphate scaffolds from nanocrystalline powders*. J Eur Ceram Soc. 2008;28(3):539-45.
19. Dorozhkin SV. *Amorphous calcium (ortho)phosphates*. Acta Biomater. déc 2010;6(12):4457-75.
20. Chen Q, Thouas G. *Biomaterials. A basic Introduction*. Taylor & Francis Group; 2015. 706 p.
21. André J-M, Catala M, Morère J-J, Escudier E, Katsanis G, Poirier J. *Histologie : les tissus*. Service d'Histologie-Embryologie, Faculté de médecine Pierre & Marie Curie; 2008. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/histoP1.pdf>
22. Murugan R, Ramakrishna S, Panduranga Rao K. *Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone*. Mater Lett. oct 2006;60(23):2844-7.
23. *Cycle de remodelage osseux*. <http://cdn.pearltrees.com/s/pic/la/cycle-remodelage-osseux-75171724>
24. Emilov-Velev K, Clemente-de-Arriba C, Alobera-García MÁ, Moreno-Sansalvador EM, Campo-Loarte J. *Bone regeneration in experimental animals using calcium phosphate cement combined with platelet growth factors and human growth hormone*. Rev Esp Cir Ortopédica Traumatol Engl Ed. mai 2015;59(3):200-10.
25. Dorozhkin SV, Epple M. *Biological and medical significance of calcium phosphates*. Angew Chem Int Ed. 2002;41(17):3130-46.

26. Fleet M. *Carbonated hydroxyapatite: Materials, Synthesis and Applications*. Pan Stanford Publishing; 2015.
27. Ivanova TI, Frank-Kamenetskaya OV, Kol'tsov AB, Ugolkov VL. *Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition*. J Solid State Chem. sept 2001;160(2):340-9.
28. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. *Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders*. Biomaterials. 15 févr 2002;23(4):1065-72.
29. Inthong S, Tunkasiri T, Eitssayeam S, Pengpat K, Rujijanagul G. *Physical properties and bioactivity of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by a co-precipitation route*. 8th Asian Meet Electroceramics AMEC-8. mai 2013;39, Supplement 1(0):S533-6.
30. Guo X, Yan H, Zhao S, Li Z, Li Y, Liang X. *Effect of calcining temperature on particle size of hydroxyapatite synthesized by solid-state reaction at room temperature*. Adv Powder Technol. nov 2013;24(6):1034-8.
31. Malakauskaite-Petruleviciene M, Stankeviciute Z, Niaura G, Prichodko A, Kareiva A. *Synthesis and characterization of sol-gel derived calcium hydroxyapatite thin films spin-coated on silicon substrate*. Ceram Int. juill 2015;41(6):7421-8.
32. Tredwin CJ, Georgiou G, Kim H-W, Knowles JC. *Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method: Bonding to titanium and scanning electron microscopy*. Dent Mater. mai 2013;29(5):521-9.
33. Suchanek K, Bartkowiak A, Gdowik A, Perzanowski M, Kac S, Szaraniec B, et al. *Crystalline hydroxyapatite coatings synthesized under hydrothermal conditions on modified titanium substrates*. Mater Sci Eng C. 1 juin 2015;51(0):57-63.
34. Mavropoulos E, Rossi AM, da Rocha NCC, Soares GA, Moreira JC, Moure GT. *Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions*. Braz Mater Res Soc Symp Curr Trends Nanostructured Mater Semicond Mater Thin Films Biomater. mars 2003;50(2-3):203-7.
35. Liou S-C, Chen S-Y, Lee H-Y, Bow J-S. *Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders*. Biomaterials. janv 2004;25(2):189-96.
36. Wang M-C, Chen H-T, Shih W-J, Chang H-F, Hon M-H, Hung I-M. *Crystalline size, microstructure and biocompatibility of hydroxyapatite nanopowders by hydrolysis of calcium hydrogen phosphate dehydrate (DCPD)*. Ceram Int. mars 2015;41(2, Part B):2999-3008.
37. Y.E. G, J.D. B, A. S, L.S. N, P.W. B, H.R. A, et al. *Hydrolysis of Ca-deficient hydroxyapatite precursors in the presence of alanine-functionalized polyphosphazene nanofibers*. Ceram Int. janv 2013;39(1):519-28.

38. Wopenka B, Pasteris JD. *A mineralogical perspective on the apatite in bone*. NATO Adv Study Inst ASI Learn Nat Des New Implant Biomater Biominer Fundam Biomim Mater Process Routes and NATO Adv Study Inst ASI Learn Nat Des New Implant Biomater Biominer Fundam Biomim Mater Process Routes. 28 avr 2005;25(2):131-43.
39. Trujillo NA, Oldinski RA, Ma H, Bryers JD, Williams JD, Popat KC. *Antibacterial effects of silver-doped hydroxyapatite thin films sputter deposited on titanium*. Mater Sci Eng C. 1 déc 2012;32(8):2135-44.
40. Rajendran A, Barik RC, Natarajan D, Kiran MS, Pattanayak DK. *Synthesis, phase stability of hydroxyapatite-silver composite with antimicrobial activity and cytocompatibility*. Ceram Int. août 2014;40(7, Part B):10831-8.
41. Mishra VK, Bhattacharjee BN, Parkash O, Kumar D, Rai SB. *Mg-doped hydroxyapatite nanoplates for biomedical applications: A surfactant assisted microwave synthesis and spectroscopic investigations*. J Alloys Compd. 25 nov 2014;614(0):283-8.
42. Grunenwald A, Keyser C, Sautereau AM, Crubézy E, Ludes B, Drouet C. *Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology*. J Archaeol Sci. sept 2014;49(0):134-41.
43. Suetsugu Y, Takahashi Y, Okamura FP, Tanaka J. *Structure Analysis of A-Type Carbonate Apatite by a Single-Crystal X-Ray Diffraction Method*. J Solid State Chem. déc 2000;155(2):292-7.
44. Peeters A, De Maeyer EA, Van Alsenoy C, Verbeeck RM. *Solids modeled by ab initio crystal-field methods. 12. Structure, orientation, and position of A-type carbonate in a hydroxyapatite lattice*. J Phys Chem B. 1997;101(20):3995-8.
45. Leventouri, Chakoumakos, Papanearchou, Perdikatsis. *Comparison of crystal structure parameters of natural and synthetic apatites from neutron powder diffraction*. J Mater Res. 2001;16:2600-6.
46. Fleet ME, Liu X. *Location of type B carbonate ion in type A-B carbonate apatite synthesized at high pressure*. J Solid State Chem. sept 2004;177(9):3174-82.
47. De Maeyer EAP, Verbeeck RMH, Naessens DE. *Optimization of the preparation of Na⁺ and CO₃²⁻ containing hydroxyapatite by the hydrolysis of monetite*. J Cryst Growth. févr 1994;135(3-4):539-47.
48. Landi E, Celotti G, Logroscino G, Tampieri A. *Carbonated hydroxyapatite as bone substitute*. Ceram Met Interfaces. 2003;23(15):2931-7.
49. Guo Y-P, Yao Y-B, Guo Y-J, Ning C-Q. *Hydrothermal fabrication of mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system*. Microporous Mesoporous Mater. 1 juin 2012;155(0):245-51.
50. Pham Minh D, Nzihou A, Sharrock P. *Carbonated hydroxyapatite starting from calcite and different orthophosphates under moderate hydrothermal conditions: Synthesis and surface reactivity in simulated body fluid*. Mater Res Bull. déc 2014;60(0):292-9.

51. Kobayashi T, Gyo K, Shinohara T, Yanagihara N. *Ossicular reconstruction using hydroxyapatite prostheses with interposed cartilage*. Am J Otolaryngol. juill 2002;23(4):222-7.
52. Fricia M, Passanisi M, Salamanna F, Parrilli A, Giavaresi G, Fini M. *Osteointegration in custom-made porous hydroxyapatite implants: from reconstructive surgery to regenerative medicine*. World Neurosurg. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878875015002946>
53. Qing Y, Yi J, Xiao-yan W, Ke-fei Z. *Inflammatory responses to Hydroxyapatite implants in middle ear in rats*. J Otol. juin 2008;3(1):24-8.
54. Yang L, Jian-jun S. *Infection associated with hydroxyapatite prosthesis and related factors*. J Otol. juin 2010;5(1):24-9.
55. Zhang X, Zhang Y, Zhang X, Wang Y, Wang J, Lu M, et al. *Mechanical properties and cytocompatibility of carbon fibre reinforced nano-hydroxyapatite/polyamide66 ternary biocomposite*. J Mech Behav Biomed Mater. févr 2015;42(0):267-73.
56. Dorner-Reisel A, Berroth K, Neubauer R, Nestler K, Marx G, Scislo M, et al. *Unreinforced and carbon fibre reinforced hydroxyapatite: resistance against microabrasion*. J Eur Ceram Soc. juin 2004;24(7):2131-9.
57. Ślósarczyk A, Klisch M, Błażewicz M, Piekarczyk J, Stobierski L, Rapacz-Kmita A. *Hot pressed hydroxyapatite-carbon fibre composites*. J Eur Ceram Soc. août 2000;20(9):1397-402.
58. Banglmaier RF, Sander EA, VandeVord PJ. *Induction and quantification of collagen fiber alignment in a three-dimensional hydroxyapatite-collagen composite scaffold*. Acta Biomater. 15 avr 2015;17(0):26-35.
59. Kane RJ, Weiss-Bilka HE, Meagher MJ, Liu Y, Gargac JA, Niebur GL, et al. *Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties*. Acta Biomater. 15 avr 2015;17(0):16-25.
60. Wang J, Liu C. *Biomimetic Collagen/Hydroxyapatite Composite Scaffolds: Fabrication and Characterizations*. J Bionic Eng. oct 2014;11(4):600-9.
61. Guo H, Su J, Wei J, Kong H, Liu C. *Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering*. Acta Biomater. janv 2009;5(1):268-78.
62. Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Tonak M, Lorenz H, et al. *Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier*. Biomaterials. oct 2005;26(29):5879-89.
63. Zhang Z, Kurita H, Kobayashi H, Kurashina K. *Osteoinduction with HA/TCP Ceramics of Different Composition and Porous Structure in Rabbits*. Oral Sci Int. nov 2005;2(2):85-95.

64. de Gabory L, Bareille R, Stoll D, Bordenave L, Fricain J-C. *Biphasic calcium phosphate to repair nasal septum: The first in vitro and in vivo study*. Acta Biomater. mars 2010;6(3):909-19.
65. Dorozhkin SV. *Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates*. Acta Biomater. mars 2012;8(3):963-77.
66. Wagner DE, Jones AD, Zhou H, Bhaduri SB. *Cytocompatibility evaluation of microwave sintered biphasic calcium phosphate scaffolds synthesized using pH control*. Mater Sci Eng C. 1 avr 2013;33(3):1710-9.
67. Røkkum M, Reigstad A. *Total hip replacement with an entirely hydroxyapatite-coated prosthesis: 5 years' follow-up of 94 consecutive hips*. J Arthroplasty. sept 1999;14(6):689-700.
68. Rogers A, Kulkarni R, Downes E. *The ABG hydroxyapatite-coated hip prosthesis: One hundred consecutive operations with average 6-year follow-up*. J Arthroplasty. août 2003;18(5):619-25.
69. Chassot E, Irigaray J., Terver S, Vanneuville G. *Contamination by metallic elements released from joint prostheses*. Med Eng Phys. avr 2004;26(3):193-9.
70. Oliveira CA, Candelária IS, Oliveira PB, Figueiredo A, Caseiro-Alves F. *Metallosis: A diagnosis not only in patients with metal-on-metal prostheses*. Eur J Radiol Open. 2015;2(0):3-6.
71. Yan Y, Neville A, Dowson D, Williams S, Fisher J. *Effect of metallic nanoparticles on the biotribocorrosion behaviour of Metal-on-Metal hip prostheses*. 17th Int Conf Wear Mater. 15 juin 2009;267(5-8):683-8.
72. Taboas J., Maddox R., Krebsbach P., Hollister S. *Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds*. Biomaterials. janv 2003;24(1):181-94.
73. Juhasz JA, Best SM, Brooks R, Kawashita M, Miyata N, Kokubo T, et al. *Mechanical properties of glass-ceramic A-W-polyethylene composites: effect of filler content and particle size*. Biomaterials. mars 2004;25(6):949-55.
74. Chiari MDS, Rodrigues MC, Xavier TA, de Souza EMN, Arana-Chavez VE, Braga RR. *Mechanical properties and ion release from bioactive restorative composites containing glass fillers and calcium phosphate nano-structured particles*. Dent Mater. juin 2015;31(6):726-33.
75. Barbieri D, Yuan H, Luo X, Farè S, Grijpma DW, de Bruijn JD. *Influence of polymer molecular weight in osteoinductive composites for bone tissue regeneration*. Acta Biomater. déc 2013;9(12):9401-13.
76. Chukov DI, Stepashkin AA, Maksimkin AV, Tcherdyntsev VV, Kaloshkin SD, Kuskov KV, et al. *Investigation of structure, mechanical and tribological properties of short*

carbon fiber reinforced UHMWPE-matrix composites. *Compos Part B Eng.* juill 2015;76(0):79-88.

77. Steinberg EL, Rath E, Shlaifer A, Chechik O, Maman E, Salai M. Carbon fiber reinforced PEEK Optima—A composite material biomechanical properties and wear/debris characteristics of CF-PEEK composites for orthopedic trauma implants. *J Mech Behav Biomed Mater.* janv 2013;17(0):221-8.

78. Cao N, Dong J, Wang Q, Ma Q, Xue C, Li M. An experimental bone defect healing with hydroxyapatite coating plasma sprayed on carbon/carbon composite implants. *Proc Fourth Workshop RIPT Rencontres Int Sur Proj Therm Third Workshop Suspens Solut Therm Spray S2TS.* 15 nov 2010;205(4):1150-6.

79. Eliaz N, Sridhar TM. *Electrocrystallization of Hydroxyapatite and Its Dependence on Solution Conditions.* *Cryst Growth Des.* 5 nov 2008;8(11):3965-77.

80. Zhang Q, Chen J, Feng J, Cao Y, Deng C, Zhang X. *Dissolution and mineralization behaviors of HA coatings.* *Biomaterials.* nov 2003;24(26):4741-8.

81. Sun L, Berndt CC, Khor KA, Cheang HN, Gross KA. *Surface characteristics and dissolution behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coating.* *J Biomed Mater Res.* 2002;62(2):228-36.

82. Choudhury P, Agrawal DC. *Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates.* *Surf Coat Technol.* 25 oct 2011;206(2-3):360-5.

83. Khandelwal H, Singh G, Agrawal K, Prakash S, Agarwal RD. *Characterization of hydroxyapatite coating by pulse laser deposition technique on stainless steel 316 L by varying laser energy.* *Appl Surf Sci.* 15 janv 2013;265:30-5.

84. Bolbasov EN, Lapin IN, Svetlichnyi VA, Lenivtseva YD, Malashicheva A, Malashichev Y, et al. *The formation of calcium phosphate coatings by pulse laser deposition on the surface of polymeric ferroelectric.* *Appl Surf Sci.* 15 sept 2015;349:420-9.

85. Macaskie LE, Yong P, Paterson-Beedle M, Thackray AC, Marquis PM, Sammons RL, et al. *A novel non line-of-sight method for coating hydroxyapatite onto the surfaces of support materials by biomineralization.* *J Biotechnol.* 4 août 2005;118(2):187-200.

86. Gopi D, Indira J, Kavitha L. *A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel.* *Surf Coat Technol.* 15 févr 2012;206(11-12):2859-69.

87. Dumelie N, Benhayoune H, Richard D, Laurent-Maquin D, Balossier G. *In vitro precipitation of electrodeposited calcium-deficient hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrate.* *Mater Charact.* févr 2008;59(2):129-33.

88. Eliaz N, Eliyahu M. *Electrochemical processes of nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium supported by real-time electrochemical atomic force microscopy.* *J Biomed Mater Res A.* 2007;80A(3):621-34.

89. Walter R, Bobby Kannan M, He Y, Sandham A. *Influence of the cathodic activity of magnesium alloys on the electrochemical deposition of calcium phosphate*. Mater Lett. 1 sept 2014;130(0):184-7.
90. Sandeman SR, Jeffery H, Howell CA, Smith M, Mikhalovsky SV, Lloyd AW. *The in vitro corneal biocompatibility of hydroxyapatite coated carbon mesh*. Biomaterials. juin 2009;30(18):3143-9.
91. Han HM, Phillips GJ, Mikhalovsky SV, FitzGerald S, Lloyd AW. *Sonoelectrochemical deposition of calcium phosphate coatings on carbon materials—effect of electrolyte concentration*. J Mater Sci Mater Med. août 2008;19(8):2845-50.
92. Han HM, Phillips GJ, Mikhalovsky SV, FitzGerald S, Lloyd AW. *Sonoelectrochemical deposition of calcium phosphates on carbon materials: effect of current density*. J Mater Sci Mater Med. 1 avr 2008;19(4):1787-91.
93. Han H, Phillips GJ, Mikhalovsky SV, Lloyd AW. *In vitro cytotoxicity assessment of carbon fabric coated with calcium phosphate*. New Carbon Mater. juin 2008;23(2):139-43.
94. Han H, Mikhalovsky SV, Phillips GJ, Lloyd AW. *Calcium phosphate sonoelectrodeposition on carbon fabrics and its effect on osteoblast cell viability in vitro*. New Carbon Mater. juin 2007;22(2):121-5.
95. Morgan P. *Carbon fibers and their composites*. Taylor & Francis Group, LLC; 2005. 1153 p.
96. +composites. *Chronique technique : Partie 2 - Marché et évolutions*. <http://www.pluscomposites.eu>
97. +composites. *Chronique technique : Partie 4 - Les composites renforcés de fibres de carbone*. <http://www.pluscomposites.eu>
98. Dupupet G. *Fibres de carbone*. Techniques de l'Ingénieur. <http://www.techniques-ingenieur.fr/>
99. Oberlin A, Bonnamy S, Lafdi K. *Structure and textures of carbon fibers*. In: Carbon Fibers, 3rd edition. J.B. Donnet, T.K. Wang, J.C.M. Peng and S. Rebouillat, Marcel Dekker Inc; p. 85-159.
100. Castro-Muñiz A, Suárez-García F, Martínez-Alonso A, Tascón JMD. *Activated carbon fibers with a high content of surface functional groups by phosphoric acid activation of PPTA*. J Colloid Interface Sci. 1 sept 2011;361(1):307-15.
101. Matsui J. *Critical reviews in surface chemistry*. 1990;1(71).
102. Montes-Morán MA, Martínez-Alonso A, Tascón JMD, Young RJ. *Effects of plasma oxidation on the surface and interfacial properties of ultra-high modulus carbon fibres*. Compos Part Appl Sci Manuf. mars 2001;32(3-4):361-71.
103. Bernal JD. *The Structure of Graphite*. Proc R Soc Lond Math Phys Eng Sci. 1 déc 1924;106(740):749-73.

104. Guigon M, Oberlin A, Desarmot G. *Microtexture and structure of some high-modulus, PAN-base carbon fibres*. Fibre Sci Technol. 1984;20(3):177-98.
105. Peñalver JL, Linares-Fernández J-L, Farías V de A, López-Ramón MV, Tassi M, Oliver FJ, et al. *Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes*. Carbon. déc 2009;47(15):3574-7.
106. Xu Z, Chen L, Huang Y, Li J, Wu X, Li X, et al. *Wettability of carbon fibers modified by acrylic acid and interface properties of carbon fiber/epoxy*. Eur Polym J. févr 2008;44(2):494-503.
107. Czajkowska B, Błażewicz M. *Phagocytosis of chemically modified carbon materials*. Biomaterials. janv 1997;18(1):69-74.
108. Liu X, Yang C, Lu Y. *Contrastive study of anodic oxidation on carbon fibers and graphite fibers*. Appl Surf Sci. 1 mars 2012;258(10):4268-75.
109. Zhao X, Li H, Chen M, Li K, Wang B, Xu Z, et al. *Strong-bonding calcium phosphate coatings on carbon/carbon composites by ultrasound-assisted anodic oxidation treatment and electrochemical deposition*. Appl Surf Sci. 1 avr 2012;258(12):5117-25.
110. Fu X, Lu W, Chung DDL. *Ozone treatment of carbon fiber for reinforcing cement*. Carbon. 1998;36(9):1337-45.
111. Paredes J., Martínez-Alonso A, Tascón JM. *Oxygen plasma modification of submicron vapor grown carbon fibers as studied by scanning tunneling microscopy*. Carbon. juin 2002;40(7):1101-8.
112. Blazewicz M. *Carbon materials in the treatment of soft and hard tissue injuries*. Eur Cell Mater. 2001;2:21-9.
113. Shi Y, Han H, Quan H, Zang Y, Wang N, Ren G, et al. *Activated carbon fibers/poly(lactic-co-glycolic) acid composite scaffolds: Preparation and characterizations*. Mater Sci Eng C. 1 oct 2014;43(0):102-8.
114. Meier B, Grathwohl G, Spallek M, Pannhorst W. *Sol-gel coatings on ceramic fibers for ceramic matrix composites*. Symp Strength Ceram Mater Univ Hambg-Harbg. 1992;10(3):237-43.
115. Huang CM, Xu Y, Xiong F, Zangvil A, Kriven WM. *Laser ablated coatings on ceramic fibers for ceramic matrix composites*. Mater Sci Eng A. 1 févr 1995;191(1-2):249-56.
116. Huang S, Zhou K, Li Z. *Preparation and mechanism of calcium phosphate coatings on chemical modified carbon fibers by biomineralization*. Trans Nonferrous Met Soc China. févr 2008;18(1):162-6.
117. Zhitomirsky I. *Electrophoretic hydroxyapatite coatings and fibers*. Mater Lett. févr 2000;42(4):262-71.

118. Zhitomirsky I. *Electrophoretic and electrolytic deposition of ceramic coatings on carbon fibers*. J Eur Ceram Soc. 1998;18(7):849-56.
119. Tao K, Huang S ping, Zhou K chao. *Influence of surface treatment of carbon fibers on electrochemical crystallization of calcium phosphate*. J Cent South Univ Technol. 2005;12(2):113-6.
120. Leilei Z, Hejun L, Kezhi L, Qiang S, Qiangang F, Yulei Z, et al. *Electrodeposition of carbonate-containing hydroxyapatite on carbon nanotubes/carbon fibers hybrid materials for tissue engineering application*. Ceram Int. avr 2015;41(3, Part B):4930-5.

Chapitre II

Matériaux, méthodologie et techniques expérimentales d'analyse

Sommaire du chapitre II

1.	Problématique.....	57
2.	Démarche expérimentale	59
3.	Matériaux et dispositif de synthèse.....	61
3.1.	Tissus de fibres de carbone	61
3.2.	Dispositif expérimental et synthèse du dépôt de CaP par sono-électrodéposition	62
3.2.1.	Dispositif de la sono-électrodéposition	63
3.2.2.	Principe général de la sono-électrodéposition	64
3.2.3.	Paramètres expérimentaux étudiés.....	64
3.3.	Electro-oxydation du TFC KIP1200	65
3.3.1.	Dispositif expérimental	65
3.3.2.	Principe général de l'oxydation électrochimique	65
3.3.3.	Paramètres expérimentaux de l'oxydation électrochimique	65
4.	Techniques et méthodologies de caractérisation	66
4.1.	Détermination de la quantité de CaP déposée	66
4.2.	Extraction du dépôt de CaP.....	66
4.3.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	67
4.4.	Microscopie électronique en transmission (MET).....	67
4.4.1.	Imagerie en fond clair contrasté	67
4.4.2.	Imagerie à haute résolution (HR-MET).....	68
4.4.3.	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX)	68
4.4.4.	Diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS)	68
4.5.	Analyse élémentaire.....	69
4.6.	Désorption à température programmée	70
4.7.	Spectroscopie de photoélectrons X.....	72
4.8.	Dosages potentiométriques	73
4.9.	pH de charge nulle.....	75
4.10.	Porosimétrie mercure	75
4.11.	Adsorption de gaz (N ₂ et CO ₂)	76
4.12.	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	77

4.13.	Diffraction des rayons X.....	77
4.14.	Résonance magnétique nucléaire.....	78
4.15.	Evaluation de la biocompatibilité des biomatériaux.....	79
4.15.1.	Préparation de la solution d'HOST	79
4.16.	Principe et méthodologie du test au XTT	79
4.16.1.	Principe	79
4.16.2.	Méthodologie.....	80
4.17.	Principe et méthodologie du test de viabilité des HOST en fluorescence	81
4.17.1.	Principe	81
4.17.2.	Méthodologie.....	81
Références		82

1. Problématique

De nos jours, les systèmes médicaux bio-intégrés, prothèses ou implants, sont constitués d'alliages de titane, d'acier inoxydable, de bio-verres, de polymères ou de céramiques renforcés par des matériaux carbonés en fonction des propriétés mécaniques requises. Depuis le milieu du XXème siècle, les développements récents montrent l'utilisation de matériaux revêtus de phosphates de calcium dont l'objectif est d'améliorer la bioactivité et la biocompatibilité avec, dans le domaine de la chirurgie orthopédique, des applications de remplacement d'articulations (prothèses) ou d'implants. Néanmoins, dans le domaine particulier de la réparation et de la reconstruction osseuse, de nombreux problèmes subsistent dans le cas des biomatériaux synthétiques. Ces derniers présentent en effet des capacités de régénération limitées ainsi que des phénomènes fréquents de réactions inflammatoires.

Le but de l'étude ne vise pas à développer les matériaux de prothèses déjà existants mais à répondre à des besoins clairement identifiés à travers des discussions menées avec le département de traumatologie et d'orthopédie du docteur Razanabola du CHR d'Orléans. Des besoins en biomatériaux flexibles apparaissent dans le cas de comblements osseux importants ou de fractures graves comprenant de nombreux débris osseux. L'idée est de développer un « pansement » souple pour l'os ajustable à la fracture à soigner. Il est évident que le rôle de soutien mécanique indispensable à la régénération d'une fracture ne sera pas assuré par le pansement osseux mais par des moyens conventionnels tels que des broches métalliques ou un système de plaques et de vis.

Parmi les architectures de matériaux flexibles possibles, les matrices fibreuses, comme les tissus de fibres de carbone (TFC), sont des substrats prometteurs capables de jouer le rôle de matrice support de cellules osseuses en phase de croissance. Ces pansements auront pour rôle d'assurer un meilleur maintien de la zone endommagée et leur porosité à différentes échelles (macro à microporosité) définissent un espace bien délimité dans lequel la reconstruction osseuse va pouvoir être contrôlée et stimulée. Afin d'améliorer la biocompatibilité et la bioactivité de ces matériaux flexibles, une céramique phosphocalcique est déposée à la surface des TFC.

Les objectifs principaux de ce travail de thèse ont été :

- de transposer et d'adapter la technique d'électrodéposition de phosphate de calcium, déjà utilisée pour des alliages métalliques, à des tissus de fibres de carbone.
- d'étudier l'influence des paramètres expérimentaux sur les caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts.
- d'analyser les mécanismes réactionnels intervenant au cours de la sono-électrodéposition et de déterminer les relations entre ces mécanismes et l'ensemble des caractéristiques des dépôts de CaP.
- puis d'étudier l'impact des caractéristiques physico-chimiques des tissus de fibres de carbone seuls et des matériaux hybrides TFC / CaP in vitro au contact d'ostéoblastes humains primaires, analysant ainsi leur biocompatibilité.

2. Démarche expérimentale

En réponse à la problématique posée, la démarche expérimentale présentée par la Figure II-18 a été mise en place.

Cette démarche a consisté dans un premier temps à sélectionner trois tissus de fibres de carbone possédant chacun des caractéristiques physico-chimiques différentes : les deux TFC activés KIP1200, BBV800 et un TFC non activé. Les données du fournisseur sur ces tissus, la société DACARB[®], sont présentées ultérieurement dans ce chapitre. Ces tissus ont par la suite été caractérisés en détail, en particulier leurs composition chimique et type de porosité (Chapitre III § 1 et 3).

Parmi ces trois tissus de fibres de carbone, le tissu KIP1200, dont la source pérenne nous assure un approvisionnement sûr, a été choisi comme substrat pour l'étude de la formation de dépôts phosphocalciques par sono-électrodéposition. Par ailleurs, pour ce type de matériau pauvre en oxygène, les caractérisations du matériau modifié et/ou recouvert s'en trouvent simplifiées. Les caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux hybrides TFC/CaP ont été analysées en particulier la quantité de CaP déposée, le recouvrement des fibres ainsi que la morphologie, la composition chimique, la structure et la microtexture des dépôts (Chapitre III § 2). Les caractéristiques ont été reliées aux conditions expérimentales afin de discuter des mécanismes liés à la sono-électrodéposition conduisant à la formation des dépôts de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone (Chapitre IV § 1 et 2). Ces résultats permettront de définir le protocole expérimental à mettre en œuvre afin d'élaborer plus spécifiquement un type de dépôt de Ca / P, voire même des dépôts à façon.

En parallèle, le TFC KIP1200 a été oxydé par méthode électrochimique afin de modifier sa composition chimique de surface. Les nouvelles caractéristiques physico-chimiques du matériau ont été analysées (Chapitre III § 1). Le but est de déterminer le rôle éventuel de la composition chimique de surface sur la biocompatibilité *in vitro* du TFC (Chapitre III § 3). Pour ce faire, la biocompatibilité *in vitro* en contact avec des ostéoblastes humains primaires des tissus BBV800, non activé, KIP1200 avec et sans dépôts de CaP, ainsi que du KIP1200 oxydé, a été évaluée (Chapitre III § 3). Le but est de déterminer l'impact des conditions expérimentales de la sono-électrodéposition sur la biocompatibilité des matériaux hybrides TFC KIP1200/CaP, ainsi que l'impact des caractéristiques physico-chimiques des TFC sur leur biocompatibilité (Chapitre IV § 3).

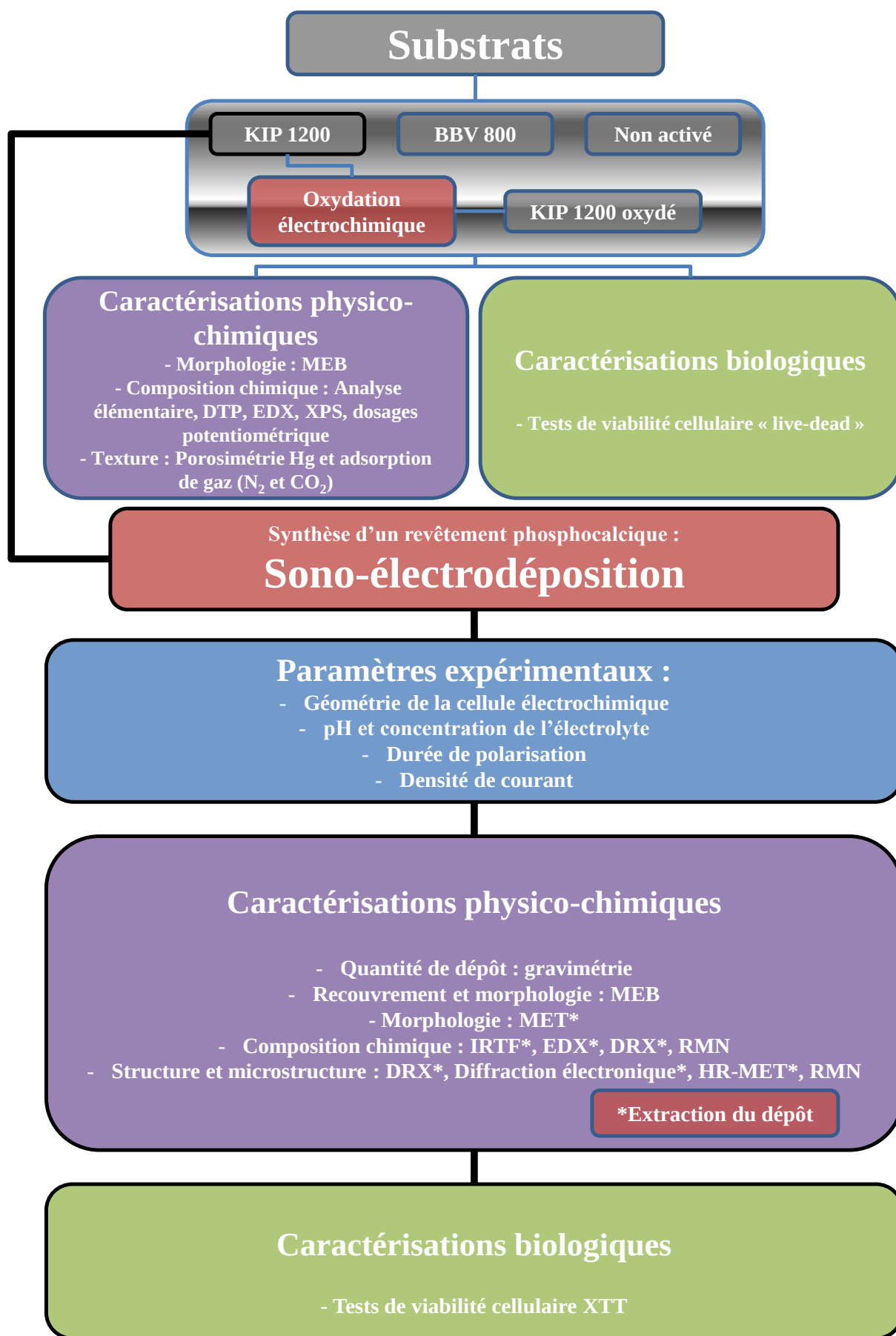


Figure II-18 : Démarche expérimentale.

3. Matériaux et dispositif de synthèse

Dans la suite de ce chapitre sont présentées successivement, les caractéristiques des TFC données par DACARB[®], la description de la méthode de synthèse des revêtements phosphocalciques par sono-électrodéposition, ainsi que l'oxydation électrochimique du TFC KIP1200. Les outils et les techniques de caractérisations physico-chimiques, microtexturales, structurales et biologiques des TFC et des dépôts de CaP sont ensuite exposés.

3.1. Tissus de fibres de carbone

Les tissus de fibres de carbone sont fournis par la société DACARB[®]. Trois tissus, dont les images MEB sont données dans la Figure II-19, ont été utilisés au cours de cette étude :

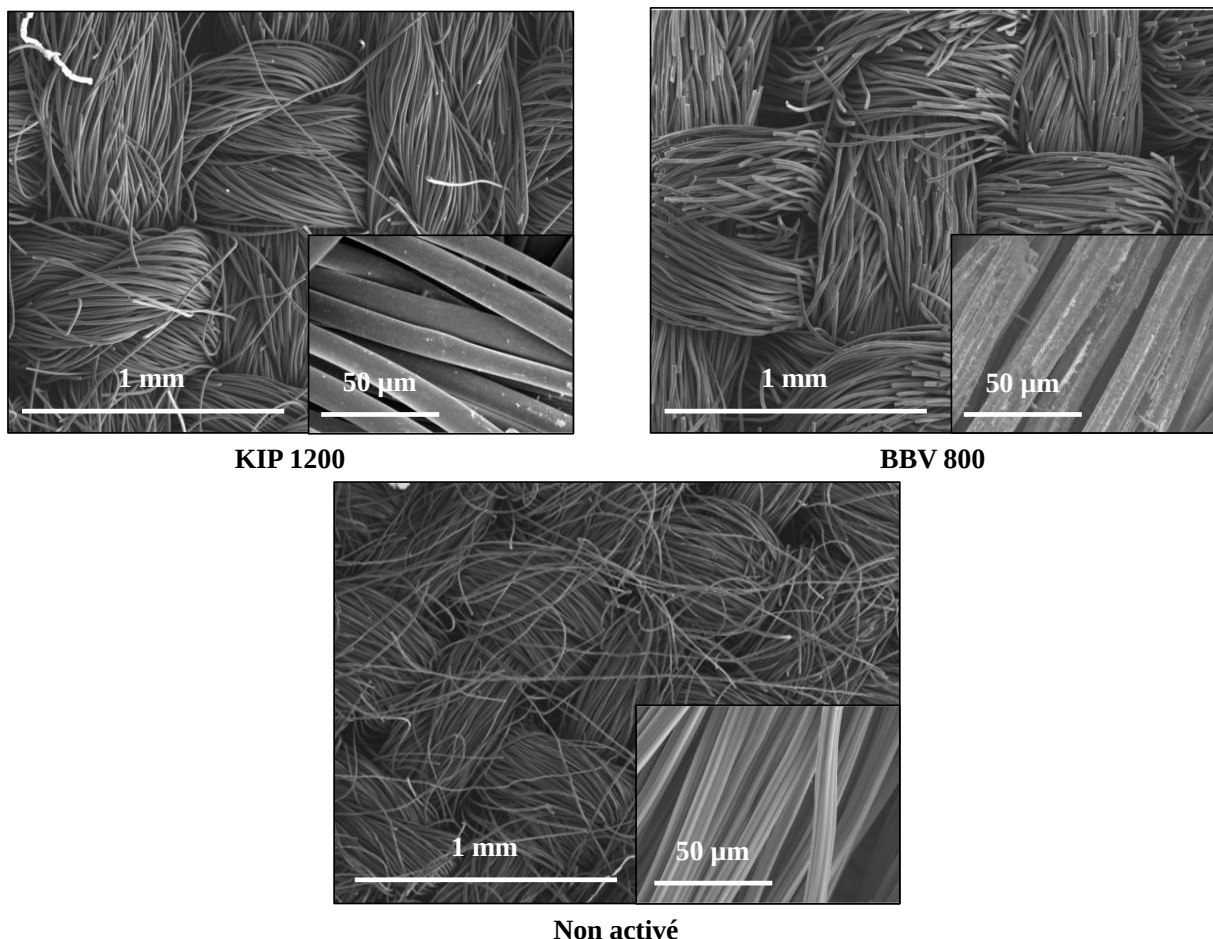


Figure II-19 : Images MEB des TFC KIP1200, BBV 800 et non activé. Grandissements x 50 et x 1000.

KIP1200[®] : le tissu est obtenu par carbonisation d'une résine phénolique. Les fibres sont tissées puis le tissu de fibres de carbone est activé par de la vapeur d'eau à une température

comprise entre 850 et 950 °C. Le grammage du tissu est d'environ 140 g/m². Les fibres de carbone ont un aspect de surface lisse et leur diamètre est compris entre 10 et 12 µm.

BBV800® : le tissu est élaboré par carbonisation d'un précurseur de type viscosse. Les fibres sont tissées puis le tissu de fibres de carbone est activé par de la vapeur d'eau à une température comprise entre 750 et 850 °C. Le grammage est d'environ 135 g/m². Les fibres ont une forme lobée et leur diamètre moyen est de 17 µm. Un pré-traitement, dit d'ensimage, avant la carbonisation, ayant pour but de faciliter le tissage des fibres, est responsable de la présence de traces métalliques.

Non activé : le tissu est obtenu par carbonisation d'un précurseur de type viscosse. Les fibres sont tissées, le tissu n'est pas activé. Le grammage est d'environ 170 g/m². Les fibres ont une forme lobée et leur diamètre moyen est d'environ 10 µm.

Avant son utilisation, le tissu non activé subit au préalable un traitement thermique à 1000 °C avec une vitesse de chauffe de 10°C/min, durant 1h, sous atmosphère inerte de N₂ (débit de 120 mL/min), dans un four tubulaire horizontal. Le but est d'éliminer les dernières traces du précurseur viscosse au sein du tissu.

Quant à l'ensemble des tissus, préalablement à leur utilisation, ils sont découpés aux dimensions de la cellule électrochimique et lavés avec de l'eau distillée portée à reflux durant 24 h dans un dispositif Soxhlet, afin d'éliminer les poussières et les impuretés. Les tissus sont ensuite séchés dans une étuve à 100 °C sous 400 mbar. Le choix d'un solvant organique pour laver les TFC a été écarté, afin d'éviter une éventuelle contamination qui pourrait nuire à leur biocompatibilité.

3.2. Dispositif expérimental et synthèse du dépôt de CaP par sono-électrodéposition

Les principaux avantages de la synthèse électrochimique sont :

- la possibilité de recouvrir des substrats poreux, rugueux ou de géométries complexes qui possèdent des surfaces internes, non accessibles par d'autres méthodes de synthèse [1, 2].
- la capacité de contrôler l'épaisseur, la composition chimique et la microstructure du dépôt [3].

L'ajout d'ultrasons lors de la synthèse permet d'améliorer l'homogénéité et la densité du dépôt [4].

3.2.1. Dispositif de la sono-électrodéposition

Le schéma de la Figure II-20 présente le montage expérimental mis en place pour faire les dépôts d'HAP par sono-électrodéposition.

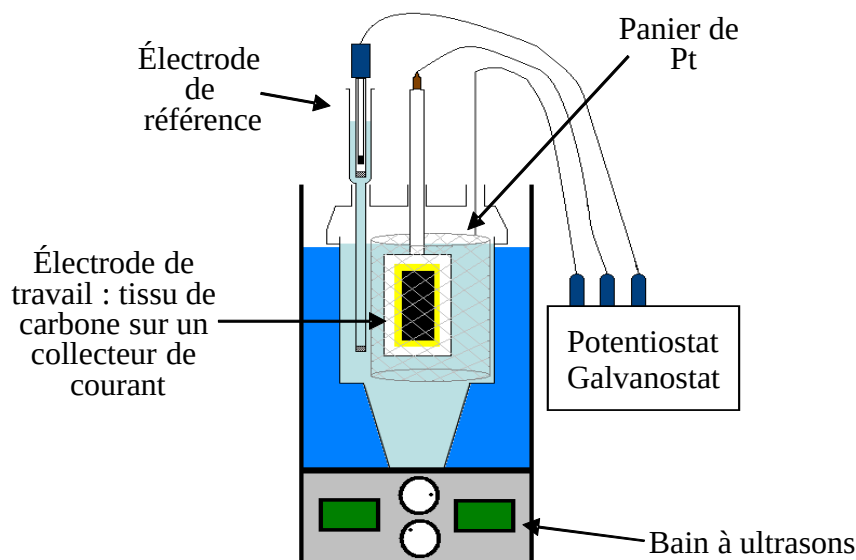


Figure II-20 : Schéma du dispositif expérimental de la sono-électrodéposition.

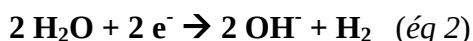
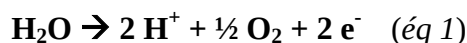
Le dispositif expérimental est un système à trois électrodes relié à un potentiostat/galvanostat VMP2 de la marque BioLogic[®]. Il se compose de :

- L'électrode de travail : tissu de carbone KIP1200 fixé sur un collecteur de courant (plaque d'or ou fil de platine).
- La contre-électrode : panier ou plaque de platine.
- L'électrode de référence : Hg/Hg₂SO₄ de la marque Radiometer Analytical[®]. Elle est placée dans une allonge remplie de l'électrolyte afin d'éviter les problèmes de dérive de mesure de l'électrode de référence et d'augmenter la précision et la stabilité de la mesure du potentiel de référence et donc du potentiel mesuré. L'allonge garantit en outre l'absence de diffusion de l'électrolyte de l'électrode de référence et par conséquent la contamination du milieu électrolytique de synthèse.
- L'électrolyte utilisé est une solution aqueuse d'ions phosphate et calcium issus respectivement du dihydrogénophosphate d'ammonium (NH₄H₂PO₄) et du nitrate de calcium tétrahydraté (Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O) fournis par Sigma Aldrich[®]. Le solvant est de l'eau ultra-pure ayant une conductivité de 0,055 µS/cm.

La cellule électrochimique est placée dans un bain à ultrasons thermostaté FB11201 de la marque Fisherbrand[®].

3.2.2. Principe général de la sono-électrodéposition

L'application d'un courant cathodique (polarisation négative) entre les électrodes provoque l'oxydation et la réduction de l'eau à la surface respectivement de la contre-électrode (équation 1) et de l'électrode de travail (équation 2).



La formation d'ions hydroxyle à l'électrode de travail augmente localement le pH entraînant la co-précipitation des ions calcium et phosphate à la surface de l'électrode selon la Figure II-21. L'électrolyse de l'eau est le moteur principal de l'électrodéposition, mais elle n'est pas la seule réaction ayant lieu lors de la synthèse. La présence des espèces ioniques en solution telles que les ions nitrate et dihydrogénophosphate provoque d'autres réactions électrochimiques aux électrodes [5]. Ces phénomènes sont plus amplement détaillés et discutés dans le chapitre IV.

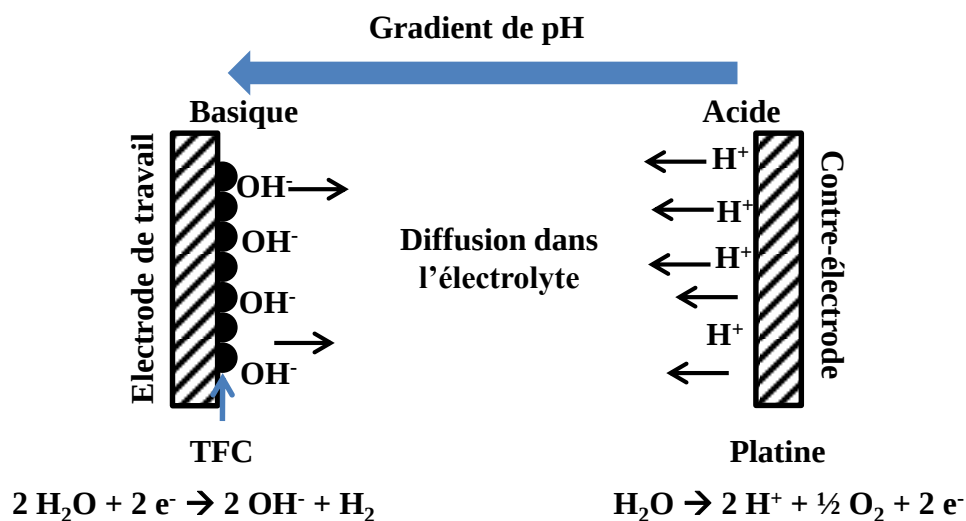


Figure II-21 : Schéma du principe de dépôt par voie électrochimique.

3.2.3. Paramètres expérimentaux étudiés

L'électrodéposition est une technique de synthèse qui implique deux types de réactions : les réactions électrochimiques qui vont induire les réactions acido-basiques. Ces dernières vont déterminer la composition chimique du dépôt de CaP. Les paramètres expérimentaux impactant les caractéristiques physico-chimiques des dépôts de CaP peuvent être regroupés en deux catégories :

- les paramètres de l'électrolyte : composition chimique, concentration, ratio Ca/P, pH, température.
- les conditions de dépôt : nature du substrat, densité de courant, durée de la polarisation, géométrie de la cellule électrochimique.

Dans cette étude, nous avons choisi d'optimiser la géométrie de la cellule électrochimique. C'est ainsi que de nouveaux designs de l'électrode de travail et de la contre-électrode ont été conçus. Le pH initial et la concentration de l'électrolyte ainsi que la durée de polarisation ont été optimisés puis ces paramètres ont été fixés. En définitive, c'est le paramètre de densité de courant et son influence sur les caractéristiques physico-chimiques des dépôts de CaP et des biomatériaux hybrides TFC/CaP qui ont fait l'objet de l'étude. Les résultats de l'ensemble des analyses et caractérisations font l'objet du chapitre III du manuscrit.

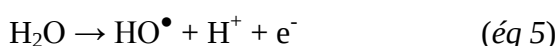
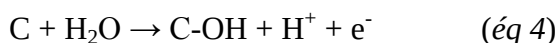
3.3. Electro-oxydation du TFC KIP1200

3.3.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé lors de l'électro-oxydation est le même que celui utilisé pour la sono-électrodéposition, sauf que la cellule électrochimique n'est pas placée dans un bain générateur d'ultrasons et que l'électrolyte consiste en une solution aqueuse de Na₂SO₄ (Sigma Aldrich®) de concentration égale à 0,01 mol/L, choisi pour son inertie chimique.

3.3.2. Principe général de l'oxydation électrochimique

Sous l'action d'une polarisation anodique (+), le potentiel de l'électrode de travail augmente ce qui entraîne l'oxydation directe du TFC KIP1200 selon les équations 3 et 4. Il est aussi possible que l'oxydation du TFC soit due à l'action de radicaux OH[•] produits *in situ* lors de l'électro-oxydation du KIP1200 selon les équations de réaction 5 et 6 [6, 7]



3.3.3. Paramètres expérimentaux de l'oxydation électrochimique

Le tissu subit une polarisation anodique (+) potentiostatique durant 6 h avec des potentiels variant de 0,3 à 1,4 V (vs Hg/Hg₂SO₄). Le but est de déterminer l'influence du

potentiel sur le degré d'oxydation du TFC. Les résultats de la caractérisation de la composition chimique et de la texture du KIP1200 oxydé sont décrits dans le chapitre III.

4. Techniques et méthodologies de caractérisation

Cette partie décrit les techniques d'analyses ainsi que les méthodologies employées pour caractériser les TFC avec et sans dépôts de CaP.

4.1. Détermination de la quantité de CaP déposée

La première analyse consiste à déterminer la quantité de CaP déposée lors de la sono-électrodéposition. Le gain de masse est un pourcentage massique calculé à partir de la pesée des TFC avant et après dépôt de CaP selon l'équation suivante :

$$\text{Gain de masse (\%)} = \frac{m_{\text{finale}} - m_{\text{initiale}}}{m_{\text{initiale}}} \times 100$$

Lors de l'étude de l'influence de la durée de polarisation sur la quantité de CaP déposée, le faible nombre d'expériences de répétabilité contraint à estimer l'incertitude sur le gain de masse au moyen de la méthode de Student, sur une série de trois expériences pour une durée de polarisation d'1h (Annexe A). L'intervalle de confiance choisi est de 95%. L'incertitude est considérée en première approximation comme étant constante pour toutes les durées de polarisation.

Concernant l'étude de l'influence de la densité de courant sur la quantité de CaP déposé un nombre suffisant d'expériences de répétabilité (minimum 7) a été réalisé permettant de déterminer l'incertitude sur le gain de masse à partir du calcul de l'écart-type.

4.2. Extraction du dépôt de CaP

La préparation des échantillons en vue de leurs analyses par certaines techniques de caractérisations a nécessité une étape d'extraction du dépôt permettant d'analyser la poudre de CaP obtenue par sono-électrodéposition. Les analyses par IRTF, MET et DRX ont nécessité cette étape.

Deux méthodes d'extraction ont été testées :

- La première consiste à gratter l'excédent de dépôt revêtant les fibres du tissu. Cette méthode ne permet pas de récupérer beaucoup de dépôt et il y a risque d'extraire aussi des fibres de carbone.

- La seconde méthode consiste à plonger le TFC recouvert par le dépôt de CaP dans de l'éthanol absolu (Sigma Aldrich®) puis à soumettre l'ensemble dans un bain à ultrasons (Fisherbrand® FB11201, 37 kHz, 1h). Le tissu isolé de son dépôt est sorti de la solution d'éthanol et la suspension contenant le dépôt de CaP dispersé est chauffée au bain-marie à 30 °C jusqu'à l'évaporation complète du solvant. La poudre de CaP récupérée peut alors être analysée.

Il n'a pas été observé de modification de la composition chimique des dépôts après leur dispersion dans l'éthanol. C'est la raison pour laquelle la seconde méthode a été retenue pour extraire les dépôts de CaP.

4.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est basée sur le principe de l'interaction entre un faisceau d'électrons et un échantillon cible. L'échantillon est balayé par un faisceau d'électrons de faible diamètre. Les interactions électrons-matière donnent naissance à divers rayonnements (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, rayons X,...). Dans le cas des électrons secondaires (réfléchis élastiquement), le MEB donne principalement une information sur la morphologie.

Des disques de 8 mm de diamètre sont découpés à l'emporte-pièce à partir des rectangles de TFC de 2 x 3 cm ayant servi ou non de substrat lors de l'électrodéposition. Ces disques sont fixés au moyen d'une bande adhésive conductrice sur le porte-échantillon. Les observations ont été faites au Centre de Microscopie Electronique (CME) de l'Université d'Orléans, sur un microscope électronique à balayage HITACHI S4200, équipé d'un canon à émission de champ, sous une tension de 10 kV.

4.4. Microscopie électronique en transmission (MET)

La poudre de CaP isolée selon la méthode décrite au paragraphe 3.3.2. est mise en suspension dans de l'éthanol absolu et dispersée sous ultrasons. La suspension est placée sur une grille de cuivre (3mm de diamètre) recouverte d'une membrane conductrice en carbone. Après l'évaporation de l'éthanol, la grille est observée au moyen du MET.

4.4.1. Imagerie en fond clair contrasté

Un diaphragme, dit objectif, est placé dans le plan d'Abbe afin d'éliminer une partie des faisceaux diffractés et des faisceaux diffusés (diffusion inélastique). Les régions de l'objet ayant émis de tels faisceaux apparaissent d'autant plus sombres dans l'image que l'intensité de

ces faisceaux est importante, que l'objet est épais et/ou que les numéros atomiques des éléments le constituant sont élevés.

Cette imagerie donne des informations sur les morphologies et microtextures des particules de CaP.

4.4.2. Imagerie à haute résolution (HR-MET)

Cette technique consiste à former une image en faisant interférer le faisceau transmis 000 avec le(s) faisceau(x) hkl. Dans le plan focal de la lentille objectif, deux sources cohérentes sont isolées grâce au diaphragme objectif et elles donnent naissance dans le plan image à un système de franges appelées franges de réseau. Celles-ci reproduisent en projection l'orientation et la longueur des plans réticulaires qui leur ont donné naissance à condition que l'objet soit assez mince pour être assimilé à un objet de phase et que la distance réticulaire d_{hkl} soit supérieure à la limite de résolution du MET utilisé.

L'imagerie HR-MET donne des informations sur l'organisation cristalline des particules de CaP.

4.4.3. Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX)

Les rayons X émis lors de l'excitation des niveaux électroniques de la matière sous l'effet du faisceau électronique sont caractéristiques de la composition élémentaire de la matière en surface du matériau. En détectant ces rayons X, il est possible de déterminer les éléments en surface du matériau étudié, c'est le principe de la microanalyse dispersive des rayons X. La profondeur sondée en surface est fonction de la tension d'accélération des électrons incidents et de la densité du matériau.

Le but de l'analyse par EDX dans cette étude est de déterminer les rapports atomiques Ca/P des dépôts obtenus à différentes densités de courant. En effet, les rapports atomiques Ca/P sont caractéristiques de la nature des phases phosphocalciques (voir chapitre I). L'étalonnage quantitatif est effectué à partir de la mesure du rapport atomique CaP d'une hydroxyapatite stœchiométrique commerciale (Sigma Aldrich). Chaque microtexture est analysée 15 fois par EDX afin de déterminer le rapport moyen Ca/P. L'incertitude est définie comme étant l'écart-type standard de la série des 15 mesures.

4.4.4. Diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS)

Un diaphragme de sélection est placé dans le plan de Gauss afin de limiter la région de l'objet dont on veut examiner le diagramme de diffraction électronique. Si on focalise les lentilles de projection dans le plan focal image de l'objectif, on verra apparaître sur l'écran, la figure de diffraction de l'objet, c'est à dire son diagramme de diffraction électronique. Les réflexions hkl sont distantes du faisceau direct de $D/2 = L\lambda/d_{hkl}$ où $L\lambda$ est la constante de diffraction du microscope (étalonnée à l'aide du graphite ou d'un cristal d'or) et d_{hkl} la distance entre les plans réticulaires.

Dans notre étude, l'étalonnage réalisé à l'aide d'un cristal d'or (JCPDS 4-784) a permis de calculer la constante de diffraction du microscope $L\lambda = 11,67 \text{ mm.Å}$. La DEAS donne des informations sur la structure cristallographique ainsi que sur la cristallinité des particules de CaP.

4.5. Analyse élémentaire

Cette technique permet de quantifier la proportion ou le pourcentage massique d'hétéroatomes présents dans le matériau carboné. La détermination de la proportion en carbone, azote, hydrogène et soufre est réalisée indépendamment de l'oxygène. En effet, l'analyse de ces hétéroatomes repose sur une combustion de l'échantillon carboné à haute température (de l'ordre de 950 °C). La combustion complète de l'échantillon en présence d'un excès d'oxygène permet de transformer le carbone en dioxyde de carbone (CO₂), l'hydrogène en vapeur d'eau (H₂O), le soufre en dioxyde de soufre (SO₂) alors que l'azote quant à lui est réduit par le cuivre (rôle de catalyseur) en diazote (N₂). Les gaz générés sont entraînés à l'aide d'un gaz vecteur (Hélium) jusqu'à une colonne chromatographique (colonne remplie) puis ensuite détectés grâce à un catharomètre. En général, le pourcentage massique en oxygène peut être évalué indirectement par la différence avec le pourcentage massique dû aux autres hétéroatomes (C, H, N, S). Ceci ne permet pas toutefois de prendre en considération la présence éventuelle d'autres hétéroatomes présents dans l'échantillon tels que des éléments provenant d'un traitement de surface (ensimage) des fibres (zinc, aluminium, phosphore ...). Le pourcentage massique en oxygène est obtenu avec précision par pyrolyse sous atmosphère d'argon ou décomposition thermique de l'échantillon à haute température (de l'ordre de 1100 °C) en absence d'oxygène afin d'éviter l'oxydation et la combustion de l'échantillon.

Environ 1 mg de TFC finement broyé est pesé précisément et placé dans une nacelle en étain pour les analyses en C,H,N et S ou en argent pour les analyses en O. Après fermeture

des nacelles, les échantillons sont analysés au moyen d'un analyseur élémentaire Flash 2000 de la marque Thermo Scientific®.

4.6. Désorption à température programmée

La désorption à température programmée (DTP ou TPD en anglais) consiste en un traitement thermique sous flux de gaz d'un échantillon suivant une rampe de température définie. Le but est d'induire la désorption thermique d'espèces adsorbées à la surface de l'échantillon carboné. Les effluents gazeux peuvent être analysés par des techniques telles que la spectrométrie de masse, spectroscopie infrarouge, chromatographie en phase gazeuse ou analyse gravimétrique. Cette technique permet d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur la nature et la quantité des groupements présents ou par exemple sur la nature des interactions d'une espèce adsorbée à la surface d'un carbone activé [8,9].

De par la présence importante de groupements oxygénés à la surface d'un carbone activé, les gaz majoritairement émis durant la désorption thermique sont principalement le dioxyde de carbone (CO_2), le monoxyde de carbone (CO) et la vapeur d'eau (H_2O) (Figure II-22 et Tableau II-3). Ces gaz sont facilement détectables par spectrométrie de masse à des valeurs respectives de m/z de 44, 28, et 18 g/mol. D'autres gaz peuvent être émis tels que le monoxyde d'azote (NO), le diazote (N_2), le dioxyde de soufre (SO_2) lorsque l'échantillon est dopé en azote ou en soufre. Le dioxyde de carbone se décompose à deux températures, caractéristiques de la présence d'entités chimiques différentes. En effet, les groupements carboxyliques se décomposent thermiquement à faible température ($T < 430\text{ }^\circ\text{C}$) tandis que les groupements anhydrides et lactones eux se décomposent à haute température (430 - 630 $^\circ\text{C}$). De manière similaire, le monoxyde de carbone se décompose selon deux vagues bien distincts à 630 et 830 $^\circ\text{C}$ correspondant à des groupements phénols, éthers et carbonyles (Tableau II-3, Figure II-23). En ce qui concerne la vapeur d'eau, un premier départ à faible température, correspondant généralement à la désorption d'eau physisorbée, peut être observé. À haute température, le départ d'eau peut provenir d'eau liée par liaisons hydrogène avec les groupements oxygénés de surface, de la désorption thermique correspondant à des groupements phénoliques ou des réactions de déshydratation de groupes carboxyliques pour donner des anhydrides d'acide carboxyliques [10–12].

Les analyses de DTP ont été réalisées sous une atmosphère d'hélium sur des prises d'essais précises d'environ 25 mg de TFC. La rampe de montée en température est de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ avec une température maximale de 1200 $^\circ\text{C}$.

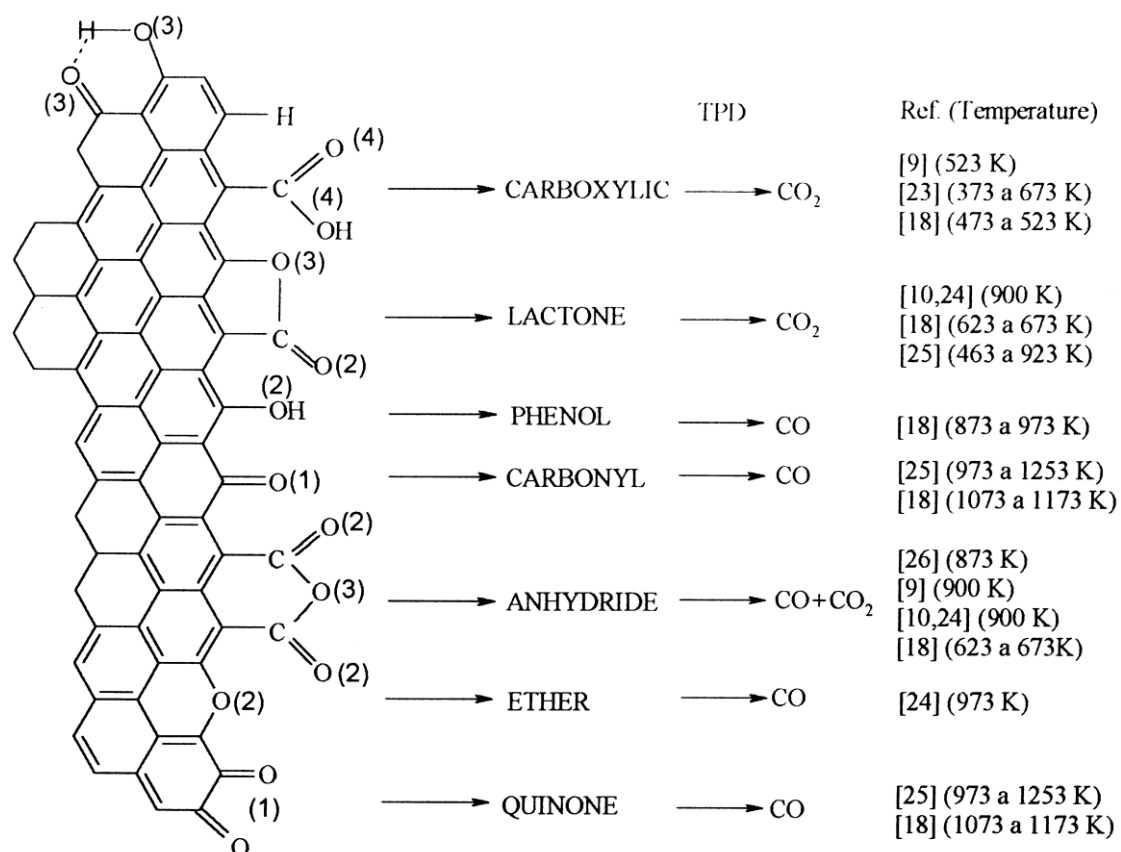


Figure II-22: Groupes de surface d'un carbone activé et leurs produits de décompositions par DTP [13].

Tableau II-3 : Températures de décomposition des groupes de surface d'un carbone activé par DTP et gaz détectés [10].

Groupements de Surface	Dégagement gazeux	T décomposition (°C)
Acide Carboxyliques	CO ₂	200 - 250
Lactones	CO ₂	350 - 400
Phénols	CO	600 - 700
Carbonyles	CO	800 - 900
Anhydrides	CO + CO ₂	350 - 400
Ethers	CO	700
Quinones	CO	800 - 900

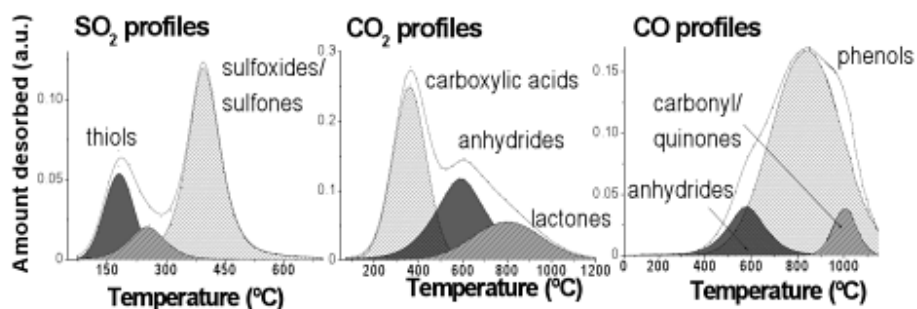


Figure II-23 : Profils de dégagements gazeux pour le SO₂, le CO₂ et le CO et déconvolution des contributions (DTP) [14].

4.7. Spectroscopie de photoélectrons X

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) est une technique d'analyse de surface permettant de réaliser une analyse chimique élémentaire (profondeur sondée de l'ordre du nm) mais aussi d'obtenir des informations sur l'environnement local des espèces (nature des premiers voisins). Les énergies de liaisons vont permettre de remonter aux différentes fonctionnalités présentes à la surface d'un carbone activé. Ces énergies de liaisons vont dépendre de l'environnement local des hétéroatomes et de l'état des liaisons avec les plus proches voisins. Les énergies de liaisons correspondant aux principaux groupes présents en surface de matériaux carbonés sont rassemblées dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 : Energies de liaisons correspondant aux principaux groupes oxygénés présents en surface de matériaux carbonés.

Pic	Composé	Position (eV)	Fonctions
C _{1s}	C _{sp2}	284,2 – 284,9	Carbone aromatique (graphite)
	C*-COOR	284,6 – 285,5	Groupe carboxyle (carbone en α)
	C*-OR	285,4 – 286,1	Ether ou groupe phénolique
	C*=O	287,2 – 287,9	Cétone
	C*OOR	288,4 – 289,5	Groupe Carboxyle
	π – π *	290 – 291,7	Transition π – π* des carbones aromatiques
O _{1s}	C=O*	529,5 – 532,5	Fonction cétone
	C=O* carboxyle	530,1 – 533,1	Groupe carboxyle
	C-O*-C	533,2 – 533,8	Fonction éther
	C-O*R	531,7 – 534,7	Oxygène ponté
	H ₂ O	533,7 – 536,7	Eau physisorbée, chimisorbée

4.8. Dosages potentiométriques

L'approche de cette méthode est de considérer que le système étudié est composé de groupements ou de sites de nature acide caractérisés par leurs constantes d'acidités K_A et décrit comme une distribution continue de pK_a . La répartition de la population des pK_a peut être déterminée par la réalisation d'une courbe de titration par la soude entre pH 3 et 11. À partir des points expérimentaux obtenus lors du dosage, il est possible de tracer une courbe dite d'« affinité protonique » Q , représentant la quantité de protons consommée ou de sites protonés présents sur le carbone activé.

La quantité de protons consommée peut être déterminée suivant l'équation suivante :

$$H_{\text{cons}} = V_0 \cdot ([H^+]_i - [OH^-]_i) + V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} - (V_0 + V_t) \cdot ([H^+]_f - [OH^-]_f)$$

Avec V_0 = Volume initial

$[H^+]_i$ et $[OH^-]_i$, départ du titrage

$[H^+]_f$ et $[OH^-]_f$, calculées à partir du pH mesuré

La quantité de protons consommée peut être ramenée à la masse de l'échantillon carbonée m analysée suivant l'équation suivante :

$$Q = \frac{H_{\text{cons}}}{m}$$

La courbe d'affinité protonique $Q = f(\text{pH})$ est reliée à la distribution de pK_A par l'équation suivante :

$$Q(\text{pH}) = \int_{-\infty}^{\infty} q(f(\text{pH}, pK_A)f(pK_A)dpK_A$$

A chaque point d'inflexion de la courbe d'affinité protonique $Q = f(\text{pH})$, sera associée une fonctionnalité de surface de pK_A donnée (Figure II-24).

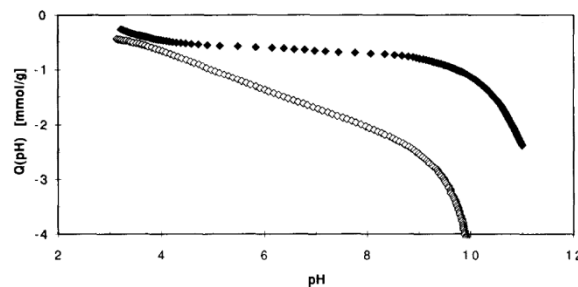


Figure II-24 : Exemple d'une courbe d'affinité protonique $Q = f(\text{pH})$ [15].

Cette intégrale peut être résolue à l'aide de la méthode Rudzinski – Jagiello. Cependant cette méthode ne permet pas de résoudre tous les pics, en particulier dans le cas de surfaces très hétérogènes.

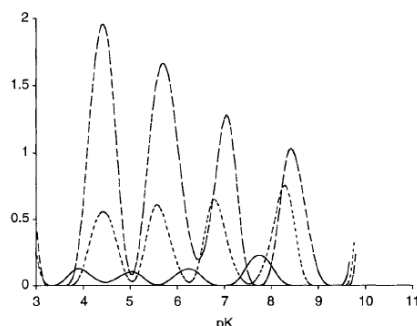


Figure II-25 : Exemple de distributions de pK_a de groupes acides sur des carbones activés (15).

Récemment une procédure numérique SAIEUS (Solution of Adsorption Integral Equation Using Spline) a été mise au point et permet d'associer les différents groupements présents à la surface selon leur constante d'acidité avec une grande précision [10, 11, 15]. En effet, cette méthode numérique est capable de résoudre des pics avec un $\Delta_{pK_a} < 1$ (Figure II-25). L'intégration des pics permet ainsi de remonter aux quantités de groupements acides de surface associés.

La titration potentiométrique est donc une méthode qui permet de décrire avec précision les propriétés acide de surface d'un carbone activé en donnant des informations qualitatives et quantitatives sur la quantité et la nature des groupes acides de surface. Une fois optimisée, cette méthode est réalisable sur de petites prises d'essai (centaine de mg) tout en conservant une bonne répétabilité et une bonne précision. Les résultats sont directement comparables avec ceux issus de la méthode de Boëhm [10].

Expérimentalement, environ 120 mg de TFC est coupé finement avec une paire de ciseaux et dispersé dans 75 mL d'une solution de NaNO_3 à 0,1 mol/L préalablement dégazée par bullage d' $\text{N}_2(\text{g})$ durant minimum 2 h. Après agitation durant 72 h, le pH est ajusté à environ 3 avec une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L. Enfin, les dosages potentiométriques par de la soude à 0,1 mol/L sont réalisés au moyen d'un titrateur automatique 848 Titrino plus, de la marque Metrohm®.

4.9. pH de charge nulle

Le pH de charge nulle (pH_{CN}) est le pH d'une solution dans laquelle est plongé un corps solide dont la charge nette de surface est nulle. Si le $pH_{solution} < pH_{CN}$ alors la surface du solide sera chargée positivement. Au contraire si le $pH_{solution} > pH_{CN}$ alors la surface sera chargée négativement.

Le pH de charge nulle constitue une caractéristique indispensable pour la compréhension de la nature des fonctions présentes à la surface du TFC. La charge de surface d'un TFC va être dépendante à la fois de la nature des groupements présents à sa surface mais aussi du pH de la solution. En effet, les groupements de surface présentant un caractère acide vont pouvoir se dissocier selon le pH pour conférer au TFC une charge nette négative. Au contraire, les groupements de surface présentant un caractère plutôt basique vont pouvoir se protoner et conférer une charge nette positive. La détermination du pH de charge nulle va permettre de prévoir le caractère acide ou basique des groupements présents à la surface du TFC et donc leur état de dissociation.

D'un point de vue expérimental, avant l'ajout de HCl 0,1 mol/L pour le dosage potentiométrique, le pH_{CN} est donné par la mesure du pH à l'équilibre de la solution de $NaNO_3$, dans laquelle le TFC coupé finement est mis en suspension et dispersé pendant 24 h.

4.10. Porosimétrie mercure

Le mercure se comporte comme un liquide non mouillant avec la plupart des matériaux comme les carbones activés ($\theta_{contact} > 90^\circ$). Une pression doit être appliquée pour faire entrer le mercure dans les pores d'un carbone activé. La différence de pression Δ_p nécessaire pour faire entrer le mercure dans un pore de forme cylindrique permet de remonter au diamètre d'accès aux pores selon l'équation de Washburn présentée ci – dessous.

$$D = - 4 \gamma \cos \theta / \Delta_p$$

Où γ représente la tension superficielle du mercure ($\gamma_{Hg} = 480 \text{ mJ.m}^{-2}$), θ angle de contact entre le mercure et la surface solide ($\theta = 140^\circ$) et Δ_p la différence de pression nécessaire pour forcer le mercure à entrer dans le pore (Pa).

La porosimétrie mercure permet d'accéder à des informations concernant la macroporosité ainsi que la mésoporosité des TFC, la limite macropores – mésopores étant fixé à 50 nm (nomenclature IUPAC).

En pratique, l'échantillon de TFC, préalablement séché, est placé dans la cellule du porosimètre mise sous vide et ensuite remplie de mercure. La pression est augmentée progressivement sur une gamme de pression appliquée comprise entre 0,0035 et 400 MPa, pression au-delà de laquelle l'intrusion de mercure peut endommager le matériau poreux. Deux mesures sont effectuées lors de la montée en pression: la pression dans le système et le déplacement de mercure dans le capillaire calibré. Ces mesures vont permettre de tracer une courbe porosimétrique représentant, pour chaque Δ_p appliqué, le volume de mercure qui a pénétré dans les pores.

4.11. Adsorption de gaz (N₂ et CO₂)

La caractérisation des TFC par adsorption de diazote gazeux N₂ va permettre d'accéder à des informations sur la porosité correspondant à des diamètres de pores compris entre 0,7 et 50 nm (micropores et mésopores). Par complémentarité, l'adsorption de dioxyde de carbone CO₂ renseigne sur la porosité correspondant à des pores de diamètres encore plus petits inférieurs à 2 nm (ultramicro pores et micropores).

L'analyse de l'isotherme d'adsorption a été faite d'une part à l'aide de méthodes classiques (BET, Dubinin-Radushkevich), et d'autre part par des méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de densité (modèle DFT). La méthode de Dubinin-Radushkevich est très utilisée car elle permet d'obtenir simplement une valeur du volume des pores de taille inférieure à 2 nm (à partir de l'isotherme à l'azote) ou 0,7 nm (à partir de l'isotherme au CO₂). Son principal inconvénient est de réduire l'isotherme d'adsorption à une fonction de 2 paramètres qui ne peut pas rendre compte de la complexité des structures poreuses. Au contraire, les modèles DFT permettent de calculer une distribution en taille des pores, au prix d'hypothèses très simples sur la forme des pores et la structure des matériaux carbonés.

- Les caractéristiques de la texture poreuse des TFC sont :
- S_{BET} (m²/g), la surface spécifique apparente obtenue à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote.
- V_{TOTAL} (N₂, DFT), le volume poreux total (cm³/g) obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote à $P/P_0 = 0,95$.
- V_{MESO} (N₂, DFT), le volume mésoporeux (cm³/g) obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote par application de la méthode DFT, pour des diamètres de pores compris entre 2 et 50 nm.

- $V_{\text{MICRO}} (\text{N}_2, \text{DFT})$, le volume microporeux (cm^3/g) obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote par application de la méthode DFT, pour des diamètres de pores inférieurs à 2 nm.

- $V_{\text{MICRO}} (\text{N}_2, \text{DR})$, le volume microporeux (cm^3/g) obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote par application de la méthode Dubinin - Radushkevich, pour des diamètres de pores inférieurs à 2 nm.

- $V_{\text{ULTRA}} (\text{CO}_2, \text{DR})$, le volume des micropores étroits ou ultramicropores (cm^3/g) obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption du dioxyde de carbone par application de la méthode Dubinin – Radushkevich, pour des diamètres de pores inférieurs à 0,7 nm.

Les analyses par adsorption de gaz ont été réalisées avec deux appareils du fabricant QUANTACHROME® : l'Autosorb - 1 pour la détermination des isothermes d'adsorption à l'azote et le Quadrasorb pour le dioxyde de carbone.

4.12. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une spectroscopie vibrationnelle donnant des informations sur la nature des liaisons chimiques et donc des informations sur la composition chimique d'une substance. Les phosphates de calcium présentent des bandes d'absorption qui permettent, dans une certaine mesure, de discriminer les différentes phases de CaP. Les détails et les références de la littérature concernant l'attribution des bandes d'adsorption des différents CaP sont donnés dans le chapitre III.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés en transmission avec un spectromètre Nicolet 6700 de la marque Thermo Scientific®. Les pastilles d'analyse de 100 mg sont constituées de l'échantillon de CaP à analyser dispersé à hauteur de 1% en masse dans du KBr. Les spectres moyennés sont obtenus par l'acquisition de 32 spectres enregistrés entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} .

4.13. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet d'accéder à des données structurales moyennées sur le volume d'échantillon considéré (généralement quelques mm^3). L'enregistrement de l'intensité diffractée en fonction de l'angle θ permet de détecter les périodicités d_{hkl} présentes dans le matériau, la diffraction ayant lieu seulement lorsque les conditions de la loi de Bragg ($d_{hkl} = \lambda / 2 \sin\theta$) sont satisfaites. Appliquée aux phosphates de calcium, cette technique de caractérisation permet de donner des informations sur la nature des phases phosphocalciques présentes au sein des dépôts ainsi que sur leur cristallinité et leur degré d'ordre/désordre.

Les diffractogrammes ont été enregistrés soit en réflexion directe sur le TFC + dépôt de CaP, soit en transmission. Dans ce dernier cas, le dépôt de CaP, extrait selon la méthode décrite au paragraphe 3.2., est placé dans un capillaire de 0,6 mm de diamètre. L'appareil de diffraction des rayons X est de la marque INEL[®] avec un générateur XRG 3000 2kW connecté à une source de cuivre qui fournit un faisceau de rayons X dont la longueur d'onde est $\lambda_{\alpha\text{Cu}} = 0,154056 \text{ nm}$. Le détecteur courbe est du type CPS 120. La durée d'acquisition des diffractogrammes est d'1h.

4.14. Résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de RMN en rotation à l'angle magique (RMN MAS) est une technique quantitative qui permet de sonder les environnements chimiques locaux du ^{31}P et du ^1H dans des solides cristallins, désordonnés ou amorphes, et ainsi, de mettre en évidence les différentes phases présentes, de déterminer leurs proportions relatives et de donner des informations sur l'ordre et le désordre structural (à l'échelle locale) dans les phases présentes. La rotation à l'angle magique est nécessaire dans le cas de l'étude de solide afin de supprimer les élargissements de raies dus aux parties anisotropes des différentes interactions (déplacement chimique, quadripolaire, dipolaire et couplage J) et d'améliorer la résolution spectrale.

Au cours de l'étude, plusieurs expériences ont été réalisées avec la RMN MAS :

- La première a consisté à enregistrer les spectres du ^{31}P découplé du ^1H afin d'obtenir des informations quantitatives sur les phases de CaP.
- La deuxième a consisté à amplifier le signal du ^{31}P par transfert de l'aimantation du proton ^1H , un noyau très abondant vers celui du ^{31}P moins abondant en utilisant les couplages dipolaires résiduels en MAS (CP-MAS). De plus, ce transfert d'aimantation permet de donner des informations sur les proximités spatiales qui existent entre les noyaux du ^1H et du ^{31}P . Les spectres acquis en CP-MAS ne sont pas quantitatifs.
- La dernière expérience a consisté à enregistrer les spectres corrélés (HETCOR) du noyau du ^1H abondant et du noyau du ^{31}P peu abondant. Après un traitement mathématique par une transformée de Fourier, on récupère une carte de corrélation 2D entre les deux noyaux. Cette carte est représentative des proximités spatiales

entre les sites des protons et les sites du phosphore des dépôts de CaP étudiés.

Comme pour le CPMAS, cette expérience n'est pas quantitative.

Expérimentalement, le TFC avec son dépôt de CaP est coupé finement et tassé dans un rotor. Le spectromètre RMN utilisé est un Advance 300 de la marque Bruker®, du laboratoire CEMHTI du campus CNRS d'Orléans, étude réalisée en collaboration avec Franck Fayon.

4.15. Evaluation de la biocompatibilité des biomatériaux

Dans le but d'évaluer la biocompatibilité des TFC et des biomatériaux hybrides TFC / CaP avec des ostéoblastes humains primaires (HOST), deux tests sont utilisés. Le premier appelé test au XTT va servir à évaluer la cytotoxicité des TFC avec et sans dépôts de CaP et le second appelé test « Live / Dead » permettra d'évaluer la prolifération des cellules à la surface des TFC. Avant de réaliser les tests, il est nécessaire de préparer les HOST à cultiver.

4.15.1. Préparation de la solution d'HOST

Les HOST sont cultivés dans une flasque en plastique placée dans une étuve à 37°C sous humidité contrôlée. Les cellules étant adhérentes au plastique, il est nécessaire pour les compter et les utiliser, de les décoller sans les tuer grâce à la trypsine.

Le milieu de culture est vidé puis la flasque est rincée deux fois avec 5 mL de solution physiologique (Tampon Phosphate) afin de retirer le milieu de culture restant ainsi que les protéines. La trypsine (2 mL) est ajoutée dans la flasque qui est ensuite placée 5 min à 37°C pour décoller les cellules. La trypsine est ensuite désactivée par ajout de 4 mL de milieu de culture complet. Après homogénéisation, le milieu est placé dans un tube en plastique stérile. La flasque est rincée avec 4,5 mL de milieu complet qui sont ensuite ajoutés au tube. Le nombre de cellules est déterminé suivant le protocole de comptage sur une lame de Malassez (Annexe B). Ainsi il est possible de prélever un nombre de cellules précis par pipetage du milieu de culture afin de les utiliser dans les différents tests.

4.16. Principe et méthodologie du test au XTT

4.16.1. Principe

C'est un test colorimétrique commercialisé par la société TREVIGEN. Le XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)2H-tetrazolium-5-carbox-anilide) est un sel soluble en milieu aqueux (jaune) se transformant en formazan (violet) lorsqu'il réagit avec les enzymes mitochondriales des cellules métaboliquement actives (Figure II-26). En mesurant la densité

optique du milieu de culture des biomatériaux après leur réaction avec le XTT, il est possible d'évaluer la viabilité cellulaire.

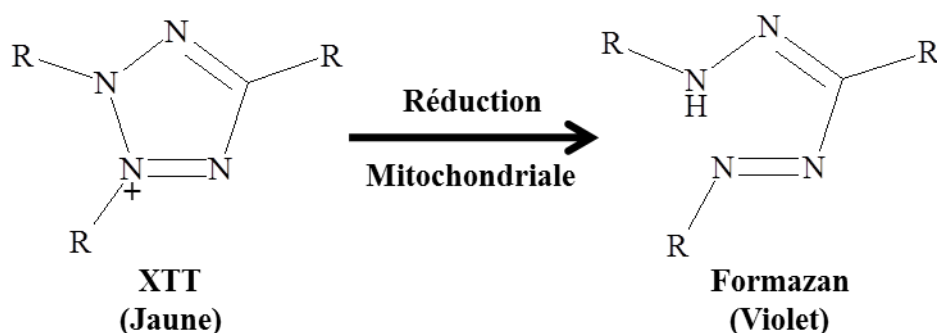


Figure II-26 : Réaction de réduction du XTT par les enzymes mitochondriales.

4.16.2. Méthodologie

Préparation de la solution de XTT :

La solution « réactif XTT » à 0,9 g/L en XTT précipite lors de son stockage à -20°C. Elle est chauffée à 37 °C pendant plusieurs minutes jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.

La solution « Activateur XTT » contenant du PMS (methosulfate de phénazine) sert à améliorer la vitesse et l'efficacité des tests de prolifération cellulaire. De même que pour le réactif XTT, la solution précipite lors de son stockage à -20°C. Elle doit être chauffée à 37°C durant quelques minutes jusqu'à la dissolution complète du précipité.

Juste avant son utilisation, la solution de travail XTT est préparée en mélangeant 100 µL d'activateur XTT à 5 mL de réactif XTT.

Détermination du nombre d'HOST à ensemer par puits de culture :

Cette étape est nécessaire afin d'obtenir le nombre optimal de cellules à ensemer par puit de culture afin d'observer, au choix, une prolifération ou une mortalité cellulaire. Cette détermination est détaillée dans le chapitre III § 3.1.1. de ce manuscrit.

Mesure de la densité optique des milieux de culture :

La mesure de la densité optique (D.O.) à 490 nm est corrigée par rapport à une mesure de la D.O. de référence à 630 nm pour éliminer les artefacts de mesure. Le spectrophotomètre d'absorption utilisé est un ELx800 de la marque Biotex.

La D.O. mesurée dépend de la concentration en formazan elle-même dépendante de la concentration en mitochondries. Cette dernière étant relative à l'activité cellulaire, la mesure de la D.O. permet de déterminer le nombre de cellules vivantes dans le milieu de culture. Ainsi, il est possible de déterminer la cytotoxicité des biomatériaux en contact avec le milieu de culture et les cellules.

Il est nécessaire d'établir la courbe représentant la D.O. en fonction du nombre de cellules afin d'en déterminer le domaine de linéarité. Ainsi, la mesure de la D.O. sera proportionnelle aux nombres d'HOST vivants dans le milieu de culture. La détermination de la droite de calibration est détaillée dans le chapitre III § 3.1.2.

4.17. Principe et méthodologie du test de viabilité des HOST en fluorescence

4.17.1. Principe

C'est un test de fluorescence qui permet d'identifier les cellules vivantes et les cellules mortes. Il repose sur l'utilisation de deux molécules :

- La calcéine AM qui est une molécule non fluorescente ayant la capacité de traverser les membranes des cellules. L'activité cellulaire convertit la molécule en calcéine hautement fluorescente incapable de retraverser les membranes cellulaires intactes. La calcéine s'accumule ainsi dans les cellules vivantes et leur confère un signal fluorescent vert.
- L'éthidium-homodimer-1 est une molécule qui traverse les membranes endommagées des cellules mortes et qui en se liant à l'ADN confère à la cellule un signal fluorescent rouge.

4.17.2. Méthodologie

Les biomatériaux hybrides CaP/TFC sont lavés avec du PBS puis maintenus durant 20 minutes dans une solution de PBS contenant 2 $\mu\text{mol/L}$ de calcéine-AM et 4 $\mu\text{mol/L}$ d'éthidium-homodimer-1.

Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, les biomatériauxensemencés avec les HOST primaires sont observés au moyen d'un microscope à fluorescence Zeiss Axioskop (Carl Zeiss, Le Pecq, France) équipés avec de filtres FITC et Texas Red.

Références

1. Eliaz N, Sridhar TM. *Electrocrystallization of Hydroxyapatite and Its Dependence on Solution Conditions*. Cryst Growth Des. 5 nov 2008;8(11):3965-77.
2. Shi J, Dong LL, He F, Zhao S, Yang G-L. *Osteoblast responses to thin nanohydroxyapatite coated on roughened titanium surfaces deposited by an electrochemical process*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. nov 2013;116(5):e311-6.
3. Eliaz N, Eliyahu M. *Electrochemical processes of nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium supported by real-time electrochemical atomic force microscopy*. J Biomed Mater Res A. 2007;80A(3):621-34.
4. Han H, Mikhalevsky SV, Phillips GJ, Lloyd AW. *Calcium phosphate sonoelectrodeposition on carbon fabrics and its effect on osteoblast cell viability in vitro*. New Carbon Mater. juin 2007;22(2):121-5.
5. Drevet R. *Élaboration de nouveaux revêtements prothétiques phosphocalciques par électrodéposition.: caractérisation physico-chimique et structurale*. Reims; 2011 <http://www.theses.fr/2011REIMS011>
6. Berenguer R, Marco-Lozar JP, Quijada C, Cazorla-Amorós D, Morallón E. *Effect of electrochemical treatments on the surface chemistry of activated carbon*. Carbon. avr 2009;47(4):1018-27.
7. Bayram E, Ayranci E. *A systematic study on the changes in properties of an activated carbon cloth upon polarization*. Electrochimica Acta. 1 févr 2011;56(5):2184-9.
8. Castillejos-López E, Nevskaya DM, Muñoz V, Guerrero-Ruiz A. *On the interactions of phenol, aniline and p-nitrophenol on activated carbon surfaces as detected by TPD*. Carbon. mai 2008;46(6):870-5.
9. Pastrana-Martínez LM, López-Ramón MV, Moreno-Castilla C. *Adsorption and thermal desorption of the herbicide fluroxypyr on activated carbon fibers and cloth at different pH values*. J Colloid Interface Sci. 1 mars 2009;331(1):2-7.
10. Bandosz TJ, Ania CO. *Surface chemistry of activated carbons and its characterization*. Acta Carbon Surf Environ Remediat. 2006;159-229.
11. Salame II, Bandosz TJ. *Surface Chemistry of Activated Carbons: Combining the Results of Temperature-Programmed Desorption, Boehm, and Potentiometric Titrations*. J Colloid Interface Sci. 1 août 2001;240(1):252-8.
12. Gorgulho HF, Mesquita JP, Gonçalves F, Pereira MFR, Figueiredo JL. *Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption*. Carbon. oct 2008;46(12):1544-55.

13. Figueiredo J., Pereira MF., Freitas MM., Órfão JJ. *Modification of the surface chemistry of activated carbons*. Carbon. 1999;37(9):1379-89.
14. Rufford TE, Zhu J, Hulicova-Jurcakova D. *Green carbon materials advances and applications*. Pan Stanford Publishing. 2014.
15. Jagiello J, Bandosz TJ, Putyera K, Schwarz JA. *Determination of proton affinity distributions for chemical systems in aqueous environments using a stable numerical solution of the adsorption integral equation*. J Colloid Interface Sci. cover date 1995;172(2):341-6.
16. Karampas IA, Kontoyannis CG. *Characterization of calcium phosphates mixtures*. Vib Spectrosc. janv 2013;64(0):126-33.

Chapitre III
Etude des matériaux hybrides
CaP/Tissus de fibres de carbone.
Dépôts de CaP obtenus par
sono-électrodéposition

Sommaire du chapitre III

1. Caractérisation du substrat : le tissu de fibres de carbone KIP1200.....	89
1.1. Morphologie et architecture du tissu de fibres de carbone	89
1.2. Caractéristiques physico-chimiques	91
1.2.1. Composition chimique du TFC KIP1200.....	91
1.2.1.1. Analyse élémentaire (C, O, H et N).....	91
1.2.1.2. Dosage potentiométrique et pH de charge nulle (pH _{CN})	91
1.2.1.3. Désorption thermogravimétrique programmée (DTP).....	93
1.2.1.4. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	94
1.2.2. Caractéristiques texturales du KIP1200	95
1.2.2.1. Porosimétrie au mercure.....	95
1.2.2.2. Adsorption de gaz N ₂ et CO ₂	97
1.2.3. Propriétés électriques des tissus de fibres de carbone activés.....	98
1.2.4. Bilan des caractéristiques du substrat au regard de la stratégie de synthèse des dépôts de Ca/P et de l'application visée.....	99
1.3. Modifications de la chimie de surface des tissus de fibres de carbone par oxydation électrochimique	99
1.3.1. Influence du potentiel de polarisation sur la composition chimique de surface du KIP1200.....	100
1.3.2. Influence du potentiel de polarisation sur la porosité du tissu KIP 1200 .	103
1.3.3. Caractéristiques des tissus oxydés	103
2. Dépôts de CaP obtenus par sono-électrodéposition.....	104
2.1. Synthèse des dépôts	104
2.1.1. Optimisation de la géométrie de la contre-électrode.....	104
2.1.2. Influence du pH initial de l'électrolyte	107
2.1.3. Influence de la durée de polarisation.....	109
2.1.4. Optimisation de l'électrode de travail	111
2.1.5. Conclusion : choix du dispositif expérimental et des conditions opératoires .	112
2.2. Influence de la densité de courant sur la quantité et la nature des dépôts.....	112
2.2.1. Quantité et homogénéité des dépôts de CaP	112
2.2.2. Morphologie des dépôts de CaP	115
2.3. Caractérisation des dépôts par IRTF	117
2.3.1. Signatures des CaP observés par spectroscopie infrarouge	117

2.3.2.	Composition chimique et nature des phases de CaP au sein des dépôts ...	121
2.4.	Caractérisation des dépôts par diffraction des rayons X.....	125
2.5.	Caractérisation des dépôts de CaP par MET	129
2.5.1.	Caractérisation de la microtexture des dépôts de CaP	129
2.5.2.	Détermination des rapports atomiques Ca/P par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX en MET)	131
2.5.3.	Imagerie MET haute résolution et diffraction électronique des dépôts....	132
2.5.3.1.	Microtexture et structure des aiguilles d'HAP obtenues à 270 mA/g....	132
2.5.3.2.	Microtexture et structure des feuillets de CaP obtenus à 25 mA/g.....	134
2.6.	Quantification des phases phosphocalciques et caractérisation de la structure des dépôts par Résonance Magnétique Nucléaire en Rotation à l'Angle Magique	136
2.6.1.	RMN du ^{31}P	136
2.6.2.	RMN du ^1H	141
2.6.3.	Spectres 2D de corrélation hétéronucléaire ^{31}P - ^1H	142
2.6.4.	Discussion et conclusion de l'étude par RMN	144
3.	Tests de prolifération in vitro d'ostéoblastes humains primaires	145
3.1.	Mesure de la viabilité et de la prolifération des HOST sur les biomatériaux hybrides TFC/CaP par la méthode au XTT.....	145
3.1.1.	Détermination de la densité d'ensemencement optimale.....	146
3.1.2.	Etalonnage de l'absorbance en fonction de la densité des cellules et du temps d'incubation.....	148
3.1.3.	Résultats des tests de prolifération des HOST primaires sur les biomatériaux hybrides TFC / CaP.	149
3.1.4.	Impact de la nanotexture des TFC sur la prolifération des HOST.	152
3.2.	Test de viabilité des HOST en fluorescence	153
3.3.	Conclusion sur les tests de viabilités cellulaires.....	156
	Références	157

La première partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation du TFC KIP1200 brut et après oxydation électrochimique. Plus particulièrement, il est détaillé l'influence du potentiel appliqué lors de l'oxydation sur la composition chimique de surface ainsi que sur la texture du TFC KIP1200.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de la formation par sono-électrodéposition des dépôts phosphocalciques à la surface du TFC KIP1200. Dans une première sous-partie sont exposés la conception et l'optimisation de la cellule électrochimique, ainsi que l'optimisation des paramètres expérimentaux tels que la concentration et le pH initial de l'électrolyte, ainsi que la durée de polarisation. La deuxième sous-partie porte sur l'étude de l'influence de la densité de courant sur les caractéristiques morphologiques, physico-chimiques, microtexturales et structurales des biomatériaux hybrides TFC KIP1200 / CaP.

La dernière partie de ce chapitre traite, dans un premier temps, de l'impact des caractéristiques des dépôts de CaP sur la biocompatibilité des matériaux hybrides au travers de tests *in vitro* avec des ostéoblastes humains primaires. Dans un second temps, les caractéristiques physico-chimiques de plusieurs tissus (KIP1200 brut et oxydé, BBV800 et non activé) sont brièvement décrites afin d'en étudier l'impact sur leur biocompatibilité *in vitro*.

1. Caractérisation du substrat utilisé : le tissu de fibres de carbone KIP1200

Le KIP1200 fourni par la société DACARB[®] est un tissu dont les fibres de carbone sont obtenues par carbonisation d'un précurseur de type résine phénolique (voir chapitre I, paragraphe 2.2.1). Le tissu est activé à la vapeur d'eau entre 850 et 950 °C afin de créer de la nanoporosité. Ce paragraphe décrit la morphologie et les propriétés physico-chimiques du KIP1200 qui a été utilisé pour cette étude.

1.1. Morphologie et architecture du tissu de fibres de carbone

Le KIP1200 possède un grammage de l'ordre de 140 g/m² et des fibres d'un diamètre moyen de l'ordre de 10-12 µm. Les clichés MEB de la Figure III-27a montrent la morphologie et l'organisation des fibres au sein du tissu KIP1200. Les faisceaux de quelques dizaines de fibres sont regroupés et torsadés en mèches, elles-mêmes tissées dans une

organisation de type « armure toile ». Les faisceaux parallèles entre eux sont soulevés en quinconce pour laisser passer les faisceaux de trame perpendiculairement. Les fibres sont cylindriques (Figure III-27b) et à leur surface on observe une porosité constituée de pores visibles sur le cliché MEB au plus fort grandissement (Figure III-27c), qui sera décrite paragraphe 1.2.2.2. Cette porosité accessible à la surface de la fibre confère ainsi au KIP1200 une diffusion intraparticulaire rapide ainsi qu'une faible résistance au transfert de masse et, par conséquent, une grande capacité d'adsorption, que ce soit en phase gazeuse ou liquide. De plus, cette porosité présente un intérêt dans les échanges des molécules entre le TFC et les fluides biologiques environnants ce qui devrait améliorer le processus de régénération osseuse.

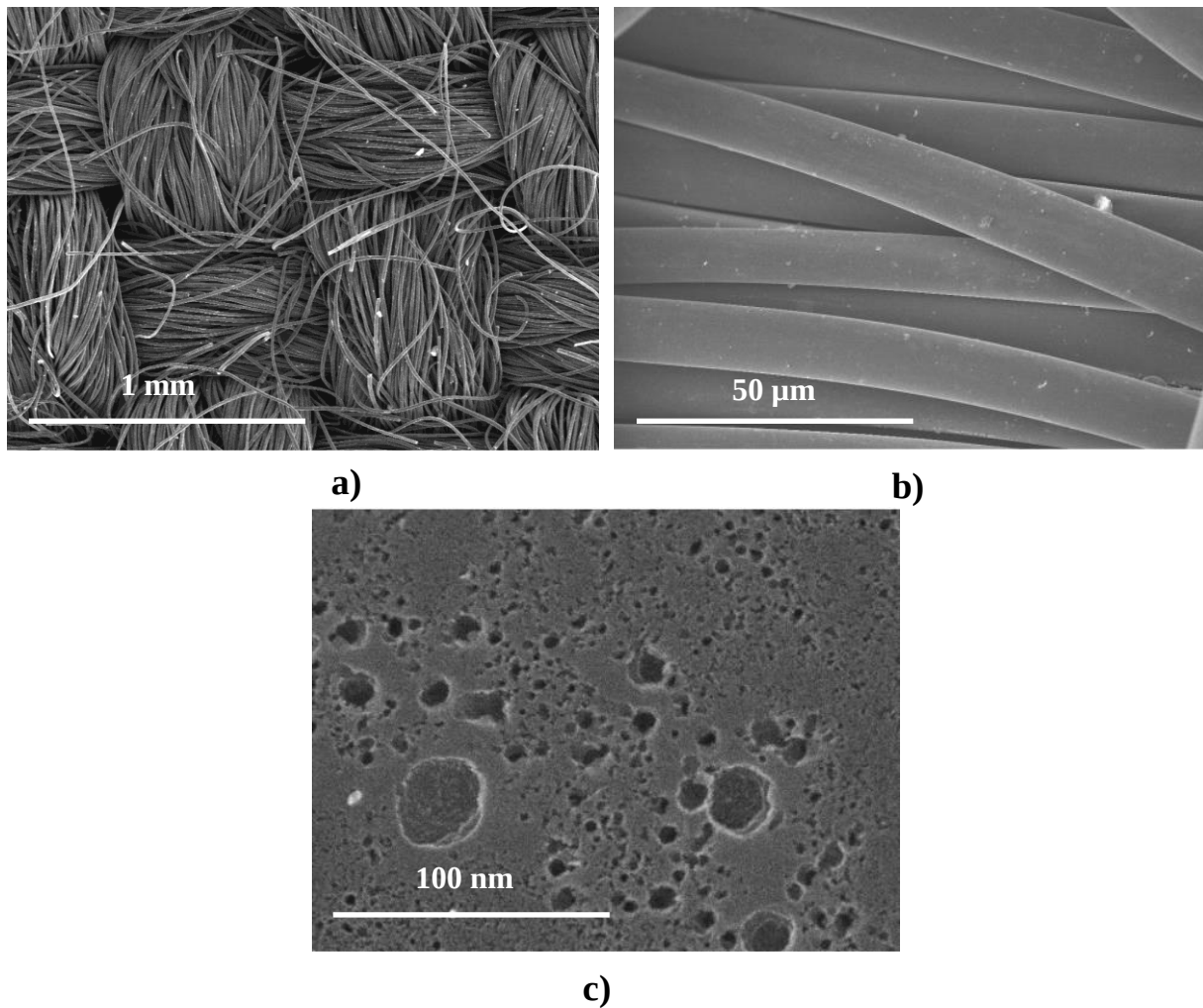


Figure III-27 : Images MEB du TFC KIP1200. a) Image de l'architecture du tissu (x50), b) image des fibres (x1000) et c) image de la surface d'une fibre (x100000)

1.2. Caractéristiques physico-chimiques

1.2.1. Composition chimique du TFC KIP1200

1.2.1.1. Analyse élémentaire (C, O, H et N)

L'analyse élémentaire permet de déterminer les compositions chimique et massique globale du tissu KIP1200 par analyse chromatographique des gaz issus de la décomposition thermique du tissu lors de sa combustion sous atmosphère contrôlée soit à 950°C pour l'analyse des éléments C, H et N, soit lors de la pyrolyse à 1100°C pour l'analyse de l'oxygène.

Dans le Tableau III-5 est reportée la composition massique de ces quatre éléments constituant le tissu. Il apparaît que le TFC est dépourvu d'azote et qu'il est constitué majoritairement de carbone à plus de 90 % avec moins de 2 % d'oxygène et moins de 1% d'hydrogène. On constate que la somme des pourcentages massiques de ces quatre éléments n'atteint pas 100 %. Ceci est dû au fait qu'il reste des cendres non analysées issus de la pyrolyse incomplète en raison de la température d'analyse du four. Le taux de cendres est estimé à environ 5 %.

Tableau III-5 : Composition chimique du KIP1200 déterminée par analyse élémentaire (% massique).

TFC	Carbone (%)	Oxygène (%)	Hydrogène (%)	Azote (%)	Total (%)
KIP 1200	92,4	1,6	0,6	0	94,6

1.2.1.2. Dosage potentiométrique et pH de charge nulle (pH_{CN})

Le dosage potentiométrique des fonctions chimiques de surface permet de déterminer et quantifier les fonctions acides de surface selon leurs valeurs de pKa. C'est une technique d'analyse réalisée en solution aqueuse qui permet de caractériser la fonctionnalité de surface, dans un état proche de celui existant lors de la synthèse électrochimique des revêtements de CaP.

La déconvolution de la courbe d'affinité protonique en fonction du pH et l'intégration de la courbe de distribution des fonctions chimiques de surface (Figure III-28) révèlent que cette dernière est pauvre en fonctions acide avec seulement 0,48 mmol/g de fonctions chimiques. L'essentiel des fonctions ont un pKa > 7 avec une prédominance des fonctions lactones (pKa ~ 9,5). Il existe une faible quantité (0,05 mmol/g) de fonctions avec des pKa < 7 attribuées à des fonctions de type acide carboxylique (Figure III-29).

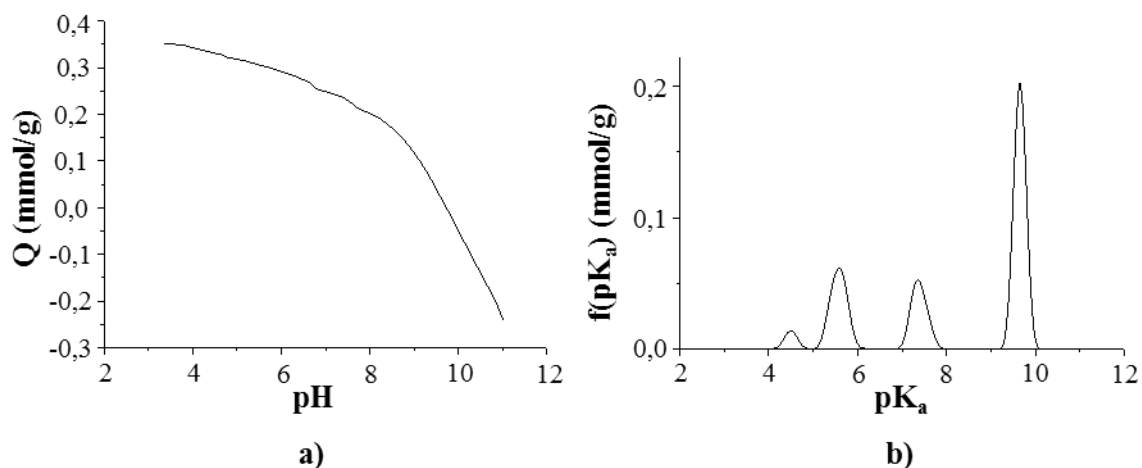


Figure III-28: Courbes d'affinité protonique en fonction du pH (a) et de distribution des fonctions de surface (b) du KIP 1200.

Bandosz et Ania [1] soulignent que la forme de la courbe d'affinité protonique est dépendante de la vitesse de titration, de la taille des particules et de l'activité de la solution. Ainsi, malgré un pK_a de $\sim 9,5$, le pic pourrait aussi bien correspondre à des fonctions de type phénol qui ont un pK_a de $\sim 11,5$. De plus, les auteurs indiquent que des fonctions chimiques différentes peuvent avoir des pK_a similaires et ne sont donc pas différentiables par titrage potentiométrique. Le pH_{CN} de 9,4 des fibres de carbone du KIP1200 est caractéristique de l'hydrophobicité de ces fibres (Tableau III-6).

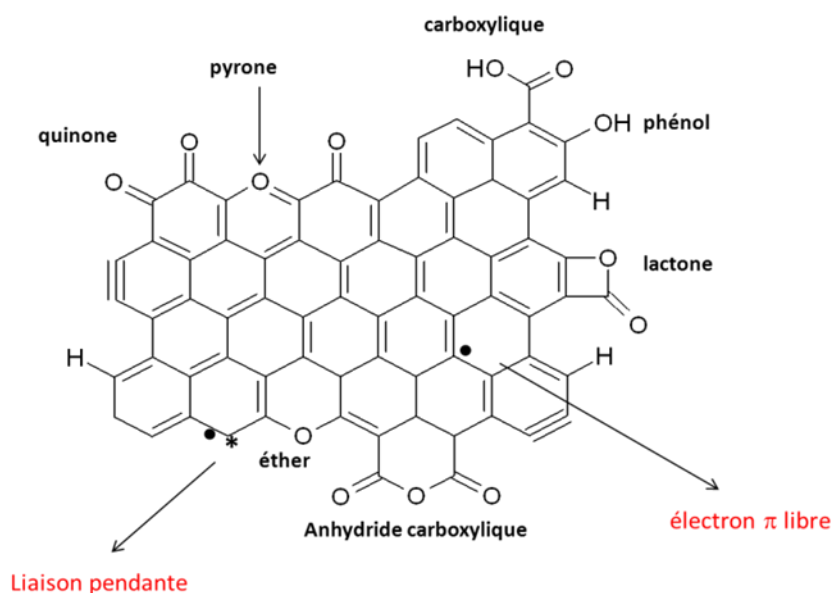


Figure III-29 : Fonctions oxygénées acides et basiques à la surface d'un matériau carboné. Adapté de Radovic [2].

Tableau III-6 : Quantification par dosage potentiométrique des fonctions de surface du KIP1200 selon la distribution de leurs valeurs de pKa.

TFC	pH _{CN}	Distribution pK _a (mmol/g)		
		3 < pK _a < 7	7 < pK _a < 11	Total
<i>KIP 1200</i>	9,4	0,05	0,43	0,48

1.2.1.3. Désorption thermogravimétrique programmée (DTP)

La DTP (ou TPD en anglais) effectuée au sein du laboratoire ICMN [3] permet de caractériser la composition chimique de surface du KIP1200 par l'analyse des gaz de décomposition (H₂O, CO et CO₂) issus du tissu soumis à un traitement thermique à 1200°C sous flux d'hélium.

Le Tableau III-7 montre que le KIP 1200 possède un taux massique en oxygène de 2,8 %. Le dégagement d'eau, caractéristique de la décomposition thermique des groupes phénoliques, est plus important que le dégagement de dioxyde de carbone, caractéristique de la décomposition thermique des fonctions de type lactone, anhydride et carboxylique. Cela signifie que le tissu KIP1200 possède des fonctions phénols ainsi que des fonctions de type lactone, anhydride et carboxylique.

Tableau III-7 : Quantités de CO et CO₂ dégagées lors du traitement thermique à 1200 °C.

TFC	Perte de masse (%)	H ₂ O (μmol/g)	CO (μmol/g)	CO ₂ (μmol/g)	O (% masse)
KIP 1200	4,1	735	565	226	2,8

La déconvolution des profils de dégagement de CO₂ et CO permet d'identifier plusieurs contributions associées aux différents groupes oxygénés présents à la surface d'un TFC. Ces contributions sont identifiées au moyen des données fournies par les travaux de Bandosz, Figueiredo, Zhou et Gorgulho.[1, 4–6]. Cependant, les paramètres expérimentaux tels que la texture poreuse de l'adsorbant, la rampe de température du four d'analyse et la géométrie de l'appareil utilisé vont affecter les valeurs de certaines températures de décomposition. C'est la raison pour laquelle l'attribution fine des profils CO et CO₂ à telle ou telle fonction chimique prête parfois sujet à discussion [7].

La Figure III-30 présente les profils de dégagement du CO₂ et du CO du KIP 1200, les pics de désorption de CO₂ à 291, 430 et 620 °C correspondent à des groupements de types carboxylique, anhydride et lactone. Les pics de désorption de CO à 525, 737 et 870 °C sont attribués respectivement à des groupements de type anhydride, lactone/phénol et

carbonyle/quinone. Les valeurs d'intégration des contributions des profils de dégagement du CO₂ et du CO sont données dans le Tableau III-8. Les concentrations des différentes fonctions acides présentes à la surface du KIP 1200 augmentent selon l'ordre suivant : carboxylique ~ lactone ~ anhydride < phénol < carbonyle/quinone. Ces résultats corroborent ceux obtenus à partir des dosages potentiométriques.

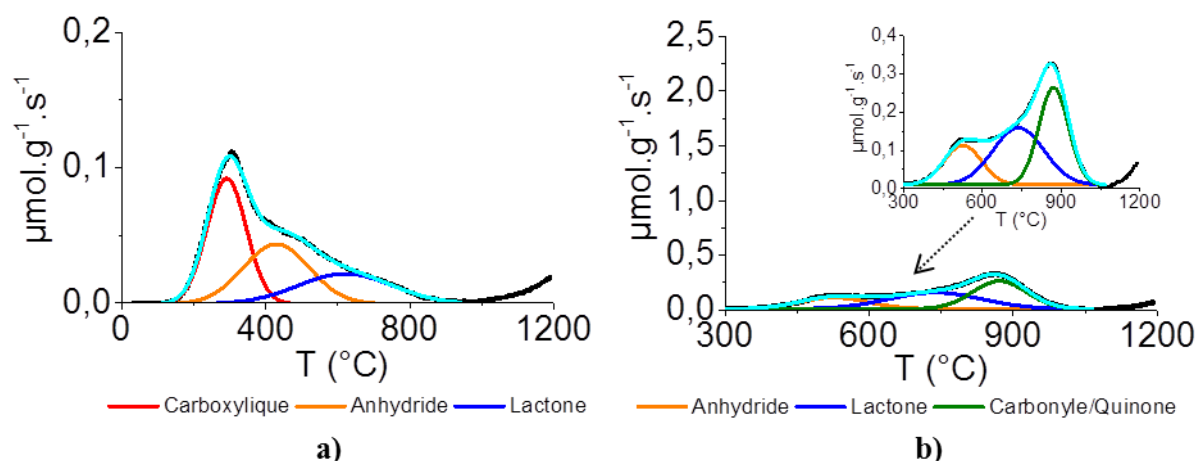


Figure III-30 : Déconvolution des profils de dégagement du CO₂ (a) et du CO (b) du KIP1200 [3].

Tableau III-8 : Fonctions chimiques (et leurs proportions) correspondant aux différents pics de CO₂ et de CO apparaissant au cours du traitement thermique de DTP du KIP1200.

	T (°C)	291	430	620
	Groupe	Carboxylique	Anhydride	Lactone
CO ₂	Aire	12,7	10,2	7,4
	T (°C)	525	737	870
	Groupe	Anhydride	Lactone/Phénol	Carbonyle/Quinone
CO	Aire	18,5	36,3	35,9

1.2.1.4. Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

L'analyse de la surface des fibres de carbone par spectroscopie XPS donne des informations sur la nature et la quantité des liaisons formées par le carbone et l'oxygène et donc sur la nature et la quantité des fonctions chimiques de surface.

La déconvolution du signal O_{1s} (Figure III-31-a) met en évidence trois contributions : les deux premières représentatives de l'oxygène lié au carbone par une double-liaison (532,3 eV) et par une simple-liaison (533,4 eV) et une troisième attribuée à de l'eau adsorbée à la

surface des fibres (~533-536 eV). La déconvolution du signal C_{1s} (Figure III-31-b) confirme l'existence des liaisons C-O et C=O (286,2 et 287,8 eV respectivement).

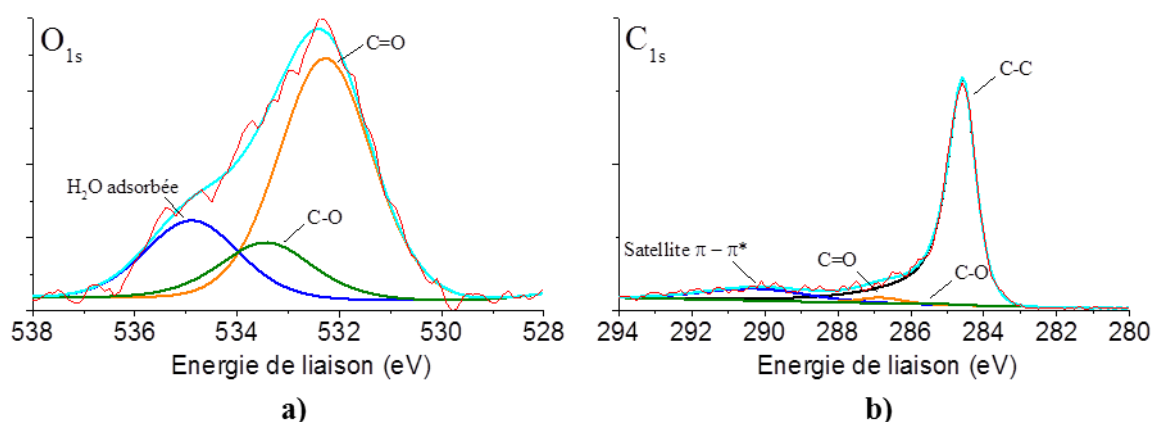


Figure III-31 : Spectres XPS, signaux O_{1s} (a) et C_{1s} (b) du KIP1200.

Les résultats de la quantification issue de l'intégration des différentes composantes des signaux sont donnés dans le Tableau III-9. La plus grande quantité de liaisons C=O que de C-O signifie qu'il y a quantitativement plus de fonctions comportant une liaison C=O. Ainsi, les groupements carbonyle sont majoritaires tandis que les groupements de types lactone, phénol et carboxylique sont présents en plus faible proportion. Ceci confirme les résultats obtenus par DTP. Enfin, l'absence d'impureté métallique indique que les fibres et le tissu KIP1200 n'ont pas subi de traitement d'ensimage.

Tableau III-9 : Dosage des fonctions oxygénées de surface du KIP1200 déterminée par XPS (% atomique).

TFC	O (% at)		O_{1s}		C_{1s}			
	Total	Lié au C	C=O	C-O	C-C	C-O	C=O	Satellite
KIP1200	3,4	2,7	532,3 eV	533,4 eV	284,6 eV	286,2 eV	287,8 eV	290,2 eV
			2,2	0,5	82	0,5	2,3	11,8

1.2.2. Caractéristiques texturales du KIP1200

1.2.2.1. Porosimétrie au mercure

La porosimétrie au mercure permet d'accéder à des informations concernant la macroporosité ainsi que la mésoporosité des TCF, la limite macropores – mésopores étant fixée à 50 nm (nomenclature IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry). La Figure III-32 donne la distribution du volume poreux du KIP1200 entre 3 nm et 450 μm [3].

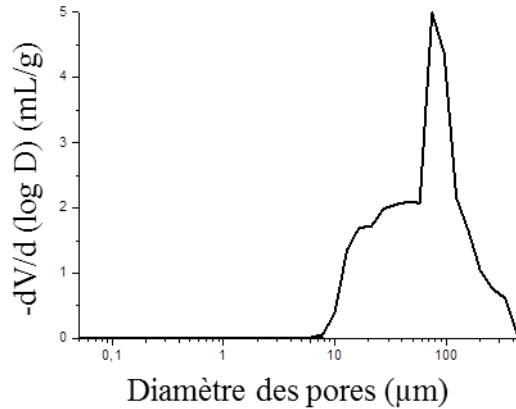


Figure III-32 : Distribution du volume poreux (-dV/d(log(D)) en fonction du diamètre d'accès aux pores [3].

Dans le domaine de la macroporosité compris entre 0,8 et 450 μm , le KIP 1200 présente un maximum vers 75 μm qui correspond à l'espace entre les mèches constitutives du tissu. La distribution du volume poreux permet également d'accéder à l'espace entre les fibres présentes à l'intérieur d'une même mèche qui est compris entre 0,8 et 60 μm dans le cas du KIP 1200. La distribution du volume poreux est nulle dans le domaine de la macroporosité compris entre 0,05 et 0,8 μm ce qui indique l'absence de macropores dans le TFC. Ceci est confirmé par les images MEB réalisées à fort grossissement où on n'observe pas de macropores. Par ailleurs, très peu de pores sont observés dans le domaine de la mésoporosité (entre 3 et 50 nm).

Les différentes caractéristiques extraites des données de la porosimétrie au mercure sont rassemblées dans le Tableau III-10. Le volume poreux du tissu prend en considération seulement les pores dont le diamètre est supérieur à 0,8 μm . Les masses volumiques du tissu ρ_{tissu} et des fibres ρ_{fibre} sont estimées à partir du volume de Hg à la pression initiale et pour des pores de diamètres supérieurs à 0,8 μm . Pour des diamètres de pores compris entre 0,05 et 0,8 μm , le volume de Hg est négligeable car le volume poreux correspondant à la macroporosité de la fibre est très faible en comparaison de celui pour des diamètres de pores supérieurs à 0,8 μm .

La compacité de l'assemblage des fibres peut être déduite :

$$\text{Compacité} = \frac{\rho_{\text{tissu}}}{\rho_{\text{fibre}}} \times 100$$

Tableau III-10 : Caractéristiques des TCF obtenues à partir des données de porosimétrie Hg. Le volume poreux est dû au mode d'assemblage des mèches par tissage.

TFC	ρ_{tissu} (g/cm ³)	ρ_{fibre} (g/cm ³)	V_{poreux} (cm ³ /g)	Compacité (%)
KIP 1200	0,22	0,76	3,19	29

Le tissu KIP 1200 possède une masse volumique de 0,22 g/cm³ et présente un assemblage des mèches avec un volume poreux de 3,19 cm³/g. Ces mèches sont composées de fibres denses et poreuses ayant une masse volumique de 0,76 g/cm³. La faible compacité, de 29 %, est caractéristique d'un assemblage plutôt aéré de fibres denses.

1.2.2.2. Adsorption de gaz N₂ et CO₂

La porosimétrie au mercure ne permet de sonder que des pores dont le diamètre est supérieur à 3 nm. La caractérisation du tissu KIP1200 par adsorption de diazote gazeux N₂ va permettre d'accéder à des informations sur la porosité correspondant à des diamètres de pores compris entre 0,7 et 50 nm (micropores et mésopores). Par complémentarité, l'adsorption de dioxyde de carbone CO₂ renseigne sur la porosité correspondant à des pores de diamètres encore plus petits inférieurs à 2 nm (ultramicro pores et micropores).

L'isotherme d'adsorption d'azote présenté sur la Figure III-33 est du type I et l'absence de boucle d'hystérésis est caractéristique d'un matériau microporeux [8].

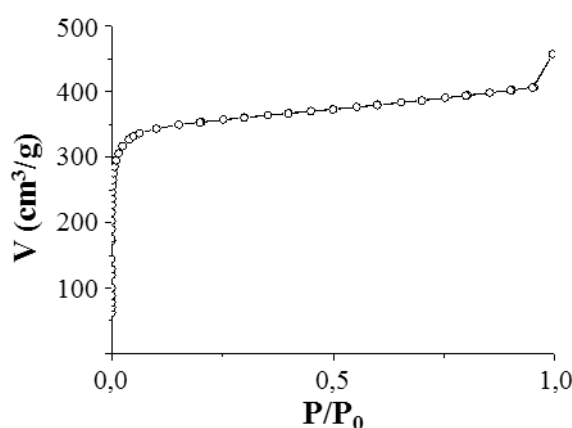


Figure III-33 : Isotherme d'adsorption d'azote (N₂) à -196 °C du KIP1200.

Tableau III-11 : Caractéristiques de la nanotexture poreuse du KIP1200 déterminée à partir des isothermes d'adsorption d'azote et de dioxyde de carbone.

TFC	S_{BET} (m^2/g)	V_{TOTAL} (cm^3/g)	V_{MICRO} (N_2 , DFT) (cm^3/g)	V_{MESO} (N_2 , DFT) (cm^3/g)	V_{MICRO} (N_2 , DR) (cm^3/g)	V_{ULTRA} (CO_2 , DR) (cm^3/g)
KIP 1200	1693	0,68	0,51	0,09	0,53	0,52

Les calculs utilisant la méthode DFT donnent un volume poreux total de $0,68 \text{ cm}^3/\text{g}$ avec une répartition de $0,51 \text{ cm}^3/\text{g}$ pour les micropores et de $0,09 \text{ cm}^3/\text{g}$ pour les mésopores. Un volume microporeux comparable de $0,53 \text{ cm}^3/\text{g}$ est obtenu par utilisation de la méthode DR. Le volume ultramicroporeux obtenu par adsorption du CO_2 est de $0,52 \text{ cm}^3/\text{g}$. La distribution en tailles de pores présentée par la Figure III-34 montre une distribution étroite de la microporosité avec un diamètre de pores centré sur 1 nm. Les mésopores, en très faible proportion, présentent une distribution de tailles de pores comprise entre 2 et 6 nm.

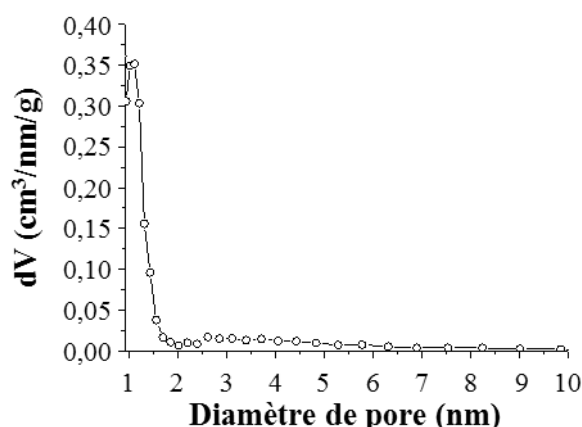


Figure III-34 : Courbe de distribution en tailles de pores du KIP1200, obtenue par traitement DFT (modèle QSDFT) de l'isotherme d'adsorption d'azote.

1.2.3. Propriétés électriques des tissus de fibres de carbone activés.

Les valeurs de résistivité déterminées par spectroscopie d'impédance électrochimique [3] montrent que la valeur expérimentale est proche de la valeur théorique (Tableau III-12). Ces valeurs sont faibles et comparables à la résistivité de l'or ($2,26 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$ à $25 \text{ } ^\circ\text{C}$) ce qui signifie que le TFC KIP1200 est un excellent conducteur électrique, une propriété indispensable pour une application électrochimique.

Tableau III-12 : Résistivités expérimentale et calculée du KIP1200.

TFC	ρ_0 (th) $\Omega.cm$	ρ_0 (exp) $\Omega.cm$
KIP 1200	2,36	2,07

1.2.4. Bilan des caractéristiques du substrat au regard de la stratégie de synthèse des dépôts de Ca/P et de l'application visée

Le substrat présente des caractéristiques architecturales et texturales en adéquation avec une utilisation dans le domaine biologique en tant qu'aide à la génération osseuse. En effet, sa faible compacité, caractéristique d'un matériau aéré, permettra l'imprégnation du tissu par les fluides biologiques, en particulier le sang. De plus, sa microporosité, associée à une bonne propriété de conduction électrique, fait de ce tissu un matériau bien adapté pour un rôle de substrat lors d'une synthèse électrochimique.

Le tissu de fibres de carbone activé KIP1200 est un matériau non ensimé, qui ne présente pas d'impuretés (en particulier métalliques) susceptibles d'entrer en jeu à la fois dans le processus électrochimique de dépôt des Ca/P et d'interférer dans la compréhension des tests de biocompatibilité. Il présente un caractère hydrophobe marqué exprimé par sa faible teneur massique en oxygène < 3%.

La faible teneur en d'oxygène du TFC KIP1200 présente un intérêt du point de vue de la caractérisation des modifications de la composition chimique après dépôt dans la mesure où le substrat est essentiellement constitué de carbone. Néanmoins, la faible fonctionnalité de surface et l'hydrophobicité de ce tissu pourraient présenter des inconvénients en terme de biocompatibilité du substrat, en particulier si on considère l'interface avec le milieu biologique aqueux, mais également l'adhésion du dépôt. Une étude a été faite afin de rendre le tissu KIP1200 plus hydrophile, sa composition chimique de surface a été enrichie en fonctions oxygénées en utilisant la technique d'oxydation anodique, et la comparaison des tests de biocompatibilité avant et après oxydation en a été réalisée.

1.3. Modifications de la chimie de surface des tissus de fibres de carbone par oxydation électrochimique

Plusieurs méthodes existent afin de modifier la chimie de surface des fibres de carbone et de les rendre hydrophiles. Il est possible de greffer des molécules par des méthodes

chimique et électrochimique ou encore d'oxyder la surface des fibres. Les voies d'oxydation chimique et plasma ont fait l'objet de nombreuses études [1, 9–11]. En particulier, une bibliographie exhaustive relate de l'oxydation chimique classique par des oxydants variés comme HNO_3 , H_2O_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ qui permet certes d'introduire des taux d'oxygène élevés (jusqu'à 25%), mais qui introduit nécessairement d'autres fonctions chimiques (nitrates, ammonium etc...). Une autre possibilité consiste à oxyder électrochimiquement la surface des fibres de carbone. Cette méthode d'oxydation présente les avantages d'être simple et rapide à mettre en œuvre, de permettre une oxydation contrôlée et homogène, ainsi que d'éviter d'introduire des espèces chimiques additionnelles capables d'induire une éventuelle augmentation de la cytotoxicité, même à l'état de traces.

L'oxydation électrochimique du TFC KIP1200 a été réalisée à des potentiels positifs croissants. La caractérisation fine des matériaux oxydés a permis de déterminer l'influence du potentiel de polarisation sur la composition chimique de surface et sur la porosité du substrat ainsi oxydé.

1.3.1. Influence du potentiel de polarisation sur la composition chimique de surface du KIP1200

Le tissu est placé dans un électrolyte aqueux de Na_2SO_4 0,01 mol/L où il subit une polarisation anodique potentiostatique durant 6 h avec des potentiels variant de 0,3 à 1,4 V (vs $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$). Les tissus oxydés sont par la suite lavés avec de l'eau distillée, afin d'éliminer les protons résiduels produits lors de l'électrolyse de l'eau, quand elle a lieu.

Les techniques de caractérisations employées sont les mêmes que pour la caractérisation du KIP1200 brut. Le Tableau III-13 récapitule les résultats obtenus par les analyses élémentaires et la désorption thermogravimétrique programmée. L'analyse élémentaire montre une augmentation significative du taux d'oxygène avec l'augmentation du potentiel appliqué, ce qui signifie que l'oxydation du tissu est d'autant plus forte que le potentiel appliqué est élevé. Bayram [12] explique que ce sont, à la fois, l'oxygène formé sur la contre-électrode ainsi que des radicaux $\text{OH}^\bullet$ très réactifs formés à partir de l'oxygène dissout qui sont responsables de l'oxydation du tissu de fibres de carbone. La perte de masse observée par analyse DPT est aussi d'autant plus importante que le potentiel appliqué est élevé. La quantité de fonctions chimiques à la surface du TFC augmente graduellement avec la valeur du potentiel anodique appliqué.

Tableau III-13: - Pourcentages massiques obtenus par analyse élémentaire et quantités de H₂O, CO et CO₂ dégagées lors du traitement thermique jusqu'à 1200 °C (TPD) du KIP1200 avant et après polarisation anodique pendant 6 heures.

TFC	Analyse élémentaire			DTP				
	% C	% O	% H	Perte de masse (%)	H ₂ O (μmol/g)	CO (μmol/g)	CO ₂ (μmol/g)	O (% m)
KIP 1200	95	1,2	0,6	4,1	735	565	226	2,8
+0,3 V	85,6	9,8	0,6	8,3	884	1225	406	4,7
+1,4 V	69,8	23,2	1,3	18,5	1192	2455	1582	10,9

Les résultats de la déconvolution des profils de dégagement de CO₂ et CO sont donnés dans le Tableau III-14. Une oxydation sous polarisation anodique à +1,4 V entraîne une forte augmentation des contributions associées aux groupements de types anhydride et lactone, ainsi qu'un léger accroissement des contributions associées aux fonctions de types carboxylique et carbonyle/quinone.

Tableau III-14 : Distribution des fonctions oxygénées de surface du KIP1200 avant et après polarisation anodique pendant 6 heures.

TFC	CO ₂			CO		
	Carboxylique	Anhydride	Lactone	Anhydride	Lactone	Carbonyle/Quinone
KIP1200	12.7	10.2	7.4	18.5	36.3	35.9
+0.3 V	23.1	34.5	18	-	123.2	64.1
+1.4 V	94	154.8	14.7	-	397.1	87.5

Le dosage potentiométrique des fonctions chimiques de surface (Tableau III-15) confirme les résultats obtenus par analyse thermogravimétrique en ce qui concerne la non sélectivité des fonctions oxygénées introduites à la surface du TFC. Le pH de charge nulle du KIP1200 passe de 9,4 pour le matériau brut à 3,2 après avoir subi une polarisation à +1,4 V. Ceci est la preuve que la surface de ce TFC est devenue hydrophile suite à son oxydation électrochimique.

Tableau III-15 : Quantification par dosage potentiométrique des fonctions de surface du KIP1200 brut et polarisé à +1,4 V selon la distribution de leurs valeurs de pK_a .

TFC	pH_{CN}	Distribution de pK_a (mmol/g)		
		$3 < pK_a < 7$	$7 < pK_a < 11$	Total
KIP 1200	9,4	0,05	0,43	0,48
+ 1,4 V	3,2	0,55	1,10	1,65

Quant aux données apportées par la spectroscopie XPS, les résultats des déconvolutions des signaux O_{1s} et C_{1s} obtenus sont reportés dans le Tableau III-16. Plus le potentiel imposé est élevé et plus la quantité d'oxygène détectée en surface du tissu est importante. Les liaisons C-O et C=O se forment au cours de l'oxydation avec une légère prédominance de liaisons C=O. De plus, des enchaînements O-C=O caractéristiques des fonctions des types carboxylique, lactone et anhydride apparaissent lors de l'oxydation électrochimique du TFC ce qui confirme les résultats obtenus par DTP. Pour le signal C_{1s} , on remarque la diminution de la contribution correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (appelé satellite dans le Tableau III-16) avec l'augmentation du potentiel. Cette contribution est caractéristique des atomes de carbone hybridés sp^2 formant les plans de graphène constitutifs des fibres de carbone. Cette diminution est significative de la transition de certains atomes de carbone de l'hybridation sp^2 vers l'hybridation sp^3 caractéristique de l'oxydation de la surface des fibres de carbone. L'analyse XPS révèle aussi la présence d'azote lié au carbone. Cet élément provient d'impuretés azotées (< 5 ppm) présentes dans le sel de sulfate de sodium ayant servi à préparer la solution électrolytique. Ces espèces azotées se retrouvent greffées et donc reconcentrées lors de l'oxydation anodique.

Tableau III-16 : Dosage par XPS (% atomique) des fonctions oxygénées de surface du KIP1200 avant et après oxydation électrochimique.

TFC	N_{1s}		O_{1s}		C_{1s}				
	N-C	% O	C=O	C-O	C-C	C-O	C=O	O-C=O	Satellite
	400,0 eV		531,6 eV	533,3 eV	284,4 eV	286,4 eV	288,3 eV	289,1 eV	290,5 eV
KIP 1200	-	3.7	1.3	2.4	77.2	2.5	2.0	-	11.1
+ 0.3 V	1.4	8.0	4.8	3.2	69.0	3.3	3.5	1.1	8.7
+ 1.4 V	2.3	12.8	7.3	5.5	60.2	4.6	4.7	1.8	7.5

1.3.2. Influence du potentiel de polarisation sur la porosité du tissu KIP 1200

L'influence du potentiel de polarisation et donc l'impact de l'introduction de groupements acides de surface sur la nanotexture du KIP1200 ont été évaluées par des mesures d'adsorption de N₂ et CO₂ (Tableau III-17). On constate une diminution de la surface spécifique S_{BET} lorsque le potentiel appliqué augmente. De même, les volumes microporeux et mésoporeux diminuent avec l'augmentation du potentiel et donc du taux d'oxygène. Ce phénomène peut être expliqué par l'incorporation de fonctions oxygénées sur les bords des plans de graphène et/ou des défauts à la surface du TFC qui va limiter l'accessibilité aux pores situés en profondeur dans les fibres de carbone [13].

Tableau III-17 : Texture poreuse du KIP1200 avant et après polarisation anodique pendant 6 heures.

TFC	S_{BET} (m ² /g)	V_{TOTAL} (cm ³ /g)	V_{MICRO} (N ₂ , DFT) (cm ³ /g)	V_{MESO} (N ₂ , DFT) (cm ³ /g)	V_{MICRO} (N ₂ , DR) (cm ³ /g)	V_{ULTRA} (CO ₂ , DR) (cm ³ /g)
KIP 1200	1693	0,68	0,59	0,09	0,57	0,57
+0,3 V	1565	0,67	0,54	0,12	0,51	0,52
+1,4 V	1284	0,49	0,46	0,03	0,40	0,47

1.3.3. Caractéristiques des tissus oxydés

L'oxydation électrochimique du TFC KIP 1200 a permis de modifier la composition chimique de surface du tissu afin de rendre sa surface hydrophile. La quantité de fonctions oxygénées incorporée est d'autant plus importante que le potentiel appliqué est élevé : les deux matériaux oxydés possèdent deux (4,7%) à trois (10,9%) fois plus d'oxygène que le matériau de départ (2,8%). Ces fonctions sont principalement de type anhydride et lactone et limitent l'accès aux pores, ce qui se traduit par une diminution de la surface spécifique.

Dans le chapitre III § 3 de ce manuscrit, les interactions des tissus KIP1200 brut et polarisé à +1,4 V avec des cellules humaines sont étudiées *in vitro* afin de déterminer si la composition chimique de surface et de la porosité ont une incidence sur la biocompatibilité des tissus de fibres de carbone.

2. Dépôts de CaP obtenus par sono-électrodéposition

2.1. Synthèse des dépôts

Les travaux portant sur l'électrodéposition de phosphates de calcium à la surface d'un substrat, en particulier les TCF, indiquent que la densité de courant (ou le potentiel) appliquée lors de la synthèse est le paramètre permettant d'obtenir la plus grande gamme de propriétés chimiques des dépôts [14, 15]. L'un des buts de ce travail est d'améliorer la compréhension des mécanismes intervenant au cours de l'électrosynthèse lorsque l'on fait varier la densité de courant appliquée. C'est la raison pour laquelle la première étape de l'étude a consisté en l'optimisation des paramètres expérimentaux que sont le pH initial et la concentration de l'électrolyte ainsi que la durée de polarisation. En parallèle, la conception de la cellule électrochimique est améliorée afin de répondre aux besoins en termes d'homogénéité et de reproductibilité des dépôts sur les TFC. Les résultats concernant l'influence de la densité de courant sur les caractéristiques finales des dépôts sont détaillés au point 2.2 de ce chapitre.

Remarque : au cours de cette étude, la polarisation est cathodique. Ceci implique que les densités de courant sont précédées d'un signe « - » représentatif du sens du courant électrique dans le système. Parfois, par soucis de simplicité, en dehors des figures, seule la valeur absolue des densités de courant sera prise en compte.

2.1.1. Optimisation de la géométrie de la contre-électrode

Comme expliqué dans le chapitre II § 3.2, la cellule électrochimique est constituée de trois électrodes. Ici, l'électrode de travail consiste en un collecteur de courant en or enchâssé dans un support en polytétrafluoroéthylène (PTFE), un matériau polymérique présentant une grande résistance face à la plupart des produits chimiques. Un morceau du TFC KIP1200 de 2 x 3 cm de dimensions est fixé sur la plaque d'or au moyen d'un fil de nylon (Figure III-35).

La première contre-électrode utilisée est une plaque de platine de 5 x 1 cm avec une surface développée de $5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$. Il est à noter que, plus la surface de la contre-électrode (CE) est importante par rapport à celle de l'électrode de travail (ET) et plus le potentiel de la CE sera stable, permettant ainsi un meilleur contrôle de l'électrodéposition. La surface spécifique de l'ET est principalement due au TFC KIP1200 ($S_{\text{BET}} = 1693 \text{ m}^2/\text{g}$) avec une surface spécifique d'environ 130 m^2 compte tenu de la masse de l'électrode ($\sim 75 \text{ mg}$ pour un morceau de 2 x 3 cm). Ainsi, un panier constitué d'une grille de platine cylindrique de 4 cm de diamètre et 5 cm de hauteur avec un diamètre de fils de 0,06 mm et une surface développée d'environ 6,5

m² est testé comme contre-électrode (Figure III-36). L'électrode de travail est placée parallèlement à la plaque de platine avec une distance de 4 cm dans le premier cas et au centre du panier de platine dans le second cas.

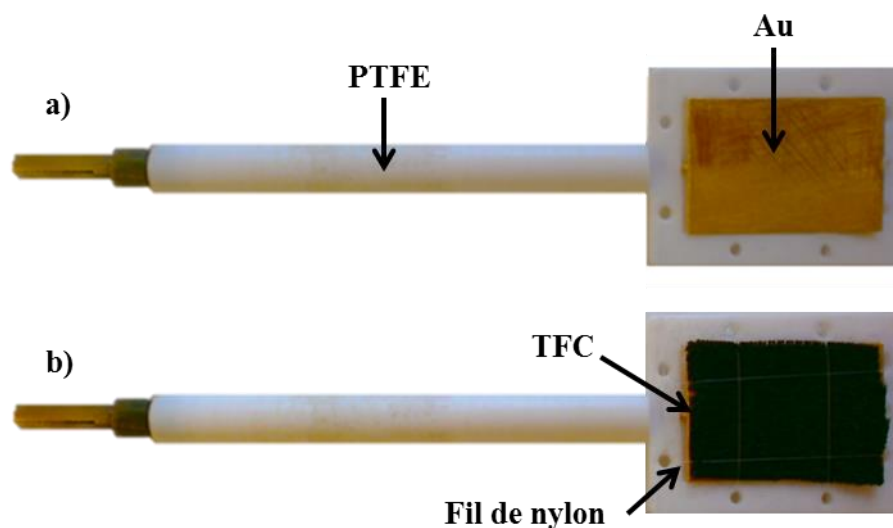


Figure III-35 : Photographies du collecteur de courant en or sans TFC (a) et avec TFC (b).

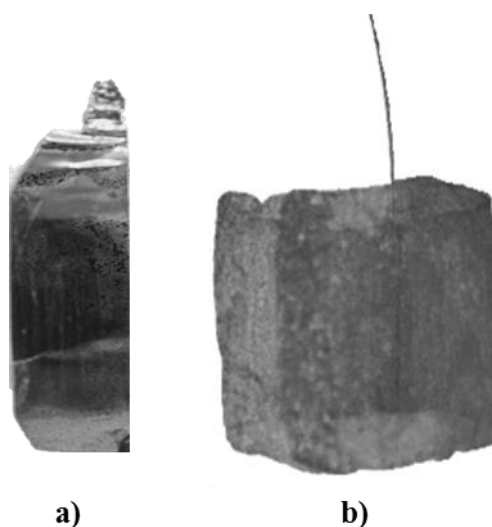


Figure III-36 : Photographies des contre-électrodes en platine : plaque (a) et panier (b).

Pour ces deux expériences, les concentrations de l'électrolyte en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sont de $10 \cdot 10^{-3}$ et $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L respectivement. Le pH de la solution a été ajusté à 5,5 par addition d'une solution d'ammoniaque à 0,3% en volume. Le courant est imposé durant 1 h avec une intensité de 20 mA. La courbe d'évolution du potentiel en fonction du temps (Figure III-37) montre un bruit de fond moins important pour l'échantillon « Panier » (courbe rouge) que

pour « Plaque » (courbe noire). Ceci met en évidence une meilleure stabilité du potentiel à la CE lors de la synthèse électrochimique avec le panier de platine plutôt qu'avec la plaque de platine. De plus, à courant constant, le potentiel mesuré sur l'électrode de travail lors de la synthèse électrochimique avec le panier est plus important (en valeur absolue) que celui avec la plaque. Cela signifie que le régime d'électrolyse de l'eau est plus important avec le panier de platine, entraînant ainsi une précipitation du dépôt de CaP plus conséquente, ce qui est confirmé par un gain de masse plus important que celui obtenu avec la plaque de platine (Tableau III-18).

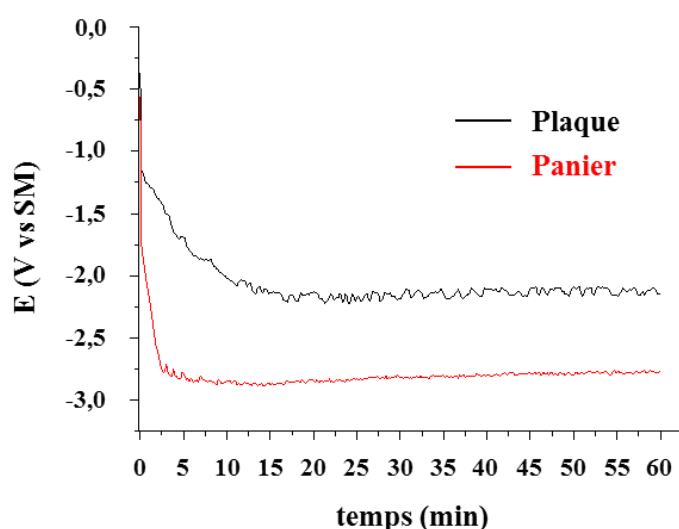


Figure III-37 : Courbes d'évolution du potentiel en fonction du temps suivant la géométrie de la CE.

Tableau III-18 : Evolution du gain de masse en fonction de la géométrie de la contre-électrode.

Référence	Contre électrode	Gain de masse (%)
Pl	plaque	13 ± 3
Pa	panier	26 ± 3

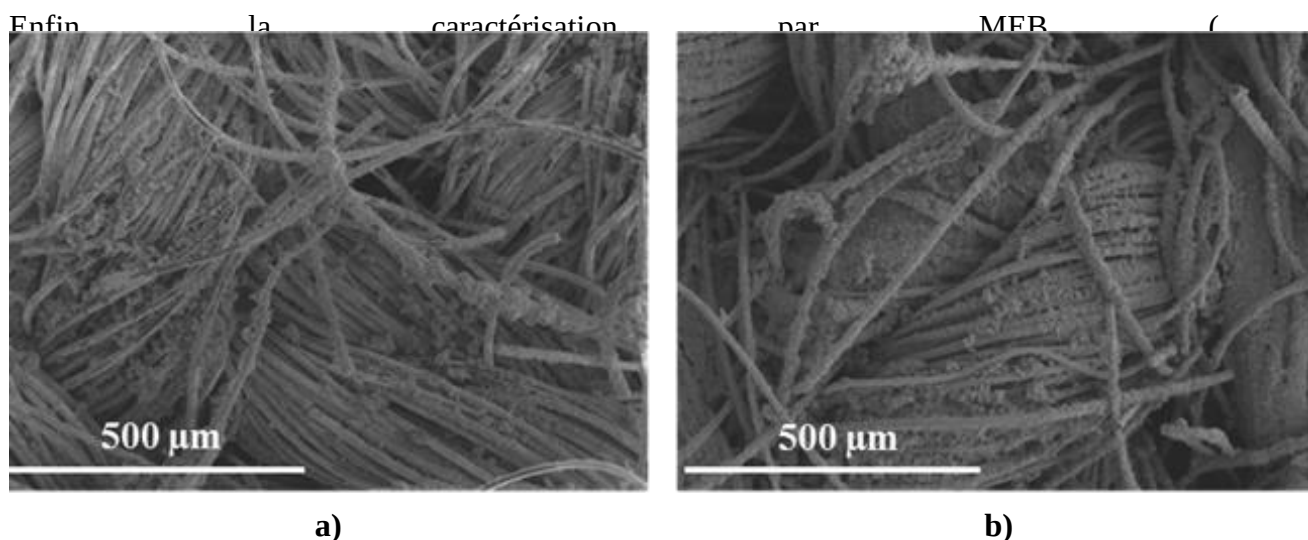


Figure III-38) permet d'observer que le dépôt obtenu avec le panier (b) est plus uniforme et les fibres sont mieux gainées en comparaison avec le dépôt obtenu avec la plaque (a).

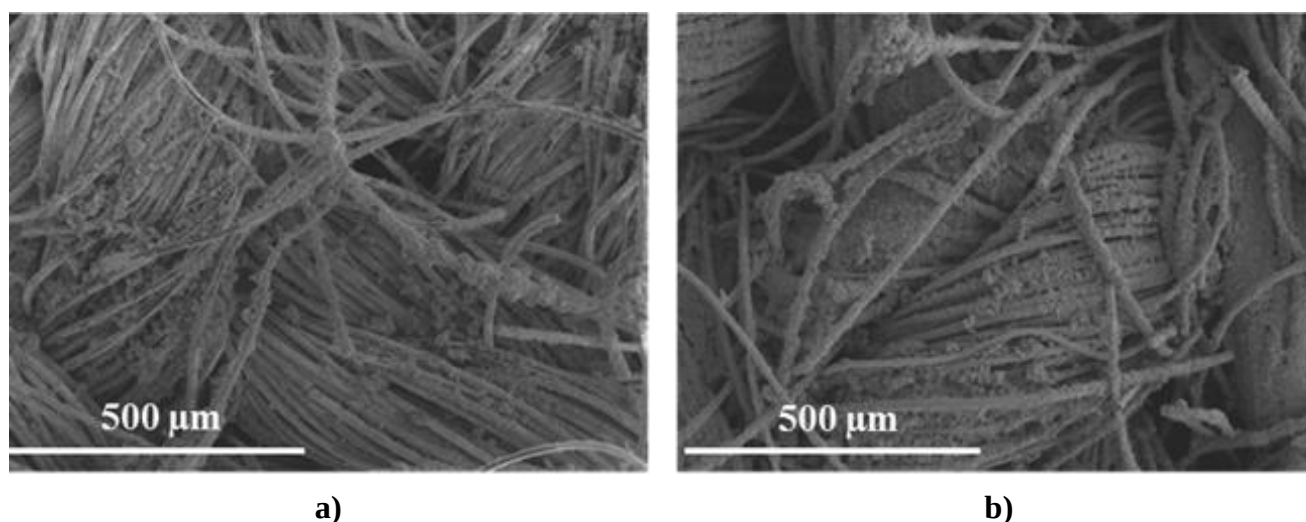


Figure III-38 : Images MEB des dépôts obtenus avec une plaque (a) et un panier de Pt (b) en tant que CE.

2.1.2. Influence du pH initial de l'électrolyte

Le pH initial de l'électrolyte, avec des concentrations en ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} respectivement de $10 \cdot 10^{-3}$ et $6 \cdot 10^{-3}$ mol/L, est de 4,8. L'étude de l'influence d'un ajustement du pH initial de l'électrolyte à 5,5 par l'ajout d'ammoniaque, 0,3%, sur la quantité et la morphologie du dépôt est reportée ci-après. Les dépôts sont réalisés à une densité de courant de -270 mA/g pour une durée d'1 heure. Un pH de 5,5 est la limite avant le début de la précipitation du phosphate de calcium. La Figure III-39 présente les évolutions du potentiel au cours du temps suivant le pH initial de l'électrolyte lors de la synthèse électrochimique.

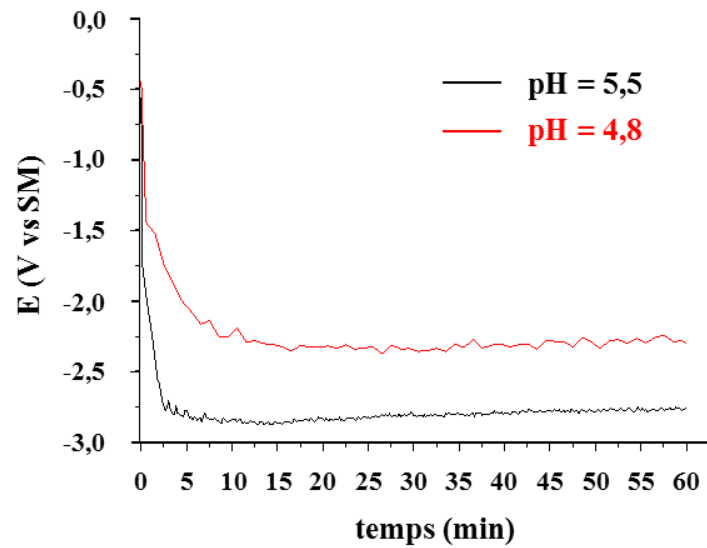


Figure III-39: Courbes d'évolution du potentiel en fonction du temps pour comparer l'influence du pH initial de l'électrolyte.

La première constatation est qu'un potentiel plus important est atteint avec un pH initial de 5,5 que de 4,8. Un potentiel plus élevé est caractéristique d'un dépôt de CaP plus conséquent à la surface du TFC. Le calcul du gain de masse confirme que pour un pH initial de 5,5, le gain de masse tend à être plus important que pour un pH initial de 4,8 (Tableau III-19).

Tableau III-19 : Comparaison des gains de masse de deux dépôts obtenus avec un électrolyte ayant un pH initial de 4,8 ou de 5,5.

pH initial	gain de masse (%)
4,8	19 ± 8
5,5	26 ± 3

Les images MEB (Figure III-40) montrent qu'il n'y a pas de différence notable de morphologie entre les deux dépôts. Dans les deux cas ils sont constitués « d'oursins d'aiguilles » qui recouvrent bien l'ensemble des fibres.

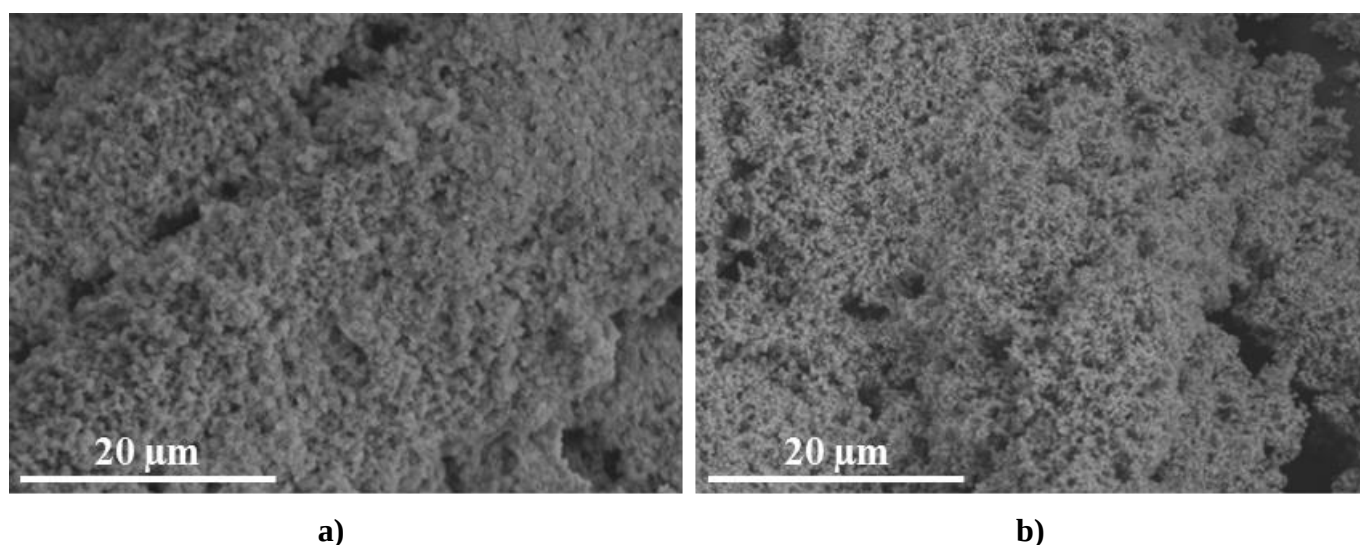


Figure III-40 : Images MEB des dépôts obtenus avec un pH initial de 4,8 (a) et 5,5 (b). Grandissement x 2000

Le pH initial de l'électrolyte ne semble jouer que sur la quantité de dépôt obtenu. Plus le pH initial est élevé, plus le dépôt sera important. Cependant, expérimentalement, il est possible de voir un précipité apparaître prématurément au sein de l'électrolyte dont le pH a été ajusté à 5,5. Ce précipité résulte d'une variation de la température qui modifie le pH et la solubilité des espèces présentes dans l'électrolyte, ce qui entraîne leur précipitation. Le but de cette étude étant d'obtenir un dépôt homogène tout en conservant la flexibilité du tissu, le fait d'ajuster le pH initial à 5,5 entraîne l'obtention d'une masse de CaP déposée plus importante, ce qui augmente la rigidité du TFC. Voici les raisons pour lesquelles le pH initial de l'électrolyte sera maintenu à 4,8 et ne sera donc pas ajusté à 5,5 pour le reste de l'étude.

2.1.3. Influence de la durée de polarisation

Le but de cette série d'expériences est de déterminer l'influence de la durée de polarisation sur l'homogénéité et la quantité de phosphate de calcium déposé. Les concentrations en ions calcium et phosphate ont été fixées à respectivement $10 \cdot 10^{-3}$ et $6 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Le pH initial de l'électrolyte est de 4,8. La densité de courant cathodique est fixée à -270 mA/g et la durée de polarisation varie de 20 min à 6 h.

Sur la Figure III-41 est reportée l'évolution de la quantité de CaP déposée en fonction de la durée de polarisation.

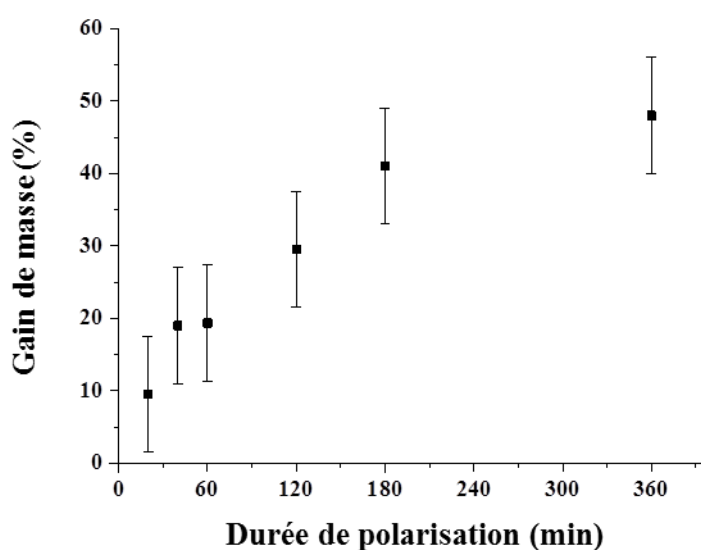
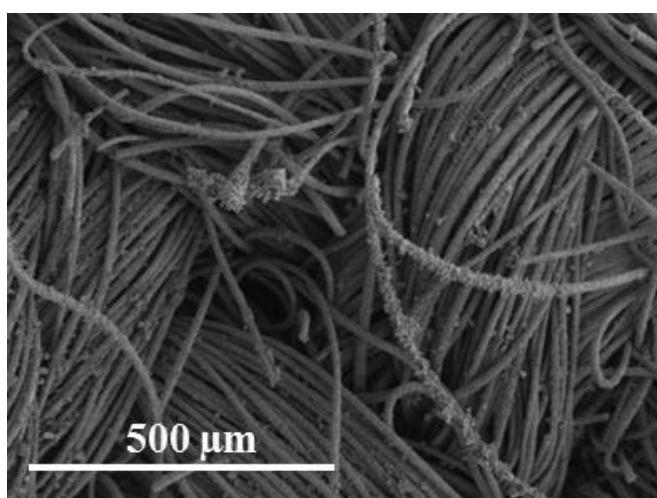
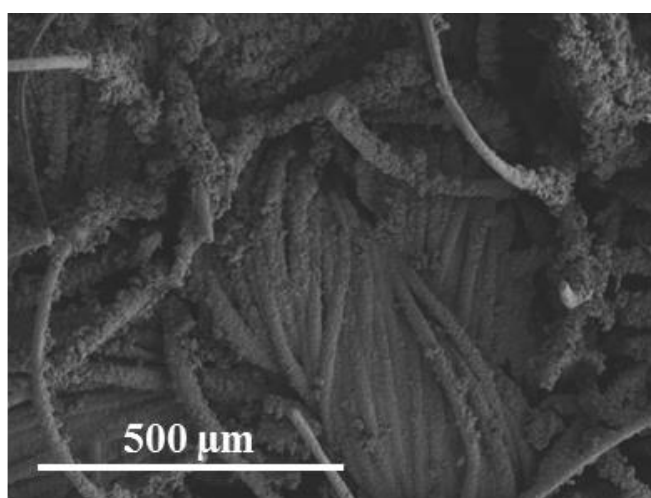


Figure III-41 : Evolution de la quantité de CaP déposée en fonction de la durée de polarisation pour une densité de courant de -270 mA/g.

Le gain de masse suit une évolution logarithmique. Les images MEB (Figure III-42 a) montrent que pour, des temps allant jusqu'à 60 mn, le dépôt est homogène avec un recouvrement uniforme des fibres, alors que pour des temps supérieurs, les phénomènes de redissolution résultant de la formation des ions H^+ sur la contre-électrode et le dégagement de $H_2(g)$ conduisent à des zones du tissu non recouvertes par la céramique. De plus, pour des durées de polarisation supérieures à 60 min, il apparaît de nombreuses zones de croissance importante de CaP qui conduisent en une prise dans la masse des faisceaux de fibres par le dépôt de CaP (Figure III-42 b).



a)



b)

Figure III-42 : Images MEB des dépôts obtenus après 20 mn (a) et 3 h (b) de synthèse sono-électrochimique. Grandissement x 100

Ces résultats montrent que, pour des concentrations en calcium et phosphates de 10.10^{-3} et 6.10^{-3} mol/L respectivement, une durée de synthèse supérieure à 1 heure crée un dépôt trop conséquent sur le TFC, entraînant une rigidité ne permettant pas l'emploi de ce matériau comme pansement osseux.

Han *et al.* [15] ont étudié l'influence de la concentration de l'électrolyte sur les processus de nucléation et de croissance des phosphates de calcium sur les fibres de carbone. Les auteurs signalent que, dans leur cas, une concentration en ions Ca^{2+} de plus de 16.10^{-3} mol/L permet la nucléation homogène des particules de CaP dans l'électrolyte puis leur migration et adsorption à la surface des fibres. Ceci explique les grandes quantités de CaP déposées et la prise en masse des fibres. En revanche, pour des concentrations inférieures, la nucléation hétérogène à la surface des fibres est favorisée. Ceci permet d'obtenir des dépôts plus homogènes en termes de recouvrement des fibres. Par conséquence, pour la suite de l'étude, il a été décidé de réduire les concentrations en calcium et phosphate à 5.10^{-3} et 3.10^{-3} mol/L afin de favoriser la nucléation hétérogène et donc d'améliorer l'homogénéité des dépôts. De plus, dans le but d'obtenir une quantité suffisante de dépôt pour pouvoir les caractériser, une durée de polarisation de 6 h a été retenue pour la suite des expériences.

2.1.4. Optimisation de l'électrode de travail

La dernière optimisation apportée au système électrochimique a consisté à améliorer le collecteur de courant constituant l'électrode de travail. Les inconvénients de la plaque d'or sont que seule la face exposée à l'électrolyte est recouverte par le dépôt et que le dégagement de H_2 gazeux entre le collecteur de courant et le TFC peut entraîner un décollement partiel de ce dernier et conduire à une hétérogénéité du dépôt. Pour éviter ces phénomènes, un collecteur de courant en PTFE évidé a été fabriqué au laboratoire (Figure III-43). Les dimensions internes du cadre de fixation sont de 2 x 3 cm. Le contact électrique est assuré par un fil de platine parcourant une partie de la rainure servant de support au morceau de TFC. Le cadre de fixation sert à maintenir le TFC sur le collecteur de courant, bien en contact avec le fil de platine (Figure III-44). Les expériences tests avec cette nouvelle électrode de travail ont montré que le recouvrement du tissu par le dépôt de CaP n'était pas uniforme. Ceci est dû à

un mauvais contact entre le fil de platine et le TFC. Pour pallier à ce problème, deux grilles de platine ont été ajoutées de chaque côté du TFC (Figure III-45).

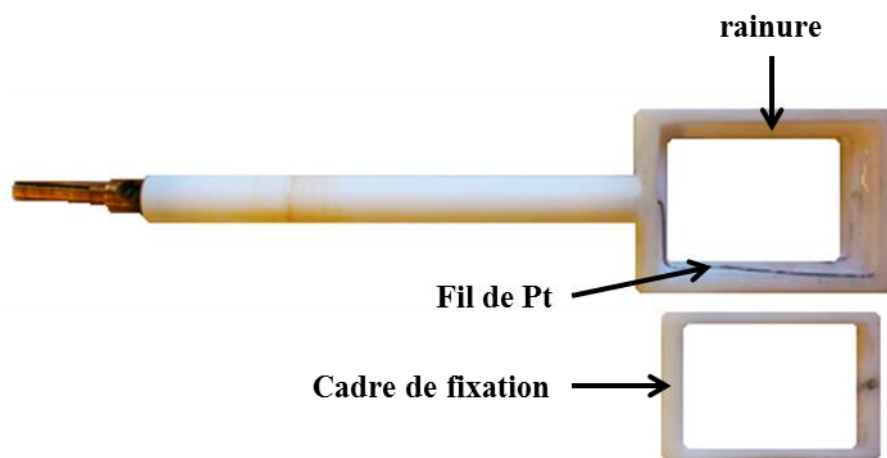


Figure III-43 : Photographie du collecteur de courant évidé.



Figure III-44 : Photographie du collecteur de courant évidé avec le TFC mis en place.

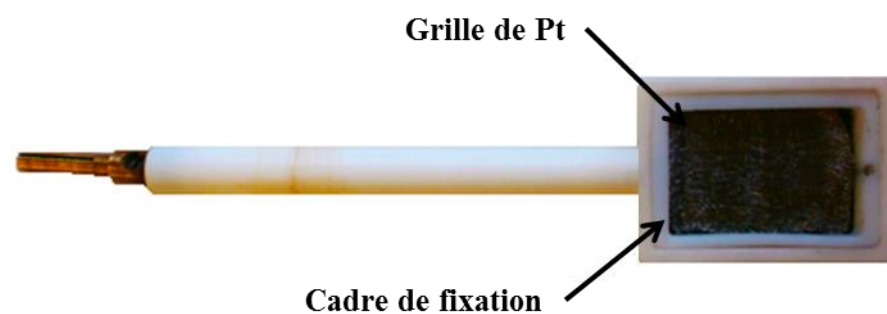


Figure III-45 : Photographie de l'électrode de travail complète.

2.1.5. Conclusion : choix du dispositif expérimental et des conditions opératoires

Cette étude a permis de définir le design de la cellule électrochimique et de fixer les conditions opératoires lors de la sono-électrodéposition. La cellule électrochimique est donc

constituée d'un système à 3 électrodes dont l'électrode de travail est le TFC placé avec les grilles de platine dans le collecteur de courant évidé et dont la contre-électrode est un panier de platine de 4 cm de diamètre au centre duquel sera placée l'électrode de travail. L'électrolyte est une solution aqueuse de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ de concentrations $5 \cdot 10^{-3}$ et $3 \cdot 10^{-3}$ mol/L respectivement, avec un pH initial de l'électrolyte de 4,8. La durée de polarisation est fixée à 6h.

Il est évident que ces paramètres peuvent encore être optimisés, notamment au niveau de la conception de la cellule électrochimique, mais le choix s'est arrêté sur ce dispositif et ces conditions expérimentales afin d'étudier plus précisément les impacts de la densité de courant appliquée lors de la synthèse des revêtements phosphocalciques sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des biomatériaux hybrides CaP/TFC.

2.2. Influence de la densité de courant sur la quantité et la nature des dépôts

2.2.1. Quantité et homogénéité des dépôts de CaP

Après optimisation du procédé, une série de neuf dépôts a été obtenue en faisant varier la densité du courant cathodique appliquée à l'électrode de carbone. La Figure III-46 présente l'évolution de la quantité de CaP déposée en fonction de la densité de courant appliquée (en mA/g) pour une durée de polarisation de 6h.

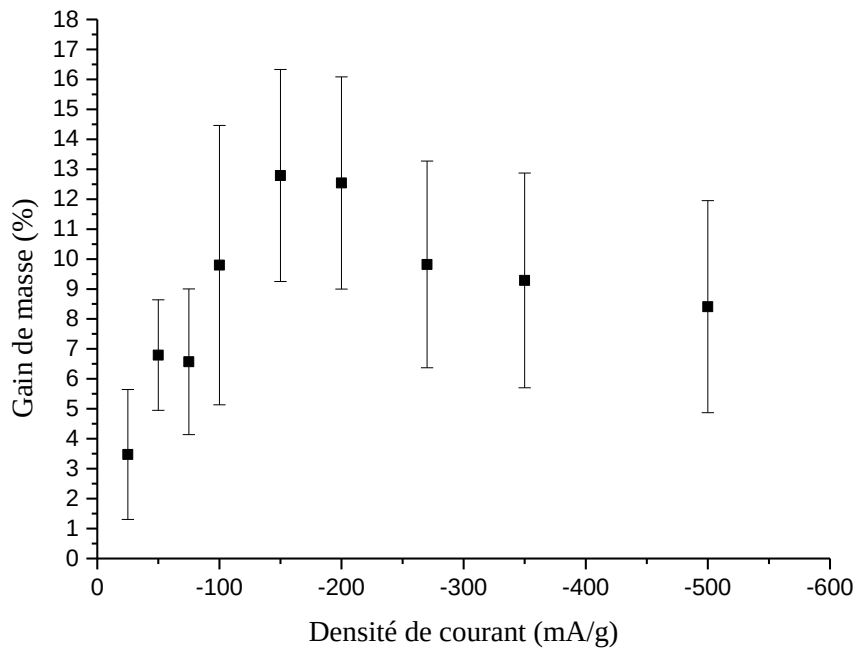


Figure III-46 : Evolution de la quantité de CaP déposée en fonction de la densité de courant pour une durée de polarisation de 6h

La courbe comprend deux domaines :

- le premier où le gain de masse augmente : de 3 % à 13 %, pour des densités de courant allant de 25 à 150 mA/g
- le second où le gain de masse diminue : de 13% à 9 % pour des densités de courant allant de 150 à 500 mA/g.

On note la présence d'un maximum de la prise de masse, et donc de la quantité des phases de CaP formées, pour une valeur de densité de courant appliquée de l'ordre de 150 mA/g.

La Figure III-47 présente les images MEB du tissu KIP1200 avec et sans dépôts. Le contraste des images a été augmenté afin de mettre en évidence le dépôt (en blanc) par rapport au TFC (en gris). Dans le cas du tissu brut, les zones en blanc sont dues à un effet d'écrantage des fibres de surface qui reçoivent et réfléchissent plus d'électrons que les fibres qui sont plus en profondeur au sein du tissu.

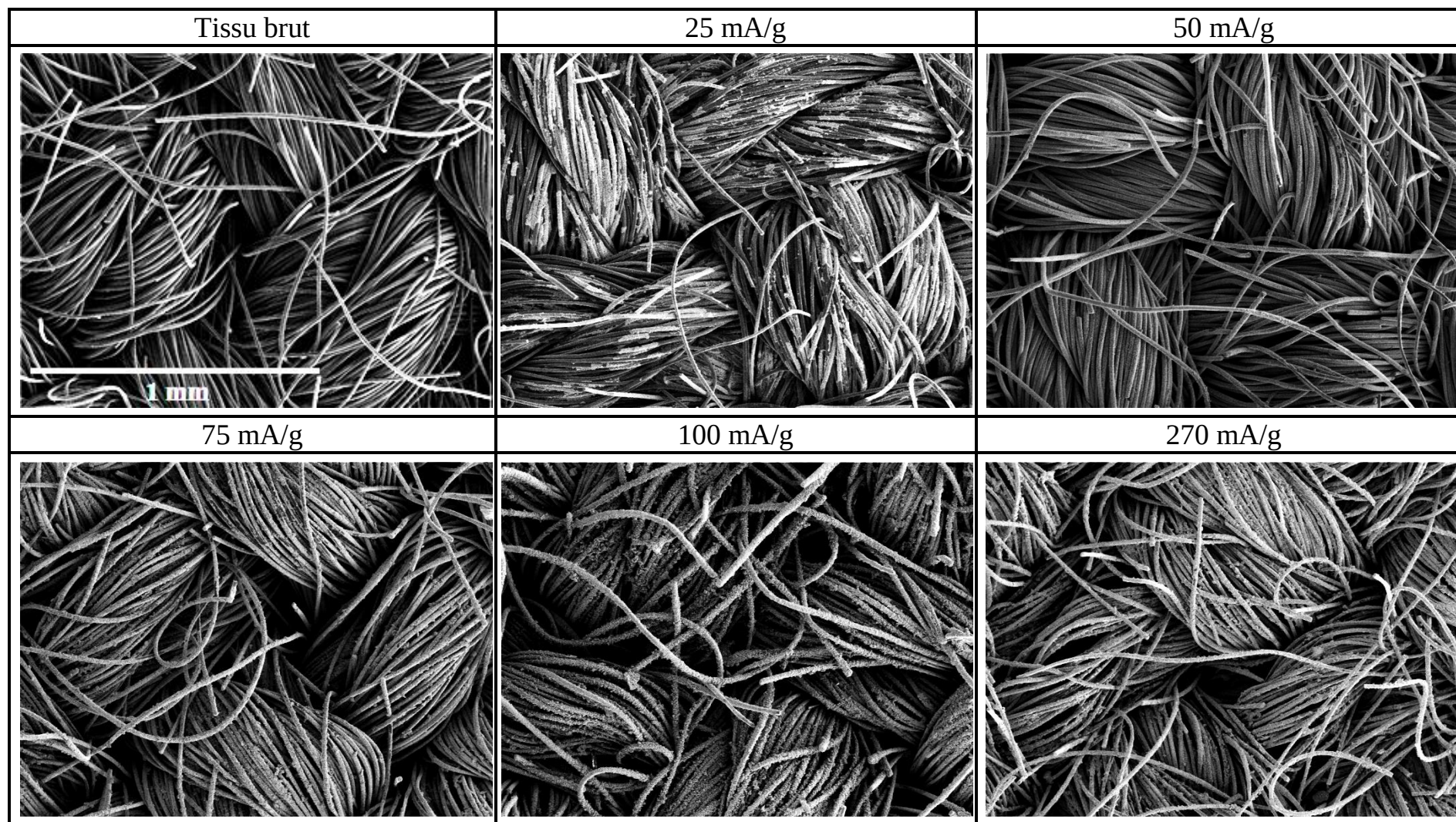


Figure III-47 : Images MEB des tissus KIP1200 brut et recouvert avec du CaP par sono-électrodéposition. Grandissement x70

Pour des densités de courant de 25 et 50 mA/g, l'observation en surface de zones « blanches » correspondant au dépôt de CaP, ainsi que de zones « grises » correspondant aux fibres nues, indique que le recouvrement des fibres par le dépôt n'est pas homogène. La proportion de zones non recouvertes est plus importante pour 25 mA/g que pour 50 mA/g. L'épaisseur du dépôt sur les fibres est homogène et < 100 nm. Le dépôt obtenu à 75 mA/g a un recouvrement plus homogène et une épaisseur plus importante, comprise entre 250 et 600 nm, avec localement la présence d'excroissances. Pour des dépôts obtenus à 100 et 270 mA/g, la proportion de zones recouvertes diminue de nouveau. De plus, l'épaisseur du dépôt n'est plus homogène : elle varie entre environ 600 nm et 2 μ m. Il y est aussi observé la présence d'excroissances au sein des dépôts sur les fibres (Figure III-48).

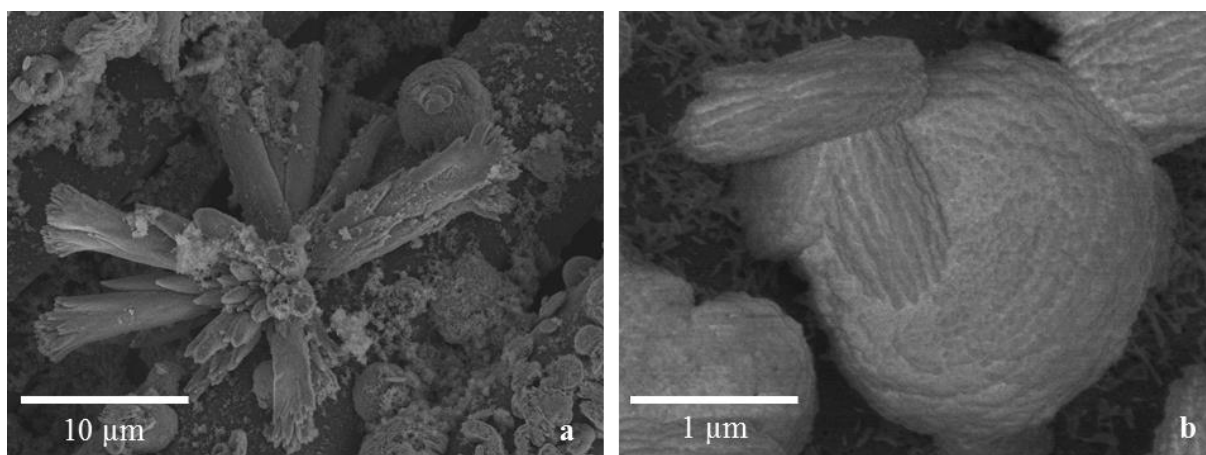


Figure III-48 : Images MEB des excroissances du dépôt obtenu à 270 mA/g. Grandissements x5000 (a) et x50000 (b)

2.2.2. Morphologie des dépôts de CaP

La Figure III-49 présente les morphologies des dépôts observées par MEB. Pour des densités de courant de 25 et 50 mA/g, le dépôt se présente sous forme de fines plaquettes de CaP, sans orientation préférentielle, gainant les fibres de carbone. Dès 75 mA/g, les dépôts gainent totalement les fibres et se présentent sous la forme de sphéroïdes rugueuses de petite taille, agrégées les unes aux autres. La dispersion en taille des sphéroïdes est importante. Leur diamètre moyen est d'environ 250 nm pour 75 mA/g et de 1,5 μ m pour 100 et 270 mA/g. Pour 100 et 270 mA/g, outre les sphéroïdes, les fibres sont recouvertes, de manière clairsemée, de dépôts de CaP de forme aciculaire.

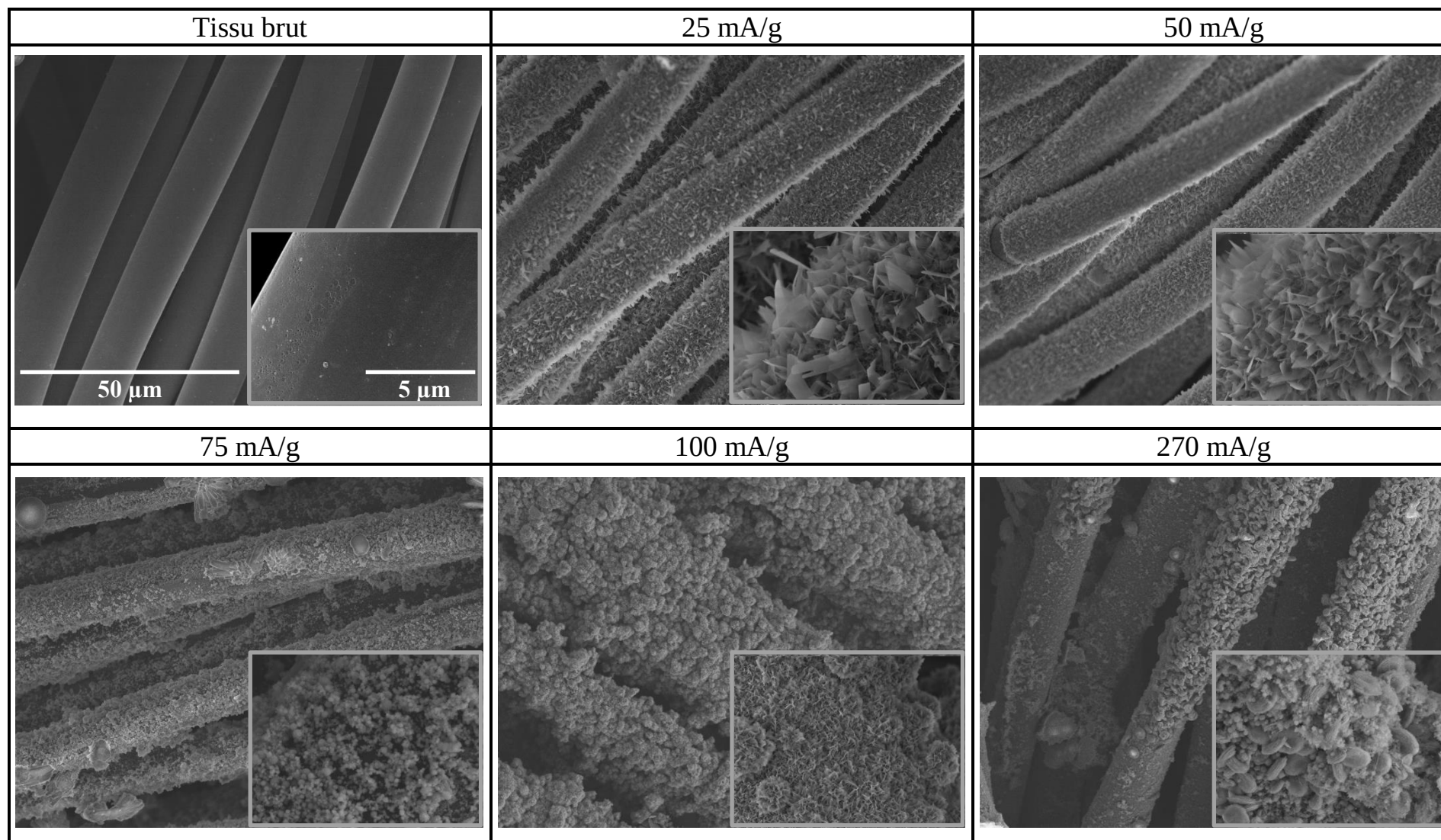


Figure III-49 : Images MEB des tissus KIP 1200 brut et recouvert avec du CaP par sono-électrodéposition. Grandissement x1000 et x10000

L'évaluation massique des dépôts de CaP, ainsi que les caractérisations MEB, montrent que, pour des densités de courant allant jusqu'à 150 mA/g, le gain de masse, ainsi que la surface de tissu recouverte par le dépôt, sont proportionnels à la densité de courant appliquée. Ensuite, pour des densités de courant > 150 mA/g, l'augmentation de la densité de courant s'accompagne d'une diminution du gain de masse, ainsi que de l'homogénéité du dépôt. Ceci est à relier à la formation plus importante de bulles de dihydrogène (issues de l'électrolyse de l'eau) à la surface du TFC induisant des zones où l'électrolyte n'est plus en contact avec les fibres de carbone, ce qui empêche localement la formation du dépôt. L'application d'ultrasons lors du processus d'électrodéposition favorise le départ des bulles de dihydrogène de la surface des fibres, donc favorise le contact entre l'électrolyte et les fibres de carbone, et favorise ainsi l'homogénéité du dépôt. Bien que le maximum de gain de masse soit obtenu pour 150 mA/g, le dépôt le plus homogène, en terme de recouvrement, est obtenu à 75 mA/g, car cette condition présente le meilleur compromis entre la quantité de dépôt précipité et le relargage du dihydrogène.

2.3. Caractérisation des dépôts par IRTF

La spectroscopie IRTF est une spectroscopie vibrationnelle permettant de caractériser les liaisons chimiques au sein d'un matériau. Elle présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre, ce qui en fait une technique de choix pour une première caractérisation de la composition chimique des dépôts de CaP.

Cette partie présente, dans un premier temps, les données de la littérature concernant la caractérisation par IRTF des CaP susceptibles d'être rencontrés dans cette étude, avant de présenter, dans un second temps, les résultats de la caractérisation par IRTF des dépôts obtenus par sono-électrodéposition à différentes densités de courant.

2.3.1. Signatures IRTF des CaP observés par spectroscopie infrarouge

Les phosphates de calcium présentent des compositions chimiques différentes mais avec des constituants élémentaires similaires. En effet, les ions phosphate ont des modes de vibrations dont les signatures se retrouvent dans tous les spectres infrarouges des CaP. Cependant, leurs structures étant différentes, il existe des variations dans les énergies de vibration des phosphates permettant de différencier, dans une certaine mesure, les différentes phases phosphocalciques. De plus, l'existence d'autres ions ou molécules pour certaines de ces phases, tels les ions hydroxydes ou l'eau, aide à l'identification des phases de CaP.

La Figure III-50 présente les spectres IRTF en absorption de trois phases phosphocalciques de référence dans le domaine de la synthèse de CaP par chimie douce : l'HAP : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, l'OCP : $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et le DCPD : $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

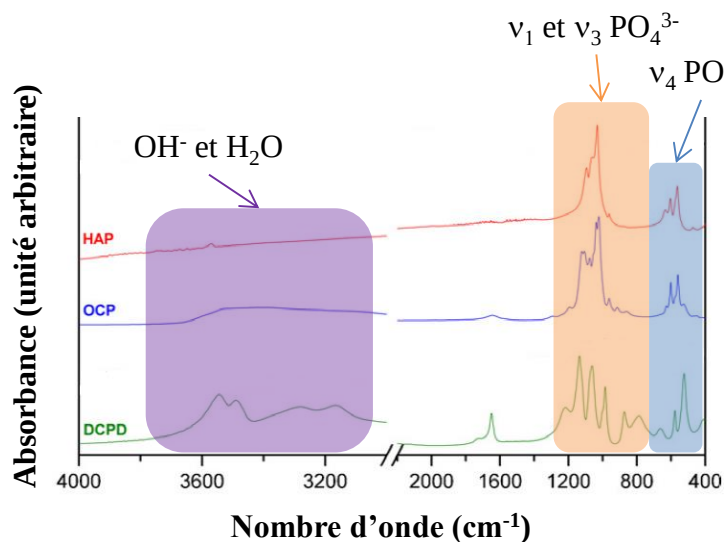


Figure III-50 : Spectres IRTF de l'HAP, de l'OCP et du DCPD. Adapté de Karampas et Kontoyannis [16].

Pour ces trois phases, on distingue trois domaines d'absorbance majeurs :

- **450-750 cm^{-1}** : ce domaine correspond au mode de flexion ν_4 des PO_4^{3-} . Dans le cas de l'HAP, la bande 633 cm^{-1} est attribuée au mode de vibration des OH^- apatitiques.
- **750-1300 cm^{-1}** : les bandes d'absorption correspondent aux modes d'élongation ν_1 et de flexion ν_3 des PO_4^{3-} . Pour l'OCP et le DCPD, les bandes d'absorption sont attribuées aux ions HPO_4^{2-} . Enfin pour le DCPD, l'eau de structure est mise en évidence avec une bande caractéristique située à 789 cm^{-1} et une bande (doublet) caractéristique à 1630 cm^{-1} de la déformation de la liaison OH.
- **3100-3800 cm^{-1}** : les bandes d'absorption larges observées sur ce domaine sont caractéristiques de l'eau de structure dans les cas de l'OCP et du DCPD. Pour l'HAP, on distingue une bande d'absorption fine vers 3570 cm^{-1} attribuée aux ions OH^- apatitiques.

Dans le premier chapitre, nous avons vu que le tissu osseux est constitué d'une phase organique, essentiellement du collagène, et d'une phase minérale qui est une hydroxyapatite déficitaire en calcium (CaD-HAP) carbonatée. Grunenwald *et al.* [17] ont étudié par

spectroscopie IRTF des échantillons biologiques de squelettes issus de différentes régions et époques, dont un exemple est donné sur la Figure III-51.

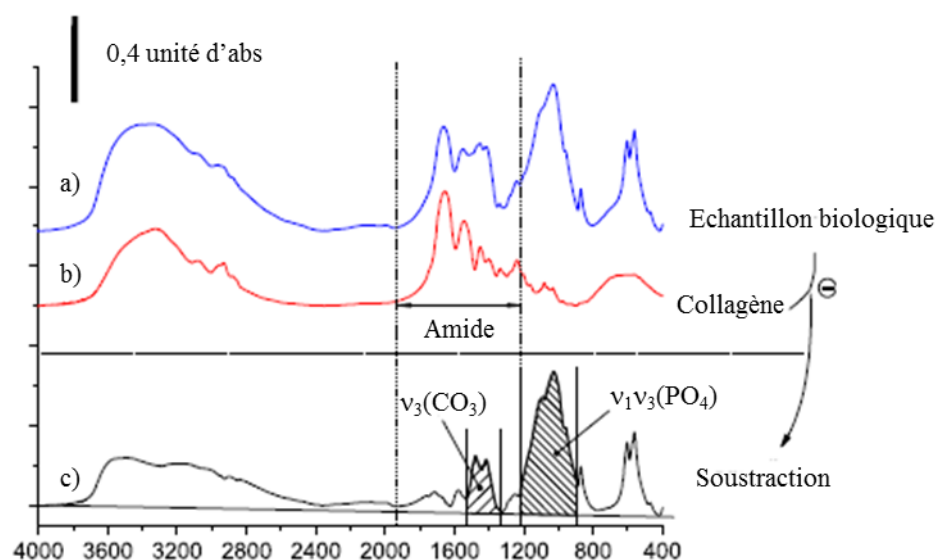


Figure III-51 : Spectres IRTF d'un échantillon biologique (a), de collagène de type I (b) et de la soustraction des deux (c). Adapté de Grunenwald *et al.* [17].

Par soustraction de la contribution du collagène au spectre de l'échantillon biologique, les auteurs mettent en évidence la carbonatation du CaD-HAP avec l'apparition de bandes d'absorption situées dans le domaine compris entre 1300 et 1580 cm^{-1} , attribuées au mode d'élongation asymétrique ν_3 des carbonates. De plus, les larges bandes situées entre 2400 et 3800 cm^{-1} attribuées à l'eau, ainsi que les contributions supplémentaires observées dans les domaines ν_1 , ν_3 et ν_4 des phosphates, sont caractéristiques d'une CaD-HAP hydratée. Fleet *et al.* [18, 19] ont étudié en détail le domaine d'absorption ν_3 des CO_3^{2-} d'HAP carbonatées obtenues par frittage sous hautes température et pression (Figure III-52) et en ont déduit la possibilité de différencier le type de carbonatation par spectroscopie IRTF. Une HAP carbonatée de type A (ions OH^- substitués) présente un doublet situé à environ 1461 et 1544 cm^{-1} . Une HAP carbonatée de type AB présente un spectre infrarouge avec une convolution des bandes d'absorption caractéristiques des substitutions de types A et B. Les bandes d'absorption caractéristiques d'une carbonatation de type A sont situées à 1540 et entre 1445 et 1470 cm^{-1} . Cette dernière bande, large, est caractéristique aussi de la contribution d'une carbonatation de type B. De plus, Fleet et Liu [19] rapportent une signature située à 1507 et 1569 cm^{-1} caractéristique d'une substitution de type A2 (cf Chapitre I).

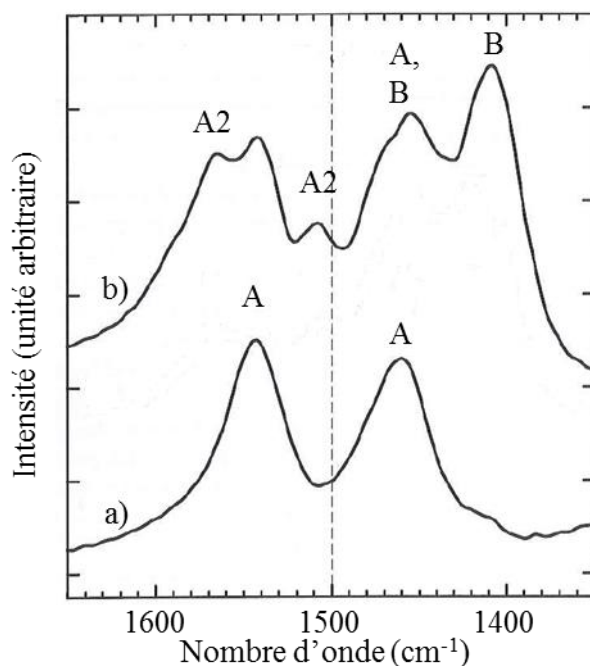


Figure III-52 : Spectres IRTF de la région d'élongation asymétrique ν_3 des carbonates d'HAP carbonatées de type A (a) et AB (b) synthétisées sous hautes pression et température. Adapté de Fleet [18].

En étudiant le domaine ν_4 des phosphates de la CaD-HAP situé entre 480 et 650 cm^{-1} , Gomez-Morales et al. [20] ont mis en évidence plusieurs contributions (Figure III-53). Outre l'existence des deux bandes les plus intenses situées à environ 560 et 605 cm^{-1} ainsi que de l'épaule à 575 cm^{-1} qui correspondent aux PO_4^{3-} apatitiques, ils attribuent les élargissements des pieds des bandes d'absorption situés à 535 et 617 cm^{-1} à la présence respective d'ions HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} non apatitiques dans une couche hydratée à la surface des cristaux de CaD-HAP. La dernière contribution de très faible intensité située à 550 cm^{-1} et attribuée aux HPO_4^{2-} apatitiques est caractéristique de la substitution des PO_4^{3-} ions par les ions HPO_4^{2-} dans une CaD-HAP.

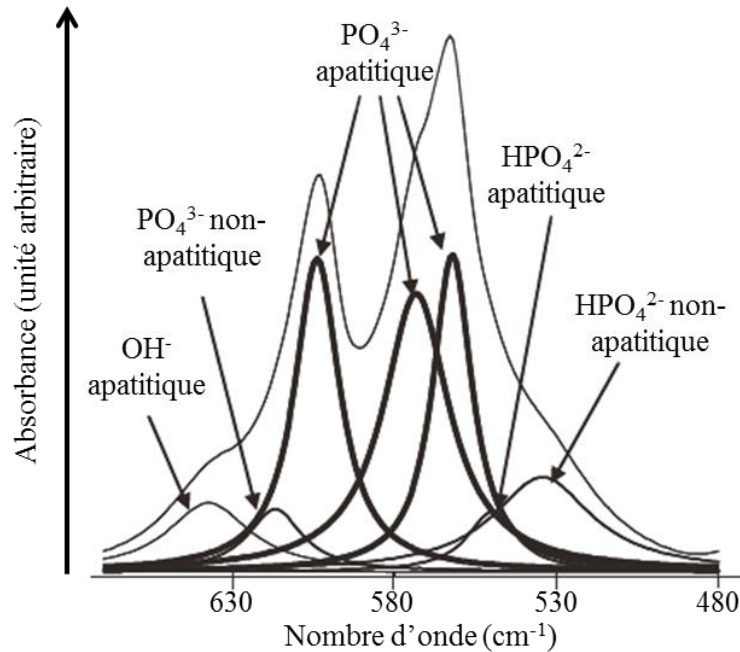


Figure III-53 : Spectre IRTF déconvolué du domaine ν_4 des phosphates de la CaD-HAP. Adapté de Gomez-Morales [20].

2.3.2. Composition chimique et nature des phases de CaP au sein des dépôts

La Figure III-54 regroupe les spectres IRTF des dépôts de CaP obtenus avec des densités de courant allant de -25 à -270 mA/g. Ces spectres comportent quatre domaines d'absorption :

- **450-800 cm^{-1} (domaine coloré en bleu):** la double bande à 566 et 603 cm^{-1} et l'épaule à 580 cm^{-1} sont attribués au mode de flexion ν_4 des PO_4^{3-} apatitiques. L'épaule à 633 cm^{-1} est attribué au mode de vibration des OH^- apatitiques.
- **800-1300 cm^{-1} (domaine coloré en saumon):** la bande la plus intense centrée sur 1036 cm^{-1} ainsi que son épaule à 1094 cm^{-1} sont attribués au mode de flexion ν_3 des PO_4^{3-} apatitiques. Le mode ν_1 des PO_4^{3-} est repéré par la bande de faible intensité située à 962 cm^{-1} . La bande d'absorption à 873 cm^{-1} de très faible intensité est attribuée soit aux ions HPO_4^{2-} et/ou aux ions CO_3^{2-} en position de substitution de type A et/ou B.
- **1300-1580 cm^{-1} (domaine coloré en vert):** la bande d'absorption fine et de faible intensité à 1385 cm^{-1} indique que les ions NO_3^- issus du sel précurseur du calcium sont présents en faible quantité. Les bandes d'absorption situées entre 1400 et 1580 cm^{-1} sont caractéristiques de la présence de CO_3^{2-} de structure.

- **1580-4000 cm^{-1}** : les bandes larges situées entre 1600 et 1800 cm^{-1} ainsi qu'entre 2500 et 3700 cm^{-1} (**domaines colorés en violet**) sont dues respectivement à de l'eau de structure et de l'eau adsorbée. La bande large au environ de 3570 cm^{-1} est caractéristique du mode d'élongation des OH^- apatitiques.

La Figure III-55 présente les bandes d'absorption du domaine ν_4 des phosphates. Outre les bandes caractéristiques des phosphates apatitiques, Mochales *et al.* [21] attribuent les élargissements aux pieds des bandes $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ situées à environ 550 et 620 cm^{-1} aux groupements non apatitiques HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} respectivement.

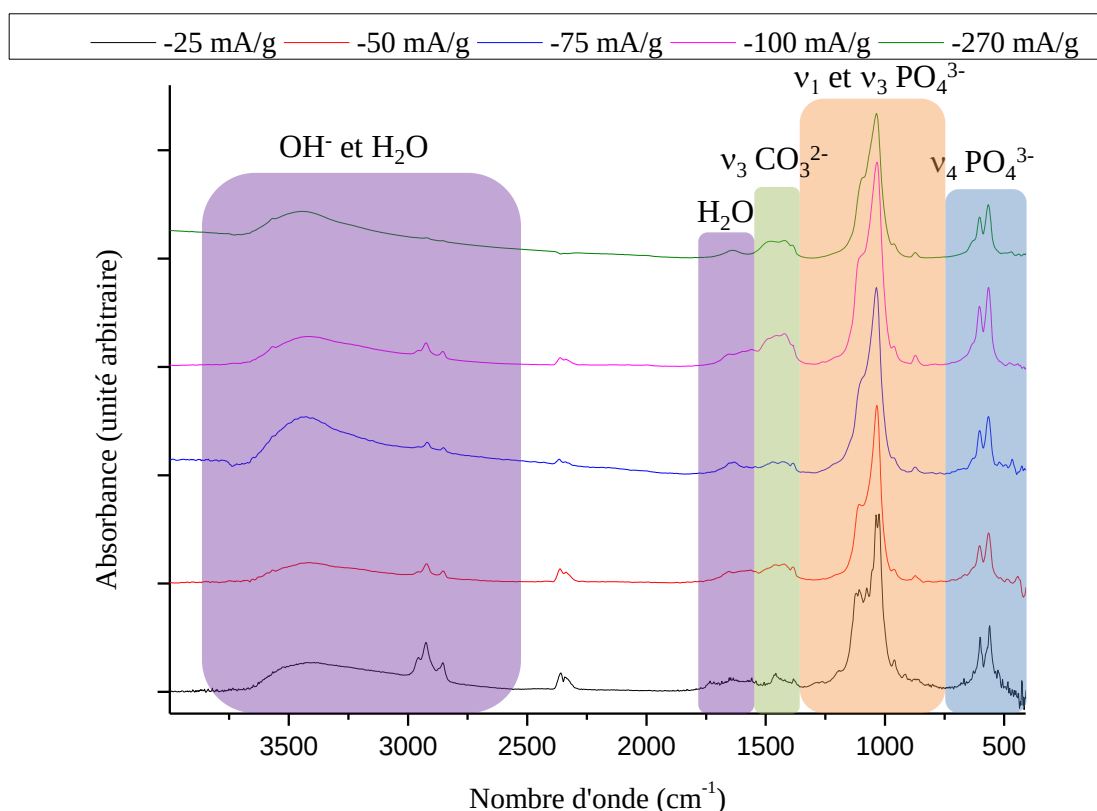


Figure III-54 : Spectres IRTF des dépôts obtenus par sono-électrodéposition.

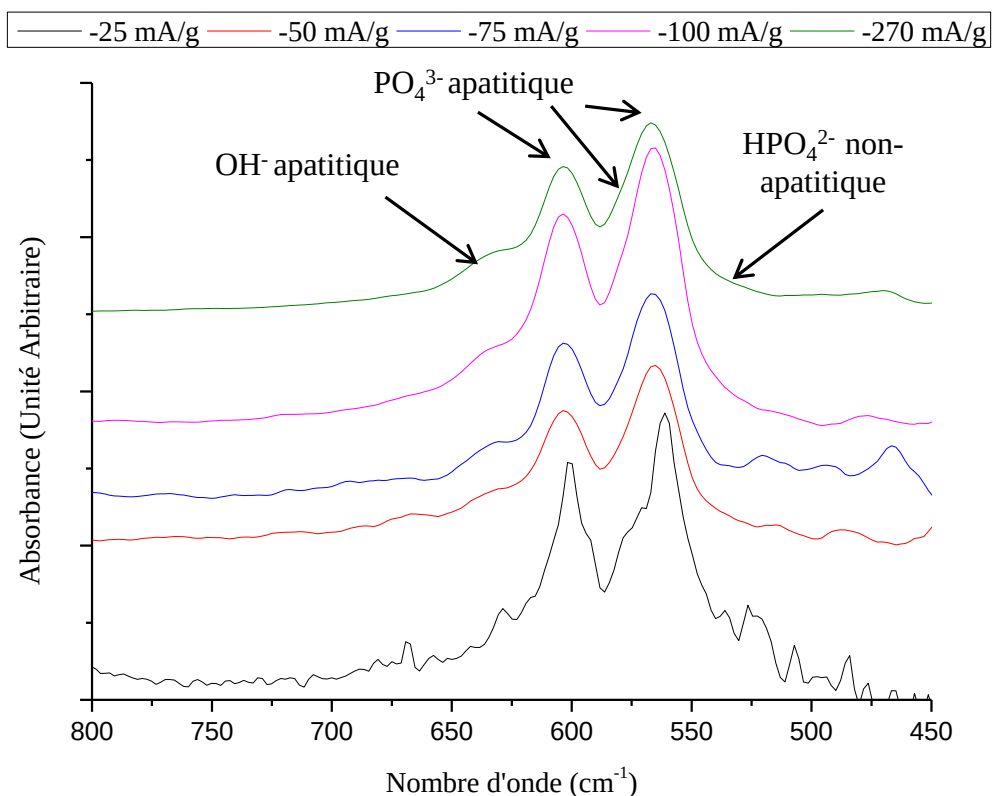


Figure III-55 : Spectres IRTF du domaine de vibrations ν_4 des phosphates pour les dépôts obtenus par sono-électrodéposition.

Les spectres IRTF du domaine ν_1 et ν_3 des phosphates montrent, pour des densités de courant autres que 25 mA/g, des signatures caractéristiques du CaD-HAP (Figure III-56). Le spectre obtenu à 25 mA/g présente des bandes d'absorption plus marquées correspondant à :

- 916 cm^{-1} : mode d'élongation de la liaison P(-OH) des HPO_4^{2-} .
- 1025, 1038, 1054 et 1077 cm^{-1} : mode d'élongation ν_3 des phosphates.
- 1108, 1121 et l'épaule à 1140 cm^{-1} : mode d'élongation ν_3 des hydrogénophosphates.
- 1193 cm^{-1} : vibration dans le plan de la liaison OH des HPO_4^{2-} .

Les bandes d'absorption à 916, 1025 et 1193 cm^{-1} sont caractéristiques du phosphate octocalcique.

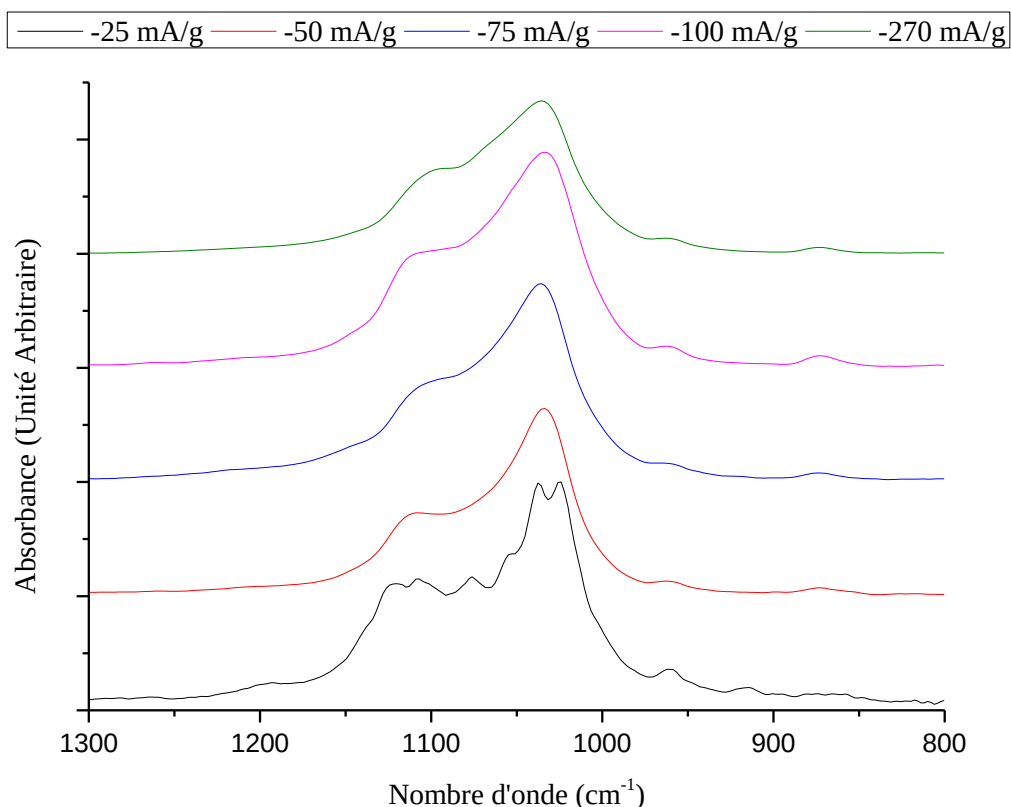


Figure III-56 : Spectres IRTF des domaines ν_1 et ν_3 des phosphates pour les dépôts obtenus par sono-électrodéposition.

Le domaine ν_3 des carbonates est détaillé sur la Figure III-57. Pour les spectres autres que celui obtenu à 25 mA/g, les bandes d'absorption larges observées à 1421 cm^{-1} attribuées à une carbonatation de type B, ainsi que celles observées à 1457 et 1489 cm^{-1} , sont caractéristiques des HAP carbonatées de type AB. Pour 50 et 100 mA/g, la bande large et de faible intensité observée à 1559 cm^{-1} est aussi caractéristique des HAP carbonatées de type AB. Pour 25 mA/g, le faible rapport signal/bruit de ce spectre, dû à la faible quantité de dépôt obtenue pour cet échantillon, rend difficile l'attribution des bandes d'absorption. Cependant, La bande la plus intense observée à 1461 cm^{-1} peut être attribuée aussi bien à une carbonatation de type A ou B. La dissymétrie de cette bande d'absorption observée, due à l'élargissement du pied de la bande vers les plus faibles nombres d'onde, révèle la présence d'une bande d'absorption vers 1425 cm^{-1} attribuée à une carbonatation de type B.

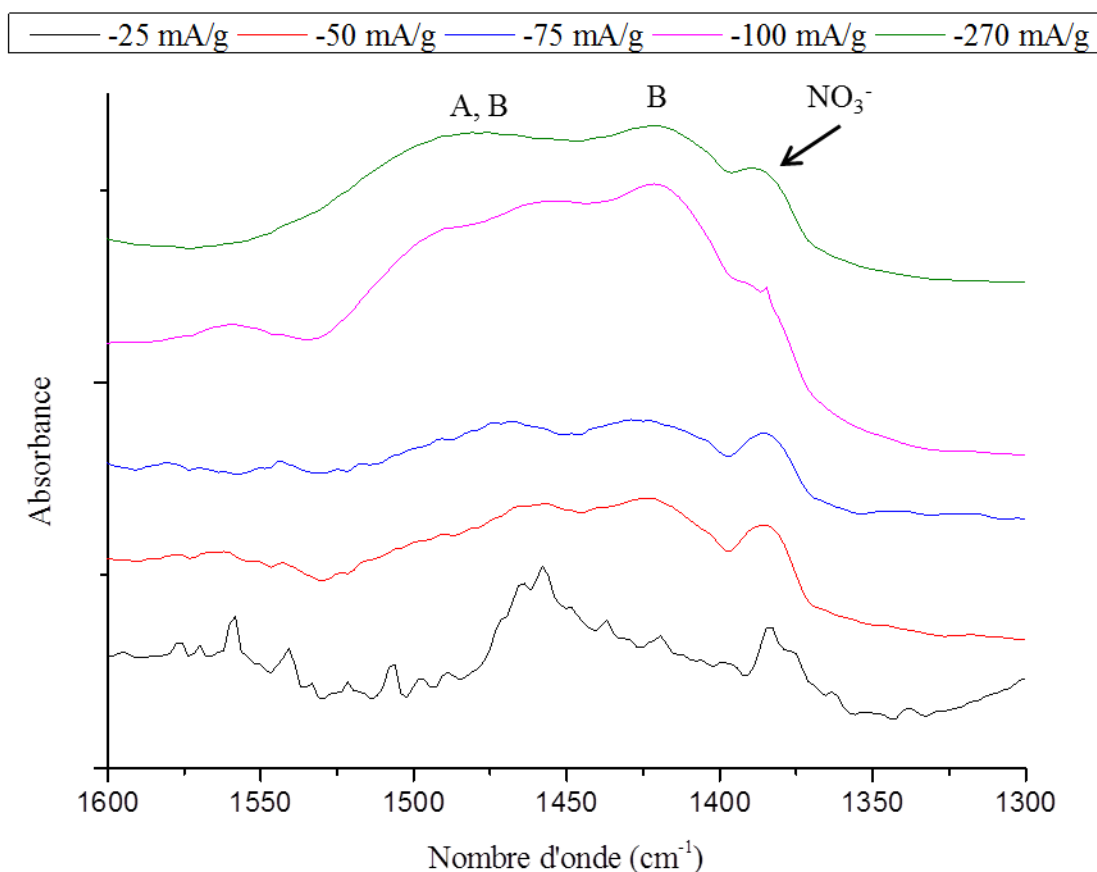


Figure III-57 : Spectres IRTF du domaine ν_3 des carbonates des dépôts obtenus par sono-électrodéposition.

En résumé, la spectroscopie infrarouge montre que pour des densités de courant > 25 mA/g, les dépôts consistent en une hydroxyapatite déficiente en calcium carbonatée de type AB. Pour 25 mA/g, le dépôt est constitué par du phosphate octocalcique et la présence de carbonates indique également l'existence d'une phase carbonatée de CaD-HAP. En effet, Gómez-Morales *et al.* [20] indiquent qu'il est impossible d'incorporer des carbonates dans de l'OCP triclinique. Il est à noter que, pour l'ensemble des dépôts, la présence des bandes d'absorption des carbonates peut aussi être attribuée à l'existence d'une ou plusieurs phases de carbonates de calcium telles que l'aragonite, la vaterite ou la calcite.

2.4. Caractérisation des dépôts par diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X des dépôts obtenus à des densités de courant cathodique comprises entre 50 et 270 mA/g confirme la présence d'HAP (Figure III-58), en référence à la fiche JCPDS 74-0566 de l'HAP stœchiométrique. De plus, des pics de diffraction supplémentaires observés pour 270 mA/g révèlent la présence de CaCO_3 de type calcite (fiche JCPDS 05-0586). Cependant, on observe un décalage général en 2θ des

positions des pics de diffraction des dépôts vers les plus grands angles par rapport à ceux de l'HAP stœchiométrique (JCPDS 74-0566). Venkateswarlu *et al.* [22] attribuent ce phénomène à une carbonatation de type B de l'HAP. La substitution des groupements phosphates par des carbonates possédant un volume stérique plus faible entraîne une diminution de volume de la maille cristalline ce qui se traduit par le décalage vers les plus grands angles sur les diffractogrammes.

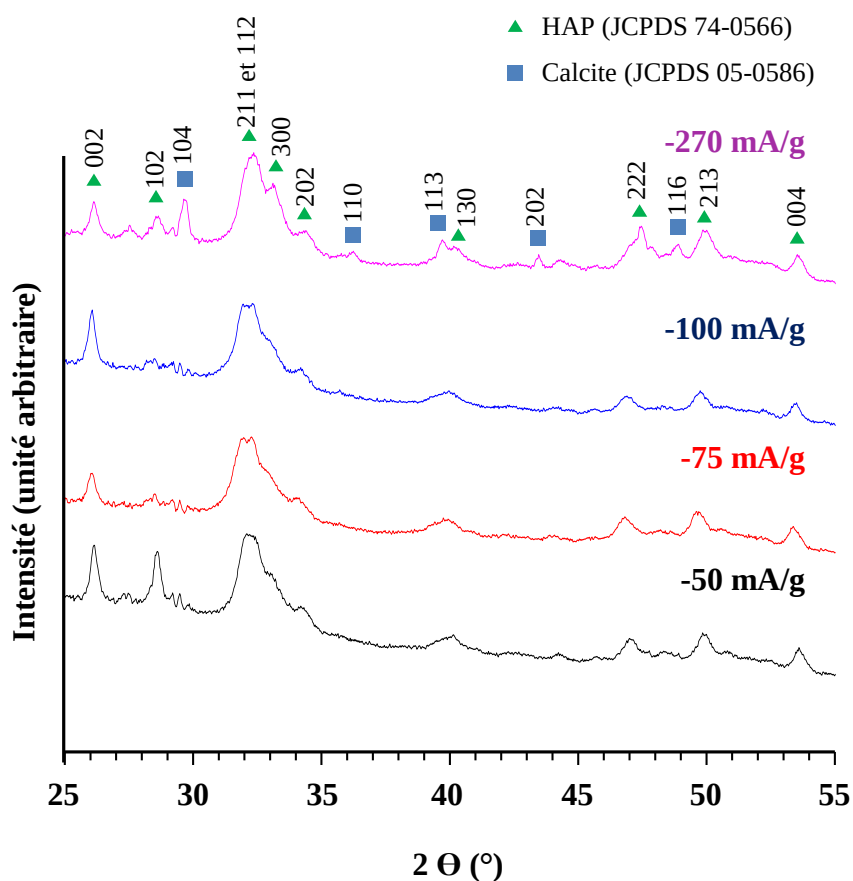


Figure III-58 : Diffractogrammes de rayons X des dépôts obtenus à 50, 75, 100 et 270 mA/g (K_{α} Cu = 0,154056 nm).

Le décalage en 2θ semble d'autant plus important que le taux de substitution des PO_4^{3-} par les CO_3^{2-} est élevé. La Figure III-59 présente les décalages angulaires $\Delta\theta$ des pics correspondant aux plans 002, 222 et 004 de l'HAP carbonatée par rapport à l'HAP stœchiométrique en fonction de la densité de courant appliquée. Ces fluctuations qui sont, à évaluer plus précisément par un traitement Rietvelt des diffractogrammes, confirment, malgré tout, les résultats obtenus par spectroscopie IRTF concernant la présence d'HAP non stœchiométrique carbonatée.

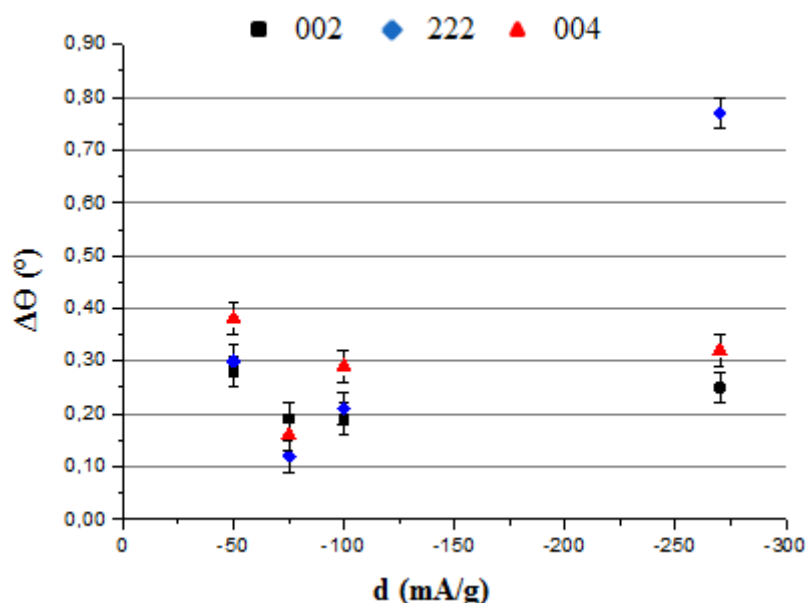


Figure III-59 : Décalage angulaire des pics correspondant aux plans 002, 222 et 004 de l'HAP en fonction de la densité de courant.

De plus, les élargissements des pics de diffraction sont caractéristiques d'un désordre cristallin induit, par la non-stœchiométrie de l'HAP due en partie, d'une part, aux substitutions des ions phosphate et hydroxyle par les ions carbonates [22] et d'autre part, aux dimensions nanométriques des domaines de cohérence [23].

Contrairement à ce qui est observé par spectroscopie IRTF, l'absence de pics de diffraction situés à $2\theta = 11,65^\circ$ et $2\theta = 20,95^\circ$ indique l'absence d'une phase de brushite (JCPDS 72-073).

Dans le cas de l'analyse par DRX du dépôt obtenu à 25 mA/g, la faible quantité de CaP déposée rend impossible l'analyse par diffraction de la poudre. Par conséquent, ce dépôt est analysé par transmission, directement sur le tissu. La Figure III-60 donne les diffractogrammes obtenus pour le tissu brut et le tissu avec le dépôt. Les pics de diffraction observés à $2\theta = 9,42^\circ$, $9,80^\circ$ et $24,32^\circ$ attribués respectivement aux familles de plans 200 (et -110), 010 et 3-21 de l'OCP (fiche JCPDS 79-0423) confirment les résultats obtenus par IRTF. Quant aux pics de diffraction situés à $2\theta = 26,18^\circ$ et entre $2\theta = 31$ et 32° , ils peuvent aussi bien être attribués à l'OCP qu'à l'HAP.

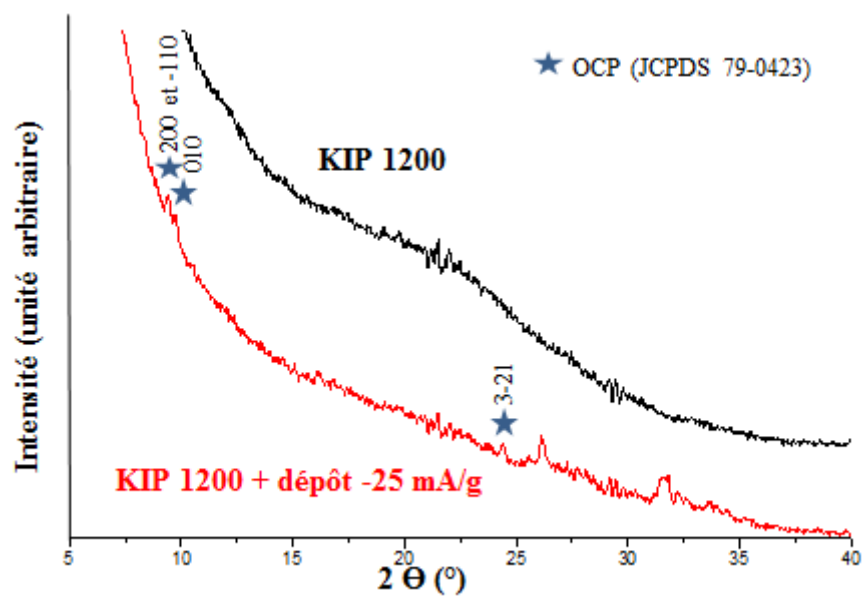


Figure III-60 : Diffractogrammes des rayons X du tissu KIP1200 et du tissu KIP1200 + dépôt à 25 mA/g ($K_{\alpha\text{Cu}} = 0,154056 \text{ nm}$).

2.5. Caractérisation des dépôts de CaP par MET

Les dépôts ont été caractérisés, en premier lieu par MEB, permettant d'avoir des informations sur les morphologies des surfaces des dépôts et sur leur épaisseur, puis en MET. Les différents modes de la MET permettent d'associer les informations obtenues en mode imagerie : images en contraste d'amplitude, dites en fond clair, pour préciser les microtextures des différentes phases de CaP ; images en contraste de phase obtenues en faisant interférer plusieurs faisceaux diffractés, permettant à plus fort grossissement d'observer les familles de plans à l'origine des interférences et d'aider à l'identification structurale des phases de CaP, en association avec les diagrammes de diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS). En mode DEAS, le diamètre du diaphragme de sélection utilisé est de 300 nm, il est représenté sur les images des microtextures, afin de bien visualiser la zone de l'échantillon correspondant au diagramme de diffraction électronique.

2.5.1. Caractérisation de la microtexture des dépôts de CaP

Les images MET représentatives des phases de CaP déposées en fonction de la densité de courant sont présentées dans la Figure III-29 (NB : toutes les images de cette figure sont au même grossissement). Les images montrent que les dépôts obtenus à 25 mA/g sont essentiellement constitués de plaquettes planes, « transparentes » aux électrons, donc fines et de ce fait constitués d'empilements de feuillets de faible épaisseur. Les plaquettes s'enroulent parfois sur leurs bords. À 50 mA/g, les dépôts sont constitués des mêmes plaquettes auxquelles sont associés des feuillets enroulés. Bien qu'il soit difficile de déterminer les dimensions exactes des particules, celles du dépôt obtenu à 25 mA/g sont de plus grande taille comparée à celles obtenues à 50 mA/g. Quant au dépôt obtenu à 75 mA/g, il présente un mélange de morphologies de type plaquettaire associées à quelques feuillets enroulés et de type aciculaire avec des aiguilles dont les dimensions sont d'environ 40 nm de largeur et de plusieurs centaines de nanomètre de longueur. Pour le dépôt obtenu à 100 mA/g, il est constitué de particules de morphologie aciculaire, les dimensions des aiguilles varient entre 10 et 100 nm, elles sont associées sous forme d'agrégats dont les dimensions sont quelques centaines de nm. Pour le dépôt obtenu à 270 mA/g, il est constitué uniquement d'aiguilles, de plus grande dimension, environ 50 nm de largeur et de quelques centaines de nanomètres de longueur, associées également sous forme de plus gros agrégats.

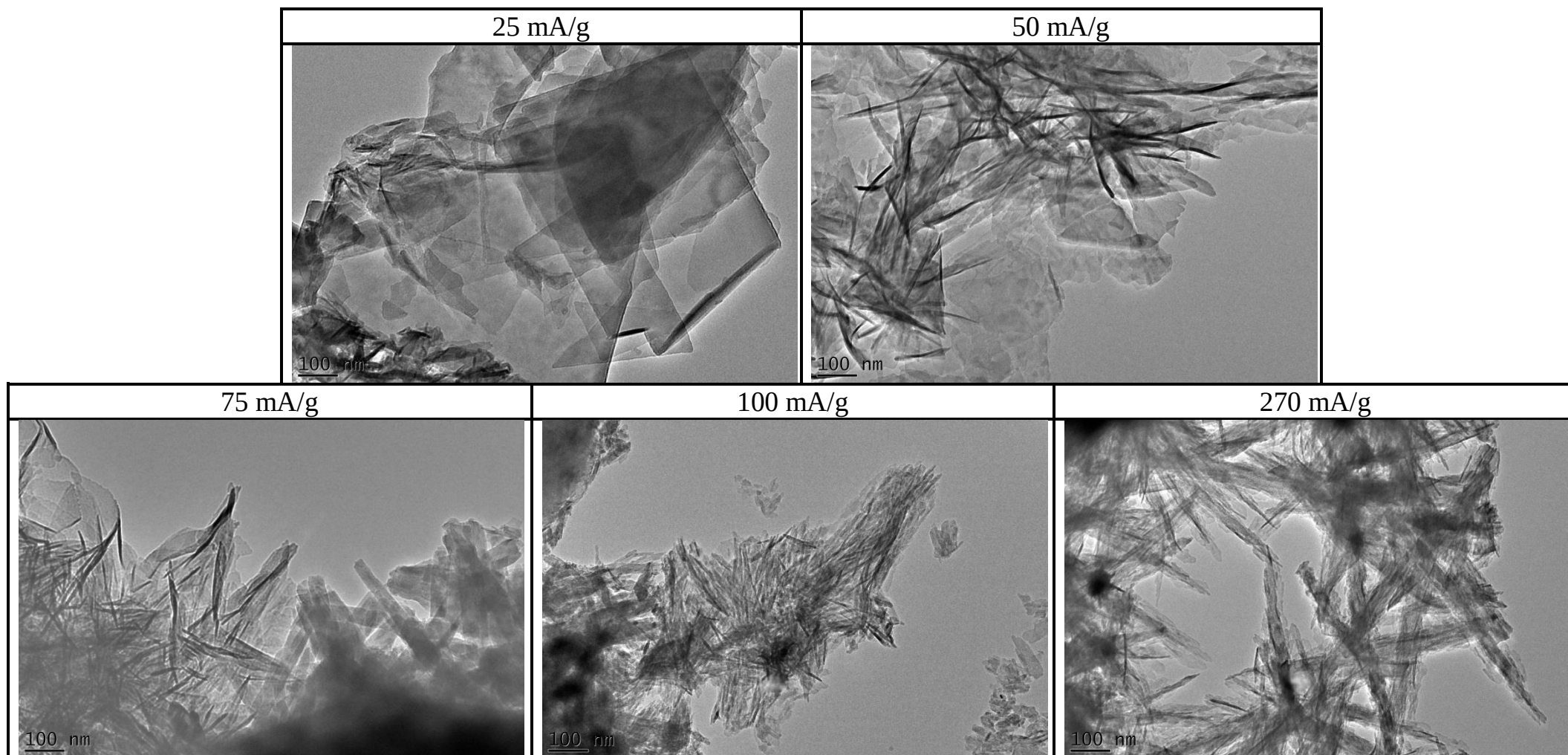


Figure III-61 : Images MET des microtextures des dépôts de CaP en fonction de la densité de courant. Grandissement x20000

2.5.2. Détermination des rapports atomiques Ca/P par spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX en MET)

Afin d'analyser plus en détail la microtexture et la structure des différentes phases identifiées, il est intéressant d'analyser leur composition chimique, au travers des valeurs des rapports atomiques Ca/P. La Figure III-62 présente l'évolution du rapport atomique Ca/P, déterminé par analyse EDX, en fonction de la densité de courant. Pour les dépôts obtenus à 25, 50, 75 et 100 mA/g, les rapports Ca/P moyens sont respectivement de $(1,40 \pm 0,08)$, $(1,44 \pm 0,04)$, $(1,68 \pm 0,14)$ et $(1,62 \pm 0,11)$. Quant au dépôt obtenu à 270 mA/g, on observe deux rapports Ca/P distincts : $(1,71 \pm 0,08)$ et $(2,3 \pm 0,3)$.

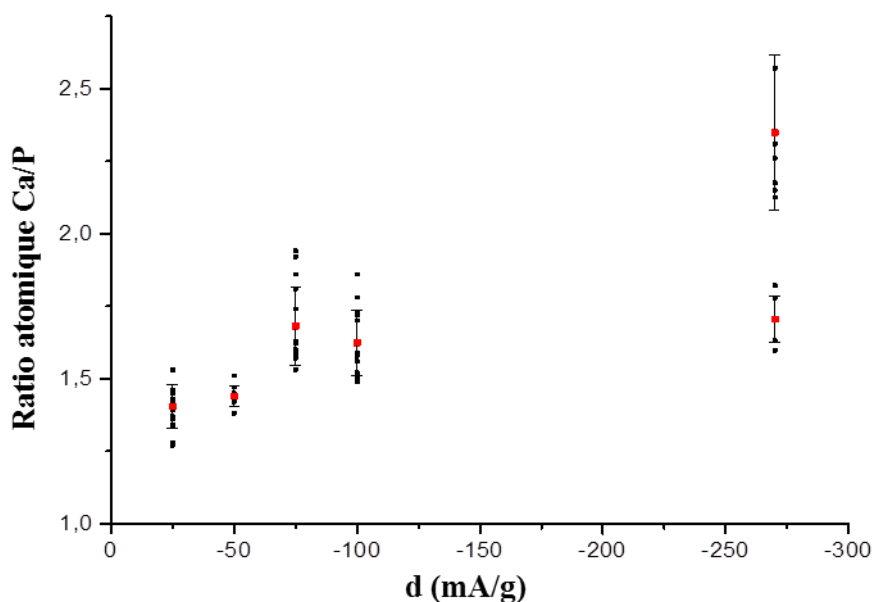


Figure III-62 : Evolution des rapports atomiques Ca/P mesurés par EDX, en fonction de la densité de courant.

Entre 25 et 270 mA/g, les rapports atomiques Ca/P augmentent de 1,40 à 1,71. A 25 mA/g les rapports Ca/P sont proches du Ca/P de l'OCP (1,33) (voir chapitre I), ce qui corrobore les résultats obtenus par IRTF et par DRX ainsi que la morphologie plaquettaire observée en MEB et MET. A partir de 75 mA/g, les rapports Ca/P sont proches du Ca/P de l'HAP (1,67), ce qui est en accord avec les aiguilles observées en MET. Le rapport intermédiaire observé pour 50 mA/g peut être expliqué par un mélange des deux phases phosphocalciques OCP et HAP, bien que la DRX ne révèle pas la présence d'OCP, cette phase est probablement présente mais en petite quantité, donc non détectable par DRX. Pour 270 mA/g, en plus du

rapport Ca/P de 1,71 attribuable à l'HAP, le mélange de la phase d'HAP avec la phase de calcite, identifiées par DRX, conduit à une augmentation du rapport Ca/P apparent qui se traduit par un-rapport Ca/P autour de 2,3.

2.5.3. Imagerie MET haute résolution et diffraction électronique des dépôts

Les phases majoritaires des dépôts obtenus à des fortes et faibles densités de courant (270 et 25 mA/g), aiguilles et plaquettes, ont été caractérisées en MET haute résolution (HR-MET) et diffraction électronique.

2.5.3.1. Microtexture et structure des aiguilles d'HAP obtenues à 270 mA/g

Sur la Figure III-63 est donné un exemple d'aiguilles représentatives du dépôt d'HAP obtenu pour les fortes densités de courant (100 et 270 mA/g), auxquelles est associé leur diagramme de diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS).

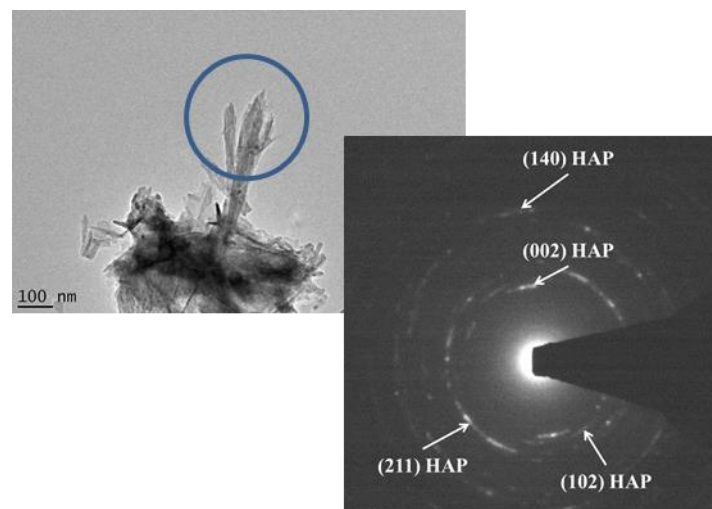


Figure III-63 : Images MET (grandissement x200000) et diagramme de diffraction électronique d'aiguilles de d'HAP pour un dépôt obtenu à 270 mA/g

Ce diagramme, constitué de réflexions de Bragg ponctuelles, est caractéristique de particules bien cristallisées. Les principales réflexions ont été identifiées, en appliquant la loi de Bragg : $(D/2) \cdot d_{hkl} = L\lambda$ (D , en mm, est le diamètre mesuré sur le diagramme de diffraction des réflexions hkl dont on cherche à déterminer les d_{hkl} , d_{hkl} est la distance interplanaire entre deux plans cristallographiques en Å, $L\lambda = 11,67 \text{ mm} \cdot \text{Å}$, déterminée à partir du DEAS d'une référence, un cristal d'or, pour une tension d'accélération de 200 kV). Les distances

interplanaires mesurées sont de : $(1,78 \pm 0,05) \text{ \AA}$, $(2,80 \pm 0,05) \text{ \AA}$, $(3,20 \pm 0,05) \text{ \AA}$ et $(3,43 \pm 0,05) \text{ \AA}$. Elles sont attribuées respectivement aux familles de plans (140), (211), (102) et (002) de l'HAP (fiche JCPDS n°74-0566). On remarque que les diagrammes de diffraction électronique des aiguilles présentent, le plus souvent, des réflexions sous forme d'arcs pour la famille de plans (002). Ceci traduit une orientation préférentielle caractéristique d'une direction préférentielle de croissance des aiguilles selon l'axe c du système hexagonal $P6_3/m$ de l'HAP.

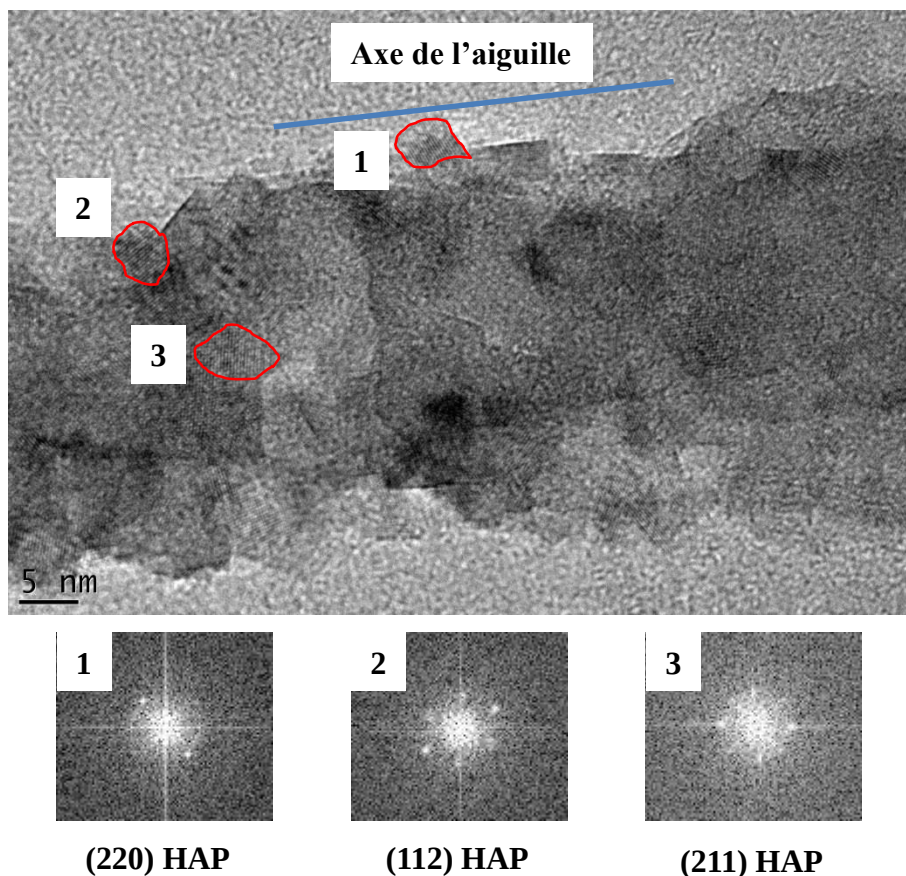


Figure III-64 : Image MET haute résolution d'une aiguille d'HAP obtenue par sono-électrodéposition à - 270 mA/g (Grandissement x 310 000) et transformées de Fourier de trois cristallites.

Des images en HR-MET des aiguilles d'HAP issues du dépôt obtenu à 270 mA/g ont été réalisées. La Figure III-64 en présente un exemple qui montre la complexité de l'organisation microtexturale au sein des aiguilles. On constate que, bien que les aiguilles possèdent une direction de croissance préférentielle, chaque aiguille est composée d'une multitude de cristallites, orientés aléatoirement les uns par rapport aux autres. Le diamètre des cristallites est d'environ 5 à 10 nm. Au sein des cristallites, on a pu identifier les familles de plans auxquelles correspondent les franges de réseau observées dans les images HR-MET en réalisant les transformées de Fourier des franges de réseau observées sur les images de haute

résolution. C'est ainsi que l'on a pu mettre en évidence plusieurs familles de plans dont les distances interplanaires sont comprises entre 2,3 et 2,9 Å, proches de réflexions attribuées aux familles de plans (220), (112) et (211) de l'HAP.

2.5.3.2. Microtexture et structure des feuillets/plaquettes de CaP obtenus à 25 mA/g

La Figure III-65 associe un ensemble d'images, accompagnées de leur diagramme de diffraction électronique, représentatives du dépôt de CaP obtenu à 25 mA/g. L'image de la Figure III-65a est constituée de feuillets/plaquettes de CaP. Le diagramme de diffraction électronique est constitué de réflexions ponctuelles qui ont été identifiées comme correspondant à des réflexions des particules d'HAP (fiche JCPDS n°74-0566) et d'OCP (fiche JCPDS n°79-0423), bien cristallisées. Un anneau presque continu de réflexions ponctuelles correspond à la réflexion (300) de l'HAP. L'image de la Figure III-65b est constituée majoritairement de feuillets enroulés. Il est à noter alors que le diagramme de diffraction électronique est également constitué d'anneaux diffus, caractéristiques de particules mal cristallisées. La présence de réflexions en forme d'arc indique une orientation préférentielle selon l'axe c correspondant aux réflexions (002) communes à l'HAP et à l'OCP. Ce diagramme de diffraction électronique montre que certaines réflexions sont communes à l'HAP, à l'OCP et aussi au DCPD, d'où la difficulté rencontrée dans l'identification des phases.

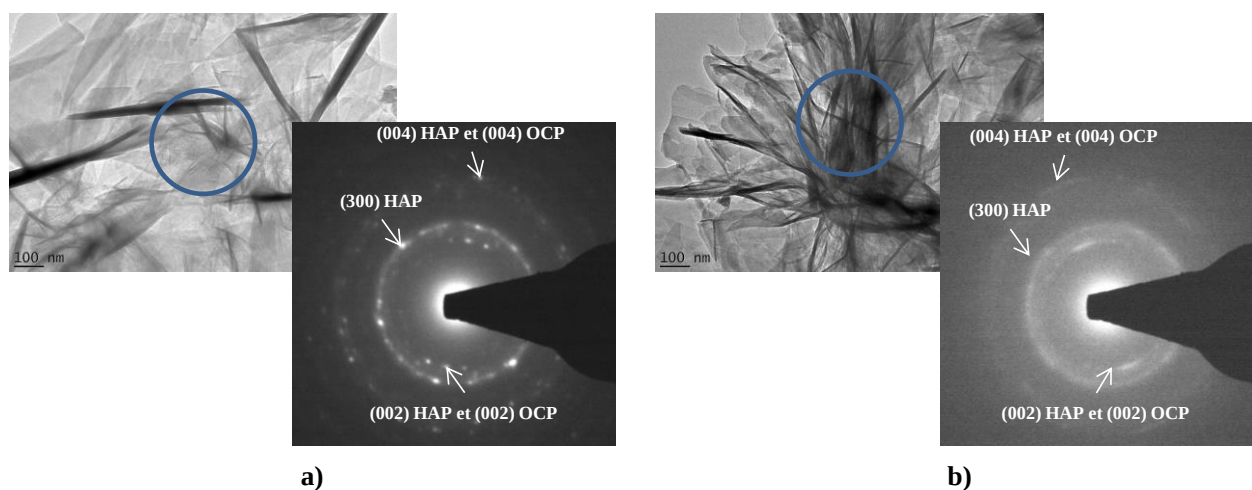


Figure III-65 : Images MET et diagrammes de diffraction électronique des feuillets de CaP bien cristallisés (a) et mal cristallisés (b) pour un dépôt obtenu à 25 mA/g (grandissement x200000).

Il est à noter pour ce dépôt, une instabilité des particules de CaP sous le faisceau d'électrons (Figure III-66 a, b et c). À titre d'exemple, après 30 s d'illumination des particules sous le faisceau d' e^- , on observe une déformation des bords de feuillets, puis leur disparition et l'apparition de domaines qui ont été attribués dans la littérature à des transitions de phases à l'état solide du CaP [24].

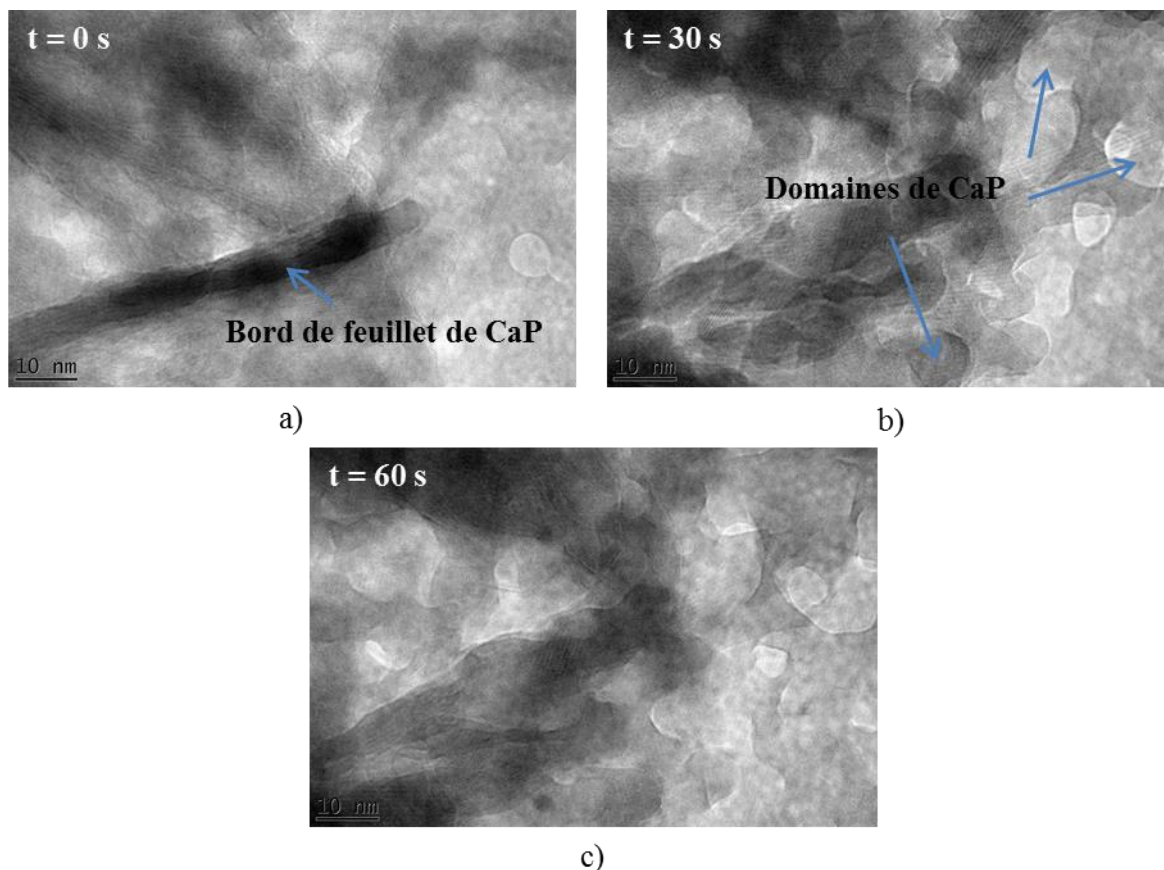


Figure III-66 : Images MET haute résolution d'un dépôt obtenu par sono-électrodéposition à -25 mA/g avec un temps d'illumination sous le faisceau d'électrons de 0s (a), 30s (b) et 60s (c).

En résumé, les caractérisations microtexturales et structurales réalisées en MET, HR-MET et DEAS apportent les informations suivantes :

- Plusieurs études par MET reportées dans la littérature [25–28] indiquent que les plaquettes /feuillets correspondent à l'OCP qui cristallise dans le système triclinique. Néanmoins, des travaux [24, 29–32] ont montré qu'il est possible d'obtenir de la CaD-HAP de morphologie plaquettaire. Cette CaD-HAP est alors issue de la
- réorganisation de la structure des plaquettes d'OCP. Ceci permet de supposer que la CaD-HAP plaquettaire observée, pour les plus faibles densités de courant, serait issue de la transition de l'OCP vers le CaD-HAP. Les mécanismes de cette transition seront discutés dans le chapitre IV.

- Les aiguilles observées pour les plus fortes densités de courant (100 et 270 mA/g) correspondent à de l'HAP qui cristallise dans le système hexagonal.
- Pour une densité de courant intermédiaire (75 mA/g), on observe simultanément la présence de plaquettes/feuillettes de CaD-HAP et d'aiguilles de CaD-HAP.

2.6. Quantification des phases phosphocalciques et caractérisation de la structure des dépôts par Résonance Magnétique Nucléaire en Rotation à l'Angle Magique

La spectroscopie de RMN en rotation à l'angle magique (RMN MAS) est une technique quantitative qui permet de sonder les environnements chimiques locaux du ^{31}P et du ^1H dans des solides cristallins ou désordonnés ou amorphes, et ainsi, de mettre en évidence la structure des différentes phases présentes, de déterminer leurs proportions relatives et de donner des informations sur l'ordre et le désordre structural (à l'échelle locale) des phases présentes. Dans le cas particulier de composés phosphocalciques stœchiométriques et parfaitement ordonnés, comme l'hydroxyapatite, l'OCP, le DCPD et le DCPA, on observe par RMN MAS du ^{31}P des signatures spectrales caractéristiques permettant l'identification et la quantification de ces phases. Ces signatures spectrales sont sensiblement affectées par la présence d'un désordre local (substitution, carbonatation, présence de lacune,...) permettant d'obtenir des informations sur la carbonatation et le désordre relatif dans les dépôts suivant leurs conditions de synthèse. Cependant, les élargissements des raies de résonance associés au désordre structural rendent plus difficile l'identification et la quantification des phases présentes. Dans ces systèmes, les méthodes RMN MAS de corrélation hétéronucléaire du ^{31}P et du ^1H permettent souvent une identification plus précise des différents environnements chimiques présents et ainsi, d'améliorer la compréhension de l'organisation structurale au sein des particules de CaP.

2.6.1. RMN du ^{31}P

Dans un premier temps, nous avons sondé l'environnement du phosphore dans les dépôts par RMN MAS du ^{31}P . La Figure III-67 présente les spectres RMN MAS quantitatifs du ^{31}P (enregistrés avec une séquence de découplage protonique) des dépôts obtenus à des densités de courant allant de 25 à 270 mA/g. Pour chacun des échantillons, on observe principalement une raie intense avec un déplacement chimique isotrope de $\delta_{\text{iso}} = 2,7\text{-}2,9$ ppm

et une largeur à mi-hauteur de l'ordre ~ 1.5 ppm. Cette raie de résonance est caractéristique d'une phase HAP non-stœchiométrique (déficiente en Ca) et carbonatée ($<10\%$) [23, 33]. Le Tableau III-20 regroupe les valeurs des déplacements chimiques isotropes et des largeurs à mi-hauteur des raies (FWHM) observées pour les différents dépôts. L'élargissement des raies par rapport à celle de l'HAP stœchiométrique (FWMH = 0.35 ppm et $\delta_{\text{iso}} = 2.8$ ppm, Figure III-67) est caractéristique d'une distribution des environnements chimiques des sites phosphates comme attendu pour une HAP non-stœchiométrique carbonatée nanocristalline [23, 33, 34].

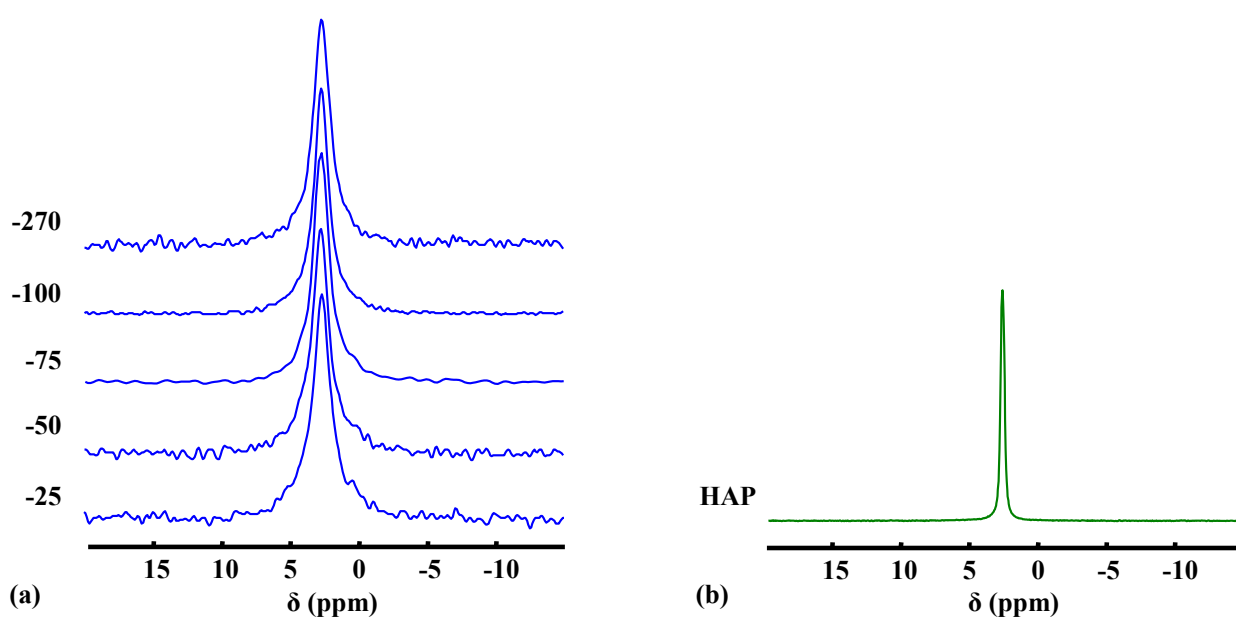


Figure III-67 : (a) Spectres RMN MAS quantitatifs du ^{31}P des dépôts obtenus de 25 à 270 mA/g. (b) Spectre RMN MAS du ^{31}P d'une hydroxyapatite stœchiométrique commerciale (Aldrich).

Pour l'ensemble des échantillons, la raie principale de ces spectres associée à la phase HAP carbonatée nanocristalline ne montre pas de variation significative en termes de déplacement chimique isotrope et de largeur de raie à mi-hauteur. Ceci indique que le taux de carbonatation de la phase HAP et que le degré de désordre local sont relativement constants pour les différentes densités de courant utilisées [33].

Tableau III-20 : Déplacements chimiques et largeurs à mi-hauteur des signaux du $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ en fonction des densités de courant.

d (mA/g)	δ (ppm)	FWHM (Hz)	Morphologies des particules
25	2,7(1)	189	Plaquettes / Feuilletts
50	2,8(0)	175	
100	2,7(3)	155	Aiguilles
270	2,7(1)	183	

Une analyse plus détaillée révèle cependant certaines différences entre les spectres des dépôts ayant des morphologies différentes. Pour les dépôts obtenus à 25 et à 50 mA/g (feuilletts/plaquettes), les spectres présentent une raie principale ayant un élargissement plus important et dissymétrique au niveau du pied. Ceci n'est pas observé pour les dépôts obtenus avec les deux plus grandes densités de courant, 100 et 270 mA/g (aiguilles).

Pour l'échantillon obtenu à 25 mA/g, la présence d'une phase OCP a par ailleurs été mise en évidence par spectroscopie IRTF et DRX. À partir de ces données, notre hypothèse est d'associer la forme asymétrique des pieds de raies sur les spectres RMN MAS du ^{31}P à la présence de la phase OCP dans les dépôts. À titre de comparaison, le spectre RMN MAS ^{31}P caractéristique d'un échantillon d'OCP cristallin est représenté sur la figure III-42 a. Ce spectre présente 4 raies de résonance résolues associées aux différents environnements du P présents dans la structure de l'OCP (4 unités PO_4 et 2 groupes HPO_4). En considérant la présence d'une phase OCP possédant un certain degré de désordre local, se traduisant par un élargissement des raies de résonance, il est possible de simuler le spectre RMN MAS quantitatif et le spectre CP-MAS de l'échantillon 25 mA/g par deux contributions associées respectivement à une phase HAP (non-stœchiométrique et carbonatée) et à une phase OCP présentant un désordre local (Figure III-68 b). L'intégration des différentes contributions permet de quantifier par RMN les deux phases : environ 10 % des atomes de phosphore sont attribués à l'OCP et le reste consiste en de l'HAP déficitaire en calcium et carbonatée.

Pour le dépôt obtenu avec une densité de courant de 50 mA/g, le spectre RMN MAS ^{31}P est très similaire à celui de l'échantillon 25 mA/g, suggérant également la présence d'une phase HAP carbonatée majoritaire et d'une phase de type OCP mal cristallisé en moindre proportion.

Enfin, pour des densités de courant > 75 mA/g, la dissymétrie au niveau du pied de la résonance principale n'est plus observée, indiquant que les dépôts sont uniquement constitués d'HAP carbonatée nanocristalline.

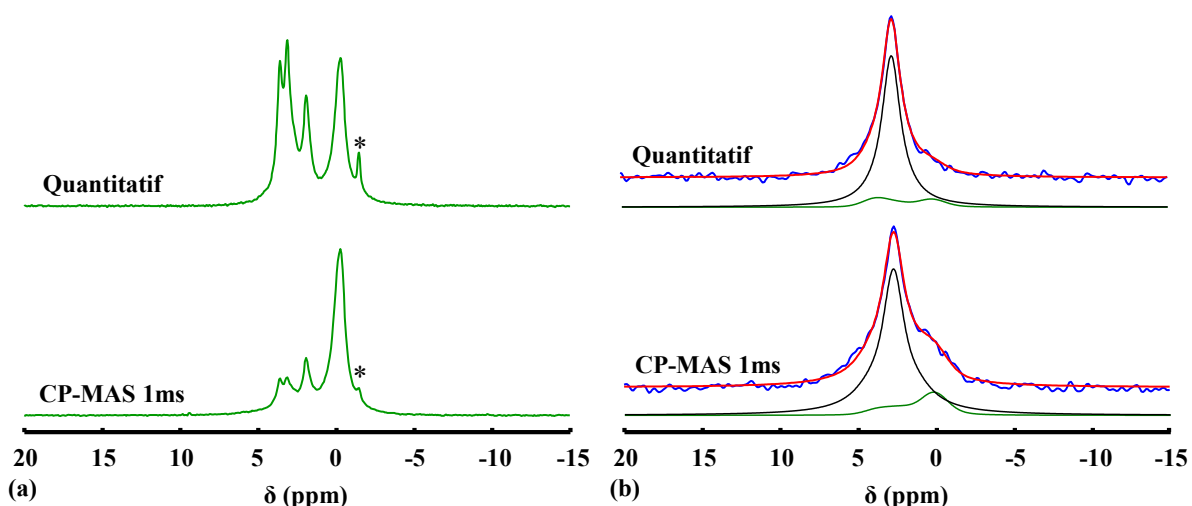


Figure III-68 : (a) Spectres RMN MAS ^{31}P quantitatif et CP-MAS (temps de transfert d'aimantation de 1 ms) d'un échantillon d'OCP. Le pic indiqué par l'astérisque est associé à une impureté. (b) Spectres RMN MAS ^{31}P quantitatif et CP-MAS (temps de transfert d'aimantation de 1 ms) du dépôt obtenu à 25 mA/g (en bleu). Les spectres simulés sont représentés en rouge et les deux contributions associées aux phases OCP et HAP sont représentées en vert et en noir, respectivement.

Pour l'ensemble des échantillons, les spectres MAS du ^{31}P obtenus par transfert de l'aimantation protonique (polarisation croisée, CP) $\{^1\text{H}\} \rightarrow ^{31}\text{P}$ avec des temps de contact de 1, 5 et 10 ms ont été également enregistrés (Figure III-69). La méthode CP-MAS permet d'observer sélectivement les atomes de P à proximité des atomes de H, comme les unités hydrogénophosphates et les groupements PO_4 au voisinage d'ions hydroxyles ou de molécules d'eau. De plus, des études antérieures [34, 35] ont démontré que l'efficacité du transfert d'aimantation dépend à la fois de la distance internucléaire P-H et de la nature des environnements chimiques locaux de ^{31}P et ^1H . Pour différents CaP (HAP, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), un transfert efficace de l'aimantation des molécules d'eau absorbées ou structurales est obtenu pour des durées de transfert courtes (1 ms), alors que pour les groupements hydroxyles de l'HAP, le transfert est maximal pour des durées longues (5 à 10 ms). Pour les unités HPO_4 , un transfert optimal est également généralement obtenu pour des durées de transfert assez courtes [34, 35].

Pour l'ensemble des échantillons, les spectres CP-MAS obtenus pour des durées de transfert de 1 ms montrent la présence d'une contribution large et d'une raie plus fine située à 2,8 ppm (Figure III-43). Sur les spectres des échantillons obtenus à 25 et 50 mA/g, cette contribution large est plus intense et de forme dissymétrique, et elle est principalement associée à une phase OCP présentant un désordre structural local. Pour les dépôts obtenus à plus forte densité de courant, la contribution large a un profil symétrique (de type pseudo-Voigt) et est de plus faible intensité. Dans ce cas, cette raie large est associée aux environnements PO_4 et HPO_4 à proximité de molécules d'eau dans la phase HAP.

Pour l'ensemble des échantillons, on observe un affinement du spectre et une disparition de la composante large pour des durées de transfert d'aimantation longues. Cette signature spectrale est associée aux unités PO_4 à proximité des ions hydroxyles de la phase HAP.

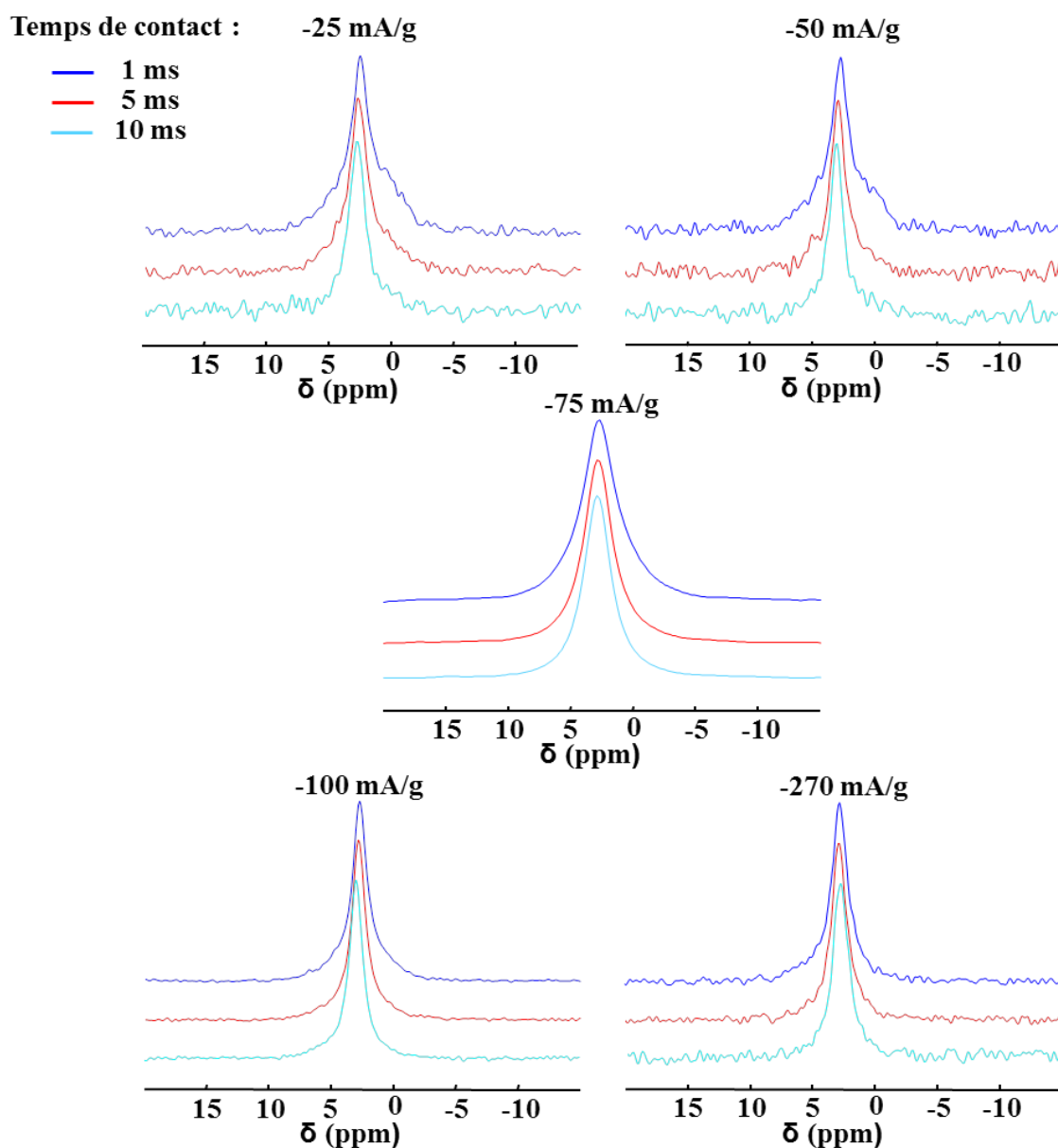


Figure III-69 : Spectres CP $\{^1\text{H}\}\text{-}^{31}\text{P}$ avec des temps de contact de 1, 5 et 10 ms.

Le Tableau III-21 regroupe les déplacements chimiques et largeurs à mi-hauteur des signaux du $\{^1\text{H}\}\text{-}^{31}\text{P}$ des dépôts pour des temps de contact de 1, 5 et 10 ms. Pour les densités de courant < 270 mA/g, on observe un déblindage progressif des déplacements chimiques avec l'augmentation du temps de transfert. Lors de l'étude d'HAP carbonatées, Aue *et al.* [33] ont reporté des variations de déplacements chimiques similaires et ont montré qu'une augmentation du taux d'ions carbonates dans l'HAP conduit à un déblindage du déplacement chimique ^{31}P . L'évolution observée en fonction du temps de transfert pourrait donc traduire

un degré de carbonatation inhomogène localement, les ions carbonates étant préférentiellement associés aux unités PO_4 à proximité des ions hydroxyles de l'HAP nanocristalline.

Tableau III-21: Déplacements chimiques et largeurs à mi-hauteur des signaux du ^{31}P en fonction du temps de contact.

d (mA/g)	t contact (ms)	δ (ppm)	FWMH (Hz)	Morphologies
25	1	2,7(4)	243	Plaquettes / Feuilletés
	5	2,8(5)	207	
	10	3,0(2)	186	
50	1	2,8(5)	216	
	5	2,9(5)	173	
	10	3,0(6)	157	
100	1	2,7(7)	173	Aiguilles
	5	2,8(7)	163	
	10	2,9(9)	159	
270	1	2,8(1)	186	
	5	2,8(1)	179	
	10	2,8(4)	185	

2.6.2. RMN du ^1H

Comme les expériences RMN MAS ont été effectuées sur les échantillons de tissus recouverts des dépôts, les spectres du ^1H obtenus par excitation directe sont très nettement dominés par la signature du tissu de fibres de carbone. Il est cependant possible de sonder sélectivement (mais de manière non-quantitative) la nature des environnements locaux de ^1H dans les dépôts en utilisant une méthodologie adaptée. Dans cette étude, les spectres ^1H sélectifs des dépôts phosphocalciques ont été obtenus par détection indirecte dans une expérience de corrélation hétéronucléaire ^{31}P - ^1H .

La Figure III-70 présente les spectres MAS ^1H issus des expériences de corrélation hétéronucléaire ^{31}P - ^1H pour les dépôts obtenus à 50, 75 et 270 mA/g. Sur les spectres des trois échantillons, la raie principale, située vers 0 ppm, est caractéristique des ions hydroxydes apatitiques de l'HAP. On observe également une raie large, de plus faible intensité, située à environ 5 ppm, qui est attribuée aux molécules d'eau adsorbées et de structure, et un second signal large, de faible intensité, situé entre 10 et 17 ppm, qui est attribué aux ions hydrogénophosphates [34, 36]. On notera que ces deux signaux larges (H_2O et HPO_4) sont

plus intenses pour le dépôt à 50 mA/g qui contient une phase OCP, ainsi que pour le dépôt à 75 mA/g.

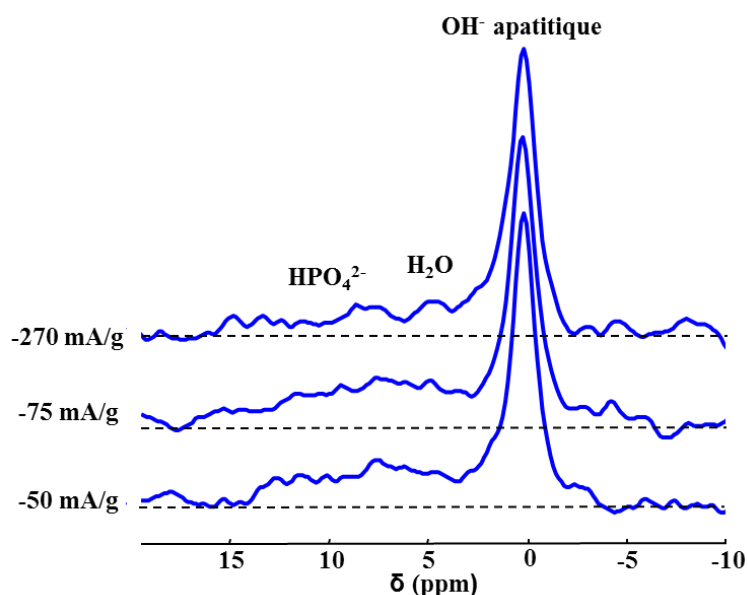


Figure III-70 : Spectres RMN MAS du ^1H obtenus par détection indirecte dans une expérience de corrélation ^{31}P - ^1H pour les dépôts obtenus à 50, 75 et 270 mA/g.

2.6.3. Spectres 2D de corrélation hétéronucléaire ^{31}P - ^1H

La Figure III-71 présente les spectres 2D de corrélation hétéronucléaire (HETCOR) ^{31}P - ^1H (enregistrés avec une durée de transfert de 1 ms) pour les dépôts obtenus à 50, 75 et 270 mA/g (Figure III-71-a, b et c respectivement). Ces cartes 2D présentent des taches de corrélation entre les différentes raies de résonance ^{31}P et ^1H qui traduisent directement les proximités entre les différents atomes P et H. Pour les trois échantillons, on observe une tache de corrélation intense entre la raie du ^{31}P située vers 2,8-2.9 ppm qui est attribuée aux groupements phosphates de l'HAP et le pic ^1H situé vers 0 ppm qui est caractéristique des OH^- apatitiques. Pour les dépôts obtenus à 75 et 270 mA/g, la contribution large ^{31}P , caractéristique d'un environnement désordonné, est corrélée aux signaux ^1H entre 5 et 15 ppm qui sont associés aux molécules d'eau et aux ions hydrogénophosphates. Comme décrits dans des études RMN précédentes d'HAP nanocristallines [34], d'HAP biomimétiques [37, 38] ou d'HAP nanocristallines modifiées en surface [39, 40], ces observations conduisent à une description de la structure des nanocristaux d'HAP sous la forme d'un cœur relativement bien ordonné et riche en ions hydroxyles (raie ^{31}P fine) et d'une couche de surface désordonnée riche en ions HPO_4^{2-} et en molécules d'eau et appauvrie en ions hydroxyles (raie ^{31}P large). Dans le cas du dépôt à 50 mA/g, la contribution ^{31}P large est également associée à la présence

d'OCP qui comprend des ions hydrogénophosphates et de l'eau de structure. La variation du déplacement chimique ^{31}P en fonction de la durée du transfert d'aimantation observée précédemment (déplacement chimique plus déblindé pour la raie fine) semble donc indiquer que le cœur des nanoparticules d'HAP est plus carbonaté que la surface.

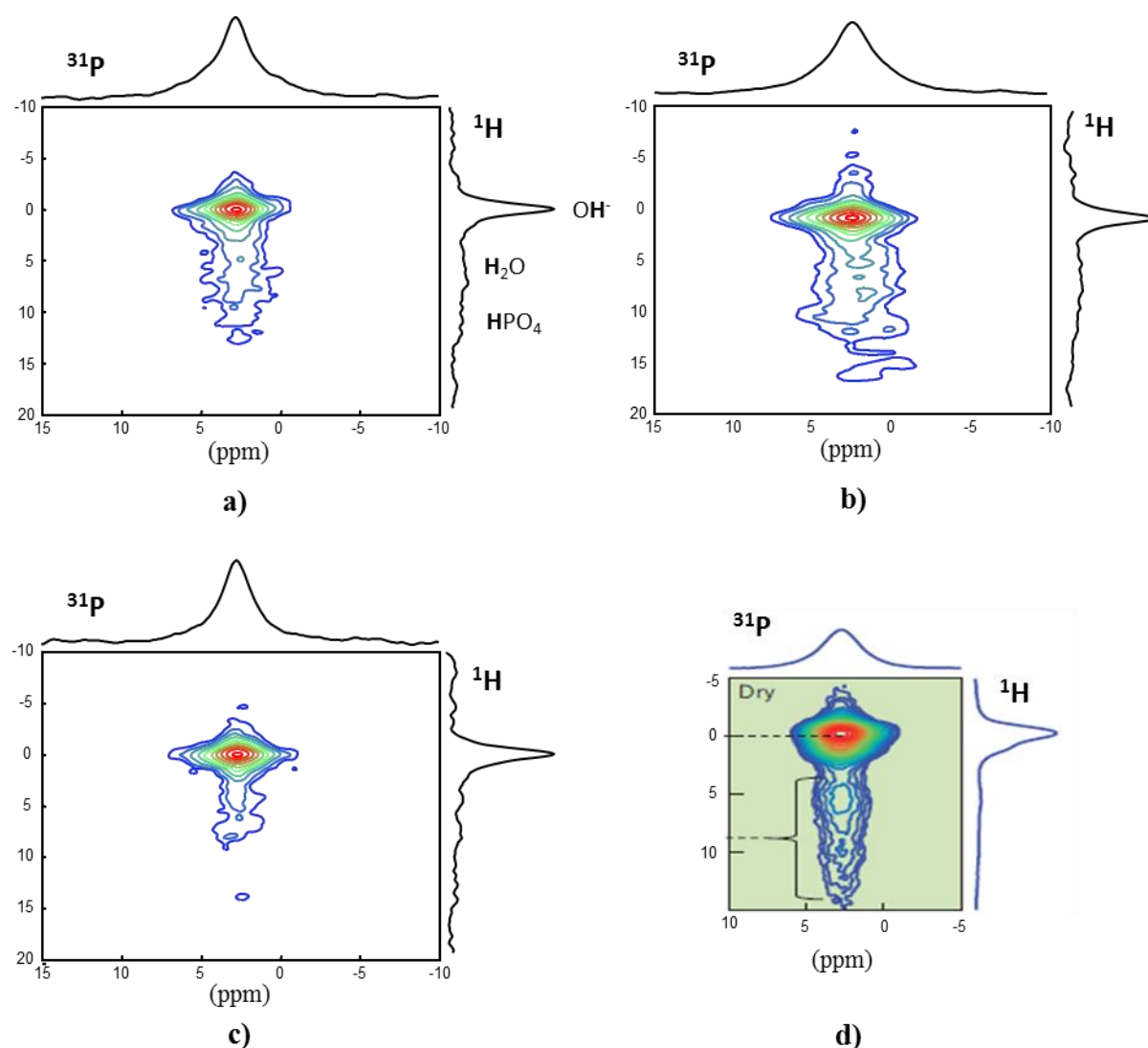


Figure III-71 : Spectres RMN MAS de corrélation hétéronucléaire 2D ^1H - ^{31}P des dépôts obtenus à 50 mA/g (a), 75 mA/g (b) et 270 mA/g (c) (temps de contact d'1 ms) comparé à celui d'un os de mouton sec (temps de contact de 10 ms) [38] (d).

Les résultats obtenus ici indiquent donc que pour les dépôts constitués uniquement d'HAP (morphologie en aiguille) ou bien d'HAP et OCP (morphologie plaquettaire), les nanocristallites d'HAP sont formés d'un cœur relativement ordonné, riche en ions hydroxyles et en groupes PO_4^{3-} apatitiques, et d'une couche de surface désordonnée, riche en molécules

d'eau et ions HPO_4^{2-} . On notera également que les spectres HETCOR des dépôts obtenus par sono-électrodéposition présentent de fortes similarités avec le spectre HETCOR obtenu pour un os de mouton sec (Figure III-71 d), révélant un caractère structural biomimétique des nanoparticules d'HAP.

2.6.4. Discussion et conclusion de l'étude par RMN

Les résultats obtenus ici par spectroscopie RMN MAS affinent les caractérisations précédentes des revêtements phosphocalciques déposés à la surface des tissus de fibres de carbone. Les dépôts obtenus pour des densités de courant faibles (25 et 50 mA/g), de morphologie plaquettaire, sont constitués d'HAP et d'une phase OCP désordonnée minoritaire, alors que pour les fortes densités de courant les dépôts à morphologie en aiguille obtenus sont constitués uniquement d'HAP carbonatée nanocristalline. Dans les deux cas, les spectres HETCOR indiquent que les nanoparticules d'HAP carbonatée sont constituées d'un cœur apatitique, bien cristallisé et riche en ions hydroxyles, et d'une couche de surface désordonnée hydratée et contenant des ions hydrogénophosphates [34, 38].

Cette similarité structurale des nanocristaux d'HAP constituant les dépôts à faible et forte densités de courant qui présentent des morphologies différentes peut apparaître surprenante mais elle peut être expliquée en considérant différents mécanismes de formation de ces nanocristaux d'HAP en fonction de la densité de courant. En effet, les dépôts à fortes densités de courant ont une morphologie (type aiguille) similaire aux HAP nanocristallines formées par coprécipitation en milieu concentré et résultent donc d'un processus de précipitation directe. En revanche, pour les dépôts à faibles densités de courant, la formation d'un dépôt à morphologie plaquettaire constitué de nanocristaux d'HAP et d'une phase OCP désorganisée minoritaire peut découler d'un processus différent : la formation initiale de nanocristaux d'OCP à morphologie plaquettaire suivie de leur transformation par réaction d'hydrolyse et réorganisation structurale en nanocristaux d'HAP conservant une morphologie plaquettaire. Cette interprétation sera détaillée dans le chapitre IV qui synthétise les résultats obtenus par les différentes techniques de caractérisation.

3. Tests de prolifération *in vitro* d'ostéoblastes humains primaires

Nous avons utilisé trois tests permettant d'évaluer la biocompatibilité *in vitro* des matériaux. Dans un premier temps, la viabilité et la prolifération d'ostéoblastes humains primaires (HOST) au contact des biomatériaux hybrides ont été testées par la méthode au XTT. Dans un second temps, nous avons utilisé un test fluorescent qualitatif (LIVE/DEAD viability/cytotoxicity) permettant l'observation directe en microscopie optique des cellules adhérentes aux biomatériaux. Le détail de la méthodologie de ces tests est donné dans le chapitre 2. Nous l'avons appliqué aux cellulesensemencées sur les TFC sans dépôt dans le but de déterminer l'influence des propriétés physico-chimiques de ces tissus sur l'adhésion et la viabilité cellulaires. En parallèle de ces deux techniques les cellules ayant adhéré et proliféré autour du biomatériau sur le plastique des puits de culture ont été observées au microscope optique inversé afin de déterminer s'il existait une cytotoxicité à distance induite par les biomatériaux.

3.1. Mesure de la viabilité et de la prolifération des HOST sur les biomatériaux hybrides TFC/CaP par la méthode au XTT.

Avant de réaliser les tests de prolifération des HOST sur les biomatériaux par la méthode au XTT, il est nécessaire de réaliser une optimisation des conditions opératoires. Nous avons donc procédé en trois étapes :

- Détermination du nombre optimal de cellules à ensemercer par puits de culture.
- Etablissement de la droite de calibration de l'absorbance du réactif du test XTT en fonction du nombre de cellules et de la durée de l'incubation des cellules avec le réactif.
- Réalisation des tests de prolifération des HOST sur les biomatériaux.

3.1.1. Détermination de la densité d'ensemencement optimale

Par ce test préliminaire notre objectif est d'établir une correspondance entre l'état de confluence des cellules sur plastique en fonction de la densité d'ensemencement. En effet les HOST, comme toutes les cellules primaires, présentent la caractéristique de cesser de proliférer lorsqu'elles entrent en contact. Ce phénomène est appelé inhibition de contact. En fonction des expériences il est donc nécessaire de pouvoir obtenir des cellules subconfluentes ou confluentes.

À partir de la solution mère d'HOST, 20 puits d'une boîte de culture de 48 puits (Boîte 1) sont ensemencés avec un nombre croissant d'HOST (**Tableau III-22**).

Tableau III-22 : Nombre d'HOST ensemencés par puits de culture.

Nombre de puits	4	4	4	4	4
Nombre de cellules par puits	96000	48000	19200	9600	4800

Chaque puits a une surface de 0,95 cm². Après 18 h d'ensemencement, laps de temps permettant l'adhésion, les cellules sont observées au microscope optique inverse (Figure III-72) afin d'examiner leur état de confluence. Nous observons que pour les trois concentrations les plus élevées, la confluence des HOST est atteinte. Pour les puits ensemencés avec 4800 et 9600 cellules, les HOST sont subconfluentes.

Pour la suite du travail, 7000 et 20000 cellules par puits sont utilisées afin de permettre les observations respectives de prolifération et de cytotoxicité.

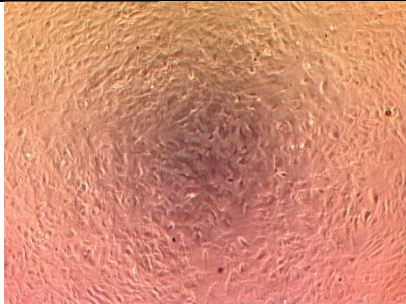
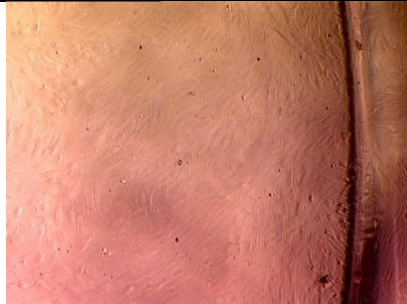
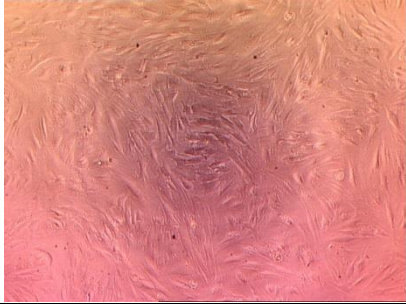
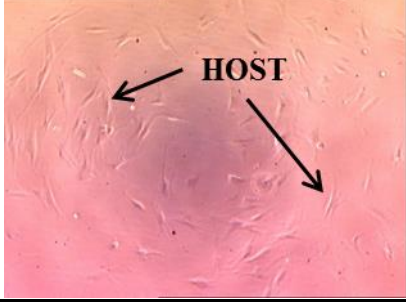
Nombre de cellules	Centre du puits	Bord du puits
96000		
48000		
19200		
9600		
4800		

Figure III-72: Images de microscopie optique inverse des HOST cultivés sur plastique (grandissement x5).

3.1.2. Etalonnage de l'absorbance en fonction de la densité des cellules et du temps d'incubation.

À partir de cette même boîte de culture, tous les surnageants sont aspirés et remplacés par 400 μL de milieu frais et 200 μL de solution de travail XTT. Après 60 min et 180 min d'incubation 100 μL de surnageant est prélevé à partir de chaque puits puis est transféré dans une boîte de 96 puits pour mesurer la densité optique (D.O.). La Figure III-73 reporte les D.O. mesurées à une longueur d'onde $\lambda = 490 \text{ nm}$. Après 60 min d'incubation des cellules avec le XTT, la D.O. observée est proportionnelle au nombre de cellules dans un intervalle allant de 0 à environ 20000 cellules. Pour 180 min d'incubation des cellules avec le XTT, le domaine de linéarité se situe entre 0 et 15000 cellules.

À partir de ces résultats, nous choisissons d'appliquer les conditions suivantes aux tests ultérieurs : 1) ensemencement des HOST à raison de 7000 cellules par puits afin d'observer leur prolifération et ; 2) temps d'incubation des cellules en présence du XTT de 60 min.

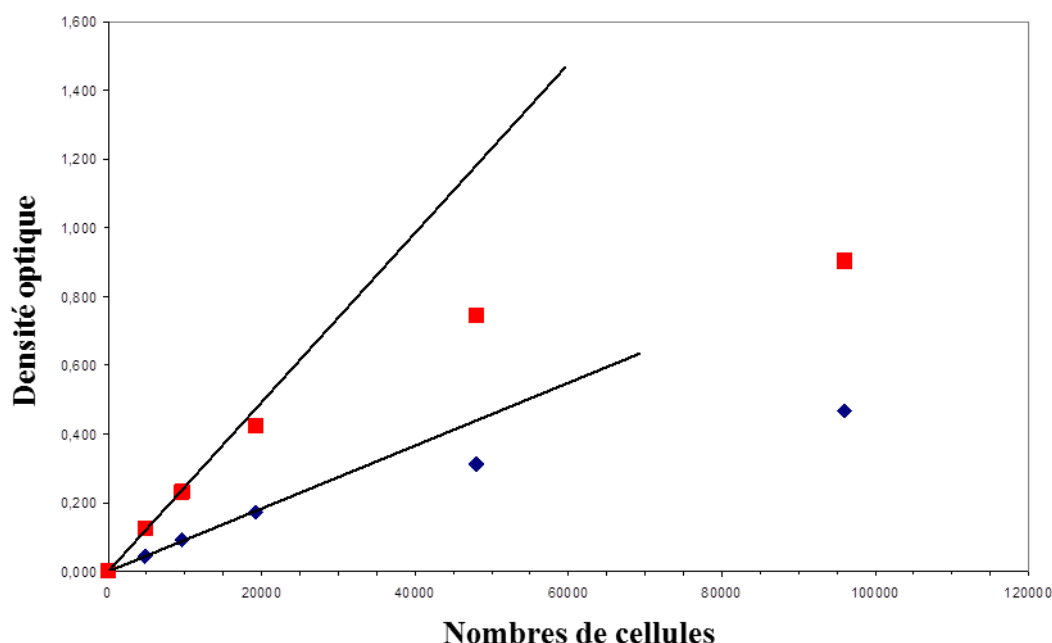


Figure III-73 : Absorbance du surnageant en fonction du nombre de cellules pour un temps de contact avec le XTT de 60min (bleu) et 180min (rouge)

3.1.3. Résultats des tests de prolifération des HOST primaires sur les biomatériaux hybrides TFC / CaP.

Les biomatériaux hybrides TFC KIP1200 / CaP obtenus à des densités de courant allant de 25 à 270 mA/g ainsi que le TFC KIP1200 seul sont stérilisés (chaleur sèche, 180°C, 2 heures), placés dans des puits de culture et pré-incubés chacun avec 1 mL de milieu de culture. Toutes les conditions sont testées en triple. Au bout de 3 h de pré-incubation, une décoloration du milieu due à l'adsorption du rouge de phénol par le tissu est observée. Le milieu décoloré est alors aspiré et remplacé par du milieu frais. Cette opération est renouvelée une fois après 17 heures. Après cette phase de pré-incubation les tissus sontensemencés avec 1 mL de milieu contenant 7000 HOST et les cellules sont cultivées pendant 24 à 192 h. La condition témoin consiste à ensemencher les HOST directement sur le plastique des puits de culture.

La Figure III-74 présente l'évolution du nombre de cellules vivantes en fonction du temps d'incubation au contact des six biomatériaux ou du plastique de culture. Au bout de 24 h, la densité optique (D.O.) mesurée dans les puits contenant les biomatériaux est d'environ 0,020 contre 0,080 dans la condition témoin. Après 48 h, la D.O. diminue pour tous les biomatériaux sauf pour le TFC/CaP obtenu à une densité de courant de 270 mA/g où la D.O. augmente jusqu'à 0,037. Nous n'observons pas de variation significative de la D.O. pour le témoin. Après 96 h, la D.O. pour les biomatériaux est quasiment nulle alors que celle du témoin augmente jusqu'à environ 0,100. Après 192 h d'incubation, les D.O. mesurées en présence des biomatériaux sont également proches de zéro tandis que celle du témoin a continué à augmenter.

Ces résultats suggèrent que le tissu KIP 1200, recouvert par une couche de CaP ou non, est cytotoxique. Dans le cas du dépôt de CaP obtenu à 270 mA/g, l'augmentation de la D.O. au bout de 48h d'incubation indique un retard de cytotoxicité mais à partir de 96 h d'incubation, plus aucune cellule HOST n'est viable. Nous avons vérifié que le pH des milieux de culture en présence des biomatériaux était le même que celui des milieux de culture des puits témoins soit $(8,6 \pm 0,1)$ à 20,3°C. Ceci permet d'exclure l'hypothèse d'un relargage d'ions hydroxyles dû à un lavage insuffisant des biomatériaux après leur synthèse.

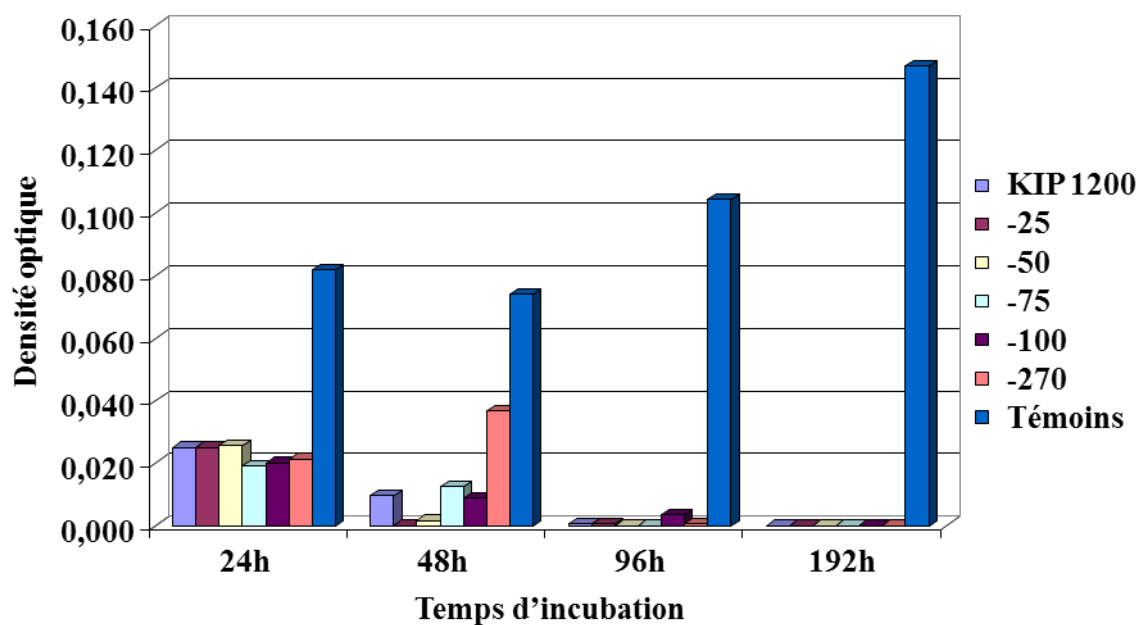


Figure III-74 : Prolifération des HOST primaires sur les biomatériaux

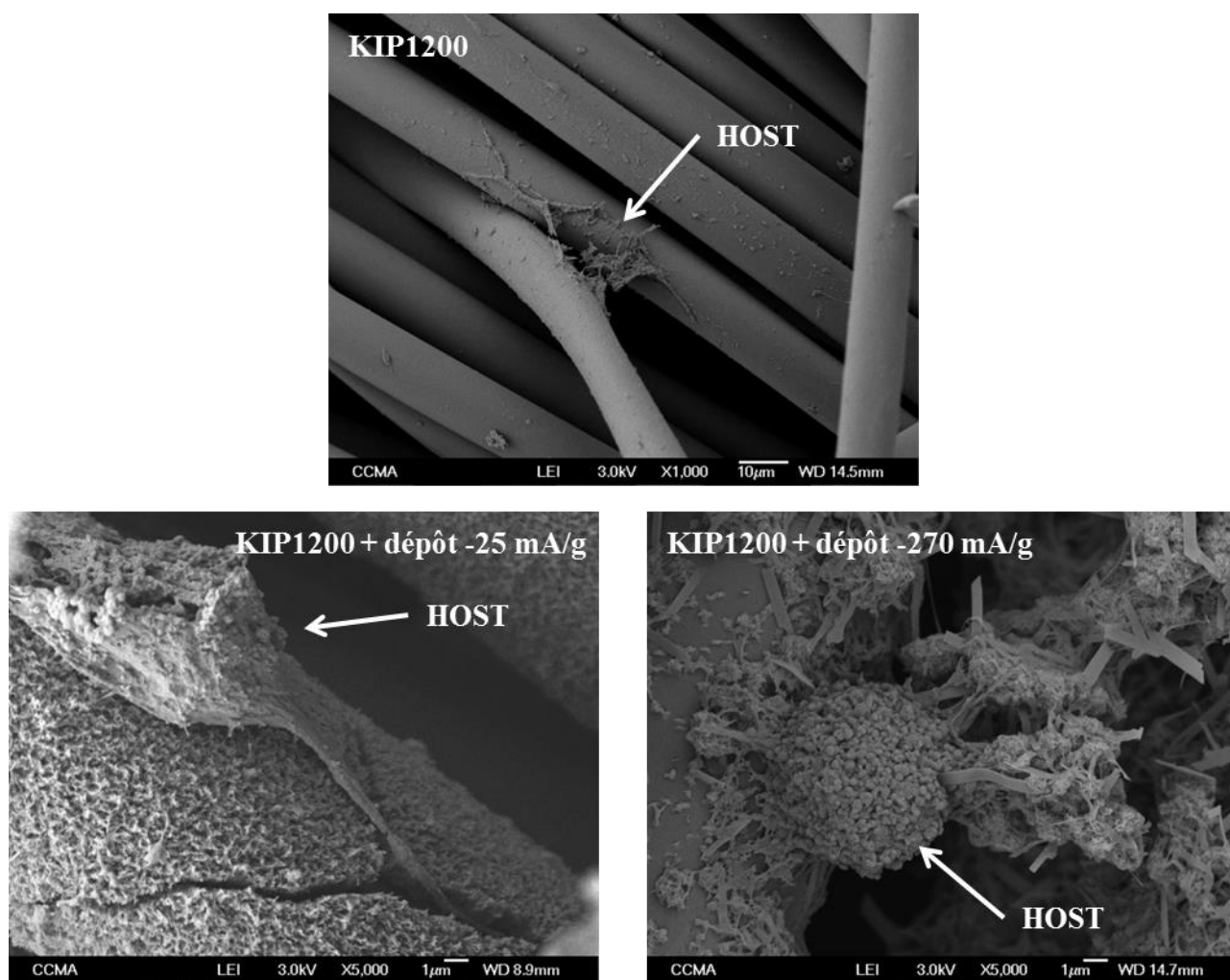


Figure III-75 : Images MEB du KIP1200 avec et sans dépôt après la culture pour les HOST.

Les observations par MEB des biomatériaux après la culture des HOST montrent la présence de très rares cellules à la surface des fibres (Figure III-75). Sur l'image du tissu + dépôt à 25 mA/g, on distingue un HOST dont un « bras » s'enfonce dans le dépôt afin d'adhérer à la surface du tissu. Pour 270 mA/g, la cellule s'est entourée d'un revêtement de CaP qui peut être attribué à une activité biologique de synthèse de phosphate de calcium. Ces observations indiquent que, avec ou sans dépôt de CaP, le KIP1200 possède au moins en partie une cytotoxicité par contact direct.

Deux mécanismes non exclusifs pourraient expliquer l'effet du revêtement de phosphate de calcium obtenu à 270 mA/g :

- Dans le cas de l'effet cytotoxique direct que nous observons ci-dessus, le dépôt de CaP le plus dense, obtenu à 270 mA/g, pourrait avoir un effet d'écrantage entre les cellules et les fibres empêchant de fait leur contact direct ;
- Le KIP1200 peut également posséder un effet cytotoxique indirect par captation des molécules du milieu environnant. C'est ce que suggère la décoloration du milieu de culture que nous observons après quelques heures d'incubation. En effet, le grand volume poreux de $0,683 \text{ cm}^3/\text{g}$ du TFC KIP1200 pourrait entraîner l'adsorption des éléments du milieu de culture nécessaires à la survie et la croissance des HOST. Dans ce cas, cet effet, serait retardé par le dépôt de CaP obtenu à 270 mA/g dont la quantité plus importante entraînerait un temps de redissolution plus long. Dans ce cas, nous avons également fait l'hypothèse que la porosité importante du KIP1200 pourrait être responsable de l'adsorption du formazan au cours du test au XTT, biaisant de fait les résultats (faux négatifs).

L'objectif des expériences suivantes est donc de tester le rôle de la porosité du KIP1200 dans sa cytotoxicité.

3.1.4. Impact de la nanotexture des TFC sur la prolifération des HOST.

Dans le but de vérifier si la cytotoxicité est liée à la nanotexture du tissu, nous avons comparé le KIP1200 à un TFC non activé ayant un volume poreux nul.

La première observation est qu'au cours de la pré-incubation, le milieu de culture du TFC non activé ne se décolore pas, contrairement à celui du KIP1200. Ce résultat prouve que la décoloration du milieu est bien liée à la porosité des fibres du TFC KIP1200.

Nous avons émis l'hypothèse que si la toxicité indirecte des TFC était liée à la captation des molécules indispensables à la survie et la croissance cellulaire, les cellules présentes dans l'environnement des biomatériaux, mais non directement en contact, devraient être affectées. Nous avons analysé en microscopie optique la morphologie et la densité des cellules présentes autour des TFC, sur la surface plastique laissée libre dans chaque puits. La Figure III-76 présente les photos de microscopie optique inverse de la périphérie des puits de culture contenant le KIP1200 et le tissu non activé après 66h d'incubation.

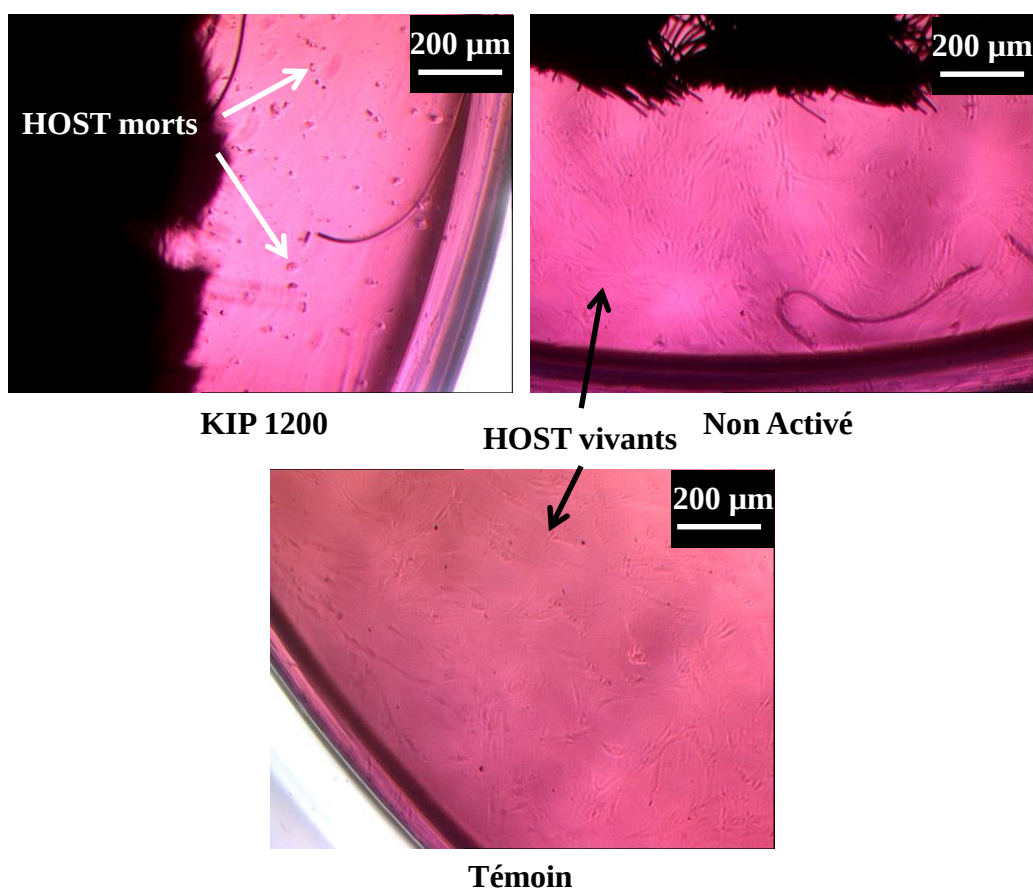


Figure III-76 : Images de microscopie optique inverse de la périphérie des puits après 66 h de culture (grandissement x5).

La condition témoin a consisté en des cellules cultivées dans un puits ne contenant pas de biomatériaux. Les images montrent que pour le TFC non activé, les HOST présents en bordure du puits ont une morphologie fibroblastique fusiforme comparable à celles des HOST de la condition témoin. En revanche pour le KIP1200, pratiquement aucun HOST n'est présent sur le bord du puits. Ces résultats indiquent que le KIP1200 possède une cytotoxicité indirecte à distance ce qui est en accord avec les tests quantitatifs avec le XTT. En revanche ils permettent d'écarter l'hypothèse d'une cytotoxicité indirecte à distance pour le TFC non activé. De plus, nous avons noté que les débris de tissu et/ou de dépôt n'entraînent pas de mortalité visible des cellules.

3.2. Test de viabilité des HOST en fluorescence

Afin de nous affranchir d'éventuelles interférences observées lors des tests de viabilité au XTT dues à la porosité des TFC, nous avons utilisé une autre méthode permettant l'observation directe, en fluorescence, des cellules présentes à la surface des TFC.

Notre but était d'étudier l'impact de la microtexture et de la composition chimique des TFC sans revêtement phosphocalcique sur la viabilité cellulaire. Quatre TFC sont étudiés : le KIP1200 avec lequel ont été effectués les dépôts, le KIP1200 oxydé électrochimiquement avec un potentiel de +1,4 V, le TFC non activé et enfin le BBV800. Ces tissus possèdent des propriétés physico-chimiques différentes qui sont récapitulées dans les Tableau III-23 et III-20. Nous avons choisi comme contrôle positif un biomatériau macroporeux de phosphate de calcium biphasé composé de 60% d'HAP ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et 40% de β -tricalcium phosphate (β -TCP, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

L'observation des cellules vivantes en fluorescence verte a permis de constater des biocompatibilités très différentes entre les tissus analysés. Nous n'observons aucune cellule vivante au contact du KIP1200, ce qui est cohérent avec nos observations en microscopie électronique à balayage. L'image, complètement noire n'est donc pas présentée ici. En présence du KIP1200 oxydé, on aperçoit quelques traces vertes allongées caractéristiques des cellules vivantes (Figure III-77).

Tableau III-23 : Composition chimique, pH de charge nulle et précurseurs des TFC.

Tissu	Composition élémentaire (% massique)					pH _{cn}	Précurseur
	N	C	H	O	Total		
KIP 1200	0	95	0,6	1,2	96,8	9,4	Résine phénolique
KIP 1200 oxydé Na ₂ SO ₄ +1,4V*	0	69,8	1,3	23,2	94,3	3,2	Résine phénolique
Non activé	1,4	60,7	3,6	10,7	76,4	5,6	Viscose
BBV 800*	1,2	70	1,4	6,1	78,7	7,2	Viscose

Tableau III-24 : Propriétés texturales des TFC.

Tissu	S _{BET} (m ² /g)	Volume poreux (cm ³ /g)	Type de porosité
KIP 1200	1700	0,683	Micropore (~1 nm)
KIP 1200 oxydé Na ₂ SO ₄ +1,4V*	1284	0,488	Micropore (~1 nm)
Non activé	< 50	-	-
BBV 800*	1060	0,634	micro/mesopore (~1 et 3 nm)

*TFC caractérisés dans une étude précédente au laboratoire ICMN [3].

Pour le TFC non activé et le BBV800, nous observons un très grand nombre de cellules vivantes, de morphologie fibroblastique très allongée, alignées le long des fibres de sorte qu'il est possible de distinguer l'organisation des faisceaux de fibres pour ces deux tissus. Ces résultats indiquent que les deux tissus, TFC non activé et BBV800, sont biocompatibles.

L'absence de cellules à la surface du KIP1200 indique, qu'en plus de posséder une cytotoxicité indirecte à distance, ce TFC possède aussi une cytotoxicité de contact.

Le KIP1200 oxydé électrochimiquement présente une meilleure mouillabilité que le KIP1200 brut de par sa composition chimique de surface plus oxygénée. La présence d'un petit nombre de cellules vivantes à la surface des fibres de KIP1200 oxydé indique que ce traitement électrochimique n'améliore que faiblement les interactions entre le tissu et les cellules.

Ainsi, la mouillabilité, caractéristique des interactions entre une surface et les cellules, n'est pas un paramètre majeur influençant la biocompatibilité. De plus, l'oxydation du TFC entraîne une diminution de sa surface spécifique ce qui pourrait limiter sa biocompatibilité.

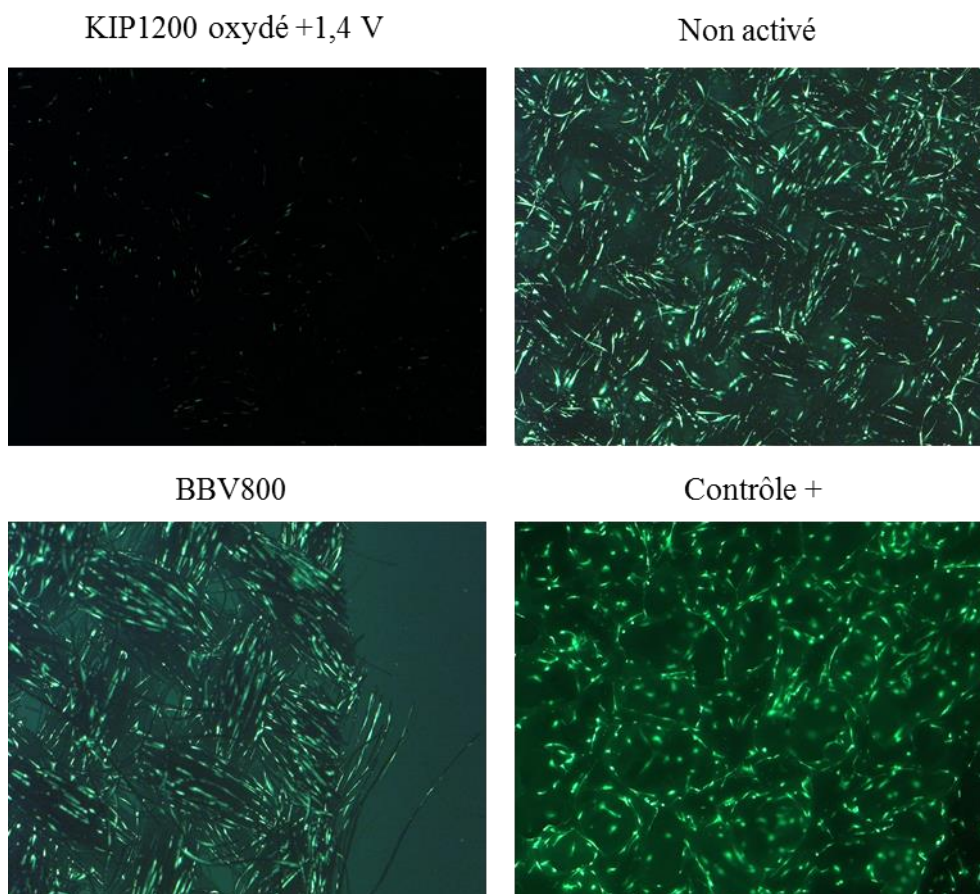


Figure III-77 : Images de microscopie optique en fluorescence (filtre vert) des TFC. Grandissement x2,5

Cependant, les tests de viabilité « Live / Dead » sur le TFC non activé montrent que malgré l'absence de porosité et une hydrophobicité plus importante que pour le KIP1200 oxydé, les HOST prolifèrent à sa surface. Les cellules adhèrent aussi à la surface du BBV800. Le précurseur de ces deux tissus est de la viscose. Mais, contrairement au TFC non activé, le BBV800 présente un volume poreux de $0,634 \text{ cm}^3/\text{g}$ qui est comparable à celui du KIP1200. Ces résultats semblent indiquer que la porosité à l'échelle nanométrique ($\varnothing < 3 \text{ nm}$) ne joue pas un rôle prépondérant dans la biocompatibilité des TFC.

On remarque que les résultats de l'analyse de la composition chimique des TFC non activé et BBV 800 donne une somme éloignée de 100 % (Tableau III-23). Dans le cas du

BBV 800, les analyses par EDX montrent que les fibres possèdent des impuretés notamment d'oxydes de zinc et d'aluminium (Tableau III-25) [3].

Tableau III-25: Composition chimique des impuretés métalliques présentes sur le BBV 800 déterminée par EDX (semi - quantitatif). [3]

TFC	Oxygène (%)	Aluminium (%)	Phosphore (%)	Chlore (%)	Zinc (%)
BBV 800	37	11	16	4	32

Les caractérisations par EDX sont en cours sur le non activé afin de déterminer quelles impuretés sont y présentes. Enfin, le dernier point commun entre les TFC non activé et BBV800 est la forme lobée des fibres de carbone (Figure III-78). Cette forme de fibre pourrait permettre une meilleure accroche des HOST primaires.

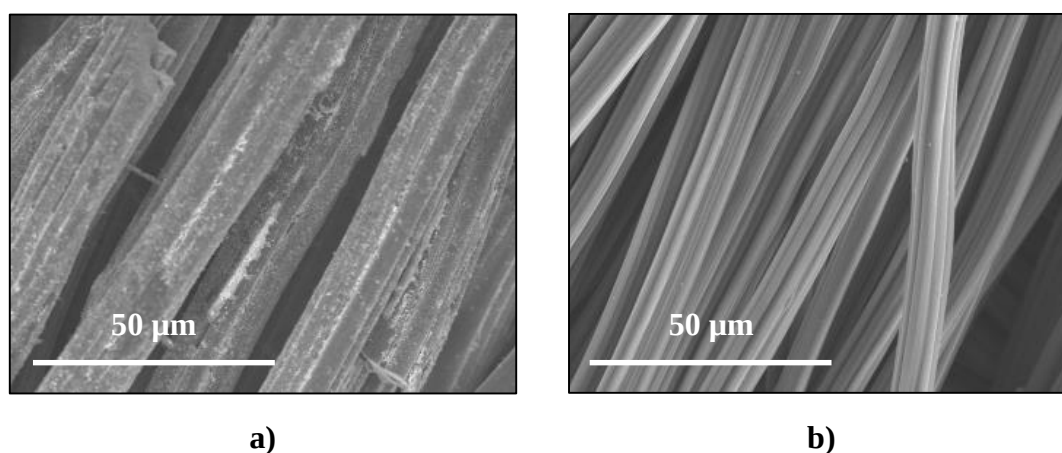


Figure III-78 : Images MEB du BBV800 (a) et du tissu non activé (b). Grandissement x1000.

3.3. Conclusion sur les tests de viabilités cellulaires.

Ces tests préliminaires ont mis en évidence qu'une porosité de taille nanométrique ainsi que le caractère hydrophile de la surface des fibres ne semblent pas être des paramètres majeurs pour la biocompatibilité et la multiplication d'ostéoblastes humains primaires. En revanche, le précurseur des fibres, les impuretés et/ou la forme lobée des fibres de carbone semblent être des paramètres favorisant l'adhésion de ces cellules.

Nous ne pouvons pas conclure quant à l'influence de la morphologie du revêtement phosphocalcique sur la biocompatibilité du matériau hybride CaP/TFC car la cytotoxicité du TFC KIP1200 est telle qu'elle masque la biocompatibilité des dépôts phosphocalciques.

Références

1. Bandoz TJ, Ania CO. *Surface chemistry of activated carbons and its characterization*. *Act Carbon Surf Environ Remediat*. 2006;159-229.
2. Ljubisa R Radovic. *Surface Chemistry of Activated Carbon Materials*. In: *Surfaces of Nanoparticles and Porous Materials*. CRC Press; 1999. <http://dx.doi.org/10.1201/9780824746681.pt3>
3. Gineys M. *Régénération électrochimique de carbones nanoporeux utilisés pour le piégeage de micropolluants*. ICMN, Thèse de l'Université d'Orléans soutenue en juillet 2015
4. Figueiredo J., Pereira MF., Freitas MM., Órfão JJ. *Modification of the surface chemistry of activated carbons*. *Carbon*. 1999;37(9):1379-89.
5. Zhou J-H, Sui Z-J, Zhu J, Li P, Chen D, Dai Y-C, et al. *Characterization of surface oxygen complexes on carbon nanofibers by TPD, XPS and FT-IR*. *Carbon*. avr 2007;45(4):785-96.
6. Gorgulho HF, Mesquita JP, Gonçalves F, Pereira MFR, Figueiredo JL. *Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption*. *Carbon*. oct 2008;46(12):1544-55.
7. Burg P, Vix-Guterl C. *Importance de la chimie de surface des matériaux carbonés Méthodes de caractérisation*. *Les matériaux carbonés : recherches et applications*. 2006;(295-296):91-4.
8. Sing KW. *Physisorption of nitrogen by porous materials*. *J Porous Mater*. 1 juill 1995;2(1):5-8.
9. Menéndez JA, Phillips J, Xia B, Radovic LR. *On the Modification and Characterization of Chemical Surface Properties of Activated Carbon: In the Search of Carbons with Stable Basic Properties*. *Langmuir*. 1 janv 1996;12(18):4404-10.
10. Castro-Muñiz A, Suárez-García F, Martínez-Alonso A, Tascón JMD. *Activated carbon fibers with a high content of surface functional groups by phosphoric acid activation of PPTA*. *J Colloid Interface Sci*. 1 sept 2011;361(1):307-15.
11. Montes-Morán MA, Martínez-Alonso A, Tascón JMD, Young RJ. *Effects of plasma oxidation on the surface and interfacial properties of ultra-high modulus carbon fibres*. *Compos Part Appl Sci Manuf*. mars 2001;32(3-4):361-71.
12. Bayram E, Ayranci E. *A systematic study on the changes in properties of an activated carbon cloth upon polarization*. *Electrochimica Acta*. 1 févr 2011;56(5):2184-9.

13. Berenguer R, Marco-Lozar JP, Quijada C, Cazorla-Amorós D, Morallón E. *Effect of electrochemical treatments on the surface chemistry of activated carbon*. Carbon. avr 2009;47(4):1018-27.
14. Han H, Mikhalovsky SV, Phillips GJ, Lloyd AW. *Calcium phosphate sonoelectrodeposition on carbon fabrics and its effect on osteoblast cell viability in vitro*. New Carbon Mater. juin 2007;22(2):121-5.
15. Han HM, Phillips GJ, Mikhalovsky SV, FitzGerald S, Lloyd AW. *Sonoelectrochemical deposition of calcium phosphate coatings on carbon materials—effect of electrolyte concentration*. J Mater Sci Mater Med. 1 août 2008;19(8):2845-50.
16. Karampas IA, Kontoyannis CG. *Characterization of calcium phosphates mixtures*. Vib Spectrosc. janv 2013;64(0):126-33.
17. Grunenwald A, Keyser C, Sautereau AM, Crubézy E, Ludes B, Drouet C. *Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology*. J Archaeol Sci. sept 2014;49(0):134-41.
18. Fleet M. *Carbonated hydroxyapatite: Materials, Synthesis and Applications*. Pan Stanford Publishing; 2015.
19. Fleet ME, Liu X. *Location of type B carbonate ion in type A–B carbonate apatite synthesized at high pressure*. J Solid State Chem. sept 2004;177(9):3174-82.
20. Gómez-Morales J, Iafisco M, Delgado-López JM, Sarda S, Drouet C. *Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects*. Prog Cryst Growth Charact Mater. mars 2013;59(1):1-46.
21. Mochales C, Wilson RM, Dowker SEP, Ginebra M-P. *Dry mechanosynthesis of nanocrystalline calcium deficient hydroxyapatite: Structural characterisation*. J Alloys Compd. 7 juill 2011;509(27):7389-94.
22. Venkateswarlu K, Sandhyarani M, Nellaippan TA, Rameshbabu N. *Estimation of Crystallite Size, Lattice Strain and Dislocation Density of Nanocrystalline Carbonate Substituted Hydroxyapatite by X-ray Peak Variance Analysis*. Int Conf Adv Manuf Mater Eng ICAMME 2014. 2014;5(0):212-21.
23. Panda RN, Hsieh MF, Chung RJ, Chin TS. *FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique*. J Phys Chem Solids. févr 2003;64(2):193-9.
24. Xin R, Leng Y, Wang N. *In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation*. J Cryst Growth. 15 mars 2006;289(1):339-44.
25. Xin R, Leng Y, Chen J, Zhang Q. *A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo*. Biomaterials. nov 2005;26(33):6477-86.

26. Zhang Q, Leng Y, Xin R. *A comparative study of electrochemical deposition and biomimetic deposition of calcium phosphate on porous titanium*. Biomaterials. juin 2005;26(16):2857-65.
27. Lu X, Leng Y, Zhang Q. *Electrochemical deposition of octacalcium phosphate micro-fiber/chitosan composite coatings on titanium substrates*. Surf Coat Technol. 25 mars 2008;202(13):3142-7.
28. Lu X, Leng Y. *TEM study of calcium phosphate precipitation on bioactive titanium surfaces*. Biomaterials. mai 2004;25(10):1779-86.
29. Brown WE, Smith JP, Lehr JR, Frazier AW. *Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystallographic and Chemical Relations between Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite*. Nature. 15 déc 1962;196(4859):1050-5.
30. Han HM, Phillips GJ, Mikhalovsky SV, FitzGerald S, Lloyd AW. *Sonoelectrochemical deposition of calcium phosphates on carbon materials: effect of current density*. J Mater Sci Mater Med. 1 avr 2008;19(4):1787-91.
31. Graham S, Brown PW. *Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite*. J Cryst Growth. 2 juill 1996;165(1-2):106-15.
32. Arellano-Jiménez MJ, García-García R, Reyes-Gasga J. *Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction*. J Phys Chem Solids. févr 2009;70(2):390-5.
33. Aue WP, Roufosse AH, Glimcher MJ, Griffin RG. *Solid-state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of synthetic solid phases of calcium phosphate: potential models of bone mineral*. Biochemistry (Mosc). 1984;23(25):6110-4.
34. Jäger C, Welzel T, Meyer-Zaika W, Epple M. *A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite*. Magn Reson Chem. 2006;44(6):573-80.
35. Kaflak-Hachulska A, Samoson A, Kolodziejski W. *^1H MAS and $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP/MAS NMR Study of Human Bone Mineral*. Calcif Tissue Int. 1 oct 2003;73(5):476-86.
36. Yesinowski JP, Eckert H. *Hydrogen environments in calcium phosphates: proton MAS NMR at high spinning speeds*. J Am Chem Soc. 1 oct 1987;109(21):6274-82.
37. Wang Y, Azais T, Robin M, Vallée A, Catania C, Legriel P, et al. *The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite*. Nat Mater. août 2012;11(8):724-33.
38. Wang Y, Von Euw S, Fernandes FM, Cassaignon S, Selmane M, Laurent G, et al. *Water-mediated structuring of bone apatite*. Nat Mater. déc 2013;12(12):1144-53.
39. Roussiere H, Montavon G, Laib S, Janvier P, Alonso B, Fayon F, et al. *Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption disorders*. J Mater Chem. 2005;15(35-36):3869-75.

40. Mellier C, Fayon F, Boukhechba F, Verron E, LeFerrec M, Montavon G, et al. *Design and properties of novel gallium-doped injectable apatitic cements*. Acta Biomater. 15 sept 2015;24:322-32.

Chapitre IV

Discussion générale

Sommaire du chapitre IV

1. Caractéristiques comparées des dépôts de CaP.	163
2. Les mécanismes réactionnels liés à la sono-électrodéposition.	166
2.1. Mécanisme de formation du dépôt de CaP à régime d'électrolyse rapide	169
2.2. Mécanisme de formation du dépôt de CaP à régime d'électrolyse lent.	172
2.2.1. Electrolyse du milieu électrolytique.	172
2.2.2. Précipitation de l'OCP.....	172
2.2.3. Hydrolyse de l'OCP en CaD-HAP.....	173
2.3. Régime d'électrolyse intermédiaire.	175
2.4. Origine et influence des carbonates.....	175
3. Origine de la phase désordonnée.	176
4. Comportement des TFC avec et sans un revêtement de CaP au cours de tests de viabilités cellulaires	179
5. Apport de la sono-électrodéposition sur le recouvrement de biomatériaux par un phosphate de calcium	181
Références.....	183

Dans ce chapitre, les mécanismes réactionnels qui ont lieu au cours du procédé de sono-électrodéposition, plus particulièrement en faisant varier la densité de courant, seront analysés et corrélés aux résultats des caractérisations des biomatériaux hybrides TFC / CaP. Ceci via les données obtenues sur les morphologies, compositions chimiques, microtextures et structures des dépôts de CaP. Il sera ensuite discuté de l'impact des caractéristiques physico-chimiques des TFC avec et sans dépôt de CaP sur la viabilité cellulaire *in vitro* des HOST primaires.

1. Caractéristiques comparées des dépôts de CaP.

Dans un premier temps, en fonction des conditions expérimentales, l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts de CaP obtenus par sono-électrodéposition ont été rassemblées dans le Tableau IV-26 pour avoir une vision synthétique des données. En fonction des régimes d'électrolyse, les caractérisations par MEB et MET ont mis en évidence des morphologies et microtextures différentes, qui associées aux analyses chimiques et caractérisations structurales des différents dépôts ont permis de proposer les mécanismes de formation des différentes phases de CaP qui seront exposés dans cette partie discussion. Dans un second temps, il est discuté des relations entre les propriétés physico-chimiques et structurales des TFC avec et sans dépôts et leurs propriétés de biocompatibilité résultant de tests de culture *in vitro* avec les HOST primaires.

En fonction des régimes d'électrolyse, trois types de dépôts sont mis en évidence :

- Pour les plus faibles densités de courant (25 et 50 mA/g), les dépôts se présentent sous forme de particules de type plaquettes/feuillet, dont un schéma est donné sur la Figure IV-79a. Ces dernières sont réparties le long des fibres de carbone, sans orientation préférentielle. Le recouvrement des fibres par le dépôt est hétérogène : de nombreuses zones du TFC ne sont pas recouvertes.
- Pour les plus fortes densités de courant (100 et 270 mA/g), les dépôts se présentent sous forme d'agrégats d'oursins d'aiguilles, dont un schéma est donné sur la Figure IV-79b. Les dépôts recouvrent totalement les fibres de carbone, mais le recouvrement est aussi hétérogène, dans le sens où le dépôt présente des excroissances ainsi que des variations d'épaisseur.
- Pour une densité de courant moyenne (75 mA/g), on observe à la fois les morphologies de type plaquettaire et de type aciculaire. Le recouvrement des fibres est homogène.

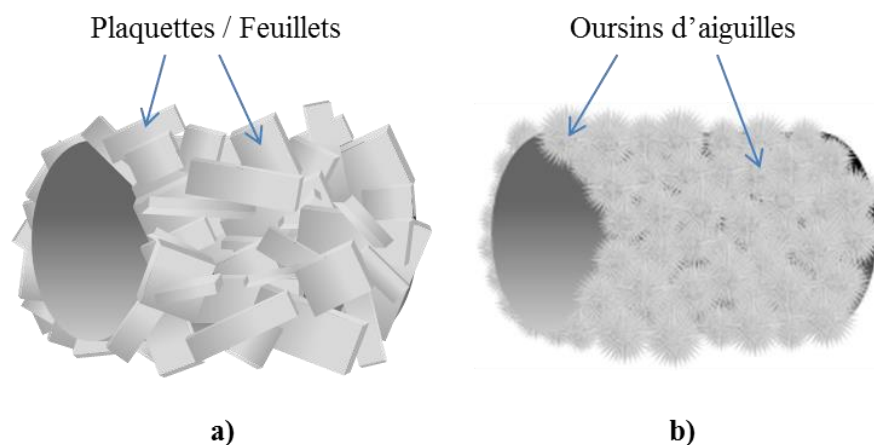


Figure IV-79 : Schémas des dépôts : morphologies plaquettaire (a) et aciculaire (b).

La spectroscopie IRTF, couplée à la DRX, ont permis une identification globale des phases phosphocalciques des dépôts. Quel que soit la densité de courant appliquée lors de la synthèse, la majorité du dépôt consiste en une phase d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CaD-HAP) carbonatée nanocristalline. Il est à noter que pour une densité de courant de 25 mA/g, ces techniques de caractérisation ont mis en évidence la présence d'une phase supplémentaire, le phosphate octocalcique (OCP). Pour une densité de courant de 270 mA/g, la DRX a mis en évidence une autre phase supplémentaire, la calcite CaCO_3 , associée à la phase d'hydroxyapatite déficiente en calcium.

La spectroscopie RMN MAS, également une technique d'analyse globale des dépôts, a permis d'obtenir des informations sur l'organisation structurale et cristalline des dépôts. Elle a mis en évidence deux environnements distincts du ^{31}P . Un premier qui a été attribué à un cœur de CaD-HAP carbonatée de structure cristallisée et riche en ions hydroxyles, et un second attribué à une couche de surface hydratée de CaD-HAP de structure désordonnée contenant des ions hydrogénophosphates. De plus, pour les plus faibles densités de courant (25 et 50 mA/g), la phase d'OCP, qui représente moins de 10 % des atomes de ^{31}P sondés, a été identifiée dans la couche de surface de structure désordonnée.

Tableau IV-26 : Récapitulatif des caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts de CaP obtenus par sono-électrodéposition.

d (mA/g)	Régime d'électrolyse	Gain de masse (%)	Epaisseur moyenne	Recouvrement	Morphologie	Caractéristiques des dépôts		
						Composition chimique	Organisation	cristallinité relative
25	Lent	3	< 100 nm	Hétérogène ++	Plaquettes / Feuilletts uniquement	CaD-HAP carbonatée majoritaire + OCP < 10 % at. minoritaire	CaD-HAP carbonatée: Cœur apatitique ordonné riche en ions hydroxyles et Surface désordonnée hydratée avec des ions hydrogénophosphates	CaD-HAP nanocristalline ordonnée -
50		7		Hétérogène +				et OCP désordonné
75	Intermédiaire	7	250 - 600 nm	Homogène	Plaquettes / Feuilletts + Aiguilles (quelques centaines de nm), Oursins (~ 250 nm)	CaD-HAP carbonatée		CaD-HAP nanocristalline ordonnée
100	Rapide	10	600 nm - 2 µm	Hétérogène +	uniquement Aiguilles (~ 100 nm), Oursins (~ 1,5 µm)	CaD-HAP carbonatée		CaD-HAP nanocristalline ordonnée ⊕
270		10		Hétérogène ++	Aiguilles (quelques centaines de nm), Oursins (~ 250 nm)	CaD-HAP carbonatée + CaCO ₃ Calcite		et CaCO ₃

La MET a permis d'identifier, pour des densités de courant ≥ 75 mA/g, que la croissance de la phase de CaD-HAP s'organise sous forme d'aiguilles composées d'une multitude de cristallites s'empilant selon l'axe des aiguilles, mais orientés aléatoirement les uns par rapport aux autres. Pour des densités de courant < 75 mA/g, l'instabilité des plaquettes / feuillets sous le faisceau d'électrons n'a pas permis d'observer si elles étaient aussi polycristallines. Cette instabilité résulte de la présence de plus grande quantité de phase désordonnée et hydratée en surface des dépôts de CaD-HAP.

Suite à cette synthèse des principaux résultats concernant les caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts, les mécanismes réactionnels intervenant lors de la sono-électrodéposition vont être discutés, permettant ainsi de mieux comprendre et d'expliquer les corrélations entre les différentes phases constituant les dépôts et les mécanismes réactionnels mis en œuvre lors de la synthèse électrochimique.

2. Les mécanismes réactionnels liés à la sono-électrodéposition.

La Figure IV-80 présente un schéma récapitulatif des processus mis en œuvre lors de la sono-électrodéposition. Ces processus sont répartis en deux familles de réactions :

- D'une part, les réactions d'électrolyse des différentes espèces présentes dans l'électrolyte et dont les régimes vont dépendre de la densité de courant appliquée.
- D'autre part, les réactions de type acido-basique qui sont les conséquences directes des réactions d'électrolyse et qui sont responsables de la précipitation du dépôt de CaP.

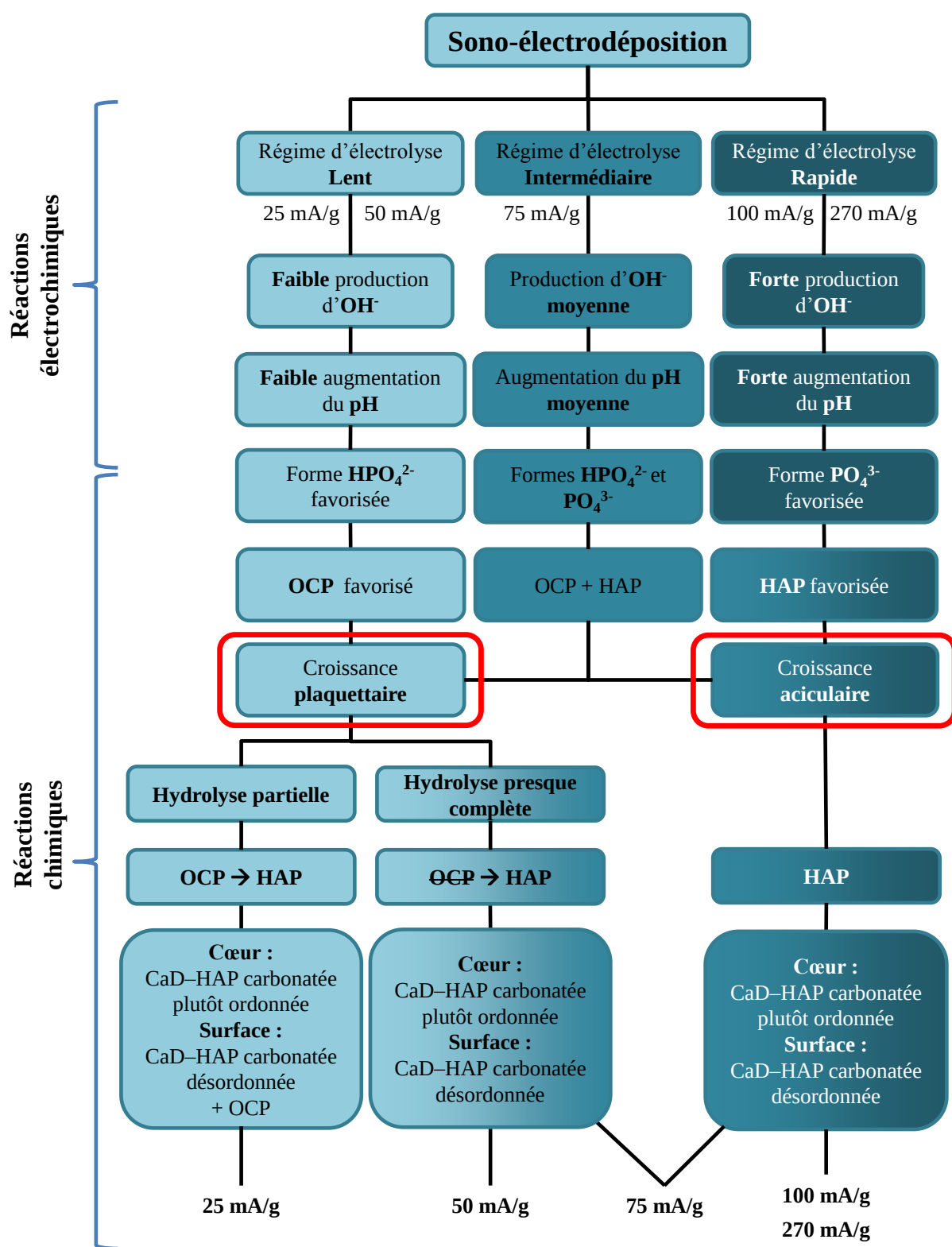


Figure IV-80 : Schéma récapitulatif des mécanismes réactionnels liés à la sono-électrodéposition en fonction du régime d'électrolyse.

La Figure IV-81 présente l'évolution des potentiels mesurés sur l'électrode de travail (le TFC) au cours de la sono-électrodéposition en fonction de la densité de courant appliquée.

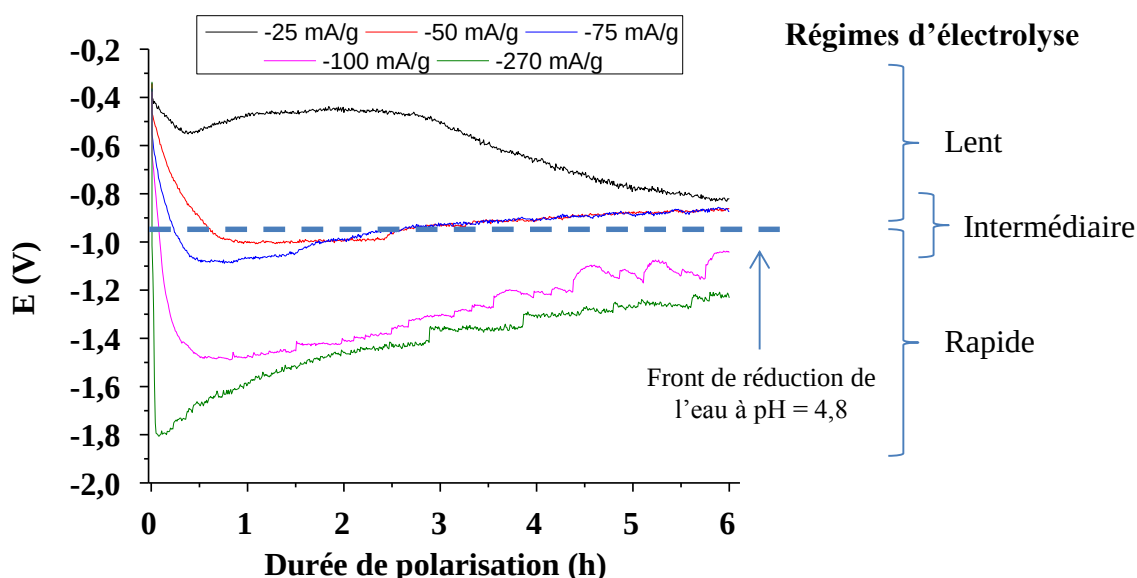


Figure IV-81 : Courbes $E = f(t)$ lors de la sono-électrodéposition conduisant au dépôt de CaP sur le TFC KIP1200 pour des densités de courant comprises entre 25 mA/g et 270 mA/g. La chute ohmique a été soustraite.

En ce qui concerne l'allure des courbes potentiel/temps, on observe, pour des densités de courant allant de 50 à 270 mA/g, une forte augmentation (en valeur absolue) du potentiel dans les premières étapes de la synthèse jusqu'à atteindre un seuil maximum. Les valeurs potentiel/temps de ce maximum dépendent de la densité de courant appliquée : plus la densité de courant est importante et plus le potentiel maximum sera élevé et atteint rapidement. Cette partie des courbes est attribuée au chargement de la double-couche électronique avec la mise en place des réactions électrochimiques et une augmentation de la résistance de l'électrode. Dans un second temps, lorsque la durée de polarisation augmente, le potentiel diminue car la résistance de l'électrode diminue. Ceci est probablement dû aux réactions d'électrolyse, en particulier celle de l'eau, qui conduisent à la formation de porteurs de charges, augmentant ainsi la conductivité globale de l'électrolyte et donc, diminuant la résistance du système. En particulier, la production de protons à la contre-électrode accentue cet effet. Pour une densité de courant de 25 mA/g, le premier maximum est observé après 20 mn de polarisation. Par la suite, on constate une diminution puis une nouvelle augmentation du potentiel. Notre interprétation est que cette courbe permet de visualiser les régimes d'électrolyse de différentes espèces, autres que l'eau, présentes dans le milieu électrolytique.

Pour les plus fortes densités de courant, les différents régimes d'électrolyse des espèces en solution sont trop rapides pour qu'ils puissent être observés sur les courbes. Une étude galvano / potentiodynamique permettrait de déterminer les réactions électrochimiques qui ont alors lieu.

En ce qui concerne le pH initial de l'électrolyte, il est de 4,8 à 23°C. A ce pH, le potentiel de réduction de l'eau est de -0,94 V et l'espèce phosphatée prédominante dans l'électrolyte est constituée des ions H_2PO_4^- (Figure IV-82). Les réactions mises en jeu au cours de la sono-électrodéposition vont dépendre des régimes d'électrolyse.

2.1. Mécanisme de formation du dépôt de CaP à régime d'électrolyse rapide

Pour des densités de courant de 100 et 270 mA/g, les potentiels mesurés sont plus élevés (en valeur absolue) que le potentiel de la réduction de l'eau. La réaction de réduction de l'eau va produire des ions hydroxydes qui vont localement augmenter le pH dans la porosité et à proximité directe du tissu de fibres de carbone selon la réaction :

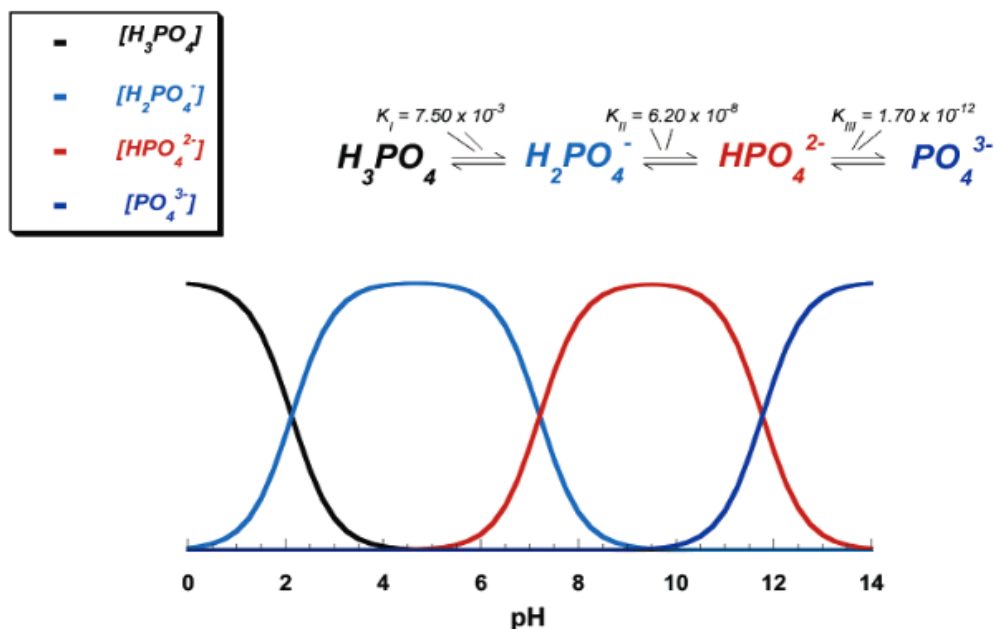
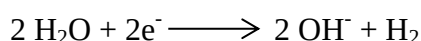
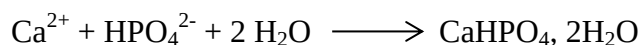


Figure IV-82 : Variation du pH en fonction des concentrations ioniques en équilibre triprotique pour l'acide phosphorique en solution. [1]

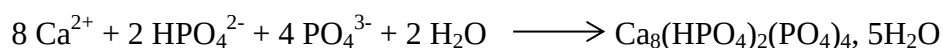
Lorsque le pH devient supérieur à environ 5,5, la formation des ions HPO_4^{2-} va permettre le début de la précipitation d'une phase phosphocalcique :

- Brushite :



Lorsque le pH dépasse environ 9,5, l'apparition des ions PO_4^{3-} peut permettre la formation d'autres phases :

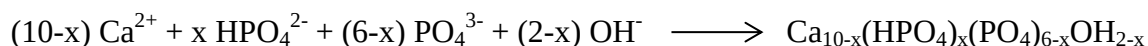
- Phosphate octocalcique :



- Hydroxyapatite stœchiométrique :



- Apatite déficitaire en calcium :



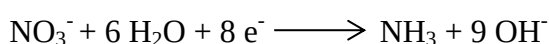
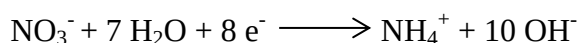
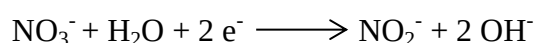
Cependant, il n'est pas reporté dans la littérature l'obtention d'HAP stœchiométrique par cette méthode, sans la réalisation d'un traitement thermique post-dépôt. En effet, les caractérisations par IRTF, DRX et RMN MAS indiquent que, pour des densités de courant de 100 et 270 mA/g, les dépôts consistent en de l'HAP déficitaire en calcium. La coexistence des ions phosphate et hydrogénophosphate conduit à ce que l'HAP déposée soit déficitaire en calcium. En effet, si des ions HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} remplacent des ions PO_4^{3-} dans la structure apatitique, la perte de charges négatives doit être compensée par la perte de charges positives sous forme d'ions Ca^{2+} afin de respecter l'électroneutralité de la structure. L'absence d'OCP s'explique par le régime rapide d'électrolyse de l'eau : la forte production d'ions hydroxyle entraîne une hausse rapide et importante du pH qui favorise l'existence des ions PO_4^{3-} et donc la précipitation de la CaD-HAP. Les aiguilles observées en MET lors d'un régime rapide d'électrolyse sont caractéristiques de la croissance de l'HAP qui cristallise dans le système hexagonal ($\text{P6}_3/\text{m}$).

Remarque : ce raisonnement prend en compte uniquement le potentiel de réduction de l'eau pour un pH initial de l'électrolyte de 4,8. Il est évident qu'au cours de la synthèse, le pH local près de l'électrode de travail va augmenter, déplaçant ainsi la barrière de réduction de l'eau vers de plus faibles potentiels tels que -1,49 V pour un pH de 14. En contrepartie, l'oxydation de l'eau sur la contre-électrode conduit à une diminution du pH global de l'électrolyte. Dans la mesure où il est impossible de déterminer le pH exact à proximité directe du tissu de fibres de carbone, le potentiel de

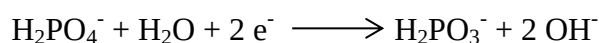
-0,95 V de réduction de l'eau est la limite supérieure. En réalité, ce potentiel diminuera au cours de l'électrodéposition rendant l'électrolyse de l'eau d'autant plus difficile.

De plus, Drevet et Eliaz *et al.* [2, 3] indiquent que la réduction des ions de type nitrate, dihydrogénophosphate, ou encore du dioxygène dissous peut entraîner une augmentation locale du pH selon les réactions suivantes :

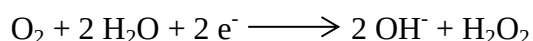
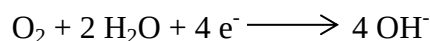
- Réactions de réduction des ions nitrate :



- Réaction de réduction des ions dihydrogénophosphate :



- Réactions de réduction du dioxygène dissous dans l'électrolyte :



Seulement, les auteurs précisent que, dans la mesure où la concentration de ces espèces dans l'électrolyte est faible, l'électrolyse de l'eau est la réaction prépondérante de formation des OH^- .

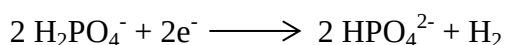
Pour les plus grandes densités de courant, le mécanisme de dépôt se résume à la réaction dominante de l'électrolyse de l'eau qui entraîne la précipitation directe de la CaD-HAP carbonatée déficiente en calcium de morphologie aciculaire.

Cependant, ce mécanisme ne peut pas expliquer l'obtention de la CaD-HAP carbonatée de morphologie plaquettaire. Pour les plus faibles densités de courant, c'est un autre mécanisme qui intervient.

2.2. Mécanisme de formation du dépôt de CaP à régime d'électrolyse lent.

2.2.1. Electrolyse du milieu électrolytique.

Pour une densité de courant de 25 mA/g, le potentiel de réduction de l'eau n'est jamais atteint. Pour une densité de courant de 50 mA/g, il n'est atteint que durant les trois premières heures de l'électrosynthèse (Figure IV-81). Or, les caractérisations physico-chimiques et structurales montrent la présence de CaD-HAP pour chacun de ces dépôts, avec de plus la présence d'OCP pour une densité de courant de 25 mA/g. Cela signifie que pour les plus faibles densités de courant, la réduction d'autres espèces présentes dans l'électrolyte va permettre la précipitation de phases de CaP. Abdel-Aal et *al.* [4] expliquent que pour des potentiels inférieurs à + 0,056 V, sous l'action d'un champ électrique, la réaction suivante a lieu :



2.2.2. Précipitation de l'OCP.

La formation des ions hydrogénophosphate permettrait la précipitation de la brushite sans augmentation du pH. Cependant, contrairement aux résultats obtenus par Abdel-Aal et *al.* [4] lors de l'électrodéposition de CaP sur une surface de titane, la brushite n'est pas observée dans les dépôts obtenus sur les tissus de fibres de carbone. En effet, la spectroscopie IRTF et la DRX mettent en évidence uniquement l'existence d'OCP en plus d'une CaD-HAP carbonatée. Ceci peut être expliqué par :

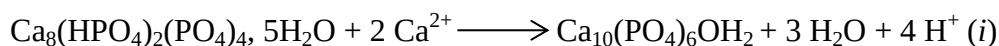
- D'une part, la différence de solubilité de ces deux phases. L'OCP (pKs = 96,6 à 25°C [5]) étant plus insoluble que le DCPD (pKs = 6,59 à 25 °C [5]), il précipitera préférentiellement.
- D'autre part le domaine de stabilité de pH du DCPD est situé entre 2,0 et 6,0 à 25 °C [5] tandis que celui de l'OCP est compris entre 5,5 et 7,0 à 25 °C [5]. Ceci signifie qu'au voisinage du tissu de carbone, le pH plus basique que dans le reste de l'électrolyte favorise la précipitation de l'OCP.

De plus, les morphologies plaquettaires observées par MEB et MET sont en accord avec le mode de cristallisation et de croissance de l'OCP qui cristallise dans le système triclinique [6].

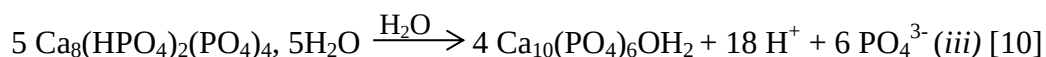
2.2.3. Hydrolyse de l'OCP en CaD-HAP.

Quant à la technique de spectroscopie RMN MAS, elle indique que, pour des dépôts obtenus à des densités de courant de 25 et 50 mA/g, la phase principale consiste en une CaD-HAP carbonatée. Han *et al.* [7] ont étudié l'influence de la densité de courant sur la morphologie et la composition chimique des dépôts de CaP sur des TFC. Les auteurs obtiennent sensiblement les mêmes résultats que dans notre étude. Ils attribuent la morphologie plaquettaire à la transition OCP → HAP sans toutefois préciser les mécanismes.

Xin *et al.* [8] ont étudié la transition OCP → HAP par MET et expliquent que le premier mécanisme (i) qui consiste en un processus de dissolution / re-précipitation est possible uniquement avec un apport d'ions calcium issus d'une solution, tandis que le second mécanisme (ii) consiste en une transition à l'état solide. Dans leur étude, les auteurs utilisent le faisceau d'électrons afin d'observer cette transition à l'état solide. Dans le cas de l'électrodéposition, le premier mécanisme pourrait justifier la transition de phase en raison de la présence de Ca^{2+} dans le milieu électrolytique.



Toutefois, il existe une autre possibilité de transition de l'OCP vers l'HAP. En effet, Brown *et al.* [6] ont étudié cette transition et un des mécanismes proposés est l'hydrolyse de l'OCP. Les auteurs précisent que l'OCP s'hydrolyse facilement en HAP, d'autant plus à des températures de l'ordre de 50°C. Or notre système étant placé dans un bain à ultrasons, les ondes mécaniques entraînent une élévation de la température de l'électrolyte jusqu'à 40 °C ce qui favoriserait l'hydrolyse de l'OCP. Graham et Brown [9] ont proposé deux réactions d'hydrolyse : soit l'OCP est hydrolysé en présence de phosphate tétracalcique et d'hydroxyde de calcium dans des proportions stœchiométriques, soit l'OCP subit une hydrolyse directe :



Cette dernière réaction (iii) est celle qui semble le mieux expliquer les résultats observés au cours de notre étude.

Arellano-Jiménez *et al.* [10] ont étudié par microscopie électronique l'hydrolyse de particules d'OCP obtenues par co-précipitation et ont mis en évidence que les grains d'HAP

apparaissent au sein même des particules d'OCP. Ce remodelage interne de l'OCP vers de l'HAP, qui permet de conserver la morphologie plaquettaire, est possible grâce aux similitudes structurales entre ces deux phases. Le Tableau IV-27 donne les paramètres de maille de ces deux phases.

Tableau IV-27 : Paramètres de maille de l'HAP (système hexagonal) et de l'OCP (système triclinique).

	a (Å)	b (Å)	c (Å)	JCPDS
HAP	9,424	9,424	6,879	74-0566
OCP	19,69	9,523	6,835	79-0423

Trois relations d'épitaxies possibles ont été décrites dans la littérature. Brown [11] propose que le paramètre a (ou b) de l'HAP est associé au paramètre b de l'OCP avec un angle entre a_{HAP} et a_{OCP} de 167° . Fernández *et al.* [12] proposent aussi une relation d'épitaxie entre a_{HAP} et b_{OCP} mais avec un angle de 131° entre a_{HAP} et a_{OCP} . Enfin, Xin [8] propose une association entre les paramètres a_{HAP} et a_{OCP} avec un angle de 128° entre a_{HAP} et b_{OCP} . Cependant, Brown *et al.* [6] soulignent que la réorganisation de la maille cristalline, par la perte de molécules d'eau, d'ions phosphate et éventuellement d'ions calcium, peut entraîner l'apparition de défauts où se retrouvent des ions étrangers tels que les ions carbonate, entraînant ainsi une diminution de la cristallinité des dépôts. Les caractérisations de nos échantillons ont montré que la CaD-HAP carbonatée ainsi que l'OCP présentent tous deux un désordre structural plus ou moins prononcé. Ceci est cohérent avec l'apparition de défauts de structure lors de la réorganisation de la maille cristalline au cours de l'hydrolyse de l'OCP en HAP.

En général, le degré d'avancement de la réaction $\text{OCP} \rightarrow \text{HAP}$ est relié à la durée de l'hydrolyse [6, 9, 10]. Or, au cours de notre étude, la durée de polarisation (6h) est identique quelle que soit la densité de courant appliquée. Pour une densité de courant de 25 mA/g, la présence d'OCP de structure désordonnée, identifiée par IRTF et DRX et quantifiée par RMN-MAS, indique que l'hydrolyse est incomplète. Pour une densité de courant de 50 mA/g, la proportion d'OCP n'est plus suffisamment importante pour pouvoir être détectée, ce qui indique un degré d'avancement de l'hydrolyse plus important que pour une densité de courant de 25 mA/g. Ainsi, dans les processus de sono-électrodéposition de CaP, pour des régimes d'électrolyse lents, le degré d'avancement de l'hydrolyse de l'OCP est d'autant plus important que la densité de courant appliquée est élevée. Ceci est dû à un effet cinétique avec une augmentation plus rapide du pH à une densité de courant de 50 mA/g qui favorise l'existence des ions PO_4^{3-} aux dépens des ions HPO_4^{2-} et qui par conséquent, accélère la réaction d'hydrolyse de l'OCP en CaD-HAP.

Ainsi, pour les plus faibles densités de courant, la formation du dépôt de CaP se fait par l'électrolyse d'espèces ioniques autres que l'eau (H_2PO_4^- , etc) qui entraîne la précipitation d'une phase d'OCP plaquettaire. Cette dernière subit une transformation en CaD-HAP par hydrolyse qui permet aux particules de CaD-HAP de conserver la forme plaquettaire (feuillets) originelle des particules d'OCP.

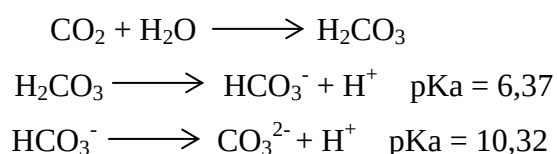
2.3. Régime d'électrolyse intermédiaire.

Pour une densité de courant de 75 mA/g, l'observation simultanée des deux morphologies (plaquettaire et aciculaire) peut être expliquée par une vitesse d'augmentation du pH modérée. Dans un premier temps, les ions HPO_4^{2-} sont la forme dominante des espèces phosphatées, d'où la précipitation d'OCP sous forme de plaquettes. Il s'ensuit leur hydrolyse pour donner de la CaD-HAP carbonatée. Dans un second temps, le pH est suffisamment élevé pour permettre la précipitation directe d'une CaD-HAP aciculaire.

Pour une densité de courant intermédiaire, on observe la coexistence des deux mécanismes de précipitation de la CaD-HAP carbonatée : celui de la précipitation directe de la CaD-HAP carbonatée aciculaire décrit pour les densités de courant élevées et celui de l'hydrolyse d'OCP plaquettaire issu de la précipitation obtenue à de faibles densités de courant.

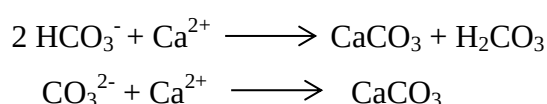
2.4. Origine et influence des carbonates.

Pour l'ensemble des dépôts, on observe que la CaD-HAP est carbonatée. La présence de CO_2 dissous dans l'électrolyte peut, grâce à une élévation de la température, dégazer et réagir avec l'eau pour former au final des ions carbonate [2] :



La formation d'ions carbonate est d'autant plus importante que la densité de courant est élevée. En effet, la forte augmentation du pH au niveau de l'électrode de travail (le TFC) favorise l'existence de la forme la plus basique de l'acide carbonique.

Les carbonates peuvent alors participer aux réactions de précipitation en s'intégrant aux dépôts de CaP par substitution ou encore en formant des carbonates de calcium [2] :



La précipitation de la calcite a été mise en évidence par DRX pour le dépôt obtenu à une densité de courant de 270 mA/g. Barrère *et al.* [13] ont étudié la précipitation de dépôts biomimétiques par immersion d'un substrat du type $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ dans du SBF. Ils ont en particulier étudié l'influence des ions HCO_3^- et CO_3^{2-} sur la composition chimique du dépôt. Tandis que les ions hydrogénocarbonate favorisent l'obtention d'HAP carbonatée de type B (PO_4^{3-} substitués), les ions carbonate limitent la croissance des particules.

Iijima *et al.* [14] indiquent que, dans le cas de la précipitation d'OCP, la présence d'ions carbonate conduit à la diminution des dimensions des plaquettes d'OCP, y compris de leur épaisseur, jusqu'à l'obtention d'agrégats de pétales d'OCP. Cette morphologie particulière est retrouvée pour les dépôts obtenus à des densités de courant de 25 et 50 mA/g. Bien que ces études aient été réalisées par précipitation biomimétique, le SBF reste une solution diluée de différents ions, notamment phosphate et calcium, dont les concentrations sont de l'ordre de celles de l'électrolyte utilisé lors de la sono-électrodéposition du CaP sur les TFC.

Une étude complémentaire est actuellement en cours de réalisation afin de déterminer l'influence de la concentration en ions carbonate sur la composition chimique et la morphologie des dépôts en fonction de la densité de courant appliquée.

3. Origine de la surface hydratée et de structure désordonnée.

La spectroscopie RMN a montré qu'il existe une surface de structure désordonnée et hydratée de CaD-HAP carbonatée à la surface d'un cœur de structure plus ordonnée constitué d'une CaD-HAP carbonatée et ceci quelque ce soit la morphologie des dépôts. Deux scénarios peuvent expliquer l'origine de cette surface.

➔ *La surface de structure désordonnée est issue d'une zone sursaturée à la surface des particules.*

Dans cette hypothèse, la croissance cristalline des particules constitutives des dépôts s'effectue à partir de points de nucléation (Figure IV-83). Les ions, apportés par l'électrolyte sous l'influence du champ électrique, vont s'accumuler à la surface des particules dans une zone hydratée où la concentration est de plus en plus élevée. Quand la sursaturation est atteinte, les ions vont précipiter et former un gel colloïdal. Les particules colloïdales vont s'accumuler pour former les particules de CaD-HAP carbonatée. Ces précipités ont plutôt une structure ordonnée tandis que la zone de sursaturation à la surface a une structure plus désordonnée. Ce mécanisme global de la précipitation est influencé par le régime d'électrolyse :

- Régime d'électrolyse rapide (forte densité de courant) :

L'accumulation des ions, ainsi que l'électrolyse rapide de l'eau, vont induire une formation rapide et importante en volume de la zone sursaturée. Ainsi, à la surface des particules, la concentration ionique est élevée. Cette forte concentration favorise la nucléation au détriment de la croissance cristalline et donc l'existence d'une multitude de domaines cristallins de petites dimensions. En effet, pour une densité de courant de 270 mA/g, les images de HR-MET montrent que chaque aiguille est constituée d'une multitude de cristallites (cf Chapitre III). De plus, l'importance en volume de la zone sursaturée permet une précipitation conséquente des particules de CaP. Ceci se traduit par un gain de masse et une épaisseur de dépôt importants. Enfin, cette zone de sursaturation n'est pas homogène en terme de concentration et elle fluctue en volume : la limite de la zone sursaturée est plus ou moins proche de la surface de la particule. Ceci peut entraîner la précipitation des particules de CaP au sein même de l'électrolyte, à proximité de la surface de l'électrode, qui vont former les excroissances observées par MEB, pour les plus fortes densités de courant.

- Régime d'électrolyse lent (faible densité de courant) :

Dans ce cas, la formation de la couche sursaturée est lente et petite en volume. La concentration ionique dans cette couche y est plus faible que pour un régime d'électrolyse rapide, ce qui favorise la croissance au détriment de la nucléation. Ceci se traduit par la formation de particules de dimensions plus importantes que celles obtenues pour les régimes d'électrolyse les plus rapides. En effet, bien que les morphologies ne soient pas comparables, les plaquettes et les feuillets de CaP obtenus à des densités de courant de 25 et 50 mA/g ont de plus grandes dimensions (de 500 nm à plusieurs μm dans le plan des plaquettes/feuillets) que les aiguilles obtenues à des densités de courant de 100 et 270 mA/g (quelques centaines de nm maximum). Enfin, le plus faible volume de la zone de sursaturation existant aux faibles densités de courant, comparé à celui existant pour les plus fortes densités de courant, conduit à un gain de masse et une épaisseur du dépôt plus faibles que pour les régimes d'électrolyse rapides.

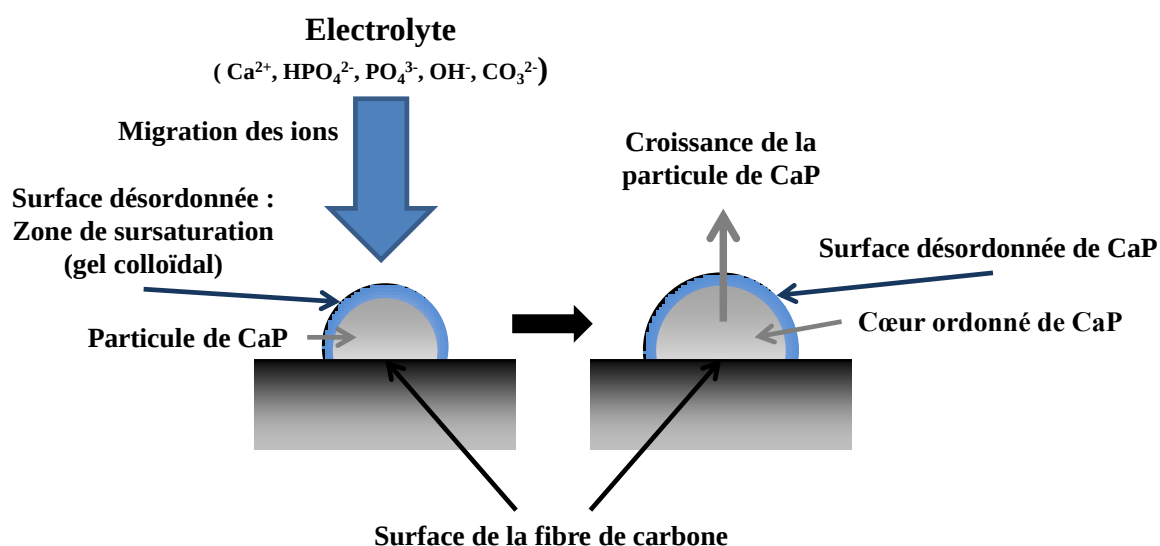


Figure IV-83 : Schéma de la croissance des dépôts de CaP à la surface d'une fibre de carbone.

En résumé, en plus de régir la morphologie, la structure et la composition chimique des dépôts, le régime d'électrolyse agit aussi sur les dimensions des particules et l'épaisseur des dépôts au travers de la zone de sursaturation :

Régime d'électrolyse **lent** → Lente formation de la **zone de sursaturation** de **concentration moyenne** et de **faible volume** → **croissance** favorisée → particules de CaP de **grandes dimensions** avec une **faible épaisseur** du dépôt.

Régime d'électrolyse **rapide** → **Rapide** formation de la **zone de sursaturation** de **concentration importante** et de **volume important** → **nucléation** favorisée → particules de CaP de **petites dimensions** avec une **grande épaisseur** du dépôt.

➔ ***La surface de structure désordonnée est due à une redissolution partielle du dépôt.***

Cette hypothèse s'appuie sur le fait qu'au cours de l'électrodéposition, le pH global de l'électrolyte diminue du fait de la production de protons lors de l'oxydation de l'eau sur la contre-électrode. Ainsi, à la fin de l'électrosynthèse, l'électrolyte acide en contact avec la surface des dépôts peut induire une redissolution partielle de la céramique, créant de fait une couche de structure désordonnée à la surface des dépôts (Figure IV-84).

De nouveau, pour les plus lents régimes d'électrolyse, le désordre peut aussi provenir de l'hydrolyse incomplète de l'OCP.

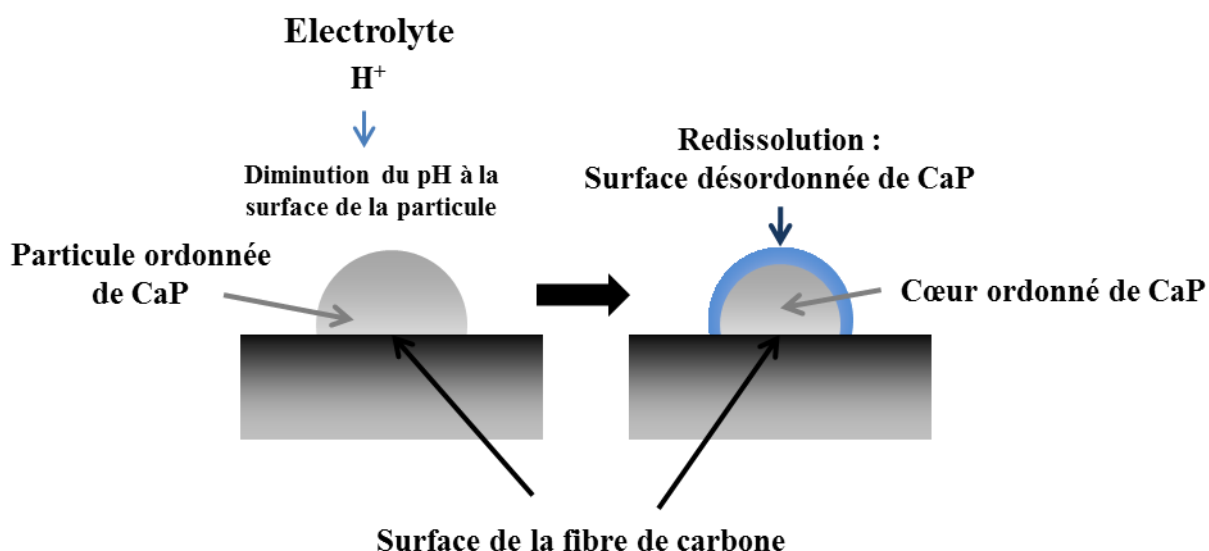


Figure IV-84 : Schéma de la redissolution de la surface d'une particule de CaP au contact des protons de l'électrolyte.

Il est aussi possible que l'existence de la couche de surface de structure désordonnée soit le fruit des deux phénomènes simultanés. Une expérience d'électrodéposition dans une cellule électrochimique compartimentée permettrait d'empêcher l'éventuelle redissolution du dépôt au contact des protons issus de l'oxydation de l'eau et ainsi d'observer s'il existe encore une couche de surface de structure désordonnée.

Des particules de CaD-HAP carbonatée qui possèdent une surface de structure désordonnée ont une solubilité plus importante que des particules d'HAP stœchiométrique. Ceci présente un avantage dans le cas de l'utilisation de ces particules dans le domaine orthopédique : une plus grande solubilité permet une plus grande interaction avec les fluides biologiques environnant, en particulier le sang. Les échanges ioniques entre ces fluides et les particules, associés à l'adsorption de protéines à la surface des dépôts de CaP, pourront faciliter les processus de la régénération osseuse.

4. Comportement des TFC avec et sans un revêtement de CaP au cours de tests de viabilité cellulaire

Han *et al.* [15] ont étudié la biocompatibilité par des tests de viabilité cellulaire MTS (similaire au XTT) d'un TFC recouvert d'un dépôt de CaP obtenu par électrodéposition. Les résultats montrent une meilleure biocompatibilité des tissus comprenant un dépôt de CaP. De plus, l'application d'ultrasons lors de la synthèse électrochimique améliore la viabilité cellulaire. Les auteurs attribuent ce phénomène à la modification de la morphologie et de la

composition chimique des dépôts obtenus par sono-électrochimie. Dans le cas d'un tissu de fibres de carbone avec dépôt de CaP obtenu par sono-électrodéposition, la viabilité cellulaire est similaire à celle du contrôle positif sur le substrat de référence (un matériau en polystyrène). Les auteurs soulignent aussi le fait que les résultats peuvent être biaisés par l'adsorption de constituants du milieu de culture nécessaire à la survie cellulaire dans les porosités des tissus de fibres de carbone. Ils en déduisent que la biocompatibilité de leurs biomatériaux est sous-évaluée. Il est à noter que, d'une part, les auteurs ne prennent pas en considération la composition chimique de surface de leurs tissus de fibres de carbone activées et que, d'autre part, les ostéoblastes utilisés dans leurs études sont du type MG63, qui est une lignée cancéreuse possédant une plus grande résistance au stress environnemental que les ostéoblastes humains primaires.

Nous avons mis en évidence que les tests au XTT peuvent induire des biais de mesures en raison de l'importante porosité des matériaux étudiés. La détermination de la viabilité cellulaire par mesure de la densité optique XTT (ou MTS) se révèle être peu adaptée pour l'étude de matériaux possédant une très grande surface spécifique, tels que les tissus de fibres de carbone activées.

Il est probable que la biocompatibilité des TFC dépende de la combinaison d'un ensemble de paramètres tels que la composition chimique de surface, la nanotexture des fibres de carbone ou encore de l'ensimage, plutôt que de chacun d'eux considéré individuellement. Il sera nécessaire de réaliser une étude approfondie sur différents tissus possédant des porosités et des compositions chimiques de surface différentes. Afin de discriminer la cytotoxicité de surface de la cytotoxicité à distance par relargage ou captation, il est important de comparer les résultats obtenus par différentes approches comme celles que nous avons utilisées, à savoir : test au XTT, microscopie électronique à balayage, microscopie optique et test de viabilité en fluorescence.

En perspective, il serait intéressant d'utiliser des inserts de culture, pour étudier la cytotoxicité des biomatériaux à distance en s'affranchissant de la cytotoxicité de contact. Il serait intéressant de doser le milieu de culture (facteurs de croissance, vitamines, calcium...) après différentes durées d'incubation afin de déterminer si la cytotoxicité à distance serait due à la captation ou au relargage d'éléments bénéfiques ou nuisibles à la survie cellulaire.

5. Apport de la sono-électrodéposition sur le recouvrement de biomatériaux par un phosphate de calcium

Cette étude a permis de mettre en évidence que la sono-électrodéposition est une méthode de synthèse permettant de synthétiser une grande variété de dépôts en termes de morphologies, microtextures, structures et composition chimique.

Ainsi, le régime d'électrolyse, régi par la densité de courant, permet d'obtenir des dépôts soit de morphologie aciculaire pour les régimes d'électrolyse les plus rapides, soit de morphologie plaquettaire pour les régimes d'électrolyse les plus lents. Pour cette dernière morphologie, la précipitation d'une phase d'OCP plaquettaire, puis sa transformation en HAP par hydrolyse est un des mécanismes proposé comme étant responsable de la biominéralisation naturelle des os et des dents [6, 16]. Hormis l'étape d'électrolyse, la sono-électrodéposition réalisée à de faibles densités de courant suit ce mécanisme, attestant que le dépôt élaboré dans ces conditions de synthèse est biomimétique.

De plus, contrairement aux techniques de synthèse en température, les procédés de chimie douce, que sont les précipitations en milieu aqueux et dont fait partie la synthèse électrochimique, permettent d'obtenir des revêtements de CaD-HAP plus solubles que l'HAP stœchiométrique de par l'existence d'une couche de surface hydratée de structure désordonnée. Ceci, allié à la très haute porosité des tissus de fibres de carbone, augmente les interactions entre les revêtements de CaP et les fluides biologiques [17]. Ce travail montre aussi que la précipitation de CaP assistée par un processus électrochimique permet de recouvrir des substrats avec des géométries complexes.

Il est aussi possible d'incorporer par méthode électrochimique des ions d'intérêts biologiques, tels que l'argent, le strontium ou le gallium, afin d'améliorer et d'adapter le biomatériau au rôle qui lui est dévolu : l'argent sert d'antiseptique [18], tandis que le strontium est un inhibiteur de l'activité ostéoclastique, il est utilisé notamment dans le traitement de l'ostéoporose [19].

L'électrodéposition est une méthode de synthèse déjà amplement employée afin de recouvrir des substrats métalliques [3, 4]. Le but est d'améliorer l'ostéointégration des prothèses et des implants. Les biomatériaux hybrides CaP/TFC, de par leur souplesse, sont des matériaux supports de la régénération osseuse qui pourront être utilisés de manière polyvalente dans le

corps humain. Ils pourront servir aussi bien de pansement osseux que de matériaux de comblement dans le cas d'un défaut critique de l'os.

Références

1. Lynn AK, Bonfield W. *A Novel Method for the Simultaneous, Titrant-Free Control of pH and Calcium Phosphate*. Mass Yield. Acc Chem Res. 1 mars 2005;38(3):202-7.
2. Drevet R. *Élaboration de nouveaux revêtements prothétiques phosphocalciques par électrodéposition.: caractérisation physico-chimique et structurale*. Reims; 2011 <http://www.theses.fr/2011REIMS011>
3. Eliaz N, Kopelovitch W, Burstein L, Kobayashi E, Hanawa T. *Electrochemical processes of nucleation and growth of calcium phosphate on titanium supported by real-time quartz crystal microbalance measurements and X-ray photoelectron spectroscopy analysis*. J Biomed Mater Res A. 2009;89A(1):270-80.
4. Abdel-Aal EA, Dietrich D, Steinhäuser S, Wielage B. *Electrocrystallization of nanocrystallite calcium phosphate coatings on titanium substrate at different current densities*. Surf Coat Technol. 15 août 2008;202(24):5895-900.
5. Dorozhkin SV. *Amorphous calcium (ortho)phosphates*. Acta Biomater. déc 2010;6(12):4457-75.
6. Brown WE, Smith JP, Lehr JR, Frazier AW. *Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystallographic and Chemical Relations between Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite*. Nature. 15 déc 1962;196(4859):1050-5.
7. Han HM, Phillips GJ, Mikhalevsky SV, FitzGerald S, Lloyd AW. *Sonoelectrochemical deposition of calcium phosphates on carbon materials: effect of current density*. J Mater Sci Mater Med. 1 avr 2008;19(4):1787-91.
8. Xin R, Leng Y, Wang N. *In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation*. J Cryst Growth. 15 mars 2006;289(1):339-44.
9. Graham S, Brown PW. *Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite*. J Cryst Growth. 2 juill 1996;165(1-2):106-15.
10. Arellano-Jiménez MJ, García-García R, Reyes-Gasga J. *Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction*. J Phys Chem Solids. févr 2009;70(2):390-5.
11. Brown WE. *Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystal Structure of Octacalcium Phosphate*. Nature. 15 déc 1962;196(4859):1048-50.
12. Fernandez ME, Zorilla-Cangas C, Garcia-Garcia R, Ascencio JA, Reyes-Gasga J. *New model for the hydroxyapatite-octacalcium phosphate interface*. Acta Crystallogr B Struct Sci. cover date 2003;59(2):175-81.

13. Barrère F, Layrolle P, van Blitterswijk CA, de Groot K. *Biomimetic calcium phosphate coatings on Ti6Al4V: a crystal growth study of octacalcium phosphate and inhibition by Mg^{2+} and HCO_3^-* . Bone. août 1999;25(2, Supplement 1):107S - 111S.
14. Iijima M, Kamemizu H, Wakamatsu N, Goto T, Doi Y, Moriwaki Y. *Effects of CO_3^{2-} ion on the formation of octacalcium phosphate at pH 7.4 and 37°C*. J Cryst Growth. janv 1994;135(1-2):229-34.
15. HAN H, Mikhalovsky SV, Phillips GJ, Lloyd AW. *Calcium phosphate sonoelectrodeposition on carbon fabrics and its effect on osteoblast cell viability in vitro*. New Carbon Mater. juin 2007;22(2):121-5.
16. Brown WE, Eidelman N, Tomazic. *Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation*. Adv Dent Res. 15 déc 1987;1(2):306.
17. Mavropoulos E, Rossi AM, da Rocha NCC, Soares GA, Moreira JC, Moure GT. *Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions*. Braz Mater Res Soc Symp Curr Trends Nanostructured Mater Semicond Mater Thin Films Biomater. mars 2003;50(2-3):203-7.
18. Jelinek M, Kocourek T, Remsa J, Weiserová M, Jurek K, Mikšovský J, et al. *Antibacterial, cytotoxicity and physical properties of laser — Silver doped hydroxyapatite layers*. Mater Sci Eng C. 1 avr 2013;33(3):1242-6.
19. Busse B, Jobke B, Hahn M, Priemel M, Niecke M, Seitz S, et al. *Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure*. Acta Biomater. déc 2010;6(12):4513-21.

Chapitre V

Perspectives

Sommaire du chapitre V

_Toc434849547

1. Etude des propriétés mécaniques des biomatériaux hybrides TFC / CaP	188
1.1. Principe général du test de flexion	188
1.2. Méthodologie du test de flexion	189
2. Elaboration de revêtements de CaP par pulvérisation thermique	191
2.1. Dispositif et principe de la technique « Spray Pyrolysis »	191
2.2. Résultats des expériences préliminaires	194
3. Incorporation du strontium dans le dépôt de CaP	196
3.1. Paramètres expérimentaux	197
3.2. Résultats	197
3.2.1. Influence de l'incorporation de strontium sur la morphologie des dépôts	197
3.2.2. Détermination des rapports atomiques Ca/P et Ca + Sr/P en fonction des densités de courant.....	198
Références	200

4. Etude des propriétés mécaniques des biomatériaux hybrides TFC / CaP

Ces tests préliminaires ont pour vocation de mettre en place des outils de caractérisations des propriétés mécaniques de nos matériaux. Les deux principales propriétés que nous voulons étudier sont l'adhérence du dépôt de CaP à la surface des TFC ainsi que la flexibilité du biomatériau hybride TFC / CaP.

Pour étudier l'adhérence du dépôt, la réalisation de tests de nano-indentation assisté par MEB sont prévus au LMR de Tours. En ce qui concerne la caractérisation de la flexibilité du TFC avec et sans dépôt, l'architecture des tissus, ainsi que les petites dimensions de nos échantillons (2 cm x 3 cm) imposées par la géométrie de la cellule électrochimique, font que les tests mécaniques conventionnels (test en flexion 3 points,...) sont inadaptés pour l'étude de ce type de biomatériau.

Cependant, en s'appuyant sur les tests mécaniques existant dans l'industrie du textile, un nouveau test de flexion est en cours d'adaptation pour l'étude de nos biomatériaux. Ci-après sont présentés le principe de ce test de flexion, ainsi que le protocole expérimental, et les premiers résultats obtenus.

4.1. Principe général du test de flexion

Ce test, réalisé en collaboration avec le LMR de Tours et l'INSA de Lyon, repose sur la mesure de la flexion du tissu lorsque qu'il est accroché à un support.

Une partie de l'échantillon est fixé au support, tandis que le reste du tissu se fléchit dans le vide sous l'effet de la gravité. Sous l'action de son propre poids, ou d'une contrainte apportée par l'ajout d'une masse, le tissu se fléchit (Figure V-85). Après un traitement informatique des images enregistrées, la valeur de la courbure du tissu est reliée à la flexibilité du TFC.

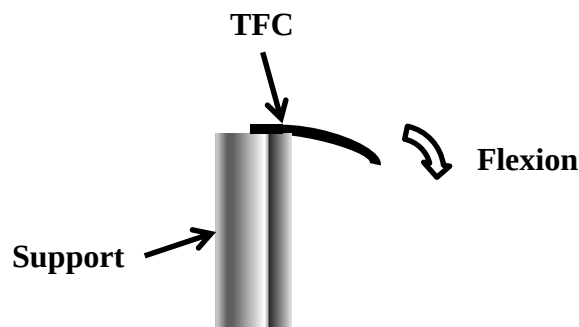


Figure V-85: Schéma du principe du test de flexion sur les TFC.

4.2. Méthodologie du test de flexion

La Figure V-86 est une photo du système de flexion adapté pour les TFC. Le tissu est fixé sur un support métallique, puis, un poids est éventuellement attaché au tissu au moyen d'un fil de nylon. Le but de ce poids, de masse connue, est d'ajouter une contrainte qui va accentuer le rayon de courbure du tissu afin de faciliter la mesure de la résistance à la flexion. Les premiers tests ont montré que les échantillons de TFC ont une longueur trop petite pour que l'on puisse observer une flexion notable sans l'ajout d'un poids supplémentaire. Lors des tests de flexion, une poudre blanche est saupoudrée sur le tissu afin de bien mettre en évidence les bords et arêtes du TFC.

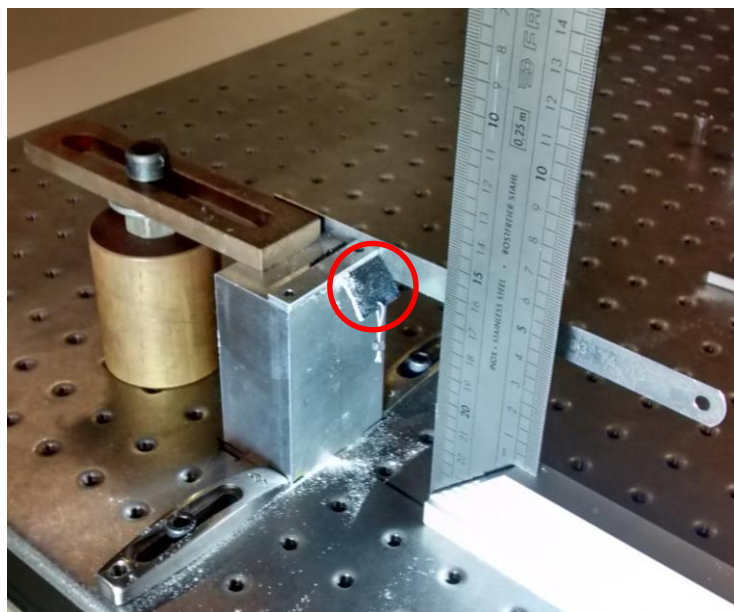


Figure V-86 : Photographie du système de flexion. Le TFC est au centre du cercle rouge.

Une caméra enregistre une photographie du bord du tissu bien visualisé grâce à la poudre blanche. Un traitement de l'image est ensuite réalisé afin d'en déduire le moment de flexion du tissu. Deux logiciels sont utilisés pour traiter l'image :

Traitement de l'image sous Image J :

À partir de la photographie, le contour du tissu est surligné, puis les coordonnées x et y du squelette sont extraites (Figure V-87).

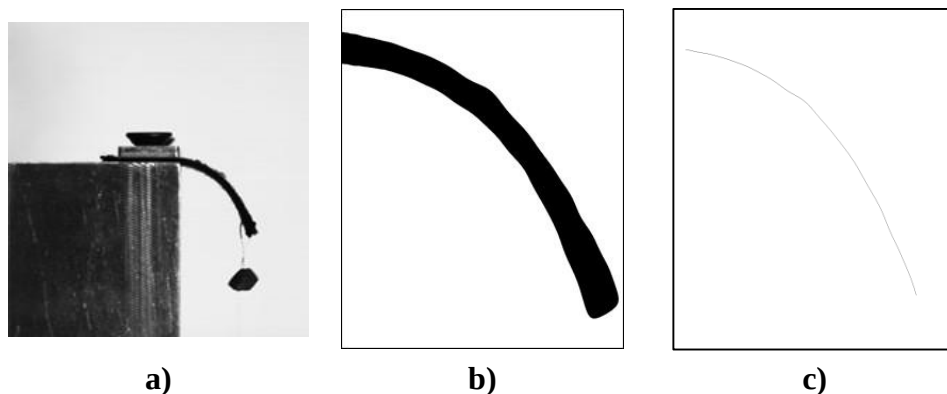


Figure V-87 : Exemple du traitement de l'image du TFC KIP1200, par le logiciel Image J, lors du test en flexion. a) Photographie du TFC, b) Contour du TFC, c) Squelette du TFC.

Traitement sous MatLab :

Ce traitement est réalisé à partir de programmes mis au point par Liang Biao de l'INSA de Lyon.

La première étape consiste à obtenir le fit du profil du tissu. A partir de ce fit, la courbure du TFC est calculée. Enfin, le moment de flexion est calculé à partir du rayon de courbure.

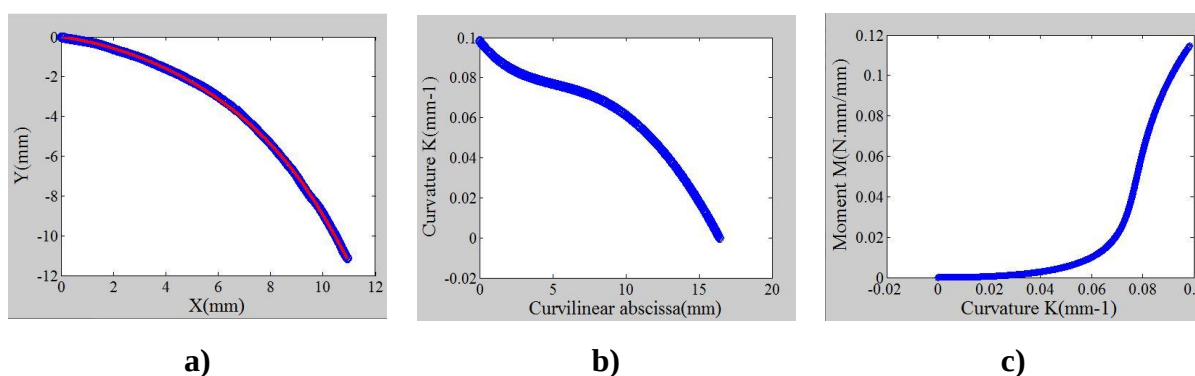


Figure V-88 : Exemple de détermination du moment de flexion du TFC KIP1200 au moyen du logiciel MatLab. a) Fit de l'inflexion du TFC, b) Calcul de la courbure du TFC, c) Calcul du moment de flexion du TFC.

Le moment de flexion est alors relié à la propriété de flexibilité du TFC.

Les TFC avec et sans dépôt de CaP sont en cours de caractérisation avec ce dispositif. Ces tests permettront de déterminer si, d'une part, ce test de flexion est bien adapté pour nos

biomatériaux et si, d'autre part, il existe une différence notable de flexibilité des matériaux hybrides TFC / CaP suivant les phases de CaP déposées.

5. Elaboration de revêtements de CaP par pulvérisation thermique

Ce paragraphe présente l'étude préliminaire mise en œuvre sur la formation de dépôts de CaP à la surface de TFC par pulvérisation thermique. Dans un premier temps, le dispositif expérimental est présenté et le mécanisme de la pulvérisation thermique décrit, avant d'exposer, dans un second temps, les résultats des expériences préliminaires effectuées au CEA de Saclay, en collaboration avec Martine Mayne et Mathieu Pinault.

La pulvérisation par pyrolyse ou « Spray Pyrolysis », est une méthode simple et relativement peu coûteuse au regard du coût de l'équipement. Cette méthode est entre autre utilisée pour la synthèse de nanotubes de carbone [1] ou pour obtenir des dépôts de films, ainsi que pour la production de poudre, de divers matériaux (céramiques, oxydes métalliques...) denses et poreux [2].

5.1. Dispositif et principe de la technique de pulvérisation thermique

Le principe de la technique de pulvérisation par pyrolyse est basé sur la pulvérisation d'une solution de précurseurs au moyen d'un gaz les entraînant sous forme de fines gouttelettes.

La Figure V-89 présente un schéma du dispositif expérimental dont les principaux composants sont :

- une buse de pulvérisation, qui dirige l'aérosol vers la zone de pyrolyse. Cette dernière consiste en un tube en quartz de diamètre assez large pour éviter la coalescence des gouttelettes.
- une solution de précurseurs.
- un système de chauffage pour le substrat et le dépôt de CaP.
- un thermocouple contrôlant la température.
- un compresseur d'air ou un propulseur de gaz.

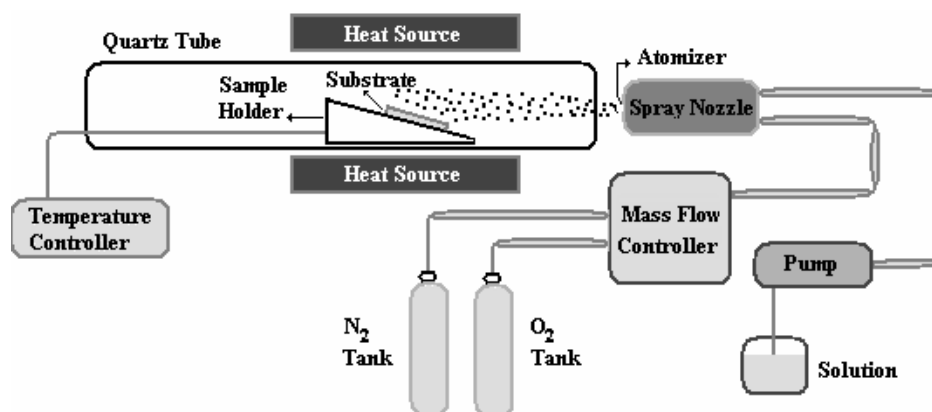


Figure V-89 : Exemple de configuration de la technique « Spray pyrolysis » [3].

- Formation de l'aérosol :

Quand un faisceau d'ultrasons à haute fréquence ou dans notre cas, sous l'action de la vibration d'un support piézoélectrique, est dirigé vers une interface liquide-gaz, un « geyser » se forme à la surface de la solution de précurseurs. Les effets de cavitation et les vibrations sur cette surface entraînent la formation d'un aérosol. La quantité d'aérosol produite dépend de la fréquence acoustique et de l'intensité des vibrations, ainsi que de certaines propriétés physiques du précurseur [4, 5].

Une fois l'aérosol formé, le gaz porteur entraîne l'aérosol vers un four dans lequel se produit l'évaporation du solvant, la diffusion du composé, la formation du précipité et la pyrolyse. L'obtention de particules à partir d'un aérosol présente plusieurs avantages, tels que le contrôle de la taille des cristallites, de la morphologie et de la composition des particules [6].

- Mécanisme de formation du dépôt :

Le procédé de pulvérisation Pyrosol peut être considéré comme un procédé dérivé de la technique CVD, il comprend trois étapes [4,5] :

1. Evaporation de la solution près du substrat.
2. Transport des espèces vers la surface du substrat.
3. Réaction des espèces à la surface du substrat.

La Figure V-90 schématise les processus pouvant intervenir dans le cas d'un dépôt par la technique Pyrosol. Ce schéma propose les différents processus intervenant lors de la formation du dépôt, en fonction de la température [3–5, 7].

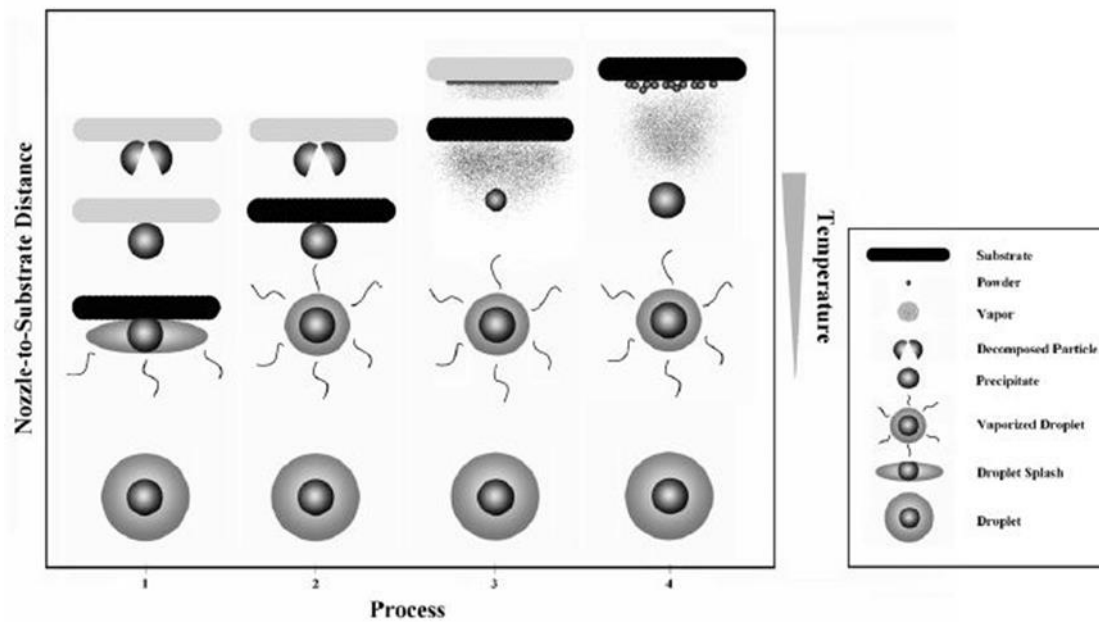


Figure V-90 : Schéma des différents processus aboutissant à la formation du dépôt [3].

Processus n°1 : A faible température, les gouttelettes atteignent le substrat à l'état liquide. Le solvant se vaporise après l'impact en laissant un précipité sec au sein duquel la décomposition a lieu.

Processus n°2 : Pour des températures supérieures, le solvant s'évapore avant que les gouttelettes n'atteignent le substrat et le précipité atteint la surface à l'état solide.

Processus n°3 : Le solvant s'évapore lors du transport des gouttelettes vers le substrat, le précipité se sublime et les vapeurs obtenues se diffusent alors sur le substrat où ont lieu les réactions chimiques en phase hétérogène. C'est le cas typique de la CVD.

Processus n°4 : Pour des températures plus élevées, la réaction chimique intervient lors de la phase vapeur et le produit de la réaction est déposé sur la surface du substrat sous forme de poudre très fine.

Le meilleur dépôt est obtenu lors du processus n°3 [4–6]. Dans le cas du dépôt par pulvérisation avec ultrasons, la distribution de taille du diamètre des gouttelettes est étroite, toutes les gouttelettes se vaporisent donc au même moment, engendrant un dépôt homogène.

Paramètres expérimentaux :

D'après Tucić *et al.* [5], les paramètres influençant la technique Pyrosol peuvent être décomposés en deux catégories :

Les *paramètres de pulvérisation* (ou atomisation). Le débit de l'aérosol dépend de la puissance des ultrasons, du débit du gaz porteur et des caractéristiques physiques de la solution (pression de vapeur, tension de surface et viscosité).

Les *paramètres de dépôt* tenant compte de paramètres chimiques comme la solution de précurseurs, le substrat, le gaz porteur et la température de dépôt qui correspond à la température de la surface du substrat.

Les caractéristiques du film obtenu dépendent du ratio cation/anion, du débit de pulvérisation, de la température du substrat, de l'atmosphère ambiante, du gaz porteur, de la taille des gouttelettes, et du refroidissement après le dépôt. L'épaisseur du dépôt peut dépendre, en plus du temps de pulvérisation, de la distance buse/substrat, de la température du substrat, de la concentration de la solution de précurseurs et de la quantité de solution pulvérisée [6, 8].

5.2. Résultats des expériences préliminaires

Les premières expériences ont porté sur l'étude de l'influence de la température du four sur les morphologies des dépôts. La solution de précurseurs est un mélange entre $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 4 H_2O et $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Sigma Aldrich) dont les concentrations sont de 1,0 et 0,6 mol/L respectivement. La température du four varie entre 400 et 600 °C et le débit du gaz porteur, de l'argon, est de 150 cm³/min.

La Figure V-91 est un récapitulatif des différentes morphologies de dépôts formés sur le tissu en fonction de la température de pulvérisation.

À 400°C, le dépôt est constitué d'agrégats en forme de « billes » sphériques de taille inférieure au micron (Figure V-7-400°C).

À 500°C, les « billes » sont moins nombreuses et un autre dépôt est présent sur la surface des fibres. Ce dépôt, d'épaisseur variable, avec un recouvrement des fibres plus important, est composé de « grains » de forme allongée, d'une centaine de nanomètres de long (Figure V-7-500°C).

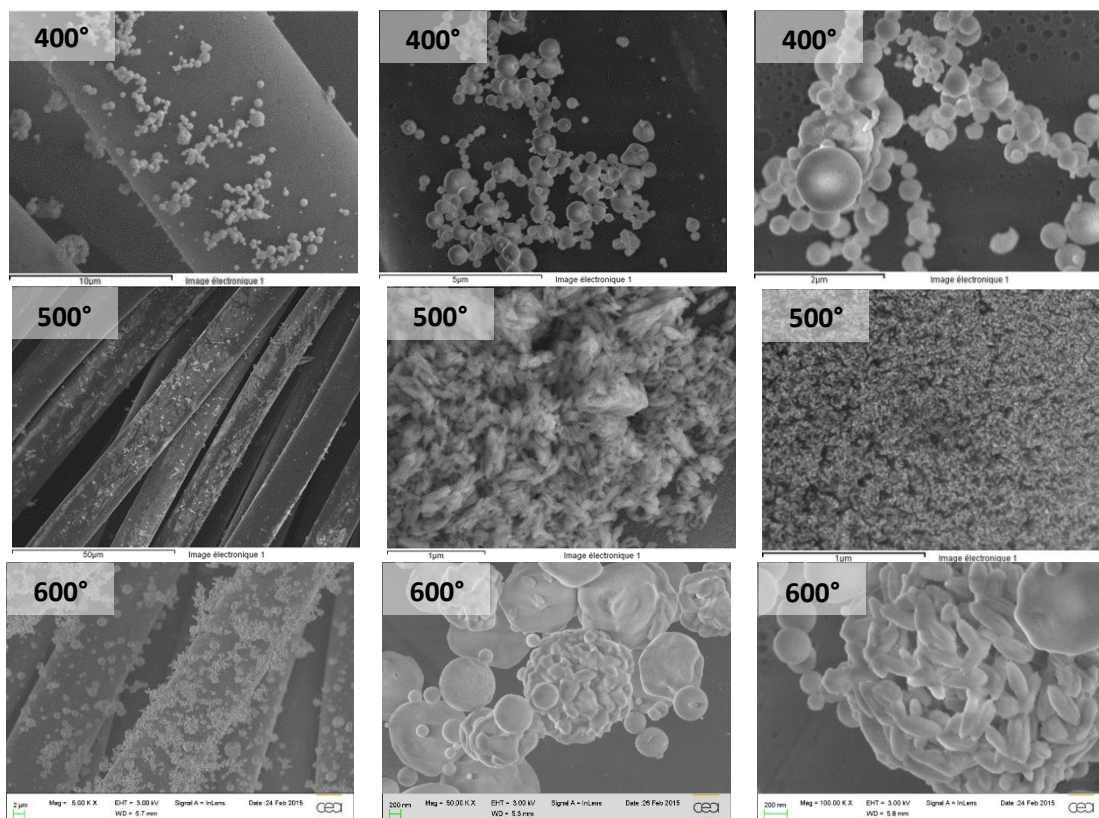


Figure V-91 : Images MEB des types de morphologies observées au sein des dépôts obtenus aux différentes températures du four de pyrolyse.

À partir de 600°C, on observe deux types d'agrégats, ceux denses et uniformes, de forme sphérique, et ceux constitués d'un assemblage, plus ou moins compact, des « grains » observés à 500°C (Figure V-7-600°C). Les observations MET montrent que ces assemblages sont constitués de « grains » cristallisés (Figure V-92). Les phases cristallines de CaP n'ont pas encore été identifiées. Leur analyse par EDX indique un rapport Ca/P de 1,36. Quant aux agrégats en forme de « billes » sphériques denses, ils présentent un rapport Ca/P plus élevé, proche de 1,5.

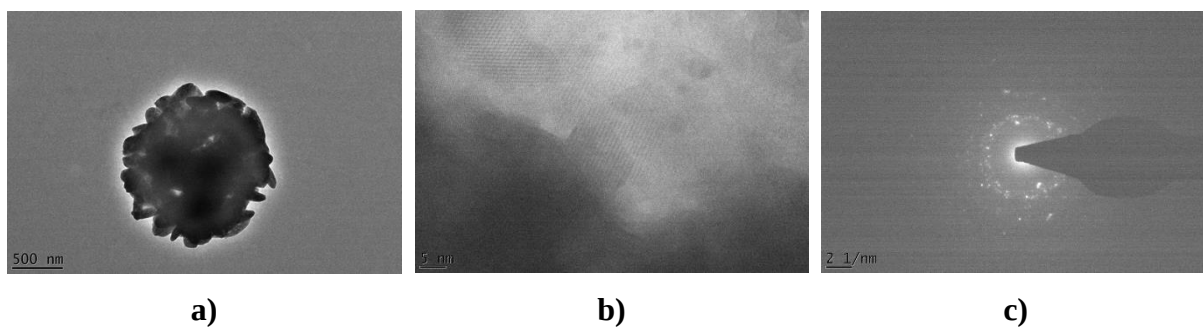


Figure V-92 : Images MET d'un agrégat sphérique (a) constitué d'un assemblage de « grains » (b) et son diagramme de diffraction électronique (c)

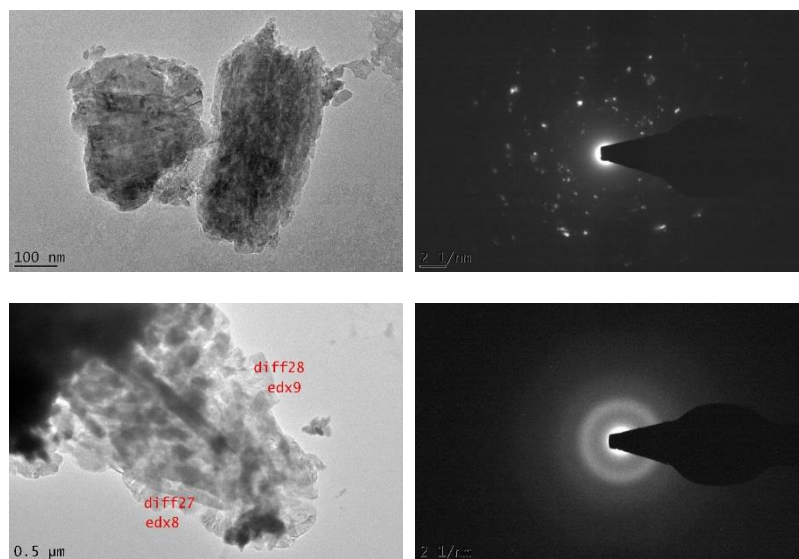


Figure V-93 : Images MET de « grains » isolés et de leurs diagrammes de diffraction électronique.

L'analyse EDX des agrégats de « grains » indique qu'ils présentent un rapport Ca/P inférieur à 1 (analyses EDX 8 et 9 sur la Figure V-93). L'analyse par diffraction électronique montre que ces grains sont constitués d'anneaux diffus, caractéristiques d'une structure très désordonnée (Figure V-93).

Cette étude préliminaire montre que les dépôts obtenus par le procédé thermique « spray pyrolysis » ont des morphologies très différentes de celles obtenues avec le procédé de sono-électrodéposition. Les synthèses et caractérisations physico-chimiques, microtexturales et structurales de ces dépôts sont en cours de réalisation.

6. Incorporation du strontium dans le dépôt de CaP

L'incorporation de strontium a pour but d'améliorer les propriétés biologiques du revêtement. Le choix du strontium se justifie du fait de son utilisation sous forme de ranélate de strontium qui est très répandu pour le traitement de déficiences osseuses telles que l'ostéoporose post-ménopausique. Un médicament à base de strontium permet d'observer chez les patients une augmentation de la densité osseuse. Ceci est attribuée à deux effets distincts, la stimulation de l'ostéo-formation et l'inhibition de la résorption osseuse. Ainsi, la substitution du calcium par le strontium dans les substituts osseux phosphocalciques a fait l'objet de nombreux travaux, notamment dans le but d'optimiser la proportion incorporée. Généralement une substitution du calcium égale à 5% entraîne les résultats les plus probants sur l'activité et la différenciation des cellules ostéoblastes et sur la prolifération des cellules ostéoclastes [9].

6.1. Paramètres expérimentaux

Une étude préliminaire a portée sur la possibilité d'incorporer, au cours de la sono-électrodéposition, du strontium dans le dépôt de CaP à la surface des TFC. Dans l'objectif d'avoir un revêtement contenant 5% en masse de strontium, nous avons choisi d'élaborer ce revêtement à partir d'un électrolyte ayant une teneur massique de 10% en strontium.

Deux densités de courant ont été testées : 50 et 270 mA/g

6.2. Résultats

6.2.1. Influence de l'incorporation de strontium sur la morphologie des dépôts

La morphologie des revêtements avec et sans incorporation de strontium a été caractérisée par MEB et MET. La Figure V-94 présente des images MET des deux revêtements obtenus en utilisant une faible densité du courant (50 mA/g) : un revêtement sans strontium (a) et un revêtement avec strontium (b).

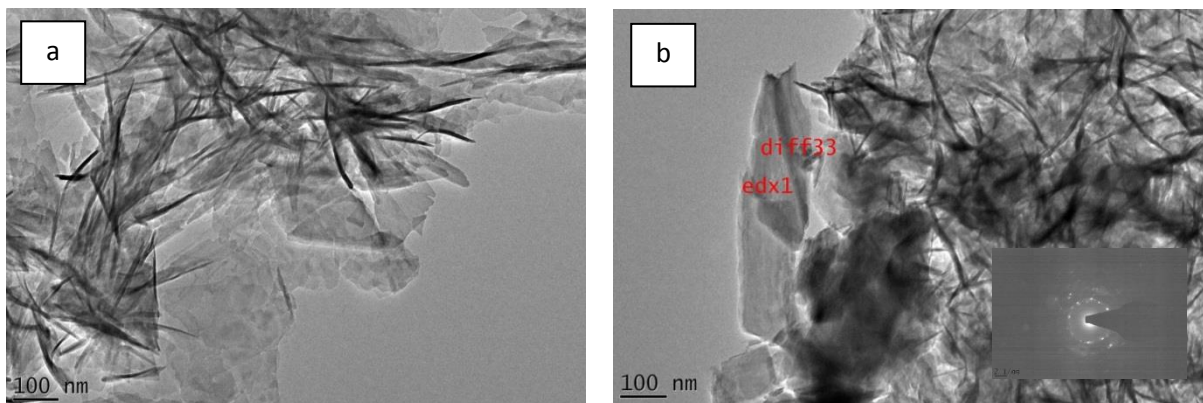


Figure V-94 : Images MET des revêtements obtenus en utilisant une densité de courant de 50mA/g (a) sans strontium (b) avec strontium

Avec ou sans strontium, les mêmes morphologies sont observées en MET. Elles sont constituées de plaquettes, qui se déposent à plat sur la grille d'observation, et de feuillets enroulés. Ces deux morphologies sont systématiquement observées à cette densité de courant.

La Figure V-95 présente des images MET obtenues pour des revêtements déposés en utilisant une forte intensité du courant (-270 mA/g).

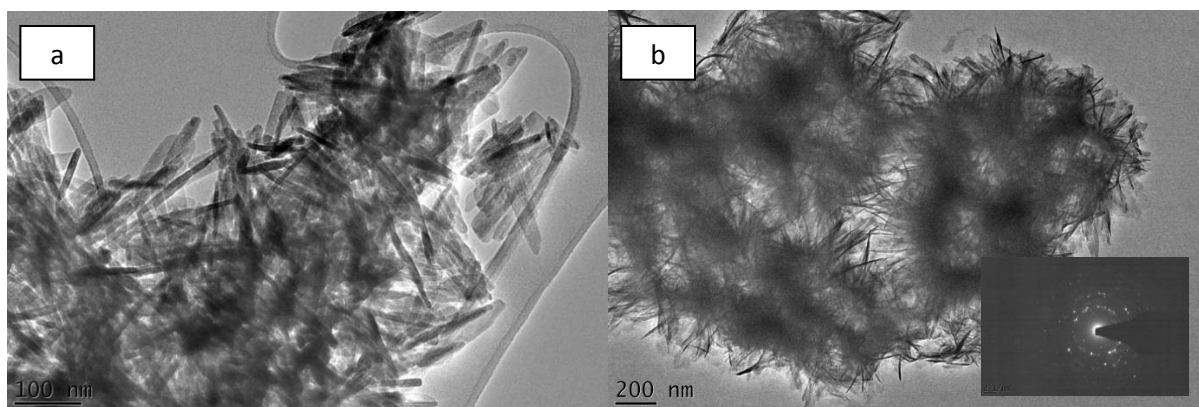


Figure V-95 : Images MET des revêtements obtenus en utilisant une densité de courant de 270mA/g (a) sans strontium (b) avec strontium

Avec ou sans strontium, les mêmes morphologies sont observées, à savoir des agglomérats de fines aiguilles d'environ 170 nm de longueur. Cette morphologie est caractéristique d'une croissance selon l'axe c d'un système hexagonal dans lequel cristallise l'hydroxyapatite.

Le diagramme de diffraction électronique (en encart dans l'image MET de la Figure V-95) présente des réflexions de Bragg ponctuelles, caractéristiques de poudres bien cristallisées. Les phases d'HAP formées n'étant pas stœchiométriques, l'indexation des phases formées est complexe et n'a pas été réalisée lors de ce travail.

6.2.2. Détermination des rapports atomiques Ca/P et Ca + Sr/P en fonction des densités de courant.

Dans le Tableau V-28 sont comparés les rapports atomiques Ca/P et Ca + Sr/P obtenus par analyse EDX associée au MET sur les dépôts avec et sans strontium.

Pour les plus faibles densités de courant (50 mA/g), les rapports Ca/P et Ca + Sr/P sont tous les deux de 1,5. L'écart à la stœchiométrie de l'HAP (1,67) indique que dans les deux cas, l'HAP est déficitaire en calcium. De plus, cela tend à démontrer que le strontium serait présent en substitution du calcium dans la structure apatitique. L'analyse par RMN MAS (Figure V-96) de l'échantillon avec le Sr montre un élargissement de la raie sur le spectre du ^{31}P , caractéristique d'une augmentation du désordre structural, par rapport à la raie sur le spectre du ^{31}P du dépôt sans Sr, confirmant l'incorporation du strontium en substitution du calcium dans la structure apatitique.

Tableau V-28 : Valeurs moyennes des ratios Ca/P et Sr + Ca/P obtenues par analyse EDX en MET.

Densité du courant	Ca/P	Ca + Sr/P
50 mA/g	1,5	1,5
270 mA/g	2 à 2,5	1,64

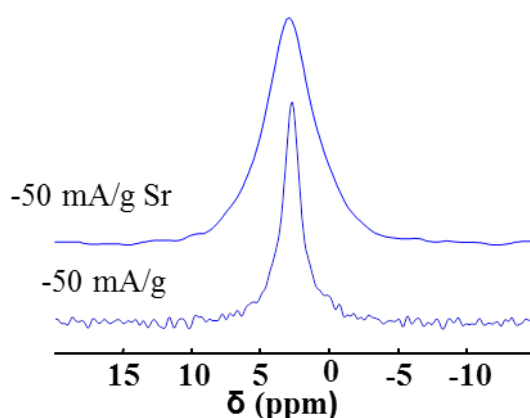


Figure V-96: Spectres RMN MAS du ^{31}P des dépôts obtenus à -50 mA/g avec et sans strontium

Pour les plus fortes densités de courant (270 mA/g), on constate une diminution de la valeur du rapport Ca + Sr/P (1,64) du dépôt avec Sr par rapport à celle du dépôt sans Sr (2 à 2,5) (Tableau V-28). Pour rappel, le rapport atomique Ca/P compris entre 2 et 2,5 est attribué à un mélange de Cd-HAP et de calcite CaCO_3 . Cela peut signifier que le strontium serait aussi un inhibiteur de la formation de la phase de calcite.

Des études complémentaires en RMN MAS, DRX et spectroscopie d'absorption atomique sont en cours de réalisation afin de mieux comprendre l'influence de l'incorporation du Sr sur les caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts de CaP. Néanmoins, cette étude préliminaire a permis de mettre en évidence la possibilité d'incorporer du strontium dans le dépôt de CaP par sono-électrodéposition. Nous envisageons également d'utiliser cette méthode pour l'incorporation d'autres cations tels que le magnésium ou encore le gallium.

Références

1. Mayne-L'hermite M, Palacin S, Chenevier P, Chancolon J, Gohier A. *Capteurs chimiques à base de nanotubes de carbone, procédé de préparation et utilisations*. Google Patents; 2011. <https://www.google.as/patents/EP2340430A1?cl=fr>
2. Perednis D. *Thin film deposition by spray pyrolysis and the application in solid oxide fuel cells*. Diss., Naturwissenschaften ETH Zürich, Nr. 15190, 2003; 2003. <http://e-collection.library.ethz.ch/view/eth:26881>
3. Amani Hamedani H. *Investigation of deposition parameters in ultrasonic spray pyrolysis for fabrication of solid oxide fuel cell cathode*. 2008 <https://smartech.gatech.edu/handle/1853/26670>
4. Chabrol C, Rouvière E, Schuster F. *The Pyrosol® Process*. In: Aegerter M, Mennig M, éditeurs. *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*. Springer US; 2004. p. 69-75.
5. Tucic A, Brankovic G, Marinkovic Z, Mancic L, Milosevic O. *Synthesis of thin films by the pyrosol process*. *Chem Ind*. 2002;56(9):375-80.
6. Guild C, Biswas S, Meng Y, Jafari T, Gaffney AM, Suib SL. *Perspectives of spray pyrolysis for facile synthesis of catalysts and thin films: An introduction and summary of recent directions*. *Catal Today*. 2014;238:87-94.
7. Messing GL, Zhang S-C, Jayanthi GV. *Ceramic Powder Synthesis by Spray Pyrolysis*. *J Am Ceram Soc*. 1993;76(11):2707-26.
8. Patil PS. *Versatility of chemical spray pyrolysis technique*. *Mater Chem Phys*. 15 juin 1999;59(3):185-98.
9. Busse B, Jobke B, Hahn M, Priemel M, Niecke M, Seitz S, et al. *Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure*. *Acta Biomater*. déc 2010;6(12):4513-21.

Conclusion générale

Les principaux résultats de ce travail de thèse ont été :

- de transposer, d'adapter et d'optimiser la technique d'électrodéposition de phosphates de calcium, déjà utilisée pour des alliages métalliques, à des tissus de fibres de carbone.
- d'étudier l'influence des paramètres expérimentaux liés à la technique de sono-électrodéposition sur les caractéristiques physico-chimiques, microtexturales et structurales des dépôts de CaP.
- de proposer les mécanismes réactionnels intervenant au cours de la sono-électrodéposition et de déterminer les relations entre ces mécanismes et l'ensemble des caractéristiques des dépôts de CaP.
- d'étudier l'impact des caractéristiques physico-chimiques des tissus de fibres de carbone seuls et des matériaux hybrides TFC / CaP, *in vitro*, au contact d'ostéoblastes humains primaires, analysant ainsi leur biocompatibilité.

Les travaux de l'équipe du Pr. Sergey Mikhalovsky de l'Université de Brighton (GB) ont démontré préalablement la faisabilité de la transposition de la synthèse de revêtements phosphocalciques par électrodéposition des substrats métalliques aux tissus de fibres de carbone. Dans un premier temps, au début de la thèse, il a fallu concevoir un dispositif électrochimique adapté au procédé de sono-électrodéposition et ainsi pouvoir réaliser des dépôts de CaP sur des TFC. La cellule électrochimique a été optimisée afin de répondre aux besoins de l'étude, avec pour objectifs la répétabilité et le contrôle des caractéristiques physico-chimiques des dépôts de CaP.

Ce travail de thèse a montré que la densité de courant appliquée lors de la sono-électrodéposition est un paramètre majeur permettant le contrôle de la composition chimique, de la microtexture et de la structure des dépôts. Nous avons mis en évidence que de fortes densités de courant favorisent la croissance d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CaD-HAP) carbonatée, de morphologie aciculaire, alors que, pour de plus faibles densités de courant, la même phase phosphocalcique, CaD-HAP carbonatée, est observée, avec, en plus, la présence d'une phase de phosphate octocalcique (OCP) ayant une morphologie plaquettaire.

Les caractérisations mises en œuvre ont mis en évidence l'existence d'une phase désordonnée de CaP à la surface des particules, quelles que soient leurs morphologies.

Les caractéristiques microtexturale, structurale et la composition chimique des dépôts ont été reliées aux mécanismes réactionnels intervenant lors du procédé de sonodéposition. La densité de courant régit le régime d'électrolyse du milieu électrolytique. Nous avons montré que, pour un régime d'électrolyse rapide (fortes densités de courant), la précipitation directe de CaD-HAP carbonatée sous forme d'aiguilles est favorisée. En effet, lors de l'électrolyse de l'eau, la forte production d'ions hydroxyle entraîne une hausse rapide et importante du pH qui favorise l'existence des ions PO_4^{3-} et la précipitation directe de la CaD-HAP.

Pour un régime d'électrolyse lent (faibles densités de courant), la croissance d'OCP plaquettaire est favorisée. Dans ces conditions, un autre mécanisme intervient étant donné que le potentiel de réduction de l'eau n'est jamais atteint. Dans ce cas, dans l'électrolyte, les ions H_2PO_4^- sont électrolysés en ions HPO_4^{2-} , qui devient alors l'espèce phosphatée dominante, et vont entraîner la précipitation d'OCP sous forme de plaquettes. Dans une seconde étape, intervient l'hydrolyse directe des particules d'OCP en une CaD-HAP carbonatée, réaction qui finalement aboutit à la formation de particules de CaD-HAP qui conservent la forme plaquettaire (feuillets) des particules originelles d'OCP. D'autre part, il a été observé que le degré d'avancement de l'hydrolyse de l'OCP est d'autant plus important que la densité de courant appliquée est élevée. En effet, à une densité de courant de 50 mA/g, une augmentation plus rapide du pH favorise l'existence des ions PO_4^{3-} au détriment des ions HPO_4^{2-} , ce qui par conséquent, accélère la réaction d'hydrolyse de l'OCP en CaD-HAP. A de plus fortes densités de courant, il y a uniquement formation de CaD-HAP carbonatée.

Quant à l'existence de la couche de CaP hydratée à la surface des particules de CaD-HAP carbonatée, elle est attribuée à une zone de sursaturation induite par l'électrolyse du milieu électrolytique. Cette zone de sursaturation se comporte comme un gel colloïdal au sein duquel vont se former et s'accumuler les particules de CaP, hydratées et de structure désordonnée, qui vont ensuite précipiter pour former les dépôts de CaD-HAP carbonatée. Cette couche se révèle d'autant plus importante qu'elle est susceptible d'améliorer les interactions entre les pansements osseux et les fluides biologiques.

En ce qui concerne, les tests de viabilité cellulaire réalisés sur les TFC activés avec et sans dépôt, ils ont montré que la détermination de la biocompatibilité de ces matériaux en contact d'ostéoblastes humains primaires par la méthode au XTT est entachée d'artefacts de mesure, du fait du très grand volume poreux de ces matériaux. C'est la raison pour laquelle il

n'a pas été possible d'évaluer la biocompatibilité des revêtements de CaP obtenus par sono-électrodéposition, du fait d'une importante cytotoxicité apparente du TFC.

Les tests « live-dead » de viabilité d'HOST primaires sur des TFC possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes ont montré que la composition chimique de surface ne semble pas être le paramètre prédominant de la biocompatibilité. Un TFC KIP1200 oxydé ne présente pas une meilleure biocompatibilité qu'un TFC KIP1200 brut. En revanche, le type de précurseur et l'ensimage des TFC semblent être des paramètres à prendre en compte : les tissus de fibres de carbone BBV800 et non activé, dont le précurseur est de la viscosse et qui sont ensimés par des oxydes métalliques, ont montré une bonne biocompatibilité avec les HOST primaires.

Cette étude a montré que la sono-électrodéposition est un procédé modulable avec lequel, en jouant sur les paramètres expérimentaux, il est possible d'obtenir toute une gamme de dépôts de phosphates de calcium, aux morphologies et caractéristiques variées, biomimétiques ou non. Un régime d'électrolyse lent, obtenu à faible densité de courant, entraîne la formation d'un dépôt de particules biomimétiques de CaD-HAP carbonatée de morphologie plaquettaire à partir d'une phase d'OCP plaquettaire. Ce mécanisme est comparable à un des mécanismes soupçonnés d'être à l'origine de l'ostéogénèse naturelle (l'autre étant la formation d'HAP à partir d'une phase de CaP amorphe). Quant au régime d'électrolyse rapide, obtenu à plus fortes densités de courant, il entraîne la formation d'un dépôt de particules de CaD-HAP carbonatée de morphologie aciculaire non biomimétiques. On voit toute la diversité de morphologies, de compositions chimiques et de structures de CaP qu'il est possible de synthétiser avec ce procédé de chimie douce.

Nous avons également vu, lors d'expériences préliminaires d'incorporation du strontium au sein des dépôts de CaP, que la sono-électrodéposition est un procédé de synthèse permettant d'intégrer par substitution, de manière simple, des ions d'intérêt biologique au sein des dépôts. En effet, en solubilisant un sel de l'ion considéré dans l'électrolyte, on obtient un dépôt incorporant cet ion.

Un autre paramètre clé à étudier est l'adhérence et la flexibilité des biomatériaux hybrides TFC/CaP. La collaboration avec le laboratoire de Mécanique et Rhéologie (LMR) de Tours permet d'adapter à nos biomatériaux des dispositifs existant pour réaliser des tests de mesure des propriétés mécaniques (flexion). Cette collaboration permettra d'étudier le rôle de l'interface entre le TFC et le revêtement de CaP afin de vérifier si la création de sites comportant des fonctions chimiques oxygénées à la surface des TFC modifie l'adhérence du

dépôt sur les fibres. Le but est d'obtenir une interface plus forte qui pourrait minimiser les pertes de dépôts lors de l'utilisation du biomatériau hybride flexible, par exemple, lors de sa mise en place dans le corps du patient par le chirurgien.

On peut signaler le démarrage à l'ICMN d'une étude portant sur la synthèse de biomatériaux hybrides TFC/CaP par pulvérisation thermique. Ce procédé « en température », permettra d'élargir la gamme de « types » de morphologie, structure, composition chimique de CaP dont il sera possible de disposer pour les applications de ces biomatériaux.

L'utilisation d'un biomatériau hybride TFC / CaP est prometteur dans le domaine de la chirurgie orthopédique. Ce matériau, alliant des propriétés de flexibilité propre au TFC et de bioactivité induite par le dépôt de CaP obtenu par sono-électrodéposition, offre une nouvelle perspective d'utilisation en tant que pansement osseux en cas de fracture ou en tant que matériau de comblement. Le choix du TFC s'avère crucial pour la fonction attendue du biomatériau : un TFC résorbable sera efficace pour une utilisation en tant que comblement osseux et un TFC non résorbable conservera ses propriétés mécaniques intactes durant son implantation dans l'organisme, ce qui en fait un matériau prometteur en tant que pansement, support de la régénération osseuse.

La biocompatibilité est une propriété primordiale des TFC. Une étude approfondie de l'impact des caractéristiques physico-chimiques des TFC sur la biocompatibilité *in vitro* est en cours, en collaboration avec l'Institut de Biologie de Valrose. Dans une seconde étape, il sera nécessaire de tester « *in vivo* » les TFC avec et sans dépôt. Les premiers tests consisteront à étudier la biocompatibilité des biomatériaux sur des rats, en collaboration avec ce même institut, puis à les tester sur des chevaux, en collaboration avec l'école vétérinaire de Nantes via l'Institut de Biologie de Valrose.

Si les résultats de ces tests se révèlent prometteurs, il sera nécessaire de passer à des tests cliniques sur l'Homme avant d'espérer, un jour, de pouvoir trouver les pansements osseux TFC / CaP parmi la gamme d'implants utilisables dans le domaine de la chirurgie orthopédique.

Cette étude a montré qu'une approche multidisciplinaire de la conception de biomatériaux est un atout majeur pour le domaine de la chirurgie orthopédique. Cette approche permet d'obtenir une synergie entre les domaines de compétences, tels que la science des matériaux et la biologie, et les différents acteurs de la recherche, démarche primordiale pour innover dans le domaine de la médecine régénérative.

Annexes

Annexe A :

Détermination de l'incertitude sur le gain de masse par la méthode de Student

Il est impossible d'évaluer analytiquement l'incertitude sur le gain de masse car les sources d'erreurs sont mal définies. Il est donc nécessaire de passer par une étude statistique de l'incertitude. En considérant que la distribution des mesures de répétabilité d'une expérience suit une loi gaussienne et que chaque mesure est indépendante, l'incertitude peut être déterminée par le calcul de l'écart type d'ordre n-1 noté σ_{n-1} :

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Avec x_i la valeur de la mesure, $\bar{x}$ la valeur moyenne des mesures et n le nombre de mesures.

Or σ_{n-1} est un bon estimateur de l'incertitude pour un grand nombre de mesures. Dans cette étude, on réalise au mieux trois expériences de répétabilité. Il est donc nécessaire d'augmenter l'intervalle de confiance des mesures. Il est donc utilisé un calcul par la méthode de Student. Cette méthode consiste à élargir l'intervalle de confiance en associant un facteur correctif à l'écart-type suivant l'équation suivante :

$$\Delta_x = t_{\%} \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

Avec $t_{\%}$ le facteur de Student qui dépend de l'intervalle de confiance voulu et du nombre de mesures de répétabilité.

n	2	3	4	5	6	7
$t_{95\%}$	12,7	4,30	3,18	2,78	2,57	2,45
$t_{99\%}$	63,7	9,93	5,84	4,60	4,03	3,71

Les résultats seront notés $\bar{x} \pm \Delta_x$

Annexe B :

Protocole de comptage cellulaire à l'aide d'une lame de Malassez

Une lame de Malassez est un support quadrillé sur lequel va être déposé une solution contenant les cellules à dénombrer (Figure B-97).

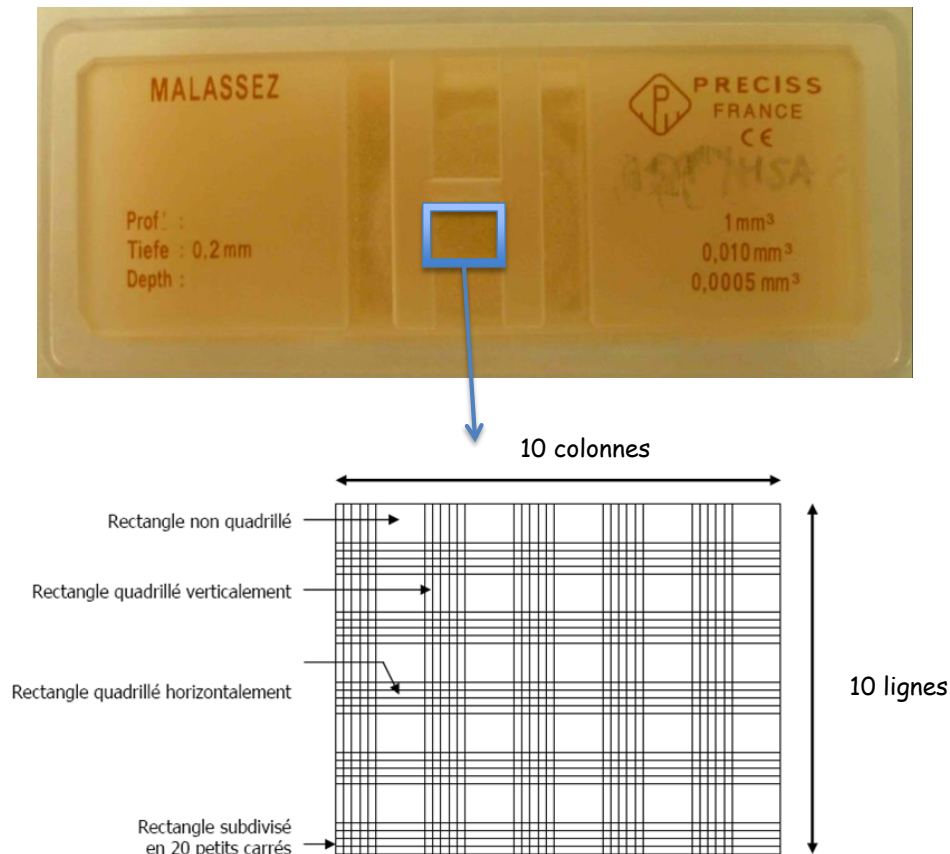


Figure B-97 : Lame de Malassez et schéma de la grille de comptage.

La grille est constituée de 10 lignes et de 10 colonnes. Le volume de solution nécessaire pour recouvrir l'ensemble de la grille est de 1 μL .

Protocole expérimental :

- Les cellules à compter sont en suspension dans du milieu de culture ou du PBS : on appellera cette suspension « A ».
- Diluer les cellules de « A » au $\frac{1}{2}$ dans du bleu trypan (exemple : 50 μL de suspension « A » + 50 μL de bleu trypan). On appellera cette suspension « B ».
- Préparer la lame de Malassez pour le comptage en déposant sur sa partie centrale une lamelle (Figure B-98).



Figure B-98 : lamelle posée sur la lame de Malassez.

- Déposer délicatement entre la lamelle et la lame la suspension cellulaire « B » (Figure B-99).

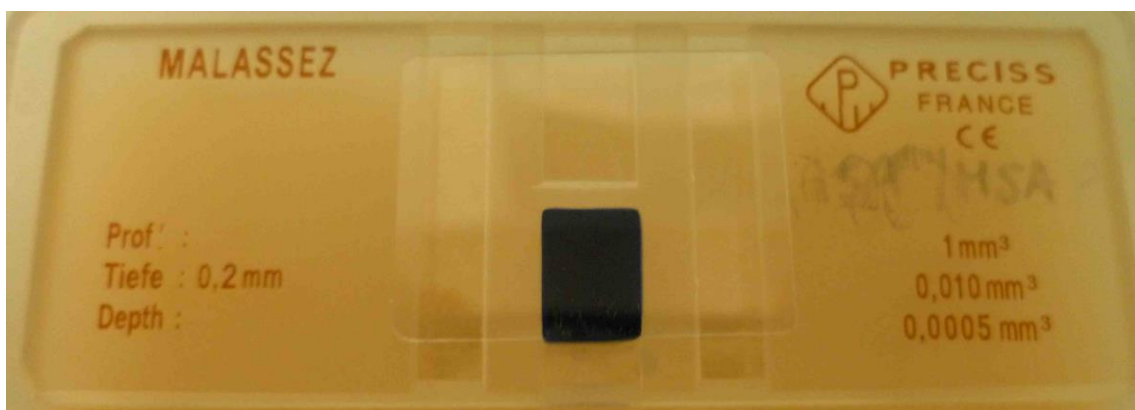


Figure B-99 : dépôt de la suspension « B » (en noir) entre la lamelle et la lame de Malassez.

- Attendre quelques minutes pour que les cellules se déposent.
- Placer la lame sur la platine du microscope et mettre au point pour visualiser la grille et les cellules. Les cellules mortes sont bleues et les cellules vivantes sont réfringentes.
- Compter le nombre de cellules vivantes présentes sur **une ligne** et compter ainsi plusieurs lignes (en général 5 lignes).
- Faire la moyenne des valeurs obtenues. La valeur obtenue correspond au nombre de cellules contenues dans 0,1 μ l de suspension « B ».
- Pour obtenir la concentration par ml dans la suspension « A », multiplier le comptage d'une ligne par 2 (dilution bleu trypan) ou par la dilution utilisée (par exemple 20 si dilution au 1/20 dans a acétique 3%) puis par 10 000.
- Multiplier ce nombre par le volume (en ml) de la suspension « A » pour connaître le nombre total de cellules contenues dans la suspension cellulaire « A ».

Annexe C :

Fiches JCPDS

Hydroxyapatite stœchiométrique HAP :

74-0566					Wavelength= 1.54060					C				
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂					d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
Calcium Hydroxide Phosphate					8.1614	170	1	0	0	1.9561	7	4	0	1
					5.2598	46	1	0	1	1.9437	281	2	2	2
					4.712	23	1	1	0	1.8908	122	1	3	2
Hydroxylapatite					4.0807	65	2	0	0	1.8723	40	2	3	0
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: d-sp: Calculated					3.8874	63	1	1	1	1.8402	313	2	1	3
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Cor.: 1.06					3.5096	23	2	0	1	1.8066	161	3	2	1
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+†, (1997)					3.4395	357	0	0	2	1.7809	116	1	4	0
Ref: Sudarsanan, K., Young, R.A., Acta Crystallogr., Sec. B, 25, 1534 (1969)					3.1695	88	1	0	2	1.7548	117	4	0	2
					3.0847	160	2	1	0	1.7548	117	3	0	3
					2.8146	999*	2	1	1	1.7197	140	0	0	4
					2.7781	514	1	1	2	1.6828	10	1	0	4
Sys.: Hexagonal S.G.: P6 ₃ /m (176)					2.7204	612	3	0	0	1.6444	59	3	2	2
a: 9.424(4) b: c: 6.879(4) A: C: 0.7299					2.6299	210	2	0	2	1.6322	2	5	0	0
α: β: γ: Z: 1 mp:					2.5298	39	3	0	1	1.6108	37	3	1	3
Ref: Ibid.					2.3560	2	2	2	0	1.5881	15	5	0	1
					2.2964	50	2	1	2	1.5847	11	2	0	4
					2.2635	205	1	3	0	1.5815	10	4	1	2
					2.2289	18	2	2	1	1.5706	8	3	3	0
Dx: 3.153 Dm: ICSD #: 026205					2.2075	4	1	0	3	1.5423	43	2	4	0
					2.1501	56	1	3	1	1.5312	32	3	3	1
					2.1337	11	3	0	2	1.5050	32	2	4	1
Peak height intensity. Specimen from Holly Springs, GA, USA.					2.0618	45	1	1	3	1.5020	50	1	2	4
R-factor: 0.023, Single-crystal data used. PSC: hP44. See					2.0403	11	4	0	0	1.4746	79	5	0	2
PDF 9-432. Mwt: 1004.64. Volume[CD]: 529.09.					1.9990	35	2	0	3	1.4658	16	5	1	0

d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
1.4536	74	3	0	4	1.1155	23	5	1	4
1.4502	93	3	2	3	1.1140	41	4	4	2
1.4336	89	5	1	1	1.1140	41	1	1	6
1.4065	21	1	4	3	1.1086	24	2	3	5
1.3890	1	2	2	4	1.1042	58	3	5	2
1.3693	4	3	1	4	1.0938	3	1	6	3
1.3602	2	6	0	0					
1.3566	2	1	0	5					
1.3484	20	5	1	2					
1.3417	4	4	3	0					
1.3344	1	6	0	1					
1.3297	2	5	0	3					
1.3206	4	1	1	5					
1.3169	37	4	3	1					
1.3068	28	5	2	0					
1.3037	17	2	0	5					
1.2958	3	3	3	3					
1.2839	19	5	2	1					
1.2797	38	2	4	3					
1.2685	13	2	3	4					
1.2649	11	6	0	2					
1.2564	45	2	1	5					
1.2499	24	3	4	2					
1.2446	18	6	1	0					
1.2371	50	1	4	4					
1.2350	44	5	1	3					
1.2277	2	3	0	5					
1.2247	9	1	6	1					
1.2216	56	2	5	2					
1.1880	3	2	2	5					
1.1839	5	5	0	4					
1.1780	17	4	4	0					
1.1756	12	1	3	5					
1.1703	6	1	6	2					
1.1703	6	6	0	3					
1.1659	7	7	0	0					
1.1611	10	4	4	1					
1.1597	10	3	3	4					
1.1580	36	4	3	3					
1.1482	34	2	4	4					
1.1465	17	0	0	6					
1.1407	2	4	0	5					
1.1354	17	5	2	3					
1.1354	17	1	0	6					
1.1317	9	2	6	0					

Phosphate octocalcique OCP :

79-0423										Wavelength= 1.54060										C									
Ca8(HPO4)2(PO4)4(H2O)5										d(A)										d(A)									
Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate										Int										Int									
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: d-sp: Calculated										h										h									
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Cor.: 2.99										k										k									
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+-. (1997)										l										l									
Ref: Mathew, M et al., J. Crystallogr. Spectrosc. Res., 18, 235 (1988)										d(A)										d(A)									
Sys.: Triclinic S.G.: P1 (2)										h										h									
a: 19.692(4) b: 9.523(2) c: 6.835(2) A: 2.0678 C: 0.7177										k										k									
α: 90.150(2) β: 92.540(2) γ: 08.650(1) Z: 2 mp:										l										l									
Ref: Ibid.										d(A)										d(A)									
Dx: 2.690 Dm: ICSD #: 065347										h										h									
Peak height intensity, R-factor: 0.054, C.D. Cell: a=9.523, b=18.935, c=6.835, α=92.72, β=90.15, γ=80.19, a/b=0.5029, c/b=0.3610, S.G.=P-1(2), PSC: aP110. Mwt: 982.56. Volume[CD]: 1213.06.										k										k									
										l										l									

d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
3.4431	7	4	2	1	2.7342	29	0	3	1	2.3433	3	8	1	1	2.0890	10	4	1	3
3.4136	81	0	0	2	2.7342	29	4	1	2	2.3297	7	1	4	0	2.0890	10	8	3	1
3.3864	24	1	0	2	2.7133	7	3	2	2	2.3297	7	2	3	2	2.0818	6	2	1	3
3.3702	18	4	2	1	2.6931	18	4	0	2	2.3213	5	2	3	2	2.0818	6	7	2	2
3.3391	6	5	0	1	2.6624	60	7	0	0	2.3213	5	5	2	1	2.0740	2	6	4	1
3.3391	6	5	1	1	2.6624	60	3	1	2	2.3125	4	6	1	2	2.0661	4	3	1	3
3.3064	29	4	1	1	2.6569	37	1	2	2	2.3125	4	3	3	2	2.0661	4	6	1	2
3.2777	20	8	1	0	2.6399	27	7	1	1	2.3047	3	3	3	1	2.0618	4	5	2	2
3.2494	12	2	0	2	2.6399	27	1	3	1	2.2965	7	7	3	1	2.0572	4	1	2	3
3.2494	12	2	1	1	2.6265	30	5	3	1	2.2965	7	1	3	2	2.0524	5	7	0	2
3.1957	24	1	1	2	2.6265	30	2	3	0	2.2766	1	0	3	2	2.0524	5	2	2	3
3.1957	24	3	2	0	2.6201	26	6	3	0	2.2766	1	8	1	1	2.0473	9	2	4	0
3.1843	23	4	1	1	2.6093	18	4	2	2	2.2691	1	1	0	3	2.0473	9	1	2	3
3.1741	15	2	3	0	2.5922	12	1	3	1	2.2691	1	4	3	2	2.0425	5	5	3	0
3.1741	15	0	1	2	2.5922	12	1	2	2	2.2553	5	0	4	0	2.0367	6	8	1	2
3.1622	37	2	2	1	2.5793	7	5	0	2	2.2553	5	7	3	1	2.0367	6	9	3	0
3.1622	37	2	0	2	2.5709	4	4	2	1	2.2486	3	5	1	2					
3.1306	8	1	3	0	2.5580	18	4	1	2	2.2444	4	6	2	0					
3.1306	8	1	1	2	2.5580	18	7	1	1	2.2444	4	8	2	1					
3.1061	8	6	0	0	2.5462	10	4	2	2	2.2400	6	4	3	2					
3.1061	8	2	1	2	2.5462	10	7	2	1	2.2400	6	8	0	1					
3.0537	23	3	0	2	2.5385	15	6	1	1	2.2171	22	8	3	0					
3.0537	23	1	1	2	2.5284	8	2	2	2	2.2171	22	4	4	1					
3.0071	13	0	3	0	2.5207	3	7	0	1	2.2133	14	1	4	1					
3.0071	13	4	3	0	2.5207	3	5	1	2	2.2133	14	1	1	3					
2.9364	23	3	2	1	2.5061	1	5	2	0	2.1973	4	0	1	3					
2.9364	23	3	0	2	2.4755	4	2	3	1	2.1973	4	7	1	1					
2.9055	9	6	1	1	2.4755	4	5	2	2	2.1921	3	1	1	3					
2.8702	12	2	3	1	2.4594	6	5	0	2	2.1883	3	6	4	0					
2.8702	12	2	1	2	2.4594	6	6	1	1	2.1883	3	2	0	3					
2.8496	41	3	2	1	2.4538	10	8	1	0	2.1716	2	2	1	3					
2.8496	41	3	3	1	2.4538	10	4	1	2	2.1716	2	5	4	1					
2.8376	67	3	3	1	2.4261	2	2	3	1	2.1552	7	5	3	2					
2.8376	67	1	3	1	2.4261	2	6	3	1	2.1552	7	0	4	1					
2.8236	95	5	3	0	2.4198	2	3	3	0	2.1496	6	1	1	3					
2.8236	95	4	0	2	2.4198	2	8	1	2	2.1496	6	7	0	2					
2.7756	40	6	0	1	2.4135	1	7	3	0	2.1303	10	0	4	1					
2.7756	40	3	1	2	2.3970	1	5	2	2	2.1303	10	8	3	1					
2.7676	32	2	2	2	2.3851	2	5	2	1	2.1230	5	7	1	2					
2.7615	25	1	2	2	2.3783	5	3	4	0	2.1087	5	2	3	2					
2.7615	25	4	3	1	2.3783	5	3	2	2	2.1087	5	3	1	3					
2.7536	18	6	2	1	2.3726	3	2	4	0	2.0987	9	9	1	1					
2.7536	18	2	2	2	2.3568	8	7	1	0	2.0987	9	8	1	0					
2.7455	15	0	2	2	2.3568	8	5	1	2	2.0938	6	8	4	1					

Phosphate dicalcique dihydrate « Brushite » DCPD :

72-0713					Wavelength= 1.54060					C				
CaHPO ₄ (H ₂ O) ₂					d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate					7.59	999 ⁺	0	2	0	2.1701	124	1	5	2
					5.2430	1	0	1	1	2.1461	109	2	4	0
					4.9232	15	1	1	0	2.1185	14	2	4	2
					4.2371	794	1	2	1	2.0990	39	2	5	1
Brushite					3.7950	46	0	4	0	2.0822	56	1	1	2
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: d-sp: Calculated					3.7504	5	0	3	1	2.0191	24	0	7	1
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/Icor.: 1.42					3.6279	13	1	3	0	2.0191	24	2	1	1
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)					3.0460	536	1	4	1	2.0017	41	1	7	0
Ref: Curry, N.A., Jones, D.W., J. Chem. Soc. A, 1971, 3725 (1971)					3.0460	536	1	1	2	1.9869	62	1	2	3
					2.9244	349	1	2	1	1.9738	34	2	1	3
Sys.: Monoclinic S.G.: Ia (9)					2.8534	56	2	1	1	1.9412	8	1	3	2
a: 5.812(2) b: 15.18(3) c: 6.239(2) A: 0.3829 C: 0.4110					2.7934	14	0	0	2	1.8975	17	0	8	0
α: β: 116.430(3) γ: Z: 4 mp:					2.6675	23	0	5	1	1.8862	29	3	1	2
Ref: Ibid.					2.6454	30	1	3	2	1.8752	98	0	6	2
Dx: 2.319 Dm: ICSD #: 016132					2.6215	324	1	5	0	1.8575	49	3	2	1
					2.6215	324	0	2	2	1.8525	37	2	3	3
					2.6022	199	2	0	0	1.8484	11	0	1	3
					2.5535	33	2	0	2	1.8171	90	1	4	3
					2.5300	12	0	6	0	1.8139	117	2	6	0
					2.5194	21	2	3	1	1.7972	62	2	6	2
					2.4616	2	2	2	0	1.7787	20	1	8	1
					2.4324	102	1	4	1	1.7787	20	1	7	2
					2.4202	99	2	2	2	1.7476	8	0	3	3
					2.2670	29	1	6	1	1.7378	2	2	7	1
					2.2496	6	0	4	2	1.7282	6	1	5	2

Peak height intensity. R-factor: 0.033. C.D. Cell: a=6.239, b=15.180, c=6.812, β=116.43, a/b=0.4110, c/b=0.3829, S.G.=Ia(9). PSC: mC52. See PDF 11-293. Mwt: 172.09. Volume[CD]: 492.91.

d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
1.7236	6	3	1	0	1.3481	7	4	3	3	1.1534	16	1	11	2
1.7102	61	3	4	1	1.3429	25	2	6	2	1.1534	16	4	8	2
1.6916	1	2	5	1	1.3397	19	0	11	1	1.1523	15	3	5	2
1.6648	5	2	5	3	1.3339	6	1	11	0	1.1523	15	0	12	2
1.6610	18	3	2	3	1.3339	6	0	10	2	1.1514	13	1	4	5
1.6410	4	3	3	0	1.3227	9	2	6	4	1.1425	2	0	13	1
1.6279	19	1	8	1	1.3155	3	1	9	2	1.1425	2	2	11	1
1.6146	10	0	9	1	1.3107	8	2	10	0	1.1398	20	4	6	4
1.6112	8	3	5	2	1.3107	8	0	4	4	1.1398	20	1	13	0
1.6020	23	1	6	3	1.3048	4	2	10	2	1.1377	11	2	12	0
1.5874	2	0	5	3	1.3011	17	4	0	0	1.1329	23	1	9	4
1.5845	4	2	0	2	1.2824	13	4	2	0	1.1329	23	3	10	3
1.5696	20	0	8	2	1.2824	13	4	5	1	1.1296	12	4	1	5
1.5516	47	2	0	4	1.2778	9	3	6	1	1.1248	8	0	8	4
1.5516	47	2	2	2	1.2698	3	4	5	3	1.1167	1	3	11	2
1.5331	24	2	8	0	1.2671	9	3	8	3	1.1143	1	0	1	5
1.5230	27	2	8	2	1.2660	6	0	12	0	1.1048	8	4	3	5
1.5230	27	1	1	4	1.2597	11	4	6	2	1.1048	8	6	2	1
1.5202	27	2	2	4	1.2597	11	4	2	4	1.1033	10	5	4	3
1.5171	14	1	2	3	1.2501	4	1	7	4	1.0975	2	3	6	5
1.5093	6	1	7	2	1.2501	4	0	9	3	1.0960	2	2	10	2
1.5062	5	3	5	0	1.2465	3	2	11	1	1.0960	2	2	7	3
1.4848	4	2	7	1	1.2434	2	2	1	5	1.0928	1	1	13	2
1.4819	2	1	9	2	1.2320	3	2	3	3	1.0904	1	1	6	5
1.4847	4	1	3	4	1.2308	3	4	4	0	1.0904	1	0	3	5
1.4822	4	2	4	2	1.2278	7	1	12	1					
1.4586	4	2	9	1	1.2240	15	1	10	3					
1.4532	36	3	2	1	1.2227	13	0	6	4					
1.4532	36	4	0	2	1.2162	15	2	8	2					
1.4406	2	3	1	4	1.2162	15	1	1	4					
1.4336	27	1	4	3	1.2098	6	3	3	2					
1.4295	15	3	7	2	1.2098	6	3	9	0					
1.4267	10	4	2	2	1.2027	8	3	2	5					
1.4123	11	0	7	3	1.2011	8	2	8	4					
1.4123	11	3	6	3	1.1996	12	1	8	3					
1.4077	7	4	1	1	1.1934	13	1	2	5					
1.3987	15	0	0	4	1.1897	13	3	10	1					
1.3921	10	4	1	3	1.1843	2	4	7	1					
1.3793	19	3	4	1	1.1748	4	4	7	3					
1.3690	29	1	10	1	1.1748	4	1	12	1					
1.3664	15	1	5	4	1.1718	3	2	5	3					
1.3566	2	4	4	2	1.1673	4	3	8	1					
1.3546	2	3	7	0	1.1598	8	3	4	5					
1.3481	7	3	8	1	1.1570	12	4	6	0					



Carbonate de calcium « Calcite »

05-0586					Wavelength= 1.5405					*				
CaCO3					d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
Calcium Carbonate					3.86	12	0	1	2	.9895	<1	3	2	1
					3.035	100	1	0	4	.9846	1	2	3	2
					2.845	3	0	0	6	.9782	1	[	1	3
Calcite, syn					2.495	14	1	1	0	.9787	3	1	2	14
Rad.: CuKα1 λ: 1.5405 Filter: Ni Beta d-sp:					2.285	18	1	1	3	.9655	2	3	2	4
Cut off: Int.: Diffract. I/100.: 2.00					2.095	18	2	0	2	.9636	4	0	4	8
Ref: Swanson, Fuyat, Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, II, 51 (1953)					1.927	5	0	2	4	.9582	<1	0	2	18
					1.913	17	0	1	8	.9429	2	4	1	0
					1.875	17	1	1	6	.9376	2	2	2	12
					1.626	4	2	1	1					
					1.604	8	1	2	2					
Sys.: Rhombohedral S.G.: R3c (167)					1.587	2	1	0	10					
a: 4.989 b: c: 17.062 A: C: 3.4199					1.525	5	2	1	4					
α: β: γ: Z: 6 mp:					1.518	4	2	0	8					
Ref: Ibid.					1.510	3	1	1	9					
					1.473	2	1	2	5					
					1.440	5	3	0	0					
Dx: 2.711 Dm: 2.710 SS/FOM: F30 - 57(.0159 . 33)					1.422	3	0	0	12					
					1.356	1	2	1	7					
ex: 1.487 ηD20: 1.659 cy: Sign: - 2V:					1.339	2	0	2	10					
Ref: Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., II, 142					1.297	2	1	2	8					
					1.284	1	3	0	6					
					1.247	1	2	2	0					
					1.235	2	1	1	12					
					1.1869	<1	3	1	2					
Color: Colorless					1.1795	3	2	1	10					
Pattern taken at 26 C. Sample from Mallinckrodt Chemical Works.					1.1728	<1	0	1	14					
CAS #: 13397-26-7. Spectroscopic analysis: <0.1% Sr; <0.01% Ba;					1.1538	3	1	3	4					
<0.001% Al, B, Cs, Cu, K, Mg, Na, Si, Sn; <0.0001% Ag, Cr, Fe, Li, Mn.					1.1425	1	2	2	6					
Other form: aragonite. Pattern reviewed by Parks, J., McCarthy, G.,					1.1244	<1	1	2	11					
North Dakota State Univ., Fargo, North Dakota, USA, ICDD					1.0613	1	2	0	14					
Grant-in-Aid (1992). Agrees well with experimental and calculated					1.0473	3	4	0	4					
patterns. Additional weak reflections [indicated by brackets] were					1.0447	4	3	1	8					
observed. Calcite group, calcite subgroup. PSC: hR10. See					1.0352	2	1	0	16					
ICSD 16710, 20179, 28627, 18164, 18165 and 18166 (PDF 72-1214					1.0234	<1	2	1	13					
and 72-1937); ICSD 73446 (PDF 81-2027); ICSD 79673 (PDF 83-577);					1.0118	2	3	0	12					
ICSD 79674 (PDF 83-578). Mwt: 100.09. Volume[CD]: 367.78.														



© 1996 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved.
PCPDFWIN v. 2.01

Liste des communications

Oraux :

- COM 1** *Calcium phosphate coatings on activated carbon fiber cloth for their use as biomedical material*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy, Carbon Conference 2012, Cracovie, Pologne, 17-22 juin 2012.
- COM 2** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy. Journées annuelles du Groupe Français d'étude des carbones, GFEC 2012, Houffalize, Belgique, 1^{er}-4 octobre 2012.
- COM 3** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Simon, S. Bonnamy, JFJPC13, Dinard, 15-19 Octobre 2012.
- COM 4** *Dépôts de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Warmont, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy, Journées annuelles du Groupe Français d'Etudes des Carbones, GFEC 2013, Voreppe, 13-16 mai 2013.
- COM 5** *Dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Warmont, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy. Journées d'Electrochimie, JE 2013, Paris, 8-11 juillet 2013.
- COM 6** *Calcium phosphate coating on activated carbon fiber clothes for their use as biomedical material*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Warmont, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy; Conférence CARBON 13, Rio de Janeiro, Brésil, 14-19 juillet 2013.
- COM 7** *Electrodeposition of calcium phosphate coatings on carbon fiber clothes* Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Warmont, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy; Conférence 12th IUMRS-ICAM conference, Qingdao, China, Sept 22-28, 2013 (Keynote)
- COM 8** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, N. Rochet, F. Fayon, F. Warmont, S. Bonnamy, GFEC2014, Nouan-Le-Fuzelier, 12-15 Mai 2014.
- COM 9** *Formation d'un matériau hybride tissu de fibres de carbone activées/phosphate de calcium pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Warmont, A. Jitianu S. Bonnamy, Journées sol-gel 2014, Tours, 13-15 Mai 2014.
- COM 10** *Calcium phosphate coatings on carbon fibers cloth for their use as biomaterial*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, N. Rochet, F. Fayon, F. Warmont, S. Bonnamy, EORS 2014, Nantes, 2-4 Juillet 2014.
- COM 11** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard¹, S. Delpeux¹, L. Guichaoua¹, J. Chancolon¹, N.Rochet², F. Fayon³, F.Warmont¹, S. Bonnamy¹, SCF2015, Lille, 4-9 Juillet 2015.

- COM 12** *Formation of hybrid materials based on calcium phosphate deposit on carbon fiber scaffold*, Q. Picard¹, S. Delpeux¹, L. Guichaoua¹, J. Chancolon¹, N.Rochet², F. Fayon³, F.Warmont¹, S. Bonnamy¹, ESB2015, Cracovie, 30 août au 3 septembre 2015.
- COM 13** *Biomatériaux hybrides tissu de fibres de carbone/phosphates de calcium : synthèse, caractérisation et biocompatibilité*, Q. Picard, F. Olivier, S. Delpeux, J. Chancolon, F. Fayon, N. Rochet, F. Warmont, S. Bonnamy, MATV2L 2016.
- COM 14** *Biomatériaux hybrides tissu de fibres de carbone/phosphates de calcium : synthèse, caractérisation et biocompatibilité*, Q. Picard, F. Olivier, S. Delpeux, J. Chancolon, F. Fayon, N. Rochet, F. Warmont, S. Bonnamy, SFEC 2016, Carqueiranne, 17-20 mai 2016.
- COM 15** *Formation of hybrid materials based on calcium phosphate deposit on carbon fiber scaffold*, Q. Picard, S. Delpeux, N.Rochet, J. Chancolon, F. Fayon, F.Warmont, S. Bonnamy, Carbon 2016, Pennsylvanie USA, 10-15 juillet 2016.

Posters :

- AFF 1** *Calcium phosphate coating on activated carbon fiber cloth for their use as biomedical material*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Bonnamy. EESEE6, Zadar, Croatie, 16-21 septembre 2012.
- AFF 2** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Simon, S. Bonnamy. JFJPC13 2012, Dinard, 15-19 Octobre 2012
- AFF 3** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, F. Warmont, F. Fayon, S. Mikhalovski, S. Simon, S. Bonnamy. Journées Surfaces Interfaces, JSI 2013, Orléans, 30 Janvier- 1^{er} Février 2013.
- AFF 4** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, J. Chancolon, S. Delpeux, N. Rochet, F. Fayon, F. Warmont, S. Bonnamy, Matériaux 2014, Montpellier, 24-28 Novembre 2014.
- AFF 5** *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone activées pour des applications biomédicales*, Q. Picard, S. Delpeux, J. Chancolon, F. Fayon, N. Rochet, C.Richard, F. Warmont, S. Bonnamy, JE2015, Rome, 6-10 Juillet 2015.
- AFF 6** *Hybrid biomaterials based on calcium phosphate coating on carbon scaffold for bone regeneration*, Q. Picard, L. Guichaoua, S. Delpeux, J. Chancolon, F. Fayon, N. Rochet, F. Warmont, S. Bonnamy, Le Studium, Orléans, 7-9 Septembre 2015.
- AFF 7** *Formation of hybrid materials based on calcium phosphate deposit on carbon fiber scaffold*, Q. Picard, L. Guichaoua, S. Delpeux, N.Rochet, J. Chancolon, F. Fayon, F.Warmont, S. Bonnamy, WBC 2016, Montréal Canada, 17-22 mai 2016.

Quentin PICARD
Biomatériaux hybrides : Tissu de fibres de carbone / Phosphates de calcium. Synthèse, Caractérisation et Biocompatibilité

Résumé :

Ce travail a consisté à élaborer un biomatériau hybride constitué d'un tissu de fibres de carbone (TFC) revêtu de phosphates de calcium (CaP) déposés par un procédé de sono-électrodéposition et à étudier l'influence des paramètres expérimentaux sur la composition chimique, la microtexture et la structure des revêtements phosphocalciques, ainsi que la biocompatibilité *in vitro* du biomatériau hybride. La densité de courant s'est avérée être un paramètre important. Pour de fortes densités de courant (≥ 100 mA/g), un régime d'électrolyse rapide de l'eau entraîne la formation d'un dépôt aciculaire d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CaD-HAP) carbonatée avec la présence éventuelle d'une phase de calcite. Pour de faibles densités de courant (≤ 50 mA/g), un régime d'électrolyse lent de l'eau entraîne la formation d'un dépôt plaquettaire de CaD-HAP carbonatée issu de l'hydrolyse *in situ* du phosphate octocalcique plaquettaire préalablement précipité. Pour l'ensemble des dépôts, les particules sont constituées d'un cœur de CaD-HAP carbonatée de structure ordonnée et d'une surface hydratée de CaD-HAP carbonatée de structure désordonnée qui résulte de l'existence d'une zone de sursaturation lors de la précipitation des CaP.

La sono-électrodéposition se révèle être un procédé versatile capable d'orienter la synthèse des phases de CaP, avec pour une faible densité de courant appliquée l'obtention d'un dépôt biomimétique comparable à la partie minérale du tissu osseux obtenue par le processus d'ostéogénèse naturelle.

Des tests de viabilité *in vitro* réalisés avec des ostéoblastes humains primaires ont montré que la nanoporosité et le caractère hydrophile des TFC n'impactent pas la biocompatibilité et que les paramètres tels que le précurseur des fibres, l'ensimage et/ou la forme lobée des fibres semblent favoriser l'adhésion et la prolifération des cellules.

Mots clés : Biomatériaux, tissu de fibres de carbone, électrodéposition, hydroxyapatite déficiente en calcium carbonatée, morphologies plaquettaire et aciculaire, biocompatibilité, HOST.

Hybrid biomaterials: Carbon fibers cloth / Calcium phosphates.
Synthesis, Characterization and Biocompatibility

Abstract:

This work is focused on the synthesis of a novel hybrid biomaterial made of carbon fibers cloth (CFC)/ calcium phosphates (CaP) using the sono-electrochemical technique and the study of the influence of experimental parameters on the chemical composition, microtexture and structure of CaP deposits and on *in vitro* biocompatibility. Current density is shown to be a crucial parameter. Specifically, at high current densities (≥ 100 mA/g), the fast water electrolysis rate leads to a needle-like deposit consisting in a major phase of carbonated calcium deficient hydroxyapatite (CaD-HAP) mixed with a calcium carbonate phase. At low current densities (≤ 50 mA/g), the slow water electrolysis rate generates a plate-like carbonated CaD-HAP phase, coming from the *in situ* hydrolysis of a former octacalcium phosphate phase. Whatever the experimental conditions, particles of the deposits consists in a carbonated CaD-HAP core showing an ordered structure, surrounded by a hydrated and disordered carbonated CaD-HAP surface layer which results of the formation of oversaturated domains during CaP precipitation.

Sono-electrodeposition is shown to be a versatile process able to control the nature of CaP phases. Especially, at low current density a biomimetic CaP deposit is obtained, similar to the mineral part of bones produced during natural osteogenesis.

In vitro biologic tests using primary human osteoblasts showed that the nano-porosity and hydrophilicity of the carbon fibers do not affect the biocompatibility and that fiber precursor, sizing and lobe shaped fibers seems to favor adhesion and proliferation of human cells.

Keywords: Biomaterials, carbon fibers, calcium phosphates, electrodeposition, carbonated calcium deficient hydroxyapatite, plate-like and needle-like morphologies, biocompatibility, HOST