

Les biomatériaux céramiques
de phosphate de calcium : de
la synthèse à la caractérisation
physico-chimique

Chapitre II. Les biomatériaux céramiques de phosphate de calcium : de la synthèse à la caractérisation physico-chimique

II.1.1. Synthèse par précipitation en voie aqueuse

Les procédés de synthèse de biomatériaux phosphocalciques font l'objet de nombreux travaux de recherche dans la littérature.

La méthode la plus couramment utilisée pour la synthèse de poudre de phosphate de calcium est la précipitation en voie aqueuse. C'est celle qui a été utilisée pour la synthèse des matériaux pour ce travail de thèse. Cette méthode consiste à utiliser un réacteur ([Figure 17](#)) pour rajouter une solution aqueuse de phosphate (enrichie ou non en silicium ou en carbonate) dans une solution de calcium à un débit, une température et un pH contrôlés. Les solutions sont mises à maturer sous agitation pendant une durée déterminée. La solution est ensuite récupérée dans des bocaux, centrifugée et le précipité mis dans une étuve à 100 °C toute une nuit (protocole détaillé ci-dessous).

3 compositions chimiques de matériaux ont été synthétisées :

-l'hydroxyapatite stœchiométrique, HA : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

-l'hydroxyapatite silicatée, SiHA : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,6}(\text{SiO}_4)_{0,4}(\text{OH})_{1,6}$

-l'hydroxyapatite carbonatée de type B, CHA : $\text{Ca}_{9,5}(\text{PO}_4)_{5,5}(\text{CO}_3)_{0,48}(\text{OH})_{1,5}$

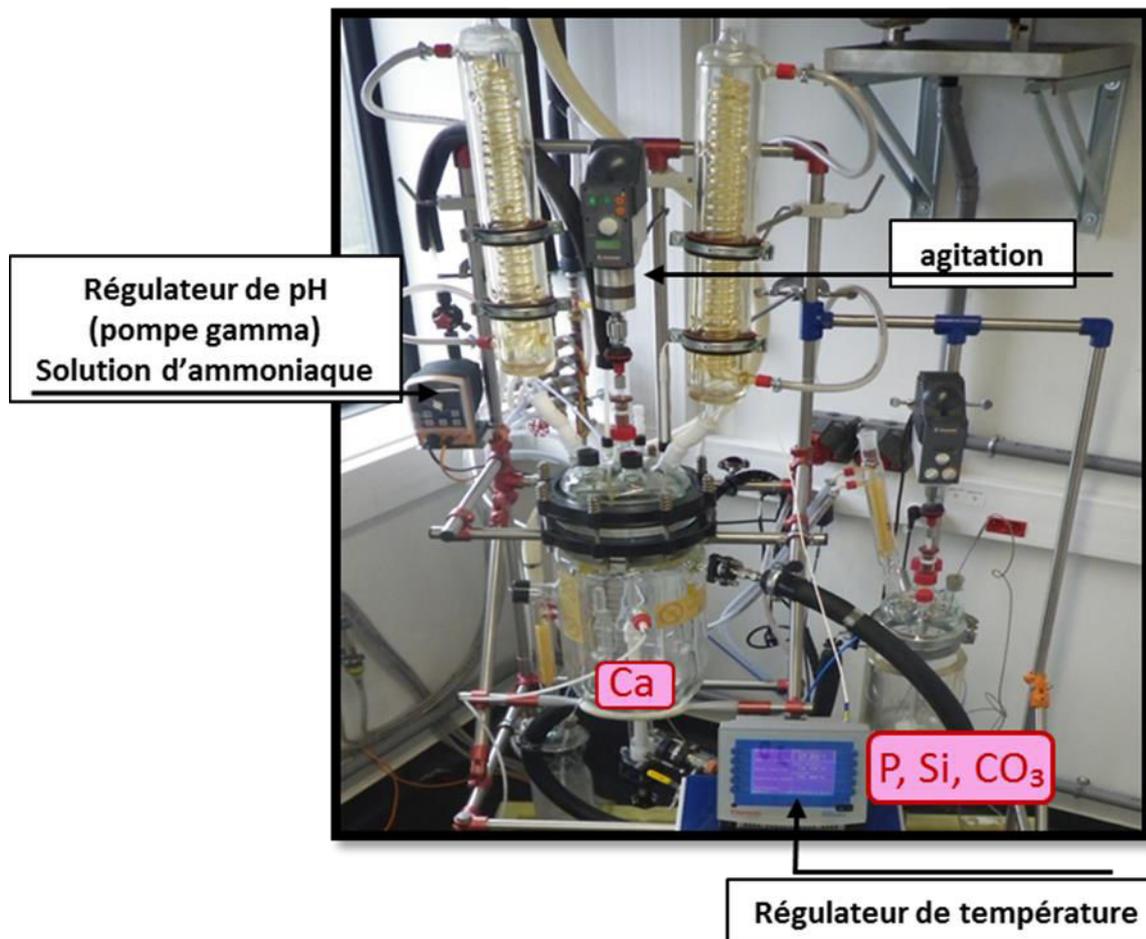


Figure 17 : photographie du réacteur utilisé pour les synthèses au laboratoire SPCTS.

II.1.1.1 Synthèse d'hydroxyapatite stœchiométrique (HA)

Sur la base des travaux de recherche de Raynaud *et al* (Raynaud et al., 2002), une solution de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ de pureté 99% (sigma aldrich) de concentration 0,19 mol/L a été ajoutée à une solution de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2,4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,32 mol/L pour avoir un rapport stœchiométrique final $\text{Ca}/\text{P}=1,667$. Le débit d'addition a été contrôlé (10mL/min). Le mélange est resté sous agitation à 120 rotations par minute (rpm) pendant 15 min, à 90°C. Le pH a été maintenu à 9 par l'ajout d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH , sigma aldrich) à l'aide d'une pompe gamma (pompe gamma/L, ProMinent). La synthèse s'est faite sous balayage d'argon à 0,5 L/min pour éviter la carbonatation. Après les 15 min de maturation, le précipité a été récupéré dans des bocaux pour être lavé et enlever les résidus de la synthèse. Les bocaux ont été remplis à moitié avec le précipité et équilibrés deux à deux avec de l'eau distillée pour être centrifugés pendant 5 min à 500G. Cette étape a été réalisée trois fois. Le précipité a été mis à sécher dans une étuve à 100°C durant 12 heures.

II.1.1.2 Synthèse d'hydroxyapatite silicatée (SiHA)

La synthèse d'hydroxyapatite silicatée a été réalisée sur la base des travaux de recherche de M. Palard, (Palard et al., 2008). Une solution de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Sigma–Aldrich, pureté : 99%) à 0,60 mol/L et de silicium $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ à 0,04 mol/L (Sigma–Aldrich, pureté : 98%) a été ajoutée dans la solution de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,64 mol/L pour avoir une substitution hypothétique en silicium $x=0,4$ mol soit 1,13% massique. La solution de silicium a préalablement été homogénéisée dans un broyeur planétaire (Pulvérisette 6, Fritsch). 13,800 g de poudre ont été mélangés à 100 mL d'eau distillée dans une jarre en alumine de 250 mL contenant 4 billes de broyage en alumine de diamètre 15 mm. La solution a été homogénéisée dans le broyeur planétaire pendant 1 min à 150 rpm. Ce mélange a ensuite été ajouté à la solution de phosphate et complété avec de l'eau distillée pour atteindre un volume final de 1,2 L. Ce mélange de solution de phosphate et de silicium a été ajouté à la solution de calcium avec un débit d'écoulement maintenu à 10 mL/min. La solution a mûri sous agitation à 120 rpm pendant 15 min à 90 °C sous un débit d'argon 0,5 L/min. Une solution d'hydroxyde d'ammonium a été ajoutée par impulsion à l'aide d'une pompe gamma (pompe gamma/L, ProMinent) pour maintenir le pH à 9. Après les 15 min de maturation, le précipité a été récupéré dans des bocaux pour être lavé et enlever les résidus de la synthèse. Les bocaux ont été remplis à moitié avec le précipité et équilibrés deux à deux avec de l'eau distillée pour être centrifugés pendant 5 min à 500G. Cette étape a été réalisée trois fois. Le précipité a été mis à sécher dans une étuve à 100 °C durant 12 heures.

II.1.1.3 Synthèse d'hydroxyapatite carbonatée (CHA)

La synthèse d'hydroxyapatite carbonatée a été réalisée selon le protocole établi par JM Lafon (Lafon et al., 2008). Une solution aqueuse de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,53 mol/L et de carbonate $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,07 mol/L a été ajoutée à la solution de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, pureté: 99%) à 0,53 mol/L. Le pH de la réaction a été maintenu à 9 par l'addition d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). La température a été contrôlée et maintenue à 90 °C et le pH à 9 grâce à l'ajout d'une solution d'hydroxyde d'ammonium. La réaction a été réalisée sous flux d'argon (0,5 mL/min) pour éviter la carbonatation incontrôlée de l'apatite par dissolution de gaz

CO₂. Le mélange réactionnel a été agité pendant 30 min, 120 rpm. Le précipité a été récupéré dans des bocaux pour être lavé et enlever les résidus de la synthèse. Les bocaux ont été remplis à moitié avec le précipité et équilibrés deux à deux avec de l'eau distillée pour être centrifugés pendant 5 min à 500G. Cette étape a été réalisée trois fois. Le précipité a été mis à sécher dans une étuve à 100 °C durant 12 heures.

Trois lots de poudres ont été synthétisés. La valeur en ions carbonates étant du même ordre de grandeur pour les trois lots d'échantillons, ces lots ont été mélangés au turbula toute une nuit. Un mélange unique des 3 lots de poudres ont été utilisés pour s'assurer d'avoir suffisamment de poudre pour réaliser l'ensemble des expériences biologiques en conditions comparables.

II.1.1.4 Caractérisation des poudres

Le précipité séché a été broyé à l'aide d'un mortier. La poudre CHA, a été calcinée à 400 °C-2h sous air pour éviter la décarbonatation qui peut se produire dès 600 °C (Lafon, 2004). Par contre, un aliquot des poudres HA et SiHA, a été calciné à 1000 °C-15 h sous air selon le standard de la norme ISO 13779-3 :2008 ⁽¹⁾ dans un four super Khantal pour vérifier la pureté des phases.

La pureté des poudres calcinées a été vérifiée selon les spécifications du standard ISO 13779-3:2008 par diffraction des rayons X (DRX) pour contrôler l'absence de phase cristalline secondaire β ou α TCP ou bien d'oxyde de calcium (CaO). La DRX a été réalisée en utilisant les radiations K α du cuivre (CuK α) sur un diffractomètre D 5000 (Figure 18) avec un pas de 0,020 °C, un temps de pause de 4 s à température ambiante sur une plage de 30-39 °C. L'identification des phases cristallines a été faite avec le logiciel EVA en comparant les pics de diffraction avec les références des fiches ICDD-PDF (*International Centre for diffraction Data-Powder Diffraction Files*) (Tableau 9). Aucune phase secondaire cristallisée n'a été détectée sur les poudres calcinées, (Figure 18), quelle que soit la composition.

¹ « ISO 13779-3:2008 - Implants for surgery -- Hydroxyapatite -- Part 3: Chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity », ISO. [En ligne]. Disponible sur: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=40828. [Consulté le: 23-juin-2016]

Nature du composé	N° de fiche PDF
Apatite (hydroxyapatite) : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	9-0432
β TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	55-0898
α TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348(29-0359)
Chaux (oxyde de calcium) : CaO	37-1497
Calcite : CaCO_3	47-1743

Tableau 9 : références des fiches PDF ICDD-PDF (*International Centre for diffraction Data-Powder Diffraction Files*)

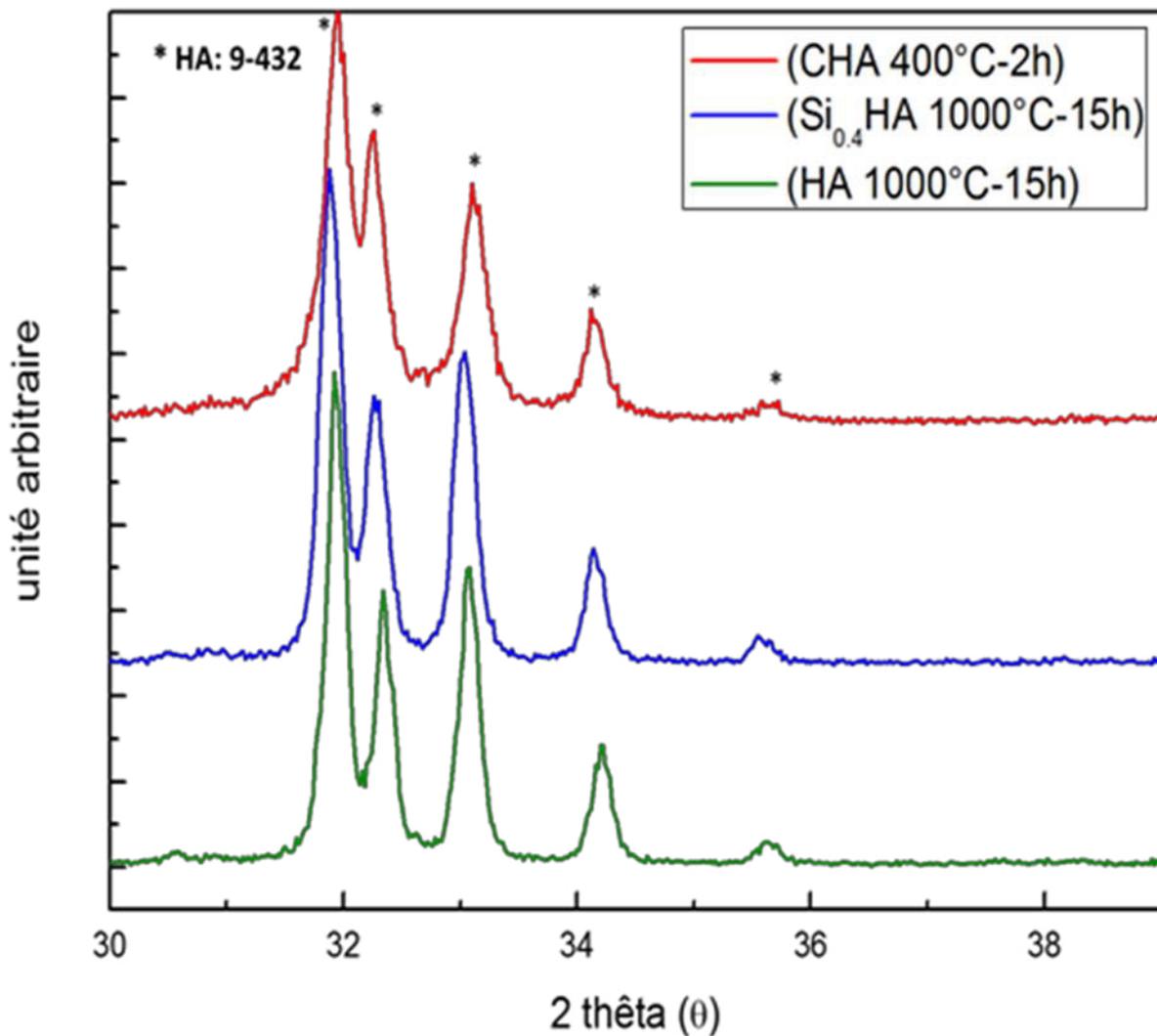


Figure 18 : diffractogramme des poudres calcinées

L'environnement ionique, donc la substitution en ions au sein de la structure apatitique a été vérifiée par la technique de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) avec un spectromètre Perkin Elmer Spectrum One. Un blanc a tout d'abord été réalisé sur une pastille de KBr réalisée par pressage uniaxial. La poudre mélangée au

KBr mise en forme de pastille par pressage uniaxial, a ensuite été analysée. Les spectres ont été réalisés en transmission sur une région de 4000–400 cm^{-1} avec 32 cycles et une résolution de 4 cm^{-1} . Les spectres ont montré les bandes vibrationnelles typiques de l'apatite pour chacune des trois compositions chimiques des poudres calcinées (Tableau 10), mais aussi des bandes correspondant aux substitutions ioniques en silicate (Marchat et al., 2013), (Tableau 11) et carbonate, (Rey et al., 2011), (Tableau 12), dans la structure apatitique respectivement pour les poudres calcinées de SiHA et CHA, prouvant la bonne incorporation de ces ions (Figure 19). Concernant les spectres IRTF des poudres SiHA, aucune bande vibrationnelle aux alentours des 800 cm^{-1} n'a été détectée. Cela a prouvé l'absence de silice vitreuse dans l'apatite et donc, la bonne incorporation d'ions silicates dans la structure de l'apatite, (Marchat et al., 2013). Pour les poudres CHA, l'assignation de groupes carbonate, montre que ceux-ci sont localisés dans les sites B de l'apatite. Ce résultat est conforme avec les études précédentes effectuées au laboratoire, (Lafon, 2004).

Bandes d'absorbances communes aux biomatériaux HA, SiHA et CHA (cm^{-1})	Mode
474	$\nu_2\text{PO}_4$
570	$\nu_4\text{PO}_4$
602	$\nu_4\text{PO}_4$
632	$\nu_{\text{L}}\text{OH}$
961	$\nu_1\text{PO}_4$
1043	$\nu_3\text{PO}_4$
1090	$\nu_3\text{PO}_4$
1640	$\delta\text{H}_2\text{O}$ adsorbée
3000-3700	$\nu\text{H}_2\text{O}$ adsorbée
3573	$\nu_{\text{s}}(\text{OH})$

Tableau 10 : bandes d'absorbances communes aux biomatériaux HA, SiHA et CHA selon (Marchat et al., 2013)

Bandes d'absorbance spécifiques de SiHA (cm ⁻¹)	Mode
504	SiO ₄
522	SiO ₄
752	SiO ₄
40	SiO ₄ ou Si-OH
90	SiO ₄
928	SiO ₄
945	SiO ₄ ou Si-OH
984	SiO ₄ ou Si-OH

Tableau 11 : bandes d'absorbances spécifiques des biomatériaux SiHA selon (Marchat et al., 2013)

Substitutions	Type A (nombre d'onde cm ⁻¹)	Type B (nombre d'onde cm ⁻¹)
v ₃ CO ₃	1542	1462
	1465	1412
v ₂ CO ₃	883	872
v ₄ CO ₃	757	718
	670	692

Tableau 12 : bandes vibrationnelles des groupements carbonates dans l'HA selon (Rey et al., 2011)

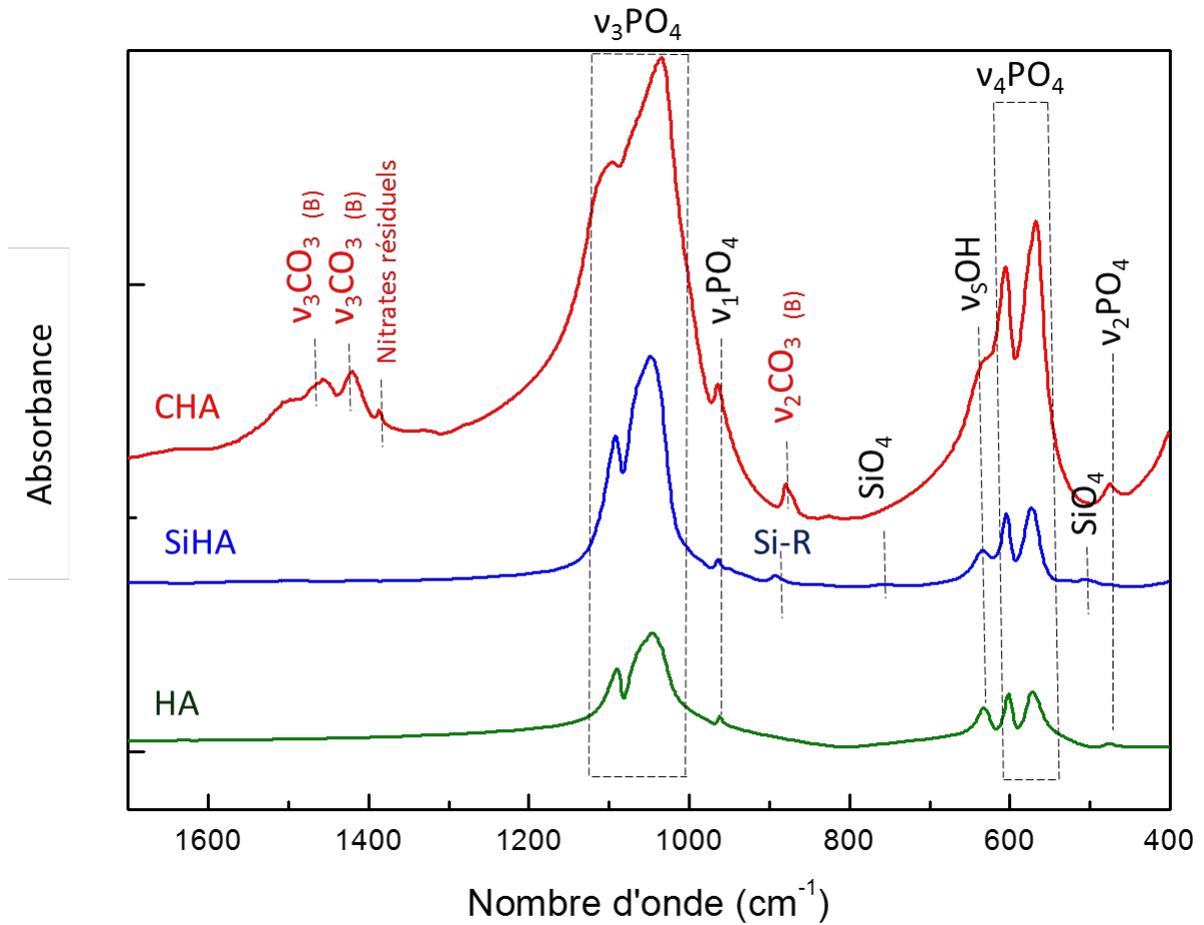
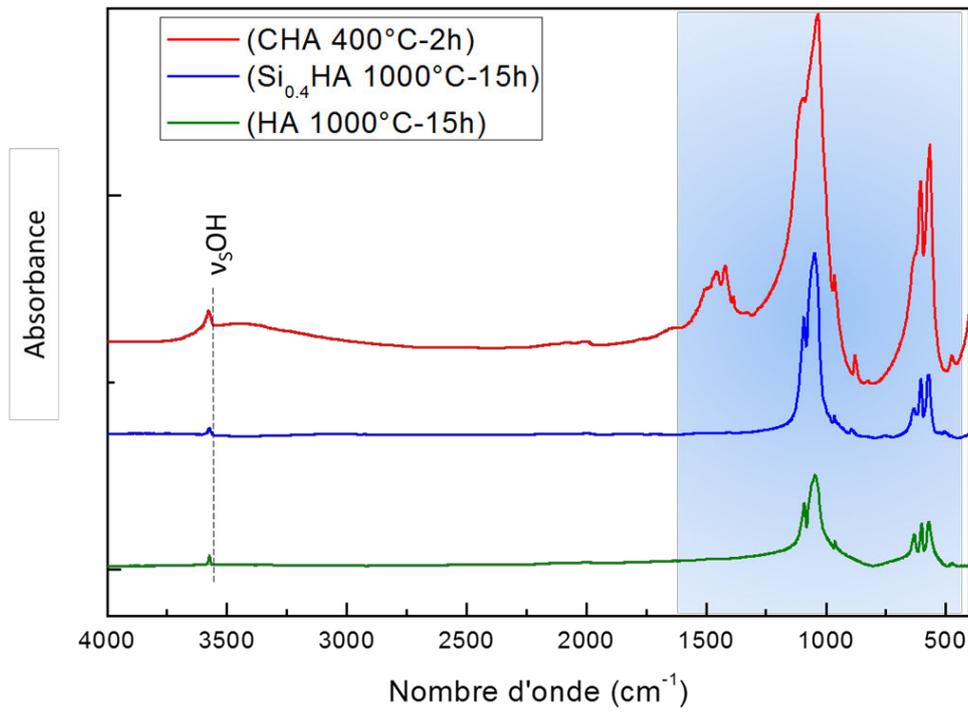


Figure 19 : spectres IRTF des poudres calcinées

Des analyses en couplage par plasma induit par spectrométrie d'émission optique ICP/OES (*Inductively Coupled Plasma/ Optical Emission Spectrometry*) ont été réalisées sur un lot de poudre SiHA pour vérifier la teneur en silicium. 0,1 g de poudre, préalablement calcinée, a été dissoute dans un mélange de 4 mL d'acide nitrique et 10 mL d'acide fluoridrique dilué au 1/20. Trois mesures de l'échantillon ont été réalisées. Les résultats ont été obtenus à l'aide d'une courbe étalon préparée avec des solutions de silicium de concentrations connues de 0 à 50 ppm. Une valeur de $x=0,42\pm 0,01$ mol a été calculée et a donné la formule chimique de SiHA:



Concernant la poudre calcinée CHA, la teneur en ions carbonates a été déterminée à l'aide d'analyse élémentaire carbone (HORIBA EMIA) (Tableau 13). L'appareil a été calibré avec des échantillons standards de concentrations connues en carbone. Ensuite, 1 g de poudre a été placé dans un creuset avec un mélange d'étain, de cuivre et de fer, puis chauffé, pour permettre la combustion totale de l'échantillon en présence d'oxygène. Les résultats sont récupérés par le logiciel EMIA. Le logiciel informe de la teneur en carbone (%). Ainsi grâce à la formule :

$$\% \text{CO}_3 \text{ massique} = \% \text{C massique} \times \frac{M\text{CO}_3}{MC}$$

Avec M= masse molaire

il a été possible de remonter à la valeur en pourcentage massique d'ions carbonates (%CO₃. massique).

Comme indiqué précédemment après synthèse, les spectres infrarouges n'ont révélé que des substitutions en carbonates de type B. C'est ainsi que la valeur du x dans le cas d'une apatite de type B : Ca_{10-x}(PO₄)_{6-x}(CO₃)_x(OH)_{2-x} a pu être calculée grâce à la formule :

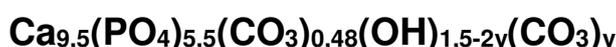
$$x = \frac{Mx}{MC} \times \frac{\%C}{100}$$

Où Mx est la masse molaire de l'apatite carbonatée de type B soit :

$$Mx = [(Mca \times (10 - x)) + (MPO_4 \times (6 - x)) + x \times MCO_3 + (MOH \times (2 - x))]$$

$$\leftrightarrow x = \frac{1004 \times \%C}{1200 + 152 \times \%C}$$

Les résultats obtenus ont permis de remonter à la formule brute de la poudre CHA calcinée à 400 °C-2 h sous air :



ainsi qu'à la valeur en carbonate massique (% CO₃ massique) et en mol (x) dans les trois lots de poudres synthétisés (Tableau 13) :

Matériaux	%C	%CO ₃ massique	x
Poudre CHA n=1	0,621±0,001	3,105±0,003	0,482±0,001
Poudre CHA n=2	0,637±0,002	3,187±0,005	0,493±0,001
Poudre CHA n=3	0,582±0,004	2,91±0,02	0,454±0,003
Moyenne	0,61±0,02	3,07±0,08	0,476±0,01

Tableau 13 : résultats de l'analyse carbone réalisée sur les poudres CHA calcinées 400 °C-2h sous air.

Trois lots de poudres indépendantes ont été analysés. Les résultats pour chaque lot représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

II.1.1.5 Mise en forme et frittage des céramiques

Les poudres ont été calcinées sous air, respectivement à 650 °C-30 min pour HA stœchiométrique, 700 °C-2h pour SiHA et 400 °C-2h pour CHA. Cela, afin d'obtenir une surface spécifique d'environ une trentaine de m²/g pour faciliter la mise en forme de pastille par pressage. La surface spécifique de la poudre calcinée a été vérifiée par la Méthode BET-8 points (Tableau 14). 1 g de poudre a été mis à dégazer 1 h à 200 °C. Après quoi les mesures ont été réalisées sous azote.

Composition	Paramètres de calcination	Surface spécifique (m ² /g)
SiHA	700 °C-2h	30,6
HA	650 °C-30 min	28,6
CHA n= 1	400 °C-2h	37,5
CHA n= 2	400 °C-2h	31,8

Tableau 14 : surface spécifique des poudres calcinées

La poudre calcinée a été mise en forme par pressage uniaxial dans une matrice cylindrique. Les poudres ont été pressées à 125 MPa pour HA et SiHA et 62 MPa pour CHA. Les pastilles obtenues ont été frittées pour obtenir pour chaque composition chimique une microstructure dense et poreuse. Pour les 2 céramiques HA et SiHA, le frittage des pastilles a été réalisé sous air, par contre, le frittage des pastilles CHA a été réalisé dans un four sous flux de CO₂ (145 mL/min), pour éviter la décarbonatation. Les paramètres de frittages des pastilles HA et SiHA ont été choisis sur la base de travaux de recherche précédents, effectués au laboratoire, (Champion, 2013) ([Tableau 14](#)). Pour les pastilles carbonatées, les paramètres de frittage ont été obtenus à la suite d'expériences de dilatométrie (NETZSCH DIL 402 C). Les pastilles ont été mises à chauffer sous flux de CO₂ de 20 mL/min avec une vitesse de montée en température de 10 °C/min ([Figure 20](#)).

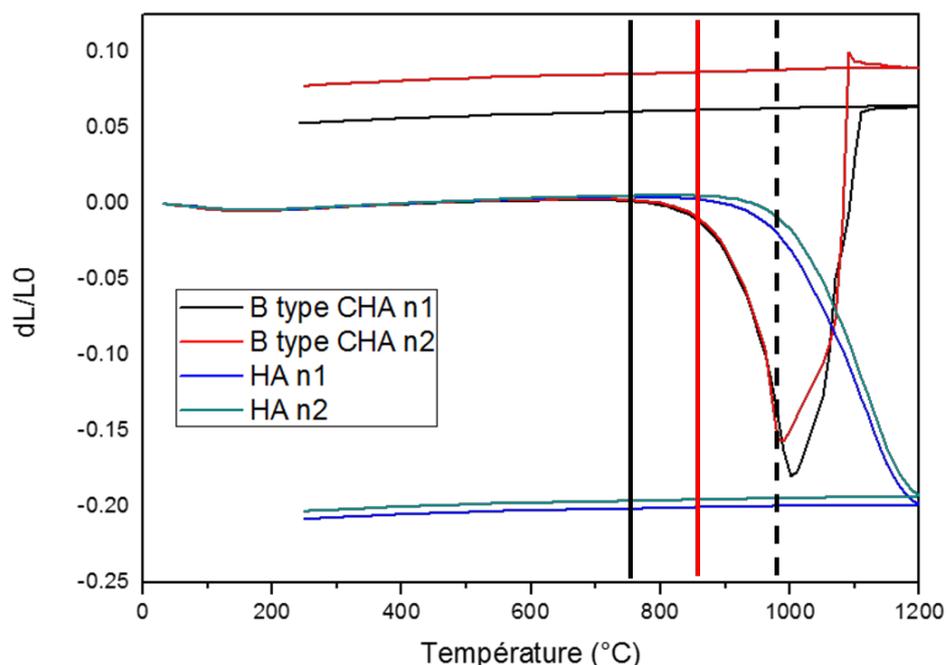


Figure 20 : courbes de dilatométrie des pastilles CHA et HA

Il a été constaté, à partir des courbes de dilatométrie, que les pastilles HA commencent à fritter plus tardivement, à des températures avoisinant les 850 °C (ligne verticale rouge), alors que les pastilles CHA commencent à fritter à des températures avoisinant les 750 °C (ligne verticale noire). Par contre, à des températures proches de 1000 °C (ligne verticale noire en pointillés), les pastilles carbonatées commencent à se décarbonater en libérant du CO₂, ce qui stoppe la densification et se traduit par une expansion brutale de l'échantillon. Cela s'est visualisé entre autre, par l'apparition de renflement à la surface des pastilles. Ainsi, en jouant sur le temps de frittage et en se basant sur ces analyses dilatométriques, un cycle de 2 h à 960 °C et de 30 min à 935 °C a été retenu pour le frittage des CHA denses et des CHA poreuses respectivement (Tableau 15). Les cycles de frittage pour les matériaux poreux ont été choisis pour obtenir un taux de porosité similaire d'environ 25-30% pour les trois compositions.

Composition	Température (°C)	Durée (h)	Rampe (°C/min)
HA dense	1200	0,5	20
HA poreux	1000	0,5	20
SiHA dense	1240	0,5	20
SiHA poreux	1160	0,5	20
CHA dense*	960	2	10
CHA poreux*	935	0,5	10

Tableau 15 : paramètre de frittage des 6 variantes de biomatériaux.

* (Le frittage des pastilles CHA a été réalisé dans un four à flux de CO₂ (145 mL/min) pour éviter la décarbonatation).

II.1.2. Caractérisations des pastilles frittées

Après la synthèse des poudres, la calcination, la mise en forme et le frittage, la pureté des phases et les substitutions ioniques des pastilles frittées ont été analysées par DRX et IRTF. Ensuite, ces pastilles frittées ont été caractérisées par un ensemble de tests, afin d'évaluer leur porosité, la taille des grains, la distribution et la taille des pores, les charges de surface, le caractère hydrophobe ou hydrophile, la topographie et la surface spécifique des pastilles (Figure 21).

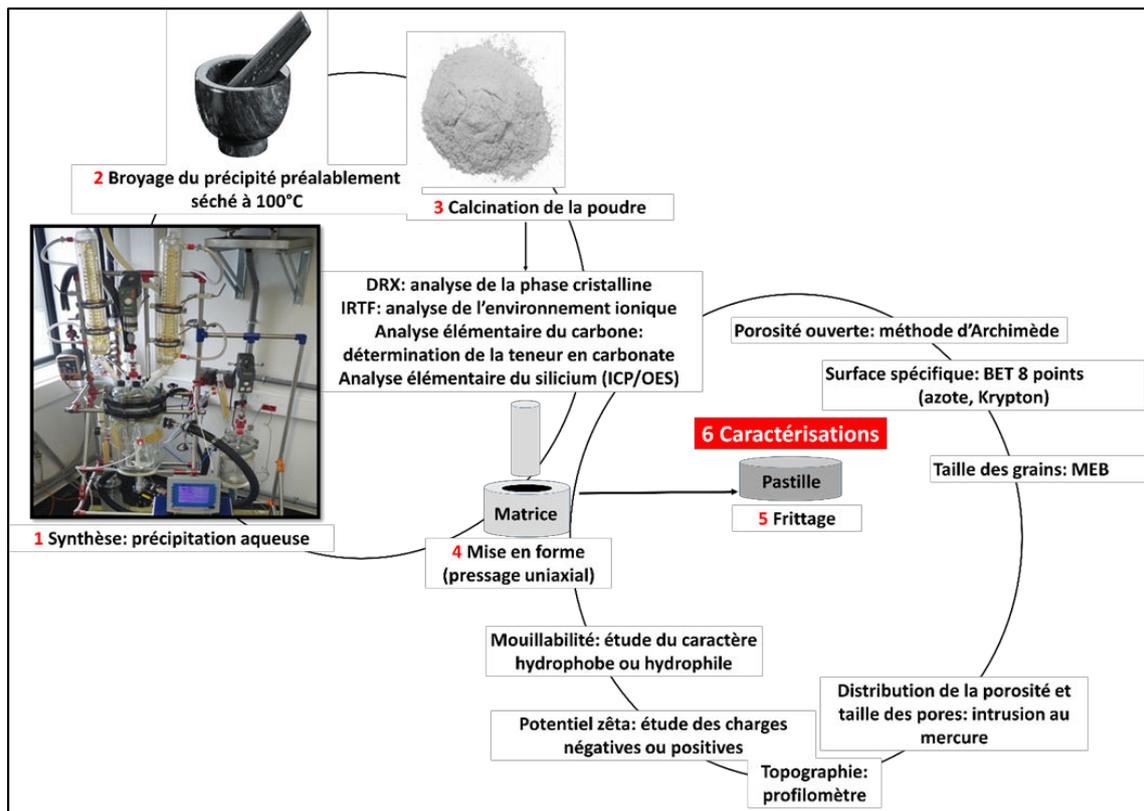


Figure 21 : ensemble des caractérisations physico-chimiques réalisées sur les 6 variantes de biomatériaux frittés

II.1.2.1 Composition chimique des pastilles

II.1.2.1.1. Résultats DRX et IRTF des pastilles frittées

Des diagrammes DRX réalisés avec un diffractomètre D8 advance Bruker (Figure 22) et des spectres IRTF (Perkin Elmer) ont été réalisés sur chaque composante de biomatériaux après frittage pour vérifier respectivement la pureté de phase et l'environnement ionique après frittage (Figure 22, Figure 23). Les diagrammes DRX n'ont révélé aucune phase secondaire α ou β TCP, ni de chaux (CaO) ou de calcite en particulier pour CHA qui serait la preuve d'une décarbonatation (Figure 22). En plus des bandes vibrationnelles communes à tous les biomatériaux CHA, HA et SiHA, les spectres des SiHA ont révélé la présence de bandes vibrationnelles spécifiques des SiHA (Tableau 11). Les spectres IFTR des pastilles CHA ont révélé l'apparition de bandes vibrationnelles à 883 cm^{-1} et 1542 cm^{-1} correspondant à la carbonatation en site A (Rey et al., 2011), (Figure 23, Tableau 12).

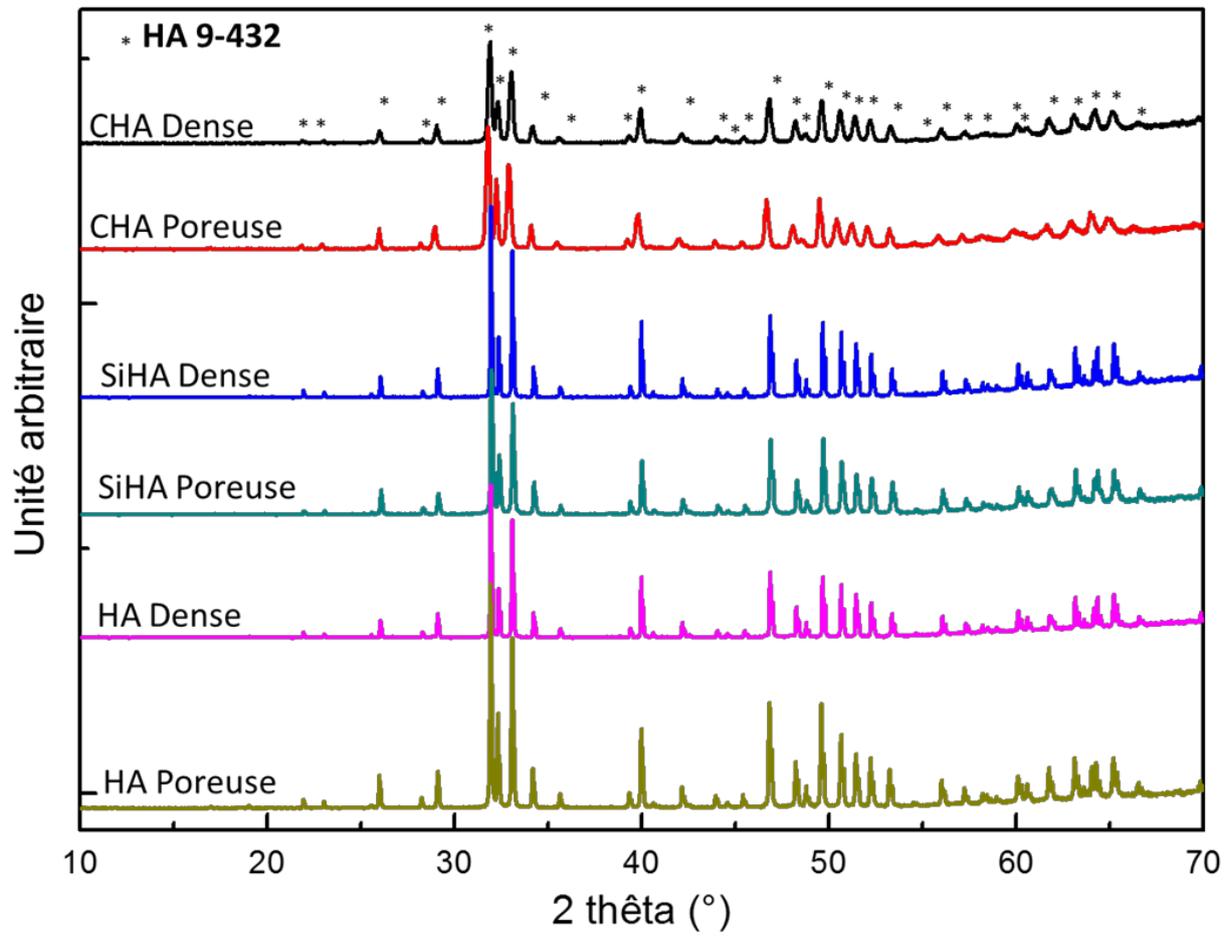


Figure 22 : diffractogrammes des pastilles frittées

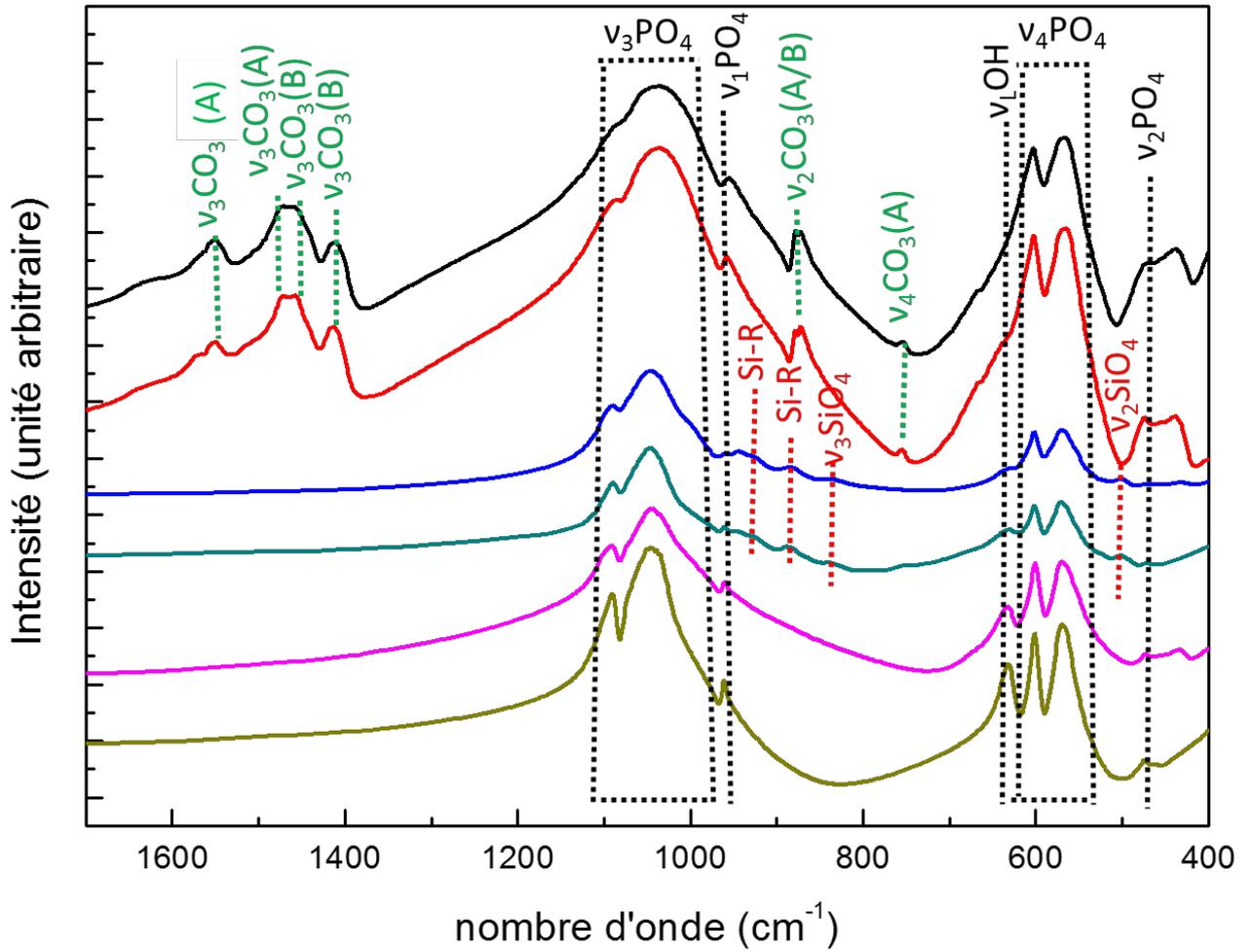
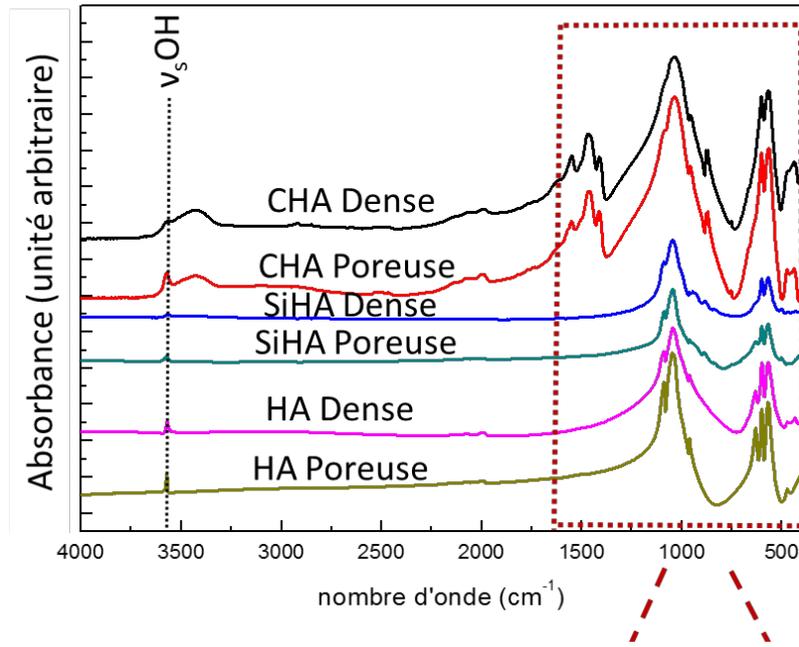


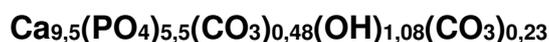
Figure 23 : spectre IRTF des pastilles frittées

II.1.2.1.2. Analyse carbone

Les pastilles CHA frittées ont donc été broyées et l'analyse élémentaire carbone a été réalisée sur les poudres obtenues, afin de vérifier le taux de substitution en carbonates après frittage sous flux de CO₂.

Alors qu'avant le frittage, les poudres CHA étaient uniquement de type B, c'est-à-dire substituées au niveau du groupe phosphate (PO₄), une apatite carbonatée mixte de type A/B a été obtenue après frittage, c'est-à-dire substituée au niveau du groupe OH (type A) et PO₄ (type B), (Lafon et al., 2008). La quantité totale de carbonates dans l'apatite frittée mesurée par analyse élémentaire était de 4,43±0,03 % massique. Elle était seulement égale à 3 wt.% dans les poudres calcinées de type B. L'augmentation en carbonate après le frittage est due à la carbonatation des sites A, apparaissant durant l'étape de frittage sous flux de CO₂ selon la réaction d'échange : $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2+y}CO_2(g) = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2y}(CO_3)_y + yH_2O(g)$, (Lafon et al., 2008) (Tableau 16).

Les analyses ont permis de remonter à la formule chimique des pastilles CHA frittées :



Matériaux	%C	%CO ₃ massique	x+y	y
CHA dense	0,882±0,003	4,413±0,018	0,707±0,003	0,707-0,48=0,227
CHA poreux	0,886±0,006	4,430±0,031	0,710±0,005	0,710-0,48=0,23

Tableau 16 : pourcentage en carbone (%C), en pourcentage massique d'ions carbonates (Wt.%CO₃), et la valeur du x+y pour chaque microstructure de biomatériaux carbonatés (dense et poreuse).

Les résultats représentent la moyenne de 3 mesures indépendantes sur 3 pastilles différentes ± SD.

II.1.2.2 Microstructure

II.1.2.2.1. Observation MEB

Les pastilles frittées ont été métallisées avec 2-3 nm d'or. Puis elles ont été observées avec un microscope électronique à balayage (SEM/FEG JEOL JSM 7400F). Les images ont été prises à basse tension (3 KV).

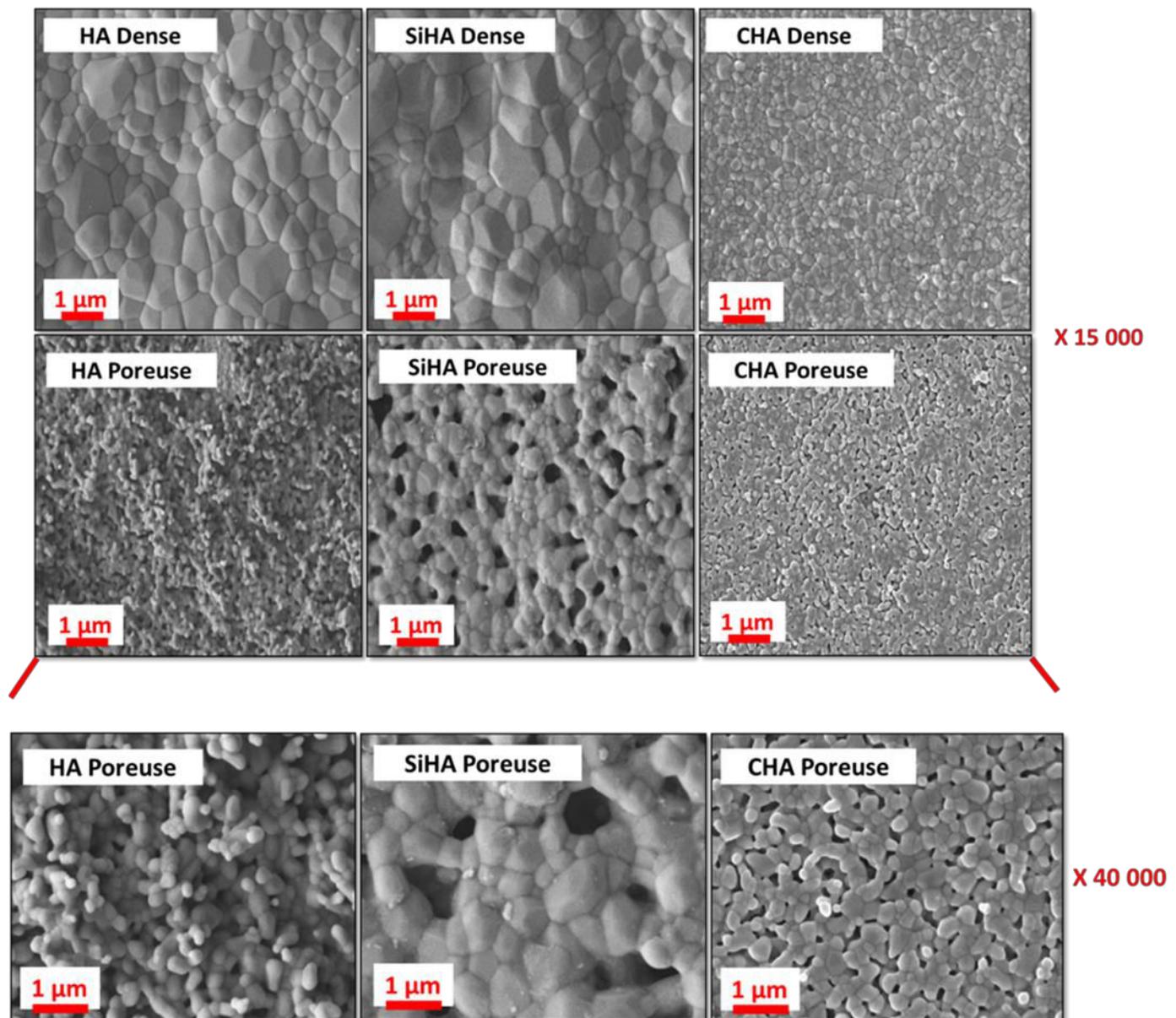


Figure 24 : images en microscopie électronique à balayage des pastilles frittées

Une microstructure typique de pastilles frittées est représentée sur la figure 24. La forme, la taille des grains ainsi que les joints de grains ont été bien délimités pour chaque substrat. Une porosité ouverte homogène a été observée sur les surfaces des pastilles poreuses (Figure 24).

II.1.2.2.2. Taille des grains

La taille des grains des pastilles après frittage est estimée par traitement d'images en MEB. Un nombre significatif d'images représentatives de l'ensemble de la pastille frittée a été réalisé. Pour les pastilles denses, un cercle contenant au minimum 30 grains a été dessiné. Le nombre de grains à l'intérieur du cercle (1 lorsque le grain était à l'intérieur du cercle et 0,5 lorsqu'il coupait le périmètre du cercle) a été compté. Pour connaître la surface d'un grain, la surface du cercle a été divisée par le nombre de grains :

$$\text{Surface d'un grain } (Sg) = \frac{\text{surface du cercle}}{\text{nombre de grains}} = \frac{\pi D^2}{4} \times \frac{1}{\text{nombre de grains}}$$

$$\text{diamètre d'un grain } (Dg) = \sqrt{\frac{4 \times (Sg)}{\pi}}$$

Sur les pastilles poreuses, le diamètre de 20 grains par images prises au hasard, a été tracé pour estimer la taille moyenne des grains.

Composition chimique	Dense	Poreuse
	Taille des grains (µm)	Taille des grains (µm)
HA	1,1±0,2	0,14±0,02
SiHA	1,4±0,1	0,63±0,07
CHA	0,20±0,01	0,10±0,01

Tableau 17 : taille des grains des pastilles frittées.

La taille des grains est mesurée sur une trentaine de grains sélectionnés au hasard sur 12 images prises sur 2 pastilles indépendantes (6x2), soit ~30x12=360 grains au total analysés. La valeur représente la moyenne des mesures ± SD.

De façon générale, la taille des grains des pastilles poreuses est plus petite que celle des pastilles denses. Par contre, pour les pastilles CHA, la taille des grains est du même ordre de grandeur que la pastille soit dense ou poreuse. La taille des grains des

CHA est aussi plus petite comparée à la taille des grains des autres compositions chimiques HA et SiHA. Cela est dû aux paramètres de frittage qui exigeaient une température plus basse pour le frittage des pastilles CHA (Tableau 17).

II.1.2.2.3. Porosité

II.1.2.2.3.1. Porosité ouverte

La porosité ouverte a été calculée par la méthode d'Archimède après pesée de la masse des pastilles sèches (M1), des pastilles humides (M2) ou immergées dans de l'eau distillée (M3) selon la formule :

$$\% \text{ porosité ouverte} = \left(\frac{M3 - M1}{M3 - M2} \right) \times 100$$

Composition chimique	Dense	Poreuse
	Porosité fermée %	Porosité ouverte %
HA	0,6±0,2	25±1
SiHA	1,1±0,3	32±1
CHA	6,0±0,1	25±1

Tableau 18 : porosité des pastilles frittées.

La porosité a été mesurée sur un minimum de 8 pastilles par composition et microstructure. Les valeurs représentent la moyenne des valeurs obtenues pour les 8 mesures ± SD.

Une porosité du même ordre de grandeur de 25 à 32% a été obtenue pour tous les biomatériaux poreux. Une densification de 99,4% a été obtenue pour HA, de 98,87 pour SiHA et de 94% pour CHA. La porosité mesurée sur les biomatériaux denses est considérée comme étant une porosité fermée. Le plus fort taux de porosité fermée retrouvé sur CHA dense vient du fait que ces biomatériaux ont été frittés à des températures plus basses, pour éviter la décarbonatation et la formation de calcite. Ce choix de température a eu pour conséquence, une augmentation de la porosité fermée (Tableau 18).

II.1.2.2.3.2. Distribution des pores

La distribution et la taille des pores ont été analysées par la technique d'intrusion au mercure sur les matériaux poreux (AutoPore IV 9500 VI.09). En fonction de la pression et du volume de mercure utilisés, la distribution et la taille des pores ont pu être estimées (Figure 25).

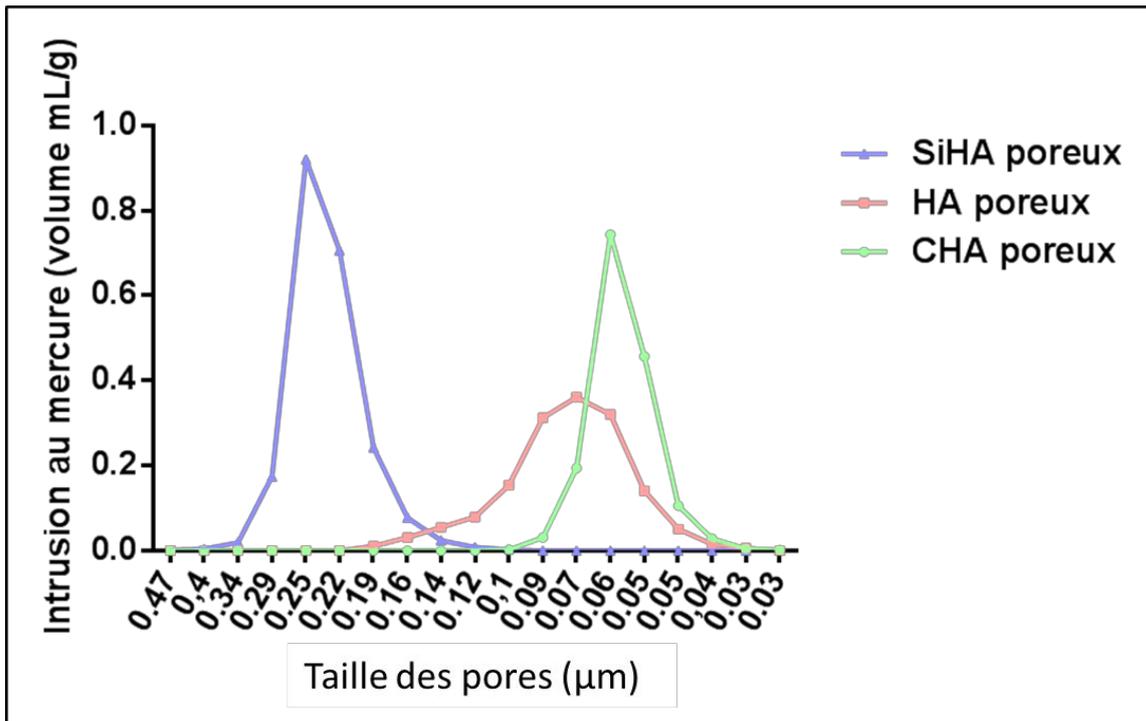


Figure 25 : distribution des pores

Composition chimique	Poreuse
	Taille des pores (D50:μm)
HA	0,07
SiHA	0,25
CHA	0,055

Tableau 19 : taille médiane des pores pour chaque composition chimique

La distribution est monomodale. Une seule population de pores a été observée. La taille moyenne des pores des pastilles frittées SiHA est plus de deux fois supérieure à celle de HA et CHA. La taille des pores de HA et CHA est du même ordre de grandeur. CHA présente malgré-tout, une distribution en taille plus étroite (Tableau 19).

II.1.2.3 Caractérisation de la surface des céramiques

II.1.2.4 Surface spécifique

La surface spécifique a été déterminée selon la méthode BET 8 points (Brunauer, Emmett et Teller) (Micromeritics ASAP 2000), en utilisant de l'azote pour les pastilles poreuses, ou du Krypton pour les pastilles denses. Les échantillons ont été mis à dégazer à 200 °C-1 h au préalable (Tableau 20).

Composition chimique	Dense	Poreuse
	Surface spécifique (m ² /g)	Surface spécifique (m ² /g)
HA	0,003±0,001	4,0±0,3
SiHA	0,009±0,002	2,0±0,1
CHA	0,61±0,13	1,42±0,06

Tableau 20 : surface spécifique des pastilles frittées.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures indépendantes au minimum ± SD

Une coalescence granulaire a pu être observée pour CHA poreux, ce qui a expliqué la surface spécifique légèrement plus petite obtenue pour les pastilles de CHA (1,4 m².g⁻¹), comparées aux pastilles HA (4 m².g⁻¹), à porosité égale 25% (Tableau 18). Ce phénomène est généralement rencontré pendant le frittage d'apatites phosphocalciques qui contiennent des lacunes dans leur structure favorisant la diffusion superficielle (Champion, 2013).

Une croissance granulaire beaucoup plus importante (Tableau 17) explique également la faible surface de SiHA poreuse comparée à celle de l'HA poreuse.

Une taille de grains beaucoup plus petite pour CHA dense que pour HA et SiHA dense (Tableau 17), est également à l'origine de sa surface spécifique plus élevée.

II.1.2.5 Topographie de surface

Un profilomètre tactile DEKTAK 6M a servi à déterminer la topographie de surface des pastilles. Un stilet en diamant de radius 12,5 µm a parcouru la surface de la pastille sur plusieurs lignes de 10 mm de long avec une masse appliquée de 1 mg. Les données de rugosité moyenne : RA, la moyenne des creux : RV ou encore la moyenne des bosses : RZ a été enregistrée (Figure 26).

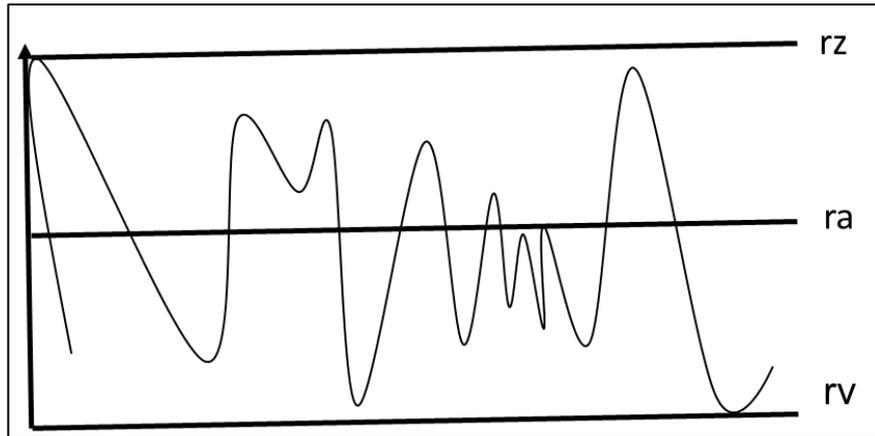


Figure 26 : schéma représentant les grandeurs RA : rugosité moyenne, RZ : moyenne des bosses, RV : moyenne des creux

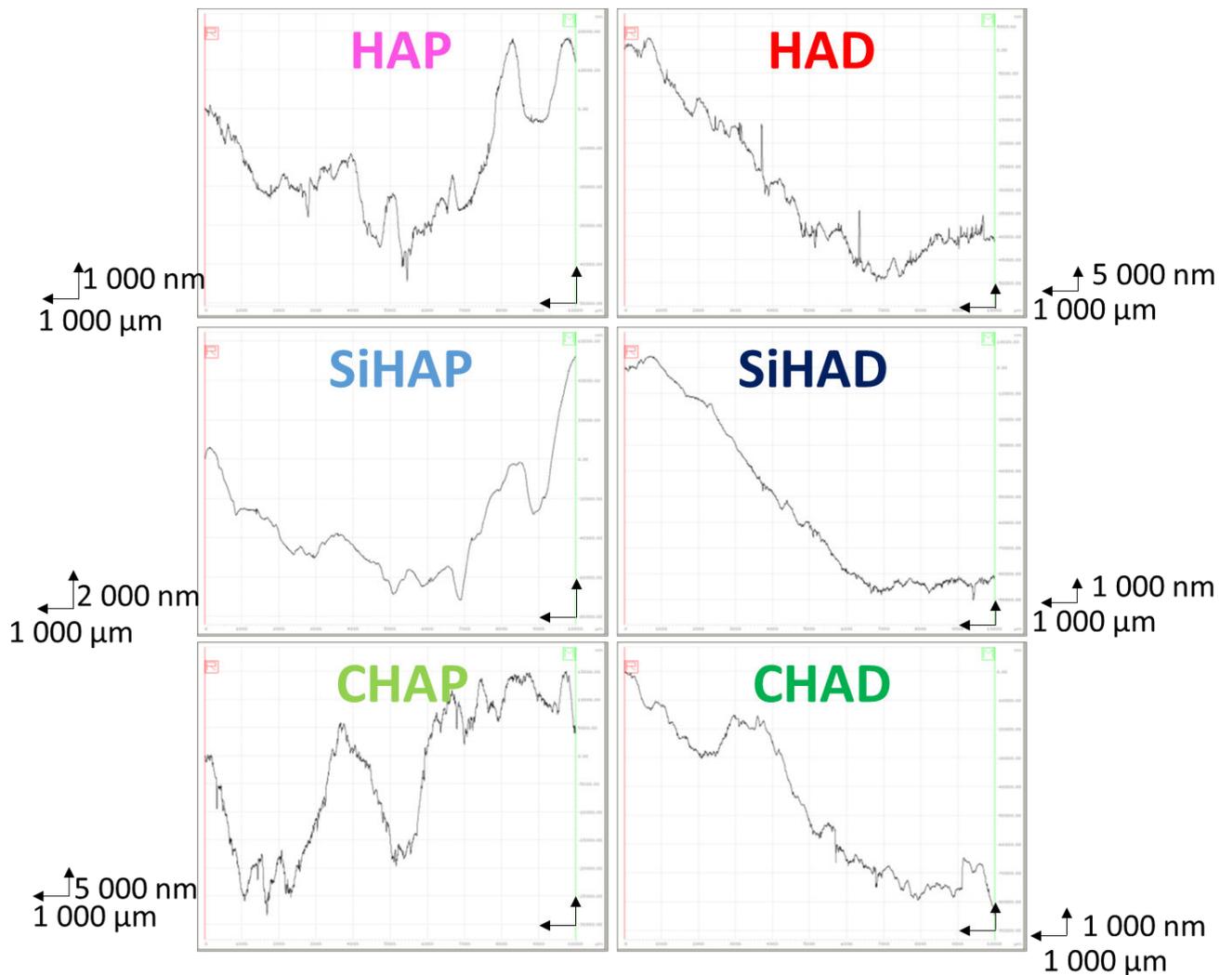


Figure 27 : exemples de profils obtenus au profilomètre pour chaque composition et microstructure de biomatériau

Composition chimique	Dense			Poreuse		
	Topographie (µm)			Topographie (µm)		
	RA	RZ	RV	RA	RZ	RV
HA	4,0± 0,3	12,0±0,4	-12±1	14±1	33±2	-23±2
SiHA	8,1±0,6	16±1	-15±1	9,0±0,6	26±1	-26±2
CHA	7,1±0,6	23±1	-19±1	7,7±0,4	25±1	-25±3

Tableau 21 : analyse de la topographie de surface des pastilles frittées.

RA est la rugosité moyenne, RZ représente la valeur moyenne des bosses et RV la valeur moyenne des creux. Six lignes sur 3 pastilles indépendantes ont été mesurées soit (3x6=18 lignes par composition et microstructure). Chaque valeur représente la moyenne des 6 mesures ± SD.

Les valeurs de topographie des pastilles poreuses sont plus élevées comparées à celles des pastilles denses. Les valeurs RZ et RV de CHA dense sont plus élevées que celles des autres compositions chimiques HA et SiHA denses. Cela est probablement dû aux paramètres de frittage (température moins élevée) pour éviter la décarbonatation. Ces paramètres de frittage sont à l'origine de micropores en surface des pastilles CHA denses. La porosité modifie notablement la topographie de surface. Néanmoins, la comparaison de topographie des pastilles denses et poreuses doit donc être considérée avec précautions. Cela, d'autant plus que les mesures RV ne sont pas représentatives des valeurs réelles du fait de la limite du palmer qui ne peut pas « atteindre » la profondeur des pores (Tableau 17).

II.1.2.6 Potentiel zêta

Le potentiel zêta a été déterminé sur de la poudre de pastilles frittées. Des pastilles non traitées (D0) ont été broyées, ainsi que des pastilles traitées, c'est-à-dire immergées pendant 14 jours dans du milieu de culture complet (paragraphe III.2.1, page 132) (D14). 0,1g de poudre a été mélangé pendant 1 h sous agitation. Puis, le mélange a été filtré avec un filtre de diamètre 0,8 µm. Les mesures ont été réalisées avec un zêta sizer (Malvern Instrument).

Composition chimique	Dense		Poreuse	
	Potentiel zêta (mV)		Potentiel zêta (mV)	
	D0	D14	D0	D14
HA	-21±4	-26±8	-25±5	-18±5
SiHA	-22±4	-25±6	-23±4	-22±4
CHA	-24±4	-20±6	-22±4	-21±6

Tableau 22 : potentiel zêta des pastilles frittées.

Mesures réalisées sur pastilles brutes (D0) et après immersion 14 jours dans du milieu de culture (D14). 12 cycles de mesures ont été réalisés sur un même échantillon. La valeur représente la moyenne des 12 mesures et l'écart type représente la déviation standard.

Les valeurs sont négatives et du même ordre de grandeur pour toutes les compositions chimiques et les microstructures. Aucune différence dans la charge de surface des pastilles n'a été observée même après immersion pendant 14 jours dans le milieu de culture.

II.1.2.7 Mouillabilité

Des tests de mouillabilité ont été réalisés sur les différents biomatériaux en mesurant l'angle de contact selon la méthode de la goutte Sessile (Figure 28) avec de l'eau ultra pure, à température ambiante, à l'aide d'un DSA 30, Krüss. La valeur d'angle correspond à la moyenne des 5 valeurs obtenues sur 5 secondes. Ce test a été réalisé sur des pastilles non traitées (D0) et sur des pastilles traitées, c'est-à-dire immergées dans du milieu de culture complet (paragraphe III.2.1, page 132), pendant 14 jours.

Composition chimique	Dense		Poreuse	
	Angle de contact (θ°)		Angle de contact (θ°)	
	D0	D14	D0	D14
HA	93±2	47±3	11,0±1,1	54±5
SiHA	93±2	60±3	1,0±0,6	79±4
CHA	98±8	77±2	53±7	85±4

Tableau 23 : valeur de l'angle de contact des pastilles frittées.

D0 : mesure réalisée sur pastilles brutes et D14 : mesure réalisée sur pastilles immergées dans le milieu de culture 14 jours. 6 à 8 mesures par pastille ont été réalisées. Chaque mesure représente la moyenne de 5 valeurs d'angle réalisées sur une période de 5s (1 mesure chaque seconde) ± SD.

A (D0), pour les matériaux denses, les angles de contact sont similaires pour les 3 matériaux avec un caractère très légèrement hydrophobe. Pour les matériaux poreux, les valeurs doivent être prises avec précautions du fait des phénomènes de capillarité. Elles ne sont données qu'à titre indicatif. Elles ne peuvent être associées directement au caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface. Elles peuvent en revanche être reliées à la taille des pores, (Tableau 19). Plus les pores sont gros, plus la capillarité est forte, ce qui se traduit par une diminution d'angle de contact. Toutefois, des valeurs ont pu être enregistrées sur les pastilles poreuses. Néanmoins, sur SiHA la porosité de taille importante a entraîné une forte capillarité.

Après 14 jours d'immersion dans le milieu de culture, que les pastilles soient denses ou poreuses, des valeurs similaires ont pu être collectées. Cela peut s'expliquer par la fermeture des pores par un dépôt protéique et d'apatite biologique sur les matériaux, du fait du phénomène de dissolution précipitation, apparaissant en surface de matériaux phosphocalciques, (Hench, 1998), (LeGeros, 2008). La valeur de l'angle de contact a diminué sur les pastilles denses, preuve d'un changement de caractère légèrement hydrophobe en caractère plus hydrophile. Ce caractère plus hydrophile des matériaux peut s'expliquer par l'adsorption de protéines contenues dans le milieu de culture (sérum de veau fœtal) à la surface des pastilles, (Rouahi et al., 2006a), (Rouahi et al., 2006b). Une interprétation similaire peut être avancée pour les matériaux poreux.

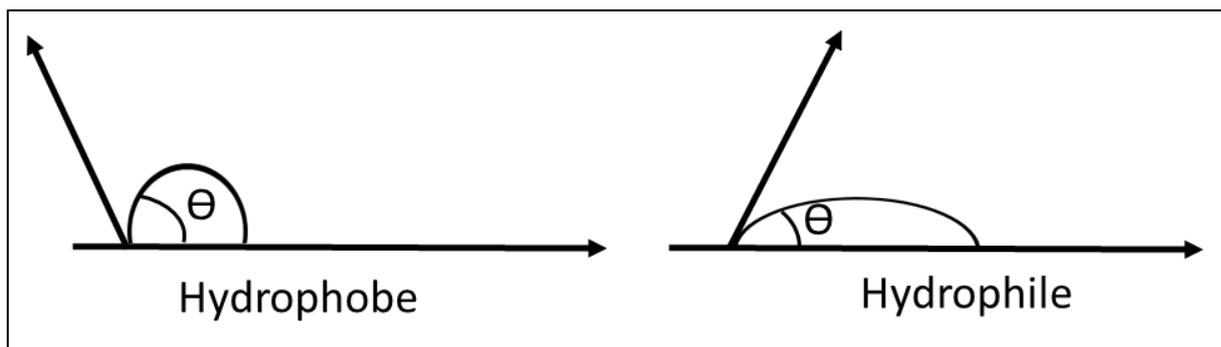


Figure 28 : schéma représentant le paramètre thêta (θ) mesuré.

Des angles supérieurs à 90° représentent un caractère hydrophobe du substrat alors que des angles plus petits traduisent un caractère hydrophile des substrats.

II.1.2.8 Discussion

Au Bilan, les caractérisations physico-chimiques des 6 biomatériaux sont résumées dans le tableau ci-dessous, (Tableau 24).

CARACTÉRISATIONS	DENSES			POREUSES		
	HA (Ca/P)=1,667	SIHA (1.13%massique)	CHA (4,4 % massique)	HA (Ca/P)=1,667	SiHA (1.13%massique)	CHA (4,4 % massique)
COMPOSITION CHIMIQUE						
ANGLE DE CONTACT (D0)	93±2	93±2	98±8	11,0±1,1	1,0±0,6	53±7
ANGLE DE CONTACT (D14)	47±3	60±3	77±2	54±5	79±4	85±4
POTENTIEL ZETA (mV) (D0)	-21±4	-22±4	-24±4	-25±5	-23±4	-22±4
POTENTIEL ZETA (mV) (D14)	-26±8	-25±6	-20±6	-18±5	-22±4	-21±6
SURFACE SPECIFIQUE (m ² /g)	0,003±0,001	0,009±0,002	0,61±0,13	4,0±0,3	2,0±0,1	1,42±0,06
POROSITE (%)	0,6±0,2 fermée	1,1±0,3 fermée	6,0±0,1 fermée	25±1 ouverte	32±1 ouverte	25±1 ouverte
TAILLE DES GRAINS (µm)	1,1±0,2	1,4±0,1	0,20±0,01	0,14±0,02	0,63±0,07	0,10±0,01
TAILLE DES PORES (µm)	φ	φ	φ	0,07	0,25	0,055
RUGOSITE MOYENNE (RA: µm)	4,0±0,3	8,1±0,6	7,1±0,6	14±1	9,0±0,6	7,7±0,4
MOYENNE DES CREUX LES PLUS PROFONDS (RV: µm)	-12±1	-15±1	-19±1	-23±2	-26±2	-25±3
MOYENNE DES PICS LES PLUS HAUTS (RZ: µm)	12,0±0,4	16±1	23±1	33±2	26±1	25±1

Tableau 24 : caractérisations physico-chimiques des 6 variantes de céramiques phosphocalciques synthétisées

En considérant les valeurs du tableau, concernant le potentiel zêta, on peut en déduire que ce paramètre n'influencera pas l'activité cellulaire puisqu'il est négatif et du même ordre de grandeur pour les 6 variantes de biomatériaux testées. De plus, il reste identique à D0 et à D14 après immersion des pastilles dans le milieu de culture. Le taux de porosité ouverte est légèrement supérieur pour SiHA poreux que pour CHA et HA poreux. Concernant la taille des pores, celles des pastilles poreuses SiHA sont deux fois plus grosses que les pores des pastilles HA et CHA poreuses qui sont du même ordre de taille. Ces valeurs sont corroborées par les images MEB ([Figure 24](#)). Cette différence pourrait être à l'origine d'un comportement cellulaire différent sur SiHA poreux comparée à HA et CHA poreux. Cela pourrait être dû à une différence de capillarité avec le milieu de culture sur les pastilles SiHA poreuses, comme en témoigne l'angle de contact très faible mesuré à D0 ([Tableau 23](#)), qui pourrait par exemple, influencer l'adhésion cellulaire. Les biomatériaux denses HA et SiHA partagent en commun une plus grosse taille de grain comparée à leur homologue en composition chimique mais de microstructure poreuse. Les biomatériaux CHA qu'ils soient denses ou poreux partagent les caractéristiques des biomatériaux HA et SiHA poreux en terme de taille de grains : c'est-à-dire une taille de grains plus petite que les biomatériaux denses HA et SiHA.

L'angle de contact mesuré sur les pastilles brutes appelé angle de contact D0, possède une valeur spécifique propre au biomatériau dense et légèrement supérieure à 90° , ce qui confère aux trois matériaux (HA, SiHA et CHA denses), un caractère très légèrement hydrophobe. Les valeurs mesurées sur les biomatériaux poreux sont à relier aux phénomènes de capillarité, fonction de la taille des pores. En effet, à D0, il a été possible de mesurer une valeur d'angle sur CHA poreux, car la taille des pores est plus petite sur CHA poreux comparée aux autres matériaux poreux. Par contre, la taille des pores est deux fois plus importante sur SiHA poreux.

Le biomatériau HA dense possède les valeurs de rugosité moyenne RA les plus faibles. Cette mesure est du même ordre de grandeur pour les biomatériaux SiHA et CHA probablement du fait du lissage des valeurs par le calcul de la moyenne. Les valeurs RV sont aussi des valeurs à prendre avec précaution et particulièrement pour les pastilles poreuses, car la course du palmer est limitée du fait de l'impossibilité d'atteindre le fond des pores. Quant aux valeurs RZ, elles sont plus faibles sur les biomatériaux denses HA et SiHA comparées à leur homologue de composition

chimique, mais de microstructure poreuse. La valeur est du même ordre de grandeur pour CHA, que la pastille soit dense ou poreuse. Cette valeur est du même ordre de grandeur pour SiHA poreux, HA poreux, CHA dense et poreux.

La surface spécifique est plus importante sur HA poreux comparée aux autres biomatériaux poreux. Par contre, HA poreux possède un taux de porosité et une taille de grains du même ordre de grandeur que CHA poreux. Néanmoins, la coalescence granulaire sur CHA poreux fait que la surface spécifique de ces biomatériaux est plus faible que celle de HA poreuse. Concernant SiHA poreux, les pores de tailles plus importantes et le taux de porosité ouverte plus important sur ces matériaux comparés à la porosité ouverte et à la taille des pores sur CHA poreux, font que la surface spécifique a été plus importante, comparée à CHA poreux, même si les grains étaient de plus petites tailles sur CHA poreux.

Les caractéristiques physico-chimiques propres à une variante de biomatériaux et susceptibles d'influencer le comportement cellulaire sont évaluées par les analyses ACP ci-dessous.

Principe de l'analyse ACP

L'analyse en composantes principales est utilisée pour le traitement de données quantitatives. C'est une méthode d'analyse des données qui fait appel à la statistique multivariée. Il s'agit d'une approche à la fois géométrique et statistique. Les variables sont représentées dans un nouvel espace selon des directions d'inertie (dispersion) maximale.

La recherche porte sur des axes indépendants expliquant au mieux la variabilité (la variance) des données.

La principale caractéristique de cette analyse est d'être multidimensionnelle et descriptive. Elle structure et résume l'information. Elle aide à faire ressortir les relations pouvant exister entre les différentes données et à en tirer une information statistique qui permet de décrire de façon plus succincte les principales informations contenues dans ces données.

Elle permet de regrouper les données de façon à faire apparaître clairement ce qui les rend homogènes et ainsi mieux les connaître.

But de l'analyse ACP

Ces analyses ont été réalisées pour prédire et discriminer le rôle de la composition chimique de celui de la microstructure. Un nombre important de données quantitatives obtenues lors des différents tests de caractérisations et des évaluations biologiques ont été traités par cette approche statistique pour connaître les relations entre les différents paramètres entre eux et entre les paramètres (variables) et les différentes variantes de biomatériaux (composantes).

Le table de corrélation complète l'ACP et permet d'établir les liens et sens de corrélation entre les différents paramètres.

Le choix des composantes étudiées (axe géométrique de l'ACP) est déterminé à partir de la courbe de décroissance et de l'analyse de la somme des variances des variables étudiées. Cette approche permet de confirmer que l'on peut négliger les autres composantes à partir de la 3^{ème} composante et ne garder que les deux premières composantes principales (soit 81,33% de variances sur axe 1 et 2), donc rester en 2 dimensions, sur deux axes ce qui permet une représentation du modèle en 2D sur deux axes orthogonaux principaux. Le tableau de corrélation et les courbes de décroissance ainsi que l'analyse des variances obtenus pour chaque analyse réalisée sont représentés en Annexe 8 (Annexe 8).

Design de l'analyse ACP

Seules les données quantitatives ont été utilisées pour réaliser les analyses ACP. Les analyses DRX et les IRTF n'ont donc pas été intégrées dans ces analyses. En revanche, ces analyses ont permis de prouver la pureté des pastilles et la substitution ionique a été validée.

Les 6 composantes de l'ACP correspondent aux 6 variantes de biomatériaux : HA dense, HA poreuse, SiHA dense, SiHA poreuse, CHA dense, CHA poreuse.

Pour chacune des 6 composantes, l'analyse de la caractérisation a été réalisée avec les 8 variables suivantes :

- Taille des grains (n=10)
- Angle de contact D0 (n=12)
- Angle de contact D14 (n=12)
- Porosité (n=13)

- Surface spécifique (n=4)
- Rugosité (RA) (n=18)
- Rugosité (RZ) (n=18)
- Rugosité (RV) (n=18)

Excepté pour la taille des pores et le potentiel zêta, pour toutes les autres mesures, une analyse en composantes principales a été réalisée, afin d'avoir une vision d'ensemble des grandes tendances comparables ou non, des 6 variantes de céramiques phosphocalciques synthétisées. Cela a également permis de discerner les caractéristiques physico-chimiques qui peuvent être corrélées entre elles et celles qui peuvent être inversement corrélées entre elles (Figure 29).

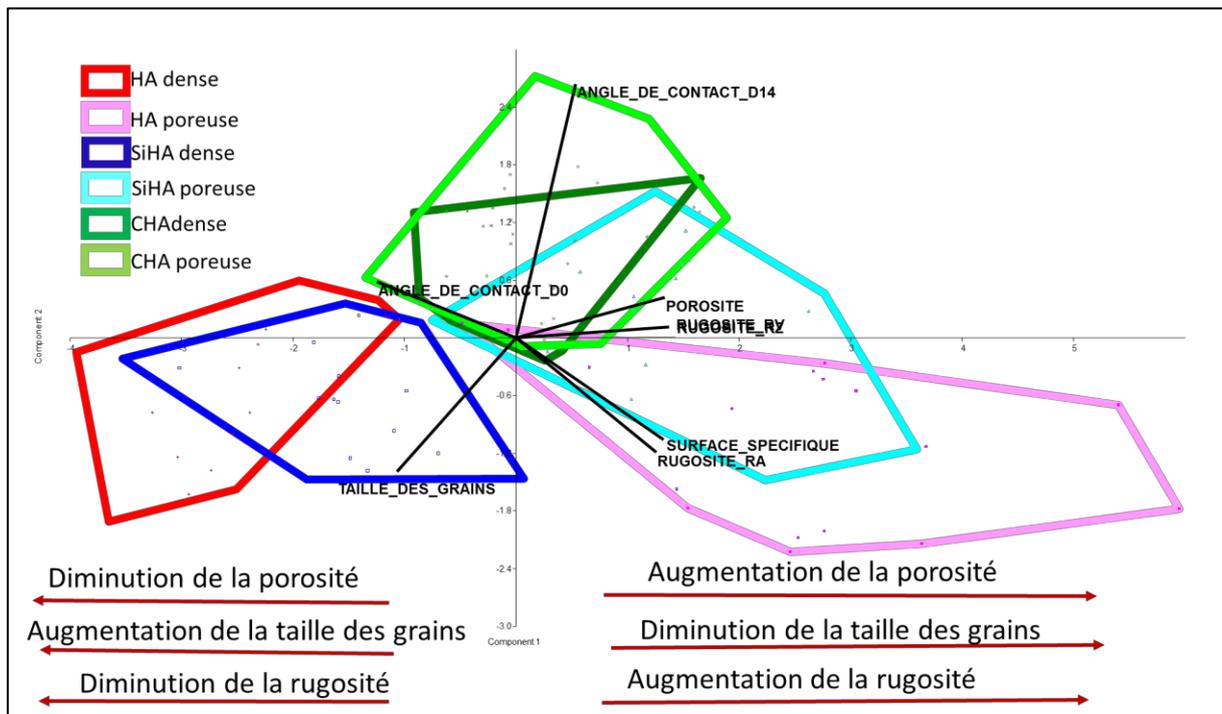


Figure 29 : analyse ACP des caractéristiques physico-chimiques des biomatériaux.

Ces analyses permettent en effet de mettre en évidence des corrélations ou des corrélations inverses, en fonctions de différents paramètres analysés. Une enveloppe regroupe l'ensemble des valeurs des paramètres analysés pour une variante de biomatériau. Chaque vecteur représente un paramètre donné. En fonction de la direction du vecteur et l'orientation de l'enveloppe, il est possible de savoir si un paramètre donné est corrélé avec un sous type de biomatériau. Des enveloppes qui se superposent partagent des caractéristiques communes, par contre, des enveloppes qui sont distinctes et opposées possèdent des caractéristiques différentes.

A partir des analyses ACP, la première observation est que trois groupes peuvent être distingués :

- 1 **HA dense** et **SiHA dense**
- 2 **HA poreux** et **SiHA poreux**
- 3 **CHA dense** et **CHA poreux**

On en a déduit que l'influence distincte de la composition chimique de celle de la microstructure (porosité, topographie, surface spécifique) peut être discriminée pour les céramiques HA et SiHA.

En effet, ces analyses montrent qu'il sera possible d'analyser HA dense et SiHA dense pour mettre en évidence, l'influence de la substitution en silicium.

En comparant SiHA poreux et HA poreux, il sera possible de mettre en évidence le rôle de la substitution en silicium, mais en se rappelant que la porosité peut également influencer la réponse cellulaire, en jouant un rôle synergique avec celui de la microstructure.

La comparaison des structures HA et siHA dense avec HA et siHA poreux permet de mettre en évidence le rôle de la microstructure. De plus, la comparaison des groupes SiHA dense et HA dense peut permettre de discriminer l'influence de la substitution en silicium, de celle de la microstructure. Il est à noter que les groupes CHA dense et CHA poreux ne peuvent être discriminés du point de vue de la microstructure. En effet, les enveloppes de l'ACP sont superposées. De plus, ces enveloppes sont orientées différemment des autres groupes. Ces deux groupes possèdent des caractéristiques chimiques, mais aussi microstructurales différentes des autres groupes, mais propres à cette composition chimique.

La substitution en ions silicates et carbonate est d'emblée considérée comme significative et pourra être prise en compte comme élément influençant la réponse cellulaire. De plus, de ces analyses, des caractéristiques physico-chimiques sont susceptibles d'agir de façon corrélée sur l'activité cellulaire et non de façon directement indépendante.

Une corrélation inverse entre la taille des grains, la rugosité et la porosité a pu être observée. Une taille de grains supérieure est associée à une porosité moindre voire nulle et à une rugosité inférieure. Ce sont les 3 caractéristiques que partagent SiHA dense et HA dense. Par contre, les biomatériaux poreux HA et SiHA, comme attendus,

possèdent la porosité la plus importante qui est associée à une taille plus petite de grains et une rugosité plus importante. Les biomatériaux CHA dense et poreux se comportent de façon intermédiaire. Néanmoins, la tendance dégagée par l'axe principal vertical n'a pas pu être déterminée.

La corrélation inverse ($R = -0,5$) entre taille des grains et porosité est significative ($p = 1,12 \times 10^{-5}$).

Il a effectivement pu être observé des tailles plus petites de grains associées aux matériaux poreux par rapport aux matériaux denses pour les compositions chimiques HA et SiHA. Ces différences de taille de grains peuvent être associées à la température de frittage que l'on choisit moins élevée pour créer de la porosité par rapport à la température de frittage pour densifier (Champion, 2013). Cette différence n'a pas été observée pour la composante CHA du fait d'une température de frittage quasi similaire entre celle choisie pour créer des matériaux denses et celle choisie pour créer la porosité. La densification s'est réalisée en augmentant le temps de frittage car les analyses de dilatométrie ont montré que des températures supérieures à 1000 °C sont responsables de la décarbonatation et de la dédensification des matériaux CHA (Figure 20).

La surface spécifique et la porosité sont corrélées positivement ($R = 0,79$) ce qui suggère que lorsque la porosité augmente la surface spécifique augmente également (Table des corrélations obtenues pour les caractérisations des biomatériaux, Annexe 7).

II.1.3. Conclusion sur la caractérisation des biomatériaux

Les 6 variantes de biomatériaux ont été caractérisées afin de connaître leurs caractéristiques physiques et chimiques (Tableau 24).

Il est communément admis que les propriétés physico-chimiques des biomatériaux agissent sur la capacité d'adhésion des cellules et donc leur activité fonctionnelle. Néanmoins, des réponses sur le rôle précis de l'influence de la microstructure et de la composition chimique sur l'activité cellulaire, en rapport avec la régénération osseuse, restent à apporter. Dans la mesure où les conclusions issues de la littérature sur l'efficacité d'une substitution ionique et particulièrement en silicium et en carbonate ainsi que l'influence de la microstructure sur l'activité des ostéoblastes et des

ostéoclastes divergent (Tableau 3, Tableau 4, Tableau 7, Tableau 8), l'analyse ACP, une analyse multiparamétrique, nous a permis de discriminer l'influence de la microstructure et de la composition chimique des 6 céramiques de phosphate de calcium synthétisées, sur l'activité cellulaire. Ces analyses ont permis d'établir des premières tendances afin de déterminer les liens (corrélations) existants entre les facteurs physiques et biologiques. Cette démarche permet de distinguer les facteurs d'intérêt susceptibles d'influencer le comportement cellulaire sur un biomatériau et ainsi de les étudier de manière plus précise. Une étude comparative par rapport aux données de la littérature est bien sûr menée en parallèle dans la suite de la thèse.

Dans ces travaux de thèse, il a été choisi d'étudier en conditions comparables, l'influence de ces six biomatériaux, sur l'activité des deux types cellulaires impliqués dans le processus de régénération osseuse : les ostéoblastes et les ostéoclastes.

- la première partie du chapitre : résultats et discussions, traitera des analyses biologiques avec la même approche statistique que précédemment : des analyses ACP. L'objectif de cette partie est de discriminer des tendances globales sur l'influence respective de la microstructure et de la composition chimique sur les réponses des deux types de cellules. Par la suite nous chercherons à d'établir une corrélation avec les concentrations en calcium mesurées dans le milieu de culture avec ou sans cellule. En effet, les céramiques de phosphate de calcium sont supposées libérer des éléments calcium et phosphore dans l'environnement, susceptibles de moduler l'activité cellulaire.
- La deuxième partie se focalisera sur l'étude comparative des propriétés physico-chimiques des 4 variantes de biomatériaux : SiHA dense, SiHA poreuse, HA dense, HA poreuse, sur l'activité ostéoblastique. En effet, les analyses ACP des caractéristiques physico-chimiques des 6 biocéramiques synthétisées, ont montré que l'influence du silicium et celle de la microstructure peuvent être discriminées en comparant ces 4 biomatériaux (Figure 29). Cette analyse comparative sera confrontée aux données de la littérature. En effet, au regard de la littérature (paragraphe 1.2.2.1.1), les conclusions divergent concernant l'efficacité d'une substitution ou d'une microstructure pour la réparation osseuse, du fait notamment d'un manque de caractérisation au

préalable des biomatériaux et d'études réalisées en conditions non-comparables.

- Les analyses ACP ont montré qu'il n'est pas possible de discriminer le rôle de la microstructure en ce qui concerne les biomatériaux CHA dense et poreux. Par contre, ces biomatériaux se comportant différemment de l'ensemble des 4 autres biomatériaux. L'influence de la substitution en carbonate dans l'apatite pourra être discriminée en comparant les CHA à l'HA stoechiométrique (Figure 29). La supériorité biologique des biomatériaux substitués en carbonates par rapport à de l'hydroxyapatite pure, est largement discutée dans la littérature (paragraphe 1.2.2.1.2). Une analyse comparative sur l'activité ostéoblastique et ostéoclastique n'incluant que les biomatériaux CHA dense, CHA poreuse, HA dense et HA poreuse, a été réalisée. La troisième partie du chapitre s'intéressera à la réponse
- Réponse ostéoblastique et ostéoclastique au biomatériau d'hydroxyapatite carbonatée de type A/B.
- La 4^{ème} partie sera consacrée à l'étude comparative des 6 variantes de biomatériaux sur l'activité ostéoclastique. Dans cette partie, une corrélation avec l'expression du VEGF-A par les cellules et leur activité de résorption a été réalisée.

Pour réaliser ces études, les cellules ont directement étéensemencées à la surface des pastilles. Différents critères et tests fonctionnels ont été réalisés selon un plan d'expérience. Le matériel et méthode pour l'approche biologique est présenté dans le chapitre suivant.