



Composite chitosane-phosphate de calcium : synthèse par atomisation séchage et caractérisation structurale

Sylvain Le Grill

► To cite this version:

Sylvain Le Grill. Composite chitosane-phosphate de calcium : synthèse par atomisation séchage et caractérisation structurale. Matériaux. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30023 . tel-02061858

HAL Id: tel-02061858

<https://theses.hal.science/tel-02061858>

Submitted on 8 Mar 2019

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

LE GRILL Sylvain

Le lundi 29 janvier 2018

Titre :

Composite chitosane/phosphate de calcium : synthèse par atomisation
séchage et caractérisation structurale

ED SDM : Sciences et génie des matériaux - CO034

Unité de recherche :

CIRIMAT

Directeur(s) de Thèse :

BERTRAND Ghislaine

BROUILLET Fabien

Rapporteurs :

CHEVALIER Jérôme

WEISS Pierre

Autre(s) membre(s) du jury :

AIME Carole

BERNACHE-ASSOLANT Didier

TOURBIN Mallorie

A mon grand-père

« Je préfère une tête bien faite qu'une tête bien pleine. »

Emmanuel Aragon citant Michel de Montaigne

« Qui pense peu se trompe beaucoup. »

Léonard de Vinci

Remerciements

Avant toute chose, je souhaite remercier mes deux rapporteurs, Jérôme Chevalier et Pierre Weiss, pour leurs retours constructifs sur mes travaux de thèse et le manuscrit ainsi que pour leurs remarques au moment de la soutenance. Je tiens également à remercier Didier Bernache-Assolant qui nous a fait l'honneur de présider le jury de thèse ainsi que Mallorie Tourbin pour sa participation à ce jury et ses retours scientifiques. Enfin je remercie Carole Aimé pour avoir également fait partie de ce jury, pour m'avoir mis le pied à l'étrier et pour les retours scientifiques et humains qu'elle nous a partagé.

Je tiens également à remercier toutes les personnes extérieures au laboratoire avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler. Ainsi merci à Stéphanie Balor et Vanessa Soldan pour leur aide sur les observations MET, merci à Yannick Coppel pour les mesures RMN et pour son investissement dans ce projet, merci à Pierre Roblin pour les mesures SAXS et son aide dans l'interprétation de celles-ci, merci à Pascale Saint-Aguet pour les mesures SEC du polymère et un grand merci à mon parrain de thèse Pierre Lecante pour les mesure WAXS et là encore pour son aide dans leurs interprétations.

Cette thèse a également été l'occasion de travailler en collaboration avec l'équipe du professeur Ion Mihailescu au « *National Institut for Laser Plasma & Radiation Physics* » à Bucarest en Roumanie avec Anita Visan que je tiens également à remercier chaleureusement pour leur accueil, les formations qu'ils m'ont données, les conseils qu'ils m'ont prodigués et leur générosité si agréable. J'ai également eu l'occasion de travailler avec le professeur Besim Ben-Nissan à l'« *University of Technology* » à Sydney en Australie et je tiens à le remercier également pour son accueil, sa bienveillance et les conseils scientifiques qu'il m'a généreusement donnés.

Comment parler de ces deux voyages sans évoquer leur initiateur j'ai nommé : David Grossin (ou plutôt monsieur Projet). Merci à lui d'avoir pensé à moi pour ces déplacements et merci pour ces avis scientifiques pendant les réunions. Merci également à Christophe Drouet pour sa gentillesse, ses conseils et ses exposés clairs et concis pendant les réunions qu'il a présidées pendant deux de mes trois années de thèses. Avant lui, Christèle Combes les présidait et je tiens également à la remercier pour sa disponibilité (enfin avoir réussi à trouver une disponibilité de temps en temps entre deux activités dans son emploi du temps de ministre). Je remercie également Jérémy Soulié et tout particulièrement pour son aide dans la prise de contact avec le SAXS (technique qui, *in fine*, a été l'une de mes fiertés de ces travaux de thèse). Je remercie également (avec une mention toute spéciale) Christian Rey pour m'avoir accompagné pendant cette thèse et pour toutes ses remarques, idées, analyses sur mon sujet de thèse. Je tiens à

remercier toutes les personnes qui font également que les différentes techniques à notre disposition soient appréhendables. Ainsi merci à Cédric Charvillat pour l'AFM, l'ATG et la DRX, Olivier Marsan pour le Raman et l'IRTF, Yannick Thebault et Djar Oquab pour le MEB et Françoise Bosc pour leurs disponibilités, leurs aides (fréquente pour certains), leurs conseils, leurs conversations ...

Enfin merci au personnel administratif rendant le fonctionnement du laboratoire possible. Merci donc à Katia Reliquet, Caroline Job et Dominique Bonsirven pour leur investissement général et leur disponibilité.

Difficile de parler de personnel faisant fonctionner un laboratoire sans avoir une pensée pour Sandrine Cavalié. Merci à elle de faire fonctionner (à bout de bras) l'équipe de pharmacie. Merci de prendre en charge tant de démarches et de nous libérer de l'aspect gestion et administration (dont personnellement je suis un peu allergique). N'oublions pas qu'en plus de ces compétences, tu prodigues des formations, aides généreusement pour nos manip ... Je suis désolé de ne pas avoir fourni de potins ou bruits de couloir pendant ces trois années en paiement de tout ce que tu as fait pour nous.

Je tiens à remercier toute l'équipe de pharmacie pour son accueil, ses conseils, sa bonne ambiance générale avec ses repas « dégustation gastronomie française ». Merci donc à Sophie Cazalbou, Audrey Tourrette-Diallo et Sophie Girod-Fullana. Je pense avoir évolué (en mieux je l'espère) pendant ces trois années et il est certain que vous y êtes pour quelque chose. J'espère que cette ambiance bon enfant et pourtant scientifiquement rigoureuse sera restée longtemps dans ces murs pour que les futures générations de thésards y passent un aussi bon temps.

Bien évidemment, cette thèse aura également été l'occasion de connaître et de travailler avec d'autres thésards, stagiaires et post doctorants. Les échanges entre sujets de thèse se sont régulièrement avérés être scientifiquement enrichissants pour les deux partis et d'autres échanges (moins scientifiques) se sont avérés être tout aussi passionnants. En quatre ans de thèse, des têtes y sont passées dans ces bureaux de thésard, je vais essayer d'être ici le plus exhaustif possible et de n'oublier aucune d'entre elles. Commençons par le « plus vieux », le grand (littéralement et allégoriquement) Pierre Gras. Merci à lui pour ces premières instructions, son protocole MEB, et pour m'avoir permis de m'intégrer assez rapidement. Merci également à Emmanuelle Kergourlay. Merci à Maela Choimet pour sa gentillesse et le bon temps passé en sa compagnie. Je tenais à mentionner Camille Pierre également. Je ne sais pas si je le remercie, après tout il a fait son Camille et moi mon Sylvain ; et étonnamment ça marchait assez bien. Je

regrette de ne pas plus te connaître car je pressens que tu es bien plus complexe que ce que tu laisses paraître. En tout cas je dois te dire que je suis assez jaloux des compétences de manager dont tu as fait preuve pendant ta thèse tout en étant capable de te perfectionner dans ton « bricolage ». Merci également à Loïc Ferrage et notamment pour sa compagnie en Australie, sa gentillesse et sa disponibilité. Ensuite viens la génération de Marine Chambard, Laetitia Mayen et Clémentine Aubry. Pour ce qui est des deux premières, je regrette de ne pas vous connaître plus mais j'ai apprécié ces quelques moments avec vous. Clémentine, là pour le coup je suis obligé de te dire merci pour plein de choses. Tu es une personne passionnée et passionnante (notamment capable de manger quelque chose de pas bon par conviction) et ça c'est beau, ultra capable malgré ce que tu te répètes à longueur de journée (y'a qu'à voir la conf de biocéramique !), gentille à souhait et un peu décalée bref une bonne personne qu'il est super agréable de connaître. La dernière génération de thésard (à ma connaissance) est composée de Maylis Farno, Thibault Canceill et Maximilien Desbord. Même si ça a été court, j'ai apprécié de vous connaître et je vous souhaite bon courage pour la suite. Enfin un grand merci à Ambra Paterlini pour avoir fait preuve d'autant d'autonomie pendant son stage et pour avoir su le valoriser par un article. Merci également pour son sourire permanent, sa bonne humeur et pour son investissement au sein de l'équipe. En parlant de bonne humeur et d'investissement au travail, je remercie également Farouk Ayadi pour son passage à Toulouse, pour tout ce qu'il m'a apporté personnellement et scientifiquement et pour sa gentillesse.

Enfin Dr Guillaume Conzatti. Bien évidemment, tu mérites un paragraphe à part. Nous avons commencé nos thèses respectives ensemble (et tu m'as clairement dépassé sur la fin) et si je suis devenu la personne que je suis c'est en grande partie grâce à toi. Tu m'as fait évoluer tant personnellement que scientifiquement et je t'en serai toujours reconnaissant. Je disais plus haut que les échanges avec les thésards étaient enrichissants et c'est notamment avec toi que les échanges ont été les plus riches. Rendons à César ce qui appartient à César certaines des très bonnes idées de ces travaux sont de toi. Je me réjouis de t'avoir connu et je ne me fais absolument aucun souci pour ta carrière, tu es fait pour ce métier et ça se sent quand tu en parles. N'oublie pas de m'appeler pour le Nobel.

Enfin, je remercie très chaleureusement mes encadrants de thèse Ghislaine Bertrand et Fabien Brouillet. J'ai conscience de ne pas avoir été le thésard le plus simple qu'il soit et vous avez su faire preuve d'une très grande patience et d'une très grande écoute à mon égard. Même s'il y a eu des hauts et des bas, je suis sincèrement content de vous avoir eu, vous, comme tuteurs. J'ai

beaucoup appris pendant ces trois années et j'espère vous avoir donné envie de poursuivre ce projet avec de futurs doctorants.

Parce qu'il n'y a pas que le travail dans la vie, je tiens bien évidemment à remercier tous les membres de ma famille : mes parents et mes deux sœurs chéries. Je remercie également mes amis Cyrielle, Thomas, Erwan, Pierre, Pierre, Vincent, Jérémy, Cécile, Lorédane et Bernard pour leur soutien, leur compagnie, leurs bonnes vibrations pendant ces trois années.

Enfin, je ne remercie pas Ray Chan et Chris Chan pour avoir créé « 9GAG » (site sur lequel j'ai perdu trop de temps) et je ne remercie pas Mark Zuckerberg pour son fameux réseau social. Par contre merci à Steve Chen, Chad Hurley et Jawed Karim pour avoir fondé « Youtube » (source de musique infinie) et merci à Jimmy Wales et Larry Stranger pour avoir créé Wikipédia (première source utilisée pour défricher un sujet inconnu).

Table des Matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Etat de l'art.....	3
I.1.Contexte	4
I.1.1 Minéralisation de l'os	5
I.2.Les phosphates de calcium	8
I.2.1 Généralités	8
I.2.1.1 Les phosphates dicalciques	9
I.2.1.2 Phosphate octocalcique	10
I.2.1.3 Phosphates tricalciques	10
I.2.2 Les apatites.....	11
I.2.2.1 L'hydroxyapatite stœchiométrique	11
I.2.2.2 Les apatites non stœchiométriques	13
I.2.2.2.1 Caractéristiques des apatites non stœchiométriques : les carbonates.	13
I.2.2.2.2 Caractéristiques des apatites non stœchiométriques : réactivité	14
I.2.2.2.3 Synthèse par voie humide.....	15
I.2.3 Les phosphates de calcium amorphes.....	16
I.2.3.1 Généralités	16
I.2.3.2 Techniques de synthèse	19
I.2.3.3 Caractéristiques physico-chimiques	20
I.3.1 Origine	21
I.3.2 Intérêt biologique.....	22
I.3.3 Propriétés physico –chimiques.....	22
I.4.Les matériaux composites à matrice chitosane chargés en phosphates de calcium	25
I.4.1 Procédés de mise en forme	25
I.4.2 Etude des interactions organique/inorganique.....	26
I.5.Le procédé d'atomisation séchage	28
I.6.Pour aller plus loin	31
Liste des figures	33
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	35
II.1. Matériels	36
II.2. Méthodes	36

Table des matières

II.2.2	Préparation des phases solides	36
II.2.2.2	Synthèse de l'apatite biomimétique.....	36
II.2.2.3	Broyage de l'hydroxyapatite commerciale	36
II.2.3	Atomisation	37
II.2.4	Formulations.....	37
II.2.4.2	Suspensions	37
II.2.4.3	Solutions	37
II.2.5	Évolution des poudres en milieu aqueux.....	38
II.2.6	Spectroscopies vibrationnelles	38
II.2.6.2	Spectrométrie infrarouge	38
II.2.6.3	Spectrométrie Raman	39
II.2.6.4	Spectrométrie RMN	39
II.2.6.4.1	Etat de l'art.....	39
II.2.6.4.2	Protocoles expérimentaux.	40
II.2.7	Analyses X.....	40
II.2.7.2	DRX	40
II.2.7.3	SAXS	41
II.2.7.3.3	Etat de l'art.....	41
II.2.7.3.4	Protocole expérimental.....	45
II.2.7.4	WAXS	45
II.2.8	Microscopies électroniques	46
II.2.8.2	Microscopie électronique à balayage- MEB	46
II.2.8.3	Microscopie électronique en transmission-TEM	46
II.2.9	Granulométrie	46
II.2.9.2	Voie sèche.....	46
II.2.9.3	Voie humide.....	47
II.2.10	Analyse thermogravimétrique/thermique différentielle - ATG/ATD.....	47
II.2.11	Chromatographie d'exclusion stérique - SEC.....	48
II.2.12	Evaporation laser assistée par matrice - MAPLE	48
II.2.13	Etudes biologiques.....	49
II.2.13.2	Culture cellulaire.....	49
II.2.13.3	Activité antimicrobienne	49
II.2.14	AFM	50
II.2.15	Impression 3D	50
	Liste des figures.....	51
	Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation de la phase minérale	53
III.1	Atomisation de suspensions	54

III.1.1	Introduction.....	54
III.1.2	Caractérisation de la phase solide des suspensions.....	54
III.1.2.1	Hydroxyapatite stœchiométrique	54
III.1.2.1.1	Evolution de l'hydroxyapatite commerciale en solution acide.....	55
III.1.2.1.2	Impacts de l'atomisation sur l'hydroxyapatite.....	56
III.1.2.2	Apatite biomimétique	58
III.1.2.2.1	Caractérisation de la poudre après atomisation.....	61
III.2	Atomisation de solutions	63
III.2.1	Caractérisation de l'acétate de calcium avant et après atomisation	63
III.2.2	Préparation de la solution	67
III.2.3	Caractérisation de la poudre obtenue.....	68
III.2.3.1	Caractérisations morphologiques.....	68
III.2.3.2	Caractérisation physico-chimique	73
III.2.3.3	Evolution thermique et en solution de la poudre atomisée.....	78
III.2.4	Influence du rapport Ca/P	81
III.2.4.1	Influence sur la morphologie des poudres atomisées.....	81
III.2.4.2	Influence sur la chimie.....	86
III.3	Résumé.....	90
	Liste des figures	93
Chapitre 4 : Synthèse et caractérisation du matériau composite.....		97
IV.1	Caractérisation de la phase organique.....	98
IV.1.1	Caractérisation du polymère avant atomisation	98
IV.1.2	Effet de l'atomisation sur le chitosane	100
IV.2	Caractérisation du matériau composite.....	103
IV.2.1	Suspension.....	103
IV.2.2	Solution.....	108
IV.2.2.1	Influence structurelle sur la phase minérale	109
IV.2.2.2	Influence chimique de la phase organique.....	115
IV.2.2.3	Evolution en milieu aqueux	119
IV.3	Résumé.....	122
	Liste des figures	124
Chapitre 5 : Mise en forme du matériau composite		127
V.1	Revêtement.....	128

Table des matières

V.1.1	Etat de l'art	128
V.1.2	Présentation de la technique.....	129
V.1.3	Etude des revêtements obtenus.....	132
V.2	Impression 3D	141
V.2.1	Etat de l'art	141
V.2.2	Etude de faisabilité	142
V.3	Résumé	146
	Liste des Figures	147
	Conclusion générale	149
	Bibliographie	153

Introduction générale

L'os est un matériau composite structuré et vivant. Il est principalement constitué d'une phase organique composée en majorité par du collagène de type 1, d'eau et d'une phase minérale phosphocalcique. La phase organique se structure en triple hélice : les tropocollagènes. Ceux-ci se réorganisent à nouveau en fibrilles en laissant un espace entre elles de 67 nm. C'est, dans cet espace vacant, que la minéralisation de l'os se produit. Bien que les mécanismes de minéralisation du collagène *in vivo* restent encore un sujet de débat, un consensus sur la nature chimique et structurale de la phase minérale de l'os *in fine* est établi. Cette phase minérale, qui représente 65 % de la masse de l'os chez un humain adulte, est constituée d'un phosphate de calcium apatitique, carbonaté, déficient en calcium et mal cristallisé de formule approchée $[\text{Ca}_{8.3}(\text{HPO}_4)_{0.7}(\text{PO}_4)_{4.5}(\text{CO}_3)_{0.7}(\text{OH})_{1.3}]$.

L'os possède une faculté de régénération grâce aux cellules qui le composent. Les ostéoclastes sont responsables de la résorption du tissu osseux et, les ostéoblastes assurent sa reconstruction. Le squelette est ainsi renouvelé environ tous les dix ans à l'âge adulte. Une modulation du remodelage osseux se produit sous l'effet des contraintes mécaniques et ainsi dans des situations d'hypercontraintes ou de contraintes insuffisantes la balance résorption/formation osseuse est défavorable. Cette faculté de renouvellement de l'os lui permet de combler certaines pertes osseuses cependant elle a ses limites et dans le cas de défauts ne pouvant plus ou pas être naturellement corrigés, l'utilisation de substituts devient nécessaire. Du fait des risques potentiels d'infections ou de contaminations des matériaux d'origines humaine ou animale, les recherches actuelles se focalisent sur l'élaboration de substituts à base de matériaux de synthèse. En fonction de la taille du défaut osseux généré par un traumatisme ou une maladie, les formes et les matériaux utilisés varient. Ceux-ci doivent, dans certains cas, présenter des propriétés mécaniques suffisantes pour répondre correctement aux sollicitations mécaniques auxquelles ils sont soumis. Dans ces conditions, les prothèses utilisées seront préférentiellement en métal (alliage de titane par exemple) mais dans le cas de traumatismes de tailles plus modérées (comme des comblements osseux ou dentaires) des matériaux céramiques sont préférés.

Dans ces deux cas, l'utilisation de matériaux monophasiques induit une interface franche entre le tissu osseux et la prothèse. Pour créer des interphases plus intimes entre le substitut et l'os et favoriser une intégration rapide et à long terme, les matériaux développés doivent être : biocompatibles, ostéoconducteurs, bioactifs... Afin de proposer aux cellules un environnement

proche de celui de l'os, de nouveaux matériaux composites sont à l'étude. Ainsi des matrices organiques chargées en particules minérales ont par exemple été développées. Le substitut osseux possède ainsi des propriétés physicochimiques proches de celles de l'os ce qui favorise une meilleure intégration. L'utilisation de matériaux pulvérulents permet des applications variées allant de la mise en forme de matrices poreuses ou de granules à une utilisation en pâte pour l'injection dans des défauts osseux en passant par l'application comme vecteur de médicament. Le contrôle de la répartition des phases à l'échelle de la brique de base que représentent les grains de poudre assure, dans les procédés basses températures et en conditions douces, un contrôle à des échelles plus grandes une fois la poudre mise en forme.

L'objectif de ces travaux de thèse est d'élaborer un matériau composite organique/inorganique sous forme de poudre et avec la plus grande homogénéité de répartition possible entre les deux phases. Nous nous sommes donc attachés à caractériser l'interface entre ces deux phases à différentes échelles. Nous avons travaillé avec un polymère issu de la biomasse, le chitosane, et des phosphates de calcium pour obtenir une poudre composite. Le procédé de mise en forme choisi est l'atomisation séchage et nous avons développé une stratégie permettant en une étape de synthétiser et mettre en forme de poudre le matériau composite.

Nous présentons dans le premier chapitre un état de l'art de la synthèse de certains phosphates de calcium, des propriétés du chitosane, des matériaux composites et enfin du procédé utilisé : l'atomisation séchage. Nous avons ensuite structuré les résultats de ces travaux en trois parties : une première partie traite de l'obtention de la phase minérale par atomisation séchage, la seconde de l'obtention de la poudre composite et enfin de la mise en forme de cette poudre.

Pour obtenir la phase minérale atomisée, nous avons procédé suivant deux stratégies : l'atomisation d'une suspension de phosphate de calcium dans une solution acide et l'atomisation d'une solution de précurseurs. La nature chimique et les caractéristiques structurales de la poudre alors obtenue ont été étudiées. Par la suite, nous avons incorporé la phase organique dans les préparations pour atomisation et étudié l'impact de sa présence sur la nature et la structure de la phase minérale. Les deux stratégies énoncées plus haut ont été testées et nous avons porté notre attention sur les possibles interactions entre les deux phases de la poudre composite. Enfin deux procédés de mise en forme faisant usage de la poudre composite synthétisée précédemment ont été mis en œuvre. Un revêtement a été ainsi développé ainsi qu'un matériau massif imprimé en 3D. Nous avons cherché à établir la faisabilité de ces transformations et avons été jusqu'à la caractérisation des propriétés biologiques des revêtements formés.

Chapitre 1 : Etat de l'art

I.1. Contexte.....	4
I.1.1 Minéralisation de l'os.....	5
I.2. Les phosphates de calcium.....	8
I.2.1 Généralités.....	8
I.2.2 Les apatites.....	11
I.2.3 Les phosphates de calcium amorphes	16
I.3.1 Origine.....	21
I.3.2 Intérêt biologique.....	22
I.3.3 Propriétés physico –chimiques	22
I.4. Les matériaux composites à matrice chitosane chargés en phosphates de calcium	25
I.4.1 Procédés de mise en forme.....	25
I.4.2 Etude des interactions organique/inorganique	26
I.5. Le procédé d'atomisation séchage	28
I.6. Pour aller plus loin.....	31
Liste des figures.....	33

Ce chapitre expose la motivation des travaux qui ont été réalisés pendant cette thèse. Dans un premier temps nous présentons le contexte : l'os et les mécanismes en jeu lors de sa minéralisation et de sa formation. C'est ce matériau composite naturel organique/inorganique nanostructuré qui a inspiré et orienté ces travaux. Dans un deuxième temps nous décrivons la famille des phosphates de calcium ainsi que certaines de leurs propriétés avec une attention particulière pour les apatites et les phosphates de calcium amorphes. Nous poursuivons cette revue de littérature par la présentation de la phase organique choisie pour cette étude et finissons en décrivant le procédé utilisé : l'atomisation séchage.

I.1. Contexte

L'os est un matériau composite principalement constitué de collagène de type I, représentant 90 % des protéines du tissu osseux, et d'une phase minérale phosphocalcique, représentant environ 65 % de la masse sèche de l'os chez l'homme adulte [1].

Le collagène de type I est une protéine d'environ 1 400 acides aminés qui présente le motif Gly-X-Y où X est majoritairement occupé par des prolines ou lysines et Y par des lysines [2]. La présence de résidus aminés (amines primaires et secondaires respectivement) confère au collagène ses propriétés de protonation et donc de solubilisation en milieu acide [3] ainsi que la possibilité de se lier, via l'intervention d'enzymes spécifiques et après hydroxylation des lysines, à des sucres [4]. La glycine, présente régulièrement le long de la macromolécule, permet sa structuration en triple hélice : les tropocollagènes. Ceux-ci sont stabilisés par les résidus hydroxylés des prolines et ont une taille de 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre [5]. Enfin, les triples hélices s'organisent en fibrilles dans le sens de la longueur avec un espace de 67 nm entre elles. Pour des concentrations importantes (5-30 mg/mL) similaires à celles trouvées *in vivo*, le collagène adopte, *in vitro*, des structures de type mésophases (cristaux liquides) cholestériques ou nématiques [6].

Le tissu osseux contient également des cellules caractéristiques : les ostéoblastes et les ostéoclastes qui contribuent au remodelage du squelette en formant respectivement de l'os nouveau et en résorbant l'ancien. Les ostéoclastes solubilisent la phase minérale via l'utilisation de pompes à protons qui acidifient le milieu. Le collagène se retrouve alors déminéralisé et est décomposé par des enzymes sécrétées par les ostéoclastes. Une fois la lacune osseuse formée, les ostéoblastes interviennent pour reformer l'os en produisant du collagène et en libérant du calcium et du phosphate. Le squelette est ainsi renouvelé d'environ 10 % chaque année [7] pour une personne saine et d'âge moyen. Ce remodelage est guidé par les contraintes mécaniques

qui sont appliquées à l'os : les zones faiblement sollicitées mécaniquement sont plus rapidement résorbées alors que les zones plus contraintes sont renforcées par ce mécanisme [8]. Il est également régulé par la sécrétion de certaines enzymes qui agissent sur l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes [9].

Weiner et Wagner [10] ont proposé une hiérarchisation de l'os en sept niveaux associés à différentes échelles d'observation et différents constituants (Figure 1). Ainsi ces niveaux sont classés de l'échelle centimétrique où l'os spongieux (ou épiphyse) et l'os cortical (ou diaphyse) sont observés à l'échelle micrométrique où apparaissent les ostéons et le motif de l'arrangement fibrillaire jusqu'à l'échelle nanométrique (niveau 1 à 3) où l'association intime entre les fibrilles de collagène et les cristaux phosphocalciques est mise en évidence. C'est cet assemblage d'un matériau polymérique structuré en fibrille avec un matériau inorganique qui constitue la brique élémentaire du tissu osseux auquel nous nous sommes intéressés dans ces travaux.

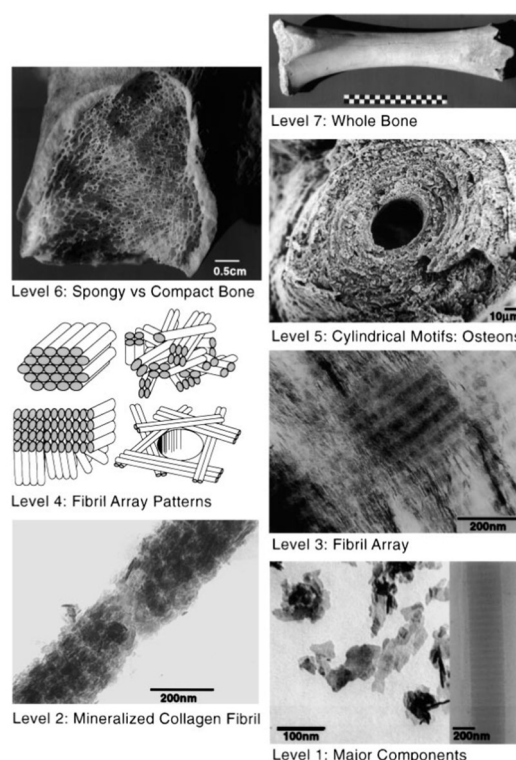


Figure 1 Organisation hiérarchique proposée par Weiner et Wagner[10].

I.1.1 Minéralisation de l'os

La minéralisation de l'os représentée sur la Figure 2 est initiée entre les fibrilles de collagène dans l'espace laissé vacant par l'enroulement de la triple hélice. La structuration de la phase minérale au sein de la phase organique semble suivre le motif laissé par celle-ci. En effet, les

cristaux minéraux retrouvés dans l'os ont une forme allongée suivant l'axe c de la maille hexagonale de l'apatite et s'orientent avec cet axe cristallographique c parallèle à l'axe de la fibre. La morphologie typique de la phase minérale de l'os est sous forme de plaquettes de longueur 50 nm, de largeur 25 nm et d'épaisseur 2 à 5 nm [11].

Si les chercheurs s'accordent sur la nature chimique et cristalline de la phase minérale osseuse naturelle après minéralisation, les mécanismes mis en jeu pour aboutir à cette phase ne font toujours pas consensus. Deux principaux modèles s'opposent en effet pour expliciter ce phénomène. D'un côté, certains chercheurs comme Grynpas ou Glimcher sont favorables à un modèle de nucléation croissance de l'apatite entre les fibrilles de collagène [12,13]. De l'autre côté, un modèle initialement défendu par Posner et Termine [14], propose une minéralisation de l'os passant par des phases phosphocalciques de transitions. Crane *et al.* [15], dans leurs travaux, observent par spectroscopie Raman des bandes à 1010-1014 cm^{-1} caractéristiques des phosphates octocalciques (OCP) et une bande large à 945 cm^{-1} caractéristique d'un environnement amorphe. Les analyses spectroscopiques d'os nouvellement formé révèlent la présence d'une grande quantité d'ions carbonates, non compatible selon Rey *et al.* [13] avec l'identification de cristaux d'OCPs ou d'une phase solide semblable à l'OCP. L'absence de bande à 915 cm^{-1} sur le spectre infrarouge de l'os (spécifique à la vibration P-OH des ions HPO_4^{2-} dans l'OCP) semble en contradiction avec les résultats de Crane *et al.* De plus Grynpas *et al.* [12] indiquent dans leurs travaux l'impossibilité d'observer par diffraction des rayons X la présence d'une phase amorphe dans l'os. Les auteurs évoquent plus généralement la difficulté pour isoler les premières phases formées de l'os du fait de leur instabilité. Ainsi les préparations nécessaires à la mise œuvre de diverses méthodes de caractérisation ou les fortes énergies impliquées (en microscopie électronique notamment) sont susceptibles de causer des altérations majeures des premières entités minérales et d'engendrer des interprétations erronées.

Cependant le second modèle s'appuie sur des résultats *in vitro* qui tendent à prouver que la phase amorphe peut suivre cette évolution [16,17]. Une étude récente a apporté un nouvel argument en faveur de ce modèle en démontrant la présence d'un phosphate de calcium amorphe au sein d'un os en formation chez le poisson zèbre [18]. Dans la même optique, les travaux de Beniash *et al.* [19] tendent à démontrer la présence d'une phase amorphe dans la formation de l'émail (également constitué de phosphate de calcium tout comme l'os). Le modèle propose ainsi une minéralisation de l'os en trois temps : dans une première étape, il y aurait formation d'un phosphate de calcium amorphe. Ce minéral se formerait entre deux tropocollagènes (les triples hélices formées par le collagène). Cette phase évoluerait par la suite

vers une seconde espèce phosphocalcique : l'OCP qui sera décrit en détail plus loin dans ce texte. L'OCP n'est qu'une phase de transition puisqu'elle se transformerait *in fine* en phase apatitique.

A ces mécanismes de formation de la phase minérale, il faut ajouter l'importance de la phase organique. Il y a bien sûr l'influence stérique du collagène, de sa semi-cristallinité ainsi que de son hypothétique structure cholestérique. Celle-ci n'a pas été prouvée *in vivo* mais il existe pourtant une grande similitude entre cette structure cristal liquide et les organisations géométriques des fibrilles constituant les ostéons. Ainsi des études ont démontré le rôle prédominant du collagène dans la structuration et la croissance de l'os [20,21]. Au rôle du collagène, il faut ajouter les contributions des différentes protéines non collagéniques. Certaines de ces protéines sont des régulateurs importants de l'activité des ostéoclastes et ont démontré leur influence sur la croissance, la formation ou la minéralisation de l'os. L'une des hypothèses est que les protéines qui présentent de nombreux résidus phosphorés peuvent se lier à des germes ou à des cristaux de petites tailles et ainsi stopper la croissance de ceux-ci [22].

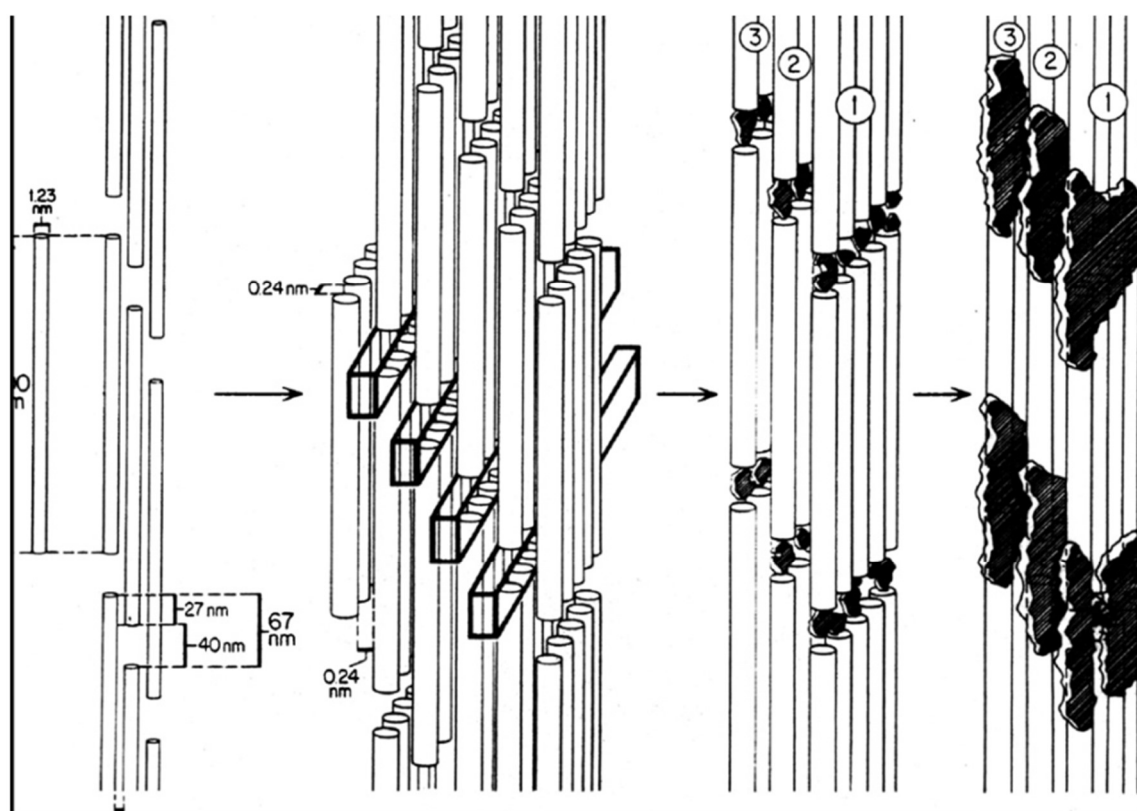


Figure 2 Schéma représentatif de la minéralisation du collagène extrait des travaux de Landis *et al.* [23].

Les cylindres représentent les tropocollagènes alors que la phase minérale est représentée par les plaques noires de formes irrégulières. Les auteurs démontrent par imagerie TEM puis reconstruction 3D par tomographie que la minéralisation du collagène a lieu dans un premier temps dans les espaces entre les triples hélices puis que celle-ci se poursuit pour donner des minéraux sous forme de plaquettes.

I.2. Les phosphates de calcium

I.2.1 Généralités

Les phosphates de calcium représentent une famille de matériaux minéraux issus de la combinaison des différentes formes acides de l'acide phosphorique H_3PO_4 avec l'ion Ca^{2+} . L'acide phosphorique a 3 pKa (2,15, 7,20 et 12,42) correspondant aux trois formes ioniques : H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} et PO_4^{3-} [24]. D'autres éléments tels que le zinc [25], l'argent [26], le cuivre [27] ou encore des ions tels que SiO_4^{4-} [28] peuvent se substituer ou s'insérer dans la maille des phosphates de calcium. Ces dopants peuvent donner aux matériaux des propriétés antibactériennes [29] ou encore modifier la stabilité chimique du minéral [30]. Les « phosphates de calcium » correspondent à différents composés identifiés par leur rapport atomique calcium/phosphore (Ca/P) (Figure 3) et dont la solubilisation est dépendante du pH du milieu ainsi que de la concentration en ions comme décrit dans la Figure 4. Nous avons fait le choix de présenter dans ce paragraphe les phosphates dicalciques, octocalciques, tetracalciques et les hydroxyapatites.

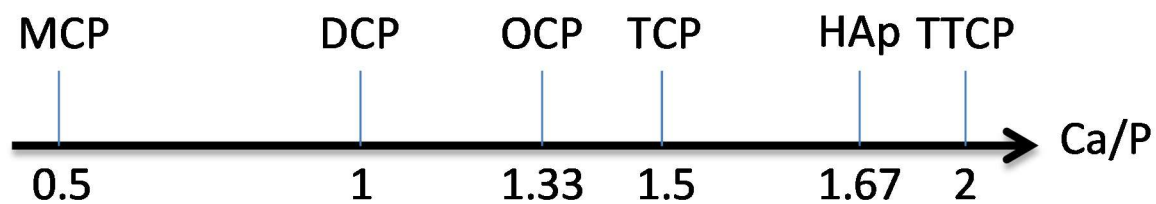


Figure 3 Frise représentant les orthophosphates de calcium. De gauche à droite, nous retrouvons les phosphates monocalciques (MCP) de formule générale $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, les phosphates dicalciques (DCP) de formule générale $\text{CaHPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, les phosphates de calcium octocalciques (OCP) de formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, les phosphates tricalciques (TCP) de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, les hydroxyapatites phosphocalciques (HAp) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et enfin les phosphates tétracalciques (TTCP) de formule $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$.

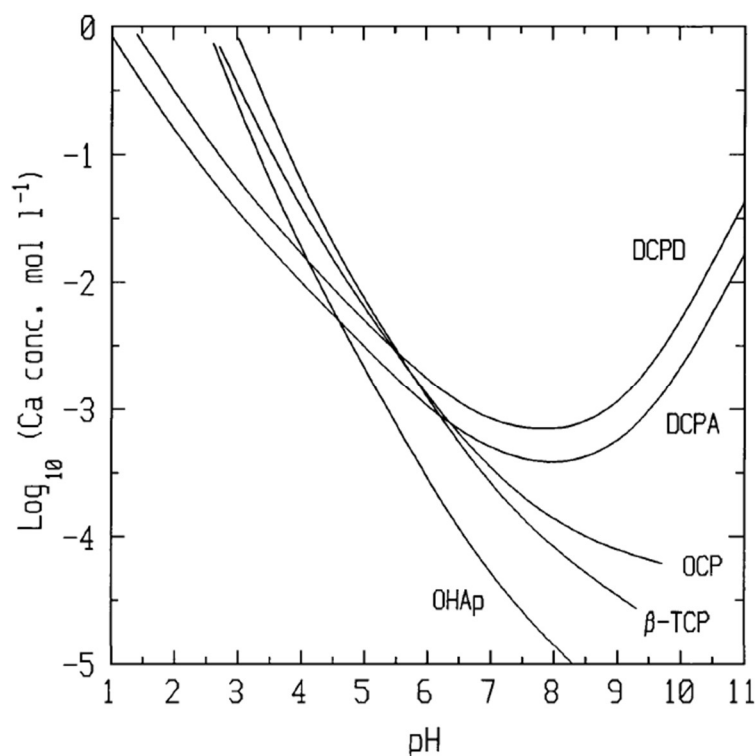


Figure 4 Isothermes de solubilité des différentes phases phosphocalciques dans le système $\text{Ca(OH)}-\text{H}_3\text{PO}_4-\text{H}_2\text{O}$ à 37 °C calculées avec le programme RAMESES extrait de la référence [31].

I.2.1.1 Les phosphates dicalciques

Si le rapport molaire Ca/P vaut 1, du phosphate dicalcique (DCP) est alors formé. Dans la sous famille des DCP, une distinction est faite entre deux types de cristaux : le DCPD pour phosphate dicalcique dihydraté (ou brushite) et le DCPA pour phosphate dicalcique anhydre (ou monétite).

- brushite

La brushite de formule $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est obtenue par précipitation en milieu acide [32] ($\text{pH} < 6.5$). Elle se distingue de la monétite en spectrométrie infrarouge par la présence d'une bande à 1652 cm^{-1} et de bandes entre 3000 et 3600 cm^{-1} attribuées aux vibrations de la liaison OH de l'eau [33]. Les autres bandes caractéristiques de la brushite se trouvent à 1217 , 1062 , 985 , 872 et 526 cm^{-1} et sont respectivement associées aux vibrations ν_5 , ν_6 , ν_2 , ν_3 et ν_4 de l'hydrogénophosphate [34]. La présence d'eau est également visible en ATG avec une perte de masse non négligeable de l'ordre de 20 % vers 200 °C [35]. Enfin sa structure monoclinique (dont les paramètres de maille sont : $a = 5.182 \text{ Å}$, $b = 15.180 \text{ Å}$, $c = 6.239 \text{ Å}$ et $\beta = 116^\circ 25'$) produit un diagramme de diffraction caractérisé par des pics à $13,57$, $24,36$, $34,11$, $35,58$ et $39,88^\circ 2\theta$ (avec une source au cobalt $\lambda = 1,788970 \text{ Å}$) respectivement attribués aux plans (020), (021), (041), (-221) et (-220) selon la fiche standard JCPDS # 09-0077.

La brushite se retrouve à l'état naturel dans certains cals osseux [36,37] de fractures. Elle a une importance quant à la vitesse de réparation de l'os notamment chez les enfants. Elle évolue en milieux aqueux vers une structure apatitique mal cristallisée [38,39]. Elle est, de ce fait, largement utilisée pour les ciments osseux [40–42].

- monétite

La monétite est la forme anhydre de la brushite. Elle a donc comme formule chimique CaHPO_4 . Les spectres infrarouges de ces deux formes, brushite et monétite, se distinguent uniquement par les bandes de la liaison OH de l'eau ; absentes dans celui de la forme anhydre. Sa structure triclinique possède les paramètres de mailles suivants : $a = 6,906 \text{ \AA}$, $b = 8,577 \text{ \AA}$, $c = 6,634 \text{ \AA}$, $\beta = 91,50^\circ$ et $\alpha = 127,6^\circ$. Le diagramme de diffraction est caractérisé par des pics à $26,45$, $26,61$, $30,21$ et $32,92^\circ 2\theta$ correspondants respectivement aux plans (020), (-220), (112) et (102) selon la fiche standard JCPDS # 09-0080.

Elle est issue généralement de la déshydratation de la brushite à 200°C pendant 1h [39]. Elle intervient dans la composition de certains ciments osseux [43] ou dans la synthèse d'autres phosphates de calcium comme le phosphate tricalcique en la chauffant par exemple en présence d'une autre source de calcium comme la calcite [44,45].

I.2.1.2 Phosphate octocalcique

Si le rapport Ca/P vaut 1,3, le phosphate de calcium considéré est appelé phosphate octocalcique (OCP). De formule générale $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ c'est un phosphate de calcium souvent observé *in vitro* comme un intermédiaire instable évoluant vers une apatite déficiente en calcium en solution aqueuse [38]. Bien que sa structure soit triclinique, l'OCP laisse apparaître quelques arrangements atomiques proches de ceux de l'apatite. Comme les DCPA et DCPD, c'est un phosphate de calcium dit acide et donc relativement soluble en milieu neutre en comparaison avec les phosphates de calcium ne contenant que des ions PO_4^{3-} [46].

I.2.1.3 Phosphates tricalciques

Si le rapport Ca/P vaut 1,5, c'est le phosphate tricalcique (TCP) de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ qui est présent. Trois phases cristallines sont distinguées.

- TCP apatitique

La phase apatitique du TCP ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$) peut être obtenue par le mélange d'une solution de nitrate de calcium et d'hydrogénophosphate d'ammonium [47–49]. Ces poudres sont

en général utilisées comme intermédiaires réactionnels pour la synthèse par voie solide des autres formes de TCP.

- β -TCP

La phase β -TCP est une phase rhomboédrique obtenue par voie solide en chauffant à une température entre 850 et 1125 °C. Elle est aussi expérimentalement obtenue en chauffant de l'os et est alors appelée « poussière d'os » [50]. Bien que le β -TCP n'intervienne jamais dans les processus de calcification naturels, il est pourtant largement utilisé dans le domaine de la substitution osseuse (BIOSORB®, CEROS®, CERASORB® ...) ou celui des ciments phosphocalciques [38,41].

- α -TCP

La phase α -TCP (monoclinique) est plus soluble dans l'eau que son pendant β et métastable à température ambiante. Elle est obtenue par trempe de la phase β portée à une température au-delà de la température de transition beta : 1125 °C [51]. Elle peut être également obtenue en chauffant du phosphate tricalcique amorphe entre 600 et 700 °C [52]. Du fait de sa faculté à s'hydrolyser rapidement en hydroxyapatite déficiente en calcium, elle est utilisée dans le domaine de la substitution osseuse pour former des céramiques poreuses résorbables [53,54].

I.2.2 Les apatites

Nous distinguerons ici trois types de composés : l'hydroxyapatite stœchiométrique, les apatites biomimétiques et les apatites nano.

I.2.2.1 L'hydroxyapatite stœchiométrique

La formule chimique de l'hydroxyapatite stœchiométrique est $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et correspond donc à un rapport atomique Ca/P de 1,67. D'une façon plus générale les apatites correspondent à une vaste famille de composés minéraux de formule chimique $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ dans laquelle Me représente un métal bivalent, XO_4 un anion trivalent et Y un anion monovalent. Les apatites stœchiométriques cristallisent le plus souvent dans un système hexagonal. C'est le cas de l'hydroxyapatite phosphocalcique et plus particulièrement pour les apatites phosphocalciques avec les paramètres de maille suivants : $a = 9,418 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$, $\beta = 120^\circ$ [55]. Une représentation de la projection de la maille de l'hydroxyapatite sur le plan (001) est donnée sur la Figure 5. Cette projection fait apparaître deux types de tunnels : les premiers hébergent les ions calcium alors que les seconds sont occupés par les ions OH^- .

Cette phase cristalline peut être obtenue par voie sèche ou par voie liquide. Dans les deux cas, l'obtention de la phase pure stœchiométrique nécessite souvent une calcination à haute température (1000 °C) d'un précurseur apatitique mal cristallisé [56,57]. Les synthèses en voie liquide nécessitent également la plupart du temps un post traitement par rinçage de la poudre [58] pour éliminer les sous-produits de réaction et purifier la phase cristalline.

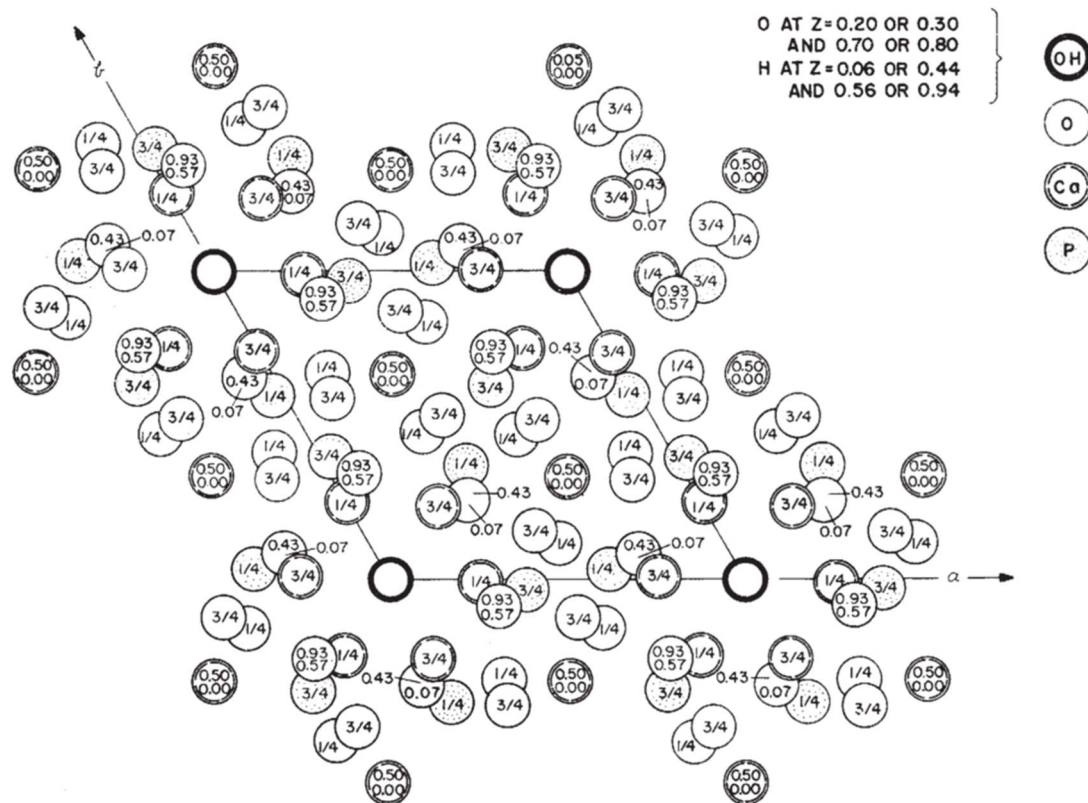


Figure 5 Projection sur le plan (001) de la maille de l'hydroxyapatite. Image extraite de la référence [55].

Le spectre infrarouge de l'hydroxyapatite présente des bandes de vibrations fines à 3572 et 630 cm^{-1} correspondant au groupement hydroxyle du cristal, les bandes de vibrations à 1090 et 1030 cm^{-1} correspondent à la vibration $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, la bande à 960 cm^{-1} est associée à la vibration $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, celles à 600 cm^{-1} et 570 cm^{-1} correspondent à la vibration $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ et celle à 474 cm^{-1} à la vibration $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$. Entre 10 et 60 ° 2 θ ($\lambda \text{ K}\alpha_{\text{Co}} = 1.79 \text{ \AA}$), le diffractogramme de l'hydroxyapatite présente notamment des raies à 30, 37, 37,5, 38,4, 39,8, 46,6, 54,8 et 58,3 ° 2 θ respectivement associées aux plans (002), (211), (112), (300), (202), (310), (222) et (213) répertoriés dans la fiche JCPDS # 09-0432.

La haute cristallinité de l'hydroxyapatite stœchiométrique calcinée et sa stabilité chimique en font un composé peu soluble et sa dissolution nécessite des solutions acides. Tonino *et al.* [59] ont démontré que des revêtements d'hydroxyapatite se résorbent très lentement (*i.e.* en

quelques années) *in vivo*. Malgré ce manque de solubilité, l'hydroxyapatite possède de bonnes propriétés biologiques d'ostéoconductivité qui justifient son utilisation comme matériau de substitut osseux.

I.2.2.2 Les apatites non stœchiométriques

L'os est constitué d'une phase apatitique carbonatée déficiente en calcium et mal cristallisée de formule $[\text{Ca}_{8,3}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{PO}_4)_{4,5}(\text{CO}_3)_{0,7}(\text{OH})_{1,3}]$ [50,60] et de taille nanométrique (de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de nanomètres). Les apatites qui présentent des carbonates, des hydrogénophosphates, des lacunes ou qui sont de petite taille ont, au vu de leur similitude avec la phase minérale naturelle de l'os, un intérêt biologique plus marqué que l'hydroxyapatite stœchiométrique. Elles ont un rapport Ca/P qui peut varier autour de 1,67 et présentent des diffractogrammes plus ou moins bien résolus du fait de leur plus faible cristallinité et de leur taille nanométrique.

I.2.2.2.1 Caractéristiques des apatites non stœchiométriques : les carbonates.

Les ions carbonates (CO_3^{2-}) peuvent se substituer soit aux ions PO_4^{3-} soit à OH^- dans la maille de l'hydroxyapatite. Dans le premier cas, la substitution peut être obtenue par réaction à haute température (en présence de carbonate de calcium) ou par précipitation et le carbonate est dit de type B ; la substitution totale des OH^- s'obtient en chauffant dans une atmosphère de gaz carbonique desséché et l'apatite est dite carbonatée de type A. La carbonatation partielle en A peut aussi être obtenue en milieu aqueux ce qui est généralement le cas des apatites biologiques. L'insertion des carbonates de type B peut être obtenue de façon volontaire en ajoutant un sel de carbonate (typiquement de l'hydrogénocarbonate de sodium, NaHCO_3 [61]) ou de manière fortuite à cause de dioxyde de carbone solubilisé dans l'eau du milieu réactionnel [62] ou à cause d'impuretés dans les réactifs [63]. La présence de ces carbonates (types A ou B) augmente significativement la solubilité de l'apatite [64].

La présence des carbonates se manifeste par l'apparition de bandes de vibration dans la région comprise entre 1350 et 1570 cm^{-1} dans le spectre infrarouge [65,66]. Plus particulièrement, les carbonates de type A se présentent en doublet à 1450 et 1540 cm^{-1} alors que les carbonates de type B sont identifiés également par leur doublet à 1410 et 1470 cm^{-1} [67].

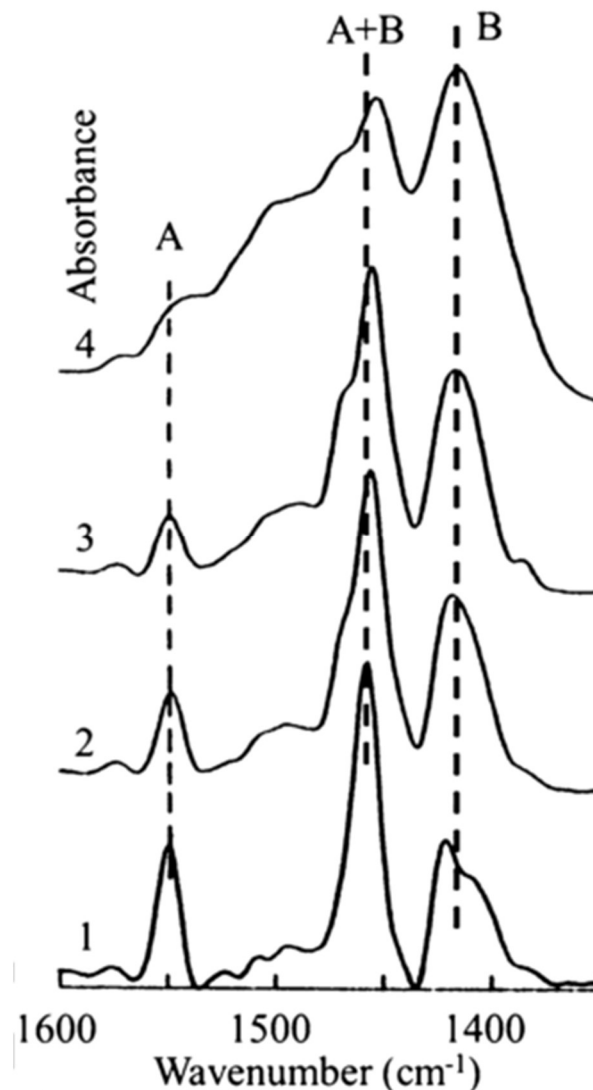


Figure 6 Spectres infrarouges centrés sur le domaine de vibration $\nu_3 \text{CO}_3$. Les différents spectres représentent des concentrations en carbonate variables (1 : 1,3 %, 2 : 2,8 %, 3 : 3,5 % et 4 : 10 %). Ces spectres sont issus de la référence [68].

1.2.2.2 Caractéristiques des apatites non stœchiométriques : réactivité

Du fait de leur taille nanométrique, ces apatites possèdent une grande surface spécifique (de l'ordre de $160 \text{ m}^2/\text{g}$ [69]) ce qui a pour effet de les rendre de manière générale, plus réactives. De plus, la description de ces apatites nanométriques non stœchiométriques biomimétiques carbonatées est celle d'un système à cœur apatitique recouvert d'une couche de surface hydratée [70,71]. Cette couche hydratée leur permet d'échanger de nombreux ions et augmente ainsi leur fonctionnalité. Cette structure en sandwich (Figure 7) n'a pas pu être directement observée mais des preuves indirectes ont été mises en évidence dans le spectre infrarouge : la présence de carbonates différents des types A et B et appartenant à des domaines hydratés ainsi que la contribution de bandes à 617 et 534 cm^{-1} attribuées à la présence d'ions

hydrogénophosphates non apatitiques. Enfin une très grande capacité à échanger des ions a été démontrée pour ces apatites qui est imputée à cette couche hydratée [72,73].

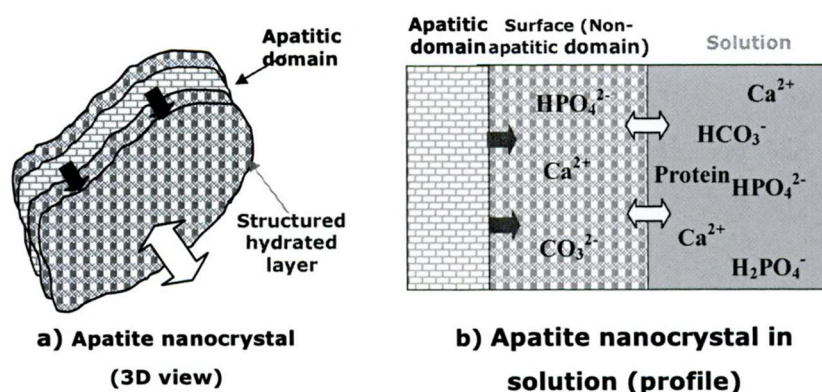
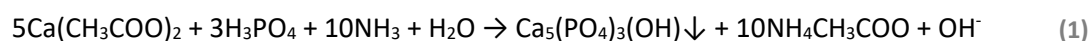


Figure 7 Représentation schématique du modèle de la couche hydratée des apatites nanométriques mal cristallisées [74].

1.2.2.2.3 Synthèse par voie humide

Les apatites non stœchiométriques carbonatées nanométriques peuvent être obtenues selon le même protocole de synthèse en voie humide que les apatites stœchiométriques en adaptant le pH, la température, le temps de maturation [75]. La morphologie et la taille de ces apatites nanométriques peuvent également être contrôlées par l'ajout de surfactants comme le CTAB [76] ou de polymère comme le PEG [77]. Ces molécules agissent alors comme des modèles ou des points de nucléation pour la phase minérale [78] à l'instar du mécanisme proposé de minéralisation de l'os. Il est également possible d'obtenir des apatites de taille nanométrique par hydrolyse d'un précurseur phosphocalcique. Ces procédés impliquent généralement des phénomènes de solubilisation reprécipitation d'un composé minéral moins stable comme de la brushite, de la monétite, de l'OCP ou de l' α -TCP en solution vers une forme minérale plus stable : une apatite.

Ustundag *et al.* [79] utilisent dans leurs travaux de l'acétate de calcium et de l'acide phosphorique pour former un revêtement d'hydroxyapatite à la surface de nanotubes de carbone en suivant la réaction (1) :



Les solutions de précurseurs sont mélangées en maintenant le pH ≥ 10 grâce à l'ajout d'une solution d'ammoniaque. A cette suspension d'hydroxyapatite nanométrique a été ajoutée 1 %

massique de nanotubes de carbone. Le tout est placé dans un réacteur hydrothermal à 200 °C pendant 2 H puis séché à 100 °C pendant une nuit après avoir été rincé à l'eau. Les nanocristaux ainsi formés ont une morphologie en bâtonnet de 60-70 nm de long et 10-15 nm de large (Figure 8). Cependant, de l'acétate d'ammonium est associé à ces nanocristaux d'apatite, comme produit secondaire de la réaction. Dans la synthèse de l'apatite nanométrique, ce résidu de réaction est indésirable. Cependant dans l'élaboration du matériau composite nanotubes de carbone/apatite, il intervient dans la fonctionnalisation de surface des nanotubes.

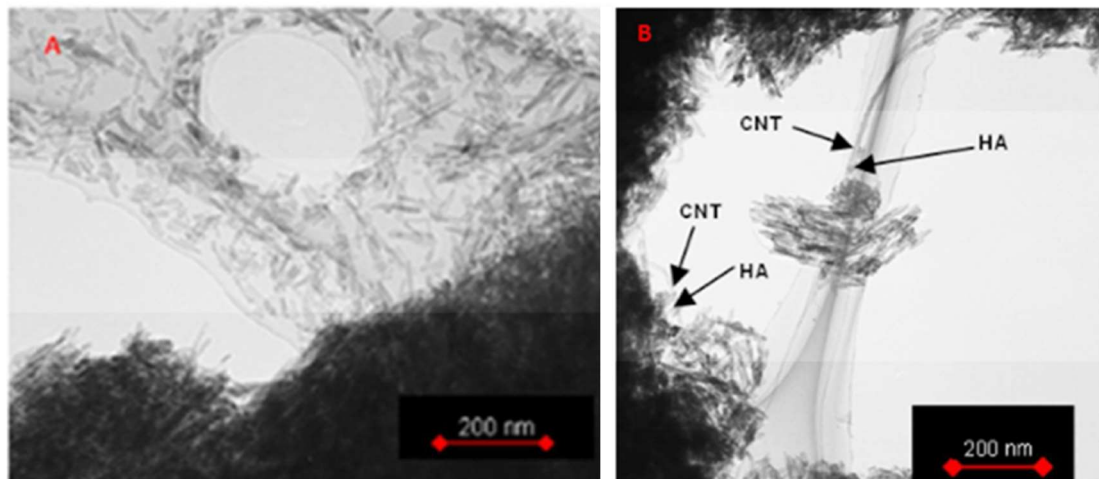


Figure 8 Images en microscopie électronique à transmission de la synthèse d'apatites nanométrique (A) et du composite nanotube de carbone/apatite nano (B) repris des travaux de Ustundag *et al.* [79].

I.2.3 Les phosphates de calcium amorphes

Lorsque la périodicité atomique d'un solide n'est plus assurée, la phase alors formée est qualifiée d'amorphe. Elle ne peut plus alors être associée à un réseau de Bravais et ne présente pas de motif de diffraction (rayons X, électrons, neutrons ...) indexable avec des indices de Miller [80].

I.2.3.1 Généralités

Les phosphates de calcium amorphes (ACP) les plus courants décrits dans la littérature sont les amorphes dits de Posner. Ils sont obtenus en solution aqueuse en mélangeant une préparation de sel de calcium (souvent du chlorure de calcium ou du nitrate de calcium) avec une solution de phosphate (souvent potassium, sodium ou ammonium). La réaction se fait dans un milieu tamponné basique (TRIS ou ammoniaque). Ce milieu réactionnel est le même que le milieu utilisé pour synthétiser l'hydroxyapatite ou les apatites nano car l'ACP est supposée être un précurseur de ces phases. Les phénomènes de maturation, de vieillissement sont empêchés en

séparant le précipité du surnageant rapidement (par filtration ou centrifugation) après la réaction de précipitation et le précurseur phosphocalcique amorphe est alors récupéré. Le rapport molaire Ca/P de ces ACPs de Posner est de 1,5 avec la formule théorique chimique $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$.

En 1974, Betts et Posner [81] présentent des fonctions de distribution de paires (PDF) d'ions obtenues par transformé de Fourier du signal de la diffraction X de phosphates de calcium amorphes. Ils identifient des pics à 1,55, 2,4, 3,4 et 4,1 Å qu'ils associent respectivement aux paires d'ions P-O, O-O et Ca-O, Ca-Ca et enfin P-P. Les deux premiers pics sont particulièrement semblables en position et taille aux pics observés sur la PDF d'hydroxyapatite. Ce résultat suppose un arrangement à courte distance similaire des paires d'ions entre l'ACP et l'HAp. Les troisième et quatrième pics sont sensiblement plus larges et moins intenses que ceux d'une apatite bien cristallisée et pourtant à la même position. Ces pics traduisent des arrangements atomiques similaires peu étendus et suggèrent l'existence d'un domaine cristallin caractérisé par une distance de cohérence de l'ordre du nanomètre. La similarité de positionnement des pics de la fonction de distribution de paires entre l'ACP et l'HAp ainsi que la tendance de l'ACP à évoluer vers une HAp [82] laissent supposer que la portion $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ du motif cristallin de l'hydroxyapatite peut être un modèle pour le cluster de Posner. Ainsi le premier modèle d'ACP a une géométrie sphérique d'une taille de 9,5 Å et est supposé être déshydraté.

Cependant, même si l'ordre de grandeur ainsi que la géométrie sphérique des clusters d'ACP sont régulièrement démontrés expérimentalement, le modèle de Posner est fréquemment remis en question notamment quant à sa chimie. Termine *et al.* [83] ont, par exemple, obtenu des ACPs différents de ceux de Posner à des pH acides. Les ACPs ainsi formés présentent des rapports Ca/P compris entre 1,18 et 1,5. Ces résultats sont corrélés au fait qu'en milieu acide, des hydrogénophosphates interviennent dans la formation de la phase minérale ce qui a pour conséquence de faire décroître le rapport Ca/P. La chimie du modèle d'amorphe est alors plus semblable à celle des OCPs avec des quantités de phosphates et d'hydrogénophosphates variables. Dans leurs travaux Karimi *et al.* [84] utilisent différents précurseurs ainsi que différents mélanges eutectiques de solvants (chlorure de choline-urée, chlorure de choline-éthylène glycol ou chlorure de choline-glycérol) pour produire des phosphates de calcium amorphes avec des rapports molaires Ca/P variables. Les ACPs sont préparés par voie liquide en ajoutant une solution de phosphate à une solution de calcium. Le précipité ainsi formé est ensuite filtré puis séché au lyophilisateur pendant 65 h. Le minéral obtenu a un rapport Ca/P différent de 1,5 (plus faible, de l'ordre de 1 à 1,15) calculé en EDX et dépendant du solvant utilisé (sensible à la nature

alcaline du milieu). Cette étude présente l'intérêt de proposer une voie de synthèse en milieu non aqueux. L'aspect métastable des phosphates de calcium amorphes étant un facteur limitant dans le contrôle de leur synthèse.

Les particules d'ACP ont une taille qui varie usuellement de 20 à 100 nm en fonction du solvant ou de la nature des précurseurs et elles s'organisent le plus souvent en chapelet. Brecevic *et al.* [85] proposent que la formation de ces particules nanométriques résulte de l'agrégation de particules primaires (Figure 9) qui peuvent être associées aux clusters définis précédemment. Dans la même optique Habraken *et al.* [86], par suivi du pH, de la concentration d'ions libres Ca^{2+} et par imagerie TEM démontrent la formation spontanée d'un cluster amorphe avec une dimension caractéristique de 1 nm. Celui-ci s'organise en nodules sphériques correspondant aux nanoparticules d'ACP. D'autres études évoquent cette formation spontanée d'un cluster amorphe dans des conditions de sursaturation d'ions [87–89].

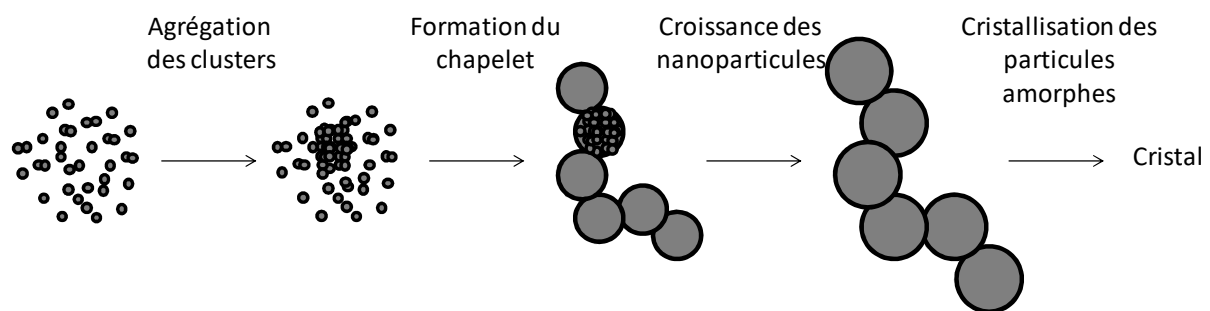


Figure 9 Représentation schématique de la formation des particules de phosphate de calcium amorphe (inspiré de la référence [90])

Les ACPs sont connus pour évoluer en milieu aqueux et pour former des apatites mal cristallisées. Dans leur étude Kim *et al.* [16] démontrent cette évolution en mettant en exergue l'importance du rapport Ca/P initial dans la solution. Plus le rapport est élevé, plus l'évolution de l'amorphe vers l'apatite est rapide. Cette évolution sert de modèle pour la formation et la croissance des apatites biomimétiques comme évoqué par Kazanci *et al.* [17]. Christoffersen *et al.* [91] observent également dans leurs travaux par imagerie TEM la formation de particules sphériques d'une taille de 100 nm. Ces particules ont un rapport molaire Ca/P de 1,35 et évoluent par la suite pour donner des cristaux de taille nanométrique qui eux même évoluent vers des tailles plus importantes. Après hydrolyse, le produit final est ainsi constitué d'un mélange d'OCP et d'apatite déficiente en calcium.

I.2.3.2 Techniques de synthèse

L'histoire de la découverte des phosphates de calcium amorphes est rapportée dans la revue de littérature de S. V. Dorozhkin [92]: « En 1955, Robinson et Watson [93] étaient les premiers à suggérer qu'une portion substantielle du minéral nouvellement formé dans un os jeune n'était pas cristallin. Au lieu de cela, ils décrivirent ce minéral comme étant similaire par ses caractéristiques à un précipité amorphe qu'ils avaient préparé pour une étude sur l'apatite synthétique [94]. Ce précipité, est apparu initialement dans leur synthèse quand des solutions suffisamment concentrées de CaCl_2 et Na_2HPO_4 ont été mélangées à température ambiante et pH neutre. La texture extrêmement fine et non cristalline des précipités a été mise en évidence par des observations au MET et des clichés de diffraction des électrons sans motif. Cette dernière caractéristique les a amenés à déduire que le motif plus diffus de la diffraction électronique d'un os nouvellement formé en comparaison avec celle d'un os mature, même si toujours apatitique, indiquait la présence d'un composant amorphe. »

Ainsi les phases amorphes semblent être les premières phases qui apparaissent lorsqu'un précipité phosphocalcique est formé avec des concentrations suffisamment élevées. Elles sont donc obtenues en utilisant des protocoles déjà définis pour former des apatites cristallisées. Brangule *et al.* [67] synthétisent ainsi des ACPs en utilisant des sels de nitrate de calcium avec du phosphate diammoniaque et du carbonate d'ammonium diammonique. Safronova *et al.* [95] utilisent de l'acétate de calcium et d'acide phosphorique pour former ces phosphates de calcium amorphes. La solution de calcium est versée dans la solution de phosphate en maintenant le pH à 9 par ajout d'ammoniaque. Un précipité se forme alors instantanément et est laissé pendant 15 min sous agitation. Il est ensuite filtré (sans rincer) et séché à l'air pendant 48 h. L'absence de rinçage laisse apparaître la formation de produit secondaire et, plus spécifiquement dans ce cas, d'acétate d'ammoniaque. La présence de ce groupement organique engendre, par dégradation thermique de l'acétate, la formation de carbonate dans le phosphate de calcium après une chauffe modérée.

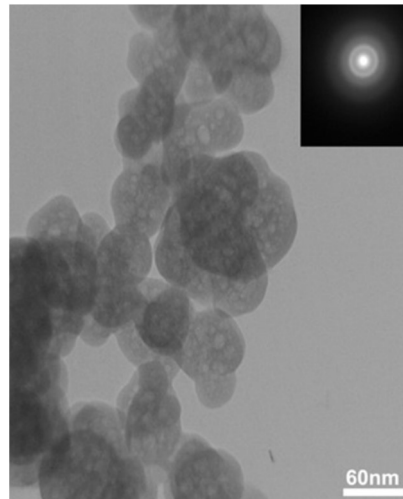


Figure 10 Image TEM de particules amorphes synthétisées avec du CaCl_2 et K_2HPO_4 dans un mélange eutectique chlorure de choline [84].

Les phosphates de calcium amorphes ont aussi été synthétisés par des procédés sol-gel comme décrit par Layrolle *et al.* [96]. Leur procédé se déroule en milieu alcoolique en faisant réagir du calcium avec de l'acide phosphorique (85 %). L'éthanol et le calcium vont alors former du $\text{Ca}(\text{OEt})_2$ qui réagit avec l'acide phosphorique. L'ajout du phosphore se fait à basse température ($< 10^\circ\text{C}$) et lentement pour éviter la formation de monétite. Un gel se forme alors et est laissé pendant 24 H sous azote à température ambiante. Le précipité est ensuite récupéré et séché à 100°C pendant 8 H.

I.2.3.3 Caractéristiques physico-chimiques

Les ACPs ne fournissent pas de raie de diffraction en DRX mais des halos. Le manque d'organisation et la présence de nombreux environnements chimiques se traduisent sur le spectre infrarouge de l'ACP par des bandes larges et mal résolues. Cependant en spectroscopie Raman, les phosphates de calcium amorphes présentent une raie assez bien définie (bien que large) à 950 cm^{-1} qui correspond à la vibration $\nu_1\text{PO}_4$ et qui est caractéristique d'un environnement amorphe.

I.3. Le chitosane

Nous l'avons vu, un biomatériau dont la composition reproduit celle du tissu osseux naturel devrait être composé, pour sa phase organique, de collagène. Cependant, le collagène est une protéine sensible qui dès 62 °C, commence à se dénaturer en gélatine de manière irréversible [97]. Le collagène est également un matériau onéreux et de ce fait, notre choix s'est orienté vers un autre biopolymère : le chitosane. Ce polymère d'origine naturelle a comme avantage d'être plus résistant thermiquement.

Le chitosane est un polysaccharide issu de la déacétylation de la chitine. C'est un copolymère composé d'unités de glucosamine et de N-acetyl-glucosamine [98] (Figure 11). Il s'agit par conséquent d'un polymère cationique soluble en milieu acide [99]. Il a de plus démontré de bonnes propriétés de biocompatibilité et est considéré comme un matériau bioactif [100–102] en interagissant avec des molécules extracellulaires comme les glycosaminoglycanes [103]. Par cette interaction, le chitosane augmente indirectement la concentration locale des facteurs de croissance impliqués dans la formation de l'os [104] ainsi que le recrutement et la différenciation d'ostéoprécurseurs [103]. Du fait de ces propriétés, son utilisation dans le domaine des biomatériaux a connu une augmentation notable durant les dernières décennies [100] et, tout particulièrement, pour l'élaboration de matériaux de substituts osseux de synthèse.

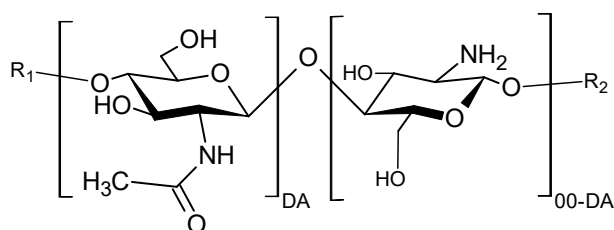


Figure 11 Représentation des motifs constituant le chitosane. DA représente le degré d'acétylation. À gauche le motif N-acetyl-glucosamine et à droite, le glucosamine

I.3.1 Origine

La chitine est le second polysaccharide le plus abondant sur Terre après la cellulose [100]. Il représente 16 % de la masse des carapaces des crabes ou 38 % de celle des homards [105]. Ces carapaces sont, à l'instar du tissu osseux des vertébrés, des matériaux composites constitués de carbonate de calcium pour la phase minérale, d'une phase organique qui comporte majoritairement de la chitine à laquelle sont associées différentes protéines et de l'eau. Pour purifier la chitine, il faut donc déminéraliser les carapaces par un traitement acide. Une fois déminéralisées, les carapaces sont déprotéinées par un traitement alcalin (typiquement une

solution de NaOH 1 M pendant plusieurs heures) [106] ou par des traitements enzymatiques [107].

Une fois la chitine extraite et purifiée, elle est transformée en chitosane (CTS) par déacétylation. La modification se fait par un traitement en milieu alcalin dans une solution de NaOH à chaud (température de réaction supérieure à 100 °C) [108]. A température constante et temps de réaction constant, une augmentation de la concentration en NaOH augmente le degré de déacétylation [107,109]. Ce degré de déacétylation (DD) correspond au rapport de motifs N-acetyl-glucosamine sur la somme des motifs N-acetyl-glucosamine et glucosamine [110]. Il influence de nombreuses caractéristiques physico-chimiques du chitosane comme sa solubilité ou encore ses propriétés biologiques. Il permet également de faire la distinction entre chitine et chitosane avec un seuil symbolique à 50 % de DD. Au cours de la déacétylation de la chitine, une possible rupture des ponts glycosidiques peut avoir lieu menant à la diminution de la longueur des chaînes du chitosane [111].

I.3.2 Intérêt biologique

Le chitosane possède des propriétés biologiques antibactériennes, antifongiques, des facultés de recrutement de cellules etc ... Ces propriétés sont dépendantes des caractéristiques physico-chimiques du chitosane comme son poids moléculaire, son degré de déacétylation et peuvent être influencées par le pH. Qi *et al.* [112] ont démontré les propriétés antibactériennes du chitosane dans une solution à pH 5.0 contre une gamme de bactéries à Gram négatif et Gram positif. L'effet du chitosane est plus marqué sur les bactéries à Gram positif que sur celles à Gram négatif. No *et al.* [113] ainsi que Xiao *et al.* [114] rapportent l'importance du poids moléculaire sur l'activité antibactérienne et antifongique respectivement.

Le chitosane permet également de fixer des cellules comme les ostéoblastes et de contribuer à leur prolifération. Dans leur étude, Seol *et al.* [102] démontrent une minéralisation d'une matrice de chitosane par des cellules osseuses dans un milieu tamponné PBS. En couplant le polymère avec des facteurs de croissance, il est possible d'augmenter significativement le développement ou la régénération de l'os [115].

I.3.3 Propriétés physico –chimiques

Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, le chitosane est un polymère bloc composé de deux sucres liés en β (1-4). La protonation de l'amine du glucosamine en milieu acide permet la solubilisation du chitosane. Usuellement de l'acide acétique est utilisé pour solubiliser le

chitosane et Rinaudo *et al* ont démontré que, pour avoir une solubilisation complète du chitosane, il suffisait d'avoir une protonation de l'ordre de 50 % de la chaîne [99].

Le chitosane étant un polysaccharide, il ne possède pas de température de transition vitreuse. Sa stabilité thermique est dépendante de son poids moléculaire et sa dégradation se fait dans une gamme de températures comprises entre 200 et 300 °C [116].

La réactivité chimique du chitosane est due à ses résidus comme cela se produit dans les réactions de phosphorylation du chitosane. Différents réactifs comme l'acide phosphorique, le pentoxyde de phosphore ou le triethyl phosphate peuvent réagir et conduire à la fixation du groupement phosphate aux alcools résiduels du chitosane [117,118]. Par extension, c'est également un procédé qui a été proposé par Lee *et al.* [119] pour réticuler deux chaînes de chitosane. Dans leurs travaux, ils font réagir un groupement phosphate sur l'alcool du carbone C-6 d'une unité du chitosane dans un solvant constitué d'urée et de diméthyleformamide à 70 °C. Suite à cette phosphorylation du chitosane, les auteurs proposent un mécanisme de formation de polyphosphate qui permet de réticuler le chitosane. Un autre groupe contribuant à la réactivité du chitosane est son amine résiduelle. Celle-ci étant chargée positivement lorsque le chitosane est solubilisé, des liaisons ioniques sont rendues possibles. Amaral *et al.* proposent ainsi plusieurs configurations pour des sels d'hydrogénophosphates de chitosane [120] et par extension, Fwu-Long *et al.* [121] suggèrent la réticulation ionique du chitosane par le tripolyphosphate comme illustré sur la Figure 12.

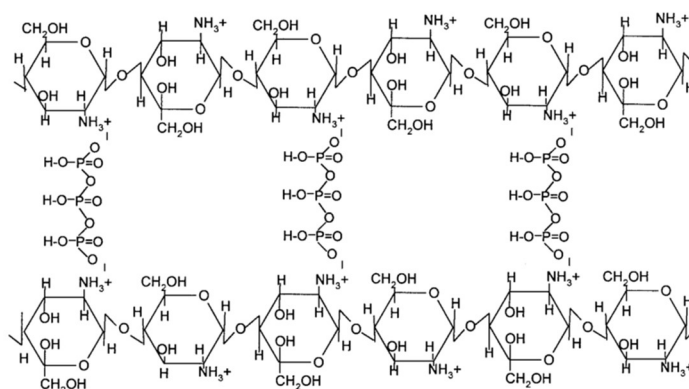


Figure 12 Schéma de réticulation ionique proposé par Fwu-Long *et al.* [121]

Le chitosane est un polymère semi-cristallin qui présente plusieurs arrangements dits « tendon » et « recuit ». Tous les deux sont stabilisés par des liaisons hydrogène intramoléculaires O(3)-O(5) et s'organisent en double hélice de façon antisymétrique sous la forme d'une structure en zigzag

pour former des feuillets (Figure 13). Le polymorphe « tendon » est le plus couramment rencontré dans le commerce, c'est la forme hydratée qui est donc stabilisée par les liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Le composé anhydre est appelé « recuit » et est obtenu en dispersant le chitosane dans de l'eau puis en le chauffant à 200 °C. Il présente également une structure en zigzag mais sans liaison hydrogène avec l'eau. La transition vers le chitosane recuit est irréversible [122].

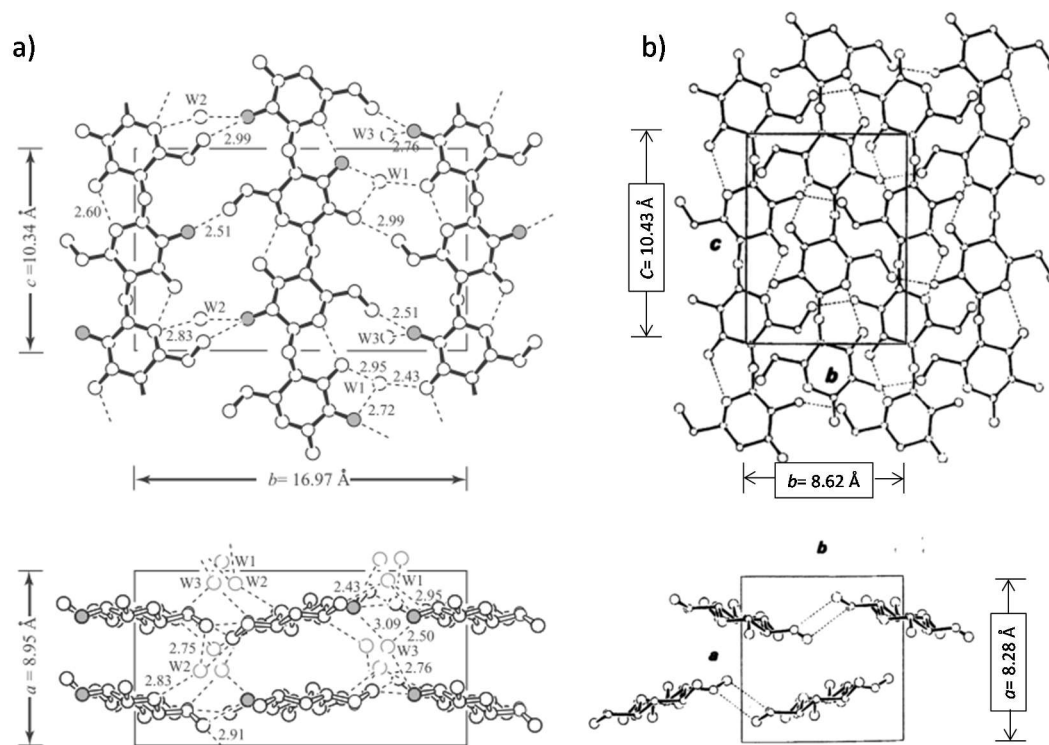


Figure 13 Arrangements des CTSs a) « tendon » et b) « recuit » projetés suivant l'axe a (haut) et l'axe c (bas). Repris et adapté de [123,124]

Les sels de chitosane peuvent adopter d'autres structurations appelées Type I, Type II ou Type III [123] présentes en fonction du sel utilisé, de la température de synthèse et de la concentration en acide. Le sel d'acétate de chitosane peut présenter une structure mixte Type I et Type II qui se traduit sur le spectre RMN par la présence d'un doublet du carbone C-1 (100 - 97 ppm) caractéristique de la structure Type II mais pour lequel la composante à 97 ppm n'est pas prédominante (contrairement à ce qui pourrait être attendu). Il en va de même pour le pic du carbone C-4 (83 - 78 ppm) [125]. Le sel d'acétate de chitosane est un matériau semi-cristallin comme le démontre le motif de diffraction présenté sur la Figure 14. A partir de cette diffraction, Yamamoto *et al.* [126] concluent à une structure monoclinique de la phase cristalline de ce sel.

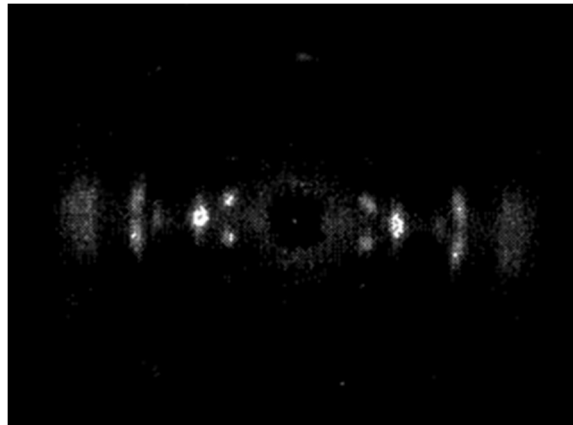


Figure 14 Motif de diffraction d'un sel d'acétate de chitosane préparé à 110 °C [126].

I.4. Les matériaux composites à matrice chitosane chargés en phosphates de calcium

Comme l'os est un matériau composite constitué de nanocristaux d'apatite distribués dans une matrice organique, de nombreuses études ont tenté d'associer une phase minérale avec un polymère. Cette association organique/inorganique est notamment retrouvée dans des composites chitosane/phosphate de calcium. Cette phase minérale doit alors avoir la répartition la plus homogène possible dans la phase organique. Dans leurs travaux, Ding *et al.* [127] ont par exemple préparé des suspensions de phosphates de calcium dans une solution de chitosane puis laissé sécher par évaporation de solvant. Ils ont démontré que pour le rapport massique CaP/CTS de 25 dans la suspension de départ ils obtenaient un film avec la meilleure résistance mécanique. Ils constatent également que ce rapport correspond à la limite à partir de laquelle la phase minérale commence à s'agréger et à présenter une moins bonne répartition dans le polymère.

I.4.1 Procédés de mise en forme

Les composites chitosane/CaP peuvent être mis en forme par évaporation de solvant à partir d'une suspension comme Xianmiao *et al.* l'ont démontré [128] ou encore comme Ding *et al.* [127] l'utilisent. Leurs travaux respectifs permettent de mettre en forme des membranes composites. Cette évaporation mène à la précipitation du chitosane ce qui engendre le piégeage des particules mises en suspensions (respectivement de l'apatite et du TCP).

De la même manière, la faculté du chitosane à précipiter en milieu basique est utilisée dans le procédé de fabrication additive développé par Ang *et al.* [129]. Dans leur étude, c'est une

suspension d'hydroxyapatite dans une solution acide de chitosane qui est imprimée via une buse dans une solution d'hydroxyde de sodium et d'éthanol. Le chitosane présent dans la phase liquide précipite au contact de la soude et forme ainsi un hydrogel piégeant la phase solide de la suspension dans un réseau de chaîne polymérique.

Parmi les autres procédés de mise en forme possibles des matériaux composites chitosane/CaP, la coprécipitation est la méthode de choix étant donné que les deux composés précipitent à pH basique. Dans leur étude Danilchenko *et al.* utilisent une solution contenant du chlorure de calcium, du dihydrogénophosphate de sodium, du chitosane et de l'acide acétique. En augmentant le pH avec de la soude, ils obtiennent après lyophilisation une matrice poreuse [130]. Le matériau développé possède de très bonnes propriétés biologiques et notamment une résorbabilité quasi complète en 24 jours *in vivo*, le matériau de synthèse étant remplacé par de l'os nouvellement formé. La co-précipitation permet également d'obtenir des matériaux pulvérulents comme Li *et al.* l'ont démontré [131]. Dans leur étude, c'est une solution acide de chitosane, d'acide acétique et d'acide phosphorique qui est versée goutte à goutte dans une solution d'hydroxyde de calcium à 4 % d'éthanol, pour laquelle la concentration est ajustée pour obtenir des rapports chitosane/apatite variables. Des particules composites se forment alors, elles sont rincées à l'eau distillée et sont séchées pour former des poudres avec une distribution de tailles, une composition et une répartition de la phase minérale dans la matrice organique homogène.

I.4.2 Etude des interactions organique/inorganique

Nous avons mentionné précédemment dans ce texte que les fonctions réactives du chitosane sont les groupements alcool, amide et amine formant des liaisons hydrogène, covalentes ou ioniques. Sur cette base, Xianmiao *et al.* [128] proposent une possible interaction entre l'amine du glucosamine du chitosane et les groupements hydroxyles de l'hydroxyapatite. Ils constatent en effet un déplacement des bandes des groupements polaires du chitosane et une disparition de la bande des OH de l'apatite. A ces arguments vient s'ajouter une diminution de la cristallinité du chitosane en présence des nano particules d'apatite ce qui permet aux auteurs de supposer une interaction de type liaison hydrogène entre les deux phases. Fang *et al.* [132] proposent, quant à eux, une possible liaison de coordination entre le calcium et la fonction amide du chitosane en se basant sur un décalage observé sur le spectre infrarouge de la bande des amides II (C-N). Selon eux, l'amide formerait un complexe avec le calcium grâce à une stabilisation par des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau environnantes. Basargan *et al.*

[133] font la même hypothèse en observant également des décalages des modes de vibration des liaisons amide II et III du chitosane.

D'autres études évoquent une déstabilisation thermique du chitosane en présence de phosphates de calcium [134]. Dans leur étude Peña *et al.* forment des revêtements et des poudres composites par un traitement alcalin d'une suspension de brushite dans une solution de chitosane. La décomposition de la phase organique a lieu à plus basse température dans ce composite. Ils démontrent également un impact de la présence du chitosane sur la formation de la phase minérale. Celui-ci semble inhiber la formation de la phase β -TCP.

L'impact de la présence de chitosane sur la formation et la croissance de particules de phosphate de calcium a aussi été rapporté par Kumar *et al.* [135]. Leurs travaux portent sur l'étude d'un composite préparé à partir d'une solution de chaux à laquelle sont ajoutés de l'acide phosphorique et du chitosane. La suspension composite obtenue est bien plus stable que la suspension minérale simple (le temps de sédimentation s'accroît de quelques minutes à plusieurs semaines). Cette stabilisation est attribuée à une interaction entre la phase minérale et la phase organique. Cette interaction se traduit par une modification de la croissance des particules de phosphate de calcium. En présence du chitosane, la croissance suivant l'axe c de la maille hexagonale de l'apatite est inhibée alors que celle suivant l'axe a est favorisée. Les auteurs évoquent la possibilité d'une phosphorylation du chitosane pendant les premiers instants de la formation de la phase minérale en s'appuyant sur les travaux de Wan *et al.* [136]. Cependant cette réaction paraît peu probable étant donné la différence de milieu réactionnel entre ces deux études. Les auteurs excluent la formation de complexes entre l'amine ou l'amide du chitosane et l'ion Ca^{2+} du fait du pH trop acide de leur mélange.

L'impact de la préparation d'une suspension d'hydroxyapatite dans un gel d'acétate de chitosane a été rapporté également par Wilson *et al.* [137]. Les gels d'acétate de chitosane ayant un pH de l'ordre de 4-5, ils engendrent une solubilisation partielle de la phase minérale qui a pour effet d'augmenter la surface spécifique de celle-ci apportant alors plus de points d'ancrage mécanique au chitosane. Les auteurs constatent également l'augmentation importante de la stabilité colloïdale de la suspension lorsqu'elle est préparée avec du chitosane. Ils associent cette stabilisation à une adsorption importante du polymère à la surface de la phase minérale.

I.5. Le procédé d'atomisation séchage

Le procédé d'atomisation séchage est un procédé de mise en forme de poudre amplement exploité dans le secteur industriel. Il est, par exemple, largement déployé dans les domaines agroalimentaire [138] et pharmaceutique [139]. Il présente l'avantage de pouvoir travailler avec des molécules thermosensibles et de donner *in fine* une poudre avec une répartition de taille contrôlée. C'est un procédé très polyvalent avec de nombreux paramètres d'entrée qui influent sur la taille, la morphologie ou l'aspect des particules produites.

Le principe repose sur la pulvérisation d'un liquide dans un courant d'air chaud. Au contact de l'air chaud, le solvant et les composés volatils des gouttelettes formées par la pulvérisation s'évaporent pour ne laisser qu'une particule « sèche » [140]. Le principe de cette technique est représenté sur la Figure 15. Cette technique est donc fréquemment utilisée pour sécher des suspensions et ainsi augmenter la taille des grains (agglomération). Elle permet également d'utiliser les gouttelettes formées comme des microréacteurs pour réaliser des réactions chimiques *in situ*.

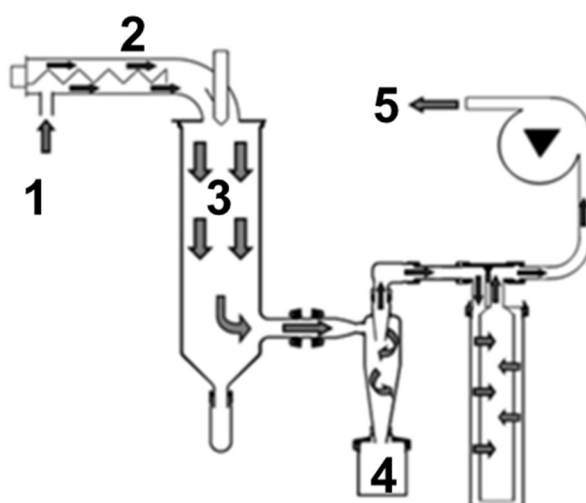


Figure 15 Fonctionnement schématique du procédé d'atomisation séchage. 1 : alimentation en liquide, 2 : chauffe du gaz porteur, 3 : pulvérisation et séchage des gouttes, 4 : récupération de la poudre et 5 : évacuation des composés volatils

La maîtrise des conditions opératoires telles que : la formulation du précurseur, la température d'entrée, le rapport flux d'air de cisaillement/débit liquide, la géométrie de la buse, le mode de séchage [141] etc. permet de contrôler la morphologie de la poudre finale comme représenté sur la Figure 16.

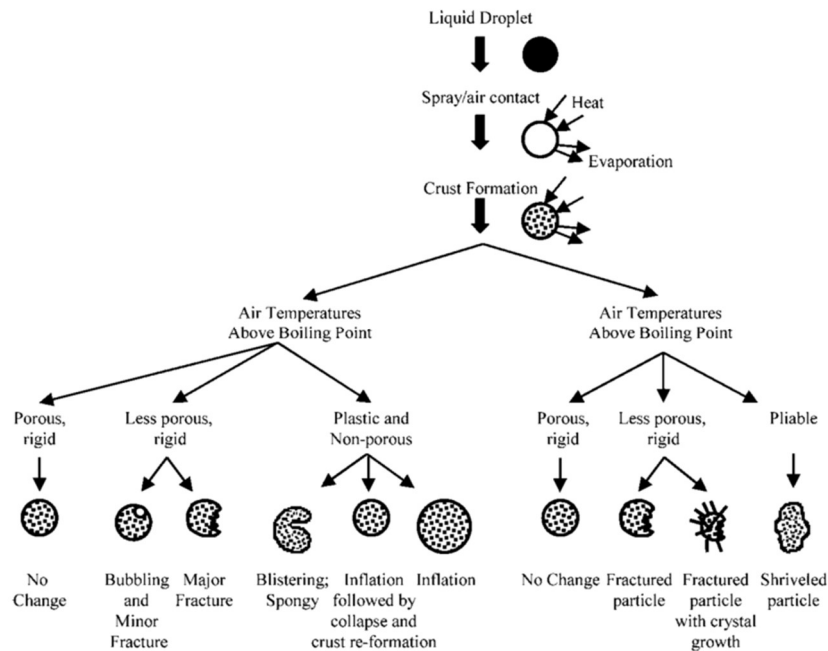


Figure 16 Représentations schématiques des différentes morphologies de particules pouvant être obtenues par atomisation séchage [141]

Le procédé d'atomisation séchage peut être utilisé comme procédé d'agglomération séchage pour obtenir des particules de tailles plus importantes. C'est par exemple dans cette optique que Wang *et al.* [142] l'utilisent. Dans leur étude, ils préparent une suspension d'hydroxyapatite qui est ensuite atomisée en faisant varier différents paramètres opératoires comme le débit d'air d'atomisation, la concentration en charge solide de la suspension ou encore le débit de liquide. Ainsi plus la concentration de la suspension augmente, plus la taille des particules est importante et plus leur surface spécifique décroît. Ces variations peuvent être expliquées par le fait que la taille des gouttes est principalement dépendante de la buse choisie ainsi que du rapport débit d'air/débit liquide à formulation équivalente [141]. L'influence de la formulation de la suspension sur la morphologie des particules a été démontrée par Sun *et al.* [143]. Dans leurs travaux, ils forment des sphères creuses microporeuses d'hydroxyapatite en utilisant dans la suspension un agent moussant gazeux : du bicarbonate d'ammonium. Celui-ci forme alors pendant l'atomisation des bulles de gaz au sein de la gouttelette. Ce gaz en s'échappant de la particule en formation draine la suspension vers l'extérieur formant ainsi la croûte.

Nous l'avons évoqué précédemment, l'atomisation séchage peut permettre de sécher des solutions de polymères comme le chitosane. Cervera *et al.* [144] évoquent par exemple que l'atomisation de chitosane mène à la formation de différents sels de chitosane en fonction de l'acide utilisé pour solubiliser ce polymère. Ils mentionnent aussi le fait que plus la température

d'entrée est élevée, plus la « sphéricité » des particules est importante. Ils signalent également le fait que ces sels de chitosane sont amorphes et que le caractère semi-cristallin du chitosane est perdu. Comme précédemment, les paramètres de l'atomisation ont un impact important sur la morphologie, la taille ... des particules. Ngan *et al.* [145] présentent, à ce sujet, une étude illustrant l'impact de différents paramètres comme la concentration en polymère, le diamètre de la buse, le poids moléculaire du chitosane sur les tailles des particules.

Plus récemment, l'utilisation de l'atomisation séchage a permis également de former des poudres composites à l'instar des travaux de Ruphuy *et al.* [146] ou Basargan *et al.* [133] en séchant une suspension d'apatite dispersée dans une solution de chitosane. Dans le premier exemple, la suspension est constituée de particules d'apatites nanométriques finement dispersées dans le chitosane avec un rapport massique inorganique/organique de 70/30 (pour être proche du rapport de l'os). Deux préparations sont réalisées à un pH de 5,5 et 7,0 respectivement. L'apatite utilisée provient d'une barbotine commerciale dans laquelle du KCl a été solubilisé. Ce composé est présent, dans les particules composites formées après atomisation, sous forme de cristaux (dont la taille dépend du pH de la suspension atomisée). Pour l'éliminer, les auteurs ont recours à un lavage. Après ce traitement, la dispersion des nano particules phosphocalciques dans la phase organique est alors visible en imagerie MEB. La qualité de cette dispersion semble dépendante du pH initial de la préparation. En effet pour le cas de la suspension préparée avec un pH de 5,5, les nano particules d'apatite semblent mieux réparties dans le polymère que dans le cas où le pH est de 7 où elles forment des agrégats. Les auteurs observent un décalage de la bande des amines protonées dans les spectres infrarouges des matériaux composites en comparaison avec celle du spectre de la phase organique seule et évoquent une possible interaction entre la phase organique et la phase minérale. Basargan *et al.*, quant à eux, préparent par coprécipitation une suspension de particules composite apatite/chitosane. Cette suspension est obtenue par l'ajout d'une solution de chitosane contenant de l'acide acétique à 2 % massique et de l'acide phosphorique à 0,12 M dans une solution de Ca(OH)_2 à 0,2 M. Le pH de la préparation est maintenu supérieur à 9 par ajout de soude. La suspension est laissée maturée 15 H puis après décantation, le surnageant est retiré et le volume restauré avec de l'eau distillée. La dispersion ainsi rincée est alors atomisée. Différentes formulations sont testées avec des rapports massiques apatite/chitosane de 1/1, 1/2, 1/3 et 1/4 et des températures d'entrée de 160 °C ou 120 °C. Il apparaît que la morphologie des microparticules est sensiblement la même pour les différents rapports testés. L'influence de la température se traduit par un plus haut degré de cristallinité et une surface spécifique plus faible pour le matériau préparé à 120 °C en comparaison avec celui préparé à 160 °C.

I.6. Pour aller plus loin

Ces deux stratégies de production du matériau composite ont comme point commun de générer la phase minérale avant le procédé de mise en forme par atomisation séchage ce qui limite les possibilités d'interaction entre les deux phases à celles établies dans la suspension. Or dès 1995, Luo *et al.* [147] proposent l'utilisation de l'atomisation séchage pour synthétiser *in situ* un précurseur apatitique. Dans leur étude, les auteurs utilisent le produit de l'atomisation pour former de l'hydroxyapatite par calcination sans caractériser ce précurseur. Ce dernier est obtenu en atomisant une solution de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en respectant le rapport molaire de 1,67 dans une solution à pH = 2, le nitrate d'ammonium résiduel étant éliminé pendant la calcination. Plus récemment, l'équipe de L.C Chow a démontré la possibilité d'élaborer des matériaux phosphocalciques amorphes par atomisation séchage de différentes solutions. Dans une première étude [148], les auteurs solubilisent de l'hydroxyapatite (HA) soit dans une solution d'acide acétique à 17,5 mmol/L, soit dans une solution d'acide carbonique à 266 mmol/L. Après atomisation, la poudre obtenue apparaît comme étant amorphe en DRX. Cependant les auteurs évoquent le fait qu'en TEM haute résolution ils retrouvent des profils cristallins avec des tailles de cristaux de 5 à 10 nm. Les grilles de TEM étant préparées en dispersant la poudre atomisée dans de l'éthanol (95 % volumique), les auteurs énoncent la possibilité que cette préparation engendre la modification de la phase amorphe vers une phase plus cristallisée comme cela a été évoqué plusieurs fois dans ce chapitre. Par la suite, les paramètres d'atomisation comme les conditions opératoires ou la formulation ont été modifiés pour étudier l'impact sur le matériau obtenu. Une formulation constituée de monétite et de carbonate de calcium dissous dans une solution d'acide acétique a ainsi également été testée [149]. La poudre obtenue présente en DRX le halo caractéristique des matériaux amorphes. La morphologie des particules reste identique à celle observée en TEM dans leur étude précédente à savoir sphérique avec une taille caractéristique de l'ordre de 100 nm. Dans une autre étude, L.C Chow et ses collaborateurs [150] utilisent comme formulation de départ deux solutions diluées d'hydroxyde de calcium (4 mmol/L) et d'acide phosphorique (correspondant aux rapports Ca/P de 1, 1,3, 1,5 et 1,67). La buse choisie dans cette étude est une buse trifluide à mélange externe pour éviter le contact entre les solutions et la formation de précipités éventuels avant l'atomisation. La poudre qui résulte de cette préparation est une poudre ACP pour les rapports 1,33 à 1,67 (et présence de phase brushitique en DRX pour le rapport 1,33) et un mélange brushite mal cristallisée et monétite pour le rapport 1. Dans cette étude, les auteurs énoncent la possibilité que les particules nanométriques formées soient constituées d'agrégats de clusters créés pendant le séchage de la gouttelette.

Ces agrégats peuvent être comparés à ceux décrits dans les travaux de Brecevic *et al.* [90]. Les phénomènes qu'ils ont observés dans des volumes importants semblent pouvoir être transposables dans la gouttelette formée pendant l'atomisation séchage qui apparaît alors comme un microréacteur pour la synthèse. Rappelons que dans l'étude de Brecevic *et al.*, les auteurs utilisent la présence de gélatine pour isoler les clusters d'ACPs et inhiber leur agrégation et la formation de chapelets issus de cette agrégation. Les auteurs obtiennent ainsi un matériau composite présentant une très bonne dispersion de la phase minérale dans la phase organique.

Nous avons énoncé précédemment que la préparation de poudre de chitosane par atomisation séchage est issue de la pulvérisation d'une solution de ce polymère. En extrapolant les résultats de L.C.Chow et de Brecevic *et al.*, nous envisageons de pouvoir, en une étape, former une poudre composite CTS/ACP par l'atomisation d'une solution contenant des précurseurs phosphocalciques et du chitosane solubilisé. Nous avons choisi les sels de calcium et de phosphate de façon à minimiser l'impact des produits secondaires de réactions et avons cherché à impliquer ces derniers dans une seconde réaction qui est la solubilisation du polymère. Les sels choisis sont donc l'acétate de calcium et l'acide phosphorique dans le but de former un phosphate de calcium amorphe et de l'acide acétique qui peut être utilisé pour solubiliser le chitosane.

Liste des figures

Figure 1 Organisation hiérarchique proposée par Weiner et Wagner[10].	5
Figure 2 Schéma représentatif de la minéralisation du collagène extrait des travaux de Landis et al. [23]. Les cylindres représentent les tropocollagènes alors que la phase minérale est représentée par les plaques noires de formes irrégulières. Les auteurs démontrent par imagerie TEM puis reconstruction 3D par tomographie que la minéralisation du collagène a lieu dans un premier temps dans les espaces entre les triples hélices puis que celle-ci se poursuit pour donner des minéraux sous forme de plaquettes.	7
Figure 3 Frise représentant les orthophosphates de calcium. De gauche à droite, nous retrouvons les phosphates monocalciques (MCP) de formule générale $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, les phosphates dicalciques (DCP) de formule générale $\text{CaHPO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, les phosphates de calcium octocalciques (OCP) de formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, les phosphates tricalciques (TCP) de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, les hydroxyapatites phosphocalciques (HAp) de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et enfin les phosphates tétracalciques (TTCP) de formule $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$.	8
Figure 4 Isothermes de solubilité des différentes phases phosphocalciques dans le système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ à 37 °C calculées avec le programme RAMESSES extrait de la référence [31].	9
Figure 5 Projection sur le plan (001) de la maille de l'hydroxyapatite. Image extraite de la référence [55].	12
Figure 6 Spectres infrarouges centrés sur le domaine de vibration $\nu_3 \text{CO}_3$. Les différents spectres représentent des concentrations en carbonate variables (1 : 1,3 %, 2 : 2,8 %, 3 : 3,5 % et 4 : 10 %). Ces spectres sont issus de la référence [68].	14
Figure 7 Représentation schématique du modèle de la couche hydratée des apatites nanométriques mal cristallisées [74].	15
Figure 8 Images en microscopie électronique à transmission de la synthèse d'apatites nanométrique (A) et du composite nanotube de carbone/apatite nano (B) repris des travaux de Ustundag et al. [79].	16
Figure 9 Représentation schématique de la formation des particules de phosphate de calcium amorphe (inspiré de la référence [90]).	18
Figure 10 Image TEM de particules amorphes synthétisées avec du CaCl_2 et K_2HPO_4 dans un mélange eutectique chlorure de choline [84].	20
Figure 11 Représentation des motifs constituant le chitosane. DA représente le degré d'acétylation. A gauche le motif N-acetyl-glucosamine et à droite, le glucosamine.	21
Figure 12 Schéma de réticulation ionique proposé par Fwu-Long et al. [121]	23
Figure 13 Arrangements des CTSs a) « tendon » et b) « recuit » projetés suivant l'axe a (haut) et l'axe c (bas). Repris et adapté de [123,124]	24
Figure 14 Motif de diffraction d'un sel d'acétate de chitosane préparé à 110 °C [126].	25

Figure 15 Fonctionnement schématique du procédé d'atomisation séchage. 1 : alimentation en liquide, 2 : chauffe du gaz porteur, 3 : pulvérisation et séchage des gouttes, 4 : récupération de la poudre et 5 : évacuation des composés volatils..... 28

Figure 16 Représentations schématiques des différentes morphologies de particules pouvant être obtenues par atomisation séchage [141]..... 29

Tableau 1 Variations du rapport molaire Ca/P et de la quantité d'acide phosphorique (PA) pour une concentration en acétate de calcium constante égale à 5 g/L..... 37

Tableau 2 Variation du rapport organique/inorganique (CTS/ACP) en fonction de la quantité de chitosane (CTS) solubilisé où « ACP » définit les phosphates de calcium obtenus avec les formulations décrites dans le Tableau 1..... 38

Tableau 3 Attribution des bandes du spectre infrarouge de l'acétate de calcium..... 65

Tableau 4 Tableau récapitulatif des données de correspondances entre le modèle de Beaucage et les différentes courbes..... 85

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

II.1. Matériels	36
II.2. Méthodes	36
II.2.2 Préparation des phases solides	36
II.2.3 Atomisation	37
II.2.4 Formulations	37
II.2.5 Évolution des poudres en milieu aqueux	38
II.2.6 Spectroscopies vibrationnelles.....	38
II.2.7 Analyses X.....	40
II.2.8 Microscopies électroniques	46
II.2.9 Granulométrie	46
II.2.10 Analyse thermogravimétrique/thermique différentielle - ATG/ATD	47
II.2.11 Chromatographie d'exclusion stérique - SEC	48
II.2.12 Evaporation laser assistée par matrice - MAPLE.....	48
II.2.13 Etudes biologiques	49
II.2.14 AFM	50
II.2.15 Impression 3D.....	50
Liste des figures.....	51

II.1. Matériels

L'acide phosphorique (PA-85%), l'acide acétique (glacial), l'acétate de calcium monohydrate (CA) et le chitosane (CTS bas poids moléculaire 50- 190 kDa) ont été approvisionnés auprès de l'entreprise Sigma Aldrich. La poudre d'hydroxyapatite stœchiométrique commerciale a été fournie par la société Teknimed.

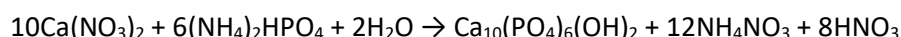
II.2. Méthodes

II.2.2 Préparation des phases solides

II.2.2.2 Synthèse de l'apatite biomimétique

La synthèse de l'apatite biomimétique a été réalisée selon le protocole établi au laboratoire et décrit par N. Vandecandelaere *et al.* [65]. Deux solutions aqueuses de précurseurs ont été préparées ; l'une de 750 mL de nitrate de calcium tétra hydraté ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) à une concentration de 0,3 M et l'autre de 1500 mL d'hydrogénophosphate de di-ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) à une concentration de 0,6 M respectivement notées solutions A et B.

La solution A est versée rapidement dans la solution B sous une agitation magnétique vigoureuse. Une fois l'ajout réalisé, l'agitation est laissée pendant 5 min puis la préparation est laissée au repos pendant 24 H. La suspension a ensuite été séparée en quatre parties égales. Chaque partie est rincée par filtration sur Büchner avec 1 L d'eau déminéralisée afin d'éliminer les produits secondaires de la réaction ainsi que les sels n'ayant pas réagi.



Une partie de la poudre obtenue a été séchée au lyophilisateur, une autre par atomisation séchage et une dernière a été utilisée pour l'étude cinétique de la distribution de tailles de grains en solution acide.

II.2.2.3 Broyage de l'hydroxyapatite commerciale

La poudre d'hydroxyapatite commerciale a été broyée en utilisant un broyeur à boulets dans lequel 86 boulets de 19 millimètres de diamètre en céramique sont placés dans un bol de 1 L. 50 g de poudre d'hydroxyapatite ont ensuite été ajoutés sans solvant ou autres réactifs. Le broyeur est mis en rotation à 100 rpm pendant 2 à 3 heures.

II.2.3 Atomisation

Les différentes atomisations effectuées au cours de ce travail de thèse ont été réalisées avec un Mini spray dryer B 290 de la marque BÜCHI (Suisse) fonctionnant en co-courant avec une buse double fluide à mélange externe de diamètre de 1,5 mm, une température d'entrée de 160 °C, une aspiration à 90 %, un débit liquide de 0,3 L.h⁻¹ (pompe péristaltique) et un débit d'air de cisaillement de 414 L.h⁻¹. La température de sortie avec ces paramètres d'atomisation est d'environ 45 °C ± 10 °C.

Avant toute atomisation 200 mL d'eau déionisée sont introduits dans l'appareil afin de stabiliser le système (températures d'entrée, de sortie et parois en verre de l'atomiseur).

II.2.4 Formulations

II.2.4.2 Suspensions

Les suspensions atomisées sont préparées en dispersant 3 g de poudre dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1 % volumique sous agitation magnétique vigoureuse. Après 15 min d'agitation, la suspension est alors atomisée en maintenant l'agitation pour éviter toute sédimentation.

Dans le cas des suspensions composites, 1,61 g de chitosane sont d'abord dissous dans la solution acide. La phase solide est ensuite ajoutée et les temps d'agitation restent inchangés. Le rapport massique organique/inorganique est alors proche de celui retrouvé naturellement dans l'os à savoir 35/65 [1].

II.2.4.3 Solutions

Les solutions de précurseurs de phosphate de calcium sont préparées en solubilisant dans un premier temps l'acétate de calcium dans 1 litre d'eau déionisée. L'acide phosphorique est ensuite ajouté goutte à goutte sous agitation pour éviter la sursaturation locale des espèces et la précipitation de composés. Cette solution est ensuite atomisée en gardant l'agitation magnétique vigoureuse. Les différentes formulations testées dans ce travail de thèse sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 Variations du rapport molaire Ca/P et de la quantité d'acide phosphorique (PA) pour une concentration en acétate de calcium constante égale à 5 g/L

Ca/P	1,3	1,5	1,67	2
PA (mL)	1,53	1,33	1,19	0,99

Les solutions composites sont préparées en solubilisant le chitosane dans 330 mL d'une solution d'acide acétique à 1 % volumique dans une fiole jaugée de 1 L. Une fois le chitosane solubilisé, le volume est ajusté à 1 L avec de l'eau déionisée et l'acétate de calcium est ajouté et dissout. Enfin l'acide phosphorique est versé de la même manière que précédemment. Les formulations testées sont décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2 Variation du rapport organique/inorganique (CTS/ACP) en fonction de la quantité de chitosane (CTS) solubilisé où « ACP » définit les phosphates de calcium obtenus avec les formulations décrites dans le Tableau 1

CTS/ACP	70/30	35/65	30/70	25/75	23/77
CTS (g)	8,05	1,61	0,805	0,5	0,161

II.2.5 Évolution des poudres en milieu aqueux

L'évolution des poudres d'ACPs en milieux aqueux a été testée en dispersant 1 g de poudre dans 50 mL d'eau déionisée. Les échantillons sont ensuite trempés dans l'azote liquide puis lyophilisé. La concentration de la suspension est choisie pour être proche de la concentration utilisée par S. Kim *et al.* [16] dans leur étude sur la formation de nanocristaux d'apatite à partir d'ACP en milieux aqueux. Contrairement à eux, nous n'avons pas cherché à contrôler le pH de la suspension.

L'évolution de la poudre composite CTS/ACP avec le rapport organique/inorganique de 35/65, a été faite en dispersant 2 g de composite dans 66 mL d'eau déionisée. Le prélèvement est effectué de façon similaire à la mesure précédente.

II.2.6 Spectroscopies vibrationnelles

II.2.6.2 Spectrométrie infrarouge

Les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) ont été réalisés grâce à un appareil Nicolet 5700 Thermo en transmission avec des pastilles de KBr. Environ 1 mg de poudre est mélangé avec 300 mg de KBr puis placé dans un moule sous 8 T de pression pendant 30 secondes. Le spectre est alors enregistré entre 400 et 4000 cm^{-1} avec une résolution de 2 cm^{-1} sur 64 accumulations en soustrayant le fond instrumental. Les spectres où le chitosane intervient ont été normalisés en utilisant le pic des liaisons COC à 1072 cm^{-1} . Les spectres issus des solutions de précurseurs sont normalisés en utilisant la bande des ions phosphates à 1078 cm^{-1} , ceux concernant l'apatite en utilisant la bande à 1048 cm^{-1} et enfin ceux concernant

l'acétate de calcium avec la vibration COO à 1540 cm^{-1} . Aucune correction de ligne de base n'a été faite sur les spectres infrarouges.

II.2.6.3 Spectrométrie Raman

Les analyses par spectroscopie Raman sont présentées sur la fenêtre $[910-990\text{ cm}^{-1}]$. Les spectres ont été obtenus avec un laser rouge (633 nm), un réseau de 1800 traits, un grandissement optique de 100, une ouverture à 100 % et sur deux accumulations d'une minute chacune. L'appareil utilisé pour ces mesures est un microscope confocal Raman Labram HR 800 Yvon Jobin (HORIBA YVON JOBIN).

Les spectres relatifs aux phosphates de calcium amorphes ont été normalisés en utilisant le maximum d'intensité dans cette fenêtre pour chaque spectre.

II.2.6.4 Spectrométrie RMN

II.2.6.4.1 Etat de l'art

II.2.6.4.1.1 Chitosane

Le spectre RMN du carbone du chitosane présente principalement sept pics à 173, 105, 82, 75, 60, 57 et 23 ppm respectivement associés au carbone fonctionnel de l'amide, au carbone 1, 4, 3 et 5, 6, 2 du sucre et au méthyle de l'amide [144,151–153]. Le degré d'acétylation (DA) est calculé en faisant le rapport entre l'intensité du pic du carbone du méthyle sur la moyenne des intensités des carbones du sucre (2).

$$DA = \frac{I_{CH_3}}{(I_{C1} + I_{C2} + I_{C3} + I_{C4} + I_{C5} + I_{C6})/6} \quad (2)$$

II.2.6.4.1.2 Phosphate de calcium

Dans le cas de l'analyse des phosphates de calcium amorphes, l'exploitation des données des spectres RMN est rendue difficile du fait du manque d'organisation de cette phase. Le spectre présente en effet des bandes larges et notamment une centrée vers 3 ppm associée à l'acide phosphorique et justifiant d'un unique site phosphorique proche de celui de l'apatite (2,7 ppm) dans le cluster de Posner [154]. En couplant la RMN du phosphore et du proton, Jaeger *et al.* [70] décomposent cette bande large en deux composantes : une contribution de HPO_4^{2-} et une de PO_4^{3-} . Leur étude tend à démontrer que le pourcentage d'hydrogénophosphate est de l'ordre de 18 % et que les ions phosphates ont un environnement très hydraté.

II.2.6.4.2 Protocoles expérimentaux.

La spectrométrie RMN a été effectuée en collaboration avec Yannick Coppel (LCC, Toulouse). Les spectres RMN MAS ^1H , ^{13}C et ^{31}P ont été enregistrés avec un spectromètre BRUKER Avance III 400 (9,4 T). Les références des déplacements chimiques sont le tétraméthylsilane (TMS) pour les noyaux ^1H et ^{13}C et une solution de 85 % H_3PO_4 pour les noyaux ^{31}P (références externes). Les échantillons ont été placés dans des rotors en zircone de 4 ou de 2,5 mm. La vitesse de rotation autour de l'angle magique (MAS) a été réglée entre 10 kHz et 24 kHz suivant les cas. Certaines expériences ^{31}P ont été acquises en rotor 2,5 mm sans MAS (phase statique). Les expériences ont été effectuées à la température ambiante de 21 °C.

Les spectres ^1H et ^{31}P MAS ont été enregistrés par polarisation directe avec un délai de recyclage de 5 s et 200 s, respectivement et de 240 s pour les ^{31}P en phase statique. La durée des impulsions RF d'excitation a été réglée pour correspondre à des rotations de l'aimantation de 30 °. Les spectres ^{13}C et ^{31}P obtenus par polarisation croisée (CP) avec le ^1H ont été enregistrés avec un temps de recyclage de 1,5 s et un temps de contact de 2 ms et 1 ms, respectivement. Pour le ^{31}P en phase statique, 3 temps de contacts à 0,05, 0,1 et 2 ms ont été utilisés. Les expériences ^1H éditées ^{31}P (nommées *aller retour* ou FBCPMAS par la suite) ont été réalisées à partir d'une expérience CP pour transférer l'aimantation du ^1H au ^{31}P avec un temps de contact de 1 ms suivi d'un deuxième module CP pour retransférer l'aimantation du ^{31}P au ^1H avec un temps de contact de 0,05 ou 1 ms.

Les expériences ^{13}C et ^{31}P ont été réalisées avec découplage du ^1H pendant l'acquisition (séquence spinal64).

II.2.7 Analyses X

II.2.7.2DRX

L'analyse DRX a été effectuée sur un diffractomètre INEL Equinox 1000 en utilisant une anticathode au cobalt ($K_\alpha = 1,788970 \text{ \AA}$) sous 30 mA et 30 kV. Les spectres ont été accumulés sur une gamme d'angles allant de 0 à 117 ° pendant 1 h mais seule la fenêtre entre 10 et 60 °2 θ est présentée. La Figure 17 présente les motifs de diffraction caractéristiques des phosphates de calcium classiquement rencontrés dans la littérature.

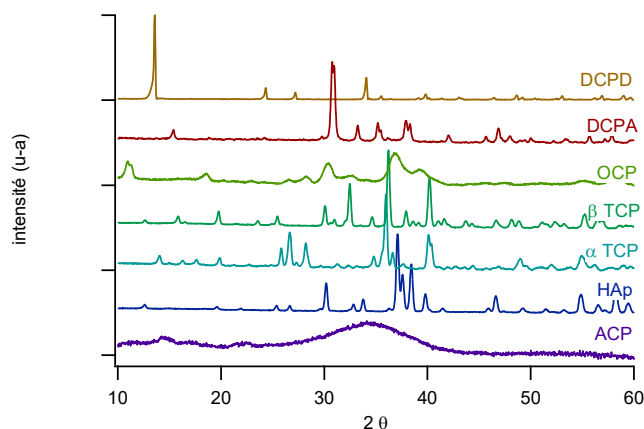


Figure 17 Motifs caractéristiques de diffraction des phosphates dicalcique dihydraté (DCPD) et anhydre (DCPA), du phosphate octocalcique (OCP), des phosphates tricalciques (TCP) α et β , de l'hydroxyapatite (HAp) bien cristallisée et du phosphate de calcium amorphe (ACP) présentés sur la fenêtre de diffraction [10-60 ° 2 θ]

II.2.7.3 SAXS

II.2.7.3.3 *Etat de l'art*

L'analyse SAXS (pour Small Angle X-ray Scattering) est basée sur la diffusion d'un faisceau de photons X à travers un échantillon. L'intensité de diffusion $I(q)$ est collectée en fonction du vecteur de diffusion (q) et apporte des informations sur les tailles caractéristiques des objets présents dans le matériau étudié. La courbe de $I(q)$ permet d'extraire des informations sur la morphologie des particules et leur interface avec le milieu, le facteur de forme ($P(q)$) ainsi que le facteur de structure $S(q)$ du matériau observé. L'intensité observée est proportionnelle au produit de $P(q) \cdot S(q)$. Le motif d'une dispersion parfaite, pour laquelle aucune particule n'interagit avec sa voisine et où le contraste électronique entre la phase dispersée et la phase dispersante est important, est présenté sur la courbe rouge de la Figure 18. Lorsque les particules s'agglomèrent les unes aux autres, le facteur de structure est modifié et il en résulte une variation de la courbe $I(q)$ (courbe noire Figure 18).

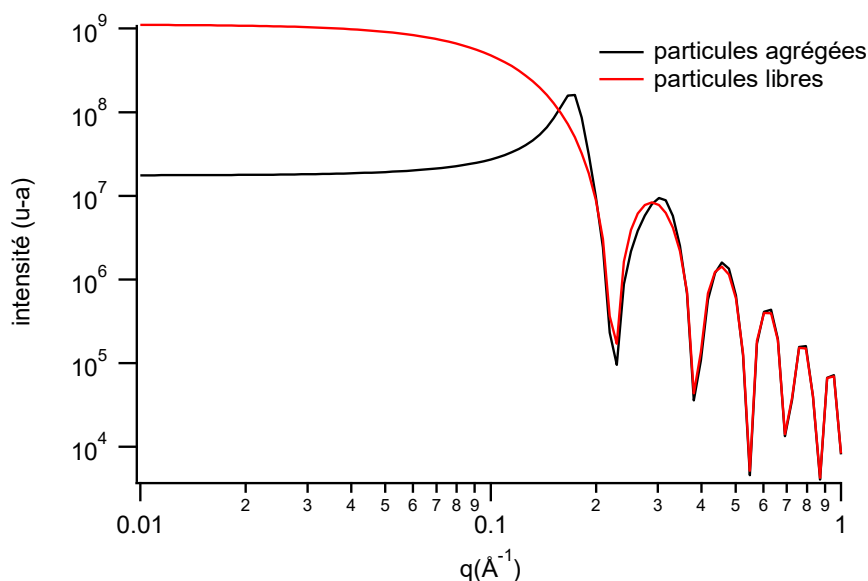


Figure 18 Représentations théoriques de particules sphériques de 2 nm de rayon agrégées ou libres

II.2.7.3.3.1 Appliqués à l'os

La forme et la taille des cristaux présents naturellement dans l'os ont été étudiées par SAXS. Wachtel *et al.* [155] ou Fratzl *et al.* [156] ont par exemple démontré que les cristaux présents dans l'os (tibias de rat typiquement) qui ont une forme de plaquette fournissent des courbes avec une pente typique en q^{-2} pour les basses valeurs de vecteur de diffusion et en q^{-4} pour les valeurs plus élevées traduisant une interface franche entre la phase minérale et la phase organique (surface « lisse » des paquettes). Selon les auteurs, l'épaisseur des plaquettes varie entre 1,8 et 3 nm.

Les travaux plus récents de Mahamid *et al.* [18] sur la mise en évidence de phosphates de calcium amorphes dans la formation d'os chez le poisson-zèbre ont montré *in vivo* la présence de plusieurs structures. Les résultats obtenus permettent de déduire que l'apatite présente une structure de plaquette avec une épaisseur de 2,2-2,5 nm. De plus, une structure sphérique de 6 nm de rayon a été mise en évidence et attribuée à une phase amorphe. Cette structure a été déduite de l'apparition d'un motif oscillant de la diffusion sur le profil SAXS caractéristique de la diffusion d'une phase sphérique présentant une distribution de tailles de grains monomodale avec un indice de polydispersité faible.

II.2.7.3.3.2 Modèle de Beaucage et traitement mathématique

Le modèle de Beaucage définit des structures qui sont elles-mêmes constituées de sous structures. Imaginons par exemple des billes (toutes de même taille) ; celles-ci représentent la

sous-structure la plus petite (notée R_s). Si, ensuite, ces billes sont disposées dans un sac rigide, ce dernier représente alors une seconde structure. Cette deuxième structure peut être associée au rayon de giration d'un agglomérat de billes (noté R_g). Ces sacs de billes peuvent ensuite être mis dans des sacs plus grands *et cetera*. Le modèle de Beaucage permet de remonter à la taille des billes initiales ainsi qu'à la taille des sacs de billes dans la limite de détection de la technique. Mais ce modèle permet également de recueillir des informations complémentaires caractéristiques de l'interface entre le milieu extérieur et la structure. Ainsi, l'interface entre la bille et le milieu extérieur est franche (surface lisse) alors que l'interface entre le sac de billes et le milieu extérieur a une interface moins franche (surface rugueuse). Ces différentes interfaces se traduisent par des pentes de valeurs différentes sur la représentation de l'intensité de diffusion. Pour des interfaces franches, la pente est en q^{-4} (sur un graphique en log/log) et correspond à la limite de Porod [157]. Moins les interfaces sont franches plus l'exposant de q est petit et donc plus la pente est faible.

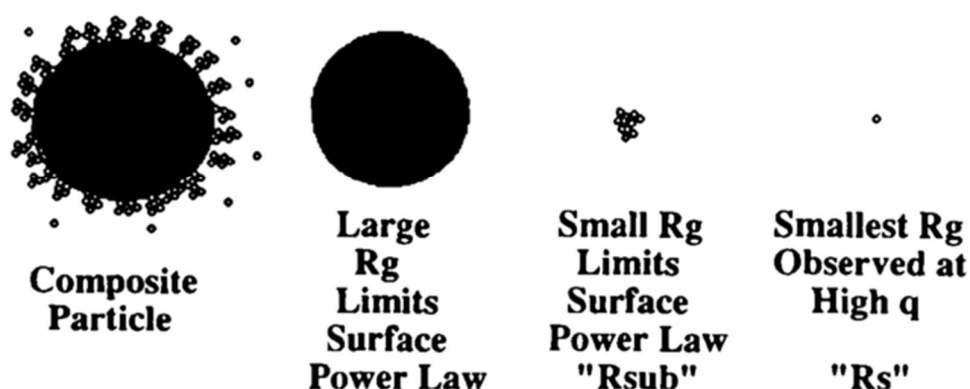


Figure 19 Représentation schématique du modèle de Beaucage où deux sous structures sont observées [158].

Pour faire correspondre la courbe expérimentale à la courbe théorique, il faut alors vérifier l'équation (3). Le premier terme de cette équation décrit les structures de grandes tailles avec un rayon de giration R_g , le second décrit le régime fractal qui lie les deux structures (avec R_{sub} qui permet de définir la « portée » d'influence de R_s sur le vecteur de diffusion et p qui correspond à la loi puissance de la structure R_g). Enfin le troisième terme décrit les sous-structures avec un rayon de giration R_s alors que le dernier définit leur facteur de structure [157,158].

$$I_{Beaucage}(q) \approx G e^{\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right)} + B e^{\left(-\frac{q^2 R_{sub}^2}{3}\right)} \left(\frac{\left[\operatorname{erf} \left(\frac{q k R_g}{\sqrt{6}} \right) \right]^3}{Q} \right)^p + G_s e^{\left(-\frac{q^2 R_s^2}{3}\right)} + B_s \left(\frac{\left[\operatorname{erf} \left(\frac{q k_s R_s}{\sqrt{6}} \right) \right]^3}{Q} \right)^{p_s} \quad (3)$$

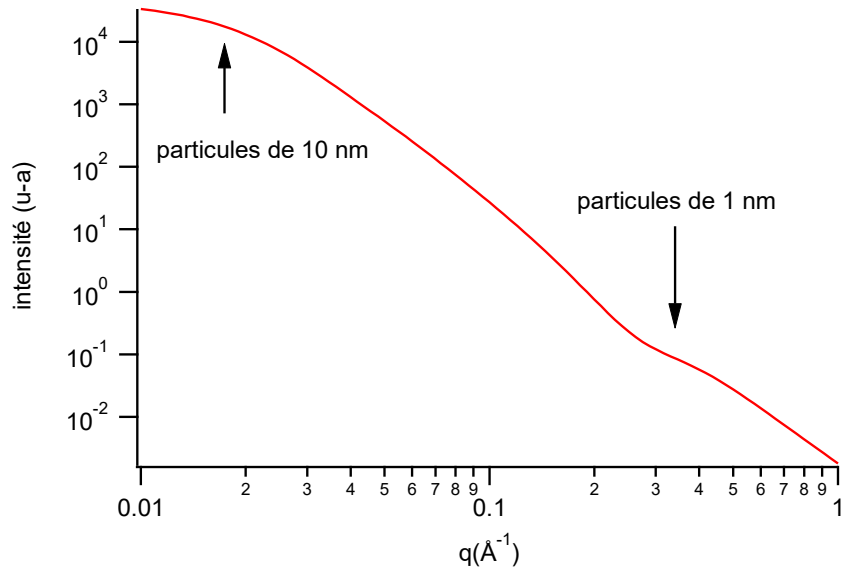


Figure 20 Représentation de la variation d'intensité de diffusion pour un modèle de Beaucage avec $R_g = 10 \text{ nm}$ et $R_s = 1 \text{ nm} = R_{sub}$ et des pentes en q^{-4}

A ce traitement mathématique, nous avons appliqué un facteur de structure « Hard sphere ». Le modèle de Beaucage est alors multiplié par la formule (4) où f_p représente la fraction volumique de la sphère de rayon R_{HS} et où G est une fonction sinusoïdale décroissante en $\frac{1}{R_{HS}q}$.

$$S_{HS}(q, R_{HS}, f_p) = \frac{1}{1 + 24 f_p \frac{G(f_p, R_{HS}q)}{R_{HS}q}} \quad (4)$$

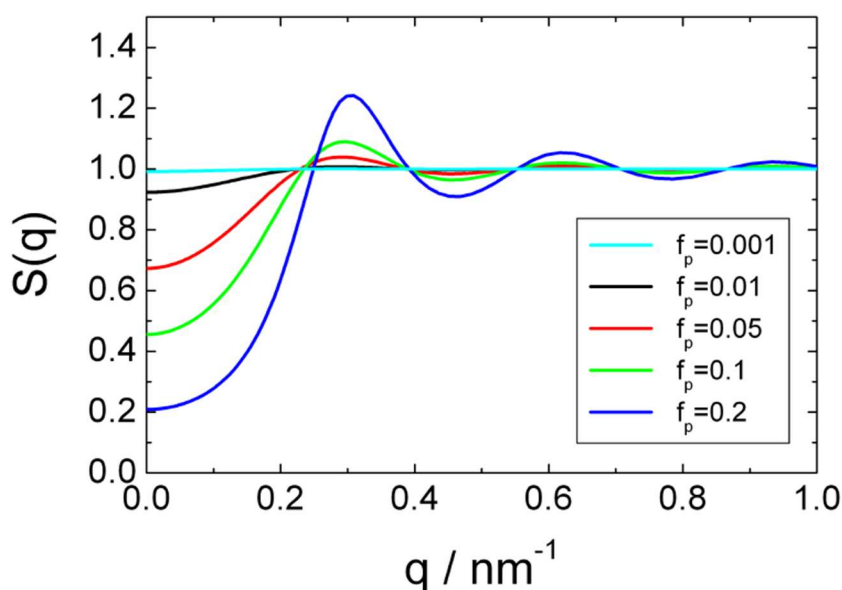


Figure 21 Facteur de structure $S(q)$ pour une sphère de rayon 10 nm et pour différentes fractions volumiques f_p

II.2.7.3.4 Protocole expérimental

Un banc de diffusion de rayonnement X aux petits angles XEUSS 2.0 disposant d'une source au cuivre a été utilisé pour les mesures SAXS. Ce travail a été conduit en collaboration avec Pierre ROBLIN (laboratoire LGC, Toulouse) via la plateforme FERMAT. Deux distances du détecteur (DECTRIS, PILATUS 1 M) à 2500 mm et 330 mm ont été utilisées pour couvrir les fenêtres de vecteurs de diffusion respectives de $[1.4 \text{ \AA}^{-1} - 0.027 \text{ \AA}^{-1}]$ et $[0.221 \text{ \AA}^{-1} - 0.0042 \text{ \AA}^{-1}]$. Les deux courbes ainsi obtenues ont été rassemblées en utilisant le point à $0,1 \text{ \AA}^{-1}$ comme point de jonction. Les motifs de diffraction ont été obtenus après 300 s d'accumulation. Les courbes d'intensité du vecteur de diffusion en fonction du vecteur de diffusion sont obtenues par intégration radiale du motif de diffusion.

Les analyses SAXS sont effectuées en plaçant la poudre sèche entre deux feuilles de kapton®. Une mesure à blanc (avec les deux feuilles de kapton® uniquement) est réalisée pour chaque analyse et soustraite au signal par la suite.

II.2.7.4 WAXS

Les mesures WAXS (Wide Angle X-ray Scattering) ont été réalisées sur une machine prototype de laboratoire dédiée à l'étude des matériaux amorphes et nanocristallins avec la collaboration de Pierre LECANTE (CEMES, Toulouse). La source de photon X est une anticathode en molybdène utilisée à 50 kV et 20 mA. Les signaux PDF (pour Pair Distribution Function ou RDF pour Radial Distribution Function) sont obtenus par la transformée de Fourier de Zernike et Prins [159] de

l'intensité réduite après normalisation du signal de diffraction. Ces signaux donnent des informations à une échelle atomique. La transformée de Fourier du signal de diffusion permet en effet de passer de l'espace réciproque à l'espace réel indiquant, entre autre, des distances récurrentes entre deux atomes et permettant de définir l'aspect cristallin d'un matériau et la distance de cohérence de ce dernier.

II.2.8 Microscopies électroniques

II.2.8.2 Microscopie électronique à balayage- MEB

Les images MEB sont obtenues grâce à un microscope LEO 435 VP avec une distance de travail de 10 mm et une tension d'accélération de 10 kV. Les matériaux sont préalablement positionnés sur un scotch carbone puis métallisés dans un plasma d'argent pendant 3 min en utilisant un Scancoat 6 Sputter Coater. Les images sont obtenues par accumulation de 5 scans à des grossissements variables. Un détecteur d'électrons secondaires (capteur latéral) et un détecteur d'électrons rétrodiffusés (capteur concentrique au faisceau d'électrons) sont utilisés pour respectivement étudier la morphologie et la répartition des phases des matériaux.

II.2.8.3 Microscopie électronique en transmission-TEM

Les échantillons ont été déposés dans des eppendorfs de 0,5 mL puis mélangés avec de la résine époxy. Ils sont ensuite centrifugés à 7 000 rpm pendant 5 minutes puis mis à polymériser à 60 °C pendant 48h. Des coupes ultrafines de 80 nm ont été réalisées à l'aide d'un cryotrim 45° (Diatome) puis déposées sur des grilles en cuivre de 200 mesh recouvertes d'un film carbone (formvar). Les échantillons ont été observés avec un MET (Jeol JEM-1400, JEOL Inc) à 80 kV. Les photos ont été prises avec une caméra numérique (Gatan Orius, Gatan Inc, Pleasanton, CA, USA). Ces observations ont été réalisées avec l'aide de Stéphanie Balor et Vanessa Soldan (METI, Toulouse).

II.2.9 Granulométrie

La distribution de tailles des particules a été étudiée en utilisant un Mastersizer 3000 (Malvern) avec deux modules différents en fonction de l'observation voulue. Il est à noter que l'acquisition de cette mesure a été faite en volume ce qui renforce artificiellement la contribution des particules les plus grosses.

II.2.9.2 Voie sèche

L'analyse par voie sèche a été réalisée en utilisant un module Aero S fonctionnant avec une pression de cisaillement de 3 bars afin de désagréger les particules micrométriques entre elles.

La mesure est effectuée pour 10 % d'obturation du laser pendant 10 secondes et répétée trois fois.

II.2.9.3 Voie humide

L'analyse de la variation de tailles des particules d'ACP en voie humide est faite via le module Hydro SM. Dans ce module 100 ml d'eau déionisée sont placés sous une agitation à 1500 rpm et 2 g de poudre y sont ajoutés. La mesure est faite pour 40 % d'obturation du laser pendant 10 secondes toutes les 30 secondes.

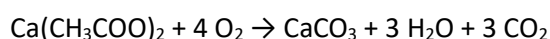
L'évolution des particules d'hydroxyapatite dans la solution acide a été faite dans le même module. La première mesure est faite sans acide acétique et dans l'intervalle entre la première et la seconde mesure, l'acide acétique est ajouté pour obtenir 1 % volumique.

II.2.10 Analyse thermogravimétrique/thermique différentielle - ATG/ATD

L'évolution thermique a été caractérisée en utilisant une balance ATG/ATD Setsys evolution (SETARAM instrumentation). La rampe choisie est de 5 °C/min entre 25 et 1000 °C. Un palier de stabilisation de 30 min à 25 °C est préalablement effectué. La température est mesurée au niveau de l'échantillon et l'acquisition se fait sous flux d'air sec. Environ 20 mg de matériau sont placés dans un creuset en platine de 200 µL pour chaque mesure.

Une première mesure est effectuée à vide afin de déterminer la ligne de base. Cette dernière est soustraite à chaque mesure pour prendre en compte les échanges thermiques et les variations de masse du porte-échantillon et des creusets.

La perte de masse entre 335 et 550 °C est associée à la dégradation de l'acétate de calcium ayant perdu ses molécules d'eau suivant la réaction suivante :



Ainsi dans la réaction de dégradation d'une mole d'acétate équivalent à 158 g, 58 g sont perdus (36 %) et 100 g évoluent en carbonate de calcium. Les matériaux contenant de l'acétate de calcium présentent donc une perte de masse de X % dans cette gamme de températures. Le pourcentage d'acétate en excès est défini comme étant le rapport $\frac{X}{36} * 100$ exprimé en pourcentage.

Le rapport organique/inorganique est caractérisé par la perte de masse totale des matériaux composites à 600 °C. Ce rapport prend donc en compte l'acétate, l'eau et le chitosane.

II.2.11 Chromatographie d'exclusion stérique - SEC

Pour déterminer la masse moléculaire de la phase organique, nous avons utilisé une chaîne de chromatographie d'exclusion stérique. Cette chaîne est constituée d'une précolonne Shodex SB-806M HQ avec une limite d'exclusion de 20 000 000 suivie d'une colonne Shodex OHpak SB-802.5 HQ avec une limite d'exclusion de 10 000. L'éluant utilisé pour cette mesure est de l'acétate de sodium (pH 4.5) à un débit de 1 mL/min avec un volume d'injection de 100 µL. L'échantillon a été préparé à une concentration de 10 mg/mL dans l'éluant et a été filtré sur un filtre de porosité 0,45 µm avant d'être injecté en SEC. La chaîne de chromatographie est également équipée d'un détecteur par diffusion statique de la lumière multiangle (détecteur MALLS Wyatt Dawn Heleos, 18 angles) sensible au produit [concentration] x Masse molaire et permettant d'avoir accès aux masses absolues des polymères analysés (pas d'utilisation de courbe étalon). Un second détecteur réfractométrique différentiel Shodex RI-101 (35°C) sensible à la concentration de l'espèce est également utilisé.

Le détecteur par diffusion de lumière est basé pour l'interprétation des résultats sur l'utilisation de l'équation de Zimm pour la détermination de la masse. L'incrément d'indice de réfraction, dn/dc , intervient dans cette équation et nécessite d'être préalablement mesuré ; cette valeur de dn/dc qui représente la variation de l'indice de réfraction d'une solution de polymère en fonction de la variation de sa concentration est spécifique du polymère pour un solvant donné et à une longueur d'onde donnée. Pour l'analyse du chitosane, nous avons utilisé une valeur donnée dans la littérature de 0,192 mL/g [160].

II.2.12 Evaporation laser assistée par matrice - MAPLE

Des suspensions de matériaux minéraux ou composites ont été préparées en prenant soin de maintenir dans tous les cas un pourcentage inorganique à 1 % massique. Par exemple, 0,05 g du matériau ACP (Ca/P=2) ou 0,077 g du composite CTS/ACP (35/65 Ca/P=2) ont été dispersés dans 5 mL d'eau déionisée pendant 10 à 15 min. La préparation de la cible est ensuite effectuée en versant la suspension dans un porte-échantillon en cuivre préalablement refroidi puis immergé dans de l'azote liquide pendant 15 minutes.

Une fois la cible formée, elle est placée dans la chambre de dépôt. Un mouvement de rotation est alors appliqué à la cible et celle-ci est maintenue froide par la circulation d'azote liquide dans le porte-échantillon. Les surfaces à revêtir (silicium (100), titane grade 4 et bioverre)

préalablement nettoyées par des bains ultrasons successifs dans l'acétone, l'éthanol et l'eau distillée puis séchés à l'azote sont placées en vis-à-vis de la cible. La chambre est alors fermée puis un vide primaire est mis en œuvre ($2 \cdot 10^{-2}$ mbar). Un laser à excimère KrF (248 nm) est alors utilisé à une fréquence de 10 Hz pour impacter la cible 40 000 fois avec une fluence de $0,58 \text{ J.cm}^{-2}$.

II.2.13 Etudes biologiques

II.2.13.2 Culture cellulaire

La biocompatibilité des revêtements obtenus par MAPLE sur des substrats titane a été évaluée *in vitro* sur des cellules osseuses humaines d'ostéosarcome (MG63, ATCC® CRL-1427™), en étudiant la morphologie et le cycle cellulaire des cellules en croissance. Pour l'étude microscopique de la morphologie cellulaire, les revêtements ont été placés dans 24 puits avec la face revêtue exposée au milieu cellulaire. Une quantité de $5 \cdot 10^5$ cellules MG63 a été ajoutée dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) avec 10 % de sérum bovin fœtal et 1 % d'acides aminés essentiels. Les revêtements ont été maintenus à 37 °C pendant 24 H sous une atmosphère à 5 % de CO₂. Après 24 H, les échantillons ont été colorés avec de l'iodure de propidium (PI) et du diacétate de fluorescéine (FDA), et respectivement avec du PI et du Hoechst (H) dans le but de différencier les cellules mortes (PI) et les cellules viables (FDA, H). Les cellules ont été directement observées au microscope à fluorescence après colorisation avec un Leica DFC450C.

Pour le dosage du cycle cellulaire, les cellules MG63 ont été cultivées dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, New York, États-Unis) complétées par 10 % de sérum bovin inactivé par la chaleur et de pénicilline/streptomycine et incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂ pendant 24 H. Ensuite, les monocouches ont été récoltées, lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), fixées dans 70 % d'éthanol froid et incubées pendant une nuit à -20 °C. Chaque échantillon a été lavé dans du PBS, traité avec 100 µg/ml de RNase A pendant 15 min, coloré avec 10 µg/mL de PI par incubation à 3 °C pendant 1 heure. Ensuite, l'acquisition a été réalisée avec un cytomètre de flux Epics Beckman Coulter. Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo et exprimées en fractions de cellules dans différentes phases du cycle cellulaire.

II.2.13.3 Activité antimicrobienne

L'activité anti-biofilm des échantillons obtenus a été étudiée en utilisant les souches *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Escherichia. coli* ATCC 8739. Les échantillons testés ont été

stérilisés par exposition à des rayonnements UV pendant 30 min. Après la stérilisation UV, une quantité de 20 μ L de suspension microbienne de 0,5 MAcFarland préparée à partir de cultures fraîches développées sur l'agar tryptique de soja (TSA) a été répartie sur les échantillons traités. Ceux-ci ont été incubés à 37 °C dans une atmosphère humide pendant 15 min, 30 min, 1 H, 4 H, 6 H, 24 H et 48 H. Après chaque période d'incubation, les échantillons ont été mis en suspension dans 5 mL de solution saline stérile et soumis à un vortex vigoureux pour remettre en suspension les bactéries adhérentes. Ensuite, des dilutions par dix en série ont été effectuées à partir des suspensions récupérées, réparties dans des puits de cultures de 10 μ L chacun et répété trois fois. Le nombre de cellules viables (VCC) a été déterminé et exprimé sous forme d'unités de formation de colonies (CFU)/mL. Le test Anova, à deux sens, Bonferroni a été effectué à l'aide de GraphPad Prism version 5.00 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

II.2.14 AFM

Les mesures AFM ont été effectuées sur un AFM 5500 Agilent. La sonde est une pointe de silicium fournie par AppNano, avec une constante de ressort de 25 N/m et un rayon de courbure nominale de 4 nm. Les mesures ont été effectuées en mode «tapping» avec une fréquence de 300 kHz.

II.2.15 Impression 3D

L'imprimante utilisée est le modèle BCN3D + de la société BCN3D technologies (Barcelone, Espagne) munie d'un module d'extrusion de pâte. Une seringue de 100 mL a été utilisée, avec un diamètre de 30 mm et un trou de sortie de buse de 1,5 mm. La plateforme de support permet un volume imprimable de 252 x 200 x 200 mm ; le processus d'impression est contrôlé par le logiciel de traitement Slic3r, qui prend en charge les fichiers STL. Au cours de l'analyse de la formulation, l'imprimabilité de chaque composition a été testée grâce à la fabrication de géométries carrées avec des côtés de base de 50 mm ou 30 mm et de 5 mm de hauteur (correspondant à 5 ou 6 couches).

Liste des figures

<i>Figure 17 Motifs caractéristiques de diffraction des phosphates dicalcique dihydraté (DCPD) et anhydre (DCPA), du phosphate octocalcique (OCP), des phosphates tricalciques (TCP) α et β, de l'hydroxyapatite (HAp) bien cristallisée et du phosphate de calcium amorphe (ACP) présentés sur la fenêtre de diffraction [10-60 ° 2θ]</i>	41
<i>Figure 18 Représentations théoriques de particules sphériques de 2 nm de rayon agrégées ou libres</i>	42
<i>Figure 19 Représentation schématique du modèle de Beaucage où deux sous structures sont observées [215].</i>	43
<i>Figure 20 Représentation de la variation d'intensité de diffusion pour un modèle de Beaucage avec $R_g = 10$ nm et $R_s = 1$ nm = R_{sub} et des pentes en q^{-4}</i>	44
<i>Figure 21 Facteur de structure $S(q)$ pour une sphère de rayon 10 nm et pour différentes fractions volumiques f_p</i>	45
 <i>Tableau 1 Variations du rapport molaire Ca/P et de la quantité d'acide phosphorique (PA) pour une concentration en acétate de calcium constante égale à 5 g/L</i>	37
<i>Tableau 2 Variation du rapport organique/inorganique (CTS/ACP) en fonction de la quantité de chitosane (CTS) solubilisé où « ACP » définit les phosphates de calcium obtenus avec les formulations décrites dans le Tableau 1</i>	38

Chapitre 3 : Synthèse et caractérisation de la phase minérale

III.1 Atomisation de suspensions.....	54
III.1.1 Introduction.....	54
III.1.2 Caractérisation de la phase solide des suspensions	54
III.2 Atomisation de solutions	63
III.2.1 Caractérisation de l'acétate de calcium avant et après atomisation.....	63
III.2.2 Préparation de la solution.....	67
III.2.3 Caractérisation de la poudre obtenue	68
III.2.4 Influence du rapport Ca/P	81
III.3 Résumé	90
Liste des figures.....	93

Dans ce chapitre, nous présentons les différentes stratégies suivies pour obtenir la phase minérale du matériau composite. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « Etat de l'art », l'atomisation séchage peut être utilisée soit pour agglomérer une suspension, soit pour synthétiser directement des matériaux. Nous analyserons donc dans un premier temps l'impact du procédé sur l'atomisation d'une suspension de phosphate de calcium selon deux formulations, puis nous nous intéresserons à l'atomisation d'une solution de précurseurs de phosphates de calcium. Enfin nous étudierons l'influence du rapport Ca/P de la solution sur le matériau atomisé obtenu.

III.1 Atomisation de suspensions

III.1.1 Introduction

Comme nous l'avons présenté, l'atomisation de suspension est largement utilisée pour agglomérer des poudres. Nous avons également mentionné dans le chapitre précédent que les phosphates de calcium sont solubles en milieu acide. Or dans notre cas, au vu du matériau composite que nous voulons synthétiser et compte tenu de la solubilité du polymère, il nous faut travailler en milieu acide. Nous présentons dans cette partie les études que nous avons réalisées sur l'atomisation de deux types de suspensions. Elles sont à base de particules minérales de phosphate de calcium de composition et structure différentes. L'une est commerciale et stœchiométrique tandis que la seconde, synthétisée au laboratoire est dite biomimétique, car nanométrique et mal cristallisée.

III.1.2 Caractérisation de la phase solide des suspensions

III.1.2.1 Hydroxyapatite stœchiométrique

Dans le but d'obtenir une poudre avec une granulométrie permettant son utilisation par un atomiseur de paillasse, la poudre d'hydroxyapatite commerciale a d'abord subi une réduction de taille par broyage à sec. Nous pouvons observer sur l'image MEB de la Figure 22 des agglomérats de particules micrométriques coexistant avec des particules submicrométriques. Ces tailles sont confirmées à l'aide de la granulométrie laser. En effet nous pouvons voir que la poudre d'hydroxyapatite broyée est constituée de deux voire trois populations : une principale centrée à 20 μm et deux autres contributions positionnées à environ 6 et 0,6 μm . Le $Dv50$ de la poudre après broyage est de 10,6 μm contre 28,6 μm avant broyage. Ce type de broyage génère une population de particules fines qui s'agrègent autour de particules de tailles plus importantes ce qui entraîne une baisse de l'efficacité du broyage et pour des temps longs un *statu quo* pour lequel les tailles des particules n'évoluent plus significativement.

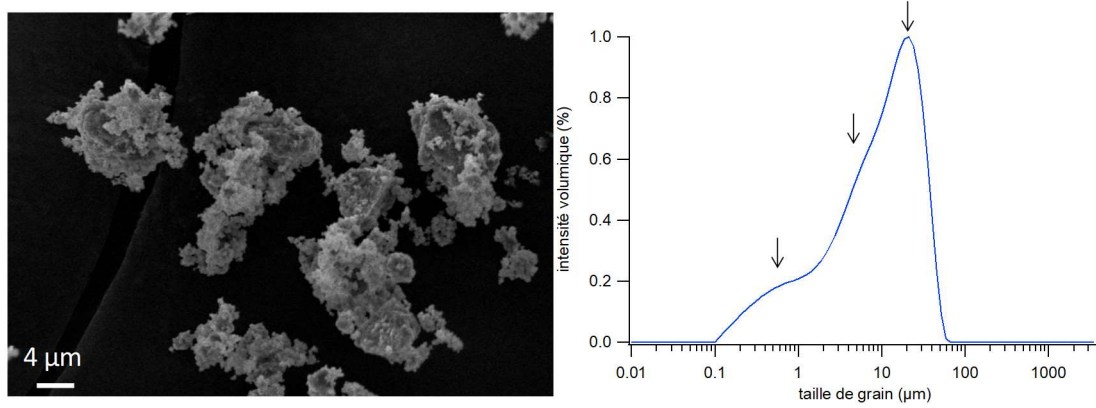


Figure 22 a) image MEB des particules d'hydroxyapatite après broyage et b) leur distribution de taille de grain

Le broyage est une opération susceptible de modifier la phase minérale. Cependant, nous pouvons constater avec les analyses IRTF et DRX (Figure 23) que la poudre broyée ne présente pas de modification de structure ou de chimie comparée à la poudre commerciale initiale. En effet le spectre infrarouge de l'hydroxyapatite broyée présente des bandes de vibration fines à 3570 et 630 cm^{-1} correspondant au groupement hydroxyle du cristal, les bandes de vibration à 1090 et 1047 cm^{-1} correspondent à la vibration $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, la bande à 960 cm^{-1} est associée à la vibration $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, celles à 601 cm^{-1} et 570 cm^{-1} correspondent à la vibration $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ celle à 472 cm^{-1} à la vibration $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$. Enfin, le diffractogramme de la poudre ne présente que les pics caractéristiques de la diffraction de l'hydroxyapatite en accord avec la fiche JCPDS #09-0432.

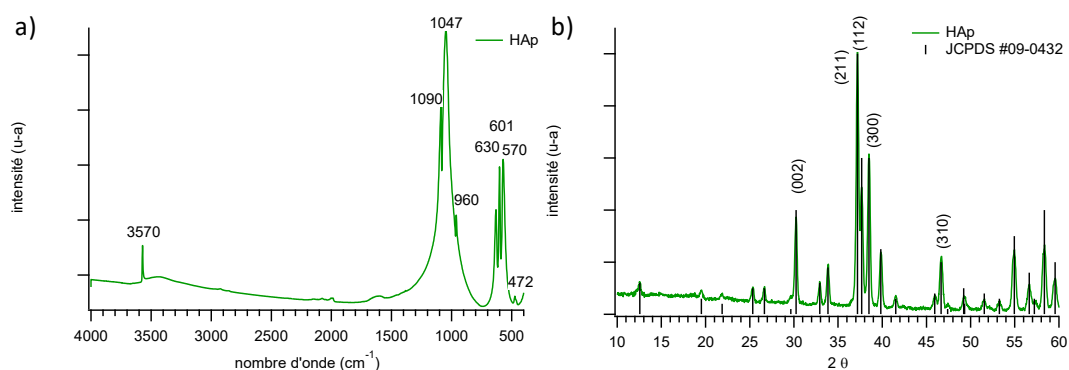


Figure 23 a) Spectre infrarouge de l'hydroxyapatite broyée et b) DRX de cette poudre comparée à la fiche JCPDS # 09-0432

III.1.2.1.1 Evolution de l'hydroxyapatite commerciale en solution acide

Les particules d'hydroxyapatite ont été mises en suspension dans une solution d'acide acétique à 1 % massique (pH = 5,4) pour reproduire le milieu utilisé ultérieurement pour préparer le matériau composite. Nous avons suivi la cinétique d'évolution de la taille des grains de cette

suspension en granulométrie laser en voie liquide. Le résultat (présenté sur la Figure 24) montre à $t = 0$ s, avant ajout de l'acide acétique, trois populations de particules dont l'une d'entre elles est de taille nanométrique (31,5 nm, 3,5 μm et 24,1 μm). Dès que le milieu est ajusté à 1 % d'acide acétique (2 min), les particules nanométriques disparaissent très rapidement tandis que la contribution due aux particules de tailles plus importantes augmente relativement. Progressivement, nous observons que la distribution en tailles des particules se resserre et devient monomodale centrée sur 24 μm . Cette disparition des particules de plus petites tailles peut également être associée à ce phénomène de dissolution. En effet les phosphates de calcium sont solubles en milieu acide [31] et les particules nanométriques présentent une surface d'échange importante ce qui favorise leur cinétique de solubilisation.

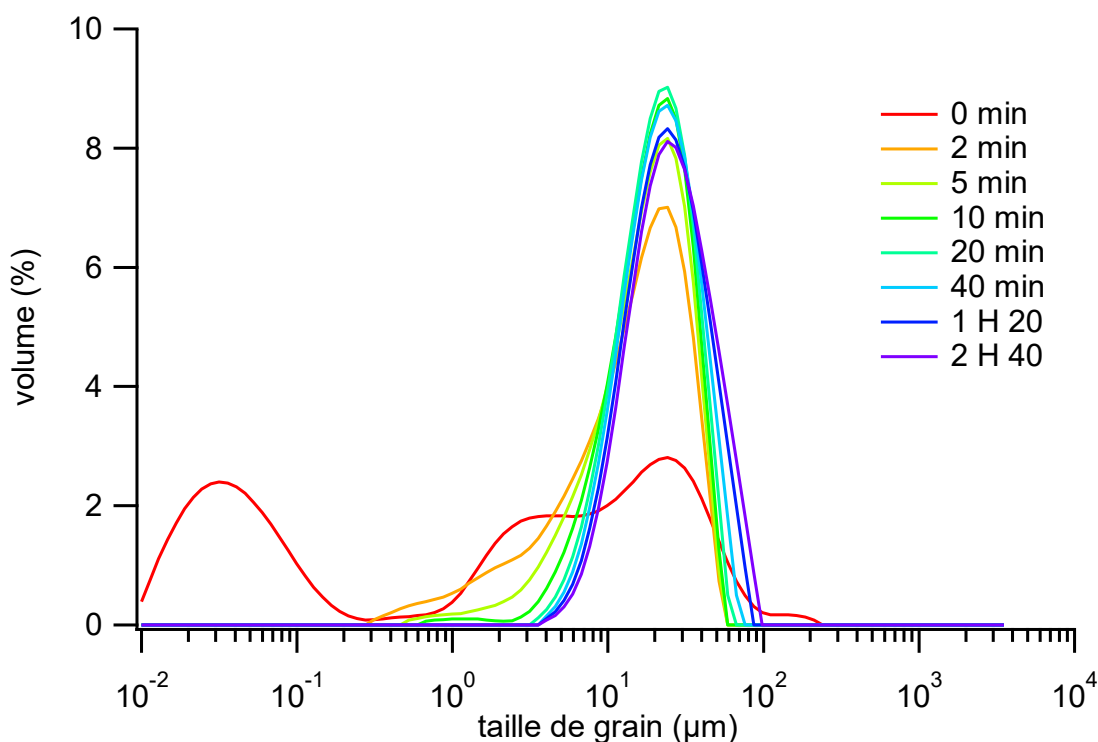
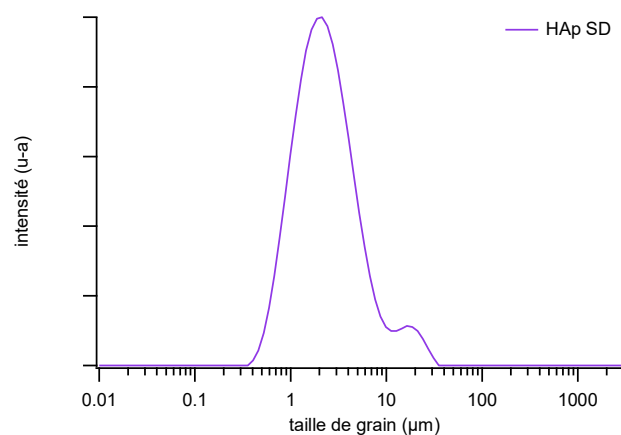
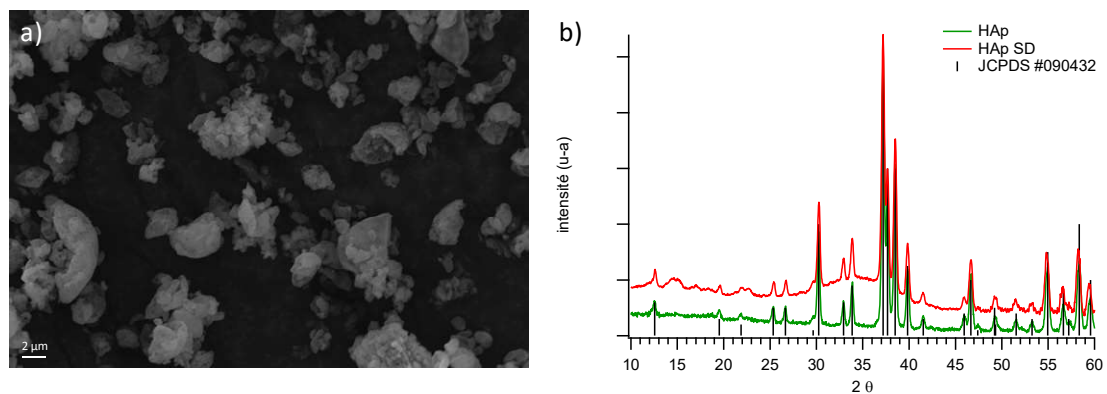


Figure 24 Evolution de la taille des particules d'hydroxyapatite en suspension acide en fonction du temps

III.1.2.1.2 Impacts de l'atomisation sur l'hydroxyapatite

La poudre obtenue après atomisation de la suspension d'hydroxyapatite est présentée sur l'image MEB de la Figure 25. Les grains apparaissent plus petits que dans le matériau d'origine et présentent un aspect irrégulier avec une morphologie de « coquilles éclatées ». Il semble que lors du séchage des gouttes atomisées le matériau séché en surface forme une couche dense limitant l'évacuation du solvant par évaporation, la pression de vapeur interne des particules

formées augmentant alors jusqu'à éclatement des particules de plus grandes tailles. Nous observons également sur cette figure une différence entre les diffractogrammes avant et après atomisation. Le diffractogramme de la poudre atomisée présente un halo amorphe centré à $34^\circ 2\theta$. La Figure 26 présente la distribution de taille de grain de l'hydroxyapatite après atomisation et permet de définir deux populations de particules à $2\ \mu\text{m}$ (majoritaire) et $16\ \mu\text{m}$ (minoritaire). Cette diminution apparente des tailles de grains est caractéristique du procédé d'atomisation séchage avec un atomiseur de type Buchi B290 car les particules avec les tailles les plus importantes ont tendance à être projetées et à adhérer aux parois du tube de séchage étroit de l'atomiseur alors que les particules de tailles plus petites sont récoltées grâce au cyclone. La présence de particules de tailles plus petites en quantité importante peut être reliée avec la précipitation d'une nouvelle phase à partir des espèces en solution issues de la solubilisation de l'hydroxyapatite ou de la dissociation d'éventuels d'agrégats.



La comparaison entre les spectres infrarouges avant et après atomisation de l'hydroxyapatite (Figure 27) montre l'apparition d'une bande large vers 3300 cm^{-1} ainsi qu'à 1640 cm^{-1} (épaulement) correspondant à la présence d'eau. Des bandes à 1564 , 1452 , 1425 et 665 cm^{-1} traduisent la présence d'acétate (provenant de l'acide acétique utilisé pour la préparation). Enfin nous voyons également apparaître une bande à 875 cm^{-1} attribuée à la présence d' HPO_4^{2-} et nous pouvons observer un élargissement de la bande vers 1070 cm^{-1} qui traduit une modification de l'environnement des ions phosphates. Nous pouvons donc supposer qu'un phénomène de solubilisation/reprécipitation partiel a eu lieu au cours de l'atomisation et que la phase reprécipitée est de nature chimique et cristalline différente de l'hydroxyapatite stœchiométrique. Cette phase reprécipitée se présente comme un phosphate de calcium amorphe avec une chimie comprenant des hydrogénophosphates.

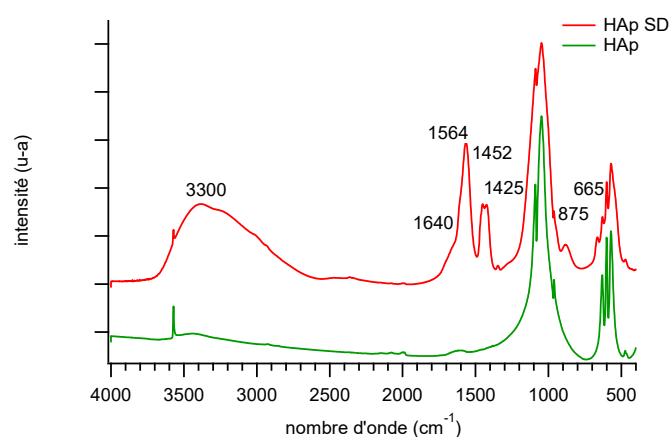


Figure 27 Spectres infrarouges de l'hydroxyapatite avant atomisation (HAp) et après atomisation (HAp SD)

III.1.2.2 Apatite biomimétique

Les images MEB (Figure 28) des particules d'apatite biomimétiques montrent une distribution hétérogène des tailles. Des blocs de $200\text{ }\mu\text{m}$ côtoient des particules de taille submicronique. Ces dernières paraissent agglomérées sur les plus grosses et de morphologie sphérique. Les plus grandes présentent, au contraire, des arrêtes importantes et une morphologie plus irrégulière due au broyage du lyophilisat. Des observations TEM précédemment faites dans l'équipe révèlent la présence de nanocristaux présents sous forme de plaquettes formant de gros agglomérats de plusieurs centaines de nanomètres [65].

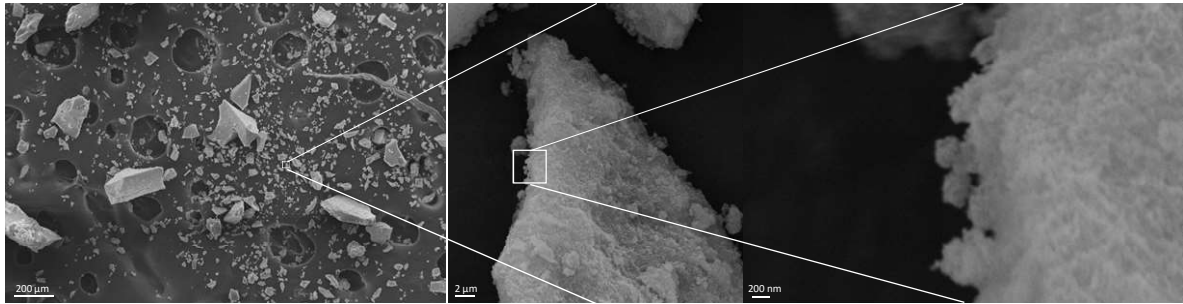


Figure 28 Images MEB des particules d'apatites synthétisées et lyophilisées.

La distribution en tailles des particules d'apatite biomimétique avant atomisation est bimodale comme présentée sur la Figure 29. Une première population centrée à 2 μm est visible alors que la seconde est centrée à 160 μm . Les particules submicroniques visibles en MEB ne le sont pas en granulométrie malgré la pression de 3 bars appliquée lors de la mesure. Ces résultats indiquent une cohésion forte entre ces particules et les blocs micrométriques qui est à relier au phénomène d'agrégation des cristaux nanométriques et à la réactivité de ces apatites et leur faculté d'agrégation via leur couche hydratée [161].

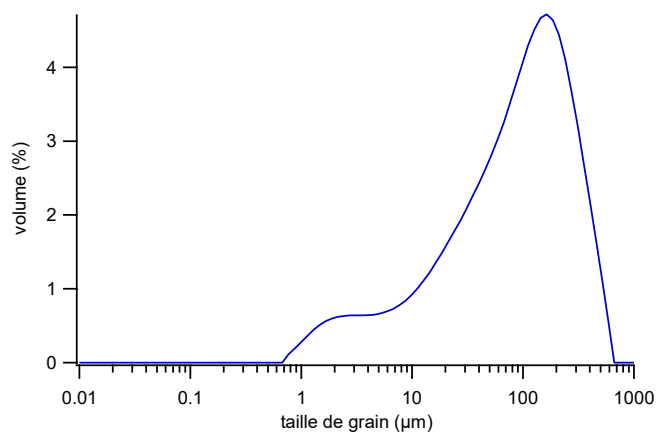


Figure 29 Distribution de taille des grains d'apatites biomimétiques et lyophilisés

En superposant le signal de diffraction des rayons X (Figure 30) avec la fiche JCPDS # 09-0432, nous constatons que tous les pics peuvent être indexés dans la structure apatitique et qu'aucune phase cristalline secondaire n'est détectée. Par l'application de la formule de Scherrer (5), nous pouvons déterminer que les cristallites ont une longueur de $20,8 \pm 0,3$ nm suivant l'axe c (raie 002) et une largeur de $7,0 \pm 0,3$ nm suivant l'axe perpendiculaire à la précédente direction (raie 310), valeurs attendues pour cette synthèse [65].

$$L_{hkl} = \frac{0.94\lambda}{\cos\theta \sqrt{\Delta_r^2 - \Delta_0^2}} \quad (5)$$

Avec :

0.94 : constante de Scherrer

$L(\text{\AA})$: taille apparente dans la direction perpendiculaire au plan de la diffraction hkl

$\lambda(\text{\AA})$: Longueur d'onde du rayonnement X ($\lambda_{\text{CoK}\alpha} = 1,78992 \text{\AA}$)

θ : Angle de diffraction de la raie hkl considérée

$\Delta_r(\text{rad})$: largeur à mi-hauteur de la raie considérée

$\Delta_0(\text{rad})$: largeur à mi-hauteur de la même raie d'une hydroxyapatite de référence bien cristallisée

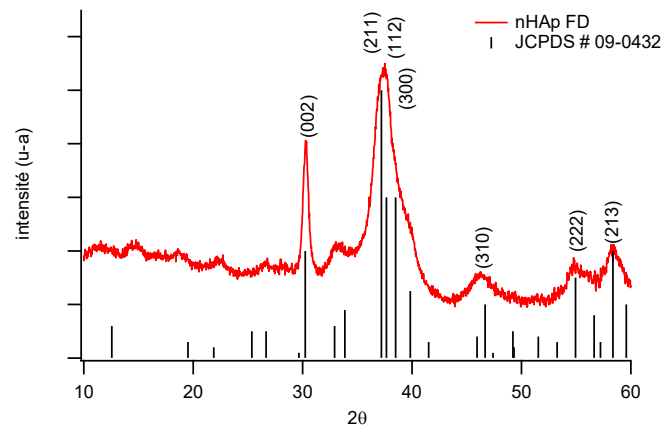


Figure 30 Diffractogramme de l'apatite synthétisée comparé à la fiche standard JCPDS # 09-0432

La spectroscopie infrarouge (Figure 31) permet de mettre en évidence les bandes caractéristiques de la présence d'eau vers 3500 cm^{-1} et à 1650 cm^{-1} . Les autres bandes visibles ($1114, 1027, 960, 874, 602, 561, 471 \text{ cm}^{-1}$) sont attribuées aux orthophosphates (respectivement $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, HPO_4^{2-} , $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$, $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$). La faible résolution de ces pics est caractéristique d'une apatite biomimétique. Vandecandelaere *et al.* présentent dans leur article une déconvolution détaillée de la fenêtre $[800-400 \text{ cm}^{-1}]$ qui met en avant la présence d'environnements apatitiques et non-apatitiques.

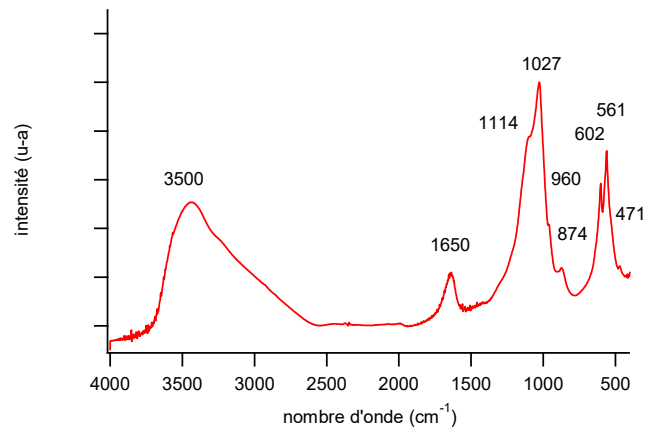


Figure 31 Spectre infrarouge de l'apatite biomimétique

Une mesure de l'évolution de la distribution de taille de grain similaire à celle réalisée avec l'hydroxyapatite a été faite pour l'apatite biomimétique. Cependant, assez rapidement, plus aucun signal n'est détecté (i.e. avant 2 min) ce qui laisse sous-entendre une dissolution complète de la poudre dans le milieu acide.

II.1.2.2.1 Caractérisation de la poudre après atomisation

L'atomisation de la suspension d'apatite biomimétique mène à la formation d'une poudre constituée de particules sphériques visibles sur l'image MEB de la Figure 32. Nous pouvons observer à nouveau sur le diffractogramme de cette figure un halo amorphe (centré à $34^\circ 2\theta$) mais qui ici est prépondérant ainsi que des pics peu intenses de diffraction à $11,9$, $14,5$ et $22^\circ 2\theta$ différents de ceux observés pour les apatites. Le diffractogramme présente également une asymétrie avec un épaulement à $30^\circ 2\theta$. La distribution de taille de grain présentée sur la Figure 33 est monomodale avec un maximum à $4\ \mu\text{m}$. Enfin le spectre infrarouge de la poudre atomisée (Figure 34) fait apparaître des bandes à 1564 , 1452 et $1425\ \text{cm}^{-1}$ très semblables à celles de la poudre obtenue après atomisation d'une suspension d'hydroxyapatite. Un élargissement des bandes autour de 1070 et $600\ \text{cm}^{-1}$ corrobore la formation du phosphate de calcium amorphe visible en DRX Figure 32.

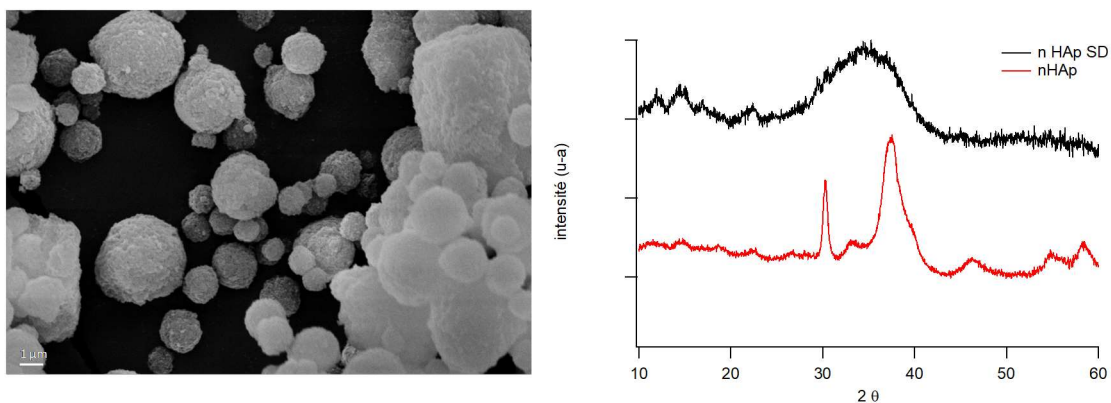


Figure 32 Image MEB et diffractogramme de l'apatite biomimétique avant (nHAp) et après (nHAp SD) atomisation

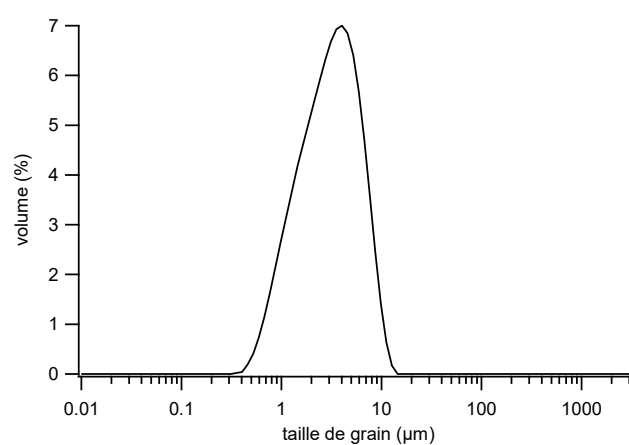


Figure 33 Distribution en taille de la poudre obtenue par atomisation d'une suspension d'apatite biomimétique

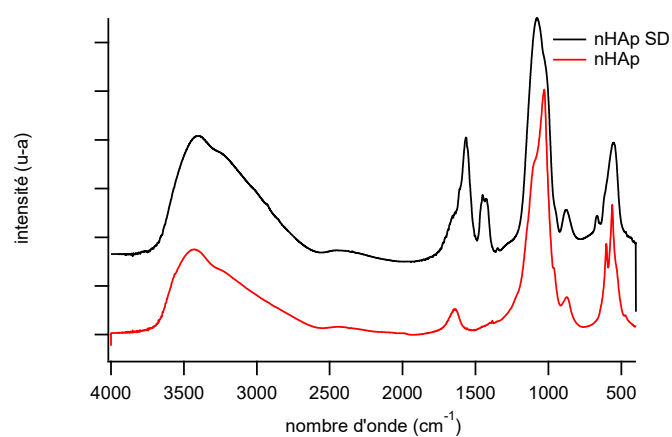


Figure 34 Spectres infrarouges des poudres d'apatites biomimétiques avant (nHAp) et après (nHAp SD) atomisation

III.2 Atomisation de solutions

Les essais d'atomisation de suspensions de phosphates de calcium en milieu acide ont permis d'observer une solubilisation partielle ou totale. Ces phénomènes ont lieu même pour les composés les plus stables (*i.e.* l'hydroxyapatite stœchiométrique) et se traduisent par l'apparition d'une phase amorphe lors de l'atomisation. Ces premiers résultats sont similaires à ceux obtenus par L. C Chow *et al.* . Ainsi l'idée consistant à atomiser directement une solution contenant les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} semble pertinente pour obtenir une poudre phosphocalcique. Dans l'objectif de réaliser un composite chitosane/phosphate de calcium, le choix des précurseurs doit permettre également de maintenir un milieu favorable à la solubilisation de la matrice chitosane. Ainsi nous avons sélectionné l'acétate de calcium et l'acide phosphorique comme précurseurs. En effet, leur mélange devrait donner, en théorie, un phosphate de calcium et de l'acide acétique volatil. L'utilisation de l'atomisation séchage devrait permettre d'évacuer ce dernier ainsi que le solvant (de l'eau déminéralisée dans notre cas) et de synthétiser un phosphate de calcium.

III.2.1 Caractérisation de l'acétate de calcium avant et après atomisation

Il est important dans une première étape d'identifier l'impact du procédé sur le précurseur de calcium. Le sel d'acétate de calcium étant initialement sous forme solide, il peut recristalliser pendant le cycle d'atomisation. Pour observer ce phénomène, nous avons atomisé une solution d'acétate de calcium à 5 g par litre correspondant à la concentration utilisée par la suite pour obtenir un phosphate de calcium. La poudre obtenue a ensuite été observée en microscopie électronique et analysée par diffraction des rayons X et par spectroscopies vibrationnelles.

En microscopie l'influence du procédé est notamment mise en évidence par un changement de taille et de morphologie des grains. En effet, leur dimension initiale typique de l'ordre de la dizaine de micromètres pour la longueur caractéristique la plus grande se réduit au micromètre après atomisation. La morphologie est également modifiée pendant le procédé. Les particules d'acétate de calcium se présentent sous la forme de bâtonnets avant atomisation alors qu'après, ils apparaissent sous forme d'agglomérats sphériques. Cette morphologie ainsi que cette taille résultent de la solubilisation préalable puis de la pulvérisation sous forme de gouttelettes lors de l'atomisation. Ainsi les conditions de cristallisation de l'acétate de calcium commercial et atomisé sont suffisamment différentes pour engendrer des morphologies et des tailles différentes.

Le diffractogramme de l'acétate de calcium atomisé (Figure 35) présente des pics de diffraction ce qui permet de démontrer que malgré les temps très courts (de l'ordre de 1,0 à 1,5 s) mis en jeu pendant le procédé de séchage, l'acétate de calcium a le temps de recristalliser. Nous pouvons cependant observer qu'après atomisation l'acétate de calcium ne présente plus les mêmes intensités relatives de ses pics de diffraction. Cette modification est particulièrement notable avec les pics à 18,4, 29,3 et 31,5 ° 2 θ . Nous observons également une augmentation de la largeur à mi-hauteur de la majorité des pics après atomisation ce qui indique des tailles de cristallites plus petites ou un désordre plus important. Ce résultat est, là encore, à corrélérer avec le procédé utilisé et sa propension à former des matériaux faiblement cristallins ou amorphes.

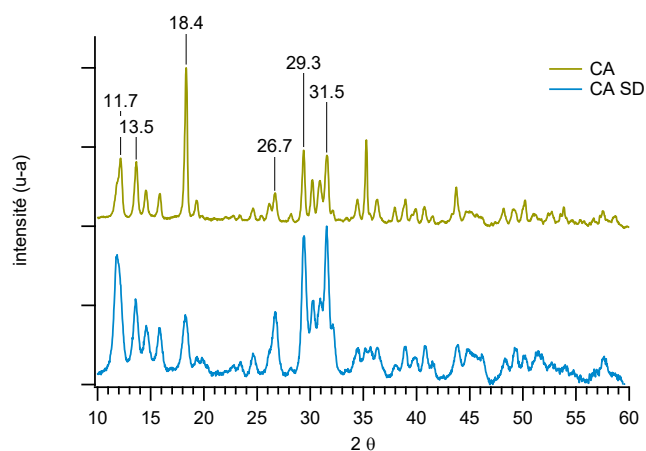


Figure 35 Diffractogrammes de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation

Les spectres infrarouges de l'acétate de calcium avant et après atomisation (Figure 36) montrent de grandes similitudes. Les quelques différences qui peuvent être observées concernent majoritairement les bandes de vibration des liaisons OH (associées à l'eau) vers 3300, 1650 et 727 cm^{-1} . En effet la bande vers 3300 cm^{-1} semble moins intense et moins diffuse et celles à 1650 et 727 cm^{-1} semblent tout simplement disparaître. D'autres modifications sont visibles sur ces spectres notamment la disparition des pics associés aux liaisons C=O vers 1700 cm^{-1} . Le détail de l'attribution des bandes de vibrations du spectre de l'acétate avant atomisation est donné dans le Tableau 3.

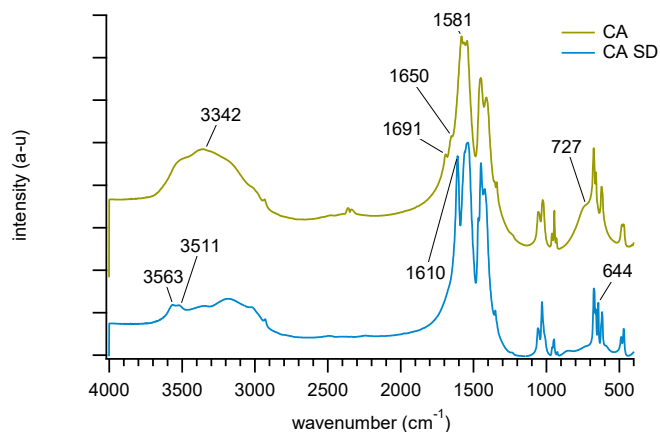


Figure 36 Spectres infrarouges de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation

Tableau 3 Attribution des bandes du spectre infrarouge de l'acétate de calcium

groupes fonctionnels	fréquences de vibration (cm ⁻¹)
OH	3563, 3511, 3342
C=O	1691, 1650
C-O	1581 (v _{as}), 1564 (v _{as}), 1544 (v _{as}), 1448 (v _s)
CH ₃	3016 (v _{as}), 2933 (v _s), 1411 (δ' _{as}), 1340 (δ _s), 1056 (ρ _{op}), 1026 (ρ _{ip})
C-C	960 (v), 945 (v), 931 (v)
OCO	675 (δ _s), 660 (δ), 621 (ρ _{op}), 615 (ρ _{op})

La spectrométrie Raman focalisée sur la fenêtre 900-1000 cm⁻¹ permet de révéler les environnements des carbones de l'acétate. En effet dans cette fenêtre, la vibration d'élongation de la liaison C-C présente trois bandes pour l'acétate mono hydraté alors que pour le semi-hydraté, elle en présente quatre (Figure 37). Ainsi l'acétate de calcium après atomisation se présente sous la forme d'un cristal semi-hydraté.

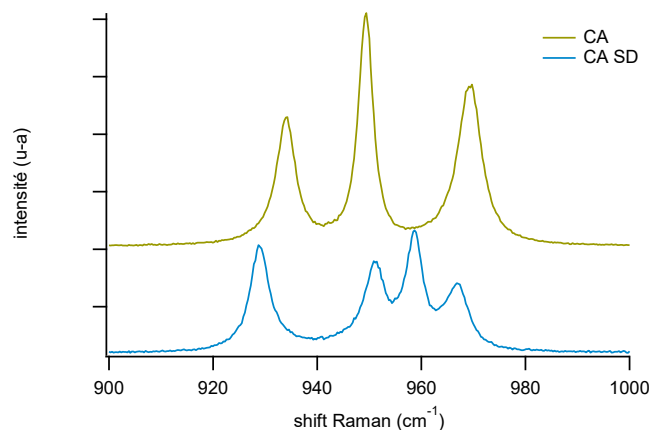


Figure 37 Spectres Raman de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation

Le spectre RMN du carbone de l'acétate après atomisation présente quatre pics fins à 185, 183, 180 et 175 ppm attribués au carbone fonctionnel de l'acétate ainsi qu'un autre pic bien résolu à 22 ppm attribué au carbone du groupement méthyle. La présence de ces pics fins confirme l'aspect cristallin de l'acétate.

Enfin l'analyse thermique (Figure 38) met en exergue les différences de composition entre l'acétate avant (CA) et après (CA SD) atomisation. Le thermogramme de CA SD montre une première perte de masse de 7,3 % entre 25 et 330 °C. Une seconde de 38 % est observée entre 350 et 395 °C suivie par une perte de masse de 6,8 % entre 395 et 465 °C. Enfin une dernière perte de masse de 34,4 % est enregistrée entre 600 et 800 °C. Si l'on considère que le CA SD est héli hydraté (en accord avec le spectre Raman), alors la première perte de masse est due à la perte de l'eau cristalline (5 %) et de l'eau adsorbée (2,3 %). La perte de masse de 38 % correspond à la perte de masse théorique (36 %) liée à la décomposition de l'acétate de calcium en carbonate. Les phénomènes qui sont associés à la perte de masse de 6,8 % ne sont pas encore expliqués et des analyses complémentaires seraient à mener pour mieux interpréter cette courbe ATG. Enfin la perte de masse vers 800 °C est corrélée à la décomposition du carbonate de calcium en CaO et CO₂.

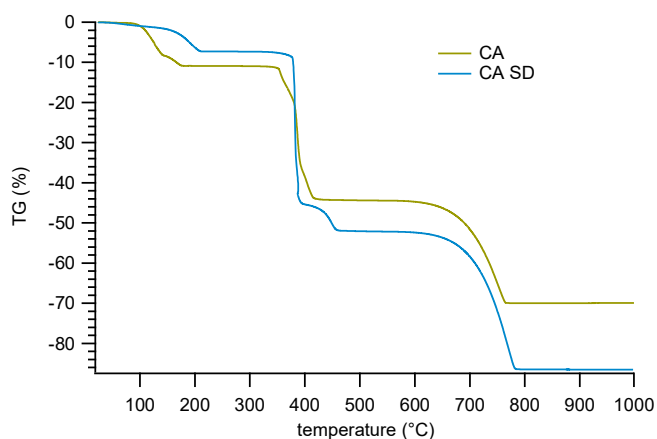


Figure 38 ATG de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation

L'acétate de calcium étant complètement dissous avant son passage en atomisation, les gouttes formées pendant la pulvérisation sont par conséquent constituées d'ions Ca^{2+} et CH_3COO^- ainsi que du solvant (de l'eau déminéralisée). Alors que le solvant est évaporé pendant le séchage de la goutte, la concentration en ions augmente jusqu'à dépasser la limite de solubilité. L'acétate de calcium peut alors cristalliser. En deçà de 58 °C, l'acétate de calcium est présent sous forme hydratée, dans une gamme de température allant de 58 à 140 °C, il est semi-hydraté et l'amorphe apparaît à des températures supérieures à 140 °C. La température d'entrée de l'atomiseur étant de 160 °C, seule la surface de la goutte la subit alors que son volume monte plus doucement en température et n'atteindra jamais ces 160 °C [162]. Nous pouvons donc considérer que c'est dans la gamme de température de précipitation de l'acétate de calcium semi-hydraté que se trouve la goutte, notamment en raison de l'évaporation du solvant (phénomène endothermique limitant la montée en température). C'est pourquoi cette forme cristallise préférentiellement pendant l'atomisation.

III.2.2 Préparation de la solution

Après cette première étape qui a montré la capacité de transformation de l'acétate de calcium, une solution saturée en ions calcium et phosphate avec un rapport molaire de 1,67 a été préparée. Pour ce faire nous solubilisons 5 g d'acétate de calcium hydraté dans 1 L d'eau déionisée à laquelle nous ajoutons 1,17 mL d'acide phosphorique.

III.2.3 Caractérisation de la poudre obtenue

III.2.3.1 Caractérisations morphologiques

La répartition de taille des particules obtenues après atomisation a été étudiée par granulométrie laser en voie sèche Figure 39. Nous pouvons observer une distribution monomodale de la taille des grains avec des valeurs de Dv_{10} de 1,01, un Dv_{50} à 2,19 et un Dv_{90} à 5,37 μm .

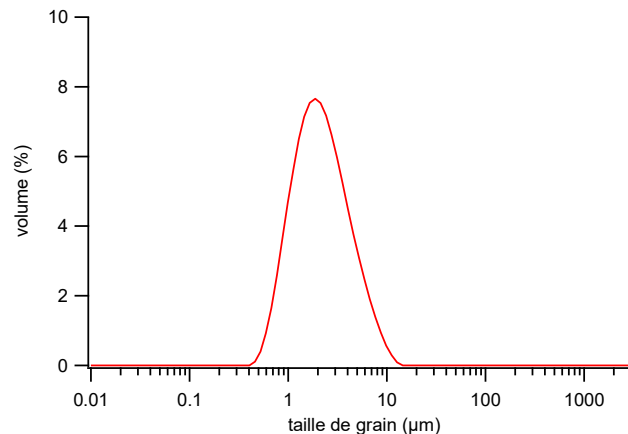


Figure 39 Distribution de taille de grain de la poudre obtenue après atomisation d'une solution de précurseurs de phosphate de calcium

La poudre obtenue après atomisation a été observée au microscope électronique à balayage et les images obtenues sont présentées sur la Figure 40. Nous pouvons voir que le matériau obtenu se présente sous la forme d'agrégats avec une morphologie relativement sphérique et des tailles de l'ordre du micromètre ou de quelques micromètres. Le zoom sur la particule de 9,5 μm de diamètre permet également de constater que ces agrégats paraissent poreux et nous voyons qu'ils sont constitués de sous structures sphériques d'une taille de l'ordre de la centaine de nanomètres.

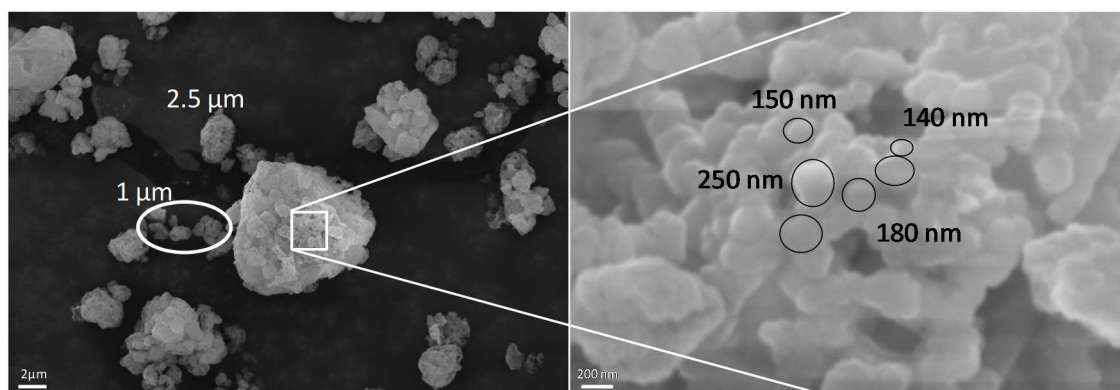


Figure 40 Images MEB des particules obtenues après atomisation d'une solution contenant les précurseurs de phosphate de calcium

Pour étudier plus en détail les nanoparticules, nous avons effectué de l'imagerie par microscopie électronique à transmission en collaboration avec Stéphanie Balor et Vanessa Soldan (METI, Toulouse) (Figure 41). Cette imagerie fait ressortir une première population de nanoparticules d'une taille moyenne de 80 ± 25 nm (entourée en blanc sur la Figure 41). Ces nanoparticules semblent s'organiser en chapelets imbriqués et tortueux sur ce qui apparaît comme la surface des particules micrométriques (représentée par le trait rouge sur cette même figure). Une seconde population de l'ordre de quelques centaines de nanomètres (correspondant aux valeurs basses de distribution de taille de grain obtenue en granulométrie) est visible sur le bas de cette image. Ces particules semblent indépendantes les unes des autres et ne présentent pas de sous structures. Elles proviennent en partie des agrégats micrométriques comme nous pouvons le voir sur les images MEB et ont été probablement formées pendant l'atomisation ; elles pourraient résulter du séchage de gouttelettes de plus petites tailles. Nous pouvons alors imaginer que ces particules de quelques centaines de nanomètres ont effectivement été séchées dans des gouttes de petite taille mais se sont agrégées *a posteriori* à des agrégats micrométriques.

Les particules submicrométriques observées semblent avoir une structure poreuse, en effet, sur les images TEM, nous pouvons constater des variations de contrastes au sein d'une même particule qui peuvent être attribuées à la présence de cavités. Ces variations de contraste apparaissent pendant les observations et sur la Figure 42, nous observons l'évolution des nanoparticules sous le faisceau d'électrons. Les deux images ont été enregistrées aux mêmes coordonnées après 5 min d'exposition au faisceau. Nous voyons clairement apparaître des zones plus claires arrondies sur l'image de droite (5 min) caractéristiques d'une dégradation.

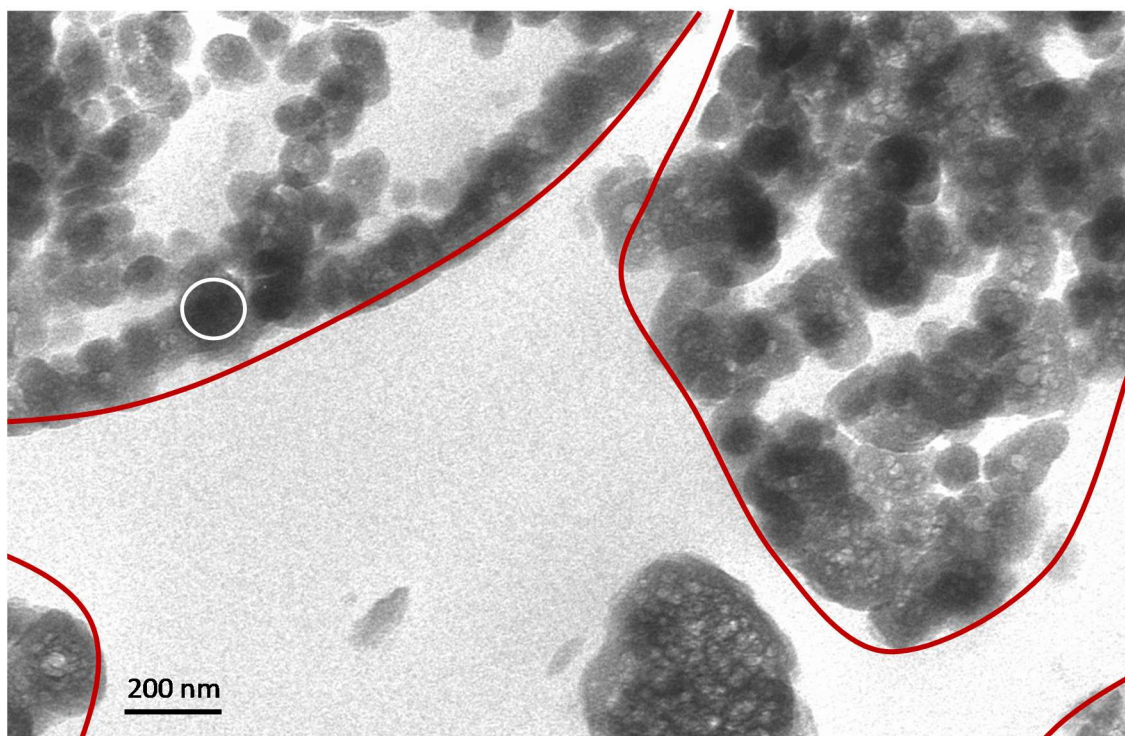


Figure 41 Image MET d'une tranche de 70 nm de profondeur des particules obtenues par atomisation de la solution de précurseur.

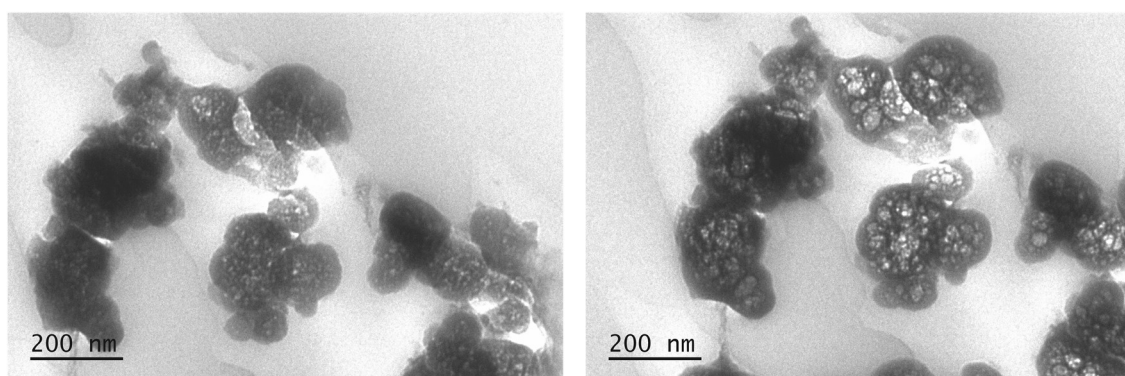


Figure 42 Evolution des nanoparticules sous le faisceau (80 kV) à t = 0 (gauche) et t = 5 min (droite). L'acquisition a été faite en faisant la mise au point dans une zone proche de la zone d'intérêt puis en déplaçant l'échantillon pour avoir une image avec le moins d'artefacts possible

Pour caractériser la structure des nanoparticules visibles en TEM, nous avons fait une étude en diffraction des rayons X aux bas angles (SAXS - Small Angle X-ray Scattering) avec l'aide de Pierre Roblin (LGC, Toulouse). L'intégration radiale du motif de diffusion du SAXS sur une gamme de vecteurs de diffusion allant de 0,004 à 1,5 Å⁻¹ est présentée sur la Figure 43. Afin d'en extraire des valeurs de distances caractéristiques, nous avons utilisé le modèle de Beaucage que nous avons fait concorder avec la courbe en se limitant à deux sous structures.

Nous avons réalisé une étude préliminaire basée sur des modèles sphériques. Cette étude a semblé indiquer que deux populations de particules sphériques coexistent. Cependant la somme des courbes différait de la courbe expérimentale car ces modèles considèrent les populations de particules indépendamment les unes des autres. Or le modèle de Beaucage permet de modéliser deux populations de particules sphériques de tailles différentes qui sont imbriquées l'une dans l'autre et qui ne se comportent pas comme des sphères indépendantes. Il paraît donc conforme au modèle de formation des particules amorphes par agrégation de clusters proposé par Brecevic *et al.* [85,90].

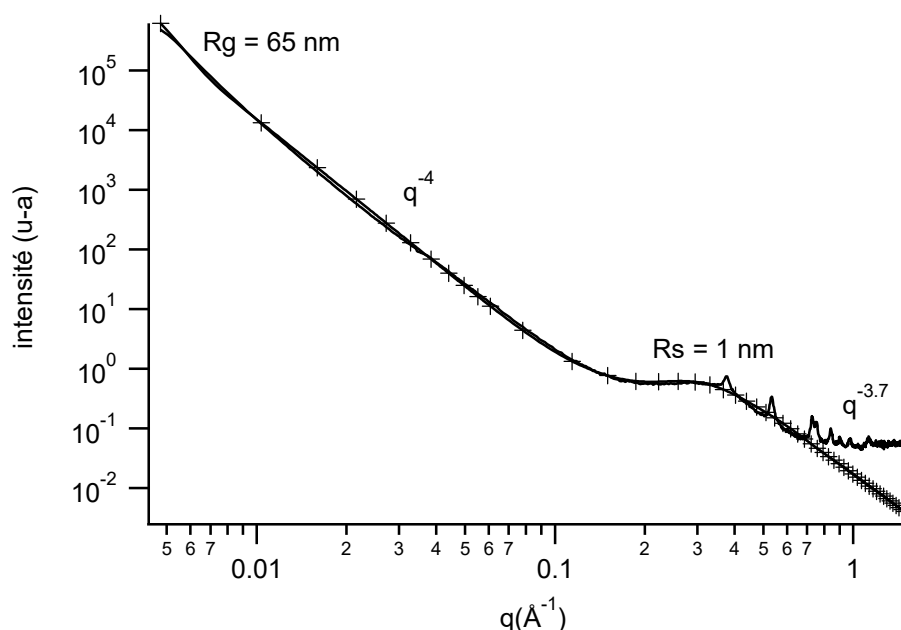


Figure 43 Courbe SAXS de l'intensité diffusée par le matériau en fonction du vecteur de diffusion

Dans notre cas, nous pouvons faire concorder le modèle avec la courbe expérimentale en prenant les valeurs de rayons de giration suivantes : $R_g = 650 \text{ Å}$, $R_s = 10.0 \text{ Å}$ et $R_{sub} = 10 \text{ Å}$. Aux structures de rayon R_g est associée une décroissance de l'intensité de diffusion en q^{-4} et aux structures de rayon R_s , en $q^{-3.7}$. Ces pentes traduisent des morphologies de surface respectives lisse et irrégulière (avec des dimensions fractales de surface[163] de 2 et 2,3). Les nanoparticules observables en microscopie électronique à transmission interviennent donc dans le signal de diffusion SAXS aux basses valeurs de vecteur de diffusion. Cette contribution est néanmoins à relativiser car soumise à trop d'incertitudes concernant le rayon des particules sphériques. Nonobstant cette approximation, le SAXS indique que ces nanoparticules sont elles-mêmes constituées de clusters de 1 nm (R_s). La proximité des valeurs de R_{sub} et R_s nous donne l'information que la sous-structure de rayon R_s se comporte comme si elle n'était pas agrégée

en sur structure cohérente comme des chapelets. La structure de rayon R_g est donc constituée de clusters de rayons R_s agrégés sans organisation particulière. Notons l'écart entre la courbe modèle et la courbe enregistrée au SAXS pour les hautes valeurs de vecteur de diffusion. Cette différence est due à un phénomène de diffraction de la poudre.

Pour compléter les hypothèses sur la structure des poudres, nous avons également fait une mesure en WAXS (Wide Angle X ray Scattering) en collaboration avec Pierre LECANTE (laboratoire CEMES, Toulouse). De cette mesure, nous avons extrait une fonction de distribution de paires (PDF-Figure 44). Cette PDF nous permet de définir les distances caractéristiques de paires d'atomes dans ce matériau. Ainsi nous observons des maxima bien définis à 1,6 Å, 2,5 Å, 3,7 Å et 4,2 Å respectivement associés aux paires PO du tétraèdre PO_4 , CaO, CaP et PP. Cependant après cette dernière valeur, les intensités des pics décroissent. Cette décroissance nous permet de définir une longueur de cohérence dans notre matériau de l'ordre du nanomètre (représenté en pointillé sur la figure). Elle nous permet également de confirmer que le matériau obtenu par atomisation est amorphe sans quoi sa longueur de cohérence serait plus élevée. Cette longueur de cohérence est en accord avec les différents modèles de clusters amorphes trouvés dans la littérature[164].

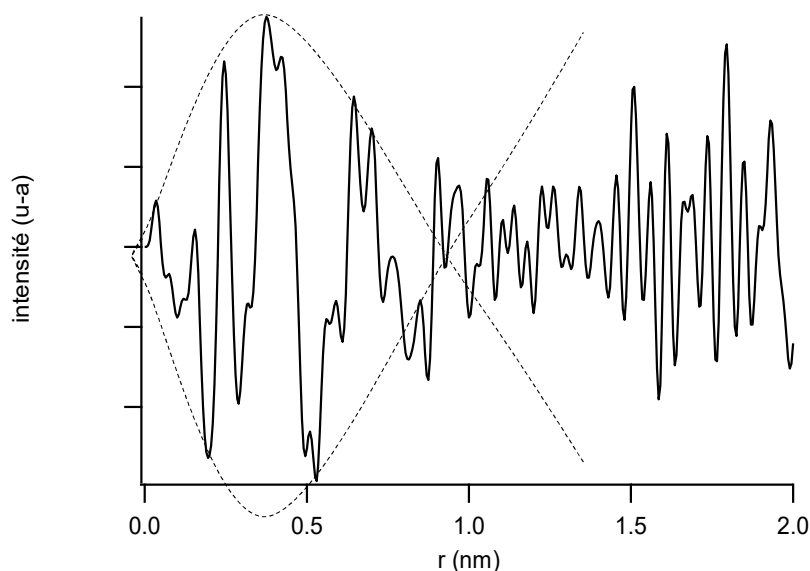


Figure 44 Fonction de distribution de paires d'atomes de la poudre atomisée. La longueur de cohérence du matériau est représentée par les pointillés.

Ces clusters amorphes que nous associerons aux objets de rayon R_s , s'agglomèreraient donc entre eux pour former des nanoparticules d'une centaine de nanomètres. Ces nanoparticules s'organisent en chapelets imbriqués et tortueux et s'agrègent pendant le séchage pour former

les particules micrométriques. Une autre famille de particule de quelques centaines de nanomètres de diamètre se forme également pendant le séchage. Celles-ci ne semblant pas être constituées de nanoparticules individualisées, nous pouvons faire l'hypothèse que leurs constituants primaires sont les clusters de 1 nm de rayon. Dans la poudre finale, ces particules se retrouvent agrégées sur les particules micrométriques comme les images MEB le montrent. Nous pouvons considérer que la pression utilisée dans le venturi du granulomètre est alors suffisante pour commencer à les détacher des particules micrométriques, ce qui expliquerait pourquoi certaines sont détectées par cette technique.

III.2.3.2 Caractérisation physico-chimique

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la poudre que nous avons obtenue présentait un début de diffraction en SAXS. Pour définir sa structure cristalline, nous avons donc fait une acquisition en DRX. Le diffractogramme obtenu (Figure 45) présente une contribution amorphe majeure et une autre contribution (moins importante) correspondant à une phase mal cristallisée. La contribution amorphe est représentée par le pic large et mal résolu centré à $35^\circ 2\theta$. Sur ce halo amorphe, nous pouvons également observer des pics de diffraction peu intenses notamment à $11,7$, $13,5$, $18,2$, $26,7$, $29,4$ et $31,5^\circ 2\theta$ caractéristiques de l'acétate de calcium. La très faible intensité et l'importante largeur à mi-hauteur de ces pics indiquent un faible taux de cristallinité et des cristallites de petites tailles.

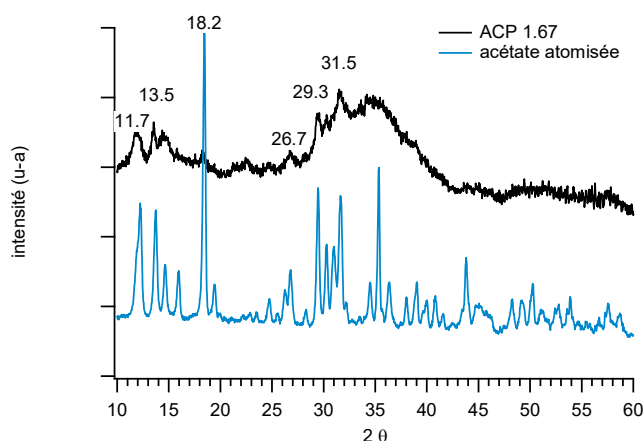


Figure 45 Diffractogramme de l'ACP 1,67 comparé à celui de l'acétate de calcium atomisé

La Figure 46 présente le spectre RMN du phosphore en polarisation croisée $1H \rightarrow 31P$ avec 1 ms de contact à 10 kHz. Le déplacement chimique observé de 1,8 ppm est proche des déplacements communément admis pour les phosphates de calcium (*i.e.* 2 ou 3,7 ppm). Cependant la largeur importante de ce pic indique que les atomes de phosphore sont présents dans de nombreux

environnements différents et aucune distinction entre phosphate et hydrogénophosphate ne peut être faite en utilisant simplement la polarisation croisée. Pour les mêmes raisons, il n'est pas possible de discriminer les environnements des phosphates ou hydrogénophosphates dans ce matériau amorphe.

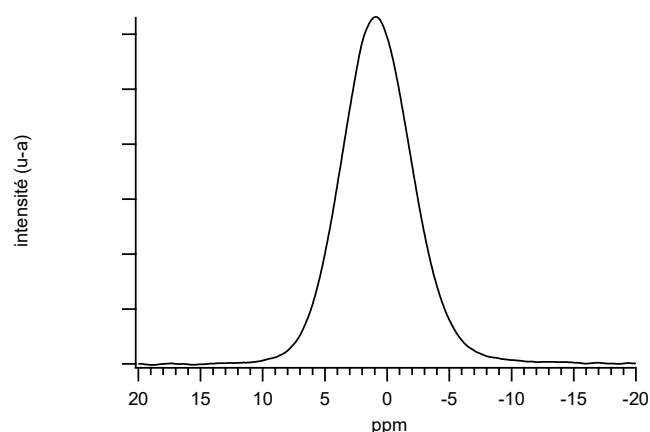


Figure 46 Spectre RMN du phosphore en polarisation croisée de l'ACP 1,67

Le déplacement chimique des protons du groupement méthyle à 1,7 ppm, visible sur la Figure 47 a), présente une intensité importante qui est corrélée à la quantité de ce groupement dans la poudre. Les bandes de rotation observables vers 28 ppm et -23 ppm sont associées à des couplages dipolaires entre atomes d'hydrogène et traduisent une faible mobilité de l'eau ainsi que de l'acétate. De plus sur le spectre du carbone (Figure 47 b), nous pouvons observer une bande fine à 22 ppm associée au déplacement chimique des carbones de ce même groupement. Quatre autres pics apparaissent également autour de 180 ppm (185, 183, 180 et 175 ppm) traduisant la présence des carbones de la fonction acétate. Les largeurs à mi-hauteur de ces quatre pics traduisent également l'aspect cristallin de cet acétate. Cependant, nous pouvons observer qu'ils se superposent à une bande moins bien résolue mais dont l'attribution est également faite au carbone fonctionnel de l'acétate. Les spectres RMN du proton Figure 47 a) et du carbone Figure 47 b) mettent donc en avant la présence d'acétate de calcium partiellement cristallisé.

En polarisation croisée *aller-retour* $1H \rightarrow 31P \rightarrow 1H$, à des temps de contact *retour* longs (1 ms- Figure 48, courbe rouge), les protons correspondants au groupement méthyle de l'acétate (1,7 ppm) sont bien visibles ce qui indique une proximité spatiale importante entre les atomes de phosphore et les protons de l'acétate. A des temps courts (50 μs -Figure 48, courbe bleue), seuls les protons dans le voisinage direct des atomes de phosphore répondent et sur ce spectre,

ce voisinage correspond à la présence des protons acides des hydrogénophosphates (déplacement chimique à 10 ppm) du matériau.

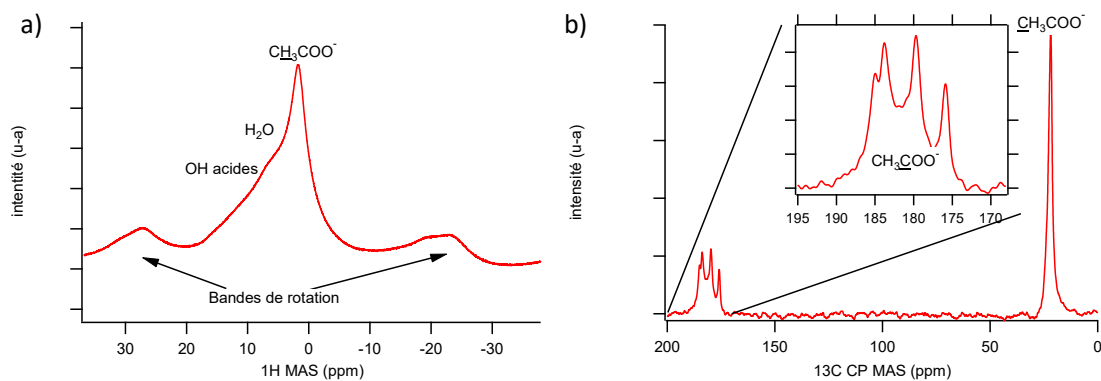


Figure 47 Spectres RMN a) du proton en excitation directe et b) du carbone en polarisation croisée de la poudre atomisée

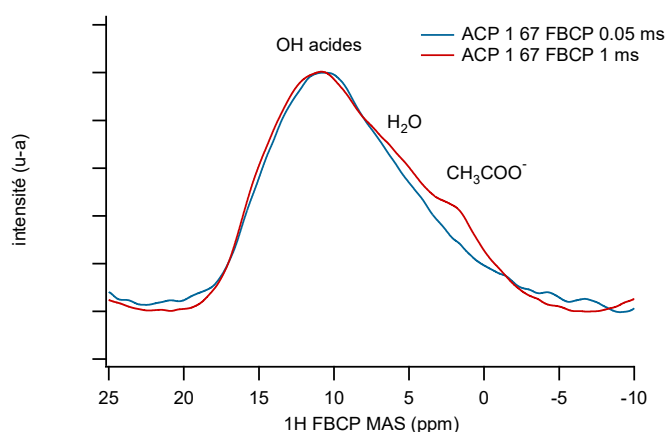


Figure 48 Spectres RMN en polarisation croisée *aller retour* du proton ($1\text{H}\{-^{31}\text{P}\}-1\text{H}$) avec un premier temps de contact de 1 ms et un second de 1 ms (rouge) et 50 μs (bleue)

L'analyse infrarouge du matériau atomisé (Figure 49) révèle la présence des bandes caractéristiques des orthophosphates ; deux bandes à 1058 et 1095 cm^{-1} (bandes 3 et 4 Figure 49 ii) attribuées à la vibration $\nu_3\text{PO}_4$. La bande à 870 cm^{-1} (bande 0 Figure 49 ii) correspondant à une vibration de l'ion HPO_4^{2-} et enfin la bande à 540 cm^{-1} (bande 1 Figure 49 iii) peut être également associée à l'hydrogénophosphate alors que la bande à 570 cm^{-1} (bande 0 Figure 49 iii) est associée au phosphate. Du fait de la faible organisation de ce matériau, les phosphates ont des environnements très variables c'est pourquoi ces bandes sont mal définies. Le composé formé par atomisation séchage peut donc être associé à un phosphate de calcium amorphe.

Cependant nous observons également une large bande à 1650 cm^{-1} (bande 5 Figure 49 i) ainsi qu'une autre vers 3500 cm^{-1} attribuées à la vibration des liaisons OH de l'eau. Sur cette dernière bande large, nous pouvons également observer des épaulements à 3012 et 2927 cm^{-1} attribués aux liaisons CH_3 . D'autres groupements comme les ions carbonate (COO^-) sont identifiés via leurs bandes de vibration à 1610 cm^{-1} , 1563 cm^{-1} , 1455 cm^{-1} et 1450 cm^{-1} (bandes 4, 3, 2 et 1 Figure 49 (i) respectivement). Les liaisons CH_3 sont aussi représentées par les bandes à 1425 cm^{-1} (bande 0 Figure 49 i) et 1030 cm^{-1} (bande 2 Figure 49 ii). Enfin la présence de liaisons OCO est mise en évidence par l'épaulement à 945 cm^{-1} (bande 1 Figure 49 ii) et les bandes à 670 cm^{-1} , 660 cm^{-1} , 644 cm^{-1} , et 615 cm^{-1} (bandes 5, 4, 3 et 2 respectivement Figure 49 iii). Ces données correspondent à la formation simultanée de phosphate de calcium, qui était attendue mais également à celle d'acétate de calcium.

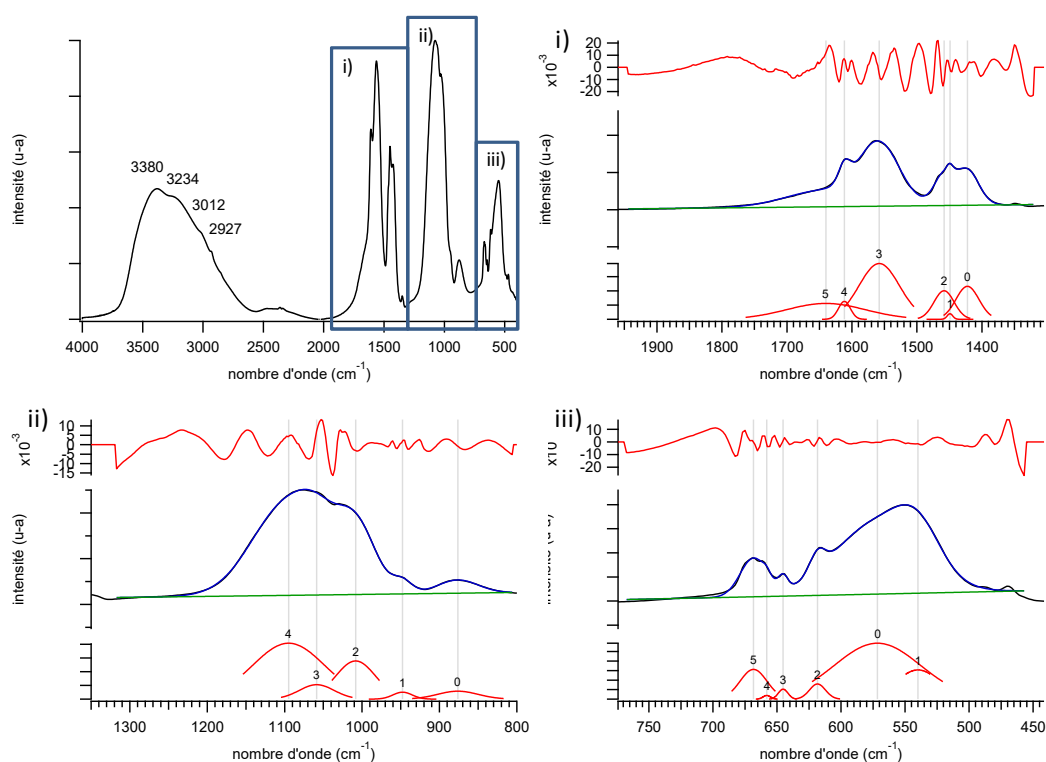


Figure 49 Spectre infrarouge du matériau amorphe et ses déconvolutions sur les fenêtres 2000-1300 (i), 1300-800 (ii) et 800-400 cm^{-1} (iii)

Le spectre Raman entre 910 et 990 cm^{-1} présente une large bande de vibration combinée avec quatre autres pics (Figure 50). Après déconvolution, il apparaît que la bande principale est centrée sur la valeur de 951 cm^{-1} qui est attribuée à la vibration $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ et est caractéristique d'un orthophosphate de calcium amorphe [17]. Les bandes additionnelles situées à 929 , 951 , 958 et 966 cm^{-1} sont attribuées à la présence de la liaison C-C et à sa vibration d'élongation au

sein de la fonction acétate d'un sel d'acétate de calcium. La présence de quatre bandes permet, de plus, de préciser que cet acétate de calcium est semi hydraté confirmant ainsi l'hypothèse faite dans le paragraphe précédent.

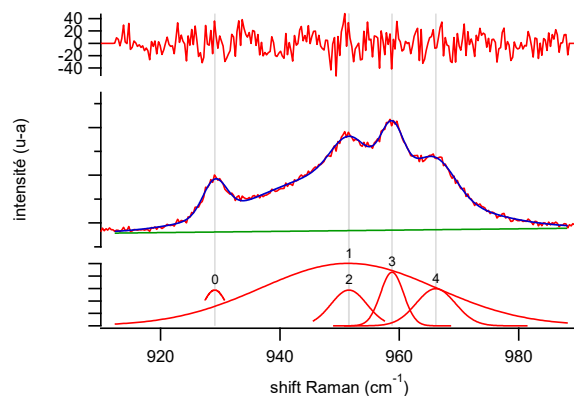


Figure 50 Proposition de déconvolution du spectre Raman de la poudre d'ACP 1,67

Pour déterminer la quantité en excès d'acétate, nous avons réalisé une étude thermogravimétrique sur la poudre obtenue après atomisation. Sur la courbe dérivée de la perte de masse, nous déterminons un premier maximum à 90 °C, un second à 158 °C, un troisième à 330 °C, un quatrième à 400 °C et enfin un dernier à 875 °C. Ces pertes de masses sont respectivement associées à la perte de l'eau libre, liée et cristalline de l'échantillon, à la décomposition de l'acétate de calcium et enfin à la décomposition de carbonates. Une perte de 13,5 % d'eau est détectée entre 25 et 235 °C. La perte de masse de 7,7 % enregistrée entre 335 et 550 °C permet de quantifier l'excès d'acétate de calcium à hauteur de 22 % de la masse de la poudre. Par extension, nous pouvons calculer que le rapport Ca/P du phosphate de calcium est proche de 1,3 (c.f. matériels et méthodes).

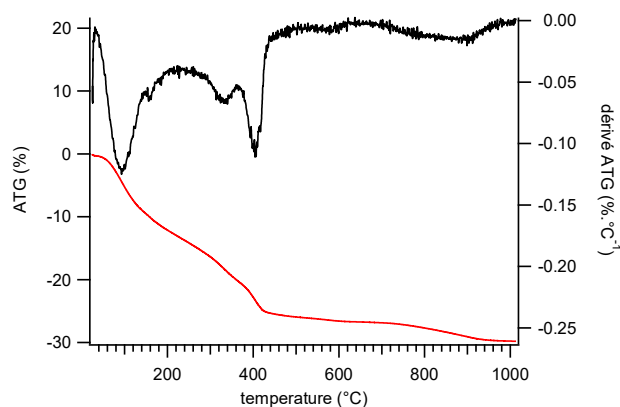


Figure 51 Courbes ATG (en rouge) et dérivée de l'ATG (en noir) de la poudre entre 25 et 1000 °C

III.2.3.3 Evolution thermique et en solution de la poudre atomisée

La Figure 52 présente l'analyse ATD de la poudre entre 25 et 1000 °C. Deux phénomènes endothermiques sont présents à 96 °C et à 156 °C, un pic large exothermique à 340 °C ainsi qu'un pic exothermique plus fin à 404 °C sont également visibles sur cette courbe ATD. Enfin un phénomène diffus apparaît entre 600 et 800 °C et un plateau est atteint entre 900 et 1000 °C. Afin d'interpréter cette courbe ATD, nous avons fait des analyses complémentaires (infrarouge et diffraction) à 500 °C et 1000 °C.

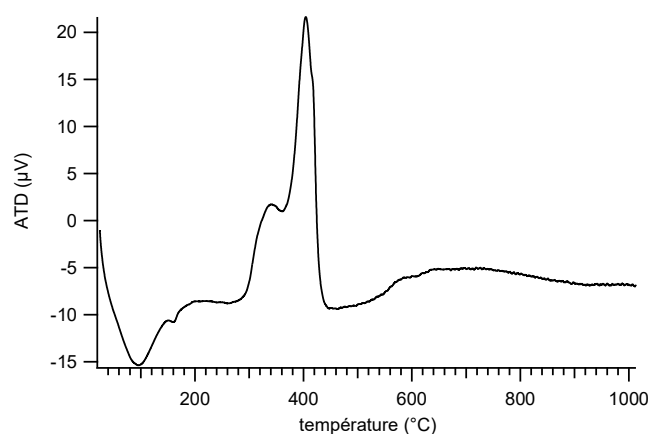


Figure 52 Courbe ATD de la poudre entre 25 et 1000 °C

Le diffractogramme de la poudre après traitement thermique à 500 °C (Figure 53 a) montre la présence d'une phase apatitique mal cristallisée. Ce minéral est carbonaté comme le spectre infrarouge (Figure 53 b) le démontre. La présence de carbonates est en effet identifiée grâce aux bandes vers 1450-1550 cm^{-1} et 875 cm^{-1} .

Ces résultats permettent d'identifier les divers événements observés sur la courbe ATD : l'absence des bandes de vibration de l'eau ainsi que de l'acétate en infrarouge indique que les deux phénomènes endothermiques observés avant 200 °C correspondent à la perte de l'eau et que le pic large exothermique correspond à la dégradation de l'acétate. Enfin, en accord avec la littérature, le pic exothermique fin observé vers 400 °C correspond à la cristallisation de carbonate de calcium. La phase amorphe phosphocalcique cristallise également en intégrant le carbonate de calcium à sa structure pour former une apatite carbonatée.

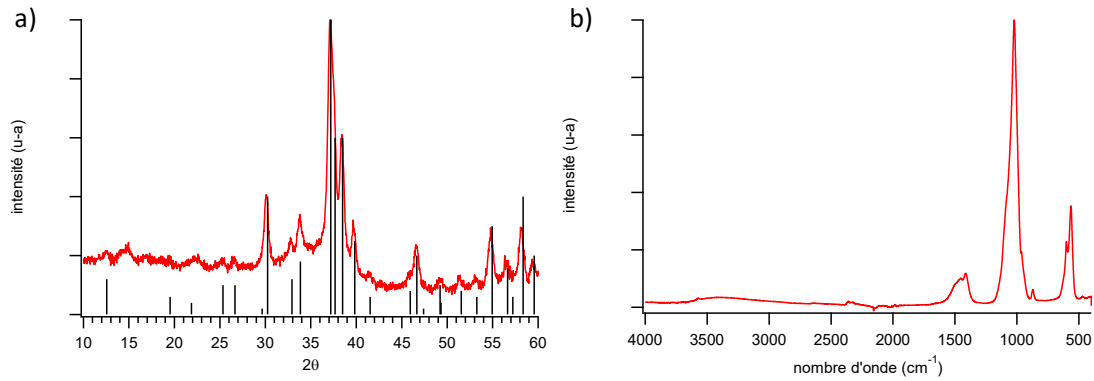


Figure 53 Diffractogramme (a) et spectre infrarouge (b) de la poudre après un traitement thermique à 500 °C

Après un traitement thermique à 1000 °C pendant 6H, le diffractogramme de la poudre (Figure 54 a) présente les pics caractéristiques de l'hydroxyapatite stœchiométrique (fiche JCPDS # 09-0432). L'absence de pics de CaO (notamment à 43,6 ° 2θ) et de β -TCP permet d'affirmer que le rapport atomique Ca/P de la poudre est de 1,67. Le spectre infrarouge (Figure 54 b) ne présente plus les bandes des ions carbonates alors que la présence des groupements hydroxyles caractéristiques de l'hydroxyapatite est révélée avec la vibration très fine et intense à 3570 cm^{-1} .

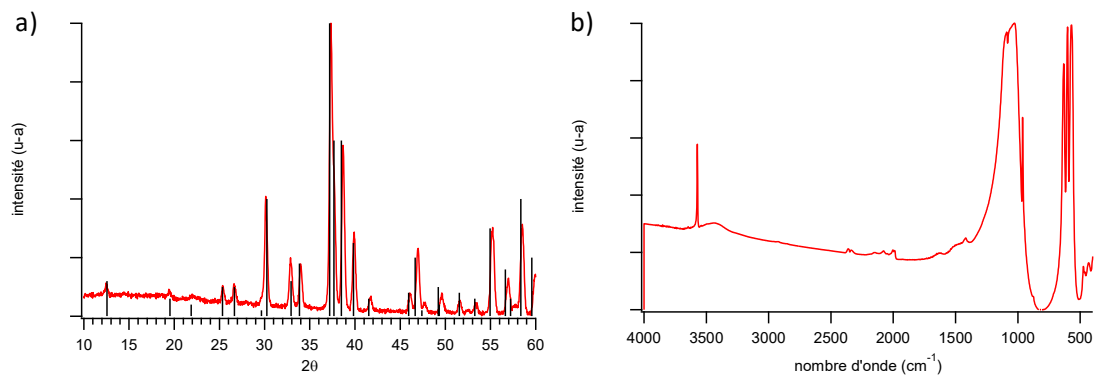


Figure 54 Diffractogramme (a) et spectre infrarouge (b) de la poudre après un traitement thermique à 1000 °C

Les phosphates de calcium amorphes évoluent en milieu aqueux et ceci est également vrai pour les échantillons de poudre atomisée comme le montre la Figure 55. Sur cette figure sont représentés la cinétique d'évolution de taille de grain de la poudre mise en suspension dans une eau déminéralisée ainsi que son évolution cristallographique et morphologique en fonction du temps. Nous pouvons constater que la distribution de tailles de grains de la première courbe est bimodale avec des valeurs de Dv_{10} , 50 et 90 respectives de 3,27, 7,17 et 26,4 μm . La présence

de particules d'une taille de l'ordre de la centaine de micromètres sur cette première courbe diffère de la distribution monomodale de tailles de grains de la poudre sèche et peut être attribuée à un début d'évolution. Cette évolution se poursuit avec la décroissance progressive de la plus petite population au profit de la plus grosse. La distribution de tailles de grains dans la suspension après une heure d'agitation est alors multimodale avec des valeurs de Dv_{10} , 50 et 90 respectives de 16,6, 93,2 et 203 μm . Après deux heures, ces valeurs sont de 49,2, 119 et 386 μm avec une distribution toujours multimodale. Nous observons un comportement asymptotique des valeurs de Dv_{10} et 50 tandis que le Dv_{90} semble augmenter de façon continue. La suspension évolue morphologiquement avec l'apparition de plaquettes enchevêtrées mais également d'un point de vue cristallographique avec l'apparition de pics de diffractions de la brushite et de l'apatite.

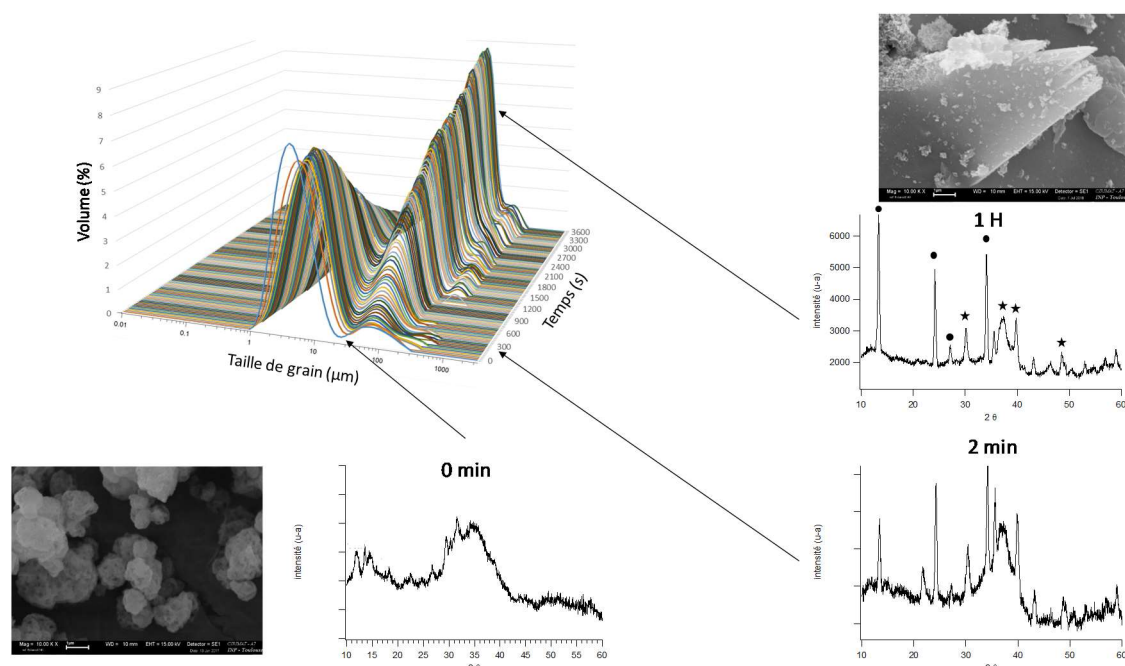


Figure 55 Cinétique d'évolution de la poudre en suspension dans une eau déminéralisée. Les points et les étoiles présents sur les diffractogrammes représentent respectivement les pics de diffractions de la brushite et de l'apatite.

Cette évolution cristallographique continue par la suite comme le montre la Figure 56 a). Nous pouvons constater sur cette figure que la suspension évolue lentement vers une apatite mal cristallisée au détriment de la phase brushitique. L'étude de la spectrométrie infrarouge (Figure 56 b) démontre également cette évolution notamment grâce à la décroissance des pics à 526 et 870 cm^{-1} attribués aux vibrations des ions hydrogénophosphates caractéristiques de la brushite.

Au vu des valeurs de pH variant de 5,6 à 5 au cours du temps, nous pouvons faire l'hypothèse que le phénomène qui entre en jeu dans cette cinétique d'évolution, est un phénomène de solubilisation-reprécipitation. L'amorphe se décomposerait alors pour former de la brushite en raison du pH acide du milieu. Cette brushite évoluerait aussi par un mécanisme de dissolution/reprécipitation en incorporant les ions calcium de l'acétate de calcium également solubilisé pour former une apatite mal cristallisée

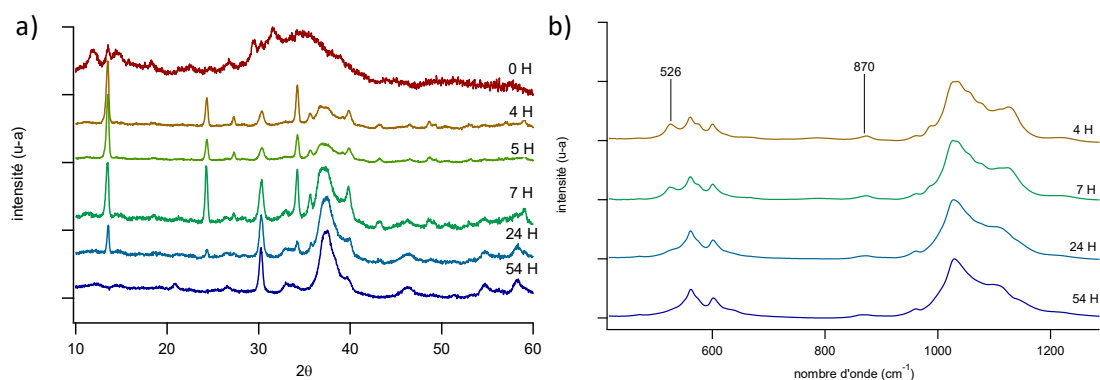


Figure 56 Evolution (a) : de la cristallographie et (b) : de la chimie de la suspension au cours du temps

III.2.4 Influence du rapport Ca/P

Nous avons montré dans le paragraphe précédent que l'atomisation d'une solution de phosphate de calcium avec un rapport Ca/P de 1,67 menait à la formation d'un matériau constitué de phosphate de calcium amorphe et d'acétate de calcium cristallisé. Nous avons également déterminé que le rapport Ca/P de la phase amorphe est d'approximativement 1,3. Dans ce paragraphe, nous allons faire varier le rapport Ca/P afin d'étudier son impact sur la morphologie ou la chimie de la poudre atomisée. Les différents rapports testés sont de 1,3, 1,5, 1,67 et 2 et les poudres qui résultent de leur atomisation sont respectivement appelées ACP 1,3, ACP 1,5, ACP 1,67 et ACP 2. Pour faire varier le rapport, seule la quantité d'acide phosphorique dans la solution a été modifiée comme décrit dans le chapitre « matériels et méthodes ».

III.2.4.1 Influence sur la morphologie des poudres atomisées

Macroscopiquement, les poudres obtenues après atomisation ont toutes une distribution de tailles de grain monomodale quel que soit le rapport Ca/P comme cela est visible sur Figure 57. Le Dv50 de ces poudres est de $2,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ avec une légère variabilité corrélée à l'augmentation du rapport Ca/P. Dans le cas de l'atomisation d'une solution, comme nous l'avons mentionné dans l'état de l'art, ce sont majoritairement les paramètres d'atomisation (taille de la buse, rapport débit d'air/débit liquide) et de séchage (température) à viscosité constante qui

définissent la taille des poudres ainsi que dans une moindre mesure la quantité d'espèces en solution. Nos solutions étant très largement diluées, elles ont toutes une viscosité proche de celle de l'eau, ce qui explique probablement leurs tailles très similaires.

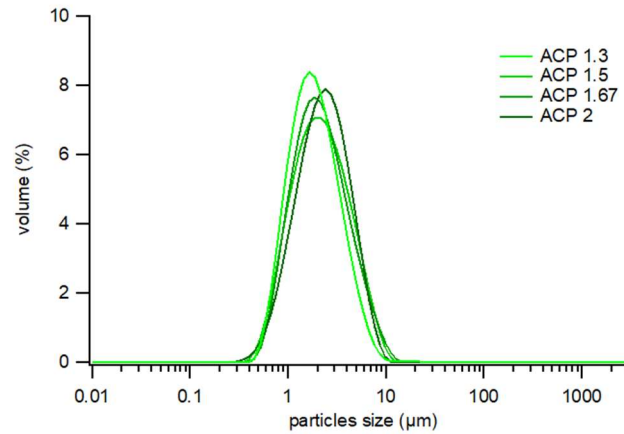


Figure 57 Répartition de taille de grain en fonction du rapport Ca/P

L'imagerie MEB nous permet de compléter la description des poudres obtenues par atomisation séchage. Nous observons sur la Figure 58 que la densité des grains de poudre diminue quand le rapport Ca/P est plus faible et rend plus visible les arrangements des nanoparticules. Ce résultat peut s'expliquer par l'apparition d'une espèce ou d'une phase visqueuse riche en ions dissous, avec l'augmentation du rapport Ca/P, comblant les pores laissés vacants par les arrangements des nanoparticules.

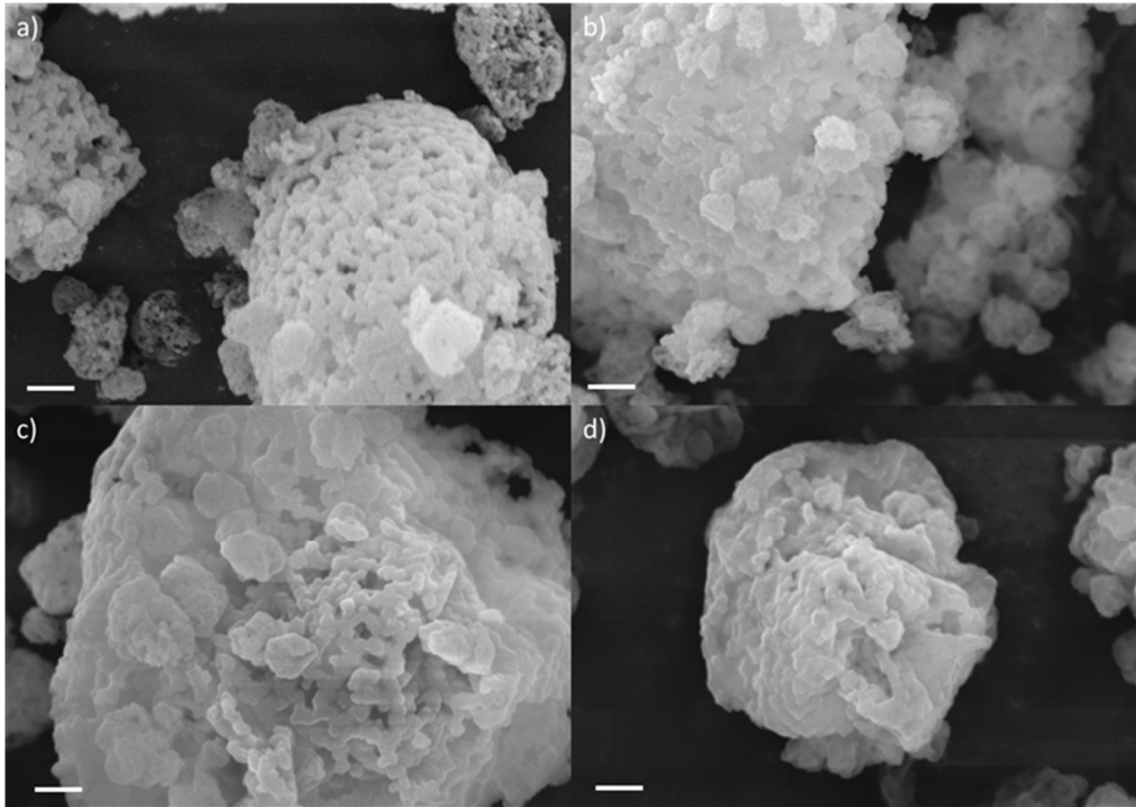


Figure 58 Images MEB des ACPs en fonction du rapport Ca/P. a : 1,3, b : 1,5, c : 1,67 et d : 2 (barre d'échelle 1 μm)

La Figure 59 présente des coupes transversales des grains de poudre pour deux rapports Ca/P : 1,3 (gauche) et 2 (droite). Nous pouvons ainsi confirmer dans un premier temps que les poudres avec le rapport le plus faible paraissent être moins denses dans le volume que les poudres avec le rapport le plus élevé (ce qui est en accord avec les observations précédentes). Dans un second temps, nous pouvons observer dans les deux cas que le contour des grains de poudre est bien délimité par une agglomération de chapelets.

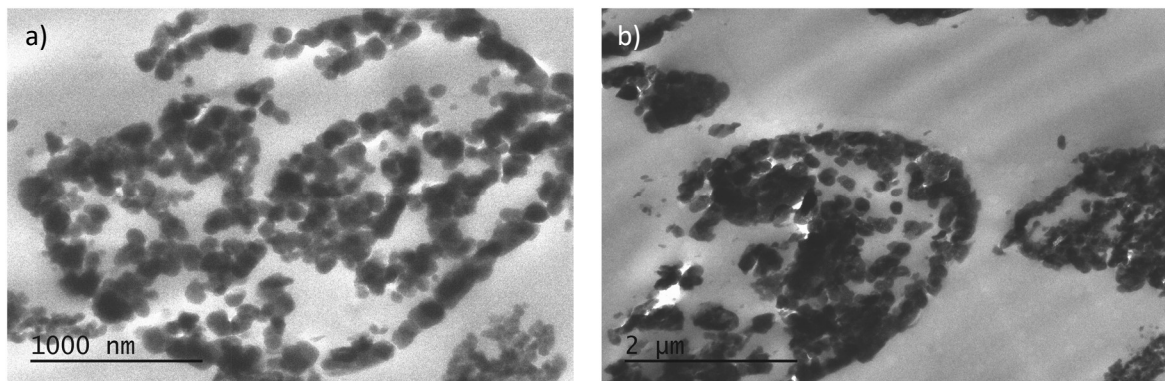


Figure 59 Images TEM des ACPs a) Ca/P = 1,3 et b) Ca/P = 2

L'analyse SAXS des particules avec les rapports 1,3, 1,5 et 2 (Figure 60) présente des valeurs similaires à celles du rapport 1,67 avec des valeurs d'ajustement du modèle de Beaucage reportées dans le Tableau 4. Nous observons également une augmentation de la diffraction avec le rapport Ca/P mais cette augmentation ne semble pas être liée à l'apparition d'une dimension caractéristique dans le matériau à l'échelle du SAXS. Nous pouvons également noter une augmentation de la fraction volumique (f_p) des clusters qui est associée à une modification de la concavité mise en évidence sur la Figure 61. Sur cette figure, nous pouvons constater que le changement de concavité dans le cas ACP 2 est plus marqué que dans le cas ACP 1,3. Ce type de courbe est habituellement obtenu quand les structures sont proches les unes des autres. Ainsi plus le rapport Ca/P augmente, plus les clusters sont rapprochés les uns des autres. Pour autant, les tailles des particules nanométriques ne sont pas modifiées excepté pour le rapport Ca/P de 2. Rappelons néanmoins que ces valeurs de R_g sont à relativiser du fait de l'erreur qui leur est associée.

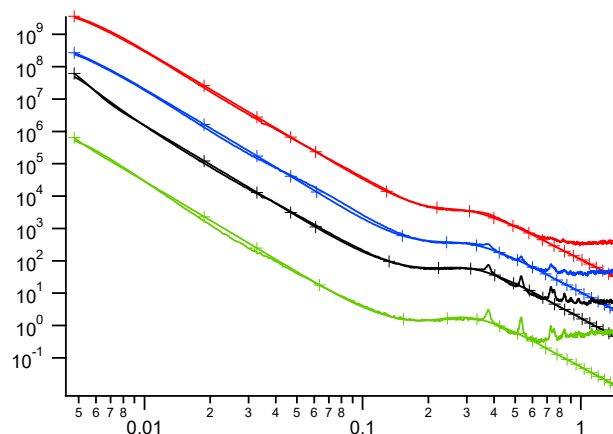


Figure 60 SAXS des ACPs. Rouge : ACP 1,3, bleu : ACP 1,5, noir : ACP 1,67 et vert : ACP 2

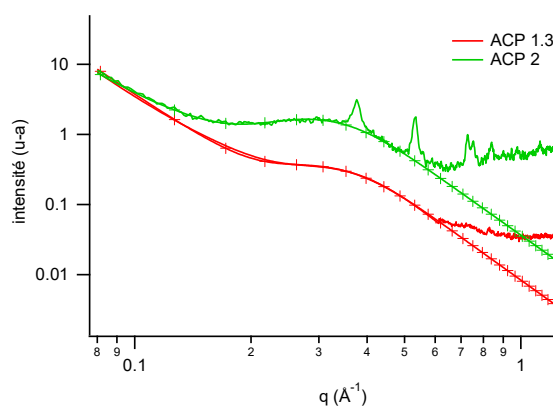


Figure 61 Zoom des courbes SAXS des ACP 1,3 et 2

Tableau 4 Tableau récapitulatif des données de correspondances entre le modèle de Beaucage et les différentes courbes

	Rg	P	Rsub	Rs	Ps	f_p
ACP 1,3	640	-4	9	10	-3,4	0.065
ACP 1,5	640	-4	11	10	-3,5	0.075
ACP 1,67	650	-4	10	10	-3,6	0.08
ACP 2	1000	-4	10	10	-3,6	0.08

Les analyses en diffraction des rayons X aux grands angles (Figure 62) montrent également le changement de diffraction du matériau en fonction du rapport Ca/P. Sur les PDF de ces diffractions (Figure 62), nous pouvons observer une diminution de l'intensité du premier pic à 0,04 Å corrélée avec l'augmentation du rapport Ca/P. Cette zone correspond à des distances liantes et implique que le matériau avec le rapport de 2 comprend plus d'éléments légers que le matériau avec le rapport 1,3. Dans les trois cas présentés sur cette figure, la distance de cohérence reste inchangée par rapport à celle obtenue pour l'ACP 1,67.

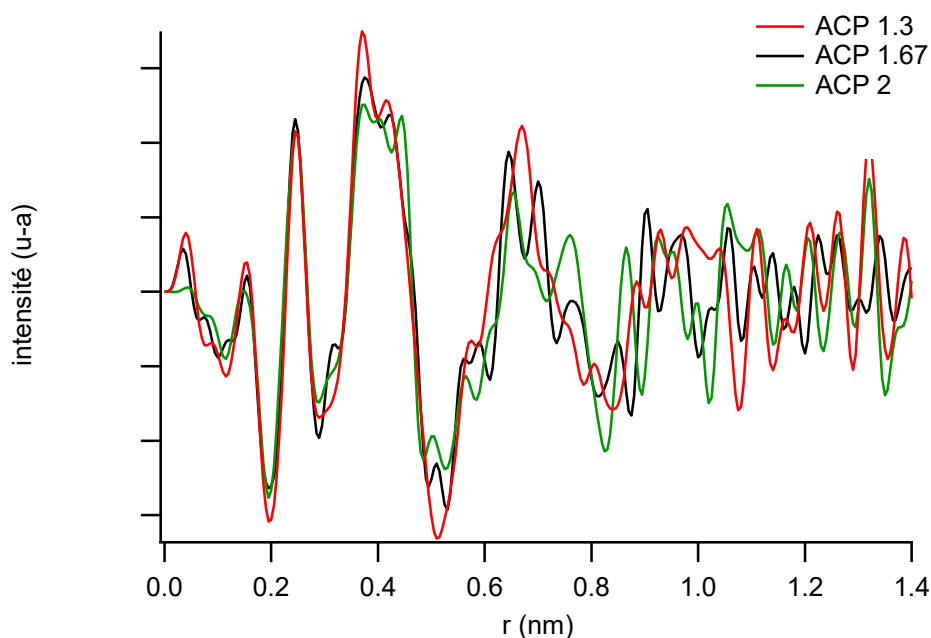


Figure 62 WAXS des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 (rouge), 1,67 (noir) et 2 (vert)

III.2.4.2 Influence sur la chimie

Les diffractogrammes des différents matériaux sont présentés sur la Figure 63. La première différence que nous pouvons constater est l'évolution des intensités des pics de l'acétate de calcium en fonction du rapport molaire Ca/P des ACPs. Nous pouvons de plus préciser que dans le cas du rapport 1,3, ces pics ne sont plus visibles. Il semblerait donc que ce rapport Ca/P soit bien celui qui correspond à la formation du phosphate de calcium sans recristallisation d'acétate de calcium.

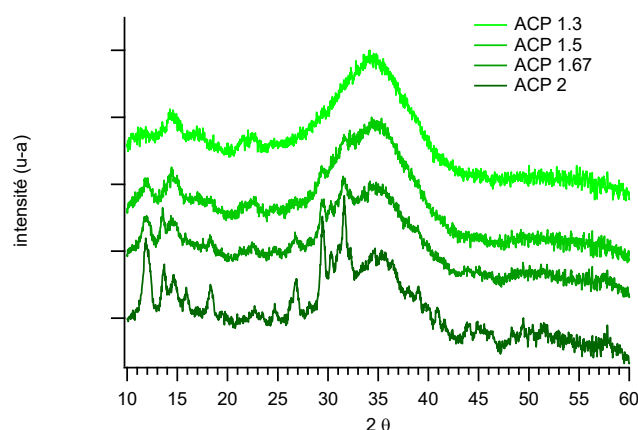


Figure 63 Diffractogrammes des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas)

L'analyse thermique des différents matériaux (Figure 64) nous montre également cette décroissance régulière de la quantité d'acétate de calcium. Les quantités d'acétate en excès sont de 6 %, 10 %, 22 % et 32 % pour les ACP 1,3, 1,5, 1,67 et 2 respectivement. Dans le cas d'un rapport molaire Ca/P de 1,3, nous n'observons pas de rupture de pente à 400 °C qui serait attendue dans le cas de la dégradation de l'acétate de calcium malgré une perte de masse à cette température.

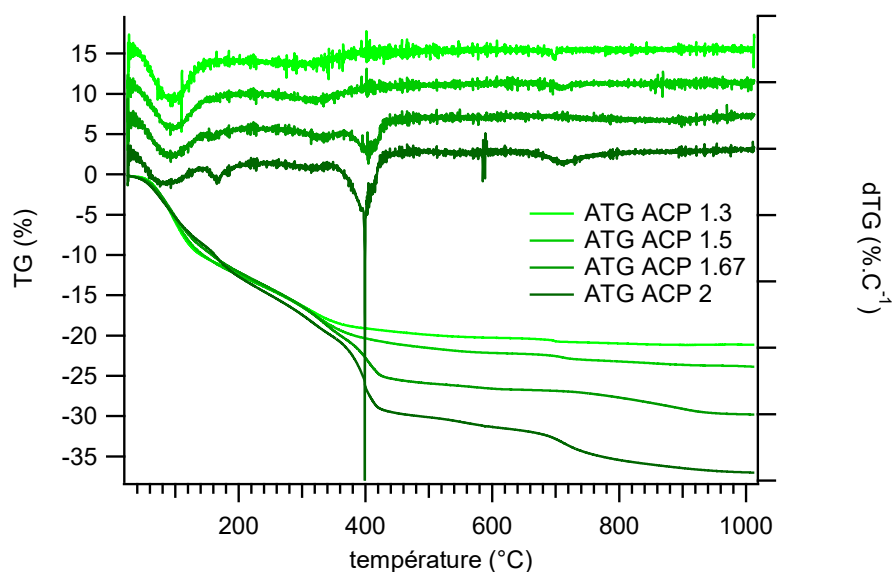


Figure 64 ATGs des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas)

Cependant les analyses vibrationnelles représentées par les spectres infrarouges et Raman (respectivement Figure 65 et Figure 66) montrent que pour le rapport Ca/P de 1,3, les bandes COO^- de l'acétate et les vibrations caractéristiques de la liaison CC de l'acétate sont toujours détectées. Les analyses RMN du proton et du carbone de l'ACP 1,3 (Figure 67) confirment la présence de l'acétate de calcium. Le spectre Figure 67 a) présente une intensité du signal du proton de l'acétate bien plus faible que dans le cas de l'ACP 1,67. La RMN du carbone (Figure 67 b), quant à elle, montre tout comme pour l'ACP 1,67 un déplacement chimique vers 180 ppm attribué au groupement COO^- de l'ion acétate. Cependant celui-ci est moins bien résolu que précédemment et correspondrait à un environnement amorphe. A l'instar des observations faites en polarisation croisée *aller-retour* ($1\text{H} \rightarrow 31\text{P} \rightarrow 1\text{H}$) avec l'ACP 1,67, nous pouvons observer sur la Figure 68 que pour des temps de contact de 1 ms, le proton de l'acétate répond contrairement au temps de contact de 0.5 ms ce qui traduit une proximité spatiale entre les atomes de phosphore et l'acétate. Cependant l'intensité des protons de l'acétate est plus faible pour un rapport Ca/P de 1,3 que pour un rapport de 1,67 du fait de la quantité moins importante de ce groupement dans la poudre.

La RMN du phosphore en polarisation croisée et en statique permet de prendre en compte l'anisotropie du matériau. La Figure 69 représente les résultats obtenus pour divers temps de contact. La variation de ce temps de contact fait apparaître deux contributions : un premier signal symétrique correspondant aux ions PO_4^{3-} et un second plus large correspondant aux ions HPO_4^{2-} . En effet, à des temps courts, les atomes de phosphores les plus proches des atomes

d'hydrogène répondent préférentiellement ce qui permet de définir la contribution large comme étant celle des hydrogénophosphates. Par simulation, en prenant en compte les deux anions, nous obtenons un rapport $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de 52/48 pour l'ACP 1,3.

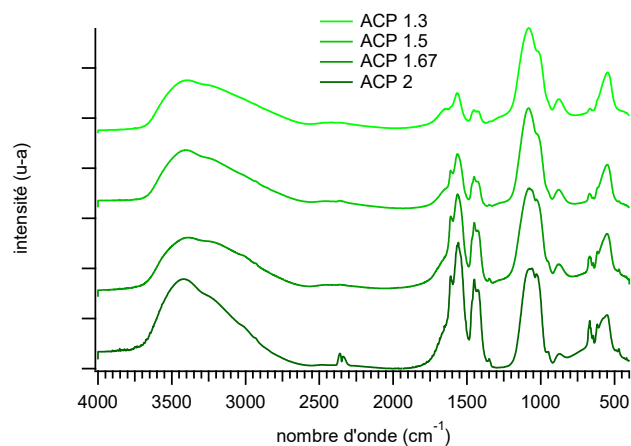


Figure 65 Spectres infrarouges des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas)

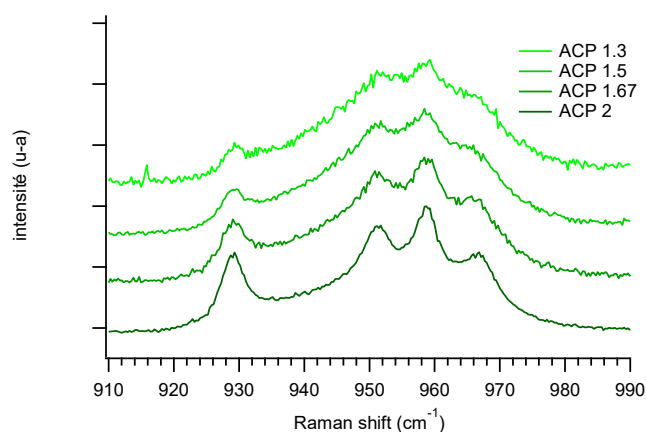


Figure 66 Spectres Raman des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas)

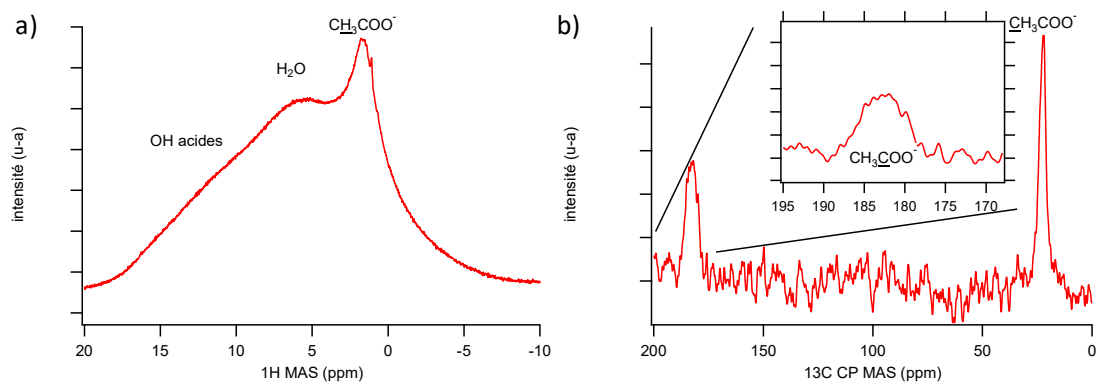
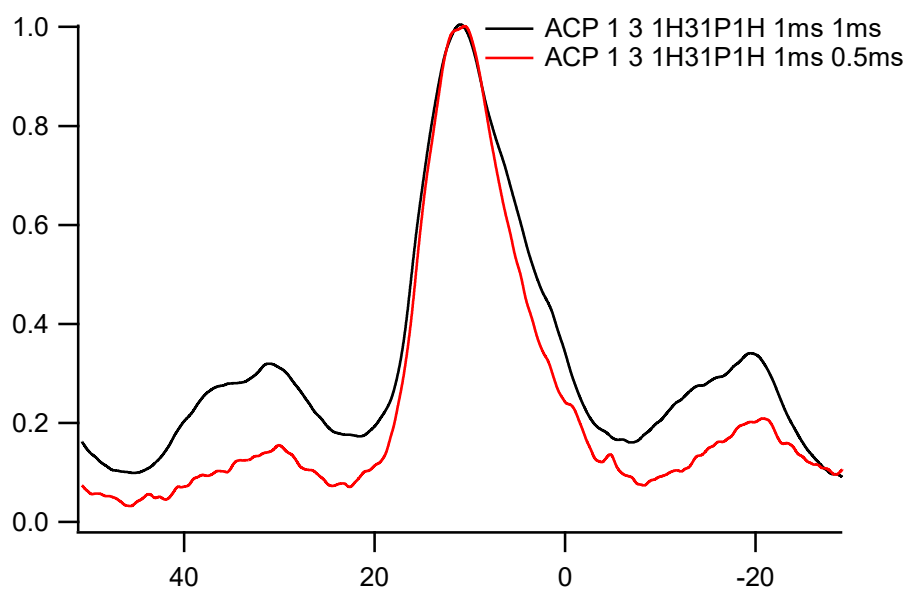
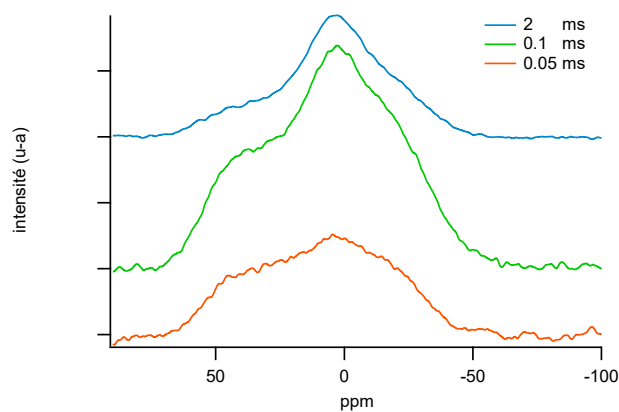

 Figure 67 a) RMN ^1H ACP 1,3 b) RMN ^{13}C CPMAS ACP 1,3

 Figure 68 Spectres RMN *aller retour* $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$ de l'ACP 1,3 à des temps de contact retour de 1 ms et 0,5 ms


Figure 69 Spectres RMN du phosphore en polarisation croisée et en statique avec différents temps de contact

III.3 Résumé

Les résultats de ce chapitre montrent que les particules d'hydroxyapatite stœchiométrique dispersées dans une solution acide à pH 5.4 se solubilisent partiellement. Jongebloed *et al.* [165] ont démontré que cette solubilisation partielle est anisotrope et se fait suivant l'axe cristallographique *c* des cristaux. Ce résultat laisse supposer une restructuration des cristallites correspondant à une minimisation de leur énergie de surface. Les particules d'apatite biomimétique ayant une taille plus petite que celles d'hydroxyapatite stœchiométrique et une plus haute réactivité, la solubilisation est plus rapide et complète. Dans les deux cas, la solubilisation, qu'elle soit partielle ou totale, mène, après atomisation de ces suspensions, à la réprécipitation dans une phase amorphe phosphocalcique. Notons que cette phase amorphe peut contenir des ions hydrogénophosphates contrairement au matériau initial. La présence de ces ions est due au pH acide de la solution. La phase amorphe n'est pas pure, en effet les épaulements visibles sur le diffractogramme de l'apatite biomimétique atomisée marquent la présence d'une autre phase. Ces résultats sont conformes à ceux présentés par l'équipe du professeur L.C. Chow. Dans leur étude [148], la DRX du matériau atomisé présente également quelques pics de diffraction non attribuables à une phase phosphocalcique mais les auteurs ne proposent pas d'identification. Pour expliciter la formation de cette phase phosphocalcique amorphe, nous avons donc réalisé l'atomisation d'une solution de précurseurs reproduisant la composition chimique résultant de la solubilisation de l'apatite biomimétique dans une solution d'acide acétique.

Ainsi l'atomisation d'une solution contenant de l'acétate de calcium et de l'acide phosphorique mène à un mélange d'une phase amorphe de phosphate de calcium (établie par l'existence des bandes de vibration présentes en spectroscopie infrarouge ainsi qu'en spectroscopie Raman et caractéristiques de cet environnement) et d'un acétate de calcium hémi hydraté et cristallisé. L'acétate de calcium semi-hydraté précipite, en effet, dans des conditions de température supérieures à 58 °C. Cette condition est très clairement atteinte dans le début du procédé d'atomisation. Nous avons également pu constater que la quantité d'acétate de calcium en excès dépend du rapport molaire Ca/P utilisé dans la solution. Quand ce rapport est inférieur ou égal à 1,3, l'acétate de calcium n'est plus détectable en DRX. L'analyse thermique ne permet pas non plus de mesurer une variation significative de la pente de la perte de masse à 400 °C (température caractéristique de la dégradation de l'acétate de calcium). Cependant les analyses vibrationnelles (IRTF et Raman) prouvent la présence de fonctions organiques caractéristiques

de l'acétate de calcium ce qui démontre que même si elle n'est pas cristallisée, la molécule d'acétate (CH_3COO^-) est présente. L'analyse RMN supporte également cette conclusion par la présence d'une bande vers 200 ppm attribuée au carbone fonctionnel de l'acétate. Cependant la largeur de la bande contraste avec la finesse des bandes observées dans le cas de matériaux cristallins. Ainsi l'acétate présent dans le matériau dont le rapport molaire Ca/P est de 1,3 n'est pas cristallisé (à ne pas confondre avec l'acétate de calcium amorphe). De plus la décroissance monotone de la quantité d'acétate de calcium en fonction du rapport molaire Ca/P de la solution atomisée permet de supposer que ce produit se forme dans un second temps après la formation de la phase amorphe de phosphate de calcium. Le phosphate de calcium amorphe précipité dans ces conditions présenterait alors un rapport atomique Ca/P quasi constant proche de 1,3. Nous proposons que la formation du matériau se déroule de la façon suivante : une fois le phosphate de calcium formé, des molécules d'acétate sont adsorbées à la surface du phosphate de calcium. Cette adsorption peut résulter de plusieurs effets. Nous avons mentionné que le phosphate de calcium amorphe avait un rapport $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de 1,08 ce qui correspondrait à un rapport Ca/P hypothétique de 1,25. Le rapport Ca/P de la solution d'atomisation étant de 1,3, il y a dans le matériau atomisé un léger excès de calcium. En faisant l'hypothèse que tout le calcium est impliqué dans la formation du phosphate de calcium, l'acétate peut alors s'adsorber à la surface du cluster pour neutraliser l'excès de Ca^{2+} . Ces molécules servent alors de point de germination pour la croissance d'acétate de calcium. Quand le rapport Ca/P dépasse la valeur de 1,3, le phosphore n'étant plus disponible, le calcium en solution cristallise avec les molécules d'acétate adsorbées à la surface des ACPs et le cristal d'acétate croît ainsi. La faible intensité des pics de diffraction de l'acétate de calcium dans le mélange minéral et leur largeur à mi-hauteur importante indiquent que cette phase est mal cristallisée avec des cristallites de petites tailles. De plus l'analyse WAXS montre que la proportion d'acétate de calcium est très faible dans le matériau et que sa présence ne modifie pas l'ordre cristallin de la poudre finale. De plus, le fait que les R_{sub} des ACP 1,3, 1,5, 1,67 et 2 en SAXS ne soient pas différents indique que si l'acétate se fixe au phosphate de calcium, il ne se fixe pas sur les clusters. Nous pouvons donc supposer que les nanoparticules de phosphate de calcium amorphe se forment puis que l'acétate de calcium en excès cristallise à leur surface.

La précipitation des particules minérales débute par la formation des phosphates de calcium amorphes puis les autres composés se forment en fonction de la disponibilité des ions. Nous avons vu que les ACPs se structuraient en clusters de 1 nm assemblés en nanoparticules elles-mêmes structurées en chapelets et agglomérés en particules micrométriques. Ces clusters ont déjà été observés dans les travaux de Brecevic *et al.* [90] ainsi que leur propension à s'organiser

en chapelets. Le fait que l'augmentation du rapport Ca/P soit à la fois corrélé à l'augmentation de la quantité d'acétate de calcium et à un regroupement des clusters amorphes peut laisser supposer que l'acétate de calcium en excès cristallise en périphérie des nanoparticules phosphocalciques et contribue à ce regroupement. Cette déduction est également corroborée par les observations faites en microscopie. La densification des particules micrométriques est ainsi associée à la formation de l'acétate de calcium à la surface des nanoparticules.

Liste des figures

Figure 22 a) image MEB des particules d'hydroxyapatite après broyage et b) leur distribution de taille de grain	55
Figure 23 a) Spectre infrarouge de l'hydroxyapatite broyée et b) DRX de cette poudre comparée à la fiche JCPDS # 09-0432	55
Figure 24 Evolution de la taille des particules d'hydroxyapatite en suspension acide en fonction du temps	56
Figure 25 a) image MEB de la poudre obtenue après atomisation de la suspension d'hydroxyapatite et b) diffractogramme de la poudre avant (HAp) et après (HAp SD) atomisation comparés à la fiche JCPDS # 09-0432	57
Figure 26 Distribution de taille de grain de la poudre obtenue après atomisation (HAp SD).....	57
Figure 27 Spectres infrarouges de l'hydroxyapatite avant atomisation (HAp) et après atomisation (HAp SD)	58
Figure 28 Images MEB des particules d'apatites synthétisées et lyophilisées.....	59
Figure 29 Distribution de taille des grains d'apatites biomimétiques et lyophilisés.....	59
Figure 30 Diffractogramme de l'apatite synthétisée comparé à la fiche standard JCPDS # 09-0432.....	60
Figure 31 Spectre infrarouge de l'apatite biomimétique.....	61
Figure 32 Image MEB et diffractogramme de l'apatite biomimétique avant (nHAp) et après (nHAp SD) atomisation	62
Figure 33 Distribution en taille de la poudre obtenue par atomisation d'une suspension d'apatite biomimétique.....	62
Figure 34 Spectres infrarouges des poudres d'apatites biomimétiques avant (nHAp) et après (nHAp SD) atomisation	62
Figure 35 Diffractogrammes de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation.....	64
Figure 36 Spectres infrarouges de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation	65
Figure 37 Spectres Raman de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation.....	66
Figure 38 ATG de l'acétate de calcium avant (CA) et après (CA SD) atomisation.....	67
Figure 39 Distribution de taille de grain de la poudre obtenue après atomisation d'une solution de précurseurs de phosphate de calcium	68
Figure 40 Images MEB des particules obtenues après atomisation d'une solution comprenant les précurseurs de phosphate de calcium	69
Figure 41 Image MET d'une tranche de 70 nm de profondeur des particules obtenues par atomisation de la solution de précurseur.....	70
Figure 42 Evolution des nanoparticules sous le faisceau (80 kV) à t = 0 (gauche) et t= 5 min (droite). L'acquisition a été faite en faisant la mise au point dans une zone proche de la zone d'intérêt puis en déplaçant l'échantillon pour avoir une image avec le moins d'artefacts possible.....	70
Figure 43 Courbe SAXS de l'intensité diffusée par le matériau en fonction du vecteur de diffusion	71

<i>Figure 44 Fonction de distribution de paires d'atomes de la poudre atomisée. La longueur de cohérence du matériau est représentée par les pointillés.</i>	<i>72</i>
<i>Figure 45 Diffractogramme de l'ACP 1,67 comparé à celui de l'acétate de calcium atomisé</i>	<i>73</i>
<i>Figure 46 Spectre RMN du phosphore en polarisation croisée de l'ACP 1,67</i>	<i>74</i>
<i>Figure 47 Spectres RMN a) du proton en excitation directe et b) du carbone en polarisation croisée de la poudre atomisée.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 48 Spectres RMN en polarisation croisée aller retour du proton ($1H\{-^{31}P\}-1H$) avec un premier temps de contact de 1 ms et un second de 1 ms (rouge) et 50 μs (bleue).....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 49 Spectre infrarouge du matériau amorphe et ses déconvolutions sur les fenêtres 2000-1300 (i), 1300-800 (ii) et 800-400 cm^{-1}(iii)</i>	<i>76</i>
<i>Figure 50 Proposition de déconvolution du spectre Raman de la poudre d'ACP 1,67</i>	<i>77</i>
<i>Figure 51 Courbes ATG (en rouge) et dérivée de l'ATG (en noir) de la poudre entre 25 et 1000 °C.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 52 Courbe ATD de la poudre entre 25 et 1000 °C</i>	<i>78</i>
<i>Figure 53 Diffractogramme (a) et spectre infrarouge (b) de la poudre après un traitement thermique à 500 °C.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 54 Diffractogramme (a) et spectre infrarouge (b) de la poudre après un traitement thermique à 1000 °C.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 55 Cinétique d'évolution de la poudre en suspension dans une eau déminéralisée. Les points et les étoiles présents sur les diffractogrammes représentent respectivement les pics de diffractions de la brushite et de l'apatite.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 56 Evolution (a) : de la cristallographie et (b) : de la chimie de la suspension au cours du temps.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 57 Répartition de taille de grain en fonction du rapport Ca/P</i>	<i>82</i>
<i>Figure 58 Images MEB des ACPs en fonction du rapport Ca/P. a : 1,3, b : 1,5, c : 1,67 et d : 2 (barre d'échelle 1 μm).....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 59 Images TEM des ACPs a) Ca/P = 1,3 et b) Ca/P = 2</i>	<i>83</i>
<i>Figure 60 SAXS des ACPs. Rouge : ACP 1,3, bleu : ACP 1,5, noir : ACP 1,67 et vert : ACP 2.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 61 Zoom des courbes SAXS des ACP 1,3 et 2.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 62 WAXS des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 (rouge), 1,67 (noir) et 2 (vert).....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 63 Diffractogrammes des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas)</i>	<i>86</i>
<i>Figure 64 ATGs des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas)</i>	<i>87</i>
<i>Figure 65 Spectres infrarouges des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas).....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 66 Spectres Raman des ACPs avec les rapports Ca/P de 1,3 à 2 (de haut en bas).....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 67 a) RMN 1H ACP 1,3 b) RMN ^{13}C CPMAS ACP 1,3</i>	<i>89</i>
<i>Figure 68 Spectres RMN aller retour $1H\rightarrow^{31}P\rightarrow 1H$ de l'ACP 1,3 à des temps de contact retour de 1 ms et 0,5 ms</i>	<i>89</i>
<i>Figure 69 Spectres RMN du phosphore en polarisation croisée et en statique avec différents temps de contact.....</i>	<i>89</i>

<i>Tableau 3 Attribution des bandes du spectre infrarouge de l'acétate de calcium</i>	<i>65</i>
<i>Tableau 4 Tableau récapitulatif des données de correspondances entre le modèle de Beaucage et les différentes courbes</i>	<i>85</i>

Chapitre 4 : Synthèse et caractérisation du matériau composite

IV.1	<i>Caractérisation de la phase organique</i>	<i>98</i>
IV.1.1	Caractérisation du polymère avant atomisation.....	98
IV.1.2	Effet de l'atomisation sur le chitosane.....	100
IV.2	<i>Caractérisation du matériau composite.....</i>	<i>103</i>
IV.2.1	Suspension	103
IV.2.2	Solution	108
IV.3	<i>Résumé</i>	<i>122</i>
	<i>Liste des figures.....</i>	<i>124</i>

Ce chapitre traite de l'élaboration du matériau composite chitosane/phosphate de calcium suivant deux stratégies : l'atomisation d'une suspension de phosphate de calcium dans une solution de chitosane et l'atomisation d'une solution comprenant les précurseurs de phosphates de calcium et le chitosane solubilisé. Dans un premier temps, nous avons établi l'impact du procédé sur le polymère seul puis nous avons porté notre attention sur la formation du matériau composite. Nous avons cherché à caractériser l'effet de la stratégie sur la répartition des phases au sein du matériau composite et à décrire les interfaces et interactions entre le polymère et la phase minérale.

IV.1 Caractérisation de la phase organique

IV.1.1 Caractérisation du polymère avant atomisation

Avant atomisation, le chitosane se présente sous la forme de paillettes ayant une distribution de tailles bimodale présentant un maximum autour de 130 μm avec une contribution mineure à 2 μm . Le diffractogramme du chitosane (Figure 70) présente un pic mal résolu à 12 $^{\circ}2\theta$ indiquant un degré de déacétylation élevé [166], un pic très large et asymétrique centré à 23 $^{\circ}2\theta$ avec un épaulement à 26 $^{\circ}2\theta$ ainsi que trois autres contributions à 34, 42 et 45 $^{\circ}2\theta$ caractéristiques de son état semi-cristallin [167].

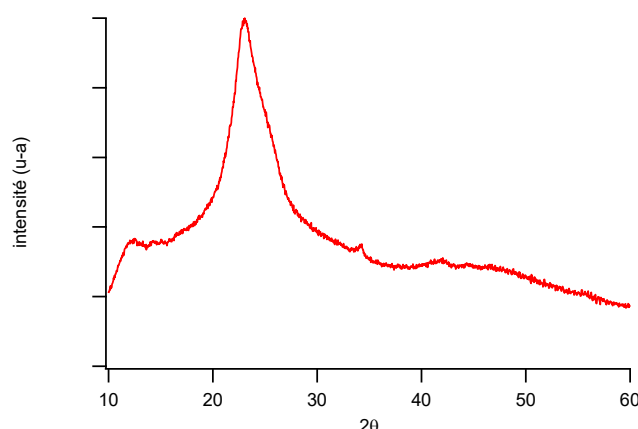


Figure 70 Diffractogramme du chitosane commercial

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Figure 71) permet d'identifier les différentes fonctions chimiques présentes dans le polymère. Ainsi la bande large vers 3300 cm^{-1} est attribuée à la présence d'eau. La présence de la fonction amide est révélée par les bandes à 2885 (1_i), 1655 (7_{ii}), 1560 (6_{ii}), 1381 (2_{ii}) (contribution mineure) et 1325 (1_{ii}) cm^{-1} respectivement associées aux liaisons CH_3 , C=O , NH , CH_3 et CN . L'amine, quant à elle, est confirmée par la présence de la bande à 1594 (5_{ii}) cm^{-1} . Les fonctions alcool des sucres sont visibles via les vibrations à 1453 (4_{ii}), 1421 (3_{ii}) et 1381 (2_{ii}) (contribution majeure) cm^{-1} . Les bandes à 1162 (5_{iii}), 1075 (4_{iii}), 1025 (3_{iii}), 988 (2_{iii}) et 939 (1_{iii}) cm^{-1} sont attribuées aux liaisons CO et plus particulièrement aux ponts COC (x2) ainsi qu'aux liaisons C-OH du carbone C3 (x2) et C6 du motif du chitosane.

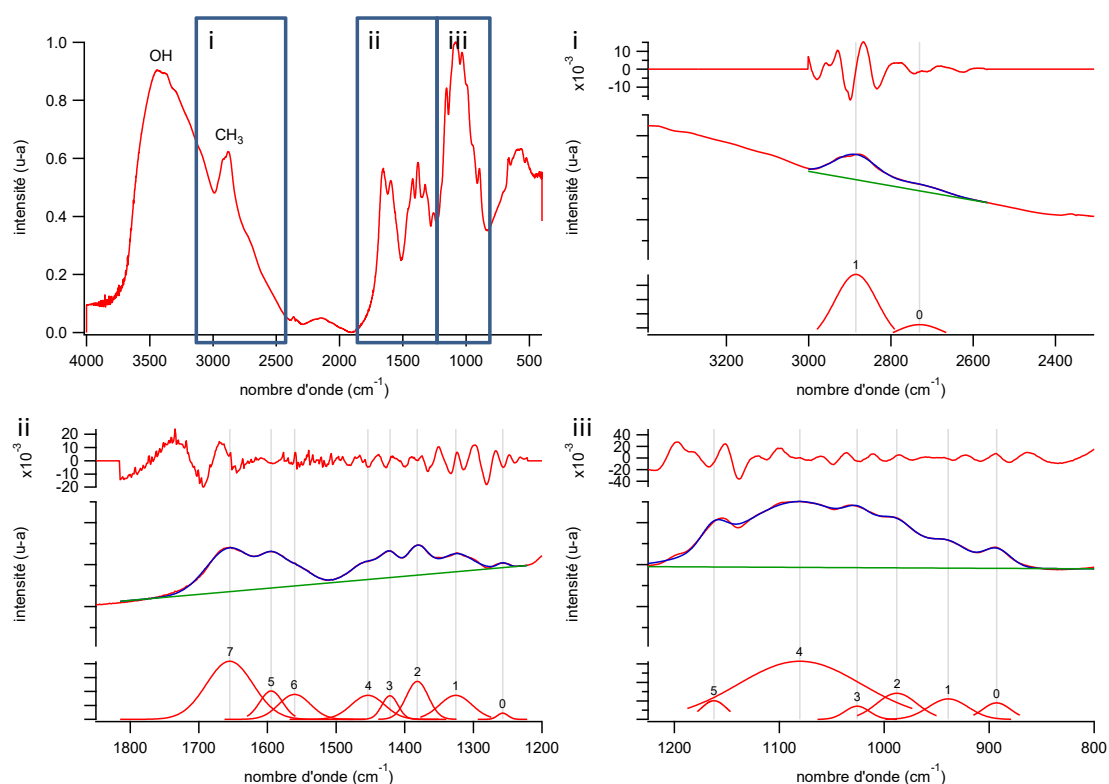


Figure 71 Proposition de déconvolution du chitosane

Le chitosane utilisé pour ces travaux est un chitosane à bas poids moléculaire commercialisé par Sigma-Aldrich dont la masse molaire, selon le fournisseur, est comprise entre 50 et 190 kDa. L'analyse thermogravimétrique montre un maximum de dégradation du chitosane à 275 °C correspondant à une gamme de poids moléculaire entre 100 et 200 kDa [116]. La valeur du poids moléculaire est précisée par analyse SEC et est égale à 120 kDa. Cette analyse permet, de plus, de démontrer que ce chitosane commercial est caractérisé par une dispersité $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ de 1,2. Cette très faible valeur de dispersité pour un polymère issu de la biomasse peut être expliquée par les procédés utilisés industriellement pour sélectionner les bas poids moléculaires.

Le degré de déacétylation est usuellement évalué à partir du spectre RMN du carbone du polymère (*cf* matériels et méthodes) (Figure 72). Dans notre cas il est estimé à $88 \pm 2\%$. Une autre méthode pour déterminer ce degré est d'utiliser les spectres infrarouges. De nombreuses solutions s'offrent à nous car le principe de base consiste à calculer le rapport entre l'aire sous un pic caractéristique de l'amide et l'aire sous un pic caractéristique de l'amine. En utilisant le rapport A_{1655}/A_{2885} régulièrement rencontré dans la littérature [110,168,169] avec les lignes de bases utilisées dans la déconvolution proposée plus haut, nous obtenons une valeur de 91 % de déacétylation qui coïncide avec la valeur obtenue par RMN.

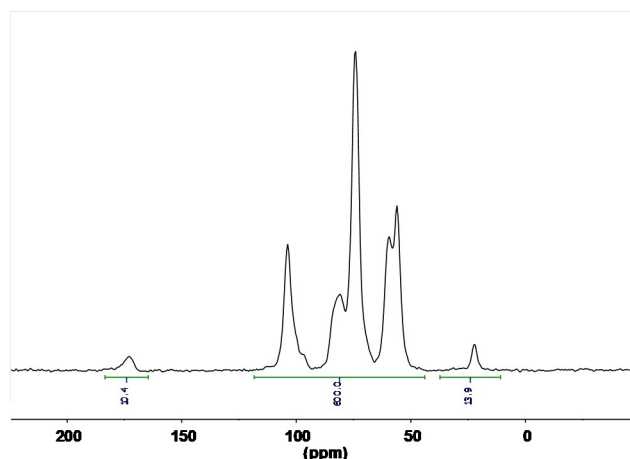


Figure 72 Spectre RMN du chitosane avant atomisation

IV.1.2 Effet de l'atomisation sur le chitosane

Les particules de chitosane après atomisation ont un aspect de grain collapsé (Figure 73 a). La Figure 73 b montre une diminution d'intensité du pic de diffraction du polymère après atomisation ainsi qu'un élargissement de celui-ci. Ces observations traduisent la perte du caractère semi-cristallin du chitosane après qu'il a été atomisé. Cette conclusion est confirmée par les analyses que l'on peut faire en ATG. En effet la poudre atomisée présente un maximum de sa température de dégradation bien plus bas qu'avant atomisation (222 °C contre 275 °C). Cette diminution de la température de dégradation est attribuée à la diminution de l'organisation des chaînes. Sur la courbe ATG, nous observons également que la pente liée à la dégradation du polymère est plus importante après atomisation qu'avant. Cette modification de la pente est attribuable à une réduction de la taille des particules qui présentent des valeurs de Dv50 avant et après atomisation respectivement de 116 μm et 2 μm (Figure 74).

Sur cette même figure, nous pouvons observer que la distribution de taille de grain après atomisation est multimodale. La population de particules centrée à 2 μm représente la grande majorité des grains mesurés mais des particules d'une taille de l'ordre de la dizaine voire de la centaine de micromètres sont également présentes. Celles-ci peuvent provenir d'une agglomération des grains micrométriques après le procédé due à la présence d'eau. En effet la courbe de perte de masse montre jusqu'à 20 % d'eau dans la poudre atomisée. Cette eau peut contribuer au collage des grains de chitosane entre eux.

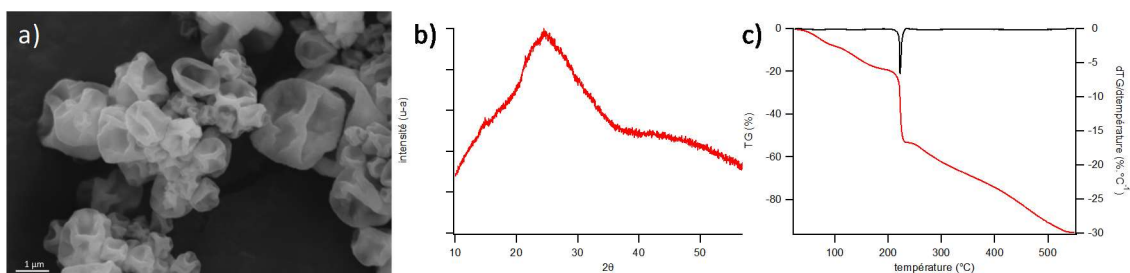


Figure 73 a) MEB, b) DRX et c) ATG et sa dérivée du chitosane après atomisation

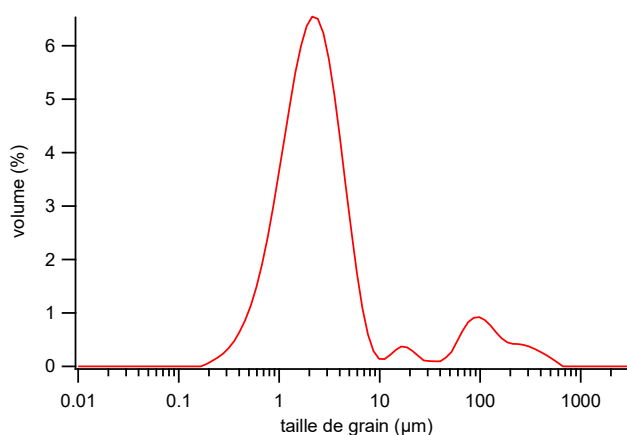


Figure 74 Distribution de taille de grain du chitosane atomisé

L'atomisation du chitosane induit une modification également dans sa chimie. Il apparaît qu'après atomisation, le spectre infrarouge présente de nouvelles bandes à 1560 et 1410 cm^{-1} notamment (Figure 75). Ces bandes peuvent être attribuées respectivement à la liaison C-O et CH_3 de l'acétate comme nous l'avons reporté dans le chapitre précédent. Toutefois, la bande à 1560 cm^{-1} peut également être attribuée à la présence d'une amine protonée comme il a déjà été rapporté dans la littérature [144].

Par ailleurs, le spectre RMN (Figure 76) fait apparaître après atomisation un pic à 180 ppm et celui à 23 ppm semble augmenter en intensité. Le pic à 180 ppm est attribué au carbone fonctionnel de l'acétate alors que l'augmentation de celui à 23 ppm est associée à l'apport de la contribution du groupement méthyle de l'acétate. La présence de fonctions amines protonées ainsi que d'acétate permet de conclure à la présence d'un sel d'acétate de chitosane dans la poudre atomisée. Ce résultat est en accord avec les observations faites par Cervera *et al.* et Nunthanid *et al.* [144,170].

Du fait de la contribution des groupements de l'acétate dans les spectres infrarouges et RMN, il n'est pas possible, par ces techniques de spectroscopies vibrationnelles, de déterminer le degré de déacétylation après atomisation. Nous ferons donc l'hypothèse qu'il reste inchangé.

Enfin une structuration hybride de Type I et de Type II du sel de chitosane peut être mise en évidence sur le spectre RMN du polymère atomisé. En effet l'élargissement de la bande du carbone 1 de l'unité glucose du chitosane peut être associé à la formation du doublet caractéristique de la structuration de Type I. Cependant le pic à 105 ppm reste majoritaire ce qui traduit la structuration de Type II. Par ailleurs, l'absence de point d'inflexion à 78 ppm dans le spectre RMN du polymère atomisé peut être également associée à la formation d'un doublet du signal du C-4 du motif du chitosane. Le fait que ces doublets ne soient pas isolés et que les pics présentent une largeur à mi-hauteur importante, indique que, si le chitosane atomisé est présent dans une structuration mixte Type I/Type II, le polymère n'est pas cristallin pour autant et propose des environnements variés assimilés à une structure amorphe.

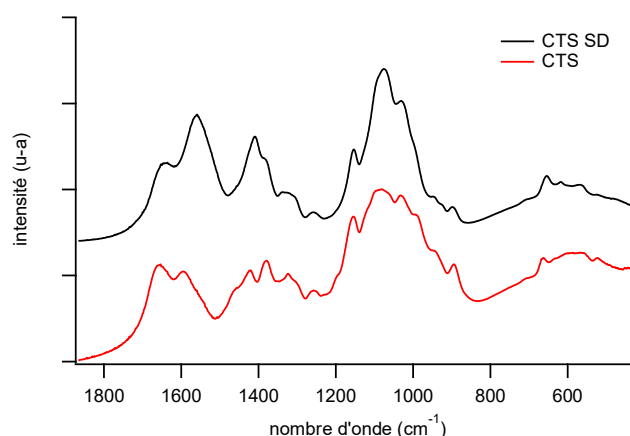


Figure 75 Spectres infrarouges du chitosane avant (CTS) et après (CTS SD) atomisation présentés sur la zone 1800-400 cm^{-1}

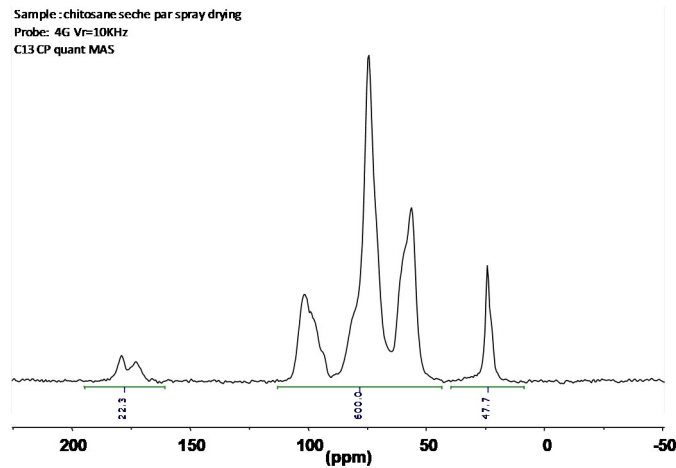


Figure 76 Spectre RMN du chitosane après atomisation.

IV.2 Caractérisation du matériau composite

A l'instar de la phase minérale, le matériau composite a été préparé suivant deux stratégies : l'atomisation d'une suspension d'un phosphate de calcium dans une solution acide de chitosane ou l'atomisation d'une solution contenant les précurseurs de phosphate de calcium et le chitosane solubilisé.

IV.2.1 Suspension

La Figure 77 présente une distribution de tailles de grains monomodale de la poudre atomisée avec des valeurs de Dv10, Dv50 et Dv90 respectives de 1,2, 3,5 et 8,5 μm . Les agrégats de 20 μm visibles dans le cas de l'atomisation de la phase minérale seule au chapitre précédent, ne le sont plus dans le cas de la poudre composite. La présence du chitosane peut avoir comme effet de stabiliser les suspensions d'hydroxyapatite comme l'ont démontré Wilson *et al.* [137]. Ainsi les particules minérales sont dispersées de manière plus homogène dans la préparation avant atomisation et leur aggrégation en particules de grandes tailles est inhibée.

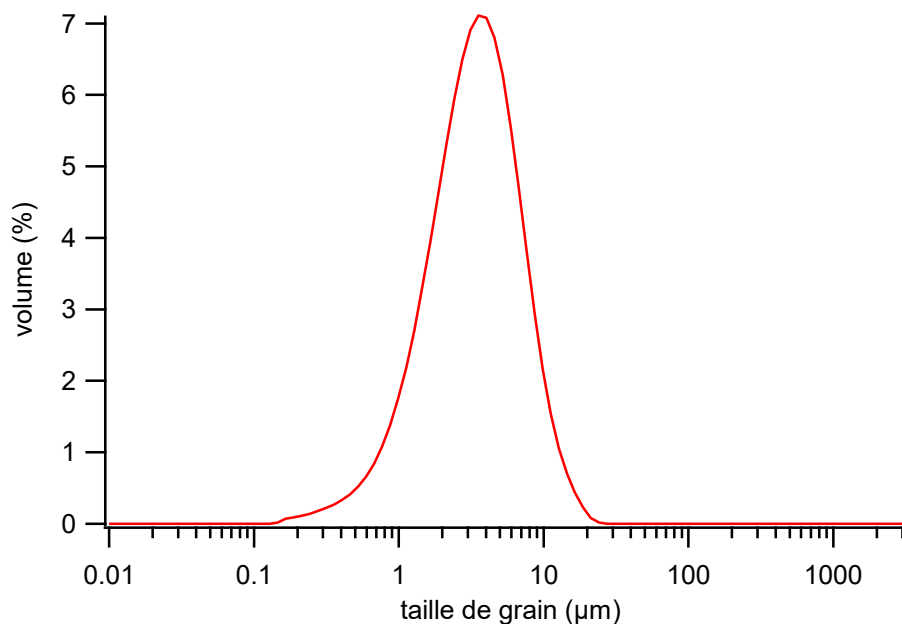


Figure 77 Distribution de tailles de grain de la poudre composite atomisée

Les images MEB de la poudre atomisée (Figure 78) présentent des particules d'aspect collapsé (flèche discontinue) semblables aux particules de chitosane observées précédemment et des particules agrégées de morphologie relativement sphérique (flèche continue). La première famille de particules peut être associée à des grains purement organiques tandis que la seconde correspond à des agrégats majoritairement minéraux. Ces derniers sont constitués de particules d'une taille de l'ordre de 500 nm. Il semblerait donc que dans le cas de l'atomisation d'une suspension d'hydroxyapatite dans une solution acide de chitosane, une ségrégation de phase ait lieu au moment de la pulvérisation des gouttes ou en amont dans la tubulure de l'atomiseur. Il existe malgré cela certaines particules constituées des deux phases (Figure 79). Sur l'image enregistrée avec un détecteur d'électrons rétrodiffusés (à droite de la figure) nous distinguons des particules blanches d'une taille de l'ordre de 100 nm attribuées à la phase minérale tandis que la matrice organique apparaît grise. Ces particules nanométriques peuvent être issues des particules d'hydroxyapatite de très petites tailles dispersées dans la matrice organique et piégées au cours du séchage. Elles peuvent également provenir de la reprécipitation en phosphate de calcium amorphe des particules ou parties de particules d'hydroxyapatite dissoutes par la solution acide formée au sein du polymère pendant le séchage de la goutte.

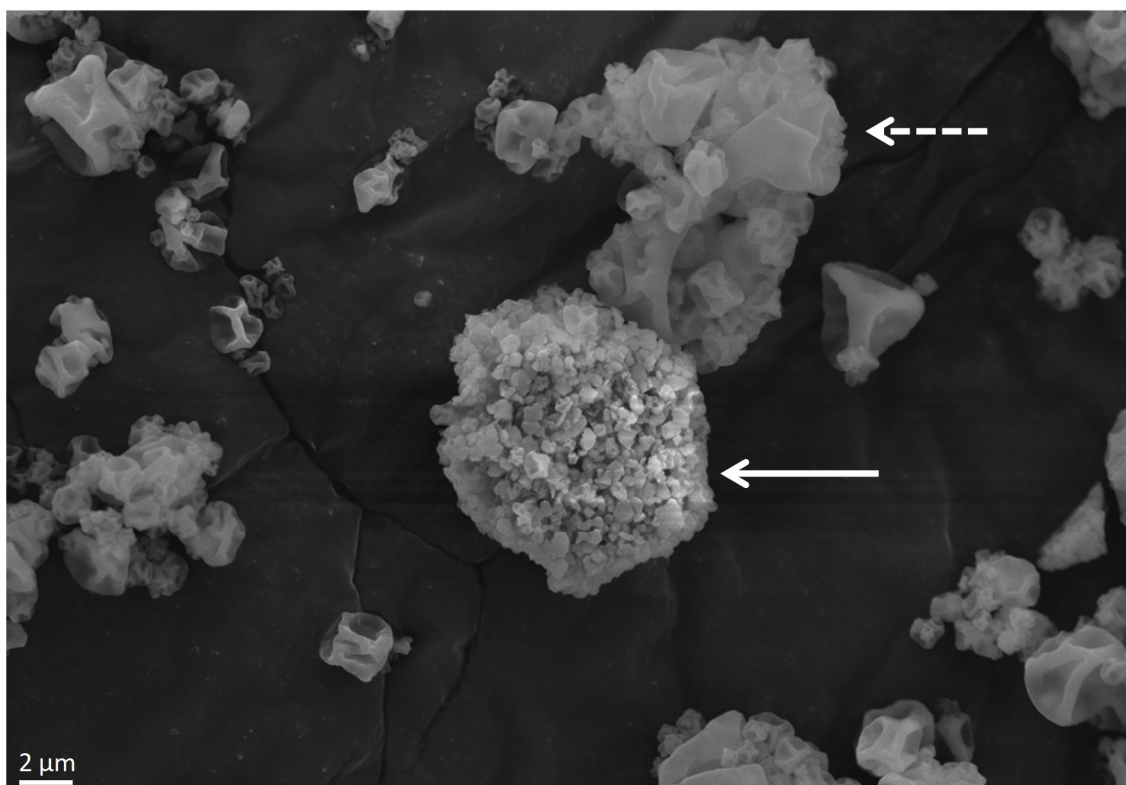


Figure 78 Image MEB du composite obtenu par atomisation d'une suspension. La flèche en trait plein montre un agrégat de particules minérales et la flèche en trait pointillés montre des particules purement organiques

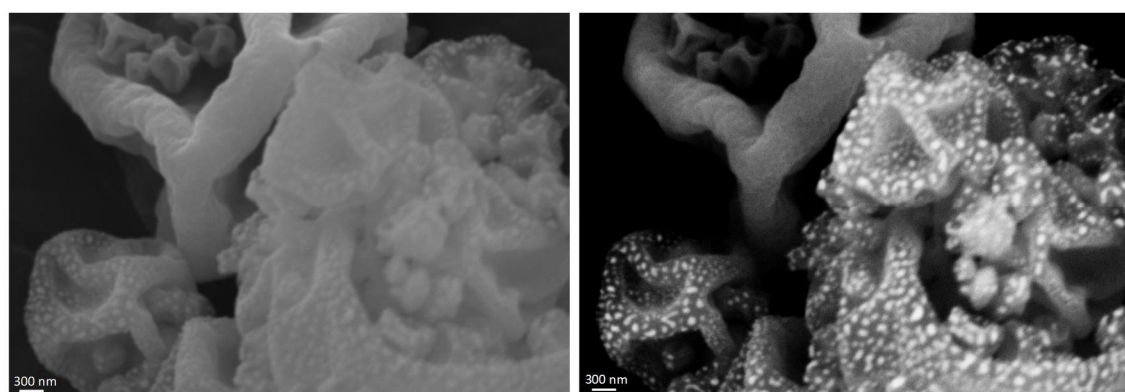


Figure 79 Image MEB en électrons secondaires (gauche) et en électrons rétrodiffusés (droite) d'une particule présentant deux phases

A partir de l'analyse ATG de la poudre composite présentée sur la Figure 80, nous notons que la température de dégradation du chitosane est plus élevée en présence de la phase minérale que pour le polymère atomisé seul (245 °C pour le composite et 222 °C pour le polymère). L'ajout de la phase minérale a donc pour effet de stabiliser thermiquement le polymère. Sur cette figure, la courbe ATD indique également un phénomène exothermique (vers le haut) à 680 °C sans perte

de masse notable associée à la cristallisation d'une phase phosphocalcique [52,171,172]. Cette valeur de température de cristallisation laisse supposer la présence d'une phase amorphe dans le matériau comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent et évoqué plus haut.

Les spectres infrarouges (normalisés relativement à la bande à 1564 cm^{-1} de l'acétate) du matériau composite, du CTS et de l'HAp isolés sont présentés sur la Figure 81. La composition chimique du matériau composite est justifiée par la présence sur son spectre des bandes caractéristiques des phosphates à 570 et 600 cm^{-1} de l'apatite ainsi que celle de l'amide I (C=O) du chitosane à 1655 cm^{-1} . De plus, un spectre simulant un mélange physique tenant compte des ratios massiques de la suspension ($I = 0.65 \times I_{\text{HAp}} + 0.35 \times I_{\text{CTS}}$) est également présenté sur cette figure. Nous pouvons constater que le spectre du matériau composite et le spectre simulé correspondent à la fois en fréquences de résonnance et en intensités des bandes. Ce résultat indique que la poudre composite obtenue après atomisation a approximativement la même composition que la suspension atomisée et se comporte comme un mélange physique. Certains auteurs associent les bandes à 1418 et 1345 cm^{-1} , présentent sur le spectre du matériau composite, comme étant des décalages des fréquences de vibration des liaisons CH_3 et CN de l'amide du chitosane (normalement présentes à 1380 et 1325 cm^{-1} respectivement). Ces décalages sont associés selon eux à des interactions de coordination entre la phase organique et la phase minérale [131,132]. Cependant la possibilité de former des liaisons de coordination entre l'amide et un ion métallique aux valeurs de pH utilisées dans notre formulation et sans modification chimique du polymère est peu probable [173,174]. Il semblerait selon nous, que ce qui a été attribué par certains auteurs comme un décalage soit la résultante d'une convolution des signaux des deux matériaux utilisés dans le composite et non un décalage effectif dû à une interaction covalente.

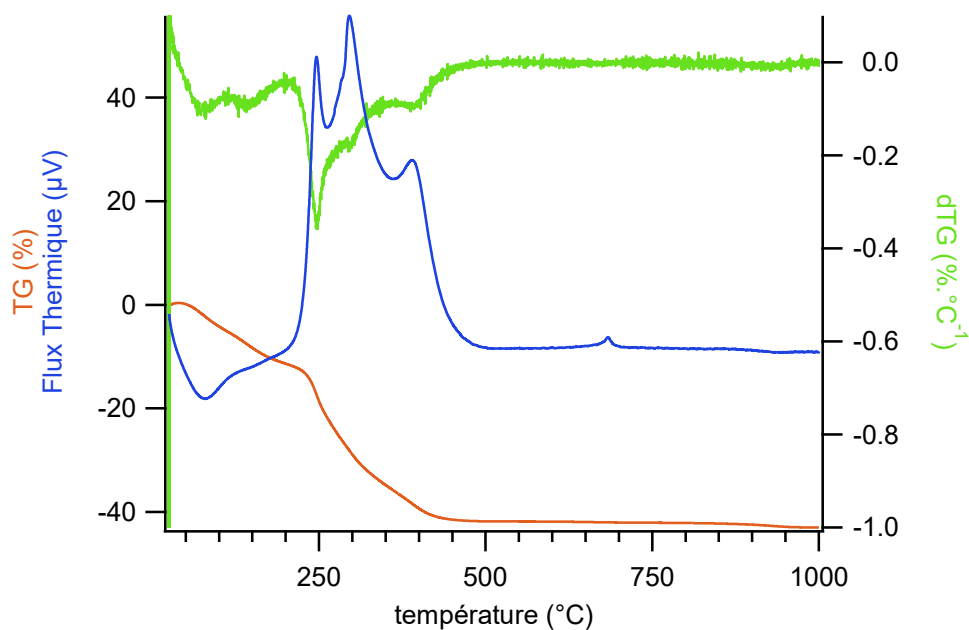


Figure 80 Courbes ATG (rouge), ATD (bleue) et dérivée de l'ATG (vert) de la poudre CTS/HAp entre 25 et 1000 °C

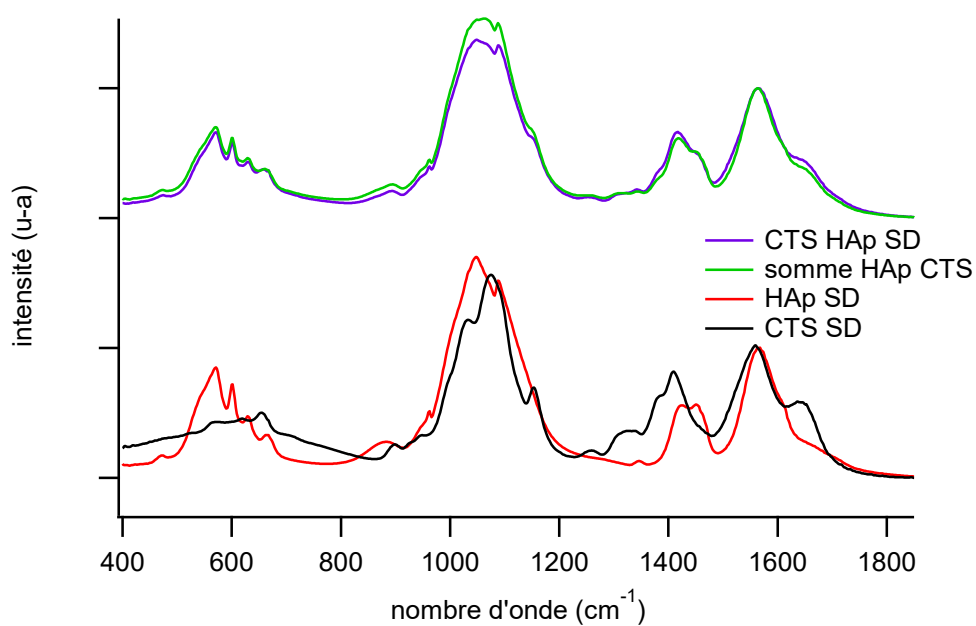


Figure 81 Spectres infrarouges de l'hydroxyapatite stœchiométrique atomisée (HAp SD), du chitosane atomisé (CTS SD), du matériau composite (CTS HAp SD) et spectre simulé de la somme pondéré de HAp SD et CTS SD (65 et 35 % respectivement)

L'analyse cristallographique du matériau composite permet de confirmer que la phase minérale est majoritairement cristallisée et de structure cristalline inchangée après atomisation comme

nous l'avons déjà conclu au chapitre précédent. La présence du polymère, avec un taux de cristallinité extrêmement bas, ne contribue au diffractogramme que sous forme d'un halo s'étendant entre 20 et 30 ° 2 θ (Figure 82).

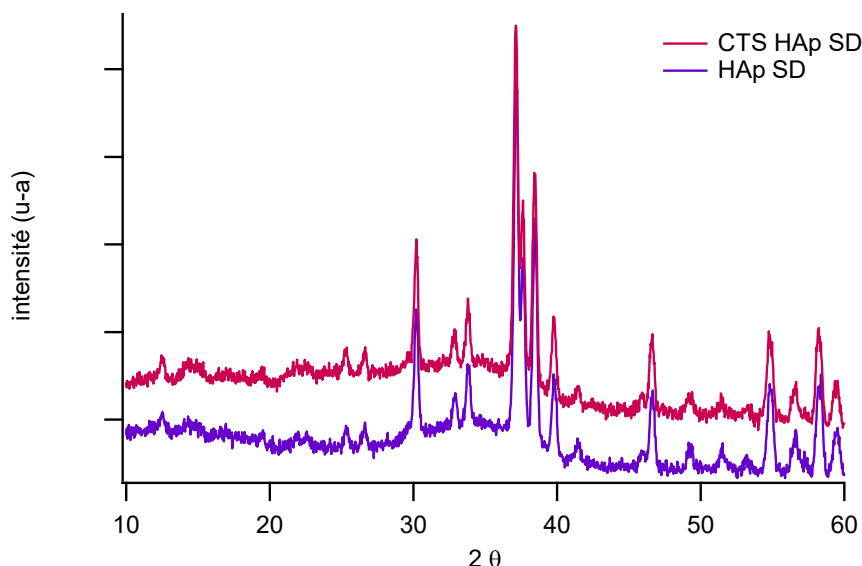


Figure 82 Diffractogrammes du matériau composite (CTS HAp SD) et de l'hydroxyapatite stœchiométrique (HAp SD) après atomisation

Hormis quelques particules visibles au MEB (BSE) pour lesquelles une distribution fine de la phase minérale dans la matrice organique est observée, les différentes caractérisations semblent indiquer que l'atomisation d'une suspension de phosphate de calcium dans une solution de chitosane résulte dans la formation d'un matériau composite qui n'est que la résultante d'un mélange inhomogène et physique des deux phases le constituant.

IV.2.2 Solution

En partant du fait, démontré au chapitre précédent, que l'atomisation d'une solution contenant des ions calcium et phosphates en proportions contrôlées permet de synthétiser pendant l'atomisation des particules de phosphates de calcium, différentes solutions contenant du chitosane solubilisé et des ions calcium et phosphates ont été testées dans ces travaux. Nous avons fait varier le rapport molaire Ca/P et le rapport massique organique/inorganique pour établir une cartographie des composites susceptibles d'être synthétisés par atomisation.

IV.2.2.1 Influence structurale sur la phase minérale

La distribution de tailles des grains en fonction du rapport Ca/P (à rapport massique organique/inorganique constant et égal à 35/65) ainsi que du rapport CTS/ACP (à rapport atomique Ca/P constant et égal à 1,67) est représentée sur la Figure 83. L'on peut y observer que si la taille des grains est assez régulière, de petites variations peuvent être considérées. En effet, une décroissance régulière des valeurs Dv_{50} et Dv_{90} est enregistrée entre le rapport CTS/ACP de 1,5 et celui de 2 (avec des valeurs respectives de 4,7 et 10 μm contre 4 et 8,4 μm). Une seconde population de petites particules apparaît quand le rapport CTS/ACP est de 30/70. Cette population de particules est de taille similaire (*i.e.* de quelques centaines de nanomètres) à celle observée dans le cas de l'atomisation de la solution dans le chapitre précédent.

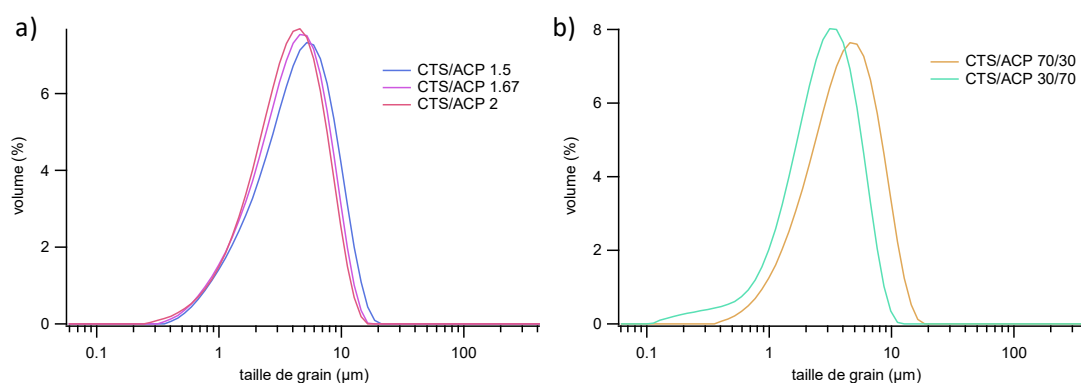


Figure 83 Distribution de taille de grain et influence a) du rapport atomique Ca/P à rapport CTS/ACP constant égal à 35/65 et b) du rapport organique/inorganique à rapport Ca/P constant égal à 1.67

Des images MEB des particules composites avec des ratios massiques organiques/inorganiques de 23/77 et 30/70 (à rapport molaire Ca/P constant égal à 1,67) sont présentées sur la Figure 84. Il apparaît clairement que la morphologie des particules est dépendante de ce rapport ; plus la proportion de phase organique est importante, plus les particules ont un aspect collapsé typique de la poudre de chitosane atomisée. Dans le cas du rapport 23/77, nous pouvons supposer que la phase organique, en très faible quantité, agit comme un liant entre les particules minérales. Ces dernières, par leur propension à s'agréger, induisent majoritairement la morphologie des particules. Dans le second cas, la morphologie semble être monitorée par la phase organique et par extension l'agrégation des particules minérale est minimisée.

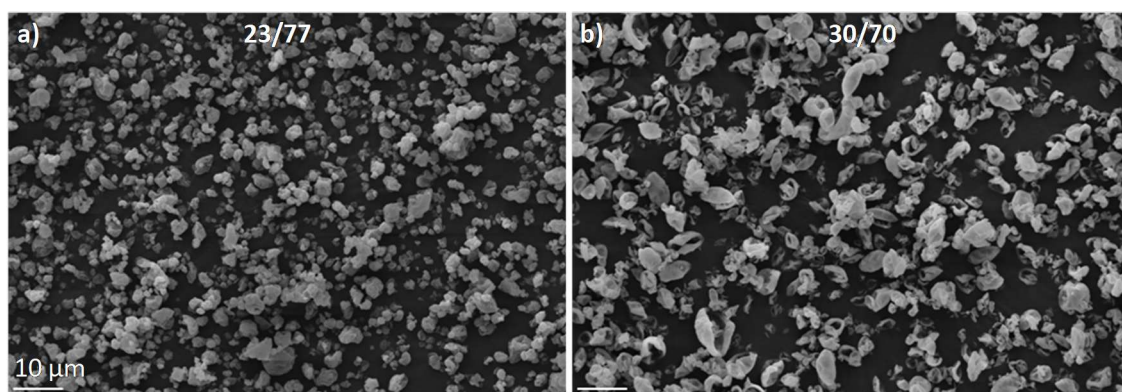


Figure 84 Images MEB des composites a) 23/77 et b) 30/70

Les aspects de surface des particules avec des rapports massiques organiques/inorganiques de 23/77, 25/75 et 30/70 sont présentés sur la Figure 85. Cette figure permet de constater que plus la proportion de polymère augmente, plus la surface des particules paraît lisse. Le rapport 25/75 présente à la fois la morphologie des particules organiques mais également une surface rugueuse. La morphologie de cette surface permet de supposer qu'un phénomène de croûtage se produit pendant le séchage. Ce phénomène est moins marqué dans le cas du rapport 30/70 ce qui dénote l'impact de la présence du polymère sur cette ségrégation périphérique. Des images MEB prises en électrons rétrodiffusés sur ces mêmes poudres ne permettent pas de distinguer de contraste de phase. Ce résultat peut traduire soit une minéralisation homogène de la surface des particules, soit une très bonne dispersion des phases entre elles à l'échelle d'observation. En considérant ce second cas, nous faisons l'hypothèse que la phase minérale se présente sous la forme de nombreux germes distribués dans la phase organique.

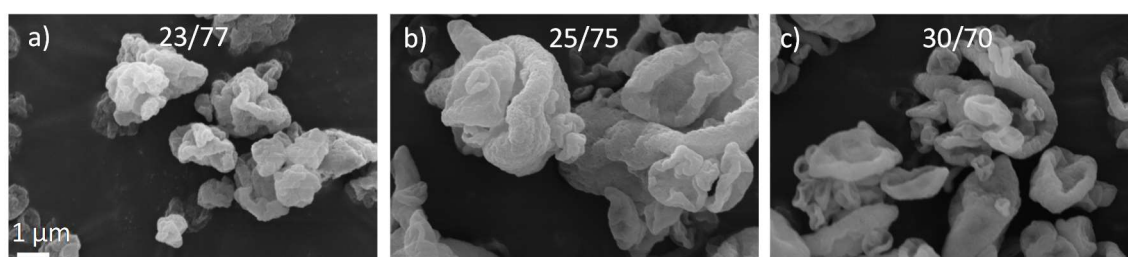


Figure 85 Images MEB des particules composites avec (de gauche à droite) des ratios massiques organiques/inorganiques de 23/77, 25/75 et 30/70 à rapport molaire Ca/P constant égal à 1.67

La Figure 86, qui propose des observations en microscopie électronique en transmission, illustre parfaitement cette hypothèse. En effet les images a) et b) (correspondant respectivement aux composites 30/70 et 70/30) montrent des coupes transversales de particules de tailles similaires et collapsées. Le zoom de la Figure 86 a) met en évidence un gradient de la répartition de la

phase minérale dans la matrice organique. En effet, nous observons que les particules minérales forment une croûte à la surface de la particule composite et que la concentration en phase minérale est bien plus faible lorsque l'on s'éloigne de cette croûte. De plus les particules en surface ont une taille différente des autres avec des tailles respectives de 70 ± 6 nm et 34 ± 4 nm. La Figure 86 b) présente un zoom du composite 70/30. Un gradient de concentration en particules minérales est également observé et peut être associé à un effet de bord de la particule ou là encore à un phénomène de croûtage mais moins marqué que dans le cas 30/70. Cependant la taille des particules minérales ne varie pas entre le cœur du composite et sa surface et est égale à 29 ± 2 nm. Les nanoparticules minérales au sein de la particule composite présentent une dispersion fine et ne semblent pas former d'agrégats ou de chapelets contrairement aux observations faites sur la phase minérale dans le chapitre précédent.

Un mécanisme possible pour la formation des particules composites peut alors être proposé : une gouttelette contenant les ions calcium et phosphates ainsi que le chitosane solubilisé est formée dans un premier temps. Dans un second temps, par l'action de la chaleur, les nanoparticules de phosphate de calcium se forment en surface mais également en volume. Ces particules tendent ensuite à s'agréger ou à croître tandis que la gouttelette se contracte d'autant plus que la quantité de chitosane est faible. Or la présence du polymère crée une gêne qui limite la migration des espèces minérales. Cette gêne est d'autant plus importante que la quantité de chitosane est importante et que sa concentration augmente du fait de l'évaporation du solvant. Ainsi les particules avec le rapport organique/inorganique 30/70 forment des gouttes très diluées en chitosane et donc présentent une mobilité plus importante de la phase minérale que les particules 70/30. Cette phase minérale peut donc croître davantage et par migration, les nanoparticules se retrouvent à la surface des grains et forment alors une croûte. Suivant cette hypothèse plus la quantité de CTS dans la solution de départ est importante, moins la croûte rugueuse est visible et importante ce qui correspond aux observations faites.

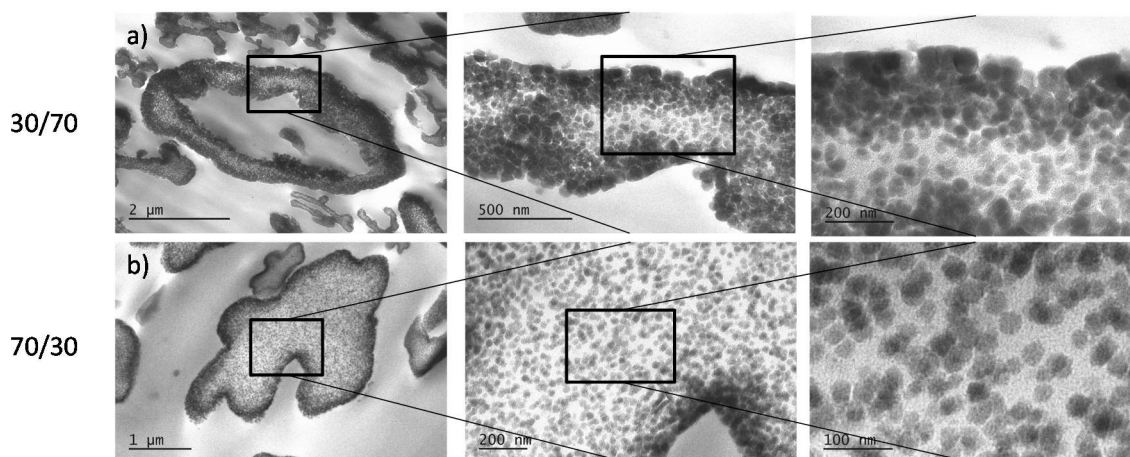


Figure 86 Images TEM du matériau composite CTS/ACP avec les rapports massiques organiques/inorganiques respectifs de a) 30/70 et b) 70/30 à rapport molaire Ca/P constant égal à 1,67

Une analyse SAXS a également été réalisée sur les matériaux composites de rapports organiques/inorganiques 70/30 et 30/70 afin d'étudier les dimensions caractéristiques des structures constituant ces matériaux. Cette analyse permet également de discerner l'impact du polymère sur l'organisation et la distribution des particules de la phase minérale. Les résultats reportés sur la Figure 87 ont été analysés, comme dans le chapitre précédent, grâce au modèle de Beaucage avec deux sous structures pour faire correspondre une courbe de corrélation et la courbe expérimentale. Les dimensions des particules minérales observées par imagerie TEM sont retrouvées par l'analyse SAXS avec des tailles caractéristiques de R_g de 35 nm dans le cas du composite 70/30 et 60 nm pour le composite 30/70. La dimension de 1 nm (R_s) des clusters amorphes énoncée dans le chapitre précédent est également retrouvée (non représentée sur la figure) ainsi que la correspondance entre des valeurs de R_{sub} et R_s . Le modèle semble de plus indiquer une différence de concavité entre les deux courbes. Comme nous l'avons évoqué plus haut (*cf* chapitre 2) ce changement de concavité est lié au comportement des clusters de rayon R_s entre eux. A ce changement de concavité sont associées des valeurs de fractions volumiques (f_p) de 0,12 pour le rapport CTS/ACP de 30/70 et 0,01 pour de rapport 70/30. Cette dernière valeur traduit une dilution des clusters au sein de la matrice organique et indique qu'ils sont en moyenne plus espacés dans le composite 70/30 et que dans le composite 30/70. Les pentes des différentes structures (R_g et R_s) ne semblent pas être influencées par la présence du chitosane. Elles indiquent dans tous les cas des surfaces relativement lisses pour les plus grandes structures (dimensions fractales de surface de l'ordre de 2) et des surfaces rugueuses pour les clusters (dimensions fractales de surface de l'ordre de 2,5) similaires aux valeurs rencontrées dans le chapitre précédent.

Le mécanisme proposé en amont semble alors s'étendre aux clusters. Quand ceux-ci sont formés dans la goutte, ils s'agglomèrent en nanoparticules mais le CTS s'intercale entre les clusters et quand la quantité de celui-ci augmente, les clusters sont éloignés les uns des autres. Ce résultat met en avant le mélange très intime entre les deux phases car pour s'intercaler entre deux clusters, le polymère doit alors passer au sein même d'une nanoparticule comme le schéma Figure 88 le représente.

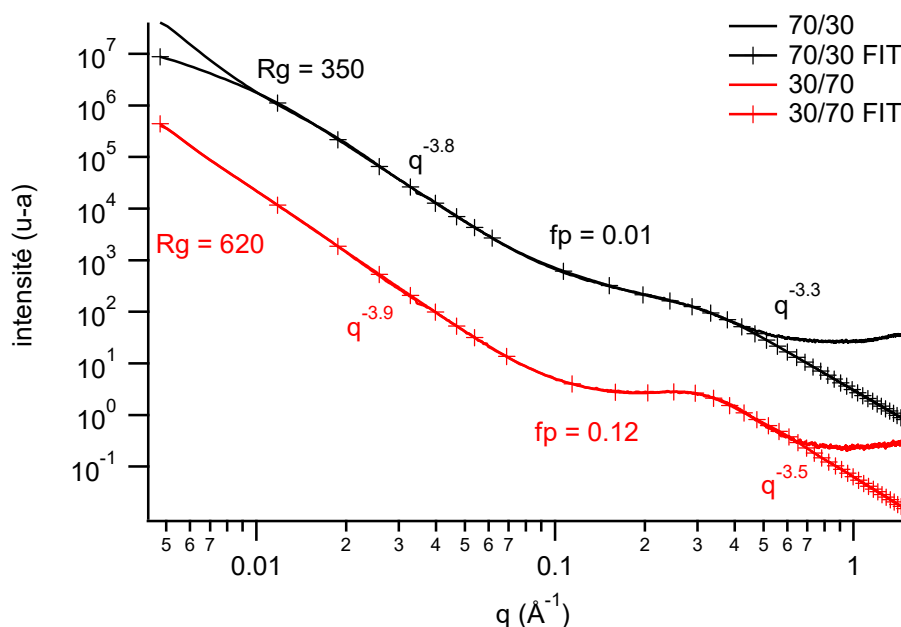


Figure 87 Courbes SAXS des matériaux composites 70/30 et 30/70 (à rapport molaire Ca/P constant égal à 2) et leur correspondance avec le modèle de Beaucage

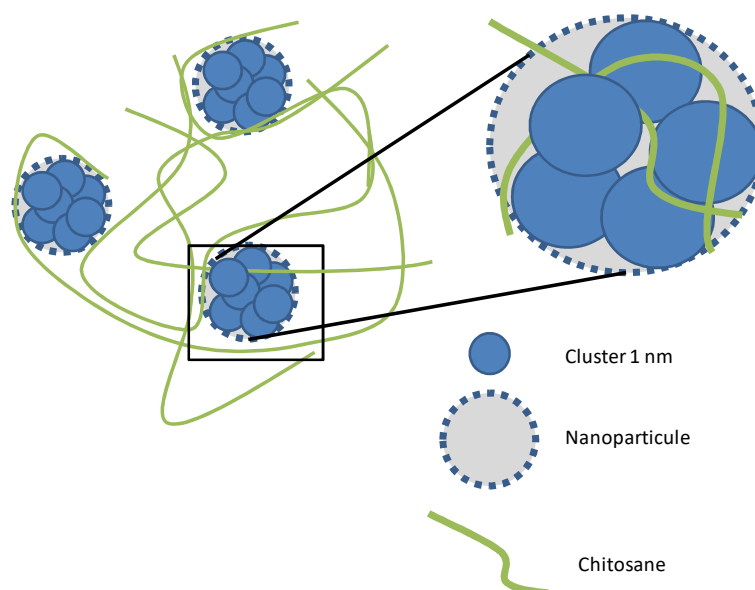


Figure 88 Représentation schématique de la structuration du matériau composite

Pour un rapport massique organique/inorganique de 35/65, correspondant au rapport massique moyen retrouvé dans l'os naturel, les analyses SAXS ont été conduites pour des composites basés sur des rapports Ca/P de 1,3 à 1,67. La Figure 89 présente les courbes ainsi obtenues. Pour alléger la figure, les distances et les pentes récurrentes ont été notées en noire. Il apparaît sur le graphique que le changement de concavité du rapport 1,3 est moins important que celui du rapport 1,67 indiquant que plus le rapport décroît, moins les particules de rayon R_s s'agrègent. Ce comportement est également mis en avant par la variation de la valeur de la fraction volumique f_p . Ce résultat est cohérent avec celui observé dans l'étude SAXS du matériau minéral seul. Les pentes associées aux deux structures R_g et R_s présentent une régularité entre les échantillons remarquable avec des décroissances respectives de 4 et 3,6.

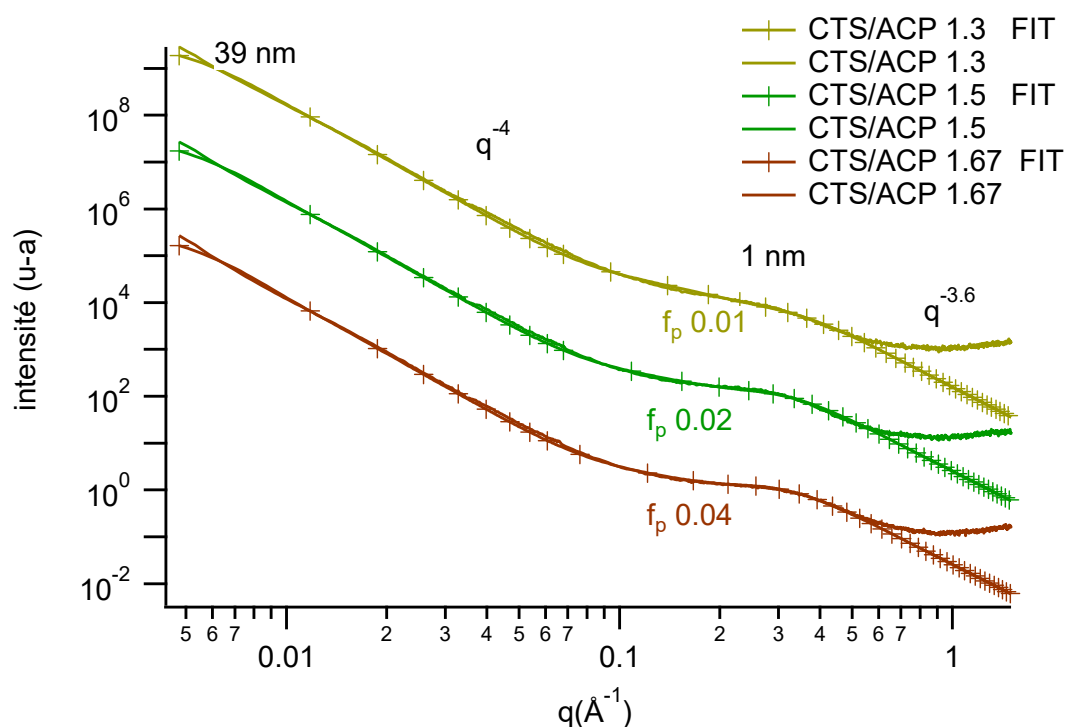


Figure 89 Courbes SAXS des matériaux composites CTS/ACP (35/65) en fonction du rapport molaire Ca/P

Pour le matériau composite de rapport organique/inorganique similaire à celui de l'os et de rapport Ca/P similaire à celui de la phase minérale de l'os, l'analyse WAXS a été réalisée. La courbe PDF de ce matériau composite est très semblable à celle de la phase minérale seule. Les intensités des pics relatifs à la phase minérale sont moins fortes dans le matériau composite du fait de la contribution de la phase organique. Seul le pic à 0,15 nm représentant les distances

typiques des matériaux organiques semble plus intense. La longueur de cohérence de la phase minérale ne semble pas être modifiée par la présence du polymère.

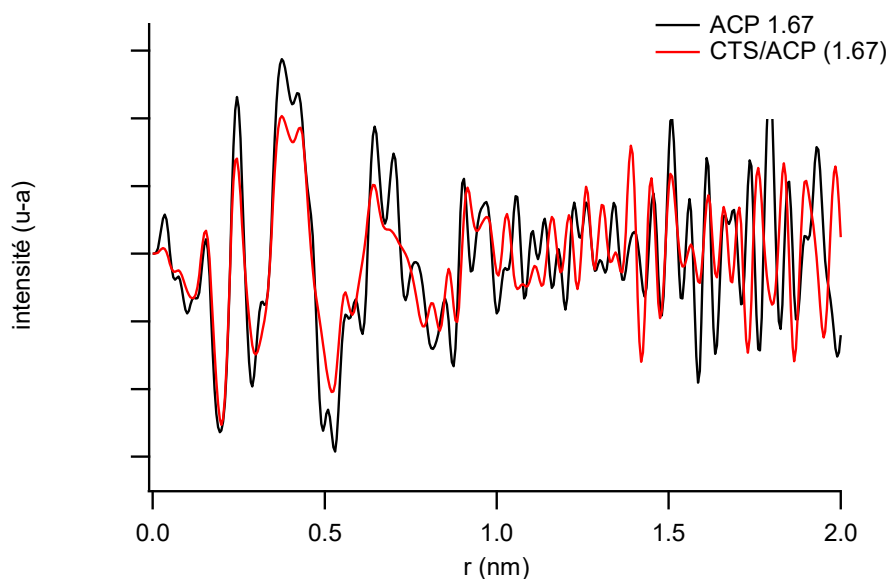


Figure 90 PDF du matériau composite CTS/ACP 35/65 pour un rapport molaire Ca/P de 1,67 comparée à la phase minérale seule

IV.2.2.2 Influence chimique de la phase organique

Comme nous pouvons le voir sur l'analyse SAXS des matériaux ainsi que sur la Figure 91, contrairement à la phase minérale seule, ces matériaux composites ne présentent pas de pics de diffraction associés à la présence d'acétate de calcium cristallisé quel que soit le rapport Ca/P. Nous pouvons cependant observer que pour le cas ACP 1,67, le halo amorphe s'élargit vers les bas angles ce qui peut correspondre à une contribution très faible d'acétate de calcium. La Figure 91 montre l'évolution des diffractogrammes en fonction du rapport massique organique/inorganique du matériau composite. Pour le rapport 23/77, des épaulements qui peuvent être attribués à de l'acétate de calcium apparaissent. De même sur le thermogramme de ce composite (Figure 92), un maximum de dégradation est visible à 400 °C ce qui correspond à la dégradation de l'acétate de calcium que nous avons définie dans le chapitre précédent. Il existe donc un rapport organique/inorganique pour lequel de l'acétate de calcium en excès cristallise. Ce rapport correspond à un équilibre molaire entre amine protonée et acétate. Quand ce rapport est dépassé, le chitosane est saturé en acétate et l'acétate de calcium cristallise. Notons que la température de dégradation du polymère dans ces composites est respectivement de 250 °C pour la composition 35/65 et 234 °C pour le rapport 30/70. Il

semblerait qu'il y ait un effet de stabilisation thermique de la phase organique dans le cas du matériau composite semblable à l'effet observé dans le cas de l'atomisation de la suspension.

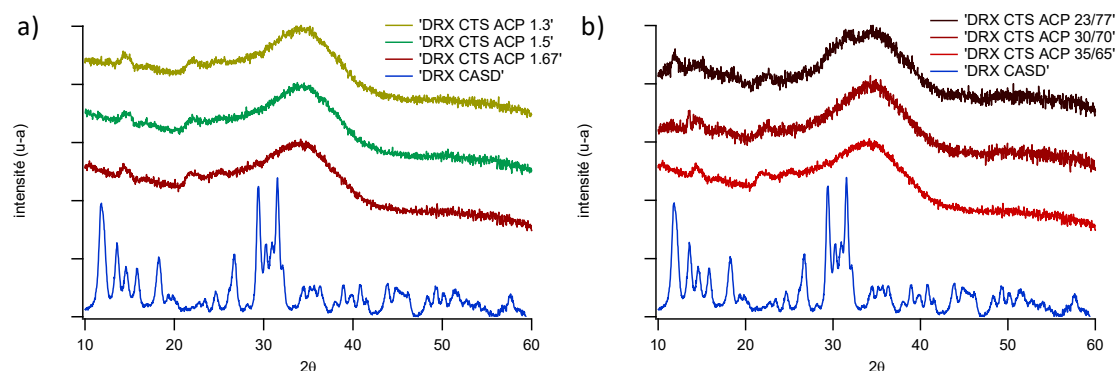


Figure 91 Diffractogrammes des matériaux composites a) à rapport CTS/ACP constant de 35/65 et en fonction du rapport Ca/P et b) à rapport Ca/P constant égal à 1,67 et en fonction du rapport massique CTS/ACP

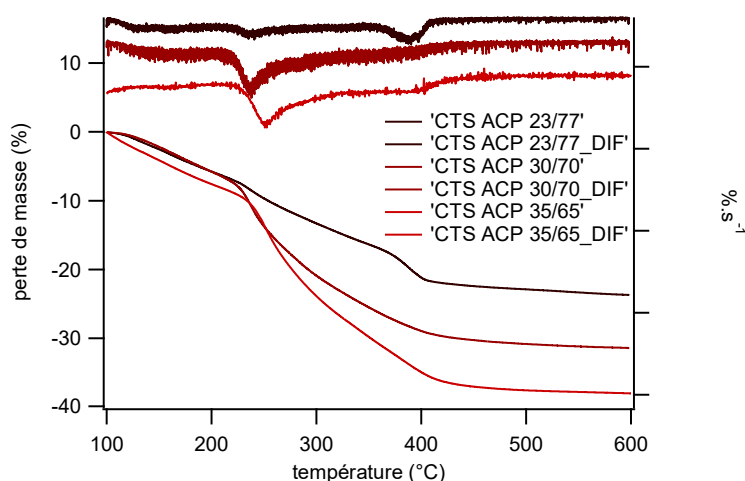


Figure 92 Analyses thermogravimétriques de différents composites à rapport Ca/P constant égal à 1,67 et leurs dérivées

La Figure 93 représente les spectres infrarouges du chitosane atomisé et du phosphate de calcium amorphe ainsi que celui du matériau composite. Un spectre simulé correspondant à la somme pondérée des intensités des constituants du matériau composite est également présenté et une bonne correspondance est trouvée entre celui-ci et le spectre du matériau composite. Les bandes à 1610 cm^{-1} et 660 cm^{-1} , caractéristiques de l'acétate de calcium cristallisé, ne sont plus visibles sur le spectre du composite. Cependant, hormis cette vibration en particulier, le spectre du matériau composite semble correspondre à la somme des spectres de ses composants.

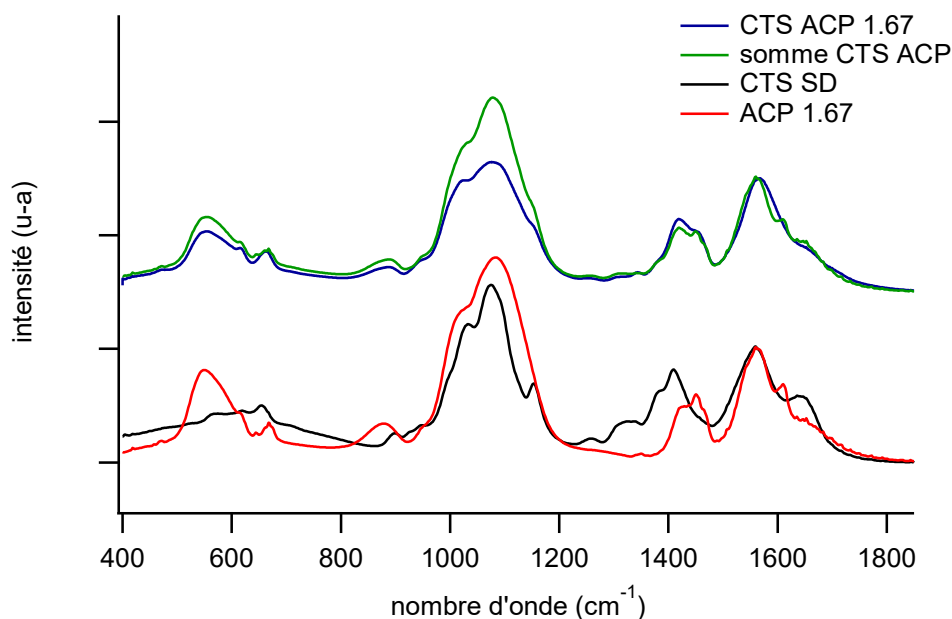


Figure 93 Spectres infrarouges du matériau composite CTS/ACP 1,67 35/65, du chitosane atomisé (CTS SD), de l'ACP 1.67 et spectre simulé de la somme pondérée de 35 % de CTS SD et 65 % d'ACP 1,67

Les spectres RMN du carbone de différents composites ainsi que du polymère sont présentés sur la Figure 94. Sur cette figure, nous pouvons observer et confirmer les interprétations faites à partir des diffractogrammes à savoir que la fonction acétate est présente dans le matériau mais sous forme non cristallisée. En effet, les déplacements vers 180 ppm sont caractéristiques du carbone de la fonction acétate alors que ceux à 23 ppm correspondent à ceux du groupement méthyle. La largeur à mi-hauteur importante des pics démontre l'aspect amorphe du matériau composite. L'absence de décalage des pics de la fonction amide du chitosane semble indiquer que l'environnement de cette fonction est inchangé en présence de la phase minérale. Ce résultat associé aux résultats infrarouges démontre qu'il n'y a pas de liaisons de coordination entre phase organique et phase minérale. Si interaction chimique il y a, elle n'est pas de nature covalente.

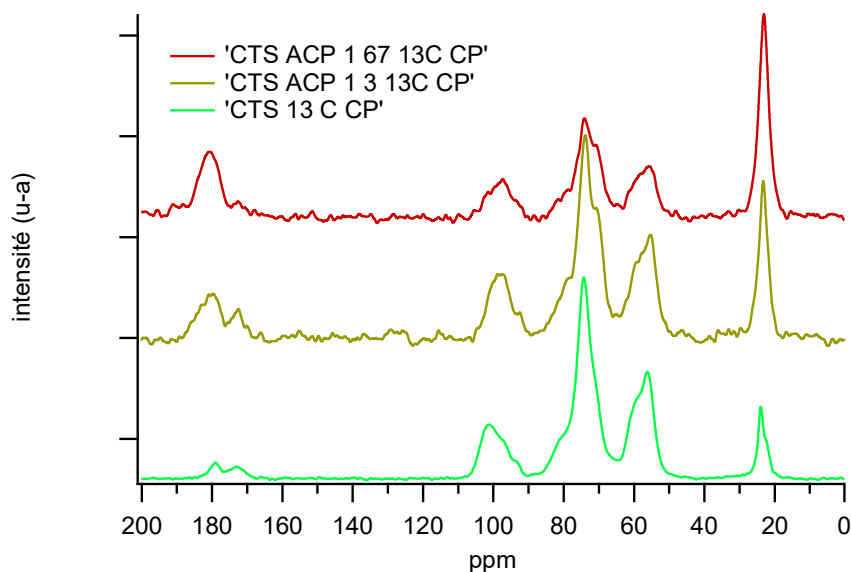


Figure 94 Spectres RMN du carbone en polarisation croisée du polymère et des matériaux composites CTS/ACP 1,3 et 1,67 à rapport CTS/ACP constant de 35/65

Les spectres RMN *aller retour* du proton (Figure 95) permettent de mettre en évidence la proximité spatiale des différentes phases du matériau composite. Ainsi dans le cas du matériau composite avec un rapport Ca/P de 1,3 et un rapport massique CTS/ACP de 35/65, le spectre correspondant à un temps de contact *retour* long $31P \rightarrow 1H$ (1ms) présente un épaulement constitué de deux déplacements : 2 ppm et 5 ppm. Le premier correspond aux protons de l'acétate tandis que le second est attribué aux CH_2 du chitosane. Le second, dont la contribution est plus importante, indique une proximité spatiale importante entre le polymère et la phase minérale. Ainsi pour transmettre l'aimantation du phosphore vers le proton du chitosane, ceux-ci doivent être à une distance de l'ordre de 5 Å pour ce temps de contact. Proximité qui est moins marquée dans le cas du rapport Ca/P de 1,67. En effet, sur le spectre de ce composite correspondant au temps de contact long, la contribution majoritaire à l'épaulement est celle de l'acétate. Notons également que les spectres aux temps courts et aux temps longs du matériau composite CTS/ACP avec un rapport Ca/P de 1,67 sont les mêmes que ceux du matériau équivalent sans la phase organique. Ce qui laisse supposer que le groupement acétate proche de la phase minérale pour les ratios Ca/P supérieurs à 1,3 empêche le polymère de se rapprocher des atomes de phosphore.

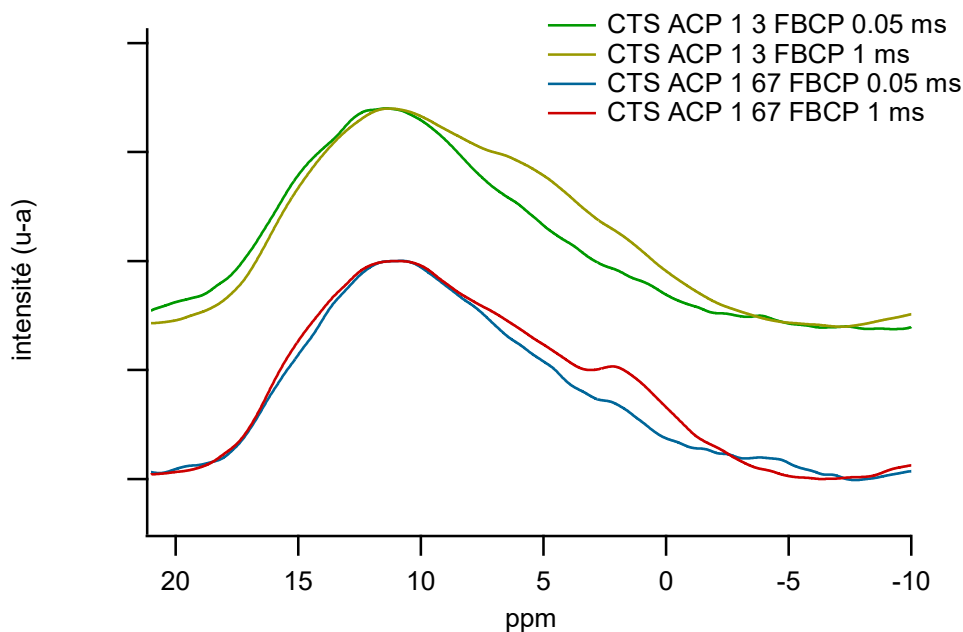


Figure 95 Spectres RMN *aller retour* du proton des composites CTS ACP 1,3 et 1,67 au rapport 35/65 pour différents temps de contact "retour"

IV.2.2.3 Evolution en milieu aqueux

Pour étudier l'influence de la présence du polymère sur l'évolution des phosphates de calcium amorphes, nous avons dispersé 2 g de poudre composite CTS/ACP 35/65 ($\text{Ca/P} = 1,67$) dans 66 mL d'eau déionisée. Nous avons suivi l'évolution de la dispersion à 5 min, 30 min, 1 h et 4 h par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge et microscopie électronique. Les valeurs de pH des dispersions aux temps donnés est respectivement de 6,4, 5,8, 5,7 et 5,7. La Figure 96 a) présente l'évolution des diffractogrammes en fonction du temps. Nous observons que de façon similaire à l'évolution de la phase minérale seule, dès 5 min, une cristallisation a lieu. Sur le diffractogramme, nous pouvons identifier la présence des pics de diffraction de la brushite et certains pics peuvent être indexés dans la structure apatitique. Nous observons également que les pics de diffraction augmentent en intensité et diminuent en largeur au cours du temps ce qui traduit la cristallisation et la maturation des espèces minérales de la même manière que ce qui a été observé dans le chapitre précédent ainsi que par Rusu *et al.* [175]. Les analyses vibrationnelles (Figure 96 b) confirment également la présence de ces espèces ainsi que leur cristallisation par l'affinement des bandes de vibration notamment à 875 et 530 cm^{-1} correspondantes aux ions HPO_4^{2-} . Les morphologies typiques des deux espèces identifiées sont visibles en microscopie électronique comme le montre la Figure 97. Sur cette figure, nous pouvons distinguer en effet des particules sphériques constituées de nanoaiguilles agrégées. Ces

aiguilles sont attribuées à la phase apatitique mal cristallisée identifiée en DRX. Sur ces images MEB, nous pouvons également observer des plaquettes au sein du matériau composite. Ces plaquettes correspondent à la morphologie type de la brushite précédemment identifiée. Cependant, contrairement à l'apatite mal cristallisée, la brushite n'est pas observable pour des temps de maturation inférieurs à quatre heures. Le polymère, quant à lui, se présente sous la forme de filaments typiques de la structure obtenue après lyophilisation et broyage d'un polymère. Nous pouvons également observer que des particules avec une morphologie en aiguille sont dispersées de façon très homogène dans le polymère. Ces particules sont associées à l'apatite mal cristallisée identifiée en DRX.

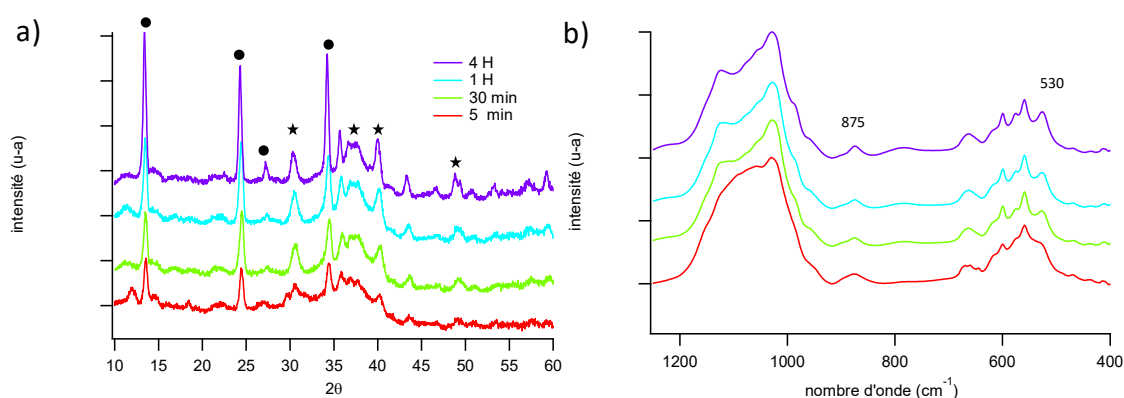


Figure 96 Evolution a) de la diffraction des espèces en dispersion et b) de leur nature chimique

Notons qu'une étude similaire a été effectuée en atmosphère saturée en eau. Il apparaît dans ce cas (non montré ici) que le matériau composite évolue également mais sans la phase brushitique. Cette évolution est associée à une réorganisation topotactique des ions de l'ACP sans solubilisation de celui-ci [31]. Dans le cas de l'évolution en dispersion, le pH acide et la dilution des ions engendrent la solubilisation de l'ACP et la précipitation des espèces brushitique et apatite.

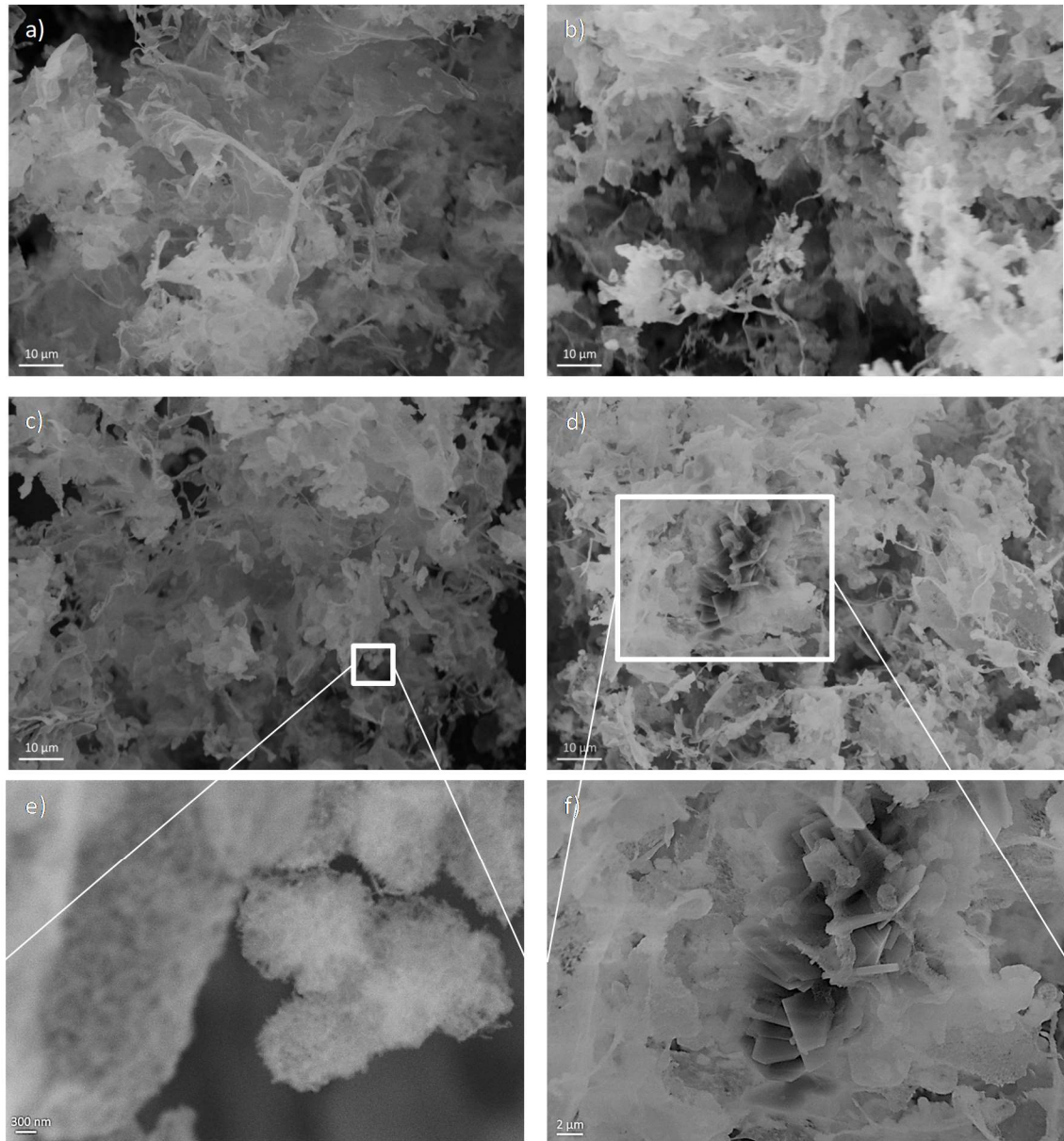


Figure 97 Images MEB de l'évolution du matériau composite dans l'eau et après lyophilisation à a) 5 min, b) 30 min, c) 1 h, d) 4h et des morphologies a) des agrégats d'aiguilles nanométriques et b) des plaquettes

IV.3 Résumé

Nous avons vu dans ce chapitre que l'atomisation d'une solution acide de chitosane mène à la formation d'une poudre dont les grains ont une taille micrométrique et un aspect collapsé. Cette poudre est constituée de sel d'acétate de chitosane et est caractérisée par son caractère amorphe.

Lorsqu'une phase solide comme l'hydroxyapatite est ajoutée à une solution de chitosane et atomisée, la poudre qui en résulte présente trois types de particules. Soit les deux phases se séparent pendant le procédé d'atomisation ce qui engendre des particules purement organiques et d'autres particules constituées majoritairement de phase minérale. Soit le mélange entre les deux phases est suffisamment intime et donne *in fine* une particule composite avec une matrice polymérique continue dans laquelle quelques particules nanométriques minérales sont dispersées. La nature de ces particules nanométriques est toutefois incertaine. En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que l'atomisation d'une suspension d'hydroxyapatite donnait un mélange d'hydroxyapatite stœchiométrique cristallisée et de phosphate de calcium amorphe. En outre, les analyses ATD et DRX confirment la présence de la phase amorphe phosphocalcique dans la poudre composite. Les nanoparticules présentes dans la matrice chitosane de ces grains composites peuvent alors être soit l'hydroxyapatite cristallisée nanométrique, soit l'amorphe reprécipité. Dans le premier cas, la taille suffisamment petite de ces particules peut permettre leur intégration au sein des particules composites. Dans le second cas, nous pouvons imaginer que les particules amorphes sont formées au sein du polymère pendant le séchage ce qui pourrait expliquer leur répartition homogène dans la particule. L'atomisation d'une solution comprenant les précurseurs phosphocalciques et le chitosane peut alors servir de modèle pour cette seconde hypothèse.

Dans le cas de l'atomisation de la solution, nous observons que la morphologie et la chimie de la poudre obtenue sont dépendantes à la fois du rapport Ca/P et du rapport CTS/ACP. D'une façon générale, il apparaît que la phase minérale se répartie de façon intime dans la phase organique. Cette dernière a comme effet de limiter l'agrégation des nanoparticules que nous avons vue dans le chapitre précédent. Le chitosane a également un effet à une plus petite échelle car sa présence minimise l'agrégation des clusters entre eux comme les données SAXS tendent à le démontrer. Chimiquement, l'acétate de calcium cristallisé que nous avons identifié dans le chapitre précédent ne semble être présent dans le matériau composite que si la quantité initiale de sel d'acétate de calcium est relativement importante en comparaison à la quantité de

chitosane. Ainsi quand le rapport CTS/ACP décroît, de façon importante, l'acétate de calcium cristallisé se forme. Nous faisons l'hypothèse que la majeure partie de l'acétate est fixée par le chitosane ce qui réduit sa disponibilité pour former l'espèce cristalline.

Le mécanisme de formation de la phase minérale dans le composite n'est pas clairement défini. Cependant au vu des différents résultats et en accord avec le mécanisme proposé par Brecevic *et al.* [85], nous proposons que les clusters d'ACPs se forment très rapidement dès que la goutte est mise en température. Du fait de la charge positive du polymère en milieu acide, nous pouvons faire l'hypothèse que les phosphates (chargés négativement) présentent une interphase ionique avec le chitosane. Ils seraient ainsi dispersés de façon homogène le long de la chaîne du polymère. Les clusters de 1 nm se formeraient alors en partie à proximité des chaînes de polymère.

Les spectres infrarouges dans la zone $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ font apparaître des pics qui peuvent avoir différentes interprétations. Il peut s'agir dans un cas des pics des liaisons CO de l'acétate mais il peut également s'agir d'un décalage du pic de l'amine protonée. Le premier cas s'explique facilement par l'ajout de la phase minérale. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que dans les deux cas d'atomisation de solution ou de suspension, nous avons ces pics de l'acétate. Comme le composite est en majorité composé de la phase minérale, la contribution de l'acétate peut alors dominer la contribution de l'amine. D'un autre côté, comme l'amine est protonée, il est possible d'avoir une interaction entre elle et les orthophosphates. Si une liaison ionique entre ces deux espèces chargées est imaginée, alors un décalage de la bande de vibration est possible.

Liste des figures

<i>Figure 70</i> Diffractogramme du chitosane commercial	98
<i>Figure 71</i> Proposition de déconvolution du chitosane	99
<i>Figure 72</i> Spectre RMN du chitosane avant atomisation	100
<i>Figure 73</i> a) MEB, b) DRX et c) ATG et sa dérivée du chitosane après atomisation.....	101
<i>Figure 74</i> Distribution de taille de grain du chitosane atomisé	101
<i>Figure 75</i> Spectres infrarouges du chitosane avant (CTS) et après (CTS SD) atomisation présentés sur la zone 1800-400 cm^{-1}	102
<i>Figure 76</i> Spectre RMN du chitosane après atomisation.....	103
<i>Figure 77</i> Distribution de tailles de grain de la poudre composite atomisée.....	104
<i>Figure 78</i> Image MEB du composite obtenu par atomisation d'une suspension. La flèche en trait plein montre un agrégat de particules minérales et la flèche en trait pointillés montre des particules purement organiques	105
<i>Figure 79</i> Image MEB en électrons secondaires (gauche) et en électrons rétrodiffusés (droite) d'une particule présentant deux phases.....	105
<i>Figure 80</i> Courbes ATG (rouge), ATD (bleue) et dérivée de l'ATG (vert) de la poudre CTS/HAp entre 25 et 1000 °C.....	107
<i>Figure 81</i> Spectres infrarouges de l'hydroxyapatite stœchiométrique atomisée (HAp SD), du chitosane atomisé (CTS SD), du matériau composite (CTS HAp SD) et spectre simulé de la somme pondéré de HAp SD et CTS SD (65 et 35 % respectivement)	107
<i>Figure 82</i> Diffractogrammes du matériau composite (CTS HAp SD) et de l'hydroxyapatite stœchiométrique (HAp SD) après atomisation.....	108
<i>Figure 83</i> Distribution de taille de grain et influence a) du rapport atomique Ca/P à rapport CTS/ACP constant égal à 35/65 et b) du rapport organique/inorganique à rapport Ca/P constant égal à 1.67.....	109
<i>Figure 84</i> Images MEB des composites a) 23/77 et b) 30/70	110
<i>Figure 85</i> Images MEB des particules composites avec (de gauche à droite) des ratios massiques organiques/inorganiques de 23/77, 25/75 et 30/70 à rapport molaire Ca/P constant égal à 1.67.....	110
<i>Figure 86</i> Images TEM du matériau composite CTS/ACP avec les rapports massiques organiques/inorganiques respectifs de a) 30/70 et b) 70/30 à rapport molaire Ca/P constant égal à 1,67	112
<i>Figure 87</i> Courbes SAXS des matériaux composites 70/30 et 30/70 (à rapport molaire Ca/P constant égal à 2) et leur correspondance avec le modèle de Beaucage.....	113
<i>Figure 88</i> Représentation schématique de la structuration du matériau composite	113
<i>Figure 89</i> Courbes SAXS des matériaux composites CTS/ACP (35/65) en fonction du rapport molaire Ca/P	114

<i>Figure 90 PDF du matériau composite CTS/ACP 35/65 pour un rapport molaire Ca/P de 1,67 comparée à la phase minérale seule.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 91 Diffractogrammes des matériaux composites a) à rapport CTS/ACP constant de 35/65 et en fonction du rapport Ca/P et b) à rapport Ca/P constant égal à 1,67 et en fonction du rapport massique CTS/ACP.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 92 Analyses thermogravimétriques de différents composites à rapport Ca/P constant égal à 1,67 et leurs dérivées.....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 93 Spectres infrarouges du matériau composite CTS/ACP 1,67 35/65, du chitosane atomisé (CTS SD), de l'ACP 1.67 et spectre simulé de la somme pondérée de 35 % de CTS SD et 65 % d'ACP 1,67</i>	<i>117</i>
<i>Figure 94 Spectres RMN du carbone en polarisation croisée du polymère et des matériaux composites CTS/ACP 1,3 et 1,67 a rapport CTS/ACP constant de 35/65</i>	<i>118</i>
<i>Figure 95 Spectres RMN aller retour du proton des composites CTS ACP 1,3 et 1,67 au rapport 35/65 pour différents temps de contact "retour".....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 96 Evolution a) de la diffraction des espèces en dispersion et b) de leur nature chimique</i>	<i>120</i>
<i>Figure 97 Images MEB de l'évolution du matériau composite dans l'eau et après lyophilisation à a) 5 min, b) 30 min, c) 1 h, d) 4h et des morphologies a) des agrégats d'aiguilles nanométriques et b) des plaquettes</i>	<i>121</i>

Chapitre 5 : Mise en forme du matériau composite

V.1 Revêtement	128
V.1.1 Etat de l'art.....	128
V.1.2 Présentation de la technique	129
V.1.3 Etude des revêtements obtenus	132
V.2 Impression 3D.....	141
V.2.1 Etat de l'art.....	141
V.2.2 Etude de faisabilité.....	142
V.3 Résumé	146
Liste des Figures	147

Dans l'optique de valoriser le matériau composite que nous avons développé, nous avons étudié deux techniques de mise en forme. Ces techniques permettent d'élaborer soit un revêtement, soit un matériau massif. Le revêtement a été obtenu par évaporation laser assistée par matrice (acronyme anglo-saxon MAPLE -Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation) à l'Institut National de Physique des Lasers, Plasmas et Radiations en Roumanie à Bucarest avec l'aide de Anita Visan et du professeur Ion Mihailescu. Le matériau massif a été élaboré par impression 3D en collaboration avec l'Université de Technologie de Sydney et le soutien du professeur Besim Ben-Nissan. L'objectif de ce chapitre est de caractériser la faisabilité de ces mises en forme ainsi que les transformations des matériaux induites par ces procédés.

V.1 Revêtement

V.1.1 Etat de l'art

De très nombreux implants, en particulier ceux supportant une charge mécanique, sont élaborés à partir d'alliages métalliques (des alliages de titane par exemple [176]) ou de matériaux polymériques (comme le polyétheréthercétone, PEEK [177]). Une des stratégies retenues pour leur conférer des propriétés biologiques améliorées leur permettant d'assurer une ostéointégration rapide ou durable sur le long terme est de les revêtir d'une couche de phosphate de calcium. Typiquement ce sont les implants orthopédiques qui ont bénéficié de ces développements. Les matériaux utilisés pour revêtir ces implants sont le plus souvent des phosphates de calcium comme les phases TCP ou HAp [178].

Historiquement et commercialement, le procédé le plus commun est la projection plasma atmosphérique. Dans cette technique, une poudre d'hydroxyapatite stœchiométrique est injectée dans une source énergétique (en l'occurrence un plasma dont les températures et vitesses des gaz sont de l'ordre de 10000 °K et 400 m.s⁻¹) où elle est fondue et accélérée en direction du substrat placé en regard. La poudre totalement ou partiellement fondue se solidifie à l'impact et il est fréquemment observé une amorphisation de celle-ci ou l'apparition de nouvelles phases. Les épaisseurs couramment obtenues par cette méthode de revêtement sont de l'ordre de 50 à 300 µm [179]. L'optimisation et la maîtrise des conditions de projection permettent d'assurer la production de revêtements conformes aux normes en vigueur (ISO 13779-2:2008 [180] et ASTM F1185-03(2014) [181]). Cependant, pour certains usages, notamment sur des implants de petites dimensions comme les implants dentaires, des revêtements d'épaisseur micrométrique sont préférables afin de limiter les problématiques de contraintes et donc d'adhérence. Par ailleurs pour favoriser les phases de phosphates de calcium sensibles à la température comme les apatites non stœchiométriques, d'autres technologies de revêtements doivent être mises en œuvre (dépôts en voie humide, sol-gel, immersion ou électrodéposition ou dépôts en voie sèche).

Ainsi, des revêtements phosphocalciques minces et à basses températures peuvent être obtenus notamment par les procédés de dépôt en phase vapeur : dépôt assisté par laser pulsé (pulsed laser deposition – PLD), dépôt assisté par faisceau d'ions (ion beam assisted deposition – IBAD), pulvérisation magnétron (RF-magnetron sputtering) [182]. Les revêtements obtenus par de tels procédés démontrent de bonnes propriétés d'ostéoinduction et de biocompatibilité [183,184]. Cependant ces propriétés sont dépendantes du contrôle des conditions opératoires mais

également du substrat utilisé. Dans leurs travaux, Bagratashvili *et al.* [185] démontrent que le contrôle de la fluence utilisée, de la pression de la chambre de dépôt, de la distance au centre de la plume ... influe à la fois sur la nature chimique du revêtement obtenu, la morphologie de celui-ci, sa densité... Ainsi plus la fluence est importante (de l'ordre de 10 J/cm²) plus les particules déposées sont de tailles importantes et plus le revêtement est dense (plus la distance entre deux particules est faible). Dans leur étude, il apparaît que la pression de la chambre et la distance au centre de la plume impactent le rapport Ca/P et par conséquent les propriétés biologiques du revêtement. Fernandez-Pradas *et al.* [186] ont montré l'impact négatif de l'épaisseur d'un film d'HAp obtenu par ablation laser sur son adhérence. Dans leurs travaux, les auteurs étudient quatre épaisseurs de revêtement de 1,5, 0,75, 0,35 et 0,17 µm et démontrent que les forces d'adhésion sont respectivement de 0,33 N, 1,64 N, 2,85 N et la dernière est supérieure à 18 N. Or les possibles délaminations du revêtement entraînent une diminution de la croissance des cellules [187].

Cependant, les techniques évoquées plus haut ne sont pas appropriées à l'utilisation de matériaux thermosensibles comme peuvent l'être les polymères ou les molécules d'intérêt thérapeutique. En effet, elles ne supportent pas de trop hautes températures ou des interactions rayonnement/matière qui pourraient dégrader ce type de composé. Le procédé d'évaporation laser assistée par matrice (MAPLE-Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation) a été développé comme une méthode alternative dérivée de l'ablation laser adaptée à l'utilisation de composés thermosensibles [188].

V.1.2 Présentation de la technique

Le procédé MAPLE diffère de la méthode de dépôt par ablation laser pulsée conventionnel par la cible. Dans la technique PLD, le matériau à déposer se trouve sous forme d'une cible solide placée dans une chambre sous vide. Un laser pulsé de forte puissance focalisé sur la cible provoque l'ablation d'atomes, de groupes d'atomes ou de fragments. Selon l'énergie disponible, un plasma peut potentiellement être généré. Dans ces conditions le transfert de molécules sensibles ne peut être réalisé directement. Ainsi une cible préparée par congélation d'un solvant dans lequel sont dispersés ou solubilisés ces matériaux d'intérêt (faible concentration massique de l'ordre de 1 à 5 %) est mise en œuvre dans le procédé MAPLE. Le solvant utilisé absorbe l'énergie du faisceau laser et s'échauffe jusqu'à se sublimer. Cette transformation permet, par entraînement, la désorption des molécules ou particules d'intérêt sans dégradation et sert alors de vecteur à la projection du matériau d'intérêt sur un substrat positionné en vis-à-vis de la cible [189]. Le solvant à l'état gazeux est éliminé par le système de pompage permettant de maintenir

le vide dans la chambre. Le principe de fonctionnement du MAPLE est représenté sur la Figure 98.

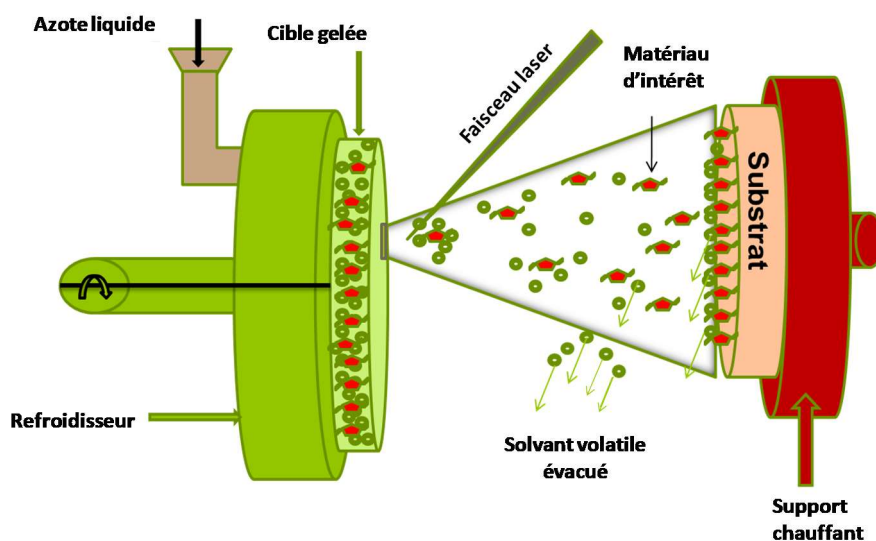


Figure 98 Représentation schématique du fonctionnement du procédé MAPLE

Dans leur étude, Mercado *et al.* [190] proposent une comparaison entre PLD et MAPLE pour la formation d'un revêtement organique de PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) sur des substrats Si(100). Le solvant utilisé est du chloroforme avec une concentration en polymère dans la cible de 1 % massique pour les revêtements obtenus par MAPLE. La cible utilisée pour la PLD est préparée par moulage. Le laser utilisé est un laser à excimère KrF à 248 nm à une fréquence de 5 Hz et une fluence variant de 0,1 à 1 J.cm⁻². La chambre de dépôt est sous atmosphère contrôlée d'argon régulé à une pression de 100 mTorr avec un flux d'argon dans le cas du MAPLE. Les surfaces obtenues par MAPLE présentent des morphologies plus irrégulières que celles obtenues par PLD et dépendantes de l'énergie du laser. Pour des énergies supérieures à 0,2 J.cm⁻², les surfaces présentent des populations de particules de 25-500 nm particulièrement prononcées. Pour des énergies inférieures ou égales à 0,2 J.cm⁻², les surfaces sont plus lisses avec une morphologie semblable à celle présente dans les revêtements obtenus par « spin coating » et sans particules de 25-500 nm visibles. Cette morphologie des surfaces indique que l'évaporation du solvant n'est pas complète au moment de la formation du revêtement. Les auteurs démontrent que dans les deux cas, une diminution de la masse molaire du polymère a lieu passant de 100 kDa initialement à 25 kDa et 8 kDa pour le MAPLE et la PLD respectivement (pour une fluence de 0,2 J.cm⁻²). Cette diminution semble indiquer qu'une interaction rayonnement/matière a lieu et cela malgré la protection qu'est supposée apporter le solvant

dans le cas du dépôt MAPLE. Elle n'est pas cependant reliée à une dégradation du polymère mais à une dépolymérisation car dans les deux cas, un pic à 200 Da traduit la présence des monomères du PLGA. D'autres observations effectuées sur d'autres polymères avec d'autres solvants indiquent à l'inverse qu'il est possible d'utiliser le MAPLE sans dépolymérisation [191,192]. Dans ces deux études, les polymères utilisés ont une masse moléculaire inférieure à 5000 Da. Nous pouvons supposer qu'il existe une influence de la taille du polymère sur ses possibles interactions avec le faisceau laser.

Motoc *et al.* [193] ont démontré une amélioration de certaines propriétés biologiques de revêtements obtenus en combinant une couche organique et une couche minérale. Dans ces travaux, les auteurs proposent d'élaborer sur un substrat en titane un revêtement composite multicouche constitué d'une couche d'hydroxyapatite obtenue par PLD et d'une couche de papaïne ou de lysozyme obtenue par MAPLE. Le revêtement possède alors des propriétés antibactériennes apportées par la couche organique et maintient les propriétés de biocompatibilité et d'ostéointégration par la présence des phosphates de calcium.

N. Mihailescu *et al.* [188] présentent des revêtements composites organiques/inorganiques obtenus uniquement par MAPLE. Cependant, à l'instar des préparations de poudres, le contrôle de la dispersion des phases dans le matériau composite nécessite, soit de passer par une étape de mélange, soit de disposer d'un matériau initial composite et homogène. A. Visan *et al.* [194] proposent dans leur étude un protocole pour former des revêtements composites chitosane/phosphate de calcium sans passer par une étape de mélange physique préalable. Dans leurs travaux, la cible utilisée est séparée en deux compartiments contenant respectivement une suspension de phosphate de calcium et une solution de chitosane. Ce protocole est développé pour permettre un contact intime entre les phases au moment du dépôt, le mélange entre les phases se déroule au sein de la plume de projection. Le revêtement ainsi formé est alors constitué d'un gradient longitudinal de composition allant du polymère pur à la phase minérale pure (le système développé pour ces travaux est présenté sur la Figure 99). Dans cette étude, les auteurs démontrent l'influence de la présence de la phase organique sur la rugosité de surface du revêtement : plus la concentration en polymère augmente, plus la rugosité est importante. Cette augmentation relative induit corrélativement l'amélioration des propriétés antibactériennes du revêtement. Les auteurs prouvent également que le polymère ne subit pas de modification chimique au cours du procédé.

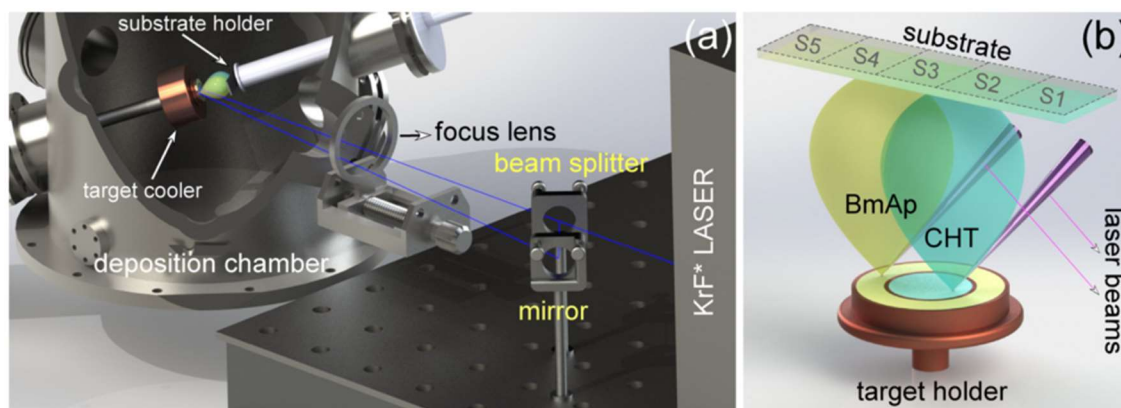


Figure 99 (a) représentation du montage utilisé pour élaborer un revêtement MAPLE composite et (b) zoom représentant le gradient de constitution du revêtement (b)

V.1.3 Etude des revêtements obtenus

Le choix du solvant utilisé pour préparer la cible répond à plusieurs critères comme la solubilité de la phase dispersée dans celui-ci, la faculté d'absorption de l'énergie du laser ... En effet dans le but de protéger le matériau d'intérêt de toutes interactions rayonnement/matière, le solvant doit représenter la majorité massique et volumique de la cible et doit spécialement absorber la longueur d'onde du laser utilisé. Dans notre cas, un laser à excimère KrF a été utilisé et les solvants trouvés dans la littérature pour la longueur d'onde de 248 nm peuvent être le DMSO [195], l'acétone [196], le toluène [197], l'eau distillée [194,198] etc. Ce dernier solvant, même s'il ne présente pas la meilleure absorbance présente l'avantage d'être écologique, non toxique et facile d'accès. C'est donc ce solvant que nous avons retenu pour notre étude.

Des suspensions de poudre minérale ACP ($\text{Ca/P} = 2$) et composites CTS/ACP (35/65 $\text{Ca/P} = 2$), CTS/ACP (35/65 $\text{Ca/P} = 1,67$) et CTS/ACP (50/50 $\text{Ca/P} = 2$) ont été testées pour étudier l'impact de la formulation de la cible sur la qualité du dépôt MAPLE effectué. Les matériaux ont été dispersés dans de l'eau déionisée en prenant soin de maintenir le pourcentage inorganique à 1 % massique. Les suspensions ainsi obtenues sont ensuite refroidies puis immergées dans de l'azote liquide pendant 15 minutes. Une fois la cible formée, elle est placée dans la chambre de dépôt. Un mouvement de rotation est alors appliqué à la cible et celle-ci est maintenue froide par la circulation d'azote liquide dans le porte-échantillon (Figure 98). Les surfaces à revêtir (silicium (100), titane grade 4 et verre) sont placées en vis-à-vis de la cible. La chambre est ensuite placée sous un vide primaire ($2 \cdot 10^{-2}$ mbar) et un laser excimère KrF (248 nm) est utilisé à une fréquence de 10 Hz pour impacter la cible 40 000 fois avec une fluence de $0,58 \text{ J.cm}^{-2}$. L'efficacité moyenne de dépôt est estimée à $68 \pm 10 \mu\text{g/cm}^2$.

Pour caractériser la faisabilité du dépôt et son efficacité, nous avons fait les premières observations sur les substrats en silicium. Ceux-ci, permettent en effet de s'affranchir de défauts de surface pouvant induire des défauts de croissance du revêtement et de l'accumulation de charge rendant difficile l'observation en microscopie électronique.

La Figure 100 présente deux zooms : l'un sur un revêtement minéral (a) et l'autre sur un revêtement composite (b). Sur ces images MEB, nous observons qu'en fonction de la nature du revêtement, la morphologie de surface varie. Dans le cas du revêtement minéral, des particules sphériques submicrométriques caractéristiques de la morphologie des dépôts de nanoparticules obtenus par MAPLE [196,199] sont réparties de façon homogène sur la surface. Dans le cas du revêtement composite, ces mêmes particules sont visibles mais accompagnées de ce qui s'apparente à un film organique et de structures moins régulières et allongées qui sont associées à la présence du polymère. Nous observons dans le cas des dépôts composites que les particules sphériques présentent une faible cohésion avec la matrice organique ce qui est associé à la présence de cavités sphériques dans le revêtement laissant supposer que certaines des particules peuvent être délogées de leur emplacement (mis en évidence par les flèches sur la Figure 100).

La hauteur quadratique moyenne de la surface (S_q) a été mesurée en accord avec la norme ISO 25 178 partie 2 (6) [200] et est égale à 0,0539 μm et 0,104 μm pour les revêtements minéral et composite respectivement. Suivant cette même norme, les hauteurs totales des surfaces (S_z) ont également été caractérisées et sont respectivement de 475 nm et 775 nm. La Figure 101 présente des images AFM des substrats revêtus avec la phase minérale seule ou avec le matériau composite. Les surfaces analysées correspondent approximativement aux surfaces présentées sur les zooms des images MEB. Les valeurs de S_q et S_z couplées aux observations MEB traduisent l'hétérogénéité du revêtement. Il semble de plus qu'en présence du polymère, l'efficacité du revêtement est accentuée.

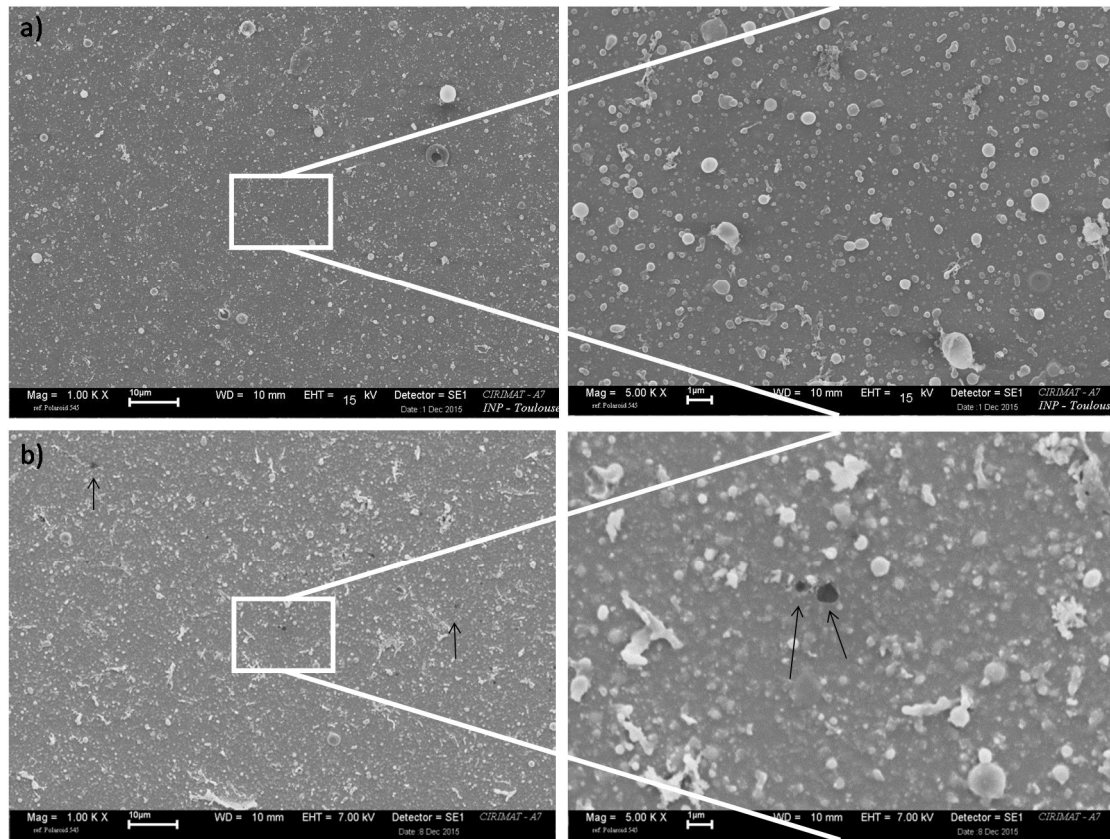


Figure 100 Images MEB a) d'un revêtement minéral (Ca/P= 2) et b) d'un revêtement composite CTS/ACP 35/65 (Ca/P = 2)

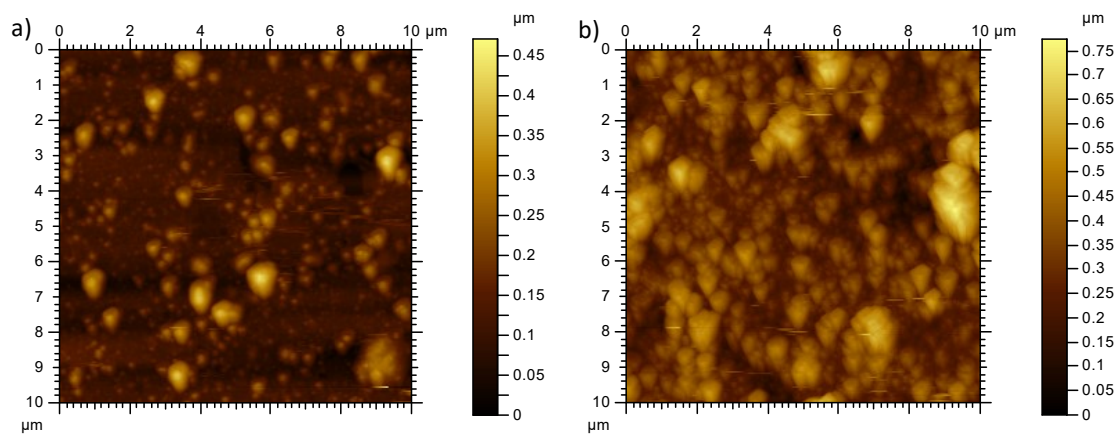


Figure 101 Images AFM de revêtements a) minéral ACP 2 et b) composite CTS/ACP 35/65 (Ca/P = 2)

$$S_q = \sqrt{\left(\frac{1}{A} \iint_A z^2(x; y) dx dy\right)} \quad (6)$$

Pour minimiser la contribution du substrat sur les caractérisations physicochimiques (notamment en diffraction des rayons X), nous avons fait ces analyses sur les dépôts réalisés sur les substrats en verre amorphe. Les analyses physicochimiques de ces revêtements se sont avérées particulièrement difficiles du fait de la faible épaisseur de ces derniers et du caractère amorphe des matériaux déposés. La spectroscopie infrarouge en ATR (Figure 102) est présentée après soustraction du signal dû au substrat et présente des bandes larges vers 1050 et 860 cm^{-1} (indépendamment des formulations) attribuables respectivement à la présence d'ions phosphates et hydrogénophosphates. Des bandes de vibrations mal résolues vers 1600-1400 cm^{-1} sont également observables et attribuées à la présence des fonctions amines ou amides du chitosane mais également possiblement aux fonctions acétates résiduelles.

Sur cette même figure, les diffractogrammes des revêtements minéraux et composites sont présentés ainsi que le diffractogramme du substrat vierge de tout dépôt. Nous constatons que les revêtements ne présentent pas de motifs de diffraction particulièrement différenciables du substrat. Ce résultat peut être interprété comme une contribution trop faible de la diffraction des revêtements par rapport au verre du fait de leur épaisseur sub micrométrique ou du fait que le revêtement est amorphe.

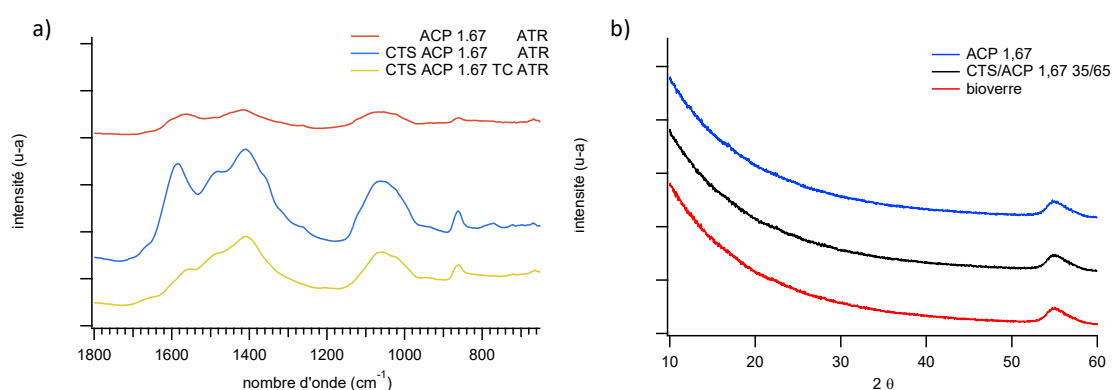


Figure 102 a) spectres infrarouges des revêtements minéraux, composites et composites avec tétracycline et b) motif de diffraction des revêtements minéral et composite comparé au motif de diffraction du substrat

Les revêtements présentent un signal Raman permettant d'étudier la répartition des fonctions dans le dépôt. Une cartographie Raman du revêtement composite (CTS/ACP 35/65 Ca/P = 1,67) est ainsi proposée sur la Figure 103 a). La bande cartographiée est la bande à 950 cm^{-1} attribuée aux phosphates de l'ACP. Sur cette cartographie, les zones en bleues correspondent à des zones où l'intensité du signal à 950 cm^{-1} est faible (point 2) et inversement, quand la couleur tend vers le blanc, l'intensité augmente (point 1). Les variations observées sont à relier non pas à une

hétérogénéité de chimie mais à la rugosité de surface. En effet l'appareil de spectroscopie Raman utilisé est un appareil confocal et la cartographie est alors faite à une certaine « hauteur » du revêtement. La Figure 103 b présente une image en microscopie optique de la zone cartographiée. Nous voyons sur cette image que certaines zones ne sont pas nettes et correspondent aux zones de faibles intensités de la bande à 950 cm^{-1} . Ainsi, ce sont les zones nettes, les « points hauts » du revêtement, qui sont représentés sur cette cartographie. Les spectres correspondants aux deux points sont présentés sur la Figure 103 c). Ces deux spectres présentent la même allure avec des bandes situées aux mêmes décalages Raman. Dans les deux cas, la bande à 950 cm^{-1} est observée ainsi qu'un massif de bandes attribué à la présence du CTS [168]. Une répartition assez homogène de la liaison PO ainsi que du polymère dans le revêtement est alors constatée.

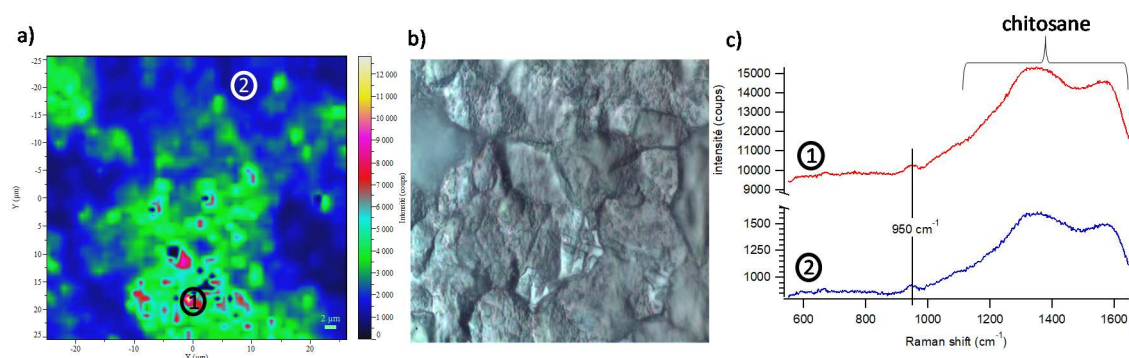


Figure 103 a) cartographie Raman du revêtement MAPLE CTS/ACP 35/65 ($\text{Ca/P} = 1,67$), b) image en microscopie optique de la zone étudiée et c) spectres Raman des points ① et ②

Pour étudier le revêtement composite sur un matériau susceptible d'être utilisé pour des prothèses osseuses, nous avons cherché à caractériser son adhérence et son comportement en présence d'eau sur des substrats en titane. La Figure 104 présente la trace laissée sur le revêtement CTS/ACP 50/50 ($\text{Ca/P} = 2$) déposé sur un substrat en titane après un essai de « scratch test » observée en microscopie électronique. Ces images ne laissent pas apparaître de délamination mais une déformation plastique associée à celle de la phase organique. L'absence de délamination peut traduire une bonne adhésion entre le dépôt et le substrat titane.

Aucune distinction de phase ne peut clairement être faite en BSE sur le dépôt (image non montrée sur ce manuscrit). Ce résultat peut traduire soit que le matériau déposé est très homogène à l'échelle de la poire d'interaction, soit que le revêtement est trop fin et que la poire d'interaction du MEB analyse systématiquement le titane. Or les revêtements obtenus par MAPLE sont (nous l'avons vu précédemment) le plus souvent submicroniques et, dans ce cas,

partiellement organiques. Il est donc très probable que la réponse du substrat couvre celle du revêtement et que c'est pour cette raison que le revêtement paraît homogène au MEB en électrons rétrodiffusés.

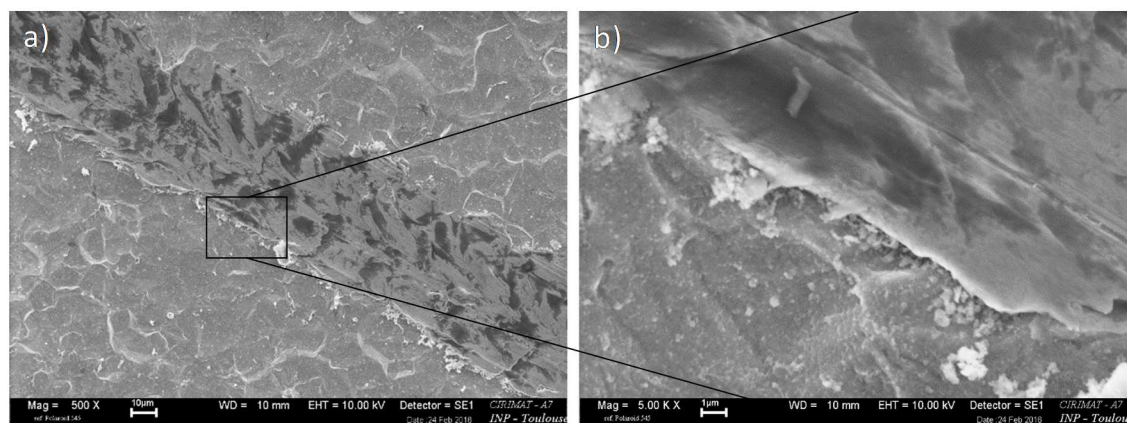


Figure 104 Images MEB du revêtement composite CTS/ACP 50/50 (Ca/P = 2) après le « scratch test »

Pour étudier le comportement des revêtements composites (CTS/ACP 35/65 Ca/P = 1.67) en présence d'eau, nous avons déposé une goutte sur la surface et l'avons laissé sécher à température et pression ambiantes. La Figure 105 présente une image en BSE du front de la goutte. Celui-ci paraît avoir une constitution différente de celle de l'intérieur et de l'extérieur de la goutte car il est plus sombre en BSE (et donc plus concentré en atomes légers). Cette observation est attribuée à un déplacement des chaînes de polymère vers le bord de la goutte déposée suivant le même mécanisme que celui observé dans le « coffee ring effect » [201]. En effet si le polymère est présent dans le revêtement sous la forme d'un sel d'acétate de chitosane (formé par l'évaporation du solvant et la présence d'acétate issu de la préparation de la poudre), il est alors soluble dans l'eau. Lorsque la goutte déposée sur la surface sèche, les chaînes de polymères se comportent alors comme des entités mobiles susceptibles de se déplacer suivant les courants de convections qui ont lieu au sein de la goutte.

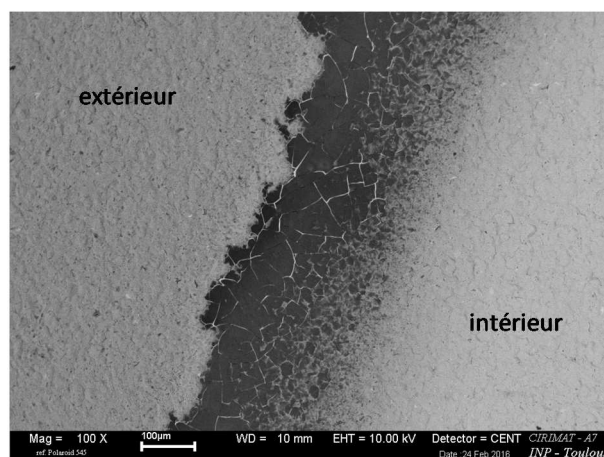


Figure 105 Front de goutte sur un revêtement composite CST/ACP 35/65 (Ca/P = 167)

L'utilisation de matériaux composites confère généralement aux revêtements de bonnes propriétés biologiques d'ostéoconduction et antibactériennes. Néanmoins, le chitosane, dans son utilisation, est régulièrement retrouvé accompagné de molécules actives qui exacerbent ses propriétés antibactériennes. La tétracycline (TC) est l'une de ces molécules [202,203] et peut également être associée aux phosphates de calcium comme Cazalbou *et al.* [204] l'ont démontré en associant de la tétracycline à des apatites biomimétiques. En s'inspirant de ces travaux, nous avons associé à la préparation de poudre composite 250 mg de TC et utilisé cette poudre fonctionnalisée pour élaborer des revêtements pour des essais biologiques. Cette étude biologique a été réalisée en Roumanie par M.C. Chifiriuc au département de microbiologie de la faculté de biologie de l'université de Bucarest.

La morphologie et la croissance des cellules MG63 sur les films minces obtenus n'ont pas été affectées par rapport au contrôle Ti (Figure 106 et Figure 107). Les résultats microscopiques ont été interprétés conformément aux recommandations de la norme ISO 10993-5: 2009 (E); Partie 5 [205]. L'examen n'a révélé aucun changement de la morphologie des cellules telle que des cellules rondes ou contractées pouvant indiquer la mort de certaines cellules.

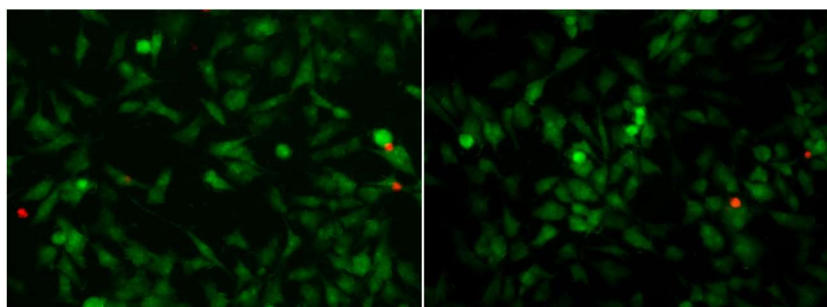


Figure 106 Images microscopiques de fluorescence des cellules MG63 cultivées sur les films minces obtenus (gauche) et sur les disques de contrôle Ti (à droite) pendant 24 h, colorés avec PI et FDA (grossissement x200)

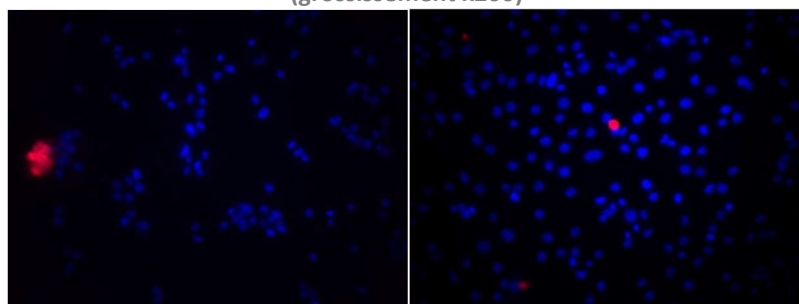


Figure 107 Images microscopiques de fluorescence des cellules MG63 cultivées sur les films minces obtenus (gauche) et sur les disques de contrôle Ti (à droite) 24 h, colorés avec PI et H (grossissement x200)

L'analyse microscopique a été confirmée par le dosage par cytométrie en flux du cycle cellulaire, ne montrant aucun changement dans la répartition des phases de croissance (Figure 108).

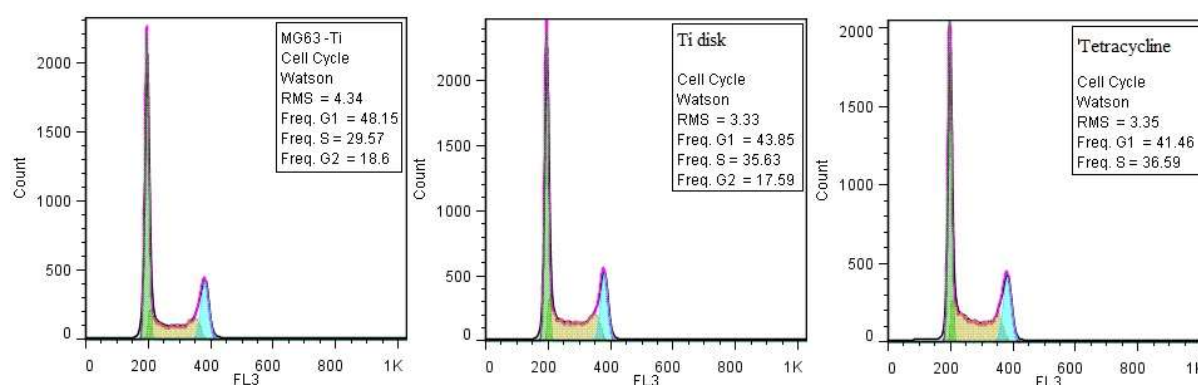


Figure 108 Diagrammes de cytométrie de flux du cycle cellulaire des cellules MG63 cultivées sur un substrat plastique standard (à gauche), des disques de contrôle Ti (milieu) et des films minces obtenus (à droite)

Dans le but d'évaluer à la fois le relargage de l'antibiotique sous sa forme active et sa durée d'action, nous avons évalué l'activité antimicrobienne du film composite avec tétracycline dans une gamme de temps allant de 10 minutes à 48 H.

Les deux premiers temps d'incubation ne présentent pas d'effet inhibiteur par rapport au contrôle titane. Après 1 H d'incubation, l'effet inhibant des revêtements contenant de la tétracycline est mis en évidence en comparaison avec le contrôle. En effet, le nombre de cellules vivaces (VCC) est plus faible dans le cas du revêtement que dans le cas du substrat seul pour les deux types de souches cellulaires testées. L'effet anti biofilm est maintenu à 4 et 6 H pour les deux souches. A 24 H, la souche *E. faecalis* semble moins sensible à l'inhibition que la souche *E. coli* alors qu'à 48 H, les deux souches sont à nouveau inhibées dans leur croissance.

L'action antimicrobienne du revêtement est donc lente et ne se fait ressentir qu'après un temps de latence. Cependant dans le cas des bactéries à gram négatif comme *E.coli*, l'activité antimicrobienne semble plus importante et durable.

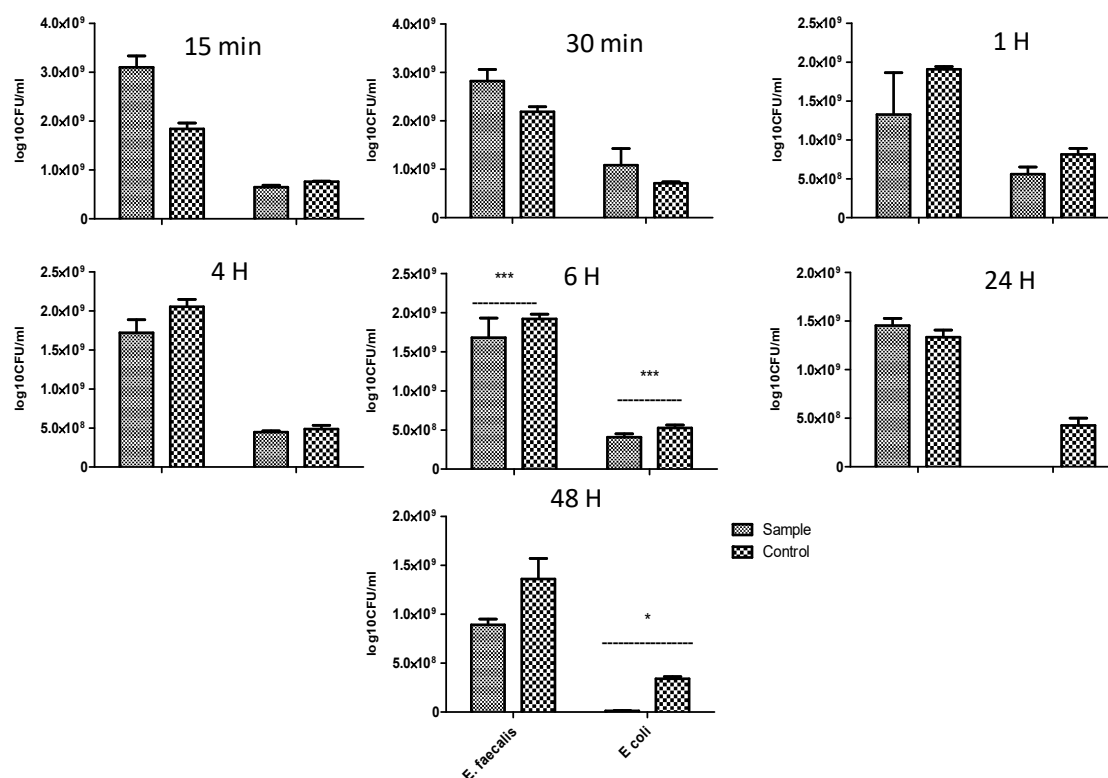


Figure 109 Cinétique de croissance microbienne sur les revêtements avec tétracycline comparée à la croissance sur un substrat contrôle (Ti) après 15, 30 min et 1, 4, 6, 24 et 48 H (two-way Anova, Bonferroni test, *p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001)

V.2 Impression 3D

V.2.1 Etat de l'art

Du fait de leur important potentiel, les méthodes de fabrication additive font l'objet cette dernière décennie d'un intérêt croissant [206]. Ces méthodes se déclinent en plusieurs techniques comme l'impression laser par frittage de poudre (SLS – Selective Laser Sintering) [207], l'impression par jet d'encre [208], l'extrusion de fil fondu ou de suspension visqueuse [209]... Si ces techniques varient par leur mode opératoire et la gamme de matériaux qu'elles proposent [210–212], elles s'appuient toutes sur le même principe : une pièce est conçue ou modélisée numériquement (et peut être modulée à souhait pour répondre à une demande précise), discrétisée en couches consécutives puis ces couches sont imprimées les unes après les autres pour former la pièce voulue. La fabrication additive a également les avantages de présenter moins de perte de matière que les techniques de fabrication par usinage et est moins coûteuse que les techniques par moulage et plus adaptable. Pour ces raisons, l'intérêt pour ces techniques dans le domaine des biomatériaux et *a fortiori* de la substitution osseuse est en croissance. Parmi les techniques rencontrées, l'impression par extrusion de pâte est régulièrement citée [44,213,214] comme technique dérivée d'une méthode utilisée pour le comblement osseux. L'injection d'une pâte phosphocalcique dans un défaut osseux est destinée à former une matrice apatitique pour combler une lacune [215]. En utilisant ce procédé, l'impression 3D de pâte vise à élaborer une matrice avec une géométrie et une porosité contrôlées.

Dans leurs travaux Akkineni *et al.* [213] démontrent la possibilité d'élaborer des matériaux structurés massifs par impression 3D d'une pâte à base de ciments phosphocalciques. La suspension qu'ils préparent est composée d' α -TCP (60 %), de monétite (26 %), de carbonate de calcium (10 %) et d'hydroxyapatite (4 %) pour la partie minérale dans 20 g d'une phase organique constituée de triglycéride, de Tween 80 et d'amphisol. Deux méthodes de prise du ciment sont proposées : une prise dans l'eau pendant 3 jours ou une prise en atmosphère saturée en vapeur d'eau pendant 3 jours également. Dans le premier cas, les auteurs observent la formation de fissures à la surface ainsi qu'au cœur des filaments alors que la seconde méthode de prise ne présente aucune fissure. Cette dernière méthode permet de plus d'obtenir un meilleur contact entre deux couches et par extension une meilleure tenue mécanique du matériau final.

L'utilisation du chitosane comme matrice organique pour l'impression 3D par extrusion a été rapportée par Dorj *et al.* [216]. Dans leur étude, une suspension de verres nanométriques dans une solution acide de chitosane est extrudée et après séchage forme un réseau de fibrilles intimement liées les unes avec les autres. Après incubation dans une solution de SBF, le matériau obtenu par impression 3D se minéralise et un phosphate de calcium avec un rapport Ca/P proche de celui de l'hydroxyapatite est formé. Ang *et al.* [129] proposent, quant à eux, de former un matériau massif par extrusion d'une suspension d'hydroxyapatite dans une solution acide de chitosane. Leurs travaux diffèrent des précédents par le fait qu'ils impriment leur matériau dans une solution basique de NaOH et non à l'air. La précipitation du chitosane piège alors la phase minérale dans le matériau et couche après couche, le matériau composite massif est formé. Dans leur étude, les auteurs énoncent l'importance de la concentration en NaOH. Si celle-ci est trop faible, alors le chitosane ne précipite pas assez vite et des filaments voisins risquent de coalescer. Inversement, quand la concentration est trop importante, le chitosane précipite trop vite et il en résulte une mauvaise adhésion entre les filaments.

Nous proposons d'utiliser notre matériau composite pour former, par extrusion de pâte, une pièce 3D. Du fait de son homogénéité initiale, l'élaboration de la pâte composite ne nécessite pas d'étape de mélange entre les phases. De plus, la propension de la phase amorphe à évoluer vers une apatite mal cristallisée au cours du mécanisme de prise permet au phénomène de biominéralisation du chitosane de se produire pendant le procédé et d'assurer une tenue mécanique à la pièce. Nous avons utilisé une imprimante grand public (BCN3D+ - BCN3D, Barcelone) munie d'un module d'extrusion de pâte pour établir la faisabilité de l'impression à partir d'une pâte constituée de la poudre composite CTS/ACP (Ca/P = 1,67 35/65) et d'eau déionisée. Nous avons cherché dans un premier temps à optimiser la formulation de la pâte pour permettre l'impression sans modifier les paramètres matériels de l'imprimante comme les moteurs d'extrusion. Dans un second temps, nous avons optimisé les paramètres d'impression dans l'optique d'obtenir une pièce cohérente. Enfin nous avons testé différents posts traitements pour investiguer leurs impacts sur la pièce imprimée.

V.2.2 Etude de faisabilité

Nous avons déjà observé que la phase minérale atomisée évolue en milieu aqueux en formant des plaques qui s'interpénètrent/s'enchevêtrent les unes aux autres à l'instar du plâtre ou des ciments phosphocalciques (Figure 55). Pour qualifier cette observation, nous avons préparé des suspensions denses en mélangeant soit une poudre minérale ACP Ca/P = 1,67, soit une poudre composite (CTS/ACP 35/65 Ca/P = 1,67) à de l'eau déionisée avec un rapport massique

liquide/solide (L/S) de 1 :1. Cette suspension est malaxée manuellement jusqu'à obtention d'une « bille » d'environ 0,5 cm de diamètre et placée à 50 °C dans une atmosphère saturée en humidité pendant 24 h. Après cette période, les échantillons minéraux et composites présentent des comportements différents. La bille minérale s'effrite par simple compression manuelle alors que l'échantillon composite présente une résistance à la compression suffisante pour garder sa cohésion et ne pas s'effriter. La présence de la phase organique a donc comme impact de minimiser la friabilité de la pièce et d'augmenter sa cohésion. Notons que cet échantillon présente également un changement de couleur évoluant du blanc au marron après séchage alors que la bille minérale reste blanche. Dans les deux cas, une diminution du diamètre de la sphère est constatée avec des valeurs de $\sim 0,3$ et $\sim 0,4$ cm après séchage pour les échantillons minéraux et composites respectivement. Ainsi lorsqu'une suspension composite est préparée, prise et séchée, elle présente une résistance mécanique à la compression appréciable en comparaison avec une suspension minérale. La propriété de cette suspension composite à passer d'un état liquide dense à solide mécaniquement résistant permet effectivement d'envisager son utilisation pour des mises en forme en impression 3D par extrusion. Cependant, le mélange massique 1 :1 est trop dense/pâteux pour être injectable par l'imprimante 3D, il nous a donc fallu le diluer.

Pour permettre une extrusion de qualité, nous avons cherché à trouver un rapport massique L/S donnant à la fois une suspension suffisamment fluide pour la puissance du moteur d'extrusion mais également suffisamment cohésive pour garder la morphologie du filament extrudé. Pour trouver la formulation la plus appropriée, les ratios massiques L/S de 5 à 3,5 ont été testés. La formulation la plus adéquate pour respecter les deux conditions a alors été établie comme étant égale à 3,8, le rapport de 4 étant trop liquide pour garder la morphologie du filament et 3,6 trop dense pour le moteur d'extrusion. Cette suspension optimisée est introduite, après 4 min de mélange, dans une seringue de 100 mL à l'aide d'une spatule en évitant d'y introduire des bulles (qui poseraient problème lors de l'impression par la suite [217]). Le piston est ensuite inséré jusqu'à la limite de l'embout de la seringue (voir un peu au-delà pour initier l'extrusion). Le comportement de la pâte évolue très rapidement lors de sa préparation : au moment de l'ajout et du mélange de la phase liquide à la poudre, la préparation apparaît très fluide mais 4 minutes après, la suspension s'épaissit de façon importante. Elle reste cependant extrudable encore 10 minutes mais devient ensuite trop dense pour le moteur d'extrusion.

Lors de l'impression, différents défauts peuvent apparaître. Le plus récurrent est la rupture de la continuité du filament durant l'extrusion de la pâte. Nous avons identifié plusieurs paramètres

ayant un impact sur cette rupture. Le premier et le plus important est la présence de bulles d'air dans la suspension introduites dans le piston d'extrusion lors de la préparation. Lorsque ces bulles sont extrudées, elles stoppent momentanément l'extrusion de la suspension et le filament devient alors discontinu. Parmi les paramètres contrôlables via l'interface ordinateur/imprimante, la vitesse d'extrusion, la hauteur de couche, le taux de remplissage (correspondant à la densité de matière présente dans le cœur de la pièce) sont des paramètres qui permettent de contrôler indirectement la qualité de l'extrusion. Ces paramètres partagent comme point commun d'influer sur la qualité du contact entre deux couches extrudées. Si la vitesse d'impression est trop importante, peu de matière se trouve en contact avec la couche inférieure et le filament n'adhère pas au suivant. Si la hauteur de couche est plus faible que le diamètre du filament extrudé, alors celui-ci est légèrement écrasé sur la couche inférieure et le contact entre les deux filaments est plus important. Enfin si le taux de remplissage est trop faible, la distance entre deux points de contact du filament est trop importante et celui-ci peut rompre sous l'effet de son propre poids au niveau du vide entre-deux extrudats voisins. Le diamètre de sortie de l'extrusion étant de 1,5 mm, la hauteur de couche est fixée à 1,3 mm pour assurer un meilleur contact entre les couches successivement imprimées. La première de ces couches est extrudée avec une hauteur de 0,8 mm afin d'écraser le filament extrudé et d'assurer avec les couches supérieures une surface de contact importante. La vitesse d'impression, correspondant à la vitesse de déplacement de la buse (la puissance du moteur d'extrusion n'étant pas contrôlable via l'interface) optimale pour assurer une extrusion continue est de 8 mm.s⁻¹. L'ajustement de la vitesse de déplacement de la buse prend en compte à la fois la continuité de l'extrusion mais également la quantité de matière à utiliser pour imprimer une pièce. Nous avons en effet cherché à minimiser cette quantité et donc la vitesse énoncée plus haut correspond à celle pour laquelle l'extrusion reste continue avec le moins de matière utilisée. Le taux de remplissage présente également ces deux aspects d'économie de matière et de continuité d'extrusion. Un taux de remplissage inférieur à 50 % est trop faible pour assurer la continuité du filament. Celui-ci repose sur trop peu de matière et se rompt sous son propre poids. Des taux supérieurs à 50 % assurent suffisamment d'appuis mais utilisent inutilement de la matière pour cette étude de faisabilité, c'est donc cette valeur de 50 % que nous avons retenue pour cette étude. Une pièce imprimée avec les paramètres ainsi définis est présentée sur la Figure 110. Malgré l'optimisation des paramètres d'impressions, certaines ruptures d'extrusion restent visibles (pointées par les flèches sur la figure).

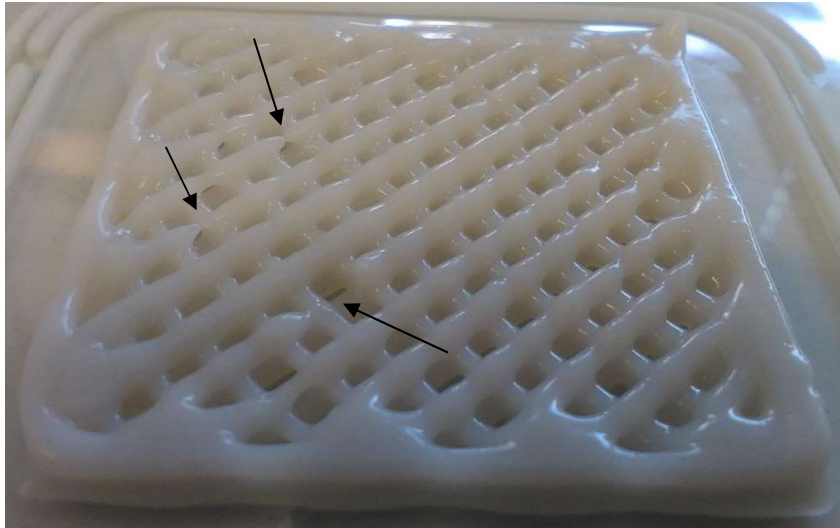


Figure 110 Pièce imprimée par extrusion avec une vitesse de $0,8 \text{ mm.s}^{-1}$, un remplissage de 50 % et une hauteur de couche de 1,3 mm

Une fois les pièces imprimées (soit des carrés de 5 cm de côté sur 3 ou 4 couches, soit des cylindres de 2 cm de diamètre également sur 3 ou 4 couches), différents traitements de séchage/prise ont été testés. Dans les premiers essais, les pièces ont séché à l'air libre toute une nuit à température ambiante. Dans ce cas, une fois sèches, elles présentent de nombreuses fissures et n'ont plus de cohérence. Dans un second temps, nous avons laissé les échantillons dans une étuve à 50°C pendant une nuit sous atmosphère saturée en vapeur d'eau. Dans ce cas, la pièce ne garde pas sa forme imprimée et s'effondre sous son propre poids. La différence avec les essais préliminaires que nous avons faits avec le matériau composite sous forme de bille et celui-ci imprimé en 3D peut être expliquée par la surface d'échange avec l'eau. Au-delà de cette surface d'échange bien plus importante offerte par une pièce imprimée en trois dimensions que celle offerte par une sphère compacte, la dilution plus importante dans le cas de la pièce imprimée en 3D est aussi un élément important. Enfin, nous avons proposé de laisser le matériau à l'air libre pendant 2 h pour qu'il puisse évoluer et se solidifie suffisamment comme mentionné dans le chapitre 2, puis nous l'avons trempé dans l'azote liquide et séché par lyophilisation. Ce dernier traitement permet de limiter les fissures et de préserver la géométrie de la pièce imprimée. Cependant, une fois lyophilisée, la pièce présente des propriétés mécaniques très faibles et s'effrite facilement. L'eau représentant une grande part du volume de la pièce du fait de la dilution de la pâte utilisée, lorsqu'elle est retirée par lyophilisation, nous pouvons supposer que la pièce présente une grande porosité qui implique que les cristaux sont trop éloignés les uns des autres pour fournir une résistance mécanique suffisante.

V.3 Résumé

Dans ce chapitre, nous avons établi la faisabilité de la mise en forme de la poudre composite chitosane/phosphate de calcium obtenue par atomisation suivant deux méthodes : les revêtements MAPLE et la fabrication additive par extrusion de pâte.

Malgré l'hétérogénéité apparente en microscopie électronique du revêtement MAPLE, celui-ci semble, dans une première approche, avoir une adhésion au substrat suffisante. Les revêtements composites semblent être plus denses que les revêtements minéraux ce qui s'explique par un piégeage des particules minérales dans une matrice, un film, organique. Nous avons défini dans le chapitre 2 que la phase minérale cristallise en un mélange de brushite et d'apatite mal cristallisée rapidement lorsqu'elle est immergée dans l'eau. Or, la préparation de la cible MAPLE implique de disperser la phase minérale dans l'eau déionisée pendant 15 minutes. Ce temps est, nous l'avons vu, suffisant pour transformer la phase amorphe et nous pourrions donc nous attendre à observer des pics de brushite ou d'apatite mal cristallisée dans le revêtement mais celui-ci semble n'être qu'amorphe. Nous avons également mentionné dans l'état de l'art de ce chapitre que certains travaux portant sur les dépôts par MAPLE rapportent une interaction rayonnement/matière entre le laser et la phase organique se traduisant par une dépolymérisation de celle-ci. Dans notre cas, nous pouvons également envisager une dépolymérisation du chitosane ou éventuellement une dégradation. Pour caractériser plus finement ces deux modifications possibles, des études de surfaces plus poussées sont à envisager (XPS, Raman infrarouge ...). Nous avons également démontré dans ce chapitre que les revêtements obtenus par MAPLE ne sont pas cytotoxiques et qu'avec l'ajout d'une molécule active appropriée, ces revêtements présentent un comportement antibactérien.

Dans ce chapitre, nous avons également démontré qu'en dispersant la poudre composite atomisée dans 3,8 fois son poids en eau, nous obtenons une pâte aux propriétés rhéologiques adaptées à l'extrusion. En utilisant ces propriétés d'extrudabilité, nous avons établi la faisabilité de mise en forme de ce matériau via un procédé d'impression 3D : l'extrusion de pâte. Cependant du fait de la grande proportion d'eau, la pièce imprimée présente un retrait important qui génère trop de fissures. Des études d'optimisation de formulation seraient donc à mettre en place en ajoutant par exemple un plastifiant qui pourrait minimiser la quantité d'eau et ainsi le retrait. Nous avons également observé que la pâte n'est plus extrudable 10 minutes après le début du mélange. L'ajout d'un plastifiant ou d'un retardateur de prise pourrait permettre d'augmenter ce temps. Enfin les caractérisations physicochimiques sont à poursuivre pour caractériser l'évolution chimique du matériau au cours de l'impression.

Liste des Figures

<i>Figure 98 Représentation schématique du fonctionnement du procédé MAPLE</i>	<i>130</i>
<i>Figure 99 (a) représentation du montage utilisé pour élaborer un revêtement MAPLE composite et (b) zoom représentant le gradient de constitution du revêtement (b)</i>	<i>132</i>
<i>Figure 100 Images MEB a) d'un revêtement minéral (Ca/P= 2) et b) d'un revêtement composite CTS/ACP 35/65 (Ca/P = 2)</i>	<i>134</i>
<i>Figure 101 Images AFM de revêtements a) minéral ACP 2 et b) composite CTS/ACP 35/65 (Ca/P = 2)</i>	<i>134</i>
<i>Figure 102 a) spectres infrarouges des revêtements minéraux, composites et composites avec tétracycline et b) motif de diffraction des revêtements minéral et composite comparé au motif de diffraction du substrat.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 103 a) cartographie Raman du revêtement MAPLE CTS/ACP 35/65 (Ca/P = 1,67), b) image en microscopie optique de la zone étudiée et c) spectres Raman des points ① et ②.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 104 Images MEB du revêtement composite CTS/ACP 50/50 (Ca/P = 2) après le « scratch test »</i>	<i>137</i>
<i>Figure 105 Front de goutte sur un revêtement composite CST/ACP 35/65 (Ca/P = 1,67)</i>	<i>138</i>
<i>Figure 106 Images microscopiques de fluorescence des cellules MG63 cultivées sur les films minces obtenus (gauche) et sur les disques de contrôle Ti (à droite) pendant 24 h, colorés avec PI et FDA (grossissement x200)</i>	<i>139</i>
<i>Figure 107 Images microscopiques de fluorescence des cellules MG63 cultivées sur les films minces obtenus (gauche) et sur les disques de contrôle Ti (à droite) 24 h, colorés avec PI et H (grossissement x200)</i>	<i>139</i>
<i>Figure 108 Diagrammes de cytométrie de flux du cycle cellulaire des cellules MG63 cultivées sur un substrat plastique standard (à gauche), des disques de contrôle Ti (milieu) et des films minces obtenus (à droite)</i>	<i>139</i>
<i>Figure 109 Cinétique de croissance microbienne sur les revêtements avec tétracycline comparée à la croissance sur un substrat contrôle (Ti) après 15, 30 min et 1, 4, 6, 24 et 48 H (two-way Anova, Bonferroni test, *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; *** $p < 0.001$)</i>	<i>140</i>
<i>Figure 110 Pièce imprimée par extrusion avec une vitesse de $0,8 \text{ mm.s}^{-1}$, un remplissage de 50 % et une hauteur de couche de 1,3 mm</i>	<i>145</i>

Conclusion générale

Dans ce manuscrit, nous avons démontré la faisabilité de l'obtention, par atomisation-séchage, de particules nanocomposites organiques/inorganiques en une étape à partir des différents précurseurs en solution. La phase minérale ainsi obtenue est particulièrement réactive et de ce fait utile pour des applications dans le domaine de la chimie des biomatériaux. De plus cette dernière est très finement dispersée au sein de la matrice polymérique.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'atomisation d'une solution de précurseurs de phosphate de calcium mène à la formation d'une espèce phosphocalcique amorphe. Ces résultats confirment certaines observations des précédents travaux de Chow et al. [148], obtenus toutefois après la dissolution d'une hydroxyapatite avant atomisation. Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu affiner les caractéristiques physico-chimiques ainsi que structurales du composé phosphocalcique formé. En effet il apparait que cette espèce est notamment définie par un rapport Ca/P proche de 1,3. Par ailleurs lorsque ce rapport dans la solution initiale est dépassé, un excès d'acétate de calcium (utilisé comme précurseur) recristallise. La spectrométrie RMN prouve une proximité spatiale importante entre le phosphate de calcium et l'acétate. Cette proximité semble indiquer que l'acétate se forme proche de la surface des particules de phosphate de calcium. De plus, le rapport $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ indique que les particules phosphocalciques ont potentiellement un excès d'ion calcium. L'acétate agirait alors comme un contre-ion pour neutraliser la poudre. Cet acétate en excès servirait par la suite de point de germination pour l'acétate de calcium.

Nous avons également démontré dans cette première partie du travail que la poudre minérale préparée à partir d'une solution de précurseurs est hiérarchiquement structurée à différentes échelles. Macroscopiquement elle se présente sous la forme de grains de poudre d'environ 2 μm de diamètre. Ces grains de poudre sont constitués d'agrégats de sphères de l'ordre de la centaine de nanomètres organisées en chapelets. Ces sphères nanométriques sont, elles-mêmes, constituées de clusters d'une taille de l'ordre du nanomètre correspondant à la longueur de cohérence du matériau. Cette structuration du phosphate de calcium amorphe est ainsi en accord avec le modèle qu'ont proposé Brecevic *et al.* en 1972 [85] par suivi de la turbidité d'une suspension obtenue par coprécipitation de phosphate de calcium.

Conclusion générale

Dans le second chapitre de cette thèse, nous nous sommes attachés à associer un biopolymère, toujours en solution, aux précurseurs minéraux. Ceci a pu être envisagé par la sélection adéquate de ces derniers au début de ce travail. A notre connaissance cet aspect composite chitosane/phosphate de calcium par atomisation n'avait été traité jusqu'à présent, dans la littérature, qu'à partir de suspension ou nanosuspension. L'homogénéité de ces poudres est alors dépendante de la maîtrise de la taille des particules minérales ainsi que des techniques de mélange des phases avant atomisation.

Tout d'abord nous avons étudié l'impact de l'atomisation sur le polymère. La solubilisation du polymère associée au procédé de séchage quasi instantané induit une désorganisation des chaînes de polymère dans la poudre obtenue et la perte de son caractère semi-cristallin. Une modification chimique a également lieu via l'atomisation. En effet la poudre de chitosane atomisée se présente comme un sel d'acétate de chitosane. Cette modification chimique implique que le matériau atomisé est plus soluble dans l'eau que le matériau commercial.

Dans un deuxième temps, nous avons pu mettre en œuvre un matériau composite pulvérulent. La chimie du phosphate de calcium amorphe n'a pas été affectée par l'ajout du polymère. Toutefois, il apparaît que cet ajout dans la solution initiale entraîne une modification de la structuration du phosphate de calcium amorphe. En effet, dans le matériau composite, l'organisation des nanoparticules en chapelets semble inhibée en présence du polymère. Il a été également établi que la répartition de la phase minérale dans le chitosane est meilleure lorsque la quantité de celui-ci est en proportion importante. Nous pouvons également constater qu'en présence du chitosane, la recristallisation de l'acétate de calcium est retardée et n'apparaît qu'à partir de rapports Ca/P plus élevés que pour la phase minérale seule ou pour des proportions de polymères faibles. Ce phénomène peut être expliqué par la formation préférentielle du sel d'acétate de chitosane qui consomme alors les ions acétate. Aucune preuve directe d'interaction chimique n'a pu être mise en évidence entre CTS et ACP. Cependant une interaction physique a été démontrée. En effet, les résultats SAXS semblent démontrer que la présence du chitosane crée une gêne stérique dans le phénomène d'agrégation des clusters amorphes et de la formation des nanoparticules. Cette interaction physique est également mise en évidence par la proximité spatiale observable via la spectrométrie RMN. Nous avons, grâce à cette technique, démontré que le chitosane a, en effet, une proximité avec les atomes de phosphore des ACPs. Cette proximité est plus marquée dans le cas des ACPs ayant un rapport Ca/P de 1,3. Dans le cas de rapports plus importants, l'acétate présent à la surface des particules amorphes pourrait constituer un écran.

L'homogénéité et la métastabilité des poudres ainsi élaborées offrent la possibilité d'une mise en forme par voie douce. Ainsi deux techniques de mise en forme ont été étudiées : le procédé MAPLE, pour l'élaboration de revêtements minces et l'impression 3D de pâtes pour l'obtention d'objets massifs. Ces essais préliminaires ont permis de mettre en avant le potentiel de transformation de la poudre préparée par atomisation séchage. Les études biologiques faites sur le revêtement ont, de plus, permis de démontrer les propriétés antibactériennes du matériau utilisé.

Bibliographie

- [1] J. Venkatesan, S.K. Kim, Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview, *Mar. Drugs*. 8 (2010) 2252–2266. doi:10.3390/md8082252.
- [2] C. Wittkowske, G.C. Reilly, D. Lacroix, C.M. Perrault, In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4 (2016). doi:10.3389/fbioe.2016.00087.
- [3] E. Szymańska, K. Winnicka, Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications, *Mar. Drugs*. 13 (2015) 1819–1846. doi:10.3390/md13041819.
- [4] H. Daniell, *NIH Public Access*, 76 (2012) 211–220. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid.
- [5] N. Nassif, F. Gobeaux, J. Seto, E. Belamie, P. Davidson, P. Panine, G. Mosser, P. Fratzl, M.-M. Giraud Guille, Self-Assembled Collagen–Apatite Matrix with Bone-like Hierarchy, *Chem. Mater.* 22 (2010) 3307–3309. doi:10.1021/cm903594n.
- [6] S.C. Cowin, Do liquid crystal-like flow processes occur in the supramolecular assembly of biological tissues?, *J. Nonnewton. Fluid Mech.* 119 (2004) 155–162. doi:10.1016/j.jnnfm.2004.01.012.
- [7] S.C. Manolagas, Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 115–137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395.
- [8] A.G. Robling, C.H. Turner, Mechanical signaling for bone modeling and remodeling., *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 19 (2009) 319–38. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- [9] S. Cenci, M.N. Weitzmann, C. Roggia, N. Namba, D. Novack, J. Woodring, R. Pacifici, Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-??, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1229–1237. doi:10.1172/JCI11066.
- [10] S. Weiner, H.D. Wagner, THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28 (1998) 271–298. doi:10.1146/annurev.matsci.28.1.271.
- [11] M. Valletregi, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Chem.*

- 32 (2004) 1–31. doi:10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001.
- [12] M.D. Gryn timer, L.C. Bonar, M.J. Glimcher, Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: A radial distribution function study, *Calcif. Tissue Int.* 36 (1984) 291–301. doi:10.1007/BF02405333.
- [13] C. Rey, C. Combes, C. Drouet¹, M. Glimcher, Bone mineral: update on chemical composition and structure, *Osteoporos. Int.* 20 (2010) 1013–1021. doi:10.1007/s00198-009-0860-y.Bone.
- [14] J.D. Termine, A.S. Posner, Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions, *Science* (80-.). 153 (1966) 1523–1525. doi:10.1126/science.153.3743.1523.
- [15] N.J. Crane, V. Popescu, M.D. Morris, P. Steenhuis, M.A. Ignelzi, Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization, *Bone.* 39 (2006) 434–442. doi:10.1016/j.bone.2006.02.059.
- [16] S. Kim, H.S. Ryu, H. Shin, H.S. Jung, K.S. Hong, In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions, *Mater. Chem. Phys.* 91 (2005) 500–506. doi:10.1016/j.matchemphys.2004.12.016.
- [17] M. Kazanci, P. Fratzl, K. Klaushofer, E.P. Paschalis, Complementary information on in vitro conversion of amorphous (precursor) calcium phosphate to hydroxyapatite from raman microspectroscopy and wide-angle X-ray scattering, *Calcif. Tissue Int.* 79 (2006) 354–359. doi:10.1007/s00223-006-0011-9.
- [18] J. Mahamid, B. Aichmayer, E. Shimoni, R. Ziblat, C. Li, S. Siegel, O. Paris, P. Fratzl, S. Weiner, L. Addadi, Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 6316–21. doi:10.1073/pnas.0914218107.
- [19] E. Beniash, R.A. Metzler, R.S.K. Lam, P.U.P.A. Gilbert, Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel, *J. Struct. Biol.* 166 (2009) 133–143. doi:10.1016/j.jsb.2009.02.001.
- [20] Y. Wang, T. Azaïs, M. Robin, A. Vallée, C. Catania, P. Legriel, G. Pehau-Arnaudet, F. Babonneau, M.-M. Giraud-Guille, N. Nassif, The predominant role of collagen in the

- nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite., *Nat. Mater.* 11 (2012) 724–33. doi:10.1038/nmat3362.
- [21] F. Nudelman, K. Pieterse, A. George, P.H.H. Bomans, H. Friedrich, L.J. Brylka, P. a J. Hilbers, G. de With, N. a J.M. Sommerdijk, The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors., *Nat. Mater.* 9 (2010) 1004–9. doi:10.1038/nmat2875.
- [22] L.C. Palmer, C.J. Newcomb, S.R. Kaltz, E.D. Spoerke, S.I. Stupp, Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4754–4783. doi:10.1021/cr8004422.
- [23] W.J. Landis, M.J. Song, A. Leith, L. McEwen, B.F. McEwen, Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction., *J. Struct. Biol.* 110 (1993) 39–54. doi:10.1006/jsbi.1993.1003.
- [24] A.K. Lynn, W. Bonfield, A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield, *Acc. Chem. Res.* 38 (2005) 202–207. doi:10.1021/ar040234d.
- [25] F. Miyaji, Y. Kono, Y. Suyama, Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite, *Mater. Res. Bull.* 40 (2005) 209–220. doi:10.1016/j.materresbull.2004.10.020.
- [26] J.S. Suwandi, R.E.M. Toes, T. Nikolic, B.O. Roep, Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells, *Clin. Exp. Rheumatol.* 33 (2015) 97–103. doi:10.1002/jbm.a.
- [27] V. Stanić, S. Dimitrijević, J. Antić-Stanković, M. Mitrić, B. Jokić, I.B. Plećaš, S. Raičević, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 6083–6089. doi:10.1016/j.apsusc.2010.03.124.
- [28] I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield, Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* 44 (1999) 422–428. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990315)44:4<422::AID-JBM8>3.0.CO;2-#.
- [29] Y. Lin, Z. Yang, J. Cheng, Preparation, Characterization and Antibacterial Property of

- Cerium Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles, *J. Rare Earths*. 25 (2007) 452–456. doi:10.1016/S1002-0721(07)60455-4.
- [30] Y. Chen, X. Miao, Thermal and chemical stability of fluorohydroxyapatite ceramics with different fluorine contents, *Biomaterials*. 26 (2005) 1205–1210. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.04.027.
- [31] J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, 1994.
- [32] S. V Dorozhkin, *Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine*, (2009) 399–498. doi:10.3390/ma2020399.
- [33] S. Singh, V. Singh, S. Aggarwal, U.K. Mandal, Synthesis of brushite nanoparticles at different temperatures, *Chem. Pap.* 64 (2010) 491–498. doi:DOI 10.2478/s11696-010-0032-8.
- [34] Y. Guo, S. Qu, X. Lu, H. Xie, H. Zhang, J. Weng, The theoretical and experimental study on dicalcium phosphate dehydrate loading with protocatechuic aldehyde, *J. Mol. Model.* 16 (2010) 1187–1194. doi:10.1007/s00894-009-0617-8.
- [35] M.C. Rodrigues, T.L.R. Hewer, G.E. De Souza Brito, V.E. Arana-Chavez, R.R. Braga, Calcium phosphate nanoparticles functionalized with a dimethacrylate monomer, *Mater. Sci. Eng. C*. 45 (2014) 122–126. doi:10.1016/j.msec.2014.08.066.
- [36] M. Bohner, Calcium orthophosphates in medicine: From ceramics to calcium phosphate cements, *Injury*. 31 (2000). doi:10.1016/S0020-1383(00)80022-4.
- [37] F.Z. Cui, H.B. Wen, X.W. Su, X.D. Zhu, Microstructures of external periosteal callus of repaired femoral fracture in children., *J. Struct. Biol.* 117 (1996) 204–8. doi:10.1006/jsbi.1996.0084.
- [38] J.L. Lacout, E. Mejdoubi, M. Hamad, Crystallization mechanisms of calcium phosphate cement for biological uses, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 7 (1996) 371–374. doi:10.1007/BF00154552.
- [39] H. Monma, T. Kamiya, Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite, *J. Mater. Sci.* 22 (1987) 4247–4250. doi:10.1007/BF01132015.
- [40] L.M. Grover, J.C. Knowles, G.J.P. Fleming, J.E. Barralet, In vitro ageing of brushite calcium

- phosphate cement, *Biomaterials*. 24 (2003) 4133–4141. doi:10.1016/S0142-9612(03)00293-X.
- [41] C.Y. Wen, L. Qin, K.M. Lee, K.M. Chan, The use of brushite calcium phosphate cement for enhancement of bone-tendon integration in an anterior cruciate ligament reconstruction rabbit model, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 89 (2009) 466–474. doi:10.1002/jbm.b.31236.
- [42] F. Theiss, D. Apelt, B. Brand, A. Kutter, K. Zlinszky, M. Böhner, S. Matter, C. Frei, J. a. Auer, B. Von Rechenberg, Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement, *Biomaterials*. 26 (2005) 4383–4394. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.056.
- [43] X. Wang, J. Ye, Y. Wang, X. Wu, B. Bai, Control of crystallinity of hydrated products in a calcium phosphate bone cement, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 81A (2007) 781–790. doi:10.1002/jbm.a.31059.
- [44] U. Gbureck, T. Holzel, U. Klammert, K. Wurzler, F.A. Müller, J.E. Barralet, Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes prepared by 3D powder printing, *Adv. Funct. Mater.* 17 (2007) 3940–3945. doi:10.1002/adfm.200700019.
- [45] E. Vorndran, M. Klarner, U. Klammert, L.M. Grover, S. Patel, J.E. Barralet, U. Gbureck, 3D Powder Printing of β -Tricalcium Phosphate Ceramics Using Different Strategies, *Adv. Eng. Mater.* 10 (2008) B67–B71. doi:10.1002/adem.200800179.
- [46] O. Suzuki, Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials, *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 49 (2013) 58–71. doi:10.1016/j.jdsr.2013.01.001.
- [47] A. Destainville, E. Champion, E. Laborde, Synthesis , characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate, 80 (2003) 269–277.
- [48] S. Belouafa, H. Chaair, W. Chroqui, K. Digua, O. Britel, A. Essaadani, Central Composite Design and Optimization by Response Analysis of β -Tricalcium Phosphate Elaboration, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* 181 (2006) 779–786. doi:10.1080/10426500500271816.
- [49] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders, *Biomaterials*. 23 (2002) 1065–1072. doi:10.1016/S0142-9612(01)00218-6.
- [50] S. V. Dorozhkin, Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine, *Materials*

- (Basel). 2 (2009) 399–498. doi:10.3390/ma2020399.
- [51] R.G. Carrodegua, S. De Aza, ??-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3536–3546. doi:10.1016/j.actbio.2011.06.019.
- [52] S. Somrani, C. Rey, M. Jemal, Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate, *J. Mater. Chem.* 13 (2003) 888–892. doi:10.1039/b210900j.
- [53] J. Zhang, W. Liu, O. Gauthier, S. Sourice, P. Pilet, G. Rethore, K. Khairoun, J.-M. Bouler, F. Tancret, P. Weiss, A simple and effective approach to prepare injectable macroporous calcium phosphate cement for bone repair: Syringe-foaming using a viscous hydrophilic polymeric solution, *Acta Biomater.* (2015). doi:10.1016/j.actbio.2015.11.055.
- [54] A. Canul-Chuil, R. Vargas-Coronado, J. V. Cauich-Rodríguez, A. Martínez-Richa, E. Fernandez, S.N. Nazhat, Comparative study of bone cements prepared with either HA or α -TCP and functionalized methacrylates, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 64B (2003) 27–37. doi:10.1002/jbm.b.10486.
- [55] M.I. Kay, R.A. Young, A.S. Posner, Crystal Structure of Hydroxyapatite., *Nature.* 204 (1964) 1050–1052. doi:10.1038/2041050a0.
- [56] U. Vijayalakshmi Natarajan, S. Rajeswari, Influence of calcium precursors on the morphology and crystallinity of sol-gel-derived hydroxyapatite nanoparticles, *J. Cryst. Growth.* 310 (2008) 4601–4611. doi:10.1016/j.jcrysgro.2008.07.118.
- [57] L. Bernard, M. Freche, J.L. Lacout, B. Biscans, Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature - Influence of purity of the raw material, in: *Powder Technol.*, 1999: pp. 19–25. doi:10.1016/S0032-5910(99)00009-1.
- [58] S. Chye, J. Loo, Æ.Y. Eva, S. Ho, Æ.F. Yin, C. Boey, Synthesis and hydrothermal treatment of nanostructured hydroxyapatite of controllable sizes, (2008) 1389–1397. doi:10.1007/s10856-007-3261-9.
- [59] A.J. Tonino, B.C.H. Van Der Wal, I.C. Heyligers, B. Grimm, Bone remodeling and hydroxyapatite resorption in coated primary hip prostheses, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467 (2009) 478–484. doi:10.1007/s11999-008-0559-y.
- [60] B.R. Constantz, I.C. Ison, M.T. Fulmer, R.D. Poser, S.T. Smith, M. VanWagoner, J. Ross, S.A. Goldstein, J.B. Jupiter, D.I. Rosenthal, Skeletal repair by in situ formation of the mineral

- phase of bone, *Science* (80-.). 267 (1995) 1796–1799. doi:10.1126/science.7892603.
- [61] E. Kergourlay, D. Grossin, N. Cinca, C. Josse, S. Dosta, G. Bertrand, I. Garcia, J.M. Guilemany, C. Rey, First Cold Spraying of Carbonated Biomimetic Nanocrystalline Apatite on Ti6Al4V: Physical-Chemical, Microstructural, and Preliminary Mechanical Characterizations, *Adv. Eng. Mater.* (2015) n/a-n/a. doi:10.1002/adem.201500409.
- [62] T. Dědourková, J. Zelenka, M. Zelenková, L. Beneš, L. Svoboda, Synthesis of sphere-like nanoparticles of hydroxyapatite, in: *Procedia Eng.*, 2012: pp. 1816–1821. doi:10.1016/j.proeng.2012.07.576.
- [63] K.H. Prakash, R. Kumar, C.P. Ooi, P. Cheang, K.A. Khor, Apparent solubility of hydroxyapatite in aqueous medium and its influence on the morphology of nanocrystallites with precipitation temperature, *Langmuir*. 22 (2006) 11002–11008. doi:10.1021/la0621665.
- [64] R. Tang, Z.J. Henneman, G.H. Nancollas, Constant composition kinetics study of carbonated apatite dissolution, *J. Cryst. Growth*. 249 (2003) 614–624. doi:10.1016/S0022-0248(02)02332-1.
- [65] N. Vandecandelaere, C. Rey, C. Drouet, Biomimetic apatite-based biomaterials: On the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2593–2606. doi:10.1007/s10856-012-4719-y.
- [66] C. Drouet, Apatite formation: Why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/490946.
- [67] A. Brangule, K.A. Gross, Importance of FTIR Spectra Deconvolution for the Analysis of Amorphous Calcium Phosphates, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 77 (2015) 12027. doi:10.1088/1757-899X/77/1/012027.
- [68] C. Rey, O. Marsan, C. Combes, C. Drouet, D. Grossin, S. Sarda, *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*, 2014. doi:10.1007/978-3-642-53980-0.
- [69] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, R. Langenati, M. Sandri, S. Sprio, Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: Dense and porous scaffold development, *Biomaterials*. 26 (2005) 2835–2845. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.08.010.
- [70] C. Jaeger, S. Maltsev, A. Karrasch, Progress of Structural Elucidation of Amorphous Calcium Phosphate(ACP)and Hydroxyapatite (HAP): Disorder and Surfaces as Seen by

- Solid State NMR, Key Eng. Mater. 309–311 (2006) 69–72. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.69.
- [71] L. Pajchel, V. Kowalska, D. Smolen, A. Kedzierska, E. Pietrzykowska, W. Lojkowski, W. Kolodziejcki, Comprehensive structural studies of ultra-fine nanocrystalline calcium hydroxyapatite using MAS NMR and FT-IR spectroscopic methods, Mater. Res. Bull. 48 (2013) 4818–4825. doi:10.1016/j.materresbull.2013.08.048.
- [72] D. Eichert, C. Combes, C. Drouet, C. Rey, Formation and Evolution of Hydrated Surface Layers of Apatites, Key Eng. Mater. 284–286 (2005) 3–6. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.284-286.3.
- [73] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, A. Lebugle, H. Sfihi, A. Barroug, Nanocrystalline apatites in biological systems: Characterisation, structure and properties, Materwiss. Werksttech. 38 (2007) 996–1002. doi:10.1002/mawe.200700229.
- [74] J.B. Kendall, Biomaterials research advances, 2007.
- [75] W.P.S.L. Wijesinghe, M.M.M.G.P.G. Mantilaka, E.V. a Premalal, H.M.T.U. Herath, S. Mahalingam, M. Edirisinghe, R.P.V.J. Rajapakse, R.M.G. Rajapakse, Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity., Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 42 (2014) 83–90. doi:10.1016/j.msec.2014.05.032.
- [76] C. García, C. García, C. Paucar, Controlling morphology of hydroxyapatite nanoparticles through hydrothermal microemulsion chemical synthesis, Inorg. Chem. Commun. 20 (2012) 90–92. doi:10.1016/j.inoche.2012.02.024.
- [77] X.Y. Zhou, Y.R. Jiang, C.C. Li, X.Y. Xie, Synthesis of poly(ethylene glycol)-functionalized hydroxyapatite organic colloid intended for nanocomposites, Chinese Chem. Lett. 24 (2013) 647–650. doi:10.1016/j.cclet.2013.04.024.
- [78] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, Acta Biomater. 9 (2013) 7591–7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [79] C.B. Ustundag, O. Avciata, F. Kaya, C. Kaya, Hydrothermally mixed hydroxyapatite-multiwall carbon nanotubes composite coatings on biomedical alloys by electrophoretic deposition., J. Phys. Chem. B. 117 (2013) 1571–6. doi:10.1021/jp305057p.

- [80] E.H. Nickel, Definition of a mineral, *Mineral. Mag.* 59 (1995) 767–768. doi:10.1180/minmag.1995.059.397.20.
- [81] F. Betts, a. S. Posner, An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate, *Mater. Res. Bull.* 9 (1974) 353–360. doi:10.1016/0025-5408(74)90087-7.
- [82] A. Boskey, A. Posner, Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion, *J. Phys. Chem.* (1973) 3–7. doi:10.1021/j100638a011.
- [83] J.D. Termine, E.D. Eanes, Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations, *Calcif. Tissue Res.* 10 (1972) 171–197. doi:10.1007/BF02012548.
- [84] M. Karimi, S. Hesarak, M. Alizadeh, A. Kazemzadeh, A facile and sustainable method based on deep eutectic solvents toward synthesis of amorphous calcium phosphate nanoparticles: The effect of using various solvents and precursors on physical characteristics, *J. Non. Cryst. Solids.* 443 (2016) 59–64. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2016.04.026.
- [85] L. Brečević, H. Füredi-Milhofer, Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions, *Calcif. Tissue Res.* 10 (1972) 82–90. doi:10.1007/BF02012538.
- [86] W.J.E.M. Habraken, J. Tao, L.J. Brylka, H. Friedrich, L. Bertinetti, A.S. Schenk, A. Verch, V. Dmitrovic, P.H.H. Bomans, P.M. Frederik, J. Laven, P. van der Schoot, B. Aichmayer, G. de With, J.J. DeYoreo, N.A.J.M. Sommerdijk, Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1507. doi:10.1038/ncomms2490.
- [87] L. Wang, S. Li, E. Ruiz-Agudo, C. V. Putnis, A. Putnis, Posner's cluster revisited: direct imaging of nucleation and growth of nanoscale calcium phosphate clusters at the calcite-water interface, *CrystEngComm.* 14 (2012) 6252. doi:10.1039/c2ce25669j.
- [88] A. Dey, P.H.H. Bomans, F. a Müller, J. Will, P.M. Frederik, G. de With, N. a J.M. Sommerdijk, The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization., *Nat. Mater.* 9 (2010) 1010–4. doi:10.1038/nmat2900.
- [89] K. Onuma, A. Ito, Cluster Growth Model for Hydroxyapatite, *Chem. Mater.* 10 (1998) 3346–3351. doi:10.1021/cm980062c.
- [90] L. Brečević, V. Hlady, H. Füredi-Milhofer, Influence of gelatin on the precipitation of

- amorphous calcium phosphate, *Colloids and Surfaces*. 28 (1987) 301–313. doi:10.1016/0166-6622(87)80191-9.
- [91] J. Christoffersen, M.R. Christoffersen, W. Kibalczyk, F.A. Andersen, A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates, *J. Cryst. Growth*. 94 (1989) 767–777. doi:10.1016/0022-0248(89)90102-4.
- [92] S. V. Dorozhkin, Amorphous calcium (ortho)phosphates, *Acta Biomater*. 6 (2010) 4457–4475. doi:10.1016/j.actbio.2010.06.031.
- [93] R.A. Robinson, M.L. Watson, CRYSTAL-COLLAGEN RELATIONSHIPS IN BONE AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE. III. CRYSTAL AND COLLAGEN MORPHOLOGY AS A FUNCTION OF AGE, *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 60 (1955) 596–630. doi:10.1111/j.1749-6632.1955.tb40054.x.
- [94] M.L. Watson, R.A. Robinson, Collagen-crystal relationships in bone. II. Electron microscope study of basic calcium phosphate crystals, *Am. J. Anat*. 93 (1953) 25–59. doi:10.1002/aja.1000930103.
- [95] T.V. Safronova, E.A. Mukhin, V.I. Putlyaev, A.V. Knotko, P.V. Evdokimov, T.B. Shatalova, Y.Y. Filippov, A.V. Sidorov, E.A. Karpushkin, Amorphous calcium phosphate powder synthesized from calcium acetate and polyphosphoric acid for bioceramics application, *Ceram. Int*. 43 (2017) 1310–1317. doi:10.1016/j.ceramint.2016.10.085.
- [96] Tateishi T Layrolle, Pierre, Ito A, Sol – Gel Synthesis of Amorphous Calcium Phosphate and Sintering into Microporous Hydroxyapatite bioceramics, *J Amer Ceram Soc*. 81 (1998) 1421–1428. doi:10.1111/j.1151-2916.1998.tb02499.x.
- [97] H. Hörmann, H. Schlebusch, Reversible and Irreversible Denaturation of Collagen Fibers, *Biochemistry*. 10 (1971) 932–937. doi:10.1021/bi00782a003.
- [98] M. Hamdine, M.-C. Heuzey, A. Bégin, Viscoelastic properties of phosphoric and oxalic acid-based chitosan hydrogels, *Rheol. Acta*. 45 (2005) 659–675. doi:10.1007/s00397-005-0024-8.
- [99] M. Rinaudo, G. Pavlov, J. Desbrières, Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan, *Polymer (Guildf)*. 40 (1999) 7029–7032. doi:10.1016/S0032-3861(99)00056-7.
- [100] P.K. Dutta, J. Duta, V.S. Tripathi, Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and

- applications, *J. Sci. Ind. Res. (India)*. 63 (2004) 20–31. doi:10.1002/chin.200727270.
- [101] A. Di Martino, M. Sittlinger, M. V. Risbud, Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials*. 26 (2005) 5983–5990. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.016.
- [102] Y.-J. Seol, J.-Y. Lee, Y.-J. Park, Y.-M. Lee, Young-Ku, I.-C. Rhyu, S.-J. Lee, S.-B. Han, C.-P. Chung, Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation., *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 1037–1041. doi:10.1023/B:BILE.0000032962.79531.f0.
- [103] R.A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 167–182. doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.002.
- [104] M.Y. Gordon, G.P. Riley, S.M. Watt, M.F. Greaves, Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment., *Nature*. 326 (1987) 403–5. doi:10.1038/326403a0.
- [105] F. Boßelmann, P. Romano, H. Fabritius, D. Raabe, M. Epple, The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*, *Thermochim. Acta*. 463 (2007) 65–68. doi:10.1016/j.tca.2007.07.018.
- [106] A. Percot, C. Viton, A. Domard, Optimization of chitin extraction from shrimp shells, *Biomacromolecules*. 4 (2003) 12–18. doi:10.1021/bm025602k.
- [107] I. Younes, S. Hajji, V. Frachet, M. Rinaudo, K. Jellouli, M. Nasri, Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 69 (2014) 489–498. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013.
- [108] X. He, K. Li, R. Xing, S. Liu, L. Hu, P. Li, The production of fully deacetylated chitosan by compression method, *Egypt. J. Aquat. Res.* 42 (2016) 75–81. doi:10.1016/j.ejar.2015.09.003.
- [109] M.F. Cervera, J. Heinämäki, M. Räsänen, S.L. Maunu, M. Karjalainen, O.M.N. Acosta, A.I. Colarte, J. Yliruusi, Solid-state characterization of chitosans derived from lobster chitin, *Carbohydr. Polym.* 58 (2004) 401–408. doi:10.1016/j.carbpol.2004.08.017.
- [110] a Baxter, M. Dillion, K. Taylor, G. Roberts, Improved method for I.R. determination of the degree of acetylation of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 166–169.

- [111] M. Hasegawa, A. Isogai, F. Onabe, Molecular mass distribution of chitin and chitosan, *Science* (80-.). 262 (1994) 161–166.
- [112] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2693–2700. doi:10.1016/j.carres.2004.09.007.
- [113] H.K. No, N. Young Park, S. Ho Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65–72. doi:10.1016/S0168-1605(01)00717-6.
- [114] T.-P.W. and Z.-X.S. Xiao-Fang Li¹, Xiao-Qiang Feng², Sheng Yang^{2*}, Effects of MolecularWeight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus Niger*, *Iran. Polym. J.* 17 (2008) 843–852.
- [115] J.Y. Lee, S.H. Nam, S.Y. Im, Y.J. Park, Y.M. Lee, Y.J. Seol, C.P. Chung, S.J. Lee, Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials, *J. Control. Release.* 78 (2002) 187–197. doi:10.1016/S0168-3659(01)00498-9.
- [116] S. Mao, X. Shuai, F. Unger, M. Simon, D. Bi, T. Kissel, The depolymerization of chitosan: Effects on physicochemical and biological properties, *Int. J. Pharm.* 281 (2004) 45–54. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.019.
- [117] R. Jayakumar, T. Egawa, T. Furuike, S. V. Nair, H. Tamura, Synthesis, characterization, and thermal properties of phosphorylated chitin for biomedical applications, *Polym. Eng. Sci.* 49 (2009) 844–849. doi:10.1002/pen.21306.
- [118] N. Nishi, A. Ebina, S. ichiro Nishimura, A. Tsutsumi, O. Hasegawa, S. Tokura, Highly phosphorylated derivatives of chitin, partially deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: preparation and characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 8 (1986) 311–317. doi:10.1016/0141-8130(86)90046-2.
- [119] Y.M. Lee, E.M. Shin, Pervaporation separation of water-ethanol through modified chitosan membranes. IV. Phosphorylated chitosan membranes, *J. Memb. Sci.* 64 (1991) 145–152. doi:10.1016/0376-7388(91)80085-K.
- [120] I.F. Amaral, P.L. Granja, M.A. Barbosa, Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 16 (2005) 1575–1593. doi:10.1163/156856205774576736.
- [121] M.I. Fwu-Long, S.S. Shyu, S.T. Lee, T.B.I. Wong, Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate

- complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 37 (1999) 1551–1564. doi:10.1002/(SICI)1099-0488(19990715)37:14<1551::AID-POLB1>3.0.CO;2-H.
- [122] M. Kawahara, T. Yui, K. Oka, P. Zugenmaier, S. Suzuki, S. Kitamura, K. Okuyama, K. Ogawa, Fourth 3D structure of the chitosan molecule: conformation of chitosan in its salts with medical organic acids having a phenyl group., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 1545–1550. doi:10.1271/bbb.67.1545.
- [123] K. Ogawa, T. Yui, K. Okuyama, Three D structures of chitosan., *Int. J. Biol. Macromol.* 34 (2004) 1–8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2003.11.002.
- [124] T. Yui, K. Imada, K. Okuyama, Y. Obata, K. Suzuki, K. Ogawa, Molecular and Crystal Structure of the Anhydrous Form of Chitosan, *Macromolecules.* 27 (1994) 7601–7605. doi:10.1021/ma00104a014.
- [125] S. Demarger-Andre, A. Domard, Chitosan carboxylic acid salts in solution and in the solid state, *Carbohydr. Polym.* 23 (1994) 211–219. doi:10.1016/0144-8617(94)90104-X.
- [126] A. Yamamoto, J. Kawada, T. Yui, K. Ogawa, Conformational behavior of chitosan in the acetate salt: An X-ray study, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 1230–1232. doi:10.1271/bbb.61.1230.
- [127] S.-J. Ding, Preparation and properties of chitosan/calcium phosphate composites for bone repair., *Dent. Mater. J.* 25 (2006) 706–712. doi:10.4012/dmj.25.706.
- [128] C. Xianmiao, L. Yubao, Z. Yi, Z. Li, L. Jidong, W. Huanan, Properties and in vitro biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 29–35. doi:10.1016/j.msec.2008.05.008.
- [129] T.H. Ang, F.S.A. Sultana, D.W. Hutmacher, Y.S. Wong, J.Y.H. Fuh, X.M. Mo, H.T. Loh, E. Burdet, S.H. Teoh, Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system, *Mater. Sci. Eng. C.* 20 (2002) 35–42. doi:10.1016/S0928-4931(02)00010-3.
- [130] S.N. Danilchenko, Chitosan–hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and in vivo tests, *J. Biol. Phys. Chem.* 9 (2009) 119–126. doi:10.4024/22DA09A.jbpc.09.03.
- [131] Z. Li, L. Yubao, Y. Aiping, P. Xuelin, W. Xuejiang, Z. Xiang, Preparation and in vitro

- investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 213–9. doi:10.1007/s10856-005-6682-3.
- [132] W. Fang, H. Zhang, J. Yin, B. Yang, Y. Zhang, J. Li, F. Yao, Hydroxyapatite Crystal Formation in the Presence of Polysaccharide, *Cryst. Growth Des.* 16 (2016) 1247–1255. doi:10.1021/acs.cgd.5b01235.
- [133] T. Başargan, G. Nasün-Saygılı, Spray-Dried Mesoporous Hydroxyapatite–Chitosan Biocomposites, *Polym. Plast. Technol. Eng.* 54 (2015) 1172–1183. doi:10.1080/03602559.2014.1003235.
- [134] J. Peña, I. Izquierdo-Barba, A. Martínez, M. Vallet-Regí, New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature, *Solid State Sci.* 8 (2006) 513–519. doi:10.1016/j.solidstatesciences.2005.11.003.
- [135] R. Kumar, K.H. Prakash, P. Cheang, L. Gower, K. a Khor, Chitosan-mediated crystallization and assembly of hydroxyapatite nanoparticles into hybrid nanostructured films., *J. R. Soc. Interface.* 5 (2008) 427–439. doi:10.1098/rsif.2007.1141.
- [136] Y. Wan, K. a M. Creber, B. Peppley, V.T. Bui, Synthesis, characterization and ionic conductive properties of phosphorylated chitosan membranes, *Macromol. Chem. Phys.* 204 (2003) 850–858. doi:10.1002/macp.200390056.
- [137] O.C. Wilson, J.R. Hull, Surface modification of nanophase hydroxyapatite with chitosan, *Mater. Sci. Eng. C.* 28 (2008) 434–437. doi:10.1016/j.msec.2007.04.005.
- [138] E. Hynes, J.C. Ogier, G. Lamberet, A. Delacroix-Buchet, The influence of starter and adjunct lactobacilli culture on the ripening of washed curd cheeses, *Brazilian J. Chem. Eng.* 19 (2002) 397–402. doi:10.1051/lait.
- [139] J. Manu, L. Ganesh, B. Manoj, C. Randhir, B. Shashikant, S. Chirag, Spray Drying in Pharmaceutical Industry: A Review, 4 (2012) 74–79. http://www.researchgate.net/publication/253243897_Spray_Drying_in_Pharmaceutical_Industry_A_Review.
- [140] R. Vehring, W.R. Foss, D. Lechuga-Ballesteros, Particle formation in spray drying, *J. Aerosol Sci.* 38 (2007) 728–746. doi:10.1016/j.jaerosci.2007.04.005.
- [141] S. Wendel, M. Celik, Spray Drying and Pharmaceutical Applications, in: *Handb. Pharm. Granulation Technol.*, 2005: pp. 129–158. doi:10.1201/9780849354953.ch5.

- [142] A. Wang, Y. Lu, R. Zhu, S. Li, X. Ma, Effect of process parameters on the performance of spray dried hydroxyapatite microspheres, *Powder Technol.* 191 (2009) 1–6. doi:10.1016/j.powtec.2008.10.020.
- [143] R. Sun, Y. Lu, K. Chen, Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite microspheres by spray drying method, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 1088–1092. doi:10.1016/j.msec.2008.08.010.
- [144] M.F. Cervera, J. Heinämäki, N. de la Paz, O. López, S.L. Maunu, T. Virtanen, T. Hatanpää, O. Antikainen, A. Nogueira, J. Fundora, J. Yliruusi, Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts., *AAPS PharmSciTech.* 12 (2011) 637–49. doi:10.1208/s12249-011-9620-3.
- [145] L.T.K. Ngan, S.L. Wang, I.M. Hiep, P.M. Luong, N.T. Vui, T.M. Crossed D Signinh, N.A. Dzung, Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity, *Res. Chem. Intermed.* 40 (2014) 2165–2175. doi:10.1007/s11164-014-1594-9.
- [146] G. Ruphuy, A. Saralegi, J.C. Lopes, M.M. Dias, M.F. Barreiro, Spray drying as a viable process to produce nano-hydroxyapatite/chitosan (n-HAp/CS) hybrid microparticles mimicking bone composition, *Adv. Powder Technol.* 27 (2016) 575–583. doi:10.1016/j.appt.2016.02.010.
- [147] P. Luo, T.G. Nieh, Synthesis of ultrafine hydroxyapatite particles by a spray dry method, *Mater. Sci. Eng. C.* 3 (1995) 75–78. doi:10.1016/0928-4931(95)00089-5.
- [148] L.C. Chow, L.M. Sun, B. Hockey, Properties of nanostructured hydroxyapatite prepared by a spray drying technique, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 109 (2004) 543. doi:10.6028/jres.109.041.
- [149] H.H.K. Xu, J.L. Moreau, L. Sun, L.C. Chow, Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition, *Dent. Mater.* 27 (2011) 762–769. doi:10.1016/j.dental.2011.03.016.
- [150] S. a. and F.B.E. Sun L, Laurence C., Chow, Preparation and properties of Nanopartilces of Calcium Phosphates with various Ca/P Ratios, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 115 (2010) 243–255.
- [151] A. Domard, C. Gey, M. Rinaudo, C. Terrassin, ¹³C and ¹H n.m.r. spectroscopy of chitosan and N-trimethyl chloride derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.* 9 (1987) 233–237.

- doi:10.1016/0141-8130(87)90058-4.
- [152] M.H. Ottøy, K.M. Vårum, O. Smidsrød, Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 17–24. doi:10.1016/0144-8617(95)00154-9.
- [153] H. Saito, R. Tabeta, K. Ogawa, High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts, *Macromolecules*. 20 (1987) 2424–2430. doi:10.1021/ma00176a017.
- [154] J. Yesinowski, Nuclear magnetic resonance spectroscopy of calcium phosphates., *Calcium Phosphates Biol. Ind. Syst.* (1998) 103–143.
- [155] E. Wachtel, S. Weiner, Small-angle x-ray scattering study of dispersed crystals from bone and tendon, *J. Bone Miner. Res.* 9 (1994) 1651–1655. doi:10.1002/jbmr.5650091020.
- [156] P. Fratzl, M. Groschner, G. Vogl, H. Plenk, J. Eschberger, N. Fratzl-Zelman, K. Koller, K. Klaushofer, Mineral crystals in calcified tissues: A comparative study by SAXS, *J. Bone Miner. Res.* 7 (1992) 329–334. doi:10.1002/jbmr.5650070313.
- [157] G. Beaucage, Small-Angle Scattering from Polymeric Mass Fractals of Arbitrary Mass-Fractal Dimension, *J. Appl. Crystallogr.* 29 (1996) 134–146. doi:10.1107/S0021889895011605.
- [158] G. Beaucage, Approximations leading to a unified exponential power-law approach to small-angle scattering, *J. Appl. Crystallogr.* 28 (1995) 717–728. doi:10.1107/S0021889895005292.
- [159] F. Zernike, J.A. Prins, Die Beugung von Röntgenstrahlen in Flüssigkeiten als Effekt der Molekulanordnung, *Zeitschrift Phys.* 41 (1927) 184–194. doi:10.1007/BF01391926.
- [160] S. Nguyen, S. Hisiger, M. Jolicoeur, F.M. Winnik, M.D. Buschmann, Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and ¹H NMR after semi-preparative SEC, *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 636–645. doi:10.1016/j.carbpol.2008.09.002.
- [161] Y. Wang, S. Von Euw, F.M. Fernandes, S. Cassaignon, M. Selmane, G. Laurent, G. Pehau-Arnaudet, C. Coelho, L. Bonhomme-Coury, M.-M. Giraud-Guille, F. Babonneau, T. Azaïs, N. Nassif, Water-mediated structuring of bone apatite, *Nat. Mater.* 12 (2013) 1144–1153. doi:10.1038/nmat3787.

- [162] I.C. Kemp, D.E. Oakley, Modelling of Particulate Drying in Theory and Practice, *Dry. Technol.* 20 (2002) 1699–1750. doi:10.1081/DRT-120015410.
- [163] R. Besselink, T.M. Stawski, A.E.S. Van Driessche, L.G. Benning, Not just fractal surfaces, but surface fractal aggregates: Derivation of the expression for the structure factor and its applications, *J. Chem. Phys.* 145 (2016). doi:10.1063/1.4960953.
- [164] A. Posner, F. Betts, Synthetic amorphous calcium-phosphate and its relation to bone-mineral structure, *Acc. Chem. Res.* 8 (1975) 273–281. doi:10.1021/ar50092a003.
- [165] W.L. Jongebloed, P.J. van den Berg, J. Arends, The dissolution of single crystals of hydroxyapatite in citric and lactic acids, *Calcif. Tissue Res.* 15 (1974) 1–9. doi:10.1007/BF02059038.
- [166] K. Kurita, T. Sannan, Y. Iwakura, Evidence for Formation of Block and Random Copolymers of N-Acetyl-D-glucosamine and D-Glucosamine by Hetero- and Homogeneous Hydrolyses, *Die Makromol. Chemie.* 178 (1977) 3197–3202. doi:10.1002/macp.1977.021781203.
- [167] M.X. Weinhold, J.C.M. Sauvageau, N. Keddig, M. Matzke, B. Tartsch, I. Grunwald, C. Kübel, B. Jastorff, J. Thöming, Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis, *Green Chem.* 11 (2009) 498. doi:10.1039/b809941c.
- [168] a Zajac, J. Hanuza, M. Wandas, L. Dymińska, Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 134 (2015) 114–20. doi:10.1016/j.saa.2014.06.071.
- [169] M.R. Kasaai, A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, *Carbohydr. Polym.* 71 (2008) 497–508. doi:10.1016/j.carbpol.2007.07.009.
- [170] J. Nunthanid, M. Laungtana-Anan, P. Sriamornsak, S. Limmatvapirat, S. Puttipatkhachorn, L.Y. Lim, E. Khor, Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets., *J. Control. Release.* 99 (2004) 15–26. doi:10.1016/j.jconrel.2004.06.008.
- [171] K. a Gross, V. Gross, C.C. Berndt, Thermal Analysis of Amorphous Phases in Hydroxyapatite Coatings, *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 106–112.
- [172] T. Kanazawa, T. Umegaki, N. Uchiyama, Thermal Crystallisation of Amorphous Calcium

- Phosphate to a-Tricalcium Phosphate, (1982) 399–406.
doi:10.1002/jctb.5030320206/pdf.
- [173] A.J. Varma, S. V. Deshpande, J.F. Kennedy, Metal complexation by chitosan and its derivatives: A review, *Carbohydr. Polym.* 55 (2004) 77–93.
doi:10.1016/j.carbpol.2003.08.005.
- [174] S. Chen, G. Wu, D. Long, Y. Liu, Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan-Ca₃V₁₀O₂₈ complex membrane, *Carbohydr. Polym.* 64 (2006) 92–97.
doi:10.1016/j.carbpol.2005.10.024.
- [175] V.M. Rusu, C.-H. Ng, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M.G. Peter, Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials., *Biomaterials*. 26 (2005) 5414–26. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.051.
- [176] Y. Yang, J.L. Ong, J. Tian, In vivo evaluation of modified titanium implant surfaces produced using a hybrid plasma spraying processing, *Mater. Sci. Eng. C*. 20 (2002) 117–124. doi:10.1016/S0928-4931(02)00021-8.
- [177] S.F.S. Shirazi, S. Gharehkhani, M. Mehrali, H. Yarmand, H.S.C. Metselaar, N. Adib Kadri, N.A.A. Osman, A review on powder-based additive manufacturing for tissue engineering: selective laser sintering and inkjet 3D printing, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16 (2015) 33502. doi:10.1088/1468-6996/16/3/033502.
- [178] L. Clères, J.M. Fernández-Pradas, G. Sardin, J.L. Morenza, Dissolution behaviour of calcium phosphate coatings obtained by laser ablation., *Biomaterials*. 19 (1998) 1483–7. doi:10.1016/S0142-9612(98)00063-5.
- [179] R.A. Surmenev, A review of plasma-assisted methods for calcium phosphate-based coatings fabrication, *Surf. Coatings Technol.* 206 (2012) 2035–2056. doi:10.1016/j.surfcoat.2011.11.002.
- [180] ISO 13779-2:2008 Prévisualiser Implants chirurgicaux -- Hydroxyapatite -- Partie 2: Revêtements à base d'hydroxyapatite, (n.d.).
- [181] ASTM F1185 - 03(2014) Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants, (n.d.).
- [182] R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, A.A. Ivanova, Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis - A review, *Acta Biomater.* 10

- (2014) 557–579. doi:10.1016/j.actbio.2013.10.036.
- [183] E.N. Antonov, Biocompatibility of Laser-deposited Hydroxyapatite Coatings on Titanium and Polymer Implant Materials, *J. Biomed. Opt.* 3 (1998) 423. doi:10.1117/1.429852.
- [184] S. Yokota, N. Nishiwaki, K. Ueda, T. Narushima, H. Kawamura, T. Takahashi, Evaluation of thin amorphous calcium phosphate coatings on titanium dental implants deposited using magnetron sputtering., *Implant Dent.* 23 (2014) 343–50. doi:10.1097/ID.0000000000000098.
- [185] V.N. Bagratashvili, E.N. Antonov, E.N. Sobol, V.K. Popov, Macroparticle distribution and chemical composition of laser deposited apatite coatings, *Appl. Phys. Lett.* 66 (1995) 2451–2453. doi:10.1063/1.113992.
- [186] J.M. Fernández-Pradas, L. Clèries, E. Martínez, G. Sardin, J. Esteve, J.L. Morenza, Influence of thickness on the properties of hydroxyapatite coatings deposited by KrF laser ablation, *Biomaterials.* 22 (2001) 2171–2175. doi:10.1016/S0142-9612(00)00408-7.
- [187] T.L. Parker, K.G. Parker, S.M. Howdle, C. Roberts, E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov, E.M. Sobol, Biocompatibility of laser-deposited hydroxyapatite coatings: Correlation of coating parameters with cell behaviour, *J. Cell. Eng.* 1(2) (1996) 121–127.
- [188] A. Miotello, P.M. Ossi, *Laser-Surface Interactions for New Materials Production: Tailoring Structure and Properties*, 2009. doi:10.1007/978-3-642-03307-0.
- [189] A. Piqué, R.C.R. a. McGill, D.B. Chrisey, J. Callahan, T.E. Mlsna, Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation (Maple) of Polymeric Materials: Methodology and Mechanistic Studies, *MRS Proc.* 526 (1998) 375. doi:10.1557/PROC-526-375.
- [190] A.L. Mercado, C.E. Allmond, J.G. Hoekstra, J.M. Fitz-Gerald, Pulsed laser deposition vs. matrix assisted pulsed laser evaporation for growth of biodegradable polymer thin films, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 81 (2005) 591–599. doi:10.1007/s00339-004-2994-2.
- [191] A. Gutiérrez-Llorente, G. Horowitz, R. Pérez-Casero, J. Perrière, J.L. Fave, A. Yassar, C. Sant, Growth of polyalkylthiophene films by matrix assisted pulsed laser evaporation, *Org. Electron. Physics, Mater. Appl.* 5 (2004) 29–34. doi:10.1016/j.orgel.2003.11.003.
- [192] P.K. Wu, B.R. Ringeisen, J. Callahan, M. Brooks, D.M. Bubba, H.D. Wu, A. Piqué, B. Spargo, R.A. McGill, D.B. Chrisey, The deposition, structure, pattern deposition, and activity of biomaterial thin-films by matrix-assisted pulsed-laser evaporation (MAPLE) and MAPLE

- direct write, *Thin Solid Films*. 398–399 (2001) 607–614. doi:10.1016/S0040-6090(01)01347-5.
- [193] M.M. Motoc, E. Axente, C. Popescu, L.E. Sima, S.M. Petrescu, I.N. Mihailescu, E. Gyorgy, Active protein and calcium hydroxyapatite bilayers grown by laser techniques for therapeutic applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 101 A (2013) 2706–2711. doi:10.1002/jbm.a.34572.
- [194] A. Visan, G.E. Stan, C. Ristoscu, G. Popescu-Pelin, M. Sopronyi, C. Besleaga, C. Luculescu, M.C. Chifiriuc, M.D. Hussien, O. Marsan, E. Kergourlay, D. Grossin, F. Brouillet, I.N. Mihailescu, Combinatorial MAPLE deposition of antimicrobial orthopedic maps fabricated from chitosan and biomimetic apatite powders, *Int. J. Pharm.* 511 (2016) 505–515. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.015.
- [195] A.G. Anghel, A.M. Grumezescu, M. Chirea, V. Grumezescu, G. Socol, F. Iordache, A.E. Oprea, I. Anghel, A.M. Holban, MAPLE fabricated Fe₃O₄@Cinnamomum verum antimicrobial surfaces for improved gastrostomy tubes, *Molecules*. 19 (2014) 8981–8994. doi:10.3390/molecules19078981.
- [196] R. Fryček, M. Jelínek, T. Kocourek, P. Fitl, M. Vršata, V. Myslík, M. Vrbová, V. Mysli, M. Vrbova, R. Fryček, M. Jelínek, T. Kocourek, P. Fitl, M. Vršata, V. Myslík, M. Vrbová, O. Ekrt, F. Vyslouzil, D. Kopecky, M. Vrnata, V. Myslik, P. Fitl, M. Jelinek, T. Kocourek, Thin organic layers prepared by MAPLE for gas sensor application, *Thin Solid Films*. 495 (2006) 268–271. doi:10.1109/COMMAD.2006.4429933.
- [197] A.P. Caricato, V. Arima, M. Catalano, M. Cesaria, P.D. Cozzoli, M. Martino, A. Taurino, R. Rella, R. Scarfiello, T. Tunno, A. Zacheo, MAPLE deposition of nanomaterials, *Appl. Surf. Sci.* 302 (2014) 92–98. doi:10.1016/j.apsusc.2013.11.031.
- [198] C.S. Ciobanu, S.L. Iconaru, E. Gyorgy, M. Radu, M. Costache, A. Dinischiotu, P. Le Coustumer, K. Lafdi, D. Predoi, Biomedical properties and preparation of iron oxide-dextran nanostructures by MAPLE technique, *Chem Cent J.* 6 (2012) 17. doi:10.1186/1752-153X-6-17.
- [199] A.P. Caricato, A. Luches, Applications of the matrix-assisted pulsed laser evaporation method for the deposition of organic, biological and nanoparticle thin films: A review, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 105 (2011) 565–582. doi:10.1007/s00339-011-6600-0.
- [200] ISO 25178-2:2012 Preview Geometrical product specifications (GPS) -- Surface texture:

- Areal -- Part 2: Terms, definitions and surface texture parameters, (n.d.).
- [201] N. Graddage, T.Y. Chu, H. Ding, C. Py, A. Dadvand, Y. Tao, Inkjet printed thin and uniform dielectrics for capacitors and organic thin film transistors enabled by the coffee ring effect, *Org. Electron. Physics, Mater. Appl.* 29 (2016) 114–119. doi:10.1016/j.orgel.2015.11.039.
 - [202] a. L.P.F. Caroni, C.R.M. de Lima, M.R. Pereira, J.L.C. Fonseca, The kinetics of adsorption of tetracycline on chitosan particles, *J. Colloid Interface Sci.* 340 (2009) 182–191. doi:10.1016/j.jcis.2009.08.016.
 - [203] P.R. Rege, R.J. Garmise, L.H. Block, Spray-dried chitinosans. Part II: in vitro drug release from tablets made from spray-dried chitinosans., *Int. J. Pharm.* 252 (2003) 53–9. doi:10.1016/S0378-5173(02)00605-1.
 - [204] S. Cazalbou, G. Bertrand, C. Drouet, Tetracycline-Loaded Biomimetic Apatite: An Adsorption Study, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 3014–3024. doi:10.1021/jp5116756.
 - [205] ISO 10993-5:2009 Prévisualiser Évaluation biologique des dispositifs médicaux -- Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro, (n.d.).
 - [206] C.M.B. Ho, S.H. Ng, K.H.H. Li, Y.-J. Yoon, 3D printed microfluidics for biological applications, *Lab Chip.* 15 (2015) 3627–3637. doi:10.1039/C5LC00685F.
 - [207] B. Partee, S.J. Hollister, S. Das, Selective Laser Sintering Process Optimization for Layered Manufacturing of CAPA[®] 6501 Polycaprolactone Bone Tissue Engineering Scaffolds, *J. Manuf. Sci. Eng.* 128 (2006) 531. doi:10.1115/1.2162589.
 - [208] A. Matavž, R.C. Frunză, A. Drnovšek, V. Bobnar, B. Malic, Inkjet printing of uniform dielectric oxide structures from sol-gel inks by adjusting the solvent composition, *J. Mater. Chem. C.* (2016) 5634–5641. doi:10.1039/C6TC01090C.
 - [209] H. Yang, S. Yang, X. Chi, J.R.G. Evans, Fine ceramic lattices prepared by extrusion freeforming, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 79B (2006) 116–121. doi:10.1002/jbm.b.30520.
 - [210] H.W. Ouyang, J.C.H. Goh, X.M. Mo, S.H. Teoh, E.H. Lee, Characterization of anterior cruciate ligament cells and bone marrow stromal cells on various biodegradable polymeric films, *Mater. Sci. Eng. C.* 20 (2002) 63–69. doi:10.1016/S0928-4931(02)00014-0.

- [211] M. Guvendiren, J. Molde, R.M.D. Soares, J. Kohn, Designing biomaterials for 3D printing, *ACS Biomater. Sci. Eng.* (2016) acsbiomaterials.6b00121. doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00121.
- [212] M. Vaezi, H. Seitz, S. Yang, A review on 3D micro-additive manufacturing technologies, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 67 (2013) 1721–1754. doi:10.1007/s00170-012-4605-2.
- [213] A.R. Akkineni, Y. Luo, M. Schumacher, B. Nies, A. Lode, M. Gelinsky, 3D plotting of growth factor loaded calcium phosphate cement scaffolds, *Acta Biomater.* 27 (2015) 264–274. doi:10.1016/j.actbio.2015.08.036.
- [214] M. Castilho, C. Moseke, A. Ewald, U. Gbureck, J. Groll, I. Pires, J. Teßmar, E. Vorndran, Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate scaffolds for substitution of complex bone defects., *Biofabrication.* 6 (2014) 15006. doi:10.1088/1758-5082/6/1/015006.
- [215] S. V. Dorozhkin, Calcium orthophosphate cements and concretes, *Materials (Basel).* 2 (2009) 221–291. doi:10.3390/ma2010221.
- [216] B. Dorj, J.H. Park, H.W. Kim, Robocasting chitosan/nanobioactive glass dual-pore structured scaffolds for bone engineering, *Mater. Lett.* 73 (2012) 119–122. doi:10.1016/j.matlet.2011.12.107.
- [217] M.S. Mason, T. Huang, R.G. Landers, M.C. Leu, G.E. Hilmas, Aqueous-based extrusion of high solids loading ceramic pastes: Process modeling and control, *J. Mater. Process. Technol.* 209 (2009) 2946–2957. doi:10.1016/j.jmatprotec.2008.07.004.

Résumé

Ce mémoire porte sur l'élaboration et la caractérisation d'un matériau composite chitosane/phosphate de calcium destiné à une utilisation dans le domaine de la substitution osseuse. Le procédé d'atomisation-séchage a été choisi pour élaborer ce composite sous forme d'une poudre susceptible d'être transformée en revêtement ou objet 3D.

Une étude préliminaire a permis d'appréhender les mécanismes de synthèse du phosphate de calcium, la phase minérale, par atomisation-séchage. Une suspension de particules d'hydroxyapatite stœchiométrique ou d'apatite biomimétique dispersées dans une solution acide mène systématiquement à l'apparition d'une phase amorphe. La proportion de cette phase amorphe dans la poudre atomisée-séchée est dépendante de la taille et de la cristallinité du matériau d'origine. L'atomisation séchage d'une solution acide contenant les ions précurseurs de calcium et phosphate mène à la formation d'une phase principalement amorphe. Cette poudre a pu être décrite à différentes échelles : à une échelle de l'ordre du nanomètre apparaissent des clusters, à une échelle de l'ordre de la centaine de nanomètres des agrégats sphériques de clusters organisés en chapelet tortueux et imbriqués sont identifiés et enfin à une échelle micrométrique des agglomérats de nanoparticules ont été mises en évidence. Le phosphate de calcium ainsi synthétisé possède un rapport molaire Ca/P proche de 1.3. Au-delà de ce rapport dans la solution à atomiser, de l'acétate de calcium (utilisé ici comme précurseur) recristallise dans la poudre. Pour élaborer la poudre composite, le polymère a été solubilisé et ajouté d'abord dans une suspension acide d'hydroxyapatite avant atomisation. Cette première stratégie mène à la formation d'un composite qui présente de fortes inhomogénéités de répartition des phases organiques et minérales. Pour limiter ce problème lié à la distribution de tailles de grains de la phase minérale, une seconde stratégie a été développée. Une solution de polymère contenant des précurseurs de phosphate de calcium a été préparée pour favoriser l'association à l'échelle nanométrique des deux phases. Après atomisation-séchage, un matériau composite présentant une très bonne dispersion de la phase minérale dans la matrice organique est synthétisé. La structuration de la phase minérale est modifiée par la présence du polymère. Cette modification se traduit par une diminution de la fraction volumique des clusters et, à l'échelle supérieure, la phase minérale n'est plus présente sous forme de chapelet mais en particules sphériques isolées. Par ailleurs, une interaction chimique est envisagée en raison des liaisons de type hydrogène, ioniques ou de coordinations possibles entre les deux phases. La présence du polymère inhibe également la formation de l'acétate de calcium cristallin en favorisant la formation d'un sel d'acétate de chitosane. Deux techniques de mises en forme ont été étudiées (MAPLE, pour l'élaboration de revêtements minces et l'impression 3D de pâte pour l'obtention d'objet massif) et ont permis de mettre en avant le potentiel de transformation de la poudre préparée par atomisation séchage. Les études biologiques faites sur le revêtement ont de plus permis de démontrer les propriétés antibactériennes du matériau utilisé.

Abstract

This thesis deals with the development and characterization of a chitosan/calcium phosphate composite material for use in the field of bone substitution. The spray-drying method was chosen to develop this composite in the form of a powder that could be transformed into a coating or 3D object.

A preliminary study made it possible to understand the mechanisms of synthesis of calcium phosphate, the mineral phase, by spray-drying. A suspension of stoichiometric hydroxyapatite particles or biomimetic apatite dispersed in an acidic solution systematically leads to the appearance of an amorphous phase. The proportion of this amorphous phase in the spray-dried powder is dependent on the size and crystallinity of the original material. The spray drying of an acidic solution containing the precursor ions of calcium and phosphate leads to the formation of a mainly amorphous phase. This powder could be described at different scales: on a scale of about one nanometer appear clusters, on a scale of about one hundred nanometers spherical aggregates of clusters organized into tortuous and nested chaplets are identified and finally on a micrometric scale, agglomerates of nanoparticles were highlighted. The calcium phosphate thus synthesized has a molar ratio Ca/P close to 1.3. Beyond this ratio in the solution to be atomized, calcium acetate (used here as a precursor) recrystallizes in the powder. To develop the composite powder, the polymer was solubilized and added first into an acid suspension of hydroxyapatite before atomization. This first strategy leads to the formation of a composite that has strong inhomogeneities in the distribution of organic and inorganic phases. To limit this problem related to the grain size distribution of the mineral phase, a second strategy has been developed. A polymer solution containing calcium phosphate precursors has been prepared to promote nanoscale association of the two phases. After spray-drying, a composite material having a very good dispersion of the mineral phase in the organic matrix is synthesized. The structuring of the mineral phase is modified by the presence of the polymer. This modification results in a reduction of the volume fraction of the clusters and, on the larger scale, the mineral phase is no longer present in the form of a string but in isolated spherical particles. Moreover, a chemical interaction is envisaged because of the hydrogen, ionic or possible coordination bonds between the two phases. The presence of the polymer also inhibits the formation of crystalline calcium acetate by promoting the formation of a salt of chitosan acetate. Two shaping techniques were studied (MAPLE, for the elaboration of thin coatings and the 3D printing of dough for obtaining massive objects) and made it possible to highlight the transformation potential of the prepared powder by spray drying. The biological studies made on the coating have also demonstrated the antibacterial properties of the material used.