

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

LABORATOIRE : Interface, Confinement, Matériaux et Nanostructures

THÈSE présentée par :
Florian OLIVIER

Soutenue le : **4 décembre 2018**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie des matériaux

Elaboration, caractérisation, dopages et évaluations
***in vitro* et *in vivo* de matériaux hybrides :**

Tissus de fibres de carbone / Phosphates de calcium

THÈSE dirigée par :
Sylvie BONNAMY

Directrice de Recherche, ICMN, Orléans

THÈSE co-encadrée par :
Sandrine DELPEUX
Jérôme CHANCOLON

Ingénieure de Recherche, ICMN, Orléans
Maître de Conférences, ICMN, Orléans

RAPPORTEURS :
Chantal DAMIA
Emmanuel FLAHAUT

Maître de Conférences (HDR), IRCER, Limoges
Directeur de Recherche, CIRIMAT, Toulouse

JURY :

Sylvie BONNAMY
Jean-Michel BOULER
Jérôme CHANCOLON
Chantal DAMIA
Sandrine DELPEUX
Christophe DROUET
Emmanuel FLAHAUT
Nathalie ROCHET

Directrice de Recherche, ICMN, Orléans, Directrice
Professeur des Universités, CEISAM, Nantes, Président du jury
Maître de Conférences, ICMN, Orléans, Co-encadrant
Maître de Conférences (HDR), IRCER, Limoges, Rapporteur
Ingénieure de Recherche, ICMN, Orléans, Co-encadrante
Directeur de Recherche, CIRIMAT, Toulouse, Examinateur
Directeur de Recherche, CIRIMAT, Toulouse, Rapporteur
Chargée de Recherche, iBV, Nice, Examinatrice

INVITES :

Franck FAYON
Caroline RICHARD

Directeur de Recherche, CEMHTI, Orléans
Professeure des Universités, GREMAN, Tours

**« Si l'on veut obtenir quelque chose que l'on n'a jamais eu,
il faut tenter quelque chose que l'on n'a jamais fait »**

Périclès

Remerciements

Cette thèse a été effectuée au laboratoire Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN) à Orléans. Je remercie Sylvie Bonnamy, directrice de l'ICMN à mon arrivée, et Caroline Andreazza, directrice-adjointe et actuelle directrice, de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire.

Mes plus sincères remerciements vont à Sylvie Bonnamy pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années et surtout de m'avoir donné les moyens de réussir tout ce que j'ai voulu entreprendre. Vous m'avez également permis de participer à de nombreuses conférences et formations qui m'ont permis de m'épanouir dans cette thèse, pour cela je vous en remercie également. Pour finir, merci de votre bienveillance et de votre implication. Vous m'avez fait grandir humainement et scientifiquement, je vous en serai toujours reconnaissant.

Je remercie également Sandrine Delpoux d'avoir encadré ces trois années de thèse. Tes conseils, ton expertise et tes connaissances m'ont permis de démarrer dans les meilleures conditions. Les discussions qui ont suivies, qu'elles soient professionnelles ou personnelles, ont été un réel plaisir pour moi.

Je remercie Jérôme Chancolon, mon second encadrant, pour avoir toujours été à mon écoute dans les moments de doutes et surtout lors de cette période qu'était la rédaction. Je tiens également à te remercier pour m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement à travers ces trois années de TP à l'IUT.

Je souhaite également remercier Chantal Damia et Emmanuel Flahaut pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse. C'est un privilège pour moi de voir ce manuscrit être jugé sous votre expertise.

Un grand merci à Jean-Michel Bouler d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. C'est un réel plaisir de pouvoir vous présenter mes travaux.

Je tiens également à remercier Christophe Drouet et Nathalie Rochet d'avoir accepté de participer à ce jury.

Christophe, je tiens à te remercier pour toutes les discussions que nous avons pu avoir ensemble ces dernières années. Ton expérience m'a permis de mieux appréhender cette thèse et notamment tout ce qui touche aux apatites. Ces deux semaines à Toulouse ont été à la fois courtes et intenses mais surtout, elles ont ouvert une nouvelle voie à ce sujet. Merci d'avoir consacré autant de temps à mes travaux de thèse et j'espère avoir de nouveau la chance de travailler avec toi.

Nathalie, comment te remercier en quelques lignes. Tu m'as fait découvrir (et aimer) cette science « obscure » qui est, pour moi, la biologie. Ta gentillesse, ta patience et ta culture scientifique m'ont permis d'apprendre bien plus que je n'aurais pu imaginer. Tous ces voyages à Nice ne sont que d'incroyables souvenirs et j'ai rarement pris de plaisir à travailler autant, je dois l'avouer. Je ne te remercierai jamais assez pour m'avoir fait également découvrir le monde de l'expérimentation animale. Cette expérience restera comme l'une des plus extraordinaires et surtout une expérience qu'il faut vivre pour y croire. Pour toutes ces discussions, pour toutes ces expériences, je tiens à te

remercier. Je tiens également à remercier Zoubir Amri pour m'avoir accueilli au sein de cette merveilleuse équipe (Cécilia, Nadine, Jean-Claude et Didier). Je remercie tous les membres de cette équipe pour leur accueil et leur inestimable aide durant ces nombreux séjours. Je voudrais tout particulièrement remercier Didier pour le temps consacré avec, en plus, cette bonne humeur du sud. Je remercie Florian et David pour leur aide inestimable durant les manip *in vivo*. Et pour finir, je l'avais promis, une pensée pour : FISTOLE, TATOUILLE, VIOLI, CAILLE, DIN, CONTÉ, CINE, Clé, BOTé, PLATI, QUETTE, PEUR, MOLO, TEAU, STA, VAGEUR, VALLé, TURE, DEAU, VIN, LEUR, BIBOCHER, CLETTE et DIUS.

Je remercie Franck Fayon du temps qu'il a consacré à discuter et à partager son expérience. Toutes ces discussions ont été un réel plaisir, et découvrir la RMN du solide à tes côtés, un réel honneur. Merci également à Vincent Sarou-Kanian d'avoir réalisé les manip RMN et IRM. Je pense que je ne saurais jamais faire un spectre RMN, ni comprendre plus de la moitié de tes explications, mais discuter des résultats avec toi fut fort enrichissant et fort intéressant. J'espère qu'un jour, tu croiras aux biomatériaux à base de carbone ! Merci également à Emmanuel Veron d'avoir accepté de traiter mes diffractogrammes.

Merci à Caroline Richard pour les tests mécaniques que nous avons essayé de réaliser. Ne perdons pas espoir, un jour on y arrivera. Un grand merci à Antoine Debray et Michel Jeandin pour les expériences préliminaires de « choc laser ».

Je tiens également à remercier Annie Richard et Fabienne Warmont pour toutes ces magnifiques images de microscopie et à Reine Nehmé pour m'avoir formé au MP-AES.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'ICMN pour tous ces moments partagés durant ces trois dernières années. Je tiens particulièrement à remercier Nicole et Jennifer sans qui nous ne pourrions rien faire, Pierre (le meilleur informaticien au monde !), ainsi qu'Eric, Marie-Pierre, Margot et Fatou toujours prêt à donner un coup de main. Et comment ne pas remercier Pascal pour nous rappeler qu'il faut travailler mais qui est toujours le premier partant pour une pause-café. Enfin, un grand merci à Jimmy le plus permanent des non-permanents (ou l'inverse je ne sais jamais !). Tu parles trop Jimmy mais heureusement que tu es là pour nous, les jeunes chercheurs.

Mes plus chaleureux remerciements vont à tous les non-permanents du laboratoire. Des plus anciens qui m'ont accueilli (Quentin, Mika, David et Daniella) aux plus jeunes (Zineb, Imer et Fatima) en passant par les post-docs et les stagiaires. Une dédicace particulière à Quentin pour m'avoir aidé à m'intégrer dans le sujet et dans le labo ainsi qu'à David pour sa joie de vivre mais surtout pour son initiation « photomontage ». Et comment ne pas remercier du fond du cœur ceux qui ont fait la route avec moi...

Guillaume, même si tu n'as été qu'à 50 % là, je te remercie à 100 % pour les bons moments passés ensemble. Henriette (beauté des îles), je te remercie d'avoir supporté mon humour noir (black power !) pendant ces deux dernières années mais désolé c'est pas fini. Emilie, un grand merci pour ta gentillesse et pour toutes nos discussions. Si j'en avais le pouvoir (et je l'ai presque), je rajouterai un E à la fin de ICMN, après tout, tu es là depuis bien plus longtemps que certains permanents. Céline, tu es arrivée comme une furie, remplissant le labo de ton rire et de ton naturel. Merci, d'avoir rendu cette dernière année et surtout cette rédaction si ambiancée (et vive la bourgogne cousine !). Aynur (ma préférée ?), même si je dis souvent l'inverse, tu tapes plus par ta bonté et ta gentillesse que par tes poings (parfois quand même !). Merci infiniment de toute l'attention que tu m'as portée, surtout ces derniers mois.

Jérôme, jéré (et je tairai les autres surnoms), que la route fut belle. Trois ans de sciences, de discussions, de doutes mais surtout de rire et de bon souvenirs. Je n'aurais jamais pu espérer trouver meilleur camarade de voyage et encore moins, un si bon ami. Malgré tes immenses défauts (tu es quand même belge et physicien !) et tes petits mollets, je tiens à te remercier pour toutes les incroyables aventures qu'on a vécues ensemble. Je ne pourrais te remercier sans une petite pensée pour Jeanne. Et je promets qu'un jour, elle ne gagnera pas au TC.

Sarra, un immense merci pour tout ce que tu m'as apporté et pour m'avoir autant supporté ces dernières années. Nos discussions, tes monologues, nos fous rires et parfois nos désaccords ne sont que de merveilleux souvenirs. Merci de m'avoir enrichi autant scientifiquement qu'humainement (comme quoi, tu es bien la preuve que sagesse rime avec vieillesse !). Par-dessus tout, je voudrais te remercier d'avoir toujours été présente dans les bons comme dans les mauvais moments, ton soutien, ton écoute et tes conseils ont été des plus précieux. Je tiens également à remercier chaleureusement Mourad (Moudar !). Merci à vous pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble (en France ou en Tunisie). شكر يا اصدقائي.

Je tiens à remercier la biz family sans que, ni le temps, ni la distance nous éloigne. Merci d'avoir toujours été là, que ce soit dans les moments de bonheur ou de tristesse. Je n'ai qu'une chose à vous dire « bisous câlins les amis ».

Je remercie ma belle-famille pour leur soutien tout au long de cette thèse. Il n'y rien de mieux pour s'évader que de se retrouver autour d'un bon verre de vin et d'un bon repas (Et chez vous, c'est la bonne adresse !).

Je remercie également toute ma famille pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de cette aventure. Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents qui m'ont permis de réaliser tous mes projets et qui m'ont soutenu, peu importe mes choix. J'espère qu'à travers ces quelques lignes vous trouverez toute la reconnaissance que je vous porte. Et si l'envie vous prend de lire les quelques pages qui suivent alors vous comprendrez, j'espère (peut-être !), ce que je fais depuis trois ans maintenant.

Inès, Agathe, que ce travail soit la preuve qu'aucun échec, qu'aucun obstacle de la vie ne peut empêcher d'accomplir ses rêves.

Mes derniers remerciements vont à Claire Ducatillon. Voilà des années que nous passons main dans la main chaque étape de la vie. Celle-ci n'aurait jamais pu se réaliser sans ton aide, sans ta présence et sans ta bienveillance. Je n'aurais jamais eu la force d'entreprendre et de réussir tout cela sans ton amour, sans notre amour. Une étape à peine passée et en voilà une autre qui arrive à grand pas, sûrement la plus belle. Je crois que les plus beaux remerciements, les plus beaux mots d'amour que nous lirons seront ceux écrits sur un petit bracelet, sur un petit poignet....

Glossaire des abréviations

AA : Aspirine

CaP : Phosphate de calcium

CDA : Hydroxyapatite déficitaire en calcium (Calcium deficient apatite)

CEMHTI : Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation

CEISAM : Chimie et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation

CIRIMAT : Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux

CP-MAS : RMN MAS par transfert de polarisation

DEAS : Diffraction électronique à aire sélectionnée

DTP : Désorption à température programmée

DRX : Diffraction des rayons X

EDX : Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie

FC : Fibre de carbone

HAP : Hydroxyapatite stœchiométrique

HETCOR : RMN MAS de corrélation hétéronucléaire

HOST : Ostéoblaste (Human osteoblast)

iBV : Institut de Biologie Valrose

ICMN : Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructure

IRCER : Institut de Recherche sur les Céramiques

IRM : Imagerie à résonance magnétique

IRTF : Infrarouge à transformée de Fourier

MEB : Microscopie électronique à balayage

MET : Microscopie électronique à transmission

MP-AES : Spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (Microwave plasma atomic emission spectroscopy)

NPX : Naproxène

OCP : Phosphate octocalcique

RMN MAS : Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire en rotation à l'angle magique

TC : Tétracycline

TFC : Tissu de fibres de carbone

μ-CT : Microscanner (micro-computed tomography)

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	7
Sommaire.....	9
A. Les tissus de fibres de carbone	11
A.1. Introduction	11
A.2. Fabrication des fibres et tissus de fibres de carbone	12
A.2.1. Procédé général d'obtention des fibres de carbone	12
A.2.2. Procédé général d'obtention des tissus de fibres de carbone	14
A.3. Caractéristiques des fibres et des tissus de fibres de carbone	15
A.4. Application des fibres de carbone et les tissus de carbone en régénération osseuse	16
B. Les phosphates de calcium	18
B.1. Introduction	18
B.2. L'hydroxyapatite.....	20
B.2.1. Généralités.....	20
B.2.2. Structure cristallographique de l'HAP	20
B.3. Les apatites nanocristallines de synthèse	22
B.4. Substitution des apatites nanocristallines de synthèse	24
B.4.1. Généralités.....	24
B.4.1. Cas du strontium.....	24
B.5. Combinaison apatite – principe actif	25
C. La régénération osseuse.....	27
C.1. Introduction	27
C.2. Le remodelage osseux	27
C.3. Les substituts osseux	29
C.3.1. Les matériaux de substitution osseuse	29
C.3.2. Les céramiques	30
C.4. Effet du strontium sur la régénération osseuse	31
C.5. Effet de l'aspirine sur la régénération osseuse	31
Positionnement du sujet	34

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP	37
Sommaire.....	39
Introduction	41
A. Le substrat : Tissu de fibres de carbone	42
A.1. Caractéristiques des tissus de fibres de carbone	42
A.2. Caractéristiques physico-chimiques des tissus de fibres de carbone	43
A.2.1. Composition chimique	43
A.2.2. Caractéristiques texturales	46
A.2.3. Conclusion	50
B. Le matériau hybride : TFC / CaP.....	52
B.1. Protocole de synthèse du revêtement de CaP par sono-électrodéposition	52
B.1.1. Introduction	52
B.1.2. Dispositif expérimental	53
B.1.3. Synthèse de CaP par sono-électrodéposition	54
B.1.3.1. Principe.....	54
B.1.3.2. Paramètres expérimentaux.....	56
B.2. Optimisation de la synthèse du revêtement de CaP	58
B.2.1. Influence de la durée de polarisation	58
B.2.2. Influence de la polarisation : mode potentiostatique	60
B.2.3. Influence de la température de l'électrolyte	64
B.2.4. Conclusion.....	66
B.3. Influence du substrat	67
C. Caractérisation du revêtement de phosphate de calcium déposé sur le tissu de fibres de carbone FM 50K® par sono-électrodéposition à -1 V	70
C.1. Homogénéité du revêtement de CaP	70
C.2. Caractérisations texturales du matériau hybride – Influence du revêtement de CaP	73
C.3. Caractérisations physico-chimiques du revêtement de CaP	75
C.3.1. Caractérisation du revêtement de CaP par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	75
C.3.2. Caractérisation du revêtement de CaP par diffraction des RX	78
C.3.3. Caractérisation du taux de carbonate dans le revêtement de CaP	80
C.3.4. Caractérisation morphologiques et microtexturales du revêtement de CaP synthétisé à -1 V.....	81
C.3.5. Détermination des rapports CaP par analyses EDX-MEB et EDX-MET	85

C.3.6. Caractérisation de la structure du revêtement de CaP par spectroscopie RMN Haute Résolution Solide	85
D. Discussion et Bilan sur les caractéristiques du matériau hybride : TFC / CaP	88
 Chapitre III. <i>Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride</i>	93
Sommaire.....	95
Introduction	97
A. Synthèse et caractérisations physico-chimiques des revêtements dopés en strontium	99
A.1. Introduction	99
A.2. Protocole de synthèse.....	100
A.3. Résultats des caractérisations des revêtements de CaP dopés en Sr^{2+}	101
A.4. Discussion.....	111
B. Couplage matériau hybride – principe(s) actif(s)	112
B.1. Introduction	112
B.2. Matériaux et principes actifs (PA)	114
B.3. Protocole d'adsorption.....	115
B.3.1. Adsorption sur apatite	115
B.3.2. Adsorption des principes actifs sur tissu de carbone et sur matériau hybride.....	115
B.4. Résultats.....	116
B.4.1. Adsorption de principes actifs sur l'apatite biomimétique.....	116
B.4.1.1. Adsorption de la tétracycline (TC)	116
B.4.1.2. Adsorption du naproxène (NPX).....	117
B.4.1.3. Discussion	118
B.4.2. Adsorption des principes actifs sur tissu de fibres de carbone	120
B.4.2.1. Adsorption de la tétracycline et du naproxène	120
B.4.2.2. Adsorption de l'aspirine	122
B.4.3. Adsorption de principes actifs sur le matériau hybride.....	125
B.4.3.1. Introduction.....	125
B.4.3.2. Adsorption de l'aspirine sur le matériau hybride	126
B.4.3.3. Adsorption de l'aspirine et de la tétracycline au sein des 2 constituants du matériau hybride	129
B.4.4. Réversibilité de l'adsorption des principes actifs par le tissu de carbone et sur l'apatite biomimétique.....	131
B.5. Discussion.....	132

Chapitre IV. Evaluation biologique Etude in vitro	135
Sommaire.....	137
Introduction	139
A. Matériels et méthodes.....	141
A.1. Matériaux utilisés.....	141
A.2. Culture des HOST sur les matériaux.....	143
A.3. Différenciation ostéoclastique des monocytes sur les matériaux	144
A.4. Tests biologiques.....	144
A.4.1. « The Live / Dead Cell Double Staining »	144
A.4.1.1. Principe.....	144
A.4.1.2. Méthodologie.....	144
A.4.2. « XTT Cell Proliferation Assay »	145
A.4.2.1. Principe.....	145
A.4.2.2. Méthodologie.....	145
A.4.3. Tartrate Resistant Acide Phosphatase (TRAP)	145
A.4.3.1. Principe.....	145
A.4.3.2. Méthodologie.....	146
B. Résultats	146
B.1. Choix du tissu de fibres de carbone	146
B.2. Caractérisation des propriétés d'adsorption des tissus de carbone	148
B.2.1. Adsorption des molécules du milieu de culture	149
B.2.2. Adsorption du formazan	149
B.3. Effets des matériaux sur la viabilité et la prolifération des HOST	150
B.3.1. Viabilité des HOST en périphérie des matériaux	150
B.3.2. Viabilité des HOST à la surface des matériaux.....	153
B.3.3. Effet des matériaux sur la prolifération cellulaire	155
B.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des cellules HOST à la surface des matériaux hybrides.....	157
B.5. Effet biologique d'un matériau hybride FM 50K®+0Sr-CaP dopé en principes actifs (PA).....	158
B.5.1. Effet des PA sur la viabilité des HOST	158
B.5.2. Effet des PA sur la prolifération des HOST.....	159
C. Discussion.....	161

Chapitre V. <i>Evaluation biologique Etude in vivo</i>	163
Sommaire.....	165
Introduction	167
A. Matériels et méthodes.....	167
A.1. Préparation des biomatériaux	167
A.2. Expérimentation.....	168
A.2.1. Animaux	168
A.2.2. Protocole chirurgical	168
A.2.3. Soins post opératoires et observations cliniques	170
A.2.4. Sacrifice et dissection des fémurs.....	170
A.3. Techniques d’analyses	171
A.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	171
A.3.2. Microscanner à rayon-X (μ-CT)	171
A.3.3. Imagerie par résonnance magnétique (IRM).....	171
A.3.4. Spectroscopie RAMAN	172
A.3.5. Histologie	172
B. Résultats	173
B.1. Animaux	173
B.2. Caractérisation du devenir des biomatériaux	173
B.3. Caractérisation de la régénération osseuse	177
B.3.1. Analyse de la régénération osseuse après 13 jours.....	177
B.3.2. Analyse de la régénération osseuse après 26 jours.....	183
C. Discussion.....	193

Conclusion et Perspectives	197
Sommaire.....	199
Conclusion.....	201
Perspectives	208
A. Perspectives « directes »	208
A.1. Dopage des constituants du matériau hybride	208
A.2. Expérimentation animale	209
B. Perspectives « indirectes ».....	210
B.1. Autre méthode de synthèse : Exemple de la « pyrolyse spray »	211
B.1.1. Dispositif et principe	211
B.1.2. Paramètres expérimentaux	213
B.1.3. Résultats préliminaires	213
B.2. Caractérisation mécanique : Exemple du « choc laser »	215
B.2.1. Principe du « choc laser »	215
B.2.2. Caractéristiques techniques	215
B.2.3. Résultats et discussions préliminaires	216

Annexes.....	219
Sommaire.....	221
Annexe 1 : Analyse élémentaire – CHONS.....	223
Annexe 2 : Microscopie électronique à balayage (MEB)	224
Annexe 3 : Dosage potentiométrique des groupes de surface du substrat carboné	225
Annexe 4 : Porosimétrie mercure	226
Annexe 5 : Adsorption de gaz.....	227
Annexe 6 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	228
Annexe 7 : Diffraction des rayons-X (DRX)	229
Annexe 8 : Désorption à température programmée (DTP).....	230
Annexe 9 : Microscopie électronique à transmission (MET).....	233
Annexe 10 : Fiche JCPDS.....	235
Annexe 11 : Résonance magnétique nucléaire (RMN) pour les solides.....	236
Annexe 12 : Spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES).....	237
Annexe 13 : Spectroscopie UV-Visible	238
Annexe 14 : Grille d'évaluation	239
Annexe 15 : Compte rendu opératoire.....	240
Annexe 16 : Grille de traitement	241
Annexe 17 : Feuille de surveillance.....	242
Annexe 18 : Analyse des images obtenues par microscanner	243
 Références bibliographiques	 245
Communications orales	257
Posters.....	258
Publication dans des revues à comité de lecture.....	258
Article de vulgarisation	258
Formations.....	258

Introduction générale

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants de l'univers. Il est à la base de la vie sur Terre et l'un des principaux composants de tous les êtres vivants. L'exploitation par l'Homme des multiples propriétés du carbone commence dès l'antiquité et est plus que jamais présente dans notre quotidien. Ces derniers siècles, l'étude et l'utilisation du carbone n'ont cessé de croître en raison de la multitude de formes allotropiques qu'il offre et des propriétés physiques et physico-chimiques associées [1].

L'étude des matériaux carbonés est un des axes de recherche du laboratoire ICMN (UMR 7374 CNRS – Université d'Orléans). Au sein de cet axe, les activités de recherche se structurent autour de matériaux carbonés fonctionnels, nanotexturés, fonctionnalisés, avec une démarche d'étude allant de l'élaboration du matériau, à la modification de leurs caractéristiques de façon à les adapter aux propriétés recherchées, à leurs caractérisations physico-chimiques, texturales et structurales, jusqu'à leur intégration dans des systèmes ; pour des applications dans des domaines aussi variés que la protection de l'environnement, l'aéronautique, la santé,... Parmi les matériaux carbonés étudiés, les tissus de fibres de carbone activées sont utilisés, en particulier, en tant que matériaux adsorbants, du fait de leur porosité très développée, mais également pour leur propriété de conductivité électrique, dans des procédés de dépollution de l'eau [2–5].

Les tissus de fibres de carbone, de par leurs caractéristiques physico-chimiques, texturales et structurales spécifiques (porosité, chimie de surface, organisation multi-échelle, ...) et leurs propriétés singulières (tenue mécanique, flexibilité et conductivité électrique), sont étudiés à l'ICMN depuis 2012 comme substrat de « biomatériaux » pour la régénération osseuse [6–8].

Actuellement, dans le domaine biomédical, les (nano)structures carbonées et les matériaux carbonés sont utilisés, le plus souvent, en tant que constituant de matériaux composites, à titre d'exemples, certaines prothèses sont constituées de composites C/C à base de fibres de carbone [9,10] ; les matériaux de valves cardiaques sont constitués de carbone pyrolytique, ... Dans le domaine de la régénération osseuse, les fibres de carbone ont été notamment utilisées, ces dernières années, comme renfort mécanique de l'hydroxyapatite [11,12].

En ce qui concerne l'hydroxyapatite, et plus généralement les phosphates de calcium, ce sont les substituts osseux les plus couramment étudiés et utilisés en réparation osseuse. Les développements récents sur les biomatériaux de substitution osseuse concernent des matériaux avancés (des apatites biomimétiques, à titre d'exemple), auxquels sont associées des molécules biologiquement actives dont le relargage contrôlé pourrait permettre une administration thérapeutique très locale au cœur des zones à traiter.

L'objectif des travaux de recherche réalisés à l'ICMN dans le domaine des biomatériaux est d'utiliser les tissus de fibres de carbone comme substrats sur lesquels sont déposés des phosphates de calcium pour élaborer un biomatériau qui agira, non pas comme matériau de substitution d'une lésion osseuse (combler osseux), mais comme matériau biocompatible et flexible qui servira de support à la régénération osseuse. La flexibilité des tissus de fibres de carbone permet d'envisager une application de ces nouveaux biomatériaux sur n'importe quel site osseux (adaptation du tissu à toute géométrie).

Dans un premier temps, les travaux de recherche se sont focalisés sur la possibilité de déposer à la surface des tissus de carbone différents phosphates de calcium. Le matériau hybride obtenu étant alors capable de délimiter la zone de reconstruction osseuse et de stimuler la régénération osseuse dans la zone fracturée ou ayant un déficit osseux. Deux tissus de fibres de carbone ont été étudiés et différentes voies de synthèse des phosphates de calcium ont été explorées, ainsi que les mécanismes réactionnels associés. Les objectifs étant d'obtenir à la surface de l'architecture du tissu de carbone, poreuse, flexible, « biocompatible », une couche micrométrique ou sub-micrométrique de phosphate de calcium, le plus biomimétique possible.

Dans un deuxième temps, de nouvelles voies de développement du matériau hybride (tissu de fibres de carbone / revêtement de CaP) ont été mises en œuvre, elles font l'objet de mon travail de thèse. Elles consistent à modifier les caractéristiques physico-chimiques et structurales, ainsi que les propriétés du revêtement de CaP par substitution du calcium par un ion connu pour ses propriétés en régénération osseuse comme le strontium, mais également par adsorption de molécules biologiquement actives, à la fois sur le substrat, et sur le dépôt apatitique. L'objectif étant de conférer au matériau hybride des propriétés qui soient additionnelles, telles qu'antalgiques, anti-inflammatoires ou anti-infectieuses. Dans un troisième temps, les propriétés de biocompatibilité des matériaux hybrides élaborés sont évaluées. Cette étape est indispensable pour envisager leur application en tant que biomatériau support pour la régénération osseuse.

Afin de répondre au sujet de recherche de la thèse et à ces problématiques, une méthodologie spécifique a été mise en place. Le travail de cette thèse a été divisé en cinq phases correspondant aux cinq chapitres autour desquels ce manuscrit s'articule.

Le premier chapitre permet, à travers une synthèse bibliographique, d'explicitier le cheminement suivi pour aboutir à la conception du matériau hybride constitué d'un substrat, un tissu de fibres de carbone, recouvert d'un phosphate de calcium, tel qu'il est élaboré lors de cette étude. Le choix du substrat, les fibres et les tissus de fibres de carbone, sont en premier lieu décrits, puis les spécificités des phosphates de calcium sont détaillées. Enfin, les notions élémentaires de régénération osseuse sont

présentées pour donner une vision des attendues, en termes d'efficacité, de tels biomatériaux. Pour terminer ce chapitre le positionnement du sujet de thèse est explicité.

Le deuxième chapitre décrit les résultats obtenus concernant l'élaboration du revêtement de phosphate de calcium en surface de tissus de fibres de carbone et les caractérisations du matériau hybride et de ses constituants. Un des objectifs du travail de thèse a été d'optimiser les paramètres du procédé de sono-électrodéposition, afin de déposer en surface des tissus de fibres de carbone, un revêtement de phosphate de calcium (CaP) qui soit couvrant, homogène et adhérent. Ce chapitre rassemble également l'ensemble des résultats obtenus sur les caractérisations physicochimiques, microtexturales et structurales des tissus de fibres de carbone et des revêtements de phosphates de calcium.

Le troisième chapitre est consacré au développement des potentialités du matériau hybride selon deux aspects. Un premier aspect consiste à « doper » le revêtement de CaP en substituant le calcium par un cation à visée thérapeutique, le strontium. L'élaboration et la caractérisation de ces nouveaux matériaux hybrides ainsi dopés sont présentées. Le second aspect consiste à utiliser les propriétés d'adsorption des deux matériaux constitutifs du matériau hybride, à savoir l'adsorption de principes actifs, à la fois dans la porosité du substrat carboné et en surface du revêtement de phosphate de calcium. L'étude de l'adsorption de principes actifs a été réalisée individuellement sur un tissu de fibres de carbone et sur une apatite biomimétique de référence, puis sur le matériau hybride. La réversibilité de l'adsorption, permettant un relargage local des espèces biologiquement actives préalablement adsorbées, a également été évaluée.

Le quatrième chapitre présente l'évaluation biologique *in vitro* des différents matériaux hybrides élaborés dans les chapitres II et III. La viabilité et la prolifération d'ostéoblastes humains en présence des matériaux hybrides ont notamment été évaluées. A la suite de ces expériences, deux matériaux hybrides ont été sélectionnés pour l'expérimentation animale.

Le cinquième chapitre décrit l'évaluation *in vivo* chez le rat dans un modèle de petit défaut osseux pour les deux matériaux hybrides sélectionnés. Les résultats sur la régénération osseuse sont présentés et discutés.

Enfin, une conclusion générale présente une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus au cours du travail de thèse et les perspectives envisagées, tant dans le domaine de la synthèse (développement d'une nouvelle technique de dépôt de CaP par « pyrolyse spray ») que dans la mise en œuvre de nouvelles techniques de caractérisation (technique « choc laser » pour l'étude des propriétés d'adhérence des dépôts de CaP).

Introduction générale

A noter que cette étude a été initiée au sein du programme européen « ABREM » (Advanced Biomaterials for REgenerative Medicine (2012-2016)) sous la coordination du Professeur Sergey Mikhlovsky, Université de Brighton (UK). Elle s'est ensuite développée autour de deux autres projets : « MatBioReOs » (Matériaux Bio-actifs hybrides pour la Reconstruction Osseuse (2014-2017)) et « MatCCaP-Bio » (Matériaux hybrides flexibles bioactifs carbone/CaP aux propriétés anti-infectieuses et antalgiques (2018-2020)), financés par la Région Centre-Val de Loire. Ces projets ont été déterminants pour la mise en place des travaux présentés dans ce manuscrit.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Sommaire

A. Les tissus de fibres de carbone	11
A.1. Introduction	11
A.2. Fabrication des fibres et tissus de fibres de carbone	12
A.2.1. Procédé général d'obtention des fibres de carbone	12
A.2.2. Procédé général d'obtention des tissus de fibres de carbone	14
A.3. Caractéristiques des fibres et des tissus de fibres de carbone	15
A.4. Application des fibres de carbone et les tissus de carbone en régénération osseuse	16
B. Les phosphates de calcium	18
B.1. Introduction	18
B.2. L'hydroxyapatite	20
B.2.1. Généralités	20
B.2.2. Structure cristallographique de l'HAP	20
B.3. Les apatites nanocristallines de synthèse	22
B.4. Substitution des apatites nanocristallines de synthèse	24
B.4.1. Généralités	24
B.4.1. Cas du strontium	24
B.5. Combinaison apatite – principe actif	25
C. La régénération osseuse	27
C.1. Introduction	27
C.2. Le remodelage osseux	27
C.3. Les substituts osseux	29
C.3.1. Les matériaux de substitution osseuse	29
C.3.2. Les céramiques	30
C.4. Effet du strontium sur la régénération osseuse	31
C.5. Effet de l'aspirine sur la régénération osseuse	31

A. Les tissus de fibres de carbone

A.1. Introduction

Parmi les formes de carbone les plus connues, on peut citer, le diamant [13], le graphite [14], les carbones désordonnés [1], les fullerènes [15], les nanotubes de carbone monoparoi [16] et multiparois, et le graphène [17,18]. Des formes plus sophistiquées comme les nanocornes [19], les nanofibres de carbone [20] et les nanocônes [21] ont également été développées depuis les années 1990. Les principales formes du carbone (ou formes allotropiques) sont représentées sur la Figure I-1.

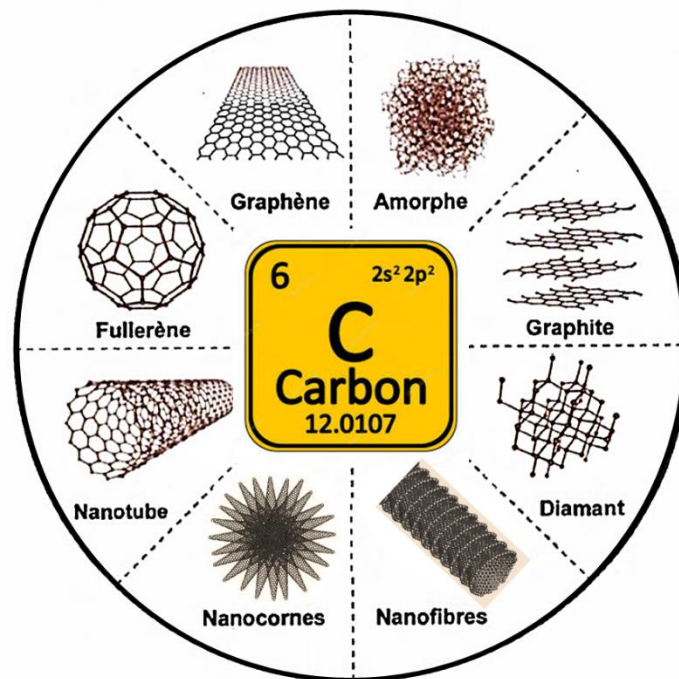


Figure I-1 : Principales formes allotropiques du carbone.

Ces matériaux carbonés ont, en règle générale, d'excellentes propriétés électriques, une dureté et une résistance mécanique élevées, ainsi qu'une stabilité chimique et thermique importante [22].

Parmi les formes du carbone, les fibres de carbone (FC) tiennent une place importante, notamment en tant que renfort de matériaux composites mais également en tant que constituant des architectures textiles (nappes, tissus, feutres, ...). Elles sont utilisées, ainsi que les tissus de fibres de carbone (TFC), dans des domaines tels que l'aéronautique et l'automobile [23].

Comme tous les carbones, les propriétés des fibres de carbone et des tissus de fibres de carbone sont fortement dépendantes de leur mode d'élaboration. Afin de mieux comprendre l'organisation de ces matériaux, il est nécessaire de connaître leurs méthodes de fabrication. Quelques éléments quant à la

fabrication des fibres de carbone et des tissus de fibres de carbone, ainsi que leurs principales caractéristiques et utilisations, sont exposés ci-après.

A.2. Fabrication des fibres et tissus de fibres de carbone

Un certain nombre de procédés industriels existent pour fabriquer des fibres de carbone et des tissus de fibres de carbone, ils suivent tous les mêmes grandes étapes de fabrication. Dans les paragraphes suivants, seront décrites les principales étapes de fabrications des fibres de carbone puis des tissus de fibres de carbone.

A.2.1. Procédé général d'obtention des fibres de carbone

Les fibres de carbone sont principalement utilisées comme matériau de renfort dans les matériaux composites. Elles sont le plus souvent assemblées sous forme de feutres ou de tissés 2D, 2,5D, 3D, ... selon l'application désirée.

On distingue plusieurs types de fibres de carbone que l'on peut classer selon divers critères [24] :

- l'origine chimique du précurseur : polyacrylonitrile (PAN), résine phénolique, brai, cellulose, lignine ou fibres générées à partir d'un gaz (fibres déposées en phase gazeuse (VGCF),
- le traitement thermique final, qui peut varier de 1100°C à 2800°C,
- les propriétés mécaniques : fibres **ultra-haut module** (module de Young $E > 600$ GPa), **haut module** (E varie de 300 à 600 GPa, σ varie de 1,6 à 3 GPa où σ est la résistance à la rupture) et **haute résistance** (E est d'environ 200 à 300 GPa, σ varie de 3 à 7 GPa) [25,26],

Les fibres de carbone les plus souvent utilisées sont celles obtenues à partir de précurseurs tels que le polyacrylonitrile ou le brai. Pour les fibres de carbone activées, les précurseurs les plus souvent utilisés sont la résine phénolique ou la cellulose ou la lignine. La Figure I-2 représente les différentes étapes du procédé d'obtention des fibres de carbone à partir du polymère acrylonitrile (fibres dites ex-PAN), à noter que le procédé permettant l'obtention des fibres de carbone ex-cellulose passe par des étapes similaires.

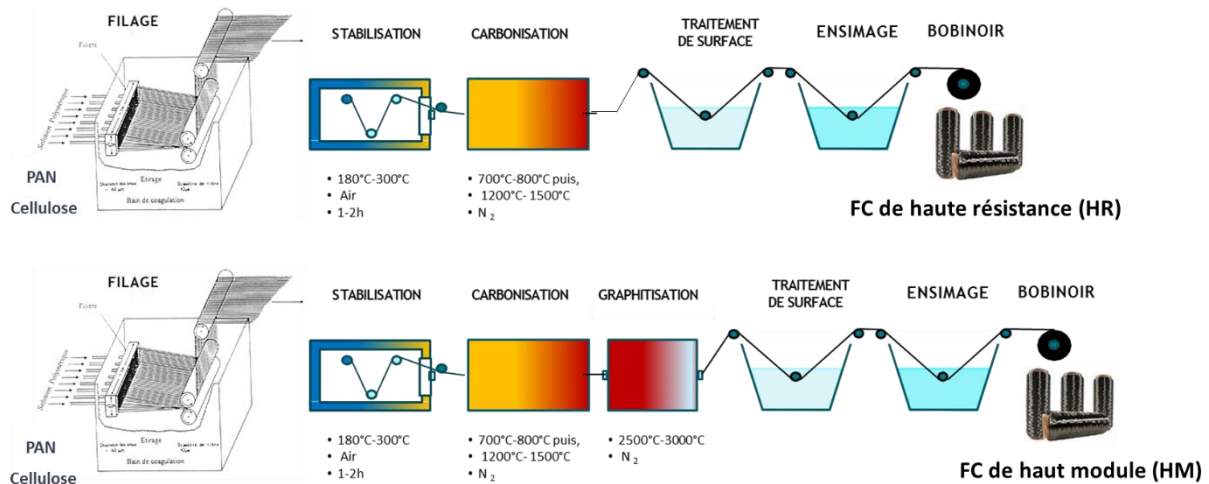


Figure I-2 : Procédé de fabrication des fibres de carbone ex-PAN ou ex-cellulose.

En premier lieu, des mèches (ensemble de fibres) de PAN sont fabriquées selon la technologie de polymérisation et de filage des fibres acryliques à usage textile par voie solvant et coagulation. L'étape de stabilisation permet de stabiliser le précurseur et de le rendre moins fusible lors des étapes thermiques suivantes. En effet, lors de l'oxydation sous air, le précurseur est partiellement déshydrogéné et des doubles liaisons se forment. Il est alors carbonisé sous azote à haute température (750 – 1500 °C). Au cours de ce processus, les fibres perdent environ 60 % de leur masse et contiennent alors entre 90 et 97 % en masse de carbone, moins de 10 % d'azote et environ 1 % d'hydrogène. Lors de cette étape de carbonisation, le réarrangement des plans aromatiques, qui se produit de façon continue, détermine directement les caractéristiques mécaniques de la fibre. Les propriétés élastiques de la fibre varient en continu et il est donc nécessaire de maintenir une tension contrôlée tout au long du procédé. A l'issue de cette étape, la fibre est qualifiée de fibre à « haute résistance ». Une deuxième étape en température peut être réalisée, dite de graphitisation. Elle consiste à traiter à très haute température (2000 – 3000 °C) les fibres carbonisées graphitées sous atmosphère inerte et sous tension mécanique contrôlée pendant quelques minutes. Les fibres contiennent alors 100 % de carbone et comparées aux fibres simplement carbonisées, possèdent une structure où l'unité structurale de base (USB) contient un nombre de feuillets aromatiques plus élevé, cela permet une croissance des feuillets aromatiques ainsi que leur alignement le long de l'axe de la fibre. Les fibres de carbone perdent alors en résistance à la traction mais gagnent en module élastique formant une fibre de carbone dite « de haut module » (HM). Il est possible d'obtenir des fibres à « module intermédiaire » en jouant sur les différentes étapes thermiques entre 1600 et 2400°C.

Il arrive souvent que des étapes supplémentaires soient réalisées sur les fibres de carbone. En effet, le carbone est chimiquement peu réactif et présente donc naturellement une faible adhérence notamment avec les matrices polymériques. Il est alors essentiel de rendre les fibres de carbone plus adhérentes lors de l'obtention d'un composite. Pour ce faire, elles sont traitées par des procédés

chimiques [27] ou physiques [28]. Les traitements de surface ont pour but d'améliorer l'affinité entre la fibre de carbone, très peu réactive, et les matrices polymères dans l'élaboration des composites C/C. Ces traitements dits d'activation permettent d'activer les fibres de carbone. Ce procédé consiste à ouvrir la porosité interne ainsi qu'à augmenter la surface spécifique de ces fibres. Les fibres de carbone ainsi activées présentent alors une grande capacité d'adsorption utile dans des applications telles que la dépollution de l'eau ou encore comme substrat pour le relargage contrôlé de principes actifs.

Une étape finale peut consister à revêtir la fibre d'un film mince, appelée ensimage, en sortie de filière sur les filaments de fibres de carbone. L'ensimage a pour fonction de lier les mono-filaments dans une mèche et d'améliorer la résistance au frottement (effet lubrifiant). Il donne un glissant aux fils de fibres et réduit les charges électrostatiques facilitant ainsi la mise en œuvre des fibres de carbone lors des opérations d'enroulement, de tissage ou de pré-imprégnation dans la matrice. Le choix de l'utilisation de l'ensimage est déterminé par l'application envisagée pour les fibres de carbone.

A.2.2. Procédé général d'obtention des tissus de fibres de carbone

Les tissus de fibres de carbone (TFC) consistent en un assemblage de fibres dans de multiples directions. Un grand nombre d'architectures est décrit dans la littérature, elles confèrent aux tissus de carbone ses propriétés. Les procédés utilisés afin de produire des tissus de fibres de carbone sont directement inspirés de ceux de l'industrie du textile. L'étape de tissage est effectuée entre les étapes d'oxydation et de carbonisation. En prenant l'exemple d'un tissu de fibres de carbone qui sera utilisé dans ce travail, le tissu FM 50K[®] provenant de la société ZORFLEX[®], le précurseur des fibres de carbone constituant le tissu est la cellulose. Une série de traitements chimiques va conduire à former une cellulose régénérée selon un procédé dit « viscose ». Celle-ci sera ensuite extrudée à travers une filière (voir Figure I-2) pour former des fils précurseurs appelés « fils de rayonne ». Ces fils sont assemblés et parfois torsadés, ils vont former « des mèches » qui peuvent comprendre jusqu'à plusieurs milliers de fibres (le nombre est variable selon le fabricant). Ces mèches sont tricotées dans le cas du tissu FM 50K[®] (mais peuvent être tissées, cas du tissu KIP 1200[®]) suivant différentes armures (toile, satin, sergé). Ces différents tissus sont ensuite carbonisés sous azote puis activés à la vapeur d'eau entre 850 et 950 °C.

A noter qu'il existe un grand nombre d'architectures, divisées en famille (non-tissé, unidirectionnelle, 2D et 3D) puis en sous famille. Lors de cette étude, le tissu correspond à une architecture de type 2D. Cette famille est divisée en 3 sous familles qui sont : les tissées, les tricotées et les tressées. Un exemple de chaque sous famille est donné dans la Figure I-3. L'architecture de type tissé représentée sur la Figure I-3 a) correspond au tissu KIP 1200[®] de la société DACARB[®]. L'architecture de type tricoté représentée sur la Figure I-3 b) correspond au tissu FM 50K[®] provenant de la société ZORFLEX[®]. A noter

que l'architecture tricotée confère au tissu une meilleure tenue physique des fibres et moins d'effilochage du matériau. Les caractéristiques physicochimiques de ces matériaux seront décrites dans le chapitre II, paragraphe A.

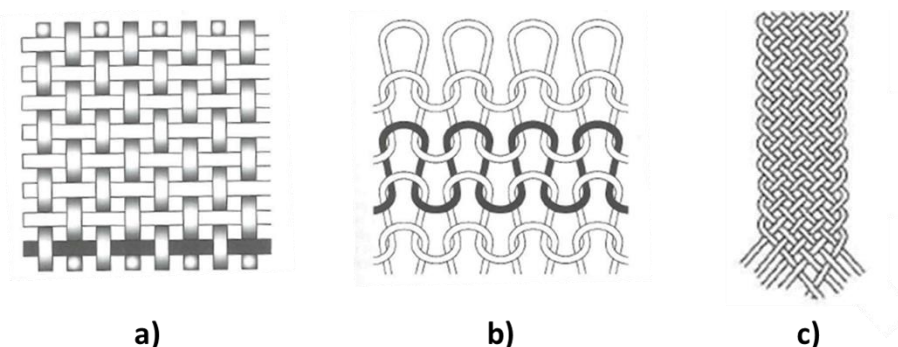


Figure I-3 : Schémas des architectures des tissus : a) Tissu tissé de type armure toile, b) Tissu tricoté de type maille et c) Tissu tressé de type cylindrique [20].

A.3. Caractéristiques des fibres et des tissus de fibres de carbone

Les FC et donc les TFC présentent généralement des propriétés mécaniques élevées ainsi que de bonnes conductivités thermiques et électriques. C'est pour ces trois principales raisons que les fibres de carbone sont très utilisées dans les matériaux composites dits à « hautes performances ». Dans certains cas, après activation, les fibres de carbone possèdent une porosité multi-échelle. En définitif, les caractéristiques des fibres de carbone sont principalement dépendantes du précurseur, du procédé de fabrication, de l'histoire thermique de la fibre, des post-traitements, qui vont déterminer sa morphologie, sa composition chimique, sa structure et sa microtexture. Les caractéristiques des fibres de carbone vont gouverner leurs propriétés physiques (mécanique, thermo-mécanique, conductivités thermique et électrique, résistance à l'abrasion, ...) et leurs propriétés interfaciales en fonction des traitements de surface qu'elles vont subir. Toutes ces caractéristiques et propriétés en font des matériaux utilisés dans de nombreux domaines d'activité.

Les deux principaux secteurs d'applications sont l'aéronautique et l'automobile [23]. Néanmoins, l'utilisation des fibres de carbone et des tissus de carbone s'étend à d'autres secteurs, tels que ceux de l'énergie [29], de l'environnement [2,5] ou encore de la santé [30]. Les fibres de carbone sont parfois utilisées dans le domaine de la santé. On peut souligner qu'elles ont été testées, en tant que substituts des tendons et ligaments [31,32], pour la régénération osseuse [11,12,33,34] et aussi en tant que constituant de matériaux composites C/C utilisés comme prothèses osseuses [9,10]. Parmi tous ces secteurs d'application, celui de la régénération osseuse a particulièrement retenu notre attention.

A.4. Application des fibres de carbone et les tissus de carbone en régénération osseuse

Les fibres de carbone et les tissus de fibres de carbone sont des matériaux biocompatibles et bioinertes. Dans le domaine de la santé, ils sont majoritairement envisagés comme renfort fibreux pour améliorer les propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite tout en conservant les propriétés de biocompatibilité et bioactivité de celle-ci [11,12,33–36]. Les études concernant le renfort de l'HAP par des fibres de carbone se sont principalement concentrées sur les voies de synthèses de ces matériaux dits « hybrides » ainsi que sur les différences entre les propriétés mécaniques de l'HAP seule et de l'hydroxyapatite renforcée en fibres.

Nous n'avons retrouvé aucune étude récente effectuée chez l'animal ou chez l'homme concernant l'utilisation des tissus de fibres de carbone pour une application dans le domaine de la régénération osseuse. D'un point de vue général, il existe très peu d'études publiées sur l'utilisation *in vivo* des fibres de carbone associées ou non à une hydroxyapatite et moins encore concernant l'utilisation seule des tissus de fibres de carbone.

En 1978, les travaux d'Adams *et al.* ont montré la biocompatibilité, de fibres de carbone renforcées par un dépôt de carbone, *in vivo* dans des fémurs de rats sur une période de 14 semaines [37]. Les résultats ont montré l'absence de réaction inflammatoire et une régénération osseuse normale jusqu'au contact des fibres.

Dix ans plus tard, Mäkisalo *et al.* ont comparé l'effet de fibres de carbone et celui du polypropylène, chez 30 rats, après implantation dans le canal fémoral [31]. Les résultats ont montré la formation d'un tissu granulaire immature au contact des fibres de carbone.

Entre 1980 et 2000 [30,38,39], plusieurs études ont porté sur l'utilisation des fibres de carbone dans le traitement des défauts ostéocondraux, modèle de défaut créé à la surface articulaire de la rotule de lapins. Carranza-Bencano *et al.* ont implanté des fibres de carbone et conclu à une utilisation potentielle de ces matériaux pour la réparation cartilagineuse mais non osseuse [30].

À notre connaissance, l'utilisation des caractéristiques des fibres de carbone, notamment leur flexibilité et leur porosité, n'a jamais été explorée dans le domaine de la régénération osseuse. Pourtant, l'utilisation des fibres/tissus de fibres de carbone activées comme matériau d'adsorption et d'élimination de molécules, telles que des pesticides, herbicides, produits médicamenteux, ..., dont des principes actifs, est actuellement très étudiée dans le domaine de l'environnement et notamment dans celui du traitement des eaux [2,5]. Ces études nous ont incités à envisager d'utiliser les tissus de fibre de carbone, à la fois comme support d'hydroxyapatite et comme vecteur de principes actifs, permettant

de bénéficier, simultanément, in situ, au contact d'un défaut osseux, des propriétés de substitut osseux de l'hydroxyapatite et des propriétés thérapeutiques d'un principe actif. La flexibilité intrinsèque des tissus de fibres de carbone permettait d'imaginer de l'apposer directement sur la surface à traiter. Avant de développer toutes les potentialités d'un tel matériau hybride, une synthèse bibliographique sur les phosphates de calcium a été réalisée.

B. Les phosphates de calcium

B.1. Introduction

Les phosphates de calcium (CaP) sont utilisés depuis de nombreuses années dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire [40], l'environnement [41,42] et plus principalement dans le domaine de la santé [43]. En effet, les CaP sont très utilisés en chirurgie dentaire et osseuse depuis les années 1980 [44,45]. Les CaP regroupent un grand nombre de composés résultants, pour la majorité, de la neutralisation des différentes acidités de l'acide orthophosphorique. Les réactions acido-basiques ainsi que les constantes d'acidités correspondantes à 37°C sont données ci-après dans la Figure I-4 [46] :

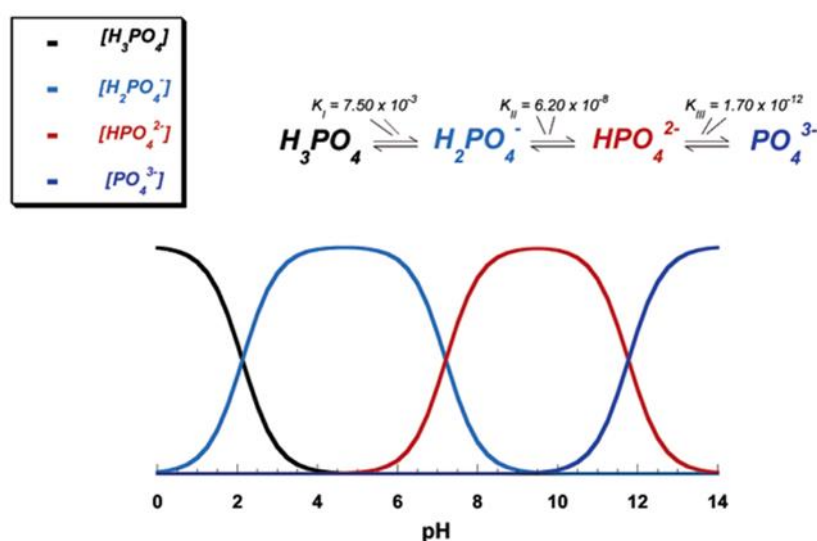


Figure I-4 : Concentrations ioniques en équilibre triprotique de l'acide phosphorique en solution en fonction du pH.

Les principaux composés formés sont regroupés dans le Tableau I-1, et classés selon leur rapport molaire $\frac{Ca}{P}$. Cette caractéristique est souvent employée car elle inclut des caractéristiques cristallographiques, morphologiques et chimiques des CaP, notamment leur stabilité/réactivité chimique et leur cinétique de dissolution. En effet, la dissolution en milieu biologique est inversement proportionnelle au rapport $\frac{Ca}{P}$.

Chapitre I. Synthèse bibliographique

Tableau I-1 : Formules chimiques et rapports $\frac{Ca}{P}$ des principaux phosphates de calcium.

Phosphate de calcium	Formule chimique	Rapport $\frac{Ca}{P}$
Phosphate de calcium monohydrate (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5
Phosphate de calcium anhydre (MCPA)	$Ca(H_2PO_4)_2$	
Phosphate dicalcique dihydrate (DCPD)	$Ca(HPO_4)_2 \cdot 2H_2O$	1
Phosphate dicalcique anhydre (DCPA)	$Ca(HPO_4)_2$	
Phosphate octocalcique (OCP) <i>de structure :</i>		
- <i>Triclinique (OCPt)</i>	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	1,33
- <i>Apatitique (OCPa)</i>	$Ca_8(HPO_4)_{2,5}(PO_4)_{3,5}(OH)_{0,5}$	
- <i>Amorphe (OCPam)</i>	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot nH_2O$	
Phosphate tricalcique		
α - <i>tricalcium phosphate (α-TCP)</i>	α - $Ca_3(PO_4)_2$	1,5
β - <i>tricalcium phosphate (β-TCP)</i>	β - $Ca_3(PO_4)_2$	
<i>Apatitique</i>	$Ca_9(PO_4)_5(HPO_4)(OH)$	
<i>Amorphe</i>	$Ca_9(PO_4)_6 \cdot nH_2O$	
Hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA)	$Ca_{10-x}[(OH)_x(HPO_4)_y(PO_4)_{6-y}(OH)_{2-z}]$	1,5-1,67
Hydroxyapatite stœchiométrique (HAP)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Oxyapatite (OXA)	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	1,67
Phosphate tétracalcique (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2O$	2

Pour rappel, l'os est un composite organocéramique de structure complexe dont le principal constituant minéral est un CaP. Les CaP synthétisés possèdent de grandes similarités de composition avec le minéral osseux, ainsi que des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques intéressantes et variées pour traiter les défauts osseux. Ils ont en plus l'avantage de pouvoir être synthétisés par de nombreuses méthodes de synthèse et de mise en forme, associées à un faible coût.

Parmi tous ces composés, deux sont largement commercialisés comme substitut de comblement osseux : l'hydroxyapatite (HAP), le phosphate tricalcique (TCP, sous forme β - ou α -) ou un mélange des deux pour former les phosphates de calcium biphasiques (BCP) [45,47]. Ces différents CaP sont généralement commercialisés sous forme de poudre, de granules, de blocs poreux de différentes formes et tailles, ou de pâte modelable dont l'avantage est de s'adapter parfaitement à la forme de la perte de substance osseuse. Ils trouvent aussi des applications en revêtement de pièces massives métalliques ou céramiques afin d'en améliorer l'ostéointégration, favorisant le développement du

tissu naturel osseux sur le dispositif prothétique et contribuant à l'adhésion et à la prolifération des cellules osseuses.

Dans la partie suivante sera détaillé un des deux substituts les plus couramment utilisés, l'hydroxyapatite.

B.2. L'hydroxyapatite

B.2.1. Généralités

L'hydroxyapatite (HAP) de synthèse est apparue sur le marché dans les années 1980 [44] et s'est rapidement imposée comme un substitut osseux incontournable en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale et implantaire [48–50]. L'HAP fait partie de la famille des « apatites » dont font partie les solides ioniques de formule chimique $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$, où Me est un cation divalent (Ca^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} ...), XO_4 un oxyanion (PO_4^{3-} , VO_4^{3-} , SiO_4^{4-} ...) et Y un anion monovalent (F^- , Cl^- , OH^- ...). Les apatites cristallisent dans le système hexagonal $\text{P6}_3/\text{m}$. Dans le cas des hydroxyapatites, Me correspond à des ions calcium, XO_4 à des ions phosphates et Y à des ions hydroxydes. La formule chimique correspondante à l'HAP est donc la suivante : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. On distingue trois principaux types d'hydroxyapatite : les HAP stœchiométriques, les HAP déficitaires en calcium (CDA) et les HAP substituées. Dans un premier temps, la description portera sur l'hydroxyapatite stœchiométrique, une des formes les plus stables de phosphate de calcium (la plus stable au pH physiologique ($\text{pH} = 7,4$)) et longtemps considérée à tort comme la phase cristallographique du minéral osseux.

B.2.2. Structure cristallographique de l'HAP

L'HAP de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ est le plus souvent représentée sous la forme $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Le groupe spatial de symétrie de l'HAP est $\text{P6}_3/\text{m}$. Les valeurs des paramètres cristallographiques de maille, a, c et β sont respectivement de 9,432 Å, 6,881 Å et 120°. Le volume de maille est égal à 530,14 Å³ [51]. L'hydroxyapatite stœchiométrique correspond à un rapport molaire $\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = 1,667$ et une densité de 3,156. La structure cristallographique de la maille d'HAP est présentée sur la Figure I-5. Naturellement, l'HAP est partiellement substituée, ce qui favorise la forme hexagonale à température ambiante [52]. Dans certain cas, l'HAP peut être de symétrie monoclinique ($\text{P2}_1/\text{b}$), mais ce cas particulier ne sera pas traité dans ce manuscrit [53].

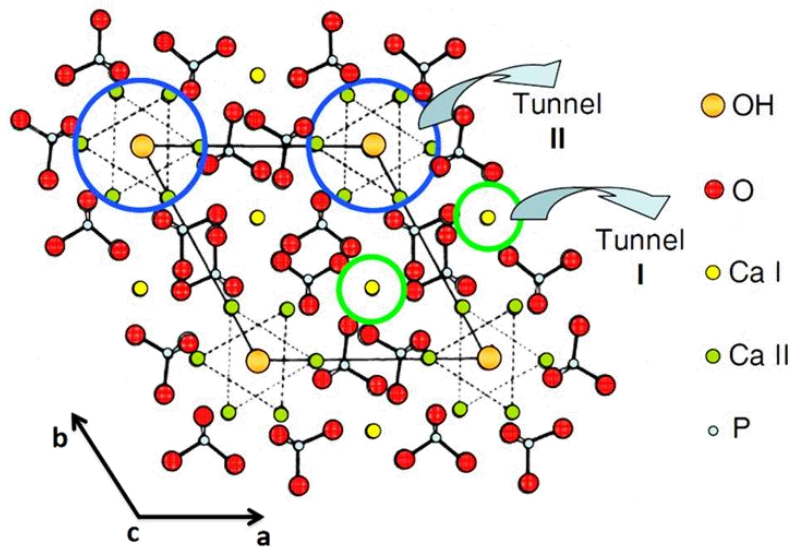


Figure I-5 : Représentation schématique de la structure cristallographique de l'HAP.

La maille élémentaire est donc composée de 10 ions Ca^{2+} , 6 tétraèdres PO_4^{3-} et 2 groupements OH^- . Les tétraèdres PO_4^{3-} définissent le squelette de la structure apatitique. Contrairement aux deux autres sites Ca^{2+} et OH^- , aucune lacune n'a jamais été observée sur ces sites. Cette maille cristalline fait apparaître deux types de tunnel, notés I et II, perpendiculaires au plan (001) :

- Les tunnels de type I possèdent un petit diamètre (2,5-2,7 Å) et sont occupés par quatre cations Ca^{2+} par maille, notés Ca_I . Ils présentent une symétrie C_h et sont en coordinence 9 avec les atomes d'oxygène des tétraèdres PO_4^{3-} uniquement.
- Les tunnels de type II, quant à eux, ont un diamètre plus grand, compris entre 3 et 4,5 Å. Ils contiennent le reste des cations Ca^{2+} , notés Ca_II , soit six cations par maille. Ces derniers sont situés en périphérie des tunnels et présentent une symétrie de type C_s . De coordinence 7, ils sont entourés de six atomes d'oxygène provenant des tétraèdres PO_4^{3-} et du groupement anionique OH^- .

L'hydroxyapatite, bien que possédant des caractéristiques chimiques et structurales très proches de celles du minéral osseux, n'est actuellement plus assimilée à la phase minérale de l'os. En effet, la phase minérale est composée d'apatite nanocristalline [54]. Contrairement à l'hydroxyapatite stœchiométrique, qui est synthétisée à haute température par différents procédés [55,56], les apatites nanocristallines sont en général formées par co-précipitation en milieu aqueux à pH physiologique et à température ambiante [57,58]. Ces apatites, plus proches de la composition et de la structure de la phase minérale de l'os, font l'objet de la prochaine partie de ce chapitre.

B.3. Les apatites nanocristallines de synthèse

Les apatites nanocristallines synthétisées sont faiblement cristallisées et non stœchiométriques contrairement à l'HAP. Cette non-stœchiométrie s'explique par la présence de lacunes sur les sites Ca^{2+} et OH^- , mais également par la substitution des ions phosphates PO_4^{3-} par des ions hydrogénophosphates HPO_4^{2-} et/ou par des ions carbonates [59,60]. Dans le cas où des lacunes sont observées au niveau des sites Ca^{2+} , ainsi qu'une substitution des ions phosphates par des hydrogénophosphates, l'apatite obtenue est désignée comme étant une HAP déficitaire en calcium (CDA pour « Calcium Deficient Apatite »). Les CDA possèdent un rapport atomique $\frac{\text{Ca}}{\text{P}}$ inférieur à 1,67, plus faible que celui de l'HAP. Ces hydroxyapatites modifiées possèdent donc des propriétés de solubilité plus importantes que l'hydroxyapatite stœchiométrique et plus intéressantes dans le cadre de la régénération osseuse [61]. Leur formule chimique, plus proche de celle de la phase minérale de l'os, peut être donnée (dans un cas non carbonatée) sous la forme de : $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ avec $0 \leq x \leq 2$ [62]. Un autre cas courant de modification de l'HAP, donc de son rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{P}}$, ainsi que de sa solubilité, est l'apport de carbonate dans la structure. Pour rappel, la phase minérale de l'os est naturellement carbonatée [63–65]. La substitution peut survenir au niveau des ions hydroxydes, des ions phosphates ou des deux. Selon le type de substitution, l'hydroxyapatite obtenue est alors de type A, B ou AB. Les différentes structures cristallographiques des HAP carbonatées sont encore discutées. La structure peut être représentée comme ci-dessous :

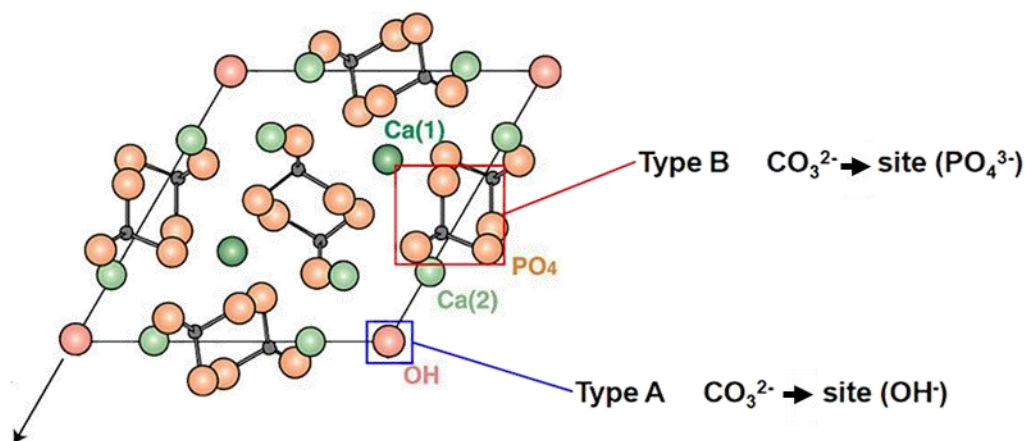


Figure I-6 : Schéma de la structure de l'HAP substituée par les carbonates.

Généralement, les substitutions de type A sont caractéristiques d'une augmentation du paramètre de maille a . Il est aussi théoriquement possible de substituer tous les ions hydroxydes [66]. Dans le cas des substitutions de type B, le paramètre de maille a diminue, tandis que 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, même

si la position des carbonates serait dépendante de la température de synthèse de l'HAP carbonatée [67]. Enfin, dans le cas des substitutions de type AB, la localisation exacte des carbonates est assez difficile à déterminer et dépend des procédés de synthèse. Une formule chimique d'HAP carbonatée de type AB, synthétisée à hautes température et pression, a été proposée [68] :

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{CO}_3)_x+(3/2)y(\text{OH})_{2-2x}$ avec $x \approx 0,7$ et $y \approx 0,6$.

Que ce soit les CDA, les hydroxyapatites carbonatées, ou toutes autres apatites nanocristallines, elles possèdent en général une structure constituée d'un cœur apatitique ordonné et d'une surface non-apatitique hydratée [6,57,62,69]. De même, il a été montré que les cristaux d'apatites biomimétiques et biologiques étaient de tailles nanométriques et présentaient à leur surface une couche phosphocalcique non-apatitique hydratée contenant des espèces ioniques [6,70–72]. La présence de cette couche hydratée, ainsi que sa surface spécifique élevée, expliquent la grande réactivité de surface de ces nanocristaux (Figure I-7).

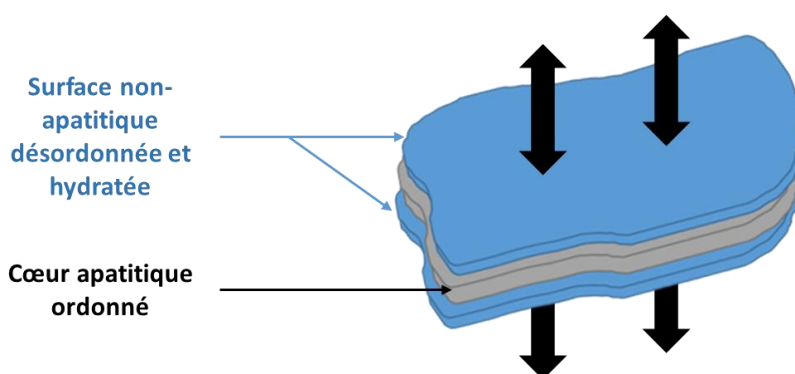


Figure I-7 : Représentation schématique d'une particule d'apatite biomimétique.

La présence d'une surface hydratée permet de rapides échanges ioniques avec les fluides environnants [60,69] et/ou l'adsorption de molécules d'intérêts biologiques ou médicamenteux [73,74]. Pour ces différentes raisons, la synthèse d'apatites nanocristallines biomimétiques est au centre des recherches actuelles, notamment dans le domaine des matériaux de substitution osseuse (ciments osseux [75,76], revêtements [77,78]) ou encore en tant que marqueurs pour l'imagerie médicale [79–81].

Afin de se rapprocher encore plus de la composition chimique de la phase minérale de l'os, d'autres substitutions peuvent être réalisées. En plus de cette similitude en composition chimique, l'ion substitué peut apporter de nouvelles propriétés à l'apatite. Cette possibilité de modification de la structure de l'apatite fait l'objet du prochain paragraphe.

B.4. Substitution des apatites nanocristallines de synthèse

B.4.1. Généralités

La phase minérale des os est associée à des cristallites nanométriques d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA), et elle est partiellement enrichie avec une grande variété d'ions de substitution [82]. Afin d'améliorer l'efficacité des substituts osseux apatitiques, en particulier leur ostéointégration, leur propriétés mécaniques et leur implantation, les céramiques de phosphate de calcium sont dopées avec de petites quantités d'ions (par exemple Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , F^- , Mn^{2+} et CO_3^{2-}), souvent présents dans l'os naturel [83].

B.4.1. Cas du strontium

Plusieurs méthodes de synthèse ont permis de synthétiser une hydroxyapatite dopée en Sr^{2+} (Sr-HAP), que ce soit par procédés sol-gel [84,85], précipitation [86,87] ou hydrothermal [88]. D'autres méthodes de synthèse, comme le traitement par micro-arc [89], le laser pulsé [90] et le laser ablation [91], ont été utilisées pour produire des revêtements d'apatite dopées au Sr^{2+} .

Le Sr^{2+} possède un rayon ionique de 1,21 Å et peut se substituer aisément dans la structure de l'hydroxyapatite au Ca^{2+} qui a, quant à lui, un rayon ionique 1,06 Å. Cette substitution peut se faire sur toute la gamme de composition, provoquant alors une expansion linéaire des constantes de réseau. Le degré de substitution dépend principalement de la concentration initiale de Sr^{2+} dans la solution initiale [92]. Cette substitution entraîne une augmentation, qui peut être considérable, des paramètres de réseau (à la fois selon l'axe a et selon l'axe c) [93–95]. Lors de la substitution, les atomes de Sr^{2+} peuvent occuper à la fois les deux sites du Ca^{2+} (I et II) [96]. A faible teneur en Sr^{2+} (environ 1 % at.), l'occupation du site (I) est préférentielle. Pour des quantités supérieures, le site (II) devient préférentiel [84,97]. Les taux d'occupation des sites par le Sr^{2+} en fonction de la quantité introduite ont été prédits par simulation et sont donnés dans la Figure I-8 [98].

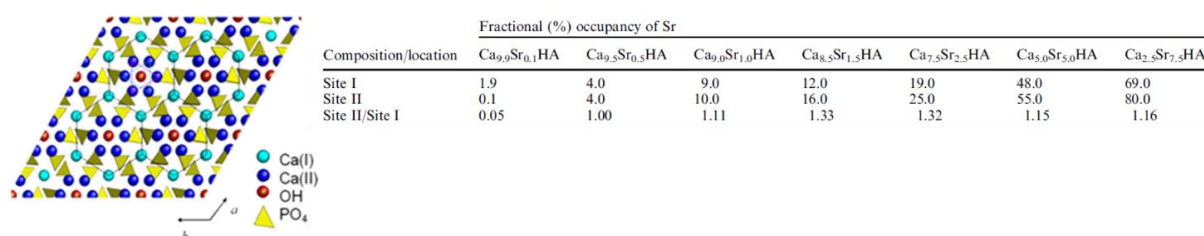


Figure I-8 : Représentation schématique des sites du Ca^{2+} dans la structure de l'hydroxyapatite [92] ainsi que le taux d'occupation du Sr^{2+} en fonction des sites [98].

Il a également été montré que l'incorporation de Sr^{2+} a une influence sur les propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite ou des composites la contenant. Une augmentation de la résistance à la compression et de la dureté ont été mesurées pour des substitution de Sr^{2+} inférieure à 10 % [99,100].

L'augmentation du taux de substitution est en lien avec une augmentation de l'incorporation d'autres ions, tels que HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} , dans la structure. Ceci a pour conséquence de réduire la cristallinité du composé et d'augmenter sa solubilité [101].

Il a également été constaté que les particules d'hydroxyapatite dopées au Sr^{2+} peuvent se présenter sous la forme de nanoparticules. Cette morphologie est privilégiée pour les systèmes de vectorisation de médicaments, en raison de leur plus grande réactivité de structure [93].

Pour conclure, le dopage au Sr^{2+} présente un intérêt particulier en régénération osseuse car son utilisation sous forme de ranelate de Sr^{2+} est très répandue pour le traitement de déficiences osseuses telles que l'ostéoporose post ménopausique. Suite à l'administration de ce médicament chez des patients, on observe une augmentation de la densité osseuse qui est attribuée à deux effets distincts, la stimulation de l'ostéoformation et l'inhibition de la résorption osseuse [83,102].

B.5. Combinaison apatite – principe actif

Le concept d'association de médicaments aux biomatériaux utilisés en ingénierie osseuse n'est pas nouveau [103,104], mais l'utilisation d'apatites biomimétiques nanocristallines n'a pas encore été grandement abordée [73]. Les apatites nanocristallines de synthèse, dites « biomimétiques », apparaissent comme d'excellentes candidates en tant que biomatériau de support pour délivrer *in situ* un antibiotique par exemple. Ces apatites osseuses présentent une réactivité de surface élevée directement liée à la présence, sur les nanocristaux, d'une couche hydratée non apatitique contenant des ions labiles [73,77,105]. Cette réactivité de surface permet de doper ces nanocristaux d'apatite avec des molécules actives. Il est alors possible d'envisager de fonctionnaliser l'apatite avec de grand nombre de molécules ou d'ions d'intérêts biologiques. En complément de son utilisation comme support d'antibiotiques, l'apatite est actuellement utilisée comme support d'enzymes antibactériennes [106], de bisphosphonate [107,108], de facteur de croissance [77,109,110], d'ions bioactifs [69,83,111–113] et plus généralement, d'un grand nombre de substances médicamenteuses [114]. Les systèmes basés sur l'apatite biomimétique possèdent déjà d'excellentes propriétés d'ostéointégration, de conduction et d'induction. La possibilité de leur conférer des fonctionnalités supplémentaires peut être considérée comme un moyen d'adapter les biomatériaux de régénération osseuse aux besoins et bien-être des patients [73,77].

Actuellement, cette démarche demande encore de nombreux efforts, notamment au niveau de la mise en place des programmes de recherche transversaux allant de la chimie de synthèse aux traitements des matériaux jusqu'aux tests cliniques, par le biais de la normalisation des évaluations biologiques et thérapeutiques [115]. De plus, bien que l'utilisation de biomatériaux comme système d'administration de médicaments soit bien développée pour les maladies cardiovasculaires (stents à élution

médicamenteuse), cette approche est encore à ses débuts pour les applications osseuses en raison de la réglementation [116].

De multiples dopages peuvent être envisagés comme la substitution du calcium ou l'adsorption de substances médicamenteuses/thérapeutiques [111–113]. La substitution du calcium par le strontium est étudiée et détaillée dans le chapitre III, tandis que les effets biologiques du strontium sont étudiés dans les chapitres IV et V. Le dopage d'apatite par adsorption de molécules à fort intérêt thérapeutique est également développé dans le chapitre III. De tels matériaux, multi-substitués et dopés en médicaments, sont actuellement beaucoup étudiés en régénération osseuse (Figure I-9).

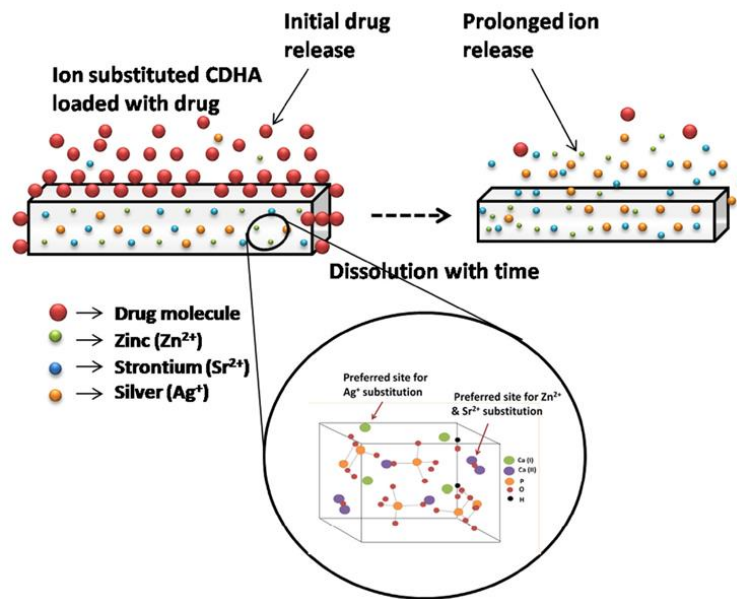


Figure I-9 : Schéma d'une CDA substituée (Zn²⁺ ou Sr²⁺ ou Ag⁺) et dopée en médicament (doxycycline) [111].

C. La régénération osseuse

C.1. Introduction

Afin d'élaborer un biomatériau utilisable pour accélérer la régénération osseuse, il est essentiel de comprendre les mécanismes naturels de reformation osseuse. C'est dans cette optique que sont résumées sommairement les principales étapes du remodelage osseux.

L'os possède d'étonnantes propriétés d'autoréparation, le rendant souvent capable de se régénérer spontanément en cas de lésion. Après fracture, le réalignement et le maintien du membre (plâtre) suffisent généralement à obtenir la consolidation totale et la restauration fonctionnelle de l'os.

Cependant, environ une fois sur dix, des problèmes mécaniques ou biologiques empêchent l'autoréparation d'une fracture et la reconstruction de l'os doit être assistée. C'est le cas des défauts dits « critiques » dont la taille et/ou la géométrie empêchent une cicatrisation spontanée. Dans ces types de situation, il est essentiel d'intervenir, le plus souvent chirurgicalement, afin de réaligner et stabiliser les fragments osseux dans des conditions favorables à la réparation et d'implanter des matériaux de substitution. Malgré le développement d'un grand nombre de substituts osseux, la réparation des pertes osseuses de grande taille reste une difficulté majeure en chirurgie osseuse.

C.2. Le remodelage osseux

Le squelette humain est en perpétuel renouvellement (de l'ordre de 10 % par an à l'âge adulte) grâce au remodelage osseux qui assure la conservation de ses propriétés mécanique, protectrice, métabolique et hématopoïétique. Le remodelage osseux permet aussi le maintien de la capacité d'adaptation aux contraintes, la réparation des fractures et/ou des micro-dommages et la mise à disposition du calcium. Il est assuré principalement par les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse, les ostéoblastes qui synthétisent une nouvelle matrice et les ostéocytes qui sont majoritaires et jouent le rôle de mécanosenseurs. L'équilibre entre résorption et formation de l'os est régulé par un réseau complexe d'interactions entre les cellules osseuses, les hormones systémiques et les facteurs de croissance.

Le remodelage osseux peut être très rapidement décrit en cinq étapes schématisées sur la Figure I-10. On distingue **1) La quiescence** : phase durant laquelle il n'y a pas d'activité de l'os. La surface de l'os est occupée par les cellules bordantes, empêchant l'accès aux ostéoclastes et donc de la résorption. Cette étape peut durer plusieurs années ; **2) L'activation** : phase durant laquelle les ostéoclastes migrent et adhèrent à la surface de l'os [117] ; **3) La résorption** : correspond à la dégradation des phases minérale et organique du tissu osseux grâce, d'une part, à l'acidification du milieu (libération d'ions H^+ dans une lacune de Howship) et, d'autre part, au relargage d'enzymes protéolytiques comme

la cathepsine K. Cette phase peut durer de quelques jours à quelques semaines (2 à 3 semaines). La Figure I-10 schématise cette étape de résorption ; 4) **L'inversion** : pendant laquelle les ostéoclastes se détachent, meurent par apoptose et sont remplacés par les pré-ostéoblastes puis les ostéoblastes ; 5) **La formation** : où les ostéoblastes synthétisent d'abord des couches lamellaires successives d'une matrice organique non calcifiée à base de collagène. Cette matrice, appelée « ostéoïde », est ensuite minéralisée afin d'obtenir un os néo-formé. Cette étape de minéralisation consiste à déposer des cristaux d'hydroxyapatite entre les fibrilles de collagènes afin de conférer une rigidité au nouveau tissu. Après une dizaine de jours, la minéralisation atteint environ 70 % de son état final, c'est la minéralisation primaire. Une minéralisation secondaire débute alors, beaucoup plus lente, qui s'étend au-delà de la durée de la phase de formation. Cette dernière phase dure en générale plusieurs mois (3-4 mois).

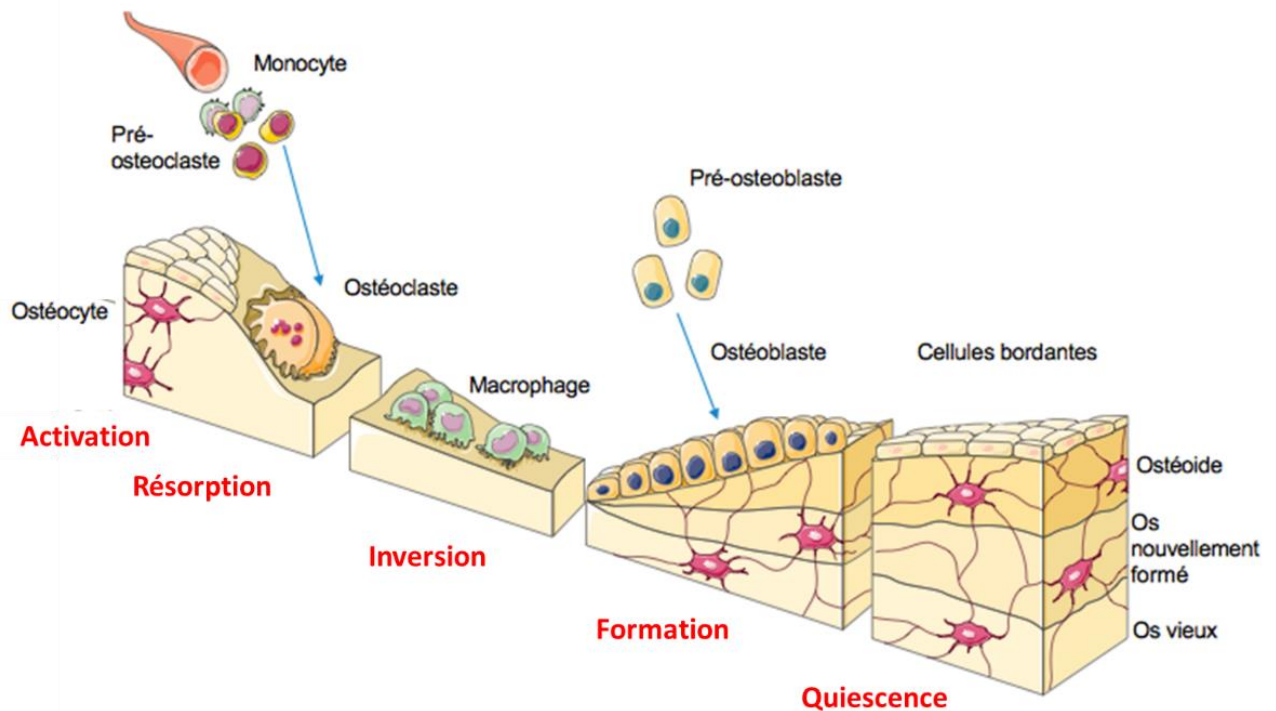


Figure I-10 : Les cinq étapes du remodelage osseux.

C.3. Les substituts osseux

Dans le domaine de la reconstruction osseuse, les greffes synthétiques, et plus particulièrement les substituts en céramique, sont fréquemment utilisés. Ces matériaux de substitution osseuse sont décrits dans la partie qui suit.

C.3.1. Les matériaux de substitution osseuse

Le terme de biomatériau, bien que couramment utilisé de nos jours, ne possède pas encore de définition bien précise. Une des définitions les plus souvent citée reste tout de même celle de D. Williams proposée lors de la Conférence de Consensus, organisée par la Société Européenne de Biomatériaux à Chester en 1986 : « matériau non vivant utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les système biologiques » [118]. Afin de compléter cette première définition, il en donnera une seconde en 1999 : « matériau prévu pour être à l'interface de systèmes biologiques dans le but d'évaluer, de traiter, d'augmenter, ou bien de remplacer un tissu, un organe ou encore une fonction du corps humain » [119]. Actuellement, le domaine des biomatériaux orthopédiques constitue la plus importante application et cette domination du secteur devrait se poursuivre encore quelques années. En effet, elle représenterait environ 40% du domaine des biomatériaux en 2023 [120].

Parmi les biomatériaux utilisés en pathologie osseuse, les substituts osseux sont parmi les plus couramment utilisés et peuvent être définis par la définition proposée par la Société française de recherche orthopédique et traumatologique (SOFROT) en 2011 :

« Tout biomatériau d'origine humaine, animale, végétale ou synthétique :

- destiné à l'implantation chez l'homme,
- dans la perspective d'une reconstitution du stock osseux,
- qu'il s'agisse du renforcement d'une structure osseuse ou du comblement d'une perte de substance osseuse d'origine traumatique ou orthopédique, de la consolidation d'une fracture ou de son équivalent.»

Les substituts osseux sont couramment utilisés en chirurgie orthopédique et odontologique. Idéalement, les substituts osseux devraient être remplacés à terme par un tissu osseux normal et donc posséder l'ensemble des caractéristiques nécessaires à la croissance osseuse et à son remodelage [121–126].

Les substituts osseux peuvent être classés selon :

- leur composition chimique : céramiques phosphocalciques, céramiques biphasées, phosphates tricalciques, carbonates de calcium, sulfates de calcium, bioverres, polymères et tous les matériaux composites qui en résultent,
- leur origine : naturelle (humaine, animale et végétale) ou synthétique,
- leurs caractéristiques d'utilisation: comblement, confinement, soutien, résorbabilité, injectabilité, durcissement, etc.

Dans la suite de ce chapitre, sera décrite très rapidement la famille des matériaux de substitution qui nous intéresse particulièrement : les céramiques.

C.3.2. Les céramiques

La majeure partie des substituts osseux est composée, entièrement ou partiellement, d'une ou plusieurs céramiques (dans environ 60 % des cas). Les céramiques peuvent être classées en deux groupes : les céramiques bioinertes et les céramiques bioactives. Dans le premier groupe, sont retrouvées toutes les céramiques à base d'oxydes, de carbures ou de nitrures ainsi que les matériaux carbonés. Le second groupe se compose principalement des céramiques à base de sels de calcium, des bioverres et des vitrocéramiques. Ce sont les céramiques bioactives, et notamment les céramiques à base de calcium, qui sont les plus étudiées et utilisées à l'heure actuelle. Elles peuvent se présenter sous forme de phosphates de calcium, de sulfates de calcium ou bien de carbonates de calcium. En raison des similarités de composition avec le minéral osseux, des nombreuses propriétés physiques, chimiques, biologiques intéressantes et variées, mais également des nombreuses méthodes de fabrication et de leur mise en forme à un faible coût, l'utilisation des phosphates de calcium apparaît particulièrement adaptée aux applications osseuses. Le choix et les caractéristiques physico-chimiques des phosphates de calcium comme biomatériaux pour la régénération osseuse ont déjà été développés dans ce chapitre.

Dans notre étude, le revêtement de phosphate de calcium a donc été choisi pour recouvrir le tissu de fibres de carbone. L'élaboration d'un matériau hybride, tissu de fibres de carbone/phosphate de calcium, est envisagée pour une application en chirurgie osseuse. Nous avons démontré qu'il était possible de doper les différents constituants du matériau hybride. Le choix de dopage s'est porté, dans notre cas, sur une substitution partielle du calcium par le strontium et une adsorption de principes actifs, tels que l'aspirine, sur l'un ou les deux constituants du matériau. Les intérêts thérapeutiques du strontium et de l'aspirine sont discutés dans les parties suivantes.

C.4. Effet du strontium sur la régénération osseuse

La présence d'ions, tels que Mg^{2+} , Sr^{2+} , F^- , Cl^- ou HPO_4^{2-} dans la structure cristalline de l'apatite, influence le comportement biologique du matériau [87,127–129]. En particulier, le Sr^{2+} est strictement lié au remodelage osseux, en favorisant la croissance de nouveaux tissus et en diminuant sa résorption [130]. Il favorise la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et inhibe l'activité des ostéoclastes lorsque son pourcentage atomique est compris entre 3 et 7 % [83,90,92,94,131,132]. En effet, à faible dose, le Sr^{2+} réduit la résorption osseuse en bloquant directement l'action des ostéoclastes, sans présenter de toxicité pour ces cellules. Le Sr^{2+} favorise également la prolifération des cellules ostéoblastiques, augmentant ainsi la surface qu'elles occupent, c'est-à-dire le nombre de sites de formation osseuse. Ainsi, en présence de Sr^{2+} , la masse osseuse est augmentée sans altérer ni le processus de minéralisation ni la composition chimique. De plus, l'effet stimulant du Sr^{2+} sur la synthèse du collagène osseux a été démontré dans la littérature [133]. Un autre avantage important du Sr^{2+} est qu'il est déjà présent en quantités infimes dans le corps humain. Le niveau physiologique du Sr^{2+} dans le plasma humain est compris entre 0,11 et 0,31 $\mu mol.L^{-1}$ [134]. De plus, plus de 99 % du Sr^{2+} du corps humain s'accumule dans les os [135]. Ainsi, implanter du Sr^{2+} à l'intérieur d'un site osseux à une faible quantité revient à incorporer un élément "connu" du corps. L'organisme est donc capable de le réguler par des processus physiologiques normaux. Des études ont montré que le Sr^{2+} suit la même voie physiologique dans le corps humain que le Ca^{2+} [135]. Le Sr^{2+} est actuellement utilisé en Europe dans le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique [136].

Le strontium apparaît alors comme un ion de choix pour apporter de nouvelles propriétés au phosphate de calcium déposé à la surface du tissu de fibres de carbone.

C.5. Effet de l'aspirine sur la régénération osseuse

Actuellement, les substituts osseux n'ont plus pour seule vocation la reconstruction osseuse. Ils peuvent être utilisés comme vecteurs de principes actifs (PA), formant ainsi un système combiné. La libération de principes actifs *in situ* améliore la biodisponibilité, l'efficacité et la tolérance du principe actif par rapport à un traitement systémique. Les systèmes combinés permettent de proposer une solution thérapeutique locale aux situations pathologiques rencontrées en chirurgie osseuse (comme la douleur, l'infection et la fragilité osseuse).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à trois principes actifs. Un des avantages d'un matériau hybride tissu de carbone/CaP réside dans le fait que les deux composants du matériau peuvent, à priori, accueillir des principes actifs.

Il est alors envisageable d'utiliser ces matériaux hybrides comme vecteur sélectif d'un ou plusieurs principes actifs. Les trois principes actifs étudiés dans cette étude, ainsi que leurs applications, sont :

- la tétracycline (TC), antibiotique bactériostatique utilisé ici comme agent antiinfectieux ;
- le naproxène (NPX), anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS) pour réduire la douleur (modérée) et potentiel activateur de la régénération osseuse ;
- l'aspirine (AA), anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS), mais également accélérateur de la régénération osseuse [137–141].

Le cas particulier de l'aspirine est décrit dans le paragraphe suivant.

L'aspirine (AA) est un agent anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) largement utilisé et peu coûteux. Ses effets pro-ostéogéniques ont été décrits très récemment chez le rongeur où il a été montré qu'elle améliore l'ostéogénèse et inhibe l'ostéoclastogénèse en affectant de multiples voies biologiques [137,138,140,141]. Les principaux effets biologiques de l'aspirine sont résumés dans la Figure I-11. Chez la femme ménopausée, un effet bénéfique modéré sur la densité minérale osseuse a été constaté [142,143]. L'utilisation de l'aspirine dans des systèmes combinés apparaît donc actuellement comme une nouvelle stratégie possible pour améliorer la régénération osseuse.

A l'heure actuelle, l'effet de l'aspirine sur la régénération osseuse n'est démontré qu'en expérimentation animale où aucun effet néfaste sur l'os n'a été signalé. Actuellement, l'effet chez l'Homme reste encore sujet à discussion. De plus, aucun lien entre l'aspirine et la prévention des fractures n'est démontré, comme régulièrement suggéré dans la littérature. Néanmoins, des cas d'augmentation de la densité minérale de l'os ont été observés, ce qui devrait conduire à de nouvelles études sur la potentialité de l'aspirine sur la régénération osseuse chez l'Homme.

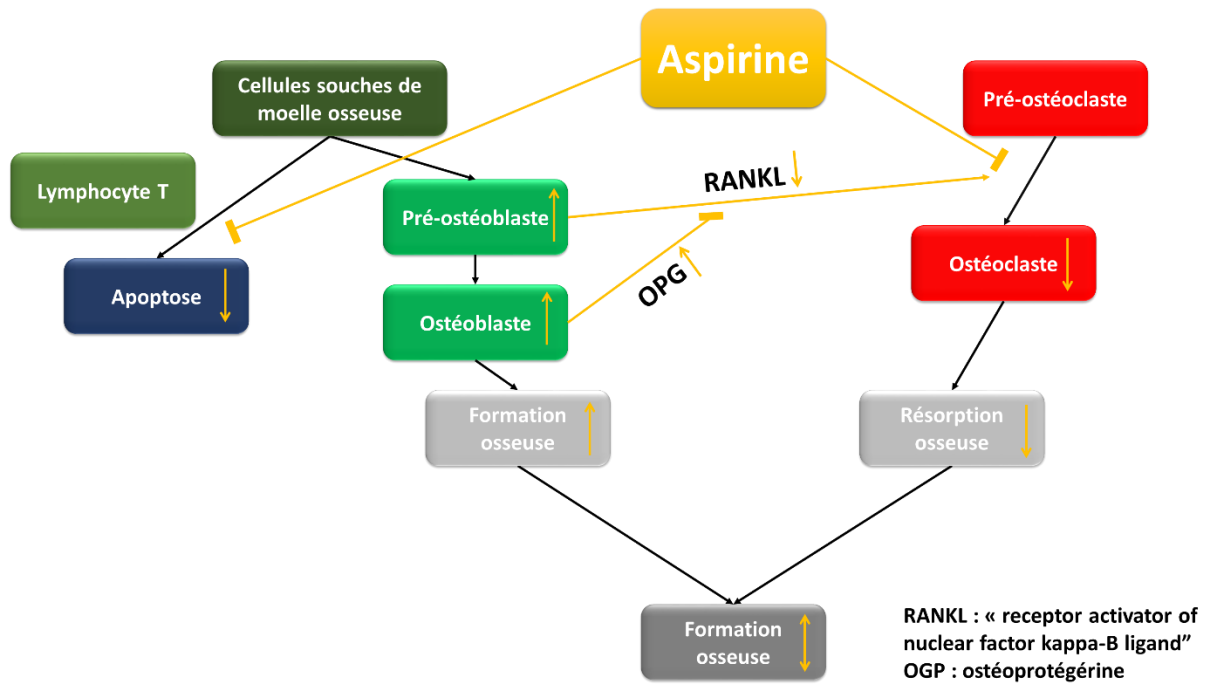


Figure I-11 : Schéma représentant les principaux effets de l'aspirine sur la formation osseuse. RANKL est un ligand permettant la différenciation des ostéoclastes. OPG est une molécule produite par les ostéoblastes engendrant la différenciation des ostéoclastes en se liant au RANKL.

Différents systèmes de relargage de l'aspirine *in situ* ont été testés allant des membranes collagène/chitosan [138], aux hydrogels [141], jusqu'aux complexes protéiques [140]. Ces systèmes ont été testés *in vivo* chez le rat avec les résultats précédemment décrits.

Au vu des systèmes déjà testés dans la littérature, l'utilisation d'un matériau hybride, tissu de fibres de carbone/phosphate de calcium, apparaît tout à fait appropriée pour délivrer de façon contrôlée l'aspirine à proximité d'une zone osseuse en reconstruction (Figure I-12).

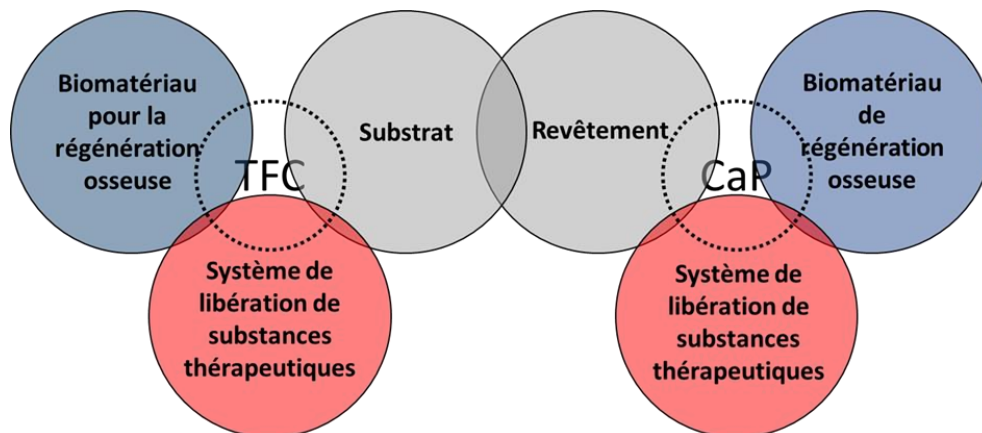


Figure I-12 : Représentations schématiques des applications médicales du revêtement de CaP et des tissus de fibres de carbone (TFC). Schéma adapté de Szcześ *et al.* [144]

Positionnement du sujet

L'étude bibliographique réalisée durant ces travaux montre que peu d'études ont été menées sur l'utilisation des fibres de carbone et des tissus de fibres de carbone comme biomatériaux. Il est à souligner que la possibilité d'application des tissus de carbone en régénération osseuse a été proposée en 2012 par le Pr S. Mikhlovsky, dans le cadre d'un projet européen. L'implication de l'ICMN dans ce projet a contribué au développement de cette thématique de recherche au laboratoire. Les travaux de recherche sur le développement de matériaux hybrides constitués d'un revêtement de CaP déposé sur la surface d'un tissu de fibres de carbone dans un objectif de régénération osseuse ont débuté avec la thèse de Q. Picard (2012-2015).

Le fondement de départ de ces travaux a résidé sur l'hypothèse selon laquelle « *L'utilisation d'un matériau hybride, tissu de fibres de carbone / phosphate de calcium, en chirurgie orthopédique permettrait le confinement d'un défaut osseux et par l'intermédiaire de ses constituants, induirait la régénération osseuse et potentiellement l'accélérerait* ».

En effet, contrairement aux substituts osseux, ce type de matériau hybride n'est pas destiné à être utilisé en tant que comblement osseux, mais comme « pansement osseux » qui serait appliqué à la surface de l'os afin de confiner le défaut à reconstruire. L'apposition en surface de l'os du matériau hybride pourrait également agir comme une sorte de « membrane » qui servirait de « guide » à la régénération osseuse et permettrait de l'accélérer.

Pour mes travaux de thèse, la problématique s'est affinée et plusieurs objectifs ont émergé, compte tenu de l'originalité de ce matériau hybride qui réside surtout dans ses potentialités. Celles-ci sont liées à :

- l'architecture du matériau hybride, basée sur l'architecture du tissu de fibres de carbone, qui doit permettre de préserver les échanges de fluides biologiques essentiels à la régénération osseuse ;
- la présence du revêtement de CaP, qui doit permettre l'apport, à proximité du défaut, des précurseurs calcium et phosphates essentiels à la reconstruction ;
- la possibilité d'incorporer des ions dans la structure du revêtement de CaP (cas du strontium dans cette étude), ions qui devraient également aider à sa reconstruction (vitesse, qualité de l'os, etc.) ;
- la possibilité de libérer *in situ* des substances thérapeutiques, dans l'objectif de diminuer les risques fréquents d'infections et d'inflammations post-opératoires, mais également de potentialiser la régénération osseuse (cas de l'aspirine).

C'est ainsi que les objectifs de mes travaux de thèse ont été fixés. Ils ont résulté des caractéristiques et des potentialités du matériau hybride.

Le premier objectif visé pour ce travail de thèse est d'élaborer, de manière contrôlée, un revêtement homogène de phosphate de calcium à la surface d'un tissu de fibres de carbone (Chapitre II.).

Le second objectif est de démontrer la possibilité d'apporter de nouvelles propriétés, par dopage ciblé, aux constituants du matériau hybride (Chapitre III.).

Le troisième objectif est d'arriver à évaluer les potentialités de tels matériaux hybrides sur la régénération osseuse. Pour ce faire, des évaluations biologiques *in vitro* sur des cellules ostéoblastiques ont été menées (Chapitre IV.). Une étude pilote *in vivo* a été ensuite mise en place pour étudier l'effet de deux matériaux hybrides sur la régénération d'un défaut osseux chez le rat (Chapitre V.).

De ces objectifs, il en résulte la démarche expérimentale qui sera suivie au cours de ce manuscrit et qui est résumée dans la Figure 1 présentée ci-après.

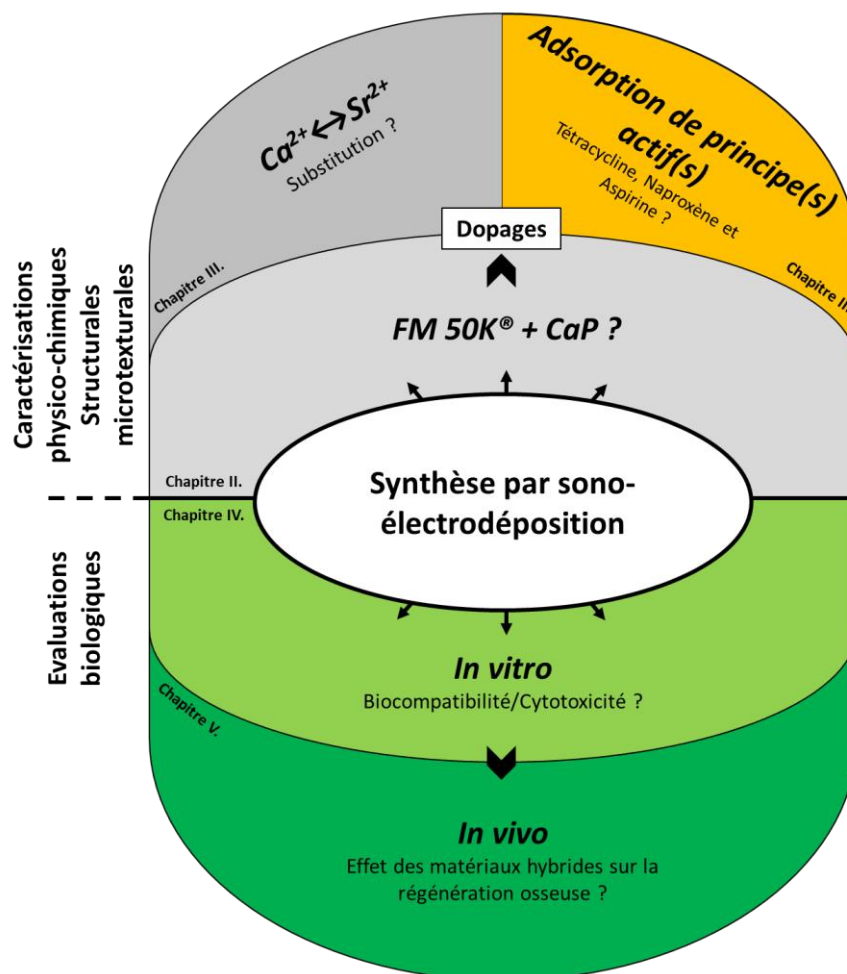


Figure 1 : Démarche expérimentale globale de ce travail de thèse.

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides :
Tissus de fibres de carbone / CaP

Sommaire

Introduction	41
A. Le substrat : Tissu de fibres de carbone	42
A.1. Caractéristiques des tissus de fibres de carbone	42
A.2. Caractéristiques physico-chimiques des tissus de fibres de carbone	43
A.2.1. Composition chimique	43
A.2.2. Caractéristiques texturales	46
A.2.3. Conclusion	50
B. Le matériau hybride : TFC / CaP	52
B.1. Protocole de synthèse du revêtement de CaP par sono-électrodéposition	52
B.1.1. Introduction	52
B.1.2. Dispositif expérimental	53
B.1.3. Synthèse de CaP par sono-électrodéposition	54
B.1.3.1. Principe	54
B.1.3.2. Paramètres expérimentaux	56
B.2. Optimisation de la synthèse du revêtement de CaP	58
B.2.1. Influence de la durée de polarisation	58
B.2.2. Influence de la polarisation : mode potentiostatique	60
B.2.3. Influence de la température de l'électrolyte	64
B.2.4. Conclusion	66
B.3. Influence du substrat	67
C. Caractérisation du revêtement de phosphate de calcium déposé sur le tissu de fibres de carbone FM 50K® par sono-électrodéposition à -1 V	70
C.1. Homogénéité du revêtement de CaP	70
C.2. Caractérisations texturales du matériau hybride – Influence du revêtement de CaP	73
C.3. Caractérisations physico-chimiques du revêtement de CaP	75
C.3.1. Caractérisation du revêtement de CaP par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).	75
C.3.2. Caractérisation du revêtement de CaP par diffraction des RX	78
C.3.3. Caractérisation du taux de carbonate dans le revêtement de CaP	80
C.3.4. Caractérisation morphologiques et microtexturales du revêtement de CaP synthétisé à -1 V	81
C.3.5. Détermination des rapports CaP par analyses EDX-MEB et EDX-MET	85
C.3.6. Caractérisation de la structure du revêtement de CaP par spectroscopie RMN Haute Résolution Solide	85
D. Discussion et Bilan sur les caractéristiques du matériau hybride : TFC / CaP	88

Introduction

Dans le cadre de cette étude, les substrats utilisés, les tissus de fibres de carbone (TFC), ont été fournis par les entreprises DACARB® et ZORFLEX® dans des quantités suffisamment importantes pour pouvoir travailler sur les mêmes matériaux tout au long de l'étude. Les synthèses de revêtements de phosphate de calcium (CaP) déposés à la surface du substrat, ainsi que la majorité des caractérisations physico-chimiques et structurales des matériaux hybrides et de ses constituants ont été réalisées à l'ICMN. Seules les caractérisations structurales par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation (CEMHTI - CNRS UPR 3079, Orléans, France).

Dans ce chapitre, dans une première partie, les résultats de la caractérisation des deux tissus utilisés comme substrat pour le dépôt de CaP seront exposés. Dans une seconde partie, la synthèse du matériau hybride TFC / CaP par sono-électrodéposition sera détaillée. Dans une troisième partie, les caractérisations du revêtement de CaP, et du matériau hybride seront détaillées. La démarche expérimentale suivie et exposée dans ce chapitre est schématisée dans la Figure II-1.

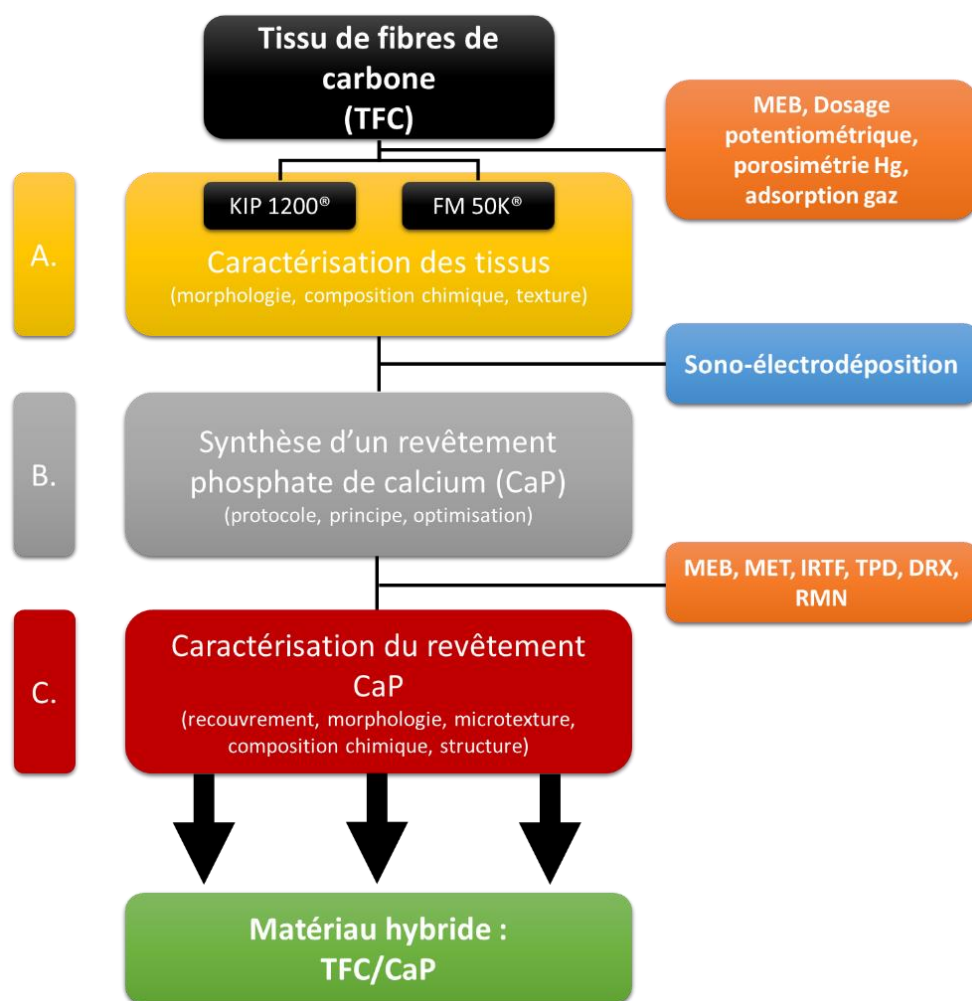


Figure II-1 : Suivre de la Démarche expérimentale exposée dans ce chapitre II.

A. Le substrat : Tissu de fibres de carbone

A.1. Caractéristiques des tissus de fibres de carbone

Deux tissus de fibres de carbone (TFC) ont été utilisés lors de ce travail. Ces tissus ont été sélectionnés pour leurs différences de caractéristiques (précurseur, architecture, etc.). Les principales caractéristiques de ces deux tissus de carbone sont les suivantes :

- Le KIP 1200® est fourni par la société DACARB®. Le précurseur des fibres de carbone constituant le tissu est un polymère synthétique : une résine phénolique. Les fils ex-résine phénolique ont été assemblés puis tissés pour former un tissu de fibres « précurseur », qui a ensuite été carbonisé puis activé à la vapeur d'eau. Le grammage du tissu est d'environ 140 g/m². L'image MEB de la Figure II-2 a) montre que les fibres de carbone constituant le tissu sont cylindriques et ont une surface d'aspect lisse. Leur diamètre est compris entre 10 et 12 µm.
- Le FM 50K® est fourni par la société ZORFLEX®. Le précurseur des fibres de carbone constituant le tissu est le fil de rayonne (cellulose régénérée (voir chapitre I)). Le grammage du tissu de fibres de carbone est d'environ 130 g/m². Les images MEB de la Figure II-2 b) et c) montrent que les fibres de carbone ont une surface rugueuse et lobée. Leur diamètre est compris entre 8 et 12 µm.

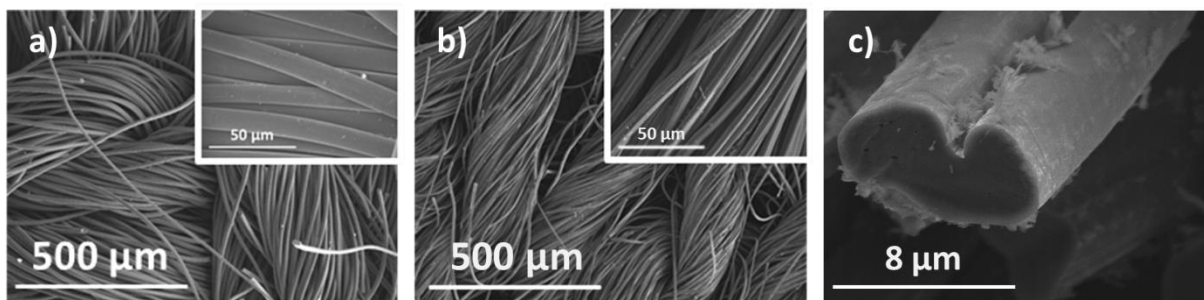


Figure II-2 : Images MEB des TFC : a) KIP 1200®, b) FM 50K® et c) section transversale d'une fibre de carbone lobée du TFC FM 50K®.

Les images MEB apportent des informations quant à la morphologie et l'organisation des fibres de carbone au sein des tissus. Dans le cas du tissu KIP 1200®, les fibres sont organisées sous forme de mèches qui sont torsadées (Figure II-3 b). Ces mèches peuvent comprendre jusqu'à plusieurs milliers de fibres (le nombre est variable selon le fabricant, pouvant aller de 1 000 jusqu'à 48 000).

Dans le cas du FM 50K®, les fils ex-rayonne, précurseurs des fibres de carbone, ont été tricotés pour former un tissu « brut », qui a ensuite subi une carbonisation puis une activation pour former un tissu de fibres de carbone (Figure II-3 b). Cette architecture tricotée confère à ce tissu une meilleure tenue physique des fibres et moins d'effilochage du matériau. Il est à noter que, pour le tissu FM 50K®, les

fil de rayonne ont subi un « ensimage » qui a pour but de faciliter la mise en œuvre des fibres lors des opérations d'enroulement et de tissage. Dans le cas présent, l'ensimage est constitué d'un mélange d'oxyde de zinc et d'aluminium.

Tous les tissus de fibres de carbone sont conditionnés de la même manière avant leur utilisation. Ils sont préalablement découpés aux dimensions du porte-électrode de la cellule électrochimique (2x3 cm) et lavés avec de l'eau distillée à reflux pendant 24 h dans un dispositif Soxhlet®, dans le but d'éliminer les poussières et les impuretés. Les tissus sont ensuite séchés dans une étuve à 80 °C et à une pression de 400 mbar. Ce protocole permet d'éliminer les éventuelles contaminations de surface qui pourraient nuire à la biocompatibilité du tissu.

Compte tenu du peu d'informations fournies par les fabricants concernant les caractéristiques des tissus de carbone, ils ont été analysés avant d'être utilisés comme substrat des matériaux hybrides. Le tissu KIP 1200® a été caractérisé lors de la thèse de Q. Picard [6]. Les principales caractéristiques sont répertoriées dans la suite de ce chapitre. Les mêmes caractérisations ont été effectuées lors de ce travail pour le second tissu de carbone, le FM 50K®.

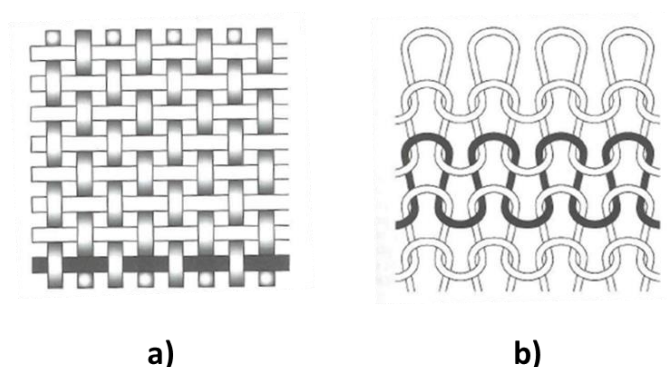


Figure II-3 : Organisation des tissu de fibres de carbone : a) Tissée de type "armure toile" pour le KIP 1200® et b) Tricotée de type « maille » pour le FM 50K®.

A.2. Caractéristiques physico-chimiques des tissus de fibres de carbone

A.2.1. Composition chimique

Une analyse élémentaire, CHONS, est réalisée. Elle permet d'obtenir, à la fois, la composition chimique et la composition massique globale des tissus. Le principe consiste en une séparation chromatographique en phase gazeuse puis quantification des gaz issus de leur décomposition à l'aide d'un catharomètre. Les éléments C, H, N et S sont dosés par analyse des gaz produits (N_2 , CO_2 , H_2O , SO_2) lors de la combustion « flash » sous oxygène à 950 °C de l'échantillon à analyser. Le dosage de l'oxygène se fait par analyse des gaz résultants de la pyrolyse à 1100°C sous flux d'hélium (Cf. Annexe 1). Les résultats des analyses massiques sont donnés dans le Tableau II-1.

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Tableau II-1 : Composition chimique du KIP 1200® et du FM 50K® déterminée par analyse élémentaire (% massique).

TFC	Carbone (%)	Hydrogène (%)	Oxygène (%)	Azote (%)	Soufre (%)	Total (%)
KIP 1200®	92,4	0,6	1,6	0	0	94,6
FM 50K®	80,6	0,8	4,8	3,2	0	89,3

Les deux tissus, le KIP 1200® et le FM 50K®, sont majoritairement composés de carbone à plus de 90 et 80 % respectivement. Ils sont également tous deux très pauvres en hydrogène 0,6 et 0,8 % et ne contiennent pas de soufre. Par contre, le KIP 1200® est dépourvu d'azote et n'a que très peu d'oxygène (<2 %), contrairement au FM 50K® qui est constitué d'environ 3 % d'azote et 5 % d'oxygène. Pour les deux tissus de carbone, la somme des pourcentages massiques n'est pas égale à 100 %. Pour le KIP 1200®, cette différence s'explique par le fait que quelques produits de décomposition ne peuvent pas être analysés en raison de la température du four qui n'excède jamais les 1100 °C. Pour le KIP 1200®, le taux de cendre est de 5,4 %. Pour le FM 50K®, le taux de cendre élevé, de 10,7 %, résulte du fait que les fibres du tissu présentent un ensimage métallique à leur surface. Un mélange d'oxydes de zinc et d'aluminium a été déposé à la surface des fibres lors de leur fabrication. Cet ensimage à la surface des fibres est visible sur les images MEB et confirmé par l'analyse EDX-MEB de la Figure II-4 (Cf. Annexe 2 pour ces techniques). Par corrélation entre les pourcentages massiques issus des analyses élémentaire et l'analyse EDX-MEB, le tissu de carbone FM 50K® serait composé d'environ 4 % d'aluminium et 3 % de zinc.

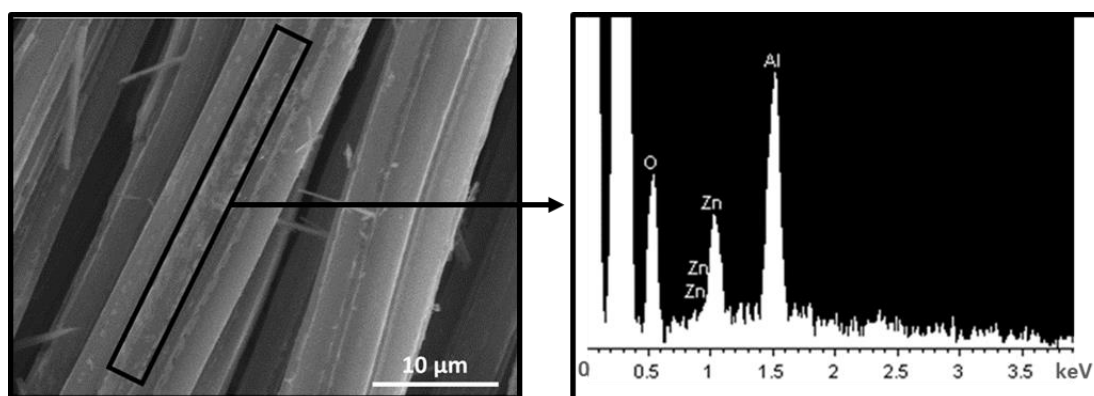


Figure II-4 : Images MEB de la surface des fibres du tissu FM 50K® et son analyse EDX associée.

Les fonctions chimiques de surface des tissus sont déterminées et quantifiées par dosage potentiométrique, méthode d'analyse à la fois qualitative et quantitative des groupes acides de surface, par mesure de leurs valeurs de pKa et par leur constante d'acidité (Cf. Annexe 3). La Figure II-5 a) représente la courbe d'affinité protonique qui correspond à l'évolution de la quantité de protons consommés en fonction du pH. La Figure II-5 b) représente la distribution des fonctions de surface en fonction de leur pKa entre pH 3 et 11, les aires des pics étant proportionnelles aux différents groupements acides dosés. Les principaux résultats de ces analyses sont regroupés dans le Tableau II-2.

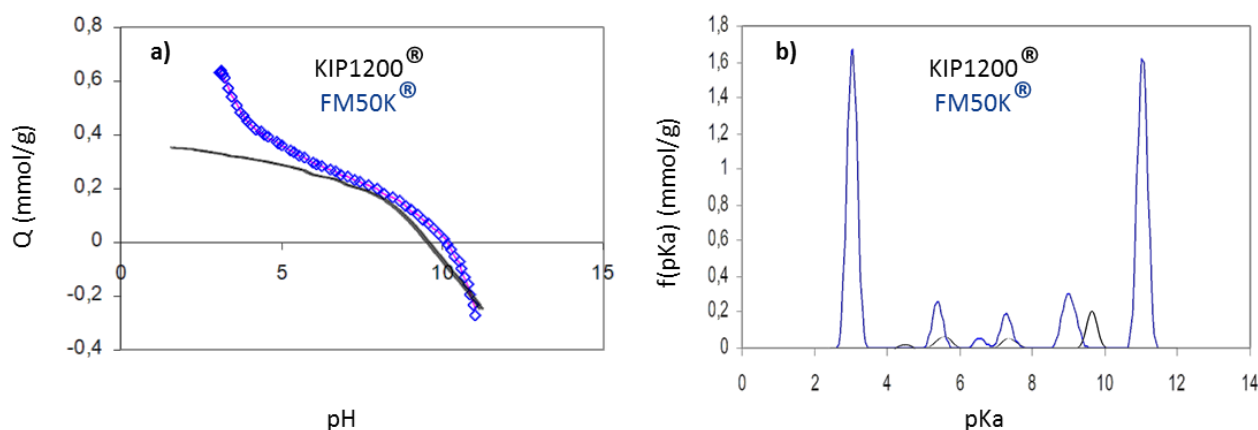


Figure II-5 : a) Courbes d'affinité protonique en fonction du pH ainsi que b) les courbes de distribution des fonctions de surface des tissus de carbone KIP 1200® et FM 50K®.

Les données du Tableau II-2 montrent que le FM 50K® est le tissu le plus riche en groupements de surface avec 2,93 mmol/g de fonctions chimiques contre 0,48 mmol/g pour le KIP 1200®. Ce dernier, possède majoritairement des fonctions ayant un pKa > 7, ce qui correspond généralement à des fonctions de type lactone ou phénol (pKa > 10). Ces données sont caractéristiques d'une surface hydrophobe pour le tissu KIP 1200®.

Le FM 50K® se différencie également par un plus grand nombre de fonctions carboxyliques (pKa 3-7) et dans une moindre mesure de fonctions lactones et phénols. Le FM 50K® possède une surface plus hydrophile que le KIP 1200®. Ces résultats sont en adéquation avec l'analyse élémentaire du Tableau II-1 et les valeurs de pH de charge nulle du Tableau II-2. Le pH de charge nulle (pH_{CN}) correspond au pH d'une solution dans laquelle est plongé un corps solide dont la charge nette de surface est nulle. Ceci signifie que, si le $pH_{solution} < pH_{CN}$, alors la surface du solide est chargée positivement et inversement. Nous verrons dans les paragraphes suivants que le pH de la solution d'électrolyse utilisée est de 4,8, de ce fait, la charge de surface des deux tissus de carbone sera positive, dans les conditions de dépôt des revêtements de CaP.

Tableau II-2 : Dosage potentiométrique des fonctions de surfaces selon la distribution de leurs valeurs de pKa pour le KIP 1200® et le FM 50K®.

TFC	pH _{CN}	Distribution pKa (mmol/g)		
		3 < pKa < 7	7 < pKa < 11	Total
KIP 1200®	9,4	0,05	0,43	0,48
FM 50K®	7,8	2,13	0,8	2,93

La présence d'impuretés métalliques à la surface du FM 50K® peut interférer sur les dosages. La valeur des fonctions de surface et la valeur du pH_{CN} peuvent être légèrement différentes des valeurs réelles. Cependant, au regard de la grande différence de valeurs entre les deux tissus, cela n'impacte aucunement les conclusions concernant la nature des fonctions chimiques présentes en surface.

A.2.2. Caractéristiques texturales

Les tissus utilisés sont constitués de fibres de carbone activées du fait de leur activation à l'étape finale de la fabrication. Les fibres activées se caractérisent généralement par une importante porosité développée. Il est primordial de prendre en compte cette caractéristique, car elle peut jouer un rôle lors de la synthèse du revêtement d'hydroxyapatite à la surface des fibres du tissu de carbone. Cette porosité, intrinsèque aux fibres de carbone et à celle du tissu de carbone, est importante à prendre en compte, notamment en post-implantation, car elle va gouverner les échanges entre les fluides corporels, les molécules, les ions et tous les éléments présents dans notre organisme. Cette porosité peut également servir de « réservoir » à des principe(s) actif(s) pour leur relargage contrôlé *in situ*.

La porosité se subdivise en trois grands domaines de taille de pores (nomenclature IUPAC [145]) représentés sur la Figure II-6 :

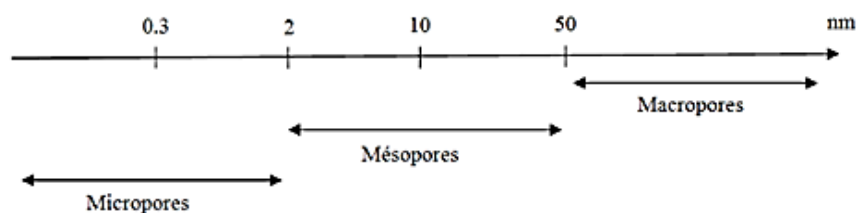


Figure II-6 : Nomenclature IUPAC des domaines de taille de pores [145].

La porosimétrie mercure est une technique d'analyse de la porosité qui permet d'accéder à des données telles que la distribution du volume poreux, dans une gamme allant de 3 nm à 450 µm, la masse volumique et la compacité des matériaux analysés (Cf. Annexe 4). Concernant le volume poreux, les informations portent essentiellement sur la macroporosité.

Sur la Figure II-7 sont reportées les distributions du volume poreux des tissus KIP 1200® et FM 50K® obtenues par porosimétrie mercure.

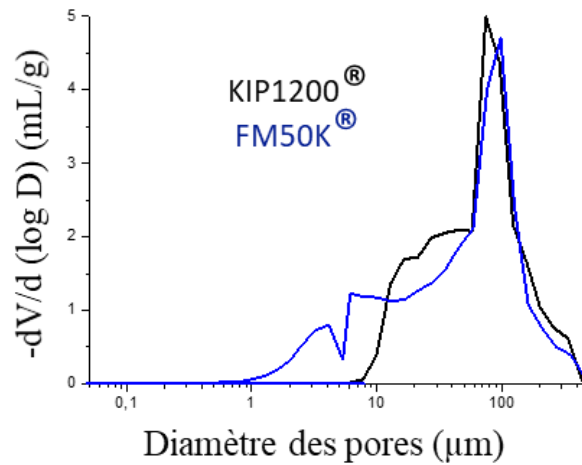


Figure II-7 : Distribution du volume poreux (-dV/d(logD)° en fonction du diamètre d'accès aux pores obtenue par porosimétrie mercure.

La Figure II-7 montre, pour les deux tissus, une distribution du volume poreux comprise entre 0,8 et 450 μm correspondant à des pores de taille macroscopique. On note que le KIP 1200® présente un maximum de volume poreux vers 75 μm, tandis que pour le FM 50K® le maximum se situe vers 95 μm. Ces valeurs correspondent à l'espace entre les mèches de fibres de carbone constitutives des tissus. Cette distribution du volume poreux permet également d'accéder à l'espace entre les fibres constituant les mèches qui est compris entre 0,8 et 60 μm pour le FM 50K® et entre 10 et 60 μm pour le KIP 1200®. Il en résulte que les interstices entre les fibres d'une mèche du tissu KIP 1200® sont de taille supérieure à ceux du tissu FM 50K®.

Les données concernant la masse volumique, le volume poreux et la compacité des tissus, sont reportées dans le Tableau II-3.

La masse volumique ainsi que le volume poreux sont calculés uniquement pour des pores de diamètres supérieurs à 0,8 μm car, pour des pores de diamètre inférieur, le volume poreux est négligeable.

La compacité de l'architecture des fibres est déterminée ainsi :

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

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Tableau II-3 : Résultats de la caractérisation des tissus par porosimétrie Hg.

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
FM 50K®	0,24	0,98	3,14	25

Les caractéristiques des deux tissus sont proches, à l'exception de la masse volumique des fibres. Son augmentation entraîne une légère diminution de la compacité. On constate que la masse volumique de la fibre du tissu FM 50K® est légèrement supérieure, cette augmentation provient notamment du procédé industriel utilisé pour la fabrication des tissus (type de précurseur, température d'élaboration, type d'activation, forme et dimension de la filière, etc.). Il en résulte que le FM 50K® possède une architecture plus compacte que le KIP 1200®.

La porosimétrie mercure ne permet pas d'avoir d'informations sur des pores dont la taille est inférieure à 3 nm. Pour accéder à ces informations, les tissus de carbone sont caractérisés par adsorption de diazote gazeux à 77 K ce qui permet d'obtenir des informations sur des pores ayant une taille allant de 0,7 à 50 nm (micropores et mésopores). Ils sont ensuite caractérisés par adsorption de dioxyde de carbone à 273 K, ce qui permet d'accéder au volume des pores de taille inférieure à 0,7 nm (ultra-micropores) (Cf. Annexe 5).

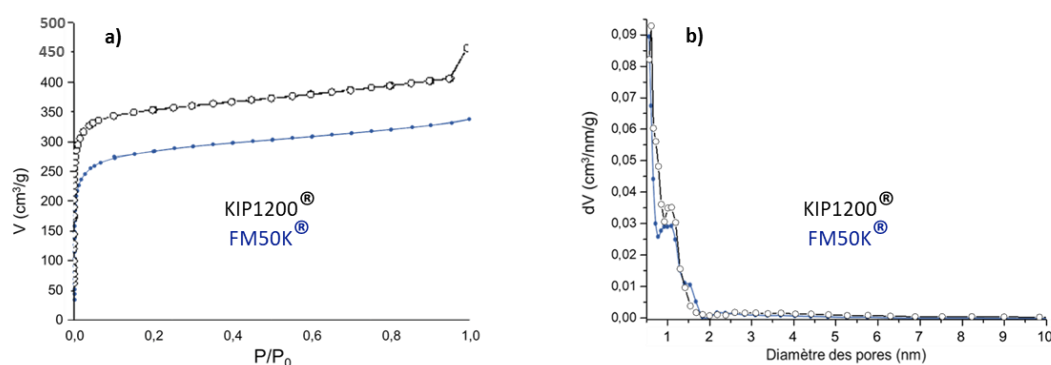


Figure II-8 : Isothermes d'adsorption d'azote à 77 K (a) et distributions en tailles de pores (b) du KIP 1200® et du FM 50K® obtenues par application de la méthode DFT (differential functional theory).

La Figure II-8 a) présente les isothermes d'adsorption N₂ à 77 K des deux tissus de carbone. Ces isothermes sont tous deux caractéristiques d'un matériau microporeux [146]. Le traitement des isothermes d'adsorption par des méthodes de calcul intensif et de simulation DFT (differential functional theory) permet d'établir la distribution en taille des pores. Les courbes de distribution en

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

taille de pores (Figure II-8 b)) confirment que les deux tissus sont très majoritairement microporeux avec une distribution étroite. La taille des micropores est centrée autour de 1 nm et le volume poreux total est de 0,68 et 0,51 cm³/g pour le KIP 1200® et le FM 50K® respectivement (Tableau II-4). Le volume poreux est essentiellement composé, dans les deux cas, par le volume des micropores (0,51 et 0,41 cm³/g). L'application de la méthode Dubinin-Radushkevish (DR) pour la détermination du volume microporeux confirme les résultats de la méthode DFT avec des volumes de micropores similaires. L'adsorption de CO₂ à 273 K indique que les micropores des deux matériaux sont pour la plupart des ultra-micropores (< 0,7 nm).

Tableau II-4 : Caractéristiques de la nanotexture poreuse déterminée à partir des isothermes d'adsorption d'azote à 77K et de dioxyde de carbone à 273K pour le KIP 1200® et le FM 50K®.

TFC	S_{BET} (m ² /g)	V_{TOTAL} (cm ³ /g)	V_{MICRO}	V_{MESO}	V_{MICRO}	V_{ULTRA}
			(N ₂ , DFT)	(N ₂ , DFT)	(N ₂ , DR)	(CO ₂ , DR)
			(cm ³ /g)	(cm ³ /g)	(cm ³ /g)	(cm ³ /g)
KIP 1200®	1693	0,68	0,51	0,09	0,53	0,52
FM 50K®	898	0,51	0,41	0,07	0,41	0,55

Pour conclure, les deux tissus de fibres de carbone sont principalement composés de micropores, qui sont essentiellement des ultra-micropores, avec un très faible pourcentage de mésopores. Cependant le KIP 1200® se démarque par une plus grande surface spécifique qui est d'environ le double de celle de FM 50K® (1700 contre 900 m²/g).

A.2.3. Conclusion

Les principales caractéristiques des tissus sont résumées ci-dessous dans le Tableau II-5 :

Tableau II-5 : Résumé des principales caractéristiques physico-chimiques des deux substrats.

TFC	KIP 1200®	FM 50K®
Précurseur	Résine phénolique	Rayonne
Diamètre des fibres (μm)	10-12	8-12
Ensimage	Non	Oui
%C	92,4	80,6
%H	0,6	0,8
%O	1,6	4,8
%N	0	3,2
%S	0	0
pH_{CN}	9,4	7,8
Groupes acide de surface (mmol/g)	0,48	2,93
Compacité (%)	29	25
Surface spécifique (m^2/g)	1693	898
V poreux TOTAL (cm^3/g)	0,68	0,51
V_{MICRO} (cm^3/g)	0,51	0,41
V_{MESO} (cm^3/g)	0,09	0,07
V_{ULTRA MICRO} (cm^3/g)	0,52	0,55

Le KIP 1200® comme le FM 50K® possèdent une microporosité et une faible compacité qui sont intéressantes pour l'imprégnation des tissus par des fluides en milieu aqueux, que ce soit par l'électrolyte lors de la synthèse du revêtement de phosphates de calcium, ou par des milieux ou fluides biologiques lors des tests permettant d'évaluer la biocompatibilité du matériau. De plus, ces caractéristiques, associées à leur propriété de conduction électrique, font de ces tissus des substrats idéaux pour une synthèse du revêtement de CaP par sono-électrodéposition.

Cependant, les deux tissus diffèrent sur certains aspects. Tout d'abord, le KIP 1200® n'a pas subi de traitement d'ensimage contrairement au FM 50K®. L'ensimage est constitué d'un mélange d'oxydes (Al et Zn), qui peut entrer en jeu dans le processus de synthèse des revêtements de CaP mais également jouer un rôle, bénéfique ou néfaste, sur la biocompatibilité du matériau. L'influence de l'ensimage sur la synthèse du revêtement de CaP est présentée dans la partie suivante de ce chapitre tandis que l'étude de la biocompatibilité est réalisée et discutée dans les chapitres IV. et V. de ce manuscrit.

Les caractérisations physicochimiques ont montré que le KIP 1200® a un caractère hydrophobe, du fait d'une faible quantité de groupements acides de surface (0,2 mmol/g) et d'un pourcentage d'oxygène trois fois inférieur à celui du FM 50K®. Etant donné que le milieu biologique est un milieu aqueux, donc hydrophile et que la qualité du revêtement dépend également de l'affinité à l'interface entre la fibre et l'électrolyte, le FM 50K® possède a priori des caractéristiques plus intéressantes. Les caractérisations ont montré qu'il possède un taux d'oxygène plus élevé, un plus grand nombre de fonctions acides de surface et est par conséquent plus hydrophile. De plus, il a été montré que l'oxydation d'un tissu de fibres de carbone permet d'améliorer l'adhésion cellulaire et donc la biocompatibilité du substrat [6]. A son avantage également, le FM 50K® possède une architecture plus resserrée qui peut être intéressante, notamment pour une meilleure adhésion cellulaire. La croissance des cellules sur un tissu se faisant de fibre en fibre, la proximité des fibres ne peut qu'améliorer l'affinité substrat/cellules.

Déposer un revêtement de CaP sur le KIP 1200® par sono-électrodéposition a déjà été réalisé au cours de la thèse de Q. Picard [6,8]. Lors de mon travail de thèse, l'étape de synthèse d'un revêtement de CaP a consisté à optimiser le procédé d'électrodéposition afin d'obtenir un revêtement avec un contrôle de ses caractéristiques, notamment de son homogénéité, structure, microtexture et composition chimique sur l'ensemble de la surface du tissu de carbone. La transposition de la méthode d'électrodéposition au tissu FM 50K® a permis d'étudier l'impact des caractéristiques intrinsèques du substrat fibreux sur la nature du revêtement de CaP. Ce questionnement fera l'objet de la partie suivante qui décrit les résultats obtenus lors de ce travail concernant les caractérisations physico-chimiques du revêtement de CaP élaboré dans des conditions expérimentales optimisées et celles des matériaux hybrides résultants.

B. Le matériau hybride : TFC / CaP

B.1. Protocole de synthèse du revêtement de CaP par sono-électrodéposition

B.1.1. Introduction

La sono-électrodéposition est une technique électrochimique simple à mettre en œuvre. Elle permet d'obtenir des revêtements de morphologie et épaisseur contrôlées, en solution aqueuse, sur des substrats rugueux comme les tissus de fibres de carbone [6,8,36]. Pour la synthèse de revêtements de CaP, le procédé consiste à plonger le tissu de fibres de carbone (électrode de travail) dans un électrolyte consistant en une solution aqueuse d'ions précurseurs calcium et phosphates issus respectivement du dihydrogénophosphate d'ammonium et du nitrate de calcium hydraté. L'application d'une polarisation cathodique provoque l'électrolyse de l'eau qui conduit à une augmentation locale du pH au niveau de l'électrode de travail (le tissu de carbone). Les ions OH^- ainsi produits vont se combiner aux ions PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} et Ca^{2+} , présents en solution, par un processus de co-précipitation à la surface des fibres de carbone. Le procédé de synthèse, ainsi que les phénomènes chimiques associés, seront plus amplement exposés dans la suite de ce chapitre. Le dopage du revêtement par des cations à visée thérapeutique peut-être également mis en œuvre en utilisant un électrolyte adapté. Ceci sera détaillé dans le chapitre III de ce manuscrit.

Parmi les principaux avantages de cette synthèse par voie électrochimique, on peut citer :

- la possibilité de recouvrir tous types de substrats conducteurs, qu'ils soient poreux, rugueux avec des géométries simples ou complexes possédant des surfaces internes difficilement accessibles par d'autres méthodes de synthèse [147–149].
- la possibilité de contrôler l'épaisseur et la microstructure du revêtement pour une composition chimique donnée [150].
- la possibilité de contrôler la composition chimique du revêtement en modulant la nature et la quantité des sels qui composent l'électrolyte [151].

L'application d'ultrasons lors de la synthèse permet notamment d'améliorer l'homogénéité du revêtement [36].

B.1.2. Dispositif expérimental

Le schéma de la Figure II-9 présente le montage expérimental utilisé lors de cette étude.

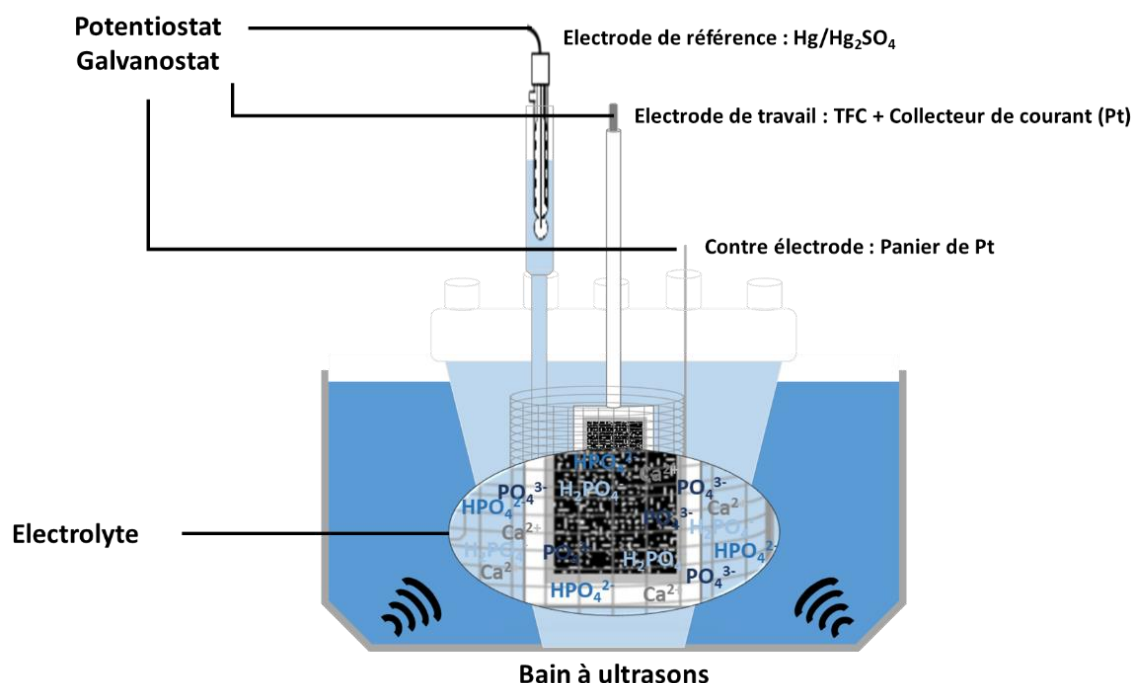


Figure II-9 : Schéma du dispositif expérimental de la sono-électrodéposition.

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

- L'électrode de travail : TFC fixé sur un collecteur de courant (fil de platine + grille de platine) plongé dans l'électrolyte. Cette électrode a été optimisée lors de la thèse de Q. Picard [6].
- La contre-électrode : panier de platine qui entoure l'électrode de travail. Cette contre-électrode a également été optimisée lors de la thèse de Q. Picard [6].
- 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 dérives de mesure de l'électrode de référence. Elle sert également à augmenter la précision et la stabilité de la mesure du potentiel de référence, 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 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich®). Le solvant est de l'eau ultra-pure d'une conductivité de $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$.

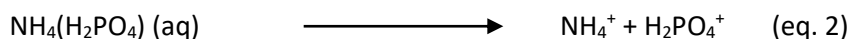
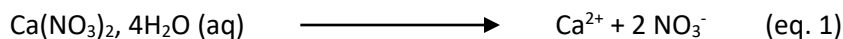
La cellule électrochimique (réacteur en verre de 150 mL) est placée dans un bain à ultrasons thermostaté TI-H-10 de la marque Fisherbrand®. Elle permet, entre autres, de fixer et de contrôler la température de la synthèse (entre 40 et 80 °C), ainsi que la puissance et la fréquence des ultrasons (35 ou 130 kHz) [6].

B.1.3. Synthèse de CaP par sono-électrodéposition

B.1.3.1. Principe

L'électrodéposition de CaP à la surface d'un substrat conducteur est un procédé de chimie douce datant des années 1990 [152]. Il permet d'obtenir un revêtement d'épaisseur contrôlée et homogène à température ambiante. De plus, cette méthode permet un contrôle des paramètres chimiques liés à la solution électrolytique (concentrations des sels, température et pH de la solution) et un contrôle des paramètres électriques (tension entre les électrodes ou intensité du courant traversant le circuit).

L'électrolyte est préparé par dissolution d'un sel de calcium et d'un sel de phosphate en milieu aqueux. Généralement, le nitrate de calcium tétrahydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et le dihydrogénophosphate d'ammonium ($\text{NH}_4(\text{H}_2\text{PO}_4)$) sont utilisés. Les réactions de dissolution en milieu aqueux s'écrivent :



La protonation des ions phosphate va dépendre du pH de l'électrolyte (Figure II-10). Au cours du temps, différents ions phosphate pourront être présents dans l'électrolyte, l'ion dihydrogénophosphate H_2PO_4^- , l'ion hydrogénophosphate HPO_4^{2-} et l'ion phosphate PO_4^{3-} , et réagir lors de la précipitation entre les deux sels précurseurs.

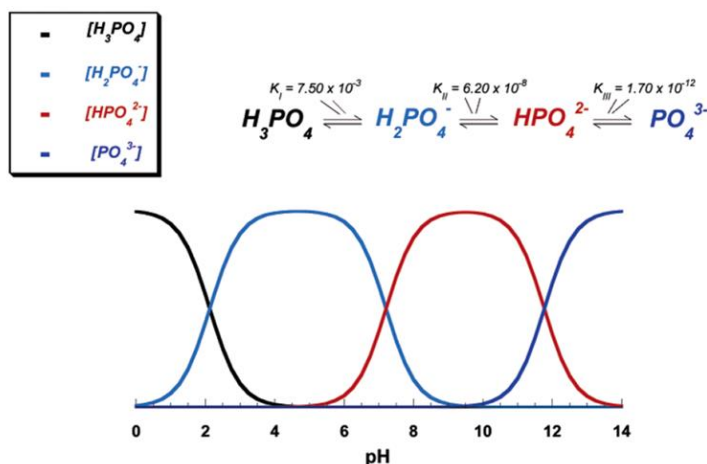
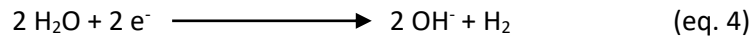
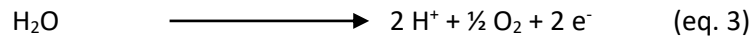


Figure II-10 : Concentrations ioniques en équilibre triprotique de l'acide phosphorique en solution en fonction du pH [46].

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Pour le revêtement de CaP, la technique électrochimique utilisée a consisté en l'application d'un courant cathodique (polarisation négative) entre les électrodes provoquant l'oxydation et la réduction de l'eau à la surface de la contre-électrode (eq. 3) et de l'électrode de travail, respectivement (eq. 4).



Comme le pH initial est acide, la réduction des protons peut également avoir lieu :



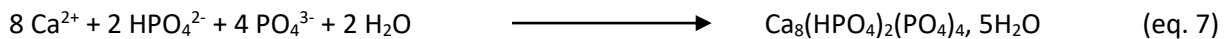
La formation d'ions hydroxydes (eq. 4) à l'électrode de travail augmente localement le pH et entraîne la co-précipitation des ions calcium et phosphate à la surface de l'électrode. À partir du pH 5,5, la formation des ions HPO_4^{2-} va permettre le début de la précipitation d'une phase phosphocalcique :

Phosphate dicalcique dihydrate (DCPD) :

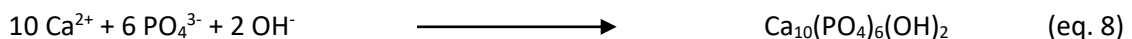


À partir du pH 9,5, l'apparition des ions PO_4^{3-} permet la formation de nouvelles phases comme par exemple :

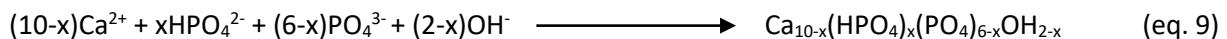
Phosphate octocalcique (OCP) :



Hydroxyapatite stœchiométrique (HA) :



Hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) :



En résumé, l'électrolyse de l'eau est la principale réaction de l'électrodéposition, mais d'autres réactions peuvent avoir lieu lors du dépôt. En effet, la présence d'espèces ioniques en solution, tels que les ions nitrates et dihydrogénophosphates, provoque d'autres réactions électrochimiques aux électrodes pouvant, entre autres, modifier le pH [147,151,153]. L'obtention d'un revêtement de CaP par sono-électrodéposition se déroule donc en trois phases : hydrolyse de l'eau et réactions électrochimiques associées, réactions acido-basiques puis précipitation.

B.1.3.2. Paramètres expérimentaux

La sono-électrodéposition est une technique de synthèse qui permet d'intervenir sur un grand nombre de paramètres. Parmi les paramètres importants qui vont influencer les caractéristiques du revêtement, peuvent être cités la concentration des précurseurs dans l'électrolyte et le pH associé. Les concentrations en précurseurs calcium et phosphate ainsi que le pH ont été optimisés lors des travaux de thèse de Q. Picard et sont conservés pour cette étude [6,8]. Les concentrations en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sont respectivement de 5 et 3 mmol/L. Le pH de l'électrolyte est le pH initial de la solution, soit $\text{pH} = 4,8$, en dessous de la valeur de pH auquel la co-précipitation s'initie ($\text{pH} = 5,5$).

Lors de cette précédente étude, les électrodes avaient également été optimisées, tout comme la durée de polarisation (jusqu'à 6 h). Cependant, le paramètre, sur lequel les travaux antérieurs s'étaient focalisés, a été la densité de courant. En effet, différentes densités de courant avaient été appliquées, de -25 mA/g à -500 mA/g, pour une durée de polarisation de 6 h. Des revêtements de CaP aux caractéristiques différentes, en termes d'homogénéité, quantité et épaisseur, microtexture, structure et composition chimique avaient été obtenus selon la polarisation appliquée.

Les résultats obtenus dans la thèse de Q. Picard [6], et qui ont servi de base à ce travail, sont regroupés dans la Figure II-11. Cependant, aucun revêtement n'était homogène sur l'ensemble du tissu de carbone. En effet, pour les revêtements synthétisés à des densités de courant allant de -25 et -50 mA/g, un recouvrement non homogène des fibres par le dépôt était observé avec une épaisseur du revêtement inférieure à 100 nm. Le revêtement obtenu à -75 mA/g possédait un recouvrement homogène et une épaisseur plus importante, comprise entre 250 et 600 nm, avec localement la présence d'excroissances de CaP. Pour des revêtements obtenus à -100 et -270 mA/g, le recouvrement était de nouveau hétérogène avec une épaisseur variant fortement de 600 nm et 2 μm . Des excroissances de CaP au sein des revêtements avaient également été observées ainsi que la présence d'une phase secondaire (carbonate de calcium).

Pour mon travail de thèse, un recouvrement homogène de CaP sur l'ensemble de la surface du tissu de carbone, ainsi qu'une épaisseur contrôlée du revêtement sont recherchés. Pour ce faire, un certain nombre de paramètres électrochimiques seront ajustés afin d'optimiser la qualité du revêtement de CaP. C'est ainsi que trois nouveaux paramètres ont été optimisés : la durée de polarisation, le type de polarisation (potentiostatique et galvanostatique), ainsi que la température de l'électrolyte.

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Dans la suite de ce chapitre, l'analyse des nouveaux revêtements de CaP, déposés en surface du tissu de carbone, sera réalisée pour évaluer :

- leur homogénéité, le recouvrement de la surface du tissu de carbone ainsi que leur épaisseur ;
- la quantité (prise en masse) de CaP déposée, la composition chimique, la morphologie, la microtexture et la structure des revêtements de CaP.

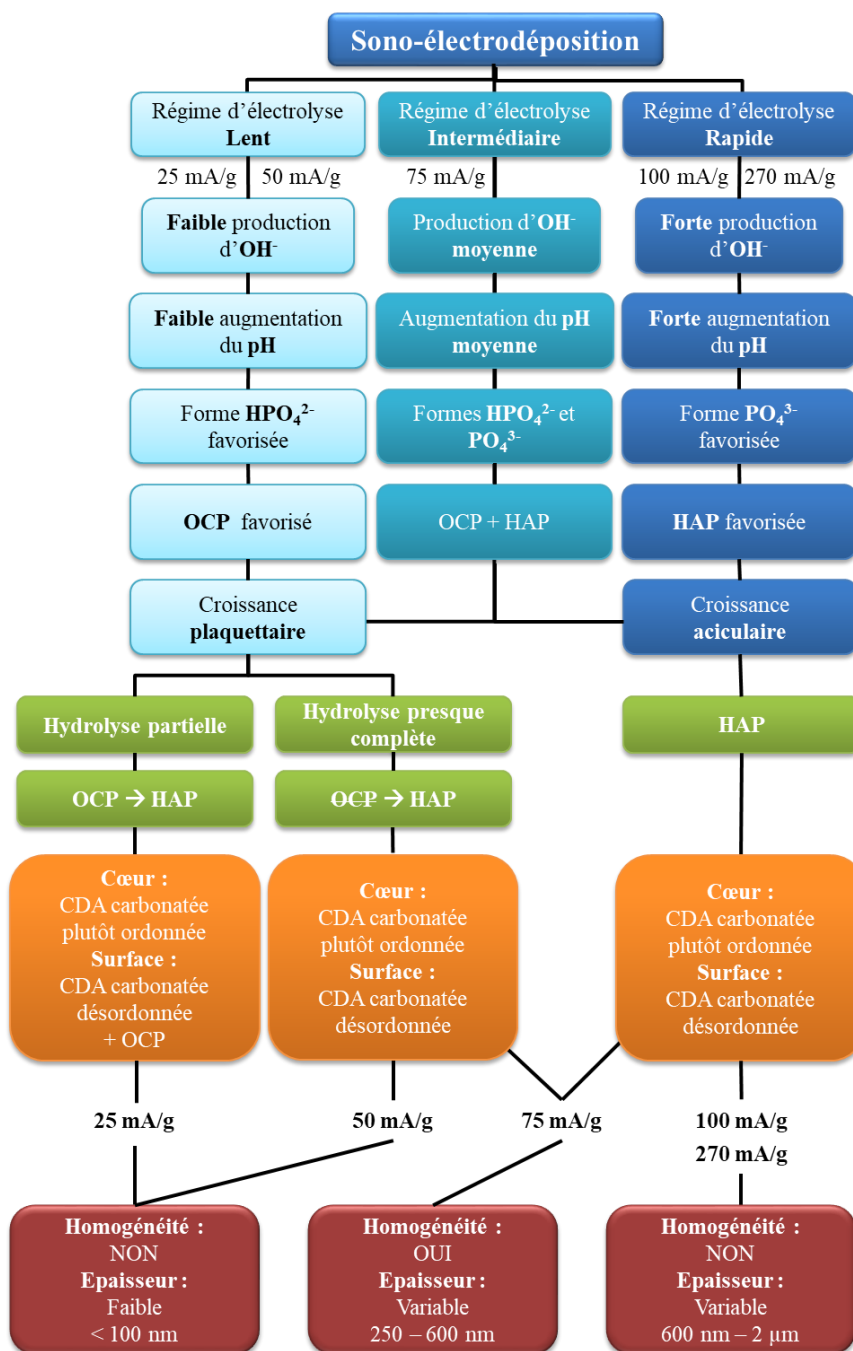


Figure II-11 : Schéma récapitulatif des mécanismes réactionnels mis en jeu lors du dépôt d'un revêtement de CaP à la surface d'un tissu de fibres de carbone par procédé de sono-électrodéposition (réactions électrochimiques (bleu), chimiques (vert)) et les structures qui en découlent (orange). Les caractéristiques d'homogénéité des revêtements formés (bordeaux) sont données en fonction du régime d'électrolyse [6].

B.2. Optimisation de la synthèse du revêtement de CaP

L'optimisation a été réalisée, dans un premier temps, sur le tissu KIP 1200® puis transposée, dans un second temps, sur le tissu FM 50K®, afin de vérifier si le changement de substrat affecte ou non les caractéristiques du revêtement de CaP. Les caractérisations MEB, IRTF et DRX sont réalisées sur les deux types de matériaux hybrides.

B.2.1. Influence de la durée de polarisation

Le premier paramètre étudié pour optimiser les revêtements de CaP sur tissu de carbone est la durée de polarisation à courant constant (mode galvanostatique). Dans un premier temps, la densité de courant de -75 mA/g, correspondant au revêtement de CaP le plus homogène des précédents travaux, est sélectionnée. Des durées de polarisation supérieures à 6 h sont testées et les résultats des prises de masse sont donnés sur la Figure II-12 a). La courbe montre l'évolution de la quantité de CaP déposé (gain de masse) pour des durées de polarisation allant jusqu'à 65 h. Le gain de masse augmente pendant les 24 premières heures. A partir de 65 h de synthèse, un très faible gain de masse (<2,5 %) est mesuré du fait d'une dissolution du revêtement. En effet, une compétition entre précipitation et dissolution a lieu dans le réacteur. Après un certain temps, la quantité d'ions précurseurs de CaP à proximité de la surface du tissu s'amenuise et la dissolution devient prépondérante. Afin d'obtenir plus d'information sur la durée optimale de synthèse, la même expérience est réalisée avec deux autres densités de courant, -50 mA/g (faible densité de courant) et -270 mA/g (forte densité de courant) pour une durée de polarisation maximale de 24 h (Figure II-12 b)). On note qu'une dissolution du dépôt a toujours lieu après 24 h pour les densités de courant comprises entre -25 et -500 mA/g. La Figure II-12 b) illustre une différence de gain de masse très faible, voire négligeable, entre 10 h et 24 h pour les 3 densités de courant. A partir de 10 h de synthèse, un plateau est atteint avec un gain de masse compris entre 15 et 20 % pour des densités de courant de -75 et -270 mA/g et de 10 % pour la densité de courant de -50 mA/g. Il est important de signaler qu'un des inconvénients possible d'un gain de masse trop important, donc d'une quantité de CaP importante, est que le revêtement soit susceptible de croître massivement dans les espaces entre les fibres. Il se formerait alors un revêtement continu et rigide qui entraînerait une diminution de la flexibilité du matériau, ainsi que la production de débris lors de sa manipulation. Une analyse par microscopie MEB est réalisée afin de vérifier le recouvrement du revêtement de CaP sur les fibres.

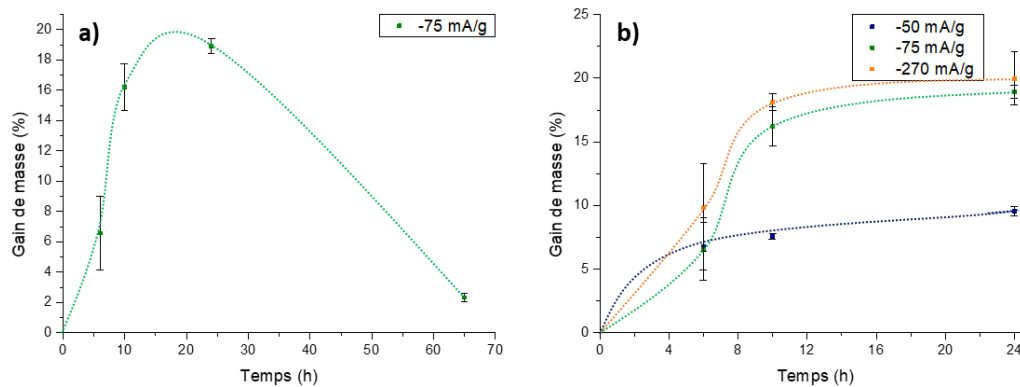


Figure II-12 : Evolution du gain de masse du tissu KIP 1200® en fonction de la durée de polarisation à différentes densité de courant à : a) - 75mA /g jusqu'à 65 h de durée de polarisation; b) -50, -75 et -270 mA/g jusqu'à 24 h de durée de polarisation.

Une étude par MEB a permis d'analyser la répartition du revêtement de CaP sur le tissu et les fibres, ainsi que la morphologie du revêtement sur les fibres. Les images MEB de la Figure II-13 donnent une illustration des revêtements de CaP déposés sur les fibres pour des synthèses réalisées à -50 mA/g pour des durées de polarisation de 6, 10 et 24 h.

Dans ces conditions de synthèse, un revêtement uniforme de CaP recouvre les fibres sans formation de « ponts » entre elles. Sur les images à faible grossissement (Figure II-13 a)), une différence de morphologie est déjà bien visible, elle consiste en une augmentation des diamètres des fibres, traduisant une augmentation des épaisseurs des revêtements, qui s'accompagne d'une évolution de la rugosité de surface des fibres. Entre 6 h et 24 h l'épaisseur évolue de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres (7 μm au maximum). A plus fort grossissement (Figure II-13 b)), après 6 h de synthèse, on observe un revêtement très homogène de morphologie de type « plaquettes ». Après 10 h de synthèse, on observe localement la formation d'excroissances sur le dépôt plaquettaire. Après 24 h de synthèse, le nombre d'excroissances augmente et celles-ci semblent recouvrir totalement la surface des fibres. Il en résulte que, dès 6 h de synthèse, le revêtement de CaP recouvre de manière homogène la totalité de la surface des fibres observées. Une fois cette première couche déposée, la précipitation de CaP engendre la formation d'excroissances directement sur cette couche homogène, et le nombre d'excroissances croît avec la durée des synthèses.

De ces observations on montre, qu'au-delà de 6 h de synthèse, l'augmentation de la prise en masse n'est pas due à une augmentation homogène de l'épaisseur du revêtement mais à la formation de nombreuses excroissances. De ce fait, pour la suite de cette étude, une durée de polarisation de 6 h a été sélectionnée, temps minimal pour obtenir un revêtement homogène de CaP sur les fibres et le tissu de carbone KIP 1200®.

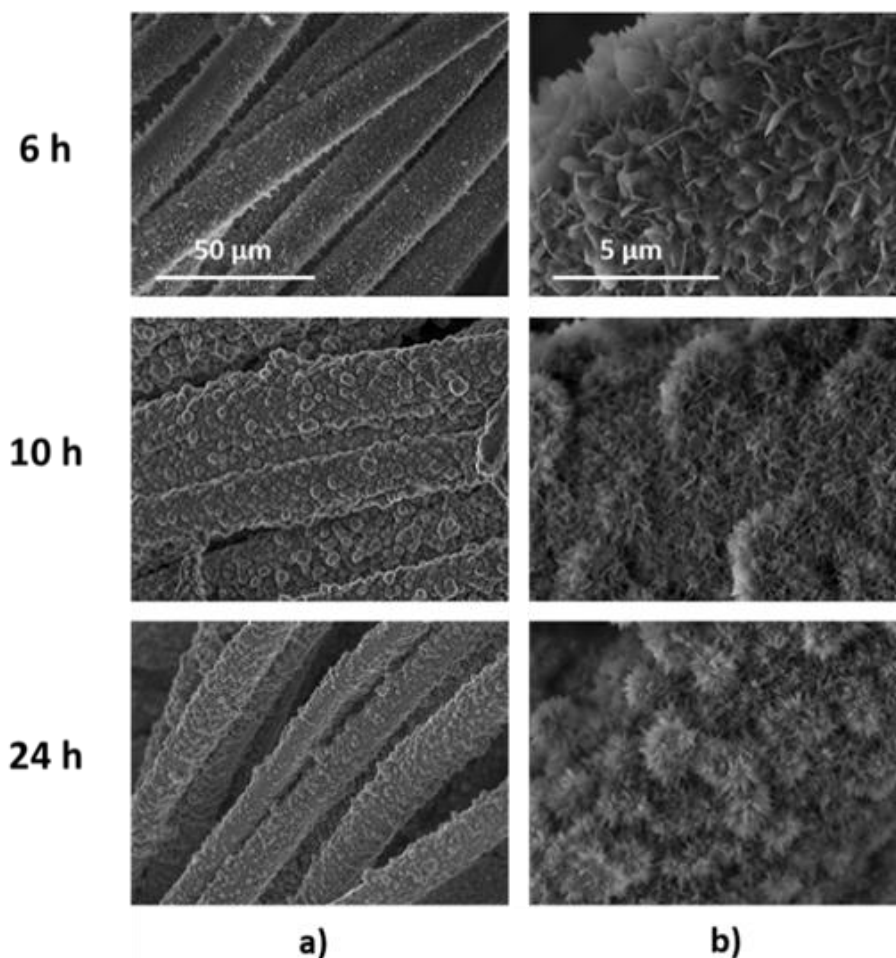


Figure II-13 : Images de MEB des revêtements de CaP déposés sur le tissu KIP 1200® à une densité de courant de -50 mA/g à différentes durée de polarisation . Grandissements de : a) x1000 et b) x10 000.

B.2.2. Influence de la polarisation : mode potentiostatique

La formation du revêtement de CaP repose principalement sur le mécanisme d'électrolyse de l'eau qui conduit à un gradient de pH entre les deux électrodes. Au voisinage de l'électrode de travail, constituée par le TFC, une augmentation de pH a lieu. Nous émettons l'hypothèse que l'application d'une polarisation au voisinage du potentiel d'électrolyse de l'eau permettrait un meilleur contrôle de la synthèse. D'où notre intérêt à travailler en mode potentiostatique et à étudier l'effet de la variation du potentiel de polarisation sur les caractéristiques des revêtements de CaP et à déterminer le potentiel optimal pour revêtir de CaP le tissu de fibres de carbone. Les trois valeurs de potentiels investiguées ont été choisies de part et d'autre du potentiel de réduction de l'eau, situé à -0,94 V / Hg/Hg₂SO₄, soit : -0,8 V, -1 V et -1,2 V vs Hg/Hg₂SO₄ pendant 6 h sans contrôle de la température (Figure II-14).

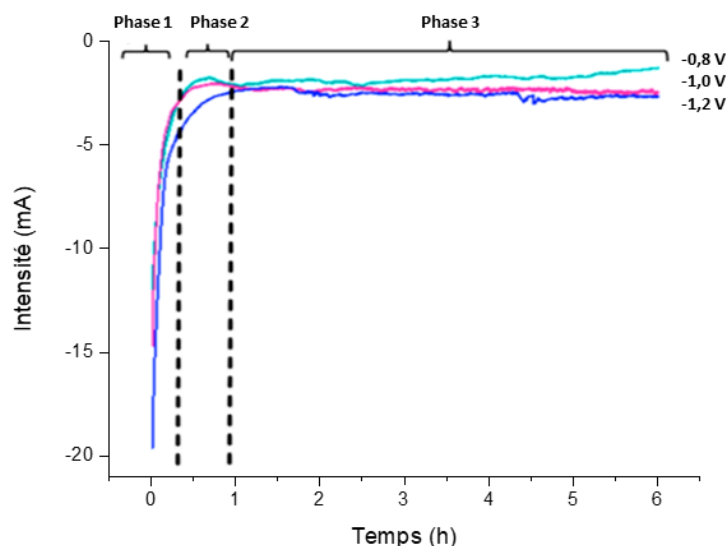


Figure II-14 : Courbes électrochimiques de l'électrodéposition de CaP sur le KIP 1200® en appliquant un potentiel constant de -0,8 V, -1 V, -1,2 V.

Les trois courbes électrochimiques se subdivisent en trois zones distinctes. Une première zone se caractérise par une augmentation rapide de l'intensité de courant (phase 1), ce qui indique le chargement de la double couche électrochimique en surface du tissu de carbone et qui traduit une formation rapide de la couche barrière de phosphate de calcium sur la surface des fibres de carbone. Le processus est contrôlé par le phénomène de transfert d'électrons. La deuxième zone (phase 2) montre un début de stabilisation de l'intensité ; ceci correspond à une étape de nucléation correspondant à la création de sites préférentiels à la surface des fibres. Cette phase est contrôlée par un processus mixte de transfert d'électrons et de transport de masse. Enfin, une stabilisation de l'intensité est atteinte après une heure correspondant à la croissance de l'hydroxyapatite à la surface du substrat (phase 3) ; le processus est contrôlé majoritairement par le transport de masse.

Le gain de masse a ensuite été calculé pour chacune des trois synthèses et les valeurs sont représentées sur la Figure II-15.

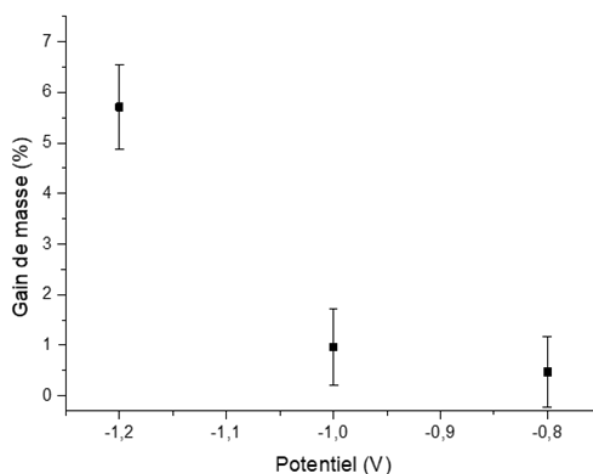


Figure II-15 : Evolution du gain de masse du tissu KIP 1200® en fonction du potentiel appliqué à l'électrode (mode potentiostatique).

Lorsque le potentiel décroît de -0,8 V à -1,2 V, le gain de masse augmente pour enregistrer une valeur maximale de 6 % à -1,2 V. Plus le régime d'électrolyse de l'eau est important plus le gain de masse est élevé et caractérisé par une élévation rapide du pH au voisinage de la surface du tissu de carbone. Le gain de masse reste relativement faible pour les 3 conditions de valeur de potentiel (inférieur à 10 %).

Les morphologies des revêtements de CaP sont ensuite observées par MEB. La caractérisation des échantillons par MEB a mis en évidence la formation d'un dépôt plaquettaire pour les trois valeurs de potentiel et une très grande disparité en épaisseur et en quantité (Figure II-16) des revêtements de CaP.

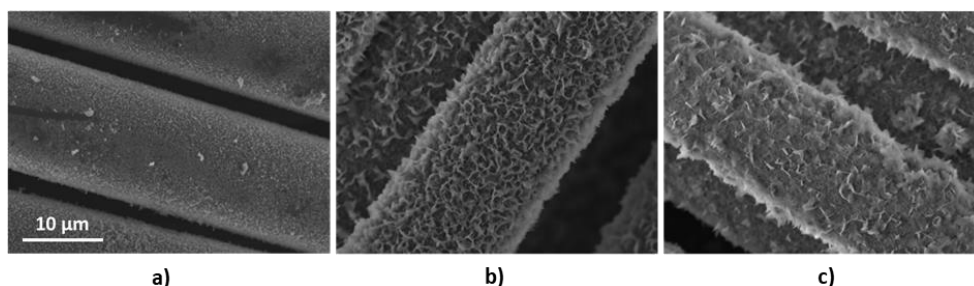


Figure II-16 : Images de MEB des revêtements de CaP sur les fibres de carbone du tissu KIP 1200® obtenus à des valeurs de potentiel de : a) -0,8 V, b) -1,0 V et c) -1,2 V.

Les échantillons synthétisés à -0,8 V (Figure II-16 a)) se caractérisent par la formation d'un revêtement très mince déposé en surface des fibres et une répartition non homogène du revêtement. L'épaisseur est très faible, de l'ordre de quelques nanomètres, et le revêtement est peu adhérent aux fibres. Dans ces conditions opératoires le régime d'électrolyse est très faible, ce qui peut expliquer la lenteur du processus de dépôt, la réaction d'électrolyse étant la réaction clé lors de l'électrodéposition.

Les échantillons synthétisés à -1 V (Figure II-16 b)) présentent des caractéristiques différentes. La répartition du revêtement à la surface des fibres est très homogène, l'épaisseur du revêtement est très mince, de l'ordre de 0,5 μm. À -1 V le revêtement montre une très forte adhésion aux fibres de carbone, ce qui n'a pas été remarqué pour les autres valeurs de potentiel. L'adhésion n'est pas mesurée, elle est uniquement évaluée empiriquement lors de la manipulation du matériau. Il est alors impossible de séparer le revêtement de CaP de la surface des fibres sans arracher ces dernières.

A un potentiel de -1,2 V, un maximum de gain de masse est obtenu avec un recouvrement total des fibres de carbone par le revêtement de CaP. Il est constitué de plaquettes de taille inférieure à celles observées précédemment et le revêtement peut atteindre une épaisseur de 1,2 μm. Le revêtement ainsi formé est très dense avec la formation d'un grand nombre d'excroissances. Ces excroissances sont constituées d'agglomérats de plaquettes et conduisent à introduire une rugosité de surface du revêtement.

Les revêtements de CaP ont également été caractérisés en MET (Figure II-17). Cependant, le revêtement synthétisé à -0,8 V n'a pu être analysé faute de pouvoir récupérer suffisamment de matière.

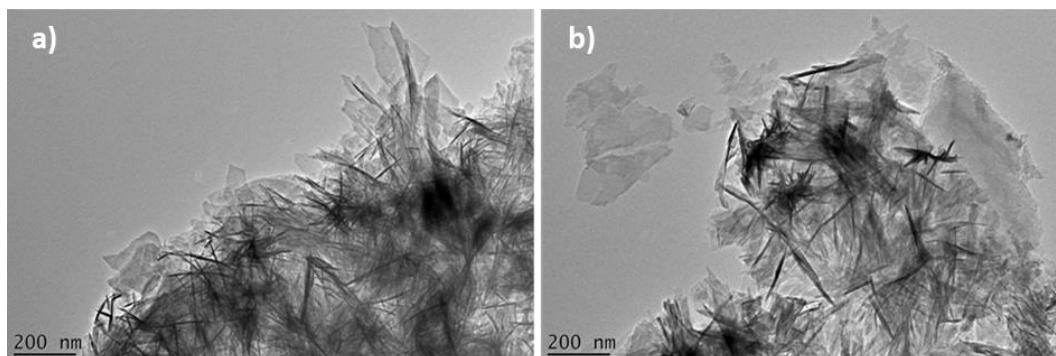


Figure II-17 : Images MET des revêtements de CaP synthétisés à un potentiel de : a) -1,0 V et b) -1,2 V.

L'analyse MET des échantillons élaborés à potentiel constant montre, pour les 2 valeurs de potentiel, des morphologies constituées essentiellement de plaquettes de type lamelles planes, déposées à plat et de plaquettes/lamelles enroulées sur leurs extrémités. En effet, naturellement les plaquettes lamellaires ont tendance à s'enrouler sur leurs bords. Aucune différence de microtexture n'est observée entre les deux revêtements de CaP. Les dimensions des plaquettes sont estimées entre 20 et 800 nm.

Au regard de ces résultats, c'est la polarisation en mode potentiostatique qui a été choisie, avec une valeur de potentiel de -1 V qui sera appliquée pour la suite des synthèses de dépôt de CaP. En effet, la polarisation à un potentiel de -0,8 V ne permet pas d'obtenir un revêtement suffisamment recouvrant, homogène et adhérent sur le tissu et les fibres de carbone. Concernant la polarisation à un potentiel de -1,2 V, même si elle permet la formation d'un revêtement de plus grande épaisseur, les excroissances créent des hétérogénéités et rugosités de surface. Les excroissances créent localement des ponts entre les fibres qui entraînent soit, une perte de la flexibilité du matériau, soit, lors d'une action mécanique, la formation de débris. La faible quantité du revêtement obtenue lors de la polarisation à un potentiel de -1 V peut être optimisée en jouant sur d'autres paramètres tels que la température de l'électrolyte lors du dépôt de CaP. L'influence de ce paramètre sur la nature du revêtement de CaP n'avait pas été envisagée dans les travaux antérieurs. On peut cependant noter que, lors des études citées dans la littérature, les expériences de sono-électrodéposition sont réalisées à une température constante comprise entre 37 °C et 70 °C, quel que soit le type de substrat [36,154–157]. On peut également signaler une étude qui a montré que le dépôt d'un revêtement de CaP sur une plaque de titane par électrodéposition à une température inférieure à 37 °C a entraîné la formation d'une phase amorphe de CaP [154].

B.2.3. Influence de la température de l'électrolyte

Cette partie est consacrée à l'étude de l'effet de la variation de la température de l'électrolyte sur les caractéristiques structurales et physico-chimiques des revêtements de CaP synthétisés à un potentiel de -1 V pendant 6 h. Sans contrôle de la température, celle-ci évolue de 22-25 °C (température ambiante) à 40-45 °C sous l'effet des ultrasons. Afin, d'étudier l'influence de la température, cette dernière est fixée à 50, 60, 70 ou 80 °C avant chaque synthèse et contrôlée pendant toute la durée de chaque synthèse.

La courbe de la Figure II-18 illustre la variation du gain de masse du tissu KIP 1200® en fonction de la température de l'électrolyte pour les synthèses réalisées à 50, 60, 70 et 80 °C pour des conditions expérimentales de polarisation identiques (valeur de potentiel de -1 V).

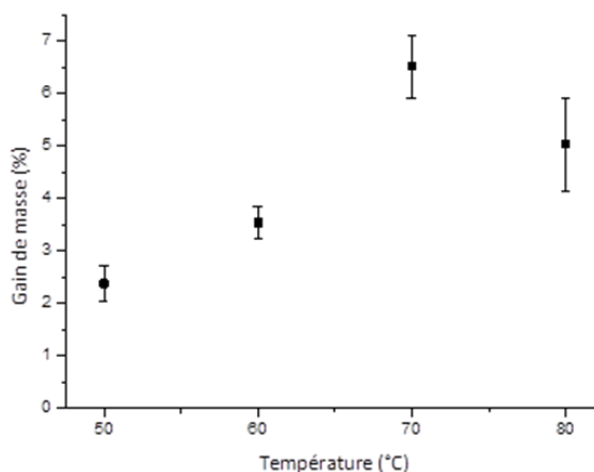


Figure II-18 : Evolution du gain de masse de CaP sur le tissu KIP 1200® en fonction de la température de l'électrolyte, à une valeur de potentiel de -1 V.

Le gain de masse de CaP augmente avec la température de l'électrolyte jusqu'à atteindre un maximum de 6,5 % à 70 °C. À 80 °C une légère diminution du gain de masse est observée avec une valeur se situant à 5 % environ. Cette diminution de la prise de masse peut s'expliquer par un changement de la composition de l'électrolyte au cours de cette synthèse. En effet, à partir de 80°C une importante évaporation de l'électrolyte est observée en comparaison aux autres températures de synthèse. De plus, une partie du tissu de carbone n'est plus totalement immergée dans l'électrolyte. Ceci conduit à un manque de revêtement de CaP sur la partie non immergée du tissu de carbone.

Pour les 4 températures de l'électrolyte, les images MEB montrent que le revêtement de CaP est homogène sur l'ensemble du tissu (sauf à l'une des extrémités des échantillons synthétisés à 80 °C, voir commentaire ci-dessus) ainsi que sur l'ensemble des fibres avec une morphologie du revêtement de CaP de type plaquettaire (Figure II-19).

A la température de 70°C, le gain de masse le plus important est obtenu. Le revêtement de CaP est homogène et déposé uniquement sur les fibres, et non pas dans les porosités inter-mèches de fibres. Les images de MEB (Figure II-19) montrent qu'à cette température la morphologie est toujours constituée de plaquettes, mais elles sont de plus grande taille. Ces observations indiquent qu'à 70 °C la vitesse de croissance des particules est plus rapide [158]. Ceci peut s'expliquer par une plus grande mobilité des espèces (précurseurs) qui entraîne une forte probabilité d'interactions. Néanmoins, cette déduction est valable uniquement jusqu'à cette température. En effet, à 80 °C, les plaquettes observées sont de plus petite taille.

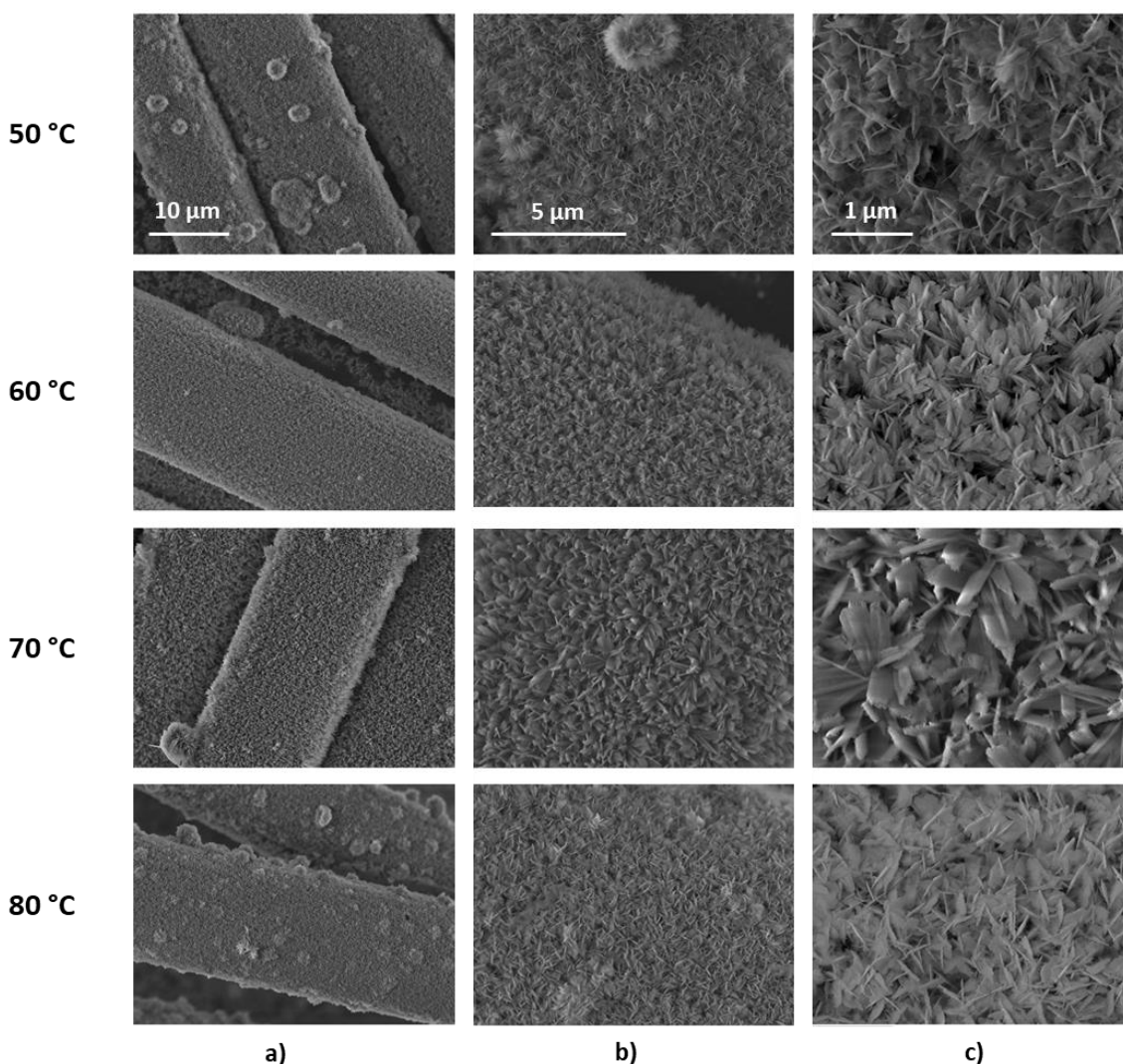


Figure II-19 : Images MEB des revêtements de CaP déposés sur le KIP 1200® aux différentes températures de synthèse pour des grossissements de : a) x3000, b) x10 000 et c) x20 000.

De ces résultats il en résulte que la température de 70°C a été sélectionnée pour la suite des synthèses. Il est à noter que des températures supérieures à 37 °C ont déjà été utilisées pour des procédés d'électrodéposition d'hydroxyapatite sur carbone [36,159]. Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature.

B.2.4. Conclusion

Les paramètres de synthèse qui ont été optimisés et qui seront utilisés pour la suite de cette étude sont :

- Concentration des précurseurs : $[Ca] = 5 \text{ mmol/L}$ et $[P] = 3 \text{ mmol/L}$
- pH initial : 4,8
- Polarisation cathodique en mode potentiostatique : $-1 \text{ V} / \text{Hg/Hg}_2\text{SO}_4$
- Durée de polarisation : 6 h
- Température de l'électrolyte : 70°C
- Ultra-sons : fréquence de 35 KHz et puissance délivrée de 30 %

Les cinq différents matériaux hybrides élaborés à différentes densités de courant (-25 , -50 , -75 et -270 mA/g) et à potentiel constant (-1 V) par dépôt de CaP sur le tissu KIP 1200® ont été photographiés dans les mêmes conditions afin de pouvoir être comparés (Figure II-20).

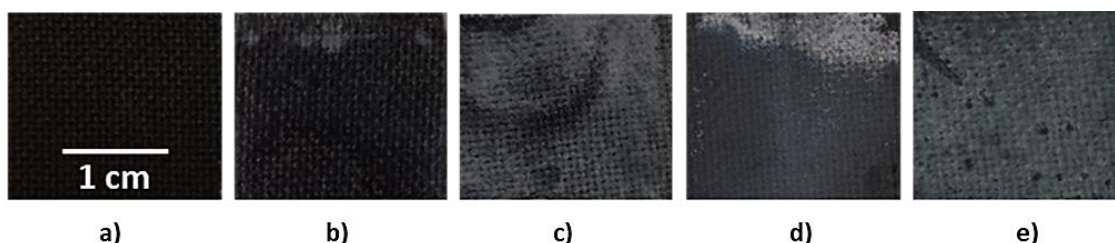


Figure II-20 : Photographies des différents matériaux hybrides (appareil photo numérique). a) Tissu KIP 1200® brut b), c), d) et e) matériaux hybrides synthétisés à -25 mA/g , -75 mA/g , -270 mA/g et $-1,0 \text{ V}$ respectivement.

La photographie e) de la Figure II-20 correspond à la synthèse optimisée lors de ce travail. Elle montre un revêtement de CaP recouvrant de manière homogène l'ensemble du tissu, contrairement aux synthèses à faible et à forte densités de courant (photographies a) et d)). Il apparaît également comme étant plus homogène que celui obtenu à densité de courant intermédiaire (-75 mA/g , revêtement considéré comme homogène dans les travaux antérieurs [6,8]). Les différences majeures entre ces deux revêtements « homogènes » (densité de courant intermédiaire de -75 mA/g et potentiel constant de -1 V) résident essentiellement sur l'homogénéité de l'épaisseur du dépôt de CaP et sur les propriétés d'adhérence du revêtement.

Le revêtement de CaP obtenu à potentiel constant est nettement plus adhérent à la fibre et recouvre de manière totalement homogène la surface des fibres et du tissu, ce qui répond aux objectifs fixés.

B.3. Influence du substrat

Une fois les paramètres expérimentaux de sono-électrodéposition optimisés, la synthèse du revêtement de CaP a été réalisée sur le second substrat, le FM 50K®, afin d'étudier l'influence d'un autre tissu de fibres de carbone qui diffère par sa chimie de surface (taux plus élevé de fonctions oxygénées acides, d'où un substrat plus hydrophile), sa compacité plus élevée et la présence d'un ensimage à sa surface.

En tout premier lieu, les courbes électrochimiques (évolution de l'intensité du courant en fonction de la durée de polarisation, à potentiel constant de -1 V) ont été comparées afin de vérifier que le changement de substrat n'a pas d'incidence sur la synthèse de CaP. Les courbes électrochimiques sont identiques, ceci indique que les deux tissus de fibres de carbone ont des caractéristiques similaires en tant que collecteur de courant. Il s'ensuit que les mêmes réactions chimiques et électrochimiques sont mises en jeu lors de la synthèse de CaP sur ces deux tissus de fibres de carbone (Figure II-21).

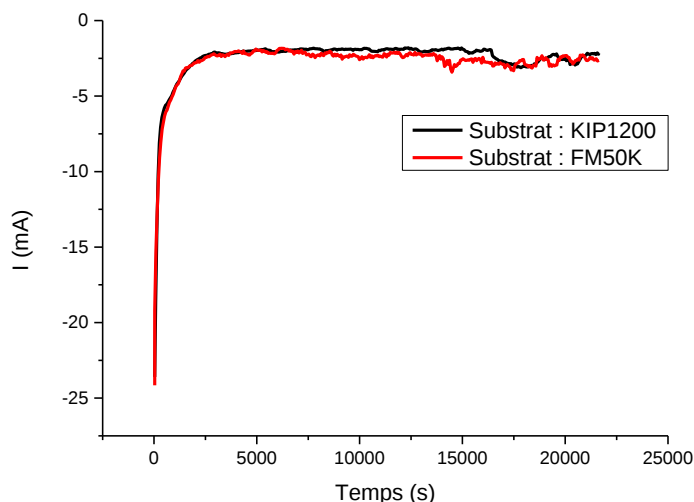


Figure II-21 : Comparaison de l'évolution de l'intensité du courant en fonction de la durée de polarisation à -1 V pour les deux tissus de fibres de carbone KIP 1200® et FM 50K®.

Le gain de masse du revêtement de CaP a été évalué pour chaque tissu en moyennant le gain de masse sur dix échantillons de matériaux hybrides obtenus dans les mêmes conditions. Pour ce faire, les expériences sur les deux substrats ont été conduites en même temps dans le même bain à ultrasons avec la même solution précurseur. Les résultats montrent un gain de masse identique pour les deux substrats de $6,5 \pm 0,9$ % dans le cas du KIP 1200® et de $6,5 \pm 0,6$ % dans le cas du FM 50K®. Malgré une surface spécifique 2 fois plus élevée pour le KIP 1200® et des volumes poreux un peu plus importants, aucune incidence de ceux-ci n'agit sur les régimes de dégagement gazeux lors de l'électrolyse de l'eau.

Il a également été effectué une analyse de la composition chimique des revêtements de CaP par IRTF. Les spectres IRTF du domaine ν_1 et ν_3 des phosphates montrent, pour les revêtements de CaP déposés

à potentiel constant sur les deux substrats, des spectres superposables (Figure II-22). Une description en détail du spectre complet d'un revêtement de CaP par IRTF est présentée dans la partie suivante.

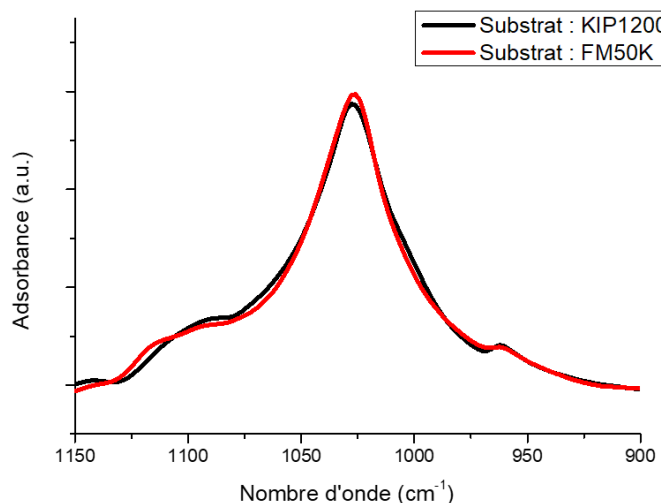


Figure II-22 : Influence du substrat sur le spectre IRTF pour le domaine ν_1 et ν_3 des phosphates.

L'ensemble de ces résultats tend à démontrer que les revêtements de CaP synthétisés sur les deux substrats à potentiel constant de -1 V ont des compositions chimiques très proches. Concernant l'homogénéité des revêtements, les images MEB montrent que les fibres en surface des deux tissus sont complètement recouvertes de CaP de façon homogène. On observe aussi quelques petites excroissances pour les 2 tissus de carbone mais aucun comblement entre deux fibres n'est observé (Figure II-23 a) et b)). À fort grossissement (x10 K), pour les deux tissus, les revêtements de CaP sont constitués uniquement de plaquettes de dimension similaire, de quelques centaines de nanomètres (Figure II-23 a') et b')).

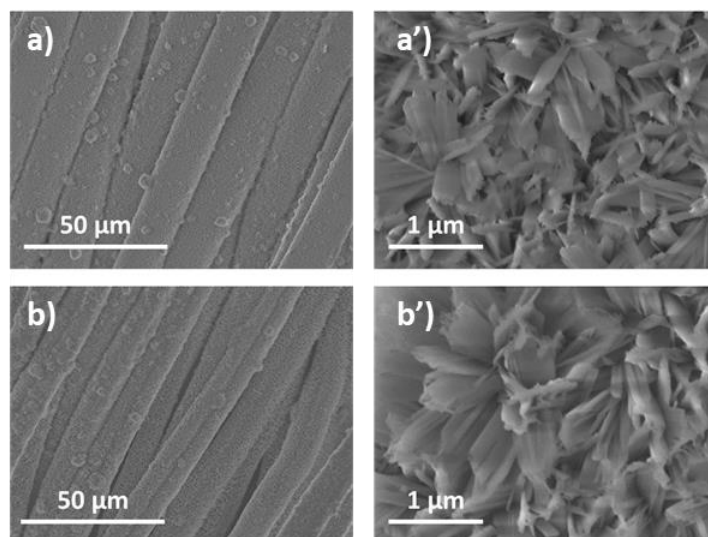


Figure II-23 : Images MEB d'un revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V sur deux différents substrats : a), a') KIP 1200® et b) b') FM 50K®.

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Dans le cas du FM 50K®, certaines plaquettes de CaP semblent être de plus grande taille. Ces plaquettes de CaP appartiennent à une excroissance. Les plaquettes des excroissances sont synthétisées dans un deuxième temps, à la surface du revêtement. L'hypothèse émise quant à leur formation est la suivante :

- Une première « couche » de dépôt de CaP bien couvrante est créée à partir de points de nucléations en surface de la fibre et sert de support pour la croissance de nouvelles plaquettes. Ces nouvelles plaquettes possèdent initialement une base de dimension importante qui s'élargirait au fur et à mesure de la croissance.

On peut signaler aussi l'analyse faite par diffraction des rayons X des revêtements de CaP déposés sur chaque type de tissu. Les données de l'analyse des diffractogrammes montrent la présence d'une seule phase, l'hydroxyapatite. Dans le Tableau II-6 sont reportées les valeurs en $2\theta^\circ$ ($\lambda K\alpha$ Cu = 0,154056 nm) des principales réflexions observées correspondant à l'hydroxyapatite. La comparaison des positions des réflexions montre que la même phase de CaP est déposée sur les deux tissus.

Tableau II-6 : Position en $2\theta^\circ$ ($\lambda K\alpha$ Cu = 0,154056 nm) des principaux pics de diffraction des revêtements de CaP déposés sur les deux substrats, KIP 1200® et FM 50K®.

	(002)	(211)	(112)	(300)
Substrat	Position en $2\theta^\circ$			
KIP 1200®	26,11	32,04	32,49	33,16
FM 50K®	26,11	31,98	32,45	33,13

Cette étude préliminaire a mis en évidence que les deux substrats utilisés, KIP 1200® et FM 50K®, n'ont pas d'influence sur les caractéristiques du revêtement de CaP. Dans la section suivante, les résultats des caractérisations détaillées du revêtement de CaP formé sur le tissu de fibres de carbone FM 50K® dans les conditions opératoires optimisées seront exposés.

C. Caractérisation du revêtement de phosphate de calcium déposé sur le tissu de fibres de carbone FM 50K® par sono-électrodéposition à -1 V

Les caractérisations physico-chimiques du revêtement de CaP sont réalisées directement sur le revêtement (ou sur la poudre de ce revêtement) et/ou sur le matériau hybride dont le substrat est le tissu de fibres de carbone, FM 50K®. Ce dernier a été sélectionné en raison de ses caractéristiques physico-chimiques (voir paragraphe A de ce chapitre) et de sa meilleure biocompatibilité (Cf. Chapitre IV.).

Pour rappel, le revêtement de CaP est synthétisé par sono-électrodéposition en mode potentiostatique à -1 V durant 6 h à 70 °C. La concentration de la solution d'électrolyte est de 5 mmol/L et 3 mmol/L en précurseurs de calcium et phosphates respectivement, pour un pH initial de 4,8. La fréquence des ultrasons appliquée est de 35 kHz pour une puissance délivrée de 30 %.

C.1. Homogénéité du revêtement de CaP

Afin d'observer la profondeur du revêtement de CaP au sein du tissu de fibres de carbone, des coupes du matériau hybride ont été réalisées par cryofracture. Pour ce faire, deux coupes perpendiculaires ont été effectuées au centre du tissu afin d'observer le revêtement selon deux directions, parallèlement et perpendiculairement à la direction de tissage. Ces sections transversales de fibres ont ensuite été caractérisées par MEB dans les conditions habituelles d'observations (Figure II-25).

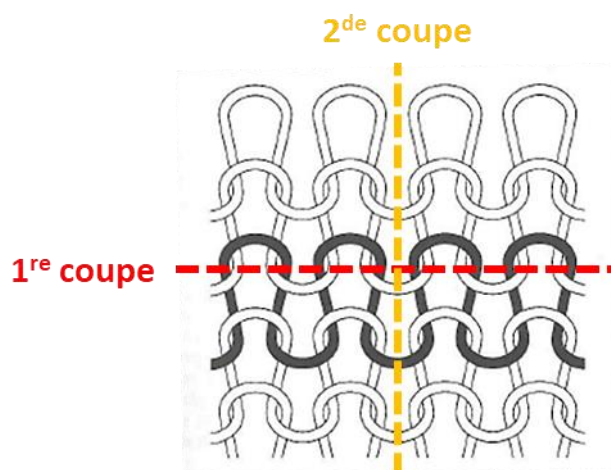


Figure II-24 : Coupes transversales réalisées par cryofracture sur le tissu de carbone FM 50K®.

Les images de MEB permettent, dans un premier temps, d'estimer l'épaisseur du matériau hybride, qui est d'environ 600 μm (Figure II-25). Dans un second temps, elles permettent également de confirmer les observations faites à l'œil nu (Figure II-20), à savoir, la présence d'un revêtement recouvrant, de façon homogène, la totalité des deux faces du tissu. Ce recouvrement se fait

uniquement la surface des fibres, sans pont de CaP entre elles. En effet, les sections transversales montrent que le dépôt de CaP recouvre uniquement l'ensemble des fibres, une à une (Figure II-25). Ce type de revêtement, sans « ponts » entre les fibres, permet de préserver la flexibilité originelle du substrat.

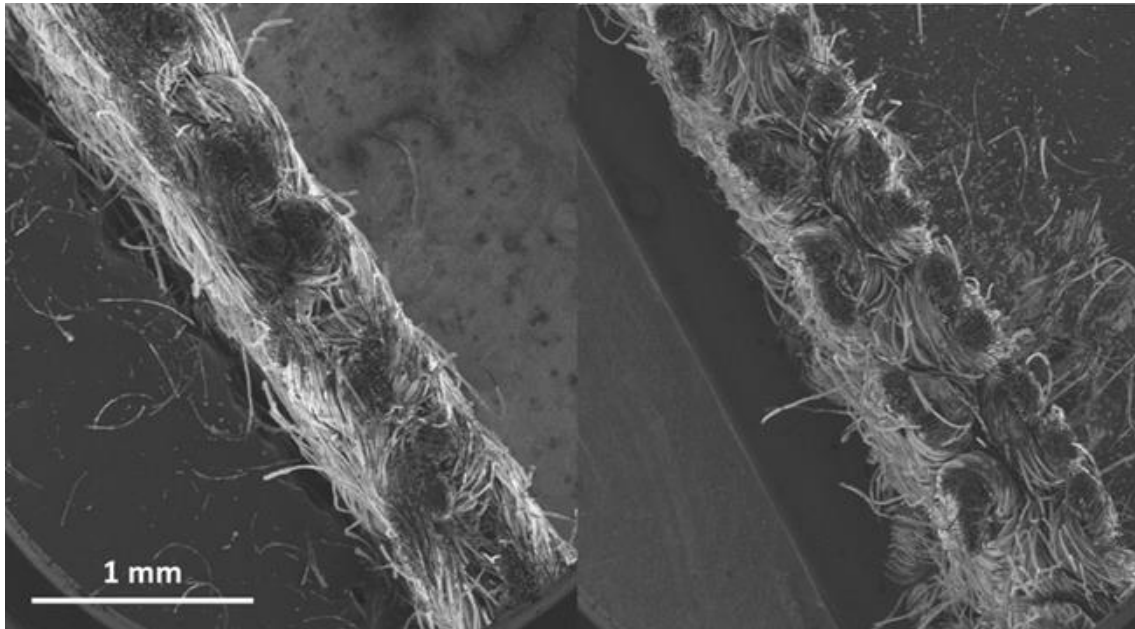


Figure II-25 : Images de MEB de deux coupes transversales, perpendiculaires entre elles, du matériau hybride (FM 50K®/CaP) réalisées par cryofracture.

Les images MEB montrent également que le revêtement de CaP n'est pas uniquement présent en surface du tissu. En effet, le revêtement ne se limite pas à envelopper les fibres qui se situent à la surface du tissu, mais il recouvre également toutes les fibres à la surface d'une mèche (en rouge sur la Figure II-26). Seul le cœur des mèches possède des fibres non revêtues (Figure II-26 c)).

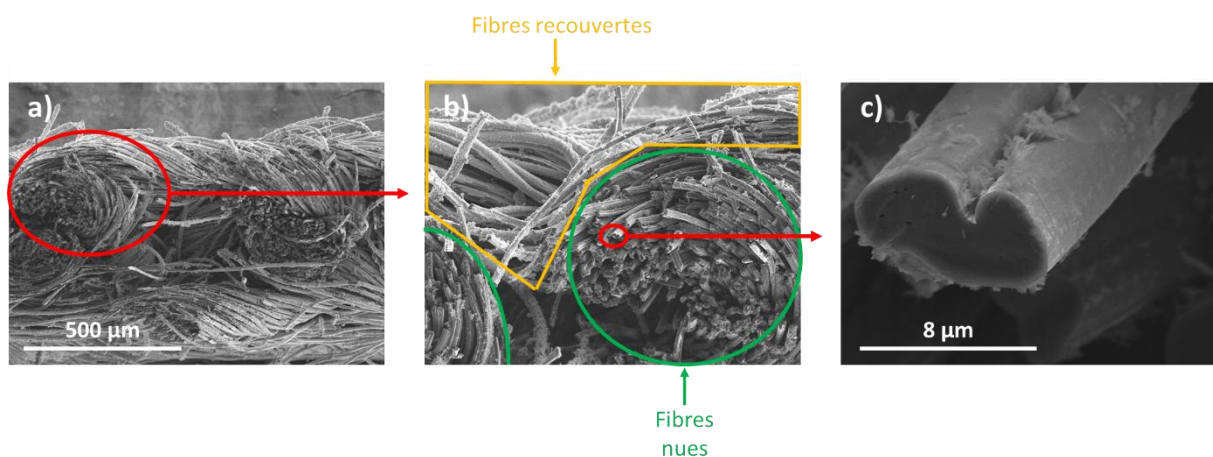


Figure II-26 : Images de MEB des mèches de fibres de carbone du matériau hybride après cryofracture, à grandissement a) x100, b) x300 et c) x7000.

Ces images montrent qu'il sera difficile pour l'électrolyte d'accéder au cœur des mèches de fibres de carbone. En conséquence, trop peu de précurseurs de CaP se retrouvent au contact de la surface des fibres au cœur de ces mèches pour pouvoir précipiter et former un revêtement de CaP.

A l'échelle de la fibre, une fibre de carbone revêtue de CaP possède une forme cylindrique. Cependant, elle est initialement lobée (Figure II-27). Cette différence de morphologie entre la fibre nue et celle recouverte vient du fait que le revêtement s'adapte et compense la morphologie lobée de la fibre. Ce qui conduit, au sein d'une même fibre, à une différence d'épaisseur du revêtement de CaP. La variation d'épaisseur est comprise entre 1,3 et 1,7 μm pour toutes les fibres et dépend de la morphologie de chaque fibre. Cette différence d'épaisseur est intrinsèque à la morphologie de la fibre et identique sur tout le tissu. A noter que, lors des synthèses réalisées à courant constant, la variation de l'épaisseur du revêtement dépendait de la zone du tissu analysée. C'est pourquoi, l'épaisseur du revêtement de CaP synthétisé à -1 V est considérée comme plus homogène qu'à courant constant.

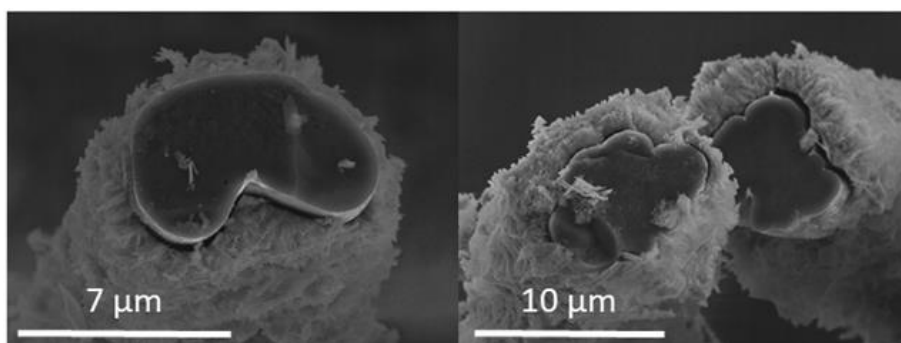


Figure II-27 : Images de MEB, après cryofracture, de fibres du tissu FM 50K® recouvertes du revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à un potentiel de -1 V.

Pour résumer, le revêtement de CaP synthétisé à un potentiel -1 V recouvre de façon homogène les fibres de carbone en surface du tissu FM 50K®. Le revêtement recouvre également les fibres en surface des mèches dans la profondeur du tissu. L'épaisseur du revêtement de CaP, estimée par MEB à partir de coupes réalisées par cryofracture, est comprise entre 1,3 et 1,7 μm . Pour rappel, le gain de masse dû au CaP ainsi déposé représente environ 6,5 %.

C.2. Caractérisations texturales du matériau hybride – Influence du revêtement de CaP

Les caractérisations texturales du matériau hybride sont réalisées afin de comparer les données avec celles du tissu brut (FM 50K®). Pour ce faire, les caractérisations par adsorption d'azote à 77 K ont été réalisées et sont comparées à celles présentées précédemment (Cf. Chapitre II. A.2.2.).

Les courbes de distribution en tailles de pores sont reportées sur la Figure II-28 :

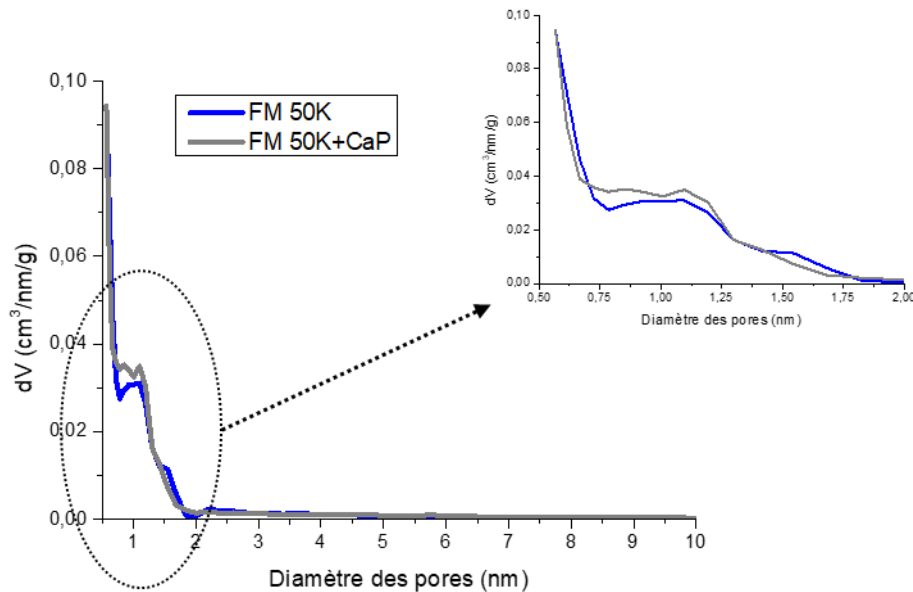


Figure II-28 : Distributions en tailles de pores du FM 50K® et du matériau hybride FM 50K®+CaP, obtenues par application de la méthode de calcul DFT.

Les courbes montrent que le revêtement de CaP ne modifie que très peu la microporosité. En effet, une distribution de taille de pores étroite, ainsi qu'une taille de micropores centrée autour de 1 nm, sont toujours observées. Lorsque les données d'adsorption de N₂ à 77 K sont comparées (Tableau II-7), très peu de différences sont observées entre le FM 50K® brut et le FM 50K® recouvert de CaP. En effet, seule la surface BET augmente dans le cas du matériau hybride, augmentation probablement liée à l'hétérogénéité de surface du revêtement de CaP. L'application de la méthode Dubinin- Radushkevish (DR) pour la détermination du volume microporeux confirme les résultats obtenus par la méthode de simulation DFT (differential functional theory) avec des volumes de micropores similaires pour les deux matériaux.

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Tableau II-7 : Caractérisation par adsorption de N₂ à 77 K des matériaux FM 50K® et FM 50k®+CaP.

TFC	S_{BET} (m²/g)	V_{MESO} (N₂, DFT) (cm³/g)	V_{MICRO} (N₂, DFT) (cm³/g)	V_{MICRO} (N₂, DR) (cm³/g)
FM 50K®	898	0,07	0,41	0,41
FM 50K®+CaP	980	0,10	0,45	0,46

Pour conclure, le revêtement de CaP déposé à la surface du tissu de carbone FM 50K® modifie que très peu les caractéristiques texturales du tissu. Le matériau hybride possède une surface spécifique BET plus élevée, mais des volumes poreux très similaires. La porosité des deux matériaux est principalement constituée de micropores avec un très faible pourcentage de mésopores. Le revêtement de CaP n'impacte pas la texture du matériau carboné qui conserve sa microporosité, elle est primordiale pour permettre :

- *l'adsorption de principes actifs (Cf. Chapitre III.),*
- *les échanges de fluides biologiques (Cf. Chapitre IV. et V.).*

C.3. Caractérisations physico-chimiques du revêtement de CaP

C.3.1. Caractérisation du revêtement de CaP par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Les analyses IRTF ont été effectuées sur un spectromètre Nicolet 6700 dans une gamme spectrale comprise entre 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} , en mode transmission, en réalisant une dispersion du matériau hybride analysé dans des pastilles de bromure de potassium (KBr) à hauteur de 1 % en masse (Cf. Annexe 6). Il est important de signaler la difficulté de réaliser des mesures par IRTF sur des échantillons riches en carbone compte tenu de la forte absorption du carbone par le faisceau IR, ce qui induit une perte de sensibilité (rapport signal/bruit) accentuée par une dérive de la ligne de base.

Les spectres IRTF du revêtement de CaP déposé par sono-électrodéposition à -1 V à la surface du tissu de carbone FM 50K® sont donnés sur la Figure II-29. Les attributions des principales bandes d'absorption IR sont figurées sur les spectres.

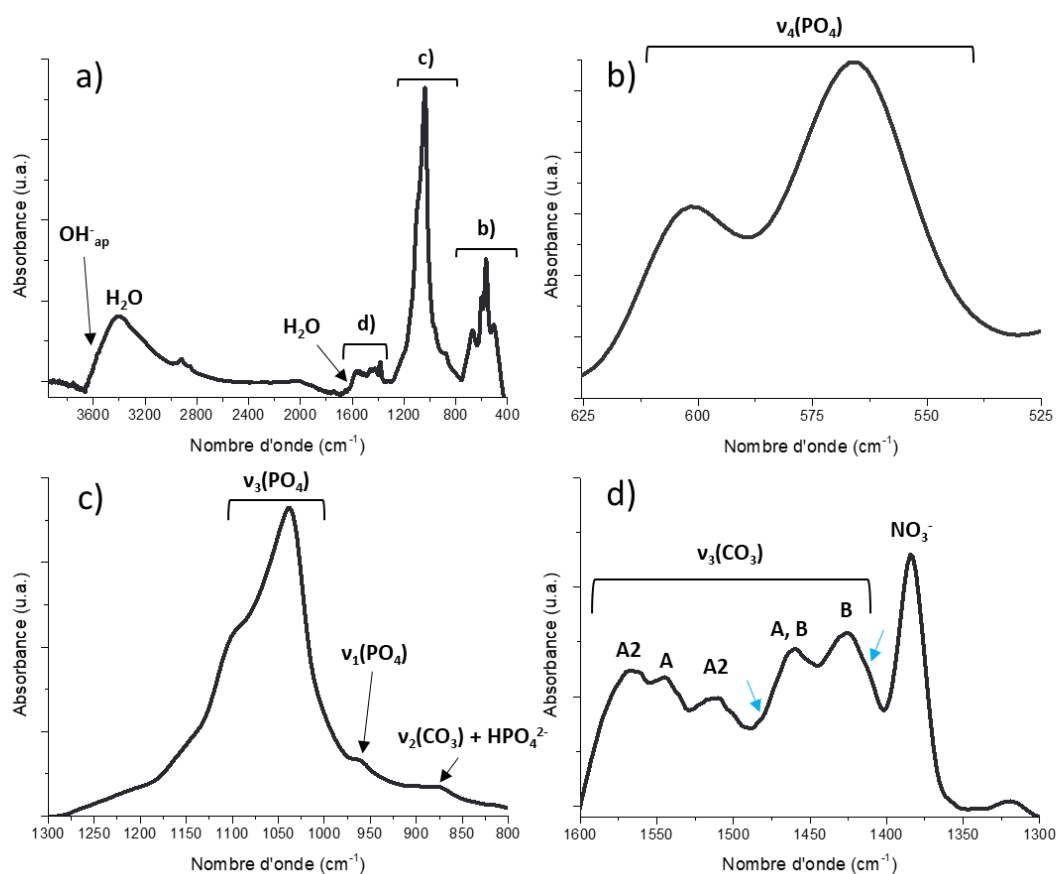


Figure II-29 : Spectres IRTF du revêtement de CaP déposé par sono-électrodéposition à -1 V sur le tissu FM 50K® : a) spectre total, b) spectre ν_4 des phosphates, c) spectre ν_1 - ν_3 des phosphates et d) spectre ν_3 des carbonates.

Le premier spectre IRTF (Figure II-29 a)), correspond au spectre global du revêtement. Ce spectre est caractéristique d'une hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA) carbonatée [160]. Ci-après seront décrites ses particularités. Le spectre peut se découper en quatre grandes zones, caractéristiques des signatures des phosphates et parfois des carbonates. Les quatre zones sont reportées dans le Tableau II-8, ainsi que l'attribution des bandes permettant de déterminer les phases en présence. Les caractéristiques de chaque zone sont décrites ci-dessous.

Tableau II-8 : Description des attributions des bandes IRTF du revêtement de CaP.

Zone	Position des bandes Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Assignment
1 (Figure II-29 b))	450-800	ν_4 (PO ₄)
2 (Figure II-29 c))	800-1300	ν_1 - ν_3 (PO ₄)
3 (Figure II-29 d))	1300-1600	ν_3 (CO ₃)
4 (Figure II-29 a))	~1600 et 2500-3700	H ₂ O

La première zone, spectre compris entre 520 et 720 cm⁻¹, est représentée sur la Figure II-29 b). Le spectre IRTF montre les bandes caractéristiques ν_4 des phosphates apatitiques. La double bande à 566 et 603 cm⁻¹ et l'épaule à 580 cm⁻¹ sont attribués à leur déformation angulaire, tandis que l'épaule à 633 cm⁻¹ est attribué au mode de vibration des OH⁻ apatitiques. La convolution des premières bandes caractéristiques ν_4 est présentée dans la Figure II-30. En plus des bandes ν_4 PO₄³⁻ et OH⁻ apatitiques apparaissent d'autres bandes caractéristiques de phosphates non-apatitiques (617 cm⁻¹), ainsi que celles des HPO₄²⁻ apatitiques (545 cm⁻¹) et non-apatitiques (535 cm⁻¹).

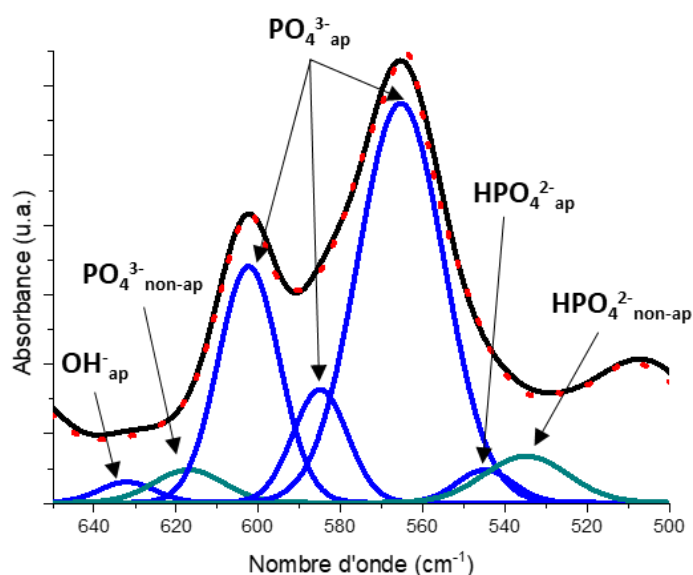


Figure II-30 : Décomposition des bandes ν_4 des phosphates et attribution des bandes caractéristiques du spectre IRTF du revêtement de CaP déposé sur le tissu FM 50K®.

La seconde zone (Figure II-29 c)) correspond à la bande la plus intense centrée à 1036 cm^{-1} , ainsi qu'à l'épaule à 1094 cm^{-1} , qui sont attribués au mode de vibration 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, peut être également attribuée aux ions HPO_4^{2-} et/ou aux ions CO_3^{2-} en position de substitution de type A et/ou B, voire des carbonates labiles (carbonates de surfaces).

La troisième zone, correspondant au domaine ν_3 des carbonates, permet de déterminer le type de substitution des carbonates. Cette zone est détaillée sur la Figure II-29 d). La bande d'adsorption étendue observée entre $1410\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique d'une carbonatation de type B, tandis que celle comprise entre $1445\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique d'une carbonatation de type A, B. Les deux bandes centrées autour de 1500 et 1560 cm^{-1} sont quant à elles caractéristiques d'une substitution A2, c'est-à-dire d'une substitution A possédant une orientation alternative dans le tunnel apatitique [161]. Enfin, la bande centrée à 1545 cm^{-1} est caractéristique d'une substitution de type A. Deux épaulements sont également observés vers 1415 et 1480 cm^{-1} (indiqués par des flèches bleues). Ils pourraient être attribués à des ions carbonates non-apatitiques. Il est également important de noter la bande fine et intense des nitrates aux alentours de 1383 cm^{-1} qui est due, à la fois, à la présence de nitrates liés au précurseur, mais également aux nitrates liés à une contamination du KBr.

Lorsque le spectre est observé sur toute la gamme (Figure II-29 a)), une quatrième zone s'étend de 1600 à 4000 cm^{-1} . Les bandes larges situées entre 1600 et 1800 cm^{-1} , ainsi qu'entre 2500 et 3700 cm^{-1} sont dues, respectivement, à de l'eau de structure et à de l'eau adsorbée.

Le spectre IRTF du revêtement de CaP est caractéristique d'une CDA carbonatée biomimétique. En effet, la déconvolution des bandes caractéristiques de ν_4 des phosphates montre la présence d' OH^- apatitiques, de PO_4^{3-} non-apatitiques et également de HPO_4^{2-} apatitiques et non-apatitiques typique d'une apatite biomimétique. De plus, les bandes ν_1 et ν_3 des phosphates décrites précédemment sont caractéristiques d'une CDA. Enfin, la présence des bandes ν_3 des carbonates indique une carbonatation de type A, B.

En résumé, le revêtement de CaP déposé sur le tissu de fibres de carbone FM 50K® par sono-électrodéposition à un potentiel de -1 V est une hydroxyapatite déficitaire en calcium carbonatée de type A, B. Cependant, une partie des carbonates pourrait également être attribuée à l'existence d'une ou plusieurs phases de carbonates de calcium, telles que l'aragonite, la vaterite ou la calcite. Afin d'identifier les phases cristallographiques, le revêtement de CaP a été caractérisé par diffraction des rayons X (DRX).

C.3.2. Caractérisation du revêtement de CaP par diffraction des RX

La DRX a été réalisée en mode transmission sur équipement INEL® directement sur le matériau hybride (FM 50K®+CaP), à l'ICMN et en collaboration avec le CEMHTI. L'appareil de diffraction possède 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 de 3 h (Cf. Annexe 7). Les diffractogrammes du TFC (FM 50K®) et du matériau hybride élaboré par sono-électrodéposition à -1 V sont représentés sur la Figure II-31.

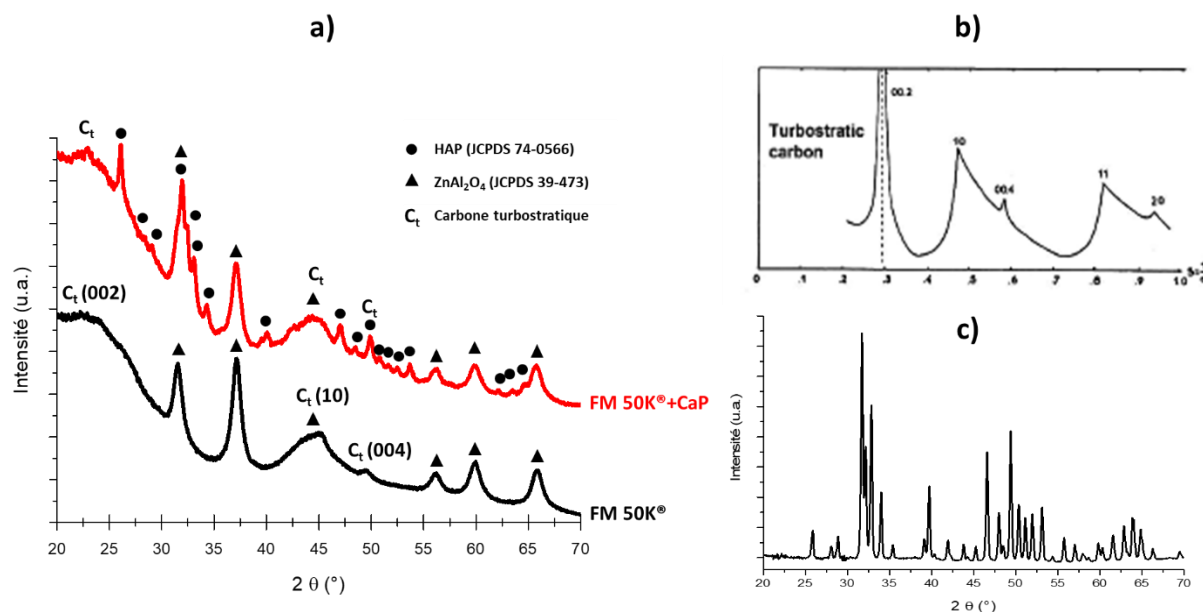


Figure II-31 : a) Diffractogrammes du substrat (en noir) et du matériau hybride (en rouge) ($\lambda_{\alpha\text{Cu}} = 0,154056 \text{ nm}$). b) Diffractogramme d'un carbone désordonné de structure turbostratique [162]. c) Diffractogramme du HAP commerciale (Sigma, CAS No. 12167-74-7).

Le diffractogramme du tissu de carbone (FM 50K®) montre des réflexions caractéristiques d'un matériau carboné de structure très désordonnée. Pour comparaison sur la Figure II-31 est donné le diffractogramme d'un carbone désordonné de structure turbostratique [162]. Le diffractogramme du tissu de carbone (FM 50K®) présente une réflexion (002) très large, située aux alentours de $2\theta = 23^\circ$ ce qui correspond à un d_{002} voisin de 0,386, et de fait une réflexion (004) très peu intense à $2\theta \sim 50^\circ$ ainsi que la réflexion qui correspond à la bande (10) à $2\theta \sim 45^\circ$.

Pour rappel, le FM 50K® est un tissu de fibres de carbone qui a subi un traitement d'ensimage à base d'aluminium et de zinc, d'où la présence de réflexions supplémentaires qui correspondent à la structure de l'aluminate de zinc (JCPDS 39-473).

Sur le diffractogramme du matériau hybride, les autres réflexions correspondent à celles du revêtement de CaP. Elles ont été indexées en référence avec la fiche JCPDS 74-0556 de l'hydroxyapatite

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

stœchiométrique (HAP) de structure hexagonale dont le diffractogramme est donné sur la Figure II-31 c). Les réflexions correspondant aux 10 pics de diffraction les plus intenses observés sont données dans le Tableau II-9 et comparées aux valeurs de l'HAP :

Tableau II-9 : Position en $2\theta^\circ$ ($\lambda K\alpha$ Cu = 0,154056 nm) des principales réflexions du revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V et de l'HAP.

	(002)	(210)	(211)	(112)	(300)	(202)	(130)	(222)	(213)	(004)
$2\theta^\circ$ (CaP)	26,09	29,13	31,98	32,59	33,15	34,28	40,09	47,03	49,87	53,62
$2\theta^\circ$ (HAP)	25,88	28,92	31,77	32,20	32,90	34,06	39,79	46,69	49,49	53,22

Par rapport à la structure de l'HAP stœchiométrique, on observe un décalage général en $2\theta^\circ$ des positions des réflexions vers les plus grands angles, ce qui signifie que le revêtement de CaP ne correspond pas à une HAP stœchiométrique. Ce qui a été démontré dans le paragraphe précédent avec les données d'IRTF et ce qui est confirmé en DRX.

Le décalage en $2\theta^\circ$ des positions des réflexions est souvent attribué à une carbonatation de type B. Les carbonates possèdent un volume stérique plus faible que les phosphates qui conduit à une diminution du volume de la maille qui se traduit en DRX par un décalage des pics aux grands angles [163]. De plus, toujours comparé au diffractogramme de l'hydroxyapatite stœchiométrique, on observe un élargissement des pics de diffraction ce qui est caractéristique d'un désordre cristallin (diminution de la cristallinité). Ce désordre est dû à la non-stœchiométrie de l'hydroxyapatite qui résulte des substitutions des ions phosphates et hydroxydes par les ions carbonates [163], mais également de la dimension nanométrique des domaines cristallins [164].

Pour conclure sur l'apport de la diffraction des RX à la caractérisation structurale du revêtement de CaP déposé en surface du tissu de carbone, sa structure correspond à des nanocristaux de CaP de structure apatitique (structure hexagonale, de groupe $P6_3/m$), non-stœchiométrique et carbonatée. Les diffractogrammes ne présentent aucune phase secondaire, hormis celles du carbone et de l'ensimage (aluminat de zinc). On peut en déduire que les carbonates présents dans le revêtement de CaP sont uniquement issus de la substitution de l'apatite.

C.3.3. Caractérisation du taux de carbonate dans le revêtement de CaP

Le taux de carbonate présent dans le revêtement de CaP a été quantifié par désorption à température programmée (DTP ou TPD en anglais) (Cf. Annexe 8) et par IRTF (Cf. Annexe 6).

Dans le cas présent, la DTP consiste à traiter thermiquement (jusqu'à 1200 °C) le matériau hybride sous flux d'hélium. L'analyse des gaz de décomposition (H₂O, CO et CO₂) par spectroscopie de masse permet de remonter au taux de carbonate dans le revêtement. En effet, après avoir soustrait la contribution des groupes de surface du tissu de fibres de carbone, il est possible d'obtenir les profils de dégagement du CO et du CO₂ provenant des carbonates du revêtement. En parallèle, les profils de dégagement du CO et du CO₂ d'un étalon sont réalisés, dans notre cas le carbonate de calcium (Sigma, CAS No. 471-34-1) sert de référence. A partir de ces profils de dégagements de gaz, le taux de carbonate présent dans le revêtement de CaP élaboré par sono-électrodéposition à -1 V peut être déduit.

Cependant, un des désavantages de la DTP est un temps d'analyse relativement long (une mesure, soit un échantillon, par jour). Afin d'obtenir le taux de carbonate d'une apatite plus rapidement, l'IRTF peut être utilisée [65]. Grunenwald *et al.* ont validé une méthode de quantification des carbonates dans les apatites par IRTF. Pour ce faire, ils ont démontré l'existence d'un lien entre le taux de carbonate et l'aire sous les bandes ν_3 des carbonates et $\nu_1\nu_3$ des phosphates. La relation est donnée par l'équation :

$$wt. \% CO_3 = 28,62 \times \frac{[Aire \nu_3(CO_3)]}{[Aire \nu_1\nu_3(PO_4)]} + 0,0843$$

A partir de cette relation, nous avons déduit le taux de carbonate contenu dans le revêtement du matériau hybride et comparé aux résultats obtenus par DTP. Les résultats sont regroupés dans le Tableau II-10 :

Tableau II-10 : Quantification du taux de carbonates par DTP et IRTF.

	DTP	IR-TF
CO₃ (wt. %)	2,3-5,5	1,8-5,5

Les conditions de synthèse ne permettent pas un contrôle du taux de carbonatation, ce qui explique la variation importante du pourcentage de carbonates selon les échantillons analysés (différents revêtements élaborés par sono-électrodéposition à -1 V). Néanmoins, le taux de carbonates dans le revêtement ne dépasse jamais les 6 % en masse (et est toujours supérieur à 1 %). Afin d'avoir un contrôle sur le taux de carbonatation, il faudrait travailler sous atmosphère inerte et/ou en présence de CO₂ afin de contrôler la source de carbonates et de voir comment celle-ci influence le taux de

carbonates incorporés dans la structure. Il serait ainsi envisageable, soit de limiter la carbonatation, soit de la contrôler.

La composition chimique du revêtement, hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) carbonatée de type A, B, possède un taux de carbonate variable mais toujours compris entre 2 et 5,5 %. Pour information, le taux de carbonate dans les os humain varie entre 3,5 et 7,4 % [52]. Le taux de carbonate est donc un paramètre qui devra être contrôlé afin d'obtenir des matériaux hybrides élaborés par sono-électrodéposition à -1 V ayant une composition chimique toujours identique.

C.3.4. Caractérisation morphologiques et microtexturales du revêtement de CaP synthétisé à -1 V

Afin d'accéder à la morphologie et à la microtexture du revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V, une étude par microscopies électroniques MEB et MET a été réalisée.

Dans un premier temps, nous avons étudié la morphologie du revêtement de CaP par MEB. Les images, réalisées à différents grossissements (Figure II-32), montrent un revêtement de CaP se présentant sous la forme d'un enchevêtrement de plaquettes de dimension inférieure au micromètre (Figure II-32 d)). Comme décrit précédemment, le revêtement de CaP recouvre les fibres de carbone sur toute leur longueur et de façon uniforme et homogène (Figure II-32 a) et c)).

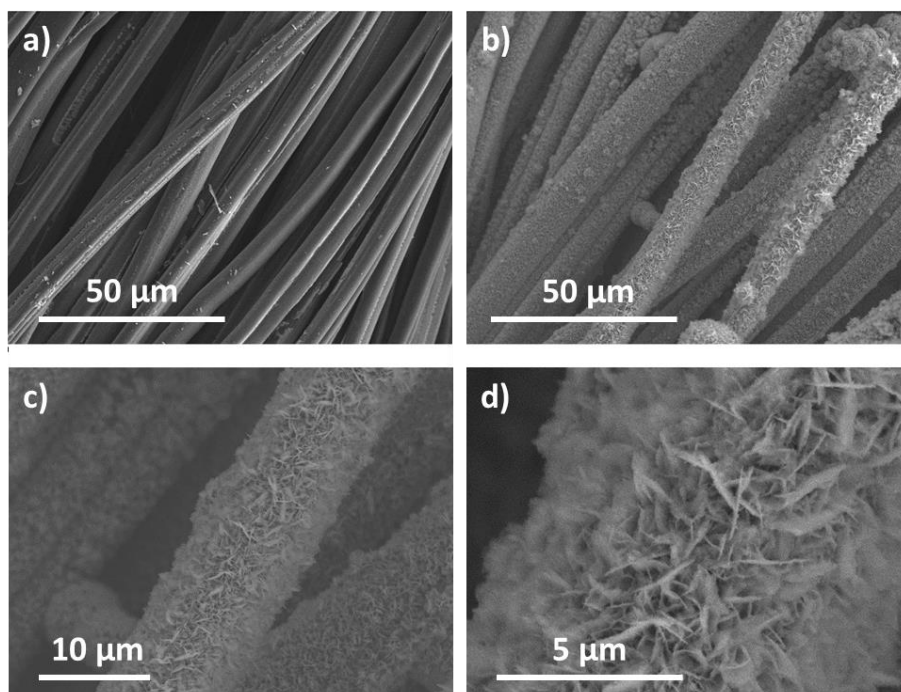


Figure II-32 : Images de MEB : a) du tissu FM 50K® ; b), c) et d) du revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V déposé sur le tissu de carbone FM 50K® à grossissement x1 K, x3 K et x10 K respectivement.

Dans un second temps, le revêtement de CaP est récupéré par grattage du tissu de carbone, puis il est broyé en poudre, déposé sur une grille en cuivre et observé en MET (voir préparation des échantillons en Annexe 9). Les images de MET confirment la microtexture de type plaquettaire du revêtement de CaP. On observe en MET que les plaquettes sont constituées d'assemblages de particules lamellaires de CDA carbonatée. Leur dimension est de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres (Figure II-33). Ces particules lamellaires sont, soit planes, quand elles restent parfaitement posées à plat (carré bleu de la Figure II-34 a)), soit elles s'enroulent sur leurs extrémités. Ces enroulements se traduisent par des contrastes plus foncés sur les images, du fait d'une épaisseur de matière légèrement plus importante qui doit être traversée par le faisceau d'électrons (Figure II-33 et Figure II-34 a), particules indiquées par des flèches blanches).

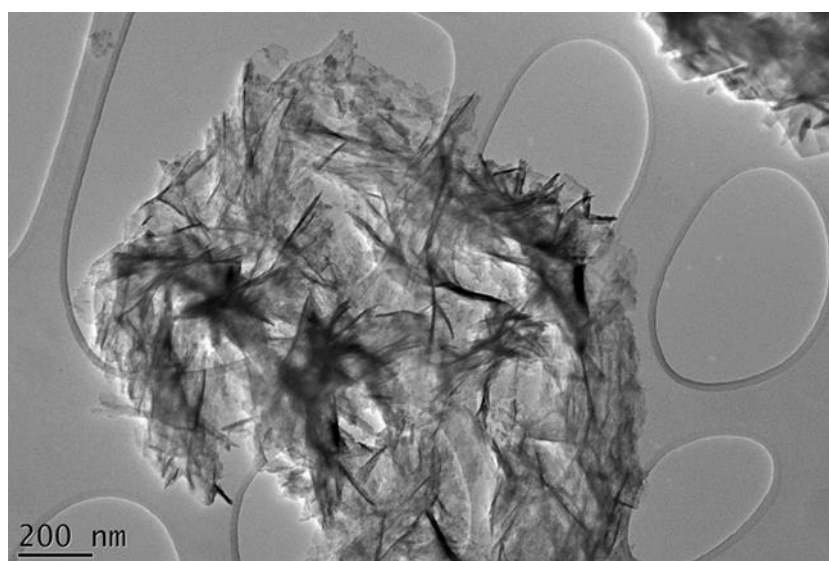


Figure II-33 : Images de MET des empilements de particules lamellaires constituant le revêtement de CDA synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V.

En réalisant des images à plus haute résolution (HR-MET) des bords des particules lamellaires enroulées (les particules lamellaires sont alors vues sur leur tranche), on observe qu'elles sont constituées d'empilements de feuillets élémentaires (Figure II-34 a) et c)). Il faut que ces feuillets aient une bonne orientation par rapport au faisceau incident, qu'ils soient exactement sous l'angle de Bragg, pour pouvoir être observés (Figure II-34 c)).

A partir de ces images HR-MET, il est possible d'identifier les familles de plans réticulaires correspondant aux franges de réseau observées, en réalisant des transformées de Fourier sur différentes zones d'intérêt de l'échantillon. Un exemple de transformée de Fourier, réalisée sur une particule lamellaire de la Figure II-34 a), est illustrée sur la Figure II-34 b)).

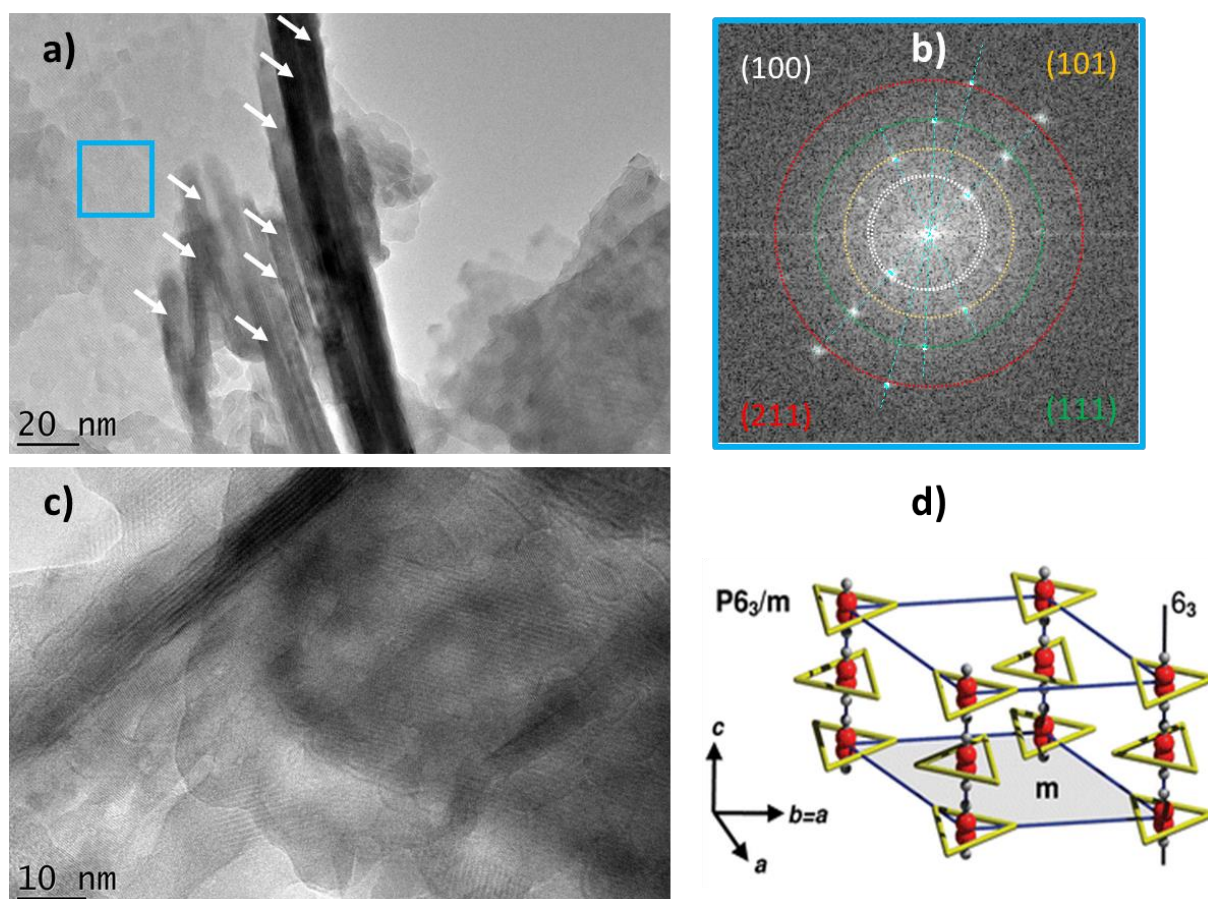


Figure II-34 : a), c) Images de HR-MET des particules lamellaires de CaP, visualisées posées à plat et vues sur leur tranches. b) Transformée de Fourier des particules lamellaires et réflexions correspondantes. f) Représentation de la structure hexagonale $P6_3/m$ de l'hydroxyapatite.

Les distances interplanaires sont déterminées à partir des transformées de Fourier des images des particules lamellaires. Elles ont été reportées dans le tableau II-11. Ces distances réticulaires calculées ont ensuite été comparées à celles de l'HAP (fiche JCPDS 74-0566, Cf. Annexe 10). Les distances calculées sont proches des distances réticulaires attribuées aux familles de plans de l'HAP. Les données sont regroupées dans le Tableau II-11 :

Tableau II-11 : Comparaison des distances interplanaires calculées à celles de l'HAP (fiche JCPDS 74-0566) et familles de plans correspondant.

d(Å) calculée	8,13	5,33	3,87	2,82
d(Å) HAP	8,16	5,26	3,89	2,81
Plan	(100)	(101)	(111)	(211)

Un exemple de diagramme de diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS) de ces empilements de particules lamellaires est donné sur la Figure II-35. La zone de l'image analysée est d'environ de 300 nm. Le diagramme DEAS correspond à un diagramme de « poudre » avec des réflexions de Bragg ponctuelles. La diffraction électronique est caractéristique de particules cristallisées en désordre azimutal.

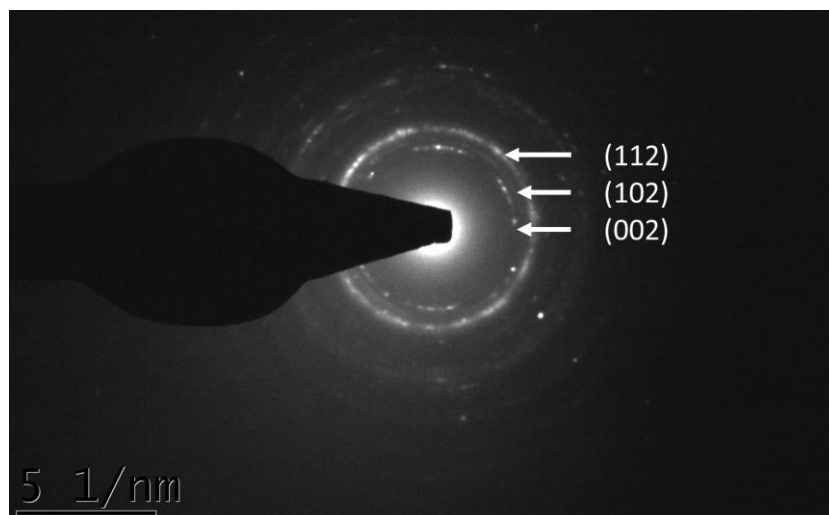


Figure II-35 : Diagramme de diffraction électronique à aire sélectionnée (DEAS) de particules lamellaires du revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V.

Les distances réticulaires des principales réflexions ont été déterminées et sont comparées à celles de l'HAP (fiche JCPDS 74-0566). Les données sont reportées dans le Tableau II-12, ainsi que les familles de plans (hkl) correspondant.

Tableau II-12 : Comparaison des distances interplanaires déterminées à partir diagramme DEAS à celles de l'HAP (fiche JCPDS 74-0566) et familles de plans correspondant.

$d_{hkl}(\text{\AA})$ calculée	3,42	3,13	2,77
$d_{hkl}(\text{\AA})$ HAP	3,44	3,17	2,78
Plans (hkl)	(002)	(102)	(112)

Les images de MET réalisées à haute résolution ont permis de mettre en évidence que le revêtement de CaP est constitué de particules lamellaires, de dimension de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Elles se présentent soit posées à plat, soit elles s'enroulent sur leurs extrémités. Ces particules lamellaires sont elles-mêmes constituées d'empilements de feuillet élémentaires. Elles sont également cristallisées, on peut parler de nanocristaux lamellaires. L'identification des réflexions, que ce soit par l'intermédiaire de transformées de Fourier ou par analyse des diagrammes de diffraction électronique à aire sélectionnée, correspondent aux familles de plans de l'HAP (Fiche JCPDS 74-0566).

C.3.5. Détermination des rapports $\frac{Ca}{P}$ par analyses EDX-MEB et EDX-MET

Afin d'analyser plus finement la structure du revêtement de CaP, il s'est avéré intéressant d'analyser sa composition chimique par l'intermédiaire du rapport atomique $\frac{Ca}{P}$. Pour rappel, ce rapport est souvent employé pour classer les CaP. Il permet ainsi d'obtenir des informations quant à la dissolution possible du composé en milieu biologique. En première approximation, on négligera la substitution des carbonates.

Afin d'obtenir les rapports $\frac{Ca}{P}$ du revêtement de CaP obtenu par sono-électrodéposition à -1 V, des analyses EDX par microscopies électroniques (MEB et MET) sont réalisées (Cf. Annexes 2 et 9). Les résultats d'analyse sont reportés dans le Tableau II-13.

**Tableau II-13 : Rapports Ca/P du revêtement de CaP déterminés après quantification du taux de Ca et de P par :
EDX-MEB et EDX-MET.**

	$\frac{Ca}{P}$
Solution précurseur	Revêtement de CaP analysé par EDX-MEB et MET
1,67	1,4 ± 0,1
1,67	1,4 ± 0,1

Les deux techniques d'analyse donnent des résultats identiques avec un rapport $\frac{Ca}{P}$ égal à 1,4 ± 0,1. La valeur est largement inférieure à la valeur de 1,67 de l'hydroxyapatite stœchiométrique, ce qui confirme le caractère non-stœchiométrique du revêtement. D'un point de vue expérimental, le revêtement de CaP devrait avoir une capacité de dissolution plus importante et donc il serait plus intéressant que l'hydroxyapatite stœchiométrique en milieu biologique.

C.3.6. Caractérisation de la structure du revêtement de CaP par spectroscopie RMN Haute Résolution Solide

Afin d'obtenir des informations sur la structure, l'environnement chimique et l'organisation du revêtement de CaP déposé par sono-électrodéposition à -1 V, il est caractérisé par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide. La RMN du solide est une technique de caractérisation intéressante pour l'étude des biomatériaux à base de phosphate de calcium. En sondant l'ordre et le désordre structural à l'échelle atomique, cette technique permet d'améliorer la compréhension des biomatériaux notamment du point de vue de la nanostructure des composés.

Dans l'étude des phosphates de calcium, la spectroscopie RMN en rotation à l'angle magique (RMN MAS) permet de sonder les environnements chimiques locaux des noyaux ^{31}P et du ^1H dans les solides qu'ils soient cristallins, désordonnés ou amorphes. Les spectres donnent ainsi des informations quant à la nature des différentes phases présentes, leurs proportions relatives et l'ordre et le désordre structural (à l'échelle locale) des phases présentes. Les matériaux solides présentent des spectres RMN possédant des pics larges du fait d'interactions anisotropes dont il est difficile de tirer des informations précises. Le fait de mettre l'échantillon en rotation (plusieurs kHz) à un angle de $54,7^\circ$ (angle magique) par rapport au champ magnétique a pour effet de moyenner (annuler) tout ou une partie des interactions anisotropes (déplacement chimique, dipolaires homo- et hétéronucléaire) et ainsi d'augmenter la résolution des pics.

Dans le cas des phosphates de calcium et en particulier des composés stœchiométriques et/ou parfaitement ordonnés, comme l'hydroxyapatite stœchiométrique, la RMN MAS du ^{31}P donne des signatures spectrales caractéristiques permettant l'identification et la quantification des phases. Afin d'étudier plus précisément la nanostructure du revêtement de CDA déposé sur le tissu de carbone FM 50K®, dans un premier temps, l'environnement du phosphore est analysé par RMN MAS du ^{31}P (Cf. Annexe 11). La Figure II-36 présente le spectre du revêtement de CaP synthétisé à -1 V comparé à celui de l'hydroxyapatite stœchiométrique (Sigma, CAS No. 12167-74-7).

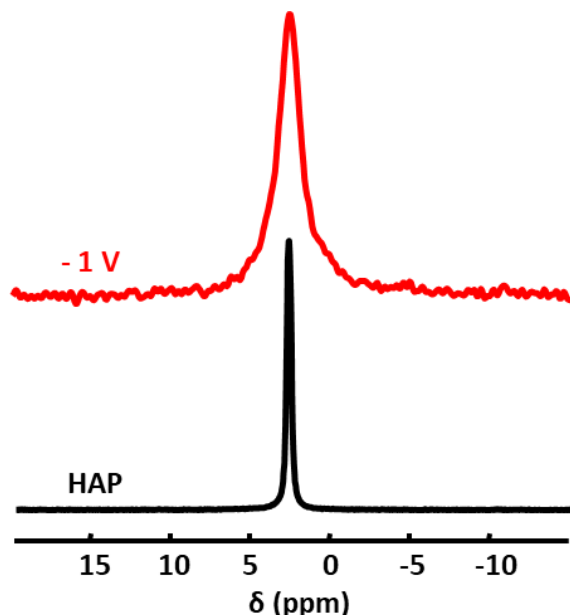


Figure II-36 : Spectre RMN MAS quantitatif ^{31}P du revêtement de CaP synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V (rouge) et d'une hydroxyapatite stœchiométrique commerciale (Sigma, CAS No. 12167-74-7). Expériences effectuées à 9,4 T à une fréquence MAS de 10 kHz.

Pour les deux échantillons, les spectres présentent une raie unique avec un déplacement chimique isotrope ^{31}P de 2,7-2,9 ppm. Cependant, dans le cas du revêtement de CDA, un important

élargissement de la raie est observé en comparaison avec l'HAP (largeur à mi-hauteur de l'ordre de 1,5 ppm pour la CDA contre 0,35 ppm pour l'HAP). Cet élargissement est également caractéristique d'une distribution des environnements chimiques des sites phosphates typiques d'une hydroxyapatite non stœchiométrique carbonatée et nanocristalline [6,8,164–166].

Le spectre 2D de corrélation hétéronucléaire (HetCor) ^{31}P - ^1H est enregistré pour le revêtement synthétisé par sono-électrodéposition à -1 V (Figure II-37). La cartographie présente les tâches de corrélation entre les différentes raies de résonance ^{31}P et ^1H qui traduisent directement les proximités spatiales entre ces atomes.

- Une tâche de corrélation intense (pointillés rouges) entre la raie du ^{31}P située vers 2,8-2,9 ppm (attribuée aux groupements phosphates de l'HAP) et le pic ^1H situé vers 0 ppm (caractéristique des OH^- apatitiques) est observée.
- Une seconde tâche de corrélation (pointillés verts) entre la contribution large ^{31}P , (caractéristique d'un environnement désordonné) et les signaux ^1H entre 5 et 15 ppm (associés aux molécules d'eau et aux ions hydrogénophosphates) est également observée.

Ces corrélations sont caractéristiques de la structure nanocristalline d'une apatite constituée d'un cœur relativement bien ordonné et riche en ions hydroxydes (raie ^{31}P fine) et d'une couche de surface désordonnée non-apatitique, riche en ions HPO_4^{2-} et en molécules d'eau et appauvrie en ions hydroxydes (raie ^{31}P large) [6,8,166–170].

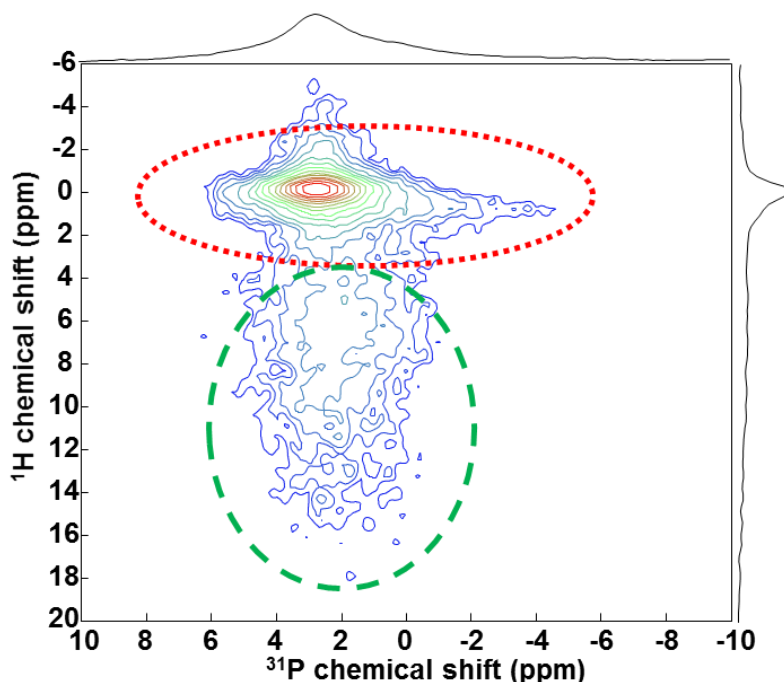


Figure II-37 : Carte de corrélation hétéronucléaire 2D ^1H - ^{31}P du revêtement de CaP (CDA) déposé par sono-électrodéposition à -1 V sur le tissu de carbone FM 50K®.

Pour conclure, la spectroscopie RMN MAS nous indique la formation, par sono-électrodéposition à - 1 V, d'un revêtement de CDA présentant une organisation des particules nanocristallines de type « cœur/coquille » caractéristique des apatites biomimétiques [54]. Le cœur des particules d'hydroxyapatite déficitaire en calcium et carbonatée serait relativement bien ordonné et riche en ions hydroxydes et leur surface serait de structure plus désordonnée, riche en ions HPO_4^{2-} et en molécules d'eau et appauvrie en ions hydroxydes.

D. Discussion et Bilan sur les caractéristiques du matériau hybride : TFC / CaP

Un des objectifs de ce travail de thèse a été d'élaborer un matériau hybride consistant en un tissu de fibres de carbone (TFC) sur lequel est déposé, par sono-électrodéposition, un revêtement homogène de phosphate de calcium (CaP).

Lors de précédents travaux à l'ICMN portant sur la synthèse de ce revêtement de CaP, il avait été montré que la densité de courant appliquée lors du procédé de sono-électrodéposition était un paramètre clé lors de la synthèse des matériaux hybrides CaP/TFC. En effet, la densité de courant (mode galvanostatique) permettait d'avoir un contrôle sur le régime d'électrolyse du milieu électrolytique qui agit sur la composition chimique, la microtexture et la structure des revêtements de CaP déposés sur le tissu de carbone. Les caractéristiques des revêtements de CaP avaient ensuite été reliées aux mécanismes réactionnels intervenant lors du procédé [6,8]. Ces travaux, résumés dans une partie de la Figure II-38, avaient mis en évidence que de fortes densités de courant favorisent la croissance d'hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) carbonatée, de morphologie aciculaire, alors que, pour de plus faibles densités de courant, la même phase CDA carbonatée, est observée, avec, en plus, la présence d'une phase de phosphate octocalcique (OCP) ayant une morphologie plaquettaire. Une des conclusions de cette étude avait été que la densité de courant régit le régime d'électrolyse du milieu électrolytique. Il avait été démontré que pour un régime d'électrolyse rapide (fortes densités de courant), la précipitation directe de CDA carbonatée sous forme d'aiguilles est favorisée. 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 un second temps, intervient l'hydrolyse directe des particules d'OCP en CDA carbonatée qui aboutit à la formation de particules de CDA qui conservent la forme plaquettaire. A courant intermédiaire, les différents phénomènes ont lieu, ce qui entraîne la formation d'un revêtement de CDA carbonatée sous forme d'aiguilles et de plaquettes. Cependant, le contrôle de la densité de courant ne permettait pas d'obtenir un revêtement homogène, en termes de recouvrement

sur l'ensemble du tissu, ainsi qu'en termes d'épaisseur. L'ensemble de ces résultats est résumé dans la Figure II-38.

En s'appuyant sur ces résultats, il a été décidé, pour ce travail de thèse et dans une première étape, d'optimiser la synthèse du revêtement de CaP. Dans l'objectif d'obtenir un revêtement de CaP réparti de manière homogène sur l'ensemble du tissu de carbone et possédant des caractéristiques physico-chimiques également homogènes. En ce qui concerne le procédé d'électrodéposition, de nouveaux paramètres expérimentaux ont été pris en compte. Dans un premier temps, dans la continuité des travaux antérieurs, l'influence de la durée de polarisation en mode galvanostatique a été optimisée. Dans un second temps, en rupture avec les travaux antérieurs, il a été décidé de changer le type de polarisation et de passer en mode potentiostatique, afin de travailler au voisinage du potentiel de l'électrolyse de l'eau, dans le but de mieux contrôler les mécanismes réactionnels. Une optimisation de la synthèse du revêtement de CaP a ainsi été réalisée en mode potentiostatique à un potentiel constant (-1 V). Un autre paramètre expérimental a également été pris en compte, la température de l'électrolyte lors de la synthèse. C'est ainsi qu'une température constante de l'électrolyte (70 °C) pour une durée de polarisation de 6 h en mode potentiostatique (potentiel constant de -1 V) se sont avérés être les paramètres pertinents permettant d'obtenir un revêtement homogène de CaP en surface des tissus de fibres de carbone. Les mécanismes réactionnels ont ainsi pu être affinés.

Il a été ainsi montré que, travailler en mode potentiostatique à un potentiel constant de -1 V, au voisinage du potentiel de l'électrolyse de l'eau, provoque une électrolyse du milieu électrolytique assez lente et régulée. Ce contrôle de la diffusion du milieu électrolytique engendre un contrôle de la précipitation des ions calcium et phosphates et agit sur la croissance cristalline des particules. Il en résulte une couverture régulière et uniforme de la surface du tissu de fibres de carbone par le revêtement de CaP lors des synthèses.

En considération des résultats antérieurs et des résultats apportés par les travaux de cette thèse, le schéma de la Figure II-38 résume les relations entre les mécanismes réactionnels (liés aux conditions expérimentales mises en œuvre lors du procédé d'électrodéposition) et les caractéristiques de tous les revêtements de CDA déposés sur les tissus de fibres de carbone KIP 1200® et FM 50K®.

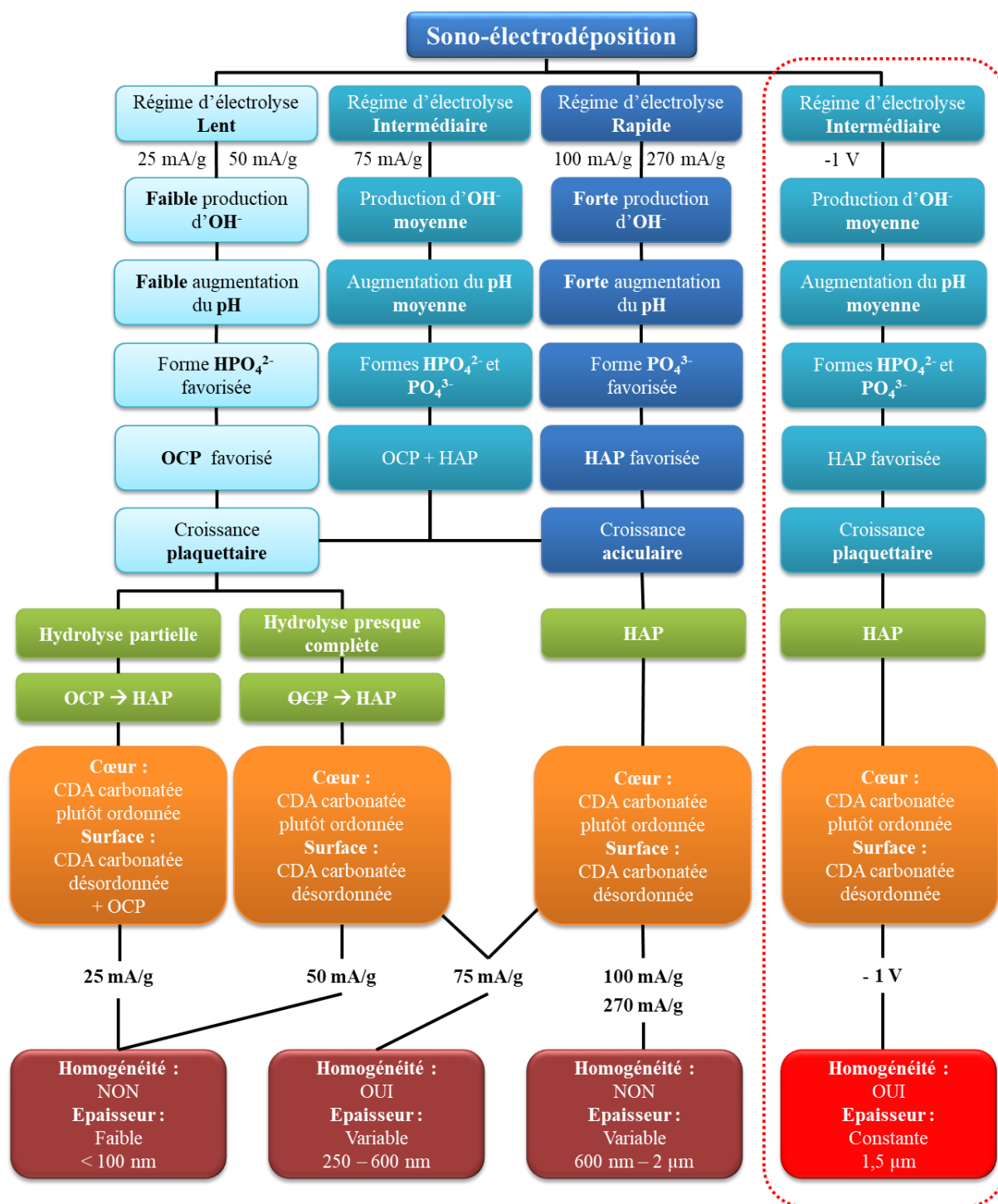


Figure II-38 : Schéma récapitulatif des mécanismes réactionnels mis en jeu lors du dépôt d'un revêtement de CaP à la surface d'un tissu de fibres de carbone (KIP 1200® et FM 50K®) par procédé de sono-électrodéposition (réactions électrochimiques (bleu), chimiques (vert)) et les structures qui en découlent (orange). Les caractéristiques d'homogénéité des revêtements formés (bordeaux) sont données en fonction du régime d'électrolyse.

Les résultats apportés lors de ce travail concernant les conditions expérimentales de synthèse optimisées et les caractéristiques des tissus de fibres de carbone et des revêtements de CaP déposés par sono électrodéposition à la surface des tissus de carbone (KIP 1200® et FM 50K®, ainsi que les caractéristiques des matériaux hybrides sont résumés ci-après.

Les caractérisations des deux tissus de fibres de carbone, le KIP 1200® et le FM 50K®, utilisés comme substrat des matériaux hybrides, ont montré que ces deux matériaux sont flexibles et poreux (essentiellement microporeux avec taille de pores centrée autour de 1 nm et un volume de 0,51 et 0,41 cm³/g respectivement). De plus, ils possèdent, une faible compacité (29 et 25 % respectivement). On peut souligner que leur flexibilité, microporosité et porosité multi-échelles, ainsi que leur faible compacité, sont des caractéristiques tout particulièrement intéressantes pour l'imprégnation des tissus de carbone en milieu biologique et en font des matériaux tout à fait pertinents et adaptés pour des applications en régénération osseuse. Cette microporosité est également très adaptée et ciblée pour une utilisation des tissus de carbone comme matériau d'adsorption et de libération de principe(s) actif(s) (ceci sera détaillé dans le chapitre qui suit). Ces caractéristiques, associées à leur propriété de conduction électrique, font de ces tissus d'excellents substrats pour une synthèse de matériau hybride, tissu de fibres de carbone / phosphates de calcium. Quel que soit le tissu, un revêtement de CaP uniforme et homogène en épaisseur est déposé en surface des fibres et du tissu lors du dépôt en mode potentiostatique, à potentiel constant de -1 V.

La caractérisation complète du revêtement de CaP a été réalisée sur le matériau hybride composé du tissu de carbone FM 50K® sur lequel le CaP a été déposé. Le revêtement de CaP correspond à une hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA) carbonatée. La carbonatation est de type A, B et est estimée à moins de 6 % en masse. Le rapport $\frac{Ca}{P}$ de $1,4 \pm 0,1$ confirme le caractère non-stœchiométrique du revêtement, il en résulte de ce fait, une solubilité du CaP supérieure à celle de l'hydroxyapatite stœchiométrique. Cette CDA carbonatée cristallise sous forme de plaquettes, constituées de particules lamellaires qui sont elles-mêmes constituées d'un assemblage de feuillets élémentaires. Les dimensions des particules lamellaires vont de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Les plaquettes recouvrent l'ensemble de la surface du tissu de fibres de carbone. Les caractérisations par RMN MAS montrent que ces plaquettes nanocristallines sont organisées, avec une organisation de type « cœur/coquille », où le cœur est constitué d'une CDA ayant une structure plutôt ordonnée et une surface de structure plus désordonnée et hydratée. Cette organisation est typique d'une apatite biomimétique [54].

Chapitre II. Elaboration et caractérisation des matériaux hybrides : Tissus de fibres de carbone / CaP

Le matériau hybride, tissu de carbone FM 50K®/CDA carbonatée, ainsi obtenu et caractérisé, peut être modifié afin d'acquérir de nouvelles propriétés. L'étude du dopage avec le strontium, pour améliorer ses propriétés en régénération osseuse, fera l'objet de l'étude décrite dans le chapitre suivant. De même, l'étude de l'adsorption de molécules biologiquement actives au sein du revêtement de surface et/ou dans la porosité du substrat carboné sera également décrite dans le chapitre suivant.

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein
des constituants du matériau hybride

Sommaire

Introduction	97
A. Synthèse et caractérisations physico-chimiques des revêtements dopés en strontium	99
A.1. Introduction	99
A.2. Protocole de synthèse	100
A.3. Résultats des caractérisations des revêtements de CaP dopés en Sr^{2+}	101
A.4. Discussion	111
B. Couplage matériau hybride – principe(s) actif(s)	112
B.1. Introduction	112
B.2. Matériaux et principes actifs (PA)	114
B.3. Protocole d'adsorption	115
B.3.1. Adsorption sur apatite	115
B.3.2. Adsorption des principes actifs sur tissu de carbone et sur matériau hybride	115
B.4. Résultats	116
B.4.1. Adsorption de principes actifs sur l'apatite biomimétique	116
B.4.1.1. Adsorption de la tétracycline (TC)	116
B.4.1.2. Adsorption du naproxène (NPX)	117
B.4.1.3. Discussion	118
B.4.2. Adsorption des principes actifs sur tissu de fibres de carbone	120
B.4.2.1. Adsorption de la tétracycline et du naproxène	120
B.4.2.2. Adsorption de l'aspirine	122
B.4.3. Adsorption de principes actifs sur le matériau hybride	125
B.4.3.1. Introduction	125
B.4.3.2. Adsorption de l'aspirine sur le matériau hybride	126
B.4.3.3. Adsorption de l'aspirine et de la tétracycline au sein des 2 constituants du matériau hybride	129
B.4.4. Réversibilité de l'adsorption des principes actifs par le tissu de carbone et sur l'apatite biomimétique	131
B.5. Discussion	132

Introduction

Le matériau hybride tissu de fibres de carbone (TFC) / revêtement de phosphates de calcium (CaP) a été synthétisé, il a été caractérisé, ainsi que ses constituants, dans le chapitre précédent. Un revêtement homogène d'hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) et carbonatée est déposé par sono-électrodéposition à la surface des fibres de carbone. Le procédé étant maintenant totalement maîtrisé, il est alors intéressant de venir modifier ce matériau afin de lui apporter de nouvelles fonctionnalités et propriétés. L'avantage d'un tel matériau hybride est qu'il est possible de doper seulement le substrat (le tissu de fibres de carbone) ou seulement le revêtement de CaP ou les deux constituants.

Lors de ce travail de thèse, plusieurs voies de modification des caractéristiques, propriétés et fonctionnalités du matériau hybride ont été mises en œuvre. Une première a consisté à modifier directement le revêtement de CaP par un dopage en strontium (Sr^{2+}). Une seconde a consisté à donner de nouvelles fonctionnalités au revêtement de CaP, mais également au tissu de carbone, par adsorption de principe(s) actif(s) (PA). Les nouvelles caractéristiques physico-chimiques et biologiques des constituants et/ou du matériau hybride seront décrites et analysées dans ce chapitre ainsi que dans le quatrième chapitre de ce manuscrit concernant l'évaluation *in vitro* du matériau hybride.

Dans le deuxième chapitre, il a été montré que le procédé de sono-électrodéposition est une méthode électrochimique qui permet de synthétiser un revêtement de CaP, en ayant la possibilité de contrôler sa morphologie, sa composition chimique et sa structure. Cependant, est-il possible avec cette technique de réaliser des substitutions au sein de la structure cristalline de l'apatite ? Ou sera-t-il possible de former uniquement une phase secondaire (sous forme d'agrégats), ou d'avoir à la fois ces deux possibilités ? Pour répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'étude de l'incorporation du strontium dans la structure des revêtements de CaP. Concernant l'adsorption des principes actifs, il est connu que les TFC et les phosphates de calcium sont de bons adsorbants [3,5,73,144,171,172]. L'originalité de ce travail a été d'étudier l'adsorption de principes actifs au sein de chaque constituant du matériau hybride, puis au sein du matériau hybride, en adsorbant des molécules actives aux propriétés thérapeutiques complémentaires. Cette possibilité de conjuguer leurs capacités d'adsorption, en adsorbant une molécule dans la porosité du tissu et une autre à la surface du revêtement, apporte une double fonctionnalité biologique au matériau hybride.

La réalisation du dopage au Sr^{2+} des revêtements de CaP, ainsi que les caractérisations physico-chimiques et structurales des matériaux, ont été effectuées à l'ICMN. Seules les caractérisations structurales par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN MAS) ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

(CEMHTI - CNRS UPR 3079, Orléans). Concernant l'étude de l'adsorption de PA, elle a été réalisée en collaboration avec le Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT - UMR CNRS 5085, Toulouse) pour leur expertise sur la partie adsorption de principes actifs sur apatite et à l'ICMN pour la partie adsorption d'aspirine sur le tissu et sur le matériau hybride.

La démarche expérimentale concernant l'étude du dopage par substitution du calcium par le strontium ou par adsorption de principes actifs au sein des constituants du matériau hybride est explicitée ci-dessous, dans la Figure III-1 :

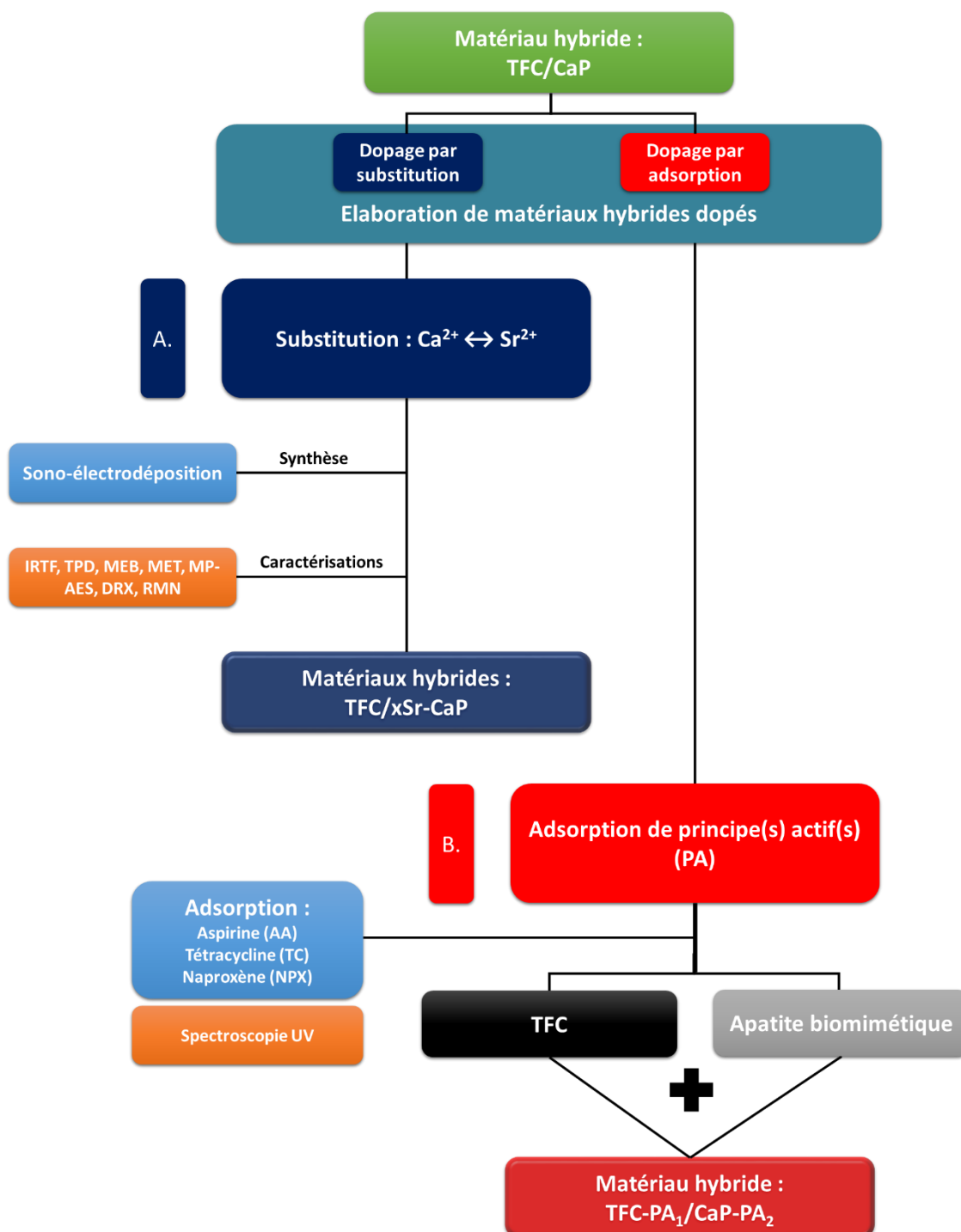
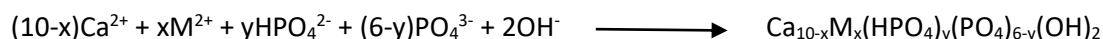


Figure III-1 : Schéma présentant la démarche expérimentale suivie lors du dopage des constituants du matériau hybride.

A. Synthèse et caractérisations physico-chimiques des revêtements dopés en strontium

A.1. Introduction

La sono-électrodéposition permet de déposer de manière contrôlée une CDA biomimétique à la surface d'un tissu de fibres de carbone (Cf. Chapitre II.). Ce procédé électrochimique pourrait également permettre de modifier la nature du revêtement par ajout d'un sel de strontium dans l'électrolyte. Ce chapitre a pour objectif d'étudier le dopage au Sr^{2+} du revêtement de CaP par procédé d'électrodéposition, de la mise en œuvre de la synthèse à la caractérisation des revêtements des CaP dopés. La modification de la structure du revêtement phosphocalcique via l'insertion d'un cation est réalisée par ajout d'un sel correspondant dans l'électrolyte. Cette insertion peut être résumée par l'équation bilan suivante [173] :



Le Sr^{2+} a été sélectionné pour plusieurs raisons. Il est connu, d'une part, pour pouvoir substituer facilement le calcium (Ca^{2+}) et, d'autre part, pour ses propriétés intrinsèques, notamment biologiques, en particulier dans le domaine de la régénération osseuse (Cf. Chapitre I.). En effet, dans la littérature il est décrit que, lorsque le taux de Sr^{2+} en substitution dans des apatites est compris entre 3 et 7 % (pourcentage atomique), l'activité et la différenciation des ostéoblastes augmentent tandis que celles des ostéoclastes diminuent [94].

Dans ce travail, différentes conditions expérimentales ont été testées avec des taux de Sr^{2+} compris entre 3 et 7 %. La caractérisation physico-chimique des matériaux hybrides dopés en Sr^{2+} a ensuite été réalisée. L'effet du Sr^{2+} sur les propriétés biologiques (biocompatibilité, différenciation cellulaire) du revêtement de CaP a également été étudié et les résultats sont présentés dans la suite de ce manuscrit (Cf. Chapitres IV. et V.).

A.2. Protocole de synthèse

Les revêtements de CaP ont été déposés par sono-électrodéposition en utilisant le protocole de synthèse optimisé dans le chapitre précédent, c'est-à-dire, en mode potentiostatique, à potentiel constant de -1 V / Hg/Hg₂SO₄ durant 6 h, sous ultrasons, à température constante de 70 °C et en milieu aqueux. Le Sr²⁺ est introduit dans l'électrolyte par ajout d'un sel de nitrate de strontium (Sr(NO₃)₂), choisi par similitude avec le sel précurseur de Ca²⁺ qui est le (Ca(NO₃)₂, 4H₂O). Afin d'obtenir une teneur finale en Sr²⁺ comprise entre 3 et 7 %, deux teneurs initiales en Sr²⁺ ont été sélectionnées. En supposant que tous les précurseurs n'interviennent pas dans les mêmes proportions dans la formation du revêtement, des teneurs en Sr²⁺ légèrement supérieures à celles souhaitées sont retenues. C'est ainsi que, pour obtenir une teneur finale en Sr²⁺ comprise entre 3 et 7 %, la quantité des sels précurseurs dissoute dans l'électrolyte choisie correspond à un rapport molaire $\frac{Sr}{Ca+Sr}$ initial de 5 % et 10 % (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Composition de l'électrolyte lors de la sono-électrodéposition pour l'obtention des revêtements de CaP dopés au strontium.

Solution	Ca(NO ₃) ₂ ,4H ₂ O (mmol.L ⁻¹)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (mmol.L ⁻¹)	Sr(NO ₃) ₂ (mmol.L ⁻¹)	$\frac{Ca + Sr}{P}$	$\frac{Sr}{Ca + Sr}$
0Sr-CaP	5,00	3,00	0	1,67	0 %
5Sr-CaP	4,75	3,00	0,25	1,67	5 %
10Sr-CaP	4,50	3,00	0,50	1,67	10 %

Les nouveaux matériaux de CaP dopés en Sr²⁺ sont désignés de la manière suivante :

$$\text{Nom du matériau} = \text{Nom du tissu} + x\text{Sr-CaP}$$

avec x : le pourcentage atomique initial de Ca²⁺ substitué par Sr²⁺ dans l'électrolyte compris entre 0 et 100 %.

Ex : FM 50K®+10Sr-CaP = Nom du tissu : FM50K® + 10 % de Sr²⁺ dans l'électrolyte.

A.3. Résultats des caractérisations des revêtements de CaP dopés en Sr^{2+}

À partir de chacune des trois solutions précurseurs préparées, un revêtement de CaP dopé ou non en Sr^{2+} est déposé sur le tissu de fibres de carbone FM 50K®. La Figure III-2 rassemble les spectres IRTF de ces trois revêtements. Dans une première analyse, on observe que les trois spectres sont relativement identiques. Ils présentent les quatre principaux domaines décrits dans le Chapitre II, ils sont surlignés en couleur dans la Figure III-2.

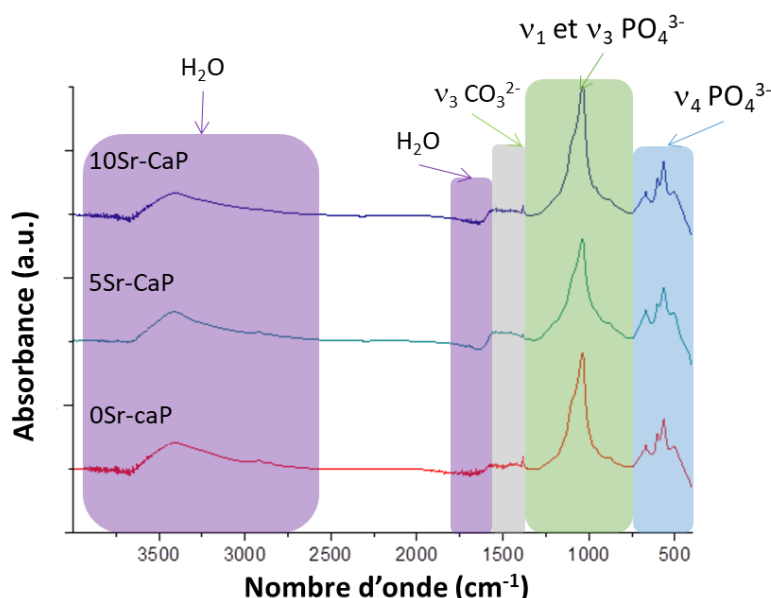


Figure III-2 : Spectres IRTF des revêtements de CaP obtenus par sono-électrodéposition pour différents taux initiaux de strontium dans l'électrolyte.

Une analyse détaillée des spectres IRTF montre que le domaine v_1 et v_3 des phosphates (surligné en vert) présente à nouveau des signatures caractéristiques de la CDA. La substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} conduit généralement à des distorsions dans la structure cristallographique de l'apatite [174]. Le Sr^{2+} possède un rayon ionique supérieur au Ca^{2+} (1,21 Å pour le Sr^{2+} contre 1,06 Å pour le Ca^{2+}) ce qui explique cette distorsion. Dans le cas présent, un très faible déplacement du domaine v_1 et v_3 des phosphates (encadré vert sur la Figure III-2), de l'ordre de quelques cm^{-1} , est effectivement observée lorsque le taux initial de strontium dans l'électrolyte augmente. Ce résultat est décrit dans la littérature comme correspondant à une incorporation de Sr^{2+} dans la structure de l'apatite [95]. Cependant, ce shift étant très minime, cette interprétation nécessite d'être confirmée par d'autres techniques d'analyse.

Concernant la présence du domaine v_3 caractéristique des carbonates (en gris clair sur la Figure III-3), elle indique que la CDA est carbonatée de type A, B pour les 3 teneurs en Sr^{2+} (Cf. Chapitre II. Figure II - 29).

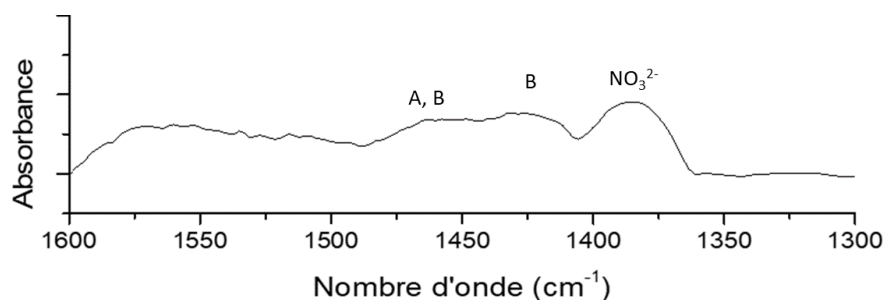


Figure III-3 : Spectre IRTF caractéristique du domaine ν_3 des carbonates.

En conclusion de la caractérisation par IRTF, l'incorporation du Sr^{2+} ne modifie pas les domaines (phosphates, carbonates) caractéristiques du revêtement. Quelle que soit la teneur en Sr^{2+} du matériau, il y a formation d'une CDA hydratée (voir domaines surlignés en violet sur la Figure III-3) et légèrement carbonatée. Le taux de carbonate est quantifié par TPD et IRTF comme décrit dans le chapitre précédent (Cf. Chapitre II. C.3.3. ; Annexes 6 et 8). Comme pour le revêtement sans Sr^{2+} , le taux de carbonatation est variable et inférieur à 6 % en masse.

L'effet de l'incorporation de Sr^{2+} sur la morphologie du revêtement de CaP a été analysé par MEB (Figure III-4).

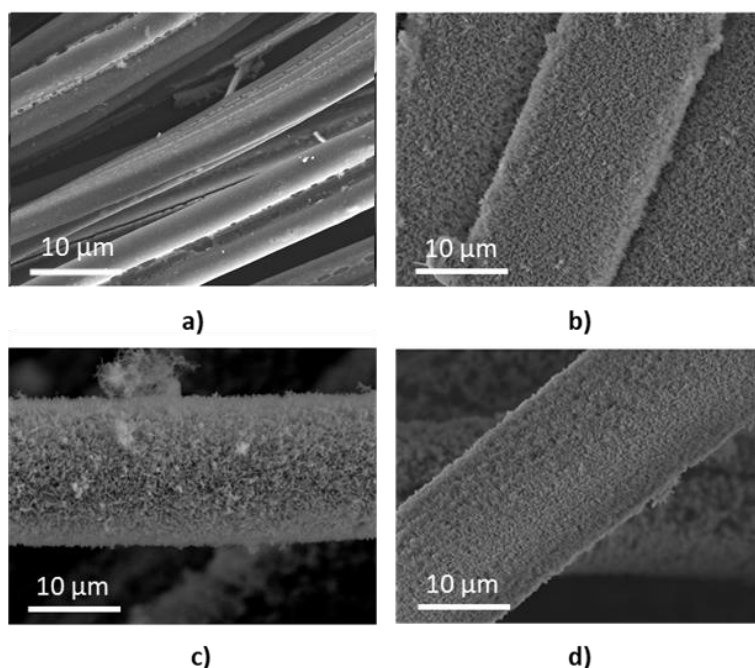


Figure III-4 : Images de MEB des différents matériaux : a) FM 50K®, b) FM 50K®+0Sr-CaP, c) FM 50K®+5Sr-CaP et d) FM 50K®+10Sr-CaP.

Les images MEB montrent un recouvrement total des fibres de carbone observé en surface du tissu, quelle que soit la quantité de Sr^{2+} initiale dans l'électrolyte, comprise entre 0 et 10 %. Il est impossible de différencier à ce grossissement les différents revêtements de CaP. A plus fort grossissement (Figure III-5), dans le cas des revêtements contenant du Sr^{2+} , on obtient des images MEB similaires à celles

observées pour le revêtement sans Sr^{2+} , c'est-à-dire un recouvrement total du tissu avec un revêtement constitué de plaquettes de CaP (Figure III-5 a)). L'épaisseur du revêtement évaluée à partir des images MEB est d'environ 1,5 μm pour les trois échantillons (Figure III-5 b)).

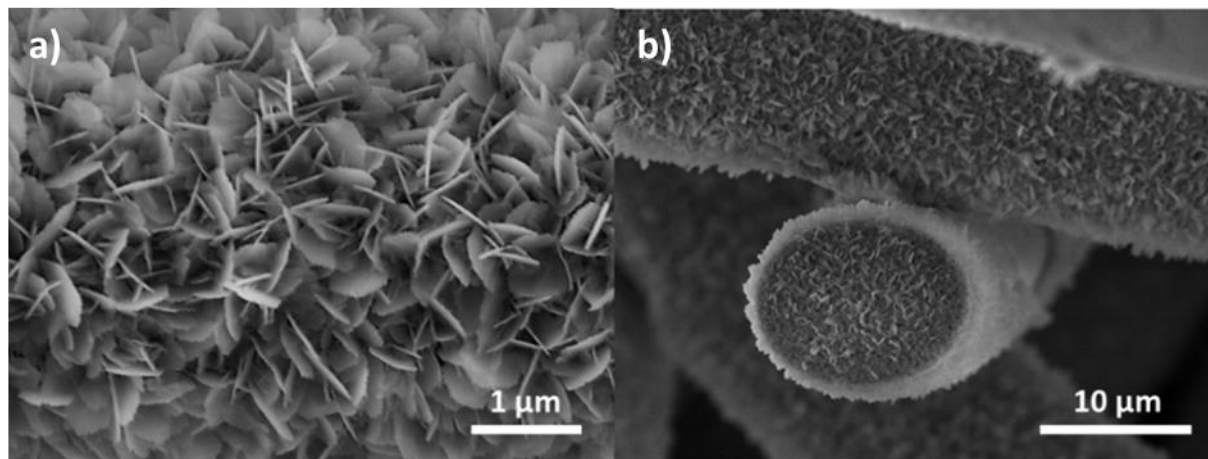


Figure III-5 : Images de MEB caractéristiques d'un revêtement synthétisé à potentiel constant (-1 V, 6 h) avec un taux de strontium initial dans l'électrolyte compris entre 0 et 10 %. a) Détail des plaquettes constituant le revêtement de CaP. b) Section transversale d'une fibre de carbone permettant de mesurer l'épaisseur du revêtement de CaP dopé au strontium.

L'analyse chimique réalisée en MEB-EDX a permis d'obtenir des spectres en énergie d'analyse des photons X. En sélectionnant sur ces spectres une fenêtre intégrant les raies $\text{L}\alpha_2$ (à 1,80 keV) et $\text{L}\beta_1$ (à 1,87 keV), raies principales correspondant à l'énergie du Sr^{2+} , il est possible de réaliser des cartographies d'émission X du Sr^{2+} (Figure III-6), et ceci pour les différents revêtements. Les deux premiers correspondent aux échantillons 5Sr-CaP et 10Sr-CaP tandis que le troisième correspond à un revêtement de type 10Sr-CaP mais synthétisé à courant constant de -270 mA/g. Ce dernier a été choisi car, dans de précédents travaux, il a été montré, qu'à forte densité de courant (exemple : -270 mA/g), d'autres phases que la CDA pouvaient se former, telles que les carbonates de calcium [6,8]. Par similitude, l'ajout de Sr^{2+} dans ces conditions expérimentales (densité de courant de -270 mA/g) pourrait aboutir à la formation de carbonates de strontium. Effectivement, il a été montré, qu'à -270 mA/g, lorsque du Sr^{2+} est ajouté à l'électrolyte, des agrégats à base de Sr^{2+} de type carbonate de strontium se forment à la surface des fibres de carbone (Figure III-6 c), flèches rouges). Pour les revêtements synthétisés à potentiel constant, aucun agrégat de Sr^{2+} n'est visible à la surface des fibres. Les images de cartographie EDX-MEB de la Figure III-6 a) et b) mettent clairement en évidence une répartition homogène du Sr^{2+} au sein des revêtements de CaP qui recouvre totalement les fibres de façon homogène.

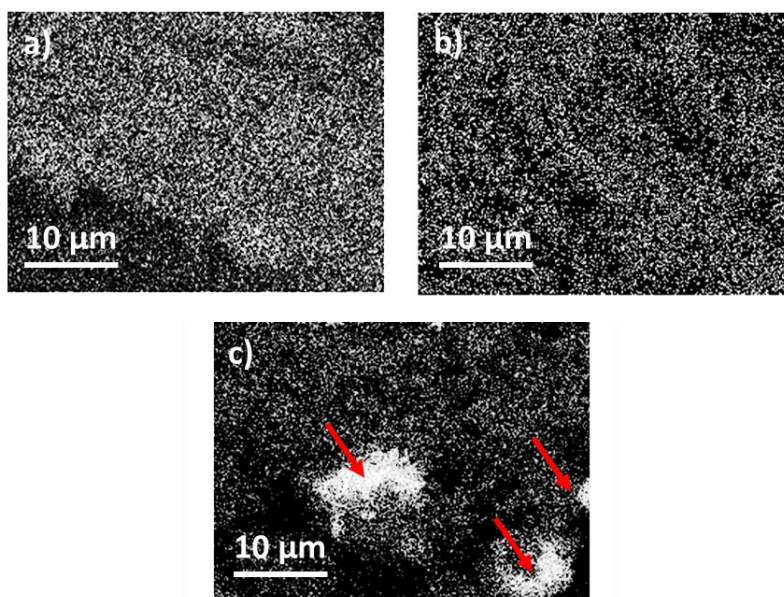


Figure III-6 : Analyse EDX-MEB. Cartographies d'émission X du Sr^{2+} des revêtements : a) 5Sr-CaP, b) 10Sr-CaP et c) 10Sr-CaP synthétisé à -270 mA/g.

Pour une caractérisation en MET des revêtements de CaP dopés, les tissus de fibres de carbone ont été tout simplement « grattés » et les poudres ainsi obtenues ont été déposées sur une grille de cuivre. Les images MET des 3 échantillons sont illustrées sur la Figure III-7.

De nouveau, aucune différence n'est observée entre les revêtements sans Sr^{2+} (a) et avec Sr^{2+} (b et c). Ils sont tous trois constitués de particules lamellaires, leur dimension est de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Elles sont superposées les unes aux autres et enroulées sur leurs extrémités (contraste noir sur les images), témoignant de leur flexibilité.

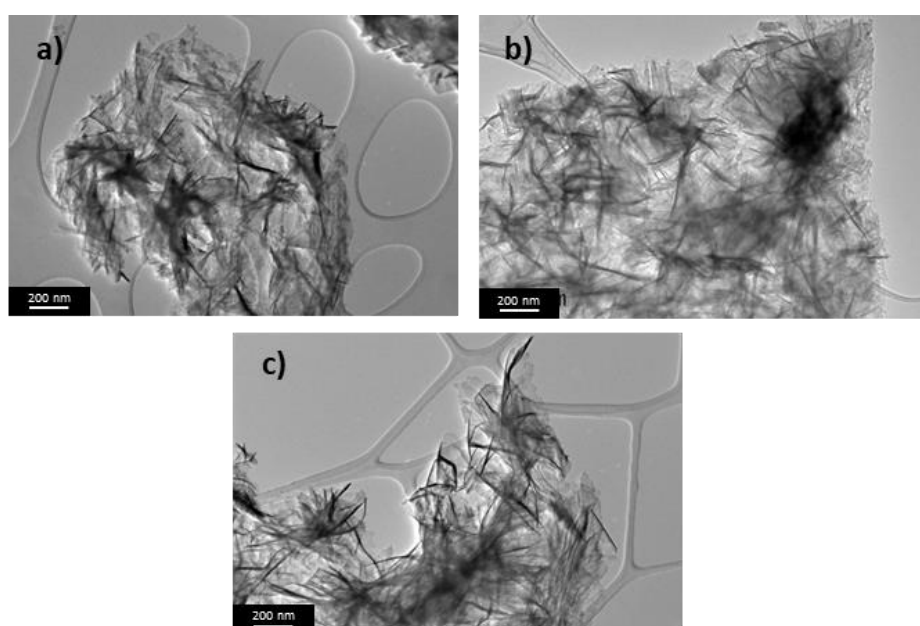


Figure III-7 : Images MET des revêtements de CaP : a) sans Sr^{2+} : 0Sr-CaP, b) avec Sr^{2+} : 5Sr-CaP et c) avec Sr^{2+} : 10Sr-CaP.

Les analyses EDX réalisées en MEB et MET ont été utilisées pour calculer le rapport $\frac{Ca+Sr}{P}$, ainsi que le taux de Sr^{2+} dans le revêtement ($\frac{Sr}{Ca+Sr} \times 100$). Pour vérifier la précision des analyses EDX du taux de Sr^{2+} , les revêtements de CaP dopés en Sr^{2+} ont été analysés par spectroscopie d'émission atomique à plasma microondes (MP-AES : Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy ; analyses réalisées à l'IUT chimie d'Orléans). Cette technique permet de quantifier les ions Ca^{2+} et Sr^{2+} présents dans les poudres de CaP des 3 échantillons (Cf. Annexe 12). Les résultats des analyses sont regroupés dans le Tableau III-2.

Les résultats obtenus par EDX permettent de constater que le rapport $\frac{Ca+Sr}{P}$ dans le revêtement est toujours égal à 1,4. Le caractère non-stoechiométrique du revêtement n'est ni diminué, ni augmenté par l'incorporation de Sr^{2+} en diverses proportions.

Concernant la teneur de Sr^{2+} dans le revêtement, elle ne correspond jamais à la teneur introduite dans l'électrolyte. Quelle que soit la solution électrolytique, le rapport $\frac{Sr}{Ca+Sr}$ du revêtement est toujours inférieur à celui introduit dans l'électrolyte (environ 60 %). En prenant en compte les trois analyses, le taux de Sr^{2+} est proche de 3 % dans le cas du revêtement 5Sr-CaP et il est d'environ 6 % dans le cas du revêtement 10Sr-CaP.

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

Tableau III-2 : Analyses des rapports caractéristiques des différents revêtements de CaP.

Echantillons	Solution		Techniques d'analyses	revêtement	
	$\frac{\text{Ca} + \text{Sr}}{\text{P}}$	$\frac{\text{Sr}}{\text{Ca} + \text{Sr}} \times 100$ (% at.)		$\frac{\text{Ca} + \text{Sr}}{\text{P}}$	$\frac{\text{Sr}}{\text{Ca} + \text{Sr}} \times 100$ (% at.)
0Sr-CaP	1,67	0	EDX-MEB	1,4 ± 0,1	0
5Sr-CaP	1,67	5		1,4 ± 0,1	4,1 ± 0,6
10Sr-CaP	1,67	10		1,4 ± 0,1	6,8 ± 0,8
0Sr-CaP	1,67	0	EDX-MET	1,4 ± 0,1	0
5Sr-CaP	1,67	5		1,4 ± 0,1	3,0 ± 0,5
10Sr-CaP	1,67	10		1,4 ± 0,1	6,6 ± 0,8
0Sr-CaP	1,67	0	MP-AES	x	0
5Sr-CaP	1,67	5		x	2,9 ± 0,5
10Sr-CaP	1,67	10		x	5,5 ± 0,4

Le but de ce dopage au strontium étant d'obtenir un revêtement xSr-CaP dont la substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} soit comprise entre 3 et 7 %, les deux revêtements 5 et 10Sr-CaP correspondent aux objectifs quantitatifs recherchés. Cependant, les analyses réalisées jusqu'à présent ne permettent pas d'affirmer si ce dopage correspond à une substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} .

Pour ce faire, la structure des trois revêtements de CaP dopés en strontium est caractérisée par DRX (Figure III-8). Pour rappel, le tissu de fibres de carbone ayant été ensimé par de l'aluminate de zinc, le diffractogramme de ce dernier est aussi représenté dans la Figure III-7 (indexé en utilisant la fiche JCPDS 39-473).

Les diffractogrammes des deux matériaux hybrides dopés au Sr^{2+} sont assez proches de celui obtenu sans dopage. Le dopage à faible quantité de Sr^{2+} (inférieur à 10 % atomique) modifie, bien que peu, la structure du revêtement de CaP. Après indexation des réflexions liées à la structure de l'hydroxyapatite (fiche JCPDS 74-0566), il est observé un déplacement en $2\theta^\circ$ de la position des réflexions en fonction de l'augmentation de la quantité de Sr^{2+} : plus le taux de Sr^{2+} augmente et plus les positions des réflexions se déplacent vers les petits angles (Tableau III-3).

Dans la littérature [95,174], il est souligné que la substitution des cations Ca^{2+} par des cations Sr^{2+} entraîne des distorsions de la structure de l'hydroxyapatite qui se traduisent par un déplacement des réflexions principales (002), (211) et (310) et une modification des paramètres de la maille hexagonale.

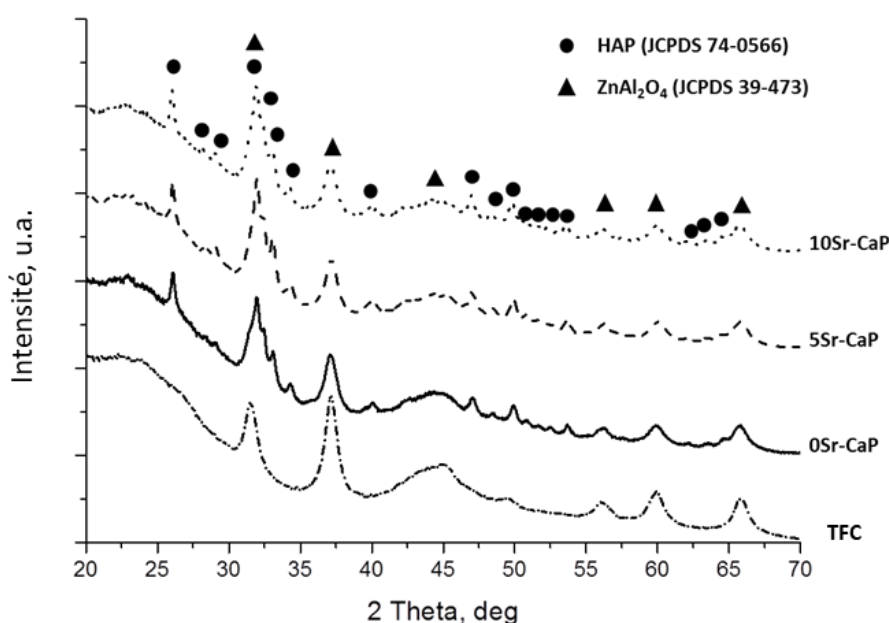


Figure III-8 : Diffractogrammes du tissu de fibres de carbone (TFC) et des matériaux hybrides sans Sr^{2+} (0Sr-CaP) et avec Sr^{2+} (5Sr-CaP et 10 Sr-CaP) ($\lambda \text{ K}\alpha \text{ Cu} = 0,154056 \text{ nm}$).

Le traitement par affinement de Debye des diffractogrammes (en enlevant la contribution du tissu de carbone) permet de déterminer les paramètres de maille (a et c). La fluctuation de ces paramètres, bien que faible, est significative (voir Tableau III-3) et correspond à une variation du volume de la maille dont l'origine peut résulter d'une distorsion de la structure cristalline résultant de la taille plus importante du cation Sr^{2+} . Pour rappel, le rayon ionique du Ca^{2+} est de 1,06 Å et celui du Sr^{2+} de 1,21 Å.

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

Ces résultats sont caractéristiques d'une substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} . De plus, aucune phase secondaire pouvant contenir du strontium, se présentant sous forme d'agrégats, n'est observée sur les diffractogrammes.

Tableau III-3 : Valeurs en $2\theta^\circ$ des principales réflexions du revêtement ainsi que les paramètres de maille associés à chaque matériau hybride ($\lambda \text{ K}\alpha \text{ Cu} = 0,154056 \text{ nm}$).

Ech.	(002)	(211)	(310)	Paramètre de maille	
	Position, $2\theta^\circ$	Position, $2\theta^\circ$	Position, $2\theta^\circ$ deg	a, Å	c, Å
0Sr-CaP	26,08	32,00	40,06	9,366	6,820
5Sr-CaP	26,05	31,97	40,03	x	x
10Sr-CaP	26,02	31,92	39,94	9,379	6,834

Pour confirmer et préciser ces résultats, la spectroscopie de RMN en rotation à l'angle magique (RMN MAS) a été utilisée. Pour rappel, cette technique permet de sonder les environnements chimiques locaux du ^{31}P et du ^1H dans des solides et de donner des informations sur l'ordre et le désordre structural (à l'échelle locale) des phases présentes, en l'occurrence ici, des phases d'hydroxyapatite. Les signatures spectrales observées par RMN MAS du ^{31}P vont être affectées par la présence d'un désordre local, ce qui sera le cas si ce désordre résulte de substitution. Les signatures spectrales vont également permettre d'obtenir des informations sur l'éventuelle évolution du désordre en fonction de la teneur en Sr^{2+} dans les revêtements de CaP.

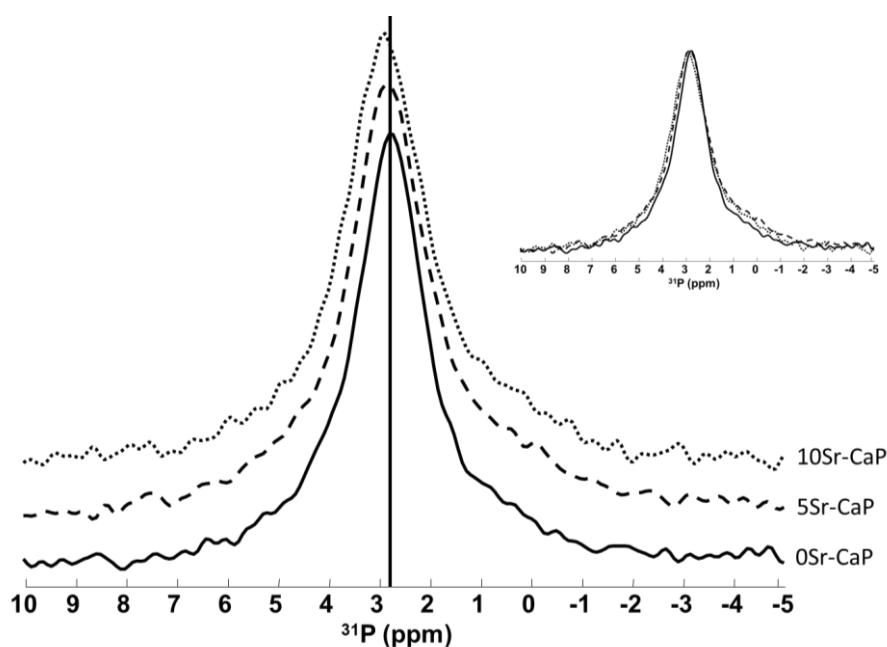


Figure III-9 : Spectres RMN MAS quantitatifs du ^{31}P des revêtements de CaP ayant différents taux de Sr^{2+} . En encart sont représentés les trois spectres superposés.

Dans un premier temps, la RMN MAS du ^{31}P a été utilisée pour sonder l'environnement du phosphore des trois revêtements, sans Sr^{2+} et à teneur croissante en Sr^{2+} (Figure III-9). Les spectres de ^{31}P possèdent une raie intense avec un déplacement chimique isotrope autour de 2,8 ppm et une largeur à mi-hauteur de l'ordre de 1,6 ppm. On note, d'une part, que cette raie se déplace très légèrement vers des valeurs de déplacements chimiques plus élevées et, d'autre part, qu'elle s'élargit progressivement avec l'augmentation de la quantité de Sr^{2+} (largeur à mi-hauteur de la raie variant de 1,6 à 1,9 ppm). De plus, un élargissement à la base des raies est également observé en présence de Sr^{2+} . Ces évolutions sont visibles dans les spectres RMN MAS ^{31}P (Figure III-10), où le signal principal est déconvolué en différentes contributions. La raie fine (en vert) est associée à des groupes PO_4^{3-} de cœur, et la résonnance large (en violet), qui forme un épaulement, est liée à des groupes de surface de type PO_x et $-\text{HPO}_x$ [95,175]. Le déplacement de la raie fine vers des valeurs de déplacement chimique plus élevées (initialement situé autour de 2,8 ppm) est caractéristique de la substitution du Ca^{2+} par le Sr^{2+} jusqu'au cœur ordonné de la particule d'apatite.

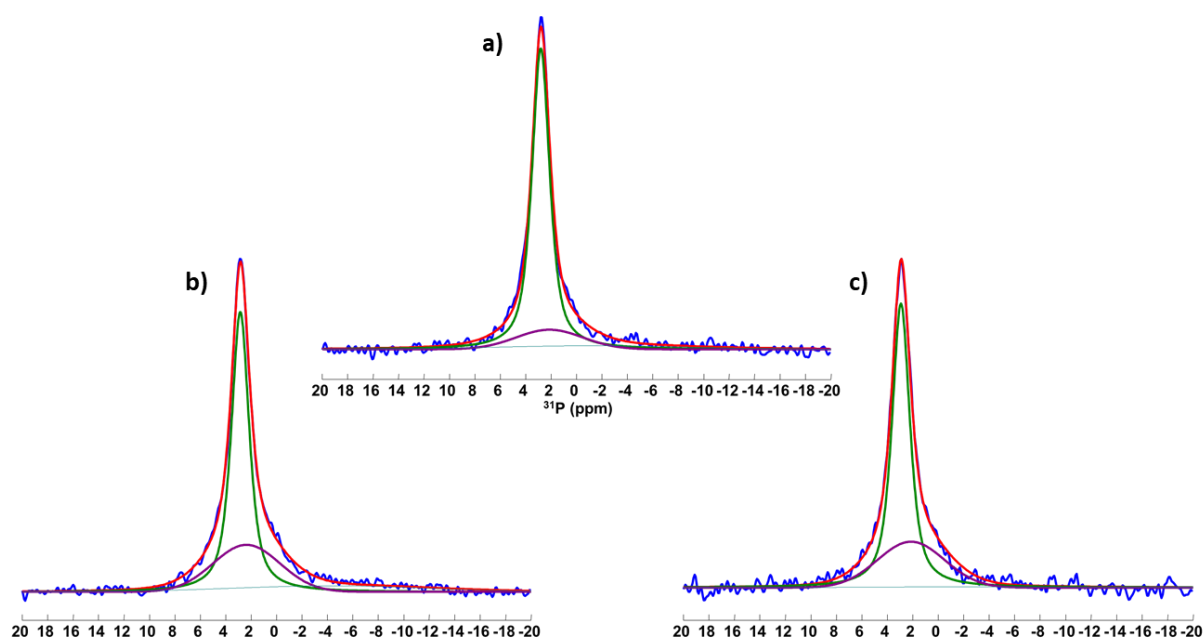


Figure III-10 : Spectres RMN MAS ^{31}P quantitatifs des matériaux hybrides : a) 0Sr-CaP, b) 5Sr-CaP et c) 10Sr-CaP. En bleu sont représentés les spectres mesurés, en rouge les spectres simulés, en vert la contribution fine et en violet la contribution large.

Les spectres 2D de corrélation hétéronucléaire (HetCor) ^{31}P - ^1H ont été enregistrés pour les trois matériaux (Figure III-11). Ces cartographies présentent les tâches de corrélation entre les différentes raies de résonance ^{31}P et ^1H qui traduisent directement la proximité entre ces atomes. Pour les trois échantillons, et comme vu dans le chapitre précédent, une tâche de corrélation intense entre la raie du ^{31}P (2,8-2,9 ppm), attribuée aux groupements phosphates de la HAP, et la raie ^1H , située vers 0 ppm, est observée (pointillés rouges). Elle est caractéristique des OH^- apatitiques. Une seconde tâche de

corrélation entre la contribution large ^{31}P , caractéristique d'un environnement désordonné, et les signaux ^1H , entre 5 et 15 ppm, qui sont associés aux molécules d'eau et aux ions hydrogénophosphates, est également observée (tirets verts). Pour rappel, ces corrélations sont caractéristiques de la structure de nanocristaux d'HAP. Les nanocristaux sont des plaquettes lamellaires (voir les images de MET de la Figure II-33) se présentant sous la forme d'un cœur de structure relativement bien ordonné riche en ions hydroxydes et d'une couche de surface de structure désordonnée riche en ions HPO_4^{2-} , en molécules d'eau et appauvrie en ions hydroxydes [166–170]. L'incorporation du Sr^{2+} ne modifie pas l'organisation des nanocristaux qui conservent leur caractère biomimétique [54,166].

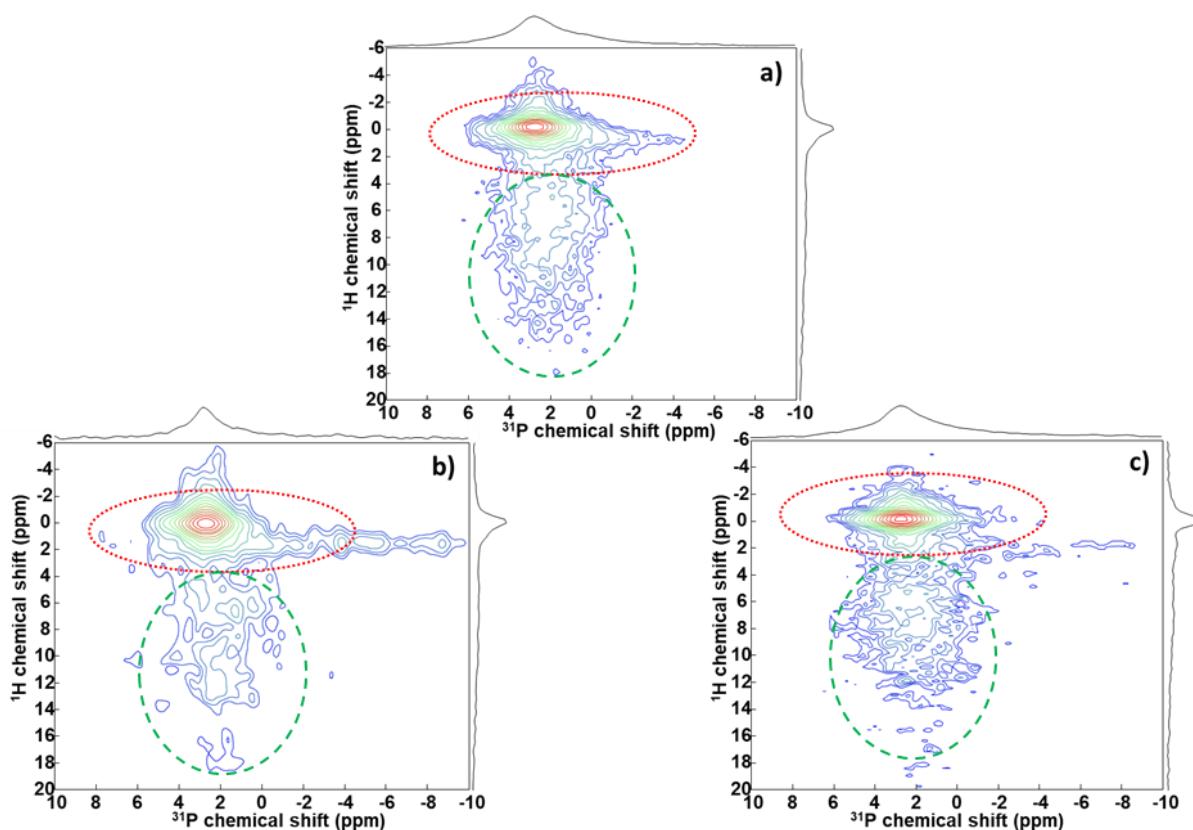


Figure III-11 : Spectres RMN MAS de corrélation hétéronucléaire 2D ^1H - ^{31}P des revêtements de CaP synthétisés à différents taux de Sr^{2+} : a) 0Sr-CaP, b) 5Sr-CaP et c) 10Sr-CaP.

A.4. Discussion

La problématique consistait à déterminer si l'ajout de strontium dans les revêtements de CaP par voie électrochimique, pour une teneur de Sr^{2+} inférieure à 10 % atomique, engendrerait une modification de la structure cristalline de l'HAP par substitution des ions Ca^{2+} par des ions Sr^{2+} ou se traduirait par la formation d'une phase secondaire d'agrégats de strontium.

Les résultats de MEB-EDX, DRX et de RMN MAS montrent que le strontium n'est pas présent dans les revêtements de CaP sous forme d'agrégats de phase mono-cationique. Il est réparti de manière homogène au sein des revêtements de CaP qui recouvrent totalement la surface des fibres de carbone. Les caractérisations morphologiques, microtexturales et structurales des revêtements de CaP non dopés et dopés en Sr^{2+} ont montré que l'ajout de Sr^{2+} , quelle que soit sa teneur, ne modifiait pas la structure plaquettaire des revêtements de CaP. Les caractérisations IRTF montrent que les revêtements de CaP restent constitués d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA) carbonatée avec ou sans ajout de strontium. L'IRTF a montré également des résultats pouvant suggérer un dopage par substitution. Les premiers résultats plaident en faveur de cette substitution ont été apportés par la diffraction des RX avec le calcul des paramètres de la maille qui met en évidence une distorsion de la maille cristalline liée à la taille plus importante du Sr^{2+} comparé au Ca^{2+} . Quant aux résultats apportés par la RMN MAS du ^{31}P et les spectres 2D de corrélation hétéronucléaire, ils ont été décisifs. La RMN MAS étant extrêmement sensible aux différents environnements chimiques d'un élément spécifique, la présence en faible quantité d'ions substitués est perçue comme un défaut ponctuel dans la structure de l'Hydroxyapatite. L'ajout du Sr^{2+} conduit à l'élargissement à la base de la raie intense du spectre RMN MAS du ^{31}P ainsi qu'à un léger déplacement de cette raie qui témoigne que la substitution a lieu jusqu'aux ions de Ca^{2+} présents dans le cœur apatitique des particules des revêtements de CaP. En effet, les résultats de RMN ont montré que les revêtements de CaP, avec et sans Sr^{2+} , ont la même organisation. Ils sont constitués d'un cœur ordonné apatitique et d'une surface hydratée et désordonnée.

La conclusion de cette partie est que le procédé de sono-électrodéposition est une technique intéressante et singulière pour obtenir un revêtement de CDA carbonatée et substituée en Sr^{2+} de manière contrôlée. Une seule phase cristalline est obtenue où les cations Ca^{2+} et Sr^{2+} occupent des positions similaires dans le réseau de la structure apatitique. La substitution des ions Ca^{2+} par les ions Sr^{2+} , ayant un rayon ionique et une électronégativité différents, conduit à de légères modifications structurales mais ne modifie ni l'organisation des nanocristaux ni leur microtexture. Les revêtements de CaP constitués de nanocristaux de CDA carbonatée substituée en Sr^{2+} pourraient être utilisés pour administrer du Sr^{2+} aux tissus osseux et favoriser ainsi leur régénération osseuse [102].

B. Couplage matériau hybride – principe(s) actif(s)

B.1. Introduction

L'objectif de ce travail est d'étudier la possibilité et la potentialité d'adsorption de différents principes actifs (PA) au sein du matériau hybride pour son utilisation comme biomatériau en régénération osseuse. L'intérêt majeur de ce matériau hybride est qu'il est constitué d'un tissu de fibres de carbone (TFC), matériau reconnu et déjà très utilisé pour ses capacités d'adsorption, notamment pour le traitement des eaux dans des problématiques environnementales. Un certain nombre de micropolluants sont adsorbés par les tissus carbonés dont un grand nombre de principes actifs [3,5]. Le matériau hybride est également constitué d'un revêtement d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA), dont de nombreux travaux ont montré toute leur potentialité en tant qu'adsorbant de principes actifs [73,107,115,116]. Dans ce contexte, il a semblé original et innovant d'envisager l'adsorption de deux principes actifs ciblés au sein de chaque constituant du matériau afin de conjuguer leurs deux efficacités pour, à titre d'exemple, une diffusion locale et rapide de certaines molécules actives et une diffusion plus lente d'autres molécules actives lors de l'implantation du matériau hybride pour une application en régénération osseuse (Figure III-12).

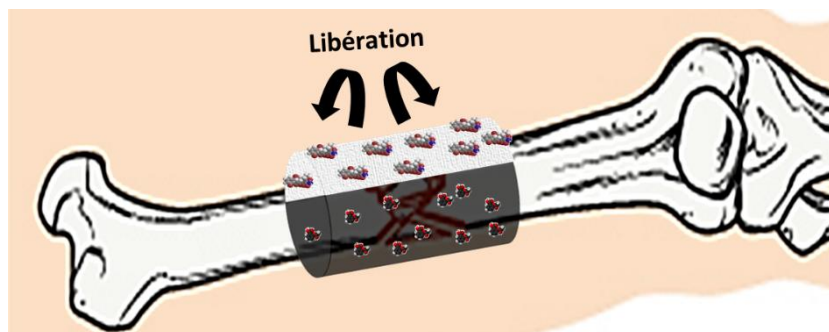


Figure III-12 : Concept d'un pansement osseux « Tissu de fibres de carbone / phosphate de calcium » dopé avec deux principes actifs différents.

Concernant le revêtement de CDA, suite à une étude bibliographique et à des discussions avec des spécialistes des biomatériaux, deux molécules, pouvant être adsorbées en surface du revêtement de CAP déposé sur le tissu de carbone, ont été sélectionnées. Il s'agit de la tétracycline (TC), antibiotique à très large spectre [73,176] et du naproxène (NPX) anti-inflammatoire non-stéroïdien fréquemment utilisé lors du traitement du cancer des os [177–180]. Avant d'étudier l'adsorption de ces molécules sur les matériaux hybrides, une étude préliminaire a été consacrée à étudier leur adsorption sur une apatite biomimétique se présentant sous forme de poudre, ayant des caractéristiques physico-chimiques très similaires à celles du revêtement de CDA carbonaté déposé en surface du tissu de carbone. Les données obtenues permettront de déterminer l'affinité entre les principes actifs et l'apatite biomimétique de référence, étape importante pour mieux comprendre ensuite les

phénomènes d'adsorption des principes actifs au sein de notre matériau hybride. L'adsorption de la tétracycline ayant déjà été étudiée sur un substrat d'apatite biomimétique, ce système sera utilisé comme référence pour notre étude. En effet, Cazalbou *et al.* ont montré la possibilité d'adsorber la tétracycline à la surface d'apatite biomimétique et le fait que ces molécules pouvaient être ensuite libérées progressivement [73]. Cette adsorption permettrait *in fine* un relargage (désorption et/ou libération accompagnée d'une dissolution progressive du substrat) de TC sur le site d'implantation. Les conditions expérimentales optimisées sur l'apatite biomimétique seront ensuite transposées sur les revêtements de CDA du matériau hybride.

Quant au TFC, testé pour pouvoir adsorber facilement des molécules hydrophobes en grande quantité, il s'avère pouvoir être un matériau de choix pour servir de « réservoir » capable ensuite de pouvoir libérer de manière contrôlée les principes actifs [5]. Le principe actif sélectionné, après discussions avec N. Rochet, est l'aspirine (AA) (marque déposée par la société Bayer en 1899), reconnu pour son action anti-inflammatoire. C'est une molécule qui a fait l'objet de nombreuses études ayant démontré ses multiples actions et effets. Son faible coût, mais surtout ses effets sur la régénération osseuse étudiées ces dernières années en font une molécule intéressante dans le cadre de ce travail [137–142]. L'adsorption de l'AA a été étudiée, en premier lieu, sur le tissu de carbone « brut », sans revêtement de CaP, ce qui a permis d'optimiser les paramètres expérimentaux d'adsorption. Les conditions expérimentales optimisées sur le tissu de carbone ont été ensuite transposées sur le matériau hybride.

Afin de comprendre au mieux l'adsorption de deux principes actifs sur les matériaux hybrides, l'adsorption des 3 principes actifs sur tous les constituants du matériau hybride a également été étudiée. La démarche expérimentale et ses différentes étapes de travail sont résumées sur le schéma de la Figure III-13 :

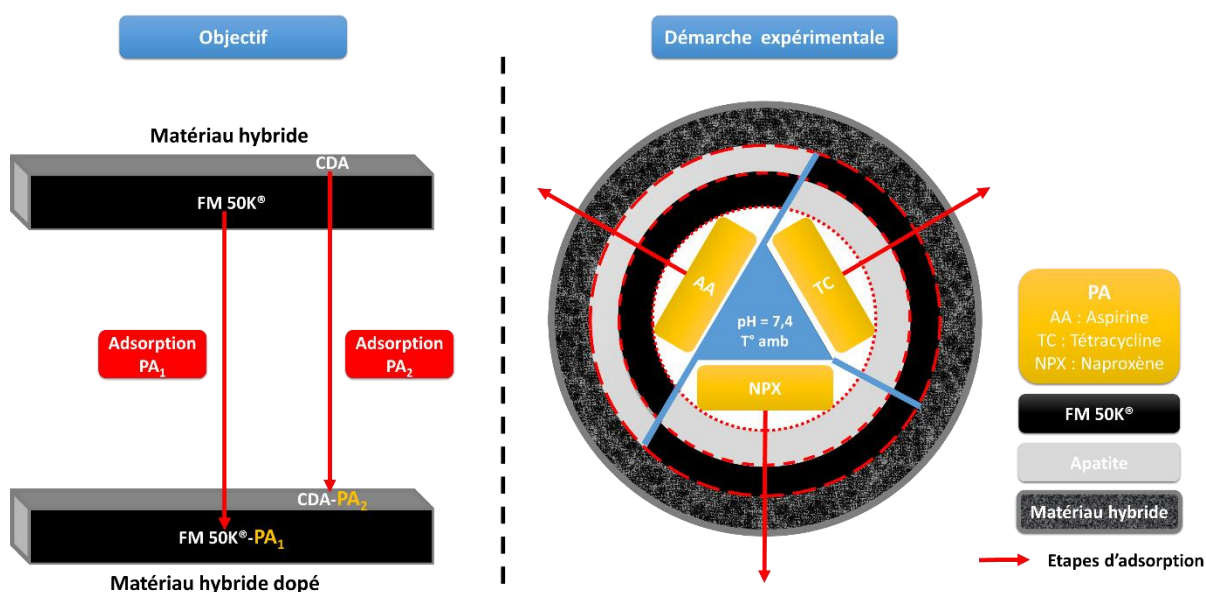


Figure III-13 : Schéma de l'objectif et des différentes étapes de la démarche expérimentale.

B.2. Matériaux et principes actifs (PA)

Le matériau de référence est une poudre d'apatite biomimétique (en gris clair sur la Figure III-13) non carbonatée. Elle a été synthétisée par co-précipitation au CIRIMAT en suivant le protocole de référence de Vandecandelaere *et al.* avec une durée de maturation de 1 mois [72]. Elle est ensuite filtrée, lyophilisée et tamisée pour obtenir un diamètre de particules compris entre 200 et 400 μm . Le choix de cette poudre d'apatite résulte d'une similarité de composition chimique avec le revêtement de CaP recouvrant le matériau hybride observée sur leurs spectres IRTF respectifs. Le second matériau adsorbant étudié est le substrat, le tissu de fibres de carbone FM 50K® (en noir sur la Figure III-13). Ses caractéristiques physico-chimiques, notamment sa porosité multi-échelles, ont été détaillées dans le chapitre précédent. Le matériau hybride, le tissu de fibres de carbone recouvert par sono-électrodéposition d'une CDA carbonatée, a ensuite été testé (en gris-noir sur la Figure III-13). Ses caractéristiques ont également été détaillées dans le chapitre précédent.

Les trois principes actifs sélectionnés sont décrits brièvement ci-dessous.

- L'aspirine (AA) (Figure III-14) utilisée dans cette étude est l'acide acétylsalicylique (Sigma, CAS No. 50-78-2).

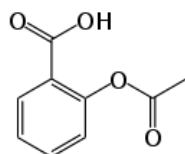


Figure III-14 : Formule de l'acide acétylsalicylique (AA).

- La tétracycline (TC) (Figure III-15) est utilisée sous forme d'un sel de phosphate de tétracycline, forme la plus soluble (Sigma, CAS No. 1336-20-5) : 100 mg du composé correspond à 82 mg de TC.

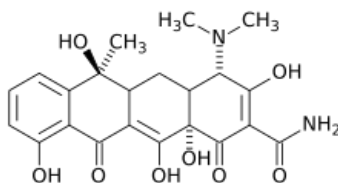


Figure III-15 : Formule chimique de la tétracycline (TC).

- Le naproxène (NPX) (Figure III-16) utilisé dans cette étude est sous forme de naproxène de sodium plus soluble également (Sigma, CAS No. 26159-34-2) : 100 mg du composé correspond à 91 mg de NPX.

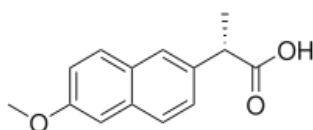


Figure III-16 : Formule chimique du naproxène (NPX).

B.3. Protocole d'adsorption

B.3.1. Adsorption sur apatite

Nous avons effectué cette étude d'adsorption au CIRIMAT à Toulouse. Elle a été réalisée dans les mêmes conditions que celles de Cazalbou *et al.* [73]. Pour ce faire, les 3 solutions de principes actifs sont préparées dans du KCl 10^{-2} M à base d'eau désionisée, à pH neutre (7,4) et à température ambiante (environ 22°C). Le pH de 7,4 est choisi afin de se rapprocher du pH de l'organisme, en vue de l'application biomédicale de notre matériau. L'étude d'adsorption des trois principes actifs sur l'apatite biomimétique de référence est effectuée en deux étapes : un suivi cinétique de l'adsorption puis la détermination de l'isotherme d'adsorption.

Ce protocole d'adsorption sera nommé **protocole 1**.

B.3.2. Adsorption des principes actifs sur tissu de carbone et sur matériau hybride

Dans le cas de la tétracycline et du naproxène, les cinétiques et les isothermes d'adsorption sont réalisées dans les mêmes conditions, que ce soit pour l'apatite, pour la pastille de tissu de carbone ou pour la pastille de matériau hybride (protocole 1).

Dans le cas de l'aspirine, le protocole d'adsorption est différent. Le tissu de carbone, ainsi que le matériau hybride, sont d'abord dégazés sous vide dans un réacteur pendant 2 h. De l'eau désionisée est ensuite introduite afin d'imprégner toute la porosité des matériaux pendant 24 h. Ils sont mis ensuite dans un nouveau réacteur contenant 100 mL de solution d'aspirine à 10^{-3} M. Le pH est de nouveau fixé à 7,4 et la température à environ 22 °C. La solution est mise sous agitation (420 rpm) pendant 24 h puis renouvelée deux fois (3 cycles de 24 h). La quantité adsorbée d'aspirine après les 3 cycles est très faible. Elle est même considérée comme négligeable, car la quantité absorbée est du même ordre de grandeur que l'erreur sur la mesure. Le temps d'adsorption de l'aspirine dans ces conditions est donc toujours de 72 h.

Ce protocole d'adsorption sera nommé **protocole 2**.

B.4. Résultats

B.4.1. Adsorption de principes actifs sur l'apatite biomimétique

B.4.1.1. Adsorption de la tétracycline (TC)

Une solution de tétracycline de concentration 820 ppm (1000 ppm du principe actif commercial) est préparée et sa cinétique d'adsorption sur apatite est suivie sur une durée de 2 h. La durée choisie pour déterminer ensuite l'isotherme d'adsorption est alors sélectionnée en considérant le temps au bout duquel la quantité adsorbée est stable, c'est-à-dire 1 h. Afin de réaliser cette isotherme, différentes solutions de concentration allant de 0 à 820 ppm ont été mises en contact avec 20 mg d'apatite dans un volume total de solution de 5 mL. Le dosage par spectrométrie UV-Visible du surnageant est réalisé à 355 nm (maximum d'absorption), en relation avec une courbe d'étalonnage établie entre 0 et 820 mg/L de TC (coefficient de corrélation $r^2 = 0,9996$). Toutes les solutions sont dosées après avoir été diluées 20 fois pour respecter la loi de Beer-Lambert (Cf. Annexe 13).

La cinétique d'adsorption (Figure III-17 a)) montre une adsorption de la tétracycline assez rapide, avec une quantité adsorbée maximum quasiment atteinte au bout de 30 min. La modélisation mathématique (courbe en rouge) montre que l'adsorption peut, en première approximation, être décrite par un comportement de type cinétique d'Elovich. Généralement, l'équation d'Elovich (modèle empirique) est associée à l'adsorption de molécules/polyélectrolytes sur des surfaces hétérogènes [181]. L'utilisation de ce modèle est donc judicieuse car l'adsorption sur l'apatite biomimétique est un phénomène relativement complexe du fait de l'hétérogénéité importante de la surface de la poudre d'apatite [73].

L'isotherme d'adsorption de la tétracycline (Figure III-17 b)) a une allure particulière aux faibles concentrations où elle présente un point d'inflexion. Cette allure rappelle notamment celle obtenue dans le cas d'une isotherme de Sips (Langmuir – Freundlich) avec un exposant « m » supérieur à 1. L'équation de Sips est la suivante :

$$Q_{ads} = Q_m \times \frac{K_s \times C_{eq}^m}{1 + K_s \times C_{eq}^m}$$

Q_{ads} : Quantité adsorbée

Q_m : Capacité d'adsorption maximum

K_s : Constante d'affinité

C_{eq}^m : Concentration à l'équilibre
avec m : exposant de Sips

La modélisation mathématique correspondant à notre cas est bien représentée par le modèle de Sips (courbe en rouge). La valeur de m , bien supérieure à 1 ($2,3 \pm 0,2$), confirme ce résultat. L'adsorption de la tétracycline suit une absorption dite de « coopération positive » (« positive cooperativity »), c'est-à-dire que l'adsorption des premières molécules à la surface de l'apatite facilite l'adsorption des

suivantes. Concernant les autres paramètres, une capacité d'adsorption maximum de $29,8 \pm 0,1$ mg par gramme d'apatite est obtenue et la constante d'affinité est d'environ 0,0034 (pour une concentration en mg/L). Les données concernant l'isotherme d'adsorption de la tétracycline sont en accord avec celles trouvées dans la littérature ($m > 1$, $Q_m = 36,4 \pm 1,1$ mg/g et $K_s = 0,0067 \pm 0,0014$) [73].

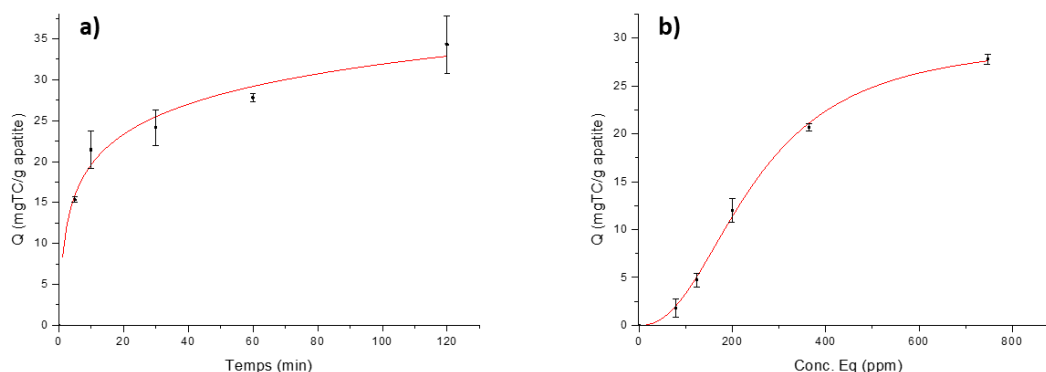


Figure III-17 : Adsorption de la tétracycline sur une poudre d'apatite biomimétique : a) cinétique d'une solution à 820 ppm et b) isotherme d'adsorption pour un temps de contact de 1 h à pH = 7,4 et à 22 °C.

B.4.1.2. Adsorption du naproxène (NPX)

Une solution de naproxène de concentration 250 ppm est préparée et sa cinétique d'adsorption est également suivie sur une durée de 2 heures avant d'étudier son isotherme. La durée sélectionnée pour réaliser l'isotherme d'adsorption est également de 1 h. Différentes solutions, allant de concentrations 0 à 250 ppm de naproxène, ont été mises en contact avec 20 mg d'apatite pour obtenir l'isotherme d'adsorption. Le dosage par UV-Visible du surnageant est réalisé à 262 nm (maximum d'absorption), en relation avec une courbe d'étalonnage établie entre 0 et 250 mg/L de naproxène (coefficient de corrélation $r^2 = 0,9996$). Toutes les solutions ont été dosées après avoir été diluées 5 fois pour respecter la loi de Beer-Lambert (Cf. Annexe 13).

La cinétique (Figure III-18 a)) montre une adsorption du naproxène assez rapide, comme dans le cas précédent pour la tétracycline. La modélisation mathématique (courbe rouge) montre que l'adsorption du naproxène semble de nouveau suivre un comportement de type cinétique d'Elovich. Les mêmes conclusions que pour la tétracycline peuvent donc être avancées.

L'isotherme d'adsorption (Figure III-18 b)) du naproxène présente une allure similaire à celle de la tétracycline. La modélisation mathématique de cette adsorption (courbe en rouge) est aussi représentée par le modèle de Sips, comme précédemment avec la tétracycline. La valeur de m est de nouveau supérieure à 1 (2,85), comme dans le cas de la tétracycline, elle est a priori caractéristique d'une adsorption qui se déroule par « coopération positive » (« positive cooperativity »). Les premières

molécules de naproxène adsorbées à la surface de l'apatite permettent ensuite une « meilleure » adsorption des suivantes. A partir du modèle, la capacité maximum d'adsorption a été estimée à environ 0,73 mg par g d'apatite. Très peu d'études sur l'adsorption du naproxène ont été décrites dans la littérature. Cependant, une étude se rapprochant des conditions opératoires décrites dans ce chapitre a déjà été réalisée. Il s'agit de l'adsorption du naproxène sur des particules d'os carbonisé (« bone char »), qui consiste en un mélange de particules de carbone/hydroxyapatite d'un diamètre d'environ 670 μm [177]. En utilisant le modèle de Sips, ils obtiennent : $m = 2,005$ et $Q_m = 2,7 \text{ mg/g}$. Comparée aux résultats obtenus sur apatite, la capacité d'adsorption est certes plus importante (environ 4 fois) mais reste relativement faible.

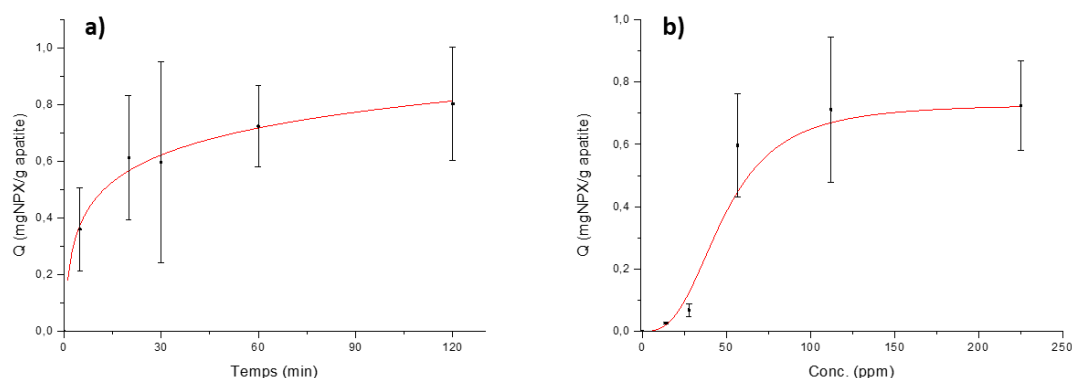


Figure III-18 : Adsorption du naproxène sur une poudre d'apatite biomimétique : a) cinétique d'une solution à 250 ppm et b) isotherme d'adsorption pour un temps de contact de 1 h, à pH = 7,4 et à 22 °C.

B.4.1.3. Discussion

Afin de comparer l'adsorption des deux principes actifs sur l'apatite biomimétique, les deux isothermes d'adsorption sont tracées sur le même graphe, où la quantité adsorbée est représentée en μmol de principes actifs par g d'apatite.

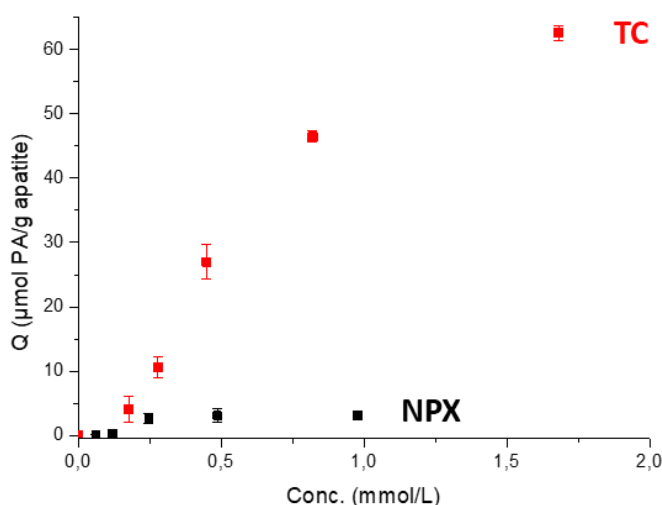


Figure III-19 : Comparaison des isothermes d'adsorption de la tétracycline et du naproxène sur apatite biomimétique à pH = 7,4 et à 22 °C.

Les isothermes d'adsorption (Figure III-19) montrent que, pour les très faibles concentrations à l'équilibre (jusqu'à 0,25 mmol/L environ), l'adsorption est identique pour les deux molécules. Ensuite pour des concentrations supérieures, leurs comportements sont très différents. Pour le naproxène la quantité maximum d'adsorption est atteinte très rapidement, dès 0,25 mmol/L ; tandis que pour la tétracycline, la quantité adsorbée continue d'augmenter au-delà de 1,5 mmol/L. La quantité adsorbable par l'apatite est nettement supérieure pour la tétracycline comparée au naproxène. D'un point de vue quantitatif, la tétracycline apparaît être un bon candidat en tant que molécule pouvant être adsorbée à la surface des matériaux hybrides, comparée au naproxène. En effet, ce dernier a une adsorption maximum inférieure à 1 mg/g d'apatite. Pour rappel, la quantité massique de CDA déposée à la surface des matériaux hybrides (2 x 3 cm) est inférieure à 10 mg, ce qui correspond à moins de 10 µg de naproxène adsorbé sur cette surface. Comparée aux données de la littérature, la dose de naproxène adsorbée sur la surface apatitique du matériau hybride est très largement insuffisante pour espérer une action thérapeutique [178–180].

Les résultats obtenus sont schématisés sur la figure suivante, Figure III-20 :

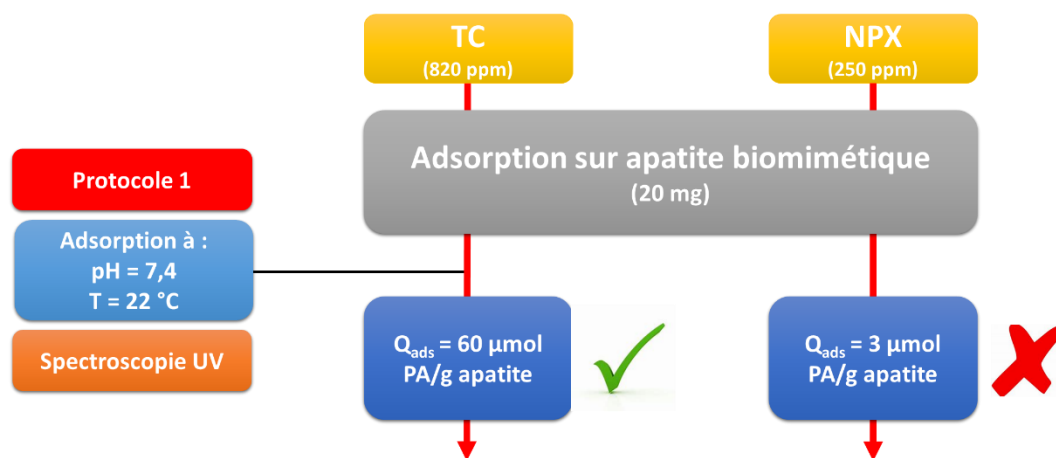


Figure III-20 : Bilan des adsorptions de la tétracycline (TC) et du naproxène (NPX) sur apatite biomimétique.

Pour la suite de cette étude, seule la tétracycline a été prise en considération pour les expériences d'adsorption à la surface du revêtement de CDA du matériau hybride, le naproxène ne s'adsorbant que très peu. Le concernant, une adsorption par le tissu devra être étudiée avant de l'exclure. En effet, il est possible qu'il soit adsorbé compte tenu de la porosité multi-échelle du tissu de fibres de carbone. Cette hypothèse implique donc que l'adsorption de la tétracycline soit aussi testée sur le tissu. Pour ce faire, les isothermes d'adsorption du naproxène, mais également de la tétracycline, sur le tissu de fibres de carbone ont été réalisées.

B.4.2. Adsorption des principes actifs sur tissu de fibres de carbone

B.4.2.1. Adsorption de la tétracycline et du naproxène

Dans cette partie, seulement les « isothermes » d'adsorption ont été réalisées. Le même protocole (protocole 1), que celui mis en œuvre pour l'adsorption de principes actifs par l'apatite, est appliqué, sauf que les 20 mg d'apatite en poudre sont remplacés par une pastille de tissu de fibres de carbone de 1 cm de diamètre et de 600 μm d'épaisseur. La durée d'adsorption est de 1 h, correspondant au temps également pris en compte dans le cas de l'adsorption de principes actifs sur apatite. Les mesures sont effectuées sur les mêmes gammes de concentration que précédemment, à pH de 7,4 et à une température de 22 °C.

L'expérience d'adsorption, pendant un temps court (1 h) a été choisie afin de « comparer » les quantités de principes actifs adsorbées sur le tissu de carbone avec celles adsorbées sur l'apatite. Il est à noter que l'équilibre d'adsorption de molécules hydrophobes telles que le naproxène ou la tétracycline sur des carbones nanoporeux est généralement atteint au bout de plusieurs heures, voire 72 heures, pour les molécules les plus encombrantes. L'adsorption implique des interactions hydrophobes de type donneur-accepteur entre les cycles aromatiques des plans des feuillets carbonés du tissu de carbone et les cycles des principes actifs.

Les « isothermes » d'adsorption (tétracycline et naproxène) sont reportées Figure III-21 en μmol de PA par gramme de tissu.

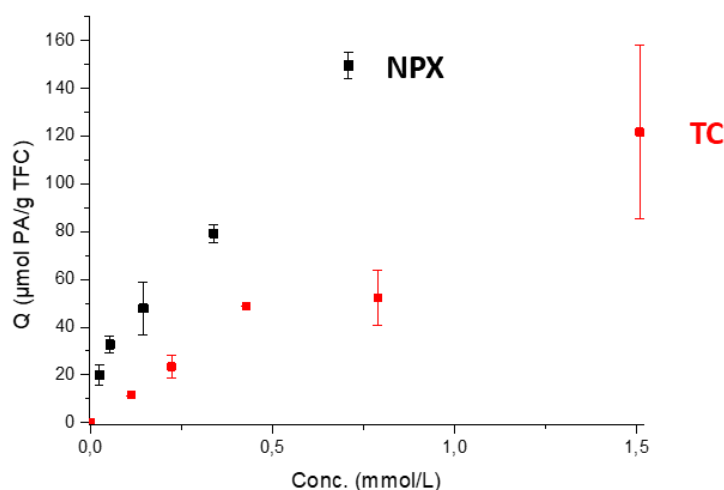


Figure III-21 : Isothermes d'adsorption de la tétracycline (TC) et du naproxène (NPX) sur le tissu de fibres de carbone FM 50K® à pH = 7,4 et à 22 °C.

L'analyse de ces deux « isothermes » montre que le tissu de carbone adsorbe ces 2 principes actifs en quantité assez importante avec des cinétiques d'adsorption très différentes. Dans le cas de la tétracycline, la quantité adsorbée par le tissu est de 120 μmol de TC/g de tissu pour une concentration de la solution initiale de tétracycline de 1,5 mmol/L. Dans le cas de l'apatite, elle est de 60 μmol de

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

TC/g d'apatite pour une concentration de la solution initiale de tétracycline de 1,6 mmol/L (2 fois supérieure). Dans le cas du naproxène, et contrairement à l'adsorption sur apatite, il y a une forte adsorption du naproxène par le tissu : la quantité adsorbée par le tissu est de 150 μmol de NPX/g de tissu pour une concentration de la solution initiale de naproxène de 0,7 mmol/L. Dans le cas de l'apatite, elle est de 3 μmol de NPX/g d'apatite pour une concentration de la solution initiale de naproxène de 1 mmol/L. Par ailleurs, les quantités adsorbées au bout d'une heure sont loin de la quantité qu'il aurait été possible d'adsorber à l'équilibre. Les résultats d'adsorption sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau III-4 : Quantités de tétracycline (TC) et de naproxène (NPX) adsorbées par l'apatite biomimétique et le tissu de carbone FM 50K® en suivant le protocole 1.

PA	TC 800 ppm 1,8 mmol/L	NPX 250 ppm 1,1 mmol/L
Q ads (μmol PA/g apatite)	60	3
Q ads (μmol PA/g FM 50K®)	120	150
<i>Transposition sur un matériau hybride composé à 94 mg de FM 50K® et à 6 mg de CDA</i>		
Q ads (μmol PA/6 mg CDA)	0,36	0,02
Q ads (μmol PA/94 mg FM 50K®)	11,28	14,10

Le naproxène, malgré sa très faible adsorption sur l'apatite dans nos conditions opératoires, n'est pas exclu de cette étude car il est facilement adsorbé par le tissu de carbone FM 50K®. Le tissu de carbone montre, en effet, une capacité d'adsorption importante pour de faibles concentrations en naproxène. La tétracycline est également adsorbée par le tissu de carbone. Cependant, dans nos conditions opératoires, la tétracycline a une capacité d'adsorption très proche (mais plus faible) que celle du naproxène et surtout à plus forte concentration.

Un résumé des principaux résultats obtenus sur l'adsorption de la tétracycline et du naproxène sont présentés sur la Figure III-22.

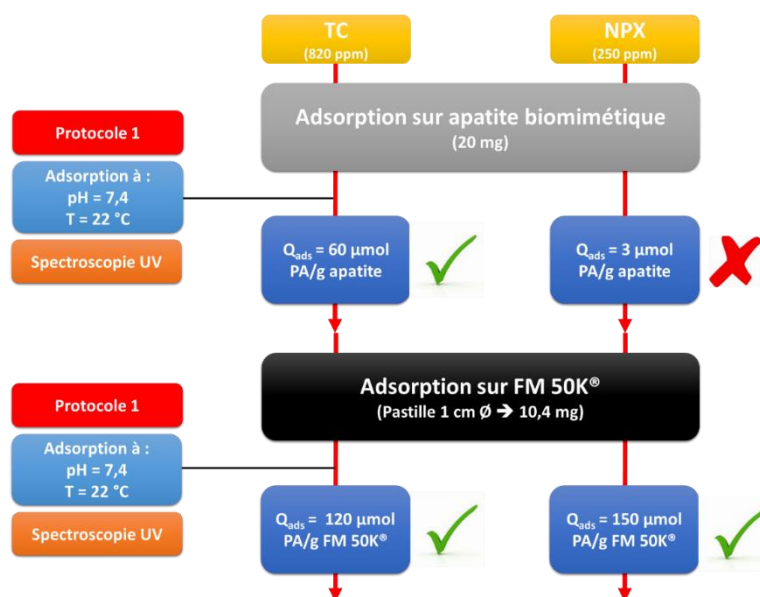


Figure III-22 : Bilan des adsorptions de la tétracycline (TC) et du naproxène (NPX) sur une poudre d'apatite biomimétique et le tissu de fibres de carbone FM 50K®.

B.4.2.2. Adsorption de l'aspirine

Pour rappel, l'aspirine est le principe actif sélectionné au début de cette expérience pour être adsorbé dans la porosité du tissu de fibres de carbone. Nous avons donc choisi un protocole d'adsorption spécifique et adapté à cet adsorbant (protocole 2). C'est pourquoi l'adsorption de l'aspirine sur le tissu de fibres de carbone, puis sur le matériau hybride, suit un protocole différent de celui jusqu'alors réalisé pour les deux autres principes actifs (tétracycline et naproxène).

Avant d'analyser les données de l'adsorption de l'aspirine, la quantité théorique pouvant être adsorbée dans la porosité du tissu de carbone peut être calculée. Pour ce faire, le volume théorique de la molécule d'aspirine est estimé grâce au logiciel ChemSketch. Le volume hydrodynamique correspond au volume du parallélépipède pouvant contenir la molécule d'aspirine. Dans le Tableau III-5 sont répertoriées, en plus du volume hydrodynamique, les principales caractéristiques de l'aspirine, c'est-à-dire sa masse molaire (M , g/mol), sa solubilité (S , mg/L) et sa polarité ($\text{Log } D$) à pH de 5,5. Il est important de préciser que les calculs prennent seulement en compte le volume hydrodynamique de la molécule d'aspirine et le volume microporeux du tissu de carbone FM 50K® (soit $0,41 \text{ cm}^3/\text{g}$). Le calcul ne prend en compte, ni la possible interaction entre deux molécules d'aspirine, ni l'effet possible de la chimie de surface du tissu de carbone sur l'adsorption. On peut signaler que le pH_{CN} du tissu de fibres de carbone FM 50K® est de 7,8, il possède donc une surface légèrement chargée positivement en solution à pH 7,4.

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

Tableau III-5 : Caractéristiques théoriques de l'adsorption de l'aspirine (AA) à partir du logiciel ChemSkeetch.

M (g/mol)	pK_A 25°C	S, H₂O 25°C (mg/L)	Log D, pH = 5,5	V_{hydrodynamique} (Å³)	V_{hydrodynamique} (Å³)	V_{hydrodynamique} (Å³)
				mini	max	moy
180,16	3,49	4600	-0,84	139	293	155

Le volume hydrodynamique minimum donné par le logiciel ne prend pas en compte les orbitales, par conséquent, la quantité de molécules qu'il est possible d'adsorber dans le volume poreux disponible peut être surestimée. Expérimentalement, les molécules d'aspirine s'adsorbent à l'état solvaté, c'est à dire que le volume occupé est bien plus grand que le volume net des adsorbats. Lorsque deux molécules solvatées vont s'adsorber dans la porosité du tissu de carbone FM 50K®, cela se fera alors à plus grande distance. Ce qui laisse à penser que l'adsorption expérimentale des molécules d'aspirine se situera entre les valeurs théoriques correspondant aux volumes moyen et maximum. Toutes les valeurs de quantités théoriques adsorbées sont regroupées dans le Tableau III-6.

Tableau III-6 : Quantité d'aspirine (AA) adsorbée par le tissu de fibres de carbone – valeurs théoriques calculées.

V_{hydrodynamique} (Å³)	Q_{ads} (mmol/g)	Q_{ads} (mg/g)
139	4,9	883
293	2,3	414
155	4,4	792

Les expériences d'une durée de 72 heures sont toutes triplées et toutes les 24 heures la solution saturée en aspirine est renouvelée, comme décrit dans le protocole 2. Dans un premier temps, la cinétique est réalisée (Figure III-23). Elle confirme une quantité d'aspirine adsorbée maximum après 72 h. Les quantités adsorbées lors des 3 premiers cycles sont rassemblées dans le Tableau III-7 et comparées aux valeurs théoriques.

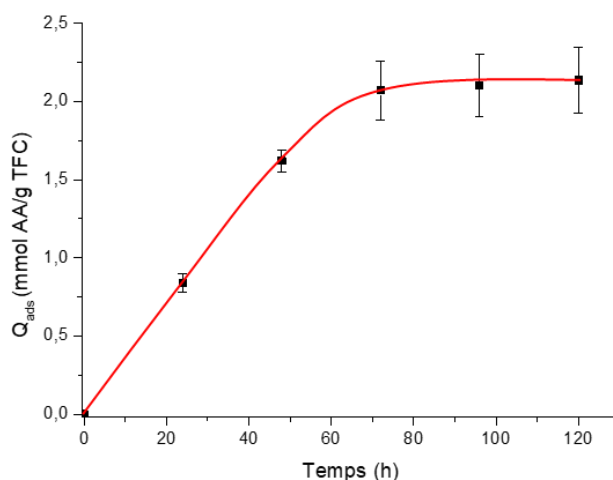


Figure III-23 : Cinétique d'adsorption de l'aspirine (AA) sur le tissu de carbone FM 50K®.

Après trois cycles de 72 h, environ 375 mg d'aspirine sont adsorbés par g de tissu de carbone (FM 50K®). Les résultats expérimentaux se rapprochent des résultats théoriques et notamment de la quantité adsorbée pour le volume hydrodynamique maximum (414 mg/g).

Tableau III-7 : Quantité d'aspirine (AA) adsorbée par le tissu de carbone– valeurs expérimentales.

Cycle	Q_{ads} (mmol/g)	Q_{ads} (mg/g)
1	0,84 ± 0,06	152 ± 11
2	0,78 ± 0,01	140 ± 2
3	0,5 ± 0,1	81 ± 21
Total	2,1 ± 0,2	373 ± 33

Le tissu de fibres de carbone FM 50K® adsorbe une grande quantité d'aspirine. Actuellement, les différents biomatériaux contenant de l'aspirine, utilisés comme comblement pour la régénération osseuse, sont dopés à hauteur de plusieurs centaines de μg [137]. A titre d'exemple, les matériaux hybrides implantés chez le rat lors de cette étude (Cf. Chapitre V.) pourraient contenir jusqu'à 2 mg d'aspirine dans ces conditions d'adsorption.

B.4.3. Adsorption de principes actifs sur le matériau hybride

B.4.3.1. Introduction

Avant d'étudier l'adsorption des principes actifs sur le matériau hybride, le schéma de la Figure III-24 présente un bilan de l'ensemble des expériences d'adsorption de principes actifs qui ont été réalisées.

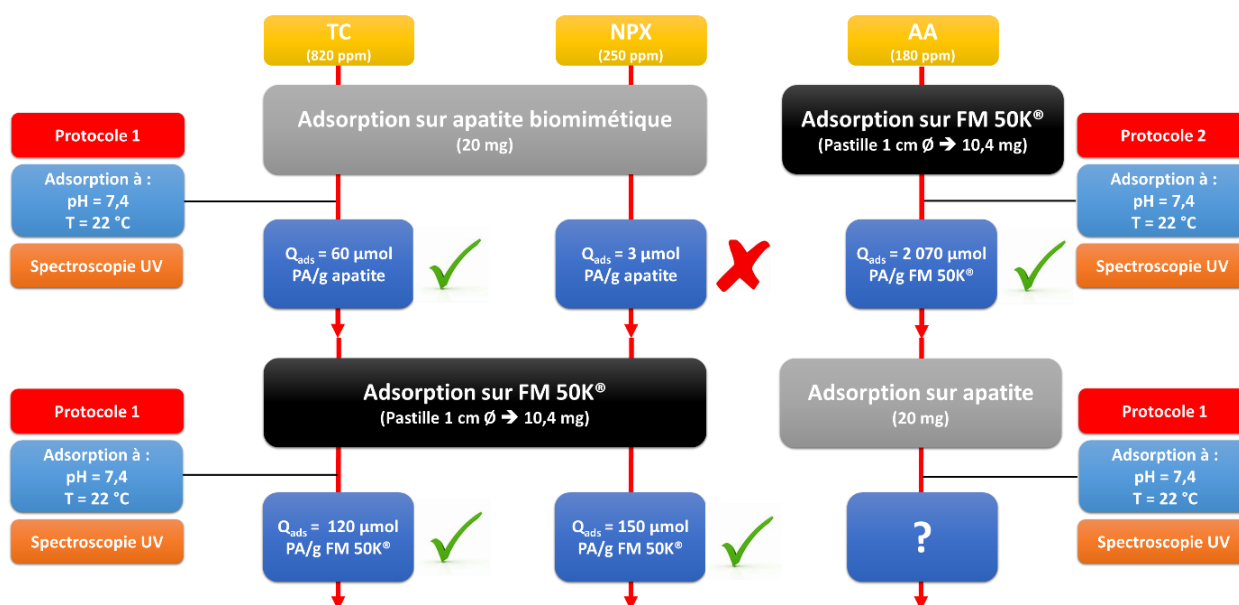


Figure III-24 : Bilan des adsorptions de la tétracycline (TC), du naproxène (NPX) et de l'aspirine (AA) sur une poudre d'apatite biomimétique et sur le tissu de fibres de carbone FM 50K®.

Les différentes expériences ont permis de montrer la possibilité d'adsorber la tétracycline sur l'apatite biomimétique et sur le tissu de carbone FM 50K®, dans nos conditions expérimentales. Elles ont également montré que le naproxène, contrairement à la tétracycline, ne s'adsorbe que très faiblement à la surface de l'apatite biomimétique. Néanmoins, le naproxène s'adsorbe également très bien sur le tissu de fibres de carbone FM 50K®. Concernant le dernier principe actif étudié, l'aspirine, elle s'adsorbe en très grande quantité sur le tissu de carbone FM 50K®.

Pour rappel, le but de cette étude est d'adsorber un principe actif sur le revêtement de CDA carbonatée déposé en surface du matériau hybride et un second principe actif dans la porosité du tissu de carbone. La tétracycline peut s'adsorber sur les deux constituants du matériau hybride, tandis que le naproxène ne s'adsorbe que dans le tissu de carbone. L'aspirine peut également s'adsorber sur le tissu de carbone, mais peut-être aussi sur le revêtement de CDA carbonatée.

B.4.3.2. Adsorption de l'aspirine sur le matériau hybride

La possibilité qu'un principe actif soit adsorbé par les deux constituants du matériau hybride a été démontrée dans le cas de la tétracycline. La possibilité que l'aspirine soit également adsorbée par les deux constituants du matériau hybride, ce qui n'avait pas été envisagée initialement, doit être discutée à cette étape de l'étude. Afin de répondre à cette interrogation, la cinétique d'adsorption de l'aspirine a été réalisée. Une seconde interrogation pouvant être également discutée concerne l'accessibilité des principes actifs à la porosité du tissu de fibres de carbone recouvert du revêtement de CDA. Pour ce faire, la caractérisation texturale du matériau hybride a été réalisée avant de réaliser l'adsorption de principes actifs.

a) Adsorption de l'aspirine sur l'apatite

Une solution d'aspirine à une concentration de 180 ppm (10^{-3} M), à pH 7,4 et à température ambiante est préparée. Sa cinétique d'adsorption sur la poudre d'apatite utilisée comme référence est suivie pendant une durée de 2 heures, en suivant le protocole 1. Le dosage par UV-Visible est fait à 277 nm (maximum d'absorption) et est en référence à une courbe d'étalonnage établie entre 0 et 180 mg/L d'AA (coefficient de corrélation $r^2 = 0,996$).

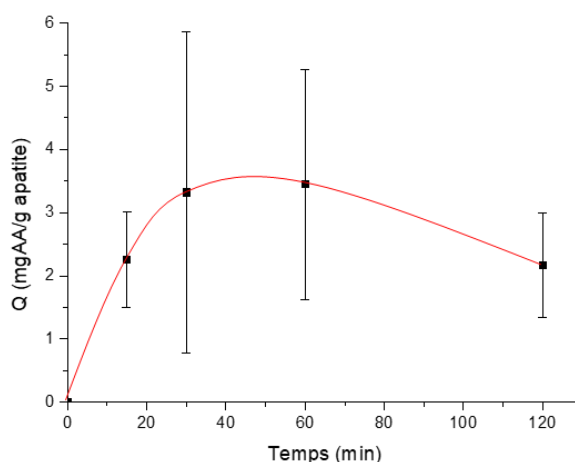


Figure III-25 : Cinétique d'adsorption de l'aspirine (AA) sur la poudre d'apatite biomimétique de référence, à pH = 7,4 et à 22 °C.

La cinétique d'adsorption de l'aspirine (Figure III-25) montre une rapide saturation de la quantité adsorbée. La quantité d'aspirine adsorbée est très faible et correspond à 2,7 mg d'aspirine/g d'apatite après 2 h. Après 30 min d'adsorption, un plateau semble atteint et après 60 min, la quantité d'aspirine adsorbée décroît. Compte tenu du manque de mesures intermédiaires (entre 30 et 60 min), il est difficile de conclure à une réversibilité partielle de l'adsorption traduisant une adsorption impliquant des sites de faible énergie. Peu de conclusions peuvent être tirées de cette cinétique, si ce n'est de

dire que les quantités d'aspirine adsorbées restent très faibles (avec des barres d'erreurs très grandes), surtout si elles sont comparées à celles de la tétracycline (5 fois inférieure).

Un récapitulatif des résultats d'adsorption des trois principes actifs étudiés sur les différents constituants du matériau hybride, selon le protocole utilisé, est donné sur la Figure III-26.

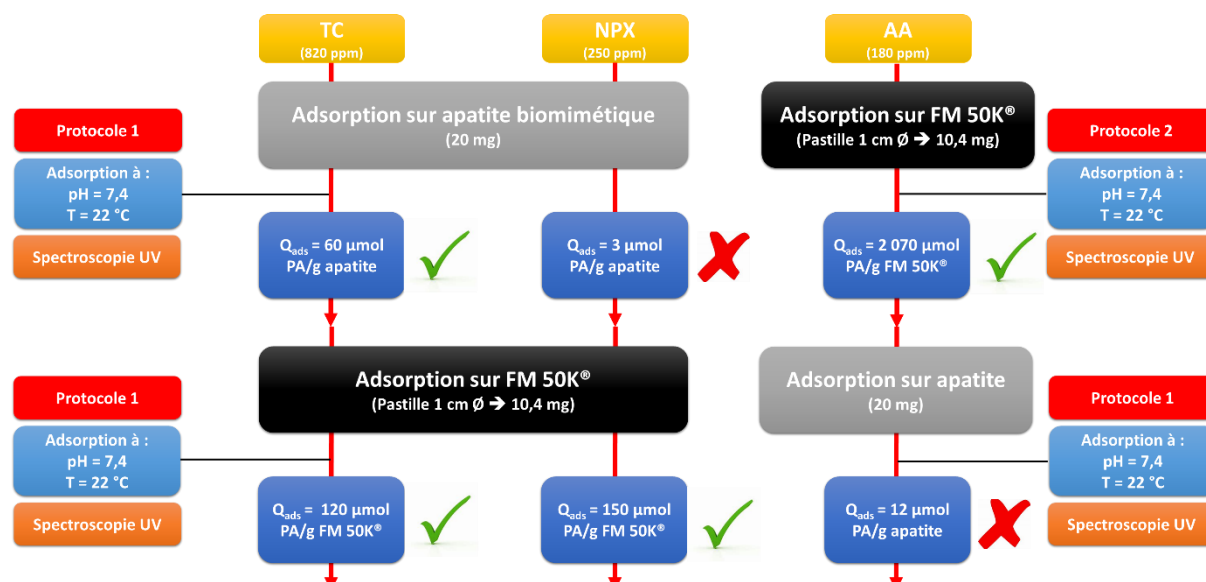


Figure III-26 : Bilan des adsorptions de la tétracycline (TC), du naproxène (NPX) et de l'aspirine (AA) sur une poudre d'apatite biomimétique et sur le tissu de fibres de carbone FM 50K®.

L'aspirine, tout comme le naproxène, ne s'adsorbent que très faiblement sur l'apatite biomimétique. Ils apparaissent, dans nos conditions expérimentales, comme de « mauvais » candidats pour être adsorbés sur le revêtement de CDA carbonatée déposé en surface du tissu de carbone. Néanmoins, l'aspirine et le naproxène peuvent être adsorbés dans la porosité du tissu de fibres de carbone, sans qu'il y ait compétition avec une absorption de ces deux molécules sur l'apatite. L'adsorption de ces deux principes actifs par le matériau hybride devrait donc pouvoir être ciblée. Afin de le vérifier, l'adsorption de l'aspirine par le matériau hybride est réalisée et les résultats sont confrontés à ceux obtenus sur le tissu de carbone FM 50K®.

b) Caractéristiques texturales du matériau hybride

Avant d'étudier l'adsorption de principes actifs sur le matériau hybride, il est intéressant de comparer les caractéristiques du matériau hybride et du tissu de carbone « brut », sans revêtement de CaP. Les caractérisations par adsorption d'azote à 77 K du tissu de carbone FM 50K® et du matériau hybride ont été réalisées et présentées dans le chapitre précédent. Les principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau III-8.

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

Tableau III-8 : Caractérisation du tissu de fibres de carbone FM 50K® et du matériau hybride FM 50K®+CaP par adsorption d'azote à 77 K.

TFC	S_{BET} (m ² /g)	V_{MESO} (N ₂ , DFT) (cm ³ /g)	V_{MICRO} (N ₂ , DFT) (cm ³ /g)	V_{MICRO} (N ₂ , DR) (cm ³ /g)
FM 50K®	898	0,07	0,41	0,41
FM 50K®+CaP	980	0,10	0,45	0,46

Pour rappel, les résultats d'adsorption d'azote à 77 K apportent des données concernant la surface spécifique et la répartition des volumes mésoporeux et microporeux. Les différences entre les deux matériaux, le tissu de carbone sans revêtement et le matériau hybride, sont peu significatives, montrant que la porosité du matériau hybride aux échelles nanométriques reste globalement inchangée, échelle de porosité correspondant au phénomène d'adsorption des principes actifs. Le matériau hybride possède donc les mêmes aptitudes vis-à-vis de l'adsorption de principes actifs que le tissu de fibres de carbone.

c) Étude de l'adsorption de l'aspirine sur le tissu de carbone et sur le matériau hybride

L'adsorption de l'aspirine sur le matériau hybride est réalisée dans les mêmes conditions que celle réalisée sur le tissu de carbone, c'est-à-dire une adsorption en 3 cycles de 24 h (protocole 2). Les résultats d'adsorption par le matériau hybride FM 50k®+CaP sont comparés à ceux du tissu de carbone dans le Tableau III-9.

Tableau III-9 : Résultats d'adsorption de l'aspirine (AA) par le tissu de fibres de carbone FM 50K® et le matériau hybride FM 50K®+CaP.

Echantillons	Q_{ads} (mmol/g)	Q_{ads} (mg/g)
Tissu de carbone FM 50K®	2,1 ± 0,2	373 ± 33
Tissu de carbone FM 50K®+CaP	2,08 ± 0,05	375 ± 8

Dans nos conditions opératoires, les adsorptions de l'aspirine par le matériau hybride et par le tissu de fibres de carbone sont similaires. Ceci est dû au fait que les deux matériaux ont les mêmes caractéristiques texturales, en termes d'accessibilité aux volumes poreux (micropores et mésopores) et de la très faible adsorption de l'aspirine par l'apatite.

B.4.3.3. Adsorption de l'aspirine et de la tétracycline au sein des 2 constituants du matériau hybride

Notre objectif est de tirer parti de la spécificité de notre matériau hybride et de ses deux constituants pour les « doper » par adsorption avec deux principes actifs différents, chacun ayant sa spécificité et sa fonctionnalité. Dans les parties précédentes, il a été démontré que les trois principes actifs possèdent une affinité avec le tissu de fibres de carbone, mais que seule la tétracycline possède une forte affinité avec l'apatite. Ces résultats nous ont conduits à étudier les capacités d'adsorption de deux nouveaux matériaux hybrides :

- le premier matériau hybride, il est constitué du tissu de carbone FM 50K®, qui sera « dopé » avec l'aspirine, sur lequel a été déposé le revêtement de CDA, qui sera « dopé » avec la tétracycline (**FM 50K®-AA + CaP-TC**),
- le second matériau hybride, il est constitué du tissu de carbone FM 50K®, qui sera « dopé » avec le naproxène, sur lequel a été déposé le revêtement de CDA, qui sera « dopé » avec la tétracycline (**FM 50K®-NPX + CaP-TC**).

Dans cette partie, le matériau hybride dopé FM 50K®-AA + CaP-TC est étudié. Pour ce faire, dans une première étape, le matériau hybride est saturé en aspirine en suivant le protocole 2, c'est-à-dire 3 cycles d'adsorption de 24 h d'une solution d'aspirine à 180 ppm, à pH neutre et à température ambiante. Un autre cycle de 24 h est ajouté afin de s'assurer de la saturation en aspirine dans ces conditions. Dans une seconde étape, un cinquième cycle est réalisé mais cette fois-ci, la solution contient à la fois de l'aspirine (de concentration 180 ppm) et à la fois de la tétracycline (de concentration 820 ppm). Les quantités d'aspirine et de tétracycline adsorbées (Q_{ads}) sont ensuite mesurées (Tableau III-10) et analysées en comparaison avec les résultats précédents (Q_{ads} attendue) donnant la quantité d'aspirine adsorbée par le tissu de carbone FM 50K® et la quantité de tétracycline adsorbée par le revêtement de CDA carbonatée.

Tableau III-10 : Résultats d'adsorption des deux principes actifs, aspirine (AA) et tétracycline (TC) par le matériau hybride FM 50K® + CaP.

	AA		TC	
	Q_{ads} (mmol/g)	Q_{ads} (mg/g)	Q_{ads} (mmol/g)	Q_{ads} (mg/g)
	FM 50K®		Apatite	
FM 50K®-AA + CaP-TC (Q_{ads} attendue)	2,08 ± 0,05	375 ± 8	0,06 ± 0,01	27 ± 3
	FM 50K® + CaP			
FM 50K®-AA + CaP-TC (Q_{ads} mesurée)	2,1 ± 0,1	370 ± 19	0,07 ± 0,01	33 ± 3

Chapitre III. Dopage par substitution et/ou par adsorption au sein des constituants du matériau hybride

Dans nos conditions opératoires, la quantité d'aspirine en solution est toujours stable au cours des deux cycles d'adsorption supplémentaires. Le matériau hybride est donc totalement saturé en aspirine et aucun relargage de ce principe actif n'est détecté. La tétracycline, adsorbée dans une seconde étape, est également adsorbée par le matériau hybride. Cette quantité adsorbée correspond à la quantité de tétracycline adsorbée sur apatite. On en déduit que la tétracycline adsorbée par le matériau hybride serait uniquement adsorbée par le revêtement de CDA, à sa surface. Ce qui laisse présager la formation du matériau hybride FM 50K®-AA + CaP-TC.

A ce stade de l'étude, aucune caractérisation de ce matériau n'a été réalisée afin de confirmer cette déduction. Néanmoins, les deux principes actifs (aspirine et tétracycline) sont tous deux adsorbés par le matériau hybride, on subodore une répartition : l'aspirine adsorbée par le tissu de fibres de carbone FM 50K® et la tétracycline adsorbée en surface du revêtement de CDA, ce qui reste à confirmer.

Les résultats de l'adsorption de deux principes actifs différents sur les deux constituants du matériau hybrides sont présentés sur la Figure III-27.

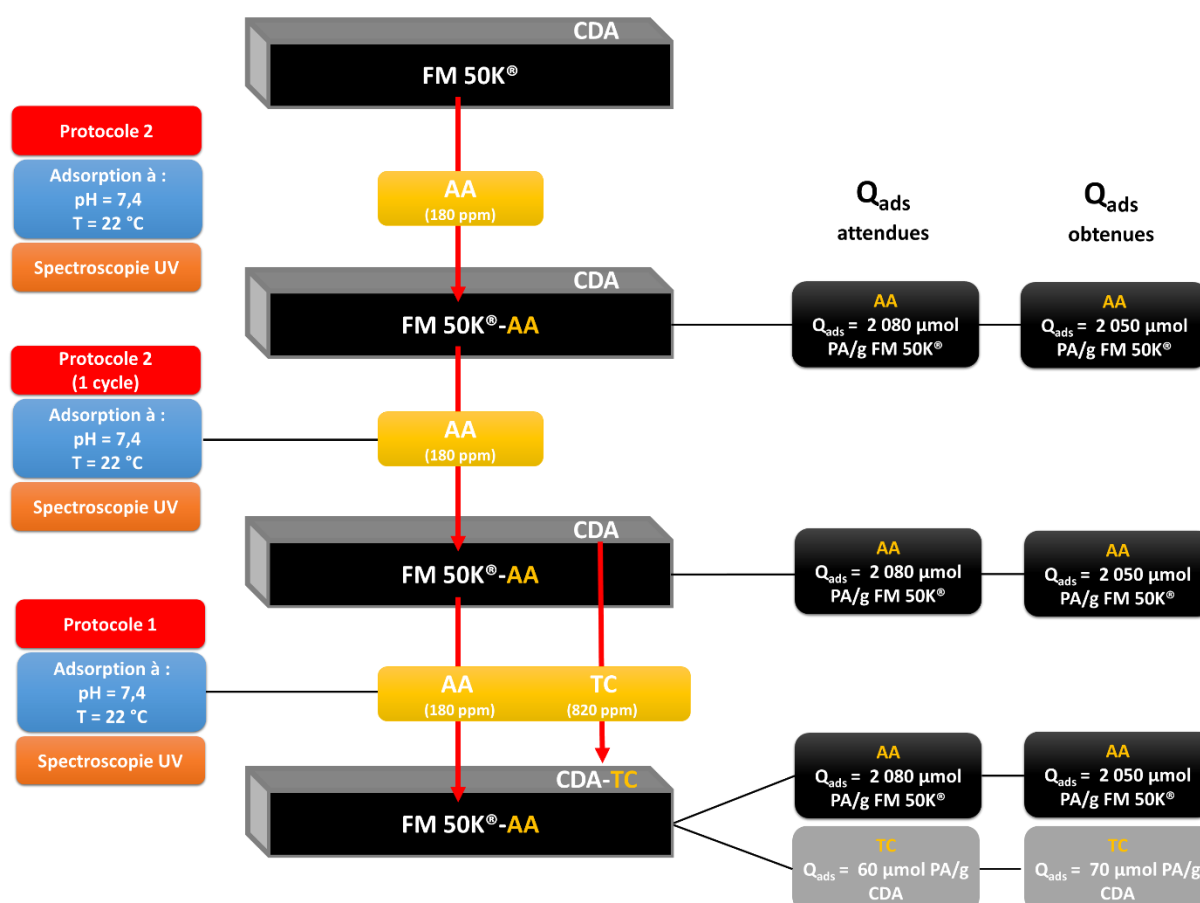


Figure III-27 : Bilan des adsorptions ciblées de l'aspirine (AA) et de la tétracycline (TC) dans les deux constituants du matériau hybride, le tissu de carbone FM 50K® et le revêtement de CDA.

B.4.4. Réversibilité de l'adsorption des principes actifs par le tissu de carbone et sur l'apatite biomimétique

L'adsorption des trois principes actifs par les constituants du matériau hybride ayant été étudiée, il est important de s'intéresser au relargage de ces principes actifs pour chacun de ces constituants. Lorsque le matériau hybride est dopé avec deux principes actifs, il est important de connaître leur processus de libération. Pour ce faire, une étude préliminaire de désorption des principes actifs par le tissu de fibres de carbone et la poudre d'apatite a été réalisée. L'étude du relargage de la tétracycline et du naproxène par ces deux matériaux consiste à réaliser une désorption par dilution. Les isothermes d'adsorption-désorption sont représentées sur la Figure III-28.

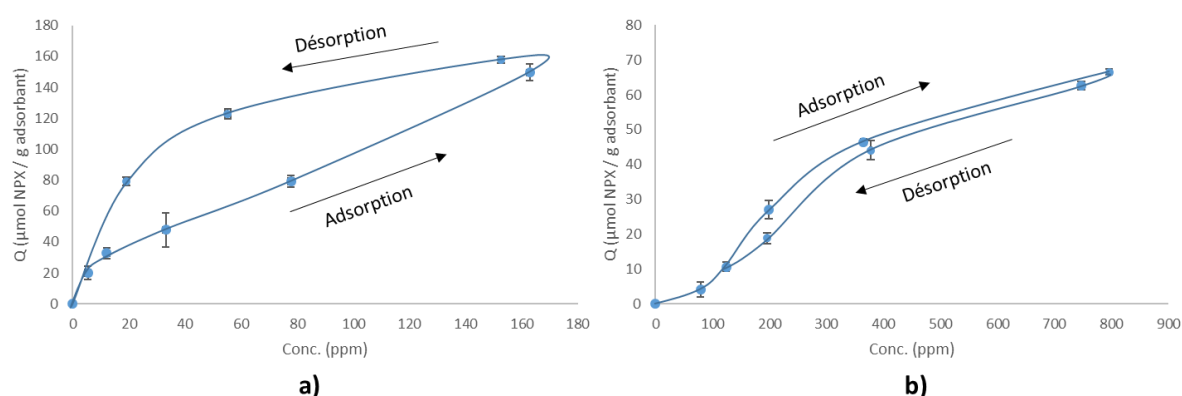


Figure III-28 : Cycle adsorption-désorption : a) Naproxène sur tissu de fibres de carbone FM 50K® et b) Tétracycline sur apatite biomimétique.

La Figure III-28 illustre très clairement deux régimes différents d'adsorption/désorption des principes actifs adsorbés par le tissu de fibres de carbone et l'apatite. Dans le cas du tissu de carbone (Figure III-28 a)), le cycle d'adsorption/désorption montre une importante hystérésis. Le fait que l'hystérésis soit large décrit un processus de désorption qualitativement très faible par rapport à l'adsorption et ceci montre que le système naproxène-tissu de fibres de carbone reste hors équilibre (non réversible). Au contraire, dans le cas de l'apatite biomimétique (Figure III-28 b)), le processus d'adsorption/désorption est réversible.

Elaborer un matériau hybride avec deux principes actifs différents s'avère être une combinaison tout à fait intéressante, surtout lorsque chaque constituant du matériau hybride peut imposer une vitesse de relargage différente du principe actif associé. En effet, l'étude préliminaire réalisée a montré que la tétracycline se désorbait rapidement de la poudre d'apatite biomimétique, alors que la cinétique de désorption du naproxène adsorbée par le tissu de carbone était ralentie dans un premier temps, puis s'accélérait dans un second temps.

B.5. Discussion

Dans la deuxième partie de ce chapitre, la démarche a été d'étudier l'adsorption de principes actifs (tétracycline, naproxène et aspirine), dans un premier temps, au sein de chaque constituant du matériau hybride considéré individuellement, puis, dans un second temps, au sein du matériau hybride considéré dans sa globalité, mais en ciblant l'adsorption d'un principe actif au sein de chaque constituant. En complément de ce travail sur les cinétiques et les isothermes d'adsorption des principes actifs, une étude préliminaire a été réalisée, focalisée sur le mode de libération de deux principes actifs, la tétracycline et le naproxène, qui ont été préalablement adsorbés, respectivement, sur la poudre d'apatite biomimétique et sur le tissu de fibres de carbone. Cette démarche globale résulte de discussions, puis d'une collaboration menée avec le CIRIMAT, où C. Drouet et collaborateurs ont montré l'intérêt de principes actifs tels que la tétracycline (un antibiotique à très large spectre) pour sa capacité d'adsorption à la surface d'un substrat d'apatite [73]. Cette étude nous a incités à envisager d'étudier l'adsorption de ce principe actif, mais également du naproxène (un antalgique et anti-inflammatoire non-stéroïdien), au sein du revêtement d'hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) déposé en surface du tissu de fibres de carbone. Pour ce faire, dans une première étape, une étude préliminaire a consisté à étudier l'adsorption de ces deux molécules sur une poudre d'apatite biomimétique ayant des caractéristiques physico-chimiques très similaires à celles du revêtement de CDA. L'adsorption de l'aspirine sur la poudre d'apatite a également été réalisée.

Par ailleurs, le tissu de fibres de carbone est reconnu pour ses remarquables capacités d'adsorption. Des tissus, aux caractéristiques texturales et de chimie de surface assez proches de celles du tissu FM 50K[®] utilisé dans notre étude, ont été étudiés et utilisés à l'ICMN pour l'adsorption de polluants, en particulier médicamenteux (tels que l'ibuprofène, la carbamazépine, l'ofloxacine, le diclofenac, ...) en milieu aqueux pour des problématiques environnementales [5]. Il nous a donc semblé important de s'intéresser à l'étude des cinétiques d'adsorption des trois principes actifs (tétracycline, naproxène et aspirine) au sein du tissu de carbone FM 50K[®] avant de se focaliser sur l'adsorption de principes actifs au sein du matériau hybride considéré dans sa globalité.

Le choix des principes actifs à adsorber au sein du matériau hybride a été effectué en se basant sur les performances d'adsorption des trois principes actifs au sein du revêtement de CDA et du tissu de carbone FM 50K[®].

Les résultats des cinétiques d'adsorption de la tétracycline, du naproxène et de l'aspirine sur une poudre constituée de nanocristaux d'apatite biomimétique (protocole 1) ont montré la possibilité d'adsorber la tétracycline à hauteur de 60 μmol par gramme d'apatite. Les résultats sont cohérents avec ceux trouvés dans la littérature (à hauteur de 80 μmol par gramme). A contrario, l'adsorption du

naproxène sur cette même poudre d'apatite conduit à des quantités adsorbées bien plus faibles, de l'ordre 3 μmol par gramme d'apatite. Quant à l'aspirine, son adsorption est à hauteur de 12 μmol par gramme, soit 5 fois moins importante que celle de la tétracycline. Nous en concluons que, dans nos conditions opératoires, la tétracycline est un bon candidat pour pouvoir être adsorbée sur le revêtement de CDA du matériau hybride.

Nous avons ensuite étudié l'adsorption de ces trois principes actifs sur le tissu de fibres de carbone. Les isothermes montrent une bonne adsorption des deux premiers principes actifs par le tissu de carbone (tétracycline et naproxène). Dans nos conditions expérimentales (protocole 1), la tétracycline présente une adsorption de l'ordre de 120 μmol , tandis que le naproxène présente une adsorption de 150 μmol par gramme de tissu. L'adsorption de l'aspirine par le tissu de fibres de carbone a également été réalisée (protocole 2). Les résultats ont montré la possibilité d'adsorber une grande quantité d'aspirine, soit au maximum environ 2000 μmol par gramme de tissu.

Ce travail a montré que la tétracycline peut être adsorbée par les deux constituants du matériau hybride. Une compétition entre les deux adsorptions pourrait donc avoir lieu lors de l'adsorption de ce principe actif dans le matériau hybride. Quant au naproxène, il n'est adsorbé, de façon quantitative, que par le tissu de carbone. Dans l'étude de l'adsorption ciblée des principes actifs au sein de chaque constituant du matériau hybride, le naproxène s'avère être un candidat potentiellement intéressant. Aux vues des différents résultats d'adsorption, il s'avère que l'aspirine est également un principe actif très intéressant à prendre en considération pour son adsorption par le tissu dans le matériau hybride. D'autant plus que, lorsque nous avons caractérisé la microporosité du matériau hybride afin de la comparer à celle du tissu de fibres de carbone brut, il a été montré que l'accessibilité à la microporosité n'était pas affectée par la présence du revêtement. Effectivement, l'adsorption de l'aspirine par le matériau hybride est identique à celle par le tissu (Cf. Tableau III-9).

En ce qui concerne le matériau hybride et l'adsorption de deux principes actifs différents, l'un étant adsorbé dans le tissu, l'autre étant adsorbé dans le revêtement d'hydroxyapatite déficiente en calcium et carbonatée (CDA), deux matériaux hybrides dopés ont été envisagés (Figure III-29) :

- celui où l'aspirine est adsorbée au sein du tissu de carbone FM 50K[®] et où la tétracycline est adsorbée en surface du revêtement de CaP : **FM 50K[®]-AA + CaP-TC**,
- celui où le naproxène est adsorbé au sein du tissu de carbone FM 50K[®] et où la tétracycline est adsorbée au sein du revêtement de CaP : **FM 50K[®]-NPX + CaP-TC**.



Figure III-29 : Représentation des deux matériaux hybrides dopés envisagés à la suite de cette étude.

Lors de ce travail, nous avons étudié uniquement le premier cas (Figure III-29 a)). L'adsorption de l'aspirine est tout d'abord réalisée dans le tissu de carbone, puis celle de la tétracycline en surface du revêtement de CDA. Le dosage des principes actifs est réalisé après chaque étape afin d'obtenir les quantités exactes adsorbées par le matériau hybride. Les quantités d'aspirine et de tétracycline adsorbées par les constituants du matériau hybride sont en cohérence avec celles adsorbées par les constituants considérés individuellement. On en conclut que l'objectif visé est atteint : l'aspirine s'adsorbe dans le tissu de fibres de carbone FM 50K® et la tétracycline s'adsorbe en surface du revêtement de CDA.

En complément de ces études de cinétiques d'adsorption, une étude préliminaire de relargage des principes actifs par désorption a été réalisée. Le relargage de la tétracycline, préalablement adsorbée sur la poudre d'apatite et celui du naproxène, préalablement adsorbé au sein du tissu de fibres de carbone, ont été réalisés. Les courbes de désorption montrent deux modes différents de libération des molécules actives, avec une désorption réversible avec une cinétique rapide dans le cas de la tétracycline adsorbée sur la poudre d'apatite biomimétique, et une désorption avec une cinétique ralentie puis qui s'accélère dans le cas du naproxène adsorbé au sein du tissu de fibres de carbone. Le fait que chaque constituant du matériau hybride puisse imposer sa cinétique de libération apparaît très intéressant d'un point de vue applicatif.

La faisabilité d'élaborer un matériau hybride avec deux principes actifs différents et ciblés a été démontrée. Disposer d'un tel biomatériau permet d'envisager une libération rapide d'un principe actif, celui présent au sein du revêtement de CDA, à titre d'exemple ce pourrait être un antibiotique (tétracycline) et une seconde libération plus lente d'un autre principe actif, celui présent au sein du tissu, qui pourrait être un anti-inflammatoire (aspirine ou naproxène). Ce type de biomatériau permettrait de diminuer les risques d'infections et d'inflammations post-opératoires et dans le cas de l'aspirine, d'améliorer en plus, la régénération osseuse [137].

Dans la suite de ce travail, des tests *in vitro* ont été mis en place afin d'évaluer la biocompatibilité des matériaux hybrides dopés en principes actifs (Cf. Chapitre IV.).

Chapitre IV. Evaluation biologique

Etude in vitro

Sommaire

Introduction	139
A. Matériels et méthodes	141
A.1. Matériaux utilisés	141
A.2. Culture des HOST sur les matériaux	143
A.3. Différenciation ostéoclastique des monocytes sur les matériaux	144
A.4. Tests biologiques	144
A.4.1. « The Live / Dead Cell Double Staining »	144
A.4.1.1. Principe	144
A.4.1.2. Méthodologie	144
A.4.2. « XTT Cell Proliferation Assay »	145
A.4.2.1. Principe	145
A.4.2.2. Méthodologie	145
A.4.3. Tartrate Resistant Acide Phosphatase (TRAP)	145
A.4.3.1. Principe	145
A.4.3.2. Méthodologie	146
B. Résultats	146
B.1. Choix du tissu de fibres de carbone	146
B.2. Caractérisation des propriétés d'adsorption des tissus de carbone	148
B.2.1. Adsorption des molécules du milieu de culture	149
B.2.2. Adsorption du formazan	149
B.3. Effets des matériaux sur la viabilité et la prolifération des HOST	150
B.3.1. Viabilité des HOST en périphérie des matériaux	150
B.3.2. Viabilité des HOST à la surface des matériaux	153
B.3.3. Effet des matériaux sur la prolifération cellulaire	155
B.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des cellules HOST à la surface des matériaux hybrides	157
B.5. Effet biologique d'un matériau hybride FM 50K®+0Sr-CaP dopé en principes actifs (PA)	158
B.5.1. Effet des PA sur la viabilité des HOST	158
B.5.2. Effet des PA sur la prolifération des HOST	159
C. Discussion	161

Introduction

Cette étude a pour objectif de développer de nouveaux biomatériaux flexibles, biocompatibles et bio-actifs se présentant comme des tissus facilement manipulables. Ces matériaux hybrides pourraient être utilisés en chirurgie osseuse comme sorte de « pansement osseux » pour accélérer la cicatrisation de déficits osseux de petite taille ou comme traitement adjuvant de la pseudarthrose (retard de cicatrisation de fracture) par exemple.

Les tissus de fibres de carbone (TFC) sont bio-inertes, souples et possèdent une architecture poreuse multi-échelle. Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle un TFC combiné à un revêtement phosphocalcique bioactif permettrait d'obtenir un matériau hybride biocompatible qui pourrait être apposé à la surface d'un os lésé pour accélérer sa régénération. Pour rappel, l'hydroxyapatite (HAP) est une céramique du type phosphate de calcium dont la composition chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ est proche de celle de la phase minérale de l'os. L'objectif, présenté dans la première partie de ce manuscrit, était de déposer par sono-électrodéposition un revêtement de phosphates de calcium (CaP) sur un tissu de fibres de carbone. Les tissus de fibres de carbone recouverts de CaP sont nommés « matériaux hybrides ».

La sono-électrodéposition est une technique qui permet d'obtenir des revêtements contrôlés sur des substrats rugueux en solution aqueuse. Le procédé consiste à plonger le tissu de carbone (électrode de travail) dans une solution d'ions précurseurs Ca^{2+} et PO_4^{3-} . L'application d'une polarisation cathodique provoque l'électrolyse de l'eau ainsi qu'une augmentation locale du pH au niveau de l'électrode de travail. Les ions OH^- ainsi produits se combinent aux ions PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} et Ca^{2+} en un processus de co-précipitation à la surface des fibres de carbone. Le dopage du revêtement par des cations tels que le strontium (Sr^{2+}) a également été étudié.

Dans une précédente étude, il a été montré que la sono-électrodéposition est un procédé très versatile permettant d'obtenir des microtextures et structures variées de CaP [6,8]. Les revêtements de CaP sont nanocristallins et polyphasés. Selon les paramètres expérimentaux, on observe la présence d'une phase de phosphate octocalcique (OCP) et/ou d'une phase de HAP carbonatée déficitaire en calcium (CDA) sous forme de plaquettes et /ou d'aiguilles. Ces phases hydratées et carbonatées sont hautement biomimétiques (similaires aux apatites naturelles) [6–8].

Dans l'étude qui suit, le revêtement de CaP est une phase CDA faiblement carbonatée ($\leq 6\%$) et hydratée en surface sous forme de plaquettes (Cf. Partie I, Chapitre II). L'incorporation du Sr^{2+} se fait par substitution du Ca^{2+} sans modification de la morphologie ni de la microtexture. La structure des

nanocristaux est légèrement modifiée (augmentation des paramètres de la maille) en raison de la taille plus importante du Sr^{2+} (Cf. Partie I, Chapitre III).

Afin d'évaluer la biocompatibilité des TFC et des matériaux hybrides, c'est-à-dire TFC+xSr-CaP où x est le taux de Sr^{2+} dans l'électrolyte, une étude de viabilité et prolifération d'ostéoblastes humains primaires (HOST pour Human OSTeoblast) cultivés à leur contact a été réalisée. Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la formation du tissu osseux contrairement aux ostéoclastes qui le dégradent. Pour ce faire, différents tests biologiques ont été mis en place. Le premier est un test semi-quantitatif en fluorescence (Live / Dead) permettant d'observer la morphologie des cellules et leur viabilité au contact des biomatériaux. Le second est un test enzymatique (XTT) permettant de quantifier le nombre de cellules vivantes et d'en déduire la vitesse de prolifération des cellules. De plus, sachant que le strontium est décrit comme un agent inhibiteur de la différenciation et de l'activité ostéoclastique, l'influence du Sr^{2+} sur la différenciation de monocytes en ostéoclastes a été abordée [94]. Pour cela, un test plus spécifique de la fonction des ostéoclastes, l'activité « Tartrate-Resistant Acide Phosphatase » (TRAP), a été utilisé.

Tous les tests *in vitro* présentés dans cette partie ont été effectués à l'iBV (Nice), sous la direction de N. Rochet.

A. Matériels et méthodes

A.1. Matériaux utilisés

Les TFC référencés FM 50K[®] sont produits par la société Zorflex[®]. Ils sont composés de fibres de carbone lobées de 8-10 µm de diamètre ayant comme précurseur la viscose. Les fibres sont entrelacées pour former des mèches qui sont ensuite tricotées afin d'obtenir un tissu. Les revêtements de xSr-CaP à la surface du TFC sont obtenus par un procédé de sono-électrodéposition utilisant une polarisation cathodique (Figure IV-1). Hg/Hg₂SO₄ est utilisée comme électrode de référence et un panier en platine comme contre électrode. L'électrolyte consiste en un mélange de calcium nitrate tétrahydrate Ca(NO₃)₂·4H₂O, de strontium nitrate Sr(NO₃)₂ et d'ammonium dihydrogenophosphate NH₄H₂PO₄, avec un rapport Ca/P ou (Ca+Sr)/P maintenu à 1,67, avec [Ca²⁺] et [Ca²⁺ + Sr²⁺] = 5.10⁻³ mol/L à pH = 4,8 et à 70°C. Dans cette étude, différents ratio Sr/(Sr+Ca) dans l'électrolyte sont étudiés : 0, 5, et 10 % (0Sr-CaP, 5Sr-CaP, 10Sr-CaP). La polarisation cathodique de l'électrode de travail est appliquée en utilisant un potentiostat/galvanostat (BioLogic VMP-2) avec un potentiel constant (-1V/Hg/Hg₂SO₄) pendant 6 h. Une sonication est appliquée durant la polarisation afin d'obtenir un revêtement uniforme et homogène sur les fibres de carbone.

Les matériaux synthétisés et testés biologiquement dans la suite de cette étude sont les suivants :

- FM 50K[®] ↔ TFC
 - FM 50K[®]+0Sr-CaP
 - FM 50K[®]+5Sr-CaP
 - FM 50K[®]+10Sr-CaP
- } Matériaux hybrides

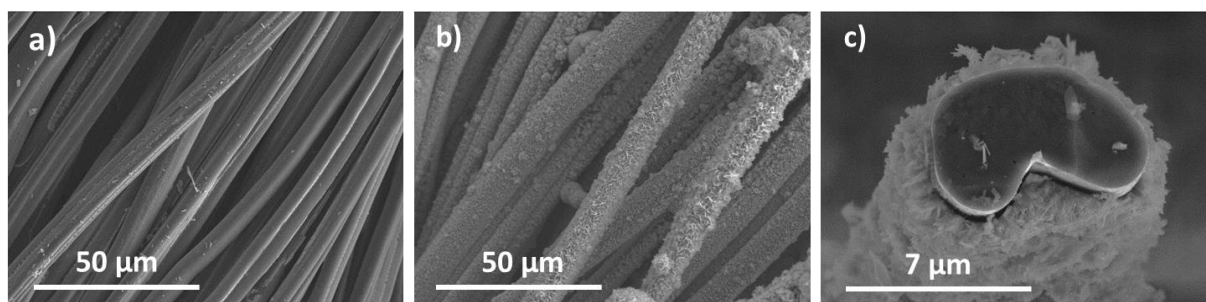


Figure IV-1 : Images MEB des différents matériaux : a) FM 50K[®], b) FM 50K[®] recouvert d'un revêtement xSr-CaP et c) coupe transverse d'une fibre FM 50K[®] lobée recouverte d'un revêtement xSr-CaP.

Le TFC et les matériaux hybrides synthétisés sont rincés à l'eau ultra pure puis séchés à l'étuve (60 °C) pendant une nuit. Ils sont ensuite découpés à l'emporte-pièce ($\varnothing$ 8 mm) avant d'être une nouvelle fois rincés et séchés pour être conditionnés dans une double papillote d'aluminium et stérilisés (chaleur sèche, 180°C, 2 h) avant d'effectuer les tests biologiques.

Afin de conférer de nouvelles propriétés à ces matériaux, différents principes actifs (PA) peuvent être adsorbés à la fois à la surface du revêtement de CaP et/ou dans la porosité du tissu de fibres de carbone (Cf. Partie I, Chapitre III). Notre hypothèse de travail était que la présence d'au moins un PA à l'intérieur du matériau permettrait d'augmenter les potentialités de ce dernier grâce à une diffusion locale, ciblée et rapide de ce principe actif. Trois PA ont été sélectionnés pour cette étude préliminaire :

- l'Aspirine (Acide acétylsalicylique) – AA, utilisée ici comme antalgique, anti-inflammatoire mais aussi comme accélérateur de la régénération osseuse selon certaines données de la littérature [137–141] ;
- le Naproxène (Naproxène de sodium) – NPX, utilisé ici comme anti-inflammatoire non stéroïdien et potentiel activateur de la régénération osseuse ;
- la Tétracycline (Tétracycline phosphate) – TC : antibiotique bactériostatique utilisée ici comme agent anti infectieux.

Nous avons émis l'hypothèse que ces agents pourraient respectivement accélérer la formation osseuse (AA), réduire la douleur (AA, NPX) et lutter contre l'infection (TC).

Les PA ont été dissous aux concentrations indiquées dans le tableau ci-dessous dans 1 L d'eau déionisée puis filtrée à 0,2 μ m pour stériliser les solutions. Des pastilles du matériau FM 50K®+0Sr-CaP de 8 mm de diamètre correspondant à une masse de 8,5 mg sont incubées pendant 1 h ou 24 h dans 10 mL de solution de PA afin d'obtenir deux charges (Tableau IV-1). Le relargage des PA après 48 h dans le milieu est également mesuré (par dosage UV-Visible, Cf. Annexe 13). Il est total pour tous les matériaux et toutes les charges de PA.

Le tableau ci-dessous récapitule les matériaux dopés ainsi que les doses de PA adsorbées correspondantes.

Tableau IV-1 : Tableau récapitulatif des doses de PA adsorbées dans les matériaux hybrides : (1) 24 h d'incubation et (2) 1 h d'incubation.

Matériaux	Conc. en PA de la solution (ppm)	Dose de PA dans le matériau (µg)	Dose de PA (mg / g de mat.)	Taux de relargage du PA après 48 heures (%)
FM 50K® + 0Sr-CaP	0	0	0	N/A
FM 50K®+0Sr-CaP + AA(1)	180	650 ± 150	77 ± 18	100
FM 50K®+0Sr-CaP + AA(2)		200 ± 30	24 ± 4	100
FM 50K®+0Sr-CaP + NPX(1)	250	600 ± 100	71 ± 12	100
FM 50K®+0Sr-CaP + NPX(2)		200 ± 50	24 ± 6	100
FM 50K®+0Sr-CaP + TC(1)	1000	700 ± 75	82 ± 9	100
FM 50K®+0Sr-CaP + TC(2)		500 ± 130	59 ± 15	100

A.2. Culture des HOST sur les matériaux

Afin d'étudier leur biocompatibilité, des pastilles de TFC et de matériaux hybrides stérilisées ont été placées dans des puits de culture et pré-incubées avec 1 mL de milieu de culture complet (DMEM, 10 % SVF (sérum veau fœtal), pénicilline, streptomycine). Chaque échantillon est préparé en triple afin de vérifier la reproductibilité interne des résultats. Après 3 h de pré-incubation, le milieu est aspiré puis remplacé par du milieu frais pendant 3 heures. Après aspiration du milieu, les tissus sontensemencés avec 1 mL de milieu de culture contenant 7000 cellules HOST qui sont cultivées pendant 2, 4 et 10 jours. Le milieu est changé tous les 3 jours. La condition témoin consiste à ensemenecer les cellules directement sur le plastique des puits de culture. Les tests de viabilité et de prolifération sont réalisés à 2, 4 et 10 jours.

A.3. Différenciation ostéoclastique des monocytes sur les matériaux

Afin d'étudier la différenciation de monocytes en ostéoclastes (OC) à la surface des matériaux, des pastilles de TFC et de matériaux hybrides stérilisées ont été placées dans des puits de culture et pré-incubées avec 1 mL de milieu de culture. Chaque échantillon est préparé en quadruple afin de vérifier la reproductibilité interne des résultats. Après 3 h de pré-incubation, le milieu est aspiré puis remplacé et incubé à nouveau pendant 3 h. Après cette nouvelle phase de pré-incubation, les tissus sontensemencés avec 500 μ L de milieu contenant 60 000 monocytes cultivés ensuite pendant 9 jours en présence de hM-CSF (human Macrophage Colony Stimulating Factor) à la concentration finale de 33 ng/mL et de hRANK-L (human Receptor Activator of Nuclear factor Keppa-B Ligand) à la concentration finale de 66 ng/mL. Ce milieu est renouvelé une fois après 4 jours. La condition témoin consiste à ensemencer les cellules directement sur le plastique des puits de culture.

A.4. Tests biologiques

A.4.1. « The Live / Dead Cell Double Staining »

A.4.1.1. Principe

Afin de visualiser les HOST à la surface des tissus et d'évaluer le pourcentage de cellules vivantes et mortes, le test Live / Dead a été utilisé. Il s'agit d'un test en fluorescence qui permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes grâce à deux molécules, la calcéine Am et l'éthidium-homodimer-1.

La calcéine AM est une molécule non fluorescente ayant la capacité de traverser la membrane des cellules vivantes. L'activité cellulaire transforme la molécule en une calcéine qui fluoresce et qui est incapable de retraverser les membranes intactes. La calcéine s'accumule dans les cellules vivantes et leur confère la propriété de fluorescer en vert.

L'éthidium-homodimer-1 est une molécule qui traverse la membrane endommagée des cellules mortes et se lie à l'ADN, ce qui confère à la cellule une fluorescence rouge.

A.4.1.2. Méthodologie

Ce test a été réalisé après différents temps de culture à J2, J4 et J10. Pour cela les TFC et les matériaux hybridesensemencés avec des HOST sont incubés pendant 20 minutes dans une solution de 250 μ L de PBS contenant 0,125 μ L de calcéine-AM et 0,5 μ L d'éthidium-homodimer-1. Après 20 minutes d'incubation, les biomatériaux sont observés grâce à un microscope à fluorescence Zeiss (Observer Z1) équipé de filtres FITC et Texas Red.

A.4.2. « XTT Cell Proliferation Assay »

A.4.2.1. Principe

Ce test est un test enzymatique colorimétrique commercialisé par la société TREVIGEN. Le XTT ou 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)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 donc vivantes (Figure IV-2). Après contact avec des cellules, la mesure de la densité optique (D.O.) du formazan à 490 nm permet d'obtenir une estimation du nombre de cellules vivantes par comparaison à une courbe d'étalonnage. Ce test a été réalisé après différents temps de culture pour évaluer la viabilité et la prolifération ces cellules.

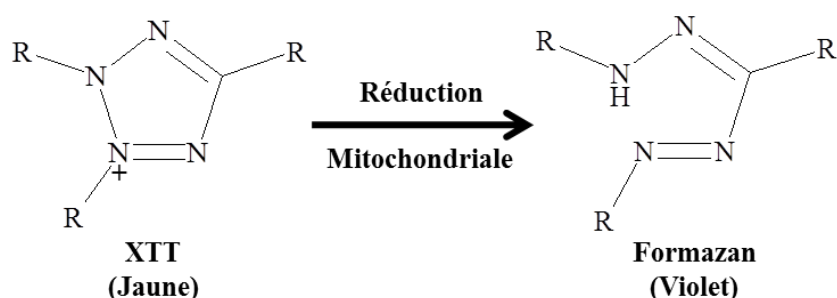


Figure IV-2 : Réaction de réduction du XTT par les enzymes mitochondriales.

A.4.2.2. Méthodologie

Ce test comprend une solution de « Réactif XTT » à 0,9 g/L en XTT et une solution d'« Activateur XTT » contenant du PMS (MethoSulfate de Phénazine) qui permet d'augmenter la vitesse et d'améliorer l'efficacité du test. Une « solution XTT » est préparée en mélangeant 100 µL d'« Activateur XTT » pour 5 mL de « Réactif XTT ». Après culture des HOST en présence des biomatériaux, le milieu de culture est aspiré et remplacé par 200 µL de la solution XTT. Après 1 h 30 à 37 °C dans l'incubateur de culture, on effectue les mesures de la D.O. en prélevant 100 µL de la solution colorée et en la transférant dans une plaque de 96 puits. La mesure de la D.O. est effectuée à 490 nm grâce un spectrophotomètre d'absorption (iMark™, BIO-RAD). Ce test a été réalisé après différents temps de culture à J2, J4 et J10.

A.4.3. Tartrate Resistant Acide Phosphatase (TRAP)

A.4.3.1. Principe

La différenciation des ostéoclastes peut être évaluée grâce à l'activité enzymatique « Tartrate Resistant Acide Phosphatase » (TRAP, kit 386 A, SIGMA-ALDRICH). Ce test, qui s'effectue sur des cellules fixées, permet de visualiser les ostéoclastes différenciés colorés en violet.

A.4.3.2. Méthodologie

Une solution de fixateur est préparée en mélangeant 25 mL de la solution de citrate, 65 mL d'acétone et 8 mL de formaldéhyde à 37 %. Dans les puits contenant les cellules cultivées en présence ou pas des biomatériaux, le milieu de culture est remplacé par 200 μ L de solution de fixation. Après 30 secondes les puits sont rincés 2 fois avec 500 μ L d'eau distillée. La « solution de Fast Garnet GBC diazotée » est préparée en mélangeant 250 μ L de solution de base de Fast Garnet GBC, 250 μ L de solution de nitrite de sodium, 22,5 mL d'eau distillé à 37 °C, 250 μ L d'une solution de naphthol AS-BI phosphate, 1 mL de la solution d'acétate et 500 μ L de la solution de tartatre. Les cellules fixées sont incubées en présence de 1 mL de ce mélange à l'abri de la lumière pendant 1 h à 37 °C. Les puits sont ensuite lavés deux fois avec 1 mL d'eau distillée puis les noyaux cellulaires contre colorés pendant 2 min dans une solution d'hémaroxiline. Après 2 lavages à l'eau courante puis séchage les cellules sont observées au microscope optique.

B. Résultats

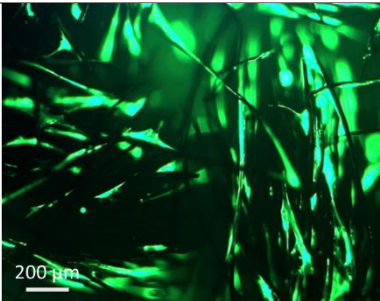
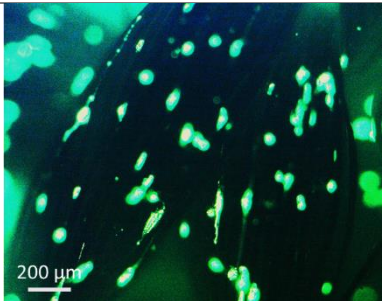
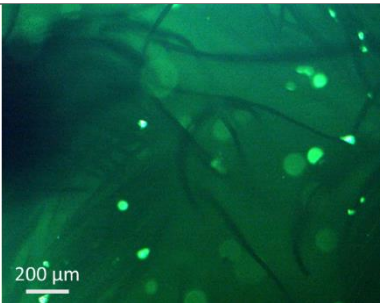
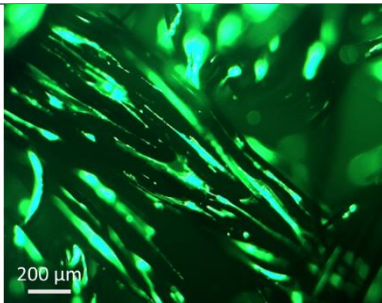
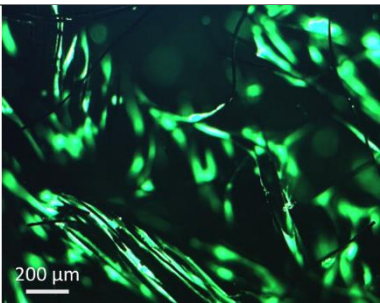
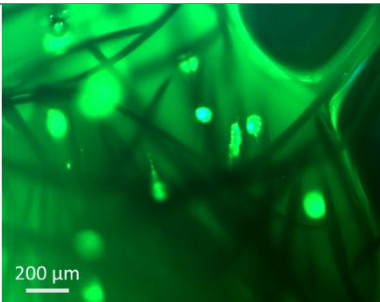
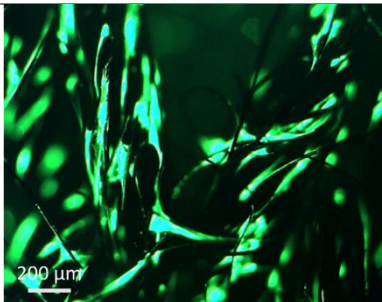
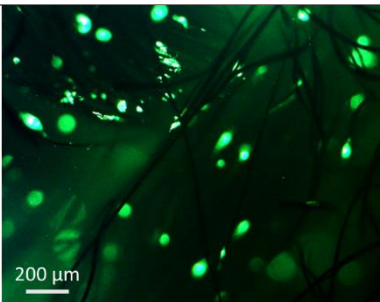
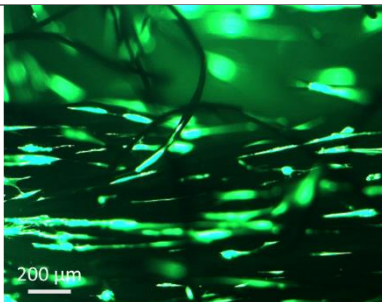
B.1. Choix du tissu de fibres de carbone

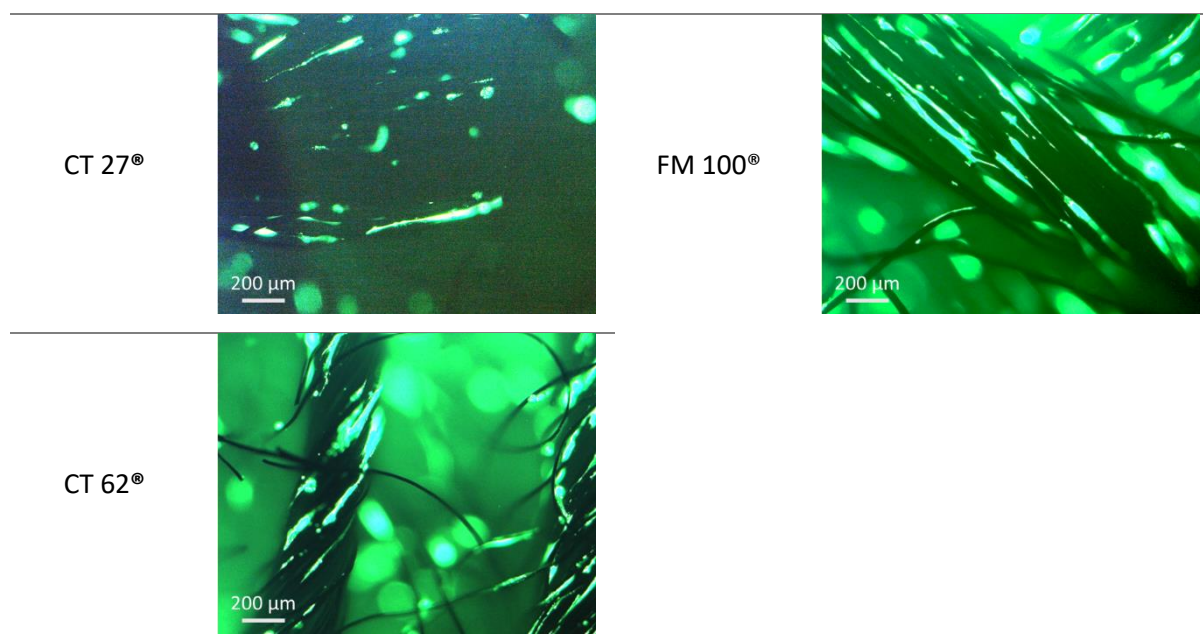
Afin de s'assurer de la biocompatibilité des matériaux hybrides, il a d'abord été nécessaire de vérifier la biocompatibilité du tissu de fibres de carbone. Pour ce faire, nous avons comparé la biocompatibilité, vis à vis de cellules osseuses, de différents tissus différant par leur précurseur, leur mode de fabrication, leur architecture et leurs groupements de surface. Nous avons utilisé le test Live / Dead qui permet de visualiser la morphologie des HOST et d'évaluer leur viabilité à la surface du biomatériau (Tableau IV-2).

Les images de microscopie à fluorescence montrent qu'il existe une différence de viabilité cellulaire selon le tissu utilisé comme support de culture. Après 2,5 jours de culture on observe un plus grand nombre de cellules vivantes (en vert) sur les fibres du tissu non activé et sur les fibres des tissus de la gamme FM par rapport aux fibres des autres tissus. Ces cellules présentent une morphologie typique de cellules fibroblastiques adhérentes.

Basé sur ces résultats, le tissu FM 50K® a été sélectionné comme substrat des futurs matériaux hybrides. Il possède notamment une meilleure tenue à la manipulation que le tissu non activé et que les FM 10®, FM 70® et FM 100® qui ont une architecture de type tissée et non tricotée. Il possède également une plus grande densité de surface comparé au second tissu tricoté FM 30K®.

Tableau IV-2 : Viabilité des cellules HOST ensemencées à la surface des différents tissus testés après 60 h de culture. Evaluation effectuée grâce au test live Dead. Images obtenues par microscopie à fluorescence.

TFC	Image microscopie fluorescence 60 h de culture (x10)	TFC	Image microscopie fluorescence 60 h de culture (x10)
Non activé®		CT 71®	
KIP 1200®		FM 10®	
CT 13®		FM 30K®	
CSC 1200 PW®		FM 50K®	
CSC 1200 TW®		FM 70®	



B.2. Caractérisation des propriétés d'adsorption des tissus de carbone

Les expériences préliminaires conduites lors du choix du TFC ont permis d'observer une décoloration du milieu de culture plus ou moins prononcée selon le tissu après quelques heures d'incubation. La Figure IV-3 illustre la décoloration observée (puits de gauche) par rapport à la couleur rouge/rose initiale du milieu (puits de droite, coloration due à la présence du rouge phénol utilisé comme indicateur de pH). Devant ces résultats nous avons testé l'hypothèse selon laquelle d'autres molécules pourraient être adsorbées au cours de nos expériences et notamment 1) des molécules entrant dans la composition du milieu de culture et nécessaires à la survie et à la prolifération cellulaire mais aussi 2) le formazan, indicateur coloré du test XTT.



Figure IV-3 : Photographie de 7 triplets de tissus différents montrant l'influence des tissus de carbone et de leur porosité sur la décoloration du milieu de culture.

Dans le premier cas l'absorption des molécules du milieu de culture pouvait engendrer une inhibition de la prolifération. Dans le second cas, l'adsorption du formazan pouvait conduire à une sous-estimation du nombre de cellules vivantes. Nous avons testé ces hypothèses par deux types d'expériences.

B.2.1. Adsorption des molécules du milieu de culture

Les cellules eucaryotes sont maintenues en culture grâce à des milieux définis qui contiennent des nutriments et des facteurs de croissance. Nous avons comparé l'effet, sur la prolifération de cellules HOST, d'un milieu de culture ayant été au contact des matériaux à celui d'un milieu ayant été au contact du plastique de culture pendant le même temps.

Pour ce faire, du milieu de culture a été mis en contact avec les différents matériaux pendant 2 jours ou en présence de plastique seul (condition contrôle). Après 2 jours, les différents milieux sont récupérés et déposés sur des cellules HOST préalablementensemencées sur plastique. Après 2 jours, le test XTT a permis de comparer le nombre de cellules vivantes dans les différentes conditions.

Les résultats (Figure IV-4) indiquent que les milieux ayant été en contact avec le tissu brut (FM 50K®) ont le même effet sur la prolifération que le milieu contrôle. En présence des surnageants des trois matériaux hybrides XSr-CaP (0, 5 et 10 %), le nombre de cellules vivantes est légèrement inférieur à celui du contrôle. Cette diminution peut s'expliquer non seulement par un phénomène d'adsorption mais également par la présence de débris générés par le revêtement, débris perturbant la prolifération cellulaire.

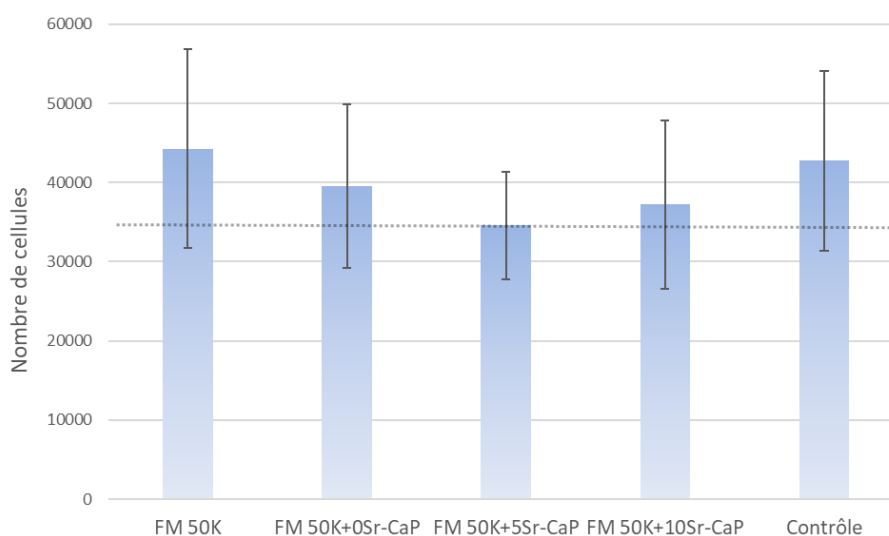


Figure IV-4 : Influence de l'adsorption des molécules du milieu sur le nombre de cellule.

Ces résultats suggèrent que les propriétés du milieu de culture sont peu modifiées par la présence des biomatériaux hybrides, au moins à court terme.

B.2.2. Adsorption du formazan

Nous avons mesuré la captation, par les matériaux, des réactifs colorés du test XTT (expérience « contrôle XTT »). Pour cela des HOST ont été cultivés sur plastique afin d'effectuer un test XTT, de collecter le milieu coloré en violet par le formazan et de mesurer sa D.O. avant (contrôle) et après

incubation en présence des différents matériaux pendant 1 h 30. Les résultats montrent une captation du formazan par les matériaux. Cette captation est similaire pour les trois matériaux hybrides et légèrement supérieure dans le cas tissu brut. La différence de D.O. mesurée après incubation du matériau hybride augmente avec le temps de culture. Cette différence de D.O. correspond à environ 10 % à J2 et 20 % à J10 de la D.O. contrôle (Figure IV-5).

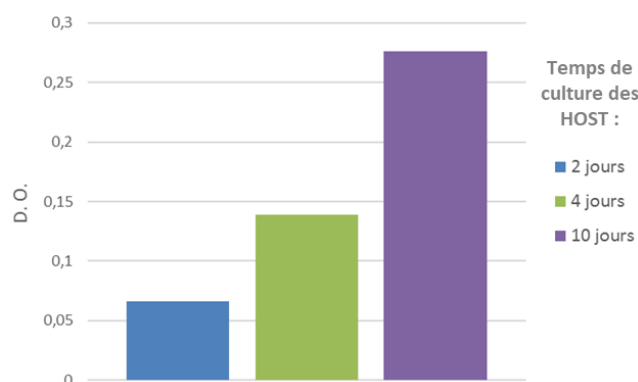


Figure IV-5 : Différence de D.O. retranchée aux résultats du test XTT correspondant à la captation du formazan par un matériau hybride (FM 50K®+xSr-CaP) selon le temps de culture des HOST.

En conséquence, tous les résultats du test XTT réalisés dans cette étude ont été corrigés par le taux d'adsorption du formazan mesuré en parallèle.

B.3. Effets des matériaux sur la viabilité et la prolifération des HOST

B.3.1. Viabilité des HOST en périphérie des matériaux

Le tissu ne recouvrant pas la totalité du puits (environ 50 % de la surface), il existe une surface résiduelle entre la pastille et le bord du puits de culture (Figure IV-6). Lors de l'ensemencement des cellules, une partie de celles-ci se dépose sur le tissu et une autre sur le plastique.

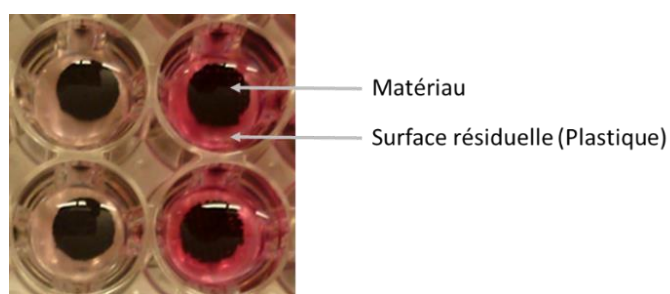


Figure IV-6 : Photographie des matériaux déposés au fond des puits de culture.

Ceci a permis d'observer au microscope optique inverse l'état des cellules présentes sur le plastique à proximité du matériau et de pouvoir détecter une éventuelle toxicité par relargage. Nous avons appelé cette toxicité « toxicité à distance ». Une observation systématique de chaque puits a été réalisée pour chaque biomatériau aux différents temps de culture (Tableau IV-3 et Tableau IV-4).

Tableau IV-3 : Observation en microscopie optique inverse des cellules présentes à proximité des matériaux après 2 et 4 jours de culture. Un seul des triplets de chaque biomatériau est présenté. Les cellules HOST sont indiquées par des flèches vertes tandis que les débris de fibres de carbone sont indiqués par des flèches blanches.

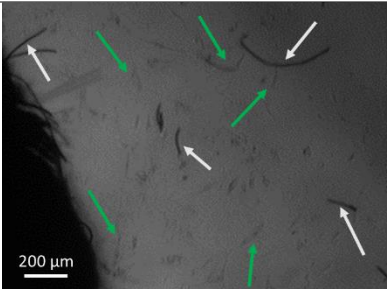
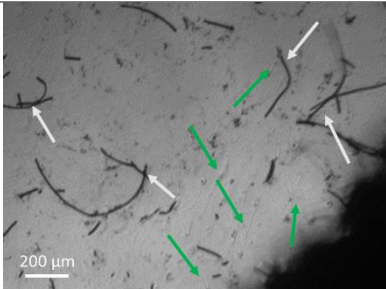
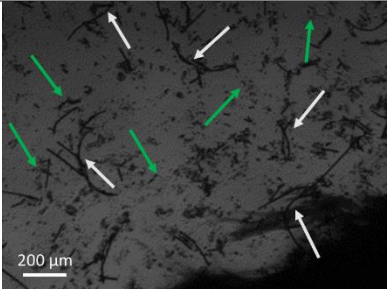
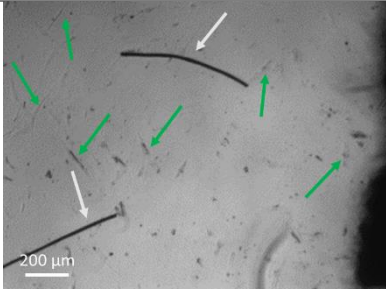
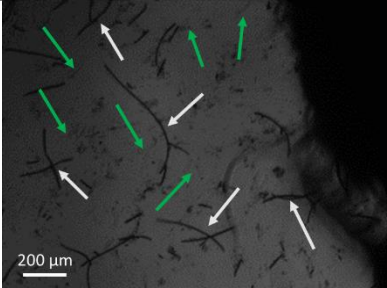
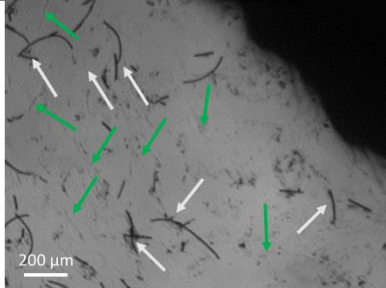
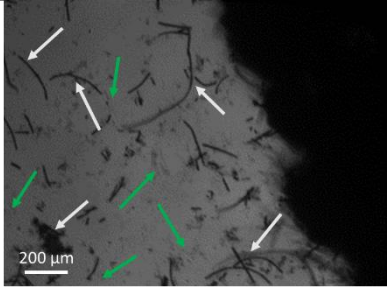
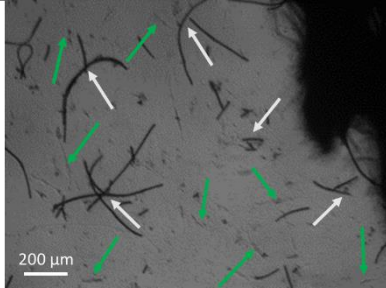
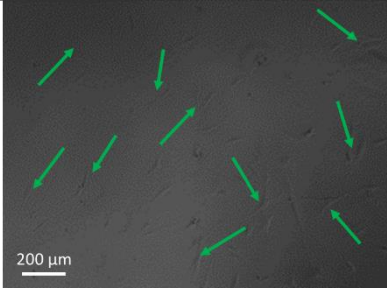
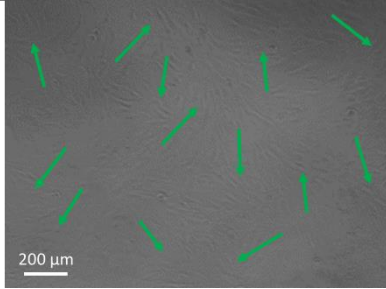
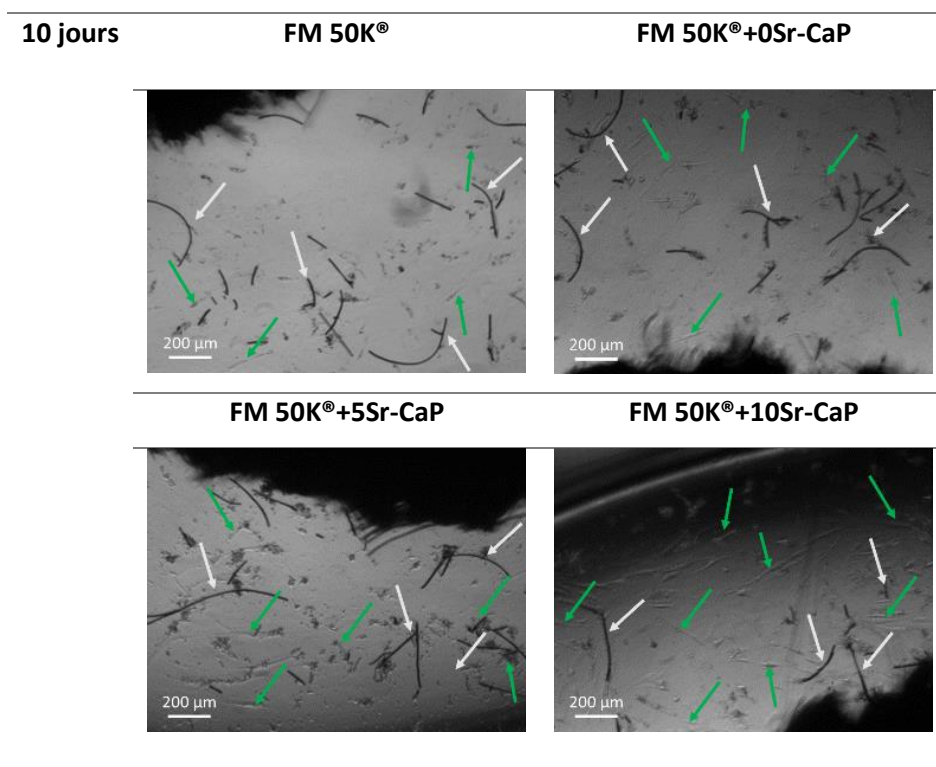
	2 jours	4 jours
FM 50K®		
FM 50K®+0Sr-CaP		
FM 50K®+5Sr-CaP		
FM 50K®+10Sr-CaP		
Contrôle		

Tableau IV-4 : Observation en microscopie optique inverse des cellules présentes à proximité des matériaux après 10 jours de culture. Un seul des triplets de chaque biomatériau est présenté. Les cellules HOST sont indiquées par des flèches vertes tandis que les débris de fibres de carbone sont indiqués par des flèches blanches.



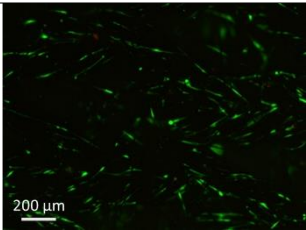
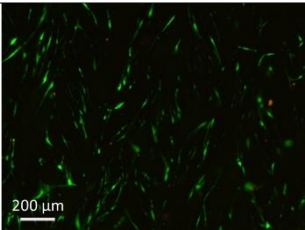
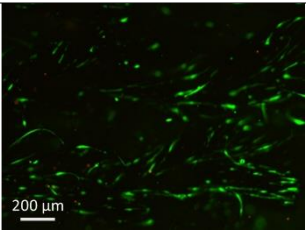
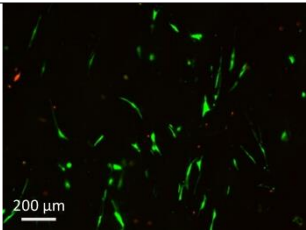
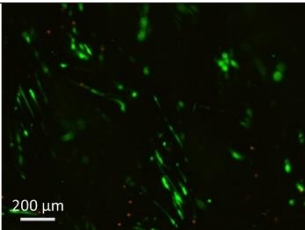
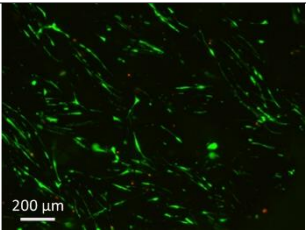
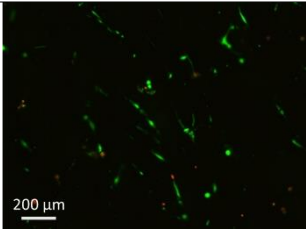
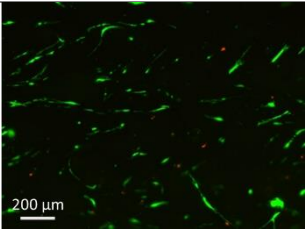
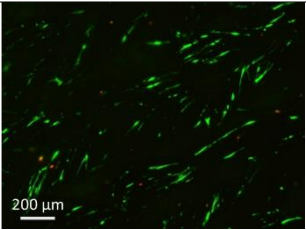
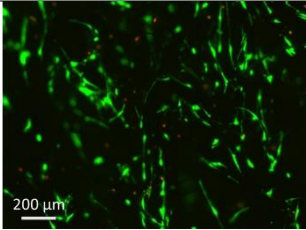
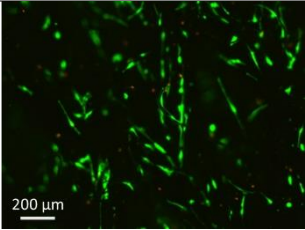
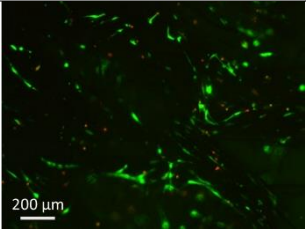
En conclusion nous avons observé qu’après 2, 4 et 10 jours de culture et pour tous les matériaux, les HOST adhérentes au plastique en périphérie du TFC possédaient une morphologie fibroblastique fusiforme comparable à celle des HOST de la condition témoin (plastique sans tissu). Pour tous les matériaux, le nombre de cellules adhérentes au plastique augmente au cours du temps suggérant une prolifération cellulaire.

B.3.2. Viabilité des HOST à la surface des matériaux

L'observation des cellules présentes à la surface des matériaux a été réalisée grâce au test Live / Dead (Tableau IV-5).

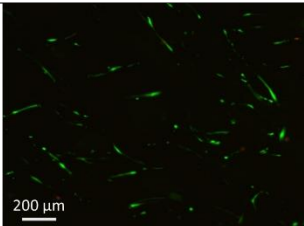
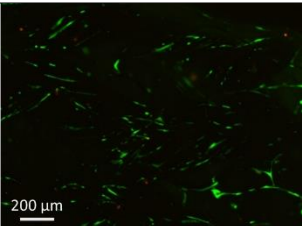
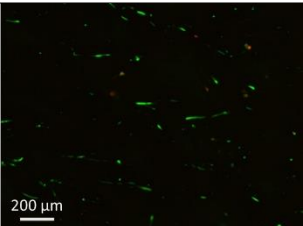
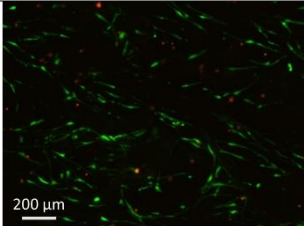
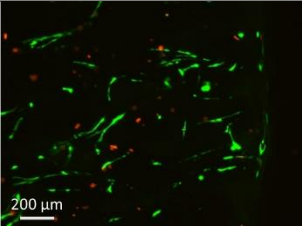
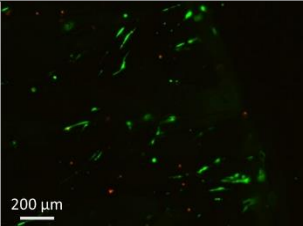
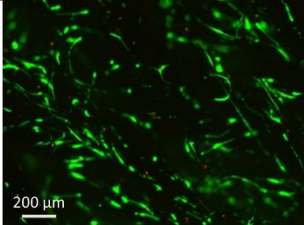
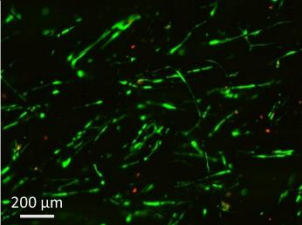
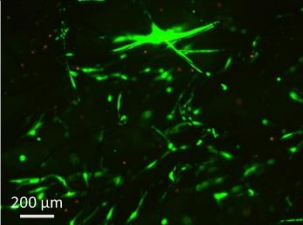
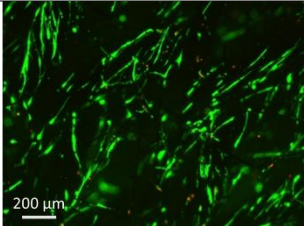
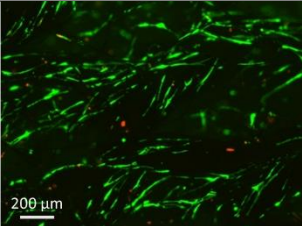
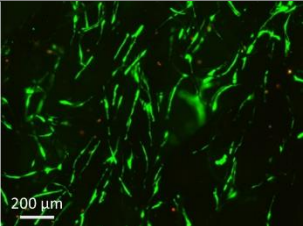
Après 2 jours de culture, nous avons observé un grand nombre de cellules vivantes et très peu de cellules mortes à la surface de tous les matériaux. Les cellules sont fusiformes et suivent l'architecture des fibres de carbone. Cependant la densité cellulaire est supérieure sur le TFC et est maximum sur le matériau hybride le plus riche en strontium (FM 50K®+10Sr-CaP).

Tableau IV-5 : Images obtenues en microscopie à fluorescence illustrant les HOST à la surface des différents matériaux après 2 jours de culture. Les cellules vivantes (vertes) et mortes (rouges) sont superposées sur la même image.

2 jours	Triplet 1	Triplet 2	Triplet 3
FM 50K®			
FM 50K®+0Sr-CaP			
FM 50K®+5Sr-CaP			
FM 50K®+10Sr-CaP			

La même étude a été réalisée pour un temps de culture de 4 jours (Tableau IV-6). Après 4 jours de culture, le pourcentage de cellules mortes (en rouge) est toujours faible pour les différents matériaux. La densité cellulaire est augmentée par rapport à J2 et les densités les plus fortes sont observées sur le TCF et les matériaux hybrides dopés au Sr^{2+} d'une façon dose dépendante. Ces résultats indiquent une prolifération des cellules à la surface des matériaux.

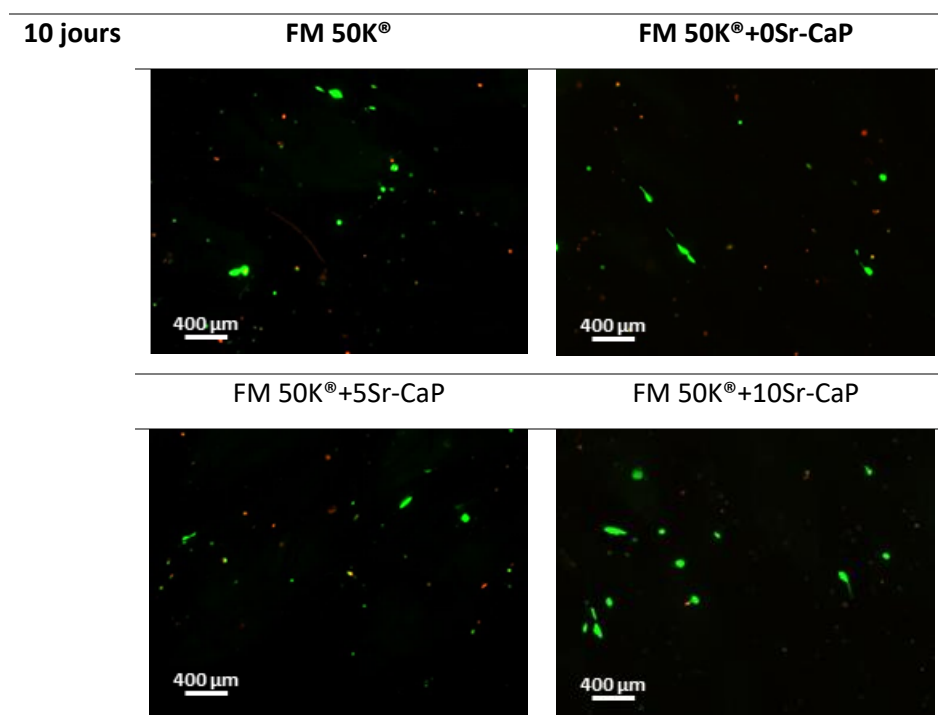
Tableau IV-6 : Images obtenues en microscopie à fluorescence des HOST à la surface des différents matériaux à 4 jours. Les cellules vivantes (vertes) et mortes (rouges) sont superposées sur la même image.

4 jours	Triplet 1	Triplet 2	Triplet 3
FM 50K®			
FM 50K®+0Sr-CaP			
FM 50K®+5Sr-CaP			
FM 50K®+10Sr-CaP			

Après 10 jours de culture en revanche on observe peu de cellules résiduelles, quel que soit le matériau (Tableau IV-7) avec une densité toujours supérieure sur les matériaux dopés en Sr^{2+} et de façon dose dépendante. Nous avons noté que les cellules présentes sur les matériaux contenant du Sr^{2+} avaient une taille supérieure et un phénotype plus allongé.

Il est important de signaler que nous avons eu de fortes difficultés à obtenir des images qui illustrent parfaitement ce que nous avons observé au microscope.

Tableau IV-7 : Images obtenues en microscopie à fluorescence des différents biomatériaux après 10 jours de culture. Un seul cliché représentatif de l'ensemble du matériau est représenté. Les cellules vivantes (vertes) et mortes (rouges) sont superposées sur la même image.



B.3.3. Effet des matériaux sur la prolifération cellulaire

La courbe d'étalonnage du test XTT est représentée dans la Figure IV-7. Pour cela, le test XTT a été réalisé sur des cellules HOST ensemencées sur plastique à des densités croissantes.

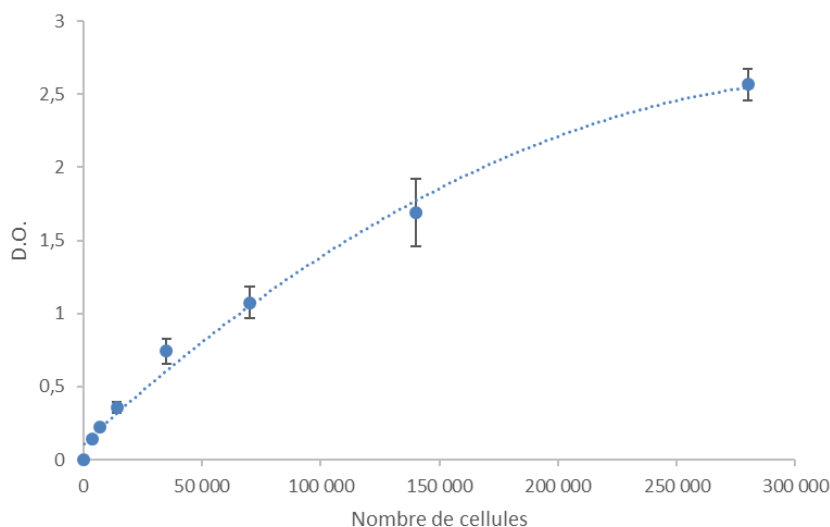


Figure IV-7 : Courbe d'étalonnage du test XTT.

La D.O. mesurée à une longueur d'onde de 490 nm est fonction du nombre de cellules vivantes dans le puits.

Le nombre de cellules vivantes présentes dans les puits en présence et en absence des différents matériaux a été quantifié aux différents temps de culture. Les résultats obtenus ont été corrigés par l'adsorption du formazan par les matériaux. Ils sont représentés dans les Figure IV-8 et IV-9. L'expérience après 4 jours de culture a été réalisée deux fois. Les tests XTT ont été réalisés sur le puits total c'est-à-dire que la quantification du nombre de cellules vivantes inclut à la fois les cellules présentes sur les matériaux mais également les cellules présentes en périphérie sur le plastique.

Les résultats de la Figure IV-8 indiquent que, quel que soit le temps de culture, la prolifération cellulaire est très diminuée en présence des matériaux quels qu'ils soient par rapport au plastique. On remarque qu'après 2 jours de culture en présence des biomatériaux, le nombre de cellules est inférieur au nombre de cellules initialementensemencées. Au contraire, dans la condition contrôle, le nombre de cellules vivantes est environ 5 fois supérieur. Ceci suggère que 80 % des cellulesensemencées en présence des matériaux sont mortes entre J0 et J2 après ensemencement. Après 4 et 10 jours de culture une prolifération faible est observée.

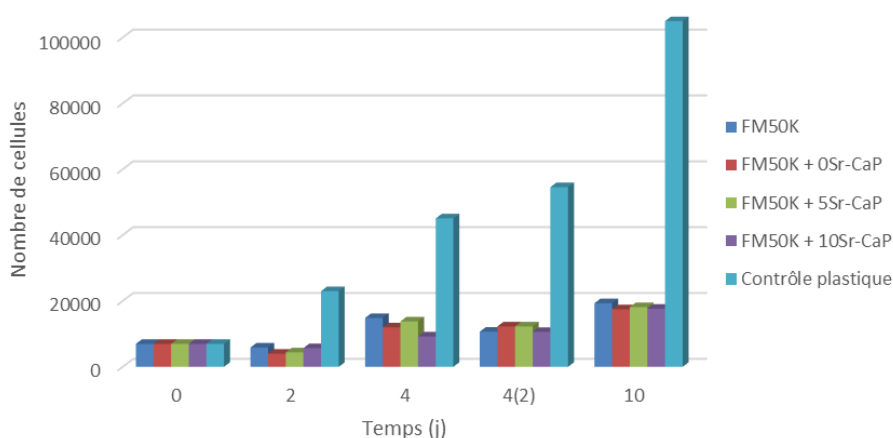


Figure IV-8 : Nombre de cellules vivantes en fonction du temps de culture avec correction de l'adsorption du formazan par les matériaux.

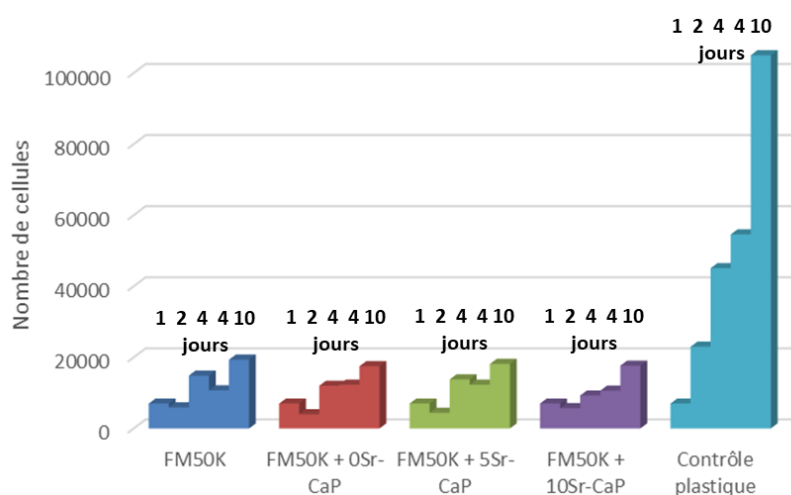


Figure IV-9 : Nombre de cellules en fonction des différents matériaux support avec correction de l'adsorption du formazan par les matériaux.

La Figure IV-10 représente l'augmentation de la prolifération entre J0 et J10 jours et montre que la prolifération mesurée à J10 est similaire pour les différents matériaux, environ 5 fois inférieure à la prolifération mesurée sur plastique.

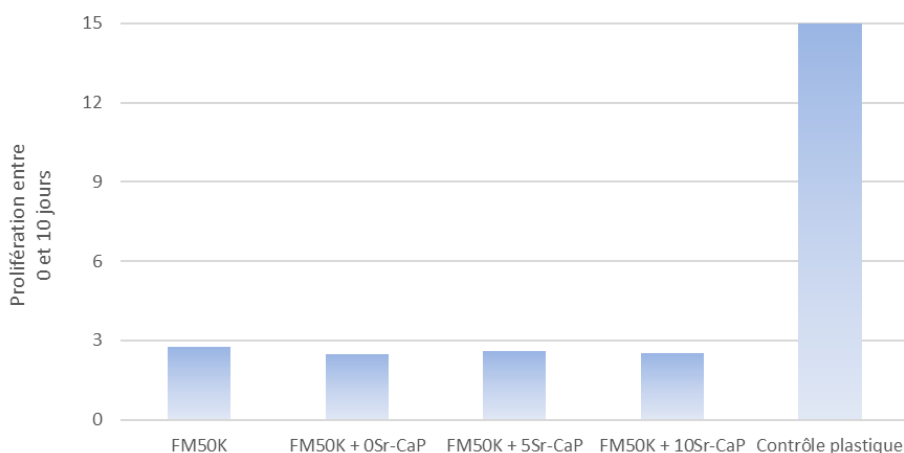


Figure IV-10 : Prolifération des HOST entre 0 et 10 jours de culture.

B.4. Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des cellules HOST à la surface des matériaux hybrides

L'observation des HOST à la surface des matériaux hybrides a été réalisée par MEB après fixation dans une solution de glutaraldéhyde. Les images présentées dans la Figure V-11 correspondent au matériau hybride FM 50K®+0Sr-CaP après 4 jours de culture.

A faible grossissement (Figure IV-11 a)), on observe de longues trainées apparaissant plus foncées à la surface des fibres de carbone (flèches rouges). Ces trainées sont caractéristiques d'objets organiques, donc dans notre cas de cellules. Le grand nombre d'images de ce type présentes à la surface du matériau, suggère que les HOST ont colonisé une partie de la surface des matériaux. À plus fort grossissement (Figure IV-11 b) et c)), nous avons observé que les cellules s'étendaient de fibre en fibre (flèche blanche) tout en se cofondant dans le revêtement (flèche verte). Ces images montrent l'adaptation des cellules HOST à la surface des matériaux.

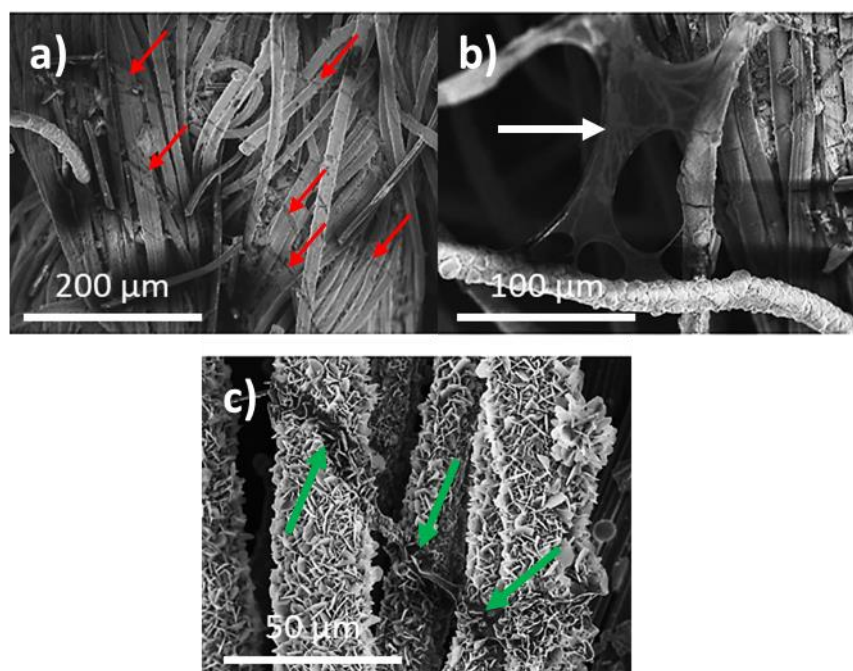


Figure IV-11 : Observation en MEB des HOST (flèches) présentes à la surface du matériau hybride FM50K®+0Sr-CaP après 4 jours de culture. Grandissement : a) x250, b) x500 et c) x1000.

B.5. Effet biologique d'un matériau hybride FM 50K®+0Sr-CaP dopé en principes actifs (PA)

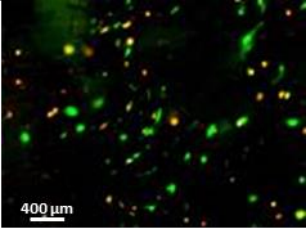
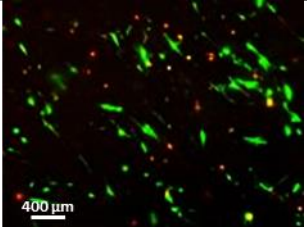
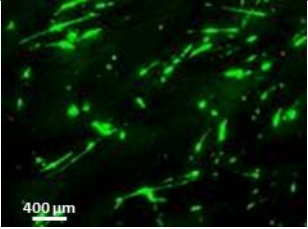
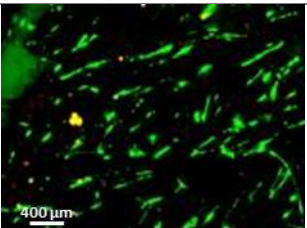
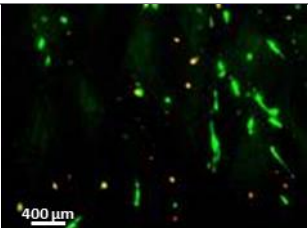
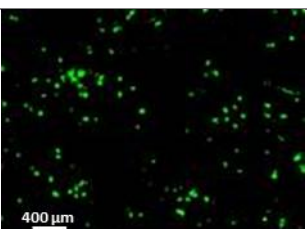
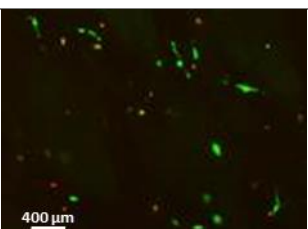
Nous avons testé trois biomatériaux chargés en principe actif, tous trois dérivés du biomatériau hybride FM50K®+0Sr-CaP. Les trois principes actifs sélectionnés étaient : l'aspirine (AA), le naproxène (NPX) et la tétracycline (TC). Deux doses différentes ont été testées.

B.5.1. Effet des PA sur la viabilité des HOST

Après 2 jours de culture, l'observation des cellules après marquage fluorescent (test Live/Dead) indique une densité cellulaire plus élevée sur les matériaux chargés en AA (dose 1 et 2) et en NPX à forte dose (dose 1) par rapport aux autres matériaux chargés et à la condition FM 50K®+0Sr-CaP non chargé (condition témoin)(Tableau IV-8). Il est intéressant de noter que les densités cellulaires obtenues en présence de ces PA sont les plus élevées que nous ayons obtenues dans cette étude.

Concernant les autres matériaux chargés, aucune différence n'a été observée avec la condition témoin pour le matériau chargé en NPX et en TC à faible dose (dose 2). Concernant la TC à forte dose (dose 1), un grand nombre de cellules ayant un phénotype arrondi est observé.

Tableau IV-8 : Images obtenues en microscopie à fluorescence des HOST à la surface des différents matériaux dopés en PA après 2 jours de culture.

FM 50K®+0Sr-CaP (condition témoin)		
	Dose 1	Dose 2
FM 50K®+0Sr-CaP+AA		
FM 50K®+0Sr-CaP+NPX		
FM 50K®+0Sr-CaP+TC		

B.5.2. Effet des PA sur la prolifération des HOST

La Figure IV-12 représente le nombre de cellules vivantes après 2 jours de culture pour chaque échantillon. La condition témoin (notée $\emptyset$) correspond au matériau hybride FM50K®+0Sr-CaP non chargé.

L'analyse quantitative (test XTT) montre que le nombre de cellules vivantes après 2 jours de culture est similaire pour tous les matériaux testés sauf pour le matériau contenant la plus faible dose (dose 2) en NPX. Globalement, la présence de PA ne joue pas un rôle prépondérant sur la quantité totale de cellules par puits, contrairement au nombre de cellules observées en surface des matériaux.

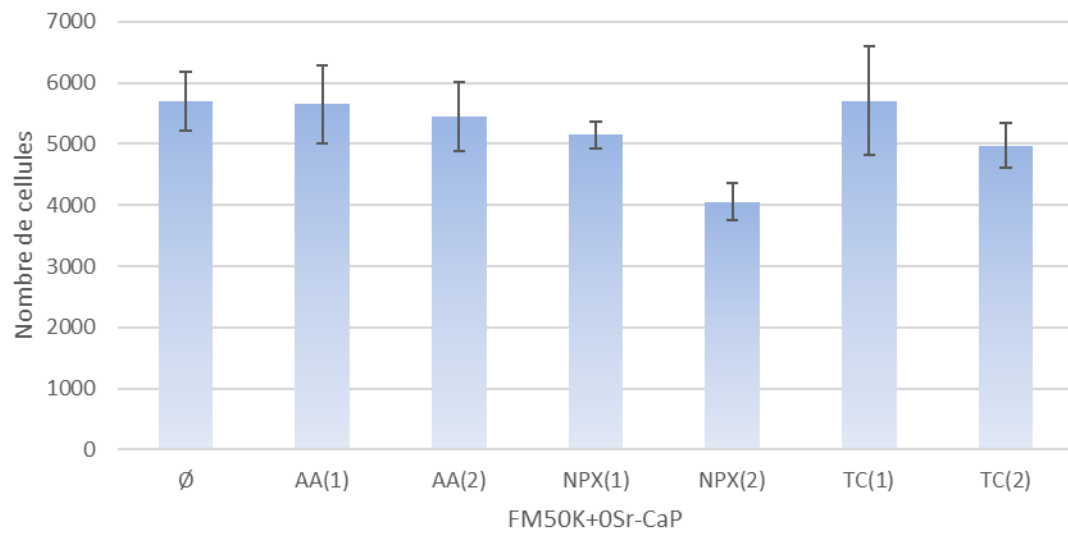


Figure IV-12 : Nombre de cellules vivantes pour les différents matériaux chargés en PA après 2 jours de culture.

C. Discussion

La viabilité des ostéoblastes humains (HOST) a été comparée après ensemencement sur une dizaine de TFC différents. Le choix final s'est porté sur le tissu nommé FM 50K® qui a servi de base aux différents matériaux hybrides et chargés qui ont été testés par la suite.

Le FM 50K®, comme la plupart des TFC testés, possède une grande capacité d'adsorption. Il s'est très rapidement avéré que le TFC pouvait adsorber des molécules du milieu de culture comme le rouge phénol par exemple mais que ceci avait peu d'impact sur la prolifération des cellules à court terme. D'autres expériences seraient nécessaires pour savoir si cet effet d'adsorption pourrait jouer un rôle à plus long terme sur la viabilité et la prolifération cellulaires *in vitro*, ce qui pourrait expliquer la quasi disparition des cellules en surface des matériaux après 10 jours de culture. Nous avons montré que cette propriété avait un impact sur le test quantitatif XTT en raison de l'adsorption du formazan (molécule responsable de la coloration). Ceci nous a conduit à corriger les résultats bruts obtenus en tenant compte de cette adsorption.

Les observations faites au microscope optique inverse montrent pour tous les matériaux l'absence de « cytotoxicité à distance » envers les HOST. Pour tous les temps de culture, la présence d'HOST à proximité des matériaux sur la surface plastique est observable. Le matériau ne relargue donc aucune substance toxique et la présence de débris de fibres de carbone n'empêche pas la prolifération cellulaire. Cependant de tels débris pourraient *in vivo* représenter une source d'inflammation non souhaitable.

Nos résultats indiquent qu'un grand nombre de cellules meurent après l'ensemencement, ce qui suggère que les fibres de carbone représentent un substrat d'adhésion beaucoup moins favorable que le plastique de culture. Après 2 jours de culture nous observons la présence de cellules viables sur tous les matériaux mais une densité cellulaire nettement augmentée et une répartition cellulaire plus homogène en présence de Sr^{2+} de façon dose dépendante et en présence des principes actifs AA et NPX (dose 1). Ces effets se confirment à J4. Nos résultats indiquent également que la prolifération des ostéoblastes humains en présence des biomatériaux est nettement inférieure à la condition contrôle sur plastique. Il est probable que la mortalité cellulaire lors de l'ensemencement et le fait que les fibres de carbone ne représentent pas un support de culture idéal, jouent un grand rôle dans ce phénomène. Une adsorption lente mais régulière par les fibres participe peut-être à cet effet délétère sur la prolifération. D'autres études devront être menées pour répondre à ces questions. Il est intéressant de noter que dans tous les cas, les conditions ayant donné les meilleurs résultats sont les conditions dopées, soit en strontium soit en aspirine et naproxène forte dose.

L'ensemble de ces résultats montre que le dopage du matériau hybride en molécules thérapeutiques comme le Sr^{2+} , l'AA et le NPX joue un rôle bénéfique sur la viabilité des cellules osseuses même si les fibres de carbone par elles-mêmes ne représentent pas, *in vitro*, un bon support d'adhésion et de prolifération cellulaire. En perspective, le couplage d'un principe actif sur un matériau déjà dopé au Sr^{2+} apparaît prometteur dans l'espoir que leurs effets bénéfiques s'additionnent.

Une expérience préliminaire de différenciation ostéoclastique a été réalisée mais, en raison de difficultés techniques, n'a pas été concluante. Cette expérience devra être renouvelée. Néanmoins, nous n'avons pas observé de toxicité des matériaux pour les cellules monocytaires.

En conclusion, nous avons posé l'hypothèse que les matériaux hybrides pourraient être utilisés comme « pansement osseux ». À notre connaissance ceci n'a encore jamais été proposé en chirurgie osseuse. Ce concept peut se rapprocher de celui de la « membrane induite » que l'on retrouve dans la « technique de Masquelet » utilisée pour la reconstruction osseuse [182]. Pour ce faire, nous avons mis en place une expérience pilote *in vivo*. Cette expérience a consisté à créer un défaut osseux à l'extrémité distale des deux fémurs d'un rat, à appliquer ou non un de nos biomatériaux à la surface de ce défaut et à analyser l'évolution quantitative et qualitative de la régénération osseuse.

Chapitre V. Evaluation biologique

Etude in vivo

Sommaire

Introduction	167
A. Matériels et méthodes	167
A.1. Préparation des biomatériaux	167
A.2. Expérimentation	168
A.2.1. Animaux	168
A.2.2. Protocole chirurgical	168
A.2.3. Soins post opératoires et observations cliniques	170
A.2.4. Sacrifice et dissection des fémurs	170
A.3. Techniques d'analyses	171
A.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)	171
A.3.2. Microscanner à rayon-X (μ -CT)	171
A.3.3. Imagerie par résonnance magnétique (IRM)	171
A.3.4. Spectroscopie RAMAN	172
A.3.5. Histologie	172
B. Résultats	173
B.1. Animaux	173
B.2. Caractérisation du devenir des biomatériaux	173
B.3. Caractérisation de la régénération osseuse	177
B.3.1. Analyse de la régénération osseuse après 13 jours	177
B.3.2. Analyse de la régénération osseuse après 26 jours	183
C. Discussion	193

Introduction

À la suite des tests effectués *in vitro*, un tissu de fibres de carbone (TFC, FM 50K®) et deux types de revêtement de phosphate de calcium (CaP) ont été retenus pour la suite de cette étude :

- **FM 50K®+0Sr-CaP**, un revêtement d'hydroxyapatite déficitaire en calcium carbonatée sur tissu de fibres de carbone ;
- **FM 50K®+10Sr-CaP**, un revêtement d'hydroxyapatite déficitaire en calcium carbonatée enrichi en strontium sur tissu de fibres de carbone.

Nous avons testé l'efficacité de ces biomatériaux sur la régénération osseuse *in vivo* chez le rat. En effet, aucune technique de culture cellulaire ne peut reproduire de façon adaptée l'environnement complexe d'un tissu en phase de régénération. C'est pourquoi une expérimentation animale a été conduite.

Pour ce faire, un défaut osseux a été créé au niveau des deux fémurs chez 24 rats. Leur cicatrisation a été analysée après 13 et 26 jours en présence ou en absence des biomatériaux.

A. Matériels et méthodes

A.1. Préparation des biomatériaux

Les biomatériaux FM 50K®+0Sr-CaP et FM 50K®+10Sr-CaP sont découpés au scalpel en patches de 10 x 4 mm (Figure V-1). Ils sont ensuite lavés à l'eau ultra-pure, séchés à l'étuve puis stérilisés dans de l'aluminium au poupinel.

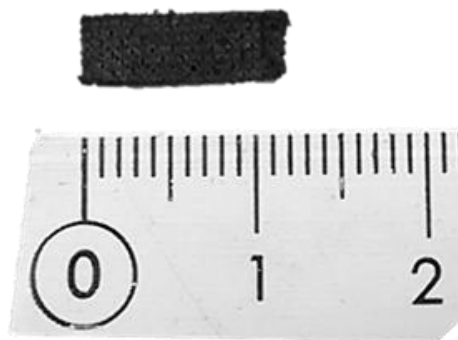


Figure V-1 : Patch de biomatériau (tissu de fibres de carbone / phosphate de calcium).

A.2. Expérimentation

A.2.1. Animaux

Au cours de cette expérience, 24 rats mâles Lewis pesant entre 300 et 400 g ont été utilisés.

L'expérimentation animale a été effectuée après approbation du « Comité Institutionnel d'Éthique Pour l'Animal de Laboratoire » (CIEPAL) et du ministère (APAFIS3#11442-2017091413241724), réalisée sous la direction de Nathalie Rochet et dans l'animalerie de la Faculté de Médecine – ZAC Tour Pasteur, à Nice. L'apprentissage du protocole chirurgical a été possible grâce à l'enseignement initial de Florian Boukhechba. Ceci m'a permis ensuite de réaliser toutes les interventions chirurgicales (anesthésie Nathalie Rochet), le suivi post opératoire des animaux, leur sacrifice, la majeure partie des analyses sur les fémurs ainsi que toutes leurs interprétations.

Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R :

- Remplacement : Il n'existe pas aujourd'hui de méthodes permettant d'éviter l'expérimentation animale pour tester le pouvoir ostéogénique de biomatériaux destinés à accélérer la reconstruction osseuse chez l'Homme.
- Réduction : Ce modèle de petit défaut osseux bilatéral permet d'opérer les deux pattes du rat pour réduire de moitié le nombre d'animaux.
- Raffinement : Toutes les expériences et manipulations des animaux sont effectuées avec le souci de préserver le bien-être de l'animal. Les analgésiques pré et post opératoires mises au point dans l'équipe de Nice permettent d'observer des suites opératoires simples et notamment une reprise de l'appui sans boiterie dès le réveil de l'animal. Comme mentionné plus loin, les rats opérés sont traités pendant au moins 7 jours contre la douleur par voie orale dans l'eau du biberon. Le contenu du biberon est changé tous les jours et la consommation d'eau de boisson est mesurée chaque jour. Si elle est excessive, elle peut indiquer une souffrance. Dans ce cas-là ou devant d'autres signes de douleur lors de l'observation quotidienne de l'animal, la posologie des antalgiques peut être doublée. Les animaux sont suivis selon une grille d'évaluation prévoyant le recours à des points limites précoces et adaptés (Cf. Annexe 14).

A.2.2. Protocole chirurgical

Tous les rats sont opérés sous anesthésie générale et analgésie adaptée dans des conditions optimales de stérilité. Nous avons créé un défaut osseux de 2,7 mm au niveau de l'extrémité distale des deux fémurs (Figure V-2). Pour cela, après rasage, désinfection et incision cutanée, chaque fémur a été exposé après dissection douce des loges musculaires de la cuisse en prenant soin de respecter le nerf sciatique. Le défaut osseux a été réalisé à l'aide d'un micromoteur de la marque Synthes équipé de 3

mèches de 1,1 ; 1,5 et 2,7 mm de diamètre (Advetis médical). La taille croissante des mèches permet de créer un défaut en 3 temps pour diminuer le risque de fractures. Une fiche de compte rendu opératoire a été remplie pour chaque rat (Cf. Annexe 15).

La taille du défaut étant assez importante par rapport à la taille du fémur et étant donné les variations inter individuelles, la localisation spatiale des défauts peut différer légèrement d'un à l'autre. Cette différence de position du défaut au niveau du fémur est prise en compte pour toutes les analyses et les conclusions qui en découlent. Le biomatériau appliqué sur le défaut a été choisi selon la grille jointe en annexe 16. Les trois groupes de 16 fémurs obtenus correspondent aux trois conditions étudiées c'est-à-dire :

- Pas de biomatériau.
- Biomaterériau : FM 50K®+0Sr-CaP.
- Biomaterériau : FM 50K®+10Sr-CaP.

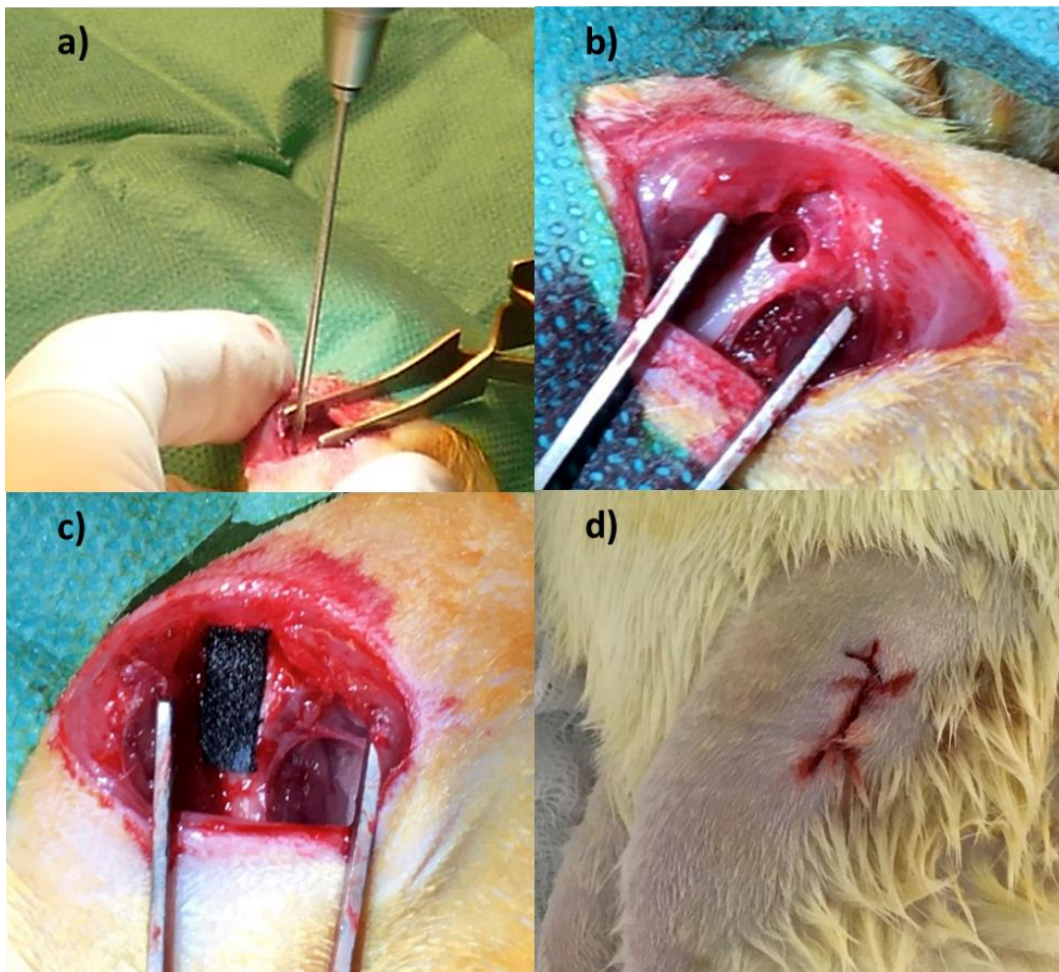


Figure V-2 : Photographies des principales étapes de la chirurgie et de l'application des biomatériaux sur les défauts osseux de 2,7 mm de diamètre au niveau de l'extrémité distale du fémur. a) Réalisation du défaut osseux à l'aide d'un micromoteur ; b) Défaut osseux à l'extrémité distale d'un fémur gauche ; c) Apposition d'un biomatériau sur le défaut

osseux et d) Suture cutanée.

Les biomatériaux sont maintenus en place sur le défaut sans qu'une suture soit nécessaire, par le simple biais du quadriceps fémoral replacé délicatement sur le biomatériau. Le biomatériau est ainsi bloqué entre le fémur et le muscle. Une radiographie des membres inférieurs de chaque rat est réalisée en post opératoire immédiat pour vérifier la position du défaut et l'absence de fracture provoquée par le fraisage.

A.2.3. Soins post opératoires et observations cliniques

En post opératoire les rats ont été traités au moins 7 jours contre la douleur par voie orale grâce à l'ajout, dans l'eau du biberon (40 ml d'eau/jour pour un rat de 400 g), de : 1) Buprenorphine (Buprecare solution buvable stock 0,3 mg/ml) ; 2) Meloxicam (Metacam, stock 2 mg/ml) ; 3) Antibiotique (Baytril, 2,5% sol). Le biberon est contrôlé et changé tous les jours ; la quantité de liquide absorbée par l'animal est mesurée et notée sur la feuille de surveillance (Cf. Annexe 17). Chaque rat est surveillé quotidiennement, y compris les week-end et jours fériés. Sont évalués : son comportement, l'état de la cicatrice et du pelage et la reprise de l'appui sur chaque patte. En cas de signes de souffrance (poil hérissé, rat peu mobile ou prostré, craintif ou agressif) la posologie d'antalgiques est doublée. En cas de non amélioration dans un délai de 24 h, une radiographie de contrôle sous anesthésie légère est effectuée (induction à l'isoflurane puis injection IM de 50 µl de Xylazine) pour vérifier l'absence de fracture ou d'infection. A l'occasion des radiographies un examen clinique est réalisé sur l'animal anesthésié. On note l'aspect des cicatrices, la longueur et la mobilité des membres, l'absence de tuméfaction ou d'infection (abcès) à la palpation. En cas de fracture ou d'infection constatées à la radio, l'animal est euthanasié par inhalation de CO₂.

A.2.4. Sacrifice et dissection des fémurs

Six rats et dix-huit rats ont été sacrifiés respectivement après 13 et 26 jours post opératoires afin d'étudier la régénération du défaut dans les trois conditions. Le sacrifice a été réalisé par inhalation de CO₂ et une radiographie de contrôle a été effectuée. Les fémurs ont été disséqués et fixés dans du formol 10 %.

A.3. Techniques d'analyses

Tous les fémurs ont été analysés au microscanner (iBV, Nice et clinique St Jean, Cagnes sur mer) et en histologie (iBV et CHU, Nice). Un seul fémur de chaque groupe a été analysé au microscope électronique à balayage (MEB, CME – Orléans), en IRM (CEMHTI, Orléans) et en spectroscopie RAMAN (CIRIMAT, Toulouse).

A.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les caractérisations réalisées en MEB ont été réalisées 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 5 kV en imagerie. Les échantillons ont été au préalable recouverts d'une fine couche d'or afin de les rendre conducteurs.

A.3.2. Microscanner à rayon-X (μ -CT)

Les analyses ont été réalisées après 13 et 26 jours post opératoires. Les fémurs ont été disséqués en préservant le biomatériau puis fixés dans du formol et transférés dans de l'éthanol 70 % avant analyse. Les acquisitions ont été réalisées dans deux tomographes de résolution différente. D'abord au SkyScan μ CT-1178 (Synergie4, Evry, France, résolution 80 μ m, iBV, Nice) ; puis au SkyScan μ CT-1173, (Synergie4, résolution 6 μ m, clinique St Jean, Cagnes). L'acquisition des images a été réalisée respectivement à des tensions de 60 kV, des courants de 615 et 133 μ A, et des temps d'exposition de 800 et 776 ms.

A.3.3. Imagerie par résonnance magnétique (IRM)

Les images obtenues par IRM ont été réalisées au laboratoire CEMHTI en collaboration avec F. Fayon et V. Sarou-Kanian (Orléans). L'IRM ^1H consiste à réaliser des images des atomes d'hydrogènes présents dans le matériau. Dans le domaine biomédical, l'IRM sonde principalement les molécules mobiles, telles l'eau ou les métabolites. Ici, nous avons utilisé une séquence IRM (ZTE [183]) permettant d'observer également les parties rigides du matériau (partie minérale de l'os). L'acquisition des images a été réalisée sur un spectromètre Bruker Avance IIIHD disposant d'un champ magnétique de 17,6 T (fréquence de Larmor de 750,13 MHz) avec une tête de mesure Bruker MicWB40 et un système de gradient 3 axes Bruker Micro 2.5 (150 G/cm par axe). Les images tridimensionnelles ont été obtenues avec un champ de vue de $15 \times 12 \times 12 \text{ (mm)}^3$ et une taille de voxel de $50 \times 40 \times 40 \text{ (}\mu\text{m)}^3$ pour une durée d'acquisition de 40 h. L'échantillon a été placé dans un tube de 10 mm rempli d'une huile fluorée (Halocarbon oil 27) pour limiter l'inhomogénéité due aux gradients de susceptibilité magnétique.

A.3.4. Spectroscopie RAMAN

Les spectres RAMAN ont été réalisés par O. Marsan au laboratoire CIRIMAT (collaboration avec C. Drouet, Toulouse). Cette spectroscopie est une spectroscopie vibrationnelle reposant sur un processus de diffusion inélastique de la lumière par la matière. Les spectres ont été obtenus par irradiation d'un laser monochromatique typiquement de longueur d'onde 532 ou 633 nm. Le spectromètre utilisé est un microscope RAMAN confocal LabRAM HR800 (Horiba Jobin-Yvon). Dans le cadre de cette thèse, l'étude est réalisée sur les bandes RAMAN comprises entre 700 et 1300 cm^{-1} où sont recherchés divers pics caractéristiques de la partie inorganique de l'os (apatite) et notamment la bande ν_1 des phosphates. La position et la largeur de cette bande peuvent donner des indications sur les caractéristiques des phases apatitiques en présence, et parfois permettre de les distinguer.

A.3.5. Histologie

Les inclusions, les coupes histologiques et les colorations ont été réalisées grâce au matériel mis à notre disposition au Centre Hospitalier Universitaire de Nice dans le laboratoire central d'anatomopathologie dirigé par le Pr J.F. MICHIELS.

Les fémurs disséqués sont fixés dans une solution de formol à 10 % et sont décalcifiés dans 5 L d'une solution d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 10 % à pH 8, à température ambiante et sous agitation pendant 9 semaines en changeant le bain deux fois. Les os décalcifiés sont découpés au scalpel autour de la zone opérée sur une longueur d'environ 5 mm. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine. A partir des blocs de paraffine nous avons réalisé des coupes de 5 μm qui ont été colorées ensuite à l'hématoxyline, éosine et safran (HES) avant observation en microscopie optique.

B. Résultats

B.1. Animaux

L'ensemble des 24 rats a été opéré suivant le protocole prévu et 23 animaux ont été sacrifiés en fin d'expérience sans que soit survenu d'événement indésirable. Pour l'un d'entre eux nous avons constaté une fracture du fémur opéré dans le groupe contrôle sans biomatériau. Au total nous avons pu analyser 15 fémurs contrôles (4 à J13 et 11 à J26) sans biomatériau et 16 fémurs dans chacun des groupes avec un des deux biomatériaux (4 à J13 et 12 à J26).

B.2. Caractérisation du devenir des biomatériaux

La première observation que nous avons faite concerne le devenir des biomatériaux après 26 jours d'application à la surface des fémurs, en particulier 1) au niveau macroscopique l'absence d'inflammation induite, le maintien en place sur le fémur et la tenue mécanique ; 2) au niveau microscopique la dissolution du revêtement de CaP (MEB) et la biocompatibilité (Histologie).

Après le sacrifice de l'animal, les cicatrices cutanées et l'état des muscles recouvrant la zone du défaut osseux ont été soigneusement inspectés et aucun signe d'inflammation des tissus environnants liés au biomatériau n'a été détecté que ce soit à J13 ou J26. Après dissection des fémurs nous avons observé que les biomatériaux étaient bien en place et très fortement adhérents à la surface osseuse (Figure V-3). En effet, il a été impossible de les dissocier des fémurs sans disséquer les tissus biologiques environnants.

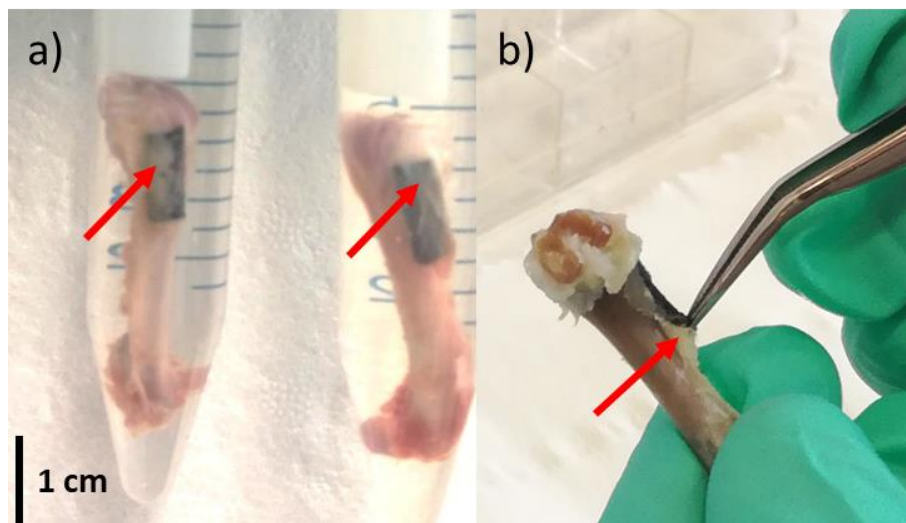


Figure V-3 : Photographies illustrant un biomatériau fortement adhérent à la surface osseuse : a) Deux exemples de biomatériaux fixés aux fémurs par l'intermédiaire des tissus biologiques (flèche rouge) et b) Forte adhérence à l'arrachement du biomatériau à la surface de l'os par l'intermédiaire des tissus biologiques (flèche rouge).

Deux biomatériaux (FM 50K®+0Sr-CaP et FM 50K®+10Sr-CaP) prélevés à J26 ont été analysés en microscopie électronique à balayage (MEB).

Pour cela les biomatériaux ont été détachés de l'os par dissection délicate des tissus biologiques périphériques. Nous avons observé que les tissus de carbone avaient perdu toute flexibilité et restaient figés selon la forme de l'os. Après métallisation sur les deux faces ils ont été observés en MEB. Seules les images du biomatériau FM 50K®+0Sr-CaP sont présentées sur la Figure V-4. Aucune différence n'a été observée en MEB entre les deux biomatériaux.

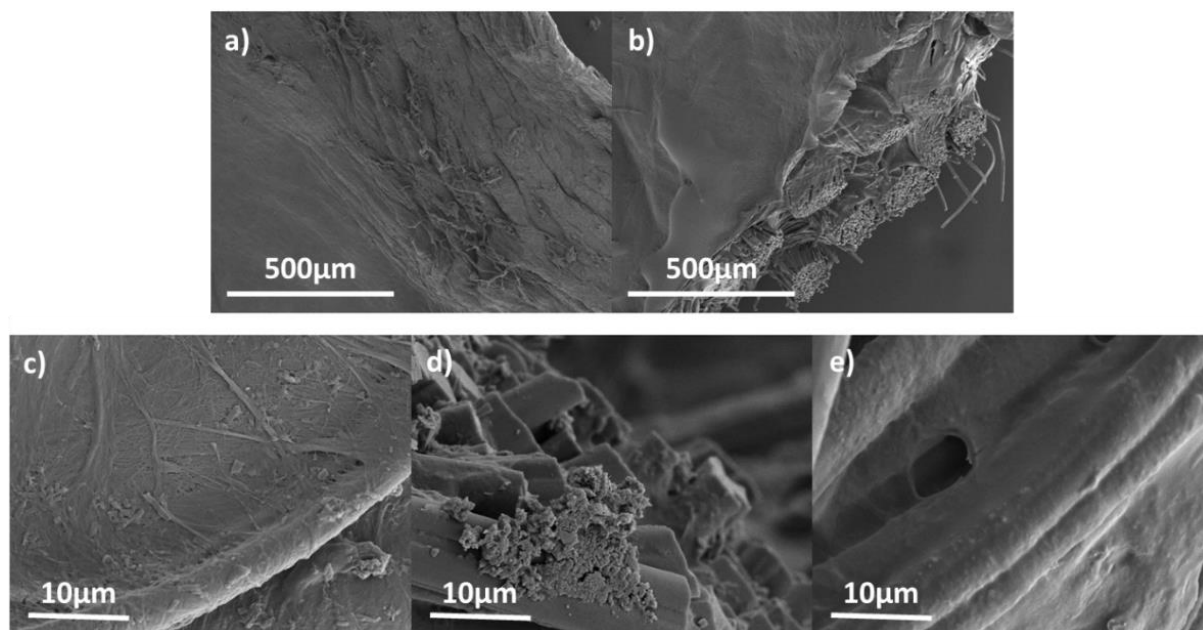


Figure V-4 : Images MEB d'un biomatériau après 26 jours d'implantation (FM 50K®+0Sr-CaP). a) Face osseuse, b) Face musculaire, c) Agrandissement de la face osseuse, d) Agrandissement au niveau d'une extrémité et e) Agrandissement sur des fibres de carbone.

Aucune différence n'a également été observée entre la face osseuse (côté os, Figure V-4 a)) et la face musculaire (côté muscle, Figure V-4 b)) du biomatériau. Chaque surface est totalement recouverte par des tissus biologiques. La Figure V-4 b), montre également que les tissus biologiques ont envahi l'intégralité du tissu. A plus fort grossissement (Figure V-4 c-e)), la colonisation des fibres et de tout le biomatériau est observée. De plus, la forme lobée des fibres est clairement visible sur ces images, ce qui suggère la dissolution du revêtement de phosphate de calcium. En effet, comme le montre la Figure V-5 lorsque les fibres du FM 50K® sont recouvertes du revêtement de CaP, leur morphologie lobée n'est plus visible. La Figure V-4 d) illustre la présence d'un agrégat résiduel de dépôt de CaP sur une fibre. Ce dépôt ne présente ni la taille ni la morphologie du revêtement initial (Figure V-5 b) et c)).

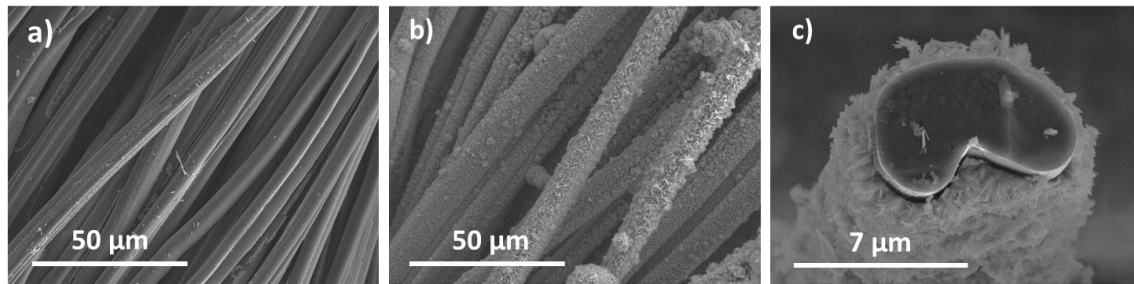
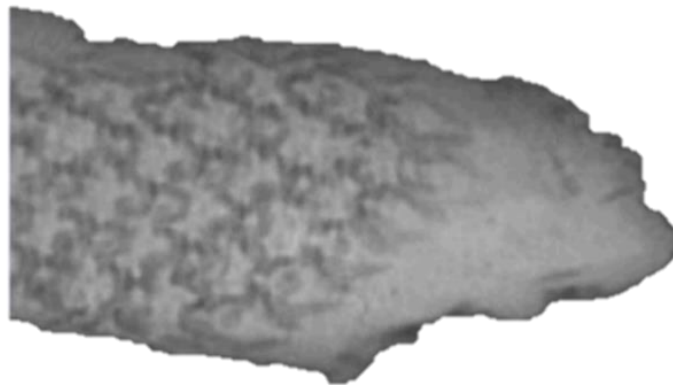


Figure V-5 : Images MEB du TFC : a) sans revêtement de forme lobée, b) avec revêtement de CaP de forme cylindrique et c) en coupe transverse d'une fibre de carbone montrant la forme lobée de la fibre et la forme cylindrique du revêtement la recouvrant.

Le biomatériau FM 50K®+0Sr-CaP a également été observé en IRM ^1H . Pour rappel, cette technique permet de visualiser les atomes d'hydrogène présents dans le matériau. De ce fait, le TFC possédant trop peu de protons à la surface de ses fibres ne devrait pas être visible par cette technique.

L'image présentée sur la Figure V-6, représente une coupe interne du biomatériau. Celle-ci permet de distinguer nettement le négatif des motifs du TFC (gris clair). Ceci permet également de déduire que le tissu carboné est envahi de matière organique sans qu'il soit possible de déterminer s'il s'agit d'une imprégnation de fluide biologique ou d'une colonisation cellulaire puisque l'image visualise principalement l'eau mobile dans le milieu.



**Figure V-6 : Image IRM ^1H d'un biomatériau FM 50K®+0Sr-CaP.
Gris clair : Présence de protons et Gris foncé: absence de proton.
(Paramètres séquence : TR= 8ms, NS = 64).**

Tous les fémurs ont ensuite été analysés en histologie. Pour cela les biomatériaux n'ont pas été dissociés de la surface osseuse et les coupes permettent d'observer le fémur comportant le défaut osseux et le TFC en regard. La Figure V-7 représente une vue d'ensemble d'une coupe histologique du biomatériau FM 50K®+OSr-CaP apposé au fémur.

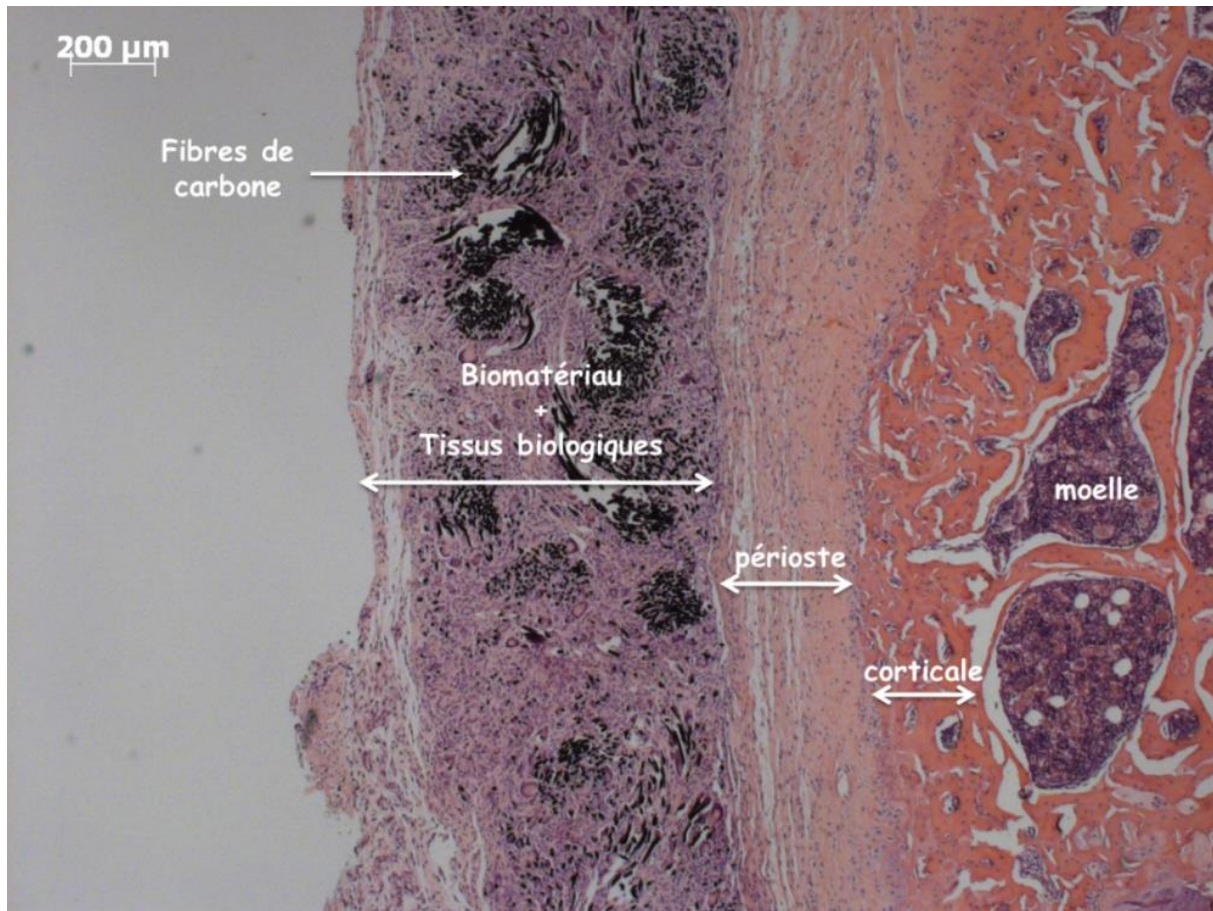


Figure V-7 : Analyse histologique d'un biomatériau TFC/CaP à la surface d'un fémur de rat à J26 postopératoire. La moelle osseuse, la corticale fémorale, le périoste et le biomatériau colonisé par des tissus biologiques sont respectivement observés.

Les fibres de carbone sont clairement visibles sous la forme d'amas de couleur noire à la surface du périoste (le périoste est une membrane riche en cellules souches recouvrant la corticale osseuse). Le biomatériau est totalement colonisé par un nouveau tissu biologique. Aucun signe d'inflammation n'est observé. Un grand nombre de cellules géantes multinucléées de type ostéoclastique (flèches blanches sur la Figure V-8) sont visibles, ce qui représente une réponse normale à l'implantation d'un élément étranger et peut représenter une étape précoce de la formation d'un tissu osseux. A plus fort grossissement, on observe la présence d'un grand nombre de néo vaisseaux sanguins (flèches rouges sur la Figure V-8). La présence d'une vascularisation abondante répartie de façon homogène au sein de fibres suggère une très bonne intégration des TFC aux tissus environnants.

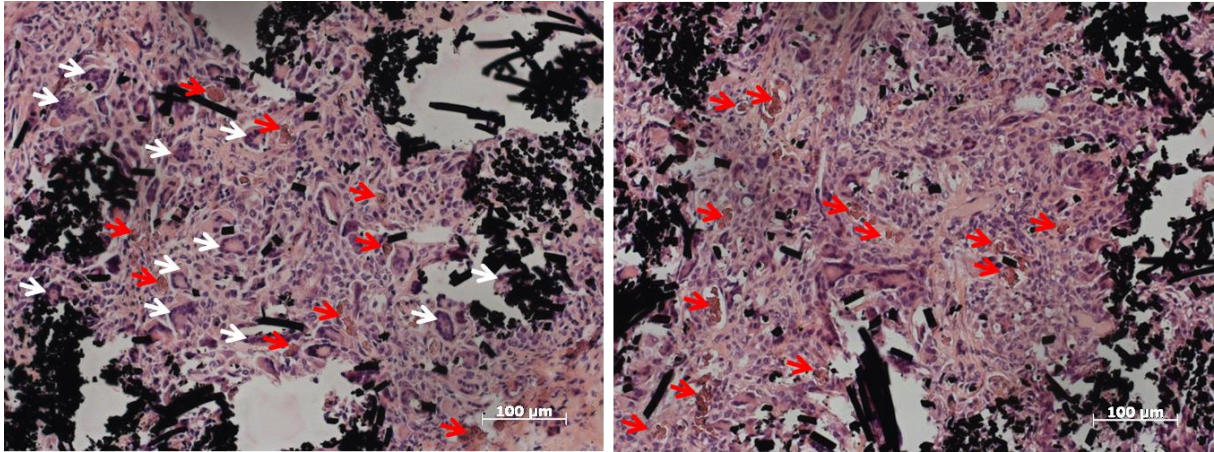


Figure V-8 : Analyse histologique d'un biomatériau TFC/CaP à la surface d'un fémur de rat après 26 jours d'apposition. Présence d'ostéoclastes (flèches blanches) et de vaisseaux sanguins (flèches rouges) à proximités des fibres de carbone.

L'ensemble de ces analyses a ainsi permis d'apprécier le devenir des biomatériaux in vivo après 26 jours, à savoir une bonne tenue mécanique, le maintien en place en l'absence de fixation initiale, l'absence de dégradation du TFC, et la perte de flexibilité en raison d'une colonisation par des tissus biologiques et probablement d'un début d'ossification. Les trois techniques d'analyses, MEB, IRM et histologie, ont permis d'observer l'envahissement du biomatériau par un tissu biologique fortement vascularisé de même que l'absence de réaction inflammatoire anormale et la dissolution totale du revêtement CaP sur l'ensemble du biomatériau. Ces résultats, obtenus sur un très petit échantillon, suggèrent la biocompatibilité des biomatériaux TFC/CaP in vivo à J26 post opératoire.

B.3. Caractérisation de la régénération osseuse

B.3.1. Analyse de la régénération osseuse après 13 jours

Six rats ont été sacrifiés 13 jours après la chirurgie soit 4 fémurs dans chaque groupe. Des clichés radiographiques (Figure V-9) ont été réalisés immédiatement après l'intervention puis après le sacrifice. Les premiers clichés permettent de visualiser le positionnement des défauts osseux et de vérifier l'absence de fracture qui pourrait être provoquée par le fraisage (Figure V-9 a)). Les seconds clichés permettent de vérifier qu'aucun événement indésirable n'a eu lieu (Figure V-9 b)).



Figure V-9 : Radiographies des défauts osseux : a) en post-opératoire et b) après 13 jours de régénération.

Après dissection des fémurs à J13, l'analyse tomographique à basse résolution (80 μm) et haute résolution (6 μm) a été réalisée et la taille du défaut cortical a été mesurée sur une coupe passant par le centre du défaut.

La Figure V-10 représente une coupe tomographique à basse résolution du défaut osseux pour un fémur sans biomatériau. A partir de ce type d'images, la taille du défaut cortical a été mesurée pour tous les fémurs et le pourcentage de cicatrisation corticale calculé dans les trois conditions (Tableau V-1 ; Cf. Annexe 18).

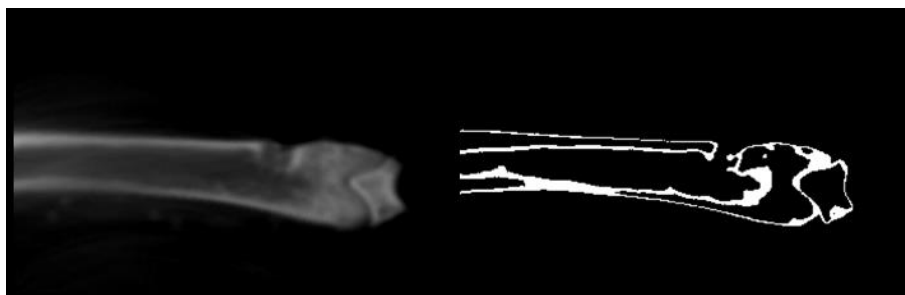


Figure V-10 : Images obtenues avec un microscanner basse résolution (80 μm) pour un fémur de rat sans biomatériau à 13 jours post-opératoire.

Tableau V-1 : Effet des biomatériaux sur la régénération des défauts osseux mesurée par μ -CT basse résolution (80 μm).

Condition	(n)	Taille minimum défaut (mm)	Taille maximum défaut (mm)	Moyenne (mm)	Médiane (mm)	Moyenne % de régénérat.	Médiane % de régénérat.	Défauts comblés
$\emptyset$	4	0	2,70	1,60	1,85	40	31,50	1/4
FM								
50K®+0Sr- CaP	4	2,15	2,70	2,45	2,50	10	8,50	0/4
FM								
50K®+10Sr- CaP	4	2,25	2,55	2,40	2,35	12	13,00	0/4

De façon inattendue c'est dans la condition contrôle sans biomatériau que nous avons constaté le pourcentage de régénération le plus élevé à savoir 40 % contre 10 et 12 % respectivement en présence de biomatériau sans et avec strontium. En effet, dans le groupe contrôle nous avons retrouvé un défaut complètement refermé alors qu'en présence des biomatériaux aucun défaut n'était totalement comblé à J13. En raison du faible nombre d'échantillon (n=4), aucune étude statistique n'a pu être réalisée.

Trois fémurs de chaque groupe ont ensuite été analysés en tomographie à haute résolution (6 μm) (Figure V-11). Les deux échantillons choisis sur cette figure représentent les deux défauts possédant la régénération la plus avancée observée dans leur groupe respectif.

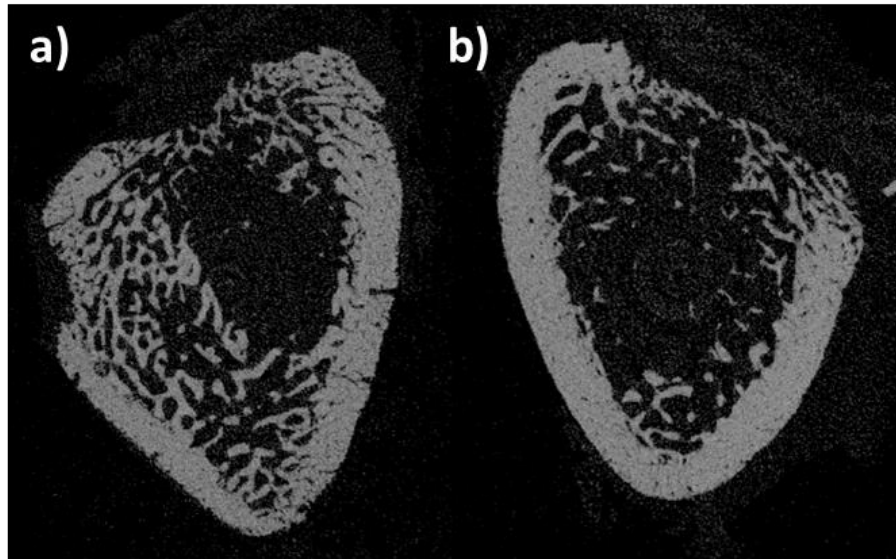


Figure V-11 : Images obtenues par microscanner haute résolution (6 μm) à partir de deux fémurs prélevés à J13 postopératoire: a) sans biomatériau et b) avec biomatériau (FM 50K®+0Sr-CaP).

Cette analyse plus fine a permis de visualiser des niveaux de régénération qui n'étaient pas visibles à basse résolution. En effet, comme le montre la Figure V-11 b), on détecte une formation osseuse qui n'était pas visible à 80 μm (flèche blanche sur la Figure V-12).

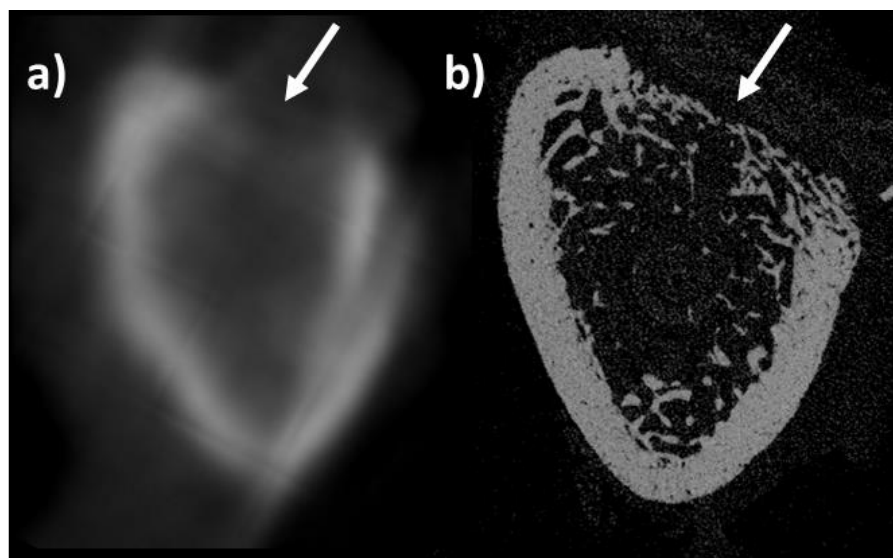


Figure V-12 : Images obtenues à partir du même fémur avec biomatériau (FM 50K®+0Sr-CaP) à J13 postopératoire par microscanner : a) basse résolution (80 μm) et b) haute résolution (6 μm).

Les résultats à haute résolution sont présentés dans le Tableau V-2.

Tableau V-2 : Effet des biomatériaux sur la régénération des défauts osseux à J13 mesurée par μ -CT haute résolution (6 μ m).

Traitement	(n)	Taille minimum défaut (mm)	Taille maximum défaut (mm)	Moyenne (mm)	Médiane (mm)	Moyenne % de régénérat.	Médiane % de régénérat.	Défauts comblés
$\emptyset$	3	0	1,12	0,70	0,98	74	64	1/3
FM								
50K®+0Sr- CaP	3	0	2,10	0,70	0	74	100	2/3
FM								
50K®+10Sr- CaP	3	0	0,99	0,33	0	88	100	2/3

Les résultats obtenus à haute résolution indiquent que le pourcentage moyen de reconstruction est identique pour le groupe contrôle et le groupe FM 50K®+0Sr-CaP mais que le nombre de défauts totalement comblés est plus élevé en présence qu'en absence de biomatériaux. De plus, ils montrent que la régénération la plus forte est obtenue en présence du TFC enrichi en strontium avec respectivement 88 % de régénération contre 74 % dans les deux autres groupes. Le nombre d'échantillon étant trop faible (n=3), aucune étude statistique n'a pu être réalisée.

La tomographie à haute résolution a permis également d'analyser d'autres paramètres du processus de régénération. En effet, sur la Figure V-11 on observe à J13 un os cortical néoformé fin composé d'un réseau discontinu de matière minérale paraissant progresser de l'extérieur vers l'intérieur du défaut.

En réorientant les images pour positionner le défaut osseux de face et en se plaçant dans le plan de l'os cortical, il est possible d'observer l'orientation que suit la reformation osseuse. Les deux fémurs de chaque groupe ayant les régénérations les plus avancées sont représentés (Figure V-13).

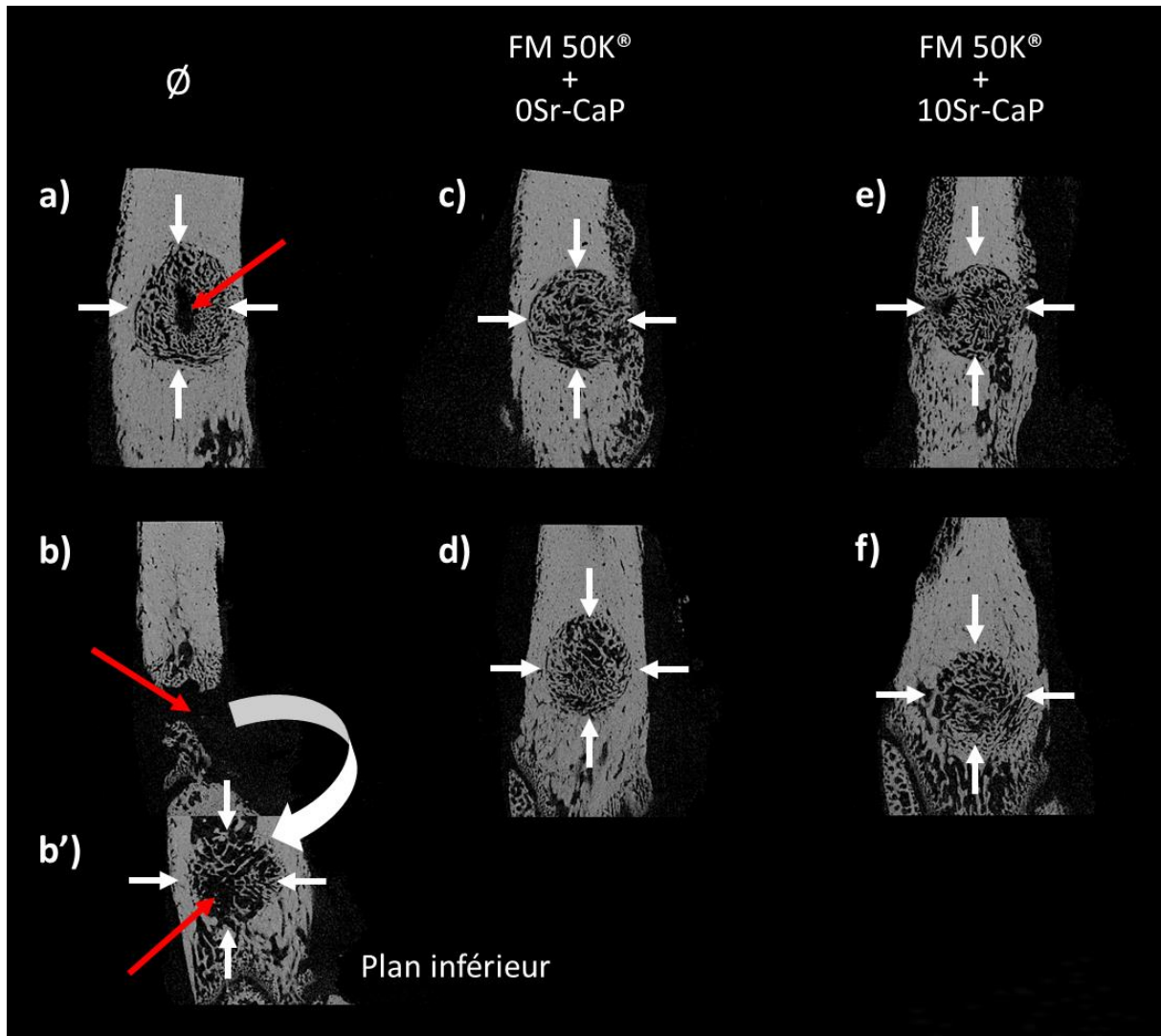


Figure V-13 : Images obtenues par microscanner haute résolution (6 μm) à partir de deux fémurs de chaque condition prélevés à J13 postopératoire. Analyse après orientation dans le plan de l'os cortical : a), b) sans biomatériau ; c), d) avec biomatériau (FM 50K[®]+OSr-CaP) ; e), f) avec biomatériau (FM 50K[®]+10Sr-CaP) et b') sans biomatériau dans un plan inférieur au plan cortical. Les flèches blanches indiquent le sens de la régénération. Les flèches rouges indiquent les zones non régénérées.

Pour les fémurs de la condition contrôle (Figure V-13 a) et b)) nous avons constaté une reconstruction incomplète de la surface corticale. Pour le premier fémur (Figure V-13 a)), l'os s'est reformé de manière centripète (flèches blanches) mais incomplète puisqu'une zone centrale non reconstruite est toujours observable dans ce plan (zone noire indiquée par une flèche rouge). Pour le second fémur (Figure V-13 b)), nous n'avons observé aucune régénération de la surface corticale mais une régénération incomplète en profondeur dans le plan sous cortical, Figure V-13 b').

En présence de biomatériau, FM 50K[®]+OSr-CaP (Figure V-13 c) et d)) ou FM 50K[®]+10Sr-CaP (Figure V-13 e) et f)), la régénération osseuse s'effectue également de manière centripète (flèches blanches) mais complète dans le plan cortical puisque nous observons une fine couche d'os néoformé à la surface de l'ensemble du défaut. Pour tous les fémurs analysés, en présence d'un biomatériau, la régénération

s'effectue de façon homogène de l'extérieur vers l'intérieur du défaut en suivant le plus souvent la courbure osseuse, et correspondant au plan de la surface profonde du biomatériau.

Un fémur des groupes contrôle et traité avec le biomatériau FM 50K®+0Sr-CaP a été analysé par IRM du ^1H (Figure V-14). Les coupes ont été réalisées à la surface de l'os cortical qui ressort en IRM ^1H en gris foncé (zone indiquée par des flèches oranges). Pour rappel, en gris clair sont retrouvés les tissus biologiques. Le défaut osseux est très nettement visible dans les 2 cas (sous forme de rond d'un diamètre de 2,7 mm). Sur ce plan, il est composé d'un mélange d'os néoformé (gris foncé) et de tissus biologiques (gris clair). Une lecture attentive montre que la reconstruction de l'os néoformé procède de l'extérieur vers l'intérieur du défaut (sens indiqué par les flèches blanches). En présence du biomatériau (Figure V-14 b)), la régénération osseuse semble plus marquée. Cette différence de contraste pourrait être expliquée par une régénération légèrement plus avancée et dans le plan de l'os cortical comme observé sur les images de μ -CT (Figure V-13).

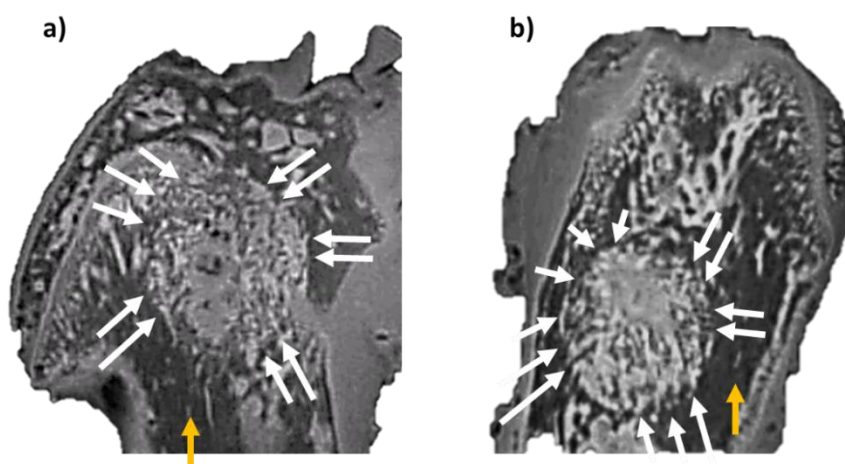


Figure V-14 : Images obtenues par IRM à partir de fémurs dans les conditions : a) sans biomatériau ; et b) avec biomatériau 0Sr-CaP. Gris clair : Tissus biologiques et gris foncé : Os cortical. Flèche blanche : Sens de la reconstruction osseuse. Flèche jaune : os cortical. (Paramètres séquence : TR= 8ms, NS = 64, Temps d'acquisition = 40 h).

En conclusion, les images obtenues à J13 grâce aux microscanners basse et haute résolution ont permis de calculer le pourcentage moyen de reconstruction de l'os cortical. Dans les deux cas, au vu de la grande dispersion des résultats et du petit nombre de fémurs analysés, nous avons obtenu peu d'informations quantitatives définitives sur l'effet des biomatériaux sur la régénération osseuse. Cependant, les résultats suggèrent que le biomatériau enrichi en strontium induirait la meilleure régénération. Les analyses au microscanner associées aux analyses IRM suggèrent principalement que la régénération induite est de type centripète et que la régénération en présence d'un biomatériau se fait plus facilement dans le plan de l'os cortical. En revanche, en l'absence de biomatériau la régénération du défaut n'est jamais complète dans le plan cortical mais peut être observée en profondeur.

B.3.2. Analyse de la régénération osseuse après 26 jours

Dix-huit rats ont été sacrifiés à J26 post opératoire. Les fémurs disséqués ont été analysés avec les mêmes techniques qu'à J13. L'analyse en tomographie à basse et haute résolution (80 et 6 μ m respectivement) a permis de calculer le pourcentage de régénération par la mesure de la taille résiduelle du défaut cortical sur une coupe passant par le centre du défaut. Les résultats sont présentés dans le Tableau V-3.

Tableau V-3 : Effet des biomatériaux sur la régénération des défauts osseux à J26 par μ -CT basse et haute résolution (80 vs 6 μ m). La partie droite du tableau correspondant au nombre de fémur dans les différentes gammes de pourcentage de régénération de la surface de l'os cortical associé à chaque condition à basse et à haute résolution.

% de régénération		Moy. (%)	Nombre de fémur associé	0≤x<50	50≤x<75	75≤x<100	100	(n)
μ -CT - 80 μ m	∅	71		2	4	2	3	11
	FM 50K®+0Sr-CaP	76		2	4	0	6	12
	FM 50K®+10Sr-CaP	85		2	1	0	9	12
μ -CT – 6 μ m	∅	69		1	7	0	3	11
	FM 50K®+0Sr-CaP	87		1	1	3	7	12
	FM 50K®+10Sr-CaP	88		0	3	2	7	12

A basse résolution, le pourcentage moyen de reconstruction mesuré à J26 est respectivement de 71 % sans biomatériau, 76 %, et 85 % en présence des biomatériaux FM 50K®+0Sr-CaP et FM 50K®+10Sr-CaP. La différence entre la condition contrôle et les conditions FM 50K®+0Sr-CaP et FM 50K®+10Sr-CaP est liée au nombre de défauts totalement comblés (3, 6 et 9 respectivement). Bien que nous n'ayons pas trouvé de significativité statistique avec les méthodes utilisées, ces résultats suggèrent fortement que la reconstruction osseuse est améliorée en présence des biomatériaux et surtout en présence des biomatériaux enrichis en Sr²⁺.

A haute résolution, les pourcentages moyens de reconstruction sont similaires à ceux obtenus à basse résolution pour les conditions contrôle et FM 50K®+10Sr-CaP, avec respectivement 69 % et 88 %. En revanche, pour la condition FM 50K®+0Sr-CaP, ce pourcentage est de 87 % au lieu de 76 % et devient ainsi similaire pour les deux biomatériaux. Les moyennes obtenues ici suggèrent que la régénération est accélérée en présence d'un biomatériau et qu'elle est similaire quel que soit le type de revêtement. Les résultats obtenus à haute résolution (6 μ m) sont détaillés dans le Tableau V-4.

Tableau V-4 : Comparaison des trois conditions sur la régénération des défauts osseux par μ -CT à haute résolution (6 μ m).

Traitement	(n)	Taille minimum défaut (mm)	Taille maximum défaut (mm)	Moyenne (mm)	Médiane (mm)	Moyenne % de régénérat.	Médiane % de régénérat.	Défauts comblés
$\emptyset$	11	0	1,70	0,83	1,00	69	65	3/11
FM								
50K®+0Sr- CaP	12	0	1,70	0,35	0	87	100	7/12
FM								
50K®+10Sr- CaP	12	0	1,00	0,32	0	88	100	7/12

Au vu des différents paramètres étudiés, nous pouvons conclure qu'à J26 la régénération osseuse est améliorée en présence des biomatériaux par rapport aux contrôles. Le fait que la dispersion des résultats soit plus faible dans la condition FM 50K®+10Sr-CaP suggère une amélioration plus reproductible de la reconstruction en présence de Sr^{2+} .

Afin d'affiner l'analyse comparative de la régénération osseuse entre les 3 groupes et plus particulièrement entre les 2 biomatériaux, nous avons procédé aux analyses suivantes : 1) analyse de la morphologie de la reconstruction, 2) comparaison des résultats de façon intra individuelle en comparant 2 conditions différentes appliquées sur les fémurs d'un même rat ; et 3) mesure de l'épaisseur de l'os néoformé.

L'étude de la morphologie de la régénération à J26 nous a permis de distinguer 4 types de reconstruction (Figure V-15) : 1) Persistance d'un défaut profond, 2) Régénération avec une dépression de surface, 3) Reconstruction corticale totale de type « rectiligne » et 4) Reconstruction corticale totale de type « naturelle » respectant la forme naturellement arrondie de la diaphyse fémorale.

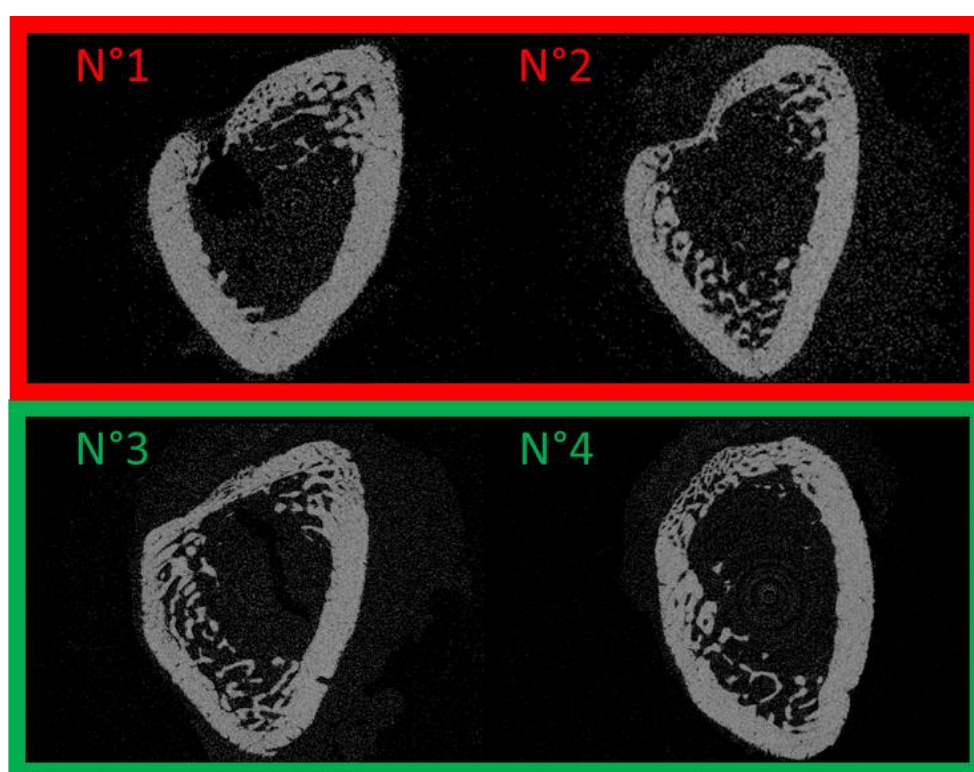


Figure V-15 : Différentes morphologies de reconstruction de l'os cortical à J26.
N°1 : Défaut profond
N°2 : Dépression de surface
N°3 : Régénération totale « rectiligne »
N°4 : Régénération totale « naturelle »

La répartition des fémurs analysés entre ces 4 types morphologiques est reportée dans le Tableau V-5.

Tableau V-5 : Répartition des fémurs par type morphologique à J26.

Type n°		1	2	3	4	Total
Traitement	∅	4	4	1	2	11
	FM 50K®+0Sr-CaP	2	3	4	3	12
	FM 50K®+10Sr-CaP	0	5	2	5	12

En l'absence de traitement, 73 % des régénérations ont une morphologie correspondant aux types 1 (n=4) ou 2 (n=4) et 27 % aux types 3 (n=1) ou 4 (n=2). En présence de biomatériau, 58 % des reconstructions ont une morphologie de type 3 ou 4 (n=7). La comparaison des biomatériaux entre eux montre que celui enrichi en strontium, FM 50K®+10Sr-CaP, favorise la morphologie de type 4 respectant la courbure naturelle du fût diaphysaire fémoral. En effet, nous avons constaté moins de reconstructions de type 1 et plus de reconstructions de type 4 en présence de Sr²⁺.

La comparaison de deux conditions différentes appliquées sur le même animal (comparaison intra individuelle) est représentée dans le Tableau V-6. Ceci représente 15 cas sur les 18 rats sacrifiés à J26.

Tableau V-6 : Comparaison de deux conditions différentes sur le même animal à J26. La comparaison est réalisée en confrontant les pourcentages de reconstruction de l'os cortical correspondants.

Cas	∅ VS FM 50K®+0Sr-CaP		∅ VS FM 50K®+10Sr-CaP		FM 50K®+0Sr-CaP VS FM 50K®+10Sr-CaP	
	∅	FM 50K® + 0Sr-CaP	∅	FM 50K® + 10Sr-CaP	FM 50K® + 0Sr-CaP	FM 50K® + 10Sr-CaP
N°1	ND	+100%	-	+100%	=100%	
N°2	-	+100%	=100%		+100%	-
N°3	-	+	=		-	+100%
N°4	-	+100%	-	+100%	-	+100%
N°5	-	+	-	+	-	+

= : % reconstruction identique ;
+ : % reconstruction plus élevé ;
- : % de reconstruction plus faible ;

=100% : % reconstruction identique avec 100% de reconstruction ;
+100% : % reconstruction le plus élevé avec 100% de reconstruction ;
ND : Fracture fémorale.

Lorsqu'une régénération sans biomatériau est comparée à une régénération en présence de biomatériau ($\emptyset$ vs FM 50K®+0Sr-CaP et $\emptyset$ vs FM 50K®+10Sr-CaP), la régénération en présence d'un biomatériau est toujours meilleure qu'en condition contrôle. La comparaison des biomatériaux entre eux suggère que la régénération est supérieure en présence de strontium.

Enfin l'analyse de l'épaisseur de l'os néoformé a été réalisée sur une coupe de μ -CT passant par le centre du défaut. L'épaisseur a été mesurée au centre et aux deux extrémités de la zone d'os néoformé (Figure V-16).

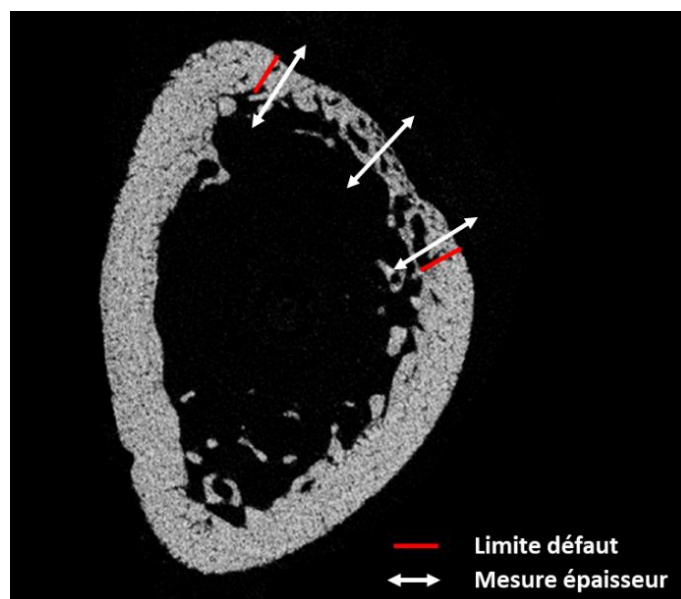


Figure V-16 : Mesure de l'épaisseur de l'os cortical néoformé à partir d'images obtenues par microscanner haute résolution.

Les résultats de la mesure de l'épaisseur de l'os cortical néoformé selon la condition sont regroupés dans le Tableau V-7.

Tableau V-7 : Analyse tomographique de l'épaisseur de l'os cortical néoformé en fonction du traitement.

Traitement	Epaisseur (μ m)			
	Extrémité G	Milieu	Extrémité D	Moyenne
$\emptyset$	385	200	370	320
FM 50K®+0Sr-CaP	395	285	435	370
FM 50K®+10Sr-CaP	460	330	470	420

Ces résultats montrent que l'os cortical néoformé est plus épais en présence d'un biomatériau et qu'il est plus épais en présence du biomatériau enrichi en strontium. L'augmentation d'épaisseur moyenne est respectivement de 15 % et 30 % en présence du biomatériau FM 50K®+0Sr-CaP et FM 50K®+10Sr-CaP par rapport à l'épaisseur de la reconstruction sans biomatériau.

Ces résultats montrent aussi que l'épaisseur mesurée au centre de la zone d'os néoformé est toujours inférieure à l'épaisseur mesurée sur les bords du défaut et que cette différence est diminuée en présence d'un biomatériau. En effet, l'épaisseur de la zone centrale est la plus impactée par la présence d'un biomatériau avec +42,5 % et +65 % correspondant au biomatériau FM 50K®+0Sr-CaP et FM 50K®+10Sr-CaP respectivement.

Nous avons cherché à savoir si ces différences pouvaient être visualisées en IRM ¹H. Pour cela, nous avons analysé un fémur représentatif du groupe contrôle et un fémur du groupe FM 50K®+0Sr-CaP. La représentativité correspond, dans notre cas, à une reconstruction possédant une morphologie et une épaisseur de l'os néoformé les plus souvent retrouvés dans sa condition. Les images IRM sont présentées sur la Figure V-17.

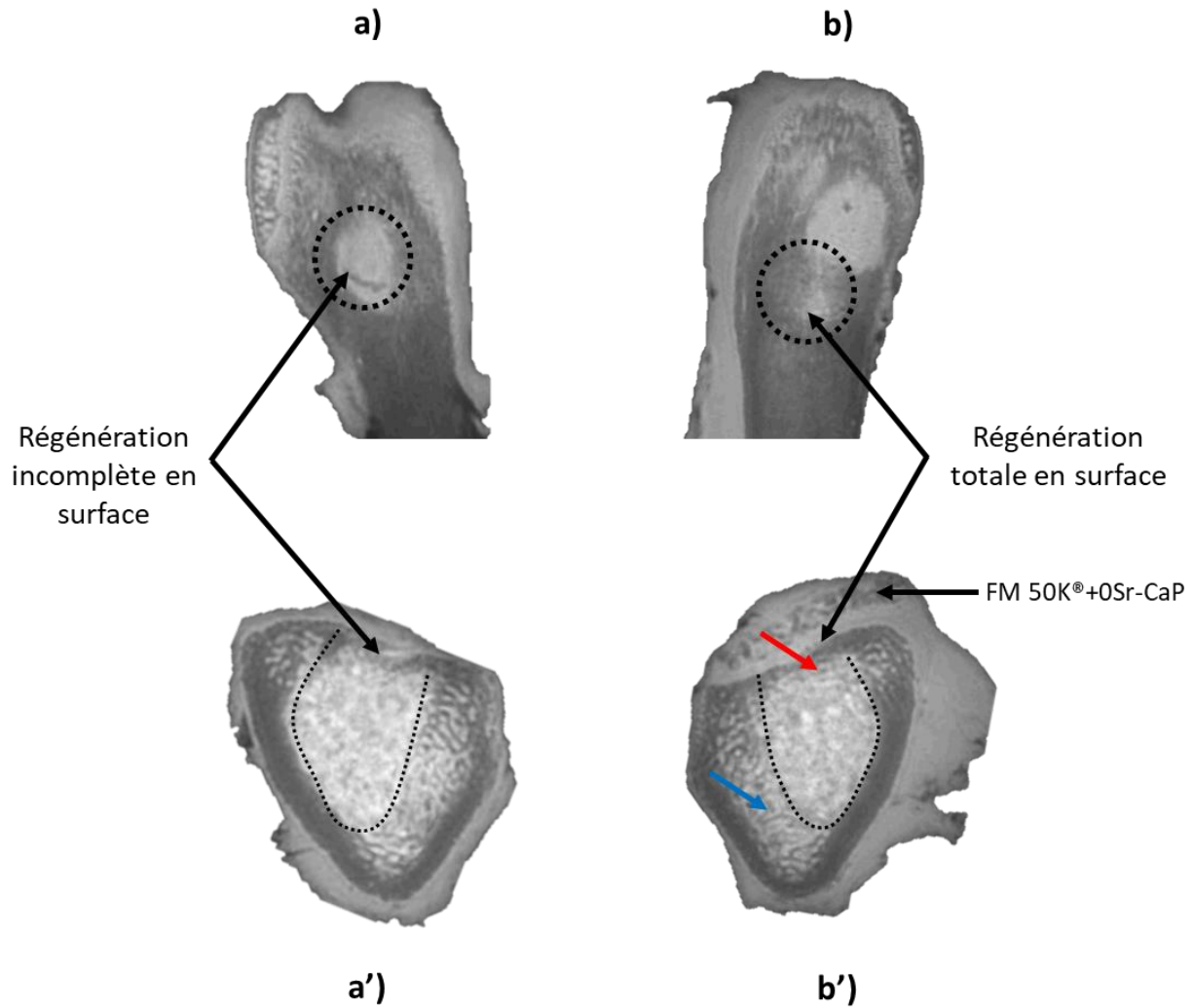


Figure V-17 : Analyse par IRM de défauts osseux à J26 : a), a') sans biomatériau et b), b') avec biomatériau FM 50K®-0Sr-CaP. a) et b) : coupe sagittale et a') et b') : coupe transversale. Les pointillés noirs indiquent la délimitation du défaut osseux créé. Les flèches rouge et bleu indiquent deux zones, à l'intérieur et à l'extérieur du défaut, possédant un environnement chimique proche (Paramètres séquence : TR= 8ms, NS = 64).

Les échantillons étant représentatifs de leur groupe, le défaut de surface est retrouvé sur le fémur sans biomatériau (Figure V-17 a) et a')) et une régénération complète est observée dans le cas du fémur avec un biomatériau (Figure V-17 b) et b')).

Les images IRM ^1H permettent également de visualiser l'environnement chimique dans toute la profondeur du défaut (Figure V-17 a') et b')). Dans le cas du fémur sans biomatériau (Figure V-17 a')), la différence entre l'environnement dans la zone du défaut (à l'intérieur des pointillés noirs) et celle de la zone native (à l'extérieure des pointillés noirs) semble plus contrastée que dans le cas du traitement avec un biomatériau. De plus, dans le cas du fémur avec un biomatériau (Figure V-17 b')), l'environnement sous l'os néoformé (flèche rouge) semble très peu différenciable de celui de l'environnement natif (flèche bleu).

Enfin, nous avons exploré la nature chimique de l'os néoformé en fonction du traitement à l'aide d'un microscope RAMAN confocal. Pour ce faire, dans chaque groupe nous avons sélectionné un fémur pour lequel la régénération était complète et le défaut refermé. L'analyse a été effectuée sur une coupe de fémur passant par le centre du défaut. Une analyse en profondeur du défaut a été réalisée et comparée à une analyse sur os natif (Figure V-18). Les spectres ont ensuite été comparés afin d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'os en chaque point (Figure V-19). Les analyses détaillées présentées sur la Figure V-18 et la Figure V-19 correspondent à un os ayant reçu le pansement FM 50K®+10Sr-CaP. Le comparatif des traitements est ensuite présenté Figure V-20.

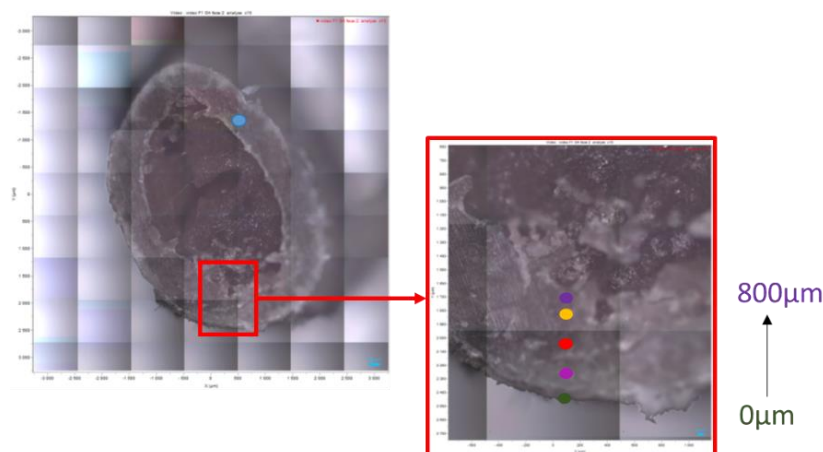


Figure V-18 : Différents points d'analyses effectués lors de l'analyse par spectroscopie RAMAN sur un fémur prélevé à J26. Points vert à violet : Mesures ponctuelles dans la profondeur de l'os néoformé (800 µm de profondeur). Point bleu : Mesure sur l'os natif.

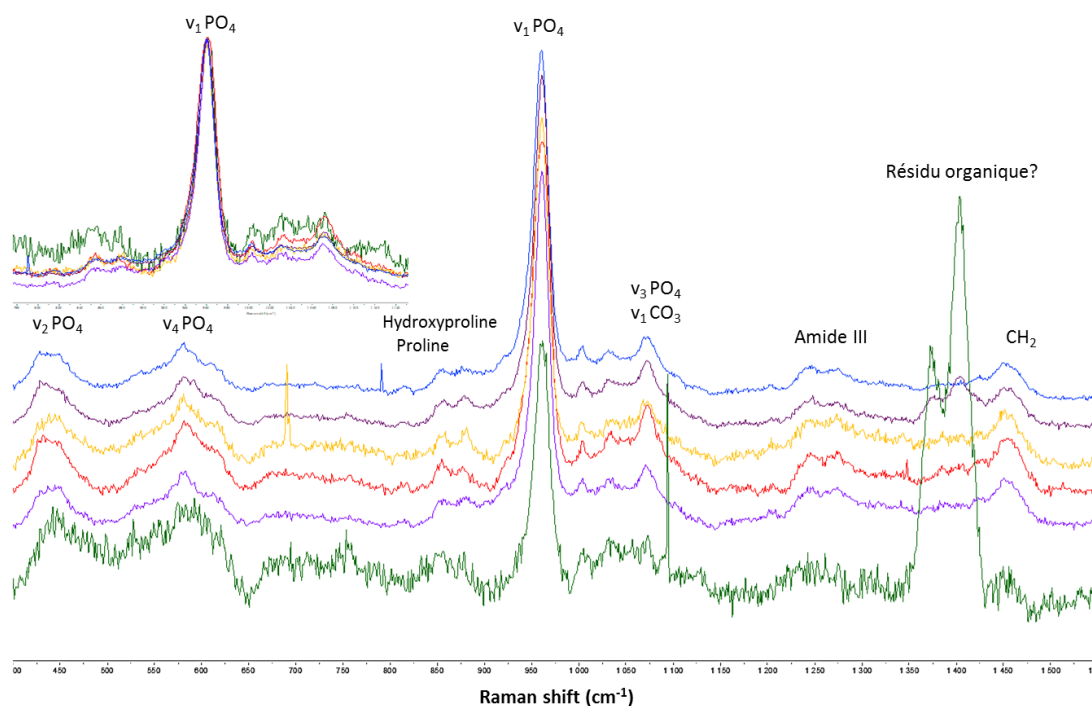


Figure V-19 : Spectres RAMAN d'un fémur de rat du groupe FM 50K®+10Sr-CaP à J26. Spectres vert à violet : spectres correspondant aux mesures ponctuelles dans la profondeur de l'os néoformé. Spectre bleu : spectre de l'os natif. Encart : Zoom sur les pics superposés v₁ des phosphates.

Les résultats indiquent que les spectres correspondant aux analyses réalisées en profondeur du défaut ou sur l'os natif sont similaires. Aucun élargissement significatif de la ν_1 des phosphates n'est observé et aucun déplacement en nombre d'ondes n'est également observé entre les spectres. En conclusion, pour un fémur de la condition FM 50K®+10Sr-CaP, quelle que soit la zone analysée, aucune différence entre la nature de l'os néoformé par rapport à celle l'os natif n'a été observée.

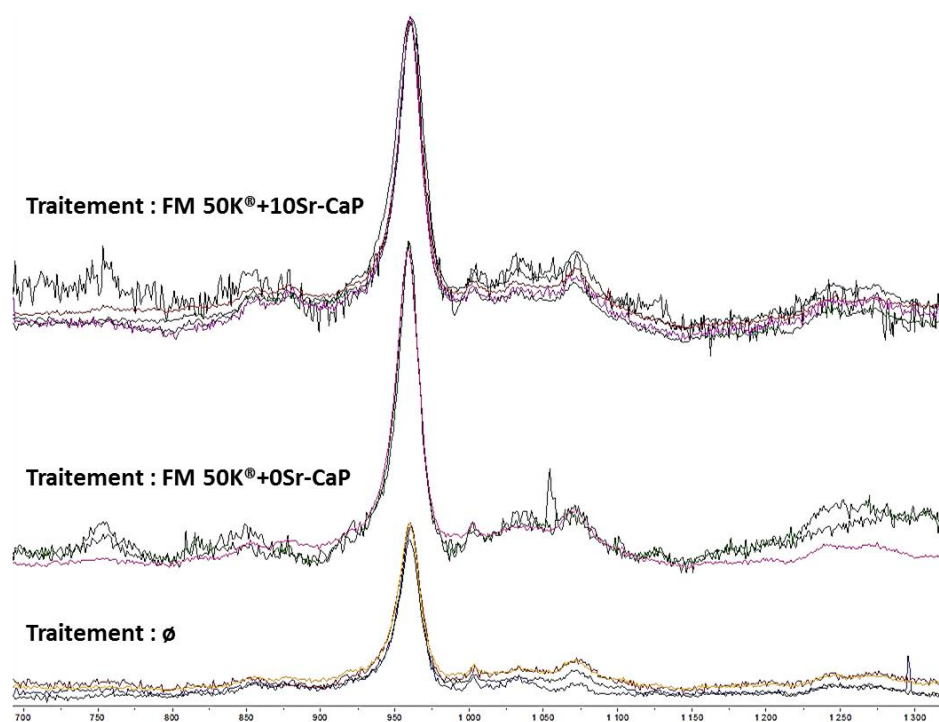


Figure V-20 : Spectres RAMAN en différents points d'un fémur de rat selon le traitement appliqué.

L'analyse des trois conditions n'a montré aucune différence significative. La bande ν_1 des phosphates, la largeur à mi-hauteur et la fréquence de chaque bande sont identiques pour tous les échantillons analysés. Les proportions carbonate et/ou amides ou proline sur phosphates sont également similaires pour tous les échantillons.

En conclusion, lorsque la reconstruction est totale à J26, l'os néoformé est de même nature chimique dans les trois conditions et similaire à celle de l'os natif. La présence du biomatériau ne modifie pas la composition chimique de l'os néoformé.

Pour terminer, nous avons comparé deux images de tomographie haute résolution et deux images d'IRM ^1H dans les mêmes conditions à J13 et J26. La Figure V-21 illustre la différence de régénération entre les deux temps de l'expérience.

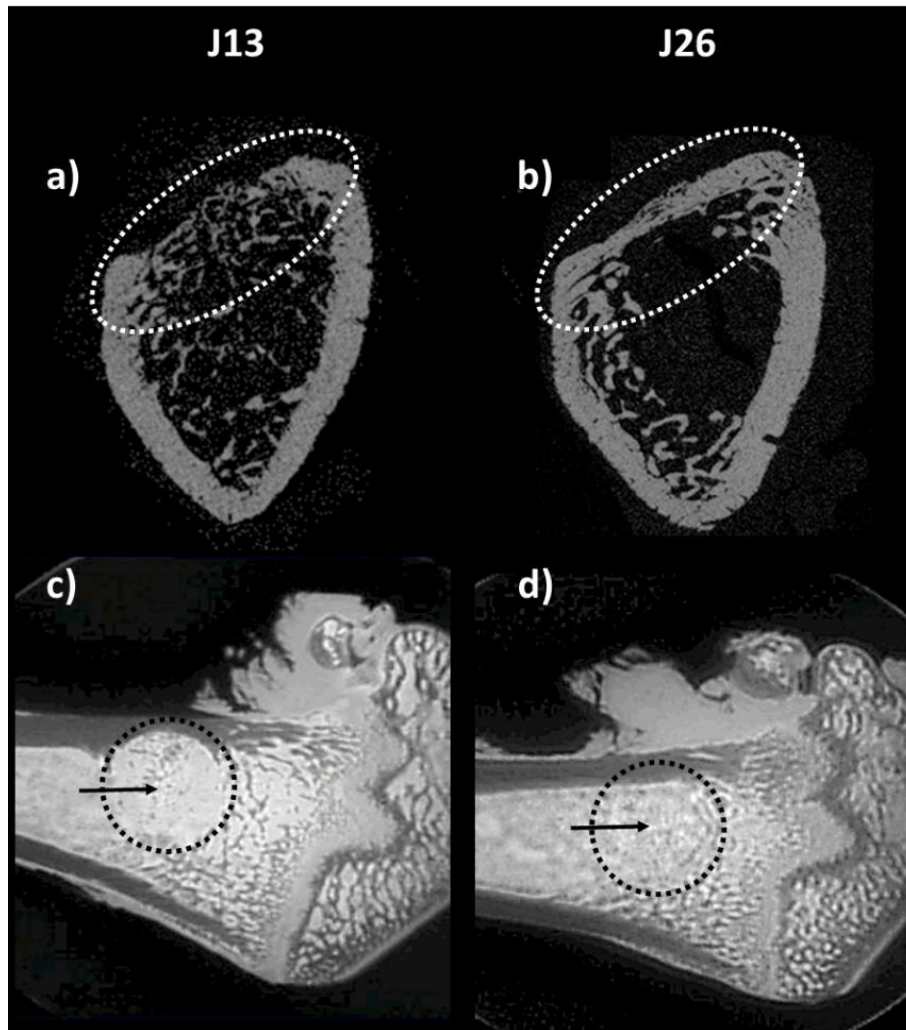


Figure V-21 : Différence de régénération entre J13 et J26 après apposition du biomatériau (FM 50K+0Sr+CaP). a), b) Images par microscanner haute résolution (6 μm). c), d) Images par IRM du ^1H (Paramètres séquence : TR= 8ms, NS = 64).

À J26, les images de microscanner illustrent une reformation osseuse plus marquée qu'à J13 avec notamment une épaisseur d'os néoformé beaucoup plus importante (zone indiquée en pointillés blancs sur la Figure V-21 a) et b)). Les images d'IRM sélectionnées dans le même plan, illustrent une différence d'environnement chimique notable à l'intérieur du défaut entre les 2 temps (zone indiquée en pointillés noirs sur la Figure V-21). En effet, l'environnement chimique dans le défaut à J13 (flèche noire) est fortement différent de l'environnement à l'extérieur (Figure V-21 c)). En revanche à J26, la différence d'environnement chimique entre l'intérieur et l'extérieur du défaut apparaît plus nuancée (Figure V-21 d)).

Ces images confirment que la régénération est bien plus avancée à J26 et confirment l'intérêt d'avoir mené l'expérience jusqu'à ce temps.

C. Discussion

Dans cette étude, 24 rats répartis en trois groupes ont été opérés afin de créer un défaut osseux de 2,7 mm de diamètre sur la partie distale de chaque fémur. Dans deux groupes, le défaut a été recouvert d'un biomatériau correspondant soit au FM 50K®+0Sr-CaP soit au FM 50K®+10Sr-CaP. Dans le troisième groupe servant de contrôle, aucun biomatériau n'a été utilisé. Six rats ont été sacrifiés à J13 et 18 rats à J26. La régénération de l'os cortical a été analysée aux deux temps et le devenir des biomatériaux à J26 uniquement.

Concernant la biocompatibilité du biomatériau à J26, l'observation des tissus biologiques environnant n'a mis en évidence aucune réaction inflammatoire. Aucune différence macroscopique n'est observée entre un membre inférieur ayant eu ou non un biomatériau. Lors de la dissection des fémurs, nous avons constaté que tous les biomatériaux étaient restés en place, qu'aucun ne s'était déplacé hors de la zone d'implantation. Tous les biomatériaux étaient recouverts d'une couche de tissu biologique qui a dû être disséquée lorsque nous avons voulu récupérer le biomatériau pour analyse. Cette membrane n'était pas inflammatoire à l'examen macroscopique. Après excision, nous avons observé que le biomatériau était devenu rigide et possédait la morphologie de la zone osseuse qu'il recouvrait, formant une sorte de moulure de la surface osseuse. Le biomatériau, lors de son implantation, épousait donc parfaitement la surface de l'os permettant un contact fort avec la diaphyse fémorale. Les images en MEB, IRM ainsi que l'analyse histologique ont confirmé la colonisation du biomatériau par du tissu vivant et actif. Les images MEB montrent également qu'après 26 jours d'implantation, le revêtement de CaP a disparu de la surface des fibres de carbone. Ceci suggère que le revêtement s'est dissout au cours du temps et a pu participer à la régénération de l'os cortical par l'intermédiaire des précurseurs PO_4^{3-} , Ca^{2+} et éventuellement Sr^{2+} . Ce relargage de précurseurs a pu favoriser voire accélérer la régénération osseuse. Il aurait été intéressant de faire les mêmes observations à J13 afin de connaître la cinétique de dissolution du revêtement de CaP *in vivo*. L'analyse histologique confirme la très bonne biocompatibilité des biomatériaux. Elle a permis d'observer une invasion totale du pansement par un grand nombre de cellules fibroblastiques, de nombreux néo vaisseaux ainsi que de nombreux ostéoclastes. La présence d'ostéoclastes est une réaction normale après implantation d'un élément étranger mais reflète aussi probablement un début d'ossification. La vascularisation est un indicateur majeur de la bonne intégration d'un biomatériau.

Après 13 jours, les 6 premiers rats sont sacrifiés et la reconstruction de l'os cortical est étudiée. La régénération du défaut osseux est globalement incomplète et les résultats de tomographie ne montrent pas de différences significatives entre les 3 groupes. Cependant, l'analyse après 13 jours d'implantation a été propice à l'étude du processus de reconstruction. En effet, en tomographie, nous

avons constaté que la régénération progressait de l'extérieur vers l'intérieur du défaut. Cependant, dans les cas étudiés, lorsqu'aucun biomatériau n'est appliqué, aucune régénération n'est complète dans le plan cortical avec absence d'os néoformé dans la région centrale du défaut. Ces conclusions sont confirmées par les images d'IRM. L'hypothèse que nous émettons pour expliquer ce phénomène, est que le biomatériau joue le rôle de « guide » de la régénération osseuse. En épousant la forme de l'os il forme une « pseudo membrane » ou un « pansement » qui peut faciliter la reconstruction. En d'autres termes, la régénération pourrait être guidée par le biomatériau dans le prolongement de la corticale.

Après 26 jours, environ 25 % des défauts sont totalement refermés dans la condition témoin, contre 60 % dans les deux conditions avec biomatériau. Le pourcentage moyen de reconstruction augmente d'environ 20 % lorsqu'un biomatériau est appliqué et les comparaisons sur un même animal (2 traitements différents sur un même rat) confirment cet effet. L'application du biomatériau a également un effet sur la morphologie de l'os néoformé puisque lorsqu'un « pansement » est appliqué, la régénération adopte la forme naturellement arrondie de la diaphyse fémorale. Pour tous les groupes, l'épaisseur centrale de l'os néoformé est toujours plus faible que l'épaisseur mesurée en bordure du défaut mais l'influence des biomatériaux est plus importante au centre (+42,5 % et +65 %) que sur les côtés (+10 % et +23 %). Cet effet sur l'épaisseur de l'os régénéré renforce la notion d'effet « matrice » du biomatériau et ces résultats sont cohérents avec une régénération centripète. Les images IRM confirment ces résultats et apportent de nouvelles informations notamment sur l'environnement chimique à l'intérieur de l'os. En présence de biomatériau, l'environnement chimique dans le défaut est proche d'un environnement d'os natif, contrairement à ce que l'on observe en absence de biomatériau. Cependant, ces résultats IRM seront à confirmer du fait qu'ils ont été réalisés sur un seul échantillon représentatif de chaque groupe. Enfin, des analyses par spectroscopie RAMAN ont été réalisées sur un fémur de chaque groupe possédant un défaut totalement régénéré. Aucune différence concernant la nature de l'os n'est visible, ni entre un os néoformé et un os natif, ni dans la profondeur de l'os néoformé, ni entre les différents groupes. Les biomatériaux ne modifient pas la nature chimique de l'os régénéré.

Il est important de rappeler que les analyses IRM ^1H et RAMAN n'ont pas été réalisées sur les mêmes fémurs, ni même sur des os ayant les mêmes caractéristiques de régénération. Une comparaison des résultats n'a donc pu être réalisée. Cependant, ces premiers résultats montrent l'intérêt de coupler ces deux techniques pour étudier la cinétique de régénération des défauts en absence et en présence des biomatériaux.

Enfin, concernant l'effet du strontium sur la régénération de ces défauts, nos résultats suggèrent que le dopage en strontium (FM 50K®+10Sr-CaP) potentialise la régénération osseuse à la fois en surface et en épaisseur avec une morphologie osseuse mieux respectée. Le Sr^{2+} incorporé dans le biomatériau pourrait jouer son rôle en tant qu'élément favorisant la différenciation et la prolifération des ostéoblastes [90]. L'analyse des coupes histologiques qui est en cours devrait permettre de savoir si un plus grand nombre d'ostéoblastes sont présents entre le pansement et le défaut osseux.

En conclusion, les deux biomatériaux que nous avons appliqués comme des « pansements osseux », le FM 50K®+0Sr-CaP et le FM 50K®+10Sr-CaP, ont eu un effet de guide de la régénération et ont permis d'obtenir :

- Une augmentation du taux de régénération ;
- Une augmentation du nombre de défauts totalement refermés ;
- Une augmentation d'épaisseur de l'os néoformé ;

par rapport à une reconstruction « naturelle » et le Sr^{2+} semble être un dopage prometteur pour potentialiser ces effets.

Conclusion et Perspectives

Sommaire

Conclusion	201
Perspectives	208
A. Perspectives « directes »	208
A.1. Dopage des constituants du matériau hybride	208
A.2. Expérimentation animale	209
B. Perspectives « indirectes »	210
B.1. Autre méthode de synthèse : Exemple de la « pyrolyse spray »	211
B.1.1. Dispositif et principe	211
B.1.2. Paramètres expérimentaux	213
B.1.3. Résultats préliminaires	213
B.2. Caractérisation mécanique : Exemple du « choc laser »	215
B.2.1. Principe du « choc laser »	215
B.2.2. Caractéristiques techniques	215
B.2.3. Résultats et discussions préliminaires	216

Conclusion

L'ensemble des différents résultats de ces travaux de thèse peuvent être scindés en deux grandes parties :

- l'élaboration et les caractérisations physico-chimiques, microtexturales et structurales des matériaux hybrides ;
- l'évaluation du comportement biologique de ces mêmes matériaux.

La première partie a consisté à élaborer, puis à caractériser, le matériau hybride ; tissu de fibres de carbone / phosphate de calcium, mais également chacun de ces constituants d'un point de vue physico-chimique, microtextural et structural. Ensuite, un dopage ciblé de chacun des constituants a été réalisé.

La connaissance des matériaux de base a été indispensable pour appréhender les mécanismes de sono-électrodéposition, mais également pour envisager, puis effectuer un dopage en principes actifs de ceux-ci. Sans cette connaissance des matériaux, l'interprétation des résultats des tests *in vitro* n'aurait pas été possible. De plus, afin d'envisager toute implantation chez l'animal, et tout protocole chirurgical, une vision complète des caractéristiques du tissu de fibre de carbone et du revêtement de CaP est nécessaire.

Tout d'abord, la caractérisation des deux tissus de fibres de carbone (KIP 1200® et FM 50K®) a montré que chacun d'entre eux possède une microporosité et une faible compacité. Cependant le FM 50K® possède un ensimage en surface des fibres (Al et Zn) qui, a priori, n'impacte pas la biocompatibilité du matériau. Il possède également un taux d'oxygène en surface bien plus important que le KIP 1200®, qui jouerait un rôle sur la meilleure adhésion et la biocompatibilité du tissu FM 50K®. A son avantage également, le FM 50K® possède une architecture tricotée qui est plus intéressante lors de sa manipulation.

L'élaboration d'un revêtement de phosphate de calcium sur tissu de fibres de carbone ayant fait l'objet d'une précédente thèse [6], une connaissance et une maîtrise du procédé existait déjà au démarrage de cette étude. Cependant, aucun matériau hybride élaboré jusqu'à présent ne possédait une homogénéité de revêtement, que ce soit d'un point de vue recouvrement sur l'ensemble de la fibre ou du tissu, mais également en termes d'épaisseur. C'est pourquoi, une nouvelle optimisation du procédé d'élaboration a été mise en place. Les rôles de la durée de polarisation en mode galvanostatique, du mode de polarisation (potentiel constant en mode potenstiosatique) et de la température de l'électrolyte ont donc été étudiés.

En additionnant l'optimisation de ces trois paramètres, c'est-à-dire 6 h, -1 V et 70 °C, un revêtement d'hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) et carbonatée, homogène sur l'ensemble du tissu, des fibres de carbone et en épaisseur, a été obtenu (Figure 1). En comparaison avec les résultats antérieurs, les mécanismes réactionnels intervenant au cours de la sono-électrodéposition ont été proposés, ainsi que les relations entre ces mécanismes et l'ensemble des caractéristiques du revêtement. Pour résumer, 6 h est le temps minimum afin d'obtenir un recouvrement homogène sur la fibre de carbone. Après 6 h, des excroissances apparaissent à la surface du revêtement. Ces excroissances peuvent, en plus de créer une hétérogénéité de surface, créer des ponts entre les fibres. Ceci entraîne donc une perte de flexibilité du matériau et augmente ainsi le nombre de débris de phosphate de calcium lors de la manipulation de celui-ci. En mode potenstiosatique, le potentiel constant appliqué lors de la sono-électrodéposition est un paramètre clé permettant un contrôle de l'épaisseur. En effet, en dessous du potentiel de l'électrolyse de l'eau un revêtement très fin est obtenu (-0,8 V). Au-dessus de ce potentiel un revêtement très épais est obtenu (-1,2 V). A la frontière du potentiel de l'électrolyse de l'eau (-1 V), un revêtement intermédiaire est obtenu possédant une grande homogénéité au niveau du tissu de carbones et des fibres de surface et surtout peu d'excroissances. Ces expériences confirment que l'électrolyse de l'eau est la « clé » de la sono-électrodéposition et que travailler au plus proche de cette électrolyse permet de contrôler les mécanismes réactionnels, afin d'obtenir un revêtement totalement homogène. L'influence du substrat a également été étudiée. Dans ces paramètres de synthèse optimisés, le même revêtement est déposé sur les deux tissus. L'image MEB présentée ci-dessous, illustre parfaitement un revêtement d'hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) et carbonatée déposé par sono-électrodéposition à -1 V pendant 6 h à 70 °C.

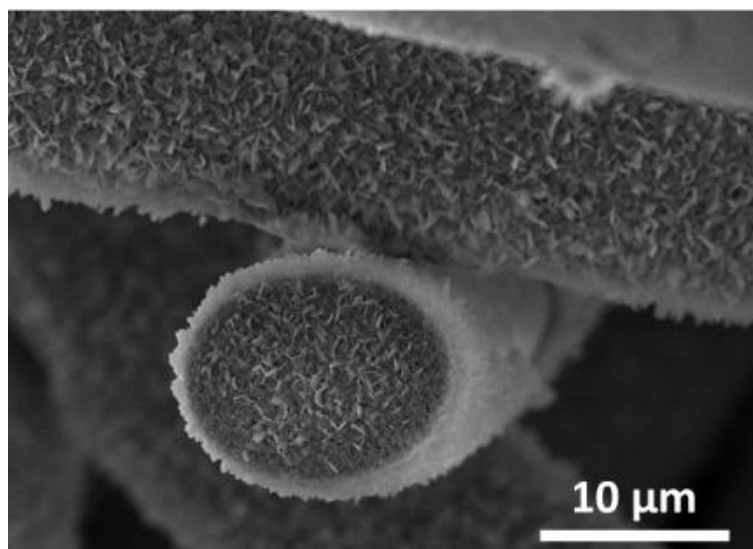


Figure 1 : Image de MEB d'un revêtement homogène de plaquettes de CDA carbonatée déposée par sono-électrodéposition pendant 6 h, à potentiel constant de -1 V et à 70 °C sur le tissu de carbone FM 50K®.

La caractérisation du revêtement « optimisé » a ensuite été réalisée. Avec ces paramètres de sono-électrodéposition optimisés, un revêtement d'hydroxyapatite déficitaire en calcium (CDA) carbonatée a été élaboré, aucune autre phase secondaire n'a été déposée. Dans notre cas, le taux de carbonates présent dans le revêtement varie entre 2 et 6 % en masse. Le revêtement est composé de plaquettes, elles-mêmes composées de particules lamellaires nanométriques. En effet, la CDA synthétisée est sous forme de nanocristaux, organisés sous la forme d'un cœur apatitique de structure ordonnée et d'une surface non-apatitique, de structure désordonnée et hydratée, organisation caractéristique d'une apatite biomimétique de type « cœur-coquille » (Figure 2). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus lors de la précédente thèse, où les revêtements de CDA avait été obtenus en mode galvanostatique, à courant constant [6,8].

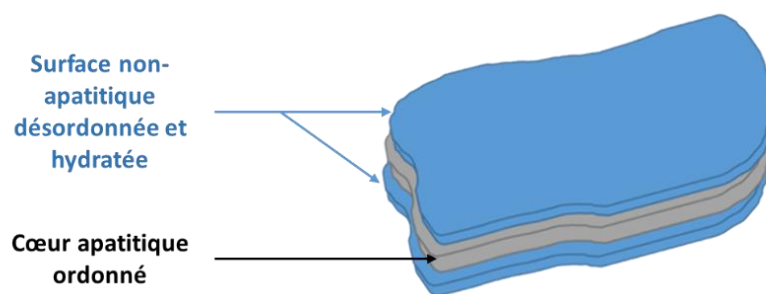


Figure 2 : Représentation schématique d'une particule lamellaire de CDA carbonatée biomimétique synthétisée par sono-électrodéposition.

La connaissance complète de chaque constituant, et donc du matériau hybride dans sa globalité, a permis d'envisager l'apport de nouvelles propriétés à celui-ci. Deux voies de modifications ont été sélectionnées lors de cette étude :

- un dopage par substitution du calcium par le strontium ;
- un dopage ciblé par des principes actifs dans chacun des constituants du matériau hybride.

Dans la première voie de dopage a été démontrée la possibilité d'utiliser la sono-électrodéposition comme processus d'incorporation contrôlé de strontium. En effet, il a été démontré la possibilité de substituer des cations calcium par des cations strontium par simple ajout d'un sel de strontium dans l'électrolyte pour les conditions optimisées. Une nouvelle fois, aucune phase secondaire n'a été observée dans le revêtement. Au final, deux revêtements de Sr-CDA carbonatée ont été réalisés. Le taux de strontium dans chacun des deux revêtements est de 3 et 6 % correspondant aux taux visés. Ce taux a été choisi car l'effet optimum du strontium, pour une application en régénération osseuse, est un taux compris entre 3 et 7 % [90]. L'incorporation du strontium dans la structure de la CDA carbonatée ne modifie ni la morphologie, ni la microtexture, ni l'organisation sous forme de « cœur-surface » de la structure des particules lamellaires. Il a été également démontré que ce dopage se faisait par substitution du calcium par le strontium jusqu'au cœur apatitique des nanocristaux.

La seconde voie de dopage a démontré la possibilité d'adsorber différents principes actifs sur les deux constituants du matériau hybride (tétracycline, naproxène et aspirine). Le tissu de fibres de carbone et le revêtement de CDA apparaissent être de potentiels systèmes de vectorisation de ces principes actifs. Il a également été montré la possibilité d'adsorber distinctement deux principes actifs ciblés sur chacun des constituants du matériau hybride (aspirine sur le tissu de carbone et tétracycline sur le revêtement). L'intérêt d'un tel système est de délivrer de manière locale et contrôlée deux principes actifs au niveau d'un même site d'implantation. De plus, deux différents modes de relargage ont été détectés pour les deux constituants du matériau (Figure 3), ce qui apporte un avantage supplémentaire à ce système de relargage. Dans le cas présent, on peut imaginer, dans un premier temps, un relargage rapide de la tétracycline à partir du revêtement CDA, dans le but d'obtenir une action anti-infectieuse rapide au niveau du site d'implantation. Puis dans les jours suivant l'implantation, un relargage plus lent de l'aspirine adsorbé dans les fibres du tissu de carbone. L'aspirine agirait alors par son action anti-inflammatoire, mais son action sur la régénération osseuse est également à prendre en compte [137].

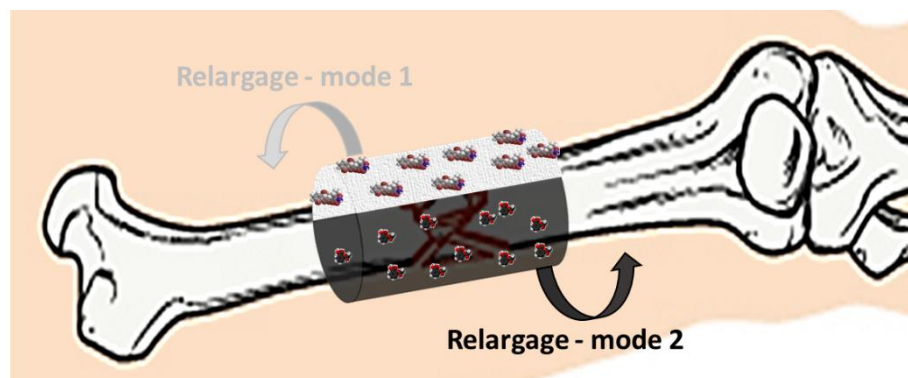


Figure 3 : Représentation schématique du matériau hybride comme système de relargage de principes actifs.

La seconde partie de ce manuscrit a été consacrée à l'évaluation biologique des différents matériaux hybrides élaborés.

Dans un premier temps, le comportement de ces matériaux en présence d'ostéoblastes humains a été testé. La viabilité de ces cellules à la surface d'une large gamme de tissus de fibres de carbone a été évaluée, ce qui a permis de sélectionner le tissu FM 50K® comme substrat des matériaux hybrides pour la globalité de cette étude. Les tests de viabilité et de prolifération effectués sur les différents matériaux hybrides élaborés ont démontré l'absence de cytotoxicité. Cependant, il s'est avéré que ces matériaux n'étaient pas de bons substrats pour la prolifération *in vitro* des ostéoblastes. Néanmoins, ces expériences ont confirmé l'effet bénéfique du strontium sur les ostéoblastes, comme décrit dans la littérature [90]. Pour des raisons techniques, l'étude analogue mise en place sur les ostéoclastes n'a pas permis de conclure quant à un effet du strontium sur ces cellules. Les premières évaluations de

viabilité des ostéoblastes effectuées à partir des matériaux dopés en principes actifs ont confirmé l'absence d'effet toxique sur les cellules. Au contraire, ces expériences suggèrent que certains matériaux dopés (aspirine et naproxène) permettent une meilleure colonisation cellulaire de surface. Cette observation n'avait encore jamais été observée sur ce genre de matériau. Le dopage par des principes actifs ouvre donc la voie à de nombreuses et nouvelles évaluations à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Dans un second temps, une expérience préliminaire chez le rat en site osseux a été réalisée. Pour ce faire, des défauts osseux de 2,7 mm de diamètre et 5 mm de profondeur ont été créés dans la partie distale de chaque fémur d'un rat. Les matériaux hybrides, sans et avec strontium (10 %), ont été apposés à la surface des défauts et la régénération osseuse engendrée a été comparée à une régénération témoin (Figure 4), en l'absence de matériau.

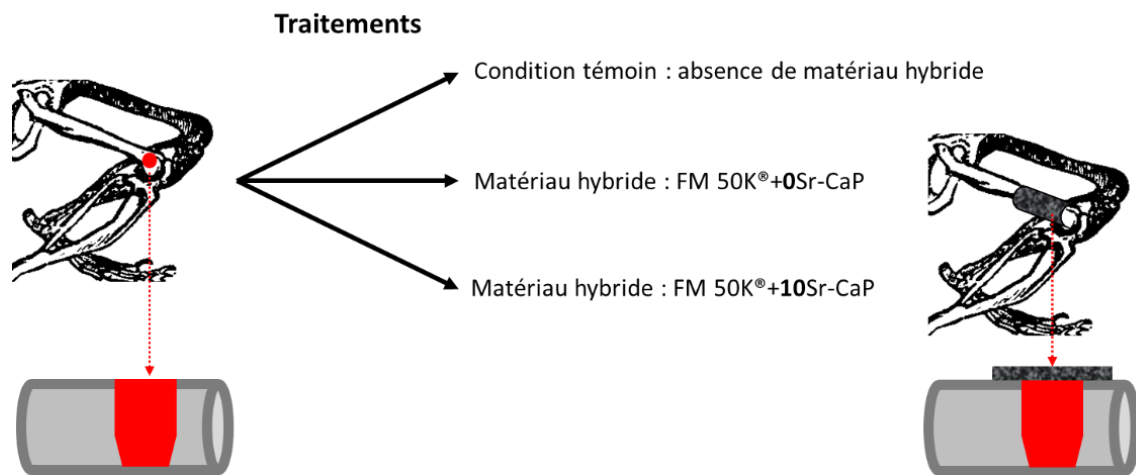


Figure 4 : Représentation schématique de l'évaluation *in vivo* des matériaux hybrides chez le rat, en rouge, est schématisée la représentation du défaut osseux.

La biocompatibilité des deux matériaux hybrides a tout d'abord été évaluée. Après 26 jours d'implantation, l'analyse histologique montre que les matériaux hybrides sont colonisés jusqu'au cœur des fibres par un tissu vivant richement vascularisé composé majoritairement de cellules de type fibroblastique. Les matériaux hybrides (ainsi figés) ont gardé tout au long de l'expérience leur emplacement initial à la surface des défauts démontrant la faisabilité d'une telle approche. De plus, il a été montré la dissolution du revêtement apatitique et donc son utilisation potentielle dans le processus de régénération osseuse. Ces observations démontrent l'excellente intégration des tissus de fibres de carbone recouverts d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA) carbonatée et la possibilité de leur utilisation pour recouvrir un défaut osseux.

La régénération osseuse a été étudiée après 13 et 26 jours d'application. Les résultats à 13 jours n'ont pas apporté d'information quantitative statistique sur l'influence des matériaux hybrides sur la régénération osseuse, en raison du petit nombre d'animaux et de la dispersion des résultats.

Cependant, ils suggèrent que les matériaux jouent un rôle qualitatif sur la néoformation osseuse, en jouant le rôle de « guide », et permettant à l'os néoformé de préserver la morphologie originelle de la surface osseuse. Ils suggèrent également qu'ils induisent une cinétique de régénération plus rapide (Figure 5).

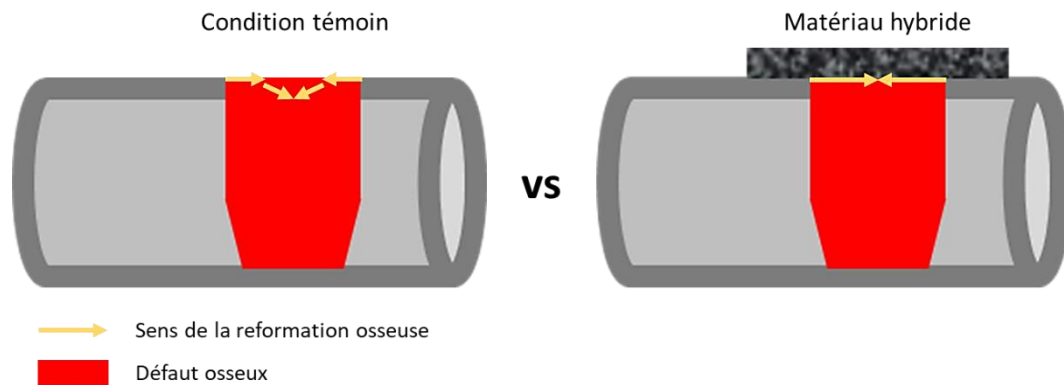


Figure 5 : Représentation schématique de la reformation osseuse en fonction du traitement appliqué - Rôle du matériau hybride comme "guide" de la reformation osseuse.

Les résultats à 26 jours ont très clairement montré l'influence des matériaux hybrides sur la régénération osseuse. En leur présence le pourcentage moyen de la surface de reconstruction est augmenté de 20 %, tandis que l'épaisseur moyenne est augmentée de 15 à 30 %, selon le matériau. L'effet du strontium, comme lors de l'évaluation *in vitro*, a été démontré avec une épaisseur d'os néoformé plus importante (+ 13,5 %) et une morphologie de reconstruction améliorée.

En conclusion, l'effet bénéfique des matériaux hybrides « Tissu de fibres de carbone / phosphate de calcium » sur la régénération osseuse a été démontrée pour la première fois.

Les résultats de cette étude se révèlent très prometteurs concernant l'utilisation de tels biomatériaux en régénération osseuse. L'approche multidisciplinaire de l'étude de ces biomatériaux hybrides, dont les résultats sont résumés dans la Figure 6, a permis de démontrer tous leurs intérêts pour le domaine spécifique de la régénération osseuse et de les envisager, chez l'homme.

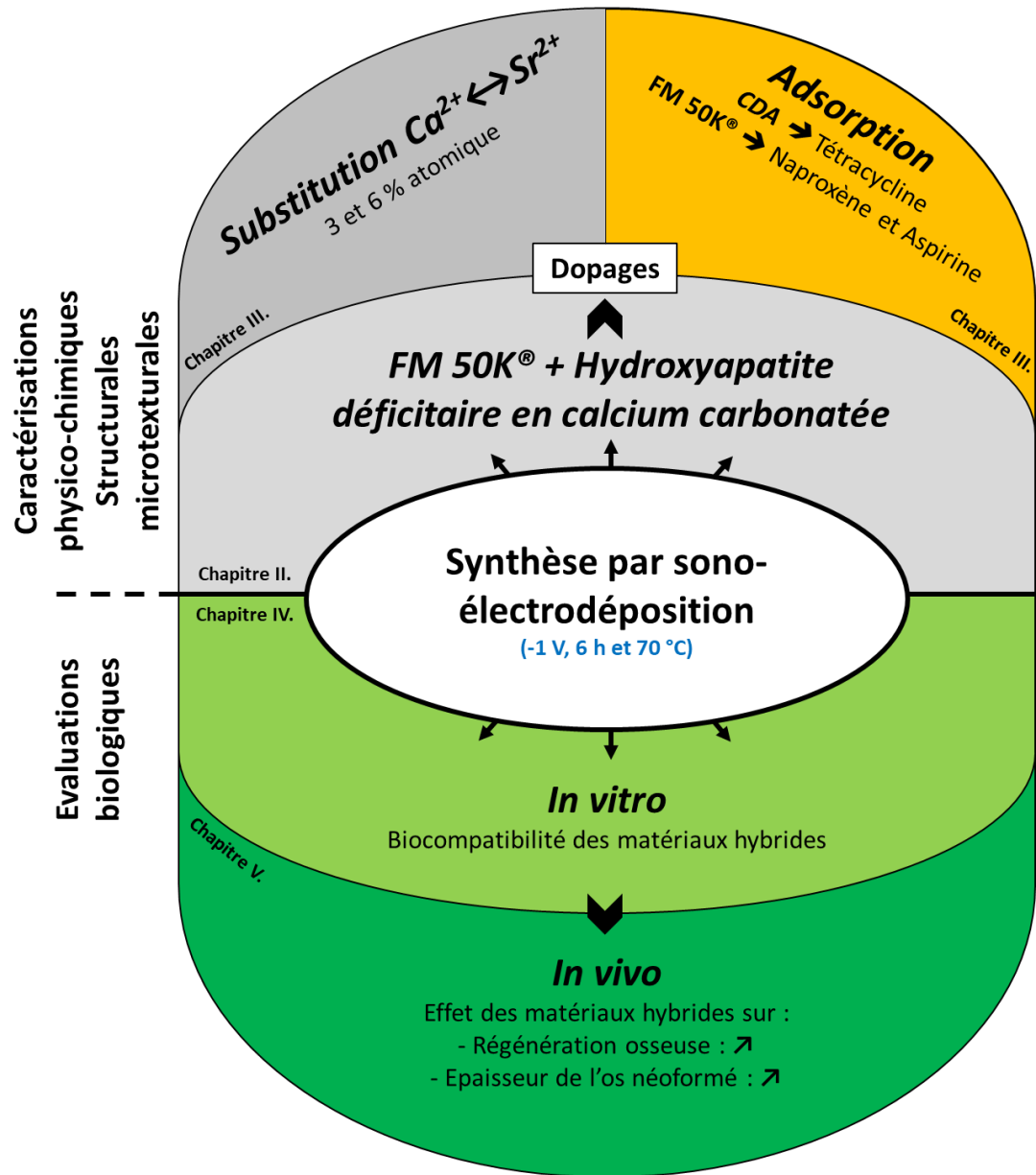


Figure 6 : Conclusions de l'approche multidisciplinaire de cette étude.

Perspectives

La connaissance du matériau hybride, sa possibilité d'être modifié aisément et ces premiers résultats d'expérimentation animale encourageants font de ces matériaux des biomatériaux prometteurs pour la régénération osseuse. Les résultats présentés dans ce manuscrit ouvrent le champ à de nombreuses voies, mais également à quelques interrogations.

Un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées. Parmi toutes les perspectives, quelques-unes ont attiré notre attention et sont discutées dans la suite de ce manuscrit. Elles sont séparées en deux catégories :

- perspectives dites « directes » : perspectives découlant directement des résultats présentés,
- perspectives dites « indirectes » : perspectives comportant des études préliminaires menées en parallèles des travaux présentés.

A. Perspectives « directes »

A.1. Dopage des constituants du matériau hybride

Une perspective qui apparaît essentielle est la poursuite de l'étude concernant le dopage du matériau hybride, que ce soit du point de vue de la substitution par des cations à visée thérapeutique ou bien du point de vue de l'adsorption de principes actifs.

Il a été démontré la possibilité de substituer le calcium par le strontium de manière contrôlée par sono-électrodéposition à -1 V. Il apparaît donc intéressant d'étudier la possibilité d'utiliser la sono-électrodéposition comme processus d'élaboration permettant d'introduire, de façon contrôlée, tous types de cations à visée thérapeutique dans la structure de l'apatite (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Na^+ , ...). Il serait également intéressant d'étudier la possibilité de réaliser une multi-substitution, afin d'additionner les propriétés de plusieurs cations.

Il a également été démontré la possibilité d'adsorber des principes actifs dans la porosité du tissu de fibres de carbone et en surface du revêtement de la CDA carbonatée. Néanmoins, la possibilité d'adsorber un principe actif ciblé et distinct dans chacune des deux parties du matériau hybride n'a pas été prouvée. Des expériences supplémentaires devront donc être réalisées afin de pouvoir affirmer l'adsorption sélective de chaque constituant. L'étude de relargage des principes actifs devra être poursuivie afin de connaître précisément le mode associé à chaque constituant et également, en fonction de la taille et de la charge de l'adsorbat. En complément, une étude sur l'importance du choix du tissu de carbone pour l'adsorption de principes actifs ciblés pourrait être menée. Analyser l'influence de la porosité, mais surtout de la chimie de surface du tissu carboné, sur la quantité, mais également sur la sélectivité du principe actif adsorbé, apparaît pertinente au vu de nos résultats.

A.2. Expérimentation animale

L'expérimentation animale présentée dans ce manuscrit a apporté certaines réponses concernant l'effet possible des matériaux hybrides sur la régénération osseuse (augmentation du pourcentage de surface de reconstruction et de l'épaisseur de l'os néoformé). Seuls les résultats des coupes histologiques correspondant à la zone du défaut osseux n'ont pas été discutés dans ce manuscrit car cette caractérisation est toujours en cours.

Cette étude appelle également un grand nombre de questions. Les trois questions qui nous apparaissent les plus pertinentes à la suite de ces travaux, sont discutées ci-dessous :

- 1) Le tissu de fibres de carbone se dégrade-t-il ?
- 2) Le tissu de fibres de carbone seul, joue-t-il un rôle de « guide » de la régénération ?
- 3) Le matériau hybride est-il un système de relargage efficace de l'aspirine pour obtenir un effet sur la régénération osseuse ?

Afin de répondre à la première question, une étude à long terme devra être réalisée. Elle consisterait à implanter les biomatériaux à la surface d'un os chez le rat (comme effectué lors de l'étude préliminaire) et de sacrifier les rats à différents temps (par exemple : 1, 3, 6, 12 et 18 mois). Les rats devront ensuite être disséqués et le taux de carbone dans chaque organe mesuré. Dans le cas d'un décès prématuré, une dissection devra également être réalisée afin de statuer sur son origine et, notamment, si le tissu de fibres de carbone peut y être associé.

Concernant la deuxième question, une expérience similaire à celle réalisée dans cette étude devra être réalisée en implantant le tissu de fibres de carbone seul (sans revêtement). Les résultats concernant la régénération osseuse associée à ce traitement seront confrontés à ceux obtenus en absence de matériau et en présence d'un matériau revêtu. Une expérience à 13 jours permettra de confirmer les résultats présentés dans ce manuscrit et de déterminer le rôle du tissu dans le processus de régénération osseuse.

Pour finir, une dernière étude consisterait à implanter ces biomatériaux dopés en aspirine. Différentes concentrations d'aspirine pourraient être testées afin d'évaluer l'effet possible de l'aspirine sur la régénération osseuse et de conclure sur la possibilité d'utiliser le matériau hybride (tissu de fibres de carbone / phosphate de calcium) comme système de relargage de substances thérapeutiques.

Afin de respecter la règle des 3R en recherche animale (réduction, raffinement, raffinement) et notamment la règle concernant la réduction, ces trois études pourraient être réalisées en parallèle, afin de limiter le nombre d'animaux. De plus, l'analyse de tous les os par microscanner, mais également par IRM, RAMAN et par histologie, devra être effectuée.

Concernant, les multiples interrogations telles que :

- L'intérêt des chirurgiens orthopédiques pour un tel biomatériau ?
- La praticité d'utilisation du biomatériau pendant une intervention chirurgicale ?
- La possibilité d'utiliser ce biomatériau comme système de relargage de médicament connaissant les contraintes liées à l'industrialisation de ces biomatériaux (notamment à la stérilisation des produits) ?

Elles devront trouver des réponses à travers des discussions avec les principaux acteurs du domaine, mais également, en confrontant toujours plus ces matériaux aux problématiques liées à la régénération osseuse.

B. Perspectives « indirectes »

En parallèle des travaux présentés, deux études préliminaires ont été réalisées :

La première concerne le développement d'une seconde voie de synthèse permettant de recouvrir la surface d'un tissu de fibres de carbone par un phosphate de calcium. Une étude préliminaire a démarré à l'ICMN portant sur la synthèse de matériaux hybrides par pulvérisation thermique ou « pyrolyse spray ». Ce procédé en température a pour but d'élargir la gamme de « type » de morphologie, structure, composition chimique de CaP.

La seconde perspective concerne un paramètre clé à étudier qui est l'adhérence du revêtement sur le tissu de fibres de carbone. Des expériences de nano-scratch et de nano-indentation ont été réalisées en collaboration avec C. Richard (GREMAN, Tours). Aucun résultat probant n'a été obtenu. Pour cause, la surface non plane et très hétérogène des matériaux hybrides qui est imposée par le tissu carboné ne permet pas l'utilisation des techniques habituellement utilisées (nano-scratch, nano-indentation). C'est pourquoi une nouvelle voie de caractérisation a été envisagée. Il s'agit de mesurer l'adhérence par « choc laser » ou LASAT. Cette étude a été réalisée en collaboration avec C. Richard (GREMAN, Tours), A. Debray et M. Jeandin (Mines ParisTech, Evry) et est présentée dans la suite de ces perspectives.

B.1. Autre méthode de synthèse : Exemple de la « pyrolyse spray »

B.1.1. Dispositif et principe

La pulvérisation par pyrolyse ou « Spray Pyrolysis » est une technique simple et relativement peu coûteuse au regard du coût de l'équipement. Cette technique, qui ne requiert pas de substrats ou de réactifs de haute qualité, est une méthode employée pour obtenir des dépôts de films denses, poreux ainsi que pour la production de poudre [184,185].

Le principe de la technique est basé sur la pulvérisation d'une solution de précurseurs au moyen d'un gaz l'entraînant sous forme de fines gouttelettes. Les précurseurs de la solution réagissent ensuite pour former, soit un dépôt sur le substrat, soit une poudre. Pour obtenir une distribution de taille de gouttelettes plus fines (micrométrique et sub-micrométrique), la solution précurseur est convertie en gouttelettes par ultrasons. Les gouttelettes sont alors de très petites tailles et distribuées de manière fine et homogène avec peu d'inertie de mouvement (pas d'échauffement). Au cours du transport des gouttelettes par le gaz, le solvant qu'elles contiennent se vaporise à mesure qu'elles approchent du substrat chauffé. Les précurseurs se diffusent alors sur le substrat entraînant la réaction formatrice d'un film déposé. La pyrolyse d'un aérosol produit par une pulvérisation ultrasonore est connu sous le nom de procédé Pyrosol [186].

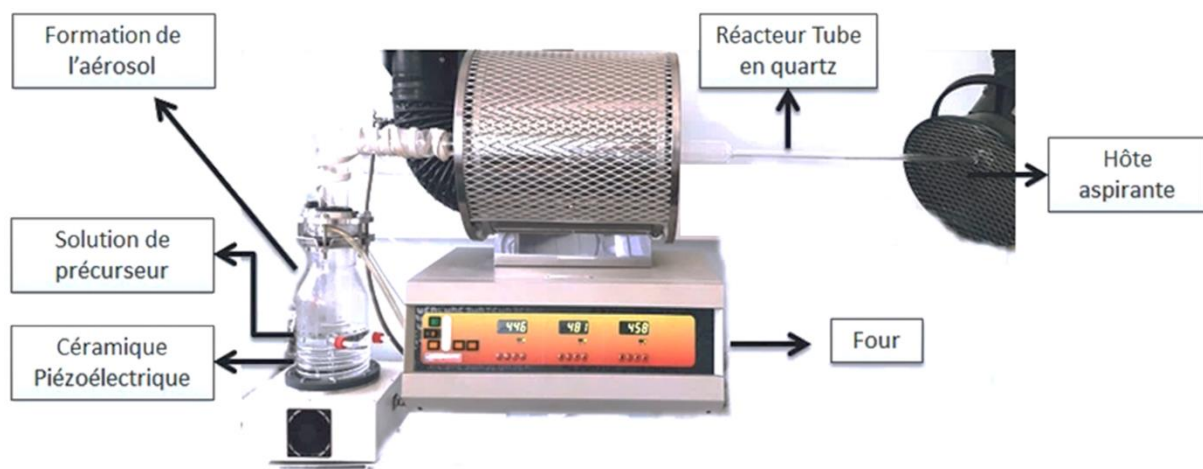


Figure 7 : Installation du procédé « pyrolyse spray ».

Une solution de précurseurs (ex : calcium et phosphate) est placée dans le réservoir du Pyrosol. La vibration de la céramique piézoélectrique entraîne alors la formation d'un « brouillard » de gouttelettes à l'interface liquide-gaz. Les effets de cavitation et les vibrations sur cette surface entraînent la formation d'un aérosol. Le gaz porteur entraîne alors l'aérosol vers le four, dans lequel peut se produire l'évaporation du solvant, la diffusion du composé, la formation du précipité et la pyrolyse (Figure 7).

Le procédé de pulvérisation par pyrolyse peut être considéré comme un procédé dérivé de la technique CVD (dépôt chimique en phase vapeur), divisée en trois étapes [187,188].

- 1 : Evaporation de la solution près du substrat,
- 2 : Transport des espèces vers la surface du substrat,
- 3 : Réaction/dépôt des espèces sur la surface du substrat.

La Figure 8, schématise les processus pouvant intervenir dans le cas d'un dépôt par la technique Pyrosol. Ce schéma propose une classification du mécanisme de dépôt intervenant en fonction de la température.

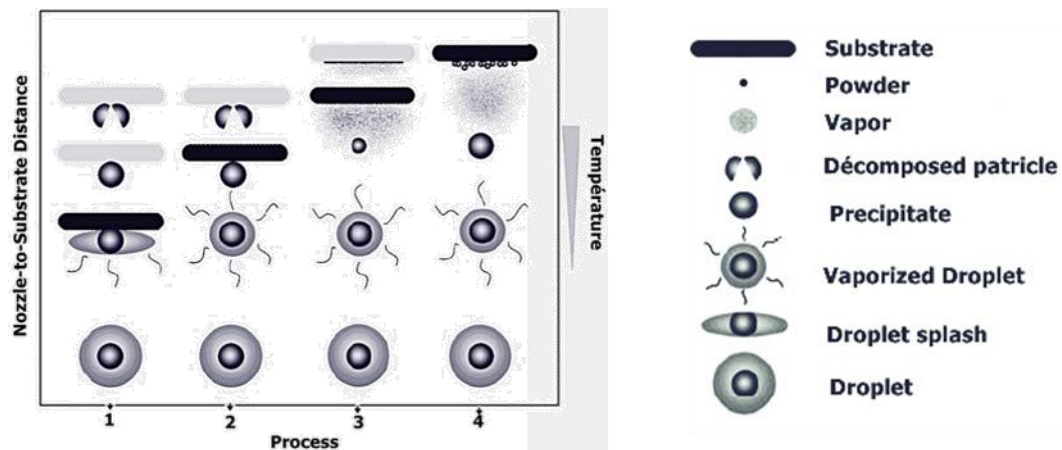


Figure 8 : Schéma des différents procédés de dépôt du procédé Pyrosol.

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 dans lequel 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 vol des gouttelettes vers le substrat, le précipité se sublime et les vapeurs obtenues se diffusent alors sur le substrat où ont lieu des réactions chimiques en phase hétérogène. C'est le cas 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 dépôt le plus homogène est obtenu lors du processus n°3. De plus, l'obtention de particules à partir d'un aérosol présente plusieurs avantages comme le contrôle de la taille des cristallites, la morphologie et la composition des particules [189]. Il en résulte que toutes les gouttelettes se vaporisent au même moment, ce qui engendre également la formation d'un dépôt plus homogène.

B.1.2. Paramètres expérimentaux

Dans cette étude préliminaire, quatre paramètres expérimentaux ont été étudiés dans l'objectif de comprendre l'influence de ceux-ci sur la nature chimique et la morphologie.

Le premier paramètre étudié est la concentration de la solution de précurseurs. Deux concentrations différentes de la solution de précurseurs ont été testées :

- La première concentration C_1 correspond à : 0,2 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ / 0,12 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en mol/L,
- La deuxième concentration C_2 correspond à : 1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ / 0,6 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en mol/L.

Le deuxième paramètre est la température du four. La température du four est la température du substrat au cours du dépôt, soit 500 °C (T_1) ou 700 °C (T_2). Cette variation permet d'étudier l'influence de la température sur la quantité ainsi que la morphologie du dépôt.

Le troisième paramètre est le débit du gaz porteur. Le gaz porteur utilisé est l'azote. Les expériences ont été réalisées avec des débits du gaz porteur de 200 cm³/min (D_1), 400 cm³/min (D_2) et 600 cm³/min (D_3). L'objectif est de voir l'impact de ce paramètre sur la quantité de dépôt obtenue.

Le dernier paramètre est la durée de pulvérisation, c'est-à-dire dans le cas présent de 1 h, 3 h ou 5 h. Ces deux dernières ont été testées pour examiner l'influence du temps sur la quantité ainsi que la morphologie du dépôt.

B.1.3. Résultats préliminaires

Après optimisation de ces quatre paramètres, les paramètres optima sont : une forte concentration en précurseurs (C_1), une température de 500 °C (T_1), un débit de gaz porteur de 200 cm³/min (D_1) et une durée de pulvérisation de 1 h.

Un dépôt de CaP sous forme de « billes » micrométriques est observé par MEB sur un grand nombre de fibres (Figure 9). La taille moyenne des « billes » se situe aux alentours de 3 µm, mais une variation du diamètre allant de 2 à 9 µm est observée. Néanmoins, le dépôt de CaP n'est pas homogène à l'échelle de la fibre. Une seconde d'optimisation devra donc être mise en place afin de recouvrir l'ensemble des fibres constitutives du tissu.

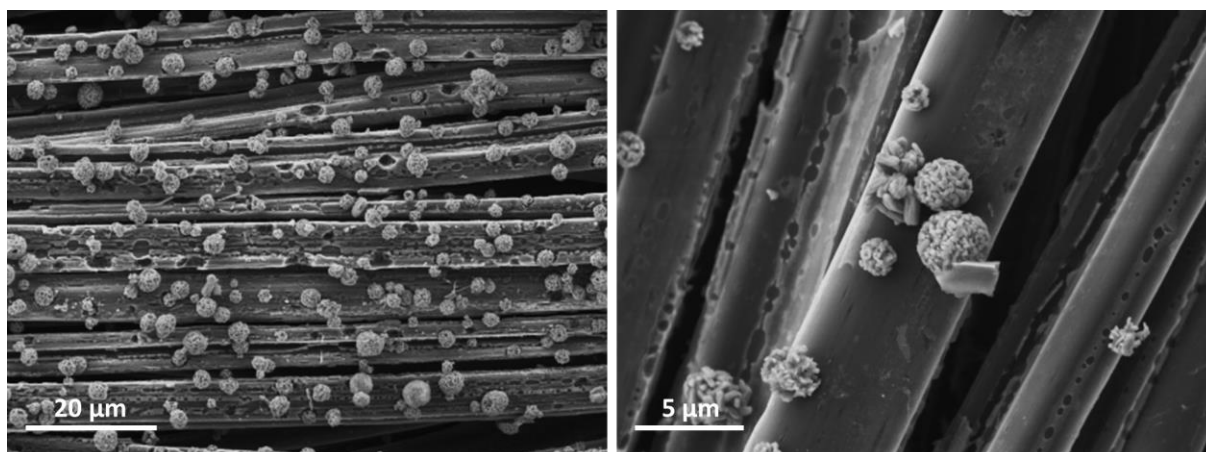


Figure 9 : Images de MEB de « billes » de CaP déposé par « pyrolyse spray » sur tissu de fibres de carbone.

Pour obtenir des informations sur la composition chimique de ces « billes » de CaP, une analyse EDX-MEB est réalisée (Figure 10). A partir de ces spectres EDX, le rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{P}}$ des « billes » est déduit. Les analyses effectuées sur un grand nombre de « billes » donnent un rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{P}}$ moyen de $1,67 \pm 0,04$. Ce rapport correspond à un phosphate de calcium de type hydroxyapatite stœchiométrique. Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui indique la « pyrolyse spray » comme une voie de synthèse de l'hydroxyapatite stœchiométrique [190]. Des caractérisations physico-chimiques sont en cours de réalisation.

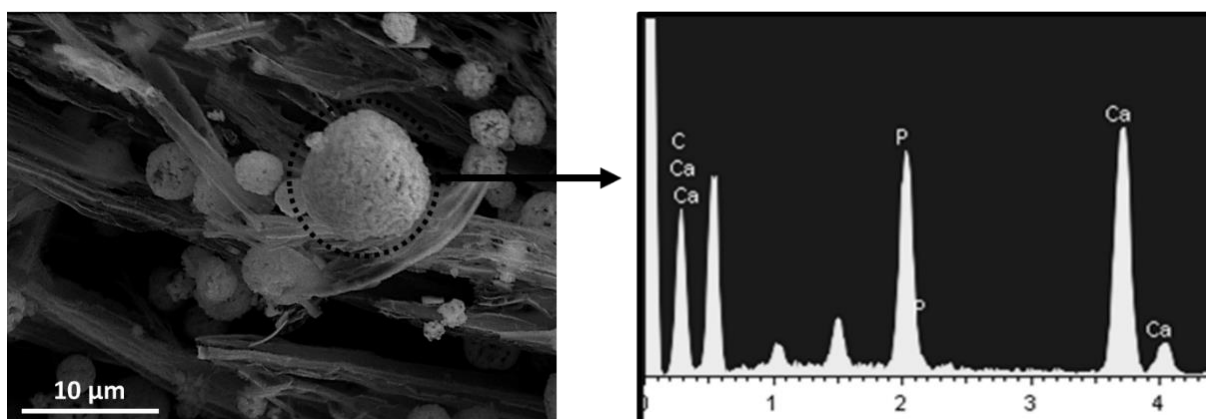


Figure 10 : Analyse EDX-MEB d'une « bille » de CaP déposée à la surface d'une fibre de carbone par « pyrolyse spray ».

B.2. Caractérisation mécanique : Exemple du « choc laser »

B.2.1. Principe du « choc laser »

Une impulsion laser très intense et de très courte durée est concentrée via une lentille puis dirigée vers un échantillon. De cette manière, des densités de puissance très importantes en surface de l'échantillon sont atteintes. Sous l'effet de cette puissance surfacique, une partie de la matière exposée au faisceau est brusquement transformée en plasma. Ce dernier effectue une détente très rapide qui, au contact de la surface de l'échantillon, génère des ondes de choc qui se propagent dans l'épaisseur de cet échantillon. Ces ondes de choc traversent l'épaisseur de l'échantillon jusqu'à atteindre sa face opposée. En cet endroit, les ondes chocs sont susceptibles de décoller d'éventuels revêtements ou dépôts présents sur cette face de l'échantillon. Selon les caractéristiques du faisceau, de l'échantillon et du résultat de cet essai, une estimation de l'énergie d'interaction entre le dépôt et le reste de l'échantillon peut être possible.

Remarque : Afin d'obtenir le meilleur rendement du plasma, la zone de l'échantillon où le faisceau est dirigé peut être couverte d'un milieu dit de confinement, par exemple un liquide ou un revêtement transparent.

B.2.2. Caractéristiques techniques

Les différents paramètres utilisés lors de cette expérience préliminaire sont décrits ci-dessous :

- Durée de l'impulsion : 5,2 nanosecondes
- Longueur d'onde : 532 nm
- Puissance : Variable selon les essais (ici de 24 à 192 MW)

$$\text{Puissance} = \frac{\text{Energie}}{\text{Temps de l'impulsion}}$$

- Puissance surfacique : Variable selon les essais (ici de 0,777 à 6,121 GW/cm²)

$$\text{Puissance surfacique} = \frac{\text{Puissance}}{\text{Surface de contact}}$$

- Diamètre de l'impulsion au contact de l'échantillon : 2 mm

Les échantillons sont fixés à un ruban adhésif afin de les disposer sur le montage expérimental (Figure 11). Ce ruban adhésif joue également le rôle de milieu de confinement.

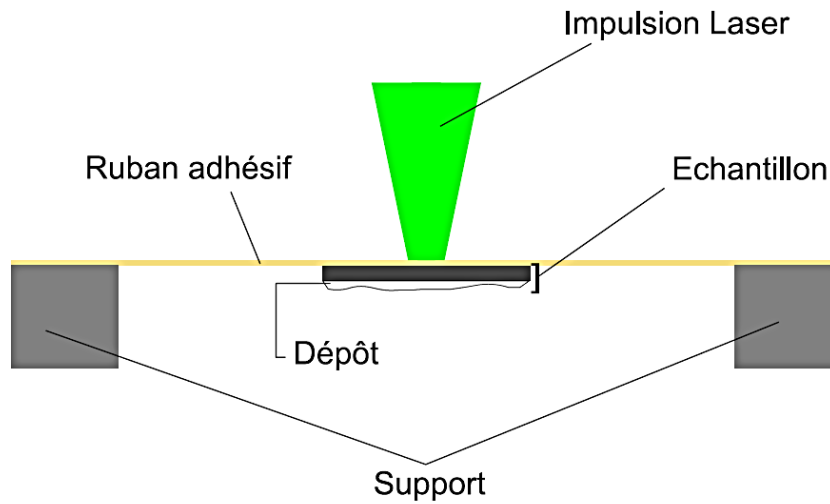


Figure 11 : Schéma de principe du montage expérimental de choc laser

B.2.3. Résultats et discussions préliminaires

Les photos présentées Figure 12 sont celles des faces opposées à celles ayant été exposées à l'impulsion laser. L'échantillon testé est un tissu de fibre de carbone recouvert d'une CDA déposée à densité de courant constante de -270 mA/g .

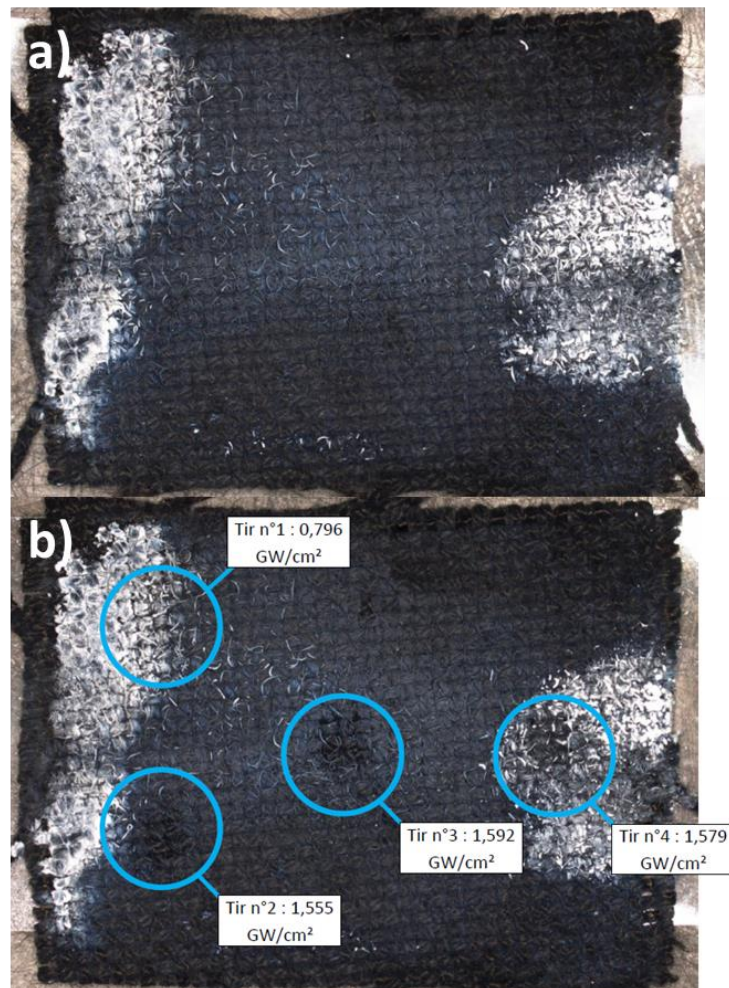


Figure 12 : Photographie de la face opposée a) avant l'impulsion et b) après l'impulsion laser.

Les impulsions laser peuvent décoller une partie du revêtement de CaP, mais une puissance surfacique suffisamment importante peut endommager profondément l'échantillon (Tir n°3). A épaisseur de revêtement *a priori* semblable et puissance surfacique équivalente, les chocs laser semblent générer des résultats similaires en termes de surfaces de dépôt affectées (Tirs n°2 et n°3). A puissance surfacique égale, le choc laser décolle moins bien le revêtement dans les zones où son épaisseur est vraisemblablement plus importante (Tir n°1). Cependant, il semble que cette différence de résultats s'amointrisse lorsque la puissance surfacique des impulsions augmente (Tir n°4).

Le modèle du choc laser se base sur la propagation des ondes de choc dans un milieu solide continu. Les matériaux de support des échantillons se présentant sous la forme de tissus, ils n'entrent pas exactement dans ce modèle et il n'est donc pas à exclure que la propagation des ondes de chocs dans le tissu diffère de ce qu'elle serait dans un matériau « massif » et qu'une partie des décollements observés soit due à des effets de « souffle » de plasma et/ou d'air traversant ce tissu.

Une voie pourrait être envisagée pour s'affranchir de cet éventuel effet de souffle : intercaler entre le ruban adhésif et l'échantillon un matériau adhésif opaque. Celui-ci générerait sous l'effet du laser un plasma tout en empêchant le mouvement de ce dernier vers l'échantillon afin de permettre la propagation d'ondes de choc. En s'affranchissant de l'effet de « souffle » et en utilisant le modèle dans un milieu solide continu, il serait possible de remonter à l'énergie d'interaction.

Au vu de ces premiers résultats et afin de remonter à l'énergie de liaison entre le revêtement de CDA et les fibres de carbone du tissu FM 50K® il est nécessaire :

- d'intercaler entre l'adhésif et le matériau hybride un matériau massif afin de s'affranchir de l'effet de souffle et de se retrouver dans le modèle de la propagation des ondes de choc dans un milieu continu ;
- d'imposer une impulsion laser suffisamment puissante pour décoller le revêtement (supérieure à $0,8 \text{ GW.cm}^{-2}$) mais suffisamment faible pour ne pas déchirer les fibres de carbone (inférieure à $1,5 \text{ GW.cm}^{-2}$).

Annexes

Sommaire

Annexes.....	219
Sommaire.....	221
Annexe 1 : Analyse élémentaire – CHONS.....	223
Annexe 2 : Microscopie électronique à balayage (MEB)	224
Annexe 3 : Dosage potentiométrique des groupes de surface du substrat carboné	225
Annexe 4 : Porosimétrie mercure	226
Annexe 5 : Adsorption de gaz.....	227
Annexe 6 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	228
Annexe 7 : Diffraction des rayons-X (DRX)	229
Annexe 8 : Désorption à température programmée (DTP).....	230
Annexe 9 : Microscopie électronique à transmission (MET).....	233
Annexe 10 : Fiche JCPDS.....	235
Annexe 11 : Résonance magnétique nucléaire (RMN) pour les solides.....	236
Annexe 12 : Spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES)	237
Annexe 13 : Spectroscopie UV-Visible	238
Annexe 14 : Grille d'évaluation	239
Annexe 15 : Compte rendu opératoire.....	240
Annexe 16 : Grille de traitement	241
Annexe 17 : Feuille de surveillance.....	242
Annexe 18 : Analyse des images obtenues par microscanner	243

Annexe 1 : Analyse élémentaire – CHONS

Les échantillons sont analysés au moyen d'un analyseur élémentaire Flash 2000 de la marque Thermo Scientific®. Environ 1 mg de TFC finement broyé et préalablement séché sous vide primaire à 120°C 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. Une calibration externe est réalisée grâce à un réactif organique de pureté contrôlée, le BBOT (Figure 1).

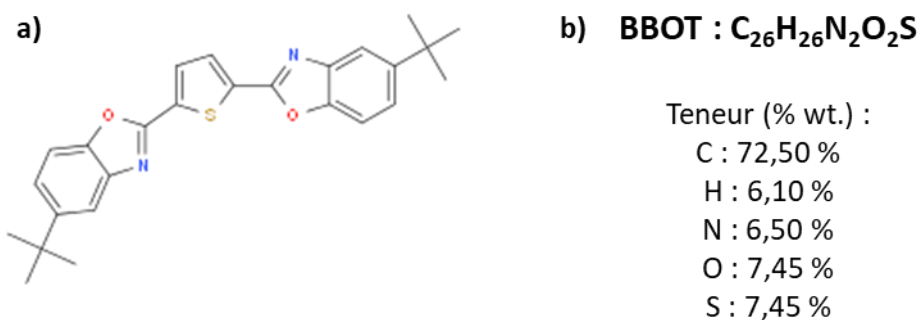


Figure 1 : a) Formule chimique du BBOT ($C_{26}H_{26}N_2O_2S$) ;
b) Teneur en différents éléments du BBOT.

L'analyse élémentaire permet de quantifier le pourcentage massique des éléments (carbone, hydrogène, oxygène, azote et soufre) présents dans le tissu de fibres de carbone. La détermination de la proportion en carbone, azote, hydrogène et soufre est effectuée par une combustion de l'échantillon carboné à haute température (de l'ordre de 950 °C) en présence d'un excès d'oxygène. Le carbone est transformé en dioxyde de carbone (CO_2), l'hydrogène sous forme de vapeur d'eau (H_2O), le soufre en dioxyde de soufre (SO_2) et l'azote est réduit par le cuivre présent dans le catalyseur en diazote (N_2). Les gaz ainsi générés sont entraînés par un gaz vecteur (Hélium) puis séparés par une colonne chromatographique (colonne remplie) et détectés grâce à un catharomètre. Le pourcentage massique en oxygène est obtenu 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. Dans le cas de l'oxygène, le pourcentage massique peut être évalué indirectement par la différence avec le pourcentage massique dû aux autres hétéroatomes (C, H, N, S). Cependant, cela néglige la présence éventuelle d'autres éléments dans l'échantillon tels que des éléments métalliques provenant d'un traitement de surface (ensimage) des fibres (zinc, aluminium, phosphore ...) comme dans le cas de la gamme FM de chez ZORFLEX®.

Annexe 2 : Microscopie électronique à balayage (MEB)

Toutes les caractérisations réalisées par MEB ont été mises en œuvre au Centre de Microscopie Electronique (CME) de l'Université d'Orléans, au moyen d'un microscope électronique à balayage HITACHI S4200, équipé d'un canon à émission de champ, sous une tension de 5 kV en imagerie et 15 kV en analyse EDX.

L'imagerie par microscope électronique à balayage (MEB) permet de reconstruire une image en relief d'un échantillon. Cette technique utilise un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du faisceau. L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation de divers rayonnements (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, rayons X, ...). Dans le cas présent, les électrons secondaires, de plus faible énergie, sont récoltés, amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique afin de former par la suite l'image en noir et blanc traduisant la topographie de l'échantillon.

Les échantillons à analyser sont préparés sous forme de pastille de 8 à 20 mm de diamètre et déposés sur des porte-échantillons à l'aide de pastilles adhésives conductrices. Malgré le fait que les revêtements électrodéposés soient de mauvais conducteurs électriques, il n'a pas été nécessaire de les revêtir d'une fine couche conductrice métallique.

Le microscope est équipé d'un système de microanalyse X composé d'un spectromètre à sélection d'énergie (EDS) de marque EDAX constitué d'un détecteur à semi-conducteur silicium-lithium Si(Li) refroidi à l'azote liquide qui permet la détection des éléments légers tels que l'oxygène qui est un élément important des phosphates de calcium. Ce spectromètre est associé à un système d'acquisition et de quantification GENESIS (Eloïse SARL, France) basé sur la méthode ZAF pour déterminer les concentrations des éléments tels que le calcium, le phosphore et le strontium dans le cas des revêtements synthétisés lors de cette étude. Tous les résultats de caractérisation par microanalyse X présentés dans ce travail ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales, à savoir une acquisition de spectre X avec une énergie de 15 keV pendant 1 minute. Les analyses ont été répétées plusieurs fois afin d'obtenir une valeur moyenne du pourcentage atomique en calcium, phosphore et strontium pour chaque type de matériau afin de calculer les rapports atomiques $\frac{Ca}{P}$ ou $\frac{Ca+Sr}{P}$.

Annexe 3 : Dosage potentiométrique des groupes de surface du substrat carboné

Le dosage potentiométrique est une méthode d'analyse à la fois qualitative et quantitative des groupes acides de surface des tissus de fibres de carbone.

Expérimentalement, 100 à 200 mg de TFC est coupé finement, broyé et dispersé dans 75 mL d'une solution de NaNO_3 à 0,1 mol/L préalablement dégazée pendant 3 heures minimum sous flux d'azote. La dispersion de TFC est ensuite mise sous agitation pendant 3 jours dans un flacon fermé et hermétique. Le pH est alors ajusté à pH 3 par ajout contrôlé d'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L afin de protoner tous les groupements acides. Enfin, les dosages potentiométriques par de la soude à 0,1 mol/L préalablement étalonnée sont réalisés au moyen d'un titrateur automatique 848 Titrino plus, de la marque Metrohm®.

À partir des mesures expérimentales obtenues lors du dosage entre pH 3 et pH 11, la courbe dite d'« affinité protonique » peut être tracée. Elle représente l'évolution de la quantité de protons consommés présents sur le tissu en fonction du pH. La procédure numérique SAIEUS (Solution of Adsorption Integral Equation Using Spline) permet de tracer la distribution des fonctions de surface en fonction de leur constante d'acidité pK_A [191–193]. L'intégration des pics permet de remonter aux quantités de groupements acides de surface associés.

Annexe 4 : Porosimétrie mercure

La porosimétrie mercure est une technique qui permet d'accéder à des informations concernant la macroporosité ainsi que la mésoporosité (Figure 2) de nos TFC.

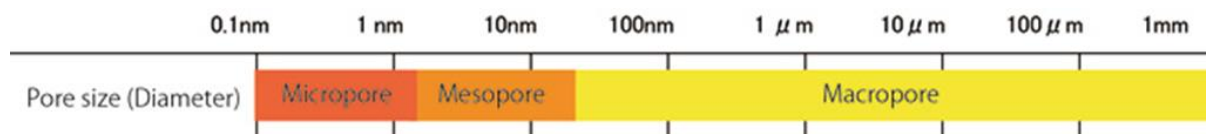


Figure 2 : Différenciation des pores selon la taille.

La technique repose sur les propriétés de mouillage du mercure. En effet, le mercure se comporte comme un liquide non mouillant avec un grand nombre de matériaux notamment avec les carbones. Afin de permettre au mercure de rentrer dans nos TFC (dans la porosité), une pression doit être appliquée. La différence de pression nécessaire pour faire entrer le mercure dans un pore permet alors de remonter au diamètre d'accès des pores selon l'équation de Washburn :

$$D = - 4 \gamma \cos \theta / \Delta p$$

γ : tension superficielle du mercure ($\gamma_{Hg} = 480 \text{ mJ.m}^{-2}$)

θ : angle de contact entre le mercure et la surface solide ($\theta = 140^\circ$)

Δp : différence de pression nécessaire pour forcer le mercure à entrer dans le pore (Pa).

Le TFC, préalablement séché, est placé dans la cellule du porosimètre qui est mise sous vide puis remplie de mercure. La pression est augmentée progressivement sur une gamme de pression appliquée comprise entre 0,0035 et 400 MPa. Au-delà de 400 MPa, le mercure peut endommager le matériau. 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 Δp appliqué, le volume de mercure qui a pénétré dans les pores, donc, la taille des pores.

Annexe 5 : Adsorption de gaz

Afin d'obtenir des informations concernant la porosité des tissus de fibres de carbone et plus particulièrement des pores ayant un diamètre compris entre 0,7 et 50 nm (micro et mésopores), l'adsorption de diazote gazeux N_2 est utilisée. Cette analyse peut également être faite par adsorption de CO_2 et permet dans ce cas d'avoir des informations sur des tailles de pores inférieurs à 2 nm (ultra et micropores).

Une fois les isothermes d'adsorptions obtenues, différentes méthodes de traitement peuvent être appliquées telles que des méthodes classiques BET, Dubinin-Radushkevich ou encore des méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de densité (modèle DFT) [5].

Les données extraites de ces analyses sont :

- S_{BET} (m^2/g) : surface spécifique apparente obtenue à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote.
- V_{TOTAL} (N_2 , DFT) (cm^3/g) : volume poreux total obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote à $P/P_0 = 0,95$.
- V_{MESO} (N_2 , DFT) (cm^3/g) : volume mésoporeux obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote par application de la méthode DFT, diamètres de pores compris entre 2 et 50 nm.
- V_{MICRO} (N_2 , DFT) (cm^3/g) : volume microporeux obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote par application de la méthode DFT, diamètres de pores inférieurs à 2 nm.
- V_{MICRO} (N_2 , DR) (cm^3/g) : volume microporeux obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption d'azote par application de la méthode Dubinin - Radushkevich, diamètres de pores inférieurs à 2 nm.
- V_{ULTRA} (CO_2 , DR) (cm^3/g) : volume des ultramicropores obtenu à partir de l'isotherme d'adsorption du dioxyde de carbone par application de la méthode Dubinin – Radushkevich, diamètres de pores inférieurs à 0,7 nm.

Les analyses par adsorption de gaz ont été réalisées sur deux appareils QUANTACHROME® :

- l'Autosorb - 1 pour la détermination des isothermes d'adsorption à l'azote ;
- le Quadrasorb pour le dioxyde de carbone.

Annexe 6 : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une spectroscopie vibrationnelle donnant des informations sur la nature des liaisons chimiques et donc 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. L'utilisation de IRTF pour la caractérisation des phosphates de calcium est développée et discutée dans le chapitre I de la partie A.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés en transmission avec un spectromètre Nicolet 6700 de la marque Thermo Scientific®. Les pastilles d'analyse d'environ 100 mg sont constituées du matériau hybride dispersé à 1% en masse dans du KBr préalablement séché. Les spectres moyennés sont obtenus par l'acquisition de 256 spectres enregistrés entre 4000 et 400 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} .

La spectroscopie IRTF permet également de quantifier le taux de carbonate dans les apatites. Grunenwald *et al.* ont validé une méthode rapide par IRTF qui permet, en calculant le rapport de l'aire sous le pic $\nu_3(\text{CO}_3)$ sur l'aire sous le pic $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$, de remonter au taux de carbonate dans l'apatite (Figure 3).

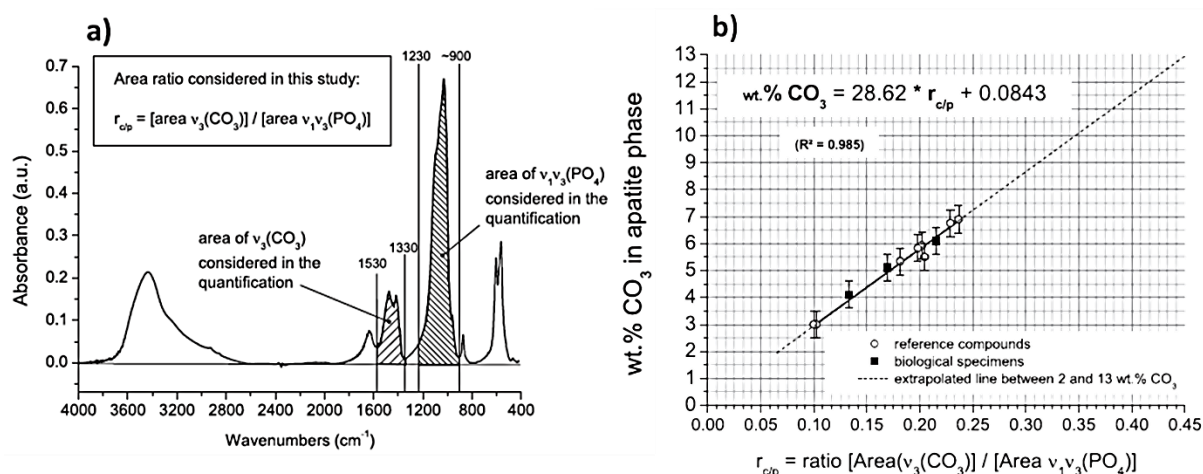


Figure 3 : Méthode IRTF de quantification des carbonates : a) évaluation du ratio $r_{c/p}$ entre l'intensité intégrée de la bande $\nu_3(\text{CO}_3)$ et celle de la bande $\nu_1\nu_3(\text{PO}_4)$, et b) corrélation entre le ratio $r_{c/p}$ et le taux de carbonatation (en % massique) de différentes apatites (synthétisées et biologiques) [65].

Dans cette étude, nous avons estimé le taux de carbonate par IRTF en suivant cette méthode et en utilisant l'équation obtenue (Figure 3 b)). Le ratio ($r_{c/p}$) a été calculé à partir des spectres IRTF réalisés dans les conditions décrites au début de cette annexe. L'intégration des aires sous les pics a été réalisée sur le logiciel OriginPro 9.

Annexe 7 : Diffraction des rayons-X (DRX)

La DRX est une technique d'analyse qui permet, entre autre, d'étudier les différentes phases cristallines d'un matériau. Par cette technique, de nombreuses informations, notamment structurales, sont mises en avant. L'enregistrement de l'intensité diffractée en fonction de l'angle θ permet de détecter les périodicités d_{hkl} présentes dans le matériau sachant que la diffraction ne peut avoir lieu que lorsque les conditions de la loi de Bragg sont satisfaites ($d_{hkl} = \lambda / 2 \sin\theta$). Dans le cas d'un revêtement de CaP, cette technique de caractérisation permet de donner des informations sur la nature des phases phosphocalciques présentes au sein des revêtements ainsi que sur leur cristallinité et leur degré d'ordre/désordre. Dans le cas d'une modification de structure par incorporation d'un nouvel élément (ex : Sr^{2+}), la DRX fournit des informations sur la modification de la structure cristalline notamment sur la modification des paramètres de maille.

Les diffractogrammes ont été enregistrés directement sur le matériau hybride par transmission selon le montage suivant Figure 4.

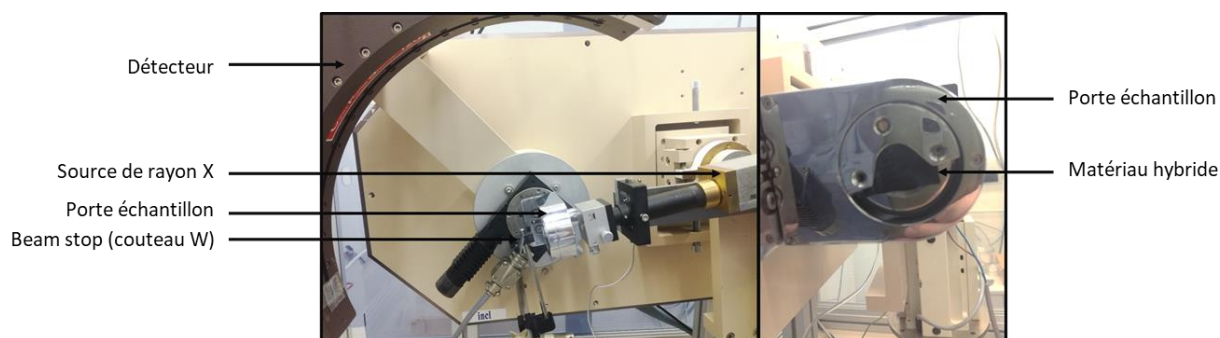


Figure 4 : Montage DRX utilisé pour caractériser les matériaux hybrides.

L'appareil de diffraction des rayons X est un 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 $\lambda_{\text{Cu}} = 0,154056 \text{ nm}$. Le détecteur courbe est du type CPS 120. La durée d'acquisition des diffractogrammes est de 3 h entre 20 et 70 $2\theta(^{\circ})$.

Annexe 8 : Désorption à température programmée (DTP)

La désorption à température programmée est une technique d'analyse par traitement thermique sous flux de gaz d'un échantillon suivant une rampe de température définie. Le but est de provoquer la décomposition thermique de l'échantillon ou d'espèces adsorbées à la surface. Les effluents gazeux peuvent alors être analysés par différentes techniques telles que la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge ou la chromatographie en phase gazeuse. Dans notre cas, une analyse des gaz par spectrométrie de masse est effectuée. La DTP permet d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur la nature et la quantité des groupements de surface de carbones. Cette technique permet également d'évaluer les énergies d'interactions d'une espèce adsorbée à la surface d'un carbone activé en comparant les températures de décomposition des molécules organiques pures et adsorbées [194,195].

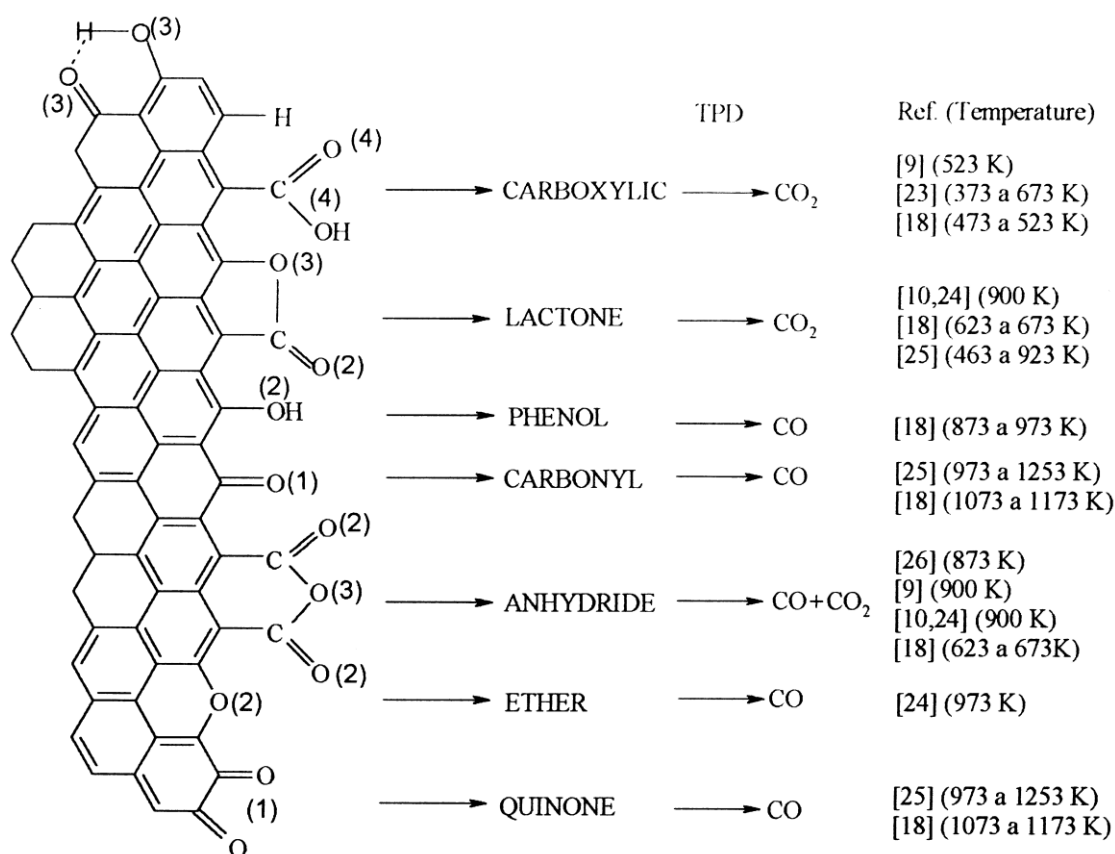


Figure 5 : Les différents groupes de surface d'un carbone activé et leurs produits de décomposition par TPD [196].

Les tissus de fibres de carbone possédant à leur surface d'importants groupements oxygénés, les gaz majoritairement émis durant la désorption thermique sont le dioxyde de carbone (CO₂), le monoxyde de carbone (CO) et la vapeur d'eau (H₂O) (Figure 5, Tableau 1). Ces gaz sont facilement détectables par spectrométrie de masse à des valeurs respectives de m/z de 44, 28, et 18 g/mol. Concernant le dioxyde de carbone, il se décompose à deux températures bien distinctes. Tout d'abord, les groupements

carboxyliques, qui se décomposent à plus faible température ($T < 430\text{ }^{\circ}\text{C}$) puis les groupements anhydrides et lactones qui se décomposent à plus haute température ($430 - 630\text{ }^{\circ}\text{C}$). De manière similaire, le monoxyde de carbone se décompose à deux températures bien distinctes à 630 et $830\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondant à des groupements phénols, éthers et carbonyles (Tableau 1). Dans le cas de la vapeur d'eau, un premier départ à faible température est observé et correspond à la signature de l'eau physisorbée. À plus haute température, l'eau analysée peut avoir plusieurs origines. En effet, l'eau peut être liée aux groupements oxygénés de surface par des liaisons hydrogène, provenir de la désorption thermique correspondant à des groupements phénoliques ou à des réactions de déshydratation de groupes carboxyliques pour donner des anhydrides d'acides [191,192,197].

Tableau 1 : Températures de décomposition des groupes de surface d'un carbone activé par DTP et gaz détectés [191].

Groupements de Surface	Dégagement gazeux	T décomposition ($^{\circ}\text{C}$)
Acides Carboxyliques	CO_2	200 - 250
Lactones	CO_2	350 - 400
Phénols	CO	600 - 700
Carbonyles	CO	800 - 900
Anhydrides	$\text{CO} + \text{CO}_2$	350 - 400
Ethers	CO	700
Quinones	CO	800 - 900

Les analyses TPD ont toutes été réalisées sous une atmosphère d'hélium avec des prises d'essais précises d'environ 25 mg de TFC avec une montée en température de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ jusqu'à la température maximale de $1200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Les analyses DTP sur les matériaux hybrides ont été réalisées exactement dans les mêmes conditions. Des contributions liées au revêtement sont également analysées par spectroscopie de masse et en particulier la décomposition des carbonates en CO et CO_2 . Après soustraction de la contribution des groupements de surface, seule la contribution des carbonates du revêtement est obtenue. La quantification du taux de carbonate peut alors être déduite après étalonnage dans les mêmes conditions du carbonate de calcium.

Un exemple de calcul du taux de carbonate par DTP est réalisé sur un revêtement de type OSr-CaP.

Pour ce faire, le carbonate de calcium (CaCO_3), le tissu FM 50K® et le matériaux hybride FM 50K®+0Sr-CaP sont analysés par DTP. Le thermogramme de l'étalon, le CaCO_3 , est présenté sur la Figure 6 a). Il montre deux températures de décomposition sur la courbe du CO et une température sur la courbe du CO_2 . Les gammes de températures et les aires associées sont données dans le Tableau 2. Dans un second temps, le thermogramme du tissu est soustrait du thermogramme du matériau hybride afin d'obtenir uniquement la contribution du revêtement (ici, 0Sr-CaP). Le thermogramme du revêtement est représenté sur la Figure 6 b). On obtient des pics CO et CO_2 pour des gammes de températures de décomposition similaires à celles de l'étalon. L'aire sous les pics est alors estimée (Tableau 2).

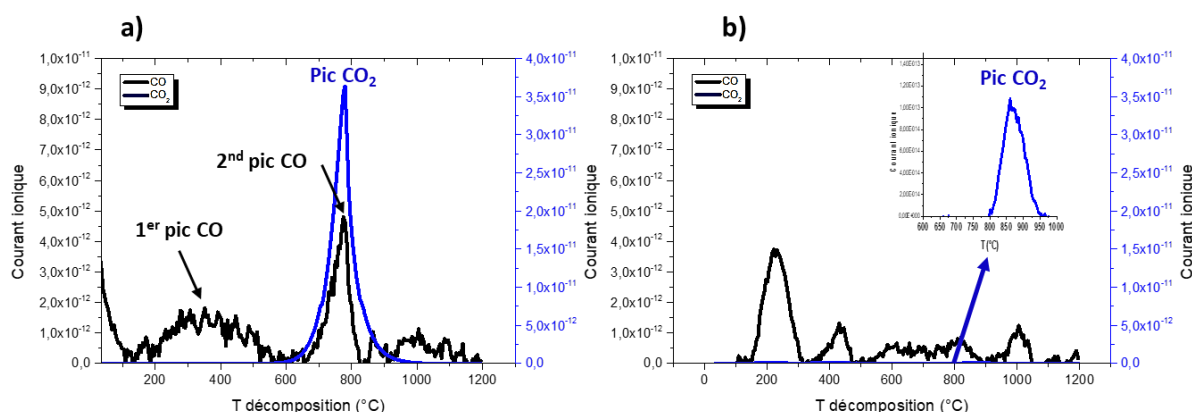


Figure 6 : Thermogrammes obtenu pour le composé : a) CaCO_3 et b) 0Sr-CaP.

L'aire sous les pics étant proportionnelle au taux de carbonate, il est alors possible de déduire la quantité de carbonate dans les revêtements. Dans le cas présent, le taux de carbonate est de 3 % en masse.

Tableau 2 : Paramètres pris en compte pour le calcul du taux de carbonate par DTP.

Ech.	Temp (°C)	Pic associé	Aire associée	Tot.	% wt. CO_3
CaCO_3	110-675	CO	$4,25 \times 10^{-10}$	$3,67 \times 10^{-9}$	60
	675-835	CO	$3,08 \times 10^{-10}$		
	560-980	CO_2	$2,94 \times 10^{-9}$		
FM 50K®+0Sr-CaP	110-675	CO	$1,35 \times 10^{-10}$	$1,86 \times 10^{-10}$	3,0
-	675-835	CO	$4,74 \times 10^{-11}$		
FM 50K®	560-980	CO_2	$3,78 \times 10^{-12}$		

Annexe 9 : Microscopie électronique à transmission (MET)

Le revêtement de CaP est isolé par simple « grattage » au scalpel des fibres puis est mis en suspension dans de l'éthanol absolu avant d'être dispersé sous ultrasons. La suspension contenant la poudre est placée sur une grille en cuivre de 3 mm de diamètre qui est recouverte d'une membrane conductrice en carbone de type Lacey. Après évaporation de l'éthanol, la grille est observée au moyen du microscope. Les images réalisées lors de cette étude ont été effectuées en fond clair contrasté sur un microscope Philips CM20 opérant à 200 kV et équipé d'une pointe LaB6.

Le MET utilise un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons à haute tension qui est ensuite focalisé sur l'échantillon par un ensemble de « lentilles électromagnétiques et diaphragmes ». En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En imagerie en fond clair contrasté, l'image est formée en faisant interférer le faisceau transmis 000 avec le(s) faisceau(x) hkl. Selon l'épaisseur, la densité ou encore la nature chimique locale de cet échantillon, les électrons sont plus ou moins absorbés. On observe ainsi en plaçant le détecteur dans le plan image, une image agrandie de la zone soumise au faisceau d'électrons. Afin d'obtenir des informations sur l'organisation cristalline des particules de CaP, l'imagerie HR-MET est utilisée.

Des diffractions électroniques à aire sélectionnée (DEAS) ont été réalisées sur les différents revêtements analysés. 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. La DEAS donne des informations sur la structure cristallographique ainsi que sur la cristallinité des particules de CaP.

Comme pour la microscopie électronique à balayage, des spectres EDX ont également été effectués. La spectroscopie des rayons X étudie la désexcitation des atomes de l'échantillon par émission de photons X. L'énergie des photons est caractéristique des atomes excités dont ils sont issus et sont donc caractéristiques de la composition élémentaire de la matière en surface du matériau. À noter, la profondeur sondée du matériau est fonction de la tension d'accélération des électrons incidents mais également de sa densité.

Cette technique est utilisée dans le cadre de cette étude afin d'obtenir les pourcentages atomiques des éléments caractéristiques de notre revêtement c'est-à-dire calcium, phosphore et strontium. Les rapports atomiques $\frac{Ca}{P}$ ou $\frac{Ca+Sr}{P}$ sont caractéristiques de la nature des phases phosphocalciques et le rapport $\frac{Sr}{Ca+Sr}$ permet de remonter au taux de substitution du strontium dans la structure. L'étalonnage quantitatif a préalablement été effectué à partir de la mesure du rapport atomique CaP d'une hydroxyapatite stœchiométrique commerciale (Sigma Aldrich, CAS No. 12167-74-7). L'analyse est répétée au minimum dix fois afin d'obtenir une moyenne représentative de nos échantillons et de pouvoir y appliquer un écart type cohérent.

Annexe 10 : Fiche 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		
						5.2596	46	1	0	1	1.9437	261	2	2	2		
						4.712	23	1	1	0	1.8906	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/ICor.: 1.06						3.5096	23	2	0	1	1.8066	181	3	2	1		
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++ (1997)						3.4395	357	0	0	2	1.7809	116	1	4	0		
Ref: Soderström, 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	614	1	1	2	1.6828	10	1	0	4		
Sys.: Hexagonal S.G.: P6 ₃ /m (178)						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:						2.5296	39	3	0	1	1.6106	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		
						2.2075	4	1	0	3	1.5423	43	2	4	0		
Dx: 3.153 Dm: ICSD #: 026205						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 Bolly Springs, CA, USA.						2.0818	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	1.4656	16	5	1	0		

d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
1.4536	74	3	0	4	1.1165	23	5	1	4
1.4502	93	3	2	3	1.1140	41	4	4	2
1.4336	69	5	1	1	1.1140	41	1	1	6
1.4085	21	1	4	3	1.1086	24	2	3	5
1.3890	1	2	2	4	1.1042	56	3	5	2
1.3693	4	3	1	4	1.0936	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					
1.2968	3	3	3	3					
1.2839	19	5	2	1					
1.2797	38	2	4	3					
1.2665	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					



Annexe 11 : Résonnance magnétique nucléaire (RMN) pour les solides

La RMN utilise la propriété magnétique de certains isotopes des atomes (spin non nul) caractéristiques de l'échantillon à caractériser. Lorsqu'un champ magnétique externe intense est appliqué, les noyaux s'orientent autour d'un champ avec une certaine fréquence caractéristique dite de Larmor. La mesure RMN consiste à émettre au niveau de l'échantillon un champ radiofréquence à la fréquence de Larmor du noyau sélectionné puis d'en enregistrer le signal de résonnance généré par le retour à l'équilibre. L'interprétation et la mesure de ces interactions permettent d'avoir des informations précieuses sur la nature et le nombre d'atomes voisins des noyaux étudiés, la liaison chimique, la conformation moléculaire, les distances interatomiques, la mobilité moléculaire, la configuration relative ou absolue de certains centres chiraux, etc.

Dans le cas de la RMN du solide, les échantillons sont placés dans un rotor et sont mis en rotation à un angle de $54,7^\circ$ par rapport au champ (MAS : Magic Angle Spinning), ce qui a pour conséquence de rétrécir la largeur des pics. En effet, la RMN MAS permet en général à haute vitesse de rotation d'annuler la partie anisotrope des différentes interactions (déplacement chimique, quadripolaire et couplage J) présentes dans les échantillons solides.

Durant cette étude, différentes expériences ont été réalisées par 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 en une détection du signal du ^{31}P par transfert de l'aimantation depuis le proton ^1H vers celui du ^{31}P en utilisant les couplages dipolaires résiduels en MAS (expérience CP-MAS). Ce transfert d'aimantation, s'il existe, permet donc de donner des informations sur les proximités spatiales qui existent entre les noyaux ^1H et ^{31}P . Néanmoins, les spectres acquis en CP-MAS ne sont pas quantitatifs.
- La dernière expérience a consisté à enregistrer les spectres de corrélation hétéronucléaires ^{31}P - ^1H (HETCOR). La représentation sous forme d'une carte de corrélation 2D entre les deux noyaux permet d'attribuer les proximités spatiales entre les différents sites des protons et ceux du phosphore des revêtements de CaP étudiés. Comme pour le CPMAS, cette expérience n'est pas quantitative.

Expérimentalement, le TFC et les matériaux hybrides sont enroulés et mis à l'intérieur d'un rotor. Le spectromètre RMN utilisé est un Avance I équipant un aimant de 7T de marque Bruker, situé au laboratoire CEMHTI (CNRS UPR 3079, Orléans, France).

Annexe 12 : Spectroscopie d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES)

Afin de déterminer la quantité de Ca^{2+} et de Sr^{2+} dans nos revêtements, des mesures ont été réalisées avec un spectromètre 4200 MP-AES d'Agilent Technologies. Les revêtements sont mis en solution en suivant le protocole suivant : le TFC recouvert par le revêtement de CaP est plongé dans une solution d'acide nitrique à 35 % (Sigma Aldrich®) pendant 3 h. Le tissu, sans son revêtement, est sorti de la solution et la suspension contenant le CaP est conservée. Elle est ensuite diluée afin d'obtenir une concentration en acide nitrique de 0,5 % pour éviter la formation d'oxydes. La solution obtenue est pulvérisée dans un plasma d'azote dont la température atteint 5000 °C. À ces températures, les atomes dans l'échantillon nébulisé sont désolvatés, atomisés, ionisés et excités. L'émission est assez forte pour la plupart des éléments ce qui permet ensuite de mesurer l'intensité de la lumière émise. Cette intensité émise est mesurée en utilisant la détection optique aux longueurs d'onde caractéristiques des éléments d'intérêt ($\lambda_{\text{Ca}} = 393,366 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{Sr}} = 407,771 \text{ nm}$). La détection et le comptage de ces photons permettent de quantifier les éléments du liquide en comparant le signal mesuré à celui obtenu pour une gamme d'étalon réalisée à partir des précurseurs. Les mesures sont réalisées au minimum sur trois échantillons afin d'obtenir une moyenne significative des résultats.

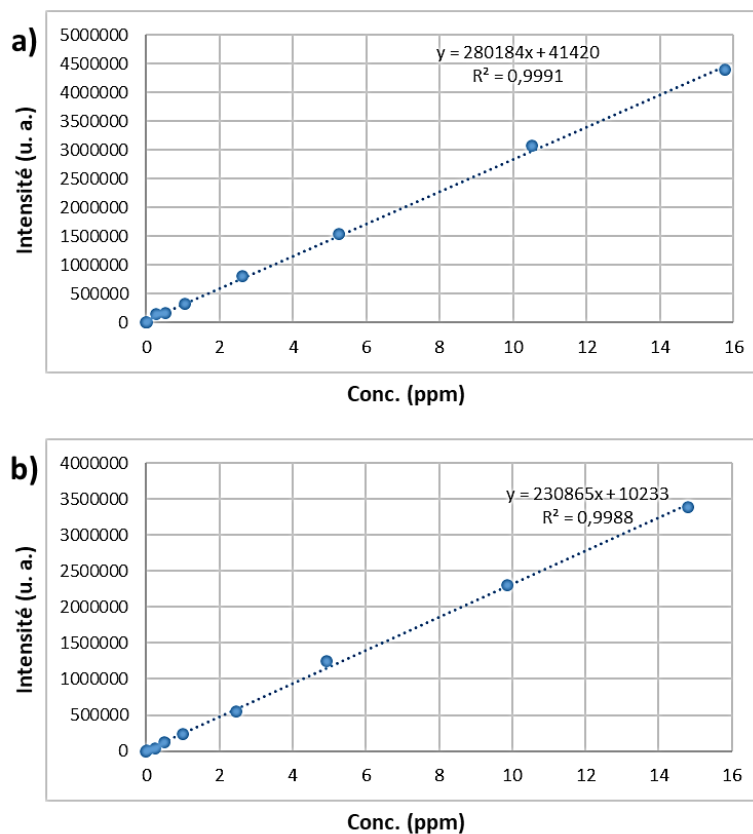


Figure 7 : Droite d'étalonnage du : a) calcium ($\lambda_{\text{Ca}} = 393,366 \text{ nm}$) et b) strontium ($\lambda_{\text{Sr}} = 407,771 \text{ nm}$) entre 0 et 16 ppm.

Annexe 13 : Spectroscopie UV-Visible

L'analyse par spectrophotométrie est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, à absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration.

$$A_{\lambda} = \epsilon * l * c$$

Où A_{λ} représente l'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée λ , l la longueur du chemin optique (cm) et c la concentration de principe actif (mol/L ou ppm). Les mesures ont été enregistrées à l'aide d'un spectromètre Cary 60 UV-Vis de chez Agilent Technologies.

Cette technique d'analyse est utilisée dans notre cas dans le but de mesurer les doses de principes actifs adsorbés dans nos matériaux hybrides. Le dosage se fait de manière indirecte par mesure de l'absorbance donc de la concentration de la solution de principes actifs avant et après adsorption.

Trois principes actifs ont été dosés lors de cette étude : la tétracycline (TC), le naproxène (NPX) et l'aspirine (AA).

Le dosage par spectrométrie UV-Visible de la TC est réalisé à 355 nm (maximum d'absorption), en relation avec une courbe d'étalonnage établie entre 0 et 820 mg/L (coefficient de corrélation $r^2 = 0,9996$). Toutes les solutions sont dosées après avoir été diluées 20 fois pour respecter la loi de Beer-Lambert.

Le dosage par UV-Visible du NPX est réalisé à 262 nm (maximum d'absorption), en relation avec une courbe d'étalonnage établie entre 0 et 250 mg/L (coefficient de corrélation $r^2 = 0,9996$). Toutes les solutions ont été dosées après avoir été diluées 5 fois pour respecter la loi de Beer-Lambert.

Le dosage par UV-Visible de l'AA est fait à 277 nm (maximum d'absorption) et est en référence à une courbe d'étalonnage établie entre 0 et 180 mg/L (coefficient de corrélation $r^2 = 0,996$). Aucune dilution n'a été nécessaire dans le cas présent.

Dans les trois cas présentés, la droite d'étalonnage est réalisée à partir de la solution la plus concentrée c'est-à-dire : 820 mg/L pour la TC, 250 mg/L pour le NPX et 180 mg/L pour l'AA. La solution est ensuite diluée à plusieurs reprises (au minimum 5 fois). La mesure de l'absorbance est ensuite réalisée pour toutes les solutions et la courbe (droite) correspondant à l'absorbance en fonction de la concentration est tracée.

Annexe 14 : Grille d'évaluation

MAJ le 29/01/2018

ETUDE D'EFFICACITÉ DE PANSEMENTS OSSEUX - CIEPAL 439 - Nathalie ROCHET

GRILLE DE SCORE

N° Protocole : Ciepal 439

Groupe : N° 1

Identification du rat : N° 1

Poids pré opératoire : 330g

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Comportement											
craintif	1										
agressif	1										
Déplacements											
Réduits	1										
Prostataion	3										
Appui											
Intermittent	2										
Pelage											
hérissé	2										
Cicatrice											
non nettoyée											
après 48h	2										
Signe d'abcès											
(tuméfaction)	2										
Radiographie											
infection	6										
fracture	6										
Total		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CONDUITE À TENIR:

Score = ou > à 4 --> anesthésie pour pesée, examen et radiographie

Radio : signes de fracture ou d'infection --> euthanasie (CO2)

COMMENTAIRES : RAS suites simples

Regroupement à J7 avec N°2 et N°3 opérés le même jour

Annexe 15 : Compte rendu opératoire

ETUDE D'EFFICACITÉ DE PANSEMENTS OSSEUX	
FICHE DE COMPTE RENDU OPÉRATOIRE	
DATE D'INTERVENTION : 13/01/2018	OPÉRATEUR : F.B.
IDENTIFICATION DU RAT : n°1 "FISTOLE"	
POIDS : 380g pesé à 11h50	
Heure de début : induction à 11h30	
Heure de fin :	
ANESTHÉSIE	
INDUCTION : BOÎTE : Isoflurane 5%, air 3L/min PUIS MASQUE : 3%, air 0,5L/min	
ROBINUL SC (5µl/100g) : 16,5µl → atropine 40x33=132µl	
Xylazine IM (38µl/100g) : 125.4µl + 50µl à 11h25	
Kétamine IM (30µl/100g) : 99µl	
ANALGESIE PRÉOPÉRATOIRE :	
BUPRECARE pré opératoire IP (12µl/100g) : 40µl	
MASQUE PENDANT INTERVENTION : O2 2L/min	
CHIRURGIE	
FEMUR GAUCHE : au premier	FEMUR DROIT : au 2e
Création du défaut : OK max 1h	Fermeture par 11h55
Taille du défaut : Fermeture 11h05	
PANSEMENT : NON	PANSEMENT : CaP.
Fin 12h00 Radio OK	
ANALGESIE POSTOPÉRATOIRE :	
BUPRECARE post opératoire IP (12µl/100g) : 40µl	
BLOC FÉMORAL POST OPÉRATOIRE (Ropivacaïne 2 mg/ml) : 200µl OK 2 colts	
INFILTRATION (Ropivacaïne 2 mg/ml) : 200µl OK 2 colts	
FERMETURE :	
Nombre de plans : 2	
Points internes : 1	
Points externes : 1	
COMMENTAIRES :	
auprès grille 11h05 - boîte adhésive de brûlé, finie → machine porte.	
50µl supp de xylazine à 11h25.	
CONCENTRATIONS STOCK :	
ROBINUL STOCK : 0,2 mg/ml Atropine	
XYLASINE STOCK : 20 mg/ml lot n° 070676 05-2018	
KETAMINE STOCK : 100 mg/ml lot n° 63K2 05-18	
BUPRENORPHINE IP : BUPRECARE solution injectable à 0,3 mg/ml lot H016 exp 05-2020.	
ROPIVACAÏNE : solution à 2 mg/ml BBE 12 LDR 14 04-2020	

Annexe 16 : Grille de traitement

Rats		Pansements		Date opération
NUM.	NOMS	FEMUR G	FEMUR D	
1	FISTOLE	Aucun	CaP	
2	TATOUILLE	Sr-CaP	Aucun	
3	VIOLI	CaP	Sr-CaP	
4	CAILLE	Aucun	Aucun	
5	DIN	Sr-CaP	Sr-CaP	
6	CONTé	CaP	CaP	
7	CINE	Aucun	Sr-CaP	
8	Clé	Sr-CaP	CaP	
9	BOTé	CaP	Aucun	
10	PLATI	Aucun	CaP	
11	QUETTE	Sr-CaP	Aucun	
12	PEUR	CaP	Sr-CaP	
13	MOLO	Aucun	Aucun	
14	TEAU	Sr-CaP	Sr-CaP	
15	STA	CaP	CaP	
16	VAGEUR	Aucun	Sr-CaP	
17	VALLé	Sr-CaP	CaP	
18	TURE	CaP	Aucun	
19	DEAU	Aucun	CaP	
20	VIN	Sr-CaP	Aucun	
21	LEUR	CaP	Sr-CaP	
22	BIBOCHER	Aucun	Sr-CaP	
23	CLETTE	Sr-CaP	CaP	
24	DIUS	CaP	Aucun	

Boee
"FISTOLE"
T^o

Boee
"FISTOLE"
T^o

TP mod!!
change dose

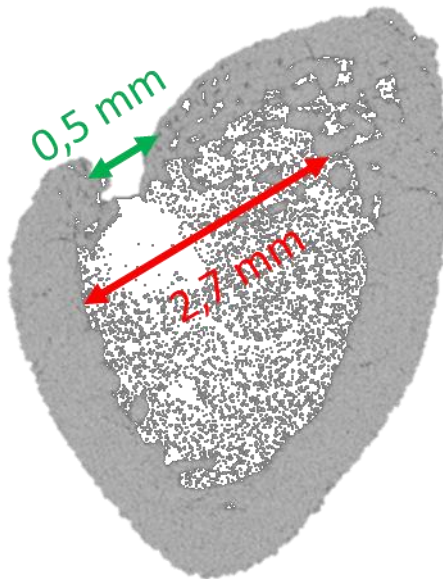
Annexe 18 : Analyse des images obtenues par microscanner

Les images obtenues par microscanner à basse et à haute résolution sont traitées à l'aide du logiciel CTAn. Le défaut étant initialement circulaire, lorsque la taille du défaut mesurée est maximum, on obtient théoriquement l'image représentant le centre du défaut. La mesure obtenue correspond alors au diamètre du défaut c'est-à-dire 2,7 mm à J0 et à la taille du défaut pour J13 et J26. Cette recherche est réalisée pour chaque fémur à chaque temps, ce qui permet d'obtenir le diamètre moyen des défauts c'est-à-dire la taille moyenne du défaut selon le temps de régénération.

Concernant le pourcentage de régénération, il est calculé à partir de la taille du défaut suivant la formule suivante :

$$\% \text{ régénération} = \frac{\varnothing \text{ initial} - \varnothing \text{ final}}{\varnothing \text{ initial}} * 100$$

Un exemple est donné ci-dessous :



On obtient pour ce temps de régénération (J26) :

- une taille de défaut de 0,5 mm
- un pourcentage de régénération de 81,5 %

$\% \text{ régénération} = \frac{2,7 - 0,5}{2,7} * 100 = 81,5 \%$

Références bibliographiques

- [1] P. Delhaes, Solides et matériaux carboné 1, phases carbonées et analogues, Lavoisier, Hermes Science Publications, 2009.
- [2] R. Leyva-Ramos, R. Ocampo-Perez, J. Mendoza-Barron, External mass transfer and hindered diffusion of organic compounds in the adsorption on activated carbon cloth, *Chemical Engineering Journal*. 183 (2012) 141–151. doi:10.1016/j.cej.2011.12.046.
- [3] S. Delpeux-Ouldriane, M. Gineys, N. Cohaut, F. Béguin, S. Masson, L. Reinert, L. Duclaux, Adsorption and Desorption of Emerging Water Contaminants on Activated Carbon Fabrics, *International Journal of Environmental Pollution and Remediation*. (2016). doi:10.11159/ijep.2016.001.
- [4] M. Gineys, R. Benoit, N. Cohaut, F. Bècguin, S. Delpeux-Ouldriane, Grafting of activated carbon cloths for selective adsorption, *Applied Surface Science*. 370 (2016) 522–527. doi:10.1016/j.apsusc.2015.11.257.
- [5] S. Masson, M. Gineys, S. Delpeux-Ouldriane, L. Reinert, S. Guittonneau, F. Béguin, L. Duclaux, Single, binary, and mixture adsorption of nine organic contaminants onto a microporous and a microporous/mesoporous activated carbon cloth, *Microporous and Mesoporous Materials*. 234 (2016) 24–34. doi:10.1016/j.micromeso.2016.07.001.
- [6] Q. Picard, Biomatériaux hybrides : tissu de fibres de carbone / phosphates de calcium : synthèse, caractérisation et biocompatibilité, Université d'Orléans, 2015.
- [7] F. Olivier, Q. Picard, S. Delpeux, F. Fayon, J. Chancolon, F. Warmont, N. Rochet, S. Bonnamy, Synthesis and Characterization of Biomimetic Strontium Substituted Carbonated Calcium-Deficient Hydroxyapatite Deposited on Carbon Fiber Cloths, *Key Engineering Materials*. 758 (2017) 199–203. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.758.199.
- [8] Q. Picard, F. Olivier, S. Delpeux, J. Chancolon, F. Warmont, S. Bonnamy, Development and Characterization of Biomimetic Carbonated Calcium-Deficient Hydroxyapatite Deposited on Carbon Fiber Scaffold, *C. 4* (2018) 25. doi:10.3390/c4020025.
- [9] M.-S. Scholz, J.P. Blanchfield, L.D. Bloom, B.H. Coburn, M. Elkington, J.D. Fuller, M.E. Gilbert, S.A. Muflahi, M.F. Pernice, S.I. Rae, J.A. Trevarthen, S.C. White, P.M. Weaver, I.P. Bond, The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review, *Composites Science and Technology*. 71 (2011) 1791–1803. doi:10.1016/j.compscitech.2011.08.017.
- [10] H. Bougherara, R. Zdero, A. Dubov, S. Shah, S. Khurshid, E.H. Schemitsch, A preliminary biomechanical study of a novel carbon–fibre hip implant versus standard metallic hip implants, *Medical Engineering & Physics*. 33 (2011) 121–128. doi:10.1016/j.medengphy.2010.09.011.
- [11] A. Slosarczyk, M. Klisch, M. Blazewicz, J. Piekarczyk, L. Stobierski, A. Rapacz-Kmita, Hot pressed hydroxyapatite-carbon fibre composites, *Journal of the European Ceramic Society*. (2000) 1397–1402.
- [12] X. Wang, X. Zhao, L. Zhang, W. Wang, J. Zhang, F. He, J. Yang, Design and fabrication of carbon fibers with needle-like nano-HA coating to reinforce granular nano-HA composites, *Materials Science and Engineering: C*. 77 (2017) 765–771. doi:10.1016/j.msec.2017.03.307.
- [13] H. Moissan, Nouvelles expériences sur la reproduction du diamant, *Comptes Rendus*. 118 (1894) 1058–1063.
- [14] J.D. Bernal, The Structure of Graphite, *Proc. Roy. Soc.* 106 (1924) 749.
- [15] H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, C₆₀: Buckminsterfullerene, *Nature*. 318(6042) (1985) 162–163.
- [16] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*. (1991) 56–58.
- [17] K.S. Novoselov, Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science*. 306 (2004) 666–669. doi:10.1126/science.1102896.
- [18] K.S. Novoselov, D. Jiang, F. Schedin, T.J. Booth, V.V. Khotkevich, S.V. Morozov, A.K. Geim, Two-dimensional atomic crystals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (2005) 10451–10453.

- [19] S. Iijima, M. Yudasaka, R. Yamada, S. Bandow, K. Suenaga, F. Kokai, K. Takahashi, Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns, *Chemical Physics Letters*. 309 (1999) 165–170. doi:10.1016/S0009-2614(99)00642-9.
- [20] P. Morgan, *Carbon fibers and their composites*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2005.
- [21] S.N. Naess, A. Elgsaeter, G. Helgesen, K.D. Knudsen, Carbon nanocones: wall structure and morphology, *Science and Technology of Advanced Materials*. 10 (2009) 065002. doi:10.1088/1468-6996/10/6/065002.
- [22] P. Delhaes, P. Orly, *Fibres de carbone et matériaux composites*, *L'actualité Chimique*. (2006) 42–46.
- [23] B.A. Newcomb, Processing, structure, and properties of carbon fibers, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 91 (2016) 262–282. doi:10.1016/j.compositesa.2016.10.018.
- [24] J.B. Donnet, R.C. Bansal, *Carbon fibres*, Taylor & Francis Group, 1990.
- [25] A. Oberlin, S. Bonnamy, K. Lafdi, 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. (1998) 85–159.
- [26] G. Dupupet, *Fibres de carbone*, *Techniques de l'ingénieur Les Grands Événements de l'année*. base documentaire : TIB625. (2008). <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/materiaux-th11/composites-a-renfort-textile-42656210/fibres-de-carbone-am5134/>.
- [27] A. Castro-Muñiz, F. Suárez-García, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, Activated carbon fibers with a high content of surface functional groups by phosphoric acid activation of PPTA, *Journal of Colloid and Interface Science*. 361 (2011) 307–315. doi:10.1016/j.jcis.2011.05.064.
- [28] M.A. Montes-Morán, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, R.J. Young, Effects of plasma oxidation on the surface and interfacial properties of ultra-high modulus carbon fibres, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 32 (2001) 361–371. doi:10.1016/S1359-835X(00)00109-3.
- [29] J.-Q. Chi, X. Shang, W.-K. Gao, B. Dong, K.-L. Yan, X. Li, Y.-R. Liu, Y.-M. Chai, C.-G. Liu, Binary metal Fe_{0.5}Co_{0.5}Se₂ spheres supported on carbon fiber cloth for efficient oxygen evolution reaction, *International Journal of Hydrogen Energy*. 42 (2017) 15189–15195. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.04.242.
- [30] A. Carranza-Bencano, J.R. Armas-Padro, Carbon "ber implants in osteochondral defects of the rabbit patella, (2000) 6.
- [31] S.E. Mäkilä, P. Paavolainen, M. Grönblad, T. Holmström, Tissue reactions around two alloplastic ligament substitute materials: experimental study on rats with carbon fibres and polypropylene, *Biomaterials*. 10 (1989) 105–108. doi:10.1016/0142-9612(89)90041-0.
- [32] K.P. Reed, S.S. van den Berg, A. Rudolph, J.A. Albright, H.W. Casey, A.A. Marina, Treatment of tendon injuries in thoroughbred racehorses using carbon-fiber implants, *Journal of Equine Veterinary Science*. 14 (1994) 371–377. doi:10.1016/S0737-0806(06)81754-5.
- [33] M. Wu, Q. Wang, X. Liu, H. Liu, Biomimetic synthesis and characterization of carbon nanofiber/hydroxyapatite composite scaffolds, *Carbon*. 51 (2013) 335–345. doi:10.1016/j.carbon.2012.08.061.
- [34] X. Zhao, X. Wang, H. Xin, L. Zhang, J. Yang, G. Jiang, Controllable preparation of SiC coating protecting carbon fiber from oxidation damage during sintering process and SiC coated carbon fiber reinforced hydroxyapatite composites, *Applied Surface Science*. 450 (2018) 265–273. doi:10.1016/j.apsusc.2018.04.164.
- [35] X. Wang, X. Zhao, W. Wang, J. Zhang, L. Zhang, F. He, J. Yang, Controllable preparation of a nano-hydroxyapatite coating on carbon fibers by electrochemical deposition and chemical treatment, *Materials Science and Engineering: C*. 63 (2016) 96–105. doi:10.1016/j.msec.2016.02.058.
- [36] H. Hong-mei, S.V. Mikhalevsky, G.J. Phillips, A.W. Lloyd, Calcium phosphate sonoelectrodeposition on carbon fabrics and its effect on osteoblast cell viability in vitro, *New Carbon Materials*. (2007) 5.
- [37] D. Adams, D.F. Williams, J. Hill, Carbon fiber-reinforced carbon as a potential implant material, *Journal of Biomedical Materials Research*. 12 (1978) 35–42. doi:10.1002/jbm.820120104.

- [38] R.J. Minns, D.S. Muckle, J.E. Donkin, The repair of osteochondral defects in osteoarthritic rabbit knees by the use of carbon fibre, *Biomaterials*. 3 (1982) 81–86. doi:10.1016/0142-9612(82)90038-2.
- [39] R.J. Minns, D.S. Muckle, Mechanical and histological response of carbon fibre pads implanted in the rabbit patella, *Biomaterials*. 10 (1989) 273–276. doi:10.1016/0142-9612(89)90105-1.
- [40] K.S. Pike, J.A. Kostinko, Calcium phosphate colorants and method for making same, MD (US) (73) Assignee: J. M. Huber Corporation, Edison, NJ, US 6,630,019 B2, 2003.
- [41] N. Lyczko, A. Nzihou, P. Sharrok, Calcium Phosphate Sorbent for Environmental Application, *Procedia Engineering*. 83 (2014) 423–431. doi:10.1016/j.proeng.2014.09.051.
- [42] C. Piccirillo, P.M. L. Castro, Calcium hydroxyapatite-based photocatalysts for environment remediation: Characteristics, performances and future perspectives, *Journal of Environmental Management*. 193 (2017) 79–91. doi:10.1016/j.jenvman.2017.01.071.
- [43] W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner, Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?, *Materials Today*. 19 (2016) 69–87. doi:10.1016/j.mattod.2015.10.008.
- [44] M. Jarcho, Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics, *Clin Orthop Relat Res*. 157 (1981) 259–78.
- [45] M. Canillas, P. Pena, A.H. de Aza, M.A. Rodríguez, Calcium phosphates for biomedical applications, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 56 (2017) 91–112. doi:10.1016/j.bsecv.2017.05.001.
- [46] A.K. Lynn, W. Bonfield, A Novel Method for the Simultaneous, Titrant-Free Control of pH and Calcium Phosphate Mass Yield, *Accounts of Chemical Research*. 38 (2005) 202–207. doi:10.1021/ar040234d.
- [47] J.H. Lee, M.Y. Ryu, H.-R. Baek, K.M. Lee, J.-H. Seo, H.-K. Lee, Fabrication and Evaluation of Porous Beta-Tricalcium Phosphate/Hydroxyapatite (60/40) Composite as a Bone Graft Extender Using Rat Calvarial Bone Defect Model, *The Scientific World Journal*. 2013 (2013) 1–9. doi:10.1155/2013/481789.
- [48] W.H. Harris, The Problem Is Osteolysis, *Clinical Orthopaedics*. (1995) 8.
- [49] K.A. Hing, S.M. Best, W. Bonfield, Characterization of porous hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 10 (1999) 135–145.
- [50] S.M. Best, A.E. Porter, E.S. Thian, J. Huang, Bioceramics: Past, present and for the future, *Journal of the European Ceramic Society*. 28 (2008) 1319–1327. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001.
- [51] M.I. Kai, R.A. Young, A.S. Posner, Crystal structure of hydroxyapatite, *Nature*. 204 (1964) 1050–1053.
- [52] S.V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates, *Angewandte Chemie International Edition*. 41 (2002) 3130–3146. doi:10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1.
- [53] Elliot, J. C., Mackie, P. E., Young, R. A., Monoclinic Hydroxyapatite, *Science*. 180 (1973) 1055–1057.
- [54] S. Von Euw, W. Ajili, T.-H.-C. Chan-Chang, A. Delices, G. Laurent, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azaïs, Amorphous surface layer versus transient amorphous precursor phase in bone – A case study investigated by solid-state NMR spectroscopy, *Acta Biomaterialia*. 59 (2017) 351–360. doi:10.1016/j.actbio.2017.06.040.
- [55] R. Young, D. Holcomb, Variability of hydroxyapatite preparations, *Calcified Tissue International*. 34 Suppl 2 (1982) S17–32.
- [56] Elliot, J. C., Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier Science, 1994.
- [57] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, M.J. Glimcher, Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 22 (2004). doi:10.1007/s00774-004-0488-0.
- [58] C. Drouet, F. Bosc, M. Banu, C. Largeot, C. Combes, G. Dechambre, C. Estournès, G. Raimbeaux, C. Rey, Nanocrystalline apatites: From powders to biomaterials, *Powder Technology*. 190 (2009) 118–122. doi:10.1016/j.powtec.2008.04.041.

- [59] R. Legros, N. Balmain, G. Bonel, Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone, *Calcified Tissue International*. 41 (1987) 137–144. doi:10.1007/BF02563793.
- [60] S. Cazalbou, D. Eichert, X. Ranz, C. Drouet, C. Combes, M.F. Harmand, C. Rey, Ion exchanges in apatites for biomedical applications, (n.d.) 5.
- [61] E. Mavropoulos, A.M. Rossi, N.C.C. da Rocha, G.A. Soares, J.C. Moreira, G.T. Moure, Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different conditions, *Materials Characterization*. 50 (2003) 203–207. doi:10.1016/S1044-5803(03)00093-7.
- [62] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug, Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials, *Materials Science and Engineering: C*. 27 (2007) 198–205. doi:10.1016/j.msec.2006.05.015.
- [63] B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Materials Science and Engineering: C*. 25 (2005) 131–143. doi:10.1016/j.msec.2005.01.008.
- [64] R. Murugan, S. Ramakrishna, K. Panduranga Rao, Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffold made of natural bone, *Materials Letters*. 60 (2006) 2844–2847. doi:10.1016/j.matlet.2006.01.104.
- [65] A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, C. Drouet, Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology, *Journal of Archaeological Science*. 49 (2014) 134–141. doi:10.1016/j.jas.2014.05.004.
- [66] Y. Suetsugu, Y. Takahashi, F.P. Okamura, J. Tanaka, Structure Analysis of A-Type Carbonate Apatite by a Single-Crystal X-Ray Diffraction Method, *Journal of Solid State Chemistry*. 155 (2000) 292–297. doi:10.1006/jssc.2000.8887.
- [67] T.I. Ivanova, O.V. Frank-Kamenetskaya, A.B. Kol'tsov, V.L. Ugolkov, Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition, *Journal of Solid State Chemistry*. 160 (2001) 340–349. doi:10.1006/jssc.2000.9238.
- [68] M.E. Fleet, X. Liu, Location of type B carbonate ion in type A–B carbonate apatite synthesized at high pressure, *Journal of Solid State Chemistry*. 177 (2004) 3174–3182. doi:10.1016/j.jssc.2004.04.002.
- [69] C. Drouet, M.-T. Carayon, C. Combes, C. Rey, Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically-active ions Mg²⁺ and Sr²⁺: A preamble to the activation of bone repair materials, *Materials Science and Engineering: C*. 28 (2008) 1544–1550. doi:10.1016/j.msec.2008.04.011.
- [70] S. Cazalbou, D. Eichert, C. Drouet, C. Combes, C. Rey, Biological mineralizations based on calcium phosphates, (n.d.) 12.
- [71] D. Eichert, M. Salomé, M. Banu, J. Susini, C. Rey, Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non-apatitic calcium phosphates of biological interest by X-ray absorption spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 60 (2005) 850–858. doi:10.1016/j.sab.2005.05.012.
- [72] N. Vandecandelaere, C. Rey, C. Drouet, Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23 (2012) 2593–2606. doi:10.1007/s10856-012-4719-y.
- [73] S. Cazalbou, G. Bertrand, C. Drouet, Tetracycline-Loaded Biomimetic Apatite: An Adsorption Study, *The Journal of Physical Chemistry B*. 119 (2015) 3014–3024. doi:10.1021/jp5116756.
- [74] S. Sarda, F. Errassifi, O. Marsan, A. Geffre, C. Trumel, C. Drouet, Adsorption of tranexamic acid on hydroxyapatite: Toward the development of biomaterials with local hemostatic activity, *Materials Science and Engineering: C*. 66 (2016) 1–7. doi:10.1016/j.msec.2016.04.032.
- [75] C. Combes, R. Bareille, C. Rey, Calcium carbonate–calcium phosphate mixed cement compositions for bone reconstruction, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 79A (2006) 318–328. doi:10.1002/jbm.a.30795.
- [76] N. Elahpour, S.M. Rabiee, M.H. Ebrahimzadeh, A. Moradi, In-vitro formation and growth kinetics of apatite on a new light-cured composite calcium phosphate cement, *Ceramics International*. 44 (2018) 15317–15322. doi:10.1016/j.ceramint.2018.05.178.
- [77] Autefage, H., Briand-Mesange, F., Cazalbou, S., Drouet, C., Fourmy, D., Goncalves, S., Salles, J., Combes, C., Swider, P., Rey, C., Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite β -tricalcium phosphate porous ceramics, 529–530 (2009) 475–479.

- [78] H. Zhou, S. Hou, M. Zhang, M. Yang, L. Deng, X. Xiong, X. Ni, Deposition of calcium phosphate coatings using condensed phosphates ($P_2O_7^{4-}$ and $P_3O_{10}^{5-}$) as phosphate source through induction heating, *Materials Science and Engineering: C*. 69 (2016) 337–342. doi:10.1016/j.msec.2016.06.090.
- [79] A. Al-Kattan, S. Girod-Fullana, C. Charvillat, H. Ternet-Fontebasso, P. Dufour, J. Dexpert-Ghys, V. Santran, J. Bordère, B. Pipy, J. Bernad, C. Drouet, Biomimetic nanocrystalline apatites: Emerging perspectives in cancer diagnosis and treatment, *International Journal of Pharmaceutics*. 423 (2012) 26–36. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.005.
- [80] M. Tourbin, A. Al-Kattan, C. Drouet, Study on the stability of suspensions based on biomimetic apatites aimed at biomedical applications, *Powder Technology*. 255 (2014) 17–22. doi:10.1016/j.powtec.2013.08.008.
- [81] A. Adamiano, M. Iafisco, M. Sandri, M. Basini, P. Arosio, T. Canu, G. Sitia, A. Esposito, V. Iannotti, G. Ausanio, E. Fragogeorgi, M. Rouchota, G. Loudos, A. Lascialfari, A. Tampieri, On the use of superparamagnetic hydroxyapatite nanoparticles as an agent for magnetic and nuclear in vivo imaging, *Acta Biomaterialia*. 73 (2018) 458–469. doi:10.1016/j.actbio.2018.04.040.
- [82] J. Gómez-Morales, M. Iafisco, J.M. Delgado-López, S. Sarda, C. Drouet, Progress on the preparation of nanocrystalline apatites and surface characterization: Overview of fundamental and applied aspects, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. 59 (2013) 1–46. doi:10.1016/j.pcrysgrow.2012.11.001.
- [83] M. Šupová, Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review, *Ceramics International*. 41 (2015) 9203–9231. doi:10.1016/j.ceramint.2015.03.316.
- [84] G. Renaudin, E. Jallot, J.M. Nedelec, Effect of strontium substitution on the composition and microstructure of sol–gel derived calcium phosphates, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 51 (2009) 287–294. doi:10.1007/s10971-008-1854-5.
- [85] S.A. Qaisar, M. Bilton, Wallace, R., Brydson, R., Brown, A. P., Ward, M., Milne, S. J., Sol-gel synthesis and TEM-EDX characterisation of hydroxyapatite nanoscale powders modified by Mg, Sr or Ti, *Journal of Physics: Conference Series*. 241 (2010) 012052. doi:10.1088/1742-6596/241/1/012052.
- [86] M.D. O'Donnell, Y. Fredholm, A. de Rouffignac, R.G. Hill, Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites, *Acta Biomaterialia*. 4 (2008) 1455–1464. doi:10.1016/j.actbio.2008.04.018.
- [87] S.C. Cox, P. Jamshidi, L.M. Grover, K.K. Mallick, Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation, *Materials Science and Engineering: C*. 35 (2014) 106–114. doi:10.1016/j.msec.2013.10.015.
- [88] K. Lin, P. Liu, L. Wei, Z. Zou, W. Zhang, Y. Qian, Y. Shen, J. Chang, Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release, *Chemical Engineering Journal*. 222 (2013) 49–59. doi:10.1016/j.cej.2013.02.037.
- [89] C.-J. Chung, H.-Y. Long, Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses, *Acta Biomaterialia*. 7 (2011) 4081–4087. doi:10.1016/j.actbio.2011.07.004.
- [90] C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I.N. Mihailescu, A. Bigi, Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response, *Acta Biomaterialia*. 4 (2008) 1885–1893. doi:10.1016/j.actbio.2008.05.005.
- [91] I. Pereiro, C. Rodríguez-Valencia, C. Serra, E.L. Solla, J. Serra, P. González, Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings, *Applied Surface Science*. 258 (2012) 9192–9197. doi:10.1016/j.apsusc.2012.04.063.
- [92] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomaterialia*. 6 (2010) 1882–1894. doi:10.1016/j.actbio.2009.12.041.
- [93] M. Kavitha, R. Subramanian, R. Narayanan, V. Udhayabanu, Solution combustion synthesis and characterization of strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Powder Technology*. 253 (2014) 129–137. doi:10.1016/j.powtec.2013.10.045.

- [94] C. Capuccini, P. Torricelli, E. Boanini, M. Gazzano, R. Giardino, A. Bigi, Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 89A (2009) 594–600. doi:10.1002/jbm.a.31975.
- [95] M. Frasnelli, F. Cristofaro, V.M. Sglavo, S. Dirè, E. Callone, R. Ceccato, G. Bruni, A.I. Cornaglia, L. Visai, Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration, *Materials Science and Engineering: C*. 71 (2017) 653–662. doi:10.1016/j.msec.2016.10.047.
- [96] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorganica Chimica Acta*. 360 (2007) 1009–1016. doi:10.1016/j.ica.2006.07.074.
- [97] Z.Y. Li, W.M. Lam, C. Yang, B. Xu, G.X. Ni, S.A. Abbah, K.M.C. Cheung, K.D.K. Luk, W.W. Lu, Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite, *Biomaterials*. 28 (2007) 1452–1460. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.001.
- [98] J. Zeglinski, M. Nolan, M. Bredol, A. Schatte, S.A.M. Tofail, Unravelling the specific site preference in doping of calcium hydroxyapatite with strontium from ab initio investigations and Rietveld analyses, *Physical Chemistry Chemical Physics*. 14 (2012) 3435. doi:10.1039/c2cp23163h.
- [99] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, M. Sandri, G. Logroscino, Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement, *Acta Biomaterialia*. 3 (2007) 961–969. doi:10.1016/j.actbio.2007.05.006.
- [100] Y. Shen, J. Liu, K. Lin, W. Zhang, Synthesis of strontium substituted hydroxyapatite whiskers used as bioactive and mechanical reinforcement material, *Materials Letters*. 70 (2012) 76–79. doi:10.1016/j.matlet.2011.11.093.
- [101] H.B. Pan, Z.Y. Li, W.M. Lam, J.C. Wong, B.W. Darvell, K.D.K. Luk, W.W. Lu, Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration, *Acta Biomaterialia*. 5 (2009) 1678–1685. doi:10.1016/j.actbio.2008.11.032.
- [102] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah, K.W.-H. Lo, The roles of ions on bone regeneration, *Drug Discovery Today*. 23 (2018) 879–890. doi:10.1016/j.drudis.2018.01.049.
- [103] H. Gautier, A. Plumecocq, G. Amador, P. Weiss, C. Merle, J.-M. Bouler, *In Vitro* Characterization of Calcium Phosphate Biomaterial Loaded with Linezolid for Osseous Bone Defect Implantation, *Journal of Biomaterials Applications*. 26 (2012) 811–828. doi:10.1177/0885328210381535.
- [104] C.A.S. de Souza, A.P.V. Colombo, R.M. Souto, C.M. Silva-Boghossian, J.M. Granjeiro, G.G. Alves, A.M. Rossi, M.H.M. Rocha-Leão, Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 87 (2011) 310–318. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.035.
- [105] D. Eichert, C. Combes, C. Drouet, C. Rey, Formation and Evolution of Hydrated Surface Layers of Apatites, *Key Engineering Materials*. 284–286 (2005) 3–6. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.284-286.3.
- [106] C.G. Weber, M. Mueller, N. Vandecandelaere, I. Trick, A. Burger-Kentischer, T. Maucher, C. Drouet, Enzyme-functionalized biomimetic apatites: concept and perspectives in view of innovative medical approaches, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 25 (2014) 595–606. doi:10.1007/s10856-013-5097-9.
- [107] R. Bosco, M. Iafisco, J. van den Beucken, S.C.G. Leeuwenburgh, J.A. Jansen, Adsorption of Alendronate onto Biomimetic Apatite Nanocrystals to Develop Drug Carrier Coating for Bone Implants, *Key Engineering Materials*. 529–530 (2012) 475–479. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.475.
- [108] F. Errassifi, S. Sarda, A. Barroug, A. Legrouri, H. Sfihi, C. Rey, Infrared, Raman and NMR investigations of risedronate adsorption on nanocrystalline apatites, *Journal of Colloid and Interface Science*. 420 (2014) 101–111. doi:10.1016/j.jcis.2014.01.017.
- [109] H.H.K. Xu, M.D. Weir, C.G. Simon, Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration, *Dental Materials*. 24 (2008) 1212–1222. doi:10.1016/j.dental.2008.02.001.

- [110] C. Damia, D. Marchat, C. Lemoine, N. Douard, V. Chaleix, V. Sol, N. Larochette, D. Logeart-Avramoglou, J. Brie, E. Champion, Functionalization of phosphocalcic bioceramics for bone repair applications, *Materials Science and Engineering: C*. (2018). doi:10.1016/j.msec.2018.01.008.
- [111] T.S. Sampath Kumar, K. Madhumathi, Y. Rubaiya, M. Doble, Dual Mode Antibacterial Activity of Ion Substituted Calcium Phosphate Nanocarriers for Bone Infections, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3 (2015). doi:10.3389/fbioe.2015.00059.
- [112] N. Lowry, Y. Han, B.J. Meenan, A.R. Boyd, Strontium and zinc co-substituted nanophase hydroxyapatite, *Ceramics International*. 43 (2017) 12070–12078. doi:10.1016/j.ceramint.2017.06.062.
- [113] I. Ullah, W. Li, S. Lei, Y. Zhang, W. Zhang, U. Farooq, S. Ullah, M.W. Ullah, X. Zhang, Simultaneous co-substitution of Sr²⁺/Fe³⁺ in hydroxyapatite nanoparticles for potential biomedical applications, *Ceramics International*. (2018). doi:10.1016/j.ceramint.2018.08.187.
- [114] V. Martin, A. Bettencourt, Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties, *Materials Science and Engineering: C*. 82 (2018) 363–371. doi:10.1016/j.msec.2017.04.038.
- [115] M. Parent, H. Baradari, E. Champion, C. Damia, M. Viana-Trecant, Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance, *Journal of Controlled Release*. 252 (2017) 1–17. doi:10.1016/j.jconrel.2017.02.012.
- [116] E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, J.-M. Bouler, Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review, *Drug Discovery Today*. 15 (2010) 547–552. doi:10.1016/j.drudis.2010.05.003.
- [117] S.C. Cowin, ed., *Bone mechanics handbook*, 2. ed, CRC Press, Boca Raton, 2001.
- [118] L.G. Donaruma, Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp., *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*. 26 (1988) 414–414. doi:10.1002/pol.1988.140260910.
- [119] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials*. 30 (2009) 5897–5909. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- [120] Biomaterials - A Global Market Overview, Industry-Experts. (2018). <http://industry-experts.com/verticals/files/articles/BT008-biomaterials-a-global-market-overview-0.pdf>.
- [121] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, (2000) 15.
- [122] P.V. Giannoudis, J.J. Chris Arts, G. Schmidmaier, S. Larsson, What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute?, *Injury*. 42 (2011) S1–S2. doi:10.1016/j.injury.2011.06.001.
- [123] P. Janicki, G. Schmidmaier, What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells, *Injury*. 42 (2011) S77–S81. doi:10.1016/j.injury.2011.06.014.
- [124] G.M. Calori, E. Mazza, M. Colombo, C. Ripamonti, The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs?, *Injury*. 42 (2011) S56–S63. doi:10.1016/j.injury.2011.06.011.
- [125] P.V. Giannoudis, G.M. Calori, T. Begue, G. Schmidmaier, Bone regeneration strategies: Current trends but what the future holds?, *Injury*. 44 (2013) S1–S2. doi:10.1016/S0020-1383(13)70002-0.
- [126] W. Wang, K.W.K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioactive Materials*. 2 (2017) 224–247. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- [127] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N.H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J.C. Knowles, R.J. Newport, A. Wong, Z. Gan, M.E. Smith, Magnesium incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials*. 32 (2011) 1826–1837. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.017.
- [128] J. Abert, C. Bergmann, H. Fischer, Wet chemical synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite and its influence on the mechanical and biological properties, *Ceramics International*. 40 (2014) 9195–9203. doi:10.1016/j.ceramint.2014.01.138.
- [129] X. Lijuan, J. Liyun, X. Chengdong, J. Lixin, Effect of different synthesis conditions on the microstructure, crystallinity and solubility of Mg-substituted hydroxyapatite nanopowder, *Advanced Powder Technology*. 25 (2014) 1142–1146. doi:10.1016/j.appt.2014.02.019.

- [130] J.T.B. Ratnayake, M. Mucalo, G.J. Dias, Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends: Substituted HA for Bone Regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 105 (2017) 1285–1299. doi:10.1002/jbm.b.33651.
- [131] Z. Leilei, L. Hejun, L. Kezhi, Z. Shouyang, F. Qiangang, Z. Yulei, L. Shoujie, Double-layer TC4/Sr substituted hydroxyapatite bioactive coating for carbon/carbon composites, *Ceramics International*. 41 (2015) 427–435. doi:10.1016/j.ceramint.2014.08.087.
- [132] W. Querido, A.L. Rossi, M. Farina, The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches, *Micron*. 80 (2016) 122–134. doi:10.1016/j.micron.2015.10.006.
- [133] M.J. Glimcher, L.C. Bonar, M.D. Grynpas, W.J. Landis, A.H. Roufosse, Recent studies of bone mineral: Is the amorphous calcium phosphate theory valid?, *Journal of Crystal Growth*. 53 (1981) 100–119. doi:10.1016/0022-0248(81)90058-0.
- [134] P.J. Marie, P. Ammann, G. Boivin, C. Rey, Mechanisms of Action and Therapeutic Potential of Strontium in Bone, *Calcified Tissue International*. 69 (2001) 121–129. doi:10.1007/s002230010055.
- [135] M. Cohen-Solal, Strontium overload and toxicity: impact on renal osteodystrophy, *Nephrology Dialysis Transplantation*. 17 (2002) 30–34. doi:10.1093/ndt/17.suppl_2.30.
- [136] A. Barbara, P. Delannoy, B. Denis, P. Marie, Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells, *Metabolism*. 53 (2004) 532–537. doi:10.1016/j.metabol.2003.10.022.
- [137] Y. Liu, L. Wang, T. Kikuri, K. Akiyama, C. Chen, X. Xu, R. Yang, W. Chen, S. Wang, S. Shi, Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α , *Nature Medicine*. 17 (2011) 1594–1601. doi:10.1038/nm.2542.
- [138] J. Zhang, S. Ma, Z. Liu, H. Geng, X. Lu, X. Zhang, H. Li, C. Gao, X. Zhang, P. Gao, Guided bone regeneration with asymmetric collagen-chitosan membranes containing aspirin-loaded chitosan nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*. Volume 12 (2017) 8855–8866. doi:10.2147/IJN.S148179.
- [139] K.-Y. Chin, A Review on the Relationship between Aspirin and Bone Health, *Journal of Osteoporosis*. 2017 (2017) 1–8. doi:10.1155/2017/3710959.
- [140] J. Du, S. Mei, L. Guo, Y. Su, H. Wang, Y. Liu, Z. Zhao, S. Wang, Y. Liu, Platelet-rich fibrin/aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats, *Journal of Periodontal Research*. 53 (2018) 47–56. doi:10.1111/jre.12485.
- [141] X. Fang, L. Lei, T. Jiang, Y. Chen, Y. Kang, Injectable thermosensitive alginate/ β -tricalcium phosphate/aspirin hydrogels for bone augmentation: INJECTABLE THERMOSENSITIVE ALGINATE/B-TRICALCIUM PHOSPHATE/ASPIRIN HYDROGELS, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 106 (2018) 1739–1751. doi:10.1002/jbm.b.33982.
- [142] D.C. Bauer, E.S. Orwoll, K.M. Fox, T.M. Vogt, N.E. Lane, M.C. Hochberg, K. Stone, M.C. Nevitt, Aspirin and NSAID use in older women: Effect on bone mineral density and fracture risk, *Journal of Bone and Mineral Research*. 11 (2009) 29–35. doi:10.1002/jbmr.5650110106.
- [143] L.D. Carbone, F.A. Tyllavsky, J.A. Cauley, T.B. Harris, T.F. Lang, D.C. Bauer, K.D. Barrow, S.B. Kritchevsky, Association Between Bone Mineral Density and the Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Aspirin: Impact of Cyclooxygenase Selectivity, *Journal of Bone and Mineral Research*. 18 (2003) 1795–1802. doi:10.1359/jbmr.2003.18.10.1795.
- [144] A. Szcześ, L. Hołysz, E. Chibowski, Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, *Advances in Colloid and Interface Science*. 249 (2017) 321–330. doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [145] E.H. Everett, IUPAC, Manual of symbol and terminology for physico-chemical quantities and units, appendix, definitions, terminology and symbols in colloid and surface chemistry, *Pure Appl. Chem*. 31(4) (1972) 579.
- [146] K.S.W. Sing, Physisorption of nitrogen by porous materials, *Journal of Porous Materials*. 2 (1995) 5–8. doi:10.1007/BF00486564.
- [147] N. Eliaz, T.M. Sridhar, Electrocrystallization of Hydroxyapatite and Its Dependence on Solution Conditions, *Crystal Growth & Design*. 8 (2008) 3965–3977. doi:10.1021/cg800016h.

- [148] J. Shi, L.L. Dong, F. He, S. Zhao, G.-L. Yang, Osteoblast responses to thin nanohydroxyapatite coated on roughened titanium surfaces deposited by an electrochemical process, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 116 (2013) e311–e316. doi:10.1016/j.oooo.2012.02.021.
- [149] Y. Huang, X. Zhang, H. Zhang, H. Qiao, X. Zhang, T. Jia, S. Han, Y. Gao, H. Xiao, H. Yang, Fabrication of silver- and strontium-doped hydroxyapatite/TiO₂ nanotube bilayer coatings for enhancing bactericidal effect and osteoinductivity, *Ceramics International*. 43 (2017) 992–1007. doi:10.1016/j.ceramint.2016.10.031.
- [150] N. Eliaz, M. Eliyahu, Electrochemical processes of nucleation and growth of hydroxyapatite on titanium supported by real-time electrochemical atomic force microscopy, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 80A (2007) 621–634. doi:10.1002/jbm.a.30944.
- [151] R. Drevet, *Élaboration de nouveaux revêtements prothétiques phosphocalciques par électrodéposition. Caractérisation physico-chimique et structurale.*, (2011).
- [152] M. Shirkhanzadeh, Bioactive calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition, *Journal of Materials Science Letters*. 10 (1991) 1415–1417. doi:10.1007/BF00735695.
- [153] R. Narayanan, T.-Y. Kwon, K.-H. Kim, Direct nanocrystalline hydroxyapatite formation on titanium from ultrasonated electrochemical bath at physiological pH, *Materials Science and Engineering: C*. 28 (2008) 1265–1270. doi:10.1016/j.msec.2007.11.009.
- [154] S. Ban, S. Maruno, 'Effect of temperature on electrochemical deposition of calcium phosphate coatings in a simulated body fluid, 16 (1995) 5.
- [155] N. Metoki, D. Mandler, N. Eliaz, Effect of Decorating Titanium with Different Self-Assembled Monolayers on the Electrodeposition of Calcium Phosphate, *Crystal Growth & Design*. 16 (2016) 2756–2764. doi:10.1021/acs.cgd.6b00057.
- [156] T. Mokabber, L.Q. Lu, P. van Rijn, A.I. Vakis, Y.T. Pei, Crystal growth mechanism of calcium phosphate coatings on titanium by electrochemical deposition, *Surface and Coatings Technology*. 334 (2018) 526–535. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.12.011.
- [157] H. Benhayoune, R. Drevet, J. Fauré, S. Potiron, T. Gloriant, H. Oudadesse, D. Laurent-Maquin, Elaboration of Monophasic and Biphasic Calcium Phosphate Coatings on Ti6Al4V Substrate by Pulsed Electrodeposition Current, *Advanced Engineering Materials*. 12 (2010) B192–B199. doi:10.1002/adem.200980058.
- [158] S. Ban, S. Maruno, Morphology and microstructure of electrochemically deposited calcium phosphates in a modified simulated body fluid, *Biomaterials*. 19 (1998) 1245–1253. doi:10.1016/S0142-9612(98)00032-5.
- [159] S. Liu, H. Li, L. Zhang, X. Yin, Y. Guo, In simulated body fluid performance of polymorphic apatite coatings synthesized by pulsed electrodeposition, *Materials Science and Engineering: C*. 79 (2017) 100–107. doi:10.1016/j.msec.2017.05.037.
- [160] S.-C. Liou, S.-Y. Chen, H.-Y. Lee, J.-S. Bow, Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders, *Biomaterials*. 25 (2004) 189–196. doi:10.1016/S0142-9612(03)00479-4.
- [161] M. Fleet, Carbonated hydroxyapatite: Materials, synthesis, and applications, (2014) 1–268.
- [162] A. Oberlin, S. Bonnamy, K. Oshida, Landmarks for graphitization, *TANSO*. 2006 (2006) 281–298. doi:10.7209/tanso.2006.281.
- [163] K. Venkateswarlu, M. Sandhyarani, T.A. Nellaippan, N. Rameshbabu, Estimation of Crystallite Size, Lattice Strain and Dislocation Density of Nanocrystalline Carbonate Substituted Hydroxyapatite by X-ray Peak Variance Analysis, *Procedia Materials Science*. 5 (2014) 212–221. doi:10.1016/j.mspro.2014.07.260.
- [164] R.N. Panda, M.F. Hsieh, R.J. Chung, T.S. Chin, FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 64 (2003) 193–199. doi:10.1016/S0022-3697(02)00257-3.

- [165] W.P. Aue, A.H. Roufosse, M.J. Glimcher, R.G. Griffin, Solid-state phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of synthetic solid phases of calcium phosphate: potential models of bone mineral, *Biochemistry*. 23 (1984) 6110–6114. doi:10.1021/bi00320a032.
- [166] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite, *Magnetic Resonance in Chemistry*. 44 (2006) 573–580. doi:10.1002/mrc.1774.
- [167] A. Vyalikh, P. Simon, T. Kollmann, R. Kniep, U. Scheler, Local Environment in Biomimetic Hydroxyapatite–Gelatin Nanocomposites As Probed by NMR Spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*. 115 (2011) 1513–1519. doi:10.1021/jp1082399.
- [168] Y. Wang, S. Von Euw, F.M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Courty, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, T. Azaïs, N. Nassif, Water-mediated structuring of bone apatite, *Nature Materials*. 12 (2013) 1144–1153. doi:10.1038/nmat3787.
- [169] H. Roussière, G. Montavon, S. Laïb, P. Janvier, B. Alonso, F. Fayon, M. Petit, D. Massiot, J.-M. Bouler, B. Bujoli, Hybrid materials applied to biotechnologies: coating of calcium phosphates for the design of implants active against bone resorption disorders, *Journal of Materials Chemistry*. 15 (2005) 3869. doi:10.1039/b503680a.
- [170] C. Mellier, F. Fayon, F. Boukhechba, E. Verron, M. LeFerrec, G. Montavon, J. Lesoeur, V. Schnitzler, D. Massiot, P. Janvier, O. Gauthier, J.-M. Bouler, B. Bujoli, Design and properties of novel gallium-doped injectable apatitic cements, *Acta Biomaterialia*. 24 (2015) 322–332. doi:10.1016/j.actbio.2015.05.027.
- [171] S. Delpeux-Ouldriane, M. Gineys, N. Cohaut, F. Béguin, The role played by local pH and pore size distribution in the electrochemical regeneration of carbon fabrics loaded with bentazon, *Carbon*. 94 (2015) 816–825. doi:10.1016/j.carbon.2015.07.010.
- [172] B. Peter, D.P. Pioletti, S. Laïb, B. Bujoli, P. Pilet, P. Janvier, J. Guicheux, P.-Y. Zambelli, J.-M. Bouler, O. Gauthier, Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration, *Bone*. 36 (2005) 52–60. doi:10.1016/j.bone.2004.10.004.
- [173] R. Drevet, H. Benhayoune, Pulsed electrodeposition for the synthesis of strontium-substituted calcium phosphate coatings with improved dissolution properties, *Materials Science and Engineering: C*. 33 (2013) 4260–4265. doi:10.1016/j.msec.2013.06.019.
- [174] Z. Huang, F. Cui, Q. Feng, X. Guo, Incorporation of strontium into hydroxyapatite via biomineralization of collagen fibrils, *Ceramics International*. 41 (2015) 8773–8778. doi:10.1016/j.ceramint.2015.03.102.
- [175] J. Kolmas, A. Ślósarczyk, A. Wojtowicz, W. Kolodziejski, Estimation of the specific surface area of apatites in human mineralized tissues using ³¹P MAS NMR, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 32 (2007) 53–58. doi:10.1016/j.ssnmr.2007.08.001.
- [176] A. Dashti, D. Ready, V. Salih, J.C. Knowles, J.E. Barralet, M. Wilson, N. Donos, S.N. Nazhat, In vitro antibacterial efficacy of tetracycline hydrochloride adsorbed onto Bio-Oss® bone graft, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 93B (2010) 394–400. doi:10.1002/jbm.b.31594.
- [177] H.E. Reynel-Avila, D.I. Mendoza-Castillo, A. Bonilla-Petriciolet, J. Silvestre-Albero, Assessment of naproxen adsorption on bone char in aqueous solutions using batch and fixed-bed processes, *Journal of Molecular Liquids*. 209 (2015) 187–195. doi:10.1016/j.molliq.2015.05.013.
- [178] V. Asadian-Ardakani, S. Saber-Samandari, S. Saber-Samandari, The effect of hydroxyapatite in biopolymer-based scaffolds on release of naproxen sodium: CHITOSAN-graft-POLY(ACRYLIC ACID)/n-HAP AS DRUG CARRIER FOR BONE TISSUE ENGINEERING, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 104 (2016) 2992–3003. doi:10.1002/jbm.a.35838.
- [179] J.M. Choi, B. Lee, D. Jeong, K.H. Park, E.-J. Choi, Y.-J. Jeon, S.D. Dindulkar, E. Cho, S.H. Do, K. Lee, I.-S. Lee, S. Park, B.-H. Jun, J.-H. Yu, S. Jung, Characterization and regulated naproxen release of hydroxypropyl cyclosophoraose-pullulan microspheres, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 48 (2017) 108–118. doi:10.1016/j.jiec.2016.12.026.

- [180] R. Kumar, P.F. Siril, F. Javid, Unusual anti-leukemia activity of nanoformulated naproxen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Materials Science and Engineering: C*. 69 (2016) 1335–1344. doi:10.1016/j.msec.2016.08.024.
- [181] F.-C. Wu, R.-L. Tseng, R.-S. Juang, Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems, *Chemical Engineering Journal*. 150 (2009) 366–373. doi:10.1016/j.cej.2009.01.014.
- [182] A.C. Masquelet, L. Obert, La technique de la membrane induite pour les pertes de substance osseuse de la main et du poignet, *Chirurgie de la Main*. 29 (2010) S221–S224. doi:10.1016/j.main.2010.10.007.
- [183] M. Weiger, K.P. Pruessmann, MRI with Zero Echo Time, in: R.K. Harris (Ed.), *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2012. doi:10.1002/9780470034590.emrstm1292.
- [184] K. Itatani, T. Tsugawa, T. Umeda, Y. Musha, I.J. Davies, S. Koda, Preparation of submicrometer-sized porous spherical hydroxyapatite agglomerates by ultrasonic spray pyrolysis technique, *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 118 (2010) 462–466. doi:10.2109/jcersj2.118.462.
- [185] J.S. Cho, J.-C. Lee, S.H. Chung, J.K. Seo, S.-H. Rhee, Effect of grain size and density of spray-pyrolyzed hydroxyapatite particles on the sinterability of hydroxyapatite disk, *Ceramics International*. 40 (2014) 6691–6697. doi:10.1016/j.ceramint.2013.11.130.
- [186] P.S. Patil, Versatility of chemical spray pyrolysis technique, *Materials Chemistry and Physics*. 59 (1999) 185–198. doi:10.1016/S0254-0584(99)00049-8.
- [187] J.C. Vigui, J. Spitz, Chemical Vapor Deposition at Low Temperatures, *J. Electrochem. Soc.* (1975) 4.
- [188] H.A. Hamedani, K.-H. Dahmen, D. Li, H. Peydaye-Saheli, H. Garmestani, M. Khaleel, Fabrication of gradient porous LSM cathode by optimizing deposition parameters in ultrasonic spray pyrolysis, *Materials Science and Engineering: B*. 153 (2008) 1–9. doi:10.1016/j.mseb.2008.07.006.
- [189] C. Guild, S. Biswas, Y. Meng, T. Jafari, A.M. Gaffney, S.L. Suib, Perspectives of spray pyrolysis for facile synthesis of catalysts and thin films: An introduction and summary of recent directions, *Catalysis Today*. 238 (2014) 87–94. doi:10.1016/j.cattod.2014.03.056.
- [190] M. Aizawa, T. Hanazawa, K. Itatani, F.S. Howell, A. Kishioka, Characterization of hydroxyapatite powders prepared by ultrasonic spray-pyrolysis technique, *Journal of Materials Science*. 34 (1999) 2865–2873.
- [191] Surface chemistry of activated carbons and its characterization, (2006).
- [192] Surface Chemistry of Activated Carbons - Combining the Results of Temperature Programmed Desorption, Boehm, and Potentiometric Titrations, (2001).
- [193] Determination of proton affinity distributions for.pdf, (n.d.).
- [194] E. Castillejos-López, D.M. Nevskaja, V. Muñoz, A. Guerrero-Ruiz, On the interactions of phenol, aniline and p-nitrophenol on activated carbon surfaces as detected by TPD, *Carbon*. 46 (2008) 870–875. doi:10.1016/j.carbon.2008.02.007.
- [195] L.M. Pastrana-Martínez, M.V. López-Ramón, C. Moreno-Castilla, Adsorption and thermal desorption of the herbicide fluroxypyr on activated carbon fibers and cloth at different pH values, *Journal of Colloid and Interface Science*. 331 (2009) 2–7. doi:10.1016/j.jcis.2008.11.004.
- [196] J.. Figueiredo, M.F.. Pereira, M.M.. Freitas, J.J.. Órfão, Modification of the surface chemistry of activated carbons, *Carbon*. 37 (1999) 1379–1389. doi:10.1016/S0008-6223(98)00333-9.
- [197] H.F. Gorgulho, J.P. Mesquita, F. Gonçalves, M.F.R. Pereira, J.L. Figueiredo, Characterization of the surface chemistry of carbon materials by potentiometric titrations and temperature-programmed desorption, *Carbon*. 46 (2008) 1544–1555. doi:10.1016/j.carbon.2008.06.045.

Communications orales

COM 1 *Biomatériaux hybrides : Tissu de fibres de carbone / Phosphates de calcium*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. MATV2L : « Matériaux carbonés », Orléans, 14-16 Mars 2016.

COM 2 *Etude de dépôt de phosphates de calcium sur des tissus de fibres de carbone pour des applications biomédicales*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. SFEC 2016, Carqueiranne, 17-20 Mai 2016.

COM 3 *Study of Biomaterials based on calcium phosphate coating on carbon fiber scaffold*, Quentin PICARD, Florian OLIVIER, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. JSPS 117th Committee on Carbon Materials, Carbon Society of Japan, Osaka electro-Communication University, Osaka, Japan, September 9-10, 2016.

COM 4 *Caractérisations de biomatériaux hybrides biomimétiques*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. MaTV2L : « Imagerie et imagerie spectrale », Limoge, 13-15 Mars 2017.

COM 5 *Caractérisations de biomatériaux hybrides biomimétiques*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. SFEC, Saint Pierre d'Oléron, 21-24 Mai 2017.

COM 6 *La sonoélectrodéposition, un procédé versatile d'élaboration d'hydroxyapatite biomimétique*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. Journées de l'Electrochimie, Bordeaux, 26-29 Juin 2017.

COM 7 *Synthesis and characterization of biomimetic calcium-deficient hydroxyapatite on carbon cloth*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. Carbon 2017, Melbourne, 23-28 Juillet.

COM 8 *Synthesis and characterization of biomimetic carbonated calcium-deficient hydroxyapatite on carbon fiber cloth*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. CESEP'2017, Lyon, 23-26 Octobre 2017.

COM 9 *Synthesis and characterization of biomimetic strontium substituted carbonated calcium-deficient hydroxyapatite deposited on carbon fiber cloth*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. Bioceramics 29, Toulouse, 25-27 Octobre 2017.

COM 10 *Tissu de fibres de carbone / Hydroxyapatite biomimétique : vers des applications biomédicales*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. MatV2L : « Matériaux et sciences du vivant », Orléans, 31 Janvier - 1er Février 2018.

COM 11 *Tissu de fibres de carbone / Hydroxyapatite biomimétique : un nouveau biomatériau hybride pour la régénération osseuse*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Vincent SAROU-KANIAN, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. SFEC, Obernai, 15-18 Mai 2018.

COM 12 *Biomimetic strontium-substituted hydroxyapatite deposited on carbon fiber cloth for bone regeneration*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Vincent SAROU-KANIAN, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. Carbon, Madrid, 1-6 Juillet 2018.

Posters

P1 *Hybrid materials based on calcium phosphate deposit on carbon fiber scaffold*, Florian OLIVIER, Quentin PICARD, Sandrine DELPEUX, Jérôme CHANCOLON, Franck FAYON, Nathalie ROCHET, Fabienne WARMONT, Sylvie BONNAMY. TERM 2016, Riva Del Garda, 4-9 Juillet 2016.

Publication dans des revues à comité de lecture

Development and Characterization of Biomimetic Carbonated Calcium-Deficient Hydroxyapatite Deposited on Carbon Fiber Scaffold, Q. Picard, F. Olivier, S. Delpoux, J. Chancolon, F. Warmont and S. Bonnamy, C. 4, 25, 2018.

Synthesis and Characterization of Biomimetic Strontium Substituted Carbonated Calcium-Deficient Hydroxyapatite Deposited on Carbon Fiber Cloths, F. Olivier, Q. Picard, S. Delpoux, F. Fayon, J. Chancolon, F. Warmont, N. Rochet and S. Bonnamy, Key Engineering Materials 758, 199-203, 2017.

Article de vulgarisation

Des pansements osseux souples à base de fibres de carbone, S. Bonnamy, S. Delpoux et F. Olivier, Microscop, Le magazine de la délégation CNRS Centre Limousin Poitou-Charentes, Hors-série - Octobre 2016.

Formations

Formation réglementaire des personnes destinées à appliquer directement des procédures expérimentales aux animaux (Formation dite « opérateur »).

Formation complémentaire destinée aux personnes habilitées à expérimenter, sollicitant l'autorisation d'effectuer, dans le cadre de leurs expériences, des interventions chirurgicales (Connaissance de l'animal de laboratoire spécialisation chirurgicale).

**Elaboration, caractérisation, dopages et évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* de matériaux hybrides :
Tissus de fibres de carbone / Phosphates de calcium**

Résumé :

Ce travail a consisté à optimiser la synthèse de phosphates de calcium (CaP) déposés sur tissus de fibres de carbone (TFC) par procédé de sono-électrodéposition afin d'obtenir des revêtements uniformes. Les paramètres électrochimiques clés optimisés sont le type et la durée de polarisation cathodique ainsi que la température de l'électrolyte. Pour un potentiel constant de -1 V à 70 °C, un régime d'électrolyse contrôlé de l'eau conduit à la formation d'un revêtement plaquettaire d'hydroxyapatite déficiente en calcium (CDA) carbonatée. Les plaquettes sont composées de particules lamellaires (de quelques dizaines à centaines de nm) constituées de CDA carbonatée de structure ordonnée au cœur et de structure désordonnée car hydratée en surface des particules, organisation typique des apatites biomimétiques. Le matériau hybride a été dopé en strontium, engendrant la formation de revêtements où les ions Ca^{2+} sont substitués par des ions Sr^{2+} de manière contrôlée, conférant au biomatériau de nouvelles propriétés en vue d'une application en régénération osseuse. Ce travail a aussi démontré la possibilité d'adsorber de façon sélective des principes actifs ciblés (tétracycline, naproxène, aspirine) dans chaque constituant du matériau hybride. Les courbes de désorption ont mis en évidence deux modes de libération selon le principe actif.

Une évaluation biologique des différents matériaux hybrides a été réalisée. L'étude *in vitro* a porté sur la viabilité et la prolifération d'ostéoblastes humains en surface des biomatériaux hybrides, démontrant leur biocompatibilité. L'intérêt d'un dopage (Sr^{2+} , aspirine et naproxène) sur l'activité des ostéoblastes a été démontré. Une expérience pilote *in vivo* a été menée, consistant à créer un défaut osseux dans des fémurs de rats et à étudier l'influence du type de biomatériaux TFC/CaP sur les évolutions quantitative et qualitative de la régénération osseuse.

Mots clés : biomatériaux hybrides, tissu de fibres de carbone, hydroxyapatite déficiente en calcium carbonatée, sono-électrodéposition, dopage, principes actifs, biocompatibilité, régénération osseuse.

**Synthesis, characterization, doping and *in vitro* and *in vivo* biological evaluations of hybrid materials:
Carbon fiber cloths / Calcium phosphates**

Abstract:

Optimization of the synthesis of calcium phosphates (CaP) on carbon fiber cloths (TFC) was performed in using sono-electrodeposition process in order to obtain uniform coatings. The electrochemical potential applied and the electrolyte temperature during the synthesis were determined as being key parameters. For a constant potential of -1 V at 70 °C, a controlled water electrolysis regime results in the deposit of plate-like calcium-deficient apatite (CDA). This plate-like particles (from a few tens to hundreds of nm in length) consist in an ordered structure of carbonated CDA in their core and in a disordered structure in the hydrated surface, a typical organization of biomimetic apatites. The hybrid material was doped with strontium, resulting in a carbonated CDA coating where the Ca^{2+} ions are controllably substituted by Sr^{2+} ions, leading to new properties for a bone regeneration application. This work has also shown the possibility of selectively adsorb targeted active molecules (tetracycline, naproxen, aspirin) in each component of the hybrid material. The desorption curves revealed two modes of release depending on the active molecule.

A biological evaluation of the different hybrid materials was carried out. The *in vitro* study investigated the viability and proliferation of human osteoblasts at the surface of hybrid materials, demonstrating their biocompatibility. The interest of a doping (Sr^{2+} , aspirin and naproxen) on osteoblast activity was demonstrated. An *in vivo* pilot experiment was conducted, through the creation of a bone defect in rat thighbones to study the influence of TFC/CaP biomaterials on the quantitative and qualitative evolutions of bone regeneration.

Keywords: hybrid biomaterials, carbon fiber cloth, carbonated calcium deficient apatite, sono-electrodeposition, doping, active molecules, biocompatibility, bone regeneration.