

Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences et Génie des Matériaux

Présentée et soutenue par

Sylvaine JACQUART

le 1^{er} Octobre 2013

Titre :

Substitut osseux injectable, antibactérien et résorbable :
études physico-chimiques et biologiques
d'un ciment composite à base d'apatite

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (EDSDM)

Unité de recherche :

Institut Carnot CIRIMAT

Directrice de Thèse :

Christèle COMBES

Professeur, INP Toulouse

Rapporteurs :

Maria-Pau GINEBRA

Professeur, Technical Univ. of Catalonia (Espagne)

Jean-Marie NEDELEC

Professeur, IC Clermont-Ferrand

Membres du jury

Paul BONNEVIALLE
Danielle LAURENCIN
Roland QUENTIN
Christian REY
Delphine CORDIER

Professeur, CHU Toulouse Purpan
Chargée de Recherche, ICG Montpellier
Professeur, Faculté de Médecine, Tours
Professeur, INP Toulouse
Ingénieur, MedicalGroup

Président
Examinatrice
Examinateur
Examinateur
Invitée

Remerciements

Par là commence finalement la partie peut-être la plus délicate à écrire de cette thèse : la mise en forme d'un bouillonnement et d'un chaos de reconnaissance envers un grand nombre de personnes ! Aventure unique, tant d'un point de vue scientifique qu'humain, cette thèse a été réalisée dans l'équipe « *Phosphates, Pharmacotechnie, Biomatériaux* » du Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux, à Toulouse.

Je tiens d'abord à remercier ceux dont le regard scientifique a permis la finalisation de ces travaux :

Maria-Pau GINEBRA, professeur à l'Université Polytechnique de Catalogne,

Jean-Marie NEDELEC, professeur à l'IC de Clermont-Ferrand,

Merci d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit et de l'éclairer de votre riche expérience.

Paul BONNEVIALLE, chirurgien orthopédiste de l'Hôpital Purpan de Toulouse,

Vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury de thèse ; merci pour votre regard de praticien et ces précieuses touches d'humour que vous avez parsemées en ce moment solennel.

Danielle LAURENCIN, chargée de recherche à l'ICG de Montpellier,

Merci pour votre œil de spectroscopiste aiguisé et votre disponibilité.

Roland QUENTIN, professeur à l'Université de Tours,

Regard biologiste de ce jury, merci d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Delphine CORDIER, ingénieur de MedicalGroup,

Merci pour cette enrichissante collaboration de trois ans.

Mais bien avant ce dernier chapitre qu'est la soutenance, l'histoire de cette thèse n'aurait jamais eu la même saveur sans de nombreux personnages, et avant tout, sans ses deux principaux protagonistes :

Christèle COMBES, *auteur et metteur en scène hors pair*. Une spontanéité et une bienveillance naturelle, un agenda noirci jusque dans les marges où il reste pourtant toujours de la place pour un point scientifique, un échange ou un éclat de rire ! Il est non seulement très formateur mais aussi extrêmement agréable de travailler à tes côtés, il me sera difficile d'exprimer ma reconnaissance à sa juste valeur ! Un immense merci pour ta confiance...

Christian REY, *cicérone de l'épopée et prêtre de l'oracle du phosphate de calcium*. D'une culture scientifique qui n'a d'égal que son humilité et sa chaleur humaine, il laisse chacun suspendu à ses lèvres à l'écoute de ses récits teintés d'une poingte de soleil toulousaing... Boudu Christian, que cette thèse n'aurait pas été la même sans vous, merci !

Cette aventure s'inscrit au sein d'un vaste projet, riche collaboration plusidisciplinaire entre différents acteurs :

Sophie GIROD FULLANA, Fabien BROUILLET et Mohamed FATNASSI, galénistes du CIRIMAT, Nadia EL KISSI et Hélène GALLIARD, du laboratoire de Rhéologie et Procédés, à Grenoble, Christine ROQUES et Christel PIGASSE, du Laboratoire de Génie Chimique, à Toulouse, Fani ANAGNOSTOU, du laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire, à Paris, Reine BAREILLE et Robin SIADOUS, de l'INSERM, à Bordeaux, Rachel AUZELY et Agathe BELIME, du CERMAV, à Grenoble, Delphine CORDIER et Aurélien BIGNON, de MedicalGroup, à Lyon.

Cette expérience a été très formatrice, j'ai été ravie de la partager avec chacun d'entre vous. Sophie, Fabien, Mohamed, *les faiseurs de microparticules et de ciments immergés*, merci pour ces études menées ensemble ! Un merci particulier, également, à Nadia et Hélène, *tortureuses de pâte*, Christine et Christel, *(anti-)réalisatrices de biofilms* et Fani, *maître des lapins et des ciments implantés*, pour votre accueil chaleureux au sein de vos laboratoires et de vos univers où il était si passionnant d'observer et d'apprendre. Je suis aussi très reconnaissante envers ceux et celles qui, jusqu'à la dernière minute, ont eu la patience et la gentillesse de me m'expliquer les subtilités de leurs spécialités, notamment biologiques, qui je crois garderont toujours pour moi une part de mystère...! Je tiens enfin à remercier l'ANR pour avoir financé ce projet *BIOSINJECT* dans le cadre du programme *TecSan*.

J'ai également eu la chance de collaborer avec l'équipe du *Pr. KOŁODZIEJSKI, du Department of Inorganic and Analytical Chemistry* de l'Université de Médecine de Varsovie, pour une étude par spectroscopie RMN du solide. Thank you *Pr. Kołodziejski* for welcoming me in your lab with such kindness and investment. I'm grateful to each person I met in Warsaw, particularly to *Łukasz PAJCHEL*, for your help, your availability and your gentleness. This was one of the experiences which made me grow up from a scientific and a personal point of view, *dziękuję bardzo !*

L'ensemble des études de cette thèse n'aurait pu non plus être réalisé sans des personnages-clés de ce laboratoire :

Olivier MARSAN et Cédric CHARVILLAT, les voisins, Capitaine Haddock de la spectroscopie et Lucky Luke de la DRX, chez qui il fait toujours bon passer pour parler cinétique de prise, structure, manips ou rien de tout cela.

Gérard DECHAMBRE, Géo Trouvetou de la mécanique, toujours une solution sous le coude, et dans l'antre de qui j'ai trouvé un calme refuge pour écrire une grande partie de ces pages...

Françoise BOSC, entraînante, investie, et particulièrement battante contre la malédiction de l'absorption atomique !

Dominique POQUILLON, aide précieuse pour donner du sens à la mécanique,
un grand merci à chacun d'entre vous !

Merci également à *Eva PANTAZOPOULOU, Cécile PRATE, Mohamed Achraf BLOUT* et *Eve HUI* pour votre implication dans cette étude en tant que stagiaires, et à l'ensemble des étudiants de projets que j'ai eu le plaisir d'encadrer : *Mathieu, Mickaël & Mohamed ; Camille, Julie & Marie-Christine* ainsi que *Kevin, Nils & Thibault*.

C'est une telle chance d'apprendre dans un environnement comme celui du CIRIMAT : *David, Christophe, Jérémy, Ghislaine, Sandrine, Sophie, Hélène, Audrey, Stéphanie, Michèle, Jean-Louis*, chacun avec vos spécificités, vous faites preuve de passion et de bienveillance, de patience et disponibilité lorsque l'on se pose toute sorte de questions presque existentielles, et toujours de chaleur humaine et de bonne humeur ! A toute l'équipe PPB merci ! Et merci à *Domi* et *Jany*, aides précieuses et toujours rayonnantes !

Et puis il y a tous ceux qui ont participé à colorer le quotidien de cette thèse et à en faire un plaisir, compagnons de ce *bureau 1-r1-1* dans la joie et la bonne humeur : *Imane*, douce comme l'eau vive et toujours à l'écoute, *Patricia*, bienfaitrice de nos papilles, pédagogue et dévouée, *Pierre* – l'homme qui secouait les bras de joie –, généreux et chaleureux, *Emmanuelle*, petite fraîcheur bretonne toujours serviable et enjouée, *Ahmed*, l'homme qui faisait rougir l'apatite, mais aussi *Marie-Alix, Nicolas, Sabrina, Hassan, Anne, Audric* et *Farid* – que l'on retrouve plus ou moins souvent dans notre bureau, avec plaisir ! – et les « *memodocs* » chez qui j'ai pu me frayer un chemin, particulièrement *Mathilde*, amie et interlocutrice privilégiée et *Koenraad*, complice et soutien quotidien. Merci pour ces moments – dingues ! – partagés !

Je me sais bavarde, mais je tiens également à remercier toutes les personnes passionnées que j'ai rencontrées et qui m'ont guidée sur cette route et donné le goût de la Recherche ! Notamment *Aurélie, Kaustubh...* à bientôt pour de nouvelles aventures j'espère !

Enfin, un immense merci à ceux, amis et famille, qui ont été là tout au long de cette expérience. Un bonus tout particulier à mes parents, pour leur soutien inconditionnel...

Et je n'oublie pas *Georges*, qui a donné son corps à la Science,
ni celle ou celui que mon étourderie aura égaré de cette page...

On attend une image, et c'est presque celle qui vient,
mais jamais tout à fait. La petite différence fait tout le
prix de ce voyage et son vertige, parfois presque son
désespoir :

on ne possédera jamais le pays des cristaux qui bougent.

Philippe Delerm,

La Première gorgée de bière et autres plaisirs minuscules

[Plonger dans les kaléidoscopes]

Sommaire

Sommaire	i
Abréviations.....	ix
Nomenclature des matériaux étudiés	xi
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 De l'os aux matériaux de comblement : quelques notions générales.....	7
1 Physiologie de l'os	7
1.1 L'os, un matériau composite : composition, structure et propriétés	7
Fonctions.....	7
Structure macroscopique.....	8
Composition.....	9
Propriétés mécaniques	10
1.2 Matrice minérale osseuse.....	10
Apatite et hydroxyapatite stœchiométrique	10
Apatite osseuse.....	11
Apatites synthétiques analogues au minéral osseux.....	14
1.3 Remodelage osseux	15
Les cellules osseuses : ostéoblastes et ostéoclastes	15
Réparation osseuse : l'auto-cicatrisation.....	15
2 Les matériaux de comblement osseux	16
2.1 Substituts osseux d'origine naturelle	17
2.2 Substituts osseux synthétiques.....	18
2.2.a Stratégies et développement	18
2.2.b Nature des substituts osseux synthétiques.....	19
3 Ciments de comblement osseux	21
3.1 Qu'est-ce qu'un ciment ?.....	21
3.2 Les ciments phosphocalciques.....	22
3.2.a Propriétés	23
Structure et composition : un matériau biomimétique.....	24
Régénération osseuse.....	24
Malléabilité de la pâte et injectabilité	25
Propriétés mécaniques	25
Association de principes actifs.....	25
3.2.b Les ciments composites.....	26
3.2.c Applications cliniques des CPCs.....	26

4	Risques infectieux et utilisation de l'argent	27
4.1	Risque infectieux en chirurgie orthopédique	27
4.2	Stratégies développées dans les ciments phosphocalciques	28
4.3	L'argent comme agent antibactérien	28
5	Objectifs de la thèse	29
Chapitre 2	Des poudres réactives au ciment de référence : synthèse, caractérisation et propriétés	33
1	Poudres réactives : synthèse et caractérisation.....	33
1.1	Brushite : $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33
1.1.a	Etat de l'art	33
	Histoire.....	33
	Structure	34
	Rôle biologique et propension à la formation d'une phase apatitique.....	34
1.1.b	Synthèse	36
1.1.c	Caractérisation.....	36
	Analyse par diffraction des rayons X (DRX)	37
	Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).....	37
	Analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	38
	Analyses par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide	39
1.2	Vatérite	40
1.2.a	Etat de l'art	40
	Histoire.....	40
	Occurrence de la vatérite naturelle	41
	Structure cristalline.....	42
1.2.b	Synthèse	48
	Protocole.....	48
	Prise en masse	48
1.2.c	Caractérisation.....	49
	Analyses par DRX	49
	Observations par MEB	50
	Analyses par spectroscopie FTIR.....	51
	Analyse thermogravimétrique.....	52
	Analyses par spectroscopie RMN ^{13}C	52
2	Etude du ciment de référence.....	55
2.1	Elaboration d'un ciment	55
2.1.a	Mise en œuvre expérimentale	55
2.1.b	Validité d'un gâchage manuel	56

2.2	Caractérisation d'un ciment totalement pris.....	58
2.2.a	Analyse par diffraction des rayons X	58
2.2.b	Observations par microscopie électronique à balayage	59
2.2.c	Analyses par spectroscopie FTIR.....	62
	Acidité des phosphates et hydroxylation de l'apatite	63
	Carbonatation de l'apatite.....	64
	Vatérite	65
2.2.d	Analyse par spectroscopie RMN.....	66
	Spectroscopie RMN ¹³ C.....	66
	Spectroscopie RMN ³¹ P.....	66
	Spectroscopie RMN ¹ H.....	67
2.3	Etude de la cinétique de prise : approche semi-quantitative combinant différentes techniques.....	68
2.3.a	Protocole expérimental.....	68
2.3.b	Analyse par spectroscopie FTIR	68
	Modèle mathématique de décomposition.....	69
	Courbes d'étalonnage à partir de mélanges binaires.....	72
	Validation de la méthode sur des mélanges ternaires	73
	Evaluation de la composition du ciment C-REF en cours de prise.....	74
2.3.c	Analyse par DRX.....	76
2.3.d	Analyses par spectroscopie RMN	79
2.3.e	Observations par MEB	81
2.4	Composition de l'apatite formée.....	82
3	Conclusion	84
Chapitre 3 Etude des ciments chargés en argent		87
1	L'orthophosphate d'argent Ag ₃ PO ₄ : synthèse, caractérisation et propriétés.....	87
1.1	Choix de l'orthophosphate d'argent.....	87
1.2	Structure	88
1.3	Synthèse.....	88
1.4	Caractérisation.....	89
	Analyses structurales et morphologiques	89
	Analyse par spectroscopie FTIR	90
	Analyses par spectroscopie RMN	91
2	Ciments chargés en argent.....	93
2.1	Elaboration des ciments	93
2.1.a	Introduction de Ag ₃ PO ₄ dans la phase solide	93
2.1.b	Introduction de AgNO ₃ dans la phase liquide.....	93

2.2	Caractérisation d'un ciment totalement pris.....	94
2.2.a	Composition des ciments (DRX)	94
2.2.b	Observations au microscope optique.....	95
2.2.c	Répartition de l'argent dans le matériau (MEB).....	95
2.2.d	Caractéristiques de l'apatite par RMN du solide.....	97
3	Temps de prise	98
4	Etude de la cinétique de la réaction de prise des ciments contenant de l'argent.....	98
4.1	Approche semi-quantitative par spectroscopie FTIR.....	99
4.1.a	Remarque préliminaire propre à l'étude par spectroscopie FTIR de ciments contenant de l'argent	99
4.1.b	Spectres FTIR des ciments chargés en argent	99
4.1.c	Etude de la cinétique de formation de l'apatite.....	100
4.2	Approche semi-quantitative par spectroscopie RMN : C-Ag(S).....	101
4.2.a	Présentation des spectres RMN ³¹ P.....	101
4.2.b	Analyse de l'apatite formée en cours de prise	102
4.2.c	Cinétique de formation de l'apatite	104
4.3	Discussion	105
4.3.a	Mécanismes de réaction de prise.....	105
	Influence de Ag ₃ PO ₄ sur la réaction de prise	105
	Influence de AgNO ₃ sur la réaction de prise	106
4.3.b	Taux d'insertion de l'argent dans l'apatite.....	107
	Estimation de la composition molaire du ciment C-Ag(S)	108
	Estimation de la quantité d'argent insérée dans l'apatite	109
5	Conclusions.....	110
Chapitre 4 Etude des ciments composites		113
1	Choix d'un polysaccharide : la CMC	114
1.1	La carboxyméthylcellulose (CMC).....	114
1.1.a	Données générales	114
1.1.a	Poudre de CMC.....	115
1.1.b	Mise en forme de microsphères.....	116
1.2	La CMC comme additif dans les ciments : état de l'art	117
2	Ciments composites : préparation et faisabilité	118
2.1	Elaboration des ciments composites.....	118
2.2	Caractérisation des ciments pris.....	120
2.2.a	Composition des ciments	120
2.2.b	Caractérisation des composites par spectroscopie FTIR	121
2.2.c	Influence de la CMC sur la microstructure du ciment.....	123

Observation des p-composites	123
Observation des μ -composites	125
2.2.d Influence de la CMC sur la porosité du ciment.....	127
3 Injectabilité.....	127
3.1 Etat de l'art bibliographique	128
Définition	128
Phénomène de séparation des phases : stratégies employées.....	128
Addition d'un polymère	129
3.2 Protocole expérimental	130
3.3 Ciment de référence : phénomène de séparation de phases	131
3.4 Introduction de la CMC : influence sur l'injectabilité de la pâte	132
3.4.a Injectabilité des composites incluant de la CMC sous forme de poudre	132
3.4.b Influence de la forme microsphère ou poudre de la CMC	133
3.5 Etude de l'orientation des plaquettes de brushite	134
3.5.a Ciment de référence et séparation des phases.....	134
Protocoles d'observation MEB mis en place	134
Résultats	135
3.5.b Injectabilité des ciments composites incluant la CMC sous forme de microsphères	137
Protocole d'observation MEB mis en place	137
Résultats	137
3.5.c Discussion	139
4 Essais mécaniques en compression.....	141
4.1 Protocole expérimental	142
4.2 Grandeurs caractéristiques.....	143
4.3 Essais sur les composites	144
4.3.a Ciments incluant la CMC sous forme de poudre	144
Principaux résultats	144
Résistance à la compression	146
Ductilité.....	146
Module d'élasticité	146
Ténacité.....	151
4.3.b Ciments incluant la CMC sous forme de microsphères.....	152
4.3.c Discussion au regard des matériaux existants.....	154
5 Cinétique et temps de prise des ciments composites.....	157
5.1 Cinétique de prise évaluée par spectroscopie FTIR.....	157
5.1.a Validation de la méthode	159
5.1.b Résultats	159
5.1.c Discussion	160

5.2	Temps de prise (aiguilles de Gillmore).....	162
6	Etude de la dissolution des ciments et de la libération de l'argent	163
6.1	Protocole.....	163
6.2	Résultats	164
6.3	Discussion	168
7	Conclusions.....	168
Chapitre 5	Propriétés biologiques des ciments composites chargés en argent.....	173
1	Activité antibactérienne	173
1.1	Activité antibactérienne des ciments	174
1.1.a	Matériel & méthodes	174
	Pastilles de ciment	174
	Essais microbiologiques	175
1.1.b	Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des ciments	176
	Ciments chargés en argent	176
	Ciments composites chargés en argent.....	178
2	Essais cellulaires	179
2.1	Etude de la cytotoxicité des ciments contenant Ag_3PO_4	180
2.1.a	Matériel & méthodes	180
2.1.b	Résultats	182
2.1.c	Confrontation des données de microbiologie et de cytocompatibilité.....	183
2.2	Etude de la cytocompatibilité d'un ciment composite $CaCO_3 - CaP-CMC-Ag$: effet de l'argent sur la différenciation ostéoblastique	184
2.2.a	Matériel & Méthodes	184
2.2.b	Résultats	185
3	Evaluation de la réponse osseuse aux ciments à base de $CaCO_3 - CaP$ après implantation in vivo	186
3.1	Méthodologie expérimentale	186
3.1.a	Procédure chirurgicale.....	186
3.1.b	Histologie	187
3.2	Etude du ciment de référence	187
3.3	Etude des ciments composites contenant de l'argent	190
3.3.a	Analyses toxicologiques.....	190
3.3.b	Analyses histologiques.....	190
4	Conclusion	192
	Conclusions générales et perspectives	193
	Bibliographie.....	I
	Annexes.....	XVII

1	Données physico-chimiques.....	XVII
1.1	Les phosphates de calcium	XVII
1.2	Equilibres ioniques en solution.....	XVII
1.3	Solubilité de différents sels de calcium et d'argent.....	XVIII
2	Techniques de caractérisation	XIX
2.1	Diffraction des rayons X (DRX).....	XIX
2.2	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	XIX
2.3	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	XX
2.4	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide	XX
2.5	Analyse thermogravimétrique.....	XXI
2.6	Aiguilles de Gillmore	XXI
2.7	Mesures de surfaces spécifiques	XXI
2.8	Porosimétrie à mercure	XXI
2.9	Granulométrie Laser	XXII
3	Synthèses.....	XXII
3.1	Apatite	XXII
3.2	Vatérite enrichie en carbone ¹³ C.....	XXII
4	Etude complémentaire sur la synthèse de la vatérite.....	XXIII

Abréviations

Composés chimiques

ACC	carbonate de calcium amorphe (<i>amorphous calcium carbonate</i>)	
ACP	phosphate de calcium amorphe (<i>amorphous calcium phosphate</i>)	
AH	acide hyaluronique	
BCP	phosphate de calcium biphasique (<i>biphasic calcium phosphate</i>) : mélange de HA et de β -TCP	
CaP	phosphates de calcium (de manière générique)	
CMC	carboxyméthylcellulose	
CPC	ciments phosphocalciques (de manière générique)	
DCPA	phosphate de calcium anhydre ou monétite (<i>dicalcium phosphate anhydrous</i>)	CaHPO_4
DCPD	phosphate de calcium dihydraté ou brushite (<i>dicalcium phosphate dihydrate</i>)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
HA	hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
PMMA	polyméthacrylate de méthyle	
TCP	phosphate tricalcique (<i>tricalcium phosphate</i>) \triangleright existe sous forme α -TCP ou β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
TTCP	phosphate tétracalcique (<i>tetracalcium phosphate</i>)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$

Techniques d'analyse physico-chimiques et acronymes associés

BET	méthode de Brunauer, Emmett et Teller pour la mesure de la surface spécifique
CP	[en RMN] polarisation croisée (<i>cross polarization</i>)
DRX	diffraction des rayons X
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
FWHM	largeur à mi-hauteur (<i>full width at half maximum</i>)
ICP-MS	spectrométrie de masse à plasma couplé par induction
JCPDS	[en DRX] base de données de référence (<i>joint committee on powder diffraction standards</i>)
MAS	[en RMN] rotation à l'angle magique (<i>magic angle spinning</i>)
MEB	microscopie électronique à balayage
RMN	résonance magnétique nucléaire

De manière spécifique au ciment...

Ap	apatite nanocristalline analogue au minéral osseux
B	brushite
V	vatérite

- (S)** se rapporte à la phase solide du ciment
(L) se rapporte à la phase liquide du ciment
L/S rapport massique phase liquide / phase solide

Biologie

- α -MEM** milieu de culture cellulaire riche, utilisé pour les essais de cytotoxicité
BBM bouillon biofilm modifié
CMB concentration minimale bactéricide
CMI concentration minimale inhibitrice
MTT test l'activité métabolique cellulaire
RN rouge neutre – test la viabilité cellulaire
SAL *sterility assurance level*
UFC unité formant colonie

Nomenclature des matériaux étudiés

Le tableau ci-dessous présente les différents ciments qui ont été étudiés au cours de ces travaux de thèse, leur composition – ramenée à un ciment dont la phase solide est de 1 g –, leur nomenclature et les chapitres dans lesquels les résultats associés sont présentés.

	Nomenclature	Phase solide				Phase liquide		L/S	Chapitres
		Brushite	Vatérite	Ag ₃ PO ₄	CMC	eau	AgNO ₃		
Ciment minéral de référence	C-REF	0,50	0,50	-	-	0,55	-	0,55	2, 3, 5
	C-REF'	0,50	0,50	-	-	0,70	-	0,70	4
Ciment + Ag₃PO₄ en phase solide	C-Ag(S)_2 (ou C-Ag(S))	0,45	0,45	9,7.10 ⁻²	-	0,55	-	0,55	3, 5
	C-Ag(S)_1	0,48	0,48	4,9.10 ⁻²	-	0,55	-	0,55	5
	C-Ag(S)_10 ⁻¹	0,50	0,50	4,9.10 ⁻³	-	0,55	-	0,55	5
	C-Ag(S)_10 ⁻²	0,50	0,50	4,9.10 ⁻⁴	-	0,55	-	0,55	5
Ciment + AgNO₃ en phase liquide	C-Ag(L)_2 (ou C-Ag(L))	0,50	0,50	-	-	0,55	1,3.10 ⁻¹	0,68	3, 5
	C-Ag(L)_10 ⁻²	0,50	0,50	-	-	0,55	5,9.10 ⁻⁴	0,56	5
	C-Ag(L)_10 ⁻⁴	0,50	0,50	-	-	0,55	5,9.10 ⁻⁶	0,55	5
	C-Ag(L)_10 ⁻⁶	0,50	0,50	-	-	0,55	5,9.10 ⁻⁸	0,55	5
Composites : Ciment + poudre de CMC	C-2pCMC	0,49	0,49	-	0,02	0,70	-	0,70	4
	C-10pCMC	0,45	0,45	-	0,10	0,70	-	0,70	4, 5
	C-20pCMC	0,40	0,40	-	0,20	0,70	-	0,70	4
	C-30pCMC	0,35	0,35	-	0,30	0,70	-	0,70	4
	C-50pCMC	0,25	0,25	-	0,50	0,70	-	0,70	4
Ciment + microsphères CMC	C-2μCMC	0,49	0,49	-	0,02	0,70	-	0,70	4
	C-10μCMC	0,45	0,45	-	0,10	0,70	-	0,70	4
Ciments composites + Ag	C-2pCMC/Ag(S)_10 ⁻²	0,49	0,49	4,9.10 ⁻⁴	0,02	0,70	-	0,70	5
	C-10pCMC/Ag(S)_10 ⁻²	0,45	0,45	4,9.10 ⁻⁴	0,10	0,70	-	0,70	5
	C-10pCMC/Ag(L)_10 ⁻²	0,45	0,45	-	0,10	0,70	5,9.10 ⁻⁴	0,71	5

Introduction générale

Une grande variété de substituts de comblement et de réparation osseuse ont été développés en réponse à la multiplicité des pathologies et des traumatismes qui nécessitent leur utilisation. La problématique est complexe : faut-il se focaliser en priorité sur des propriétés mécaniques proches de celles de l'os ou sur une architecture permettant une prolifération rapide des cellules osseuses ? Faut-il privilégier des techniques de chirurgie mini-invasives ou une structure tridimensionnelle épousant la géométrie du défaut ? Certaines qualités sont incontournables ; la biocompatibilité, gage d'acceptation par le corps en est une. Mais il n'y a certainement pas une réponse unique à l'ensemble des problématiques posées et la solution réside bien souvent en un compromis entre différentes caractéristiques parfois antagonistes dans leur élaboration et leur mise en œuvre.

L'une des dernières familles de substituts osseux développées est celle des ciments phosphocalciques. Généralement élaborés à partir de poudre de phosphates de calcium (CaP), ils présentent les avantages d'être biocompatibles, voire même biomimétiques dans le cas des ciments formant de l'apatite en cours de prise, ce qui permet une intégration optimale du matériau dans le site implanté. Se présentant sous la forme d'une pâte ils autorisent la mise en œuvre de techniques chirurgicales mini-invasives. Cependant l'injectabilité de ces matériaux n'est pas toujours acquise, principalement à cause de phénomènes de séparation de phases pendant l'extrusion de la pâte. Ils présentent également des faiblesses en termes de propriétés mécaniques, avec un comportement souvent fragile. D'autre part, leur cinétique de résorption n'est pas toujours ajustée à celle de la néoformation osseuse.

Ainsi, cette étude porte sur une nouvelle composition de ciment composite et s'inscrit dans le cadre du projet BIOSINJECT « *Composite injectable, biorésorbable et antibactérien pour la régénération osseuse* » du programme de recherche TecSan de l'Agence Nationale de la Recherche (n°ANR-09-TECS-004 ; 2009-2014). Ce projet inter- et pluridisciplinaire réunit un consortium de huit

partenaires académiques et industriels nationaux qui interviennent chacun dans leur cœur de compétences pour atteindre les objectifs de ce projet :

1 ▪ Institut Carnot CIRIMAT (Toulouse), coordinateur du projet : Elaboration du ciment et études des propriétés physico-chimiques.

2 ▪ CERMAV (Grenoble) : Synthèse de polymères à propriétés spécifiques.

3 ▪ Laboratoire Rhéologie et Procédés (Grenoble) : Caractérisation rhéologique de la pâte.

4 ▪ LGC (Toulouse) : Evaluation des propriétés antibactériennes in vitro.

5 ▪ INSERM U1026 (Bordeaux) : Evaluation du comportement cellulaire in vitro.

6 ▪ Laboratoire B2OA (Paris) : Etude animale.

7 ▪ Medical Biomat (Vaulx en Velin) : Spécifications et étude clinique.

8 ▪ Medical Lab (Vaulx en Velin) : Standardisation et transfert de technologies.

L'objectif du projet est l'élaboration d'un substitut osseux injectable, résorbable à l'échelle de quelques mois, et antibactérien, dans le but de limiter ou prévenir les risques d'infections post-opératoires. La Figure 4.1 présente schématiquement la stratégie envisagée, en termes de composition, pour arriver à ces propriétés. Le matériau de base est un ciment, élaboré à partir de deux poudres réactives : la brushite, un phosphate de calcium largement utilisée dans les biomatériaux, et la vatérite, une variété polymorphe métastable de carbonate de calcium beaucoup moins courante dans ce domaine. La dissolution de ces réactifs au sein d'une pâte conduit à la précipitation d'une phase apatitique nanocristalline. Cette apatite biomimétique peut être résorbée et remodelée par les cellules osseuses – contrairement, par exemple, à l'apatite stœchiométrique. La vatérite, d'autre part, présente une solubilité supérieure aux autres carbonates de calcium anhydres, encline ainsi à une résorption également plus rapide in vivo.

Après quelques notions générales et bibliographiques dans le premier chapitre qui permettent de situer ce travail dans le domaine des substituts osseux et de présenter le cahier des charges, nous aborderons dans un deuxième chapitre la synthèse et les caractéristiques des poudres réactives, de la réaction de prise du ciment, ainsi que ses propriétés physico-chimiques.

L'agent antibactérien choisi dans cette étude est l'argent ; l'effet de son introduction dans le système CaCO_3 – CaP précédemment décrit fera l'objet du troisième chapitre.

Un polysaccharide – la carboxyméthylcellulose (CMC) – a ensuite été introduit dans la phase solide du ciment afin d'améliorer son injectabilité. Polymère hydrophile et biodégradable, la CMC est

également susceptible de favoriser la résorbabilité du matériau voire de contrôler la libération de l'agent antibactérien. Les aspects physico-chimiques liés au caractère composite de ce matériau et aux propriétés qui en découlent constitueront le quatrième chapitre.

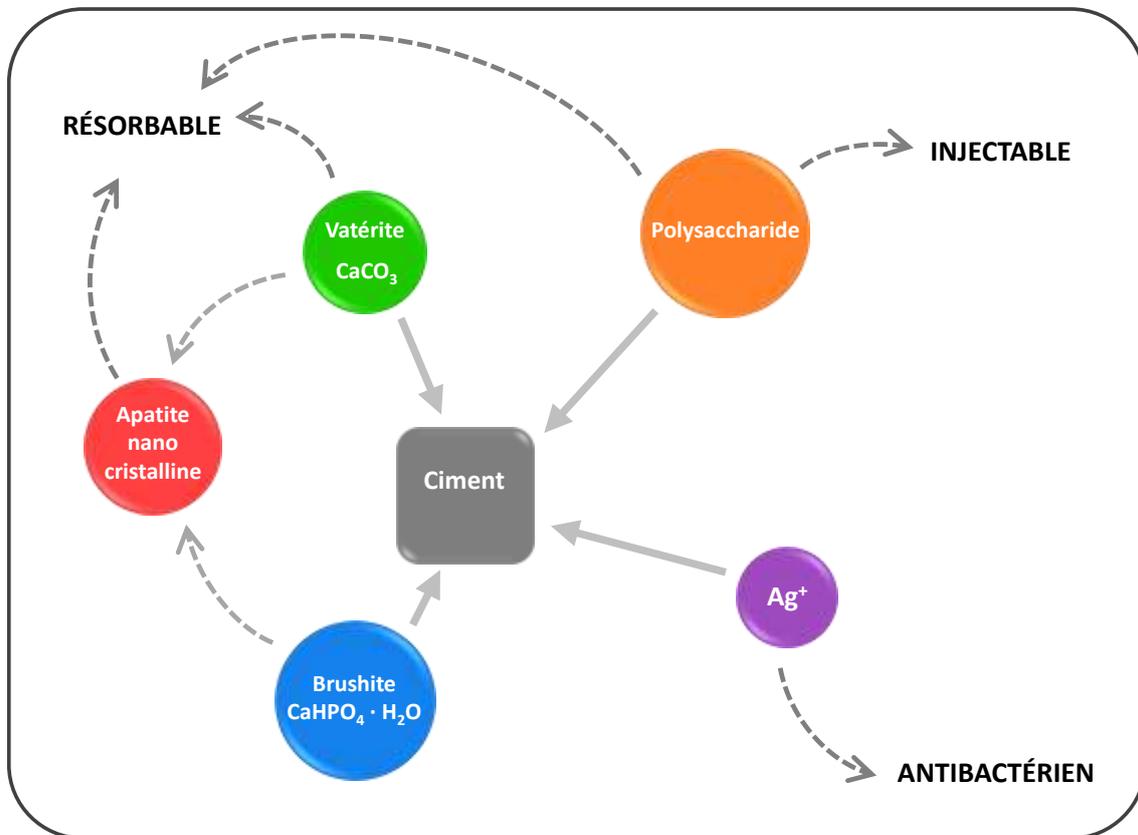


Figure 4.1 – Représentation schématique de la composition du ciment étudié et de ses principales caractéristiques.

Le cinquième chapitre exposera enfin les études biologiques *in vitro*, réalisées à la fois pour évaluer la cytotoxicité du matériau et ses propriétés antibactériennes. Des résultats préliminaires d'implantations *in vivo* seront également présentés.

Chapitre 1

De l'os aux matériaux de comblement : quelques notions générales

...
...
...
... become the most important
of Ca-P as bioactive
tion with bone min
bone substitute m
constraint of bon
Ca-P materials i
bone healing
... Ca-P m
...
...

Le tissu osseux a une fascinante capacité de se remodeler. Outre un renouvellement de l'os tout au long de la vie, cette propriété permet de cicatriser des défauts ou des fractures lorsque ceux-ci sont de petite taille. Mais dans certains cas, le remodelage seul ne suffit plus et nécessite l'implantation d'un biomatériau de comblement, naturel ou synthétique pour remplacer l'os manquant, et, dans la mesure du possible, servir de support à un remodelage du biomatériau lui-même dans le but de reformer de l'os. Après avoir présenté quelques notions générales sur ces différents points, ce chapitre s'attachera plus particulièrement à une catégorie de biomatériaux : les ciments phosphocalciques, et nous amènera à la problématique plus globale de cette étude : l'élaboration d'un substitut osseux injectable, antibactérien et résorbable.

1 Physiologie de l'os

1.1 L'os, un matériau composite : composition, structure et propriétés

Fonctions

Le corps humain compte près de 200 os articulés (Figure 1.1). Matériaux composites de taille, composition et structure complexes et diverses, ces os assurent différentes fonctions :

- un *rôle mécanique* : charpente du corps humain, le squelette sert de point d'attache aux tendons et de support aux tissus mous (muscles, ligaments...).
- un *rôle de protection* vis à vis de de nombreux organes internes, comme le cerveau par la boîte crânienne, le cœur et les poumons par la cage thoracique, ou encore la moelle épinière au sein des vertèbres.
- un *réservoir à minéraux* : 99 % du calcium et 90 % du phosphore de notre corps sont stockés dans les os, le cartilage et dans les dents.
- une *fonction hématopoïétique*, c'est-à-dire qu'il participe aux processus de formation de cellules sanguines, notamment par de la moelle osseuse rouge qui produit les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

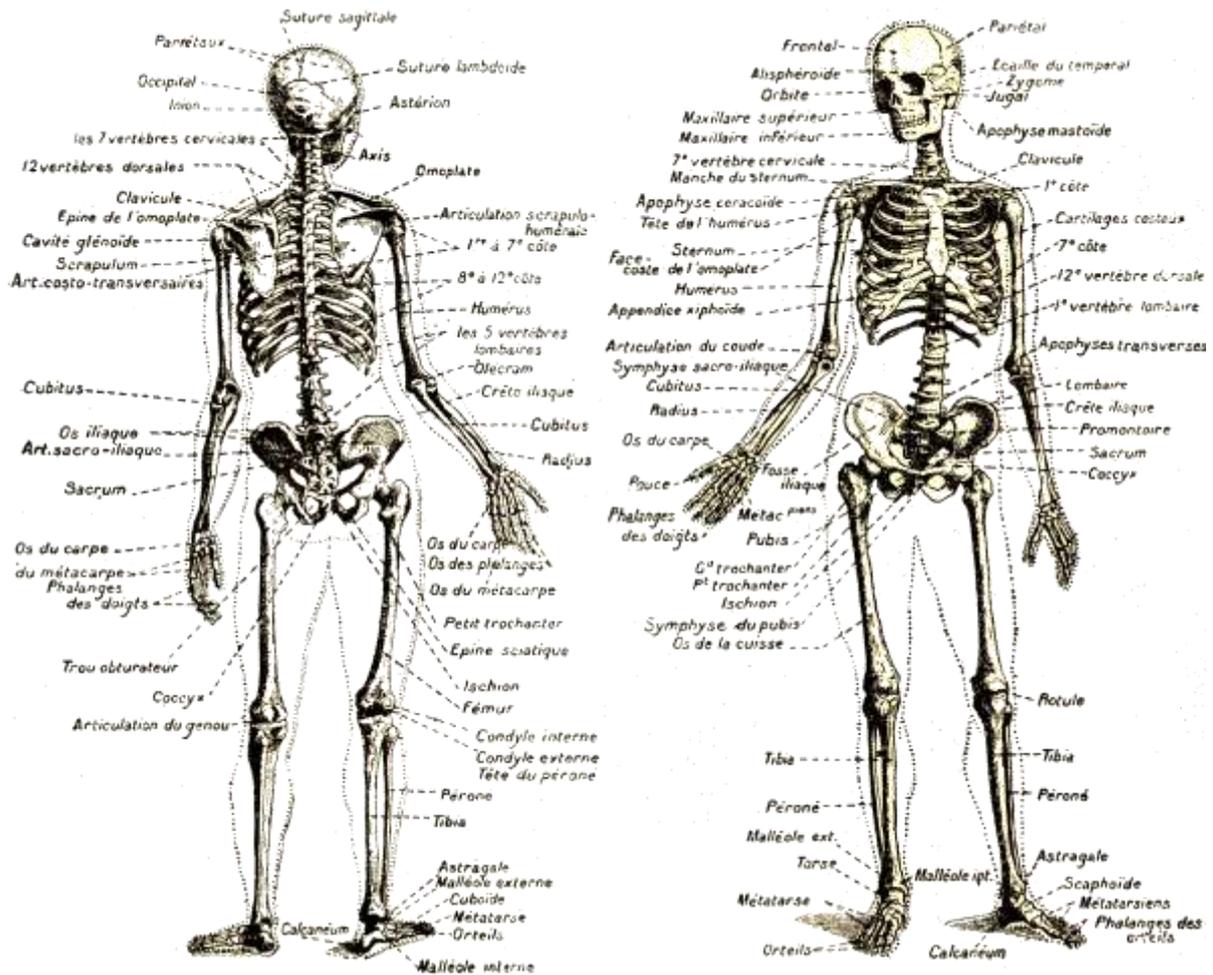


Figure 1.1 – Représentation d'un squelette humain et des différents os qui le constituent. ^[1]

Structure macroscopique

Les os se classent selon différentes catégories : les *os longs* (fémur, tibia), *courts* (phalanges), *plats* (os du crâne, omoplates) et *irréguliers* (vertèbres). D'architecture complexe, ils sont constitués de cartilage, de tissu osseux et de moelle osseuse. La Figure 1.2 présente ainsi la structure type d'un os long : il est composé de la *diaphyse*, une partie centrale longue et cylindrique, et des *épiphyes proximale* et *distale*, ses extrémités. Le tissu osseux de la diaphyse est de l'*os compact*, également appelé *os cortical* ou *lamellaire*. Se prolongeant sur toute la périphérie de l'os, il protège sa partie interne. Il représente environ 80 % de la masse osseuse du corps. Au cœur de ce cylindre compact, dans la *cavité médullaire*, se trouve la *moelle jaune* constituée principalement de tissu adipeux. A l'extrémité des os longs, et au sein des os plats et courts prend place un autre type de tissu osseux : l'*os spongieux*, ou *trabéculaire*. Comme son nom l'indique, l'os spongieux présente une porosité et

¹ Image tirée du site www.cosmovisions.com

donc une surface beaucoup plus importante que l'os compact. Riche en *moelle rouge* – un mélange de tissu sanguin, de graisse et de collagène – c'est un lieu d'échange de nutriments. Enfin, les épiphyses sont recouvertes d'une fine couche de *cartilage articulaire*, permettant de réduire la friction et d'amortir les chocs.

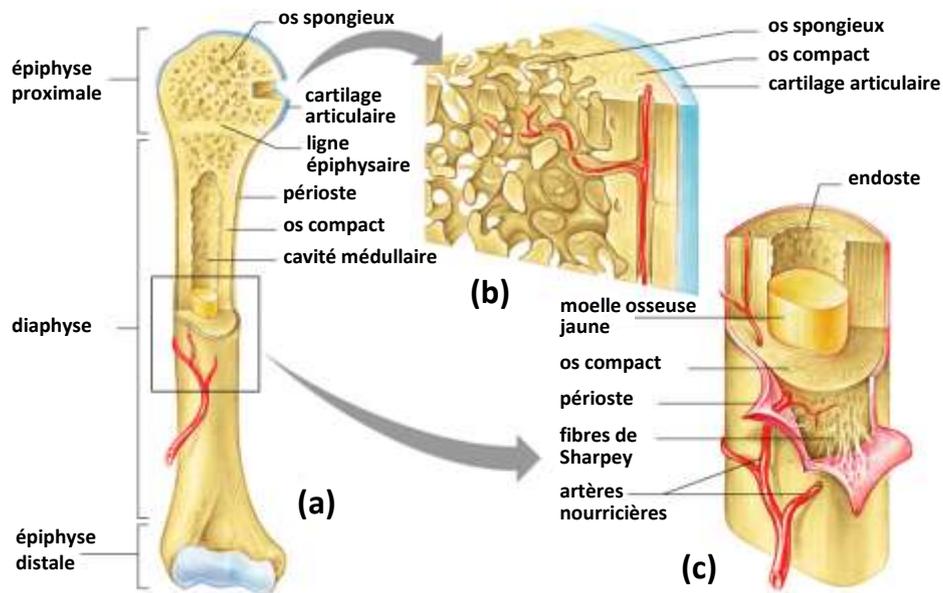


Figure 1.2 – Représentation de la structure d'un os long type (a) et agrandissements de la structure de l'épiphyse proximale (b) et d'une section de la diaphyse (c). Adapté de [Marieb 2006]

Composition

L'os est un *matériau composite*, mélange intime d'une phase organique (22 %), d'une matrice minérale à base de phosphate de calcium (69 %) et d'eau (9 %), de proportions variables selon la nature de l'os.

La *matrice organique* est la première phase synthétisée lors de la formation de l'os. Elle est constituée majoritairement de *collagène de type I* (à 90 %), une glycoprotéine fibreuse et rigide qui forme une triple hélice d'une longueur de 3000 Å et de 50 Å de diamètre [Constantin 2013]. Elle est ensuite minéralisée par un phosphate de calcium, une phase de type apatitique, qui sera décrite dans la partie 1.2 de ce chapitre.

Propriétés mécaniques

Le caractère composite du tissu osseux lui confère des propriétés exceptionnelles, notamment mécaniques. L'os cortical présente ainsi une résistance de l'ordre de 130 - 180 MPa en compression et 50 - 151 MPa en tension [Wagoner Johnson 2011]. Les propriétés mécaniques de l'os spongieux sont plus modestes en raison de sa grande porosité (Tableau 1.1).

Type d'os	Résistance à la compression (MPa)	Résistance à la flexion (MPa)	Résistance à la tension (MPa)	Module (GPa)	Porosité (%)
Cortical	130 à 180	135 à 193	50 à 151	12 à 18	5 à 13
Spongieux	4 à 12	–	1 à 5	0,1 à 0,5	30 à 90

Tableau 1.1 – Propriétés mécaniques et porosité de l'os humain, d'après la littérature. [Wagoner Johnson 2011]

1.2 Matrice minérale osseuse

La structure et la composition de la partie minérale de l'os n'a été déterminée qu'au début du XX^{ème} siècle. Déjà identifiée comme étant principalement constitué de carbonate et phosphate de calcium, un rapport chimique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 / \text{CaCO}_3$ a finalement conduit à l'hypothèse d'une unique phase et structure, de type apatitique, confirmée ensuite par analyse par diffraction des rayons X (DRX) [de Jong 1926; Bowes 1935].

Apatite et hydroxyapatite stœchiométrique

L'apatite regroupe une famille de composés minéraux dont la formule générale des composés stœchiométriques est :



où Me est un métal bivalent, XO_4 un anion trivalent et Y un anion monovalent. Cette structure a la faculté d'accepter de nombreuses substitutions de différentes valences dans chacun de ces sites, et des lacunes en site Me ou Y.

Parmi ces apatites, l'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique (HA) est un des phosphates de calcium les plus stables d'un point de vue thermodynamique. De rapport Ca/P = 1,67, elle a pour formule :



et cristallise dans le système hexagonal, de groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$ avec pour paramètres de maille $a = 9,418 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$ [Kay 1964]. La Figure 1.3.a présente la projection sur son plan basal (0001).

Ses ions phosphates sont agencés de telle sorte qu'ils forment deux types de tunnels : les premiers (pointillés oranges sur la Figure 1.3.a), sont occupés par une partie des ions calcium. Ces atomes de calcium sont communément désignés comme Ca(1) et ont une coordinence IX avec les atomes d'oxygène des phosphates voisins (Figure 1.3.b). Le deuxième type de calcium, Ca(2), forme les deuxièmes tunnels (pointillés verts sur la Figure 1.3.a). Ceux-ci sont plus larges (2,7 – 2,9 Å) pour une hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique, plus larges pour une apatite lacunaire en calcium) et contiennent les hydroxydes. Les hydroxydes occupant ce tunnel (2) ont une liaison relativement faible avec le reste de la structure d'où une propension de l'apatite à créer des lacunes ou échanger ses ions avec de petites molécules telles que O₂, H₂O, etc [Rey 1984].

Apatite osseuse

L'apatite composant la partie minérale de l'os est en réalité de composition et de structure beaucoup plus complexe que l'hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. En effet, loin d'être stœchiométrique, la composition moyenne suivante a été évaluée par analyses chimiques [Legros 1987] :



Cette formule a rapidement été ajustée, aux vues d'analyses spectroscopiques complémentaires, et a conduit à la formule suivante [Rey 1989] :



soit une apatite déficiente en calcium, carbonatée et contenant des ions HPO₄²⁻, et très peu hydroxylée. Comme il a été mis en évidence dans un deuxième temps, la carbonatation peut être de deux types :

‣ *carbonatation de type A* – le carbonate substitue un groupement hydroxyle.

‣ *carbonatation de type B* – le carbonate substitue un groupement phosphate. La substitution d'un ion trivalent PO₄³⁻ par un ion bivalent CO₃²⁻ est accompagnée par la création d'une lacune de Ca²⁺ et de OH⁻ en proximité immédiate pour assurer l'électroneutralité du solide, modèle de compensation des charges prédominant dans les apatites biologiques présenté sur la Figure 1.4 [Labarthe 1972]. Il correspond à une apatite de formule générale :



L'apatite osseuse présente aussi une *substitution des ions PO₄³⁻ par des groupements HPO₄²⁻*. Le mécanisme de compensation des charges serait le même que dans le cas d'une carbonatation de type B [Legros 1984].

L'ensemble de ces substitutions conduit ainsi à une apatite lacunaire en calcium – principalement Ca(2) – et à peine hydroxylée [Rey 1995], dont la carbonatation dépend des individus et augmente tout au long de leur vie [Legros 1987].

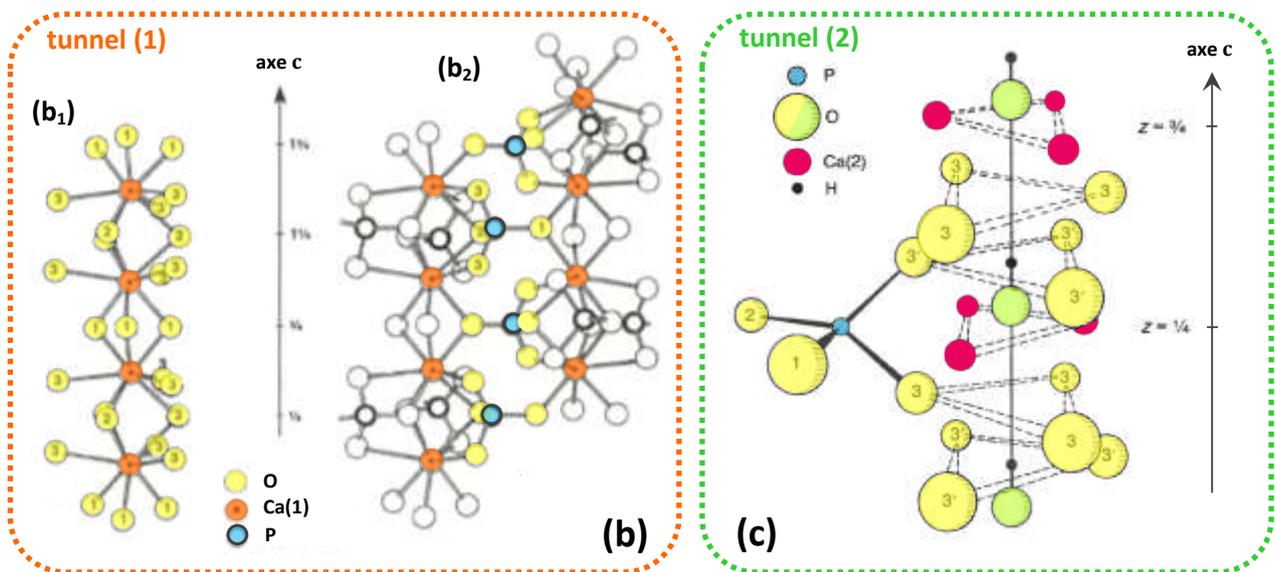
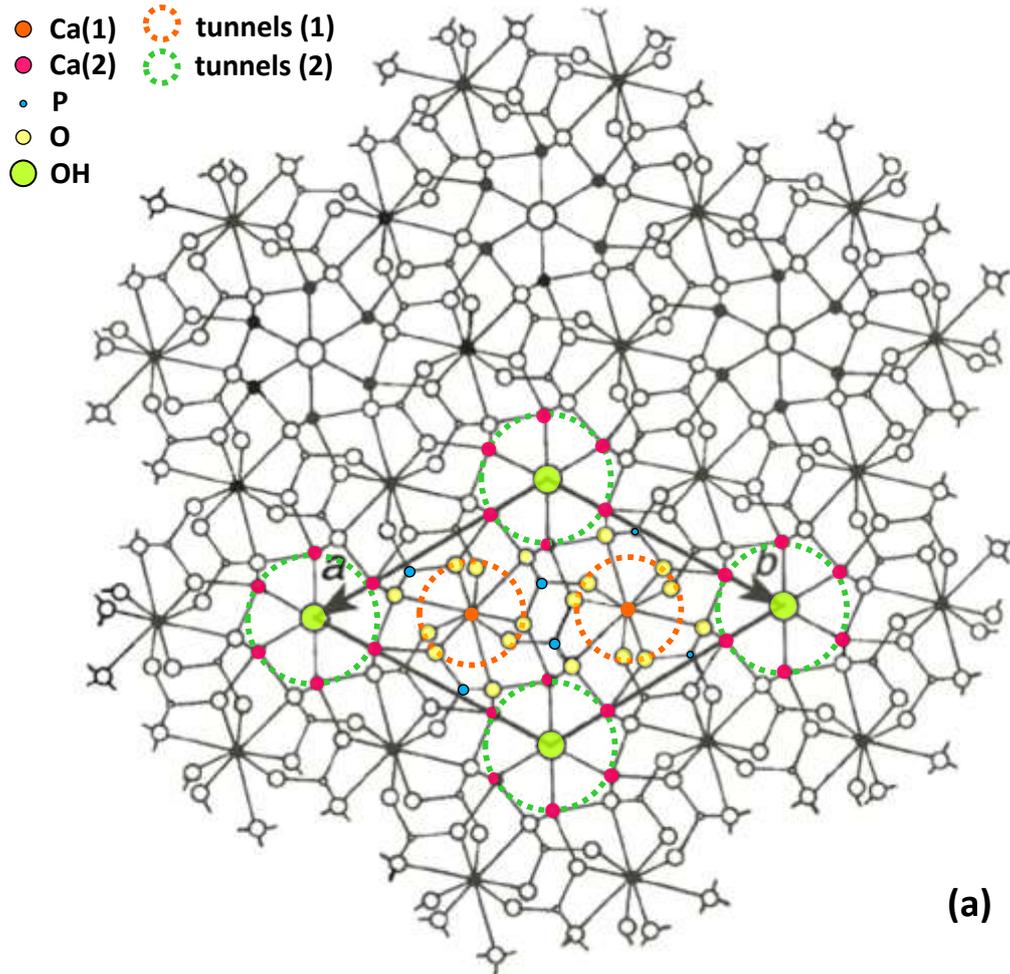


Figure 1.3 – Structure de l’hydroxyapatite stœchiométrique : (a) projection sur le plan basal (0001) ; (b) arrangement des ions selon l’axe c autour du tunnel (1) : (b₁) les atomes Ca(1) ont une coordination IX avec les atomes d’oxygène et (b₂) les différentes colonnes de Ca(1) sont reliées par des groupements PO₄³⁻ ; (c) arrangement des ions selon l’axe c autour du tunnel (2). Adapté de [Elliott 1994]

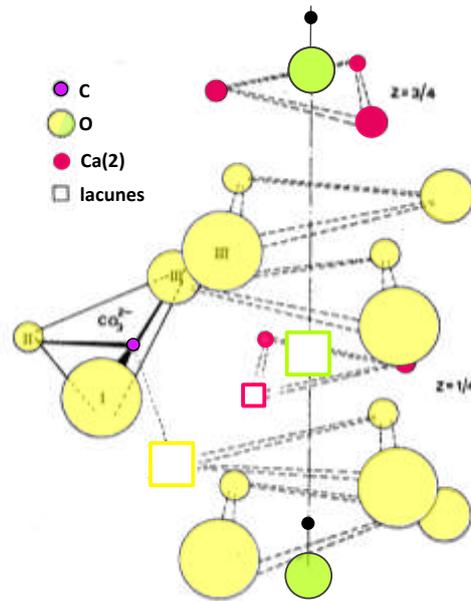


Figure 1.4 – Environnement des atomes autour du tunnel (2) le long de l'axe c dans le cas d'une carbonatation de type B. Adapté de [Labarthe 1972].

Les nombreuses lacunes et substitutions d'une part et la taille nanométrique des cristaux d'autre part conduisent à un taux de cristallinité très faible de l'apatite dans l'os, comme le montrent les diagrammes de diffraction des rayons X de la Figure 1.5. Même si l'ordre atomique augmente légèrement au cours de la vie, l'apatite reste faiblement cristalline [Bonar 1983].

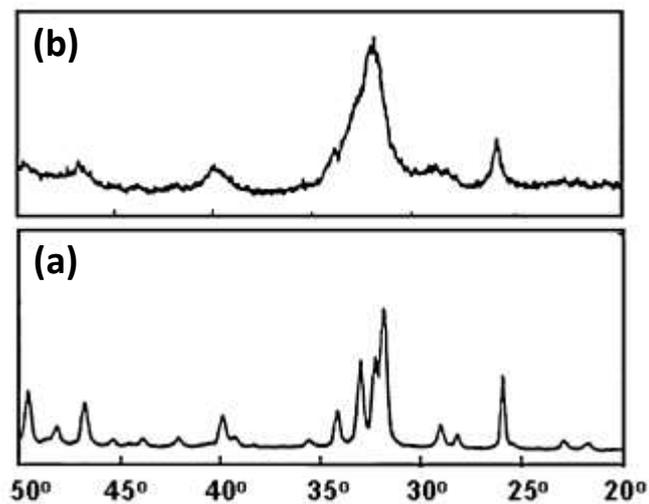


Figure 1.5 – Diagrammes de DRX (radiation $\text{CuK}\alpha$) (a) d'une hydroxyapatite synthétique à un taux de cristallinité élevé et (b) d'un os de poussin âgé de 2 ans [Bonar 1983].

Une autre caractéristique des apatites biologiques est de présenter en leur surface une *couche hydratée* structurée mais fragile, contenant des ions labiles (Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-}) susceptibles d'interagir avec les fluides environnants [Eichert 2007]. Cette couche hydratée, représentée schématiquement sur la Figure 1.6, est un des principaux facteurs responsables de l'exceptionnelle

réactivité de surface de ces composés, notamment de l'adsorption d'ions ou de molécules d'intérêt biologiques [Cazalbou 2000; Autefage 2009; Pascaud 2012].

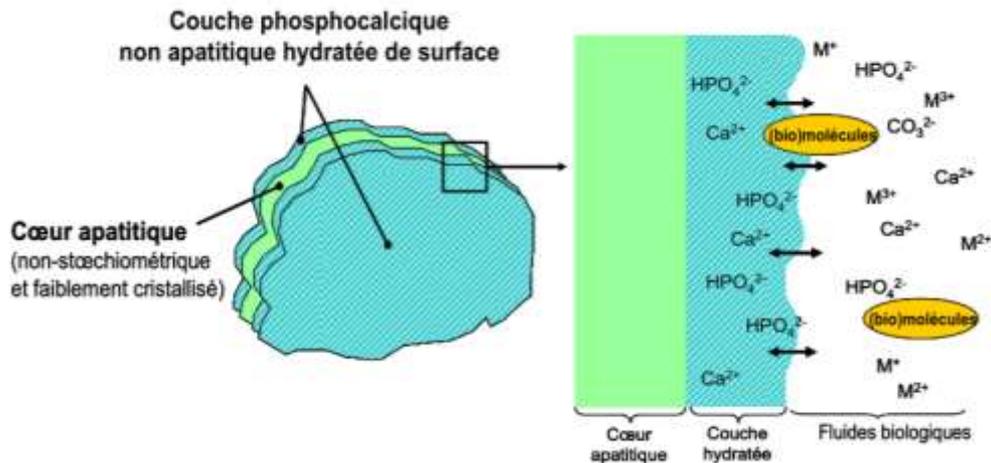
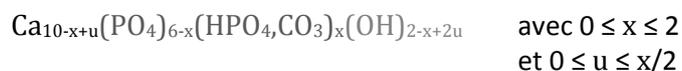


Figure 1.6 – Représentation schématique de la couche hydratée des nanocristaux d'apatite biologiques et biomimétiques [Eichert 2007].

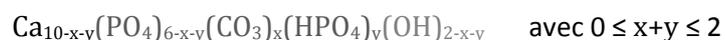
Apatites synthétiques analogues au minéral osseux

Il est possible de synthétiser des *apatites nanocristallines analogues au minéral osseux*, dites *biomimétiques*. Les différentes voies de synthèses existantes ne seront pas développées dans ce manuscrit, néanmoins nous avons relevé quelques remarques d'importance pour la suite de ce travail.

En milieu aqueux à basse température, c'est la carbonatation de type B qui est privilégiée dans les apatites synthétiques [Bonel 1972]. Il est donc courant de négliger les substitutions de type A dans les apatites formées en conditions douces, d'où une expression générale suivante [Rey 2007] :



Le paramètre u a été introduit par Labarthe comme ajustement empirique dans des conditions de synthèses alcalines [Labarthe 1972]. Cependant il a été noté que ce paramètre peut généralement être ignoré dans des apatites formées à un pH proche de la neutralité – voire légèrement acide –, ce qui amène à la formule simplifiée suivante [Rey 2007] :



Cette formule est une bonne approximation pour décrire les apatites nanocristallines synthétisées dans des conditions douces, à un pH non alcalin. Il est à noter que cela reste un modèle

simplifié, notamment étant donné le gradient de cristallinité entre le cœur apatitique et la surface hydratée, et le caractère labile des ions composant celle-ci.

1.3 Remodelage osseux

Les cellules osseuses : ostéoblastes et ostéoclastes

L'os est un organe en constante évolution et en perpétuel renouvellement. Non seulement sa matrice minérale apatitique, comme nous l'avons évoqué, se carbonate et acquiert une plus grande cristallinité dans le temps, mais l'ensemble du tissu osseux est soumis à un remodelage continu grâce à l'action des cellules osseuses. C'est un équilibre complexe entre les ostéoclastes et les ostéoblastes qui vont permettre à l'os de conserver son intégrité et ses propriétés tout au long de la vie. Les *ostéoclastes* – des cellules géantes multinucléées d'une centaine de microns de diamètre – sont à l'origine de la résorption osseuse, notamment de la phase minérale par relargage de protons qui vont la dissoudre. Parallèlement, les *ostéoblastes* – des cellules mononucléées d'une vingtaine de microns de diamètre – jouent un rôle prépondérant dans la synthèse de la matrice osseuse – le *tissu ostéoïde* – et dans sa minéralisation.

Le *remodelage osseux* correspond ainsi au processus de *résorption – néoformation du tissu osseux*, issu de cet équilibre. Ce processus permet à l'os de s'adapter aux contraintes auxquelles il est soumis – charges mécaniques, par exemple –, de prévenir la dégénération osseuse, de réguler la concentration des fluides biologiques en ions – notamment en calcium – mais il lui confère aussi une propriété remarquable : celle de pouvoir *s'auto-réparer*.

Réparation osseuse : l'auto-cicatrisation

Ainsi, à condition que le défaut soit de petite taille, l'os a une capacité d'auto-cicatrisation. La Figure 1.7 en présente le processus dans le cas général : conjointement à une *réaction inflammatoire*, un *hématome* se forme autour du site fracturé (Figure 1.7.1). Cet hématome acquiert au bout de quelques jours un pouvoir ostéogénique, c'est-à-dire qu'il est capable de former de l'os. Une substance fibreuse – ou *cal fibreux* – se développe alors dans l'espace laissé par la fracture, et remplace peu à peu l'hématome (Figure 1.7.2). A ce stade, les ostéoclastes commencent à résorber les extrémités osseuses dévitalisées. Une *ossification* du cal a ensuite lieu ce qui crée la jonction entre les deux fragments (Figure 1.7.3). Notons que les contraintes mécaniques en compression et en traction sont très utiles au développement du cal [Lerat 2005]. Les ostéoblastes reconstituent alors un système osseux « normal » (Figure 1.7.4), ce qui n'est possible que s'il n'y a plus de tissu fibreux

dans l'espace. Le cal se remodèle et s'adapte en fonction des contraintes auxquelles il est soumis. Alors que les traces de fracture peuvent entièrement disparaître chez l'enfant, le processus peut ne pas être aussi complet chez l'adulte.

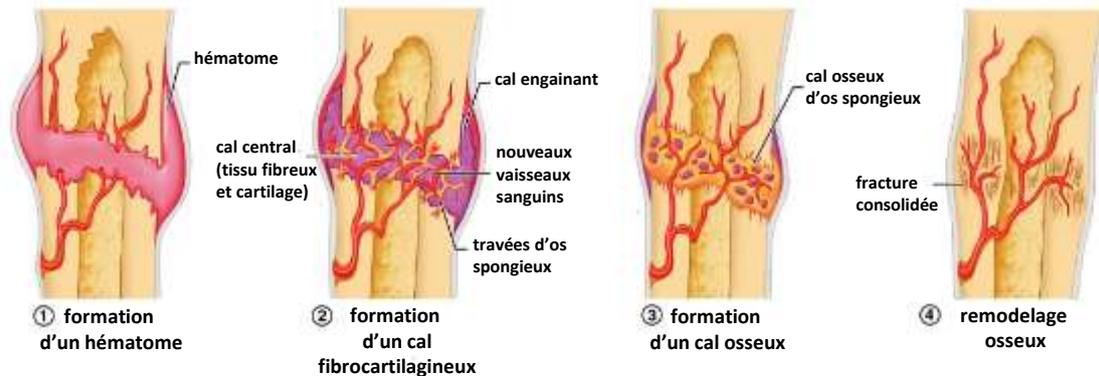


Figure 1.7 – Représentation schématique du processus d'auto-réparation osseuse dans le cas d'une fracture. Adapté de [Marieb 2006]

La consolidation osseuse est ainsi dépendante de nombreux facteurs directement liés à l'individu et à son mode de vie d'une part – âge, conditions physiques, facteurs mécaniques, nutritionnels, hormonaux, etc. – et à la nature même de la fracture, d'autre part – taille, vascularisation possible du défaut, nature du tissu osseux. L'os spongieux, par exemple consolide en 6 semaines alors que l'os cortical des diaphyses ne consolide qu'en 9 à 18 semaines [Lerat 2005].

Cependant, comme nous l'avons évoqué, cette consolidation ne peut avoir lieu que lorsque l'espace entre les parois osseuses est faible – de l'ordre de 1 cm à partir de chaque extrémité fracturée [Chiron 2013]. Or le traitement de certaines fractures et plus souvent de tumeurs, de kystes ou encore de foyers infectieux nécessite l'exérèse^[2] d'une partie de l'os de taille trop importante pour que le processus naturel d'auto-réparation puisse, à lui seul, induire une consolidation osseuse. Il est alors nécessaire de faire intervenir un matériau de comblement.

2 Les matériaux de comblement osseux

L'ingénierie ostéo-tissulaire consiste en la réparation de défauts osseux causés par des maladies, des traumatismes ou des défauts congénitaux. C'est un domaine qui s'est considérablement développé ces dernières années, en particulier à cause d'un vieillissement global d'une population mondiale qui ne cesse d'augmenter. La Figure 1.8 présente ainsi le nombre de greffes osseuses qui ont été réalisées aux Etats-Unis entre 1986 et 2004 : en 15 ans, elles ont été

² Ablation chirurgicale d'un tissu ou organe inutile ou nuisible à l'organisme ou d'un corps étranger.

multipliées par un facteur 8, avec 1,5 millions de greffes osseuses en 2004. Elles ont probablement encore augmenté ces dernières années. Cette problématique de société fait de l'ingénierie ostéotissulaire un domaine en pleine expansion.

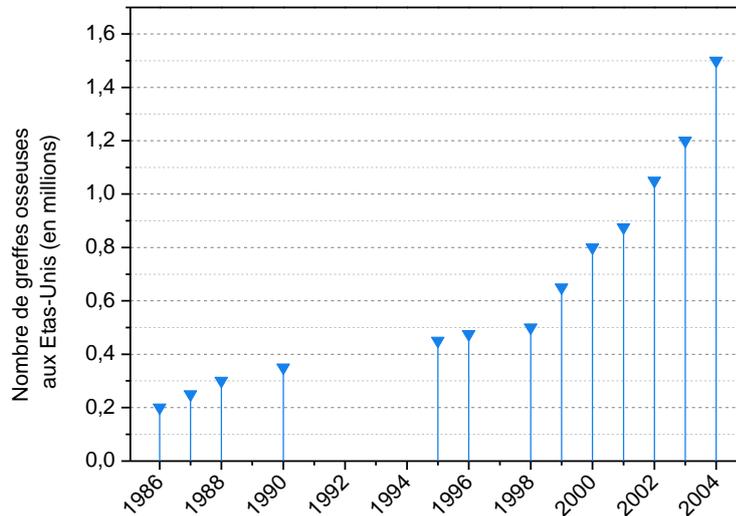


Figure 1.8 – Evolution du nombre de greffes osseuses réalisées aux Etats-Unis entre 1986 et 2004. Source : US Census Bureau, *Statistical Abstract of US 2001 & 2006, Health and Nutrition*.

Plusieurs types de matériaux peuvent être utilisés, à la condition *sine qua non* qu'ils soient *biocompatibles*, c'est-à-dire qu'ils soient bien tolérés par le corps et qu'ils ne provoquent pas de réaction de rejet, de réaction toxique ni de lésion ou d'effet nocif sur les fonctions biologiques de ce dernier. ^[3] Un *biomatériau* a ainsi été défini, selon la Société Européenne des Biomatériaux, comme un « matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle » (1986 et 1991, conférence de Chester (Royaume-Uni)). Il peut donc être considéré comme tout matériau utilisé pour remplacer une partie ou une fonction du corps de manière sûre et fiable, acceptable d'un point de vue économique et physiologique [Park 2007].

2.1 Substituts osseux d'origine naturelle

Les substituts osseux d'origine naturelle sont historiquement les premiers à avoir été développés. On compte parmi eux :

³ définition de l'Office québécois de la langue française, 1999

‣ l'*autogreffe* ou *greffe autologue*, correspondant à l'implantation d'os prélevé sur le même individu. Elle reste le *gold standard*, c'est-à-dire le matériau de référence dans le domaine des substituts osseux : tout risque de rejet est écarté, et elle possède d'autre part un potentiel ostéogénique^[4] et des propriétés mécaniques optimales. Pourtant elle est associée à des complications majeures – infections, hématomes, réopérations, douleurs prolongées durant 6 mois – dans 9 % des cas et à des complications mineures dans 18 % des cas [Younger 1989].

‣ l'*allogreffe*, alternative consistant à implanter de l'os provenant d'un individu différent, de la même espèce. Elle peut être issue de rebuts chirurgicaux (têtes fémorales, par exemple) ou prélevée post-mortem. Elle a de bonnes propriétés ostéoconductrices et ostéoinductrices mais un risque d'infection élevé [Zimmermann 2011].

‣ la *xéno greffe*, où le substitut osseux provient d'un individu d'une espèce différente – principalement le bœuf et le porc. Cependant, le risque théorique de transmission d'agents infectieux spécifiques aux espèces bovines ou porcines a considérablement limité son développement.

Notons que, outre les complications associées à ces implantations, des raisons sociales, éthiques ou religieuses peuvent également limiter leur utilisation.

Des matériaux d'origine naturelle ont également été commercialisés, notamment le *corail* ou la *nacre*. Cependant malgré leur potentiel ostéoconducteur et leur biocompatibilité, l'infime quantité disponible à l'échelle planétaire et des réactions indésirables ont limité le développement de ces matériaux.

2.2 Substituts osseux synthétiques

L'idée de remplacer un membre manquant n'est pas récente : les hommes auraient cherché à remplacer des dents perdues par des matériaux naturels comme l'ivoire ou le corail dès l'Antiquité [Barinov 2010]. Mais le développement de matériaux synthétiques comme matériaux de comblement est plus récent et a connu des avancées rapides au cours du XX^{ème} siècle.

2.2.a Stratégies et développement

La Figure 1.9 schématise les avancées dans le domaine des biomatériaux pour la réparation osseuse et les évolutions associées au concept de comblement osseux, affiné conjointement aux

⁴ capable de former du tissu osseux.

progrès scientifiques. La première génération de substituts osseux à avoir été développée correspond à des matériaux *bioinertes* qui avaient pour rôle principal de remplacer la fonction mécanique de l'os. Ce sont des prothèses métalliques, ou des céramiques comme l'alumine qui ont ainsi d'abord été utilisées. L'amélioration de la *biointégration* de l'implant a conduit à la deuxième génération de substituts osseux, dits *bioactifs*, car capables de former un lien fort avec le site receveur – ce qui est le cas de l'hydroxyapatite ou des bioverres par exemple. Mais aucun matériau n'égalant l'os lui-même, les recherches ont permis de développer une troisième génération de biomatériaux favorisant non seulement l'intégration, mais aussi la régénération osseuse. Cette génération est encore jeune et de nombreux défis restent à relever.

2.2.b Nature des substituts osseux synthétiques

Les substituts d'origine synthétique sont ainsi nombreux et sujets à de multiples recherches. Dans le domaine de l'ingénierie ostéo-tissulaire sont utilisés :

‣ les *métaux*, en raison de leur importante résistance mécanique. Ils sont surtout développés sous forme de prothèses, notamment pour l'orthopédie. Les principaux métaux utilisés sont le titane pur ou ses alliages, des alliages cobalt-chrome-molybdène, ou des aciers inoxydables.

‣ les *polymères*, en particulier le polyméthylméthacrylate (PMMA) développé comme ciment [Spadaro 1979; Alt 2004] ou encore du polyéthylène à haut poids moléculaire, dans les prothèses totales de hanche [Wang 2003]. Ces deux polymères sont hydrophobes et non biodégradables, mais présentent de relativement bonnes propriétés mécaniques. De nombreux autres polymères entrent également dans la formulation de matériaux composites.

‣ les *céramiques*, qui forment une alternative intéressante par la richesse de leurs compositions et de leurs formulations. Parmi elles on distingue quelques céramiques *bioinertes*, comme l'alumine ou la zircone, mais surtout des céramiques *bioactives* principalement à base de sels de calcium (phosphates, carbonates, sulfates, etc.). Elles peuvent se trouver sous différentes formes : granules, pièces massives denses ou poreuses, dépôts...

D'autres matériaux inorganiques non métalliques tels que les *bioverres* ou les *ciments minéraux* sont parfois affiliés à la famille des céramiques. Le rapprochement est ambigu puisqu'ils ne font pas intervenir les notions de frittage et de joints de grain généralement associées aux céramiques mais mobilisent pourtant des composés inorganiques similaires.

C'est ainsi sur cette catégorie des ciments qu'est basé le cœur de l'étude présentée dans ce manuscrit.

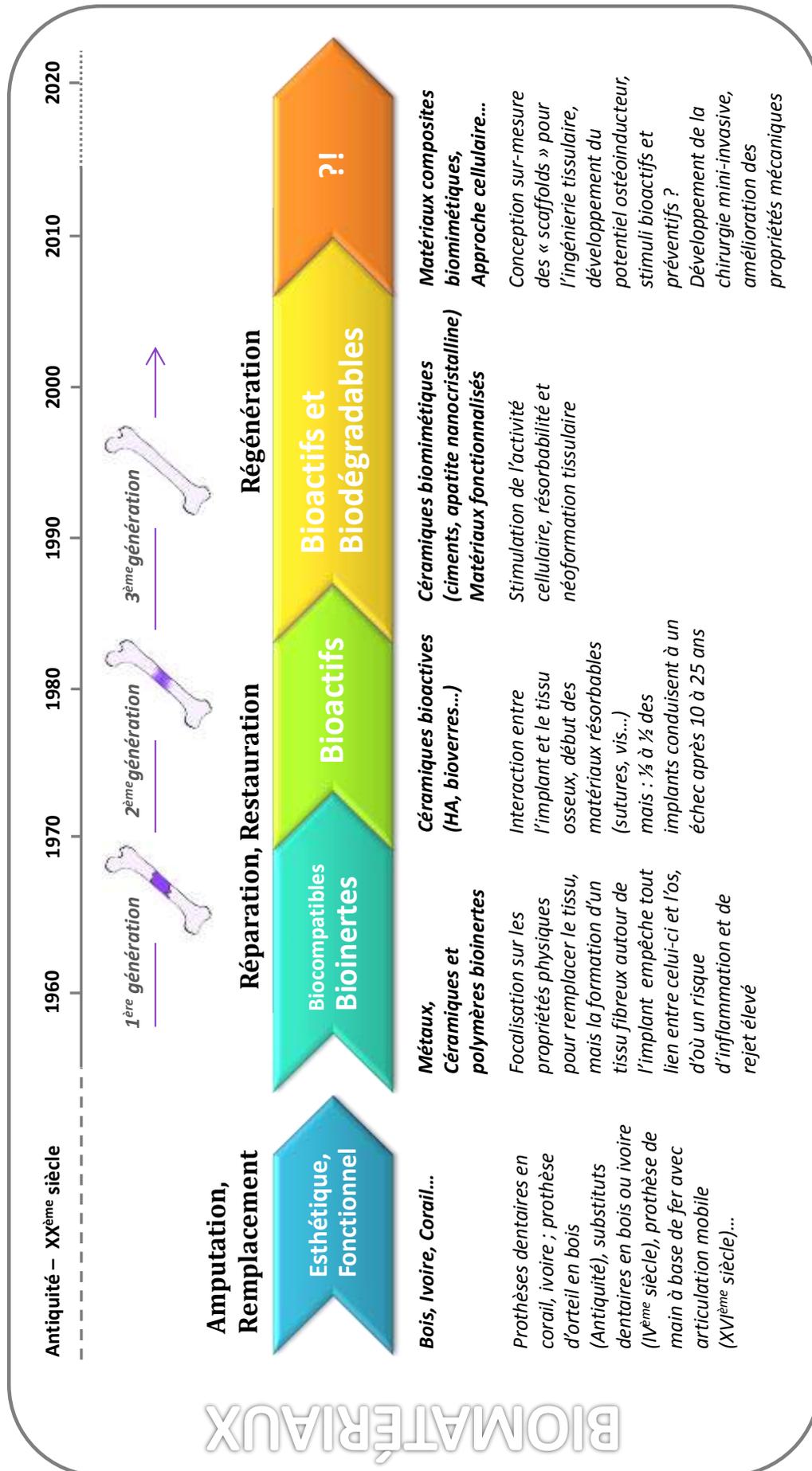


Figure 1.9 – Evolution des différentes générations de biomatériaux de comblement osseux, de leur nature, leurs rôles et leurs propriétés. Synthétisé à partir des données de la littérature [Hench 2002; Best 2008; Barinov 2010; Kolk 2012]

3 Ciments de comblement osseux

3.1 Qu'est-ce qu'un ciment ?

Le *ciment* est un matériau dynamique dont la maturation progressive se traduit par le passage d'une pâte relativement fluide à un état solide viscoélastique en l'espace de quelques minutes voire quelques heures. Ainsi, il a pour propriété essentielle de durcir une fois la phase solide – pulvérulente – gâchée avec de l'eau. La *réaction d'hydratation* est définie, pour des ciments utilisés comme liant hydraulique du béton, par « l'ensemble des changements qui se produisent quand un ciment anhydre, ou une de ses phases constitutives, est mélangé avec de l'eau » [Zreiki 2009]. A cette réaction d'hydratation est associée un *degré d'hydratation* ξ défini comme le rapport entre la quantité de ciment hydraté et la quantité initiale de ciment [Schindler 2004]. Notons que cette notion de réaction d'hydratation peut être ambiguë, si l'on étend la définition à d'autres ciments dont les réactifs peuvent déjà être hydratés.

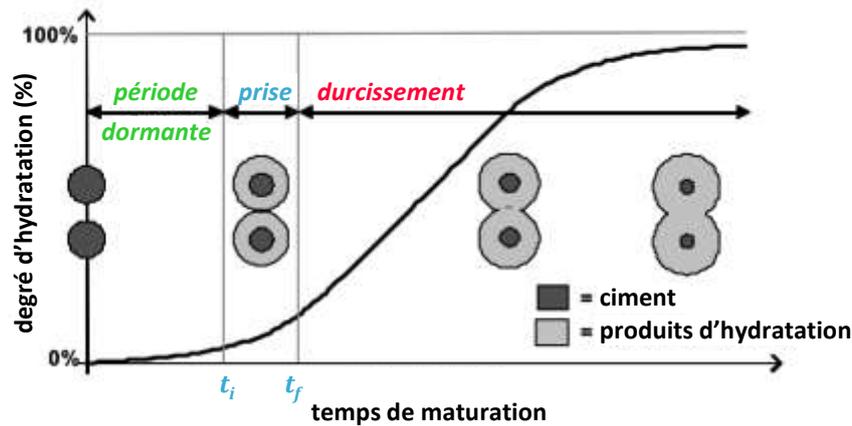


Figure 1.10 – Interprétation physique du développement du degré d'hydratation dans un ciment. Adapté de [Schindler 2004]

La courbe de la Figure 1.10 présente l'allure générale de l'évolution du degré d'hydratation d'un ciment pendant son temps de maturation, qui peut être modélisée par la fonction suivante :

$$\xi(t) = \xi_{max} \cdot \exp\left(-\left[\frac{\tau}{t}\right]^\beta\right) \quad (1.1)$$

avec $\xi(t)$ le degré d'hydratation au temps de maturation t , τ la constante de temps, β le facteur de forme et ξ_{max} la valeur maximale du degré d'hydratation [Schindler 2004]. La Figure 1.10 met d'autre part en évidence le sens physique de cette grandeur en schématisant la formation des produits

d'hydratation d'une part, et la réaction physique de prise d'autre part. Ainsi, trois phases se distinguent pendant le temps de maturation d'un ciment :

‣ Durant la *phase dormante*, la pâte de ciment semble physiquement ne pas évoluer et reste très malléable. Chimiquement, les particules réactives commencent à se dissoudre dans la phase liquide, avant que celle-ci n'ait atteint la saturation. La durée de cette période est donc variable d'une composition de ciment à l'autre, dépendant de la solubilité des particules réactives dans le système. ^[5]

‣ Une fois la saturation atteinte, on observe une brusque augmentation de la viscosité du ciment : c'est le début de la phase de *prise*. La précipitation du produit d'hydratation induit un raidissement de la pâte en créant une cohésion à la fois physique (particules imbriquées) et/ou chimique (précipitation en surface des particules réactives). Cette phase est caractérisée par un *temps de prise initial* t_i et un *temps de prise final* t_f . La fin de la prise est effective lorsque la pâte n'est plus déformable et devient un matériau rigide.

‣ La réaction chimique se poursuit ensuite dans une phase de *durcissement* et les propriétés mécaniques du ciment se renforcent.

La notion de réaction de prise peut ainsi présenter une certaine ambiguïté : nous distinguerons la *réaction physique de prise*, passage d'un état de pâte à un matériau présentant une certaine rigidité, de la *réaction chimique de prise*, correspondant au processus de dissolution des réactifs et précipitation du ou des produits, qui se poursuit bien après la prise physique.

3.2 Les ciments phosphocalciques

Le terme de *ciment* est associé dans la grande majorité des esprits à un ensemble de matériaux utilisés dans le secteur du bâtiment et des travaux publics. Pourtant une autre famille de ciments, mobilisant des volumes certes bien plus modestes, mais de haute valeur ajoutée, a été développée depuis plusieurs dizaines d'années pour trouver une place dans le marché des biomatériaux de comblement osseux. Cette famille se subdivise en deux catégories : les ciments acryliques et les ciments minéraux. C'est uniquement à ces derniers que nous nous intéresserons dans le cadre de cette étude. Précisons que la notion de « *ciment minéral* » est ici employée comme

⁵ Il a été noté dans la littérature que la cristallisation – à partir d'une solution – d'un composé sur un substrat étranger était généralement précédée d'une période d'induction qui dépendait du degré de sursaturation, de la température et de la présence d'impuretés [Koutsoukos 1981]. Cette remarque sur la croissance épitaxiale de phosphates de calcium en solution semble s'appliquer à une suspension dense de particules telle que celle de la pâte d'un ciment.

l'ensemble des ciments de comblement osseux dont le processus de prise est lié à une réaction entre des réactifs inorganiques – tels que les phosphates, carbonates ou sulfates de calcium par exemple –, elle n'exclut pas les *ciments composites* contenant d'éventuels additifs organiques.

Le premier ciment minéral utilisé en tant que substitut osseux est le plâtre de Paris, un *ciment de sulfate de calcium* CaSO_4 , dont la première utilisation a été proposée par Dreesmann en 1892 [cité par Lewis 2006]. Ils n'ont été ensuite développés que dans les années 1950 [Peltier 1957], ainsi que d'autres ciments à base de sulfate de calcium dihydraté. Néanmoins ces matériaux présentent un taux de résorption bien souvent très rapide comparé à la cinétique du remodelage osseux.

Les premiers *ciments phosphocalciques* (CPC) ont été introduits au début des années 1980 par Brown et Chow comme biomatériaux pour la réparation et la régénération osseuse [Brown 1983]. De nombreuses compositions ont depuis été développées, faisant intervenir, pour la plupart d'entre eux, un ou plusieurs phosphates de calcium. Citons notamment les phosphates dicalciques anhydre (monétite) ou dihydraté (brushite), les phosphates de calcium tricalciques α -TCP et β -TCP, ou le phosphate de calcium amorphe (ACP) (cf. Annexe 1.1).

Les compositions des ciments minéraux se sont rapidement diversifiées : quelques autres compositions « pures » ont été proposées, notamment des ciments de *carbonate de calcium* pour améliorer la résorption des matériaux [Fontaine 2001; Combes 2006b] ou encore de *phosphate de magnésium* pour le rôle de Mg^{2+} dans le métabolisme osseux [Mestres 2011] ; mais la plupart des ciments actuellement développés conservent un ou plusieurs phosphates de calcium dans leurs poudres réactives en les associant à d'autres composés, inorganiques ou organiques.

Ces ciments phosphocalciques sont usuellement classés en fonction du produit de la réaction de prise. Celui-ci peut être soit de la *brushite*, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, phosphate de calcium thermodynamiquement le plus stable à pH faible et qui se transformera ensuite en apatite après implantation *in vivo*, soit de *l'apatite*. Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux ciments apatitiques.

3.2.a Propriétés

Il est important de noter que l'apatite formée au cours de la prise n'est pas la même dans tous les ciments apatitiques et peut présenter des taux de cristallinité et de carbonatation variés, et une quantité plus ou moins importante de lacunes voire de substitutions des ions calcium ou

hydroxyle. Ces nuances ont un impact significatif sur des propriétés physico-chimiques telles que la solubilité des apatites et donc par extension sur son comportement in vivo.

Structure et composition : un matériau biomimétique

La première condition à respecter pour l'élaboration d'un substitut osseux est la biocompatibilité de celui-ci. Celle des CPCs repose sur l'analogie de composition et de structure entre la phase finale formée et le minéral osseux : ces produits ont ainsi montré une parfaite *biocompatibilité* et une excellente *ostéoconductivité* grâce à une composition que l'on peut qualifier de *biomimétique*.

Régénération osseuse

Cette similarité entre l'apatite formée et le tissu osseux offre la possibilité au matériau d'être remodelé par les processus classiques du remodelage osseux, comme décrit sur la Figure 1.11.

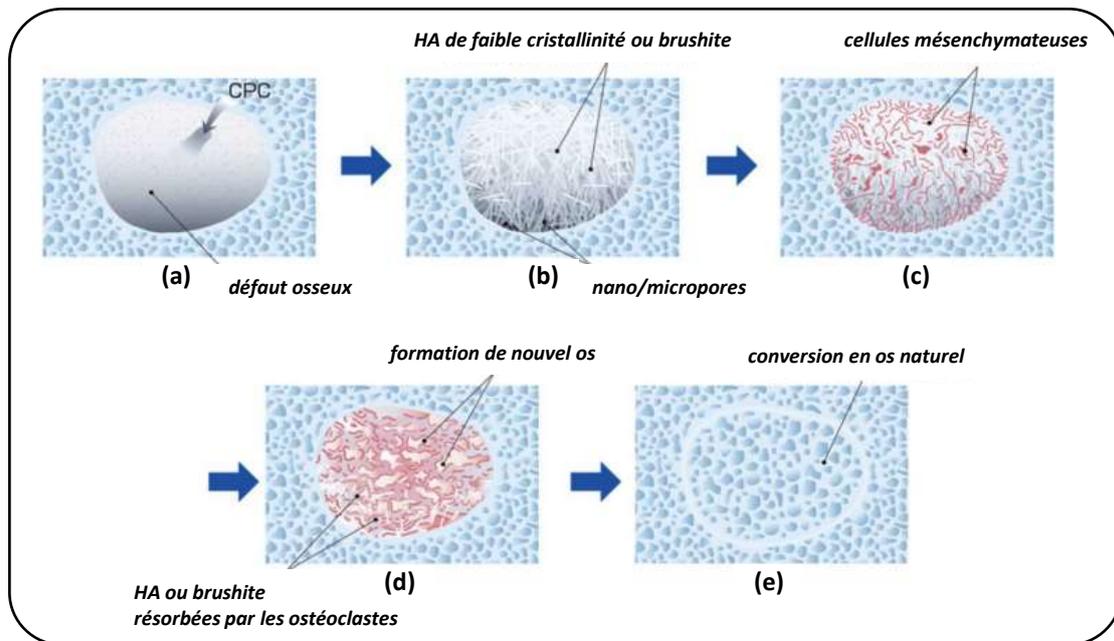


Figure 1.11 – Postulat du processus de régénération osseuse dans un défaut osseux comblé par un CPC : (a) comblement du défaut ; (b) formation d'une apatite nanocristalline directement (ciment apatitique) ou après hydrolyse de la brushite (ciment brushitique) ; (c) résidus de cellules mésenchymateuses à la surface du ciment ; (d) résorption de l'apatite mal cristallisée par les ostéoclastes et (e) régénération osseuse. Adapté de [Sugawara 2013].

Néanmoins, si l'apatite nanocristalline a montré une résorbabilité bien meilleure que l'hydroxyapatite, celle des ciments reste généralement lente, avec une biodégradation in vivo inférieure à la croissance de l'os néoformé. Une *meilleure résorbabilité* a ainsi été identifiée comme un des principaux défis à relever dans le domaine des ciments de comblement [Bohner 2010]. Plusieurs stratégies ont été étudiées pour améliorer cette résorbabilité, notamment en jouant sur

une architecture présentant une certaine macroporosité [Ginebra 2010], par l'addition par exemple d'un agent porogène [Félix Lanao 2011], ou encore en faisant intervenir une phase présentant une meilleure résorbabilité, telle que le sulfate de calcium [Thai 2010] ou un carbonate de calcium métastable [Combes 2006a].

Malléabilité de la pâte et injectabilité

Un intérêt majeur du ciment est de se présenter sous forme d'une pâte avant la réaction de prise, qui peut avoir lieu *in situ*, après implantation, à température et pH physiologiques. Cette forme malléable permet le remplissage de cavités osseuses dont la géométrie peut être complexe tout en assurant un contact optimal entre l'os et le substitut. Cela permet aussi, dans le cas de certains ciments, d'obtenir une formulation injectable et d'utiliser une technique chirurgicale mini-invasive voire percutanée qui permet d'alléger l'acte chirurgical et de limiter considérablement les risques d'infections post-opératoires.

Propriétés mécaniques

Une faiblesse des CPCs est leur caractère fragile et leur faible résistance mécanique en compression, et ce même au maximum de leurs propriétés après un certain temps de maturation et de durcissement. Cela limite donc leur utilisation à des sites osseux non – ou peu – porteurs [Neira 2010], à moins de les associer à un matériau complémentaire comme dans le cas des prothèses cimentées.

Association de principes actifs

Les ciments, une fois implantés, sont soumis à des conditions relativement douces de température (37 °C) et de pH (7,4 pour le plasma sanguin dans la mesure où il n'y a pas d'inflammation). En outre, la réaction de prise des CPCs est non exothermique. Cela fait donc de ces matériaux de bons candidats pour la libération de principes actifs [Ginebra 2012]. De nombreuses études ont ainsi déjà été menées sur l'introduction d'une grande variété d'agents actifs comme des antibiotiques [Joosten 2004; Hesaraki 2009], des anti-inflammatoires [Girod Fullana 2010], des médicaments anti-cancéreux [Tahara 2001], anti-ostéoporotiques [Panzavolta 2010] ou encore des facteurs de croissance [Ruhé 2004].

Le dopage des CPCs par des ions d'intérêt a également fait l'objet de plusieurs études. Citons notamment le strontium, en sa qualité de radio-opacifiant et pour son rôle sur les équilibres des activités des cellules ostéoblastes et ostéoclastes [Tadier 2012], rôle que joue également le zinc [Pina 2010] ou le magnésium [Wu 2008].

3.2.b Les ciments composites

Le terme de *composite* regroupe un large domaine de matériaux solides contenant au moins deux phases distinctes que ce soit à l'échelle macroscopique ou à l'échelle micrométrique voire nanométrique [Lakes 2000]. Dans le cas des ciments phosphocalciques, ce terme désigne dans la plupart des cas l'addition d'une phase organique à la matrice minérale du ciment. Cette charge organique peut être introduite :

- › dans la *phase liquide*, sous forme d'une solution [Cherng 1995; Chen 2011].
- › dans la *phase solide*, principalement sous forme de :
 - *microsphères* [Khairoun 2005; Habraken 2010; Girod Fullana 2010]
 - *fibres* ou *nanotubes* [Xu 2002; Chew 2011]
 - *poudre* [Wang 2006; Alves 2008]

Le caractère composite des CPCs a été développé dans le but d'améliorer plusieurs des propriétés évoquées précédemment, principalement la porosité, en introduisant des microsphères dans la matrice intrinsèquement microporeuse, ou encore les propriétés mécaniques.

Le cas particulier d'un polysaccharide, la carboxyméthylcellulose sera abordé plus en détail dans le chapitre 4.

3.2.c Applications cliniques des CPCs

Les pertes de substance osseuse peuvent avoir des origines très diverses, traumatiques, orthopédiques, tumorales, septiques ou congénitales.

Comme évoqué auparavant, les CPCs ont pour vocation le comblement de sites osseux peu porteurs. Ils sont ainsi largement utilisés en chirurgie cranio-faciale ou maxillo-faciale [Wolff 2004; Neira 2010].^[6]

On les retrouve également en chirurgie orthopédique dans des applications d'augmentation osseuse d'os longs – tibia [Horstmann 2003; Ooms 2003], fémur [Ooms 2004] –, en vertébroplastie ou cyphoplastie^[7] [Lewis 2006] ou encore pour le renforcement d'os ostéoporotiques ou la fixation d'implants métalliques dans des os fragilisés [Ginebra 2012].

⁶ bien qu'en chirurgie maxillo-faciale, pour des défauts souvent de petite taille, les chirurgiens préfèrent le remodelage naturel que l'implantation de matériaux souvent trop faiblement résorbables.

⁷ technique utilisée lors de l'écrasement d'un vertèbre, permettant d'abord de rétablir la hauteur et la position de la vertèbre endommagée avant comblement.

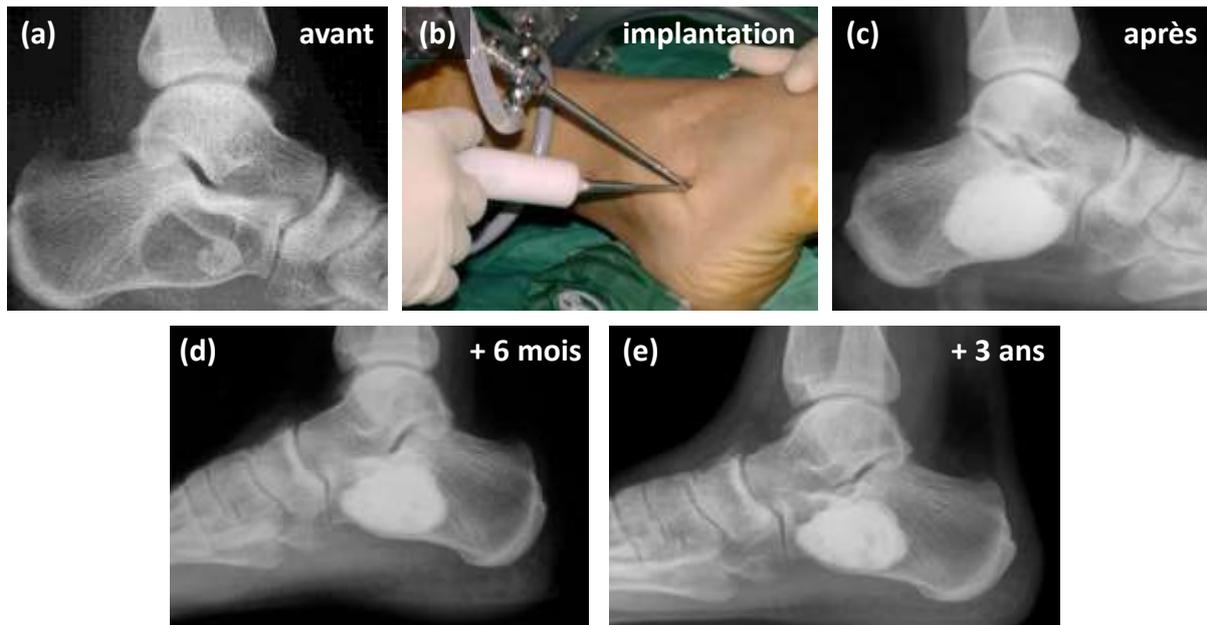


Figure 1.12 – Radiographies d'un défaut osseux traité avec un CPC, le ciment Eurobone® (a) avant et (c) après traitement ; (c) 6 mois et (d) 3 ans après l'intervention chirurgicale. La photo (b) montre l'intervention, avec un abord mini-invasif. D'après [Mainard 2010].

La Figure 1.12 présente l'exemple du traitement d'un défaut de l'os du talon, le calcaneum, par un CPC, Eurobone® (ciment brushitique, S = 98 % b-TCP + 2 % $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; L = eau, H_3PO_4 , H_2SO_4 [Bohner 2005b]), par une technique de chirurgie mini-invasive (Figure 1.12.b). Les radiographies post-traitement montrent un parfait comblement du défaut, de manière durable (Figure 1.12.c-e) et une résorption faible voire nulle du matériau, intègre, après 3 ans (Figure 1.12.e).

4 Risques infectieux et utilisation de l'argent

4.1 Risque infectieux en chirurgie orthopédique

Le risque infectieux est pris en considération depuis de nombreuses années par les chirurgiens orthopédistes, particulièrement depuis les années 1960 - 1970 où des progrès importants ont été mis en place grâce à l'amélioration des conditions d'hygiène dans les blocs opératoires, l'introduction de l'antibioprophylaxie^[8] ou, notamment, d'antibiotiques lors de l'implantation des prothèses totales de hanches cimentées [Winingar 1996; Migaud 2005].

Cependant, malgré les différentes précautions prises, il a été encore récemment relevé que « 7% des hospitalisations se compliquent par une infection nosocomiale, soit environ 750.000 cas sur

⁸ L'antibioprophylaxie correspond à un traitement antibiotique visant à prévenir (et non traiter) l'éventuelle survenue d'une infection post-opératoire. L'antibiotique est généralement administré par voie intraveineuse.

les 15 millions d'hospitalisations annuelles. Chaque année, ces infections seraient la cause directe de plus de 4000 décès »^[9] ce qui fait de cet état un problème de santé publique.

Une meilleure protection contre les infections post-opératoires a ainsi été identifiée comme un des défis les plus importants à relever dans le domaine des substituts osseux et en particulier des ciments phosphocalciques [Sugawara 2013].

4.2 Stratégies développées dans les ciments phosphocalciques

Différentes stratégies ont été employées dans le but de prévenir les infections bactériennes associées à l'implantation des CPCs [Ginebra 2012]. De nombreuses études ont été ainsi réalisées sur l'introduction de divers antibiotiques tels que la gentamicine [Joosten 2004], la céphalexine [Hesarakis 2009] ou la vancomycine [Sasaki 2005; Jiang 2010]. Cependant, si l'utilisation d'antibiotiques est bien acceptée dans le traitement d'infections spécifiques, elle reste controversée dans des applications préventives en raison de son coût et du risque d'une efficacité limitée due à la potentielle résistance des bactéries au médicament [Sugawara 2013]. L'utilisation d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [Serraj 2002; Michăilescu 2005], ou de phosphates de calcium substitués par des métaux alcalins [Gbureck 2005] ont également été proposés : la libération d'ions hydroxyle et la formation de produits très alcalins ont respectivement montré une activité antibactérienne. Néanmoins, l'utilisation de tels systèmes à caractère fortement basique posent la question de la cytocompatibilité et ne peuvent pas être transposés à l'ensemble des ciments minéraux, en particulier, a fortiori, les ciments présentant un pH relativement acide.

4.3 L'argent comme agent antibactérien

L'argent a été largement utilisé dans des dispositifs médicaux en tant qu'agent antimicrobien à large spectre d'efficacité, avec une faible toxicité [Lansdown 2010b]. Son effet antibactérien a en particulier été observé sur *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [Feng 2000], l'agent infectieux le plus fréquent lors d'implantations de prothèses [Berbari 1998]. Certains cas de résistance bactérienne à l'argent ont été relevés depuis la fin des années 1970 [Lansdown 2010a], néanmoins elles restent rares et ne concernent pas, à notre connaissance, les principales bactéries associées aux infections post-opératoires.

Parmi les biomatériaux développés, l'argent a été introduit par différentes voies dans des matrices apatitiques :

⁹ discours de Marisol Touraine, Ministre des Affaires sociales et de la Santé aux Etats Généraux des infections nosocomiales et de la sécurité du patient, le jeudi 14 février 2013.

› lors de la synthèse de l'apatite, par exemple : par co-précipitation d'un sel de calcium et de nitrate d'argent AgNO_3 avec un composé phosphaté [Kim 1998; Singh 2011; Vandecandelaere 2012] ou encore par élaboration en une seule étape de revêtements d'apatite dopée en argent [Chen 2006; Ando 2010]

› par une étape supplémentaire d'imprégnation de gels [Ghafari Nazari 2011] ou de revêtements [Shirkhanzadeh 1995; Lee 2013] d'hydroxyapatite dans une solution de AgNO_3 .

Si l'argent a fréquemment été introduit dans des ciments acryliques [Spadaro 1979; Alt 2004], seuls deux CPCs dopés à l'argent ont récemment été proposés [Ewald 2011]. Ces ciments apatitique et brushitique ont été préparés en utilisant un phosphate tricalcique dopé en argent comme réactif et ont montré une diminution significative de l'adhérence des souches *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) mais également une diminution de la cytocompatibilité des matériaux sur des cellules de la lignée ostéoblastique.

5 Objectifs de la thèse

Différents ciments de comblement osseux ont été développés commercialement depuis une vingtaine d'années et les recherches ont permis d'en faire des matériaux complets tant par leur facilité de mise en forme et d'implantation, que par leurs excellentes propriétés physico-chimiques par une composition biomimétique. Cependant des faiblesses ont pu être mises en évidence, particulièrement en termes de cohésion et d'injectabilité de la pâte et de résorbabilité.

Les objectifs de ce projet de thèse, réalisé dans le cadre du projet ANR BIOSINJECT, ont ainsi été l'élaboration d'un ciment apatitique composite, la caractérisation de ses propriétés et la compréhension des mécanismes impliqués dans sa réaction de prise.

L'ensemble des considérations nous ont donc amenés à considérer le cahier des charges, établi par un des partenaires industriel du projet, MedicalBiomat. Ce cahier des charges est présenté dans le Tableau 1.2 : il prend en compte les contraintes chirurgicales optimales en termes de préparation et d'utilisation de la pâte et de propriétés physico-chimiques et biologiques visées après implantation. Le but était donc l'élaboration d'un ciment injectable, présentant des propriétés antibactériennes pour la prévention des risques infectieux et une cinétique de résorbabilité – néoformation osseuse plus rapide que la majorité des ciments actuellement sur le marché.

Critères	Niveau d'appréciation
Temps de préparation	< 3 minutes
Temps de travail	4 à 10 min
Injectabilité	F < 120 N avec une aiguille de 18 G
Temps de prise	< 45 min
Volume de pâte	1 – 15 cm ³
Biocompatibilité	Selon ISO 10993-1. Quantité d'agent antibactérien non toxique pour les doses administrées.
Résistance mécanique en compression	> 10 ± 5 MPa
Résorbabilité	3 mois < temps de résorption < 1-2 ans
Ostéoconduction	Néoformation osseuse en moins de 3 mois. Pas d'interposition fibreuse à la surface du ciment à 3 mois.
Radio-opacité	visible à la radiographie pendant plus de 3 mois
Antibactérien	concentration active d'agent antibactérien (Ag)
Stérile	‡ SAL ^[10] < 10 ⁻⁶ ‡ stérilisable par rayons gamma
Agréments réglementaires	Chaque composant doit être conforme à la Pharmacopée Européenne ou à une norme ISO pour les produits implantables ou sinon avoir un recul clinique en tant que dispositif implantable et résorbable

Tableau 1.2 – Cahier des charges du ciment développé dans le cadre du projet BIOSINJECT

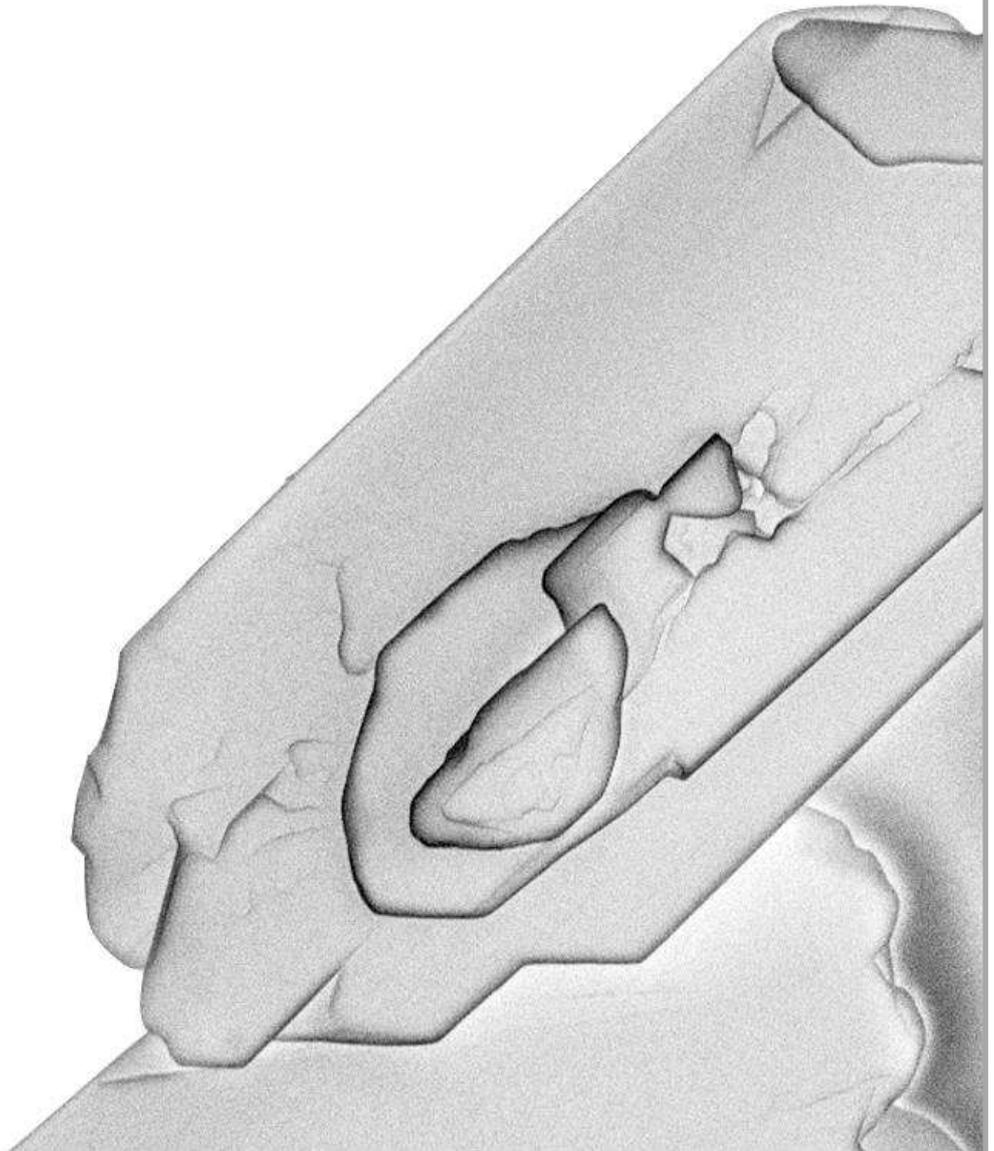
Une dimension économique, non reportée dans ce tableau, a bien sûr également été prise en compte, en termes de coûts des matières premières et de coûts de revient. Notons que dans ce manuscrit, nous ne traiterons pas de la radio-opacité du ciment, qui avait fait l'objet d'une étude préalable complète par introduction de carbonate de strontium [Tadier 2009].

Le ciment développé dans cette étude consiste ainsi en un système CaCO₃ – CaP, réalisé à partir d'un phosphate de calcium – la brushite – et d'un carbonate de calcium métastable – la vaterite –, base du ciment apatitique. Différents additifs tels que l'argent et/ou la carboxyméthylcellulose y ont ensuite été introduits afin de répondre aux spécifications présentées.

¹⁰ Le SAL est un niveau d'assurance de stérilité (*sterility assurance level*) : un SAL inférieur à 10⁻⁶ signifie qu'il n'y a qu'une chance sur un million pour que le matériau ne soit pas stérile.

Chapitre 2

Des poudres réactives au ciment de référence : synthèse, caractérisation et propriétés



La matrice minérale du ciment étudié est réalisée à partir de deux sels de calcium : un phosphate de calcium, la brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), et un carbonate de calcium, la vatérite (CaCO_3). Ces deux poudres en sont les réactifs de base : leur mélange avec de l'eau conduit par dissolution et reprecipitation à la formation d'une phase apatitique, analogue au minéral osseux. Cette réaction chimique est à l'origine de la prise du ciment, temps durant lequel la pâte se solidifie jusqu'à obtenir un matériau rigide, et se poursuit par une phase de durcissement jusqu'à ce que la réaction soit terminée, c'est-à-dire après que la totalité de la brushite ait été consommée.

Ce chapitre présentera, dans un premier temps, les synthèses des deux poudres réactives – brushite et vatérite – et leurs caractéristiques physico-chimiques. Nous nous attacherons ensuite à décrire l'élaboration du ciment $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$, établi comme ciment « de référence » dans le cadre de cette étude. Les résultats issus de différentes techniques d'analyses seront enfin discutés afin de décrire au mieux ce matériau et ses caractéristiques physico-chimiques majeures.

1 Poudres réactives : synthèse et caractérisation

1.1 Brushite : $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.1.a *Etat de l'art*

La brushite, également communément rencontrée dans la littérature sous l'abréviation DCPD (pour *dicalcium phosphate dihydrate*) et plus rarement en tant que CHPD (pour *calcium hydrogen phosphate dihydrate*) est un phosphate de calcium acide de formule $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Histoire

Découverte en 1865 par W. E. Brown et G. E. Moore dans du guano^[11] sur un cargo de Californie en provenance des îles des Caraïbes, son nom est choisi en hommage au minéralogiste G. J. Brush [Moore 1865]. Outre les dépôts de guano, elle se trouve à l'état naturel dans des grottes et des roches phosphatées [Fiore 1991; Anthony 2005].

¹¹ excréments d'oiseaux marins ou de chauve-souris

La brushite est désormais un composé largement utilisé à l'échelle industrielle que ce soit dans des engrais [Jones 1962], ou dans l'industrie alimentaire comme additif – E341ii ou E540 – que l'on retrouve dans les boissons gazeuses, les charcuteries ou encore le fromage pour ses propriétés acidifiantes.

Structure

La brushite cristallise dans un système monoclinique, de groupe d'espace non centrosymétrique $I_a (C_s^4)$ et de paramètres de maille $a = 5,812 \pm 0,002 \text{ \AA}$, $b = 15,180 \pm 0,003 \text{ \AA}$, $c = 6,239 \pm 0,002 \text{ \AA}$ et $\beta = 116^\circ 25' \pm 2'$ pour une population Z de 4 atomes par maille [Jones 1962; Curry 1971].

Sa structure est constituée de chaînes en zigzag de polyèdres CaO_8 reliées à un enchaînement similaire de tétraèdres PO_4^{3-} [Schofield 2004] créant des feuillets ondulés perpendiculaires à l'axe b (direction $\langle 010 \rangle$). Ces feuillets sont faiblement liés par des liaisons hydrogènes aux molécules d'eau de structure organisées elles-mêmes sous forme de double couches parallèles au plan (010) comme présenté sur la Figure 2.1 [Arsic 2004; Wang 2008].

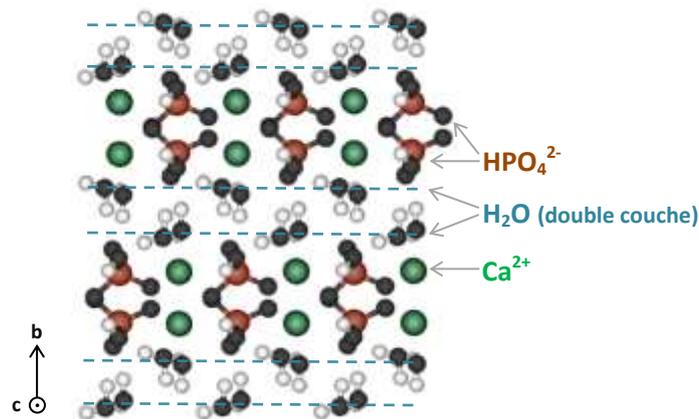


Figure 2.1 – Vue schématique de la projection de la structure de la brushite sur le plan (001). Adaptée de [Arsic 2004].

Rôle biologique et propension à la formation d'une phase apatitique

La brushite est un composé qui intervient dans différents processus biologiques du corps humain. Ainsi, sa cristallisation peut être à l'origine de calculs rénaux [Rajendran 2010], par exemple, ou de calcifications dans la pulpe dentaire [Elliott 1994]. Elle a d'autre part été proposée comme espèce intermédiaire dans la minéralisation de l'os, notamment comme précurseur spécifique de la formation d'hydroxyapatite (HA) et d'apatite déficiente en calcium [Francis 1971]. Cette hypothèse a depuis été discutée, car si la brushite a pu être souvent détectée lors de la cristallisation in vitro de

l'apatite, les études in vivo de la formation de l'os ont rarement mis en évidence sa présence [Johnsson 1992].

Sur deux de ses surfaces – parallèles aux plans (010) et (110) –, la brushite présente un réseau de calcium dont l'arrangement coïncide avec celui des surfaces correspondantes de l'hydroxyapatite, pouvant donc servir de base à une croissance épitaxiale de cette dernière (Figure 2.2). Les surfaces (010) des deux espèces, notamment, présentent la même densité de surface en ions calcium ($1 \text{ Ca} / 32,5 \text{ \AA}^2$) (Figure 2.2.a) [Francis 1971].

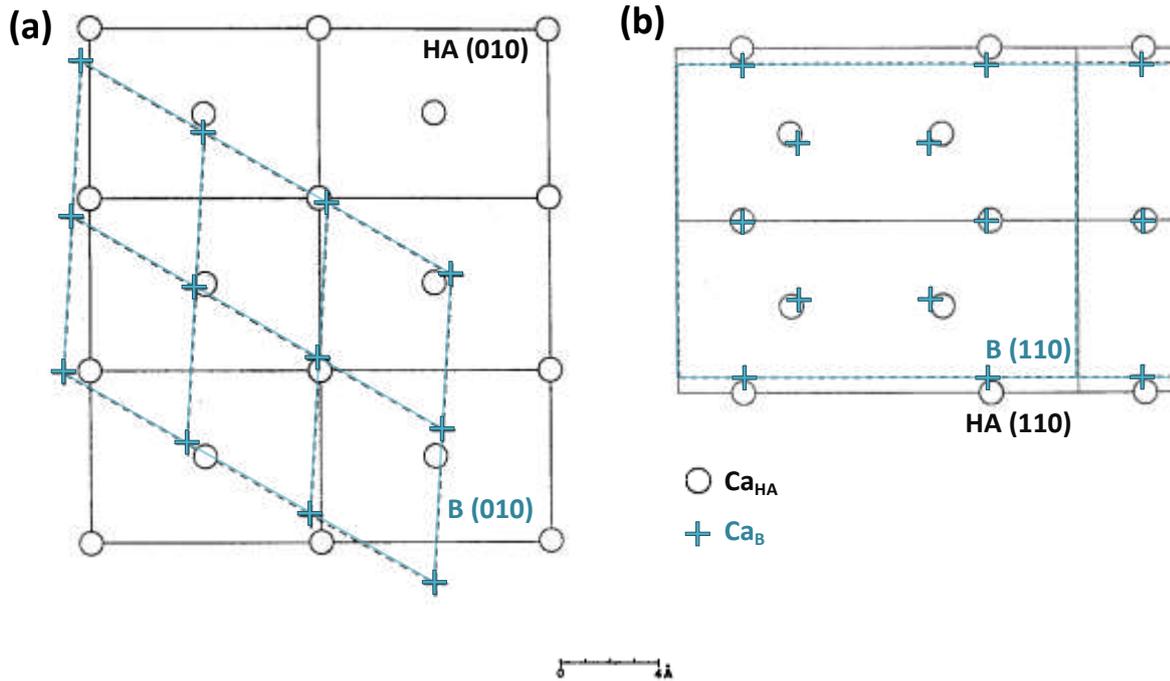


Figure 2.2 – Superposition des faces (a) (010) et (b) (110) de la brushite (B ; traits pointillés) et de l'hydroxyapatite (HA ; traits pleins) mettant en évidence la coïncidence géométrique des ions calcium des surfaces de ces deux phases (Ca_B et Ca_{HA} respectivement). Adapté de [Francis 1971].

La croissance cristalline d'hydroxyapatite en surface de la brushite a ainsi fait l'objet d'études in vitro. Koutsoukos et coll. ont montré qu'en se plaçant à faible sursaturation, de manière à favoriser la croissance plutôt que la précipitation spontanée, l'apatite cristallisait sans formation de phase précurseur. D'autre part, sa cinétique de croissance était la même que le substrat soit de la brushite ou de l'hydroxyapatite synthétique, suggérant un même mécanisme dans les deux cas. [Koutsoukos 1981]

Il est à noter que la brushite peut également se convertir en hydroxyapatite par hydrolyse, et ce en deux étapes : une première correspondant à un changement de structure (brushite → HA ; Ca/P < 1,67) et une seconde conduisant à une HA stœchiométrique par augmentation du rapport Ca/P. Monma et coll. ont noté qu'à 40°C – température proche de celle du corps humain – la

conversion de la brushite en HA ne pouvait se faire qu'à un pH compris entre 7 et 8,5 avec un optimum pour un pH \approx 7,5 - 8. Le rapport Ca/P de l'HA obtenue, compris entre 1,54 et 1,60, est d'autant plus grand que le pH et la température du milieu sont élevés, conditions favorisant le relargage des ions PO_4^{3-} de l'apatite en solution. Des ions Ca^{2+} ont été ajoutés au milieu de manière à accélérer l'augmentation du rapport Ca/P. Pourtant, en jouant probablement sur la dissolution de la brushite, ils ont conduit à un retard significatif dans la conversion de la brushite en apatite [Monma 1987].

Ainsi la brushite favorise la cristallisation d'apatite sur deux aspects : d'une part car sa structure permet une croissance épitaxiale d'une phase apatitique en sa surface dans un milieu contenant des ions calcium et phosphates, d'autre part, car sa solubilité relativement élevée en fait elle-même une source de ces ions.

1.1.b Synthèse

La brushite utilisée dans cette étude a été synthétisée par double décomposition à partir d'un mélange équimolaire aqueux de nitrate de calcium tétrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et de dihydrogénophosphate d'ammonium $\text{H}_2\text{PO}_4\text{NH}_4$, chacun de ces sels ayant été préalablement et séparément dissous dans de l'eau désionisée (Tableau 2.1). La solution de calcium est versée rapidement dans la solution de phosphate à laquelle ont été ajoutés au préalable 20 mL d'ammoniaque (NH_4OH ; 20 %). Juste après cette addition, le pH du milieu est ajusté par addition d'une quinzaine de millilitres supplémentaires d'ammoniaque de manière à être tamponné autour de 5,5. Le précipité blanc immédiatement formé est ensuite laissé à maturation, sans agitation, pendant 5 h puis filtré sur Büchner, lavé avec 2 litres d'eau désionisée et lyophilisé. Différents lots de brushite d'une soixantaine de grammes chacun ont ainsi été synthétisés. Notons que les différents lots ont été conservés au congélateur et ramenés à température ambiante avant toute utilisation.

	n_{sel} (mol)	m_{sel} (g)	V_{eau} (mL)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,37	86,67	600
$\text{H}_2\text{PO}_4\text{NH}_4$	0,37	42,21	1400

Tableau 2.1 – Réactifs engagés dans la synthèse de la brushite

1.1.c Caractérisation

Différentes techniques complémentaires ont été utilisées pour caractériser les poudres réactives et les ciments, le principe de l'ensemble de ces techniques est présenté en annexe du manuscrit (cf. Annexe 2).

Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

Le diffractogramme présenté (Figure 2.3) est caractéristique des différents lots de brushite synthétisés. Il témoigne de la pureté des composés et de sa grande cristallinité. Il met également en évidence une orientation préférentielle des cristaux perpendiculaire à l'axe [010].

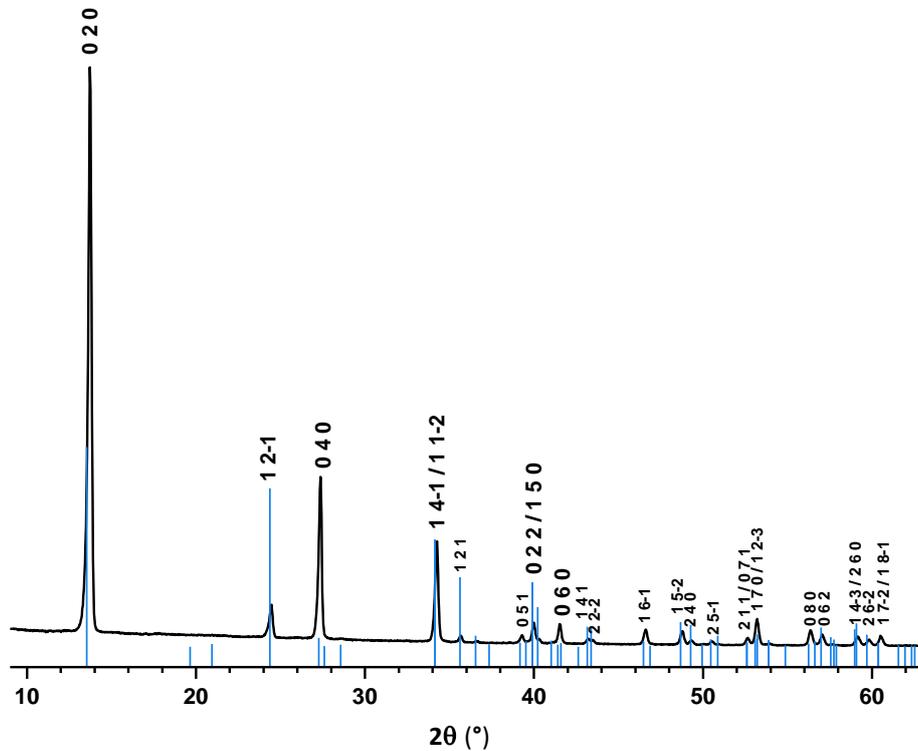


Figure 2.3 – Diffractogramme de RX de la brushite synthétisée (noir) comparé à une brushite de référence (bleu, fiche JCPDS 01-072-0713).

Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations par MEB (Figure 2.4) montrent une morphologie des cristaux de brushite en plaquettes, de quelques nanomètres à un ou deux micromètres d'épaisseur et de quelques dizaines de micromètres de long. La surface la plus importante correspond au plan (010), perpendiculaire à l'orientation préférentielle mise en évidence par DRX. Notons que cette surface correspond à l'une des deux présentant des similitudes structurales avec la surface (010) de l'apatite (cf. § 1.1.a) ce qui favoriserait, a priori, une croissance épitaxiale de cette dernière sur la brushite synthétisée.

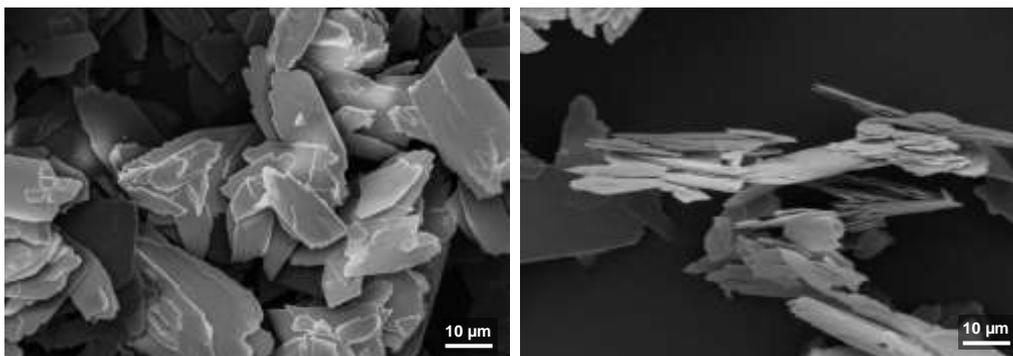


Figure 2.4 – Micrographies MEB de cristaux de brushite synthétisée

Analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La figure 2.5 présente le spectre FTIR caractéristique des lots de brushite synthétisés. Les différentes bandes de vibration caractéristiques des groupements HPO_4^{2-} et de l'eau de cristallisation de la brushite apparaissent, ainsi qu'elles sont reportées dans le Tableau 2.2 .

ν (cm^{-1})	I	Attribution des bandes	
3543	<i>i</i>		
3489	<i>i</i>	O-H	élongation
3280	<i>i</i>	(H_2O de structure)	
3166	<i>i</i>		
2930	<i>é</i>	(P)O-H	élongation
2380	<i>f</i>	P-O-H	harmoniques ou combinaisons des bandes à 1220 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} et 1059 cm^{-1}
2282	<i>tf</i>		
2130	<i>tf</i>		
1727	<i>f</i>	H_2O	combinaison de déformation et de rotation d'eau résiduelle
1650	<i>i</i>	H_2O de structure	déformation
1220	<i>i</i>	P-O-H	déformation dans le plan
1132	<i>i</i>		
1074	<i>é</i>	P-O	élongation
1059	<i>i</i>		
1004	<i>é</i>		
985	<i>i</i>		
874	<i>i</i>	P-O(H)	élongation
790	<i>i</i>	P-O-H	déformation hors du plan de P-(OH)
746	<i>é</i>	H_2O de structure	libration
661	<i>m</i>	H_2O de structure	libration
576	<i>m</i>	O-P-O(H)	déformation
524	<i>i</i>		

Tableau 2.2 – Bandes de vibrations caractéristiques de la brushite en spectroscopie FTIR [Petrov 1967; Tortet 1997; Trpkovska 1999] ; Intensité (I) – *i* : intense ; *m* : moyenne ; *f* : faible ; *tf* : très faible ; *é* : épaulement.

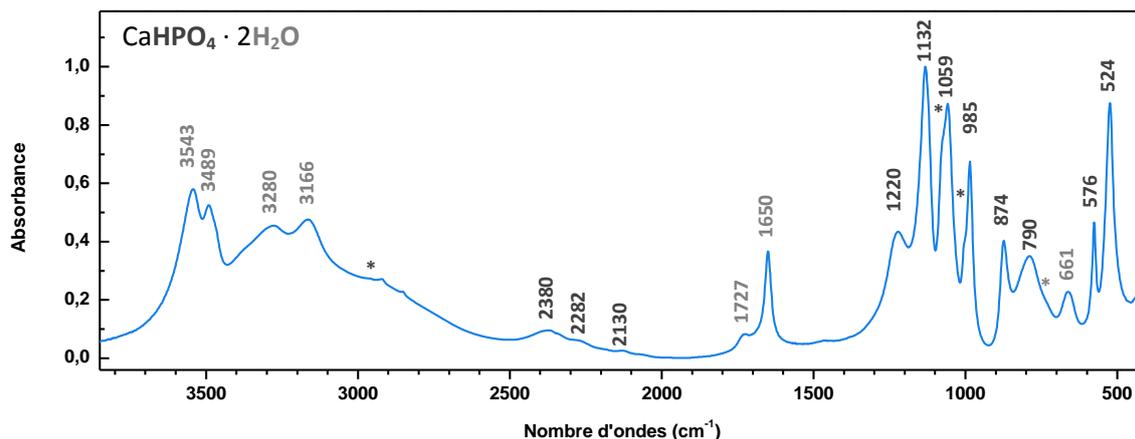


Figure 2.5 – Spectre FTIR de la brushite synthétisée. Les bandes assignées en gris foncé correspondent aux vibrations des groupements HPO_4^{2-} et en gris clair à celles de l'eau. Les épaulements sont indiqués par des astérisques. (cf. Tableau 2.2)

Analyses par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide

Différentes analyses par spectroscopie RMN ont été réalisées lors d'un séjour d'un mois à l'université de Varsovie, dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Waław Kołodziejki.^[12]

La Figure 2.6.a présente le spectre de la brushite obtenu par RMN ^{31}P par la technique de rotation à l'angle magique (MAS). Il consiste en un signal à 1,7 ppm entouré de deux paires de bandes de rotation d'intensité plus faible. Cette réponse est en accord avec les données de la littérature où le signal ^{31}P de la brushite est reporté de 1,3 ppm à $1,7 \pm 0,3$ ppm [Rothwell 1980; Pourpoint 2008; Legrand 2009].

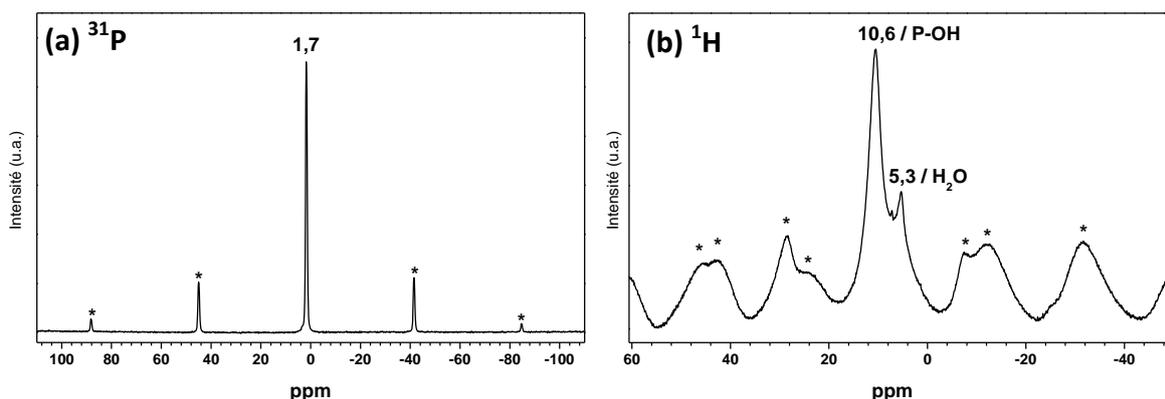


Figure 2.6 – Spectres RMN MAS des noyaux (a) ^{31}P (BD) et (b) ^1H de la brushite synthétisée. Les bandes de rotation sont indiquées par des astérisques.

¹² Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa (Varsovie, Pologne)

Le spectre obtenu par RMN ^1H (Figure 2.6.b) montre les réponses de deux types de protons : ceux des groupements HPO_4^{2-} à 10,6 ppm et ceux de l'eau de structure autour de 5,3 ppm. En théorie, les quatre protons des deux H_2O structurels de la brushite ne sont pas équivalents et devraient être à l'origine de quatre signaux distincts à 6,9 ppm, 6,0 ppm, 4,6 ppm et 3,5 ppm. Cependant, des conditions particulièrement favorables^[13] n'ont permis d'en distinguer que deux bandes relativement larges à 6,5 ppm et 4,0 ppm [Pourpoint 2008]. La moindre résolution du spectre, dans notre cas, explique l'unique large bande à 5,3 ppm, dont le déplacement correspond à la moyenne des déplacements théoriques ou expérimentaux présentés par Pourpoint et collaborateurs.

1.2 Vatérite

La vatérite, sujet de multiples études depuis maintenant presque une centaine d'années, garde une part de mystère pour la communauté scientifique. Cette partie s'attache à présenter une revue bibliographique des connaissances acquises sur ce carbonate de calcium et ses principales caractéristiques. La voie de synthèse utilisée et l'incidence de certains paramètres de synthèse sur ses propriétés seront ensuite développées. Les résultats de sa caractérisation par différentes techniques d'analyses physico-chimiques – notamment la RMN du solide – seront enfin discutés au regard de la littérature et des interrogations qui subsistent autour de sa structure.

1.2.a *Etat de l'art*

Le carbonate de calcium se trouve à l'état naturel sous six formes différentes : trois composés cristallins anhydres, la calcite, l'aragonite et la vatérite ; deux formes hydratées, la monohydrocalcite ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et l'ikaite ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ; et une forme CaCO_3 amorphe (ACC). Des trois polymorphes cristallins anhydres, la vatérite est le moins stable thermodynamiquement et le plus soluble.

Histoire

Initialement dénommée « Vater's Third Modification » par Linck en 1903 suite à sa découverte par Heinrich Vater à la fin du XIX^{ème} siècle [Friedman 1994], l'abréviation « vatérite » a été introduite pour la première fois par Meigen en 1911 et est restée dans la littérature, bien qu'à l'époque elle n'eût pas encore été identifiée dans la nature et que sa voie de synthèse eût été mal définie [Gibson 1925]. C'est en mettant en évidence un diagramme de DRX bien distinct de ceux de la

¹³ 17,6 T / 33 kHz

calcite et de l'aragonite que Rinne et Heide ont effectivement établi en 1924 que les agrégats sphérulitiques de CaCO_3 – associés à tort ou à raison aux préparations similaires décrites par Vater en 1893 – constituaient un polymorphe de carbonate de calcium. C'est Gibson et coll., en 1925, qui ont fait le lien entre ce matériau sphérulitique et la forme vatérite ou $\mu\text{-CaCO}_3$ initialement décrite [McConnell 1959].

Occurrence de la vatérite naturelle

La vatérite est un produit de biominéralisation relativement abondant, formé par de nombreux organismes vivants comme composants de leur endo- ou exosquelette, dans des systèmes où la structure est stabilisée par certaines biomolécules [Falini 1998; Hasse 2000; Mann 2001]. Elle a notamment été identifiée dans des spicules^[14] d'animaux marins (Figure 2.7.a) [Mann 2001], dans la coquille d'œufs d'oiseaux – le guira cantara et l'ani à bec lisse – (Figure 2.7.b) [Board 1979], sur la palourde asiatique – *corbicula fluminea* – [Spann 2010; Frenzel 2012] ou encore dans des perles de culture [Qiao 2006; Wehrmeister 2011].

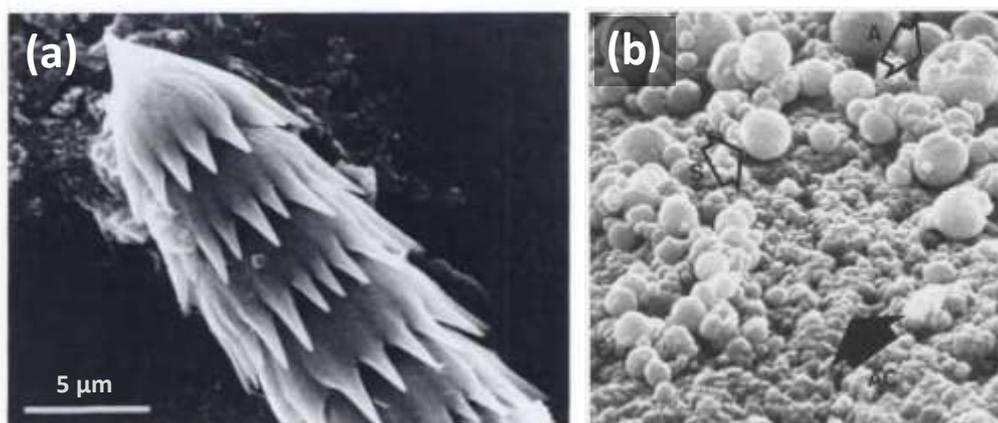


Figure 2.7 – Exemples de vatérite observée à l'état naturel : (a) spicules d'ascidies : concrétion de vatérite [Mann 2001] ; (b) sphérules présentes sur la tranche d'une tâche blanche sur un œuf de guira cantara [Board 1979].

Cependant, elle est rarement présente dans des systèmes géologiques minéraux étant donnée son instabilité dans la plupart des environnements naturels connus [Giralt 2001]. En effet, à température ambiante voire plus élevée, en milieu plus ou moins humide, elle a tendance à recristalliser en calcite ou en aragonite [Yamaguchi 1981; Sawada 1997]. Néanmoins, si elle était initialement présumée avoir un temps de vie très court, la vatérite a été observée dans des endroits aussi variés qu'un hydrogel de silicate de calcium carbonaté en Irlande [McConnell 1959], différents puits de pétrole [Friedman 1994], des zones de métamorphisme^[15] de contact en Israël (*the Mottled*

¹⁴ Aiguillon siliceux ou calcaire constitutif du squelette de certains invertébrés marins ou d'eau douce.

¹⁵ Transformation d'une roche à l'état solide du fait d'une élévation de température et/ou de pression, avec cristallisation de nouveaux minéraux, dits néoformés, et acquisition de textures et structures particulières, sous

Zone) [Kolodny 1974], le lac Issyk-Kul au Kirghizistan [Giralt 2001], l'arctique canadien [Grasby 2003] ou encore des météorites [DuFresne 1962; Vecht 2000] voire des poussières interstellaires [Day 2013], tout ceci suggérant une possible stabilisation de la vatérite dans des conditions particulières. Notamment, sa précipitation dépendrait fortement des conditions de sursaturation, et des structures et espèces déjà présentes dans le milieu [McConnell 1959].

La formation de vatérite a enfin été détectée dans des matériaux synthétiques tels que le ciment Portland, comme produit d'hydratation [Stepkowska 2005].

Structure cristalline

En dépit de son abondance dans ces systèmes naturels ou biologiques, la structure de la vatérite n'est pas encore élucidée et est sujette à débat dans la communauté scientifique. Les différents modèles qui ont été proposés sont présentés dans le Tableau 2.3 de manière chronologique. La première structure de la vatérite est communément attribuée à Meyer, en 1959 [Medeiros 2007; Wang 2009]. Pourtant, dès 1924, Heide publiait des résultats qui lui avaient été communiqués par Olshausen, sur une structure de symétrie hexagonale de paramètres de maille $a = 4,120 \text{ \AA}$ et $c = 8,556 \text{ \AA}$ très proches de ceux proposés ultérieurement [Heide 1924]. Une biréfringence positive du matériau a conduit à la conclusion que les groupements carbonates plans étaient orientés de manière parallèle à l'axe c [McConnell 1959]. Les années 60 ont vu ainsi émerger les trois principaux modèles sur lesquels les études ultérieures se sont appuyées : un système orthorhombique de groupe d'espace Pbnm [Meyer 1959] (Figure 2.8.a), puis deux systèmes hexagonaux de groupe d'espace $P6_3/mmc$ présentant des symétries des sites CO_3^{2-} différentes et introduisant un certain désordre dans l'orientation des carbonates [Kamhi 1963; Meyer 1969] (Figure 2.8.b & c). Néanmoins aucune structure n'a fait l'unanimité, des incohérences subsistant lors de leur confrontation à des résultats expérimentaux : malgré un certain désordre, les carbonates ne seraient pas orientés de manière totalement aléatoire et l'organisation à moyenne ou longue distance était délicate à déterminer.

l'influence de conditions physiques et/ou chimiques différentes de celles ayant présidé à la formation de la roche originelle.

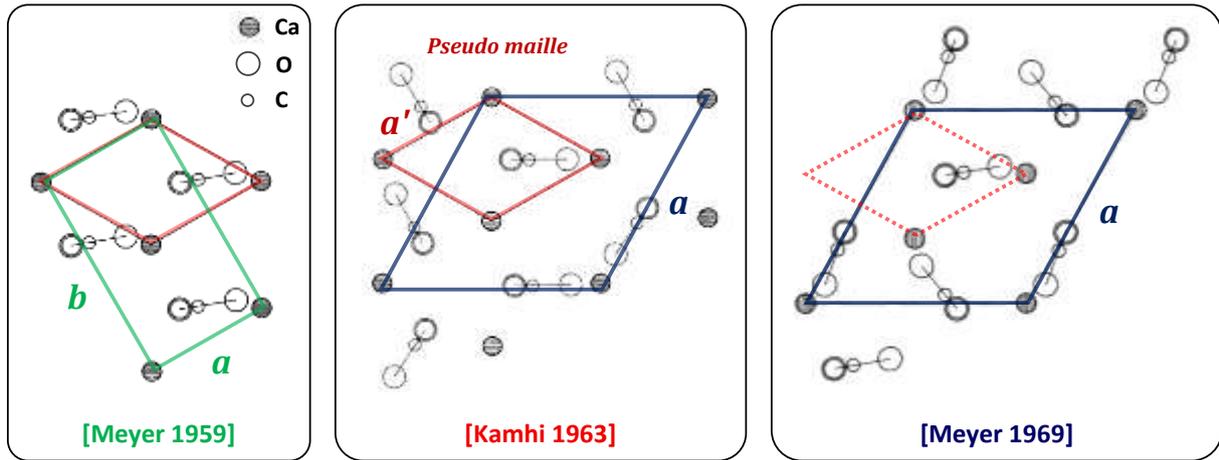


Figure 2.8 – Représentation schématique de la projection de la maille cristalline – dans le plan (001) si l’on considère la structure hexagonale – des premières structures proposées pour la vaterite : [Meyer 1959], [Kamhi 1963] et [Meyer 1969].

Peu d’études complémentaires ont été réalisées avant les années 90, où des techniques spectroscopiques sont venues apporter des éléments de discussion mais n’ont pas permis de conclure sur une structure particulière [Anderson 1996; Gabrielli 2000]. Ce n’est que depuis quelques années que de nouvelles études ont été menées, utilisant principalement des techniques de simulations dynamiques et de calculs *ab initio*. La Figure 2.9 présente les dernières hypothèses qui ont été proposées. Il est apparu dans un premier temps que la structure de la vaterite présenterait une certaine organisation à plus grande échelle que celle de la maille [Wang 2009; Mugnaioli 2012] et il semble, d’après de récentes études, que la vaterite pourrait présenter différentes structures accessibles à température ambiante [Demichelis 2012; Wang 2012] ou consisterait en un pseudo-cristal contenant des nanodomains de structure différente de celle de la matrice [Kabalah-Amitai 2013]. L’étude la plus récente envisage même de considérer la vaterite non pas comme un unique composé mais comme une famille de composés de structures très proches – qui ne diffèrentaient que dans l’agencement de couches de carbonates de différentes orientations – dont la nature dépendrait des conditions de précipitation et de formation, notamment en milieu biologique [Demichelis 2013].

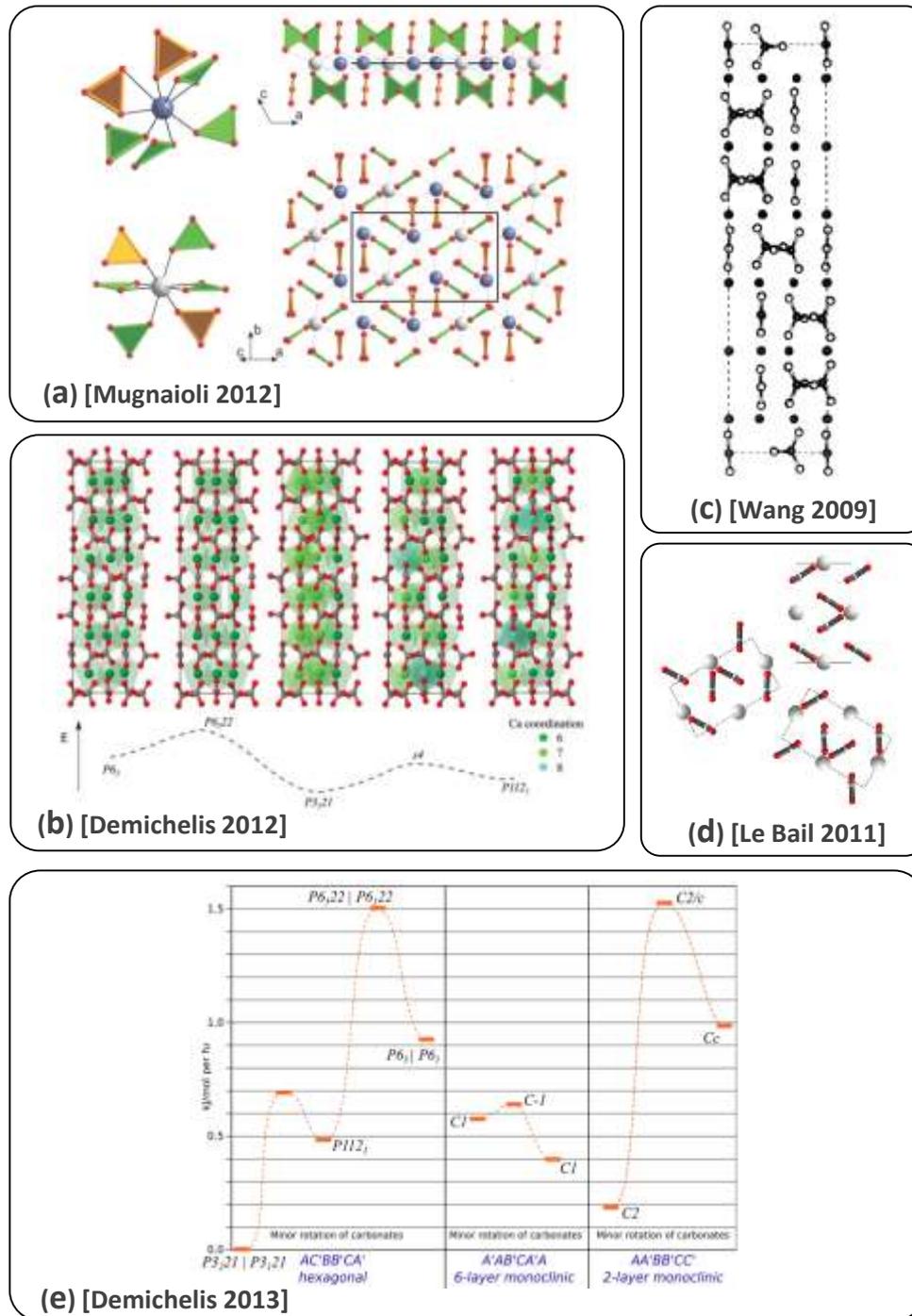


Figure 2.9 – Derniers modèles proposés pour la structure de la vaterite :

(a) Structure de la vaterite selon Mugnaioli et coll. présentant deux sites Ca^{2+} (bleu et blanc) et deux sites CO_3^{2-} distincts du point de vue de la cristallographie. [Mugnaioli 2012]

(b) Représentation graphique des structures hexagonales projetées sur le plan ac . Les ions calcium ont différents polyèdres de coordinations représentés par différentes teintes de vert. Le diagramme énergétique représente les différents états de symétrie accessibles à température ambiante. [Demichelis 2012]

(c) Superstructure de la vaterite L'orientation des carbonates montrent un certain ordre à moyenne distance. [Wang 2009]

(d) Symétrie pseudo-hexagonale par micromerite de domaines orthorhombiques pivotés de 120° . [Le Bail 2011]

(e) Proposition d'une variété de vaterites, présentant peu de différences structurales et énergétiques. [Demichelis 2013]

Référence bibliographique	Technique utilisée	Symétrie	Groupe d'espace	Paramètres de maille (Å)			Population	
				<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>		
[Heide 1924]	DRX (poudre)	Hex.	-	4,120	-	8,556	2	
Bunn 1945 *	analyse optique	Hex. ou Orthorh.	-	-	-	-	6	
		▶ Une biréfringence positive laisse penser que les plans de tous les groupements CO₃ sont verticaux , mais leur orientation par rapport aux deux autres axes est aléatoire .						
[Meyer 1959]	DRX (monocristaux)	Orthorh. (Pseudo Hex.)	Pbnm ou D_{2h}^{16}	4,13	7,15	8,48	4	
[Mcconnell 1959]	DRX (poudre) diffraction électronique	Hex.	-	7,135	-	8,524	6	
		pseudo-maille :			4,119	-	8,524	2
		▶ La pseudo-maille est en accord avec la maille définie par Olshausen en 1924. Néanmoins d'après les données de diffraction électronique la maille plus large semble être plus justifiée. La structure se rapproche de celle de la bastnäsite mais des données de diffraction électronique sur un matériau mieux cristallisé seraient nécessaires.						
[Kamhi 1963]	DRX (monocristaux)	Hex.	$P6_3/mmc$ ou D_{6h}^4	7,16	-	16,98	12	
		pseudo-maille :			4,13	-	8,49	2
		▶ désordre dans les CO₃²⁻ , en site C _{2v} . Un faible nombre de réflexions de la superstructure indique un l'existence d'un certain ordre à longue distance .						
[Meyer 1969]	DRX (monocristaux)	Hex.	$P6_3/mmc$ ou D_{6h}^4	7,151	-	16,94	12	
		▶ différente symétrie des sites CO ₃ ²⁻ par rapport à Kamhi 1963 : sites C _s						
[Sato 1969]	FTIR	▶ Même si la théorie ne permet pas de conclure, par comparaison avec d'autres structures, le spectre FTIR de la vatérite serait en accord avec une symétrie C _{2v} plutôt que C _s pour les carbonates, ce qui confirmerait la structure de Kamhi 1963 plutôt que celles de Meyer (1959 & 1969).						
Lippmann 1973 **	modèle à partir de YbBO ₃	Hex.	$P6_322$ ou D_6^6	7,15	-	8,47	6	
Behrens 1995 ***	Raman	▶ Le splitting des bandes ν_1 impliquerait deux symétries de sites distinctes pour CO ₃ ²⁻ , aucune des trois structures proposées ne conviendrait .						
[Anderson 1996]	Raman + théorie des groupes	▶ remise en cause du raisonnement de Behrens : le dédoublement de la bande ν_1 pourrait être compatible avec la structure de Kamhi 1963 ou de Lippmann 1973 , mais des données FTIR et l'assurance de la pureté du composé seraient nécessaires pour trancher. (pas d'analyse de Sato 1969)						
[Gabrielli 2000]	Raman	▶ remise en cause du raisonnement d'Anderson car la vatérite contenait de la calcite. La structure la plus plausible serait celle de Meyer 1969 .						
[Medeiros 2007]	calculs <i>ab initio</i> DFT	▶ reprise du modèle de Meyer 1959 , de symétrie orthorhombique : bonne corrélation mais les ions CO ₃ ²⁻ seraient inclinés de 67° par rapport au plan ac .						

[Bryce 2008]	RMN ^{43}Ca	<p>‣ étude de la corrélation entre les spectres RMN ^{43}Ca de la vaterite et différents modèles : l'hexagonal $\text{P6}_3/\text{mmc}$ de Kamhi 1963 et Meyer 1969, l'orthorhombique de Meyer 1959 et deux orthorhombiques de Medeiros 2007 optimisées par DFT. La correspondance n'est pas immédiate mais une structure hexagonale $\text{P6}_3/\text{mmc}$ semble être la plus cohérente avec les résultats expérimentaux.</p>					
[Wang 2009]	simulation de dynamique moléculaire, vérifiée avec la DRX	Hex.	P6_522 ou D_6^3	7,29	-	25,30	18
		<p>‣ La structure désordonnée obtenue est cohérente avec Kamhi 1963 : « pseudo-maille » dans laquelle les CO_3^{2-} sont orientés de manière aléatoire, parallèles à l'axe c, respectant un angle de 120° entre eux. Introduction de la notion d'une « super-maille » pour représenter un certain ordre à plus grande échelle de l'orientation des carbonates. L'ordre dépendrait de la voie de synthèse et de l'historique thermique de l'échantillon. (Figure 2.9.c)</p>					
[Jacob 2009]	Raman	<p>‣ bien que la structure hexagonale et le groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{mmc}$ soient communément utilisés dans la littérature, il semble qu'il y ait trois groupements CO_3^{2-} structurellement non équivalents. Une structure dont les couches de CO_3 seraient relativement ordonnées mais dont l'empilement abaisserait le degré de symétrie pourrait être envisagée.</p>					
[Wehrmeister 2011]	Raman	<p>‣ La similarité entre la structure de la vaterite et celle de la parisite suggère trois groupements CO_3^{2-} cristallographiquement indépendants.</p>					
[Le Bail 2011]	calculs <i>ab initio</i> , appliqués à la DRX	Orthorh.	Ama2	8,472	7,158	4,127	4
		<p>‣ considération de modèles de micromaclage ^[16] par mériédrie ou pseudo-mériédrie ^[17]. (Figure 2.9.d)</p> <p>‣ Le groupe d'espace Ama2 proposé est relativement similaire à celui de Meyer 1959. Néanmoins, des réflexions de la superstructure restent inexplicées. La caractérisation de la « super-maille » ne semble ainsi toujours pas évidente à mettre en œuvre.</p>					
[Mugnaioli 2012]	calculs <i>ab initio</i> , tomographie de diffraction, diffraction électronique	Monocl.	$\text{C2}/\text{c}$	12,17	7,12	9,47	12
				-	β $118,9^\circ$	-	
		Tricl.	$\text{C}\bar{1}$	12,17	7,12	25,32	36
				α $90,0^\circ$	β $99,2^\circ$	γ $90,0^\circ$	
<p>‣ Par rapport aux structures déjà proposées : déplacement des couches des groupements CO_3^{2-} le long de l'axe a détruisant la symétrie hexagonale. Mais un maclage par mériédrie possible avec cette structure suggérerait la symétrie hexagonale proposée précédemment. (Figure 2.9.a)</p> <p>‣ La structure comporte deux sites Ca^{2+} et deux sites CO_3^{2-} distincts du point de vue de la cristallographie.</p>							

^[16] Une *macle* est un assemblage géométrique très particulier de deux cristaux par l'intermédiaire d'un élément géométrique commun. Au lieu d'avoir deux cristaux en présence, ce qui est le cas généralement observé pour les échantillons minéralogiques, il est tout à fait possible que la macle se répète un très grand nombre de fois conduisant ainsi à une superposition de microcristaux constituant ce que l'on appelle un *micromaclage*. [Jeannin 1998]

^[17] Dans un cristal, la symétrie est subordonnée à la fois à celle de la molécule et à celle du système cristallin dans lequel elle se trouve pour former un cristal. Dans le cas de la *mériédrie*, le réseau n'a pas tous les éléments de symétrie de la molécule, mais seulement une partie.

[Demichelis 2012]	calculs <i>ab initio</i>	Hex.	P ₃ ₂ 21	7,12	-	25,32	18	
			P112 ₁	énergie de stabilisation par rapport à une configuration Pbnm : (en kJ.mol ⁻¹)				-2,94
			s4					-2,43
			P6 ₅					-2,35
			P6 ₅ 22					-2,07
		† Les modèles proposés précédemment (P6 ₅ 22, Pbnm, Ama2) correspondent à des états de transition, mais pas des minima énergétiques. Les cinq minima (ci-dessus) correspondent à des symétries non encore proposées dans la littérature, P₃₂21 étant ainsi le meilleur modèle pour une vatérite ordonnée . La structure réelle présente un désordre structural et qui pourrait s'expliquer par une interconversion entre ces cinq minima dans une gamme d'énergie accessible à température ambiante . (Figure 2.9.b)						
[Wang 2012]	simulation de dynamique moléculaire	Hex	P6 ₅ 22	† Transition ordre-désordre thermiquement activée à température ambiante . La réorganisation des carbonates serait issue d'un mouvement coopératif et non pas de réorientations individuelles.				
		Monocl.	C2/c					
[Kabalah-Amitai 2013]	Microscopie électronique en transmission (MET) haute résolution avec correction d'aberration	† La vatérite serait en composée d'au moins deux structures cristallographiques coexistant au sein d'un pseudo-cristal ; la structure principale serait hexagonale, la structure mineure existerait sous forme de nanodomains, de structure encore non déterminée. Il est probable que l'arrangement des ions calcium soit localement conservé dans les nanodomains et que seuls les carbonates diffèrent. Les deux structures seraient pivotées d'un angle de 30° l'une par rapport à l'autre.						
[Demichelis 2013]	calculs <i>ab initio</i>	Hex.	P ₃ ₂ 21 ou P ₃ ₁ 21	† chiralité des structures : existence d' énantiomères de vatérite ? † structures plus hautes en énergies que P ₃ ₂ 21 mais de densité plus proche des données expérimentales.				
		Monocl.	C $\bar{1}$, C1					
		Monocl.	C2					
		† Les deux modèles proposés indépendamment et presque simultanément par [Mugnaioli 2012] et [Demichelis 2012] correspondraient à des solutions différentes, parmi d'autres, l'ensemble pouvant coexister à température ambiante (Figure 2.9.e). Ces résultats valideraient d'autre part l'hypothèse que les différentes possibilités d'arrangement des couches seraient – outre la rotation des carbonates – une source de désordre. L'existence de différentes variétés de vatérite présentant peu de différences structurales et énergétiques pourrait être envisagée .						

Tableau 2.3 – Présentation chronologique des études sur la structure de la vatérite. Les cases grisées correspondent aux différents modèles proposés. Les abréviations *Hex.*, *Monocl.*, *Orthorh.* et *Tricl.* désignent les symétries hexagonales, monoclinique, orthorhombiques et tricliniques respectivement. Données issues de * [McConnell 1959] ; ** [Gabrielli 2000] et *** [Anderson 1996]

1.2.b Synthèse

Protocole

La vatérite a été synthétisée par double décomposition à partir d'un mélange équimolaire aqueux de chlorure de calcium dihydraté $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de carbonate de sodium décahydraté $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, chacun de ces sels ayant été préalablement et séparément dissous dans de l'eau désionisée (Tableau 2.4). L'addition de la solution de calcium (S-Ca) dans celle de carbonate (S- CO_3) est réalisée au moyen d'une pompe péristaltique avec un débit de $12 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, à température ambiante. Le précipité blanc formé est alors filtré sur Büchner dès la fin de l'addition, rincé avec 1,5 L d'eau désionisée puis lyophilisé. Une cinquantaine de grammes de poudre est alors obtenue et conservée ensuite au congélateur.

	n_{sel} (mol)	m_{sel} (g)	V_{eau} (mL)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,50	73,50	250
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,50	143,08	500

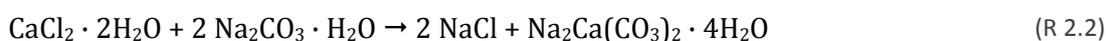
Tableau 2.4 – Réactifs engagés dans la synthèse de la vatérite

Une étude complémentaire sur l'influence du débit d'addition de la solution de calcium dans la solution de carbonates est présentée en annexe (Annexe 4).

Prise en masse

Nous avons pu observer que lors du mélange des deux solutions, la viscosité du milieu augmentait au fur et à mesure de la précipitation jusqu'à arriver à un état proche d'un gel gênant l'agitation et donc l'homogénéisation de la suspension à l'aide du barreau aimanté. Un tel phénomène de gélification a déjà été rapporté dans la littérature, notamment par Hunt, en 1866 : le mélange de solutions chlorure de calcium ($d = 1,15$) et de carbonate de soude ($d = 1,20$) dans un rapport volumique de 1:10 conduit à la formation d'un précipité gélatineux qui se transforme lentement en *gaylussite*, de formule $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – notée aussi $\text{Na}_2\text{Ca}(\text{CO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – généralement mélangée avec du carbonate de calcium [Hunt 1866]. Nous pouvons ainsi noter la similitude de protocole entre la synthèse de vatérite que nous avons utilisé (Tableau 2.4, (R 2.1)) et la synthèse de *gaylussite*, notamment celle adaptée de Dickens et coll. par Dheilly et coll. (Tableau 2.5, (R 2.2)) dont seules la stœchiométrie globale du système – ratio $\text{Ca}^{2+}/\text{CO}_3^{2-}$ de 1 et $\frac{1}{2}$ respectivement – et la concentration – nettement supérieure dans le cas de la *gaylussite* – varient [Dickens 1969; Dheilly 1997]. Or dans notre système où la solution de calcium est ajoutée progressivement à celle de carbonate, le rapport $\text{Ca}^{2+}/\text{CO}_3^{2-}$ reste inférieur à $\frac{1}{2}$ pendant la première

moitié de la synthèse. Hormis une sursaturation moindre, le début de la synthèse se rapproche donc d'un protocole permettant la synthèse de gaylussite. Il est donc possible que cette dernière soit une espèce intermédiaire dans la synthèse de la vatérite telle que décrite dans notre protocole et que la phase gélatineuse corresponde à une première organisation du milieu vers un composé de type $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{CaCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ avant de cristalliser en vatérite en concentrant le milieu en ions Ca^{2+} . Une observation de Dheilily et coll. tend à conforter cette hypothèse : le mélange de gaylussite et de calcite obtenu à l'issue de leur synthèse a tendance à évoluer vers un mélange de vatérite et de calcite lorsque le produit est lavé. Cela expliquerait également la difficulté à mettre en évidence une telle phase.



	n_{sel} (mol)	m_{sel} (g)	V_{eau} (mL)
CaCl₂ · 2H₂O	0,05	7,35	10
Na₂CO₃ · H₂O	0,10	12,4	50

Tableau 2.5 – Quantités de réactifs engagés dans la synthèse de la gaylussite [Dheilily 1997].

D'autres études ont été menées sur le rôle des phases métastables dans la précipitation de carbonate de calcium. Il apparaît que pour une sursaturation importante du milieu, ce qui est le cas dans la synthèse réalisée, une phase de CaCO_3 amorphe serait la première à se former avant toute cristallisation en calcite passant ou non par une phase de carbonate de calcium hexahydraté $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et par la vatérite selon les conditions de synthèse [Clarkson 1992]. La phase de transition pourrait ainsi également correspondre à un stade amorphe du carbonate de calcium.

1.2.c Caractérisation

Les différents lots de vatérite synthétisés ont été caractérisés par DRX, spectroscopie FTIR, MEB, granulométrie laser et analyse de la surface spécifique par la méthode BET (cf. Annexe 2.7). Une étude par RMN du solide a d'autre part été réalisée.

Analyses par DRX

L'analyse de la poudre obtenue par DRX a permis de vérifier la pureté et la cristallinité du composé. La Figure 2.10 présente le diffractogramme caractéristique obtenu. Les différentes raies ont été attribuées à la vatérite (fiche JCPDS 01-072-0506). D'autre part la calcite, impureté la plus

fréquente obtenue lors de la synthèse de la vatérite présente une raie intense à $34,26^\circ$ (fiche JCPDS 99-200-3764). L'absence de cette raie sur le diagramme de la Figure 2.10 atteste de la pureté de la vatérite synthétisée.

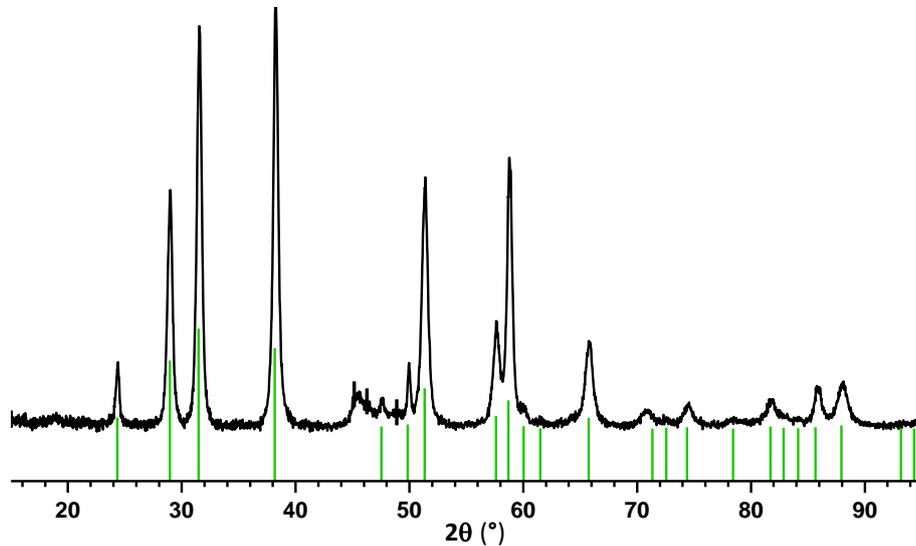


Figure 2.10 – Diffractogramme de RX de la vatérite synthétisée – Les raies vertes correspondent à la fiche JCPDS 01-072-0506. Les plans n'ont pas été indexés étant donné l'indétermination qui subsiste encore sur la structure de ce composé. (cf. §1.2.a) Les raies indiquées par des traits noirs correspondraient à des réflexions dans la supermaille [Le Bail 2011].

Observations par MEB

La vatérite synthétisée selon le protocole principalement utilisé (addition de S-Ca dans S-CO₃ à environ 12 mL.min⁻¹) présente des particules de morphologie en olive, de forme et de taille plutôt irrégulières, de 0,5 à 3 μm (Figure 2.11). Leur agglomération est relativement importante.

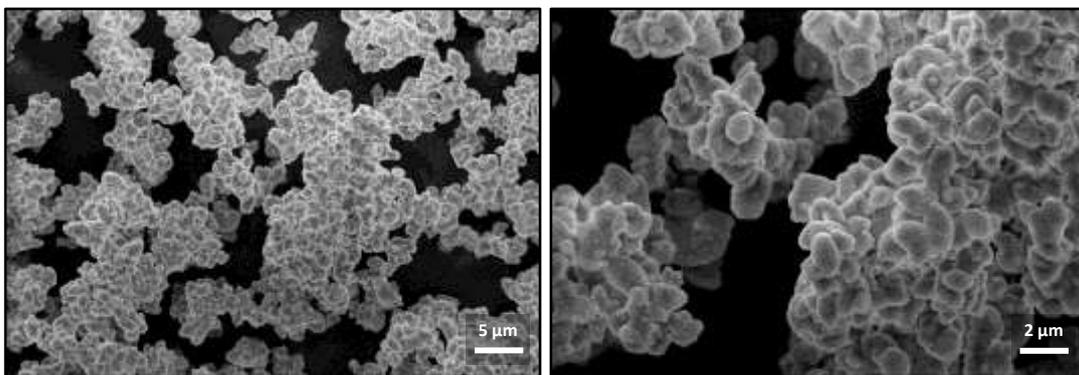


Figure 2.11 – Micrographies MEB de particules de vatérite synthétisée.

Analyses par spectroscopie FTIR

Le spectre FTIR de la Figure 2.12 présente les bandes caractéristiques de vibration de la vatérite, reportées dans le Tableau 2.6, que l’on retrouve dans la littérature, notamment étudiées par Andersen et coll. : la vibration ν_3 des carbonates entre 1400 et 1500 cm^{-1} , doublement dégénérée et les bandes ν_1 et ν_2 à 1088 cm^{-1} et 876 cm^{-1} respectivement. La vibration ν_4 apparaît nettement à 745 cm^{-1} . D’après les symétries – C_s , C_{2v} , C_2 ou C_1 [Wehrmeister 2011] – des différentes structures proposées pour la vatérite (cf. § 1.2.a) deux modes de cette bande ν_4 pourraient être actifs en spectroscopie infrarouge [Sato 1969]. Cette levée de dégénérescence pourrait être à l’origine de la bande d’intensité moindre à 675 cm^{-1} [Hollett 2000].

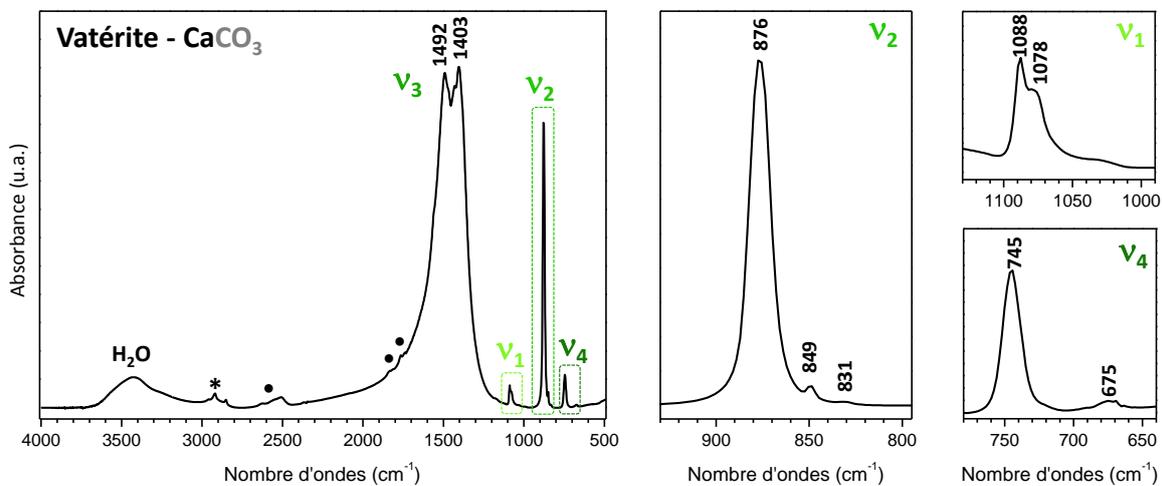


Figure 2.12 – Spectre FTIR de la vatérite synthétisée et agrandissement des bandes de vibration ν_1 , ν_2 et ν_4 des carbonates. (• : épaulements ; * : impuretés liées à la technique)

Nombre d’ondes (cm^{-1})	I	Attribution des bandes
3430	<i>m</i>	H ₂ O de surface
2626, 2548, 2508	<i>f ou é</i>	combinaisons $\nu_1 + \nu_3 \text{ CO}_3^{2-}$
1835, 1814, 1764, 1740	<i>é</i>	combinaisons $\nu_1 + \nu_4 \text{ CO}_3^{2-}$
1492	<i>i</i>	$\nu_3 \text{ CO}_3^{2-}$ élongations asymétriques C-O
1471	<i>é</i>	
1430	<i>é</i>	
1403	<i>i</i>	
1088	<i>m</i>	$\nu_1 \text{ CO}_3^{2-}$ élongations symétriques C-O
1078	<i>f</i>	
876	<i>i</i>	$\nu_2 \text{ CO}_3^{2-}$ déformation CO_3 hors du plan
849	<i>f</i>	
831	<i>tf</i>	
745	<i>m</i>	$\nu_4 \text{ CO}_3^{2-}$ déformation CO_3 dans le plan
675	<i>tf</i>	

Tableau 2.6 – Bandes de vibrations caractéristiques de la vatérite en spectroscopie FTIR [Andersen 1991; Hollett 2000] Intensité (I) – *i* : intense ; *m* : moyenne ; *f* : faible ; *tf* : très faible ; *é* : épaulement.

Une large bande dans la région $3000 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ témoigne enfin de la présence d'eau associée à ce composé. Nous avons donc réalisé une analyse thermogravimétrique (ATG) dans le but d'évaluer le degré d'interaction de cette eau avec la vatérite.

Analyse thermogravimétrique

Une analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée entre 20°C et 1000°C , avec une rampe de température de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (cf. Annexe 2.5). Sur la Figure 2.13.a, une première perte massique apparaît en dessous de 200°C , correspondant à l'évaporation de l'eau. Cette perte de $2,7\% \text{ m/m}$ est en accord avec les données de la littérature [Donnay 1967]. A 400°C , un pic exothermique témoigne de la recristallisation de la vatérite en calcite. Cette dernière se décompose enfin entre 600°C et 750°C par décarbonatation.

Si l'on s'intéresse plus particulièrement à la perte d'eau, agrandie sur la Figure 2.13.b, on s'aperçoit que la déshydratation se décompose en deux temps : une première perte d'eau dont l'évaporation a lieu en dessous de 100°C ($0,56\% \text{ m/m}$), et une deuxième dont le départ se fait entre 100°C et 200°C ($2,18\% \text{ m/m}$).

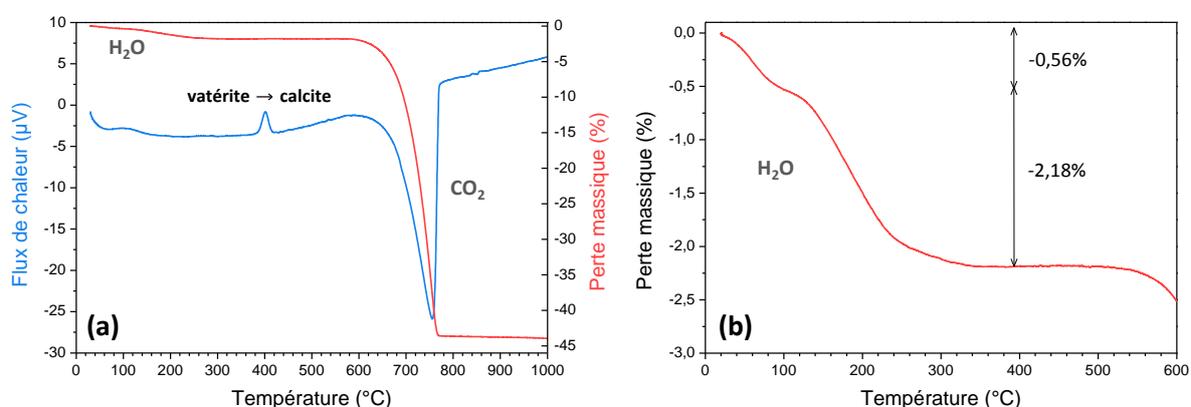


Figure 2.13 – Courbes d'analyse thermogravimétrique et analyse thermique différentielle de la vatérite (a) entre 20 et 1000°C et (b) entre 20°C et 600°C .

Il a été décrit dans la littérature que la vatérite cristallisait sous forme de sphérolite, un agrégat de fibres elles-mêmes constituées de petits cristaux séparés par un milieu interstitiel, de l'eau [Donnay 1967]. Cette eau pourrait être piégée et absorbée en raison de la précipitation rapide de la vatérite et de sa structure cristalline « ouverte » [Hollett 2000].

Analyses par spectroscopie RMN ^{13}C

Un lot de vatérite enrichi en carbone ^{13}C a été synthétisé et analysé par RMN du solide ^{13}C lors d'un séjour d'un mois effectué au département de Chimie Analytique et Inorganique de

l'Université de Médecine de Varsovie (cf. Annexe 2.4). La Figure 2.14.a en présente le spectre MAS. Contrairement aux autres carbonates de calcium – la calcite, l'aragonite ou le carbonate de calcium amorphe – qui présentent un unique signal en RMN ^{13}C [Nebel 2008], la vatérite présente deux signaux bien distincts à 170,4 ppm et 169,3 ppm. Ces résultats sont cohérents avec les déplacements donnés dans la littérature [Nebel 2008; Gebauer 2010]. Gebauer et coll. ont attribué ce doublet à deux carbonates d'orientation différente au sein de la structure : celle-ci n'est pas encore élucidée mais il y a un accord de la communauté scientifique sur un certain désordre dans l'orientation des ions carbonate (cf. §1.2.a ; Tableau 2.3). Nous pouvons noter que l'aire de ces deux bandes présente un ratio de 1,0 : 2,2 (Tableau 2.7), ce qui serait en accord avec une structure comme celle proposée par Mugnaioli et coll., de groupe d'espace C2/c présentant deux sites cristallographiques distincts pour CO_3^{2-} de ratio de 1 : 2 [Mugnaioli 2012].

En décomposant ce double signal (Figure 2.14.a et Tableau 2.7), il semble qu'il soit en réalité issu de trois bandes, la troisième – à 169,5 ppm – étant beaucoup plus large (FWHM = 210 ppm). Etant donné l'incertitude sur la structure de la vatérite, l'interprétation est délicate. Cependant, sur le spectre CP-MAS ^{13}C de la vatérite, en polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$, on retrouve une bande intense d'un déplacement chimique et d'une largeur à mi-hauteur similaires de 169,3 ppm et 208 ppm respectivement. Cette bande correspondrait donc à un signal issu de carbonates en proximité immédiate de protons, probablement d'eau. On observe d'autre part sur ce spectre que le doublet de bandes plus résolues à 170,4 ppm et 169,3 ppm a disparu et que deux bandes d'intensité plus faible sont apparues à 167,5 ppm et 166,5 ppm (Figure 2.14.b).

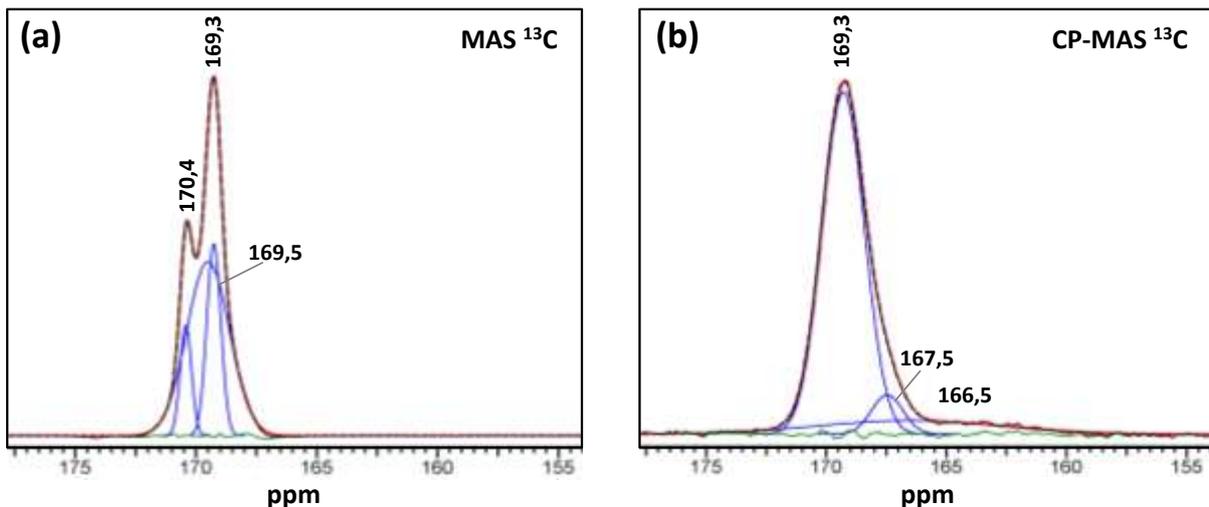


Figure 2.14 – Spectres RMN (a) MAS et (b) CP-MAS du noyau ^{13}C de la vatérite.

MAS ¹³ C			CP-MAS ¹³ C		
δ (ppm)	FWHM (ppm)	Aire (u.a.)	δ (ppm)	FWHM (ppm)	Aire (u.a.)
170,4	55,3	1,0	169,3	207,9	11,7
169,3	69,0	2,2	167,5	155,9	1,0
169,5	209,6	6,0	166,5	912,0	2,0

Tableau 2.7 – Bandes RMN de la vatérite issues de la décomposition des spectres de la Figure 2.14.

Le spectre CP-MAS témoigne de l'interaction importante entre l'eau et les carbonates de la vatérite. Cette réponse est notamment cohérente avec les deux pertes différentes observées par ATG (Figure 2.13).

La Figure 2.15 schématise ainsi une interprétation possible de la présence d'eau dans la vatérite :

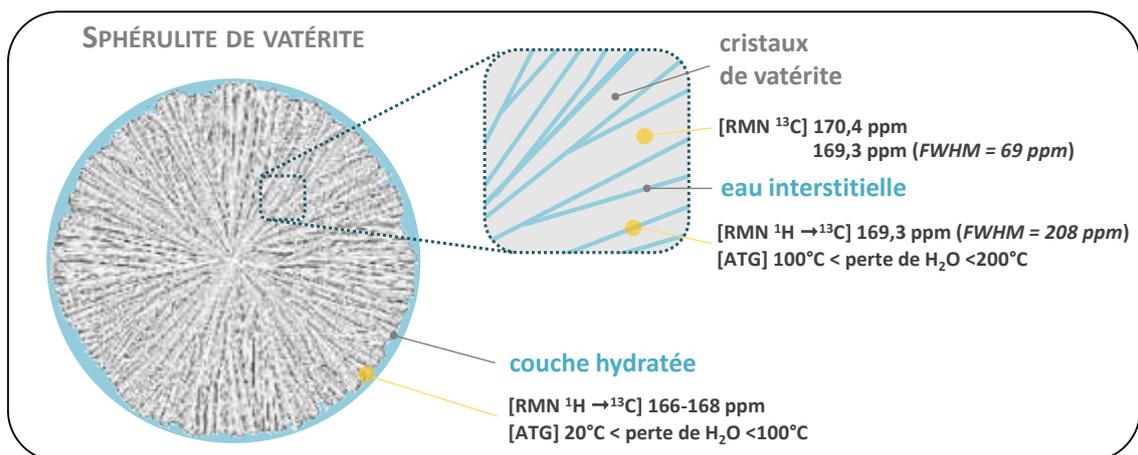


Figure 2.15 – Représentation schématique de la présence d'eau dans la vatérite : hypothèse d'une couche hydratée et d'eau interstitielle

Le premier départ d'eau à une température inférieure à 100°C pourrait être lié à une couche hydratée en surface des particules de vatérite. Les carbonates de surface, voire des ions bicarbonates HCO₃²⁻ au proton labile seraient alors à l'origine des bandes de faible intensité sur le spectre CP-MAS ¹³C, entre 166 et 168 ppm. Notons que s'il y a peu de données sur une éventuelle couche hydratée de la vatérite dans la littérature, elle a déjà été mise en évidence sur d'autres carbonates de calcium, notamment la calcite en environnement humide [Baltrusaitis 2009]. Il est d'autre part intéressant de noter que De Leeuw et coll. ont étudié l'adsorption d'eau sur la surface de la vatérite par une approche de modélisation atomistique et que celle-ci stabilise toutes les surfaces cristallographiques d'un point de vue énergétique [de Leeuw 1998].

Les bandes fines à 170,4 ppm et 169,3 ppm correspondent à des carbonates de la matrice sans interaction avec aucun proton. En revanche, celle à 169,3 ppm, plus large, pourrait être issue de groupements CO_3^{2-} au sein du cristal, mais à proximité d'eau piégée au sein des sphérulites. Plus intimement lié à la structure – physiquement, étant moins accessible ou chimiquement, par adsorption – elle s'évaporerait à une température plus élevée, entre 100°C et 200°C (Figure 2.13.b). Cela serait cohérent avec un milieu aqueux interstitiel mis en évidence par Donnay et coll. en étudiant les propriétés optiques de la vatérite [Donnay 1967].

2 Etude du ciment de référence

Le ciment dit « de référence » (C-REF) à partir duquel nous avons réalisé l'ensemble de cette étude a été présenté comme un matériau de comblement osseux prometteur et mis au point au sein du CIRIMAT en 2001 [Fontaine 2001; Combes 2006a; Combes 2006b]. Cette partie de l'étude s'attache à décrire l'élaboration du ciment, ses principales caractéristiques physico-chimiques et à étudier les mécanismes mis en jeu lors de sa prise. ^[18]

2.1 Elaboration d'un ciment

2.1.a Mise en œuvre expérimentale

Le processus d'élaboration du ciment de référence C-REF est schématisé sur la Figure 2.16. La *phase solide* (S) du ciment consiste en un mélange équimassique de brushite et de vatérite. Après *homogénéisation des poudres* dans un mortier, d'abord à la spatule puis plus finement au pilon – sans broyer les poudres – la *phase liquide* (L), de l'eau désionisée, est ajoutée de manière à respecter un rapport massique liquide/solide $L/S = 0,55$. Notons que le rapport L/S aura une influence sur les propriétés du ciment, notamment sa porosité, ses propriétés mécaniques et son temps de prise. Il a ici été choisi étant le minimum permettant la mise en forme d'une pâte cohésive. La mise en contact des deux phases (L et S) marque l'origine de temps (t_0). La pâte est *gâchée* manuellement pendant environ $1 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$; le temps de gâchage a été adapté en fonction de la

¹⁸ Notons que ses propriétés en termes d'injectabilité, de temps de prise (physique), de porosité et de propriétés mécaniques ne seront abordés que dans le chapitre 4.

quantité de pâte préparée et d'une évaluation visuelle de son homogénéité. Il est à noter que le ciment C-REF présente un comportement rhéofluidifiant^[19] où la pâte, au cours du gâchage, se travaille de plus en plus aisément et finit même par « suinter » et avoir un aspect « mouillé » en surface.

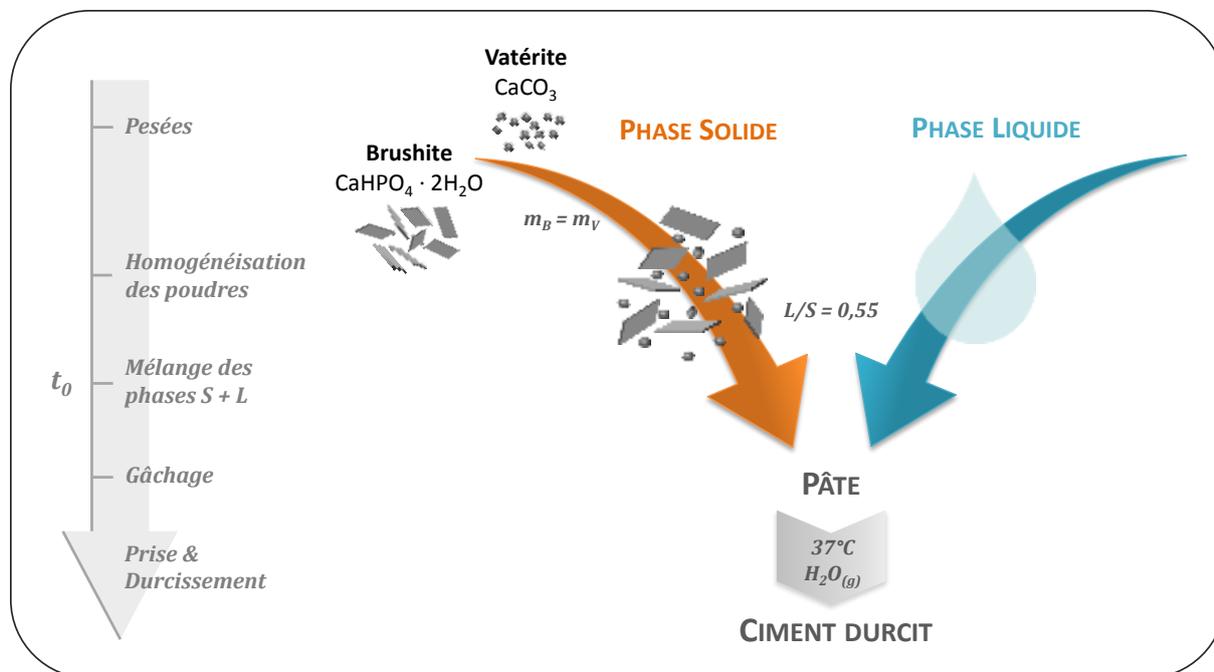


Figure 2.16 – Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans l'élaboration du ciment de référence C-REF.

Après gâchage, la pâte est mise en forme selon les besoins de l'essai à réaliser en prenant garde d'éliminer les éventuelles bulles d'air puis elle est placée dans un récipient fermé en *atmosphère saturée en eau* dans une étuve à 37°C – température corporelle moyenne du corps humain – le temps de la *prise* et du *durcissement du ciment*. Des échantillons de pâte d'une masse de l'ordre de 1 g ont été réalisés pour la plupart des essais.

2.1.b Validité d'un gâchage manuel

La question de la répétabilité d'un gâchage manuel peut se poser dans le cas de l'étude d'un système dynamique comme le ciment en particulier lors de sa mise en œuvre par le chirurgien impliquant de nombreuses sollicitations mécaniques (gâchage de la pâte, remplissage d'une seringue, extrusion de la pâte lors de l'implantation). Une étude rhéométrique a ainsi été réalisée par

¹⁹ Un fluide *rhéofluidifiant* est caractérisé par une viscosité qui diminue lorsque le taux de cisaillement augmente.

Nadia El Kissi au Laboratoire Rhéologie et Procédés de Grenoble ^[20] (partenaire du projet BIOSINJECT) à l'aide d'un rhéomètre rotatif plan-plan, mesurant le *module élastique* G' du ciment C-REF soumis à un cisaillement. Ce module G' est caractéristique de l'avancée de la prise physique du ciment, la viscosité du matériau augmentant alors et provoquant une réponse élastique plus importante.

Lors d'un essai réalisé à 25 °C, le ciment a été soumis à une déformation constante en cisaillement sous différentes fréquences de sollicitations. Dans un premier temps le cisaillement a été effectué sous une fréquence de 1 Hz (« zone 1 »), puis l'échantillon a été soumis à un balayage en fréquences allant de 0,1 Hz à 100 Hz (« zone 2 ») pour enfin être sollicité de nouveau à une fréquence constante de 1 Hz (« zone 3 »). Les résultats présentés Figure 2.17 montrent qu'à cisaillement constant, dans la zone 1, la cinétique de prise suit une loi monotone croissante. Lorsque l'échantillon est soumis au balayage en fréquence entre 0,1 et 100 Hz, la cinétique de prise est perturbée. On observe d'abord une augmentation du module en raison de la prise, puis une chute drastique de sa valeur pour une fréquence de l'ordre de 20 Hz, indiquant une déstructuration de l'échantillon qui peut affecter la prise du ciment. Cette zone de balayage en fréquence sous cisaillement est représentative de ce que subit la pâte lors d'un gâchage manuel, ou lors de la mise en place de la pâte dans une seringue et de son extrusion. Or, lorsque l'on impose à nouveau la fréquence initiale de cisaillement de 1 Hz, les résultats représentés en zone 3 montrent que la cinétique de prise reprend le cours qu'elle aurait eu sans l'épisode de déstructuration subi en zone 2, ce qui met en évidence le caractère réversible de cette déstructuration de la pâte. Il apparaît ainsi que le cisaillement auquel est soumis le matériau lors de sa préparation n'affecte pas sa cinétique de prise à long terme. La possible variabilité dans le gâchage et la mise en forme de la pâte peuvent donc être considérées comme ayant un impact limité sur les études qui s'en suivent.

²⁰ Laboratoire de Rhéologie et Procédés, 363 rue de la Chimie - Bâtiment B, Domaine Universitaire BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9

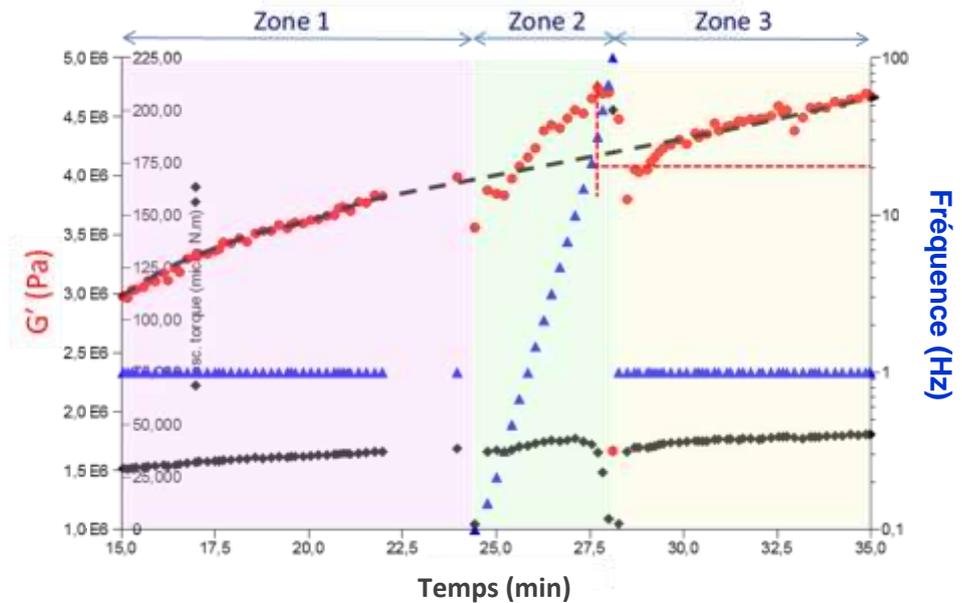


Figure 2.17 – Variation du module élastique G' de la pâte du ciment de référence (C-REF) en fonction du temps et de la fréquence du cisaillement auquel elle est soumise.

2.2 Caractérisation d'un ciment totalement pris

Cette partie de l'étude s'attache à caractériser l'état final du ciment après réaction totale de prise et d'en déterminer sa composition et sa structure.

2.2.a Analyse par diffraction des rayons X

Le diffractogramme de RX du ciment C-REF après réaction totale de prise présenté sur la Figure 2.18 montre la présence de deux phases : l'apatite et la vatérite. La brushite, réactif limitant d'un point de vue de la stœchiométrie en tant que source de phosphate, a été entièrement consommée pendant la réaction chimique de prise et n'apparaît donc pas sur le diagramme de C-REF. La phase apatitique formée est une apatite nanocristalline biomimétique (analogue au minéral osseux, cf. Figure 1.5), ayant un signal beaucoup plus proche de celui d'une apatite nanocristalline carbonatée maturée 48 h (Ap) que d'une hydroxyapatite stœchiométrique (HA). L'apatite formée présente néanmoins une cristallinité plus élevée avec des raies légèrement mieux résolues.

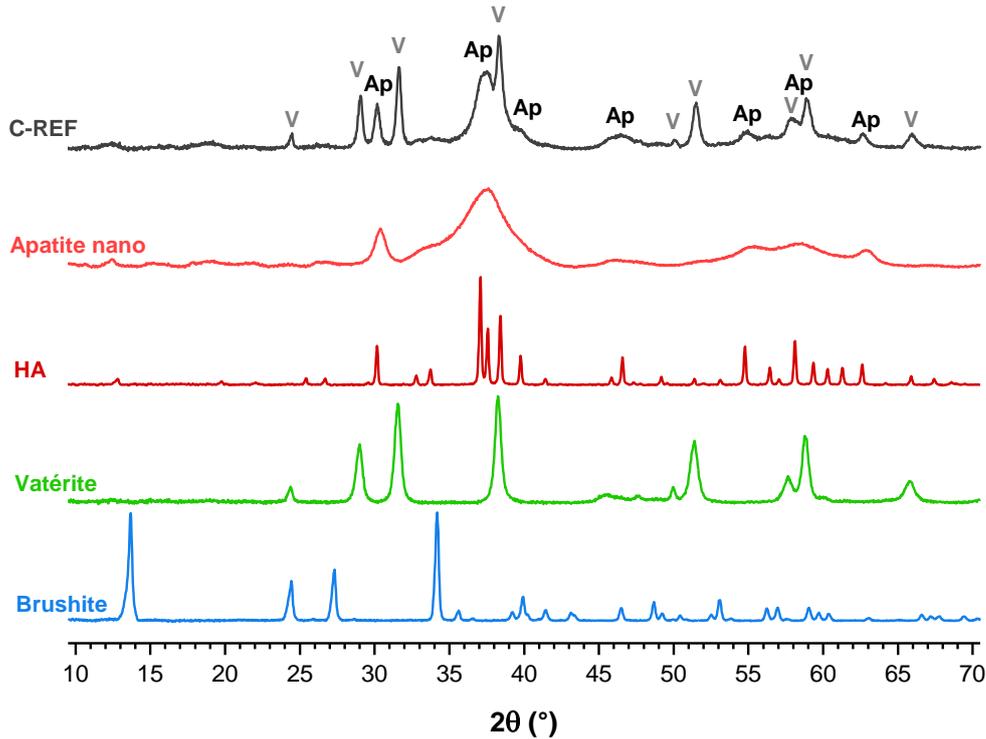


Figure 2.18 – Diffractogrammes de RX d'un ciment de référence (C-REF) totalement pris, de la brushite (B), de la vatérite (V), d'une hydroxyapatite stœchiométrique (HA) et d'une apatite nanocristalline carbonatée maturée 48 h (Ap).

2.2.b Observations par microscopie électronique à balayage

Les Figures 2.19 et 2.20 présentent différentes micrographies MEB de ciments C-REF, à un stade de réaction de prise avancé (24 h au moins).

La porosité du matériau est mise en évidence sur ces images à différentes échelles. Les Figures 2.19.a & b montrent des empreintes sphériques de quelques microns à quelques centaines de microns. Cette *porosité macrométrique* est due à un dégagement gazeux de CO_2 ^[21] au cours de la réaction. Il est ainsi très probable que ces empreintes sphériques, vestiges de bulles de CO_2 , soient créées à un stade assez précoce de la prise, lorsque la pâte du ciment présente encore une certaine malléabilité. Or l'apatite ne peut précipiter que dans le milieu aqueux, dense en particules solides, où la diffusion des ions est possible. Ces zones gazeuses ont donc été préservées de toute invasion de la phase apatitique.

Sur des agrandissements plus importants (Figure 2.19.b & c), il apparaît que le matériau présente également une *porosité micrométrique*.

²¹ mis en évidence par coulométrie, non présenté dans ce manuscrit.

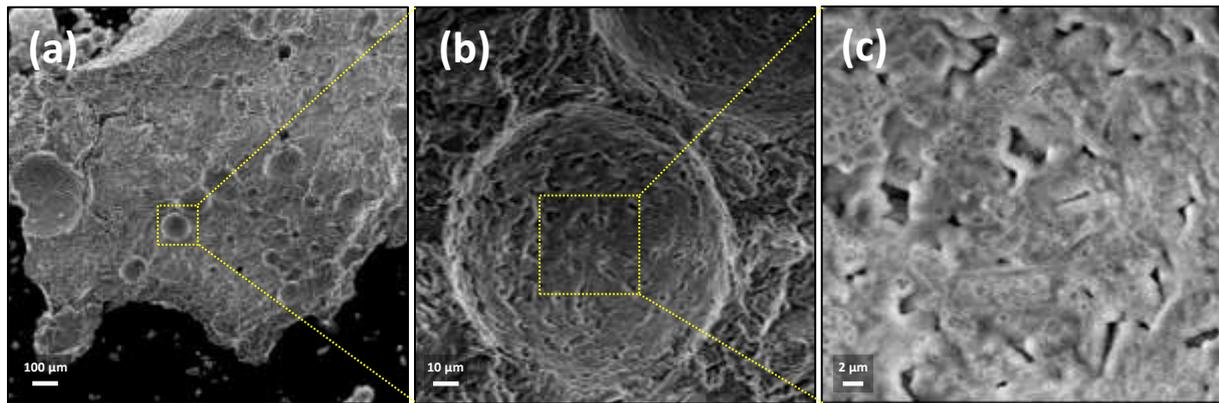


Figure 2.19 – Micrographies MEB d'un ciment C-REF après 24 h de maturation.

En fin de prise, peu de plaquettes de brushite sont encore présentes ; néanmoins quelques traces sont visibles à différents endroits du bloc (Figure 2.20.a & b). Empreintes négatives intactes des particules de brushite (crevasses de forme allongée), elles correspondent probablement à des plaquettes dissoutes après un certain temps de maturation de la pâte du ciment et une certaine rigidification du matériau. A certains endroits, l'apatite apparaît nettement sous forme de nanocristaux enchevêtrés (Figure 2.20.c & d). Une *porosité nanométrique* est ainsi également créée au cours de la prise, par le caractère nanocristallin intrinsèque du produit apatitique formé.

Nous avons établi, par une analyse de DRX notamment, qu'une quantité non négligeable de vaterite était toujours présente dans le matériau. Aucune particule de vaterite, sous sa forme présentée sur la Figure 2.11, n'a pourtant pu être mise en évidence sur les images MEB obtenues à partir des électrons secondaires. Cependant, sur l'image de la Figure 2.20.f réalisée à partir des électrons rétrodiffusés, des « noyaux » de contraste chimique plus clair se distinguent au cœur de la structure apatitique nanoporeuse. Ces zones plus brillantes peuvent être la conséquence de deux phénomènes : soit ces « noyaux » contiennent des éléments chimiques plus lourds ou une espèce au numéro atomique moyen plus élevé, soit ils présentent une densité supérieure à leur environnement. Le système n'étant composé que de carbonates et de phosphates de calcium, la première hypothèse peut être écartée. Il semble donc que ce cœur soit constitué de vaterite sur laquelle de l'apatite – moins dense grâce à son importante nanoporosité – aurait précipité au cours de la prise, masquant les particules réactives sur les images issues des électrons secondaires.

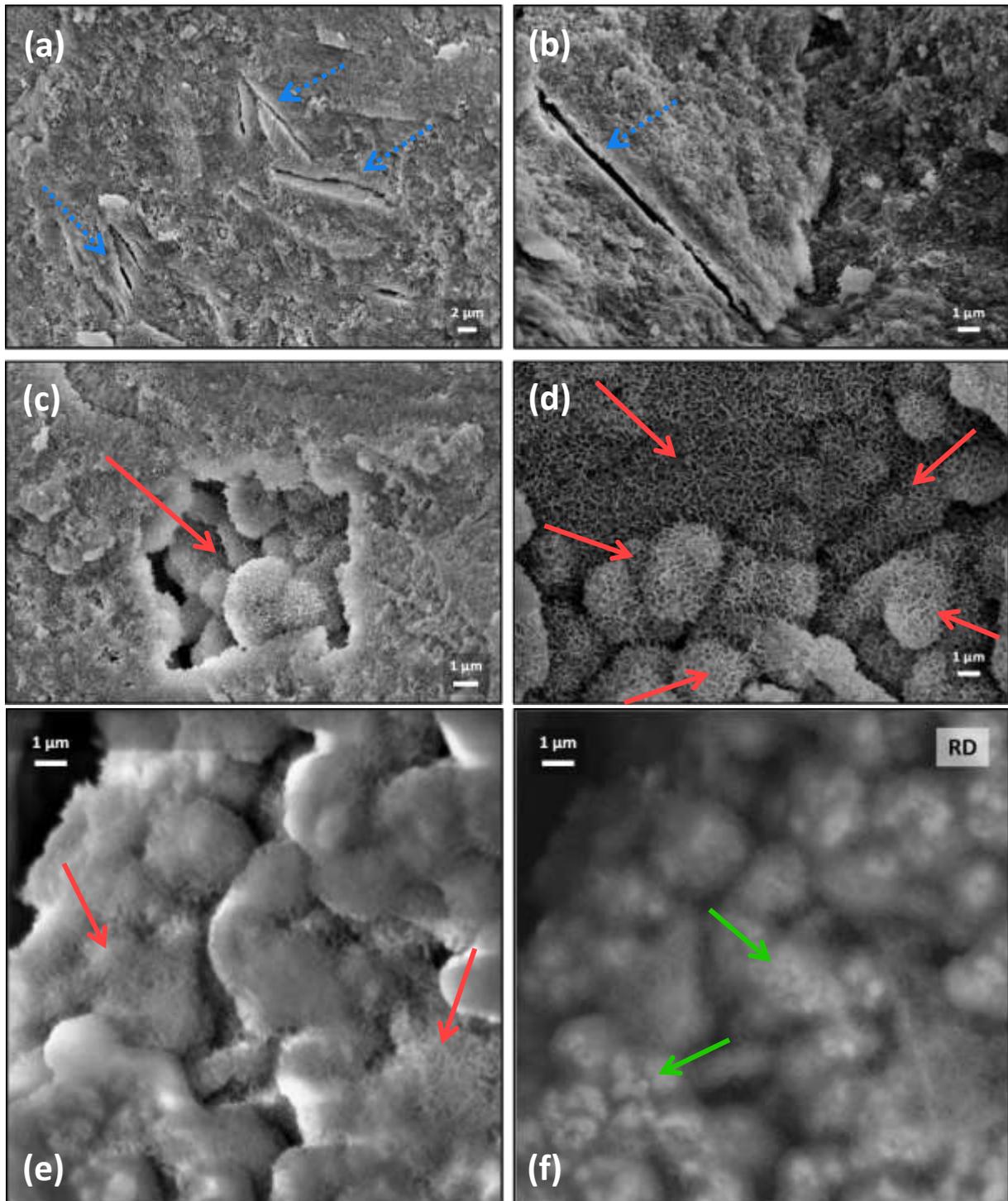


Figure 2.20 – Micrographies MEB du ciment C-REF après 24 h (d) ou 48 h (a,b,c,e,f) de maturation. L'image (f) est issue des électrons rétrodiffusés (RD) – les autres étant issues des électrons secondaires. L'apatite, la brushite et la vaterite sont indiquées par des flèches rouges, bleues et vertes respectivement.

2.2.c Analyses par spectroscopie FTIR

Le spectre FTIR du ciment C-REF (Figure 2.21) confirme la présence de deux phases : la vatérite et une apatite nanocristalline déjà identifiées par analyse DRX. On peut observer les bandes caractéristiques à la fois des carbonates de la vatérite, des phosphates de l'apatite et de l'eau, principalement liée à l'apatite, reportées Tableau 2.8. Les bandes de vibration de la brushite, elles, n'apparaissent plus.

Notons qu'une bande très large et de faible intensité semble apparaître entre 750 et 650 cm^{-1} . Cette bande, plus de l'ordre d'une déformation de la ligne de base, peut être attribuée à la libration des molécules d'eau, reportée dans la littérature à 670 cm^{-1} [Kaftrak 2011] ; probablement l'eau de la couche hydratée.

Position (cm^{-1})	Phase	Attribution
3570	Ap	ν_s OH
3400		H ₂ O
1645		H ₂ O
1430,1403	V	ν_3 CO ₃
1540		ν_3 CO ₃
1500		
1460 – 1470	Ap	
1420		
		type A labile
		type A et B
		type B et labile
1144	Ap	HPO ₄
1088, 1078	V	ν_1 CO ₃
1104, 1091, 1072, 1059, 1044, 1031, 1020, 1006	Ap	ν_3 PO ₄
962	Ap	ν_1 PO ₄
876, 849, 831	V	ν_2 CO ₃
880		ν_2 CO ₃
871	Ap	
866		
		type A
		type B
		labile
870	Ap	HPO ₄
750 – 650	Ap	H ₂ O
745	V	ν_4 CO ₃
633		OH
617		PO ₄ labile
603, 575, 562		ν_4 PO ₄
551	Ap	
533		
469		
		HPO ₄
		HPO ₄ labile
		ν_2 PO ₄

Tableau 2.8 – Bandes de vibration caractéristiques de la vatérite (V) et de l'apatite nanocristalline (Ap) en spectroscopie FTIR. [Andersen 1991; Eichert 2007; Kaftrak 2011]

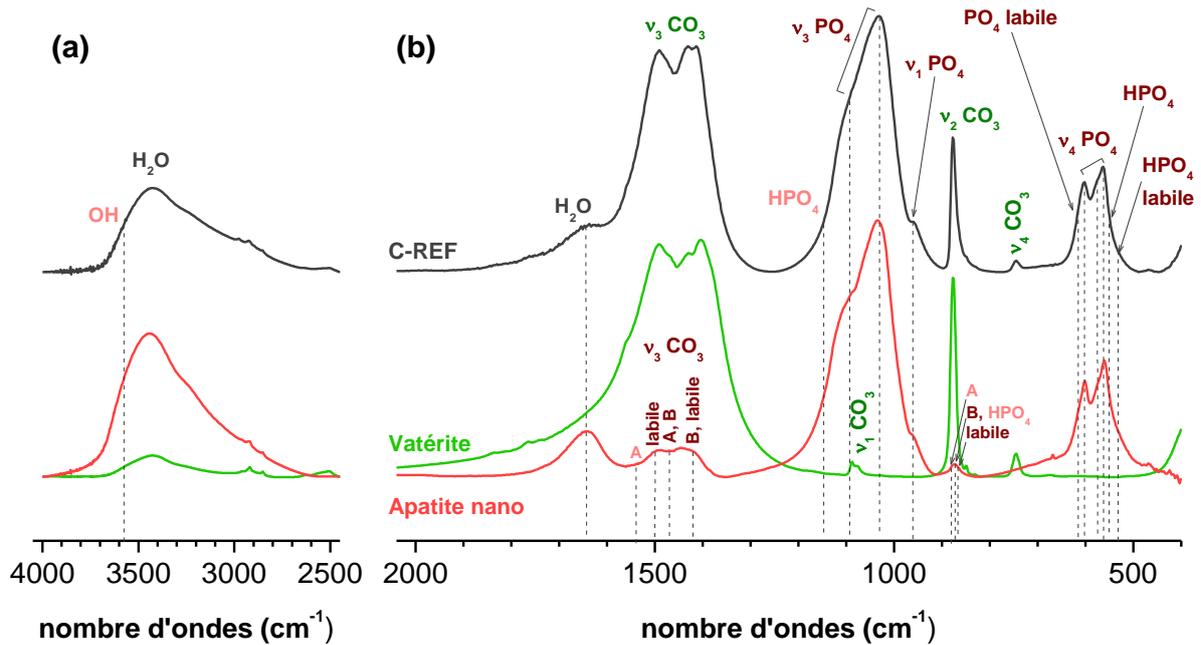


Figure 2.21 – Spectres FTIR d'un ciment de référence (C-REF) totalement pris, de la vatérite et d'une apatite nanocristalline carbonatée maturée 48 h dans les régions (a) 4000 – 2500 cm⁻¹ et (b) 2000 – 400 cm⁻¹.

Acidité des phosphates et hydroxylation de l'apatite

La région ν_4 des phosphates (700 - 450 cm⁻¹) a été utilisée dans la littérature pour caractériser plus finement l'apatite, notamment la teneur en ions HPO₄²⁻ dans sa structure apatitique ou la composition de sa couche hydratée. La Figure 2.22 propose une décomposition mathématique des différentes bandes de ce domaine dans le ciment C-REF en fin de prise, et après consommation de la totalité de la brushite, selon le modèle décrit dans la littérature [Eichert 2007]. L'apatite formée au sein du ciment ne semble ainsi présenter que peu de groupement HPO₄²⁻, situés principalement en surface. Le signal de libration des liaisons O-H paraît également particulièrement faible, la bande associée ayant pu être négligée dans la décomposition : l'apatite serait donc d'autre part très peu hydroxylée.

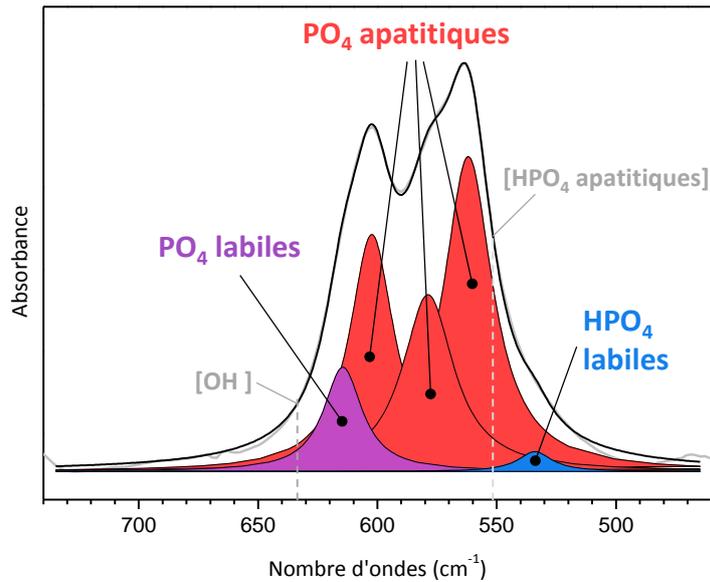


Figure 2.22 – Décomposition de la région des vibrations ν_4 des phosphates de l'apatite d'un ciment C-REF totalement pris (après 5 jours de maturation).

Carbonatation de l'apatite

Comme nous l'avons déjà évoqué auparavant (Chapitre 1 - § 1.2), l'apatite peut présenter différentes substitutions de ses groupements et de nombreuses lacunes. Si la diffraction des RX donne une indication sur sa pureté et sa cristallinité, la spectroscopie FTIR permet de caractériser plus finement la composition de l'apatite formée, en particulier les groupements qui la constituent : une substitution partielle de PO_4^{3-} par HPO_4^{2-} ou une potentielle carbonatation auront une signature spectroscopique différente de celle d'une apatite stœchiométrique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ainsi l'apatite présentée ici comme élément de comparaison est une apatite carbonatée maturée 48 h dont la carbonatation apparaît dans les régions $1540 - 1420 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_3 \text{ CO}_3$) et $880 - 860 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_2 \text{ CO}_3$). Une décomposition plus fine de ces bandes peut même permettre de déterminer l'environnement de ces carbonates, entre ceux dits « de type A », qui substituent les hydroxyles, ceux « de type B » qui substituent les phosphates et les carbonates labiles qui font partie de la couche hydratée à la surface des nanocristaux d'apatite. Néanmoins, dans le cas du ciment, de la vatérite est toujours présente dans le matériau, même en fin de réaction chimique de prise, et les vibrations intenses de ses carbonates se superposent à celles des carbonates apatitiques ce qui empêche une analyse aussi fine de la composition de l'apatite formée.

Si l'on s'intéresse pourtant à la région de vibration ν_2 des carbonates, la bande à 876 cm^{-1} caractéristique de la vatérite présente une dissymétrie sur le spectre du ciment C-REF (Figure 2.23.a). Et en effet, alors qu'il est possible de décomposer le spectre de la vatérite entre 910 cm^{-1} et 800 cm^{-1} en ses bandes constitutives (Figure 2.23.b) : Pseudo-Voigt à 876 cm^{-1} et lorentzienne à 850 cm^{-1} (la

bande à 831 cm^{-1} est d'intensité trop faible pour être prise en compte dans la décomposition), une bande supplémentaire (Figure 2.23.c) gaussienne à 867 cm^{-1} a dû être introduite pour permettre un bon ajustement de la décomposition mathématique à la courbe expérimentale. Cette bande ne peut que correspondre à la somme des contributions de l'apatite vibrant dans cette région : $\nu_2\text{ CO}_3$ de type A (880 cm^{-1}), de type B (871 cm^{-1}), labiles (866 cm^{-1}) et les HPO_4 (870 cm^{-1}) (Tableau 2.8). Or dans le domaine ν_4 des phosphates, très peu de groupements HPO_4 vibrent. La contribution viendrait donc principalement des carbonates. Etant donné, d'autre part, que la gaussienne est centrée autour de 867 cm^{-1} (largeur à mi-hauteur (FWHM) = 17 cm^{-1} ; $875 - 858\text{ cm}^{-1}$) il semble que la carbonatation de type A soit relativement faible.

Cette carbonatation est d'autre part cohérente avec le faible degré d'hydroxylation observé, dont les lacunes compenseraient la substitution des PO_4^{3-} par des ions divalents.

Vatérite

Sur les spectres de la Figure 2.23.a, la bande à 876 cm^{-1} de la vatérite apparaît plus fine dans le ciment C-REF que dans la vatérite pure (FWHM = $10,5\text{ cm}^{-1}$ et $13,2\text{ cm}^{-1}$ respectivement). Il est vraisemblable que la vatérite consommée au cours de la réaction de prise du ciment soit la part présentant le plus de défauts et donc la plus soluble. Cette phase gagnerait donc en cristallinité relative, d'où une bande mieux définie.

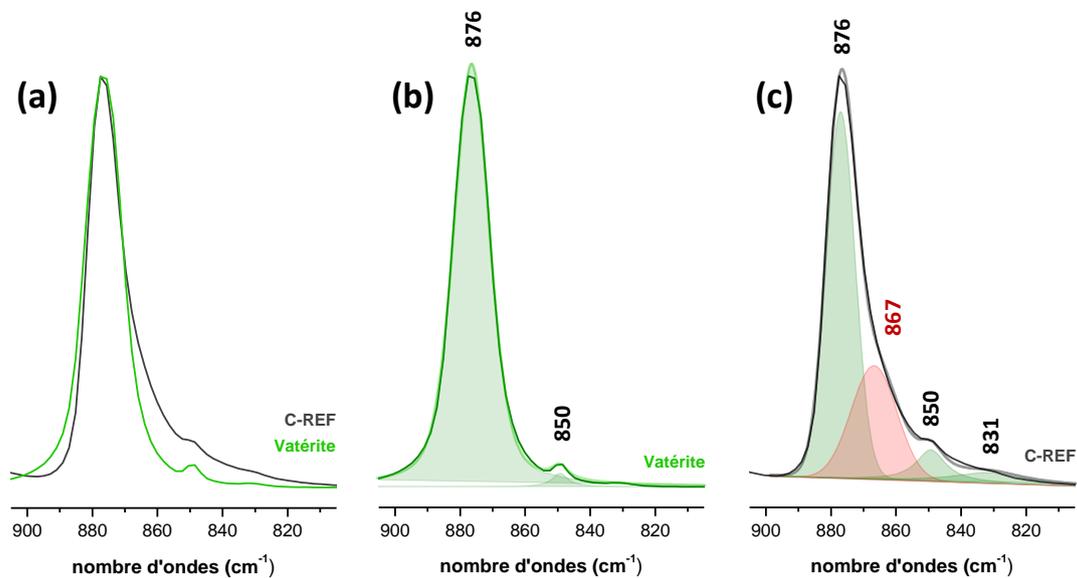


Figure 2.23 – (a) Agrandissement de la zone $\nu_2\text{ CO}_3$ des spectres FTIR de la vatérite et de C-REF ; décomposition de cette bande pour (b) la vatérite et (c) C-REF.

2.2.d Analyse par spectroscopie RMN

Spectroscopie RMN ^{13}C

La Figure 2.24 présente le spectre RMN ^{13}C d'un ciment de référence préparé à partir d'une vatérite enrichie en carbone ^{13}C (cf. Annexe 3.2) ; il est noté C-REF*. On retrouve les bandes de la vatérite à 170,4 ppm et 169,3 ppm (cf. Chapitre 2 - 1.2.c). Cependant, un épaulement supplémentaire se distingue vers les plus faibles déplacements chimiques, autour de 166 – 170 ppm. Ce domaine correspond à celui de la carbonatation des apatites, présentant des bandes à 170,2 ppm, 168,2 ppm et 166,5 ppm pour les carbonates de type B, labiles et de type A respectivement [Beshah 1990]. Comme c'était le cas en spectroscopie FTIR, le signal intense de la vatérite ne permet pas de distinguer de manière assez résolue la nature des carbonates de l'apatite – de type A, B ou labiles.

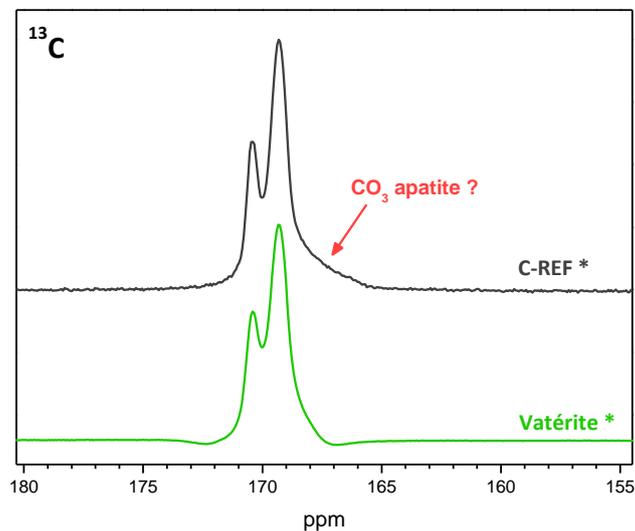


Figure 2.24 – Spectres RMN MAS ^{13}C de la vatérite – enrichie en carbone ^{13}C – et d'un ciment C-REF* après 48 h de maturation.

Spectroscopie RMN ^{31}P

Le spectre RMN MAS ^{31}P d'un ciment C-REF après 5 j de maturation est présenté sur la Figure 2.25. Il est constitué d'une bande large et asymétrique à 3,7 ppm. Ce déplacement est légèrement supérieur à ceux habituellement attribués à l'apatite dans la littérature (2,8 – 3,1 ppm) [Panda 2003; Kolodziejski 2005], néanmoins un tel déplacement a déjà été reporté dans des gels d'apatite [Eichert 2001; Eichert 2004].

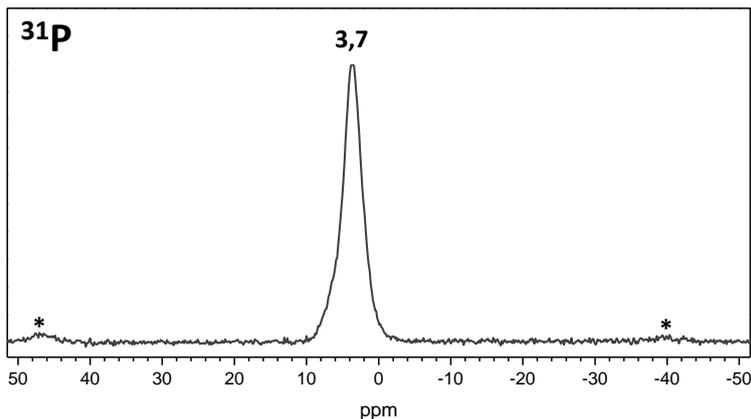


Figure 2.25 – Spectre RMN MAS ^{31}P d'un ciment C-REF après 5 j de maturation. Les bandes de rotation sont indiquées par des astérisques.

Spectroscopie RMN ^1H

Outre la présence d'eau à 5,2 ppm, le spectre RMN MAS ^1H du ciment C-REF confirme la très faible hydroxylation de l'apatite formée au cours de la prise, à peine visible à un déplacement chimique de 0,0 ppm [Kafalak 2011].

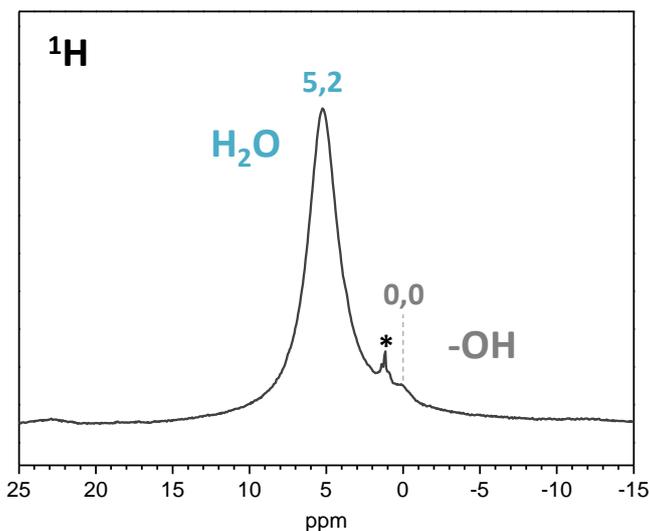


Figure 2.26 – Spectre RMN MAS ^1H d'un ciment C-REF après 5 j de maturation. *artéfact.

2.3 Etude de la cinétique de prise : approche semi-quantitative combinant différentes techniques

2.3.a Protocole expérimental

De manière à mieux appréhender la dynamique du matériau au cours de la prise, nous avons étudié l'évolution de la composition du ciment C-REF au cours du temps, pendant la prise et le durcissement. Différents échantillons de ciments ($m_{\text{pâte}} = 0,9 \pm 0,1 \text{ g}$) ont été préparés à partir d'une même pâte, élaborée comme décrit dans le paragraphe 2.1.a ; ils ont ensuite été placés à l'étuve pendant un temps t_i au bout duquel la réaction de prise a été stoppée en les mettant au lyophilisateur. Notons que durant la réaction de prise, la masse de la phase solide du ciment (m_s) diminue – en raison d'une décarbonatation partielle de la vatérite sous forme de CO_2 – la masse de la pâte a donc été pesée au moment de sa mise en forme pour chaque échantillon, puis après lyophilisation pour en évaluer la perte.

Les matériaux ont enfin été analysés par différentes techniques – DRX, MEB, spectroscopies FTIR et RMN du solide – de manière à comprendre la cinétique de prise chimique du ciment et l'évolution de ses caractéristiques physico-chimiques.

Nous utiliserons la notation « C-REF $_{t_i}$ » pour désigner les ciments de maturation de temps t_i , exprimé en heures.

2.3.b Analyse par spectroscopie FTIR

Les ciments de composition C-REF dont la réaction de prise avait été stoppée à différents temps de maturation (entre 0 h et 5 j) par lyophilisation ont été analysés par spectroscopie FTIR. La Figure 2.27 en présente les spectres dans le domaine $850 - 400 \text{ cm}^{-1}$, après soustraction de la ligne de base et normalisation de l'intensité à 576 cm^{-1} . Cette figure met nettement en évidence la disparition de la brushite – notamment à 525 cm^{-1} – et de la vatérite – à 745 cm^{-1} – au profit de l'apatite – à 603 cm^{-1} et 562 cm^{-1} .

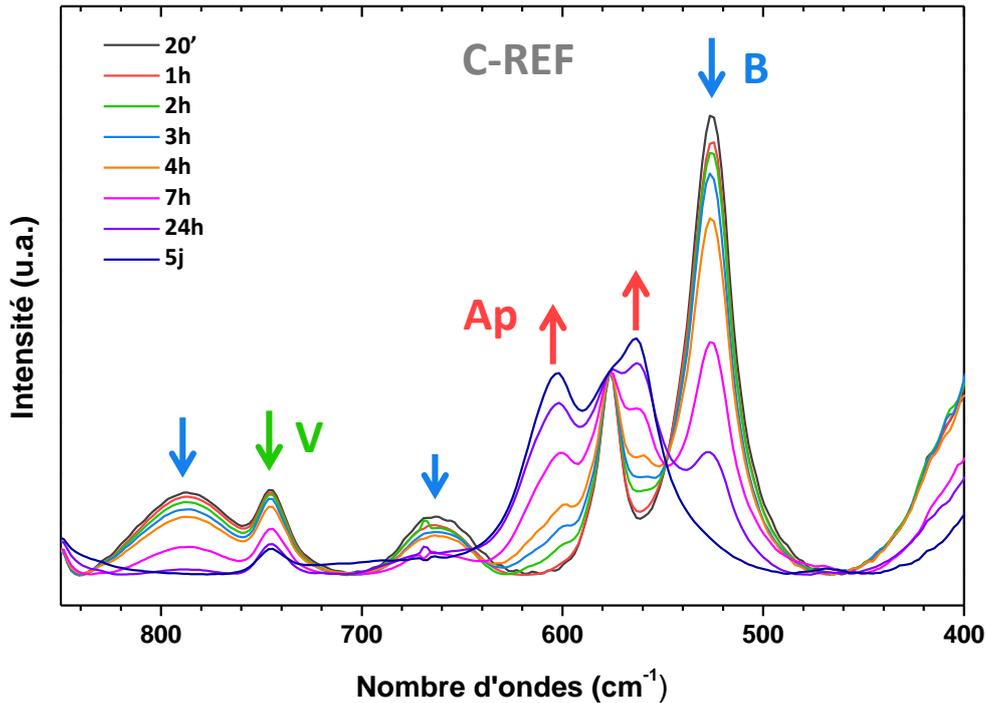


Figure 2.27 – Evolution des spectres FTIR du ciment C-REF au cours de la prise, après soustraction de la ligne de base et normalisation par rapport à l'intensité à 576 cm^{-1} .

Nous avons ainsi cherché à évaluer de manière semi-quantitative la composition du ciment au cours de la prise et du durcissement. En effet, la loi de Beer-Lambert établit une relation de proportionnalité entre la concentration d'une espèce dans un milieu et son absorbance. Nous avons donc dans un premier temps élaboré un modèle de décomposition des différentes bandes de ce domaine en nous appuyant sur les données de la littérature. Des courbes d'étalonnages ont ensuite été réalisées à partir de mélanges binaires brushite / apatite et vatérite / apatite. Leur pertinence a enfin été vérifiée sur des mélanges ternaires avant de les appliquer aux différents spectres du ciment C-REF.

Modèle mathématique de décomposition

Pour réaliser le dosage des différentes phases du système, nous avons analysé plus finement la région des spectres FTIR comprise entre 840 et 450 cm^{-1} . Nous avons ainsi cherché à décomposer mathématiquement l'ensemble des bandes de vibration présentes dans ce domaine – plus particulièrement entre 840 et 705 cm^{-1} et entre 700 et 450 cm^{-1} . L'ensemble des décompositions a été réalisé à l'aide du logiciel *OriginPro 8.1*.

Les différentes bandes de vibration caractéristiques de la brushite et de l'apatite vibrant entre 700 cm^{-1} et 450 cm^{-1} ont été présentées dans les Tableau 2.2 et Tableau 2.8 respectivement.

Devant leur multiplicité et au vu des spectres obtenus pour le ciment au cours de la prise, nous avons choisi de faire les hypothèses simplificatrices suivantes pour établir notre modèle :

‣ Nous négligerons les bandes de vibration de OH^- (630 cm^{-1}) et HPO_4^{2-} apatitiques (551 cm^{-1}), d'intensité négligeable devant les autres bandes de l'apatite (cf. § 2.2.c).

‣ Les groupements PO_4 de la brushite et de l'apatite vibrent autour de 576 cm^{-1} ; la somme de ces deux bandes sera modélisée par une unique bande, de type lorentzienne. Elle ne pourra donc pas être utilisée comme facteur déterminant la composition.

‣ Dans le spectre de la brushite pure, il n'est pas possible de décomposer la vibration à 525 cm^{-1} par une unique bande de type lorentzienne ou gaussienne. Cela peut notamment s'expliquer par un épaulement à 541 cm^{-1} qui n'apparaît que dans les spectres réalisés à basse température [Trpkovska 1999]. Ainsi, au sein du ciment, la bande à 533 cm^{-1} qui n'est en théorie attribuée qu'aux ions HPO_4^{2-} labiles de l'apatite se trouve affectée par la teneur en brushite dans le milieu. Nous écarterons donc cette bande de toute interprétation tant sur la composition du ciment que sur les propriétés de l'apatite formée in situ.

Ces hypothèses nous amènent au modèle de décomposition proposé dans le Tableau 2.9. Notons que la nature gaussienne ou lorentzienne des bandes a été déterminée de manière empirique à partir des spectres des composés purs.

Position (cm^{-1})	Notation	Phase	Bandes	Modèle de bande
664	B_{664}	B	H_2O	Gaussienne
617	Ap_{617}	Ap	PO_4^{3-} non apatitiques	Lorentzienne
603	Ap_{603}	Ap	PO_4^{3-} apatitiques	Lorentzienne
576	ApB_{576}	Ap + B	PO_4 apatitiques et brushitiques	Lorentzienne
562	Ap_{562}	Ap	PO_4^{3-} apatitiques	Lorentzienne
533	ApB_{533}	Ap + B	HPO_4^{2-} non apatitiques et brushitiques	Lorentzienne
525	B_{525}	B	HPO_4^{2-}	Lorentzienne

Tableau 2.9 – Modèle de décomposition du domaine $700 - 450 \text{ cm}^{-1}$ d'un matériau contenant de la brushite (B, en bleu) et de l'apatite (Ap, en rouge). Les bandes grisées correspondent à celles effectivement utilisées dans le dosage semi-quantitatif de ces deux phases

La ligne de base est déterminée par la droite qui passe par les minima autour des extrémités à 705 cm^{-1} et 450 cm^{-1} (cf. l'exemple de la Figure 2.28). Un troisième point est ajouté autour du minimum à 625 cm^{-1} dans le cas des échantillons contenant très peu d'apatite de manière à ce que la courbe ne croise pas la ligne de base. Cette dernière est maintenue fixe lors de la décomposition.

Les paramètres suivants – largeur de bande (w) et position (x) – ont été fixés dans un premier temps de manière à atteindre un résultat chimiquement pertinent, puis « libérés » lorsque la décomposition le permettait :

$$w(\text{Ap}_{617}) = 16 \text{ cm}^{-1}$$

$$w(\text{Ap}_{562}) = 19 \text{ cm}^{-1}$$

$$x_0(\text{ApB}_{533}) = 535 \text{ cm}^{-1}$$

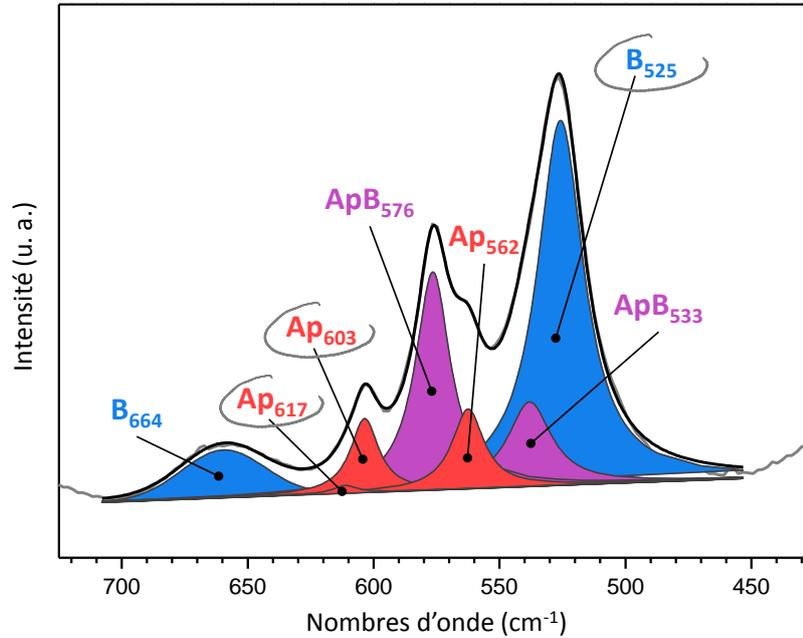


Figure 2.28 – Exemple de décomposition du domaine 700 – 450 cm^{-1} d'un mélange apatite (Ap) / brushite (B) (50 : 100). Les bandes entourées ($\text{Ap}_{617} + \text{Ap}_{603}$ et B_{525}) correspondent à celles effectivement utilisées pour le dosage des deux phases.

Pour doser la vatérite par la bande ν_4 de ses carbonates qui vibre à 745 cm^{-1} (cf. Tableau 2.6) le domaine spectral 840 – 705 cm^{-1} a d'autre part été étudié. Dans ce domaine, la brushite présente également des bandes de vibration larges autour de 787 cm^{-1} (liaisons P-O-H) et de 743 cm^{-1} (libration de l'eau) (Tableau 2.2). Enfin, la large bande observée autour de 740 cm^{-1} dans les échantillons contenant de l'apatite (cf. Tableau 2.8) est difficilement distinguable du signal de la brushite autour du même nombre d'onde ; la somme des deux a donc été modélisée par une unique bande. Cette hypothèse nous conduit à un modèle de décomposition présenté dans le Tableau 2.10 comportant trois bandes dont la nature gaussienne a été déterminée de manière empirique.

Position (cm^{-1})	Notation	Phase	Bandes	Modèle de bande
787	B_{787}	B	P-O-H	Gaussienne
745	V_{745}	V	$\nu_4 \text{CO}_3^{2-}$	Gaussienne
743	ApB_{743}	B + Ap	libration de l'eau	Gaussienne

Tableau 2.10 – Modèle de décomposition du domaine 840 – 705 cm^{-1} d'un matériau contenant de la vatérite (V), de la brushite (B) et de l'apatite (Ap).

Comme présenté sur les deux exemples de la Figure 2.29, la ligne de base, tangente aux pieds de bandes, est maintenue fixe lors de la décomposition. La largeur de la bande V_{745} a également été fixée de manière empirique à $w(V_{745}) = 14,2 \text{ cm}^{-1}$ pour tous les échantillons.

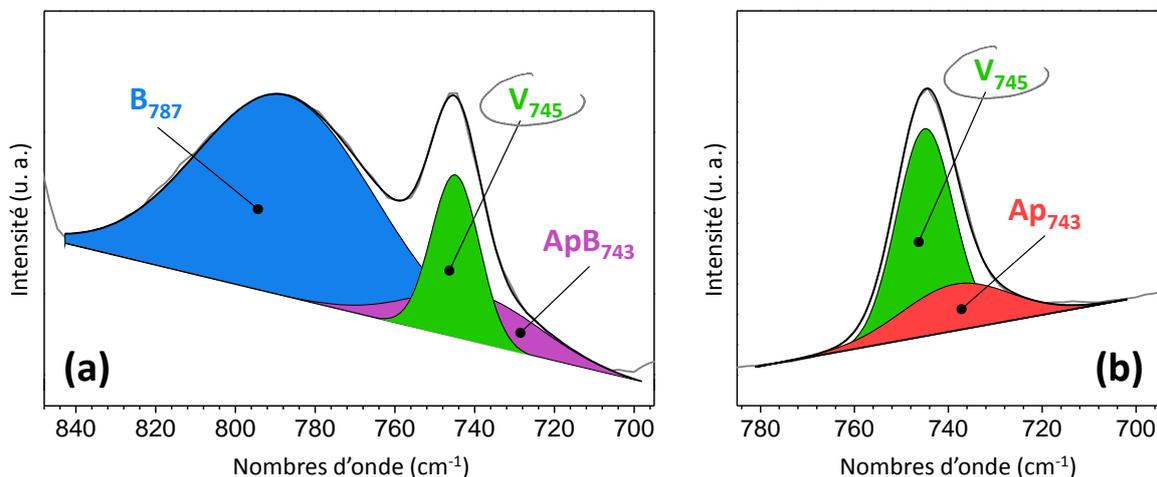


Figure 2.29 – Exemple de décomposition du domaine 700 – 450 cm^{-1} de (a) un mélange ternaire brushite (B) / vatérite (V) / apatite (Ap) (35 : 35 : 30) ; (b) un mélange binaire V / Ap (67 : 33)

Courbes d'étalonnage à partir de mélanges binaires

Des mélanges binaires apatite / brushite (Ap / B) et apatite / vatérite (Ap / V) ont été réalisés en tant qu'étalons. La brushite et la vatérite synthétisées tel que décrit dans les parties 1.1.b et 1.1 ont été utilisées pour leur réalisation. Une apatite de synthèse carbonatée maturée 48 h (cf. Annexe 3) a été choisie comme modèle de l'apatite se formant dans le ciment au cours de la prise.

Les spectres des différents échantillons ont été décomposés selon les deux modèles présentés précédemment. En validant cet étalonnage sur des mélanges ternaires apatite / brushite / vatérite (Ap / B / V), les rapports des aires des bandes $(Ap_{617} + Ap_{603})/B_{525}$ et $(Ap_{617} + Ap_{603})/V_{745}$ sont apparus comme étant les plus significatifs pour déterminer la composition relative des mélanges. Deux courbes d'étalonnage représentant le rapport des aires sur le rapport des masses ont ainsi été tracées. Présentée sur la Figure 2.30.a, la relation suivante :

$$(Ap_{617} + Ap_{603})/B_{525} = f\left(\frac{m_{Ap}}{m_B}\right) \quad (2.1)$$

a pu être modélisée par une droite de type $f(x) = a + b.x$ avec $a = -0,02385$ et $b = 0,31971$. La deuxième relation :

$$(Ap_{617} + Ap_{603})/V_{744} = g\left(\frac{m_{Ap}}{m_V}\right) \quad (2.2)$$

a été modélisée par une fonction $g(x) = (b+x)/(a+c.x)$ avec $a = 0,19738$, $b = -0,06413$ et $c = -0,02333$.

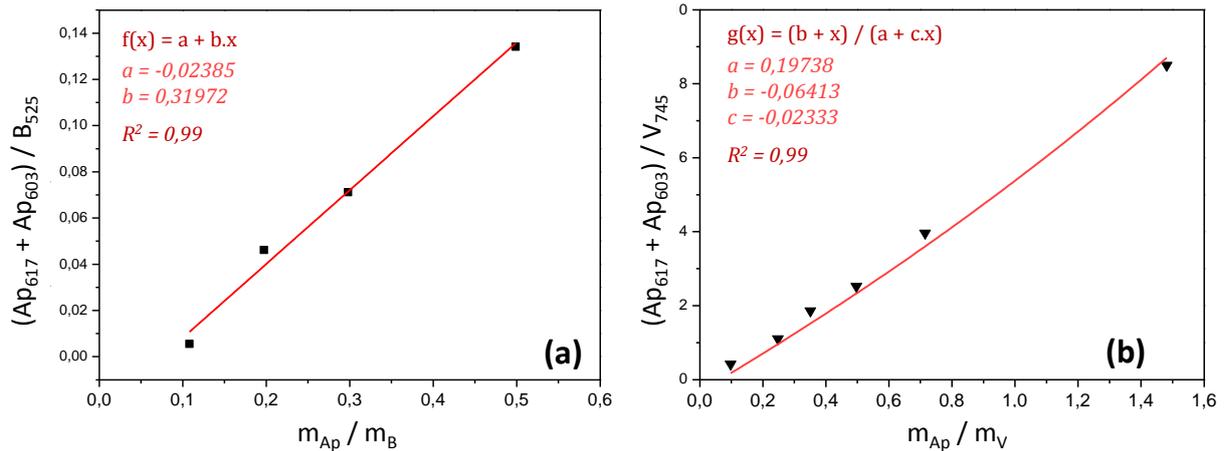


Figure 2.30 – (a) Droite d’étalonnage des échantillons contenant de l’apatite et de la brushite ; (b) Courbe d’étalonnage des échantillons contenant de l’apatite et de la vatérite.

Les rapports m_{Ap}/m_B et m_{Ap}/m_V permettent ainsi d’estimer la composition relative d’un mélange de ces trois phases et devraient nous permettre d’effectuer une analyse semi-quantitative de la composition du ciment au cours de la prise.

Validation de la méthode sur des mélanges ternaires

Des mélanges ternaires contenant différents ratios d’apatite, de brushite et de vatérite ont été réalisés et analysés par spectroscopie FTIR. Les spectres ont été décomposés deux fois selon le modèle proposé précédemment afin de le valider et d’évaluer son domaine d’incertitude. Les résultats sont reportés dans le Tableau 2.11.

Il apparaît ainsi que le modèle de décomposition associé aux courbes étalons proposé permet une bonne estimation de la composition d’un mélange ternaire contenant à la fois de la brushite, de la vatérite et de l’apatite. En effet, pour une majorité des valeurs – pourcentages massiques – obtenues, l’incertitude absolue par rapport à la valeur attendue est inférieure à $\pm 3,0\%$. Cette erreur absolue devient supérieure à $\pm 5,0\%$ pour l’apatite et la vatérite dans le cas des échantillons contenant beaucoup de brushite (>35 % et 45 %) : les bandes intenses de cette dernière diminuent de manière rationnelle la précision de la déconvolution sur les bandes de plus faible

intensité du même domaine. D'après ces résultats, nous estimerons donc que l'erreur absolue est, au maximum, de 6-7 %. Notons que la masse de vatérite est systématiquement surestimée et que la masse de l'apatite a tendance à être sous-estimée.

	Composition réelle			Composition évaluée par décomposition			Erreur relative (%)		
	B	V	Ap	B	V	Ap	B	V	Ap
Mélange n°1	44,7	45,0	10,3	43,6 <i>+1,1</i>	49,8 <i>-4,8</i>	6,6 <i>+3,7</i>	3	10	56
Mélange n°2	35,0	34,9	30,1	34,6 <i>+0,4</i>	41,0 <i>-6,2</i>	24,3 <i>+5,8</i>	1	15	24
Mélange n°3	19,9	30,0	50,1	19,2 <i>+0,7</i>	30,3 <i>-0,3</i>	50,5 <i>-0,4</i>	4	1	1
Mélange n°4	9,9	20,0	70,1	11,4 <i>-1,5</i>	21,8 <i>-1,8</i>	66,8 <i>+3,3</i>	13	8	5

Tableau 2.11 – Comparaison de la composition de quatre mélanges ternaires brushite (B) / vatérite (V) / apatite (Ap) obtenue par décomposition mathématique des spectres FTIR à la composition réelle évaluée à partir des masses initialement pesées. Les teneurs sont exprimées en pourcentage massique de chaque phase dans le mélange. Les valeurs inscrites en italique correspondent à l'incertitude absolue (vert $\leq \pm 3,0$ < orange $\leq \pm 5,0$ < rouge) ; les trois dernières colonnes donnent l'erreur relative (vert $\leq \pm 5\%$ < orange $\leq \pm 10\%$ < rouge)

Evaluation de la composition du ciment C-REF en cours de prise

L'ensemble des spectres présentés sur la Figure 2.27^[22] ont été décomposés à partir des deux modèles précédemment présentés dans le Tableau 2.9 et le Tableau 2.10. La Figure 2.31 donne l'exemple de la décomposition obtenue sur un ciment après 7 h de maturation : elle montre une bonne corrélation avec le spectre expérimental.

A partir des courbes d'étalonnage de la Figure 2.30, nous avons estimé les rapports m_{Ap}/m_B et m_{Ap}/m_V au sein du ciment C-REF en fonction du temps de maturation. D'autre part, la perte massique de la phase solide ayant été évaluée pour chaque échantillon, nous en avons déduit une troisième relation de conservation des masses :

$$m_S = m_B + m_V + m_{Ap} \quad (2.3)$$

avec m_S la masse de la phase solide. A partir de ces trois relations, nous avons pu évaluer l'évolution massique de chaque phase au sein d'un ciment C-REF – de masse initiale théorique $m_S = 1$ g – dont la Figure 2.32.a en donne l'aperçu général.^[23]

²² Notons tout de même que la décomposition a été réalisée sur les spectres non traités, c'est-à-dire sans soustraction de la ligne de base.

²³ Les données correspondent à la moyenne et à l'écart type issus des résultats de deux cinétiques.

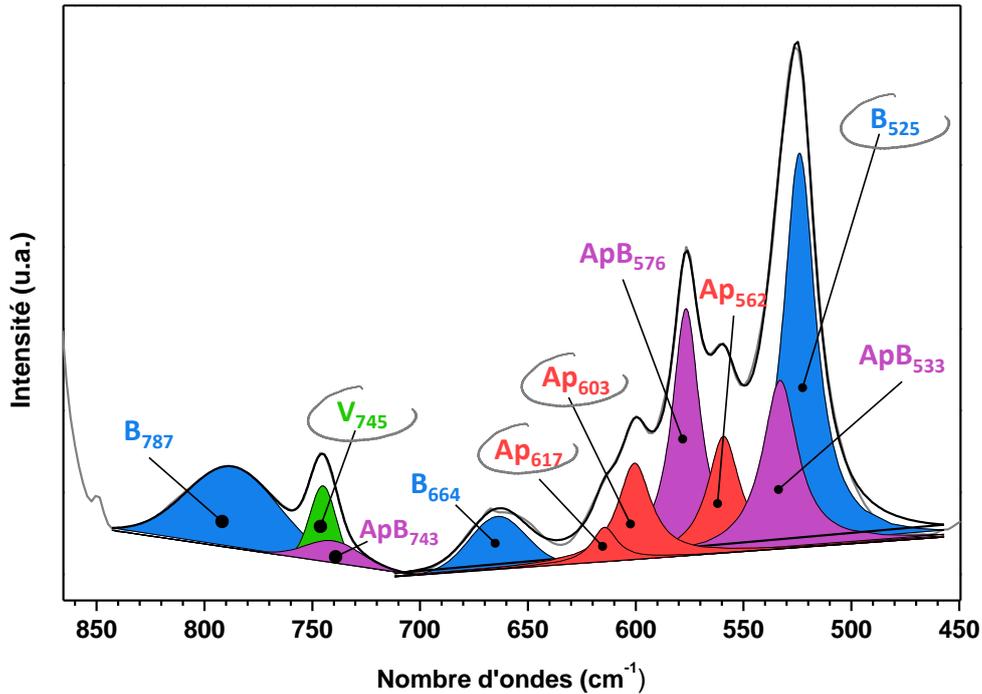


Figure 2.31 – Exemple de déconvolution du domaine $840\text{ cm}^{-1} - 450\text{ cm}^{-1}$ d'un ciment de référence C-REF₇, soit 7 h après le début de la prise : la courbe expérimentale est en gris, la courbe résultant de la décomposition est en noir.

Comme nous l'avons observé dans les mélanges ternaires, il semble que la teneur en vatérite soit légèrement surestimée en présence d'une quantité importante de brushite. Le mélange brushite / vatérite est initialement préparé de manière équimassique ($m_B = m_V = 0,5\text{ g}$ pour un ciment de 1 g). Or à 20 minutes de maturation, la vatérite est estimée à $m_V = 0,52 \pm 0,01\text{ g}$. Les incertitudes indiquées ici sont celles issues de la répétabilité des données sur deux cinétiques, mais il est à noter qu'elle est en réalité supérieure, en raison de l'incertitude liée à la technique de décomposition établie ($\pm 0,06\text{ g}$, d'après les résultats précédemment présentés – cf. Tableau 2.11).

Au bout de 5 jours, la brushite a été entièrement consommée et la vatérite a perdu de l'ordre de 50 % de sa masse. En parallèle, une quantité importante d'apatite s'est formée et constitue, en fin de réaction de prise, $72 \pm 1\%$ m/m de la phase solide. Notons que le ciment perd $11 \pm 1\%$ de sa masse au cours de la prise. La Figure 2.32.b met plus particulièrement en évidence le début de la réaction de prise, pendant les huit premières heures : pendant la première heure, il y a très peu d'évolution au sein de la phase solide. Cela correspond à la phase dormante du ciment, présentée sur la Figure 1.10 (cf. Chapitre 1 - 3.1). A partir de 1 h de maturation, la dissolution de la brushite semble précéder celle de la vatérite pour commencer à former de l'apatite. On peut penser que l'acidification du milieu associée à la précipitation de l'apatite et la dissolution de la brushite est un élément moteur de la dissolution de la vatérite. La phase où la réaction de prise est la plus rapide –

entre 2 h et 7 h – semble également celle présentant la plus grande variabilité d'un échantillon à l'autre.

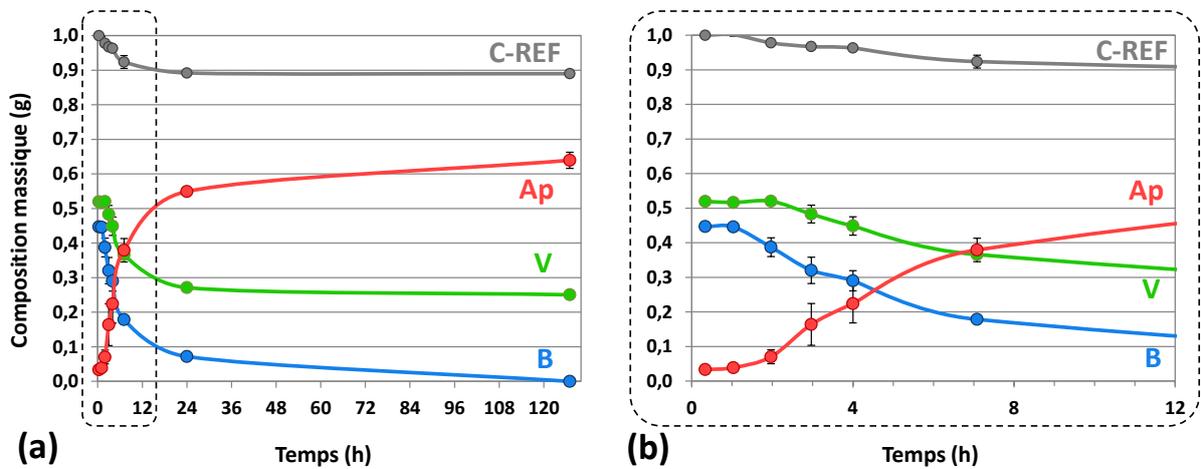


Figure 2.32 – Evolution de la composition de la phase solide du ciment C-REF, exprimée en masse, évaluée à partir de la décomposition des spectres FTIR : (a) entre 10' et 5 j de maturation ; (b) agrandissement des courbes entre 10' et 12 h.

Notons que nous avons pu observer des différences plus notables dans ces cinétiques en fonction des propriétés du lot de vatérite synthétisé – cristallinité et surface spécifique notamment. Dans cette étude, les comparaisons des différentes compositions seront ainsi faites sur un même lot de vatérite ou des lots aux caractéristiques similaires. Des remarques complémentaires sont proposées en annexe (cf. Annexe 4). Il semble ainsi important de maîtriser les paramètres de synthèse de la vatérite pour en contrôler le comportement lors de son utilisation au sein d'un ciment.

2.3.c Analyse par DRX

La Figure 2.33 présente les diagrammes DRX du ciment C-REF à différents temps au cours de la prise. Elle met en évidence là encore la dissolution de la brushite – particulièrement sur la raie [020] à $13,6^\circ$ – et de la vatérite, notamment à $29,0^\circ$ et $31,6^\circ$, bien que la décroissance de ces deux raies soit moins remarquable : d'une part la cristallinité de ce réactif est moindre, d'autre part il n'est pas entièrement consommé au cours de la prise. La précipitation de l'apatite nanocristalline se distingue autour de $30,1^\circ$ et $37,4^\circ$ mais sa cristallinité est encore moindre. ^[24]

²⁴ Se reporter à la Figure 2.18 pour l'attribution de l'ensemble des raies.

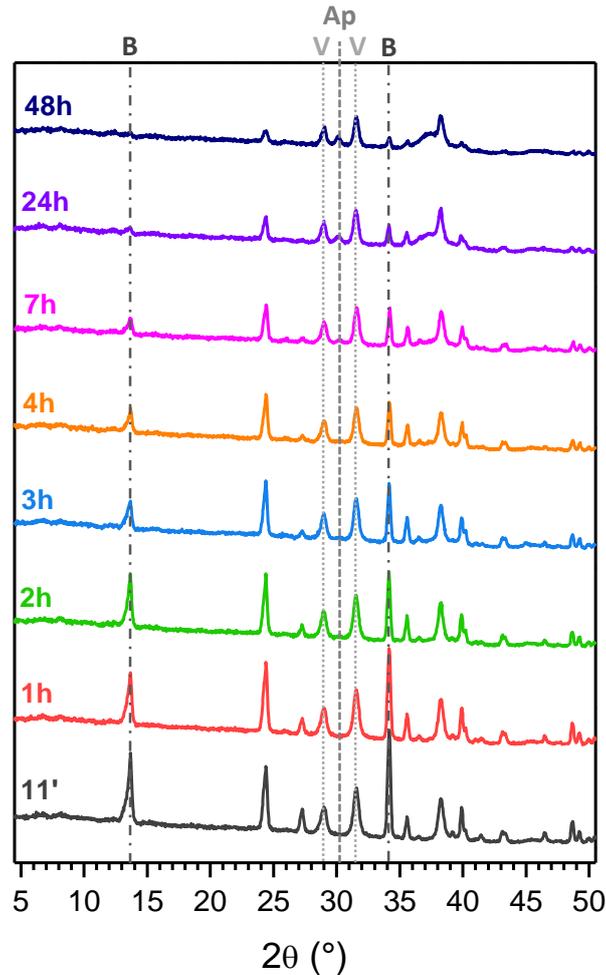


Figure 2.33 – Evolution des diagrammes de DRX d'un ciment C-REF au cours de la prise

Une analyse par DRX offre l'avantage de signaux souvent mieux résolus – mais seulement dans le cas de phases bien cristallisées – et moins superposés que dans le cas de la spectroscopie FTIR. Tout comme cette dernière, l'approche quantitative nécessite des mélanges de composition connue comme élément de comparaison ou l'utilisation d'un étalon interne. Cependant cette technique nous confronte à d'autres difficultés : des éventuelles orientations préférentielles – par exemple la raie [020] de la brushite – qui peuvent varier au cours de la prise et fausser la quantification, et la faible cristallinité de certaines phases – notamment l'apatite – qui ont un signal moins bien résolu. Dans cette étude, nous avons ainsi choisi de ne pas approfondir cette méthode dans une approche semi-quantitative ; nous avons cependant comparé quelques résultats issus de l'analyse DRX à ceux obtenus plus finement par spectroscopie FTIR.

Les échantillons ont été préparés en suivant un même protocole et l'ensemble des diagrammes ont été réalisés avec un même temps d'acquisition (cf. Annexe 2.1). Nous avons donc minimisé la variabilité liée aux paramètres instrumentaux entre les différents ciments. Une quantification relative des différentes phases a ensuite été réalisée à partir de l'aire des raies à $16,6^\circ$

et 34,2° pour la brushite, 29,0° et 31,6° pour la vatérite, et 30,1° pour l'apatite, raies les moins affectées par le caractère multiphasique du système. De manière à comparer les résultats à ceux obtenus par spectroscopie FTIR, les quantités maximales de chaque phase ont été arbitrairement établies à 100 % – soit à t_0 pour la brushite et la vatérite et à 48 h de maturation pour l'apatite. Les résultats obtenus pour les trois phases sont présentés sur la Figure 2.34.

Dans le cas de la brushite, la cinétique liée à la raie à 13,6° connaît une décroissance plus rapide que celle évaluée par spectroscopie FTIR, ce qui s'explique par une forte orientation préférentielle des plaquettes en début de poudre qui disparaît en cours de prise. Par contre la cinétique basée sur l'intensité de la raie à 34,2° montre une très bonne corrélation avec celle obtenue grâce à la spectroscopie FTIR. Si les allures générales des cinétiques de la vatérite sont cohérentes, celles-ci montrent tout de même une variabilité plus importante du fait de la faible intensité des raies. Cependant, alors que l'on aurait pu attendre un constat similaire pour une phase apatitique mal cristallisée il apparaît que la DRX donne une bonne première estimation de la cinétique de formation du produit, comme le montre la Figure 2.34.c, et confirme la pertinence de la méthode proposée par spectroscopie FTIR.

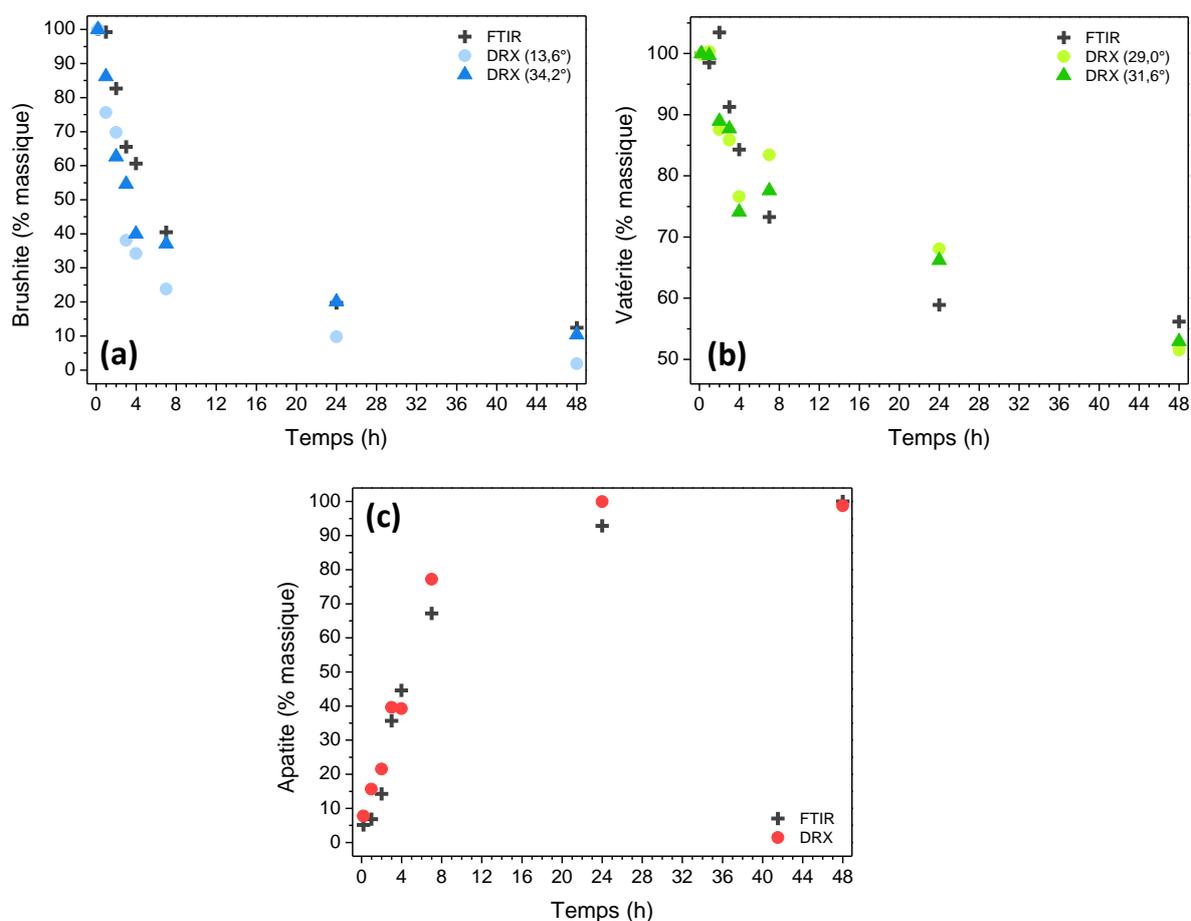


Figure 2.34 – Cinétiques de prise évaluées par DRX pour (a) la brushite, (b) la vatérite et (c) l'apatite, comparées aux résultats obtenus par spectroscopie FTIR.

2.3.d Analyses par spectroscopie RMN

Une approche similaire a été enfin menée par spectroscopie RMN du solide. La Figure 2.35 présente ainsi l'évolution des spectres du ciment C-REF entre les débuts de la prise et 48 h de maturation.

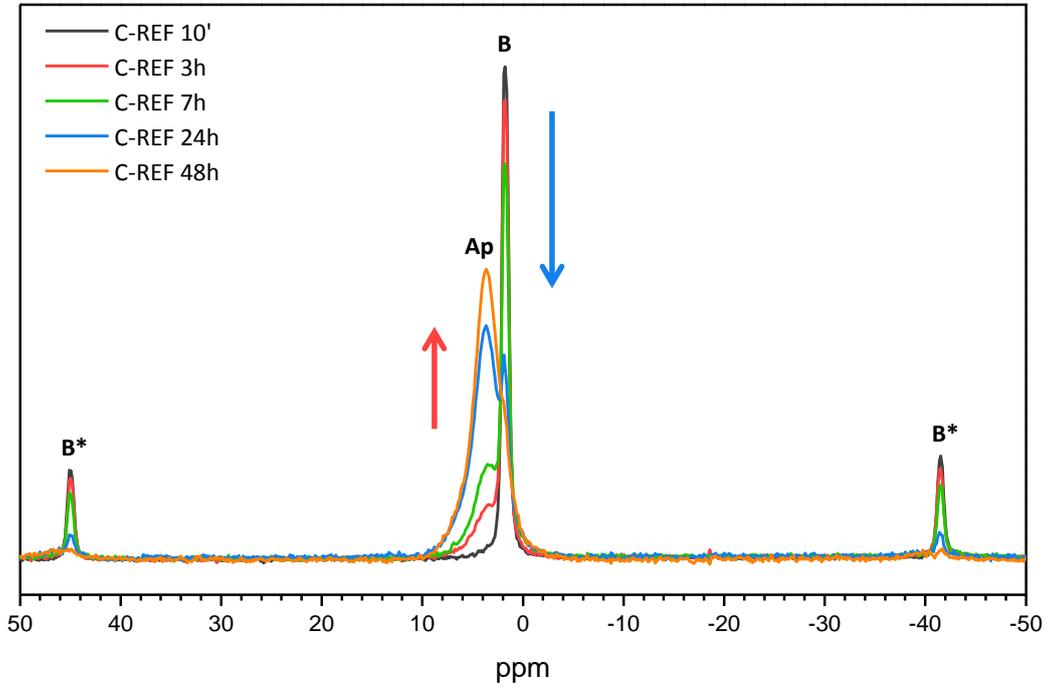


Figure 2.35 – Superposition des spectres RMN MAS ^{31}P du ciment C-REF après 10', 3 h, 7 h, 24 h et 48 h de maturation. Tous les spectres ont été normalisés par rapport à la masse de ciment analysée dans le rotor.

Cette technique de RMN ^{31}P ne permet pas le dosage du système triphasique, la vaterite étant totalement absente des spectres, mais elle met en évidence la diminution de la bande correspondant aux ions HPO_4^{2-} de la brushite au profit de la formation d'apatite au cours du temps. Les ciments C-REF₀ et C-REF₄₈, notamment, présentent des phases pures de brushite et d'apatite respectivement. Afin d'évaluer la cinétique de dissolution et précipitation de chacune de ces phases nous avons donc modélisé chaque spectre intermédiaire C-REF_i par une combinaison de C-REF₀ et C-REF₄₈ :

$$\text{C-REF}_i = \alpha_i \text{C-REF}_0 + \beta_i \text{C-REF}_{48} \quad (2.4)$$

dont les coefficients α_i et β_i sont présentés dans le Tableau 2.12 et les courbes dans la Figure 2.36.

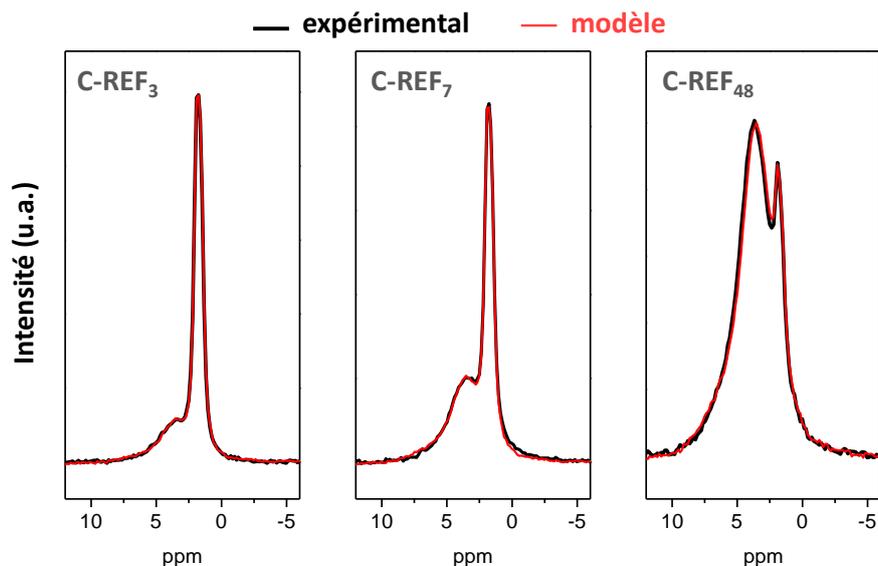


Figure 2.36 – Spectres expérimentaux des ciments C-REF à 3 h, 7 h et 24 h de maturation et leur modèles issus des combinaisons des ciments C-REF₀ et C-REF₄₈.

Ciment	t (h)	contribution de la brushite : α_i	contribution de l'apatite : β_i
C-REF ₀	0,2	1	0
C-REF ₃	3	0,89	0,15
C-REF ₇	7	0,72	0,29
C-REF ₂₄	24	0,18	0,77
C-REF ₄₈	48	0	1

Tableau 2.12 – Données issues des spectres RMN ³¹P (BD) du ciment C-REF au cours de la prise : coefficients α_i et β_i , significatifs de la quantité relative de brushite et d'apatite respectivement, déterminés d'après l'équation (2.4).

A partir de ces coefficients, nous avons estimé la cinétique de dissolution de la brushite et de précipitation de l'apatite au cours de la prise. D'après la Figure 2.37, ces cinétiques obtenues sont très proches de celles issues de l'analyse par spectroscopie FTIR.

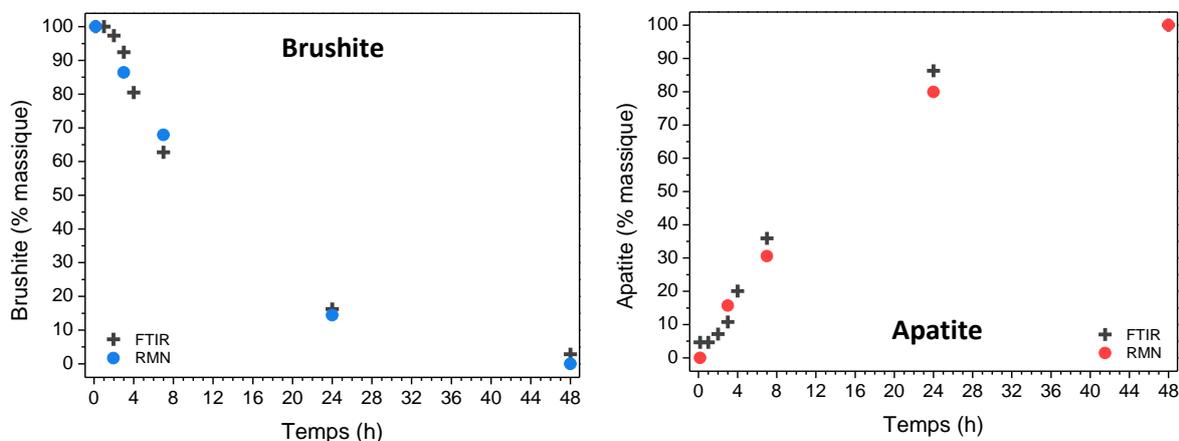


Figure 2.37 – Evolution de la composition relative du ciment C-REF en brushite et en apatite au cours du temps : comparaison de l'analyse par RMN ³¹P BD et par spectroscopie FTIR.

Cette analyse par RMN permet donc de valider la pertinence du dosage semi-quantitatif établi par spectroscopie FTIR. En effet, cette dernière fait intervenir un mélange étalon de comparaison – notamment une apatite qui peut différer de celle effectivement formée au cours de la prise – alors que par spectrométrie RMN, l'analyse a été faite de manière relative entre les différents échantillons. La très bonne corrélation entre les résultats obtenus lors d'une analyse semi-quantitative effectuée avec ces deux techniques spectroscopiques (FTIR et RMN du solide) nous conforte dans le bien-fondé des hypothèses pour établir le modèle de dosage par spectroscopie FTIR.

2.3.e Observations par MEB

En complément des observations présentées sur la Figure 2.20, la Figure 2.38 montre ici l'évolution de la microstructure du ciment pendant la prise de manière plus détaillée, après 1 h, 2 h, 24 h et 48 h de maturation. Sur le ciment C-REF₁, la morphologie type des plaquettes de brushite et des particules de vatérite sont bien visibles. Néanmoins, une phase présentant une surface plus rugueuse est déjà présente, notamment autour des particules de vatérite et sous forme de germes en surface de la brushite. Ce sont les premières traces de la précipitation d'apatite. Après 2 h de maturation, la phase apatitique a envahi de plus en plus le système. Le matériau se densifie et on devine une certaine cohésion dans la matrice. Les particules réactives – lentilles de vatérite et plaquettes de brushite – sont toujours identifiables. Après 24 h de prise, la matrice minérale semble s'être encore densifiée, cependant une porosité de quelques dizaines de microns est très nette. Sur les images à plus fort grossissement, la phase apatitique est mise en évidence. Peu de particules de brushite ont été observées, et la vatérite n'est plus visible dans le matériau. Après 48 h, le ciment est devenu relativement dense et compact mais conserve une certaine macroporosité due à la libération du CO₂ et des traces d'anciennes plaquettes de brushite. A quelques endroits, la morphologie de l'apatite nanocristalline a pu être observée.

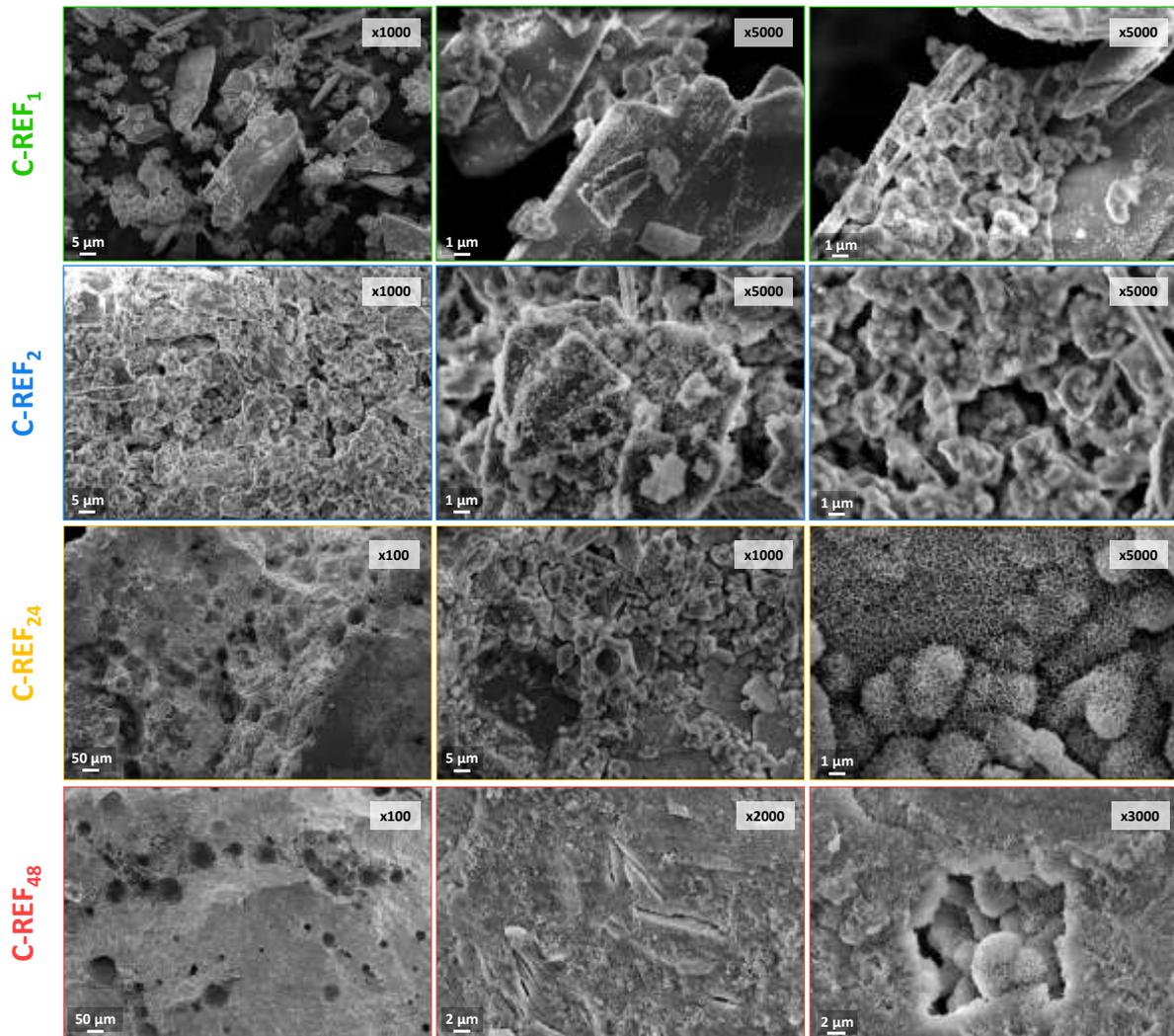
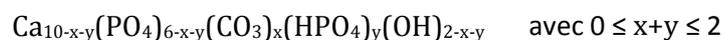


Figure 2.38 – Micrographies MEB d'un ciment C-REF à 1 h, 2 h, 24 h et 48 h de maturation.

2.4 Composition de l'apatite formée

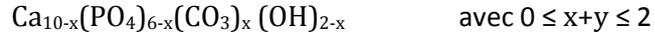
Comme l'ensemble des analyses présentées ont pu le mettre en évidence, la prise du ciment C-REF consiste en la précipitation d'une phase apatitique conjointement avec la dissolution des réactifs initialement introduits, la brushite et la vatérite, au sein de la suspension aqueuse dense et sursaturée de la pâte cimentaire.

Nous avons vu dans le premier chapitre (§ 1.2) que la formule générale des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux synthétisées dans des conditions douces, à un pH non alcalin, pouvait s'exprimer ainsi :



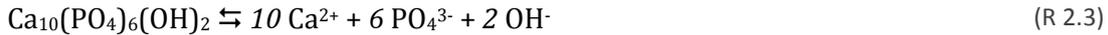
Or les analyses spectroscopiques réalisées ont établi que l'apatite formée au cours de la prise du ciment C-REF était carbonatée, mais contenait très peu d'ions HPO_4^{2-} et OH^- . Nous pouvons donc

en première approximation supposer que dans la formule précédente, le coefficient y est nul, nous ne prendrons donc en compte que la carbonatation comme écart à la stœchiométrie, et les lacunes de calcium et de groupements hydroxyles associés :

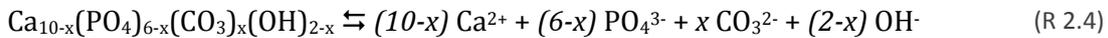


L'excès de vatérite dans le milieu rend cependant délicate la détermination du degré de carbonatation de cette apatite.

L'apatite stœchiométrique, en solution, suit l'équilibre suivant :



avec une constante d'équilibre K_{SHA} de $10^{-117,3}$ à 37°C [McDowell 1977]. Dans le cas d'une apatite carbonatée, cette relation devient la suivante :



D'autre part, la dissolution des réactifs est définie par les équilibres suivants :



avec des constantes de solubilité K_{SB} de $10^{-6,62}$ à 37°C pour la brushite [Chow 2009] et K_{SV} de $10^{-8,02}$ pour la vatérite [Plummer 1982].

La dissolution de la brushite d'une part (R 2.5) et la précipitation de l'apatite d'autre part (R 2.4) induisent une légère acidification du milieu ^[25] ce qui favorise une décarbonatation partielle du ciment :



de constante d'équilibre $K_{\text{CO}_2} = 10^{-18,15}$.

L'équilibre des équations (R 2.4), (R 2.5), (R 2.6) et (R 2.7) amène à la réaction de dissolution reprécipitation suivante :



²⁵ contrôlée par mesure du pH de la pâte en début de prise

3 Conclusion

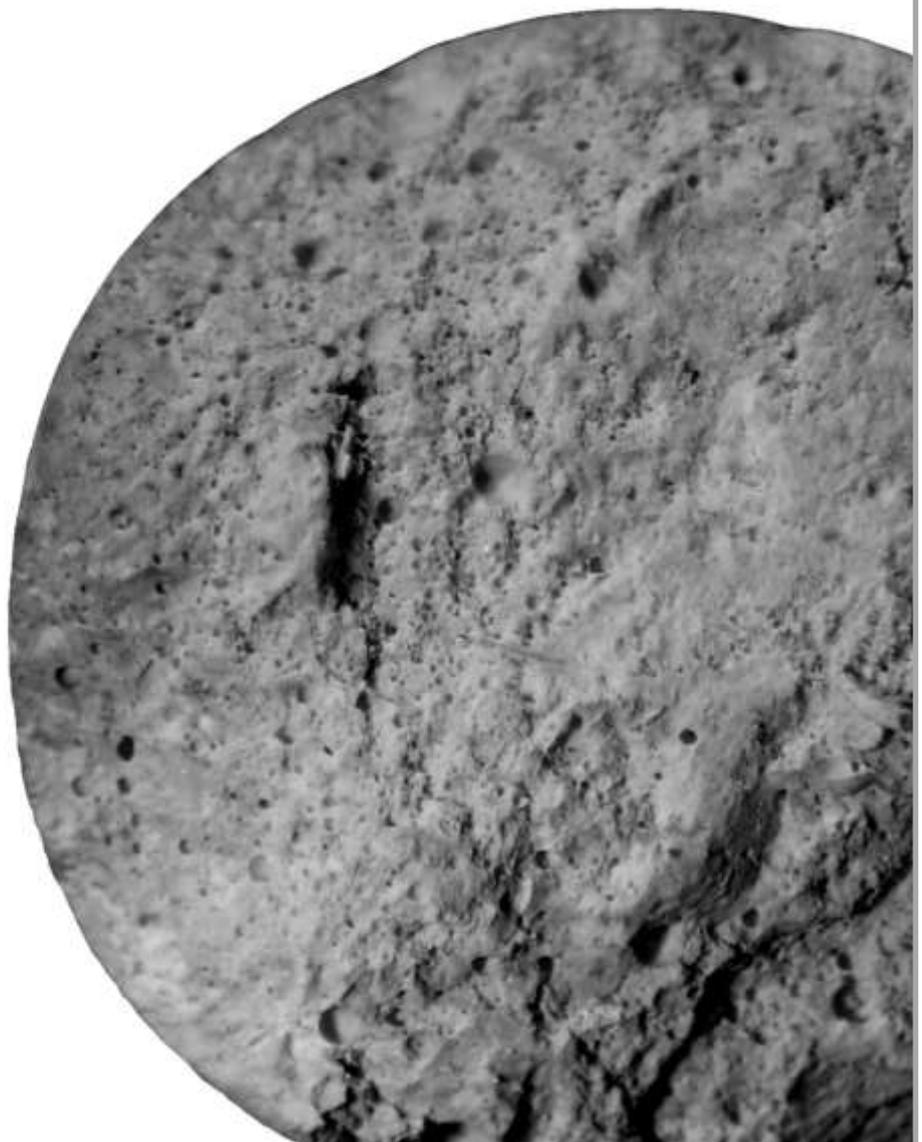
La brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et la vatérite (CaCO_3), poudres réactives impliquées dans la réaction de prise du ciment mixte CaCO_3 -CaP, ont été synthétisées et caractérisées par des techniques spectroscopiques (FTIR, RMN ^{31}P , ^{13}C et ^1H), de l'observation microscopique (MEB), de la diffraction (DRX) et une analyse thermogravimétrique (ATG). Dans le cas de la vatérite, en particulier, un modèle a été proposé pour rendre compte d'une présence d'eau de l'ordre de 2,7 % m/m : ce composé pourrait présenter à la fois de l'eau au sein de sa structure sphérolitique (eau interstitielle) et une couche hydratée à sa surface, à l'origine notamment de bandes caractéristiques en RMN CP-MAS ^{13}C , par transfert de l'aimantation des protons ^1H aux carbones ^{13}C .

L'élaboration d'un ciment CaCO_3 – CaP a ensuite été présentée. Le mélange d'une phase solide constituée de brushite et de vatérite et d'une phase aqueuse a conduit, par une réaction de dissolution – reprécipitation, à la formation d'une apatite nanocristalline analogue au minéral osseux. Différentes techniques de caractérisation suggèrent une carbonatation de type B relativement importante et une faible hydroxylation, soit une apatite de type $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x}$ ($0 \leq x \leq 2$).

Des études cinétiques ont été menées par spectroscopie FTIR, par DRX et par RMN afin de caractériser le ciment au cours de la prise. La mise au point d'une méthode de dosage semi-quantitatif par spectroscopie FTIR a notamment permis d'évaluer l'évolution du système triphasique brushite – vatérite – apatite au cours du temps. Après 2-3 jours de maturation à 37°C en atmosphère humide, la totalité de la brushite a été dissoute, laissant place à un matériau composé d'apatite et de vatérite avec un rapport massique de l'ordre de 30 : 70. Des approches cinétiques complémentaires par diffraction des RX et particulièrement par spectroscopie RMN ^{31}P ont enfin confirmé la pertinence de la méthode mise au point par spectroscopie FTIR en conduisant à des profils cinétiques de prise similaires.

Chapitre 3

Etude des ciments chargés en argent



L'implantation d'un matériau « étranger » au corps humain est un acte délicat qui ouvre la voie à de possibles infections. Malgré l'application de procédures chirurgicales respectant une stricte asepsie et une attention particulière à la stérilisation du produit implanté – ici un substitut osseux – il est impossible de s'affranchir totalement d'une éventuelle contamination par des bactéries, pouvant même provenir du patient lui-même. Or les infections post-opératoires sont une des premières causes d'échec en chirurgie orthopédique. Un enjeu majeur est donc de conférer des propriétés antibactériennes au ciment, de manière à éviter le développement de l'infection dans le cas où des bactéries seraient présentes à sa surface. L'agent antibactérien choisi dans cette étude est l'argent (cf. Chapitre 1 - § 4.3). Cette partie de l'étude s'attache ainsi à présenter deux voies d'introduction de l'argent dans le ciment – par sa phase solide ou sa phase liquide – et à mettre en évidence l'impact de cet additif sur les propriétés physico-chimiques du ciment.

1 L'orthophosphate d'argent Ag_3PO_4 : synthèse, caractérisation et propriétés

1.1 Choix de l'orthophosphate d'argent

Le ciment CaCO_3 – CaP étant constitué principalement de phosphates et de carbonates (cf. chapitre 2), les premiers sels d'argent envisagés pour l'introduction d'ions Ag^+ dans le matériau ont été l'orthophosphate d'argent Ag_3PO_4 et le carbonate d'argent Ag_2CO_3 . Ils ont été introduits sous forme de poudre dans la phase solide du ciment, d'autant que leur très faible solubilité^[26] ne permettait pas de les introduire par voie liquide dans une gamme de concentration assez large. Il s'est avéré que dans le cas d' Ag_2CO_3 , une phase Ag_3PO_4 , de solubilité moindre, précipitait rapidement dans le ciment au cours de la prise^[27]. L'orthophosphate d'argent a donc été choisi comme principal sel d'étude pour conférer des propriétés antibactériennes au ciment. Néanmoins il nous a semblé

²⁶ Leur solubilité, exprimée en concentration massique d'argent, est de $s_{\text{Ag}_3\text{PO}_4} = 4,95 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et $s_{\text{Ag}_2\text{CO}_3} = 2,83 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ à 20°C.

²⁷ Etude préliminaire dont les résultats, en particulier l'identification de la phase Ag_3PO_4 par DRX, n'est pas présentée ici.

intéressant d'utiliser également un sel plus soluble pouvant permettre d'introduire l'argent en phase liquide : d'une part la voie d'introduction peut avoir un effet différent sur les propriétés physico-chimiques et biologiques du ciment, d'autre part cela permet de tester des concentrations très faibles en argent et particulièrement pour l'évaluation des limites d'activité antibactérienne et de la cytotoxicité (cf. chapitre 5). Des concentrations inférieures à 0,03 % m/m en argent seraient difficiles à mettre en œuvre par voie solide sur quelques grammes de ciments. Ainsi, l'utilisation de solutions de nitrate d'argent – de solubilité 1485 g.L^{-1} d'argent à 25°C – comme phase liquide constitue une alternative comme voie d'introduction d'argent dans le ciment.

1.2 Structure

L'orthophosphate d'argent Ag_3PO_4 cristallise dans une structure cubique de groupe d'espace $P43n$, de paramètre de maille $a = 6,004 \text{ \AA}$ [Ng 1978]. Les phosphates tétraédriques PO_4 forment un réseau cubique centré dans lequel les ions Ag^+ occupent les positions 12(h) (Figure 3.1) [Ma 2011].

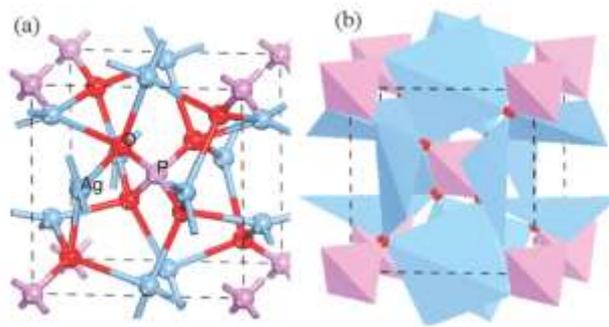


Figure 3.1 – Maille cubique unitaire de Ag_3PO_4 [Ma 2011].

1.3 Synthèse

Le phosphate d'argent a été préparé par double décomposition à partir d'un mélange stœchiométrique de nitrate d'argent AgNO_3 et d'hydrogénophosphate de sodium dodécahydraté $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, chacun de ces sels ayant été au préalable dissous dans de l'eau désionisée (Tableau 3.1). La solution d'argent est ajoutée rapidement à la solution de phosphate. Le précipité jaune vif ainsi formé est filtré sur Büchner, lavé avec 500 mL d'eau désionisée puis placé au lyophilisateur. Il est à noter que l'orthophosphate d'argent noircit rapidement à la lumière, particulièrement en solution juste après sa précipitation. Toute la verrerie utilisée et le Büchner ont ainsi préalablement été couverts de feuilles d'aluminium de manière à conserver la solution et la poudre à l'obscurité pendant la synthèse, le séchage et le stockage du produit.

	n_{sel} (mol)	m_{sel} (g)	V_{eau} (mL)
AgNO_3	0,036	6,12	200
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,012	4,30	300

Tableau 3.1 – Réactifs engagés dans la synthèse de l'orthophosphate d'argent

Grâce à ce protocole, environ 4 g de poudre de couleur jaune vif sont recueillis et stockés dans un flacon à température ambiante.

1.4 Caractérisation

Analyses structurales et morphologiques

Le diffractogramme de RX de la poudre synthétisée présenté sur la Figure 3.2 est caractéristique d'une phase Ag_3PO_4 ; il est constitué de raies fines qui attestent de l'excellent état cristallin de la poudre. Une observation MEB (Figure 3.3) montre des particules de taille relativement disperse : des cristaux micrométriques (de 1 à 10 μm) côtoient une population importante de cristaux de quelques dizaines voire quelques centaines de nanomètres. Notons que la plupart des plus gros cristaux sont facettés (Figure 3.3.b).

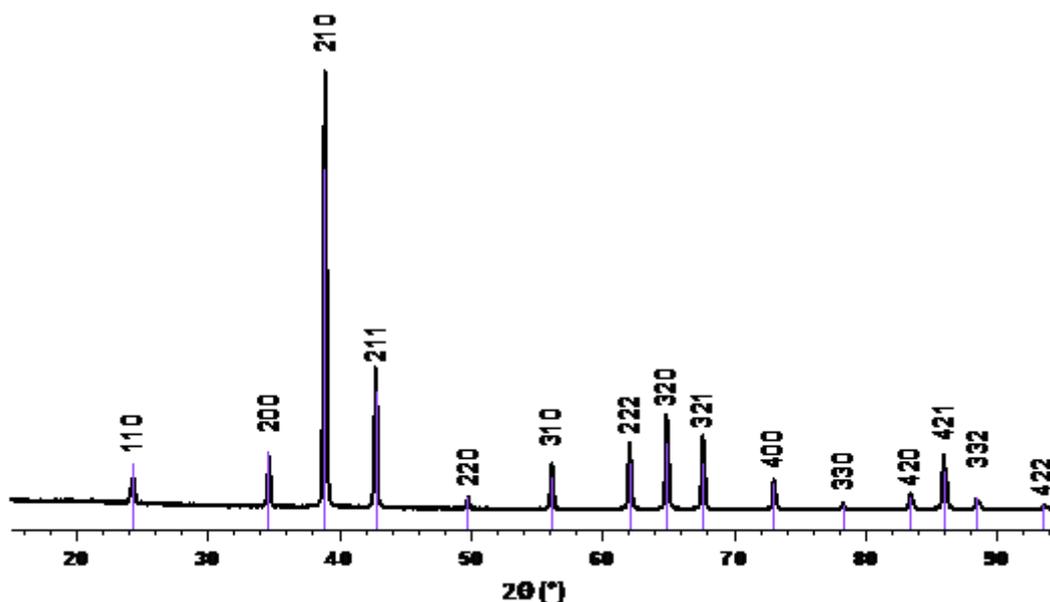


Figure 3.2 – Diffractogramme de rayons X de l'orthophosphate d'argent synthétisé (noir) et de la fiche JCPDS 00-06-0505 (violet) de l'orthophosphate d'argent

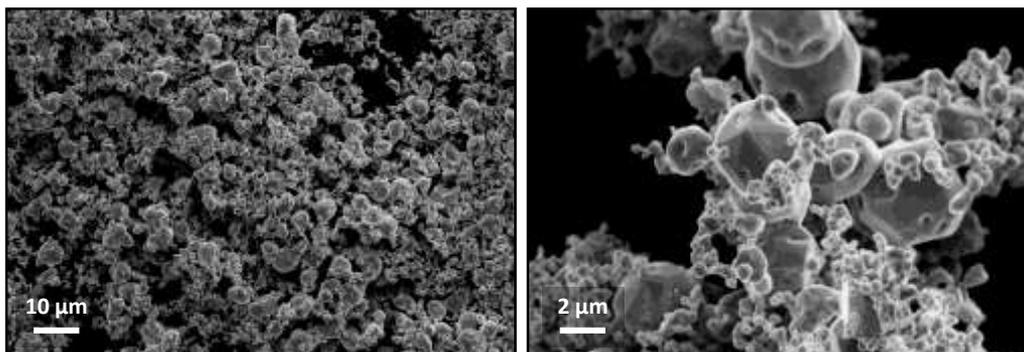


Figure 3.3 – Micrographies MEB de la poudre d'orthophosphate d'argent Ag_3PO_4 synthétisé, au grossissement (a) x1000 et (b) x5000

Analyse par spectroscopie FTIR

La spectroscopie FTIR en transmission – dans les conditions classiques d'analyse du matériau dans une pastille de KBr – ne permet pas de caractériser une phase Ag_3PO_4 . En effet, nous avons mis en évidence par DRX la formation rapide de bromure d'argent (AgBr) pendant le temps de la réalisation de la pastille (quelques minutes), en proportion d'autant plus importante que le temps de mélange du phosphate d'argent dans le KBr était long. La précipitation de AgBr peut s'expliquer par une solubilité moindre ^[28] et probablement par un phénomène de mécanosynthèse. ^[29]

Le spectre de la Figure 3.4 permet néanmoins d'identifier les bandes attribuées à différents modes de vibration des groupements PO_4 de l'orthophosphate d'argent, à 1017 cm^{-1} , 866 cm^{-1} et 558 cm^{-1} [Liang 2012]. Notons tout de même que cet auteur utilise également une matrice KBr, et donc observe probablement le même biais, peut-être non pris en compte dans l'attribution des bandes.

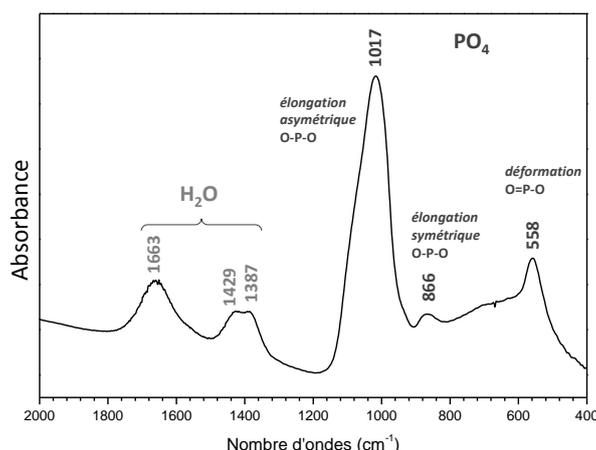


Figure 3.4 – Spectre FTIR de la poudre de Ag_3PO_4 synthétisée. Bandes attribuées d'après [Liang 2012].

²⁸ $K_{\text{Ag}_3\text{PO}_4} = 8,89 \cdot 10^{-17}$ et $K_{\text{AgBr}} = 5,35 \cdot 10^{-13}$, soit en terme d'activité ionique moyenne :
 $(K_{\text{AgBr}})^{1/2} = 7,3 \cdot 10^{-7} < (K_{\text{Ag}_3\text{PO}_4})^{1/4} = 9,7 \cdot 10^{-5}$

²⁹ Technique de fabrication mécanique de matériaux, qui consiste à broyer ensemble des poudres jusqu'à ce qu'on obtienne des alliages ou de fins mélanges

Analyses par spectroscopie RMN

Le spectre RMN ^{31}P de Ag_3PO_4 (Figure 3.5) présente une bande très fine à 29,0 ppm. Un tel déplacement chimique a déjà été reporté dans la littérature pour l'orthophosphate d'argent [Machida 1995].

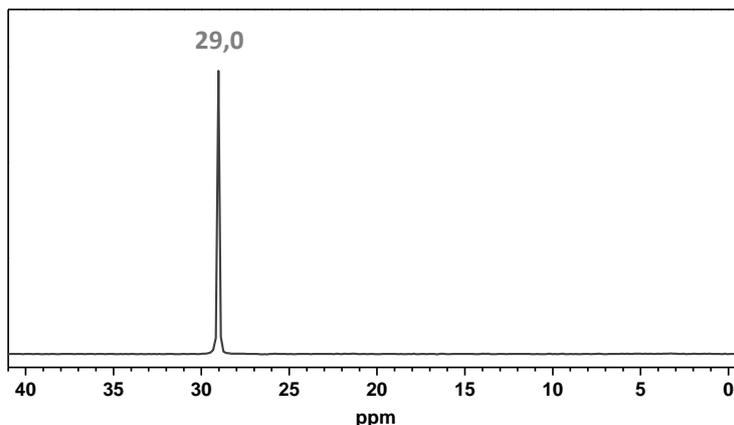


Figure 3.5 – Spectre RMN MAS ^{31}P de Ag_3PO_4 synthétisé.

Néanmoins, peu d'études par RMN du solide ont été réalisées sur l'orthophosphate d'argent et, à notre connaissance, aucune ne justifie un tel déplacement chimique, plus élevé que celui des orthophosphates de manière générale. Machida et coll. associent ainsi une valeur expérimentale de 28,6 ppm à une unité monomère PO_4 de type Q^0 – dont les oxygènes sont non-pontants – par comparaison à des déplacements moindres pour des espèces comme $\text{Ag}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ($\delta = 7,3$ ppm) ou AgPO_3 ($\delta = -13,1$ ppm et $-15,4$ ppm) dont les tétraèdres PO_4 présentent respectivement un et deux atomes d'oxygène pontants (Q^1 et Q^2) [Machida 1995]. Néanmoins, si effectivement un caractère Q^0 de PO_4 conduit à un phosphore plus déblindé que lorsqu'une partie des atomes d'oxygène sont pontants, cela n'explique pas un déplacement aussi élevé du signal. En effet, d'après la littérature, les orthophosphates anhydres de type X_3PO_4 – également de type Q^0 – ont des déplacements chimiques compris entre $-7,1$ ppm et $10,8$ ppm (Tableau 3.2) [Hayashi 1989]. Turner et coll. ont relié le déplacement chimique isotrope δ_i de ces phosphates à l'électronégativité de Pauling du cation (EN) par l'équation :

$$\delta_i = -35,5(EN) + 41,4 \quad (3.1)$$

Cette relation serait valable pour des orthophosphates anhydres qui ne contiennent qu'un cation et pas d'autres anions. En l'appliquant à Ag_3PO_4 , qui vérifie ces conditions, avec $EN_{\text{Ag}} = 1,93$, on obtiendrait un déplacement de $-27,1$ ppm à l'opposé de celui expérimentalement obtenu. Turner et coll. notent tout de même qu'étant donnée la dispersion des points autour de la droite ($R^2 = 0,92$), la relation aurait difficilement un rôle de prédiction. Par ailleurs, d'autres valeurs expérimentales de déplacement de différents orthophosphates ne vérifient pas non plus cette équation (Tableau 3.2).

Les données suivraient même une tendance inverse : un cation plus électronégatif déblinderait d'autant plus le phosphore [Hayashi 1989].

Turner et coll. ont également proposé une corrélation entre le déplacement chimique, la charge du cation et son rayon ionique [Turner 1986] :

$$\delta_i = -7,7 Z/\sqrt{r} + 18,6 \quad (3.2)$$

Or d'après Ma et coll. la charge de l'argent dans Ag_3PO_4 serait de $Z = +0,45$ et $r(\text{Ag}^+(\text{IV})) = 1,0 \text{ \AA}$ d'où un déplacement de 15,1 ppm pour le signal ^{31}P de Ag_3PO_4 , encore éloigné de la valeur expérimentale [Ma 2011; Shannon 1976]. Cette équation ne permettrait de toute manière pas d'expliquer de déplacements chimiques supérieurs à 18,6 ppm.

	δ_{exp} (ppm)	EN	δ_{EN} d'après [Turner 1986]
Ag_3PO_4 [a]	29,0	1,93	-27,1
Li_3PO_4 [b]	10,8	0,98	6,6
Na_3PO_4 [b]	14,0	0,93	8,4
K_3PO_4 [b]	12,5	0,82	12,3
Rb_3PO_4 [b]	0,5	0,82	12,3
	-0,2		
	-0,9		
	-5,2		
Cs_3PO_4 [b]	-5,6	0,79	13,4
	-3,1		
	-5,1		
	-6,4		
	-7,1		

Tableau 3.2 – Déplacements chimiques expérimentaux de différents orthophosphates ([a] donnée de cette étude ; [b] [Hayashi 1989]) et comparaison au modèle proposé par [Turner 1986].

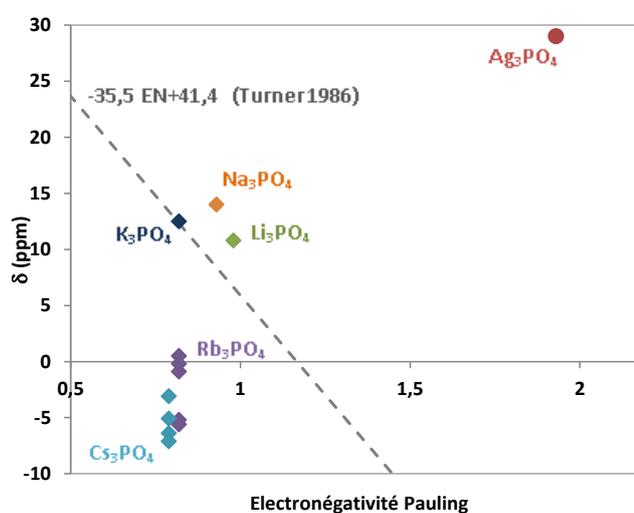


Figure 3.6 – Variation du déplacement chimique d'orthophosphates en fonction de l'électronégativité de Pauling (EN). (cf. Tableau 3.2)

Il apparaît donc que le blindage du ^{31}P dans les orthophosphates dépend de relations plus complexes que celles proposées dans la littérature. L'orthophosphate d'argent, notamment, a des propriétés semi-conductrices [Yi 2010; Bi 2011] contrairement aux orthophosphates d'alcalin et alcalino-terreux. Il est envisageable que des niveaux d'énergies singuliers aient un impact sur le déplacement chimique ^{31}P .

2 Ciments chargés en argent

Nous présenterons dans cette partie les protocoles d'élaboration de ciments contenant de l'argent introduit soit dans la phase solide sous forme d' Ag_3PO_4 , soit dans la phase liquide sous forme d' AgNO_3 . Une concentration relativement importante d'argent ($\text{Ag}/\text{Ca} = 0,097$) a été choisie de manière à mettre en évidence l'effet de l'argent sur les propriétés physico-chimiques du ciment au cours de la prise. Des matériaux incluant des concentrations moindres d'Ag seront présentés dans le chapitre 5 pour une caractérisation de leurs propriétés biologiques.

2.1 Elaboration des ciments

2.1.a Introduction de Ag_3PO_4 dans la phase solide

Le protocole de mise en œuvre du ciment utilisé est le même que celui décrit précédemment (chapitre 2, § 2.1.a). L'argent est introduit sous forme de sel de phosphate Ag_3PO_4 de synthèse (§ 1.3) dans la phase solide avec la brushite et la vatérite, avant homogénéisation des poudres à la spatule et au pilon. Une attention particulière a été portée lors de l'homogénéisation du mélange, de manière à ce qu'il soit bien réparti au sein de la phase solide et par conséquent du ciment qui sera noté C-Ag(S). La composition de la phase solide du ciment C-Ag(S) ainsi élaboré est reportée dans le Tableau 3.3.

2.1.b Introduction de AgNO_3 dans la phase liquide

Dans le cas du ciment C-Ag(L) pour lequel l'argent est introduit en phase liquide, l'eau désionisée utilisée comme phase liquide dans les différents matériaux précédemment présentés a été remplacée par une solution de nitrate d'argent. De manière à être comparable au ciment C-Ag(S), la quantité d'argent introduite a respecté le même rapport $\text{Ag}/\text{Ca} = 0,097$ (cf. Tableau 3.3). Usuellement, dans les ciments, lorsque la phase liquide est modifiée, le rapport massique L/S est fixé pour comparer les différents matériaux. Néanmoins dans le cas du ciment C-Ag(L), le rapport $\text{L}/\text{S} = 0,55$ équivaut à un rapport eau/S de 0,43 soit de l'ordre de 20 % d'eau de moins que C-Ag(S) ce qui ne permet pas le gâchage et la mise en forme de la pâte. Nous avons donc fait le choix de conserver le rapport eau/S = 0,55 plutôt que le rapport L/S.

Dès l'ajout de la solution de nitrate d'argent au mélange brushite/vatérite à t_0 , on note une coloration jaune du milieu. Celle-ci a été identifiée par DRX comme étant due à la précipitation de phosphate d'argent.

Nomenclature	% Ag	Phase S (m/m)			Phase L (m/m)	
		Ag/Ca	Ca/P	Ca/C	L/S	eau/S
C-REF	0	0	2,72	1,58	0,55	0,55
C-Ag(S)	Phase S : 7,5 % m/m	0,097	2,50	1,58	0,55	0,55
C-Ag(L)	Phase L ~ 7,5 % m/m dans la phase S	0,097	2,72	1,58	0,68	0,55

Tableau 3.3 – Compositions des ciments C-REF, C-Ag(S) et C-Ag(L)

2.2 Caractérisation d'un ciment totalement pris

2.2.a Composition des ciments (DRX)

La Figure 3.7 présente les diffractogrammes de RX des ciments C-Ag(S) et C-Ag(L), après la prise et le durcissement. Très similaires à celui d'un ciment de référence, ces diagrammes présentent les mêmes raies caractéristiques de la vatérite qui n'a pas réagi et d'une apatite nanocristalline formée au cours de la prise. Dans les deux ciments contenant de l'argent, une phase Ag_3PO_4 bien cristallisée se distingue. Ainsi, l'introduction de la solution de nitrate d'argent dans le milieu $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{CaCO}_3$ conduit de manière quasi instantanée à une dissolution partielle de la brushite et à la précipitation de l'orthophosphate d'argent, de très faible solubilité.^[30]

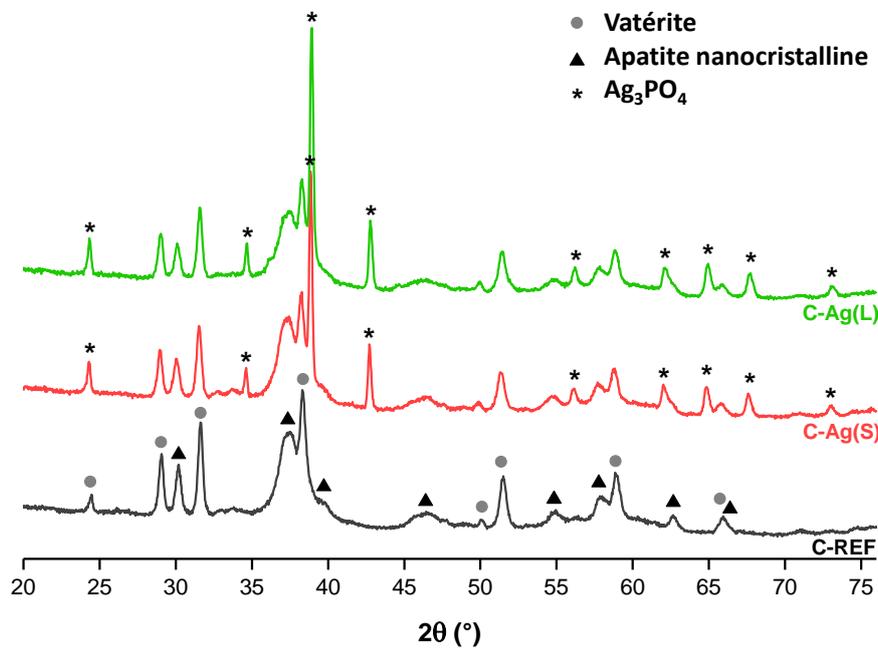


Figure 3.7 – Diffractogrammes de RX des ciments chargés en argent ($\text{Ag}/\text{Ca} = 0,097$), introduit par voie solide ou liquide (C-Ag(S) et C-Ag(L) respectivement) comparés au ciment de référence C-REF.

³⁰ $K_{\text{S}_{\text{Ag}_3\text{PO}_4}} = 8,89 \cdot 10^{-17}$ et $K_{\text{S}_\text{B}} = 2,77 \cdot 10^{-7}$, à 25°C, soit en terme d'activité ionique moyenne :
 $(K_{\text{S}_{\text{Ag}_3\text{PO}_4}})^{1/4} = 9,7 \cdot 10^{-5} < (K_{\text{S}_\text{B}})^{1/2} = 5,3 \cdot 10^{-4}$

2.2.b Observations au microscope optique

La Figure 3.8 montre des photos des ciments C-REF, C-Ag(S) et C-Ag(L) prises au microscope optique. Outre une couleur jaune marquée, on remarque une présence de macropores plus importante dans les ciments chargés en argent, particulièrement le ciment C-Ag(L).

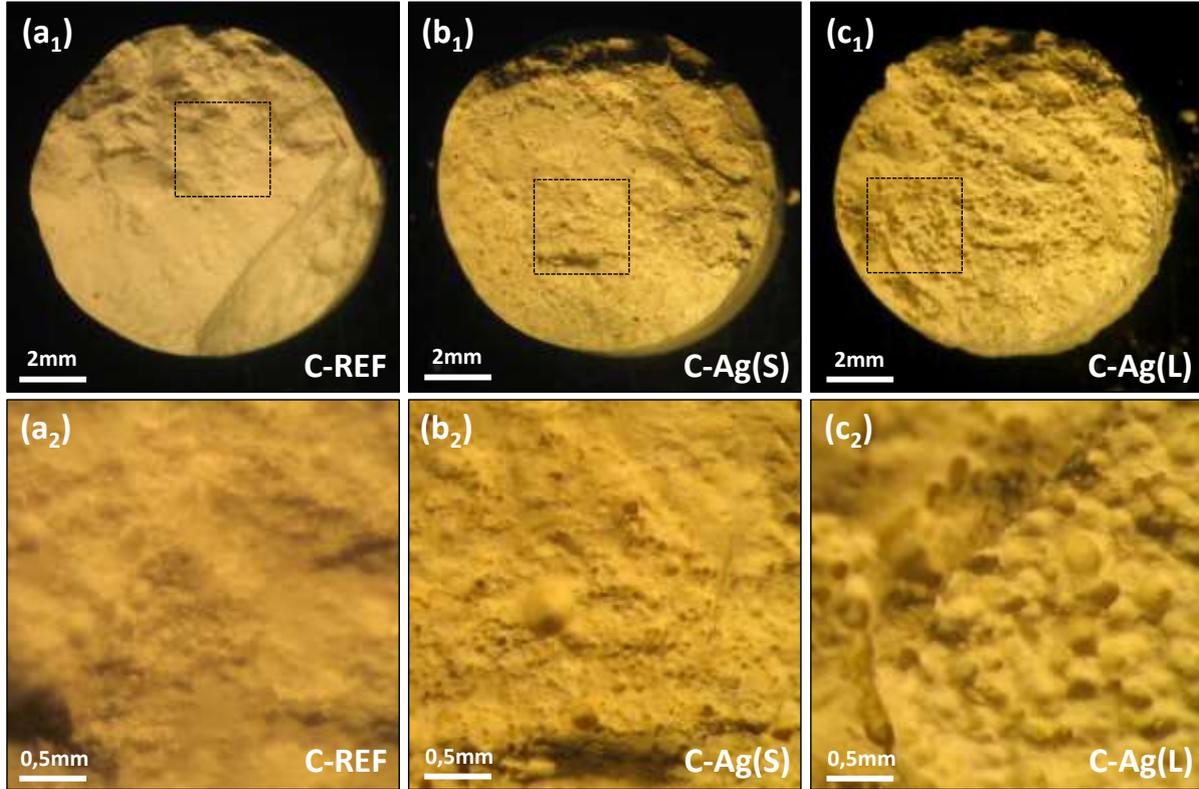


Figure 3.8 – Photos des ciments (a) C-REF, (b) C-Ag(S) et (c) C-Ag(L) aux grossissements x 20,5 (indice « 1 ») et x 82 (indice « 2 »).

2.2.c Répartition de l'argent dans le matériau (MEB)

L'observation par MEB en mode de détection des électrons rétrodiffusés permet de faire apparaître un contraste chimique dans le matériau : l'argent, élément beaucoup plus lourd que le reste des composants du matériau, apparaît ainsi de manière beaucoup plus claire sur l'image. Les micrographies présentées Figure 3.9 montrent deux différences majeures entre les ciments C-Ag(S) et C-Ag(L) : la taille et la répartition des particules d'Ag₃PO₄. Dans le cas de C-Ag(S), ces particules, d'environ 2 μm, sont réparties de manière homogène alors que des particules beaucoup plus petites (quelques centaines de nanomètres) apparaissent plus ou moins concentrées dans certaines zones du ciment C-Ag(L).

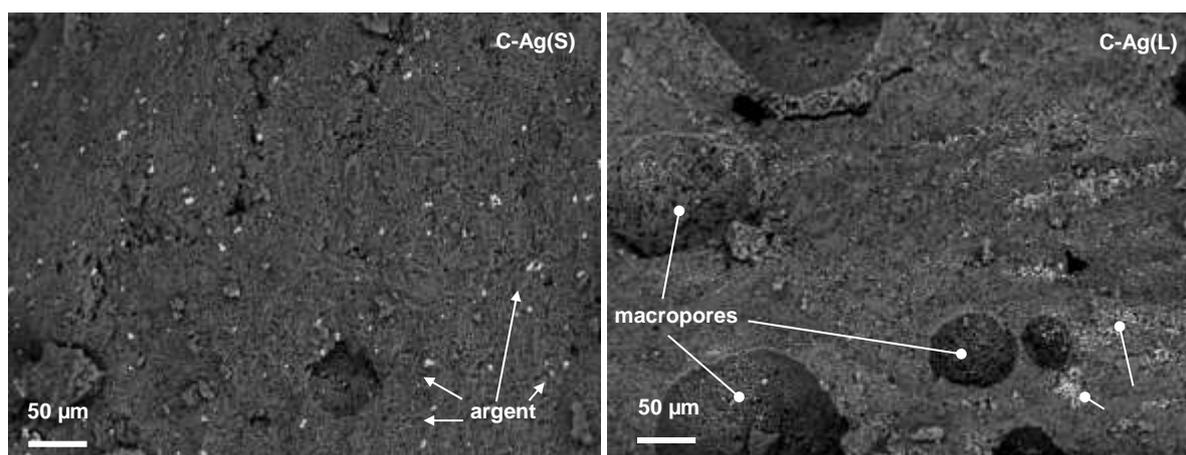


Figure 3.9 – Micrographies par MEB en électrons rétrodiffusés des ciments C-Ag(S) et C-Ag(L) montrant la répartition de l'argent (élément apparaissant en blanc).

Ces deux paramètres clés pourraient avoir un impact sur l'activité antibactérienne du ciment. Une répartition homogène de l'argent est bien entendu nécessaire de manière à contrôler la concentration locale en agent antibactérien dans tout le matériau. Dans le cas de C-Ag(S), l'homogénéisation se fait au sein de la phase solide, elle est donc facilement contrôlable, même à une échelle industrielle, en validant le protocole et le temps de mélange avant l'emballage et la stérilisation de la phase solide. Dans le cas du ciment C-Ag(L), la précipitation de l'argent sous forme Ag_3PO_4 se fait dès l'ajout de la phase liquide, à l'interface entre les deux phases, dont la surface est difficile à déterminer. La pâte est ensuite gâchée pendant environ 1'30 ce qui permet une certaine homogénéisation à l'échelle macroscopique. Néanmoins, au vu des analyses MEB, il serait nécessaire d'optimiser la procédure et le temps de gâchage pour arriver à une répartition homogène de l'argent dans le matériau également à une échelle microscopique. La validation de l'homogénéité du mélange apparaît alors plus délicate. En effet, cette étape de gâchage n'est plus réalisée en amont, mais par le chirurgien juste avant implantation.

La taille des particules, elle, peut être discutée en termes de solubilité : dans la mesure où elles ont la même composition et la même cristallinité, en raison de la prise en compte nécessaire de l'énergie interfaciale, les particules les plus petites auront une solubilité plus importante que les grosses. Toutefois cet effet reste difficile à évaluer. Par ailleurs, en raison d'une surface spécifique plus importante, les petites particules d' Ag_3PO_4 auront également a priori une vitesse de dissolution plus grande. Il est probable que, dans ce cas, la cinétique de libération des ions Ag^+ soit plus rapide. Or dans le cadre de cette application, l'objectif est de conférer des propriétés antibactériennes dans un rôle préventif, pour éviter toute croissance des bactéries en surface du matériau, non dans un rôle curatif (cf. chapitre 5). Il semble ainsi plus intéressant de maintenir une concentration suffisante d'argent en surface et d'éviter sa libération trop rapide, ce qui serait en faveur d'une taille plus

importante. Pourtant, des particules de plus petites tailles réparties de manière homogène pourraient conférer des propriétés antibactériennes au matériau à des teneurs plus faibles en argent mais pour une durée plus réduite.

Nous pouvons enfin noter un plus grand nombre de macropores de quelques dizaines voire quelques centaines de micromètres dans le ciment C-Ag(L) que dans le ciment C-Ag(S) ou le ciment de référence C-REF (cf. Figure 2.38). Ces macropores sont a priori formés lors du dégagement de CO_2 par dégradation de la vatérite alors que la pâte est encore malléable et non physiquement figée par la prise. Il semblerait donc que la libération de CO_2 soit plus importante ou plus précoce dans le cas du ciment dont la phase liquide est une solution de nitrate d'argent. Ce phénomène pourrait être lié à la formation rapide d' Ag_3PO_4 aux dépens de la brushite et à l'acidification du milieu, comme nous en discuterons plus loin.

2.2.d Caractéristiques de l'apatite par RMN du solide

Si l'on se penche sur les résultats obtenus par RMN du solide ^{31}P sur ces ciments chargés en argent (Figure 3.10), deux signaux apparaissent : un signal très fin à 29,0 ppm, caractéristique des ions phosphate de l'orthophosphate d'argent, et un signal beaucoup plus large autour de 3,8 ppm, caractéristique de ceux de l'apatite. Les spectres ont été normalisés par rapport à la masse de matériau initialement introduite, nous pouvons donc considérer que l'aire des bandes liées aux phosphates est directement proportionnelle à leur teneur au sein du ciment.

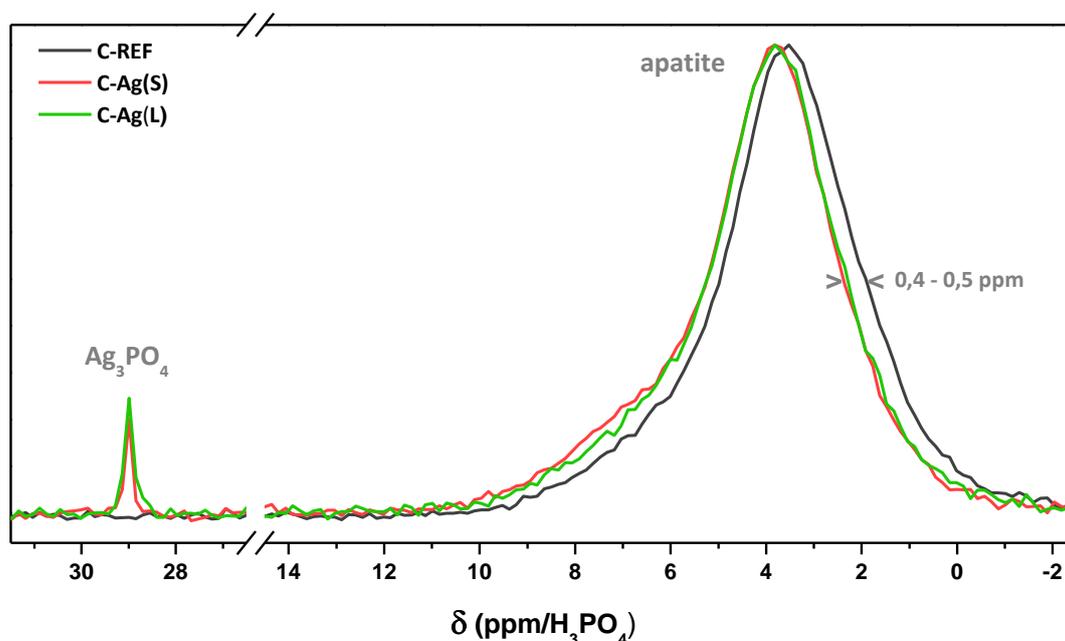


Figure 3.10 – Spectres RMN MAS ^{31}P des ciments C-REF, C-Ag(S) et C-Ag(L).

Si l'on analyse plus finement le signal ^{31}P de l'apatite, il semble qu'il y ait un léger décalage entre le ciment C-REF et les deux ciments C-Ag(S) et C-Ag(L) où de l'argent a été introduit à un teneur de $\text{Ag}/\text{Ca} = 0,097$. Cette différence de déplacement, de l'ordre de + 0,4 à 0,5 ppm dans les ciments chargés en argent par rapport au ciment C-REF, apparaît de manière particulièrement nette et significative.^[31] Ainsi l'introduction d'argent dans le ciment a un impact sur l'environnement direct des phosphates de l'apatite formée pendant la prise.

3 Temps de prise

Le temps de prise des ciments a été mesuré par la méthode normalisée des aiguilles de Gillmore (cf. Annexe 2.6). Les temps de prise initial et final ont été évalués à 1h15 et 2h15 respectivement pour le ciment de référence (sans argent) (Tableau 3.4). Il apparaît que l'introduction d'argent dans la composition n'a pas d'influence significative sur ces valeurs, néanmoins un léger retard de la prise a été observé pour le ciment C-Ag(L).

Ciment	Temps de prise initial (t_i)	Temps de prise final (t_f)
C-REF	1h15	2h15
C-Ag(S)	1h15	2h00
C-Ag(L)	1h30	2h15

Tableau 3.4 – Temps de prise des différents ciments mesuré par les aiguilles de Gillmore. Les mesures ont été réalisées toutes les 15 minutes et trois fois pour chaque ciment.

Ces temps sont relativement longs pour une application en chirurgie orthopédique ; une étude sur l'effet d'un accélérateur de prise sera présentée dans le chapitre 4.

4 Etude de la cinétique de la réaction de prise des ciments contenant de l'argent

La cinétique de la réaction chimique de prise des ciments contenant de l'argent a été étudiée, dans une approche semi-quantitative, à la fois par spectroscopie FTIR – suivant la méthode présentée dans le chapitre 2 – et par spectroscopie RMN. L'approche chimique est ainsi

³¹ D'une part la résolution spectrale est de 0,15 ppm et d'autre part deux autres échantillons C-REF et C-Ag(S), dont les analyses ne sont pas présentées dans ce manuscrit, ont montré des spectres parfaitement superposables avec les courbes de la Figure 3.10, ce qui confirme le caractère significatif de ce décalage.

complémentaire aux temps de prise (prise physique) déterminés par la méthode des aiguilles de Gillmore (cf. § 3).

L'étude par spectroscopie FTIR menée sur les ciments C-Ag(S) et C-Ag(L) ($Ag / Ca = 0,097$) a pour but de comparer les deux voies d'introduction de l'argent dans le ciment de référence à ce dernier (C-REF, sans argent). Seul le ciment C-Ag(S) a été caractérisé par spectroscopie RMN afin d'étudier plus finement l'effet de l'argent sur la composition du ciment au cours du temps – notamment sur les propriétés de l'apatite formée – et de confronter les deux méthodes d'analyses semi-quantitatives.

Les mécanismes réactionnels impliqués dans la réaction de prise lorsque l'argent est ajouté dans le ciment par voie solide ou par voie liquide seront discutés dans un second temps.

4.1 Approche semi-quantitative par spectroscopie FTIR

4.1.a Remarque préliminaire propre à l'étude par spectroscopie FTIR de ciments contenant de l'argent

Nous avons évoqué une possible ambiguïté lors de l'analyse d'une phase Ag_3PO_4 par spectroscopie FTIR en mode transmission étant donné la précipitation de bromure d'argent dans la pastille (cf. § 1.4). L'étude présentée ci-après s'attache donc à l'observation uniquement de la brushite, de la vatérite et de l'apatite au sein du ciment. Les phosphates du sel d'argent vibrent à une fréquence autour 560 cm^{-1} , très proche d'une bande de vibration ν_4 des PO_4 de l'apatite (562 cm^{-1}). Nous avons néanmoins conservé le même modèle de décomposition (cf. chapitre 2, § 2.3.b), la bande lorentzienne à 562 cm^{-1} étant désormais issue de la contribution des deux phases (apatite et phosphate d'argent). Le sel d'argent n'a par contre pas d'influence sur les bandes à 745 cm^{-1} , 617 & 603 cm^{-1} et 525 cm^{-1} utilisées pour le dosage semi-quantitatif respectivement de la vatérite, de l'apatite et de la brushite dans le ciment. ^[32]

4.1.b Spectres FTIR des ciments chargés en argent

La Figure 3.11 présente les spectres FTIR des ciments chargés en argent C-Ag(S) et C-Ag(L) comparés au ciment C-REF, après différents temps de maturation dans une étuve à 37°C dans une atmosphère saturée en eau. Nous pouvons nettement observer que, déjà à $t = 1\text{ h}$ et encore plus à $t = 4\text{ h}$, la disparition de la phase brushitique (bande caractéristique à 525 cm^{-1}) en faveur de la formation d'apatite (mise en évidence en particulier à 603 cm^{-1} et 617 cm^{-1}) est beaucoup plus

³² La composition similaire obtenue à l'issue de la décomposition pour C-Ag(S)₀, C-Ag(L)₀ et C-REF₀, dont le mélange respectait les mêmes proportions en vatérite et en brushite ont confirmé cette hypothèse.

significative pour C-Ag(L) que pour les deux autres matériaux (C-REF et C-Ag(S)). Cependant, après 48 h, cette bande de brushite à 525 cm^{-1} n'apparaît ni pour C-Ag(L), ni pour C-Ag(S) – suggérant que ce réactif a été entièrement consommé – alors qu'elle apparaît encore nettement pour le ciment de référence (sans argent).

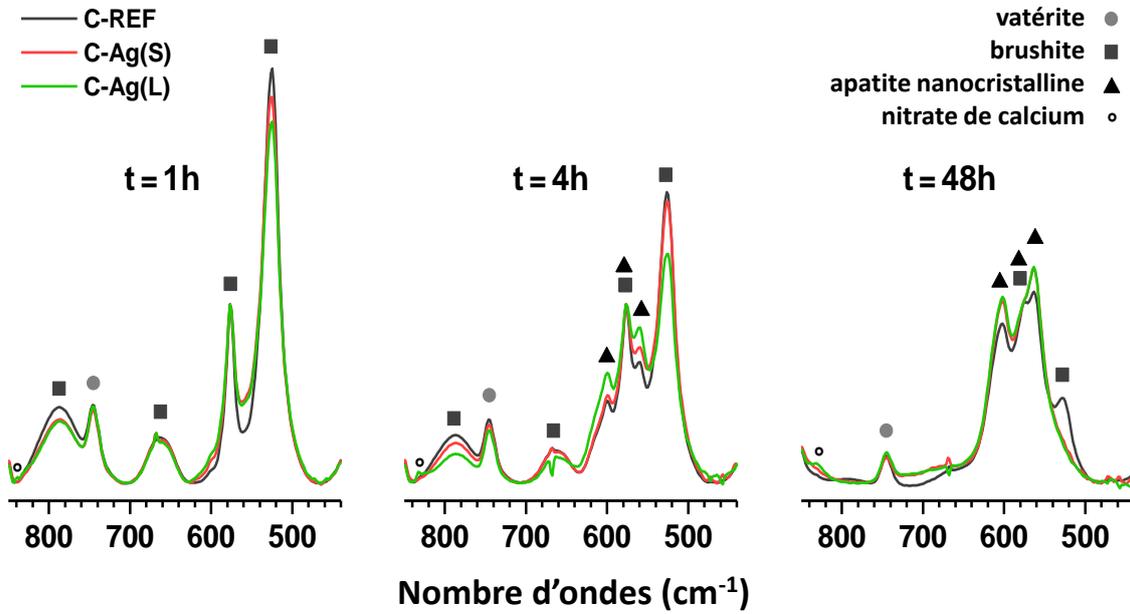


Figure 3.11 – Superposition des spectres FTIR (domaine $850 - 450\text{ cm}^{-1}$) des ciments C-REF (sans argent), C-Ag(S) et C-Ag(L) après différents temps de maturation (1 h, 4 h et 48 h)

4.1.c Etude de la cinétique de formation de l'apatite

Une approche semi-quantitative par spectroscopie FTIR a ainsi été menée à partir de la totalité des spectres de ces ciments C-Ag(S) et C-Ag(L) par comparaison avec l'étude déjà présentée pour le ciment C-REF dans le chapitre 2. L'évolution de la quantité d'apatite formée au sein du matériau est exposée sur la Figure 3.12. Ces données confirment que pendant les huit premières heures de maturation du ciment la présence d' Ag_3PO_4 dans la phase solide ne semble pas avoir d'influence significative sur la prise du ciment. Au contraire, la formation d'apatite est bien plus rapide dans le ciment C-Ag(L). Entre 8 h et 24 h, la courbe de la cinétique de C-Ag(S) se détache de celle du ciment de référence, témoignant d'un avancement plus rapide de la réaction de dissolution - reprécipitation, jusqu'à rejoindre le taux de formation d'apatite du ciment C-Ag(L). Enfin après 48 h, comme observé sur la Figure 3.11.c, les deux ciments contenant de l'argent apparaissent totalement pris en terme de réaction chimique de prise, alors que la réaction se poursuit dans le cas de C-REF.

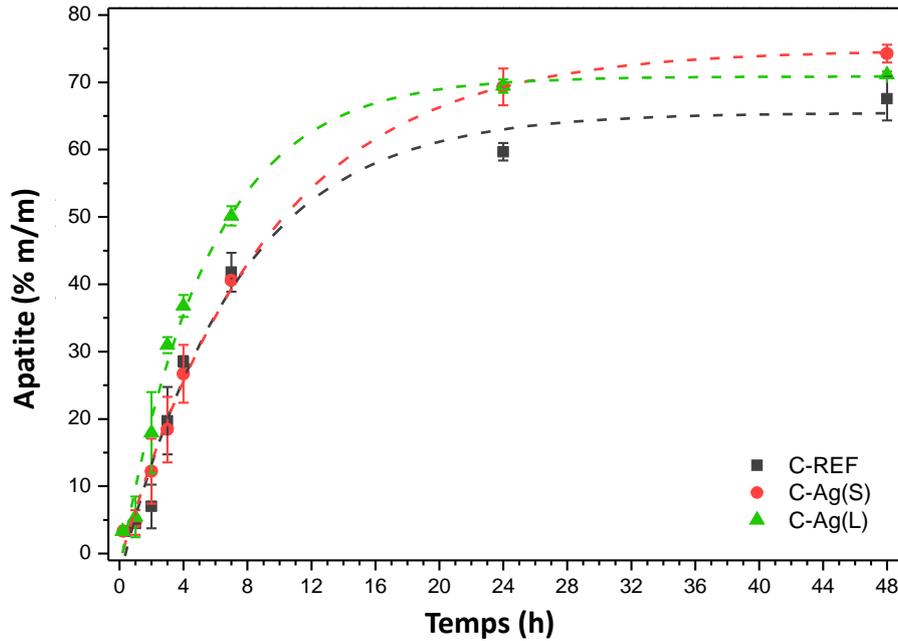


Figure 3.12 – Evolution de la quantité d’apatite formée dans les trois types de ciments étudiés. La quantité d’apatite est exprimée en pourcentage massique par rapport au mélange ternaire brushite / vatérite / apatite. Il est à noter que dans le cas de C-Ag(S) et C-Ag(L), une phase Ag_3PO_4 est également présente et non prise en compte. Chaque courbe de tendance peut être décrite par une équation de type $y(t) = a \cdot \exp(-t/\tau) + y_0$ dont les paramètres sont présentés dans le Tableau 3.5.

	a	τ (h^{-1})	y_0 (%)
C-REF	$-0,74 \pm 0,05$	$6,2 \pm 1,0$	$64,7 \pm 2,8$
C-Ag(S)	$-0,79 \pm 0,01$	$8,2 \pm 0,3$	$74,1 \pm 0,7$
C-Ag(L)	$-0,79 \pm 0,03$	$4,7 \pm 0,4$	$70,3 \pm 1,3$

Tableau 3.5 – Paramètres des courbes de tendance décrivant l’évolution de la quantité d’apatite formée en fonction du temps dans le cas des 3 types de ciment étudiés.

4.2 Approche semi-quantitative par spectroscopie RMN : C-Ag(S)

Une approche similaire d’analyse semi-quantitative de la composition du ciment au cours du temps a été menée par RMN du solide sur le ciment C-Ag(S). Les échantillons analysés sont ceux dont la réaction a été stoppée à t_0 , 3 h, 7 h et 48 h. Trois phases sont ainsi mises en évidence par RMN ^{31}P : la brushite, à 1,8 ppm ; l’apatite, à 3,7 ppm et l’orthophosphate d’argent, à 29,0 ppm.

4.2.a Présentation des spectres RMN ^{31}P

La Figure 3.13 présente les spectres RMN ^{31}P du ciment C-Ag(S) à quatre temps de maturation. Ils mettent ainsi en évidence la diminution de la bande correspondant aux HPO_4 de la brushite au profit de la formation d’apatite au cours du temps. Le ciment C-Ag(S)₀ ne présente que

les signaux de la brushite et du phosphate d'argent. De l'apatite apparaît dans les trois temps ultérieurs analysés, jusqu'à C-Ag(S)₄₈ ou seuls Ag₃PO₄ et l'apatite sont identifiés sur le spectre. La bande des phosphates du sel d'argent, d'intensité significative tout au long de la prise, voit néanmoins son aire diminuer, notamment après 48 h de prise (Figure 3.13 et Tableau 3.6).

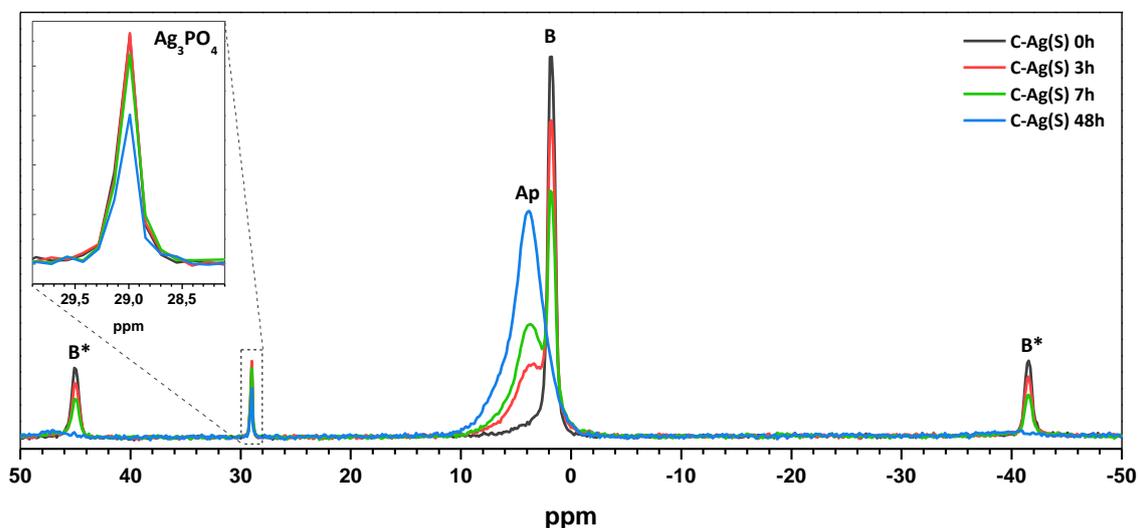


Figure 3.13 – Superposition des spectres RMN ³¹P BD du ciment C-Ag(S). Tous les spectres ont été normalisés par rapport à la masse de ciment analysée dans le rotor.

Ciment	t (h)	Aire de la bande Ag ₃ PO ₄ (%)
C-Ag(S) ₀	0,2	99
C-Ag(S) ₃	3	100 *
C-Ag(S) ₇	7	94
C-Ag(S) ₄₈	48	67

Tableau 3.6 – Données issues des spectres RMN ³¹P (BD) du ciment C-Ag(S) au cours de la prise : variation de l'aire de la bande caractéristique du phosphate d'argent. * Une aire de 100 % a été arbitrairement attribuée à la valeur maximale

4.2.b Analyse de l'apatite formée en cours de prise

Les ciments C-Ag(S)₀ et C-Ag(S)₄₈ correspondent ainsi à des mélanges triphasiques brushite / vatérite / Ag₃PO₄ et apatite / vatérite / Ag₃PO₄. Dans la gamme de déplacement comprise entre 12 ppm et -3 ppm, leurs spectres RMN ³¹P présentent donc une phase pure respectivement de brushite et d'apatite. Afin d'évaluer la quantité relative de brushite et d'apatite dans le ciment au

cours de la prise, nous avons modélisé les spectres de C-Ag(S)₃ et C-Ag(S)₇ en les exprimant comme une combinaison de C-Ag(S)₀ et C-Ag(S)₄₈^[33] :

$$\text{C-Ag(S)}_i = \alpha_i \text{C-Ag(S)}_0 + \beta_i \text{C-Ag(S)}_{48} \quad (3.3)$$

Les spectres obtenus par combinaison sont présentés pour C-Ag(S)₃ et C-Ag(S)₇ sur la Figure 3.14, superposés aux spectres expérimentaux. Il apparaît que les sommes de la phase brushitique (C-Ag(S)₀) et de la phase apatitique (C-Ag(S)₄₈), avec des coefficients (α_3, β_3) et (α_7, β_7) adaptés (Tableau 3.7), se superposent très bien avec les spectres expérimentaux. Nous pouvons tout de même noter un léger décalage de +0,1 à +0,5 ppm dans la gamme de déplacement 9 - 1 ppm entre la bande de l'apatite de chacun de ces spectres « réels » et des spectres obtenus par combinaisons (cf. agrandissements sur la Figure 3.14). Ce décalage, faible mais significatif,^[34] laisse penser que les phosphates de l'apatite formée après 48 h de maturation présenteraient un environnement légèrement différent de ceux des ciments après 3 h et 7 h de maturation. Ainsi, l'apatite de ces deux ciments en début de prise se rapprocherait plus de celle formée au sein d'un C-REF, l'argent n'interviendrait donc pas dans un premier temps dans l'environnement apatitique, contrairement au ciment C-Ag(S)₄₈, en fin de prise (cf. § 2.2.d).

Ciment	t (h)	Contribution de la brushite : α_i	Contribution de l'apatite : β_i
C-Ag(S) ₀	0,2	1	0
C-Ag(S) ₃	3	0,78	0,27
C-Ag(S) ₇	7	0,56	0,46
C-Ag(S) ₄₈	48	0	1

Tableau 3.7 – Détermination de la proportion relative de brushite et d'apatite à partir de la combinaison linéaire de raies des spectres RMN ³¹P (BD) du ciment C-Ag(S) au cours de la prise : coefficients α_i et β_i , significatifs de la quantité relative de brushite et d'apatite respectivement, déterminés d'après l'équation (3.3).

³³ La phase Ag₃PO₄ n'a pas été prise en compte dans cette modélisation.

³⁴ La résolution spectrale est de 0,15 ppm. D'autre part, les bandes de la brushite du spectre expérimental et du spectre modélisé, elles, sont dans les deux ciments C-Ag(S)₃ et C-Ag(S)₇ parfaitement superposées sans aucun décalage.

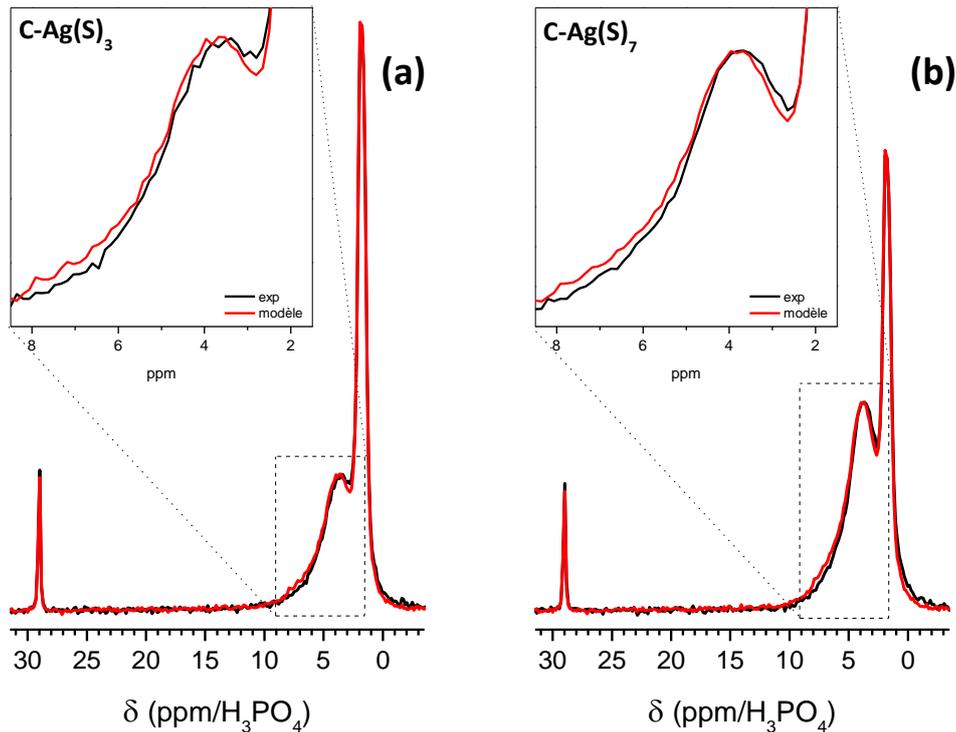


Figure 3.14 – Superposition des spectres RMN ^{31}P expérimentaux et des modèles obtenus par combinaison des spectres de C-Ag(S) $_0$ et C-Ag(S) $_{48}$: (a) C-Ag(S) $_3$ et (b) C-Ag(S) $_7$. La gamme 9 - 1 ppm a été agrandie pour plus de lisibilité.

4.2.c Cinétique de formation de l'apatite

Les coefficients α_i et β_i précédemment déterminés (Tableau 3.7) l'ont été sur des spectres dont l'intensité a été normalisée par rapport à la masse de ciment analysée. Ils ont donc une valeur quantitative quant à la dissolution de la brushite et la précipitation de l'apatite. En spectroscopie FTIR, le dosage a permis d'évaluer un pourcentage massique des phases par rapport au mélange triphasique brushite / vatérite / apatite et n'a pas pris en compte la phase Ag_3PO_4 . Pour être en mesure de comparer les deux méthodes, nous avons exprimé de la même manière le pourcentage massique de brushite et d'apatite par rapport à ce mélange triphasique en prenant en compte la teneur initiale en Ag_3PO_4 dans le matériau analysé (9,7 % m/m de sel, équivalent à 7,5 % m/m de Ag) et sa dissolution au cours du temps. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.15, comparés aux résultats obtenus par spectroscopie FTIR.

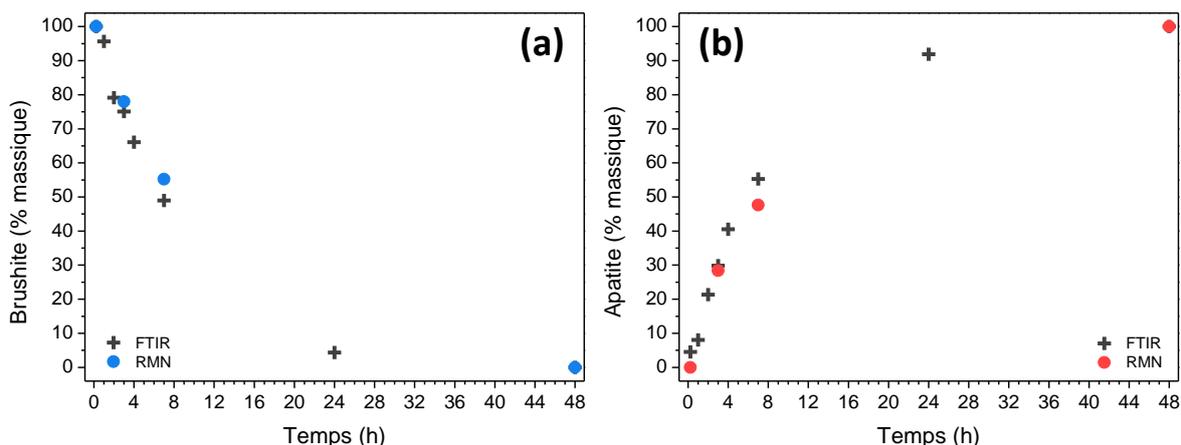


Figure 3.15 – Evolution de la composition relative de C-Ag(S) en brushite et en apatite au cours du temps : comparaison de l'analyse par RMN du solide (couleur) et par spectroscopie FTIR (gris) (§ 4.1.c).

La confrontation de ces données montre une analogie dans les résultats issus des deux techniques d'analyses et méthodologies de traitement des données spectrales mises en œuvre. Comme nous l'avons mis en exergue sur un ciment C-REF (chapitre 2, § 2.3.d), l'analyse par RMN, dont les spectres sont mieux définis, valide que la méthode de dosage mise au point par spectroscopie FTIR est significative et ce même en présence de phosphate d'argent.

4.3 Discussion

4.3.a Mécanismes de réaction de prise

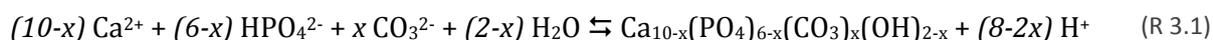
Dans cette étude, nous avons montré que l'introduction d'un sel d'argent dans la composition du ciment ne changeait pas le principe global de la réaction chimique impliquée dans la prise et le durcissement du ciment : au cours de la prise, la brushite se dissout et réagit avec une partie de la vatérite pour former une phase apatitique. Néanmoins une analyse semi-quantitative plus fine par spectroscopie FTIR a mis en évidence de légères différences dans la cinétique de la réaction chimique de prise des ciments C-Ag(S), C-Ag(L) et C-REF. L'analyse complémentaire des matériaux par RMN a d'autre part fait ressortir une différence d'environnement des phosphates de l'apatite.

Influence de Ag_3PO_4 sur la réaction de prise

Dans le cas du ciment C-Ag(S) pour lequel l'orthophosphate d'argent Ag_3PO_4 a été introduit dans la phase solide du ciment, nous pouvons distinguer deux étapes : pendant les huit premières

heures de la prise, la cinétique de formation de l'apatite suit parfaitement celle d'un ciment C-REF sans argent. Dans un second temps, la prise s'accélère et la réaction conduit à une quantité plus importante d'apatite formée dans le ciment après 48 h de maturation.

Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, Ag_3PO_4 a une solubilité très faible. Il ne jouera ainsi qu'un rôle « spectateur » dans le processus de dissolution reprécipitation impliqué dans la réaction de prise du ciment, ce qui explique qu'il n'ait pas d'effet significatif sur la cinétique de la réaction chimique en début de prise ni même sur la prise physique évaluée par les aiguilles de Gillmore. Cependant, à mesure que l'apatite se forme, le milieu s'acidifie légèrement selon l'équation suivante :



Cette acidification se neutralise partiellement en dissolvant de la vaterite, libérant ainsi une partie des carbonates sous forme de gaz carbonique. Mais elle pourrait également favoriser la dissolution du phosphate d'argent et modifier les équilibres des ions dans le liquide interstitiel. Ainsi, l'analyse spectrométrique par RMN MAS ^{31}P a montré une diminution de la bande Ag_3PO_4 pour l'échantillon C-Ag(S)₄₈ par rapport aux premiers temps de maturation^[35] (Figure 3.13) et d'autre part un déplacement de la bande de l'apatite (Figure 3.10), très probablement dû à l'introduction d'ions Ag^+ dans le réseau apatitique. Le phosphate d'argent passerait donc d'un rôle de « spectateur » à un rôle de réactif impliqué dans le processus de réaction de prise, à la fois en tant que source de phosphates et d'ions Ag^+ . Ceci expliquerait une légère accélération de la cinétique en fin de prise et une quantité d'apatite formée plus importante.

Influence de AgNO_3 sur la réaction de prise

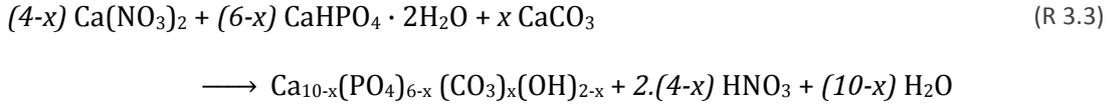
Dans le ciment C-Ag(L) pour lequel l'argent est introduit sous forme d'une solution de nitrate d'argent utilisée comme phase liquide du ciment, une phase de phosphate d'argent précipite de manière quasi instantanée dès le mélange des deux phases. Cette première réaction (R 3.2) induit d'une part la dissolution d'une partie de la brushite – ce qui est en accord avec la décroissance plus rapide de la bande à 525 cm^{-1} par spectroscopie FTIR (Figure 3.11) – et d'autre part une acidification du milieu selon l'équation suivante :



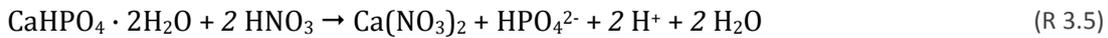
Etant donné que le nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ est très soluble dans l'eau ($1,44 \cdot 10^3 \text{ g.L}^{-1}$ à 25°C), leurs ions calcium sont plus enclins à participer à la formation de germes apatitiques que ceux

³⁵ Le ciment C-Ag(S)₂₄ n'a pas été analysé par RMN du solide, mais aurait potentiellement pu présenter un résultat similaire s'il suivait ceux obtenus par spectroscopie FTIR.

de la brushite ou de la vatérite seuls du ciment C-REF. Cette réaction correspond à l'équation suivante :



L'acidification du milieu peut aussi favoriser la dissolution des réactifs, particulièrement en jouant sur un équilibre acido-basique avec la vatérite (R 3.4), voire la brushite (R 3.5), ce qui conduit à la régénération du nitrate de calcium initialement impliqué dans la précipitation de l'apatite. Etant donné les nombreux macropores observés par MEB (Figure 3.9), on peut supposer que la vatérite est majoritairement impliquée dans ce processus. Les équations chimiques correspondantes s'écrivent :



A partir de ces équations, il apparaît que $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ pourrait avoir un rôle de catalyseur dans la réaction chimique de prise du système étudié, comme décrit dans la Figure 3.16 ci-dessous, jusqu'à la dissolution totale de la brushite, réactif limitant. Ceci expliquerait la précipitation plus rapide de l'apatite, dans le cas du ciment C-Ag(L), observée par spectroscopie FTIR dès les premiers temps de la prise.

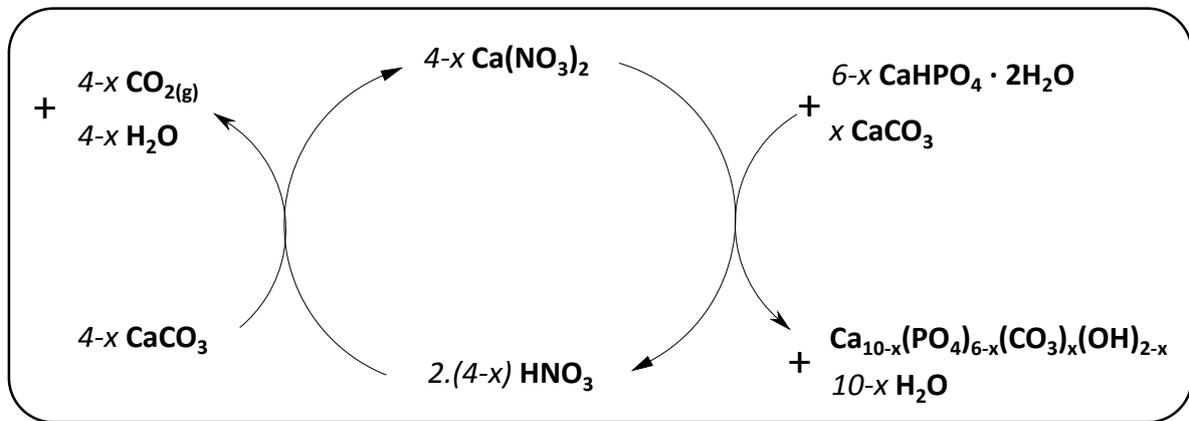


Figure 3.16 – Représentation schématique du rôle catalytique de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dans la réaction de précipitation de l'apatite au sein du ciment C-Ag(L).

4.3.b Taux d'insertion de l'argent dans l'apatite

En suivant l'hypothèse que la totalité de l'argent issu de la dissolution partielle de Ag_3PO_4 s'est inséré dans l'apatite, nous avons cherché à déterminer le taux d'argent de cette dernière. Cependant, l'ensemble des analyses quantitatives ou semi-quantitatives conduisent à des grandeurs

massiques, nous avons donc dû d'abord estimer la composition molaire du ciment avant de quantifier l'argent dans l'apatite formée.

Estimation de la composition molaire du ciment C-Ag(S)

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, nous pouvons considérer que l'apatite est carbonatée de la forme $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2x}$, avec $0 \leq x \leq 2$. Il est cependant difficile d'en déterminer la composition exacte. Sa masse molaire s'exprime donc comme une fonction de x :

$$M_{Ap}(x) = 1004,6 - 92,0 x \text{ [g.mol}^{-1}\text{]} \quad (3.4)$$

L'enjeu est de déterminer la quantité de calcium du ciment mobilisée dans la phase apatitique ($n_{Ca(Ap)} = (10 - x) \cdot n_{Ap}$). Or en première approximation l'expression ci-dessus peut être factorisée par le facteur stœchiométrique $(10 - x)$:

$$M'_{Ap}(x) = (10 - x) \times 100,5 \text{ [g.mol}^{-1}\text{]} \quad (3.5)$$

L'erreur que nous commettons alors s'exprime selon la formule suivante :

$$\text{erreur} = \left| \frac{M_{Ap}(x) - M'_{Ap}(x)}{M_{Ap}(x)} \right| = \frac{8,5 x}{1004,6 - 92,0 x} \quad (3.6)$$

ce qui, pour x compris entre 0 et 2, revient à une erreur comprise entre 0 et 2 %, valeur faible qui valide l'approximation. Le nombre de moles de calcium mobilisés dans la phase apatitique peut alors s'exprimer de cette manière :

$$\begin{aligned} n_{Ca(Ap)}(x) &= (10 - x) \times n_{Ap} \quad (3.7) \\ &= (10 - x) \times \frac{m_{Ap}}{M_{Ap}(x)} \approx (10 - x) \times \frac{m_{Ap}}{M'_{Ap}(x)} = \frac{m_{Ap}}{100,5} \end{aligned}$$

Cette expression nous permet ainsi de nous affranchir du taux de carbonatation – indéterminé – de l'apatite pour estimer la quantité de calcium $n_{Ca(Ap)}$ mobilisée dans cette phase à partir de la masse m_{Ap} évaluée par spectroscopie FTIR. D'autre part, étant donné que la masse molaire de la vatérite M_V est de $100,1 \text{ g.mol}^{-1}$, ce qui est peu différent de $100,5 \text{ g.mol}^{-1}$, nous pouvons en déduire l'approximation suivante :

$$\frac{n_{Ca(Ap)}}{n_{Ca(V)}} \approx \frac{m_{Ap}}{100,5} \times \frac{M_V}{m_V} \approx \frac{m_{Ap}}{m_V} \quad (3.8)$$

Le rapport molaire des ions calcium des deux phases – apatite et vatérite – est ainsi peu différent du rapport massique de ces deux phases.

Nous avons déterminé par spectroscopie FTIR que le pourcentage massique d'apatite en fin de prise était de $75 \pm 2 \%$ dans le mélange triphasique brushite – vatérite – apatite. D'autre part il a

été mis en évidence par différentes techniques de caractérisation (diffraction RX, spectroscopies FTIR et RMN ^{31}P) que la brushite était entièrement consommée au cours de la réaction. Nous pouvons ainsi supposer que $\frac{n_{Ca(Ap)}}{n_{Ca(tot)}} = 75 \pm 2 \%$, nous ne commettons alors qu'une erreur comprise entre 0,1 % et 0,5 % pour x compris entre 0 et 2.

Estimation de la quantité d'argent insérée dans l'apatite

Dans le ciment C-Ag(S) étudié dans ce chapitre, la quantité d'argent initialement introduite respecte un rapport Ag/Ca de 0,097 qui reste inchangé au cours de la prise. Or, par RMN du solide, il apparaît que l'aire de la bande correspondant à Ag_3PO_4 diminue de 33 % pendant la réaction de prise. Aucune phase autre que la brushite, la vatérite, l'apatite ou l'orthophosphate d'argent n'a été détectée par les différentes techniques de caractérisation utilisées, à savoir la DRX, la RMN et la spectroscopie FTIR. D'autre part, un léger déplacement de la bande correspondant aux PO_4 de l'apatite a été observé par RMN ^{31}P sur les échantillons contenant de l'argent. Il est donc probable que l'argent issu de la dissolution de l'orthophosphate s'insère dans le réseau de l'apatite qui se forme au cours de la prise. Sa structure est en outre connue pour pouvoir substituer une partie de ces ions – dont l'argent – à la place des ions calcium [Hwang 2008; Rameshbabu 2007; Vandecandelaere 2012].

Ce système nous amène alors aux trois équations suivantes :

$$\frac{n_{Ca(tot)}}{n_{Ag(tot)}} = 10,3 \quad (3.9)$$

$$\frac{n_{Ca(Ap)}}{n_{Ca(tot)}} = 75 \pm 2 \% \quad (3.10)$$

$$\frac{n_{Ag(Ap)}}{n_{Ag(tot)}} = 33 \% \quad (3.11)$$

avec $n_{Ca(tot)} = n_{Ca(Ap)} + n_{Ca(V)}$ et $n_{Ag(tot)} = n_{Ag(Ag_3PO_4)} + n_{Ag(Ap)}$. La résolution de ce système conduit à un taux d'insertion de l'argent de l'apatite égal à $4,0 \pm 0,1 \%$. Ce résultat est en bonne adéquation avec une valeur maximale de 3-4 % d'argent inséré dans l'apatite sans mise en évidence de phase secondaire [Rameshbabu 2007; Vandecandelaere 2012].

5 Conclusions

De l'argent a été introduit dans le système $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$ présenté dans le chapitre 2 dans l'objectif de lui conférer des propriétés antibactériennes.^[36] L'argent a été introduit de deux manières : soit par voie solide, sous forme d'un phosphate d'argent, Ag_3PO_4 (C-Ag(S)), soit par voie liquide, en remplaçant l'eau par une solution de nitrate d'argent (C-Ag(L)).

Il a été mis en évidence que de l'orthophosphate d'argent précipitait dès le mélange de la phase liquide et de la phase solide du ciment C-Ag(L) ; les deux voies d'introduction conduisent ainsi, en fin de réaction de prise, à un système apatite – vatérite – Ag_3PO_4 . Comme dans le ciment C-REF, l'apatite formée est nanocristalline, analogue au minéral osseux.

Les caractéristiques et la répartition des particules d'argent ne sont pourtant pas les mêmes au sein des deux matériaux. Dans le cas du ciment C-Ag(S), la synthèse du phosphate d'argent et l'homogénéisation des poudres sont des étapes déterminantes : la première détermine la taille des particules, ajustable dans une certaine mesure, et la deuxième assure sa répartition homogène dans la phase solide du ciment. Pour le ciment C-Ag(L) l'étape-clé vient ensuite : c'est celle du gâchage, au cours duquel les particules de Ag_3PO_4 , tout juste précipitées, vont se répartir au sein de la pâte. Leur taille nanométrique est difficilement contrôlable. L'introduction d'argent par voie solide permettrait, a priori, une maîtrise plus fine des caractéristiques du ciment, notamment en termes de distribution de l'argent.

Une étude par spectroscopie FTIR a mis en évidence une cinétique de prise légèrement plus rapide dans les ciments chargés en argent que dans le ciment de référence C-REF. Le phosphate d'argent, en milieu légèrement acidifié par la précipitation d'apatite, semble se dissoudre partiellement et prendre part à la réaction de prise dans les deux ciments. L'argent ainsi libéré s'insérerait dans l'apatite, à une teneur estimée à 4 % atomique par rapport au calcium pour le ciment C-Ag(S).

Le ciment C-Ag(L) montre les mêmes caractéristiques quant à l'environnement des phosphates ou la quantité de phosphate d'argent restant, analysés par RMN MAS ^{31}P . Il présente pourtant une cinétique de prise légèrement plus rapide, encore, que le ciment C-Ag(S). Un modèle justifiant ce phénomène a été proposé : le nitrate de calcium, formé lors de la précipitation du phosphate d'argent pourrait agir comme un catalyseur du processus de dissolution de la vatérite et de précipitation d'apatite impliqué lors de la prise du ciment.

Enfin, l'analyse par RMN nous a permis de valider que la méthode de dosage mise au point par spectroscopie FTIR est robuste et ce même en présence de phosphate d'argent.

³⁶ Ces aspects biologiques seront abordés dans le chapitre 5.

Chapitre 4

Etude des ciments composites



Les ciments CaCO_3 - CaP développés dans les chapitres 2 et 3, chargés ou non en argent, présentent de nombreux avantages liés d'une part aux propriétés particulièrement intéressantes des phosphates et carbonates de calcium pour une application biomédicale et d'autre part à l'enjeu de conférer des propriétés antibactériennes au matériau.^[37] Pourquoi introduire un polysaccharide dans cette matrice minérale ? Si les biomatériaux composites inorganique-organique sont au cœur de nombreuses études, c'est pour de multiples raisons. Dans les ciments phosphocalciques, l'addition d'un polymère peut ainsi permettre de conférer une certaine cohésion au matériau et d'éviter le délitement de la pâte cimentaire ou la fragmentation en particules – potentiellement phlogogènes – du ciment durci dans le site de l'implantation [Combes 2013]. Cette modification de la cohésion et un changement de comportement rhéologique vont par ailleurs jouer sur l'injectabilité de la pâte, propriété incontournable du ciment pour une application en chirurgie mini-invasive. Ces aspects seront développés dans le troisième paragraphe. Le polymère par ses propriétés intrinsèques et l'impact qu'il va avoir sur la microstructure du ciment composite aura également des conséquences sur les propriétés mécaniques du matériau, spécificité qui sera présentée ensuite. Enfin, son effet sur la réaction de prise tant d'un point de vue chimique que physique sera exposé et discuté.

Un autre aspect de l'étude était la possible utilisation du polysaccharide pour contrôler d'une part la dégradation du ciment et assurer ainsi une meilleure résorbabilité, et d'autre part la libération de l'argent, agent antibactérien choisi dans ce projet. L'idée était ainsi une formulation du polysaccharide sous forme de microsphères chargées en argent qui seraient introduites dans la matrice minérale du ciment (Figure 4.1). Après implantation, au contact des fluides biologiques, la dégradation plus rapide du polysaccharide par rapport à la phase minérale conduirait à la formation d'une porosité interconnectée favorisant le remodelage osseux et contrôlerait de manière conjointe la libération de l'agent antibactérien [Girod Fullana 2010].

³⁷ Cet aspect sera développé plus particulièrement dans le chapitre 5.

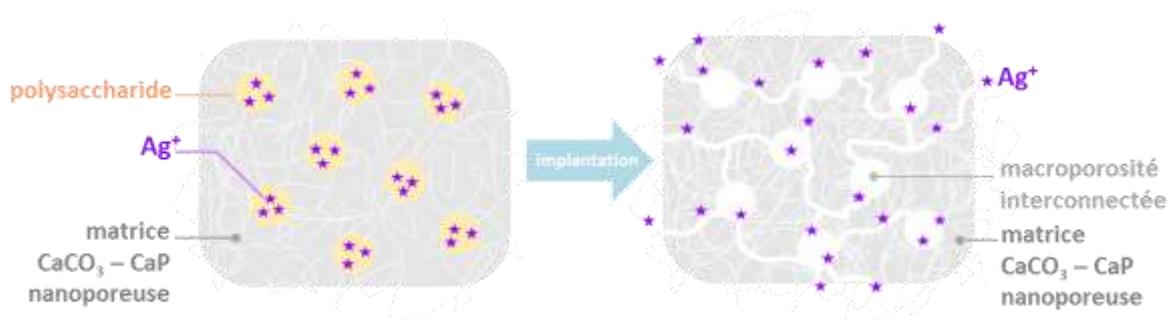


Figure 4.1 – Schéma de principe du composite à élaborer et de son évolution une fois implanté

1 Choix d'un polysaccharide : la CMC

Les polysaccharides sont des polymères constitués d'un enchaînement covalent d'oses – ou monosaccharides – qui sont les plus petites unités de la famille des glucides.^[38] D'excellentes propriétés telles que leur non toxicité, leur hydrophilie, une certaine stabilité vis à vis de variations de pH et la diversité de leurs structures chimiques en ont fait matériaux de choix dans le domaine biomédical [Barbosa 2005]. Les plus répandus en ingénierie tissulaire comptent parmi eux les alginates [Rowley 1999], le chitosane [Francis Suh 2000], les celluloses [Müller 2006] ou encore l'acide hyaluronique [Solchaga 1999] et leurs dérivés.

Dans le cadre du projet ANR BIOSINJECT, cinq polysaccharides, tous disponibles à un grade pharmaceutique, avaient été préalablement sélectionnés : le chitosane, le carraghénane λ , deux dérivés de la cellulose – l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) et la carboxyméthylcellulose (CMC) – et l'acide hyaluronique (AH). Une étude préliminaire prenant en compte divers aspects tels que la faisabilité de leur mise en forme de microsphères par atomisation-séchage, l'impact de ces polysaccharides sur différentes propriétés physico-chimiques du ciment $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$ ou encore leur coût nous ont conduit à focaliser notre étude sur la CMC. Ce chapitre s'attache donc à présenter le système $\text{CaCO}_3 - \text{CaP} - \text{CMC}$ et ses propriétés physico-chimiques.

1.1 La carboxyméthylcellulose (CMC)

1.1.a Données générales

La carboxyméthylcellulose (CMC) est un polysaccharide anionique dérivé de la cellulose, dont une partie des groupements hydroxyles a été substitué par des groupements carboxyméthyle (Figure

³⁸ Anciennement nommés *hydrates de carbone*, les glucides sont des composés organiques de formule générale $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_p$.

4.2). Il est ainsi caractérisé par un degré de substitution (DS) correspondant au nombre de groupements hydroxyle substitués par anhydroglucose, unité monomère de la cellulose. Le DS est en conséquence compris entre 0 et 3, la limite haute étant expérimentalement non réalisable.

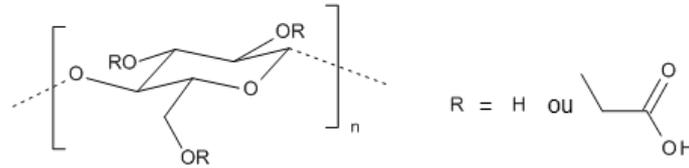


Figure 4.2 – Structure chimique de la carboxyméthylcellulose (CMC) : sur l'ensemble des chaînes, le monosaccharide contient en moyenne (1-DS) groupements hydroxyle et DS groupements carboxyméthyle.

La CMC est un polymère hydrophile soluble dans l'eau largement utilisé dans les industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques à la fois en tant que stabilisant d'émulsion (mousses et lotions cosmétiques), épaississant (adhésifs, crèmes, gelées pharmaceutiques), liant (encres, revêtements) ou agent favorisant la rétention de l'eau (viande, shampoings), cette liste n'étant pas exhaustive [Hercules Inc. 1999]. Il a été remarqué qu'un DS de 0,9 ou 1,2 conduisait généralement à un comportement rhéofluidifiant de la CMC, alors qu'il serait plutôt thixotropique pour un DS de 0,7. Cette thixotropie est notamment utilisée dans les pâtes de dentifrice dans lesquelles une bonne stabilité du gel est requise au repos, mais où la chute de viscosité au niveau de la paroi facilite l'écoulement et l'extrusion de la pâte du tube lorsqu'une certaine force est appliquée [Ashland Inc. 2010].

1.1.a Poudre de CMC

Une grande partie des ciments composites qui seront présentés dans ce chapitre ont été élaborés en introduisant la CMC directement sous forme de poudre dans la phase solide du ciment (§ 2.1). La poudre utilisée, de nom commercial « blanose[®] » (Ashland, Aqualon[®]) est de type 7H4XF-PH. Le polymère choisi est donc, comme l'indique cette référence, de grade alimentaire (F) et pharmaceutique (-PH), avec un DS de 0,7 et une haute viscosité en solution (H4) [Ashland Inc. 2010]. Sa masse volumique apparente est de $0,75 \text{ g.cm}^{-3}$ ^[39]

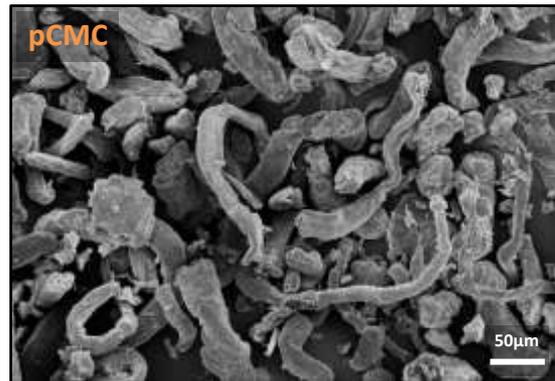


Figure 4.3 – Micrographie MEB de poudre commerciale de CMC.

³⁹ Cette grandeur ne donne donc pas la densité réelle du polymère sous forme de poudre compte tenu de l'air interstitiel.

et sa densité réelle de l'ordre de 1,5 - 1,6 [Brenntag Canada Inc. 2010]. La micrographie MEB présentée sur la Figure 4.3 montre une poudre constituée de particules de taille micrométrique et de morphologie irrégulière et fibrillaire.

1.1.b Mise en forme de microsphères

Comme présenté dans l'introduction de ce chapitre, un des objectifs du projet était d'incorporer l'argent, agent antibactérien, dans des microsphères de polysaccharide dans le but de contrôler sa libération une fois ces dernières incluses dans le ciment d'une part, via la dégradation des microsphères et d'autre part, via celle du ciment.

Des microsphères de CMC ont ainsi été préparées au sein du CIRIMAT notamment par le post-doctorant, Mohamed Fatnassi, recruté pour la première année de ce projet ANR puis par Fabien Brouillet et Sophie Girod Fullana tout au long de ce projet. Elles ont été élaborées par atomisation-séchage (atomiseur-sécheur BUCHI B290 équipé d'une buse avec une ouverture de diamètre 0,7 mm). Cette technique présente l'avantage de permettre la mise en forme de particules quasi sphériques, en conservant la composition et la qualité du produit grâce à un traitement thermique réduit. C'est d'autre part un procédé continu et une opération de séchage simple et rapide qui peut être facilement mis en place à une échelle industrielle.

Les microsphères ont été réalisées à partir d'une solution contenant la CMC et, dans la plupart des cas, du nitrate d'argent (AgNO_3 Alfa Aesar 99.9+%). La température d'entrée a varié de 100 °C à 150 °C au cours de la préparation des microsphères. L'optimisation du procédé d'élaboration de ces microsphères a été réalisée au cours de la première année (2010-2011) du projet ANR BIOSINJECT par le chercheur post-doctorant, Mohamed Fatnassi.

La micrographie MEB de la Figure 4.4.a présente des microparticules sphériques et lisses. Une analyse par granulométrie met en évidence une certaine dispersion de leurs tailles, allant de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres, avec un diamètre médian d_{50} de 25 μm .^[40]

⁴⁰ Le *diamètre médian* d_{50} de la distribution est défini tel que 50 % v/v des particules soient de taille inférieure à ce diamètre et 50 % v/v de taille supérieure.

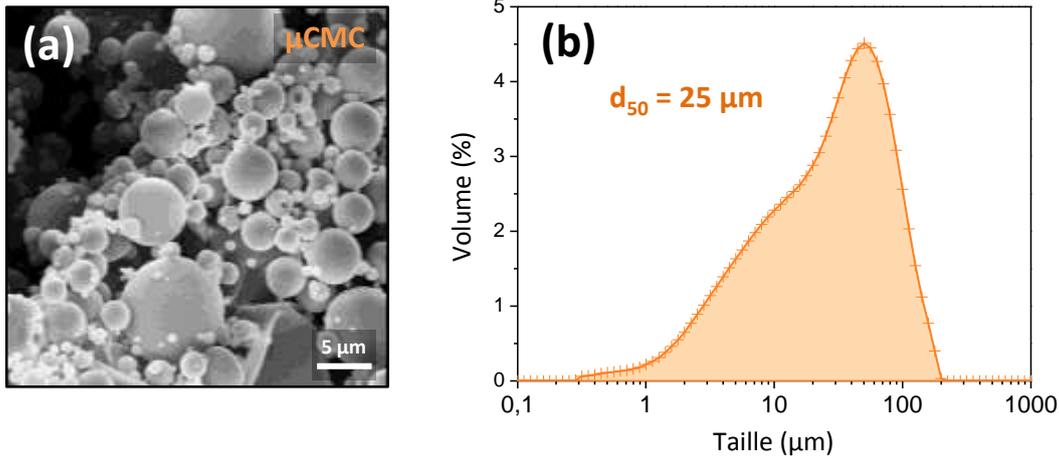


Figure 4.4 – (a) Micrographie MEB et (b) granulométrie des microsphères de CMC élaborées par atomisation-séchage.

Avec un rendement de l'ordre de 50 %, les microsphères chargées en argent – dosé par absorption atomique – présentent un taux d'encapsulation élevé, de l'ordre de 74% et contiennent 9,3 % m/m d'argent.

1.2 La CMC comme additif dans les ciments : état de l'art

Diverses études ont été menées sur l'ajout de CMC dans un ciment de type Portland – liant hydraulique du béton. Il a été noté que cet additif conduisait notamment à un retard de la prise, une légère augmentation de la résistance en compression et de la ténacité, une sensibilité moindre à l'acide et à l'eau d'où une meilleure résistance à la corrosion et une diminution de la porosité du matériau [Mishra 2003; Farooque 2010].

Dans le domaine des ciments biomédicaux, peu d'études rendent compte de l'utilisation de la CMC comme additif. Le polysaccharide est cité dans la composition de la phase liquide d'un ciment α -TCP dans une étude de Akashi et coll. [Akashi 2001]. Alves et coll. ont étudié l'effet de son introduction sous forme pulvérulente dans la phase solide d'un ciment similaire, à une concentration de 0,4 à 6,4 % m/m. Outre une meilleure cohésion et malléabilité de la pâte, la CMC a permis, même à de faibles concentrations, d'améliorer nettement l'injectabilité de la pâte grâce à son effet lubrifiant [Alves 2008]. Kobayashi et coll. ont également mené une étude in vivo sur le ciment BoneSource[®] – à base de TTCP et de DCPA – associé à de la CMC pour faciliter son injection. De bons résultats ont été observés en terme d'ostéoconductivité, biocompatibilité et résistance à la compression mais le rôle particulier de la CMC dans ces propriétés n'a pas été déterminé [Kobayashi 2009].

Enfin, récemment, Park et coll. ont utilisé l'association d'un gel de CMC et d'un ciment apatitique à base de phosphate de calcium amorphe (ETEX[®]) dans le but d'y introduire des cellules souches mésenchymateuses : dans cette étude la CMC avait un rôle de protection de ces cellules vis à vis d'une certaine cytotoxicité de la pâte du ciment avant prise [Park 2011].

Ces études confirment donc la pertinence de l'introduction de CMC en phase solide ou liquide pour compenser certains défauts des ciments phosphocalciques, comme leurs mauvaises cohésion, malléabilité ou injectabilité, tout en préservant leur activité biologique. A notre connaissance, aucune étude ne mentionne l'utilisation de microsphères de CMC comme additifs dans des ciments.

2 Ciments composites : préparation et faisabilité

2.1 Elaboration des ciments composites

Les ciments composites ont été élaborés de manière similaire aux ciments précédemment décrits (chapitre 2, § 2.12.1) : la partie minérale de la phase solide a été réalisée à partir d'un mélange équimassique de brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de vaterite CaCO_3 . A ce mélange de poudre a alors été ajouté le polysaccharide, introduit soit sous forme de microsphères élaborées par atomisation-séchage, soit directement sous forme de poudre commerciale. Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons respectivement les préfixes « μ » et « p » pour désigner ces deux types de ciments composites. La phase solide du ciment constituée de ce mélange de poudres réactives minérales et organique a alors été homogénéisée à la spatule puis au pilon dans un mortier en céramique.^[41] La phase liquide – de l'eau désionisée – a été ajoutée au mélange au temps t_0 . Après gâchage, la pâte a été mise en forme selon les besoins de l'essai à réaliser puis placée en atmosphère humide dans une étuve à 37 °C.

Notons que l'ajout d'un polysaccharide dans la phase solide nous a amené à augmenter le rapport L / S à une valeur de 0,70 – au lieu de 0,55 pour les ciments C-REF et C-Ag(S) présentés dans les chapitres 2 et 3 – afin d'assurer la cohésion, l'homogénéité et la malléabilité de la pâte. Les quantités de réactifs nécessaires à l'élaboration des composites étudiés sont reportés dans le Tableau 4.1.

⁴¹ Dans le cas des μ -composites, un soin particulier a été apporté pour ne pas dégrader les microsphères de polymère lors de cette étape.

La nomenclature utilisée pour désigner les différents échantillons est la suivante : C-XpCMC pour les composites réalisés à base de poudre de CMC (p-composites) et C-X μ CMC pour ceux contenant des microsphères (μ -composites), X désignant le pourcentage massique de CMC introduit dans la phase solide du ciment ($X \in [2,50]$). Il est à noter que les μ -composites contiennent donc de l'argent.

Nous avons pu remarquer dès le début du gâchage que la pâte change totalement de texture : rappelons que le ciment C-REF présentait un comportement rhéofluidifiant. En d'autres termes, la pâte, au fur et à mesure où elle était travaillée – et subissait donc un cisaillement plus important – se fluidifiait et finissait même par « suinter » et avoir un aspect « mouillé » en surface, attribuable à un phénomène de synérèse. Avec l'ajout de la CMC – déjà à 2 %, encore plus à 10 % m/m dans la phase solide – la pâte est devenue rapidement très malléable, presque élastique, d'une texture proche de celle de la pâte à modeler. Notons que pour les ciments composites les plus chargés en CMC – à 30 % et 50 % m/m –, le gâchage et la mise en forme de la pâte ont été moins aisés à cause d'un aspect beaucoup plus « collant » du matériau.

Un ciment de référence, de même composition de phase solide que le ciment C-REF ($m_B = m_V$) mais avec un rapport L / S de 0,70 (au lieu de 0,55) a été réalisé : il sera noté C-REF'.

	Phase solide			Phase liquide (eau désionisée)
	Brushite	Vatérite	CMC (p ou μ)	
C-REF'	0,50	0,50	-	0,70
C-2pCMC	0,49	0,49	0,02	0,70
C-10pCMC	0,45	0,45	0,10	0,70
C-20pCMC	0,40	0,40	0,20	0,70
C-30pCMC	0,35	0,35	0,30	0,70
C-50pCMC	0,25	0,25	0,50	0,70
C-2 μ CMC	0,49	0,49	0,02	0,70
C-10 μ CMC	0,45	0,45	0,10	0,70

Tableau 4.1 – Ciments composites et réactifs engagés dans leur élaboration. Les quantités sont exprimées en fractions massiques, l'unité est la masse totale de phase solide. ($m_S = 1$; $L/S = m_L/m_S = 0,70$)

Jusqu'à une teneur d'au moins 50 % m/m de CMC, après quelques heures à l'étuve à 37°C dans une atmosphère saturée en eau, le ciment a pris et durci. ^[42] Il semble donc que l'introduction d'un polysaccharide, même en assez grande quantité, n'empêche pas la réaction de prise.

⁴² Il apparaît même, lorsque les échantillons doivent être réduits en poudre pour différentes analyses, que les ciments sont d'autant plus difficile à casser et à broyer qu'ils contiennent une quantité importante de polysaccharide.

2.2 Caractérisation des ciments pris

Une première étape dans l'élaboration de ciments composites est d'étudier les conséquences de l'ajout de la CMC sur leur composition et leur microstructure. Il s'agit de déterminer d'une part la manière dont le polysaccharide s'agence et interagit avec la matrice minérale, et d'autre part l'impact qu'il a sur celle-ci afin de vérifier que ses propriétés physico-chimiques les plus remarquables ne sont pas altérées par l'additif organique.

2.2.a Composition des ciments

Une analyse par DRX a été réalisée sur les différents ciments composites élaborés. La Figure 4.5 présente les résultats obtenus pour les ciments C-2pCMC à C-50pCMC après 48 h de prise, comparés au ciment C-REF'. Les diffractogrammes de RX sont très similaires pour tous les matériaux : seules de la vaterite et de l'apatite nanocristalline analogue au minéral osseux formée au cours de la prise ont pu être identifiées. La brushite, entièrement consommée, n'apparaît pas sur le diagramme. Ainsi jusqu'à au moins 50 % m/m de poudre de CMC dans la phase solide, la phase organique n'empêche pas la réaction de prise de la phase minérale et ne semble pas en modifier le processus global de dissolution – reprécipitation. Cependant, nous constatons une diminution de l'aire de l'ensemble des raies, notamment de celles de l'apatite par rapport à celles de la vaterite suivant la quantité de CMC introduite (raies à 30,1° (Ap), 29,0° (V) et 31,6° (V) et sur la raie très large autour de 37,3° (Ap)). D'une part, l'introduction du polysaccharide diminue la proportion de phase minérale apparaissant sur le diffractogramme RX. Mais il semble par ailleurs que l'état de cristallinité de l'apatite formée dans les composites soit d'autant plus faible que la quantité de polymère introduite est grande. Cependant, une analyse plus fine serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse étant donné la faible intensité de ses raies sur ces diagrammes de résolution insuffisante.

Des résultats équivalents ont été observés pour les μ -composites,^[43] il apparaît donc que quelle que soit la teneur de CMC introduite dans la phase solide – entre 2 % et 50 % m/m – et sa forme – poudre ou microsphères – le ciment composite fait prise et une apatite nanocristalline analogue au minéral osseux est formée. Le processus de dissolution – reprécipitation est très proche de celui d'un ciment de référence, l'apatite présentant toutefois possiblement des caractéristiques légèrement différentes.

⁴³ Les diagrammes ne sont pas présentés dans ce manuscrit.

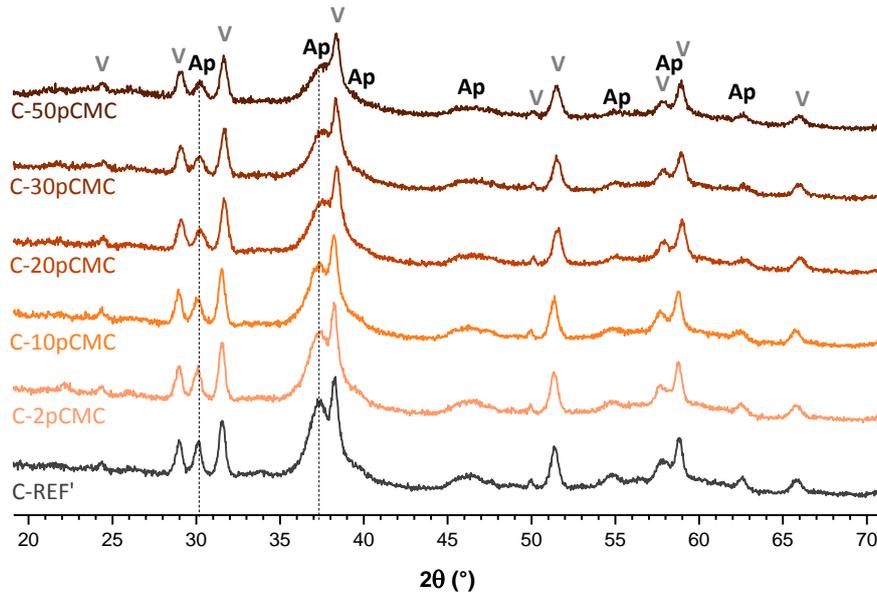


Figure 4.5 – Diffractogrammes de RX d'un ciment de référence (C-REF') et de ciments composites contenant 2 % à 50 % m/m de CMC dans leur phase solide après 48 h de maturation à 37 °C (Ap = apatite ; V = vaterite).

2.2.b Caractérisation des composites par spectroscopie FTIR

Contrairement à l'analyse DRX où le polymère, amorphe, a très peu d'influence sur le signal des phases minérales, la vibration des multiples liaisons chimiques du polysaccharide peut sensiblement complexifier les spectres FTIR des ciments. Or, dans les chapitres 2 et 3, un suivi de la cinétique de prise des différents ciments C-REF, C-Ag(S) et C-Ag(L) avait été réalisé par cette technique en décomposant les bandes dans le domaine spectral 840 - 450 cm^{-1} , domaine spectral permettant d'évaluer la composition de la phase minérale en brushite, vaterite et apatite de manière semi-quantitative. Ainsi, outre un éventuel complément d'information sur les phases présentes et la variation de composition finale de la phase minérale entre le ciment C-REF' et les ciments composites, la caractérisation FTIR des ciments composites après réaction de prise avait pour but de déterminer dans quelle mesure le polysaccharide allait affecter le spectre dans ce domaine spectral d'intérêt.

La Figure 4.6 montre le spectre de la CMC entre 850 cm^{-1} et 450 cm^{-1} . Il apparaît sur ce spectre que ce polysaccharide présente des bandes de vibration larges et peu définies – dues aux déformations des chaînes et des cycles – conduisant à une absorbance non nulle mais quasi constante entre 720 cm^{-1} et 450 cm^{-1} .

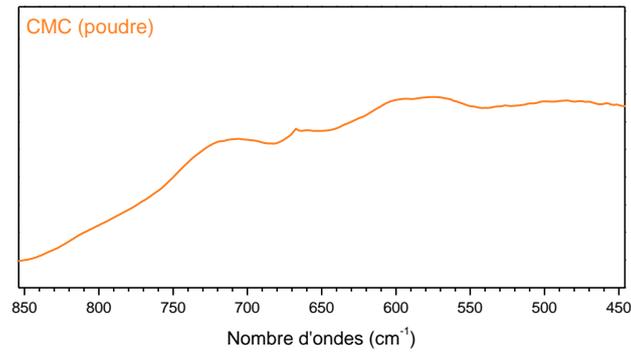


Figure 4.6 – Spectre FTIR de la CMC sous forme de poudre dans le domaine spectral 850 - 450 cm^{-1} .

La Figure 4.7 présente les spectres obtenus pour les ciments composites contenant différentes teneurs en CMC. Les spectres de C-2pCMC et C-10pCMC sont comparables à celui de C-REF' et présentent les bandes caractéristiques (phosphates apatitiques et carbonates de la vaterite) d'un ciment dont la réaction chimique de prise est terminée. La présence de CMC ne semble induire qu'un très léger élargissement du pied de la bande des phosphates pour C-10pCMC. Les spectres des ciments composites contenant 20 % ou plus de CMC, eux, sont nettement affectés par les bandes de vibration du polymère. Il semble donc, a priori, qu'une étude cinétique de la formation d'apatite ne soit envisageable que sur les compositions C-2pCMC et C-10pCMC (cf. § 5.1).

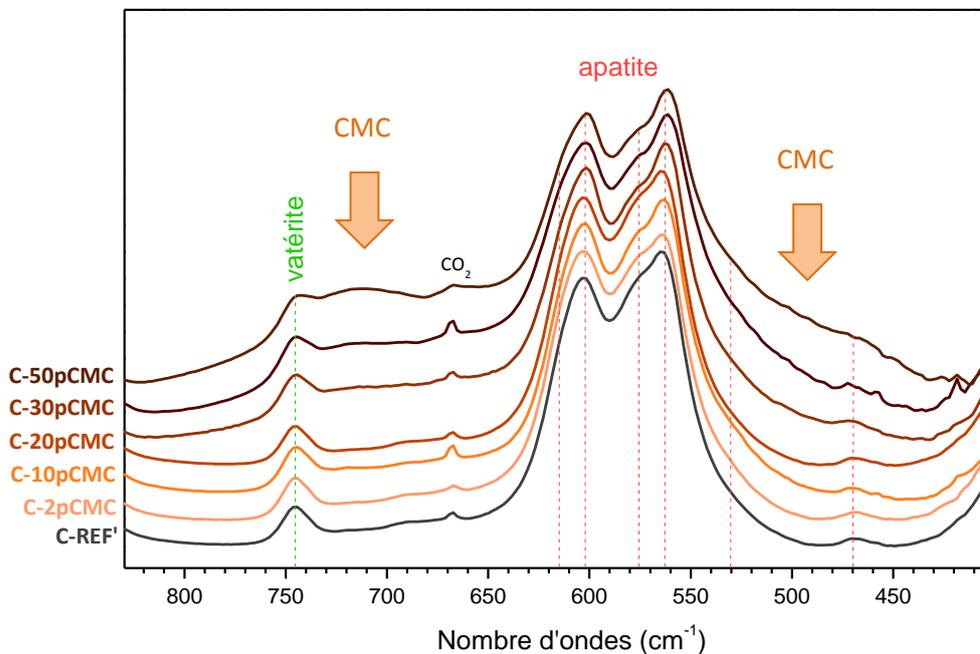


Figure 4.7 – Spectres FTIR de ciments composites contenant 2 % à 50 % m/m de CMC sous forme de poudre dans leur phase solide après 48 h de maturation, comparés au ciment C-REF'.

2.2.c Influence de la CMC sur la microstructure du ciment

Observation des p-composites

La Figure 4.8 présente des micrographies des ciments C-2pCMC et C-10pCMC après 1 h de maturation, alors que la réaction chimique de prise n'est pas encore totalement terminée. Il apparaît sur ces images que, d'un point de vue de la microstructure, le ciment composite C-2pCMC présente très peu de différences avec un ciment C-REF' : des restes de plaquettes de brushite partiellement dissoutes ainsi que des particules de vatérite sont encore visibles. L'ensemble de ces particules sont reliées entre elles par une phase importante présentant un aspect légèrement rugueux, similaire à ce qui a pu être observé sur un ciment C-REF (cf. Figure 2.38), correspondant donc à de l'apatite.

Très peu de traces de polysaccharides ont été observées sur l'ensemble des micrographies des composites C-2pCMC. Sur les deux images présentées, seul un petit filament apparaissant en arrière-plan de la micrographie à plus fort grossissement (Figure 4.8.b, flèche orange) a été identifié de manière certaine comme appartenant à la partie organique du composé. Ceci laisse penser que la CMC s'est majoritairement solubilisée dans la phase liquide et est probablement intimement liée à la phase apatitique formée en cours de réaction ; l'eau a en effet été retirée des ciments par lyophilisation sans pourtant induire de reprecipitation visible du polymère.

Sur les micrographies du composite C-10pCMC (Figure 4.8.c & d), la présence du polysaccharide est manifeste : elle apparaît parfois sous forme d'un voile comme froissé (Figure 4.8.c, zone orange), mais le plus souvent comme si les particules minérales étaient recouvertes d'un film lisse formant parfois des feuillets, reliant toujours les particules entre elles (Figure 4.8.d, zone orange).

Il avait été mis en évidence dans les ciments ne contenant pas de polysaccharide que du CO₂ se formait au cours de la prise conduisant à la formation de bulles de taille micrométriques (de quelques dizaines à quelques centaines de microns) dont les empreintes visibles par MEB étaient particulièrement sphériques (chapitre 2 - Figure 2.19). Il apparaît sur la Figure 4.9 que l'introduction de polysaccharide dans la matrice modifie à la fois la quantité, la taille et la morphologie de ces bulles. Dans le composite C-2pCMC (Figure 4.9, à gauche), des empreintes de sphères légèrement déformées de quelques microns à quelques dizaines de microns ont été observées de manière plus ponctuelle que dans un ciment C-REF. Lorsque l'on augmente la quantité de polysaccharide, la morphologie sphérique est totalement perdue et laisse plutôt place à des crevasses de taille et de forme irrégulière, zone d'observation privilégiée du polymère. Ce phénomène est particulièrement visible sur la micrographie du ciment C-30pCMC (Figure 4.9, à droite), où le polysaccharide forme comme un nappage lisse autour de ces macroporosités. En effet, la réaction de dissolution des

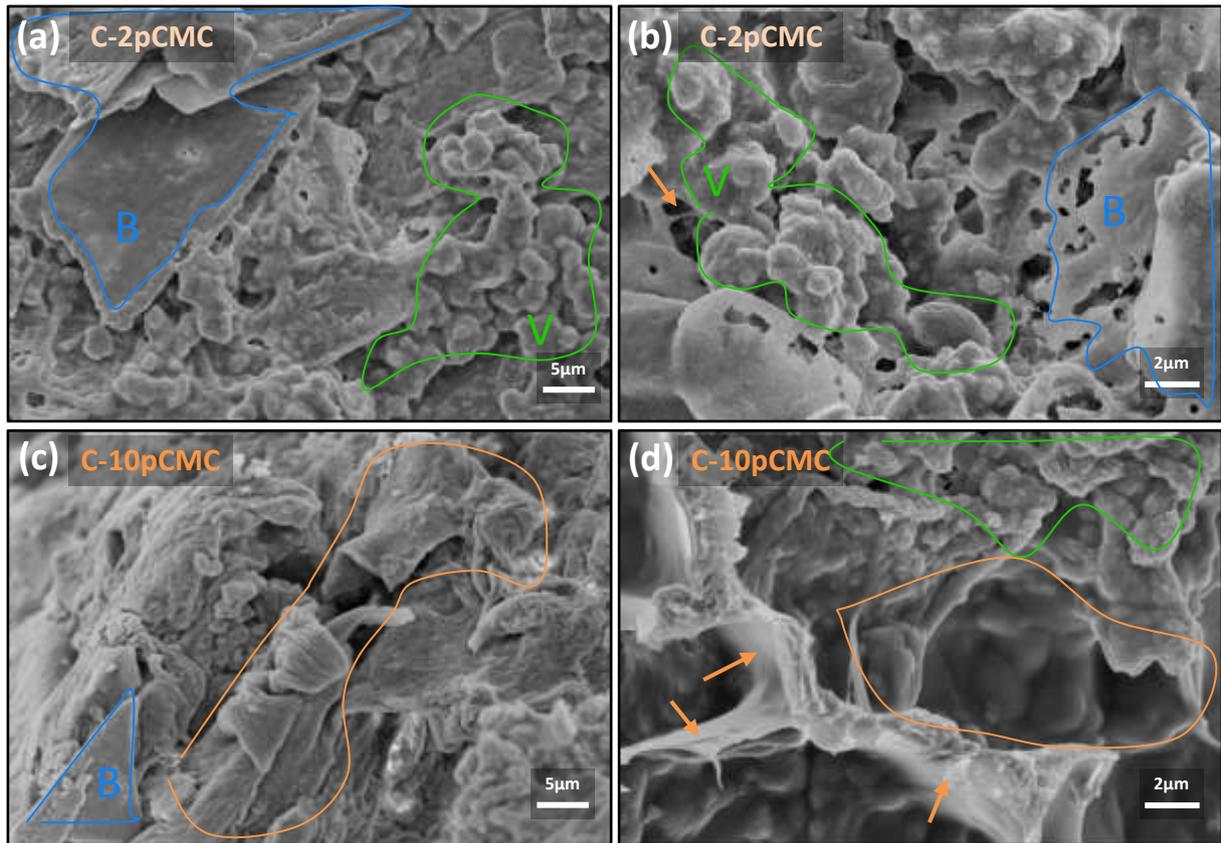


Figure 4.8 – Micrographies MEB des ciments C-2pCMC (a et b) et C-10pCMC (c et d) après 1 h de maturation (zones délimitée en bleu et notées B : brushite ; zones délimitées en vert et notées V : vaterite ; zones et flèches délimitées en orange : présence de CMC).

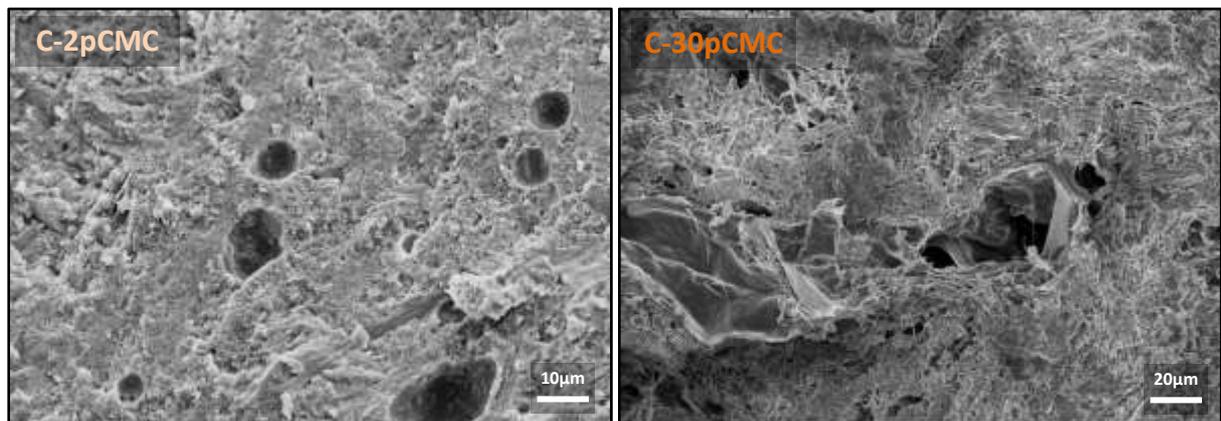


Figure 4.9 – Micrographies MEB des ciments composites totalement pris C-2pCMC (x1000, à gauche) et C-30pCMC (x500, à droite).

réactifs minéraux et de précipitation de l'apatite est stoppée à l'interface entre la zone de gaz et le fluide contenant les particules. Sans aucune source d'ions pour permettre la précipitation de l'apatite du côté de la phase gazeuse, la CMC reste donc pure de toute phase minérale d'où cet aspect lisse. Il est en outre probable qu'elle se place préférentiellement à l'interface gaz-liquide. En revanche, au sein de la pâte même, elle sera très probablement intriquée dans la matrice minérale, en particulier

dans la phase apatitique qui aura pu germer et croître à sa surface étant donné les possibles interactions ioniques entre les groupements carboxyliques et le calcium.

Observation des μ -composites

Plusieurs ciments composites où le polysaccharide avait été initialement introduit dans la phase solide du ciment sous forme de microsphères ont été observés par MEB. Dans aucun des échantillons analysés le polymère n'a pu être observé sous cette forme initiale. Les résultats se sont avérés similaires à ceux obtenus pour les p-composites. La Figure 4.10 montre ainsi sur un ciment C-10 μ CMC, après 24 h de maturation, que les particules de brushite et de vaterite semblent reliées entre elles par une phase composite CMC / apatite présentant un aspect minéral rugueux et quelques filaments caractéristiques du polymère. La CMC jouerait encore ici un rôle de liant entre les particules et un éventuel support de minéralisation.

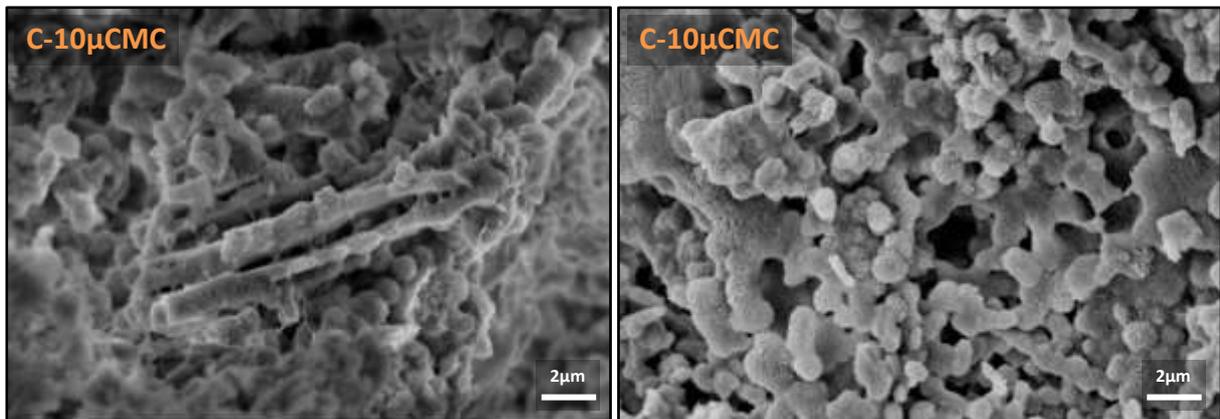


Figure 4.10 – Micrographies de ciments composites C-10 μ CMC après 24 h de maturation (x 5000).

Il apparaît ainsi d'après ces observations que les microsphères se dégradent au cours de l'élaboration et de la prise du ciment : la CMC, hydrophile, est reconnue pour sa grande capacité à absorber l'eau. La micrographie de la Figure 4.11 atteste de la déstructuration rapide des microsphères en présence d'eau (ici quelques gouttes), qui conduit rapidement à leur agglomération et la dénaturation de leur morphologie sphérique.

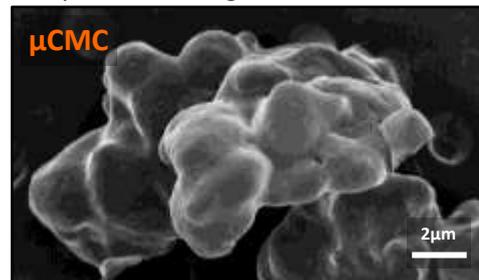


Figure 4.11 – Micrographie MEB de microsphères de CMC agglomérées par quelques gouttes d'eau (x50).

De manière à minimiser le contact direct des microsphères avec l'eau, nous avons modifié le protocole d'élaboration des ciments composites en introduisant les microsphères non pas dans la phase solide – voie la plus facile à mettre en œuvre d'un point de vue industriel – mais juste après le gâchage et l'homogénéisation de la pâte de ciment (correspondant donc à une composition initiale

d'un ciment C-REF'). Le ciment composite ainsi élaboré sera noté C-10 μ CMC' ; il a été lyophilisé immédiatement et observé par MEB. La microstructure observée (Figure 4.12) s'est avérée équivalente à celle d'un ciment composite C-10 μ CMC élaboré par la voie classique : les microsphères étaient de la même manière dégradées et la CMC apparaissait plutôt comme un liant entre les particules.

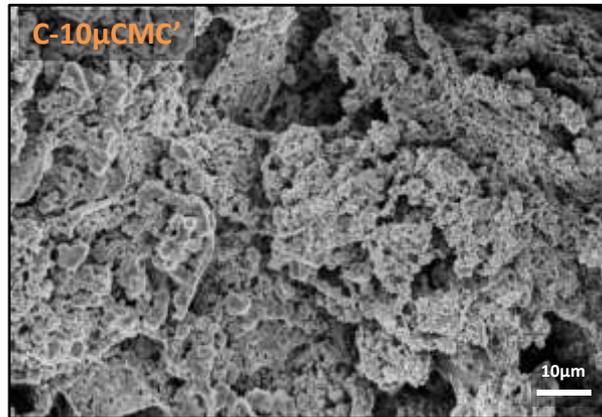


Figure 4.12 – Micrographie MEB d'un ciment C-10 μ CMC' dont les microsphères ont été introduites a posteriori dans la pâte et non au préalable dans la phase solide du ciment (grossissement x1000).

Il apparaît ainsi difficile d'introduire de la CMC à l'état de microsphère sans en altérer la forme. Il semble que les principales différences entre les p-composites et les μ -composites résident dans la différence de granulométrie initiale du polysaccharide – de quelques microns pour les microsphères à quelques dizaines de microns pour la poudre – et dans sa densité, supérieure pour les microsphères. Ceci peut entraîner une différence d'homogénéité et de répartition dans un mélange plus ou moins intime avec la phase minérale. En effet, les zones de polysaccharide mises en évidence dans le ciment C-10pCMC (Figure 4.8) ont été très peu observées dans le ciment C-10 μ CMC.

Une étude de renforcement des microsphères, en associant un deuxième polymère permettant d'augmenter sa stabilité à la réhydratation serait nécessaire. Cette étude n'ayant pu être réalisée dans le cadre de ces trois ans thèse, la stratégie d'introduction du polysaccharide sous forme de microsphères a été temporairement mise entre parenthèse et l'ensemble de ce chapitre se concentrera principalement sur les propriétés des ciments p-composites. Quelques résultats obtenus sur les μ -composites y seront néanmoins associés dans la mesure où ils peuvent apporter un éclairage complémentaire sur le rôle du polysaccharide dans les propriétés physico-chimiques des ciments composites à la fois à l'état de pâte au tout début du processus et à l'état solide après prise et durcissement.

2.2.d Influence de la CMC sur la porosité du ciment

La porosité des ciments composites a été évaluée par porosimétrie à mercure (cf. Annexe 2.8) sur le ciment C-REF' et les ciments p-composites et μ -composites. Les résultats présentés dans le Tableau 4.2 mettent en évidence un rôle prépondérant de la CMC sur la porosité des ciments : alors que le ciment C-REF' présente une porosité de l'ordre de 88 % celle-ci chute jusqu'à une valeur de 24 % pour C-50pCMC. La porosité de ces ciments est principalement nanométrique, avec un diamètre moyen des pores qui semble augmenter avec la teneur en polymère.

	Porosité (% v/v)	Diamètre moyen des pores (nm)
C-REF'	88	13
C-2pCMC	88	15
C-10pCMC	66	22
C-20pCMC	55	51
C-30pCMC	59	48
C-50pCMC	24	15
C-2 μ CMC	68	16
C-10 μ CMC	77	21

Tableau 4.2 – Porosité et taille moyenne des pores dans les ciments C-REF', p-composites et μ -composites.

Cette diminution de la porosité peut d'une part être due à une quantité relative de phase minérale – et donc de vaterite – moindre, et par conséquent de CO₂ dégagé et d'autre part à une perte de la nanoporosité, obstruée par le polymère.

3 Injectabilité

Il a été initialement établi que l'un des intérêts majeurs des ciments en tant que substituts osseux est de se présenter sous forme d'une pâte : ceci permet à la fois de donner au substitut une forme parfaitement adaptée au site d'implantation – ce qui relève d'une notion de malléabilité – et d'utiliser une chirurgie qualifiée de « mini-invasive » en implantant le matériau à l'aide d'un dispositif muni d'un trocart et/ou d'une canule, limitant la taille des incisions et ainsi le traumatisme opératoire chez le patient. Pour ce faire, le ciment doit donc pouvoir être extrudé manuellement facilement à l'aide de ce type de système : ceci relève d'une notion d'injectabilité.

Dans cette partie de l'étude, nous discuterons de cette notion d'injectabilité et de sa définition. Après avoir présenté le protocole expérimental utilisé dans ce projet, nous exposerons les résultats de l'étude du ciment de référence C-REF' et les problématiques associées, puis ceux des

ciments composites. L'influence de la teneur en CMC et de sa forme – poudre ou microsphères – sera ensuite discutée. Nous nous attacherons alors à déterminer le rôle du polymère lors de l'extrusion de la pâte.

3.1 Etat de l'art bibliographique

Définition

La notion d'*injectabilité* des ciments n'a pas fait l'objet d'un accord dans la communauté scientifique et varie selon les études. Alors que les résultats les plus couramment relevés dans la littérature expriment un *pourcentage de masse de pâte extrudée* pour une seringue donnée [Khairoun 1998; Chen 2010], Nilsson et coll. cherchent, à différents temps, le *plus petit trocart* qui permet l'extrusion de la pâte [Nilsson 2008]. Leroux et coll. définissent une *pression d'injection* mesurée entre le corps de la seringue et l'aiguille alors que looss et coll. mesurent le « *travail d'injectabilité* » en utilisant un analyseur de texture [Leroux 1999; looss 2001].

Dans cette étude, nous considérerons qu'un ciment est injectable si, 5 minutes après le mélange de la phase liquide avec la phase solide, la pâte peut être extrudée par l'application d'une force inférieure à 120 N – force à appliquer jugée comme la limite pour un chirurgien – tout en restant homogène. L'absence de séparation des phases pendant l'extrusion est ainsi également importante à prendre en compte [Bohner 2010].

Aussi, si la plupart des études expriment l'injectabilité en un unique point par matériau, nous présenterons ici l'évolution de la charge appliquée pour déplacer le piston de la seringue – profil d'injectabilité que l'on peut retrouver dans les travaux de Gauthier, Gbureck et coll. ou Tadier [Gauthier 2003; Gbureck 2004; Tadier 2009].

Phénomène de séparation des phases : stratégies employées

La séparation des phases solide et liquide constituant la pâte reste, d'après la littérature, le principal obstacle conduisant à une mauvaise injectabilité des ciments phosphocalciques [Habib 2010].

Bohner et coll. ont exprimé de manière théorique les lois déterminant l'injectabilité des pâtes de phosphate de calcium [Bohner 2005a] et deux principales stratégies se dessinent pour améliorer cette injectabilité :

(1) la *diminution de la taille des particules* en suspension dans la pâte

(2) l'*augmentation de l'écart entre le rapport L/S et la limite plastique*, définie comme le rapport L/S minimum nécessaire pour former une pâte assez cohésive.

La première stratégie implique de jouer sur les paramètres de synthèse des réactifs ou d'ajouter une étape de broyage sur les poudres, plus adaptée dans le cas du ciment CaP - CaCO₃ [Tadier 2009].

La deuxième stratégie peut être mise en place par le biais de certainement plus de leviers. Il est bien sûr possible d'augmenter dans une certaine mesure le rapport L/S, bien que cela puisse avoir des conséquences non négligeables sur d'autres propriétés du ciment telles que son temps de prise, sa porosité ou ses propriétés mécaniques. La limite plastique peut être abaissée de différentes manières, par exemple en jouant sur la forme des particules et leur surface, en privilégiant des particules sphériques et lisses [Andrianjatovo 1996]. Différents additifs ayant une influence sur les interactions interparticulaires ont également été étudiés. Ils peuvent prendre une forme ionique, en solution, ou la forme d'un polymère. En solution, citons notamment l'acide citrique, dont l'effet semble dépendre de la composition du ciment : alors qu'il a montré une amélioration de l'injectabilité sur un ciment α -TCP – HA jusqu'à une concentration de 1,5 % (m/m) dans une solution de Na₂HPO₄ [Sarda 2002], l'effet inverse a été mis en évidence sur un ciment ACP – DCPD [Wang 2006].

Addition d'un polymère

Le diagramme de la Figure 4.13 témoigne de l'influence du rapport L/S d'une part et de la teneur en polymère – un copolymère acrylique – d'autre part sur la consistance d'un ciment de construction de type Portland [Lombois-Burger 2006]. Ainsi, pour une quantité de polymère donnée, lorsque le rapport L/S est faible, on se trouve dans une *zone de faible cohésion*. Le système se trouve à l'état de poudre ou d'une pâte non cohésive. Lorsque l'on augmente le rapport L/S, la pâte acquiert une certaine cohésion : d'abord dans un état de *pâte dure*, dont la rupture en traction est de type fragile, puis de *pâte molle*, dont la fracture a un caractère ductile. Si l'on augmente encore la proportion de liquide, le système trouve l'aspect d'une *crème*. Or, les deux seuls régimes réellement adaptés à un dispositif d'extrusion sont les états de pâte dure et de pâte molle.

Les valeurs limites de ces différentes zones ne sont certes pas extrapolables à tous les ciments phosphocalciques et l'ensemble des additifs de type polymère, mais ce diagramme met en évidence l'importance de ces additifs : pour un même rapport L/S, la teneur en polymère peut complètement changer la consistance de la pâte et donc son aptitude à être extrudée.

L'addition de différents polymères ont ainsi permis d'améliorer l'injectabilité de ciments phosphocalciques [Khairoun 1999; Ginebra 2001].

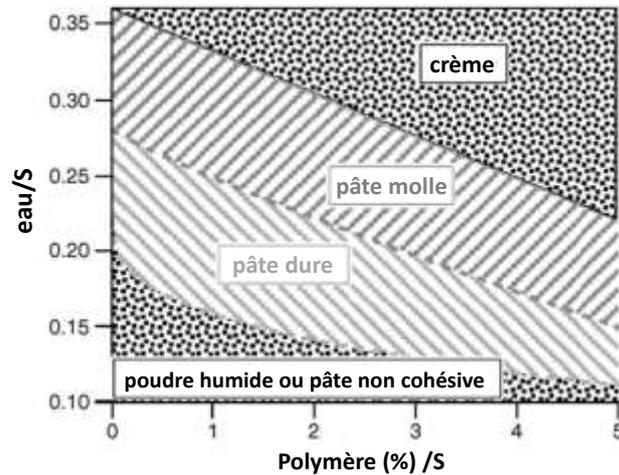


Figure 4.13 – « Diagramme de consistance » de ciments de type Portland contenant un copolymère acrylique en fonction de leur rapport eau/S et de la teneur en polymère. Adapté de [Lombois-Burger 2006].

3.2 Protocole expérimental

Dans cette étude, l'injectabilité des ciments a été évaluée en utilisant un texturomètre (TAXT2, Stable Micro System®). Le dispositif et le protocole utilisés sont ceux qui ont été mis au point par Tadier et coll. au sein du CIRIMAT [Tadier 2009]. Le ciment, une fois gâché, est mis en place dans une seringue (Terumo® 2,5 mL ; surface intérieure 64 mm² ; section de sortie de la seringue 3 mm²) placée comme indiqué sur le schéma de la Figure 4.14 sur une tablette adaptée au système de mesure.^[44] A un temps $t = 5$ minutes après le mélange des deux phases, le bras du texturomètre applique une force de manière à extruder la pâte en imposant un déplacement vertical du piston de 15 mm à une vitesse constante de 2 mm.s⁻¹.

Pour chaque composition trois essais ont été réalisés. Les résultats ont été exprimés graphiquement comme l'évolution de la force appliquée pour maintenir cette vitesse de 2 mm.s⁻¹, en fonction du déplacement de la colonne de pâte sur une hauteur de 15 mm dans le corps de la seringue. Les courbes présentent systématiquement un des profils d'injectabilité obtenus et l'écart type issu de la moyenne des trois essais.

⁴⁴ Dans cette étude, les tests ont été réalisés sur une seringue non munie de canule pour comparer l'influence de la composition de la pâte sur son injectabilité en simplifiant au maximum les paramètres notamment géométriques du dispositif d'une grande importance sur les résultats. L'ajout d'une canule à la seringue a fait l'objet d'une étude complémentaire, non présentée dans ce manuscrit.

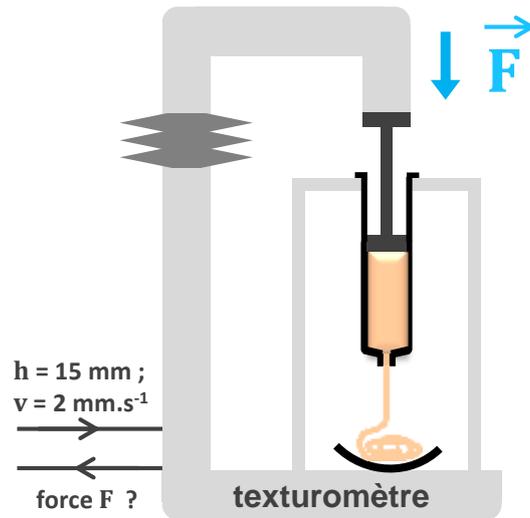


Figure 4.14 – Schéma du dispositif permettant d'évaluer l'injectabilité de la pâte du ciment

3.3 Ciment de référence : phénomène de séparation de phases

La Figure 4.15 présente le profil d'injectabilité du ciment de référence C-REF'. La courbe monotone croissante obtenue pour ce ciment est caractéristique de la présence d'un phénomène de séparation de phases, ou « *filter-pressing* », qui intervient lorsque la pression requise pour filtrer le liquide à travers les particules du ciment est inférieure à la pression nécessaire pour injecter la pâte [Bohner 2005a]. Il se traduit donc par l'extrusion d'une pâte plus riche en phase liquide au début de l'extrusion, soit une augmentation du rapport L/S de la pâte extrudée par rapport à la pâte initialement gâchée et introduite dans la seringue. Il en découle une accumulation de phase solide restant dans la seringue au cours du déplacement du piston ce qui rend ainsi de plus en plus difficile l'extrusion de cette pâte appauvrie en phase liquide.

Ce phénomène conduit à deux problèmes majeurs pour utiliser ce matériau en chirurgie mini-invasive : la charge nécessaire pour injecter un tel ciment dépasse, d'une part, rapidement celle qu'un chirurgien est capable d'appliquer manuellement (cf. Tableau 1.2) et, d'autre part, la pâte extrudée est inhomogène et de composition non contrôlée en raison du phénomène de séparation de phases caractérisé par l'augmentation de la force au fur et à mesure du déplacement du piston et donc de l'extrusion de la pâte. Cette séparation des phases reste, d'après la littérature, le principal obstacle conduisant à une mauvaise injectabilité des ciments phosphocalciques [Habib 2010].

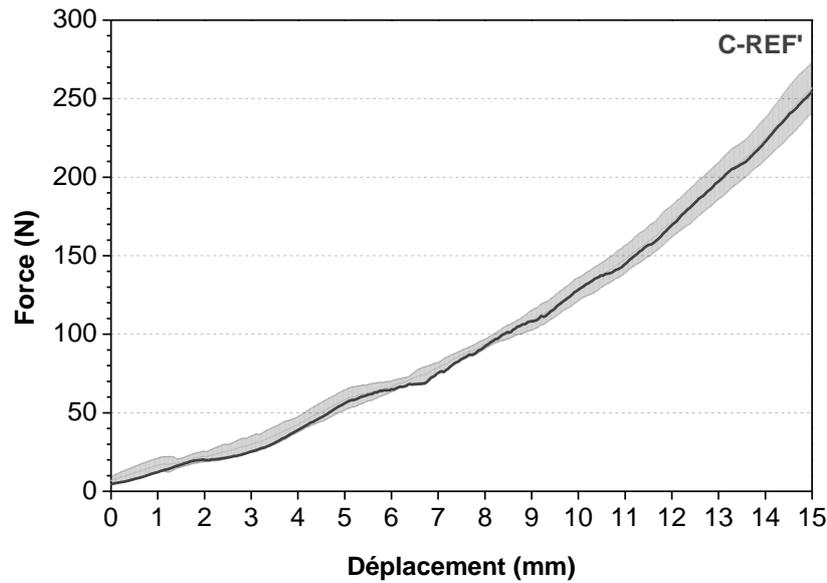


Figure 4.15 – Profil d’injectabilité du ciment de référence C-REF’ soit la force nécessaire à l’extrusion de la pâte au cours du déplacement du piston : un des profils (trait noir) et écart type autour de la moyenne des trois essais (zone grisée)

3.4 Introduction de la CMC : influence sur l’injectabilité de la pâte

Nous avons pu remarquer lors de la préparation de la pâte que l’introduction de 2 % et 10 % (m/m) de CMC modifiait radicalement la texture et le comportement rhéologique de la pâte : d’un comportement rhéofluidifiant pour le ciment de référence, nous avons obtenu une pâte avec un comportement plus élastique et cohésif et ce d’autant plus que la teneur en polysaccharide était plus élevée. Il apparaît donc que l’introduction de polysaccharide dans le ciment améliore nettement la malléabilité de la pâte bien que cette notion soit assez arbitraire et délicate à quantifier.

3.4.a Injectabilité des composites incluant de la CMC sous forme de poudre

Les profils d’injectabilité obtenus pour les ciments C-2pCMC et C-10pCMC (Figure 4.16) mettent en évidence la considérable amélioration de l’injectabilité du ciment composite : au-delà d’un régime transitoire de l’ordre d’une seconde – correspondant à un déplacement de 2 mm du piston – la force appliquée reste quasi constante et faible au cours de l’extrusion. On s’affranchit ainsi du phénomène de *filter-pressing*. La force n’excède d’autre part pas 30 - 40 N pour les deux compositions, ce qui est bien inférieur à celle nécessaire pour le ciment de référence (jusqu’à 250 N après une course de 15 mm) et à la limite fixée dans le cahier des charges (120 N). Il apparaît même que l’extrusion est légèrement facilitée au fur et à mesure du déplacement, avec un gain de l’ordre de 10 N pour le ciment C-2pCMC et de 15 N pour le ciment C-10pCMC.

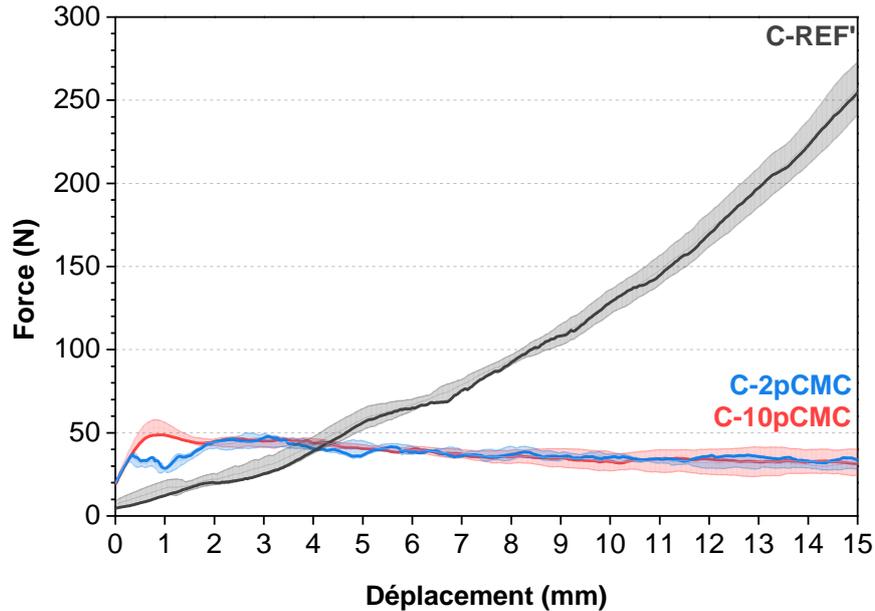


Figure 4.16 – Profils d'injectabilité des ciments C-REF', C-2pCMC et C-10pCMC

L'introduction de CMC sous forme de poudre dans la phase solide du ciment permet ainsi de rendre celui-ci injectable au sens où nous l'avons défini et ce même pour une faible quantité de polysaccharide (2 %). Hormis un comportement différent lors de la période transitoire du début de l'extrusion, il n'y a pas d'effet dose significatif entre un ciment p-composite contenant 2 % et 10 % m/m de CMC.

3.4.b Influence de la forme microsphère ou poudre de la CMC

Les essais ont de la même manière été réalisés sur les μ -composites et les profils obtenus, comparés à ceux des p-composites pour une quantité de CMC équivalente, sont présentés sur les Figure 4.17.a et b. Les résultats sont relativement similaires : les deux ciments C-2 μ CMC et C-10 μ CMC sont injectables ; la force appliquée est constante au cours du déplacement et bien inférieure à 120 N. Celle-ci est plus élevée pour le ciment C-2 μ CMC (60 N) que pour le ciment C-2pCMC (30-40 N) et montre une grande variabilité due à une inhomogénéité de répartition entre les trois essais. Cette variabilité n'est pas retrouvée pour le ciment C-10 μ CMC qui a été extrudé par une force de l'ordre de 40 N.

Il semble que l'écart observé entre les μ -composites et les p-composites pour des ciments chargés à 2 % m/m en polysaccharide s'atténue lorsque la quantité de ce dernier est augmentée.

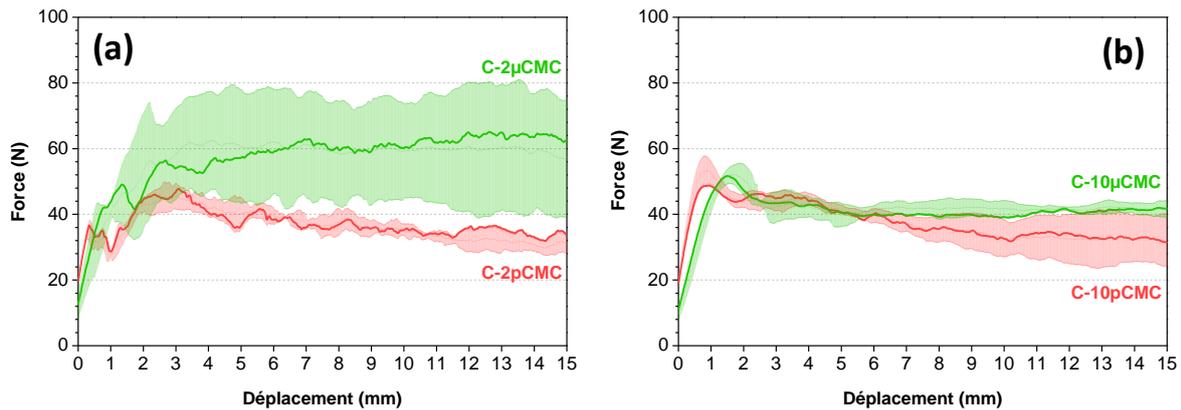


Figure 4.17 – Profils d’injectabilité des ciments μ -composites comparés aux p-composites chargés à (a) 2 % et (b) 10 % m/m en CMC.

3.5 Etude de l’orientation des plaquettes de brushite

La pâte du ciment C-REF’ est une suspension dense de plaquettes de brushite et de particules quasi sphériques de vatérite en milieu aqueux. Il a été montré par Tadier et coll. que le broyage de la brushite améliorait l’injectabilité^[45] mais sans supprimer le phénomène de séparation de phases alors que le co-broyage des particules de brushite et de vatérite permettait de s’affranchir de cet effet et de réduire la force à appliquer d’un facteur 100 [Tadier 2009]. D’autre part, nous avons mis en évidence que l’addition de CMC dans la phase solide du ciment conduisait, sans cette étape de broyage, à une nette amélioration de l’injectabilité du matériau.

De manière à mieux comprendre les causes du phénomène systématique de séparation des phases sur le ciment C-REF’ et sa disparition sur les ciments composites, nous avons cherché à observer l’organisation des particules au sein de ces deux systèmes et pendant l’extrusion de la pâte.

3.5.a Ciment de référence et séparation des phases

Protocoles d’observation MEB mis en place

Le protocole mis en place est décrit sur le schéma de la Figure 4.18 : la pâte d’un ciment C-REF’ a été placée dans une seringue juste après gâchage et manuellement extrudée de cette dernière au maximum. Le matériau était alors décomposé en deux parties : l’extrudat d’une part, et la pâte restante, bloquée dans le corps de la seringue. L’extrudat a été observé juste après extrusion au MEB sous pression contrôlée, permettant ainsi l’observation de la pâte contenant encore de

⁴⁵ La force à appliquer tout au long de l’essai est diminuée d’un facteur 4-5 par rapport à un ciment de référence sans pré-traitement des poudres

l'eau. La pâte restante bloquée dans le corps de la seringue et cette dernière ont été placées à l'étuve à 37 °C en milieu humide pendant 2 h de manière à initier la réaction de prise pour figer le bloc, sans toutefois que les plaquettes de brushite ne soient trop consommées. Le bloc a été ensuite séché dans cette même étuve, puis sa partie saillante, correspondant à un début d'extrusion, a été coupée (Figure 4.18). Il a alors été observé au MEB.

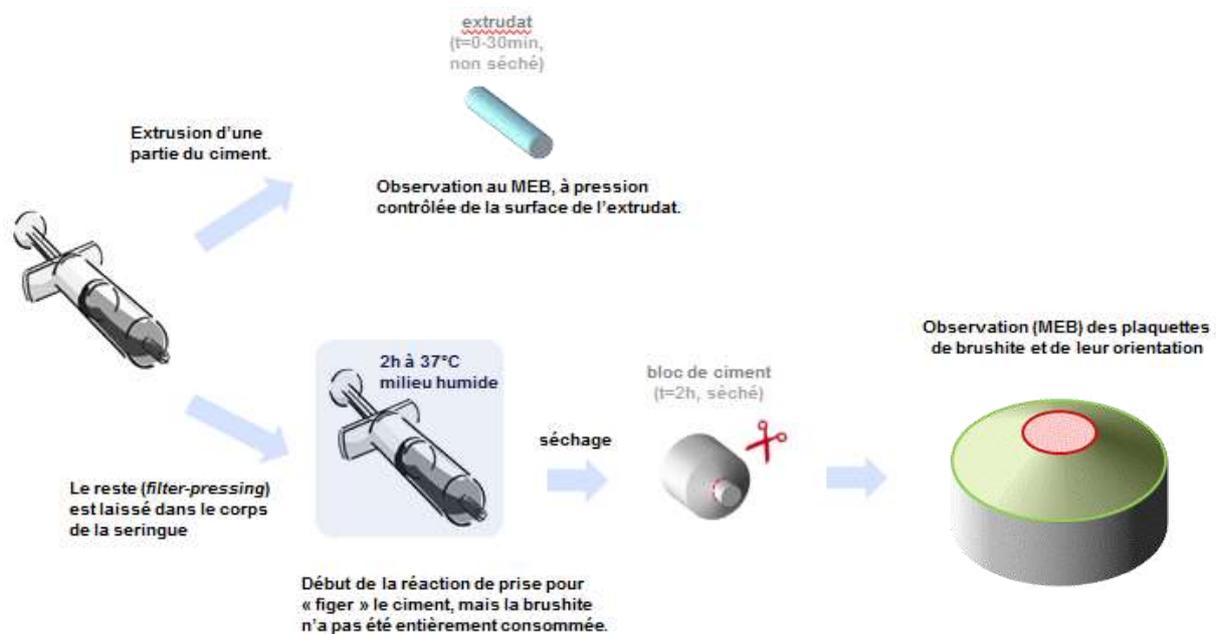


Figure 4.18 – Schéma du protocole suivi pour observer l'agencement des particules de brushite et de vatérite dans la pâte d'un ciment C-REF' après extrusion manuelle maximale de la pâte. Les zones colorées (en bleu, rouge et vert) correspondent à celles qui ont été analysées par MEB, dont les résultats sont présentés ci-après.

Résultats

La Figure 4.19 présente les micrographies de l'extrudat à divers grossissements. Les craquelures visibles sur les images a et b sont probablement dues à un début de séchage de l'échantillon dans un milieu à très basse pression sans apport extérieur d'eau. L'agencement des particules est néanmoins bien visible : sur les Figure 4.19.a et b, la plupart des plaquettes de brushite de la surface de l'extrudat (en forme de « spaghetti ») montrent une orientation préférentielle parallèle à celle-ci. L'extrusion semble donc être à l'origine d'un certain réarrangement des plaquettes au sein de la pâte, ou tout du moins à sa surface en contact avec la seringue.

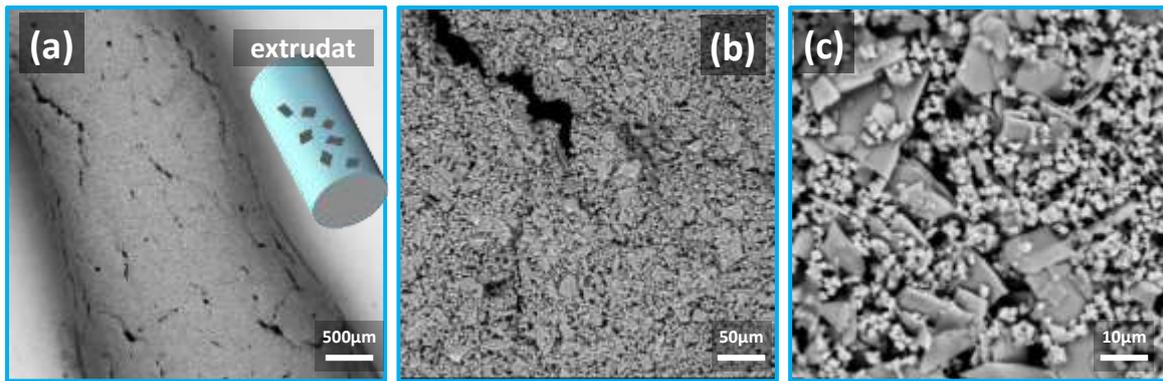


Figure 4.19 – Micrographies MEB de l'extrudat d'un ciment C-REF' aux grossissements (a) x20, (b) x200 et (c) x1000.

La Figure 4.20 présente les micrographies du bloc de pâte bloquée dans le corps de la seringue figée par un début de prise. Sur la surface qui était en contact avec la paroi de la seringue (Figure 4.20.a ; zone verte), l'orientation préférentielle des plaquettes est confirmée : avant même l'extrusion, les plaquettes apparentes ont toutes leur plus grande surface alignée parallèlement à la paroi de l'embout de la seringue. Ce qui est plus remarquable, c'est que la coupe de l'extrudat, à l'interface avec le reste de pâte bloquée dans la seringue (Figure 4.20.b, zone rouge), montre elle aussi une nette orientation des plaquettes de manière parallèle à l'axe de l'extrusion, même au cœur de la coupe circulaire. Il apparaît donc que le mouvement d'extrusion de la pâte conduit à une forte réorganisation des plaquettes de brushite dans l'ensemble du matériau selon la direction de l'écoulement. Ceci impliquerait notamment un changement d'orientation probablement complexe des particules de brushite au niveau du rétrécissement de la seringue.

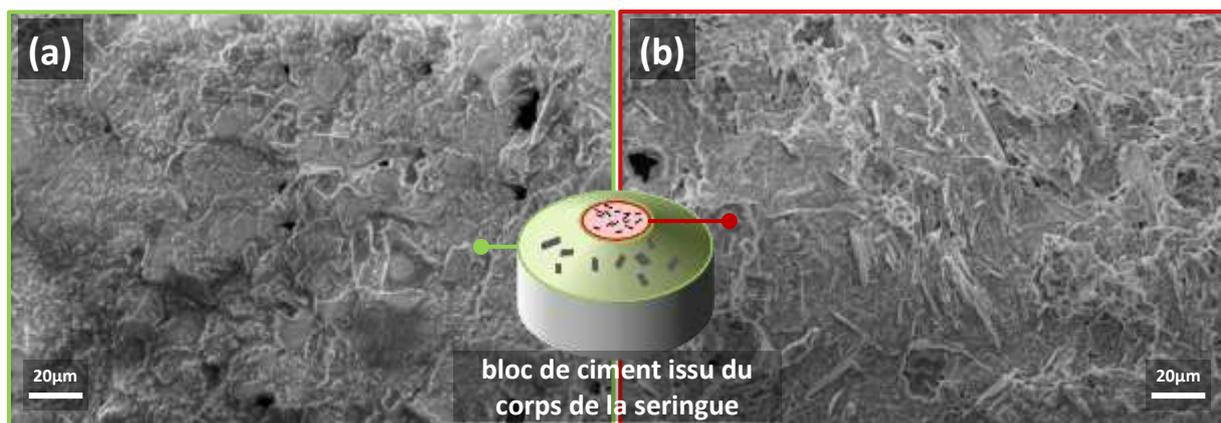


Figure 4.20 – Schéma et micrographies MEB de la pâte restée bloquée dans le corps de la seringue, après 2 h de prise. Observation (a) à la surface initialement en contact avec la paroi de la seringue (zone verte) ; (b) au centre du bloc, correspondant à une coupe de l'extrudat (zone rouge).

3.5.b Injectabilité des ciments composites incluant la CMC sous forme de microsphères

Protocole d'observation MEB mis en place

Des extrudats de ciments composites C-10 μ CMC ont également été observés par MEB de manière à mieux comprendre leur injectabilité et la disparition du phénomène de séparation des phases. Etant donné la cohésion que le polymère apporte au ciment, l'utilisation d'un MEB à pression contrôlée ne s'est pas révélée nécessaire comme dans le cas du ciment C-REF'. Les matériaux ont pu être figés par lyophilisation après un temps de prise de seulement 1 h (échantillon (a), Figure 4.21.a) voire directement après extrusion, sans être placés à l'étuve en milieu humide 10 minutes après le temps t_0 (échantillon (b), Figure 4.21.b). Les échantillons ont pu être manipulés et scindés sans être déstructurés – contrairement au ciment C-REF' – de manière à en analyser différentes zones : leur surface extérieure vue de dessus (a_{1-2}) ou en coupe (b_{1-2}) et le cœur de ces « spaghetti » (a_{3-5}).

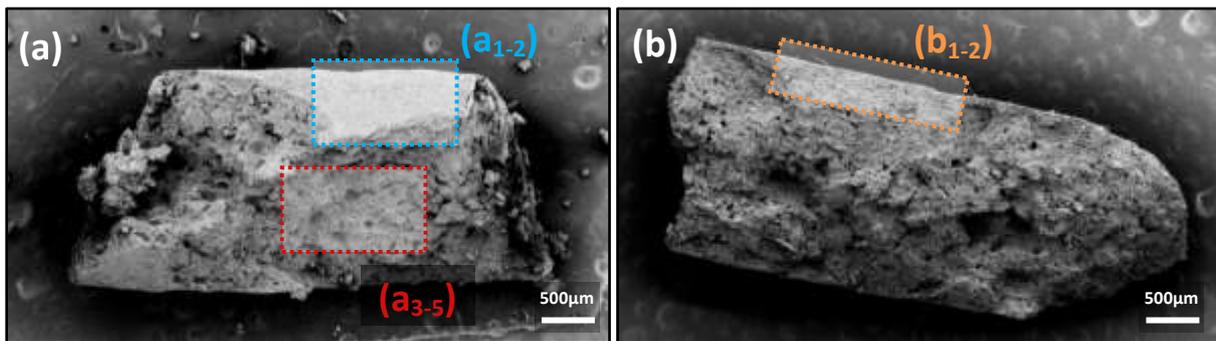


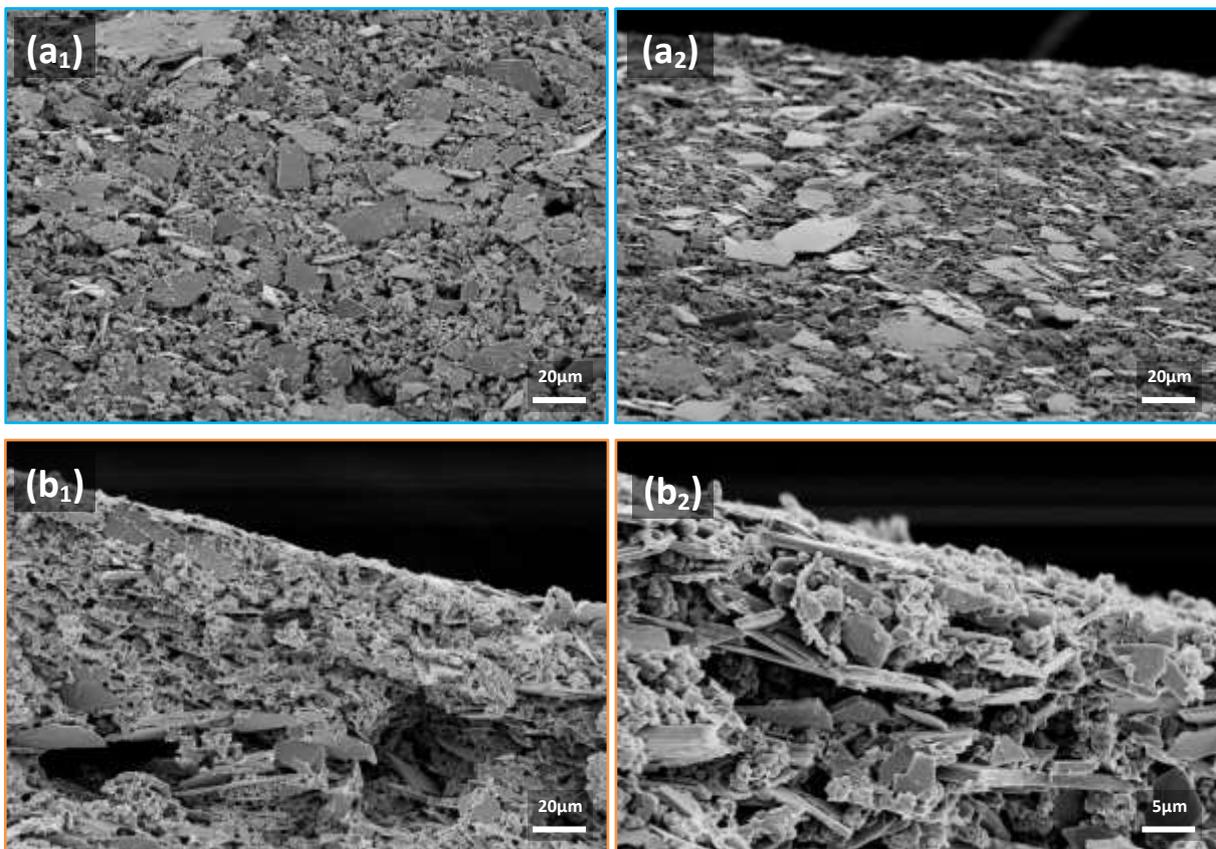
Figure 4.21 – Micrographies MEB de deux extrudats de ciments C-10 μ CMC après (a) 1 h à l'étuve à 37°C en milieu humide puis lyophilisation et (b) lyophilisation directement après extrusion. Les différentes zones mises en évidence sont celles observées plus particulièrement et dont les résultats sont présentés dans la Figure 4.22.

Résultats

Les Figure 4.22.a₁ et Figure 4.22.a₂, correspondant à un grossissement x500 de l'échantillon (a), montrent l'extérieur de la surface de l'extrudat du ciment C-10 μ CMC. Comme dans le ciment C-REF' (Figure 4.19), les plaquettes de brushite apparaissent orientées parallèlement à cette surface. L'orientation est même plus flagrante : alors que sur la Figure 4.19.c certaines particules de brushite se présentaient sur la tranche ou en diagonale, la proportion de plaquettes alignées à la surface apparaît ici plus importante. Une vue en coupe de cette zone sur les Figure 4.22.b₁ et Figure 4.22.b₂ confirme cet alignement : le plus fort grossissement de la Figure 4.22.b₂ montre bien l'agencement des plaquettes de manière parallèle à la surface et un grossissement moindre (Figure 4.22.b₁) révèle que cet arrangement n'est pas propre qu'aux bords externes de l'extrudat mais s'étend au sein de la pâte. Comme remarqué sur le ciment C-REF' (Figure 4.20.b), et

de manière peut-être encore plus remarquable, les plaquettes de brushite s'alignent dans la direction de l'écoulement lors de l'extrusion de la pâte de ciment.

Si les Figure 4.22.a₁₋₂ et b₁₋₂ montrent des similarités entre le ciment C-10 μ CMC et le ciment C-REF', les images (a₃), (a₄) et (a₅) de la Figure 4.22 mettent en évidence le rôle essentiel du polysaccharide dans la cohésion de la pâte et les interactions entre les particules minérales. Son rôle de liant avait déjà été remarqué dans les ciments contenant au moins 10 % de CMC après réaction totale de prise (cf. Figure 4.8) ; il est d'autant plus flagrant sur ces micrographies : sur la Figure 4.22.a₃ le polysaccharide apparaît comme une toile dans laquelle les particules de brushite et de vatérite sont enchevêtrées. Ces particules semblent suivre le mouvement du polymère, notamment aux environs d'une bulle de gaz – bulle d'air piégée lors du mélange ou début de libération de CO₂ issu de la réaction de prise – autour de laquelle les plaquettes de brushite semblent s'aligner. Les Figure 4.22.a₄ et a₅ mettent en évidence le rôle de liant de la CMC, qui forme une sorte de nappage qui relie les agglomérats de vatérite aux plaquettes de brushite. Il est possible que ce phénomène soit accentué par le séchage, néanmoins il a également été observé sur d'autres échantillons analysés à pression contrôlée sans étape de séchage.



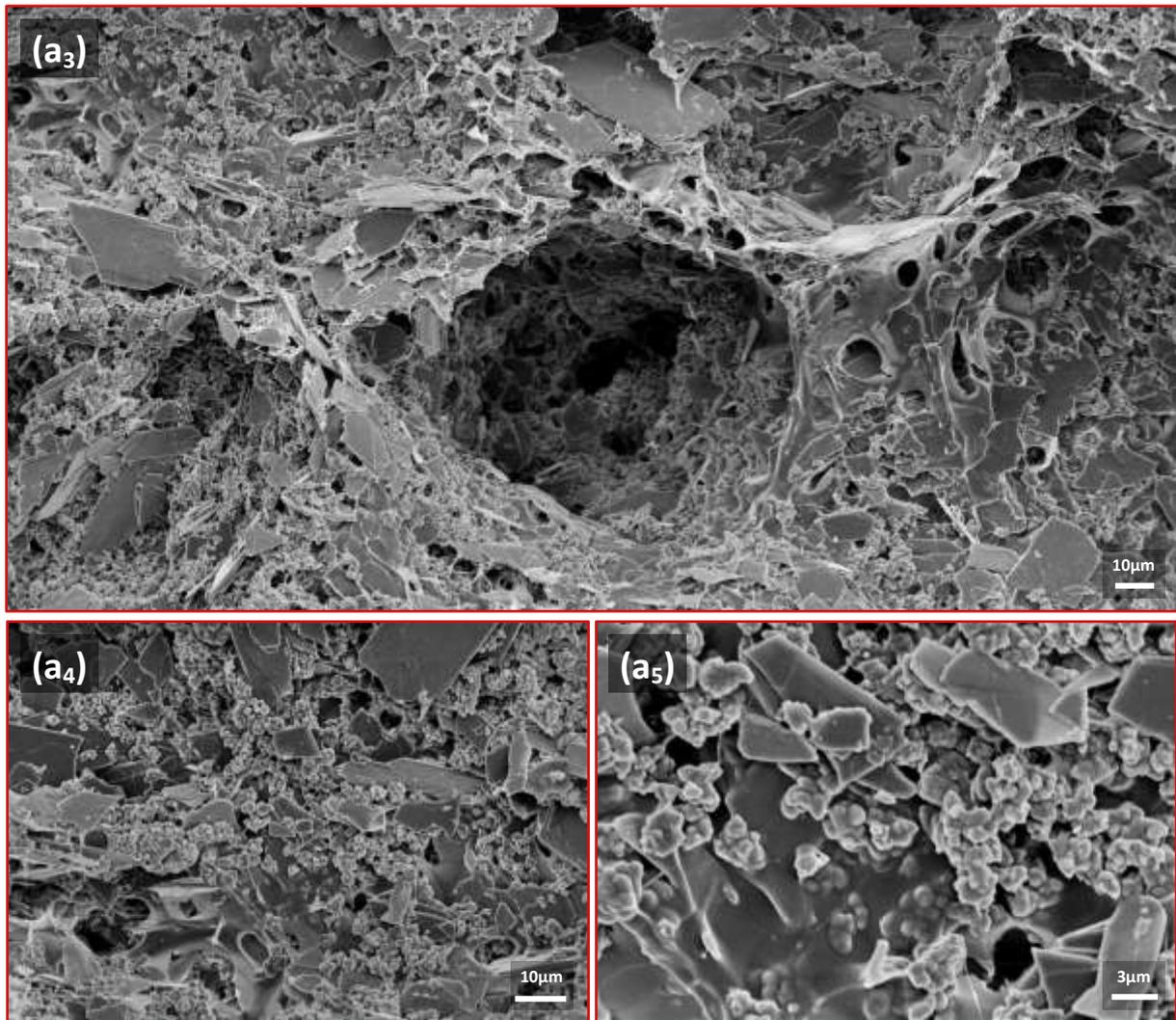


Figure 4.22 – Micrographies MEB de deux extrudats de ciments C-10 μ CMC après (a) 1 h à l'étuve à 37°C en milieu humide puis lyophilisation et (b) lyophilisation directement après extrusion. Différentes zones ont été observées : (a₁₋₂) la surface extérieure, (b₁₋₂) un coupe de cette surface et (a₃₋₅) le cœur de l'extrudat.

3.5.c Discussion

Une hypothèse proposée pour expliquer la séparation des phases lors de l'extrusion de la pâte du ciment C-REF' était un blocage des particules de brushite formant comme un « bouchon » en sortie de la seringue [Tadier 2009]. Les dernières observations réalisées par MEB permettent d'affiner cette interprétation : le blocage en question ne semble pas être dû, comme on aurait pu le penser, à un enchevêtrement désordonné des plaquettes de brushite au niveau de la zone de rétrécissement de la seringue. En effet, même après blocage, les plaquettes apparaissent toutes alignées à l'axe d'extrusion ce qui, d'un point de vue géométrique, pourrait a priori permettre le glissement des particules selon cet axe. Certes, même si nous n'avons pas pu l'observer par MEB,

l'interface entre les deux zones observées sur la Figure 4.20 doit être une zone où les contraintes géométriques sont plus complexes étant donné que l'orientation des plaquettes est modifiée d'un angle proche de 90°. Néanmoins la similarité de l'agencement des particules entre les ciments C-REF' et C-10 μ CMC ne permet pas d'expliquer une telle différence de comportement rhéologique entre les deux pâtes.

Le phénomène de *filter-pressing* pourrait ainsi être plutôt lié à l'interaction entre les plaquettes de brushite qui, une fois orientées, favoriseraient d'une part le passage de l'eau lorsque la force est appliquée et d'autre part seraient soumises à un frottement important de la part des particules voisines et ce d'autant plus que le rapport L / S diminue dans la pâte en cours d'extrusion. Cette dualité entre friction des particules et filtration a déjà été reportée dans la littérature comme une limite à la bonne extrusion de la pâte cimentaire dans le cas d'un ciment Portland [Lombois-Burger 2006].

A partir de ces observations, l'addition d'un polymère dans la composition du ciment pourrait alors faciliter l'extrusion de la pâte en jouant sur plusieurs paramètres. La CMC, gonflant en présence d'eau, conduit à une augmentation globale du volume de la pâte pour une même quantité de particules. Les contacts entre ces dernières et donc les frottements seraient ainsi minimisés à la fois par une dispersion plus grande et une répulsion stérique voire électrostatique des chaînes de polymères enveloppant les particules [Fernández 2005]. Ces observations rejoignent un mécanisme de lubrification hydrodynamique ^[46] proposé dans le cas du ciment Portland contenant différents polymères par Lombois et coll. pourrait d'autre part être extrapolé à notre système CaCO₃-CaP-CMC [Lombois-Burger 2006].

Un espacement plus grand entre les particules pourrait en contrepartie conduire à une filtration facilitée de la phase liquide à travers celles-ci. Pourtant l'effet de cet espace interparticulaire semble nettement contrebalancé par une viscosité accrue de la phase liquide associée à la présence du polysaccharide, voire même la formation d'un gel faible, réseau tridimensionnel dans lequel l'eau serait emprisonnée. Ce dernier élément renforcerait donc aussi la disparition du phénomène de séparation de phases.

⁴⁶ La *lubrification hydrodynamique* correspond à un milieu où le film de fluide sépare totalement les surfaces en présence soit, dans le cas du ciment, les particules minérales.

4 Essais mécaniques en compression

Les intérêts à l'utilisation des ciments à base de phosphate de calcium sont multiples, comme nous avons pu l'évoquer auparavant. Néanmoins si ces derniers présentent une faiblesse elle se situe certainement sur le plan de leurs propriétés mécaniques, bien faibles comparées à celles de l'os, notamment liées à leur comportement fragile [Dorozhkin 2012]. Si les propriétés de l'os sont si exceptionnelles, c'est en particulier grâce à son caractère composite entre sa phase minérale apatitique et sa phase organique, le collagène (Chapitre 1 - § 1.1). L'élaboration d'un ciment composite inorganique-organique s'inscrit donc dans une approche biomimétique.

L'imbrication des phases qui constituent un matériau composite peuvent prendre plusieurs formes qui auront un rôle différent d'un point de vue des propriétés mécaniques. La Figure 4.23 présente ainsi trois types « classiques » d'inclusions.

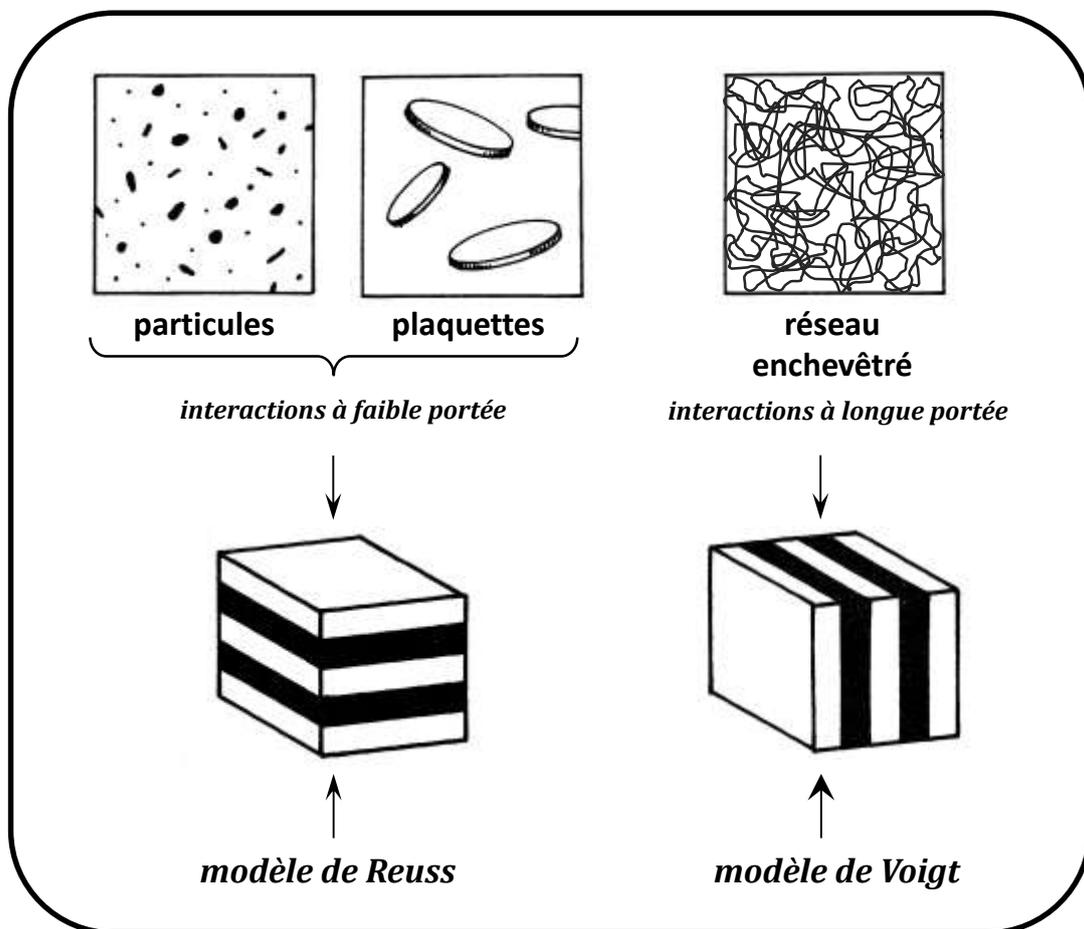


Figure 4.23 – Morphologie de différents matériaux composites et modèles idéalisés de Reuss et Voigt associés. Adapté de [Lakes 2000].

Supposons qu'une phase B est incluse dans une matrice A. Cette phase B peut ainsi se trouver sous forme de particules, de plaquettes, de courtes fibres... Les interactions y sont dans ce cas à faible portée, sous l'application d'une force en compression, par exemple. Le modèle qui décrit

le mieux ce comportement est le *modèle de Reuss* [François 1992]. Le module élastique E_{Reuss} du composite peut alors s'exprimer ainsi :

$$1/E_{\text{Reuss}} = \alpha_A.(1/E_A) + \alpha_B.(1/E_B) \quad (4.1)$$

avec α_A et α_B les fractions volumiques de chacune des phases dans le composite et E_A et E_B leur module élastique. Si au contraire la phase B prend la forme d'un réseau enchevêtré dont les interactions ont une longue portée dans le matériau, le modèle le plus adapté pour décrire la structure est le *modèle de Voigt*. Le module élastique s'exprime alors comme une combinaison des modules des phases :

$$E_{\text{Voigt}} = \alpha_A.E_A + \alpha_B.E_B \quad (4.2)$$

Nous pourrions utiliser ces modèles pour décrire les ciments composites.

4.1 Protocole expérimental

Des essais de résistance mécanique en compression ont été réalisés sur les différents types de ciments composites étudiés dont la composition est donnée dans le Tableau 4.1. Des blocs cylindriques de ces ciments ($h = 19,5 \text{ mm}$; $\varnothing = 10,5 \text{ mm}$) ont été réalisés par moulage de la pâte dans des moules en silicone juste après gâchage. Ils ont ensuite été placés à l'étuve à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en milieu humide pendant 48 h pour permettre la prise et le durcissement du ciment puis séchés pendant une semaine. Leurs propriétés mécaniques ont été évaluées en réalisant des essais de compression uniaxiale – avec une vitesse imposée de $0,8 \text{ mm.min}^{-1}$ – sur ces éprouvettes cylindriques (schéma de la Figure 4.24) à l'aide d'un appareil d'essais mécaniques (Hounsfield série S) .

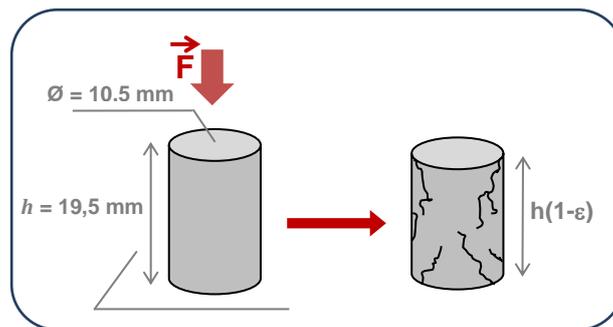


Figure 4.24 –Représentation schématique des essais de compression réalisés sur un bloc cylindrique de ciment

Les données enregistrées tout au long de l'essai ont ainsi permis de relier la contrainte (σ) subie par chaque éprouvette, définie comme la force (F) appliquée par unité de surface ($S = 86,6 \text{ mm}^2$, éq. (4.3)) à leur déformation (ϵ), exprimée en pourcentage par rapport à la hauteur h initiale.

$$\sigma = F / S \quad (4.3)$$

4.2 Grandeurs caractéristiques

Une courbe de déformation (ε) – contrainte (σ) caractéristique des résultats obtenus, présentée sur la Figure 4.25, décrit le comportement mécanique général des ciments en compression.

Sous l'action de la force uniaxiale appliquée, dans une première phase, le matériau emmagasine l'énergie et sa hauteur diminue. La déformation, alors élastique et réversible, est directement proportionnelle à la contrainte exercée et suit la loi de Hooke :

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (4.4)$$

où le facteur de proportionnalité est le *module de Young* ou *module d'élasticité* E . Ce dernier correspond à la pente initiale du diagramme de déformation – contrainte ; il caractérise la rigidité du matériau, d'autant plus rigide que le module est important et d'autant plus flexible qu'il est faible. ^[47] A la *limite d'élasticité* R_e , la déformation devient plastique et irréversible. Cette grandeur étant difficile à mettre en évidence expérimentalement, c'est la *limite du domaine élastique à 0,2 % de déformation irréversible* ($R_{e0,2}$) qui est conventionnellement utilisée pour discuter de ce changement de comportement. La valeur maximale R_c de la courbe $\sigma = f(\varepsilon)$ témoigne de la *résistance à la compression* du matériau avant qu'il ne perde son intégrité : la rupture se traduit par l'apparition d'un réseau de fissures avant la rupture macroscopique de l'éprouvette. La capacité du matériau à emmagasiner de l'énergie sous la contrainte peut être évaluée par l'aire sous la courbe du diagramme contrainte – déformation du début de l'essai jusqu'à la contrainte maximale R_c , correspondant à une déformation ε_c du cylindre. Cette aire a la dimension d'une énergie et sera notée \mathcal{E}_c (énergie à la contrainte maximale) dans la suite de cette étude.

⁴⁷ Il est à noter que le module de Young se détermine habituellement dans une phase de décharge (ou de relaxation) et non de charge comme présenté ici, dans cet essai principalement destiné à déterminer la résistance à la compression du matériau. Néanmoins l'évaluation qui en est faite en donne un ordre de grandeur pertinent.

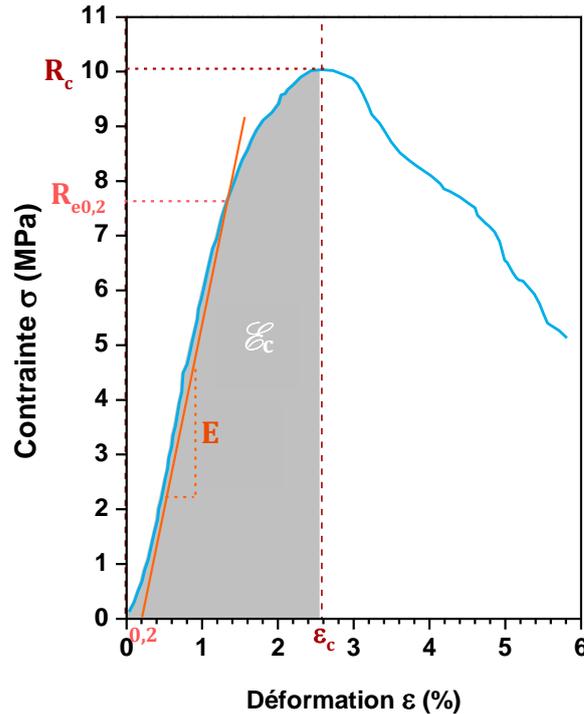


Figure 4.25 – Exemple de diagramme de déformation (ε) – contrainte (σ) obtenu expérimentalement pour un ciment C-10pCMC et grandeurs caractéristiques du matériau.

Nous avons ainsi cherché à évaluer l'effet de la composition – teneur en CMC dans les p-composites et les μ -composites – sur ces différentes grandeurs caractéristiques et à en discuter les conséquences sur les propriétés mécaniques des ciments.

4.3 Essais sur les composites

4.3.a Ciments incluant la CMC sous forme de poudre

Des essais de compression ont été réalisés sur les ciments C-REF', C-2pCMC, C-10pCMC, C-20pCMC, C-30pCMC et C-50pCMC, contenant respectivement de 0 % à 50 % m/m de CMC sous forme de poudre dans la phase solide. Pour les quatre premiers matériaux ces essais ont été répétés cinq fois ($n = 5$)^[48]. Un seul essai a été réalisé sur les ciments les plus chargés en polysaccharide (C-30pCMC et C-50pCMC ; $n = 1$) pour confirmer les tendances observées quant à l'influence de la teneur en CMC sur les propriétés mécaniques du ciment.

Principaux résultats

Un diagramme contrainte – déformation type de chacun de ces matériaux est présenté sur la Figure 4.26.a ; les grandeurs significatives moyennes issues de la totalité des essais sont reportées

⁴⁸ Sauf pour le ciment C-10pCMC où seuls quatre essais ont pu être réalisés

dans le Tableau 4.3. Etant donné que les propriétés mécaniques d'un matériau sont intimement liées à sa porosité (P), cette donnée présentée dans le Tableau 4.2 a également été reportée dans le Tableau 4.3.

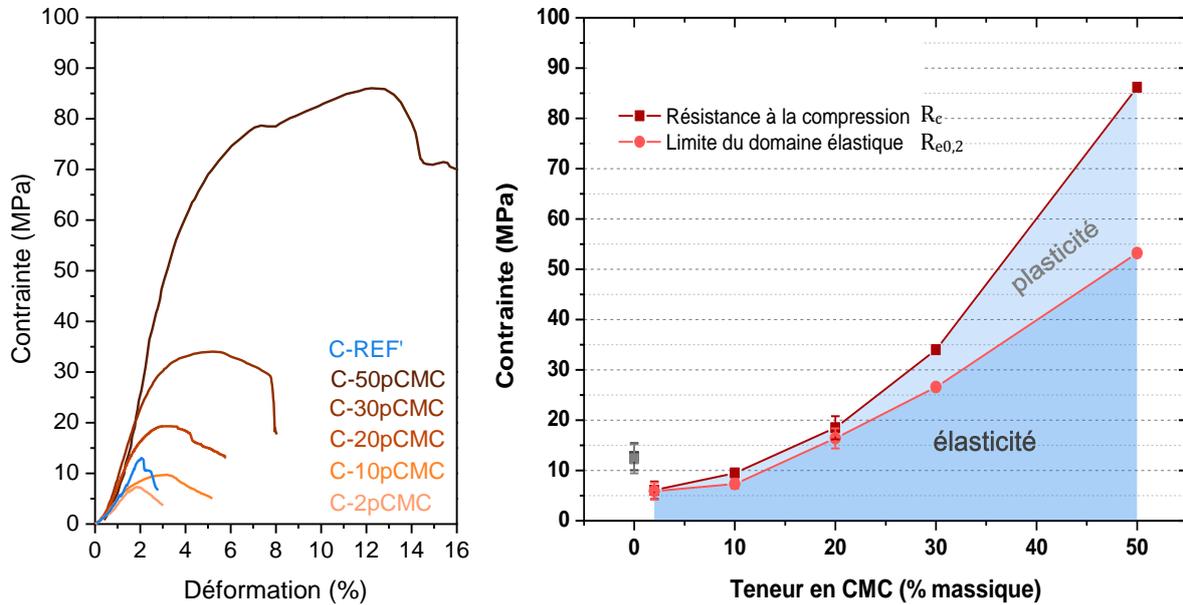


Figure 4.26 – (a) Diagrammes contrainte – déformation des ciments p-composites comparés au ciment C-REF'. (b) Evolution de la résistance à la compression R_c et de la limite du domaine d'élasticité à 0,2 % de déformation $R_{e0,2}$ en fonction de la teneur en CMC sous forme de poudre dans le ciment composite.

		E (GPa)	$R_{e0,2}$ (MPa)	R_c (MPa)	ϵ_c (%)	\mathcal{E} (kJ.m⁻³)	P (%)
C-REF'	(5)	0,9 ± 0,4	12,3 ± 2,9	12,7 ± 2,7	2,1 ± 0,4	119 ± 11	88
C-2pCMC	(5)	0,6 ± 0,2	5,9 ± 1,7	6,1 ± 1,7	1,5 ± 0,4	49 ± 24	88
C-10pCMC	(4)	0,6 ± 0,1	7,3 ± 0,9	9,5 ± 0,5	2,8 ± 0,3	163 ± 26	66
C-20pCMC	(5)	1,2 ± 0,2	16,4 ± 2,0	18,5 ± 2,3	2,5 ± 0,4	270 ± 65	55
C-30pCMC	(1)	1,4	26,6	34,0	5,3	1200	59
C-50pCMC	(1)	2,3	53,2	86,2	12,3	7590	24

Tableau 4.3 – Grandeurs caractéristiques issues des essais mécaniques en compression sur des ciments composites C-pCMC comparés au ciment C-REF'.

Avec un domaine plastique très limité, le ciment de référence C-REF', comme la plupart des céramiques a un comportement fragile : sa contrainte chute rapidement après la phase élastique (Figure 4.26.a). Sa résistance mécanique (12,7 ± 2,7 MPa) est d'autre part faible comparée à celle de l'os (cf. Tableau 1.1). C'est le propre et la faiblesse de la plupart des ciments phosphocalciques et ce qui guide leur application en comblement d'os dits non porteurs.

L'ajout d'un polysaccharide tel que la CMC dans la matrice minérale joue très nettement sur le comportement mécanique du matériau, comme les données présentées Figure 4.26 et Tableau 4.3 le mettent en évidence. L'addition d'une petite quantité de CMC (2 %) affaiblit ainsi la plupart des propriétés mécaniques telles que la résistance à la compression des ciments composites ou leur

ténacité pourtant ces mêmes propriétés apparaissent ensuite renforcées dès l'introduction d'une quantité plus grande de polysaccharide. La suite de cette étude s'attache ainsi à évaluer l'influence de l'ajout de CMC sous forme de poudre dans la phase solide du ciment sur les propriétés mécaniques des ciments composites étudiés.

Résistance à la compression

La résistance à la compression des ciments est présentée à la fois dans le Tableau 4.3 et sur la Figure 4.26.b. Une diminution par rapport au ciment C-REF' est observée pour les ciments contenant moins de 10 % de CMC, notamment pour le ciment C-2pCMC pour lequel la résistance est diminuée de moitié. Cependant un effet dose considérable est révélé lors de l'addition d'une quantité plus importante de ce polymère : la résistance mécanique en compression atteint jusqu'à 86,2 MPa pour le ciment C-50pCMC. Le polysaccharide apparaît donc comme un moyen d'améliorer cette résistance à la compression souvent faible des ciments CaP. Toutefois, il est probable que l'hétérogénéité du milieu induite par l'ajout de cette nouvelle phase soit prépondérante sur cet effet lorsque la quantité incluse est trop faible et favorise alors l'apparition de fissures. Il apparaît donc important d'ajouter au moins 10 % de CMC dans le ciment et d'en contrôler la bonne dispersion.

Ductilité

La CMC augmente d'autre part très nettement la ductilité du ciment composite en accroissant sa déformation à rupture, comme en témoigne l'écart entre $R_{e0,2}$ et R_c qui se creuse lorsque la quantité de CMC augmente (Figure 4.26.b). En effet alors que le ciment C-REF' montrait un comportement fragile, la présence de polysaccharide conduit à une déformation maximale beaucoup plus importante sous l'action de la contrainte (jusqu'à $\epsilon_c = 12,3$ % pour C-50pCMC ; Tableau 4.3).

Module d'élasticité

Le module de Young du ciment montre lui aussi une importante dépendance à sa composition (Tableau 4.3). A première vue il apparaît que le module élastique des ciments p-composites augmente avec leur teneur en CMC (Figure 4.27.a), c'est-à-dire que ces matériaux seraient d'autant plus rigides qu'ils contiennent une quantité importante de polymère. Cette seule considération pourrait sembler surprenante, étant donné le faible module élastique de la CMC (1,2 GPa d'après [Layek 2012]) comparé à celui des minéraux (de l'ordre de 100 GPa pour une hydroxyapatite dense d'après [Rezwan 2006], certes bien moindre pour une apatite nanocristalline). Néanmoins deux grandeurs caractéristiques sont essentielles à prendre en compte pour comprendre ce comportement : non seulement la teneur en polysaccharide mais aussi et surtout la porosité du ciment. Ces deux grandeurs sont liées : comme présenté dans le Tableau 4.3, la porosité du ciment

composite est d'autant plus faible qu'il contient une quantité importante de polysaccharide. Ainsi, la Figure 4.27.b met en évidence que le module élastique est d'autant plus faible et donc le composé d'autant plus flexible que le matériau est plus poreux, ce qui est cohérent avec les données de la littérature, même si les études associent peu les résultats mécaniques des biomatériaux composites à une caractérisation de la porosité du matériau [Wagoner Johnson 2011].

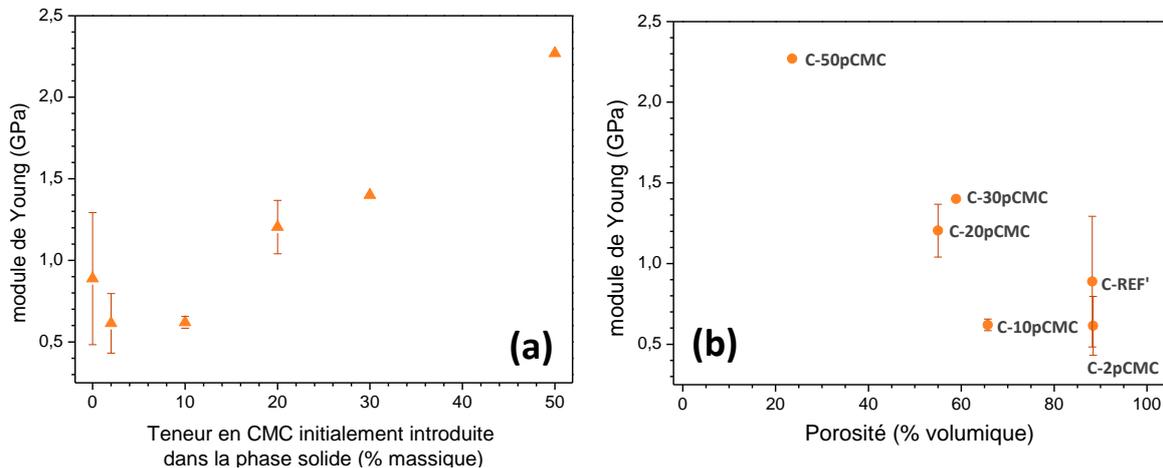


Figure 4.27 – Variation du module de Young des ciments C-REF' et p-composites en fonction (a) de la teneur en CMC initialement introduite dans le ciment et (b) de la porosité après 48 h de prise

Comme évoqué en début de cette partie, le module élastique d'un matériau composite est fonction du module et de la fraction volumique de chacun de ses constituants. En fin de prise, les ciments sont constitués de deux phases minérales, l'apatite (Ap) et la vaterite (V) et, dans le cas des composites, d'une phase organique : la CMC. Etant donnée les observations faites par MEB mettant en évidence le rôle de liant de cette dernière, notamment dans le cas des ciments p-composites contenant plus de 10 % de polysaccharide (Figure 4.8 et Figure 4.22), il est très probable que celui-ci s'apparente plus à un réseau interconnecté qu'à des éléments dispersés et ait ainsi une interaction à longue portée dans les ciments composites (cf. éq. (4.2)). Le modèle de Voigt nous a donc semblé, a priori, le plus pertinent pour décrire l'effet de la charge sur le module élastique. Celui-ci s'exprimerait alors comme suit :

$$E = \alpha_{Ap} \cdot E_{Ap} + \alpha_V \cdot E_V + \alpha_{CMC} \cdot E_{CMC} \quad (4.5)$$

avec E_{Ap} , E_V et E_{CMC} les modules élastiques de chacune des phases et α_{Ap} , α_V et α_{CMC} leurs fractions volumiques. L'existence d'une porosité importante dans ces ciments nous amène à l'expression suivante :

$$\alpha_{Ap} + \alpha_V + \alpha_{CMC} + P = 1 \quad (4.6)$$

ce qui revient à considérer dans le modèle de Voigt le vide comme une phase supplémentaire – de fraction volumique P – dont le module élastique serait nul.

Les fractions volumiques de chacune des phases sont délicates à déterminer notamment car la plupart des résultats dont nous disposons sont des données massiques. Or il paraît difficile d'évaluer avec précision la densité d'une part de l'apatite et d'autre part de la CMC au sein du ciment en fin de prise, et après séchage à l'étude. Nous avons donc été amenés à faire plusieurs hypothèses et approximations :

- la réaction de prise conduit à une perte massique de l'échantillon due à un dégagement de CO₂. Pour un ciment C-REF, cette perte a été évaluée à 11 ± 2 % (Chapitre 2 - § 2.3.b). Pour les ciments composites, nous admettrons que la masse de CMC ne varie pas pendant la réaction de prise et nous estimerons que la masse perdue en fin de réaction est proportionnelle à la quantité de vatérite initialement introduite. ^[49]

- la densité de la CMC est de l'ordre de 1,6 [Brenntag Canada Inc. 2010; Layek 2012]. Il est possible que dans le ciment, après gonflement en présence d'eau, prise de la partie minérale et séchage à l'étuve à 37 °C cette densité soit moindre. Nous utiliserons néanmoins cette valeur $d_{CMC} = 1,6$ en ayant vérifié qu'une densité inférieure ne modifiait pas de manière significative le raisonnement et les résultats présentés ci-après. ^[50]

- la densité de l'apatite, fonction de sa stœchiométrie, varie de 3,2 pour une apatite stœchiométrique Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ à 2,6 pour une apatite mal cristallisée de carbonatation maximale de type Ca₈[(PO₄)₄(CO₃)₂]□₂. La stœchiométrie réelle de l'apatite formée au sein du ciment se situe entre ces deux extrêmes, plus proche d'une apatite carbonatée lacunaire, nous choisirons donc cette dernière comme modèle.

- La densité de la vatérite est de 2,6. L'approximation précédente permet donc, dans un souci de simplification, de modéliser le système apatite – vatérite comme une unique phase de densité 2,6 et de module élastique global E_{Ap-V}. L'expression du module de Young du ciment composite se simplifie alors :

$$E = \alpha_{Ap-V} \cdot E_{Ap-V} + \alpha_{CMC} \cdot E_{CMC} \quad (4.7)$$

expression qui, en prenant en compte la relation (4.5) peut aussi s'écrire :

$$E = (1 - \alpha_{CMC} - P) \cdot E_{Ap-V} + \alpha_{CMC} \cdot E_{CMC} \quad (4.8)$$

⁴⁹ Les résultats expérimentaux obtenus pour C-2pCMC et C-10pCMC sont cohérents avec cette hypothèse ; la perte massique n'a pas été évaluée pour les ciments les plus chargés en CMC.

⁵⁰ Ces résultats ne sont pas présentés dans le manuscrit.

L'ensemble de ces hypothèses et approximations nous permettent d'estimer les compositions massiques et volumiques suivantes (Tableau 4.4) :

	Perte massique totale estimée	fraction massique ($f_{m(CMC)} + f_{m(Ap-V)} = 1$)		fraction volumique ($\alpha_{vide} + \alpha_{CMC} + \alpha_{Ap-V} = 1$)		
		$f_{m(CMC)}$	$f_{m(Ap-V)}$	$P (= \alpha_{vide})$	α_{CMC}	α_{Ap-V}
C-REF'	0,11	0,00	1,00	0,88	0,00	0,12
C-2pCMC	0,11	0,02	0,98	0,88	0,00*	0,12
C-10pCMC	0,10	0,11	0,89	0,66	0,06	0,28
C-20pCMC	0,09	0,22	0,78	0,55	0,14	0,31
C-30pCMC	0,08	0,33	0,67	0,59	0,18	0,23
C-50pCMC	0,06	0,53	0,47	0,24	0,49	0,27

Tableau 4.4 – Composition des ciments C-REF' et p-composites en prenant en compte les hypothèses présentées ci-avant. * La teneur volumique estimée pour C-2pCMC est de 0,004.

De manière à nous affranchir de tout autre paramètre que de la fraction volumique de CMC dans le matériau, nous avons été amenés à exprimer la porosité comme une fonction de cette dernière à partir des données expérimentales. Le modèle mathématique le plus adapté s'est avéré être une fonction parabolique exprimée comme suit :

$$P(\alpha_{CMC}) = A + B.\alpha_{CMC} + C.(\alpha_{CMC})^2 \tag{4.9}$$

extrapolée pour $\alpha_{CMC} \in [0 ; 1]$.^[51] La courbe et les constantes A, B et C obtenues sont présentées sur la Figure 4.28.

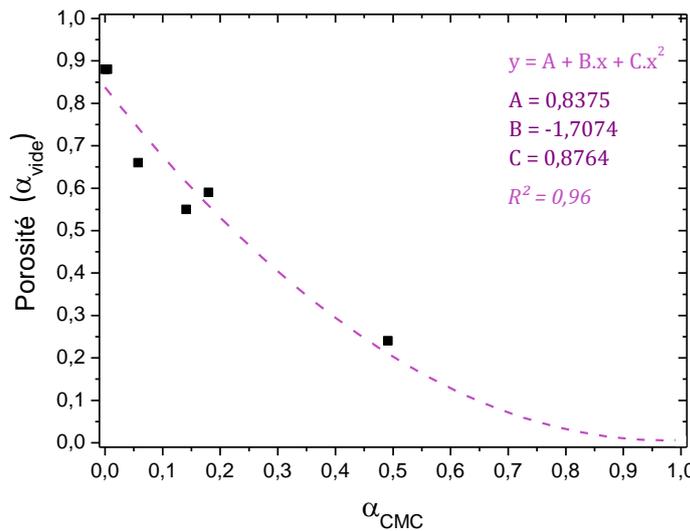


Figure 4.28 – Evolution de la porosité ($P = \alpha_{vide}$) des ciments en fonction de leur fraction volumique en CMC α_{CMC} .

⁵¹ Une contrainte de passer par le point (1 ; 0) a été ajoutée pour déterminer le polynôme du second degré, de manière à rapprocher le modèle d'une réalité physique : un matériau ayant une fraction volumique α_{CMC} de 1, au sens où nous l'avons défini, aurait en effet nécessairement une porosité nulle.

L'expression (4.7) a pu se redéfinir alors comme une fonction de la seule variable α_{CMC} :

$$E(\alpha_{CMC}) = (1-A).E_{Ap-V} + (E_{CMC} - (1+B).E_{Ap-V}).\alpha_{CMC} - C. E_{Ap-V}.\alpha_{CMC}^2 \quad (4.10)$$

En conséquence directe de l'expression (4.10), une équation parabolique a également été utilisée pour modéliser cette relation $E = f(\alpha_{CMC})$.^[52] Avec les paramètres A', B' et C' définis sur la Figure 4.29.a, ce modèle semble pertinent et amène à trois équations (4.11), (4.12) et (4.13) reliant les deux inconnues E_{Ap-V} et E_{CMC} :

$$\begin{cases} A' = (1-A).E_{Ap-V} & (4.11) \\ B' = E_{CMC} - (1+B).E_{Ap-V} & (4.12) \\ C' = -C.E_{Ap-V} & (4.13) \end{cases}$$

Les équations (4.11) et (4.13) n'étant pas équivalentes, deux solutions mathématiques ont été établies : (1) $E_{Ap-V} = 3,0$ GPa et $E_{CMC} = 3,3$ GPa ; (2) $E_{Ap-V} = 4,2$ GPa et $E_{CMC} = 2,5$ GPa. La Figure 4.29.b confronte ces deux solutions aux résultats expérimentaux. La solution (2), d'un point de vue physique, est non recevable : il est improbable que le module de Young des ciments p-composites diminue à partir d'une certaine teneur en CMC. La solution (1) en revanche montre une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux et semble physiquement recevable.

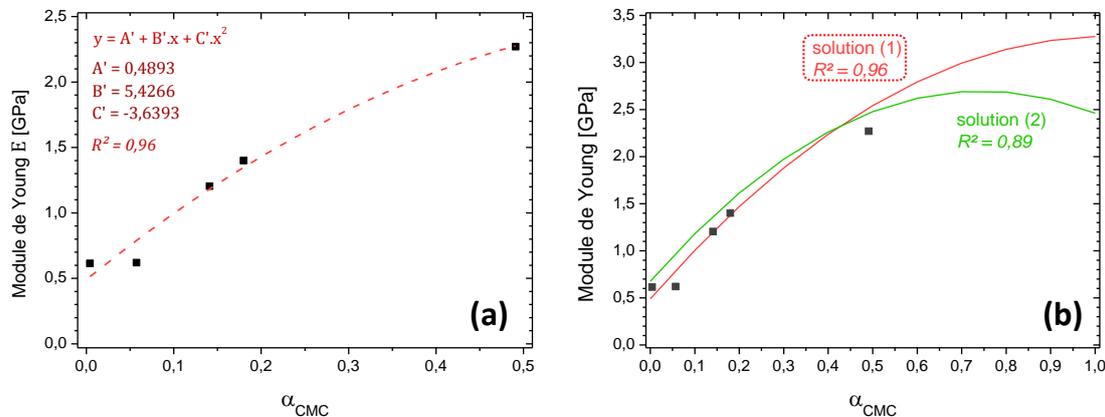


Figure 4.29 – Expression du module de Young $E = f(\alpha_{CMC})$: (a) régression parabolique à partir des données expérimentales ; (b) solutions mathématiques possibles suite à la résolution de l'ensemble du système.

Cette estimation des modules élastiques de la fraction minérale et de la fraction organique des ciments p-composites ($E_{Ap-V} = 3,0$ GPa ; $E_{CMC} = 3,3$ GPa) n'a pas pour but d'en déterminer une valeur purement quantitative : elle est en effet issue d'un ensemble d'approximations – notamment les densités réelles des différentes phases qui nécessiteraient une évaluation plus fine – sources

⁵² Le ciment C-REF', cas particulier de ciment composite dont $\alpha_{CMC} = 0$, a été écarté de la modélisation ne montrant pas une apparente continuité de ses propriétés mécaniques avec celles des p-composites. Cette fonction est donc valable pour $\alpha_{CMC} \in]0 ; 0,5]$.

d'une incertitude non négligeable. Cependant cela nous donne deux informations intéressantes sur ces ciments.

La première est que ces modules semblent être du même ordre de grandeur dans ce composite et donc n'expliqueraient pas, seuls, une telle variation de celui du matériau en fonction de sa composition. Des données de la littérature sur des ciments TTCP-monétite tendent à confirmer la faible influence du polysaccharide sur le module élastique du ciment composite : l'addition de 0,25 % à 1,5 % massiques d'hydroxypropyméthyl cellulose (HPMC) [Burguera 2005] ou de 3,3 % à 7,0 % massiques de chitosan [Xu 2005] n'ont ainsi entraîné aucune modification significative du module élastique du ciment, compris entre 2 et 6 GPa selon le rapport L/S.^[53] Dans le cas de notre ciment composite CaCO_3 – CaP – CMC, il semble que ce soit la porosité qui joue un rôle prépondérant.

La seconde information que nous pouvons en déduire est que le modèle de Voigt utilisé au départ n'a pas été mis en défaut au cours du raisonnement et semble effectivement pertinent. Cela confirmerait l'interaction longue portée du polymère d'un point de vue mécanique au sein du matériau qui s'apparenterait ainsi à un réseau enchevêtré intimement mêlé à la matrice minérale. L'interaction entre ces deux phases serait d'autant plus importante que les groupements carboxyliques de la CMC sont préposés à former des liens ioniques forts avec les sels de calcium, particulièrement l'apatite précipitée in situ [Kawashita 2003; Nge 2006].

Ces indications sur la répartition volumique du polymère sont importantes, notamment en vue du comportement du ciment une fois implanté en site osseux : l'agencement de la CMC au sein de la matrice minérale pourra en effet jouer un rôle dans la dégradation et la résorption du matériau par les cellules ostéoclastiques.

Ténacité

Peu d'études s'attachent à quantifier la ténacité des ciments contenant un polymère. Pourtant, étant donné la fragilité des matériaux à base de phosphates de calcium, l'amélioration de leur ténacité a été reportée dans la littérature comme un des principaux enjeux à venir [Wagoner Johnson 2011]. L'énergie à la contrainte maximale, correspondant à la somme d'une énergie élastique stockée de manière réversible et d'une énergie dissipée de manière irréversible dans le bloc de ciment, est un paramètre qui permet d'évaluer cette grandeur.^[54]

⁵³ Dans les deux études citées, le polysaccharide a été introduit en phase liquide. De manière à pouvoir comparer nos résultats à ceux de ces études, les pourcentages ont été rapportés à la phase solide et non à la phase liquide comme ils étaient initialement exprimés dans les publications.

⁵⁴ Contrairement au module d'élasticité, par exemple, qui est une grandeur intrinsèque au matériau, cette énergie à la contrainte maximale est dépendante des paramètres expérimentaux. Cependant elle permet une comparaison relative des différents échantillons.

La Figure 4.30 reporte la variation de cette énergie en fonction de la composition du ciment composite. En accord avec les observations faites sur les différentes grandeurs précédemment discutées – module élastique et résistance à la compression notamment – le ciment C-2pCMC est inférieur au ciment C-REF' en termes de ténacité. Mais pour des teneurs plus importantes, l'énergie emmagasinée croît de manière exponentielle avec la teneur en CMC dans la phase solide. Conjointement à la résistance en compression, l'introduction du polysaccharide en quantité suffisante dans la matrice minérale du ciment – supérieure à 10 % – semble considérablement améliorer sa ténacité.

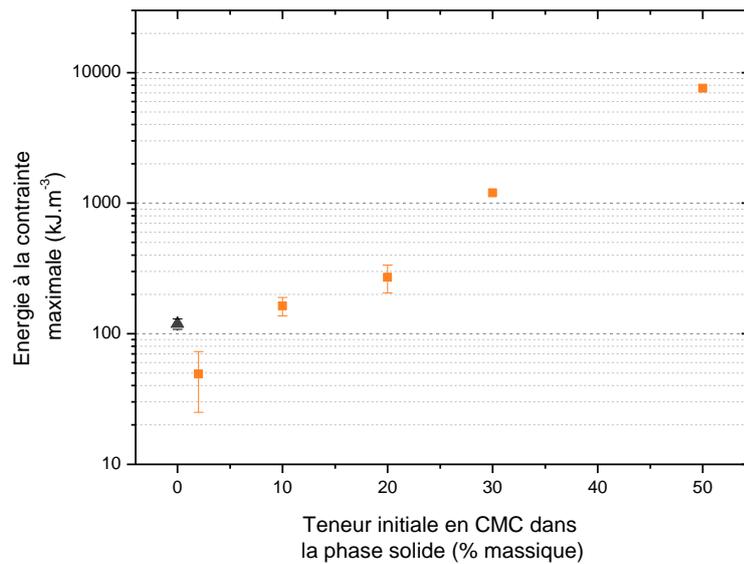


Figure 4.30 – Variation de l'énergie à la contrainte maximale en fonction de la composition des ciments.

4.3.b Ciments incluant la CMC sous forme de microsphères

Les mêmes essais de compression ont été réalisés sur des ciments contenant 2 % et 10 % de CMC sous forme de microsphères, soit C-2 μ CMC et C-10 μ CMC (quatre et cinq fois respectivement). La Figure 4.31 présente un diagramme contrainte – déformation caractéristique de chacun de ces μ -composites comparés aux p-composites C-2pCMC et C-10pCMC et au ciment C-REF'. Les grandeurs significatives moyennes issues de la totalité des essais sont reportées dans le Tableau 4.5.

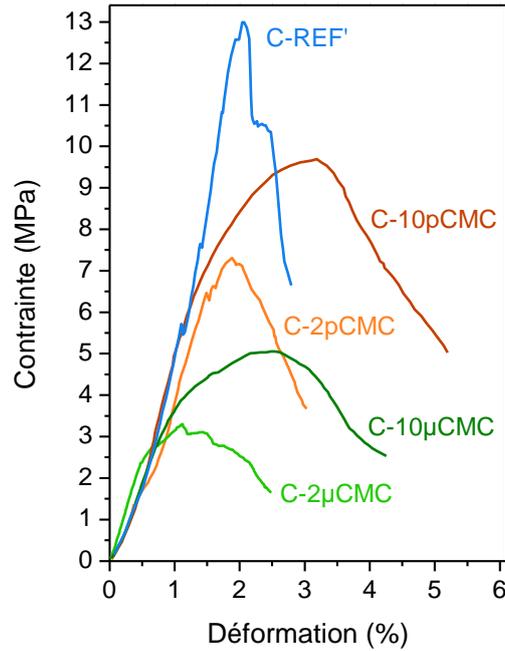


Figure 4.31 – Diagrammes contrainte – déformation des ciments μ -composites comparés aux ciments p-composites et C-REF'

	n	E (GPa)	R_{e0,2} (MPa)	R_c (MPa)	ϵ_c (%)	\mathcal{E} (kJ.m⁻³)	P (%)
C-REF'	(5)	0,9 \pm 0,4	12,3 \pm 2,9	12,7 \pm 2,7	2,1 \pm 0,4	119 \pm 11	88
C-2pCMC	(5)	0,6 \pm 0,2	5,9 \pm 1,7	6,1 \pm 1,7	1,5 \pm 0,4	49 \pm 24	88
C-10pCMC	(4)	0,6 \pm 0,1	7,3 \pm 0,9	9,5 \pm 0,5	2,8 \pm 0,3	163 \pm 26	66
C-2 μ CMC	(4)	0,4 \pm 0,1	3,2 \pm 0,5	3,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,3	27 \pm 5	68
C-10 μ CMC	(5)	0,4 \pm 0,1	4,1 \pm 0,2	5,4 \pm 0,5	2,7 \pm 0,3	98 \pm 10	77

Tableau 4.5 – Grandeurs caractéristiques issues des essais mécaniques en compression sur des ciments μ -composites comparés au ciment C-REF' et aux p-composites.

Si l'on observe la Figure 4.31, il apparaît que les propriétés des ciments p-composites sont supérieures à celles des ciments μ -composites en termes de résistance à la compression. Ils présentent pourtant des similarités : les ciments C-2pCMC et C-2 μ CMC montrent ainsi une courbe « accidentée » comme celle du ciment minéral, témoin d'un comportement fragile avec fissuration précoce. Au contraire, l'introduction de 10 % de microsphères de CMC conduit à une courbe d'aspect beaucoup plus lisse et une capacité de déformation du matériau supérieure. Les grandeurs issues du Tableau 4.5 confirment ces observations : la différence entre R_c et $R_{e0,2}$ est minime pour les ciments C-2 μ CMC, C-2pCMC et C-REF' – inférieure à l'incertitude – alors qu'elle devient significative et caractéristique d'une certaine « plasticité » du matériau pour C-10 μ CMC comme pour C-10pCMC. Il apparaît bien que c'est la teneur en polysaccharide qui a une influence de premier ordre sur le comportement plus ou moins ductile ou fragile des ciments composites, ainsi que mis en évidence dans le paragraphe 4.3.a, la forme poudre ou microsphères ayant une influence d'ordre 2.

Pourtant, les ciments μ -composites et p-composites ne sont pas équivalents : leur résistance en compression est diminuée de moitié comparée à ces derniers, ce qui les rend nettement plus faibles que le ciment C-REF'. Cette observation semble aller dans le sens de l'hypothèse avancée dans le paragraphe 4.3.a : l'hétérogénéité induite par l'ajout d'une petite quantité de polysaccharide pourrait favoriser l'initiation et la propagation de fissures par rapport au ciment C-REF'. La granulométrie des microsphères étant inférieure à celle de la poudre et leur densité plus importante, il est probable que cette hétérogénéité soit d'autant plus marquée dans le ciment composite C-2 μ CMC que dans C-2pCMC, et de même dans le ciment composite C-10 μ CMC que dans C-10pCMC, avec un nombre d'interfaces matrice minérale / polymère plus important. Au regard des différents résultats, il semble qu'il y ait une compétition entre l'hétérogénéité amenée par l'introduction d'une nouvelle phase organique et les qualités mécaniques intrinsèquement supérieures du polysaccharide par rapport à la phase minérale. Ainsi que présentée sur le schéma de principe de la Figure 4.32, cette compétition pourrait expliquer la perte en résistance mécanique initiale, compensée plus ou moins rapidement par la meilleure résistance de la CMC par rapport à la phase apatite – vaterite.

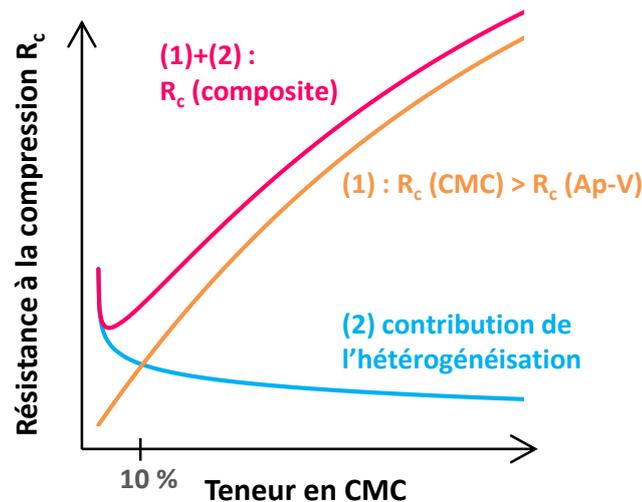


Figure 4.32 – Schéma de principe illustrant la compétition entre la source d'hétérogénéité et les meilleures propriétés mécaniques de la CMC par rapport à la matrice minérale.

4.3.c Discussion au regard des matériaux existants

L'élaboration d'un matériau de comblement osseux implique un équilibre complexe entre différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques. Les résultats issus des tests de compression ont une fois de plus mis en évidence la difficulté de concilier, par exemple, de bonnes propriétés mécaniques avec une importante porosité. Ainsi les données de la Figure 4.33 mettent en évidence cette ambivalence entre résistance mécanique et porosité dans différents matériaux

développés pour des applications de comblement osseux : l'augmentation de l'un se fait au détriment de l'autre. Le compromis ne peut alors se faire qu'en ciblant une application particulière : privilégier un site porteur, ou favoriser la dégradation du matériau et la régénération de l'os ? C'est cette deuxième option à laquelle les ciments phosphocalciques sont les plus adaptés étant donné leurs faibles propriétés mécaniques et c'est dans cette optique que nous avons cherché à comprendre et développer les ciments ici présentés. Il est ainsi intéressant de constater que pour une porosité importante (88 %), les ciments C-REF' ou composite C-2pCMC présentent une résistance mécanique en compression supérieure à celle des matériaux reportés dans la littérature (Figure 4.33). Cette remarque doit bien sûr être modérée par le fait que cette figure ne prend pas en compte la taille des pores et leur éventuelle interconnexion, mais présente tout de même ces deux ciments comme un bon compromis entre porosité et propriétés mécaniques. Nous pouvons d'autre part constater que la seule variation du rapport CMC / matrice minérale permet de couvrir une large gamme d'équilibres possibles entre résistance et porosité. Ces résultats préliminaires, qui nécessiteraient bien sûr des études complémentaires, offrent la perspective d'un matériau dont la composition pourrait être ajustée en fonction des propriétés souhaitées.

La Figure 4.34 permet la comparaison des modules élastiques et de la résistance en compression de différents matériaux utilisés en ingénierie tissulaire osseuse et de l'os. Les ciments développés dans cette étude prennent une place intéressante dans ce diagramme : leurs propriétés sont proches de celles de l'os spongieux.⁵⁵ Or, les matériaux ayant des propriétés similaires correspondent sur ce schéma à des polymères biodégradables denses, alors que les matrices poreuses, composites ou non, ont des modules élastiques et une résistance mécanique beaucoup plus faible. Un bon compromis entre propriétés mécaniques et porosité est une fois encore mise en évidence sur ces ciments C-REF', p-composites et μ -composites.

⁵⁵ Il serait néanmoins nécessaire de vérifier l'ensemble des conditions expérimentales pour valider cette observation, notamment si les essais ont été réalisés sur des matériaux humides ou préalablement séchés.

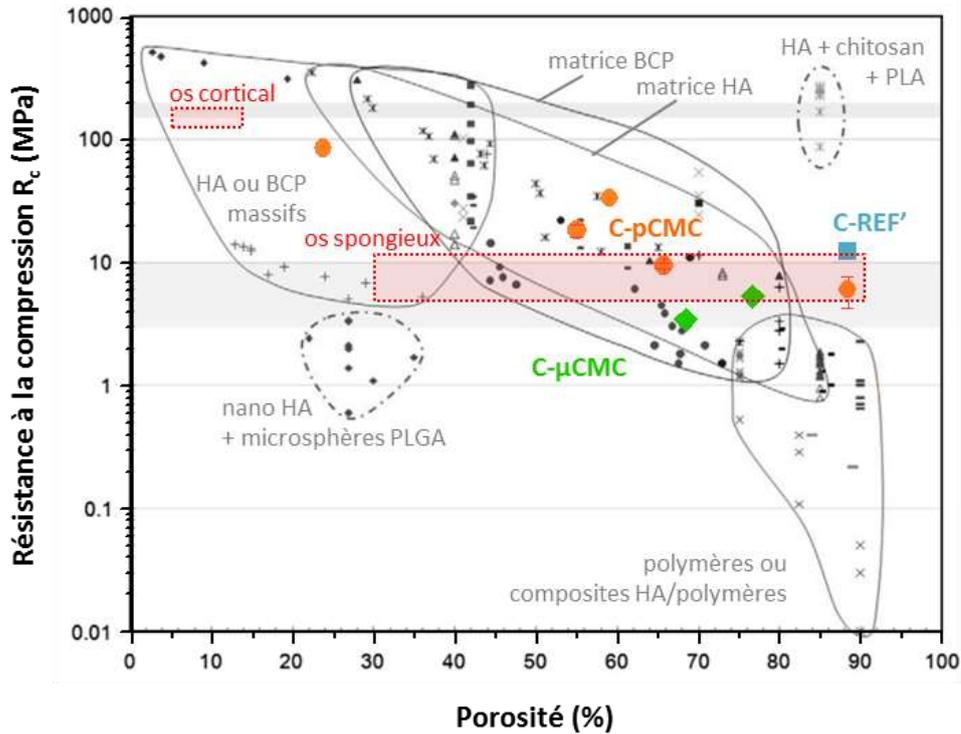


Figure 4.33 – Résistance à la compression des ciments C-REF' (en bleu), p-composites (en orange) et μ -composites (en vert) en fonction de leur porosité par rapport à différents biomatériaux à base de phosphates de calcium (en gris) et à l'os cortical ou spongieux (en rouge). Adapté de Wagoner Johnson et coll. : les données de la littérature ont été compilées à partir d'un vingtaine d'études indépendantes [Wagoner Johnson 2011].

HA = hydroxyapatite ; β TCP = phosphate tricalcique β ; BCP = Phosphate de calcium biphasique = HA + β TCP
 PLA = acide polylactique ; PLGA = acide poly(lactique-co-glycolique)

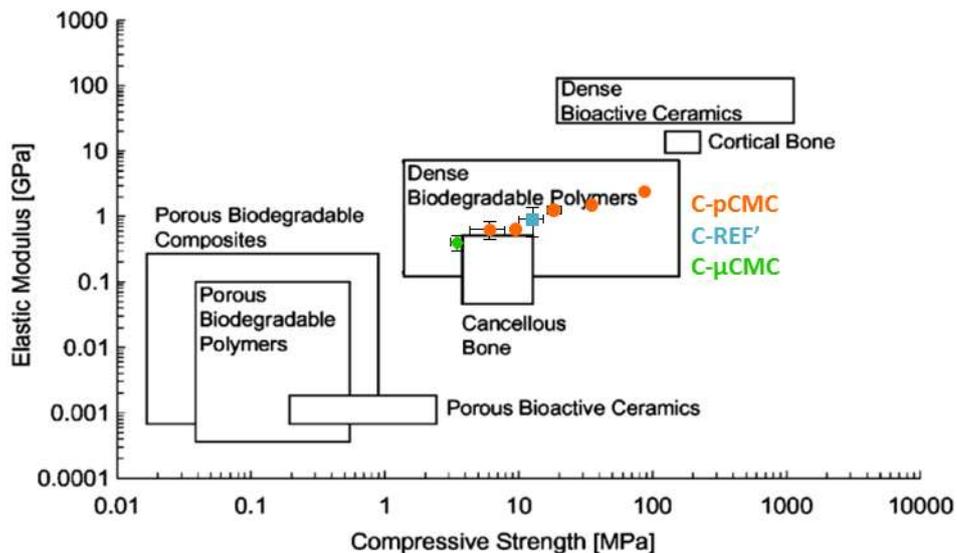


Figure 4.34 – Module élastique des ciments C-REF' (en bleu), p-composites (en orange) et μ -composites (en vert) en fonction de leur résistance, au regard des données de la littérature concernant des céramiques denses bioactives, des polymères biodégradables, l'os cortical et l'os spongieux. Adapté de Rezwan et coll. [Rezwan 2006]

5 Cinétique et temps de prise des ciments composites

5.1 Cinétique de prise évaluée par spectroscopie FTIR

La Figure 4.35 présente les spectres FTIR de l'étude cinétique de trois compositions de ciment : C-REF', C-2pCMC et C-10pCMC. Etant donné la nouvelle complexification du système en introduisant le polysaccharide, nous n'avons pas pu appliquer la méthode de décomposition présentée dans le chapitre 2 (§ 2.3.b) aux derniers ciments présentés. Nous avons ainsi choisi de nous intéresser à l'évolution de l'intensité des bandes – après traitement des courbes ^[56] – à 526 cm^{-1} et 602 cm^{-1} afin de comparer relativement les cinétiques de ces trois ciments. Certes en spectroscopie les intensités des bandes n'ont de valeur quantitative que pour une même largeur à mi-hauteur, et d'autre part dans ce domaines de nombreuses bandes se superposent ce qui affecte les valeurs des maxima. Cependant, d'un point de vue purement qualitatif d'après les spectres de la Figure 4.35, la variation des intensités à ces deux nombres d'onde semble significative de l'évolution de la composition du ciment en brushite et en apatite.

⁵⁶ Comme présenté dans le chapitre 2 : correction de la ligne de base puis normalisation par rapport à 576 cm^{-1} (fréquence à laquelle les phosphates de la brushite, qui se dissout, et l'apatite, qui précipite, vibrent ce qui minimise la variation de l'intensité de cette bande par rapport aux autres points de ce domaine de nombre d'ondes. La normalisation n'a certes pas de sens physico-chimique mais permet une bonne visualisation de l'évolution des phases)

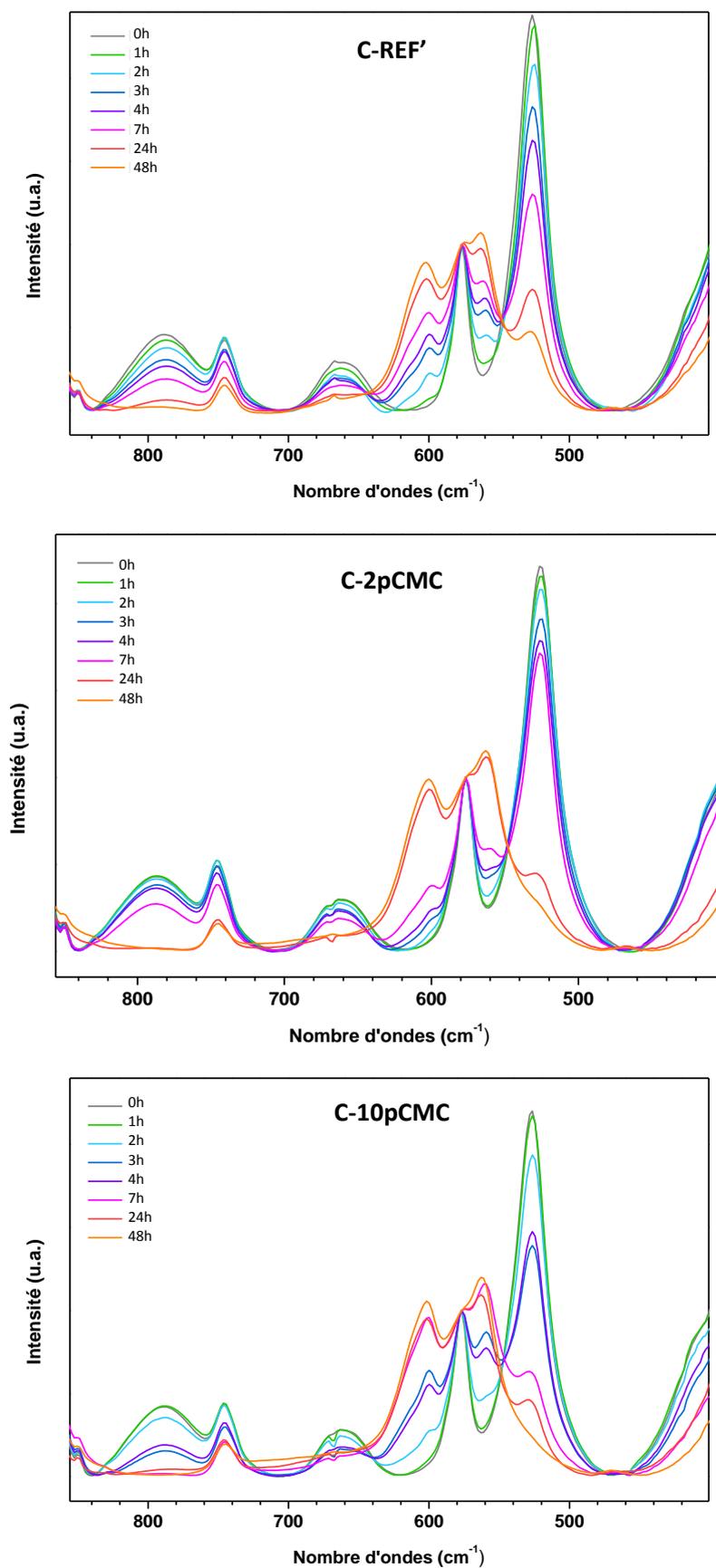


Figure 4.35 – Evolution des spectres FTIR des différents types de ciments étudiés en fonction de leur temps de maturation : (a) C-REF' ; (b) C-2pCMC ; (c) C-10pCMC

5.1.a Validation de la méthode

Dans le but de valider le bon fondement de cette démarche (« méthode (2) »), nous l'avons confrontée, à la cinétique obtenue à l'issue d'une décomposition des différentes bandes de ce domaine (« méthode (1) » ; cf. § 2.3.b) pour un ciment C-REF'. Même si la vitesse de dissolution de la brushite (Figure 4.36.a) est légèrement minimisée, les cinétiques mettent en évidence une même tendance. La similarité des résultats est d'autant plus marquée sur les deux courbes, superposables, de l'apatite (Figure 4.36.b). Ces résultats attestent donc de la valeur qualitative de la deuxième méthode basée uniquement sur l'évolution de l'intensité des deux bandes caractéristiques sélectionnées.

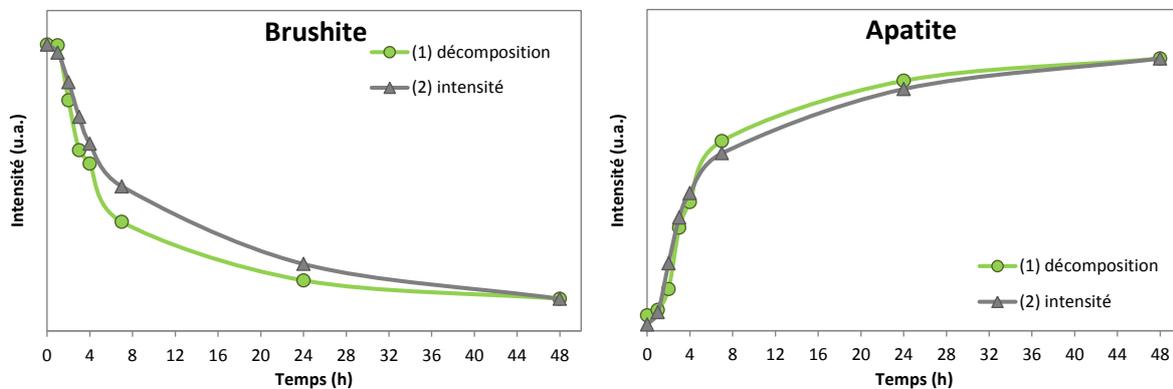


Figure 4.36 – Comparaison des cinétiques de dissolution de la brushite et de précipitation de l'apatite du ciment C-REF' obtenues (1) par la méthode de décomposition présentée dans le chapitre 2 ; (2) par la méthode décrite dans ce paragraphe, par mesure des intensités des bandes. Les courbes issues de cette deuxième méthode ont été normalisées par rapport aux premières.

5.1.b Résultats

La Figure 4.37 donne ainsi une évaluation qualitative et relative de la composition des ciments C-REF', C-2pCMC et C-10pCMC au cours des premières 48 h de prise. La tendance issue des deux phases considérées est la même : la réaction chimique de prise du ciment C-2pCMC présente une cinétique plus lente que celle du ciment C-REF' pendant les premières heures de maturation. Cette tendance s'inverse ensuite : à 24 h et 48 h la brushite a presque totalement disparu et l'apatite est proche de sa teneur maximale pour C-2pCMC alors que la réaction se poursuit toujours pour le ciment C-REF'. Le composite C-10pCMC montre une évolution tout autre : après 1 h de maturation, la réaction chimique de prise montre une évolution bien plus rapide que pour le ciment C-REF' – et a fortiori le ciment C-2pCMC – comme en témoignent notamment les pentes des courbes illustrant les cinétiques de précipitation de l'apatite (Figure 4.37.b) entre 1 h et 7 h.

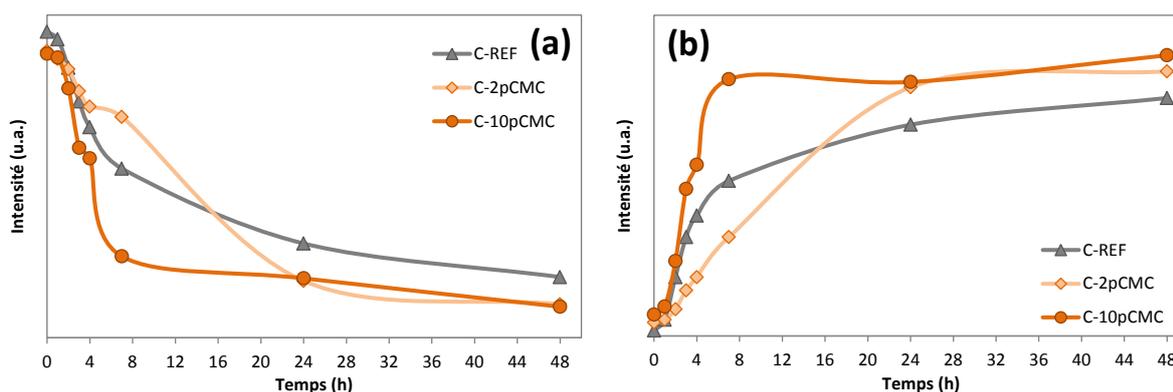


Figure 4.37 – Evolution de l'intensité absolue des bandes caractéristiques de (a) la brushite (526 cm^{-1}) et (b) l'apatite (602 cm^{-1}) des spectres FTIR des ciments C-REF', C-2pCMC et C-10pCMC au cours de la prise.

Les cinétiques des trois ciments ont été répétées une deuxième fois – avec des lots de brushite et de vatérite différents – et la même tendance a été mise en évidence : l'addition de 2 % de CMC semble ralentir les réactions de dissolution de brushite et de précipitation de l'apatite alors que l'addition de 10 % de CMC a mené à une vitesse plus importante des réactions. Une différence à tout de même été notée sur ce dernier ciment composite C-10pCMC : la réaction chimique de prise n'a démarré de manière réellement significative qu'après un temps de latence de 3 h.

5.1.c Discussion

La réaction chimique de prise du ciment fait intervenir deux phénomènes intimement liés : la dissolution des poudres réactives – brushite et vatérite – et la précipitation d'une nouvelle phase, l'apatite. La CMC, par sa possible interférence avec ces deux phénomènes, complexifie encore ce système dynamique. En effet, de nombreux paramètres peuvent entrer en jeu avec l'addition de ce polymère :

- la dissolution des poudres réactives et la diffusion des ions peuvent être gênées par une viscosité accrue de la phase liquide du ciment. La CMC pourrait donc induire un ralentissement de la dissolution des réactifs et conjointement de la précipitation de l'apatite.

- la présence de CMC peut affecter l'interaction entre les particules minérales réactives : d'une part celles-ci sont plus dispersées que dans un ciment C-REF', d'autre part elles semblent recouvertes d'une pellicule de polymère (cf. Figure 4.8). Ce recouvrement pourrait être de nature physique (« enrobage des particules dans le polymère environnant ») voire chimique, les groupements carboxyliques de la CMC étant susceptibles de se complexer avec les ions calcium des particules réactives [Ginebra 2001]. Ceci appuierait l'effet ralentisseur de la CMC dans le processus de prise.

- cependant les groupements carboxyliques ont également déjà été reportés dans la littérature comme des inducteurs de précipitation d'apatite sur des polymères tels que la CMC ou d'autres polymères carboxyméthylés [Kawashita 2003; Nge 2006]. La forte interaction ionique entre les groupements -COO^- et les ions calcium Ca^{2+} favoriserait la nucléation d'apatite ; la CMC pourrait ainsi multiplier le nombre de sites et la surface de nucléation possible – dans le cas où cette surface reste bien définie, c'est-à-dire pour une réhydratation limitée – ce qui induirait un effet accélérateur.

Cependant, cette interaction ionique peut conduire à la stabilisation de germes de taille sous-critique ce qui conduirait à un effet en deux temps : d'abord un retard de la croissance des germes, puis une croissance « brusque » une fois la taille critique des germes atteinte [Combes 2002].

La compréhension de l'ensemble des mécanismes impliqués est délicate et nécessiterait de poursuivre l'étude. D'après nos premiers résultats, il semble que le passage d'un ciment C-REF' à un ciment composite C-2pCMC par l'addition d'une petite quantité de CMC ait, dans un premier temps de la maturation, une influence majeure sur les deux premiers points cités ci-dessus : la phase liquide devient plus visqueuse, les particules minérales sont recouvertes par le polysaccharide, la réaction de prise est donc naturellement ralentie ; la réaction limitante serait alors la dissolution des réactifs. Une fois la réaction amorcée, l'affinité de l'apatite avec la CMC pourrait accélérer la précipitation de l'apatite par rapport au ciment C-REF'. Le ciment C-10pCMC ne montre pas la même cinétique. La principale différence entre ces deux ciments composites réside certainement dans la répartition du polymère dans la matrice (mis en évidence par MEB notamment, cf. Figure 4.8). Dans C-2pCMC, le rapport volumique CMC / particules minérales est faible et le rapport eau / CMC est grand. Lors de l'addition d'eau, il est probable que le polymère capte l'eau en priorité et soit rapidement réhydraté, privilégiant un phénomène de recouvrement des particules minérales précédemment évoqué. Dans le ciment C-10pCMC, le polymère est plus susceptible de former un gel, plus ou moins structuré, le rapport eau / CMC étant plus faible. Est-il possible que le recouvrement des particules minérales, en compétition avec cette agglomération soit moindre ? Il est difficile de le dire. Cependant il se peut qu'une partie de l'eau soit contenue dans les zones denses de CMC, agissant comme des « réservoirs », et soit libérée au fur et à mesure de la réaction de prise.

Dans la littérature, la plupart des résultats portent plus sur l'effet de l'addition d'un polymère sur la réaction physique de prise et durcissement que la réaction chimique de prise du ciment. Ginebra et coll. ont mis en évidence un retard dans la formation d'apatite dans un ciment α -TCP par addition de poly(4-HMA) (5 à 10 % massiques dans la phase liquide, soit 2 à 4 % massiques par rapport à la phase solide avec $L/S = 0,4$) [Ginebra 2001]. Au contraire, Bigi et coll. observent une précipitation plus rapide de l'apatite par addition de gélatine (17 % massique dans la phase solide) dans un ciment α -TCP – contenant 5 % de brushite [Bigi 2004]. Notons que le poly(4-HMA) et la

gélatine, malgré une grande différence de structuration 3D, présentent tous deux des groupements carboxyliques dans leur structure. La différence entre ces systèmes – que ce soit le polymère ou la phase minérale – et le ciment CaCO_3 – CaP – CMC doit nous rendre prudent sur toute extrapolation, mais ces deux études vont dans le sens d'un effet dose du polymère sur le ralentissement ou l'accélération de la formation d'apatite.

5.2 Temps de prise (aiguilles de Gillmore)

L'ajout de 10 % de CMC dans le ciment retarde sa prise d'un point de vue physique, avec un temps de prise initial passant de 1h18 à 1h45 et un temps de prise final de 2h30 à 3h45 (Tableau 4.6). Nous avons donc été amenés à introduire de l'hydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4 largement utilisé comme accélérateur de prise dans divers ciments phosphocalciques afin de compenser si possible l'effet retardateur de la présence de CMC.

	T_i (min)	T_f (min)
C-REF'	1h18 ± 3'	2h30 ± 15'
C-10pCMC	1h45 ± 15'	3h45 ± 15'
C-10pCMC ; L = Na_2HPO_4 1%	18' ± 3'	1h18 ± 3'
C-10pCMC ; L = Na_2HPO_4 2,5%	13' ± 3'	48' ± 3'

Tableau 4.6 – Temps de prise initial (T_i) et final (T_f) des ciments C-REF' et C-10pCMC préparé avec de l'eau désionisée ou avec une solution de Na_2HPO_4 à 1 % et 2,5 % m/m.

La Figure 4.38 présente ainsi l'influence de la concentration en Na_2HPO_4 de la phase liquide du ciment C-10pCMC sur sa prise physique. Comme cela a déjà pu être reporté dans la littérature, ce phosphate de sodium permet une diminution significative du temps de prise et permet de l'ajuster aux contraintes définies dans le cahier des charges (Chapitre 1- § 5).

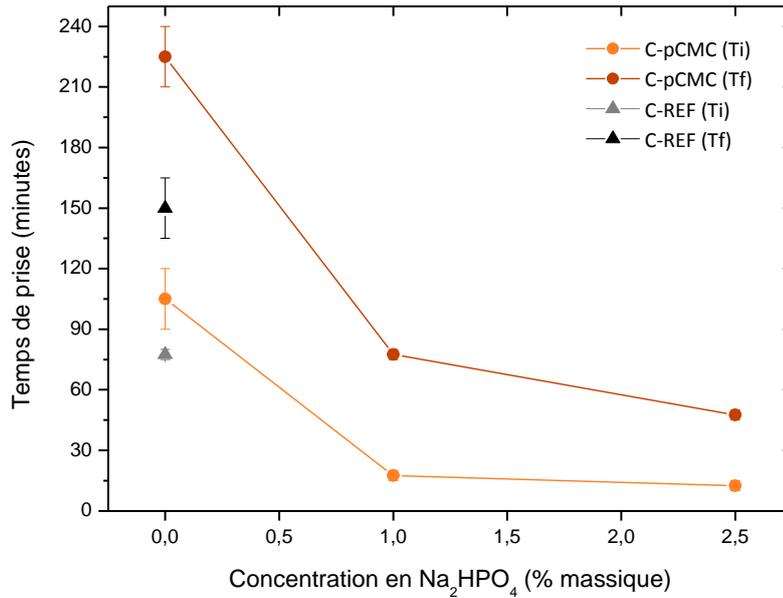


Figure 4.38 – Influence de l'utilisation d'une solution de Na_2HPO_4 en tant que phase liquide sur le temps de prise du ciment C-10pCMC.

6 Etude de la dissolution des ciments et de la libération de l'argent

6.1 Protocole

Des blocs de ciments C-Ag(S) et C-10 μ CMC/Ag de 1 g ($h = 16,5$ mm ; $\varnothing = 10,5$ mm) ont été élaborés selon les protocoles décrits précédemment (chapitre 2 - 2.1.a et chapitre 3 - 2.1, respectivement). La teneur des microsphères en argent est de 9,3 % m/m, soit 0,9 % m/m pour une ciment C-10 μ CMC/Ag. L'argent a donc été introduit à une teneur de 1 % m/m dans la phase solide du ciment C-Ag(S), sous forme de Ag_3PO_4 . Après 32 h de maturation en atmosphère humide à 37°C, les ciments ont été séchés pendant 10 jours à 37°C.

Le test de dissolution des ciments a été réalisé en accord avec la Pharmacopée Européenne (7^{ème} édition) selon le montage schématisé sur la Figure 4.39. Après pesée, chaque bloc de ciment a été immergé dans un bain de 1 L d'une solution tampon de tris(hydroxyméthyl)aminométhane à 0,1 M, acidifiée jusqu'à un pH 7,4 par de l'acide chlorhydrique.

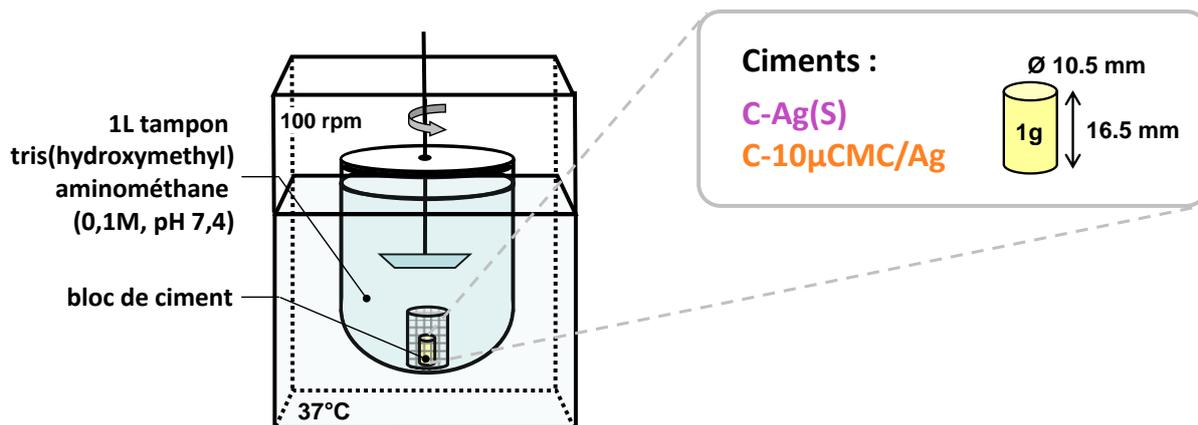


Figure 4.39 – Schéma du montage de dissolution et libération de l'argent

Des prélèvements de 10 mL de solution ont été effectués quotidiennement pendant 11 jours ; le volume du bain a été maintenu constant tout au long de l'essai. Les quantités de calcium et d'argent libérés au cours du temps ont ensuite été dosées par spectrométrie par torche plasma (ICP-AES). La quantité d'ions dosés est exprimée par rapport à la quantité initialement introduite dans le ciment.

6.2 Résultats

Sur la Figure 4.40 il apparaît que le ciment C-10µCMC/Ag libère plus rapidement Ag^+ et Ca^{2+} que le ciment C-Ag(S). Ainsi, après 11 jours, la quantité de calcium libéré a été de l'ordre de 10 % de Ag et 12 % de Ca pour C-Ag(S), et 13 % de Ag et 15 % de Ca pour C-10µCMC/Ag. Notons que la masse totale de ciment sec a diminué de $18,3 \pm 0,4$ % m/m pour le ciment C-Ag(S) et $20,7 \pm 0,1$ % m/m pour le composite C-10µCMC/Ag. La variation pourrait être due à une différence de porosité.

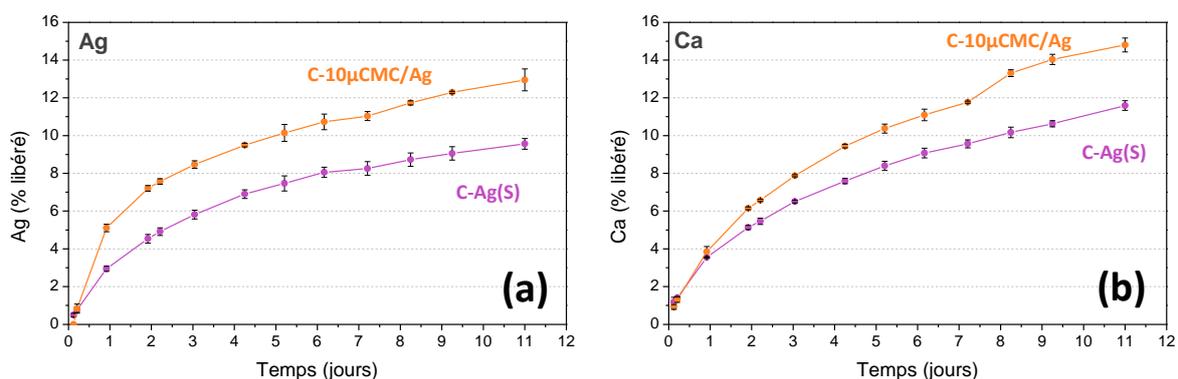


Figure 4.40 – Profils de libération (a) de l'argent et (b) du calcium, exprimé en pourcentage par rapport à la quantité initiale introduite dans les ciments.

La Figure 4.41 présente la variation du rapport Ag/Ca, libérée en solution, par rapport au rapport initial $(\text{Ag}/\text{Ca})_s$ de 0,032 et 0,033 dans les ciments C-Ag(S) et C-10µCMC/Ag, respectivement.

Les deux premiers jours, correspondent à une phase de mise en équilibre du système. Dans le cas du ciment C-10 μ CMC/Ag, cela se caractérise par un pic de libération de l'argent par rapport au calcium. Le rapport $(Ag/Ca)_{libéré}/(Ag/Ca)_s$ atteint ensuite un palier autour de 0,8-0,9, identique pour les deux ciments.

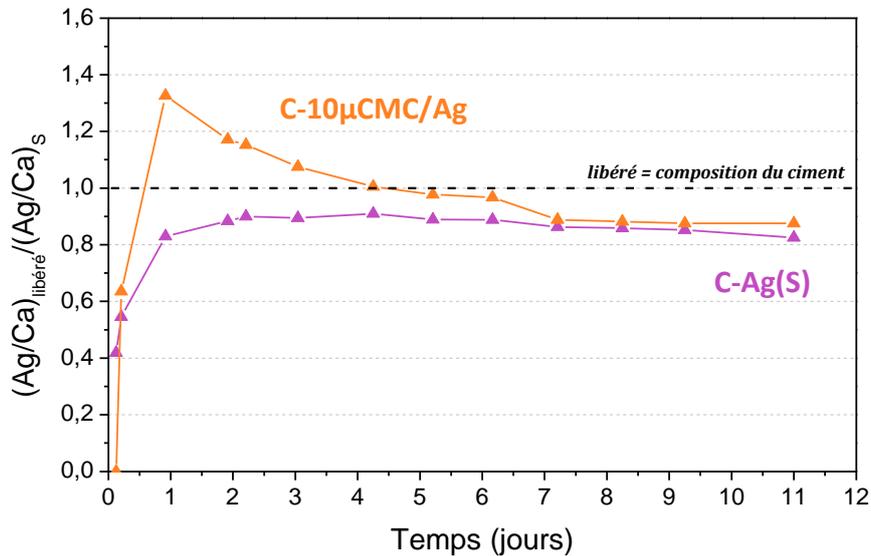


Figure 4.41 – Evolution du rapport (Ag/Ca) libéré, par rapport au rapport $(Ag/Ca)_s$ initialement introduite dans les ciments.

Dans le ciment C-10 μ CMC/Ag, l'argent est initialement introduit dans les microsphères de polysaccharide. La libération de l'argent relativement supérieure à celle du calcium correspond ainsi probablement à une différence de porosité entre les ciments, liée à la présence de zones riches en CMC hydratée, même si elle n'est plus sous forme de microsphères. Le ciment C-Ag(S) suit une mise en équilibre différente. Une fois les systèmes en équilibre, les deux éléments se libèrent à peu près au même rythme : le mécanisme privilégié serait donc celui de l'érosion par rapport à un mécanisme de diffusion de l'argent.

Le modèle de Higuchi, qui a mis en évidence une relation linéaire entre la quantité d'actif libérée et la racine du temps dans le cas d'un mécanisme de diffusion pure [Higuchi 1963], appliqué à nos cinétiques de libération de l'argent est présenté sur la Figure 4.42 : il y a un net écart à la linéarité des deux courbes expérimentales, particulièrement pour le ciment C-10 μ CMC/Ag ($R^2 = 0,96$). Cela confirme que les mécanismes engagés sont plus complexes que de la diffusion pure et sont certainement en partie guidés par les limites de dissolution de certains composés et par l'érosion.

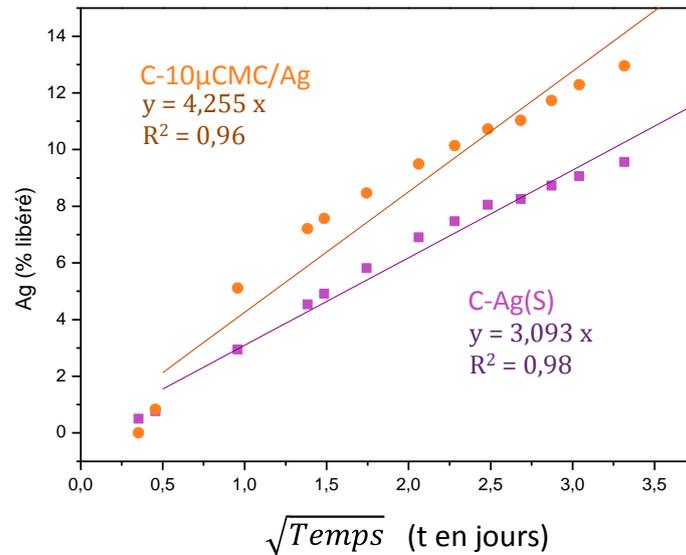


Figure 4.42 – Application du modèle de Higuchi aux cinétiques de libération de l'argent des ciments C-Ag(S) et C-10µCMC/Ag.

Notons que dans le cas du C-Ag(S), et après 4 jours d'immersion pour le ciment la libération du calcium est supérieure à celle de l'argent (Figure 4.42), ce qui ne serait pas le cas dans un mécanisme d'érosion pur. La vaterite, plus soluble que l'apatite et que le phosphate d'argent, est très probablement à l'origine de cet écart. Les diffractogrammes de RX de la Figure 4.43 confirment la dissolution partielle de la vaterite au cours de l'essai. Il semble d'autre part qu'il y ait une certaine recristallisation de l'apatite étant donné la meilleure définition des raies du diagramme. Notons la présence d'une phase secondaire de chlorure d'argent dans le ciment C-10µCMC/Ag.

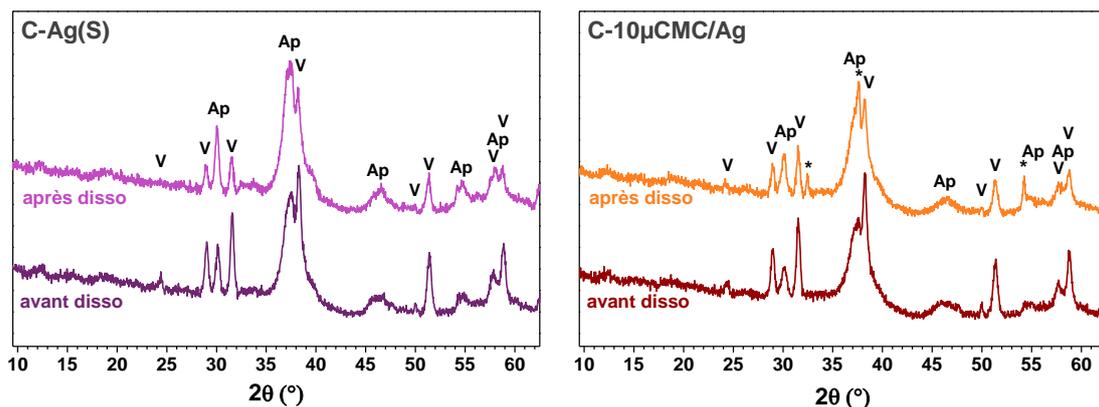


Figure 4.43 – Diffractogrammes RX des ciments C-Ag(S) et C-10µCMC/Ag avant et après l'essai de dissolution. (* AgCl)

Un ciment C-10µCMC/Ag issu de l'essai de dissolution a été observé par MEB. Les Figure 4.44 et Figure 4.45 mettent en évidence de très nettes différences de morphologie comparées aux ciments n'ayant pas subi le test (Figure 4.10). La Figure 4.44 montre une précipitation importante

d'apatite en surface de la CMC, qui forme un réseau tridimensionnel. Dans d'autres zones, des feuillets de CMC piégés dans la matrice minérale ont pu être observés (Figure 4.45). Des petites particules noires en surface du polymère ont pu être identifiées par des images issues des électrons rétrodiffusés comme étant constituées d'argent. Elles pourraient correspondre au chlorure d'argent identifié par DRX ou encore à des nanoparticules d'argent [Hebeish 2013].

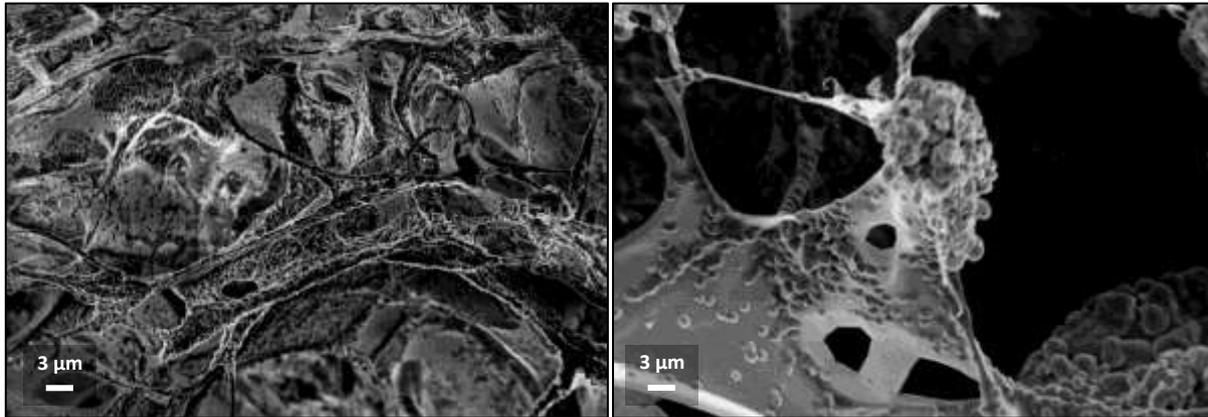


Figure 4.44 – Micrographies MEB du ciment C-10µCMC/Ag après l'essai de dissolution

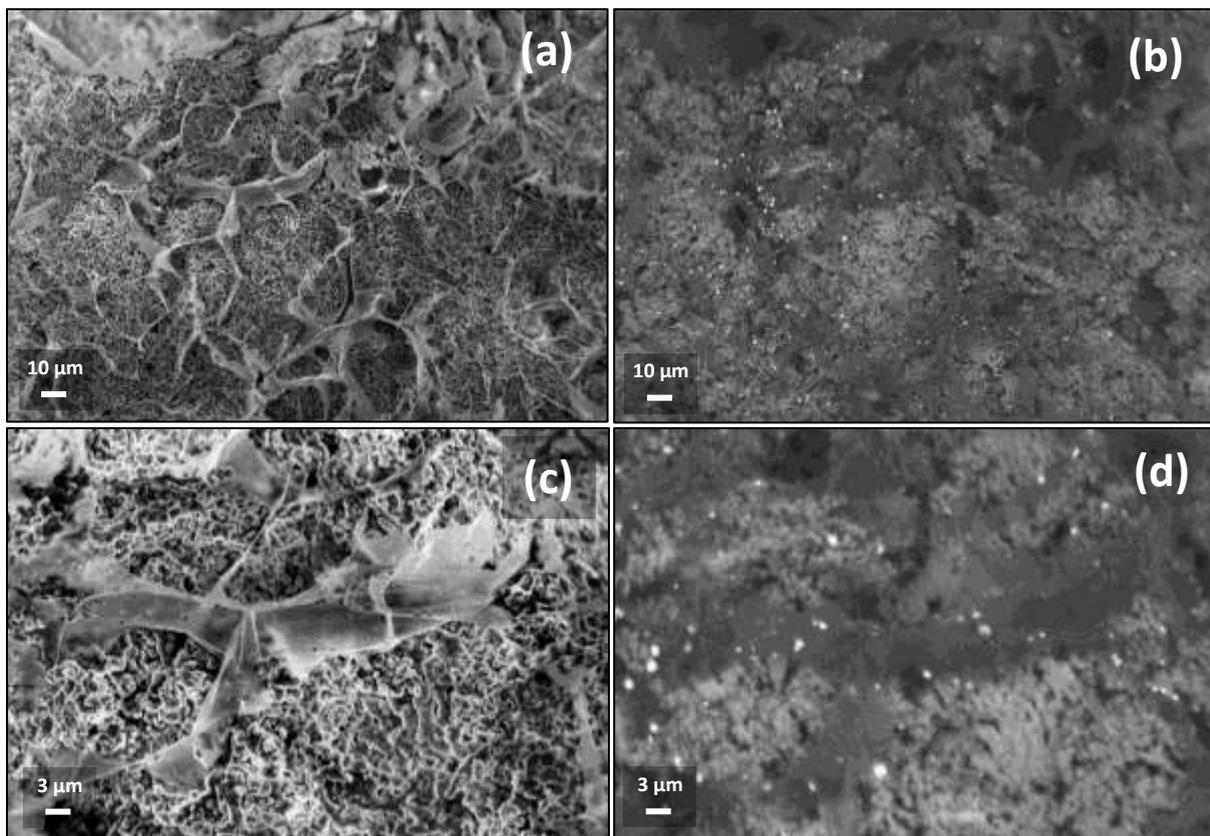


Figure 4.45 – Micrographies MEB du ciment C-10µCMC/Ag après l'essai de dissolution : (a) et (c) images par électrons secondaires ; (b) et (d) images par électrons rétrodiffusés de la même zone.

6.3 Discussion

Cet essai avait pour objectif de mettre en évidence d'éventuelles différences de comportement entre des systèmes $\text{CaCO}_3 - \text{CaP} - \text{Ag}$ et $\text{CaCO}_3 - \text{CaP} - \text{CMC/Ag}$.

Le ciment C-10 $\mu\text{CMC/Ag}$ a montré une dégradation légèrement plus rapide que le ciment C-Ag(S), tant au niveau de la masse du ciment, du calcium que de l'argent. La dissolution de la CMC n'a pas été évaluée, mais si l'on considère la perte massique totale de C-Ag(S) et C-10 $\mu\text{CMC/Ag}$ (18 % vs 21 %, respectivement) et la différence de libération en ion calcium (13 % vs 15 %, respectivement), il ne semble pas qu'il y ait de lessivage significatif de la phase organique. Notons tout de même que la stabilité à la réhydratation dans le temps des microsphères a été évaluée : elle est de l'ordre de 24 h en milieu ouvert. Il est néanmoins difficile d'extrapoler cette durée lorsque les microsphères sont en milieu confiné.

Les ions chlorure issus de l'ajustement à pH 7,4 de la solution tampon entrent en interaction avec le système, étant donnée la phase AgCl identifiée par DRX dans le ciment C-10 $\mu\text{CMC/Ag}$ après l'essai de dissolution. Une acidification à l'acide nitrique est donc préférable lorsque de l'argent est présent dans le système, pour éviter tout biais dû à la précipitation d'une phase secondaire.

Il est donc difficile d'exploiter pleinement ces résultats car il est probable que les cinétiques soient ici entachées d'un ralentissement lié à la faible solubilité de AgCl. En outre, ces premiers essais ont été réalisés dans des gammes de concentration finalement trop élevées par rapport aux résultats des études bactériologiques (Chapitre 5 - § 1), l'extrapolation pouvant s'avérer délicate.

Une nouvelle étude de libération de l'Ag a donc été menée récemment et durant 14 jours prenant en compte cette remarque ; les résultats n'ont cependant pas pu être intégrés dans ce manuscrit car les dosages de Ag et Ca dans les nombreux prélèvements ont été retardés en raison d'un problème technique du nouveau spectromètre d'absorption atomique (flamme) disponible au laboratoire.

7 Conclusions

Dans ce chapitre, nous sommes passés d'un système minéral $\text{CaCO}_3 - \text{CaP} - \text{Ag}$ à un système composite $\text{CaCO}_3 - \text{CaP} - \text{CMC}$, voire $\text{CaCO}_3 - \text{CaP} - \text{CMC/Ag}$, comportant un polysaccharide : la carboxyméthylcellulose (CMC). Celui-ci a été introduit soit sous forme de microsphères (2 % et 10 % m/m de la phase solide), soit directement sous forme de poudre (2 % à 50 % m/m de la phase solide). La faisabilité de ces ciments composites a été démontrée en mettant en évidence le

processus de dissolution de la brushite et de la vaterite et de précipitation de l'apatite, même dans les ciments les plus chargés en polymère.

Il est apparu que la CMC, hydrophile, gonflait en présence d'eau et se présentait comme un liant entre les particules minérales. Le faible temps de rémanence de la forme microsphère ne permet pas de profiter pleinement de ses potentialités en terme de modulation des cinétiques de libération, c'est pourquoi des étapes supplémentaires de formulation vont être nécessaires avant d'évaluer in vitro et in vivo la stratégie d'encapsulation de l'argent.

L'introduction de CMC a permis une nette amélioration de l'injectabilité du matériau en supprimant le phénomène de séparation de phases et en diminuant la force nécessaire à l'extrusion de la pâte. Elle a également montré un effet important au niveau des propriétés mécaniques du matériau : la résistance à la compression, de l'ordre de 13 MPa pour un ciment C-REF, a été augmentée jusqu'à 86 MPa pour un ciment composite contenant 50 % m/m de polysaccharide. La variation du module élastique du matériau a pu être associée à une porosité moindre lorsque de la CMC est introduite plutôt qu'au caractère composite même du matériau. Outre une meilleure résistance à la compression, les ciments composites ont montré une ductilité nettement supérieure à celle du ciment de référence, fragile, et une ténacité accrue de manière exponentielle (pour une teneur en CMC supérieure à 10 % m/m). Les propriétés évaluées semblent donc donner des résultats satisfaisants au regard de l'os et des substituts osseux existants.

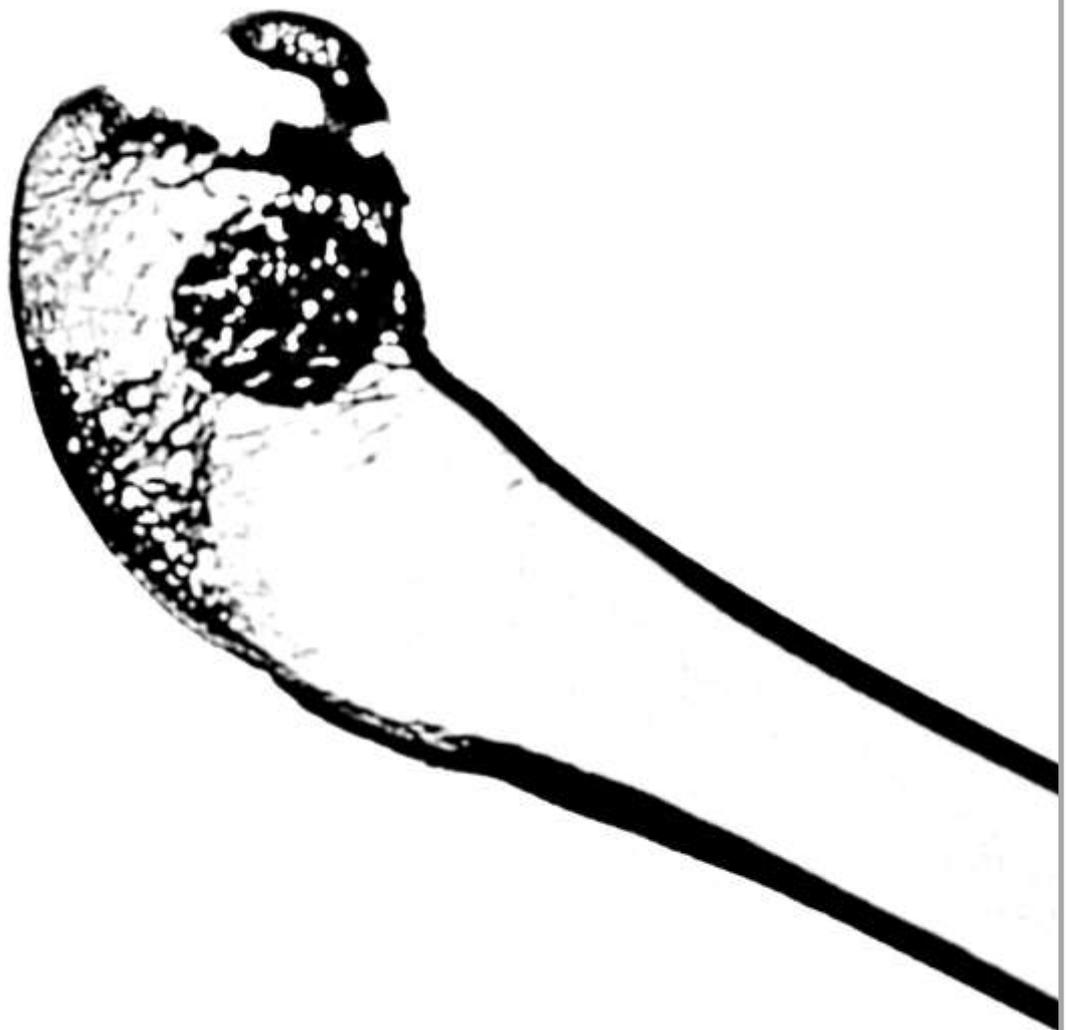
Le retard mis en évidence dans la réaction de prise peut être facilement compensé par l'utilisation d'une solution d'hydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4 .

Il semble d'autre part que le polymère ait plusieurs rôles dans le processus de dissolution – reprécipitation des phases CaCO_3 – CaP, ce qui pourrait induire des conséquences variables en fonction de la quantité introduite dans la matrice.

Enfin, une légère différence de comportement a été mise évidence entre un ciment composite contenant des microsphères de CMC chargées en argent (C-10 μ CMC/Ag) et un ciment où l'argent a été introduit sous forme d'un sel de phosphate Ag_3PO_4 avec une libération plus rapide des ions argent et calcium pour le premier. Ces différences de comportements peuvent induire une réponse différente du tissu hôte, au niveau cellulaire et bactériologique.

Chapitre 5

Propriétés biologiques des ciments composites chargés en argent



Des études biologiques ont été réalisées tout au long du projet, en complément des avancées physico-chimiques présentées dans les trois chapitres précédents. Trois approches ont donc été considérées : d'une part, une approche *microbiologique*, en évaluant le potentiel antibactérien des matériaux chargés en argent, composites ou non. Limiter les risques d'infections post-opératoires était en effet un de nos principaux enjeux dans l'élaboration de ce substitut osseux. La *cytotoxicité* des différents ciments a d'autre part été étudiée, leur biocompatibilité étant une condition incontournable pour une application en tant que biomatériau. Enfin deux études ont été menées chez l'animal afin d'observer le comportement, *in vivo*, des compositions des ciments les plus prometteuses. Chacune de ces études ont jalonné les avancées du projet d'un point de vue physico-chimique et ont été des éléments déterminants notamment pour certaines étapes clef de choix des matériaux.

Ces études biologiques ont été menées au sein de trois laboratoires partenaires du projet BIOSINJECT : le Laboratoire de Génie Chimique (LGC) sur le site de la Faculté de Pharmacie de Toulouse, l'INSERM U1026 à Bordeaux et le laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B2OA), à Paris. Dans ce manuscrit nous n'en présenterons que les principaux résultats. Ceux-ci, indissociables des résultats physico-chimiques, donnent tout son sens à l'ensemble du projet : une approche transdisciplinaire est indispensable dans l'élaboration d'un matériau à visée biomédicale.

1 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par Christine Roques, Christel Henocq Pigasse et Julien Grimoud au Laboratoire de Génie Chimique^[57] sur les matériaux développés dans les chapitres précédents.

Un des enjeux majeurs du ciment composite que nous avons cherché à développer est de lui conférer des propriétés antibactériennes dans le but de limiter les risques d'infections associés à l'implantation d'un corps étranger et à l'acte chirurgical impliqué. Le rôle visé de l'argent est donc un

⁵⁷ Université de Toulouse, LGC, UMR 5503 UPS-INPT-CNRS, Faculté de Pharmacie, 35 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex 9, France

rôle préventif et non pas curatif : le site d'implantation et le dispositif implanté sont considérés stériles et soumis à des bactéries de manière très ponctuelle et en nombre très limité, provenant de l'environnement ou du patient lui-même, voire de l'opérateur.

Deux espèces bactériennes ont été choisies pour réaliser cette étude : *S. aureus* et *S. epidermidis*. Les deux sont des bactéries à Gram positif.^[58] La première, *S. aureus*, est responsable de près de 20 % des infections nosocomiales [INVS 2007] et 90 % des ostéomyélites, infections de l'os et de nombreuses contaminations d'implants osseux à la surface desquels elle forme un biofilm [Karlov 2002]. *S. epidermidis* est considérée comme une bactérie opportuniste ; ainsi, son implication dans les processus infectieux sur implants s'est accrue conjointement avec le développement de biomatériaux sur lesquels elle adhère et prolifère également sous forme de biofilm [Patel 2006]. C'est désormais une des principales causes d'infections notamment des implants orthopédiques. Elle est d'autre part souvent impliquée quand un polymère fait partie des composants [Gristina 1987].

Le potentiel antibactérien de différentes compositions de ciment a ainsi été évalué par la propension de ces matériaux à permettre l'adhésion et la prolifération de ces deux types de bactéries sous forme de biofilm à leur surface.

Après avoir introduit la méthode mise en œuvre pour ces essais microbiologiques, nous discuterons des résultats associés au système $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$, chargé à différentes concentrations en argent. Nous présenterons ensuite l'influence de l'introduction de CMC dans ce système sur son activité antibactérienne.

1.1 Activité antibactérienne des ciments

1.1.a Matériel & méthodes

Pastilles de ciment

Des pastilles de ciments ($h = 5 \text{ mm}$; $\varnothing = 10 \text{ mm}$) ont été préparées en mettant en forme la pâte de ciment^[59] dans des moules en silicone puis en plaçant le tout dans une étuve à 37°C dans une atmosphère saturée en eau pendant 48 h. Les pastilles ont ensuite été séchées pendant quelques jours, toujours à 37°C. Enfin elles ont été stérilisées par rayons gammas (25 KGy). Le Tableau 5.1 recense les ciments qui ont fait l'objet de cette étude microbiologique et leur composition. Des concentrations en argent de $3,75 \cdot 10^{-6} \%$ à 7,5 % m/m ont été testées. La notation

⁵⁸ La principale différence entre bactéries à *Gram positif* et à *Gram négatif* se situe dans la paroi bactérienne (notamment dans sa composition et son épaisseur).

⁵⁹ réalisée comme décrit dans le dans le chapitre 2 (§ 2.1), le chapitre 3 (§ 2.1) et chapitre 4 (§ 2.1) pour le ciments C-REF, les ciments C-Ag(S) et C-Ag(L) et les composites respectivement.

utilisée est la suivante : C-Ag(S ou L)_X pour une concentration massique en argent de 3,75.X dans la phase solide, introduit sous forme de Ag_3PO_4 dans la phase solide (S) ou AgNO_3 dans la phase liquide (L).

	Ag % (m/m)	phase solide (m/m)				phase liquide (m/m)	
		Brushite	Vatérite	CMC (poudre)	Ag_3PO_4	eau	AgNO_3
C-REF	0	0,50	0,50	-	-		-
C-Ag(S)_2	7,5	0,45	0,45	-	$9,7 \cdot 10^{-2}$	0,7	-
C-Ag(S)_1	3,75	0,48	0,48	-	$4,9 \cdot 10^{-2}$	0,7	-
C-Ag(S)_ 10^{-1}	$3,75 \cdot 10^{-1}$	0,50	0,50	-	$4,9 \cdot 10^{-3}$	0,7	-
C-Ag(S)_ 10^{-2}	$3,75 \cdot 10^{-2}$	0,50	0,50	-	$4,9 \cdot 10^{-4}$	0,7	-
C-Ag(L)_ 10^{-2}	$3,75 \cdot 10^{-2}$	0,50	0,50	-	-	0,7	$5,9 \cdot 10^{-4}$
C-Ag(L)_ 10^{-4}	$3,75 \cdot 10^{-4}$	0,50	0,50	-	-	0,7	$5,9 \cdot 10^{-6}$
C-Ag(L)_ 10^{-6}	$3,75 \cdot 10^{-6}$	0,50	0,50	-	-	0,7	$5,9 \cdot 10^{-8}$
C-10pCMC	0	0,45	0,45	0,10	-	0,7	-
C-10pCMC/Ag(S)_ 10^{-2}	$3,75 \cdot 10^{-2}$	0,45	0,45	0,10	$4,9 \cdot 10^{-4}$	0,7	-
C-10pCMC/Ag(L)_ 10^{-2}	$3,75 \cdot 10^{-2}$	0,45	0,45	0,10	-	0,7	$5,9 \cdot 10^{-4}$

Tableau 5.1 – Composition des ciments ayant fait l'objet d'une étude microbiologique. Toutes les masses ont été rapportées à 1 g de phase solide ; une pastille a une phase solide de l'ordre de 0,40 g.

Essais microbiologiques

L'activité antibactérienne des matériaux a été évaluée en étudiant l'aptitude de staphylocoques à adhérer à la surface des ciments et à la coloniser. La Figure 5.1 en donne une représentation schématique. Les deux souches d'intérêt, *S. aureus* CIP 4.83 et *S. epidermidis* CIP 68.21 (Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France), ont été cultivées dans des microplaques 24 puits contenant les pastilles de ciment précédemment présentées et 2 cm³ de bouillon biofilm modifié (BBM)^[60] [Khalilzadeh 2010]. Le modèle a été choisi en considérant que la composition du BBM et le renouvellement du milieu permettait la croissance de cellules adhérentes en une structure de biofilm, sans donner lieu à une croissance planctonique – c'est-à-dire à l'état libre dans le milieu. Dans ces conditions, les bactéries planctoniques sont celles issues du relargage à partir du biofilm. Les souches-test sont conservées et entretenues selon la norme NF EN 12353 (Juin 2013). A partir d'une culture sur milieu trypticase soja (Biomérieux, Craaponne, France) de 24 heures à 37 °C, une suspension est réalisée à 10⁸ UFC /mL^[61] (mesure de la transmission à 640 nm). Cette suspension est diluée afin d'obtenir une inoculation initiale avec 10² UFC /puits. Le milieu a été renouvelé après différents temps d'incubation à 37°C – 4, 6, 20, 24 et 48 h pour *S. aureus* et 6, 20, 24 et 48 h pour

⁶⁰ Le BBM est un milieu de culture contenant différents sels de sulfates ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , FeSO_4) de phosphates (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) et du glucose.

⁶¹ UFC pour « Unité Formant Colonie », une UFC correspond donc à une colonie de bactéries.

S. epidermidis – après deux légers rinçages à l'eau distillée stérile (2 cm³). Les biofilms ont été cultivés pendant 72 h. Les puits et les ciments ont ensuite été rincés et 2 cm³ d'eau sont ajoutés. Les bactéries adhérentes ont été récoltées par grattage des surfaces du puits à l'aide d'une spatule stérile et remises en solution. Le dénombrement des UFC a été réalisé sur cette suspension et sa dilution au dixième en ajoutant respectivement 1 mL et 100 µL à une gélose tryptic soja (incubation pendant 48 h à 37°C). Chaque expérience a été répétée trois fois ; les résultats présentent la moyenne et l'écart type issus de ces trois essais.

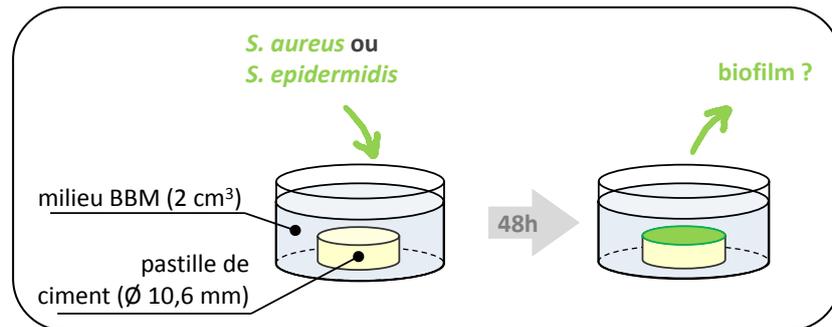


Figure 5.1 – Représentation schématique de l'évaluation des propriétés antibactériennes (anti-biofilm) d'un ciment.

1.1.b Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des ciments

Ciments chargés en argent

Dans un premier temps, l'activité antibactérienne a été évaluée sur le ciment C-REF – sans argent – d'une part, et sur des ciments C-Ag(S) contenant 3,75.10⁻² % à 7,5 % (m/m) d'argent d'autre part. Ainsi, nous avons pu noter que le ciment C-REF ne présentait pas d'activité antibactérienne significative – même densité microbienne après 72 heures d'incubation que les témoins puits de microplaque – et autorisait la formation d'un biofilm dense à sa surface, avec une population adhérente supérieure à 6 log (Figure 5.2, point gris). Sur les compositions contenant de l'argent, que ce soit pour *S. aureus* ou *S. epidermidis* on note une inhibition significative de la formation du biofilm. Jusqu'à une concentration de 3,75.10⁻² % (m/m) en argent introduit sous forme Ag₃PO₄ dans la phase solide du ciment : le nombre de bactéries à la surface du ciment est inférieure à 3 log (limite de détection dans les conditions d'essai) (Figure 5.2.a & b, points rouges).^[62]

Dans le but de mettre en exergue l'effet dose de l'argent et de déterminer les limites de son effet, nous avons cherché à diminuer encore sa concentration. La voie solide C-Ag(S) s'est alors

⁶² Le protocole utilisé ne permettant pas un dénombrement significatif inférieur à 10³ UFC.cm⁻²

avérée délicate et des compositions de plus faibles concentrations en argent sont apparues difficiles à mettre en œuvre expérimentalement sur quelques grammes de ciment. Nous avons donc choisi de réaliser des ciments C-Ag(L), deuxième voie d’insertion de l’argent proposée dans le chapitre 3, où l’agent antibactérien est introduit par le biais d’une solution de nitrate d’argent – ce qui autorise des concentrations beaucoup plus faibles d’ions Ag^+ . Trois nouvelles compositions ont alors été préparées : un ciment C-Ag(L)_{10⁻²}, comme point de comparaison avec le ciment C-Ag(S)_{10⁻²}, et les ciments C-Ag(L)_{10⁻⁴} et C-Ag(L)_{10⁻⁶} d’un facteur de dilution 10⁻² et 10⁻⁴ respectivement par rapport à ces derniers ciments.

La Figure 5.2 (points verts) présente les résultats obtenus pour ces ciments C-Ag(L). Nous pouvons ainsi remarquer que pour une même quantité d’argent, le ciment C-Ag(L)_{10⁻²} semble présenter une activité antibactérienne moins prononcée que le ciment C-Ag(S)_{10⁻²} – et ce pour les deux souches testées – mais toujours notable : le nombre de bactéries a été diminué de 2 à 3 log. Lorsque la quantité d’argent a été diluée d’un facteur 100, l’adhésion et la prolifération de *S. aureus* sous forme de biofilm à la surface des ciments n’a plus été freinée. Dans le cas de *S. epidermidis*, une légère diminution (-1 log(UFC/cm²)) est restée significative pour les ciments C-Ag(L)_{10⁻⁴} et C-Ag(L)_{10⁻⁶} par rapport au ciment C-REF, mais non suffisante par rapport à nos objectifs.

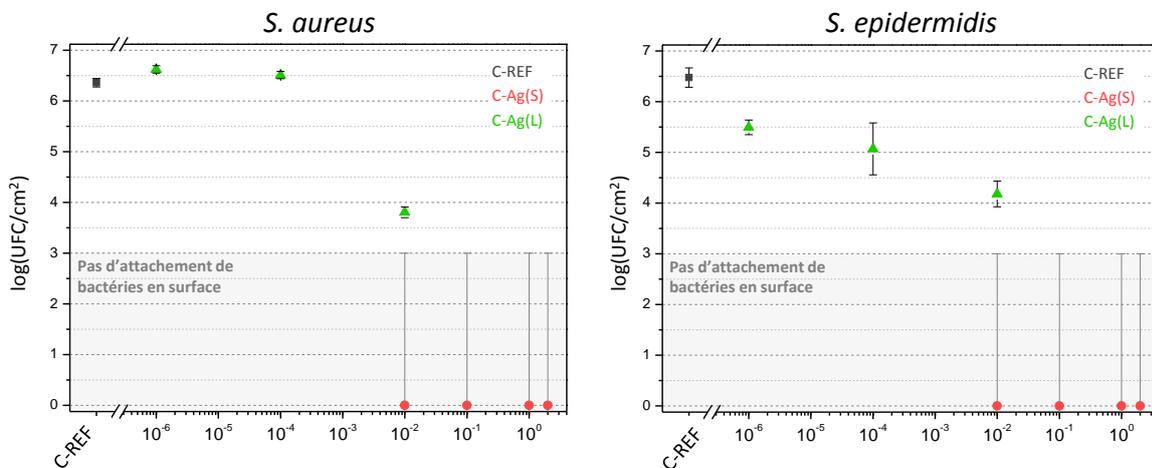


Figure 5.2 – Evaluation de l’activité antibactérienne (anti-biofilm) des ciments C-REF, C-Ag(S)_{10⁻¹}, C-Ag(S)_{10⁻²}, C-Ag(L)_{10⁻²}, C-Ag(L)_{10⁻⁴} et C-Ag(S)_{10⁻⁶} contre les souches *S. aureus* et *S. epidermidis*.

Il apparaît donc, d’après ces résultats, qu’une concentration d’au moins 3,75.10⁻² % (m/m) d’argent en phase solide du ciment CaCO₃ – CaP permettrait de prévenir l’adhésion bactérienne et/ou la multiplication des bactéries adhérees.

Notons que des essais préliminaires ont été réalisés pour évaluer le potentiel antimicrobien du surnageant, après l’essai : celui-ci n’a pas montré d’effet significatif sur des cellules planctoniques.

Cela signifie donc que le relargage de l'argent de la pastille est faible, en accord avec les essais préliminaires de libération in vitro (Chapitre 4 - § 7) d'une concentration dans la solution inférieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) et à la concentration minimale bactéricide (CMB), de l'ordre de 1-10 ppm.

Ciments composites chargés en argent

Les résultats du chapitre 4 nous ont menés à la conclusion qu'une teneur de 10 % (m/m) de CMC, introduite sous forme de poudre dans la phase solide du ciment, permettait d'obtenir un ciment composite cohésif et injectable (Chapitre 4, § 3.4). Par ailleurs, nous venons de présenter les résultats d'une deuxième série d'analyses réalisée pour étudier l'impact de l'introduction du polysaccharide sur les propriétés antibactériennes du ciment chargé en argent à une concentration de $3,75 \cdot 10^{-2}$ % (m/m) dans la phase solide.

Le Tableau 5.2 présente les résultats issus de cette série de tests sur des ciments composites chargés en argent (avec CMC introduite sous forme de poudre). Nous pouvons ainsi tout d'abord remarquer que l'introduction de 10 % de CMC a un impact sur les propriétés antibactériennes du matériau : la quantité de bactéries dénombrées était moindre d'environ 1,5 log dans C-10pCMC que dans C-REF, et ce pour les deux souches. Il a été noté dans la littérature qu'en milieu hydraté, la CMC formait un gel capable d'encapsuler et d'immobiliser des bactéries, notamment *S. aureus* [Walker 2003]. Il est donc possible que la quantité de CMC présente en surface de l'échantillon ait cette faculté de piéger une partie des bactéries.

Les ciments composites chargés en argent C-10pCMC/Ag(L) $_10^{-2}$ et C-10pCMC/Ag(S) $_10^{-2}$ n'ont pas présenté, comme nous aurions pu l'espérer, un effet synergique des deux additifs (CMC et Ag) sur les propriétés antimicrobiennes : les résultats sont du même ordre de grandeur avec ou sans CMC. L'activité antibactérienne des ciments p-composites chargés en argent est cependant démontrée puisque nous retrouvons dans cette série d'essais des réductions de l'ordre de 3 log (Tableau 5.2).

Nombre de bactéries exprimées en log (UFC/cm ²)	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Puits vide	6,58 ± 0,15 (3)	6,33 ± 0,09 (3)
C-REF	5,71 ± 0,05 (2)	5,67 ± 0,32 (3)
C-10pCMC	4,10 ± 0,14 (2)	4,33 ± 0,34 (3)
C-Ag(L)_{10⁻²}	3,06 ± 0,02 (2)	3,16 ± 0,22 (3)
C-10pCMC/Ag(L)_{10⁻²}	3,26 ± 0,12 (2)	2,93 ± 0,10 (3)
C-Ag(S)_{10⁻²}	3,62 ± 0,18 (2)	3,39 ± 0,09 (2)
C-10pCMC/Ag(S)_{10⁻²}	3,70 ± 0,09 (2)	3,32 (1)

Tableau 5.2 – Evaluation de l'activité antibactérienne de ciments contenant ou non de la CMC – 10 % (m/m) sous forme de poudre (en orange) – et/ou de l'argent – 3,75.10⁻² % (m/m) introduit par voie liquide Ag(L) (en vert) ou solide Ag(S) (en rouge). Les valeurs moyennes et écart-types (en italique) sont issus d'un nombre d'essais précisé entre parenthèses.

Ces essais microbiologiques ce sont ainsi avérés probants : que ce soit en introduisant l'argent par voie liquide sous forme de AgNO₃ ou directement par voie solide sous forme de Ag₃PO₄, la possibilité de conférer des propriétés antibactériennes à des systèmes CaCO₃ – CaP – Ag et CaCO₃ – CaP – CMC – Ag a été démontrée. Des concentrations de 3,75.10⁻² % à 7,5 % (m/m) d'élément Ag dans la phase solide des ciments ont ainsi permis d'inhiber la formation de biofilm des souches *S. aureus* et *S. epidermidis* en surface des matériaux.

Des essais complémentaires sont en cours afin d'abaisser la limite de détection (dénombrement des bactéries) et de pouvoir définir s'il s'agit d'une inhibition totale de formation de biofilm ou d'une réduction partielle.

Compte tenu de la large gamme de concentrations en Ag testées et efficaces d'un point du vue bactériologique, nous nous sommes ensuite préoccupés de vérifier la cytocompatibilité de telles formulations de ciments (composites ou non) chargés en Ag vis-à-vis des cellules.

2 Essais cellulaires

Si la cytocompatibilité de la matrice CaCO₃ – CaP (ciment C-REF) avait déjà été contrôlée dans des études préalables [Combes 2006a], un deuxième aspect biologique clef était à examiner : la biocompatibilité des compositions contenant de la CMC et/ou de l'argent. Alors que la biocompatibilité de la CMC n'est plus à prouver [Barbosa 2005; Hebeish 2013], l'argent lui peut présenter un caractère cytotoxique en fonction de sa concentration [Miura 2009]. L'enjeu de ces études cellulaires était donc dans un premier temps d'évaluer dans quelle gamme de concentration l'argent, au sein d'une matrice CaCO₃ – CaP, allait s'avérer cytocompatible et dans un deuxième

temps d'étudier l'influence d'un composite $\text{CaCO}_3 - \text{CaP/CMC/Ag}$ sur la différenciation ostéoblastique de cellules mésenchymateuses humaines.

2.1 Etude de la cytotoxicité des ciments contenant Ag_3PO_4

2.1.a Matériel & méthodes

Des pastilles de ciments de différentes compositions (Tableau 5.1) ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe 1.1.a, puis également stérilisées par rayonnement gamma (25 KGy) à l'aide d'un irradiateur (Nordion, Gammacell).

La toxicité éventuelle d'un matériau vis à vis des cellules peut-être recherchée en étudiant l'effet provoqué par l'extrait de ce matériau. Les extraits permettent de mettre en évidence l'effet toxique de substances « entraînaibles » ou de produits de relargage. Les extraits sont préparés selon les normes AFNOR6NF EN 30993^[63] et ISO10993-5^[64] en respectant le rapport entre la surface apparente immergée de l'échantillon et le volume du véhicule d'extraction à savoir entre 3 à 6 cm^3/cm^2 de l'échantillon.

Nous avons donc préparé des extraits à partir des différents ciments sous forme de pastilles de 1 cm^2 pour chaque série. Les matériaux ont été placés dans des tubes en présence de milieu α -MEM^[65] + Glutamax (Invitrogen, France) seul, puis incubés dans une étuve à 37°C en présence de 5 % de CO_2 et 95 % d'humidité (Figure 5.7.a). Après 24 heures, l'extrait (J_1) de chaque série est récupéré et remplacé par une même quantité de milieu puis replacé dans l'étuve. Cette deuxième extraction est récupérée 24 heures plus tard (J_2) et une quantité identique de milieu est rajoutée de nouveau. Cette étape est renouvelée encore 2 fois. Après récupération du dernier (J_5), les 5 extraits sont supplémentés avec 10 % de sérum fœtal de veau (SVF, Lonza France) et utilisés purs (100%).

Des cellules souches mésenchymateuses, isolées à partir du stroma de la moelle osseuse (HBMSC), ont été cultivées dans un milieu de culture basique non inducteur, l' α -MEM en absence d'acide ascorbique supplémenté en SVF à 10 % (v/v) afin de garantir un état de cellules stromales [Vilamitjana-Amédée 1993]. Ces cellules ont ensuite étéensemencées à une densité de 15000 cellules/ cm^2 dans des plaques de 96 puits (Nunc, Denmark) et incubées à 37°C pendant

⁶³ Evaluation biologique des dispositifs médicaux. Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité : Méthodes in vitro. 1994. AFNOR6NF EN 30993-5.

⁶⁴ Norme ISO10993-5, 1992, Biological evaluation of medical devices. Test for cytotoxicity: in vitro methods.

⁶⁵ Le α -MEM (pour *Minimum Essential Medium*) est un milieu de culture cellulaire riche particulièrement adapté à la culture de cellules de la moelle osseuse.

3 jours. A l'issue de ce temps, le milieu de culture est remplacé par 100 μ L de chaque extrait (J_1, J_2, J_3, J_4, J_5) à raison de 6 puits pour chaque extrait (Figure 5.7.b). Les plaques sont placées dans un incubateur thermostaté à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité pendant 24 heures. Deux témoins ont été utilisés : un témoin positif – phénol à 64 g.L⁻¹ – qui est susceptible d'induire une réponse cytotoxique de façon reproductible et un témoin négatif – milieu de culture alpha MEM dépourvu d'échantillon de matériau et incubé dans les mêmes conditions. Deux tests ont été réalisés : le test du rouge neutre (RN)^[66] ou test de viabilité [Parish 1983] et le test au MTT^[67] ou test d'activité métabolique. Après 24 h de contact entre les extraits et les cellules, les plaques de culture sont retirées de l'incubateur et après élimination de l'extrait, les cellules sont rincées puis incubées respectivement avec la solution de RN et de MTT pendant 3 h.

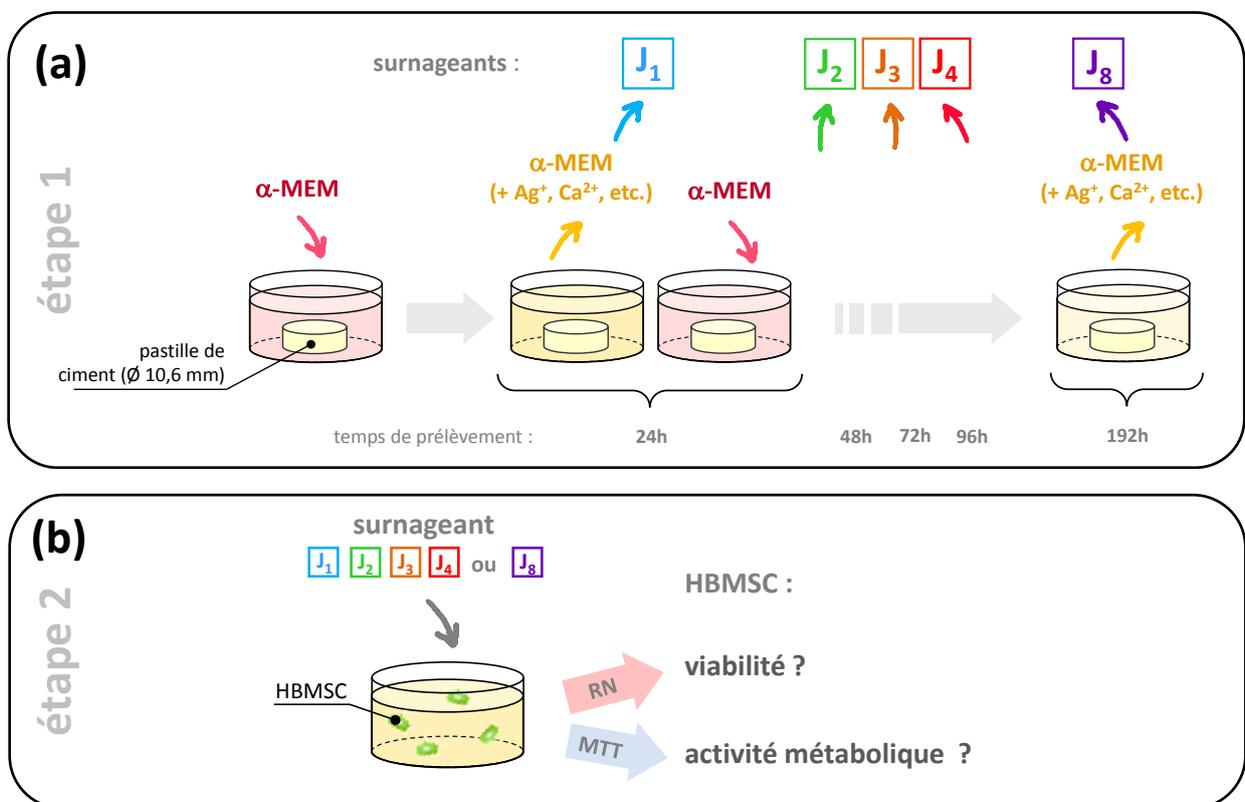


Figure 5.3 – Représentation schématique (a) de la préparation des différents surnageants ; (b) de la détermination de la cytotoxicité de ce surnageant sur des HBMSC.

L'extraction du RN est réalisé avec un mélange composé d'acide acétique à 1 % (v/v) dans de l'éthanol à 50 % (v/v) et les cristaux de formazan sont solubilisés par l'addition de DMSO pour le test

⁶⁶ Le rouge neutre est un colorant vital qui se fixe par liaisons électrostatiques sur les sites anioniques de la matrice lysosomiale et toute diminution de l'incorporation de ce colorant traduit une altération de l'intégration membranaire de ce compartiment

⁶⁷ Le MTT ou bromure de 3-(4-5 diméthylthiasol-2-yl) diphenyl Tétrazolium (Sigma) est un sel de tétrazolium de couleur jaune en solution aqueuse à pH neutre. Il est réduit en cristaux bleus de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. La quantité de formazan générée est ainsi proportionnelle à l'activité des cellules.

MTT. Les plaques sont lues au spectrophotomètre (DYNEX MRX, Dynatech) à la longueur d'onde de 540 nm. La coloration s'étendant de l'incolore pour les dilutions entraînant 100 % de cytotoxicité (témoin positif) à une couleur rouge (RN) ou violacée (MTT) d'autant plus intense que les extraits sont moins toxiques. Les résultats seront exprimés en pourcentage par rapport au témoin qui représente le 100 % d'activité, sur une moyenne de six essais par composition.

2.1.b Résultats

La Figure 5.4 présente les résultats obtenus sur les trois ciments les plus chargés en argent : C-Ag(S)₁₀⁻¹, C-Ag(S)₁ et C-Ag(S)₂ contenant respectivement 0,375 %, 3,75 % et 7,50 % (m/m) d'élément Ag dans leur phase solide. Les résultats obtenus sont comparés aux résultats des témoins que représentent les cellules n'ayant pas vu d'extraits des matériaux. Dans ce travail et selon la norme AFNOR, un produit est considéré comme cytotoxique lorsque le pourcentage de mortalité est supérieur à 25%. Selon cette norme seul le test de viabilité est préconisé, mais nous avons souhaité y associer le test du MTT pour introduire la notion d'activité métabolique car une cellule vivante n'est pas forcément active.

On peut remarquer que quelle que soit la dose d'argent introduite dans cette gamme de ciments, la viabilité cellulaire n'a pas été affectée. Par contre, pour le ciment le plus chargé en argent, nous observons une cytotoxicité pour l'extrait J₁ qui représente les premières 24 h de libération de l'argent dans le milieu. Cependant dès la seconde extraction nous pouvons noter une conservation de l'activité métabolique similaire aux autres conditions puisque le pourcentage d'activité est supérieur à 75 %.

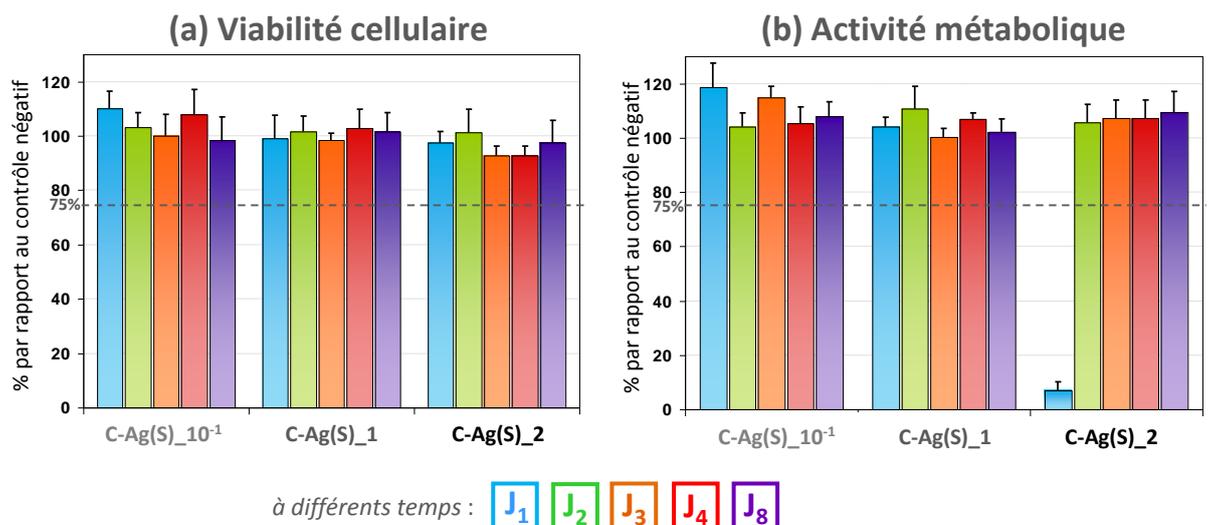


Figure 5.4 – (a) Viabilité cellulaire (RN) et (b) activité métabolique (MTT) des ciments C-Ag(S)₁₀⁻¹, C-Ag(S)₁ et C-Ag(S)₂ contenant respectivement 0,375 %, 3,75 % et 7,50 % (m/m) d'élément Ag dans leur phase solide.

Ces résultats ont été obtenus sur des ciments ayant mûri préalablement 48 h dans une atmosphère saturée en eau. Leur extrapolation sur un possible comportement in vivo doit prendre en compte deux principales différences : la première est que le ciment, implanté sous la forme d'une pâte, peut présenter une cinétique de libération différente et probablement plus rapide pendant les premières heures de prise et de durcissement. Néanmoins, dans notre cas, l'argent a été introduit sous forme de particules solides d'orthophosphate d'argent Ag_3PO_4 , très peu solubles (cf. chapitre 3), ce qui minimise un éventuel pic de libération plus important. D'autre part, les essais in vitro ont été réalisés dans un milieu statique^[68] ; il est très probable que, in situ, après implantation dans un système dynamique dans lequel les fluides biologiques circulent, la concentration effective d'argent en surface du matériau soit bien moindre.

Ces résultats mettent ainsi en évidence la cytocompatibilité des ciments contenant de l'argent, jusqu'à une concentration de 3,75 % m/m en phase solide, concentration relativement élevée à l'échelle biologique. Les résultats obtenus sur le ciment le plus chargé laisse penser qu'une concentration d'argent libérée éventuellement supérieure dans des conditions in vitro n'affecteraient pas la vie des cellules et que très peu leur activité métabolique.

2.1.c Confrontation des données de microbiologie et de cytocompatibilité

Les résultats de microbiologie ont mis en évidence une activité antibactérienne du ciment jusqu'à une concentration de $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m d'argent en phase solide. D'autre part les essais réalisés sur les cellules souches mésenchymateuses ont démontré la cytocompatibilité des matériaux jusqu'à une concentration de 3,75 % m/m. Comme schématiquement représenté sur la Figure 5.5, ces deux données nous permettent de déterminer les valeurs limites de la gamme dans laquelle nous pouvons élaborer un ciment ayant les caractéristiques biologiques requises.

En cohérence avec la volonté d'élaborer un matériau ayant des propriétés préventives vis à vis des souches bactériennes – et non pas curatives –, nous avons ainsi choisi de poursuivre les études biologiques avec la plus faible concentration de $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m en argent dans les ciments.

⁶⁸ avec renouvellement quotidien du milieu

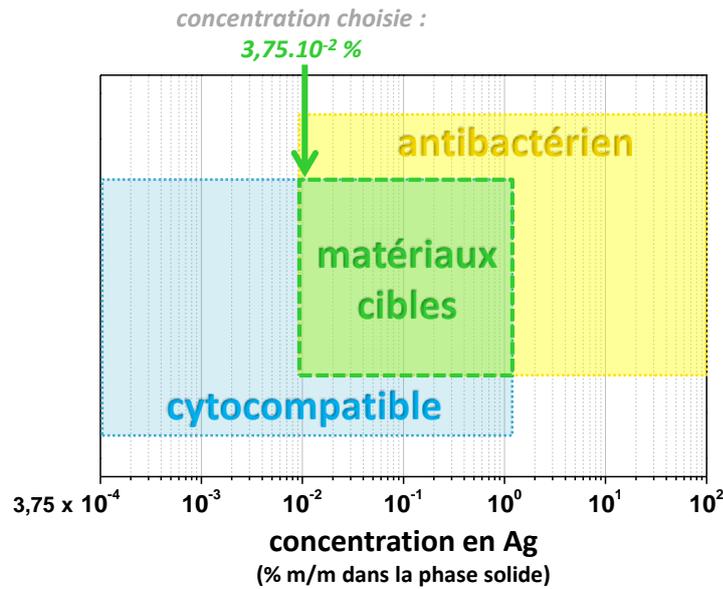


Figure 5.5 – Définition de la concentration en argent à introduire dans la phase solide du ciment d’après les résultats de cytocompatibilité et de microbiologie

2.2 Etude de la cytocompatibilité d’un ciment composite CaCO_3 – CaP -CMC-Ag : effet de l’argent sur la différenciation ostéoblastique

Cette partie de l’étude concerne un ciment p-composite contenant 10 % m/m de CMC et $3,75 \cdot 10^{-2} \%$ m/m d’argent dans sa phase solide, soit le ciment C-10pCMC/Ag(S)_{10⁻²}. Nous simplifierons sa dénomination en « C-10pCMC/Ag ».

2.2.a Matériel & Méthodes

Les pastilles de ciments élaborées puis stérilisées par rayonnement gamma (§ 2.1.a) ont été utilisées pour les études de différenciation. Après 24 h en milieu Alpha MEM seul, les pastilles ont étéensemencées avec 10^5 cellules/cm² dans du milieu à raison de 4 matériaux par temps et par série. Les plaques sont placées dans un incubateur thermostaté à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d’humidité pendant 3, 7 et 15 jours de culture.

A l’issue de chaque temps et après vérification de la présence des cellules (test live dead) et pour chaque série de matériaux, les ARN totaux des cellules HBMSCs sont extraits à l’aide de la trousse d’extraction Quiagen (RNeasy total RNA kit) et 1 µg sera utilisé pour la synthèse de l’ADNc et

la différenciation cellulaire a été suivie par PCR quantitative en temps réel^[69] des marqueurs de différenciation ostéoblastique, plus particulièrement la *phosphatase alcaline* (PAL) – marqueur précoce –, l'*ostéocalcine* (OC) – marqueur tardif – et le *collagène de type I* (Coll1).

Des cellules HBMSCs témoins ont été cultivées sur plastique et serviront de contrôle d'expression.

2.2.b Résultats

Nous pouvons observer sur la Figure 5.6 une expression augmentée aussi bien du marqueur précoce (PAL) que du marqueur tardif (OC) de la différenciation ostéoblastique des HBMSCs sur le ciment C-10pCMC/Ag comparativement au témoin et ceci dès le 3^{ème} jour de culture avec une expression plus importante à J7 et un maintien de cette différenciation à J15 pour les 2 marqueurs. L'expression du collagène reste similaire au cours du temps et ceci quel que soit le support.

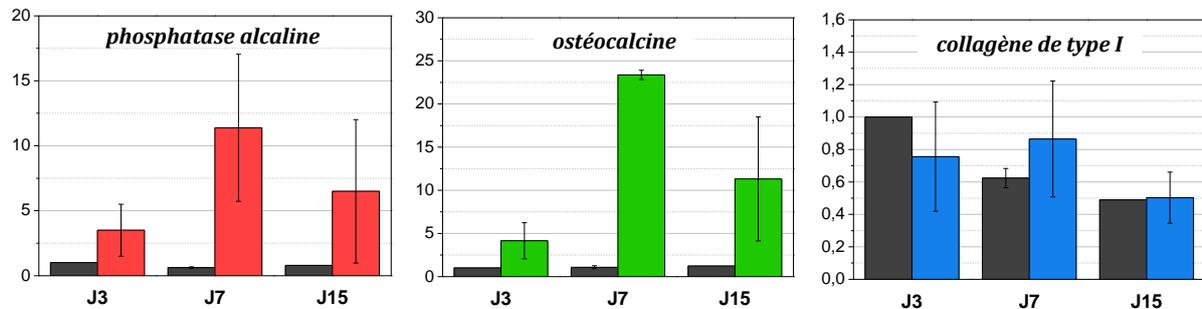


Figure 5.6 – Expression de (a) la phosphatase alcaline, (b) l'ostéocalcine et (c) le collagène de type I en présence du ciment C-10pCMC/Ag ou d'un échantillon contrôle (plastique).

Ces différents essais in vitro mettent en évidence que le ciment C-10pCMC/Ag, par son caractère antibactérien, cytocompatible et favorisant la différenciation ostéoblastique, se présente comme un candidat prometteur en tant que substitut osseux. L'étape suivante a consisté à étudier le comportement in vivo de certaines compositions de ciments.

⁶⁹ La PCR (Polymerisation Chain Reaction) quantitative en temps réel est une méthode d'analyse qui permet de quantifier le niveau d'expression d'un gène spécifique d'une cellule. Son principe repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement dont l'intensité sera directement mesurée à un moment donné au cours de chaque cycle PCR.

3 Evaluation de la réponse osseuse aux ciments à base de $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$ après implantation in vivo

Deux séries d'études in vivo ont été menées au laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) (travaux de Master 2 – Dr Maïté Souyet sous la direction de Pr Fani Anagnostou).^[70] La première étude, à laquelle j'ai pu participer, évalue in vivo la biocompatibilité et l'ostéoconductivité du ciment C-REF $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$. La deuxième étude portait sur le ciment composite comportant de la CMC et de l'argent afin d'évaluer l'influence de ces deux additifs sur son potentiel ostéoconducteur et sa cytocompatibilité in vivo.

3.1 Méthodologie expérimentale

3.1.a Procédure chirurgicale

Les essais in vivo ont été réalisés sur des lapins néo-zélandais (âgés de 4 mois ; ≈ 4 Kg). Un défaut cylindrique ($h = 10$ mm ; $\varnothing = 6$ mm) a été effectué dans le condyle fémoral^[71] des lapins (Figure 5.7.a & b₁). Ces défauts ont ensuite été comblés avec la pâte de différents ciments préparés extemporanément : leurs compositions sont présentées dans le Tableau 5.3 – préparés extemporanément.^[72] Chaque composition a été implantée au niveau de 6 sites fémoraux. Les animaux ont été sacrifiés au bout de 6 semaines.

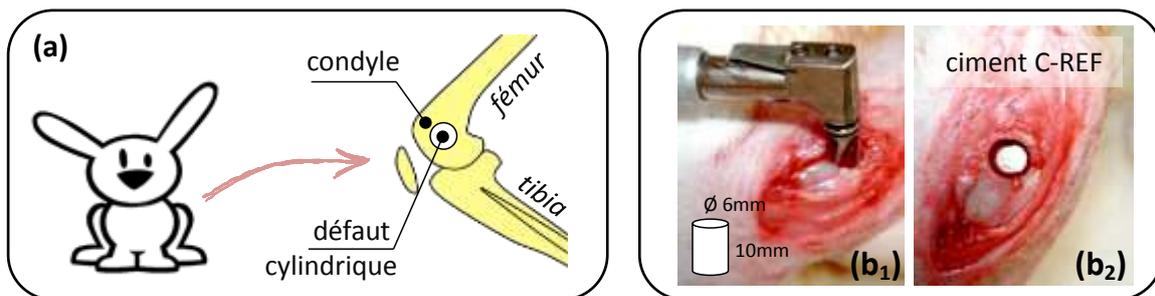


Figure 5.7 – (a) site d'implantation fémoral chez le lapin ; défaut (b₁) avant et (b₂) après comblement par le ciment.

⁷⁰ Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéoarticulaire, UMR-CNRS 7052, Paris, France

⁷¹ Un *condyle* est une surface articulaire arrondie dans un sens, et aplatie dans l'autre, qui s'articule avec un autre os – le tibia, dans le cas d'un condyle fémoral.

⁷² Les ciments ont été préparés comme décrit dans les chapitres 2, 3 et 4. Les poudres réactives avaient été préalablement stérilisées par rayonnement γ .

	Composition de la phase solide du ciment (m/m)			
	Brushite	Vatérite	CMC (poudre)	Ag (Ag ₃ PO ₄)
C-REF	0,50	0,50	-	-
C-2pCMC	0,49	0,49	0,02	-
C-2pCMC/Ag(S) _{10⁻²}	0,49	0,49	0,02	375 ppm
C-10pCMC	0,45	0,45	0,10	-
C-10pCMC/Ag(S) _{10⁻²}	0,45	0,45	0,10	375 ppm

Tableau 5.3 – Composition des ciments ayant fait l'objet d'une étude in vivo

3.1.b Histologie

Après le sacrifice, les prélèvements effectués ont été fixés dans du formol 10 % pendant un mois puis déshydratés dans des bains d'alcool croissants (70 ° à 100 °) et inclus en bloc dans du polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Après la polymérisation les blocs de fémurs ont été orientés à l'aide de radiographies puis découpées pour obtenir des coupes transversales. Elles ont été collées sur des lames, d'abord poncées afin d'arriver à une épaisseur de 70 à 80 µm (Exakt Micro grinding System®, Micron France) puis polies et colorées au bleu de Stevenel^[73] et à la picrofuch sine de van Gieson^[74]. Des coupes de 100 µm non collées ont été utilisées pour réaliser des microradiographies.

3.2 Etude du ciment de référence

La Figure 5.8 montre deux microradiographies obtenues sur deux explants après 6 semaines d'implantation du ciment CaCO₃ - CaP C-REF. Nous pouvons remarquer d'une part que le ciment présente la même radio-opacité que l'os, ce qui ne permet pas de distinguer a priori par cette technique la matrice osseuse présente avant implantation, le matériau implanté et l'os néoformé au cours de l'implantation. Conférer une certaine radio-opacité à ce ciment CaCO₃ - CaP est une préoccupation qui a fait l'objet d'une étude complémentaire [Tadier 2009]. L'addition de carbonate de strontium SrCO₃ comme radio-opacifiant sera donc prise en compte pour la formulation finale du matériau. Néanmoins sur ces radiographies, le matériau se devine sur la Figure 5.8.a ; il a perdu sa circularité et son intégrité sur la Figure 5.8.b : ces premières observations sont le témoin d'une résorbabilité du matériau, apparemment variable selon les implants.

⁷³ coloration bleue des noyaux cellulaires

⁷⁴ coloration rose du tissu osseux (fibres de collagène).

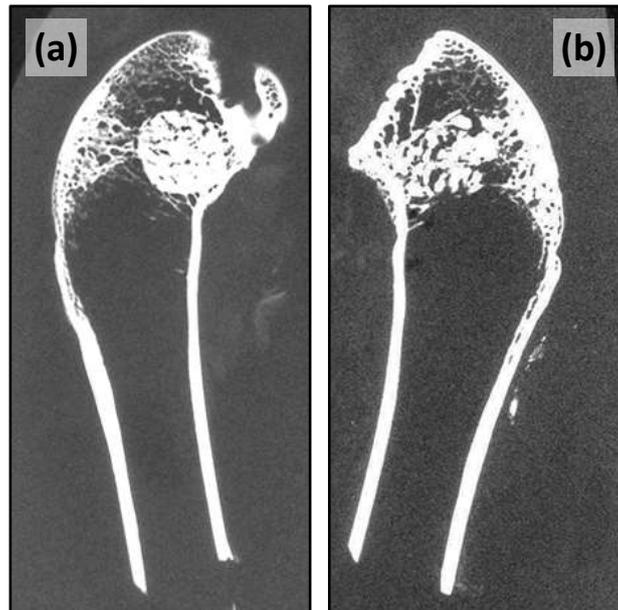


Figure 5.8 – Microradiographies de coupes de deux implants C-REF (a) et (b).

Les Figure 5.9 et Figure 5.10 présentent les coupes histologiques issues de différents échantillons C-REF. Aucune réaction inflammatoire n'a été observée au niveau des défauts comblés avec ce ciment (Figure 5.10.c & d). Après 6 semaines d'implantation, des îlots de matériau (couleur sombre) sont encore présents dans tous les explants, montrant une bonne résorbabilité, relativement variable selon les échantillons (Figure 5.9). Une analyse histomorphométrique a mis en évidence que 6 semaines après l'implantation, la surface du ciment n'était plus que de l'ordre de 35 %. De l'os néoformé (couleur rose) a d'autre part été détecté autour du matériau résiduel ce qui indique un potentiel ostéoconducteur. Cette néoformation, de l'ordre de 20 % et également présente jusqu'au cœur du matériau, a également présenté une relativement grande variabilité d'un implant à l'autre.

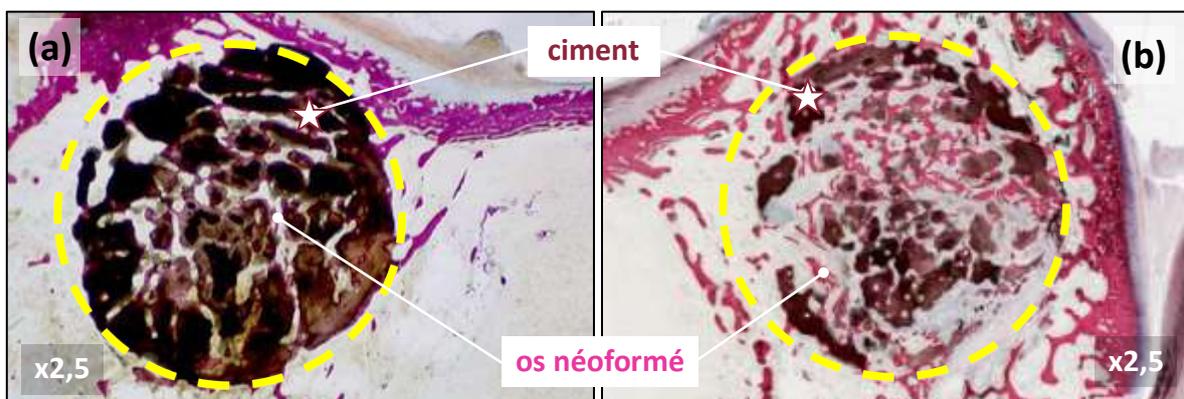


Figure 5.9 – Coupe histologique non décalcifiée de deux implants C-REF (a) et (b) après 6 semaines (cercle interne : $\varnothing = 2,5$ mm ; cercle externe : $\varnothing = 6$ mm)

Sur les Figures 5.10.a & b, la microstructure du ciment résiduel présente de nombreuses stries correspondant à des traces de plaquettes de brushite dissoutes comme nous avons pu l’observer in vitro par MEB (Figure 2.10).

Quelques cellules multinucléées ont également pu être observées à la surface du matériau (Figure 5.10.e & f).

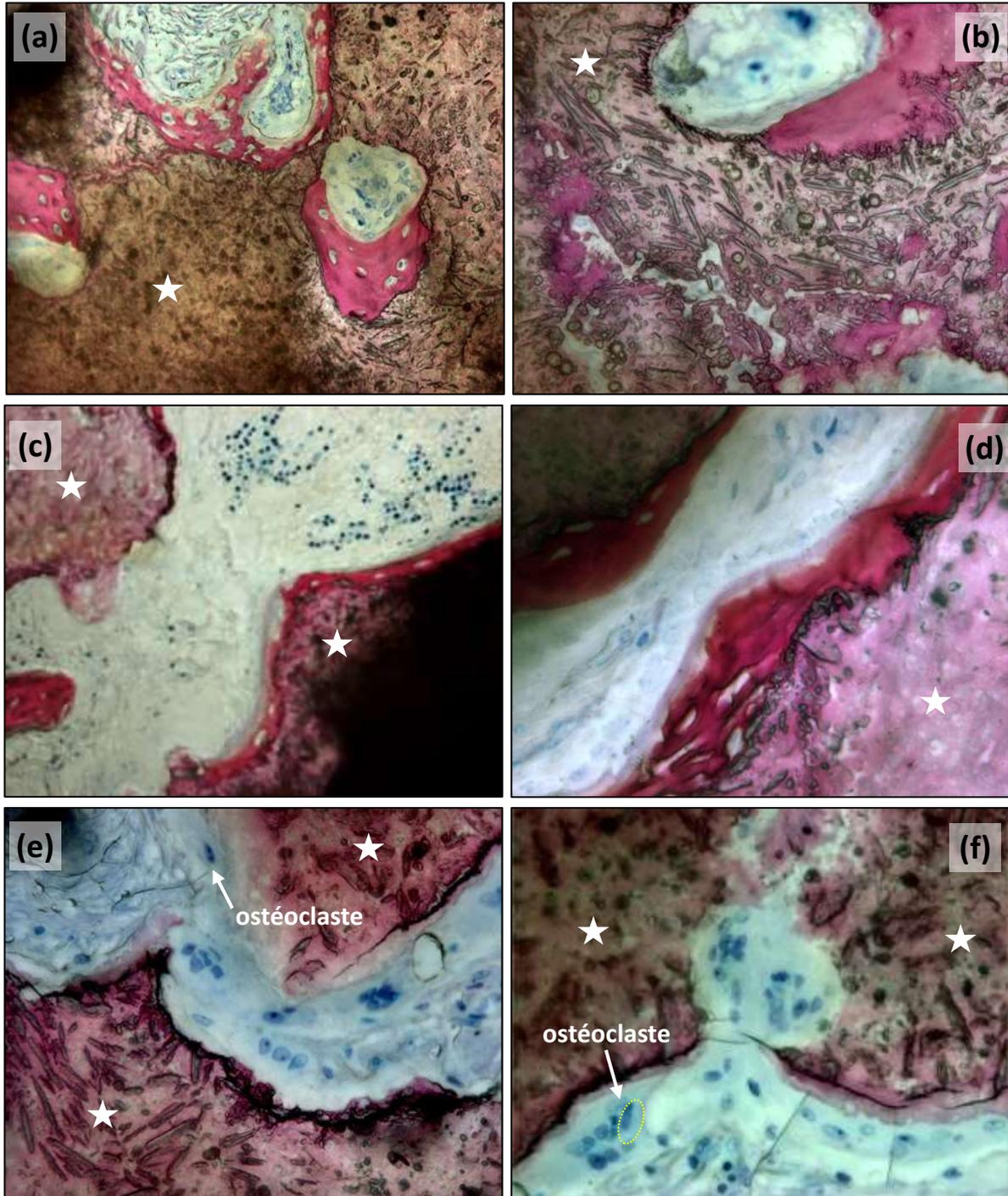


Figure 5.10 – Coupes histologiques d’implants du ciment C-REF : (a) & (b) Dissolution du matériau, fissures, néoformation osseuse ; (c) & (d) Absence réaction inflammatoire et néoformation osseuse ; (e) & (f) Présence des cellules multinucléées en contact avec le matériau (ce dernier est indiqué par une étoile blanche).

3.3 Etude des ciments composites contenant de l'argent

Une deuxième étude a été réalisée sur des ciments contenant 2 % et 10 % de CMC (Tableau 5.3) et $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m d'argent.

3.3.a Analyses toxicologiques

Une analyse de la concentration en argent présent dans les organes tels que la rate et le foie a été réalisée afin de vérifier que l'argent ne s'était pas accumulé dans ces organes. Les rates de 15 des 16 lapins ont été lyophilisées et analysées par spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS).^[75] Aucune trace d'argent – c'est-à-dire une teneur inférieure à 5 ppm – n'y a été détectée. L'analyse des foies est en cours.

3.3.b Analyses histologiques

L'analyse complète des coupes histologiques est en cours, mais différents points ont d'ores et déjà pu être remarqués. Sur l'ensemble des ciments composites implantés – avec ou sans argent – l'absence de réaction inflammatoire ainsi qu'une néoformation osseuse au contact du matériau ont été notées. L'introduction de phosphate d'argent Ag_3PO_4 dans la phase – à $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m en élément Ag – n'a pas montré d'influence significative sur la néoformation osseuse et la résorbabilité du matériau. L'analyse histomorphométrique est en cours afin d'évaluer l'effet de la CMC sur ces paramètres (Figure 5.11.c vs Figure 5.11.a&b). Les ciments C-10pCMC semblent d'autre part présenter un aspect plus fragmenté (Figure 5.11.e). L'os néoformé est observé au sein du matériau (Figure 5.11.d & d₂). Des ostéoclastes présents suggèrent un mécanisme de résorption non seulement chimique mais à médiation cellulaire. Ces premiers résultats apparaissent comme prometteurs pour la suite du développement de ces ciments composites incluant de l'Ag en tant qu'agent antibactérien.

⁷⁵ Institut des Sciences Analytiques, CNRS, Villeurbanne

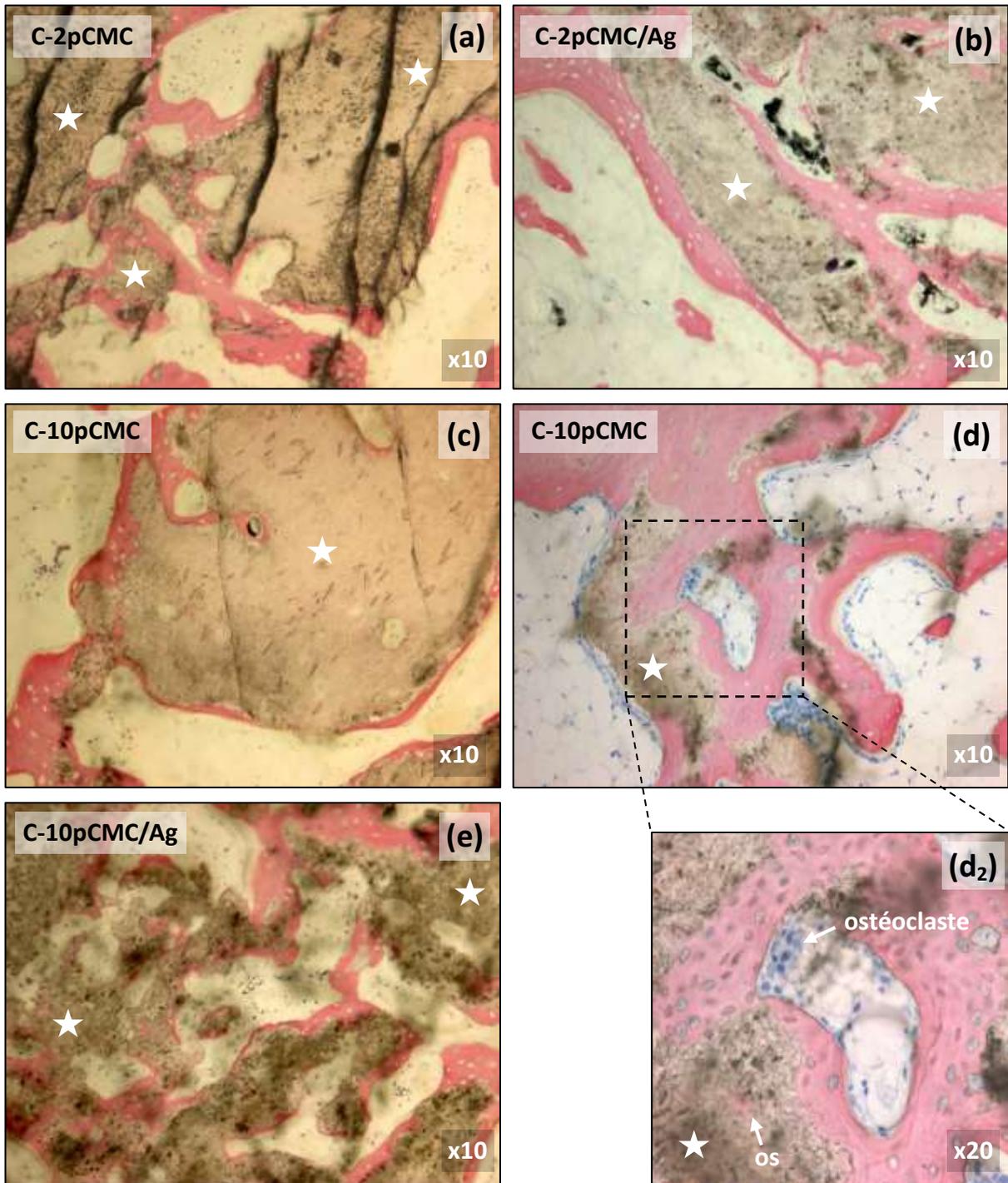


Figure 5.11 – Images des coupes histologiques des ciments composites (a) C-2pCMC ; (b) C-2pCMC/Ag ; (c) & (d) C-10pCMC et (e) C-10pCMC/Ag à un grossissement x10 et agrandissement de l'image (d) à un grossissement x20.

4 Conclusion

Dans ce chapitre, trois axes d'études biologiques ont été présentés. L'activité antibactérienne des ciments contenant de l'argent a d'abord été mise en évidence. Pour des teneurs supérieures ou égales à $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m d'argent, sous forme Ag_3PO_4 dans la phase solide, le développement de deux souches staphylocoques sous forme de biofilm a été inhibé, que ce soit dans un système CaCO_3 – CaP – Ag que dans un système CaCO_3 – CaP – CMC – Ag. Des concentrations inférieures, où l'argent a été introduit par voie liquide, n'ont montré qu'une inhibition partielle voire nulle, en fonction de la dose d'argent.

La cytocompatibilité de ces mêmes matériaux a d'autre part été mise en évidence : jusqu'à 7,5 % m/m d'argent, les cellules du milieu dans lequel les ciments étaient immergés étaient viables. Seule la composition la plus concentrée a provoqué une baisse de l'activité métabolique le premier jour, ensuite retrouvée les jours suivants. Il apparaît ainsi qu'une gamme de concentration en argent entre $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m et 3,75 % m/m est parfaitement adaptée pour élaborer un ciment biocompatible antibactérien.

Des essais in vivo ont confirmé ces résultats prometteurs : des ciments de référence et p-composites, contenant de l'argent, ont été implantés et n'ont montré aucune réaction inflammatoire. Le ciment C-REF a d'autre part démontré une résorption, après 6 semaines, de l'ordre de 35 %, dont 20 % d'os néoformé. Les premiers résultats sur les ciments composites, contenant notamment 10 % de CMC semblent présenter une cinétique de résorption encore supérieure sans toutefois conduire à une accumulation d'argent dans les organes.

Conclusions générales et perspectives

► Résolution de la problématique de développement d'un substitut osseux : état d'avancement

L'objectif de cette étude était de développer un ciment composite de comblement osseux répondant aux critères du cahier des charges présentés dans le Tableau 1.2, dont l'attention se portait principalement sur une mise en forme injectable, des propriétés antibactériennes préventives et une bonne résorbabilité. Ce travail est parti d'une matrice $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$ mise au point au sein du CIRIMAT, conduisant à une apatite nanocristalline analogue au minéral osseux associée à de la vatérite introduite en excès en tant que réactif.

Nous synthétisons ci-après les principaux résultats et perspectives des différentes étapes qui nous ont permis d'avancer dans la mise au point du ciment composite aux propriétés recherchées.

Le ciment composite a révélé une *mise en forme de la pâte* plus facile que celle du ciment de référence grâce à un aspect plus cohésif et élastique. Des essais d'*injectabilité* ont d'autre part été réalisés sur des seringues de 2,5 mL, sans canule. Le ciment de référence $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$ n'est pas injectable au sens où il présente un phénomène de séparation de phases au cours de l'extrusion et où la force à appliquer dépasse rapidement 120 N, limite fixée pour une injection manuelle. L'introduction de CMC (2 à 10 % m/m) a permis de s'affranchir de la séparation de phases, et la force nécessaire à l'extrusion a été nettement diminuée (30-60 N). La problématique de l'injectabilité reste néanmoins complexe lorsque l'on ajoute une canule, nécessaire pour une implantation mini-invasive ; la notion d'injectabilité est en effet complètement dépendante de la géométrie du système d'injection et des contraintes associées (diamètre du corps de la seringue et de la canule, angle de rétrécissement entre le corps et l'embout, longueur de la canule). Des études complémentaires sont en cours pour déterminer le meilleur compromis entre les propriétés du ciment et la géométrie du dispositif la plus adaptée.

Une décorrélation a été mise en évidence entre la *prise physique* du ciment et la *réaction chimique de prise*, que ce soit pour les ciments chargés en argent ou les ciments composites. Les premiers ont ainsi montré des cinétiques de formation d'apatite plus rapides que le ciment de référence et pourtant peu d'influence sur le temps de prise. La CMC, d'un autre côté, retarde nettement la prise physique du ciment alors que son impact sur la réaction de dissolution-

reprécipitation semble dépendre de sa concentration. Un accélérateur de prise, sous forme d'une solution de Na_2HPO_4 , a donc été introduit dans le système et a permis d'atteindre un temps de prise de l'ordre de 15 minutes.

Une *résistance à la compression* autour de 10 MPa a été mesurée sur les ciments comportant 0 à 2 % m/m de CMC, ce qui répond au cahier des charges. L'introduction d'une plus grande quantité de polymère a même conduit à des valeurs de l'ordre de 85 MPa (pour 50 % m/m), et à une très nette amélioration de la ductilité et de la ténacité du matériau, résultats très prometteurs. Il serait intéressant de poursuivre l'étude, notamment en mettant en place des essais sur matériaux humides, plus proche de la réalité des conditions d'implantation et pouvant avoir des conséquences importantes sur le polysaccharide.

La *radio-opacité* des ciments CaCO_3 – CaP avait fait l'objet d'une étude préalable [Tadier 2009]. L'addition de carbonate de strontium SrCO_3 devra donc être prise en compte pour ajuster les paramètres du système.

Des études cellulaires ont été réalisées sur des ciments minéraux ou composites chargés ou non en argent. Leur *biocompatibilité* a ainsi été mise en évidence pour une concentration inférieure à 3,75 % m/m en argent dans la phase solide des ciments. Notons que la concentration la plus élevée, 7,5 % m/m, n'a pas montré de cytotoxicité à proprement parler, seulement une baisse de l'activité métabolique des cellules le premier jour de contact, dans un milieu statique. La biocompatibilité des matériaux a pu également être attestée par l'absence de formation de tissus fibreux autour des implants in vivo dans des condyles de lapins, sacrifiés après 6 semaines. Aucune trace d'argent n'a par ailleurs été détectée dans la rate, dans une limite de détection de 5 ppm.

L'*activité antibactérienne* des ciments minéraux ou composites a été démontrée sur des souches *S. aureus* et *S. epidermidis* à partir de $3,75 \cdot 10^{-2}$ % m/m en argent, sous forme Ag_3PO_4 , dans leur phase solide. L'idée d'associer cellules mésenchymateuses et quelques bactéries dans une même expérience a été évoquée afin de modéliser au mieux l'environnement du substitut osseux une fois implanté.

Les études in vivo ont mis en évidence une *résorbabilité* et une *ostéoconductivité* intéressantes de ces matériaux. En effet, après seulement 6 semaines d'implantation, le ciment de référence ne représentait plus que 35 % de la surface des coupes histologiques, et l'os néoformé était présent sur environ 20 % de la surface. Les analyses histomorphométriques des ciments composites (2 % et 10 % m/m de CMC) sont en cours, mais d'après les résultats préliminaires il semble que la CMC ait un effet positif sur la résorbabilité des ciments.

La question de la *stérilisation*, non présentée dans ce manuscrit, a été étudiée. Une stérilisation par rayons gamma (25 KGy) ne semble pas avoir d'effet significatif sur les poudres minérales. Par contre, il est vraisemblable que la poudre de CMC soit partiellement dégradée, ce qui atténue l'amélioration d'injectabilité associée à cet additif, mise en évidence dans le chapitre 4. En ce sens, il apparaît plus judicieux de choisir une teneur de 10 % plutôt que de 2 % de polysaccharide dans la formulation du composite. D'autre part, La stérilisation d'une solution de Na_2HPO_4 étant plus difficile à mettre en place que celle d'eau désionisée d'un point de vue industriel, une étude préliminaire a été engagée afin d'étudier la possibilité d'introduire l'accélérateur de prise dans la phase solide. Les résultats sont prometteurs, il est néanmoins important de maîtriser la granulométrie de cet additif et sa répartition homogène dans la phase solide.

D'un point de vue des *aspects réglementaires*, la plupart des essais qui ont été mis en place ont répondu à une norme (temps de prise, test de dissolution, études cellulaires et bactériologiques...). Les composés que nous avons utilisés ont en outre déjà été introduits dans des dispositifs médicaux et sont soit de grade pharmaceutique, soit facilement stérilisables.

Ainsi, à l'issue de cette étude, il apparaît que le système CaCO_3 – CaP – CMC – Ag est un matériau prometteur pour une application en comblement osseux. Des teneurs de 10 % de CMC sous forme de poudre et de $3,75 \cdot 10^{-2}$ % d'argent sous forme Ag_3PO_4 dans la phase solide du ciment semblent être le meilleur compromis en termes de propriétés physico-chimiques et biologiques. L'ajustement de la composition – notamment en introduisant un radio-opacifiant – est en cours. Notamment, de récents essais préliminaires d'injectabilité impliquant des contraintes géométriques plus drastiques pour l'extrusion de la pâte (seringue de 10 mL équipée d'une canule de 8,5 cm de long et 2,5 mm de diamètre) et l'utilisation de CMC stérilisée ainsi que l'addition du radio-opacifiant (SrCO_3) et de l'accélérateur de prise (Na_2HPO_4) ont conduit à un maximum de la force d'extrusion de la pâte égal à 90 N avec 2 % de CMC et supérieure à 350 N pour 10% de CMC. Notons, de plus, qu'un traitement préalable des poudres réactives minérales par co-broyage permet d'améliorer très significativement l'injectabilité avec une force d'extrusion maximale qui atteint 0,9 N avec 2% de CMC et qui est proche de 0 N avec 10% de CMC. ^[76]

Une étape de transfert de technologie est planifiée dans les mois à venir. La maîtrise des propriétés du matériau passe notamment par le contrôle de ses poudres réactives : une attention particulière devra être portée à la synthèse de la vaterite dont les paramètres peuvent influencer sur ses caractéristiques physico-chimiques et par conséquent se répercuter sur les propriétés de la pâte. Des

⁷⁶ La mesure n'a pas pu être réalisée en raison d'une pâte rendue bien trop liquide.

essais in vivo complémentaires et des essais cliniques seront enfin nécessaires avant tout développement et mise sur le marché.

► Bilan de la démarche scientifique

Cette étude associée à une problématique de développement d'un matériau a permis d'explorer finement les mécanismes impliqués dans la réaction de prise de différentes compositions de ciments.

Ainsi, un intérêt particulier a été porté, dans un premier temps, sur la vaterite, dont la structure fait encore l'objet de débats dans la communauté scientifique. Nous avons mis en évidence que l'eau associée à ce composé – de l'ordre de 2,7 % m/m, en accord avec les données déjà reportées dans la littérature – était de deux types, distinguables par analyse thermogravimétrique (ATG) et par RMN du solide par polarisation croisée $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$. Ils pourraient correspondre à une couche hydratée peu liée à la surface et à de l'eau interstitielle piégée au sein de la structure sphérolitique de la vaterite. Cette hydratation, rarement prise en compte dans la littérature, pourrait être d'importance quant à la réactivité de ce composé, notamment dans un processus de dissolution – reprécipitation tel que celui du ciment $\text{CaCO}_3 - \text{CaP}$. Des études complémentaires seraient intéressantes pour approfondir cette hypothèse. Une analyse cinétique par RMN du solide en polarisation croisée (variation des temps de contact $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) est en cours, grâce à la collaboration initiée avec le groupe du Pr. Kołodziejcki et renforcée lors d'un séjour d'un mois à Varsovie. Elle pourrait permettre de caractériser plus finement la nature de l'eau – labile ou fixe – et son interaction avec les groupements carbonates.

Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués lors de la réaction de prise de ce ciment, nous avons adapté une technique d'analyse semi-quantitative par décomposition de spectres FTIR, développée au sein du CIRIMAT, à notre système. Cette technique nous a permis d'évaluer l'évolution de la composition en brushite, en vaterite et en apatite des ciments de référence ou chargés en argent, au cours du temps. Les cinétiques de dissolution de la brushite et de formation de l'apatite obtenues par des données de RMN ^{31}P ont été en parfait accord avec les résultats issus des analyses par spectroscopie FTIR, appuyant leur pertinence en termes de quantification. Notons que les analyses par RMN du solide ont également permis de mettre en évidence une dissolution partielle du phosphate d'argent et un changement d'environnement des phosphates apatitiques laissant penser à l'introduction d'ions Ag^+ dans la structure. Cela expliquerait également une cinétique de prise légèrement plus rapide et une formation d'apatite plus importante dans les ciments C-Ag(S) et C-Ag(L). Il a d'autre part été envisagé que le nitrate de calcium formé lors de la précipitation de

Ag_3PO_4 a un rôle catalytique dans la réaction de prise du ciment C-Ag(L), présentant une cinétique encore plus rapide que celle du ciment C-Ag(S).

Si la faible rémanence de la forme microsphère de la CMC au sein de la pâte n'a pas permis de finaliser la stratégie d'encapsulation de l'argent dans ce projet de thèse, des essais préliminaires de renforcement de ces microsphères de CMC par un autre polymère ont donné des résultats très prometteurs et invitent à la poursuite de cette voie.

La richesse des collaborations interdisciplinaires a ainsi permis d'avancer dans l'élaboration d'un nouveau substitut osseux et dans la compréhension de certains mécanismes qui y sont associés.

Bibliographie

- AKASHI, A., MATSUYA, Y., UNEMORI, M., AND AKAMINE, A. 2001. Release profile of antimicrobial agents from α -tricalcium phosphate cement. *Biomaterials* 22, 2713–17.
- ALT, V., BECHERT, T., STEINRÜCKE, P., ET AL. 2004. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 25, 18, 4383–91.
- ALVES, H.L.R., DOS SANTOS, L. A, AND BERGMANN, C.P. 2008. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19, 5, 2241–6.
- ANDERSEN, F. A. AND BREČEVIĆ, L. 1991. Infrared spectra of amorphous and crystalline CaCO_3 . *Acta Chemica Scandinavia* 45, 1018–24.
- ANDERSON, A. 1996. Group Theoretical Analysis of the ν_1 (CO_3^{2-}) Vibration in Crystalline Calcium Carbonate. *Spectroscopy Letters* 29, 5, 819–25.
- ANDO, Y., MIYAMOTO, H., NODA, I., ET AL. 2010. Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion. *Materials Science and Engineering: C* 30, 1, 175–80.
- ANDRIANJATOVO, H., JOSE, F., AND LEMAITRE, J. 1996. Effect of β -TCP granularity on setting time and strength of calcium phosphate hydraulic cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 7, 34–9.
- ANTHONY, J.W., BIDEAUX, R.A., BLADH, K.W., AND NICHOLS, M.C. 2005. *Handbook of Mineralogy*. Mineralogical Society of America.
- ARSIC, J., KAMINSKI, D., POODT, P., AND Vlieg, E. 2004. Liquid ordering at the Brushite-{010}-water interface. *Physical Review B* 69, 24, 1–4.
- ASHLAND INC. 2010. Aqualon polymers for personal care - Rheology and conditioning solutions. *Document commercial*, 1–24.
- AUTEFAGE, H. 2009. Rôle ostéoinducteur d'un revêtement d'apatite carbonatée nanocristalline sur des céramiques de phosphate de calcium biphasique. *Thèse, Université de Toulouse*.
- LE BAIL, A., OUHENIA, S., AND CHATEIGNER, D. 2011. Microtwinning hypothesis for a more ordered vaterite model. *Powder Diffraction* 26, 01, 16–21.
- BALTRUSAITIS, J. AND GRASSIAN, V.H. 2009. Calcite (1014) surface in humid environments. *Surface Science* 603, 17, L99–L104.
- BARBOSA, M. A., GRANJA, P.L., BARRIAS, C.C., AND AMARAL, I.F. 2005. Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration. *ITBM-RBM* 26, 3, 212–7.
- BARINOV, S.M. 2010. Calcium phosphate-based ceramic and composite materials for medicine. *Russian Chemical Reviews* 79, 1, 13–29.

- BERBARI, E.F., HANSEN, A.D., DUFFY, M.C., ET AL. 1998. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clinical Infectious Diseases* 27, 5, 1247–54.
- BESHAH, K., REY, C., GLIMCHER, M., SCHIMIZU, M., AND GRIFFIN, R. 1990. Solid state carbon-13 and proton NMR studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel. *Journal of Solid State Chemistry* 84, 71–81.
- BEST, S.M., PORTER, A.E., THIAN, E.S., AND HUANG, J. 2008. Bioceramics: Past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* 28, 7, 1319–27.
- BI, Y., OUYANG, S., UMEZAWA, N., CAO, J., AND YE, J. 2011. Facet effect of single-crystalline Ag_3PO_4 sub-microcrystals on photocatalytic properties. *Journal of the American Chemical Society* 133, 17, 6490–2.
- BIGI, A., BRACCI, B., AND PANZAVOLTA, S. 2004. Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. *Biomaterials* 25, 14, 2893–9.
- BOARD, R.G. AND PERROTT, H.R. 1979. Vaterite, a constituent of the eggshells of the nonparasitic cuckoos, *Guira guira* and *Crotophaga ani*. *Calcified Tissue International* 29, 1, 63–9.
- BOHNER, M. 2010. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *European Cells & Materials* 20, 1–12.
- BOHNER, M. AND BAROUD, G. 2005a. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials* 26, 13, 1553–63.
- BOHNER, M., GBURECK, U., AND BARRALET, J.E. 2005b. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 26, 33, 6423–9.
- BONAR, L., ROUFOSSE, A., SABINE, W., GRYPAS, M., AND GLIMCHER, M. 1983. X-ray diffraction studies of the crystallinity of bone mineral in newly synthesized and density fractionated bone. *Calcified Tissue International* 35, 2, 202–9.
- BONEL, G. 1972. Contribution à l'étude de la carbonatation des apatites. *Thèse, Université de Toulouse*.
- BOWES, J.H. AND MURRAY, M.M. 1935. The chemical composition of teeth. The composition of human enamel and dentine. *Biochemical Journal* 2, 2721–7.
- BRENNTAG CANADA INC. 2010. Material safety data sheet : Carboxymethylcellulose gum, Aqualon. *Document commercial*, 1–6.
- BREČEVIĆ, L., NÖTHIG-LASLO, V., KRALJ, D., AND POPOVIĆ, S. 1996. Effect of divalent cations on the formation and structure of calcium carbonate polymorphs. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 92, 6, 1017–22.
- BROWN, W.E. AND CHOW, L.C. 1983. A new calcium phosphate setting cement. *Journal of Dental Research* 207, 672.

- BRYCE, D.L., BULTZ, E.B., AND AEBI, D. 2008. Calcium-43 chemical shift tensors as probes of calcium binding environments. Insight into the structure of the vaterite CaCO_3 polymorph by ^{43}Ca solid-state NMR spectroscopy. *Journal of American Chemical Society* 130, 9282–92.
- BURGUERA, E.F., XU, H.H.K., AND WEIR, M.D. 2005. Injectable and rapid-setting calcium phosphate bone cement with dicalcium phosphate dihydrate. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials* 77B, 1, 126–34.
- CAZALBOU, S. 2000. Echanges cationiques impliquant des apatites nanocristallines analogues au minéral osseux. *Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse*.
- CHEN, F., LIU, C., AND MAO, Y. 2010. Bismuth-doped injectable calcium phosphate cement with improved radiopacity and potent antimicrobial activity for root canal filling. *Acta Biomaterialia* 6, 8, 3199–207.
- CHEN, F., LIU, C., WEI, J., CHEN, X., ZHAO, Z., AND GAO, Y. 2011. Preparation and characterization of injectable calcium phosphate cement paste modified by polyethylene glycol-6000. *Materials Chemistry and Physics* 125, 3, 818–24.
- CHEN, W., LIU, Y., COURTNEY, H.S., ET AL. 2006. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 27, 32, 5512–7.
- CHERNG, A., TAKAGI, S., AND CHOW, L.C. 1995. Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research* 35, 3, 273–77.
- CHEW, K.-K., LOW, K.-L., SHARIF ZEIN, S.H., ET AL. 2011. Reinforcement of calcium phosphate cement with multi-walled carbon nanotubes and bovine serum albumin for injectable bone substitute applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, 3, 331–9.
- CHIRON, P. AND BROUCHET, A. 2013. Consolidation osseuse adaptation de l'os aux contraintes aspects fondamentaux. *Cours, Université de Toulouse*, 1–22.
- CHOW, L.C. 2009. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dental Materials Journal* 28, 1, 1–10.
- CLARKSON, J.R., PRICE, T.J., AND ADAMS, C.J. 1992. Role of metastable phases in the spontaneous precipitation of calcium carbonate. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 88, 2, 243–9.
- COMBES, C., BAREILLE, R., AND REY, C. 2006a. Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement compositions for bone reconstruction. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 79, 2, 318–28.
- COMBES, C., MIAO, B., BAREILLE, R., AND REY, C. 2006b. Preparation, physical-chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements. *Biomaterials* 27, 9, 1945–54.
- COMBES, C. AND REY, C. 2002. Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. *Biomaterials* 23, 13, 2817–23.

- COMBES, C. AND REY, C. 2013. Biomatériaux à base de phosphates de calcium. *Techniques de l'Ingénieur* 33, N 4 950, 1–19.
- CONSTANTIN, A. 2013. Appareil locomoteur - Physiologie du tissu osseux. *Cours, Université de Toulouse*, 1–20.
- CURRY, N. AND JONES, D. 1971. Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate: a neutron-diffraction investigation. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, 3725–29.
- DAY, S.J., THOMPSON, S.P., PARKER, J.E., AND EVANS, A. 2013. Non-aqueous formation of the calcium carbonate polymorph vaterite: astrophysical implications. *Astrophysics: Solar and Stellar Astrophysics*, 1–11.
- DEMICHELI, R., RAITERI, P., GALE, J.D., AND DOVESI, R. 2012. A new structural model for disorder in vaterite from first-principles calculations. *CrystEngComm* 14, 1, 44.
- DEMICHELI, R., RAITERI, P., GALE, J.D., AND DOVESI, R. 2013. The Multiple Structures of Vaterite. *Crystal Growth & Design* 13, 6, 2247–51.
- DHEILLY, R. AND TUDO, J. 1997. Contribution à l'étude de la gaylussite: $\text{Na}_2\text{Ca}(\text{CO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences II b*, 407–414.
- DICKENS, B. AND BROWN, W.E. 1969. The crystal structures of $\text{CaNa}_2(\text{CO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, synthetic gaylussite, and $\text{CaNa}_2(\text{CO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, synthetic pirssonite. *Inorganic Chemistry* 8, 2093–103.
- DONNAY, J.D.H. AND DONNAY, G. 1967. Optical determination of water content in spherulitic vaterite. *Acta Crystallographica* 22, 2, 312–314.
- DOROZHKIN, S.V. 2012. Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties. *International Journal of Materials and Chemistry* 1, 1, 1–48.
- DUFRESNE, E. AND EDWARD, A. 1962. On the retention of primordial noble gases in the Pesyanoe meteorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 26, 2, 251–254.
- EICHERT, D. 2001. Etude de la réactivité de surface d'apatites de synthèse nanocristallines. *Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse*.
- EICHERT, D., DROUET, C., SFIHI, H., REY, C., AND COMBES, C. 2007. Nanocrystalline apatite-based biomaterials: synthesis, processing and characterization (Biomaterials Research Advances). *JB Kendall*, 93–143.
- EICHERT, D., SFIHI, H., COMBES, C., AND REY, C. 2004. Specific Characteristics of Wet Nanocrystalline Apatites. Consequences on Biomaterials and Bone Tissue. *Key Engineering Materials* 254-256, 927–930.
- ELLIOTT, J. 1994. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. *Elsevier*.
- EWALD, A., HÖSEL, D., PATEL, S., GROVER, L.M., BARRALET, J.E., AND GBURECK, U. 2011. Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity. *Acta Biomaterialia* 7, 11, 4064–70.

- FALINI, G., FERMANI, S., GAZZANO, M., AND RIPAMONTI, A. 1998. Oriented crystallization of vaterite in collagenous matrices. *Chemistry: A European Journal* 4, 6, 1048–1052.
- FAROOQUE, K., YEASMIN, Z., HALIM, M., MAHMOOD, A., AND MOLLAH, M. 2010. Effect of Carboxymethyl Cellulose on the Properties of Ordinary Portland Cement. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 45, 1, 1–8.
- FENG, Q.L., WU, J., CHEN, G.Q., CUI, F.Z., KIM, T.N., AND KIM, J.O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52, 4, 662–8.
- FERNÁNDEZ, E., SARDA, S., HAMCERENCU, M., ET AL. 2005. High-strength apatitic cement by modification with superplasticizers. *Biomaterials* 26, 15, 2289–96.
- FIGURE, S. AND LAVIANO, R. 1991. Brushite, hydroxylapatite, and taranakite from Apulian caves (southern Italy): New mineralogical data. *American Mineralogist* 76, 1722–1727.
- FONTAINE, M., COMBES, C., MOUNIC, S., AND REY, C. 2001. Composition de ciment hydraulique à base de carbonates de calcium. *Brevet FR2830249*.
- FRANCIS, M.D. AND WEBB, N.C. 1971. Hydroxyapatite formation from a hydrated calcium monohydrogen phosphate precursor. *Calcified Tissue Research* 6, 335–42.
- FRANCIS SUH, J.K. AND MATTHEW, H.W.T. 2000. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21, 24, 2589–98.
- FRANÇOIS, D., PINEAU, A., AND ZAOUÏ, A. 1992. Comportement mécanique des matériaux : élasticité et plasticité. *TEC ET DOC/LAVOISIER*.
- FRENZEL, M., HARRISON, R.J., AND HARPER, E.M. 2012. Nanostructure and crystallography of aberrant columnar vaterite in *Corbicula fluminea* (Mollusca). *Journal of Structural Biology* 178, 1, 8–18.
- FRIEDMAN, G. AND SCHULTZ, D. 1994. Precipitation of vaterite (CaCO_3) during oil field drilling. *Mineralogical Magazine* 58, 401–408.
- FÉLIX LANA O, R.P., LEEUWENBURGH, S.C.G., WOLKE, J.G.C., AND JANSEN, J. A. 2011. Bone response to fast-degrading, injectable calcium phosphate cements containing PLGA microparticles. *Biomaterials* 32, 34, 8839–47.
- GABRIELLI, C., JAOUHARI, R., JOIRET, S., AND MAURIN, G. 2000. In situ Raman spectroscopy applied to electrochemical scaling. Determination of the structure of vaterite. *Journal of Raman Spectroscopy* 31, 497–501.
- GAUTHIER, O., KHAÏROUN, I., BOSCO, J., ET AL. 2003. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 66, 1, 47–54.
- GBURECK, U., BARRALET, J.E., SPATZ, K., GROVER, L.M., AND THULL, R. 2004. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials* 25, 11, 2187–2195.

- GBURECK, U., KNAPPE, O., GROVER, L.M., AND BARRALET, J.E. 2005. Antimicrobial potency of alkali ion substituted calcium phosphate cements. *Biomaterials* 26, 34, 6880–6.
- GEBAUER, D., GUNAWIDJAJA, P.N., KO, J.Y.P., ET AL. 2010. Proto-calcite and proto-vaterite in amorphous calcium carbonates. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49, 47, 8889–91.
- GHAFARI NAZARI, A., TAHARI, A., MOZTARZADEH, F., MOZAFARI, M., AND BAHROLOLOOM, M.E. 2011. Ion exchange behaviour of silver-doped apatite micro- and nanoparticles as antibacterial biomaterial. *Micro & Nano Letters* 6, 8, 713.
- GIBSON, R., WYCKOFF, R., AND MERWIN, H. 1925. Vaterite and μ -calcium carbonate. *American Journal of Science and Arts* 10, 5, 325–333.
- GINEBRA, M.-P., CANAL, C., ESPANOL, M., PASTORINO, D., AND MONTUFAR, E.B. 2012. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 12, 1090–110.
- GINEBRA, M.P., ESPANOL, M., MONTUFAR, E.B., PEREZ, R. A, AND MESTRES, G. 2010. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia* 6, 8, 2863–73.
- GINEBRA, M.P., RILLIARD, A., FERNÁNDEZ, E., ELVIRA, C., SAN ROMÁN, J., AND PLANELL, J. A. 2001. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. *Journal of Biomedical Materials Research* 57, 1, 113–8.
- GIRALT, S., JULIA, R., AND KLERKX, J. 2001. Microbial biscuits of vaterite in lake Issyk-kul (Republic of Kyrgystan). *Journal of Sedimentary Research* 71, 3, 430–435.
- GIROD FULLANA, S., TERNET, H., FRECHE, M., LACOUT, J.L., AND RODRIGUEZ, F. 2010. Controlled release properties and final macroporosity of a pectin microspheres-calcium phosphate composite bone cement. *Acta Biomaterialia* 6, 6, 2294–300.
- GRASBY, S.E. 2003. Naturally precipitating vaterite (μ -CaCO₃) spheres: unusual carbonates formed in an extreme environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 9, 1659–1666.
- GRISTINA, A. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237, 4822, 1588–1595.
- HABIB, M., BAROUD, G., GITZHOFER, F., AND BOHNER, M. 2010. Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste. Part II: particle separation study. *Acta Biomaterialia* 6, 1, 250–6.
- HABRAKEN, W.J.E.M., LIAO, H.B., ZHANG, Z., ET AL. 2010. In vivo degradation of calcium phosphate cement incorporated into biodegradable microspheres. *Acta Biomaterialia* 6, 6, 2200–11.
- HASSE, B., EHRENBERG, H., MARXEN, J.C., BECKER, W., AND EPPLE, M. 2000. Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Chemistry: A European Journal* 6, 20, 3679–3685.
- HAYASHI, S. AND HAYAMIZU, K. 1989. High-resolution solid-state ³¹P NMR of alkali phosphates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 62, 3061–68.

- HEBEISH, A., HASHEM, M., EL-HADY, M.M.A., AND SHARAF, S. 2013. Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications. *Carbohydrate Polymers* 92, 1, 407–13.
- HEIDE, F. 1924. Über den Vaterit. *Centralblatt für Mineralogie*, 641–651.
- HENCH, L.L. AND POLAK, J.M. 2002. Third-generation biomedical materials. *Science* 295, 5557, 1014–7.
- HERCULES INC. 1999. Aqualon sodium carboxymethylcellulose - Physical and chemical properties. *Document commercial*, 1–29.
- HESARAKI, S. AND NEMATI, R. 2009. Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied biomaterials* 89, 2, 342–52.
- HIGUCHI, T. 1963. Mechanism of sustained- action medication - Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52, 12, 1145–49.
- HOLLETT, M.J. 2000. The spectroscopic analysis of vaterite and other forms of calcium carbonate. *Thèse de maîtrise ès sciences, Memorial University of Newfoundland*.
- HORSTMANN, W.G., VERHEYEN, C.C.P.M., AND LEEMANS, R. 2003. An injectable calcium phosphate cement as a bone-graft substitute in the treatment of displaced lateral tibial plateau fractures. *Injury* 34, 2, 141–4.
- HUNT, T.S. 1866. Further contributions to the history of lime and magnesia salts. *American Journal of Science and Arts* 42, 49.
- HWANG, K.-S., HWANGBO, S., AND KIM, J.-T. 2008. Silver-doped calcium phosphate nanopowders prepared by electrostatic spraying. *Journal of Nanoparticle Research* 10, 8, 1337–1341.
- INVS. 2007. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales. *Institut de Veille Sanitaire*.
- IOOSS, P., RAY, A.L., GRIMANDI, G., DACULSI, G., AND MERLE, C. 2001. A new injectable bone substitute combining poly (ε-caprolactone) microparticles with biphasic calcium phosphate granules. *Journal of Materials Science* 22, 2785–2794.
- JACOB, D.E., WEHRMEISTER, U., SOLDATI, A.L., AND HOFMEISTER, W. 2009. Spectroscopic characterisation of biological vaterite: relations to synthetic and geological vaterites. *Geophysical Research Abstracts* 11, 2006–2007.
- JEANNIN, Y. 1998. Résolution d'une structure cristalline par rayons X. *Techniques de l'Ingénieur P 1 075*, 1–18.
- JIANG, P.-J., PATEL, S., GBURECK, U., CALEY, R., AND GROVER, L.M. 2010. Comparing the efficacy of three bioceramic matrices for the release of vancomycin hydrochloride. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied biomaterials* 93, 1, 51–8.
- JOHANSSON, M.S. AND NANCOLLAS, G.H. 1992. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 3, 1/2, 61–82.
- JONES, D. AND SMITH, J. 1962. The Structure of Brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Journal of the Chemical Society*, 1414–1420.

- DE JONG, W. 1926. La substance minérale dans les os. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 45, 6, 445–448.
- JOOSTEN, U., JOIST, A., FREBEL, T., BRANDT, B., DIEDERICH, S., AND VON EIFF, C. 2004. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 25, 18, 4287–95.
- KABALAH-AMITAI, L., MAYZEL, B., KAUFFMANN, Y., ET AL. 2013. Vaterite crystals contain two interspersed crystal structures. *Science* 340, 6131, 454–7.
- KAFLAK, A. AND KOLODZIEJSKI, W. 2011. Complementary information on water and hydroxyl groups in nanocrystalline carbonated hydroxyapatites from TGA, NMR and IR measurements. *Journal of Molecular Structure* 990, 1-3, 263–270.
- KAMHI, S.R. 1963. On the Structure of Vaterite, CaCO_3 . *Acta Crystallographica* 16, 770–772.
- KARLOV, A V., KHLUSOV, I. A, PONTAK, V. A, IGNATOV, V.P., IVIN, M. A, AND ZINATULINA, S.Y. 2002. Adhesion of staphylococcus aureus to implants with different physicochemical characteristics. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 134, 3, 277–80.
- KAWASHITA, M., NAKAO, M., MINODA, M., KIM, H., BEPPU, T., AND MIYAMOTO, T. 2003. Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. *Biomaterials* 24, 2477–2484.
- KAY, M., YOUNG, R., AND POSNER, A. 1964. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* 204, 1050–1052.
- KHAIROUN, I., BILLON, A., DACULSI, G., MERLE, C., AND BOULER, J.-M. 2005. Improvement of porosity of a CaP cement by incorporation of biodegradable polymer microspheres. *Key Engineering Materials* 284-286, 192–132.
- KHAIROUN, I., BOLTONG, M.G., DRIESSENS, F.C.M., AND PLANELL, J.A. 1998. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 9, 425–428.
- KHAIROUN, I., DRIESSENS, F.C., BOLTONG, M.G., PLANELL, J. A, AND WENZ, R. 1999. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 20, 4, 393–8.
- KHALILZADEH, P., LAJOIE, B., EL HAGE, S., ET AL. 2010. Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by an N-butanoyl-L-homoserine lactone analog. *Canadian journal of microbiology* 56, 4, 317–25.
- KIM, T.N., FENG, Q.L., KIM, J.O., ET AL. 1998. Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite. *Journal of materials science: Materials in medicine* 9, 3, 129–34.
- KOBAYASHI, H., FUJISHIRO, T., BELKOFF, S.M., ET AL. 2009. Long-term evaluation of a calcium phosphate bone cement with carboxymethyl cellulose in a vertebral defect model. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 88, 4, 880–8.
- KOLK, A., HANDSCHEL, J., DRESCHER, W., ET AL. 2012. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 40, 8, 706–18.

- KOLODNY, Y. AND GROSS, S. 1974. Thermal metamorphism by combustion of organic matter: isotopic and petrological evidence. *Journal of Geology* 82, 489–506.
- KOŁODZIEJSKI, W. 2005. Solid-state NMR studies of bone. *Topics in Current Chemistry* 246, 235–270.
- KOUTSOUKOS, P.G. AND NANCOLLAS, G.H. 1981. Crystal growth of calcium phosphates - epitaxial considerations. *Journal of Crystal Growth* 53, 10–19.
- LABARTHE, J.-C. 1972. Contribution à l'étude de la structure et des propriétés des apatites carbonatées de type B phospho-calciques. *Thèse, Université de Toulouse*.
- LAKES, R. 2000. Composite Biomaterials - The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition. Ed. Joseph D. Bronzino.
- LANSDOWN, A.B.G. 2010a. Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use. Cambridge : Royal Society of Chemistry.
- LANSDOWN, A.B.G. 2010b. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1–16.
- LAYEK, R.K., KUNDU, A., AND NANDI, A.K. 2012. High-Performance Nanocomposites of Sodium Carboxymethylcellulose and Graphene Oxide. *Macromolecular Materials and Engineering*, early view.
- LEE, J.S. AND MURPHY, W.L. 2013. Functionalizing calcium phosphate biomaterials with antibacterial silver particles. *Advanced Materials* 25, 8, 1173–9.
- DE LEEUW, N.H. AND PARKER, S.C. 1998. Surface Structure and Morphology of Calcium Carbonate Polymorphs Calcite, Aragonite, and Vaterite: An Atomistic Approach. *The Journal of Physical Chemistry B* 102, 16, 2914–2922.
- LEGRAND, A P., SFIHI, H., LEQUEUX, N., AND LEMAÎTRE, J. 2009. (31)P Solid-State NMR study of the chemical setting process of a dual-paste injectable brushite cements. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied biomaterials* 91, 1, 46–54.
- LEGROS, R. 1984. Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés. *Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse*.
- LEGROS, R., BALMAIN, N., AND BONEP, G. 1987. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcified Tissue International* 41, 137–144.
- LERAT, J. 2005. Orthopédie - Fractures - Généralités. *Cours, Faculté de Médecine Lyon-Sud*.
- LEROUX, L., HATIM, Z., FRÈCHE, M., AND LACOUT, J.L. 1999. Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 25, 2 Suppl, 31S–34S.
- LEWIS, G. 2006. Injectable bone cements for use in vertebroplasty and kyphoplasty: state-of-the-art review. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied biomaterials* 76, 2, 456–68.

- LIANG, Q., SHI, Y., MA, W., LI, Z., AND YANG, X. 2012. Enhanced photocatalytic activity and structural stability by hybridizing Ag_3PO_4 nanospheres with graphene oxide sheets. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP* 14, 45, 15657–65.
- LOMBOIS-BURGER, H., COLOMBET, P., HALARY, J.L., AND VAN DAMME, H. 2006. Kneading and extrusion of dense polymer–cement pastes. *Cement and Concrete Research* 36, 11, 2086–2097.
- MA, X., LU, B., LI, D., SHI, R., PAN, C., AND ZHU, Y. 2011. Origin of photocatalytic activation of silver orthophosphate from first-principles. *The Journal of Physical Chemistry C* 115, 4680–4687.
- MACHIDA, N., KAWACHI, M., UEDA, A., AND SHIGEMATSU, T. 1995. Mixed anion effect of silver ion conducting glasses in the systems $\text{AgI-Ag}_2\text{MoO}_4\text{-Ag}_3\text{PO}_4$ and $\text{AgI-Ag}_2\text{MoO}_4\text{-Ag}_2\text{PO}_{3.5}$ and structural study by ^{31}P MAS-NMR. *Solid State Ionics* 79, 273–278.
- MAINARD, D. 2010. Les nouveaux substituts osseux phosphocalciques injectables : principes généraux. *Intervention dans le Groupe d'Etude pour la Chirurgie osseuse (GECO)*.
- MANN, S. 2001. Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. *Oxford University Press*.
- MARIEB, E.N. AND HOEHN, K. 2006. Human Anatomy & Physiology. *Pearson*.
- MCDOWELL, H., GREGORY, T., AND BROWN, W. 1977. Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25 and 37°C^* . *Journal of Research of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry* 81, 2 & 3, 273–281.
- MCCONNELL, B.J.D.C. AND PLACE, D. 1959. Vaterite from Ballycraigy, Lame, Northern Ireland. *Mineralogical Magazine* 1911, 535–545.
- MEDIROS, S.K., ALBUQUERQUE, E.L., MAIA, F.F., CAETANO, E.W.S., AND FREIRE, V.N. 2007. First-principles calculations of structural, electronic, and optical absorption properties of CaCO_3 Vaterite. *Chemical Physics Letters* 435, 1-3, 59–64.
- MESTRES, G. AND GINEBRA, M.-P. 2011. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta Biomaterialia* 7, 4, 1853–61.
- MEYER, H.J. 1959. über Vaterit und seine Struktur. *Angewandte Chemie* 21, 678–9.
- MEYER, H.J. 1969. Struktur und Fehlordnung des Vaterits*. *Zeitschrift für Kristallographie* 128, 3-6, 183–212.
- MICHĂILESCO, P., KOUASSI, M., EL BRIAK, H., ARMYNOT, A., AND BOUDEVILLE, P. 2005. Antimicrobial activity and tightness of a DCPD-CaO-based hydraulic calcium phosphate cement for root canal filling. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied biomaterials* 74, 2, 760–7.
- MIGAUD, H., SENNEVILLE, E., GOUGEON, F., MARCHETTI, E., AMZALLAG, M., AND LAFFARGUE, P. 2005. Risque infectieux en chirurgie orthopédique. *EMC - Rhumatologie Orthopédie* 2, 2, 151–172.
- MISHRA, P.C., SINGH, V.K., NARANG, K.K., AND SINGH, N.K. 2003. Effect of carboxymethyl-cellulose on the properties of cement. *Materials Science and Engineering: A* 357, 1-2, 13–19.

- MIURA, N. AND SHINOHARA, Y. 2009. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390, 3, 733–7.
- MONMA, H. AND KAMIYA, T. 1987. Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite. *Journal of Materials Science* 22, 4247–4250.
- MOORE, G.E. 1865. On brushite, a new mineral in phosphatic guano. *American Journal of Science and Arts* 39, 43–44.
- MUGNAIOLI, E., ANDRUSENKO, I., SCHÜLER, T., ET AL. 2012. Ab Initio structure determination of vaterite by automated electron diffraction. *Angewandte Chemie* 51, 28, 7041–5.
- MÜLLER, F. A, MÜLLER, L., HOFMANN, I., GREIL, P., WENZEL, M.M., AND STAUDENMAIER, R. 2006. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 27, 21, 3955–63.
- NEBEL, H., NEUMANN, M., MAYER, C., AND EPPLE, M. 2008. On the structure of amorphous calcium carbonate—a detailed study by solid-state NMR spectroscopy. *Inorganic chemistry* 47, 17, 7874–9.
- NEIRA, I.S., KOLEN'KO, Y.V., KOMMAREDDY, K.P., MANJUBALA, I., YOSHIMURA, M., AND GUITIÁN, F. 2010. Reinforcing of a calcium phosphate cement with hydroxyapatite crystals of various morphologies. *ACS applied materials & interfaces* 2, 11, 3276–84.
- NG, H.N., CALVO, C., AND FAGGIANI, R. 1978. A new investigation of the structure of silver orthophosphate. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 34, 3, 898–899.
- NGE, T.T. AND SUGIYAMA, J. 2006. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 9–11.
- NILSSON, M., LIDÉN, E., EHRENBORG, C., FORSGREN, J., AND JÖNSSON, S.A. 2008. What is injectability? A new injectability method for hydraulic cements developed for minimally invasive surgery. *Proceedings of the 18th GRIBOI Meeting, Montreal*, 51.
- OOMS, E.M., VERDONSCHOT, N., WOLKE, J.G.C., ET AL. 2004. Enhancement of initial stability of press-fit femoral stems using injectable calcium phosphate cement: an in vitro study in dog bones. *Biomaterials* 25, 17, 3887–94.
- OOMS, E.M., WOLKE, J.G.C., VAN DE HEUVEL, M.T., JESCHKE, B., AND JANSEN, J. A. 2003. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials* 24, 6, 989–1000.
- PANDA, R.N., HSIEH, M.F., CHUNG, R.J., AND CHIN, T.S. 2003. FTIR , XRD , SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 64, 193–199.
- PANZAVOLTA, S., TORRICELLI, P., BRACCI, B., FINI, M., AND BIGI, A. 2010. Functionalization of biomimetic calcium phosphate bone cements with alendronate. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104, 10, 1099–106.

- PARISH, C.R. AND MÜLLBACHER, A. 1983. Automated colorimetric assay for T cell cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 58, 1-2, 225–237.
- PARK, J. AND LAKES, R. 2007. Biomaterials - An introduction. *Springer*, 2.
- PARK, S.-H., TOFIGHI, A., WANG, X., ET AL. 2011. Calcium phosphate combination biomaterials as human mesenchymal stem cell delivery vehicles for bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials* 97, 2, 235–44.
- PASCAUD, P. 2012. Apatites nanocristallines biomimétiques comme modèles de la réactivité osseuse : Etude des propriétés d'adsorption et de l'activité cellulaire d'un bisphosphonate, le tiludronate. *Thèse, Université de Toulouse*.
- PATEL, J.D., EBERT, M., WARD, R., AND ANDERSON, J.M. 2006. S. epidermidis biofilm formation : Effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80A, 3, 14–20.
- PELTIER, L., BICKEL, E., LILLO, R., AND THEIN, M. 1957. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Annals of Surgery* 146, 1, 61–69.
- PETROV, I., ŠOPTRAJANOV, B., FUSON, N., AND LAWSON, J.R. 1967. Infra-red investigation of dicalcium phosphates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 23, 10, 2637–2646.
- PINA, S., VIEIRA, S., TORRES, P., ET AL. 2010. In vitro performance assessment of new brushite-forming Zn- and ZnSr-substituted β -TCP bone cements. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 94B, 2, 2010.
- PLUMMER, N.L. AND BUSENBERG, E. 1982. The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO_2 - H_2O solutions between 0 and 90°C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO_3 - CO_2 - H_2O . *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46, 1011–1040.
- POURPOINT, F., GERVAIS, C., BONHOMME-COURY, L., MAURI, F., ALONSO, B., AND BONHOMME, C. 2008. Calcium phosphates: First-principles calculations vs. solid-state NMR experiments. *Comptes Rendus Chimie* 11, 4-5, 398–406.
- QIAO, L., FENG, Q., AND LI, Z. 2006. Special vaterite found in freshwater lackluster pearls. *Crystal Growth & Design* 7, 2, 275–279.
- RAJENDRAN, K. AND DALE KEEFE, C. 2010. Growth and characterization of calcium hydrogen phosphate dihydrate crystals from single diffusion gel technique. *Crystal Research and Technology* 45, 9, 939–945.
- RAMESHBABU, N., KUMAR, T.S.S., PRABHAKAR, T.G., SASTRY, V.S., MURTY, K.V.G.K., AND RAO, K.P. 2007. Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite : Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80, 3, 581–91.
- REY, C. 1984. Etude des relations entre apatites et composés moléculaires. *Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse*.

- REY, C., COLLINS, B., GOEHL, T., DICKINSON, I., AND GLIMCHER, M.J. 1989. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier transform infrared study. *Calcified Tissue International* 45, 157–64.
- REY, C., COMBES, C., DROUET, C., SFIHI, H., AND BARROUG, A. 2007. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* 27, 2, 198–205.
- REY, C., MIQUEL, J.L., FACCHINI, L., LEGRAND, A P., AND GLIMCHER, M.J. 1995. Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone* 16, 5, 583–6.
- REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER, J.J., AND BOCCACCINI, A.R. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 18, 3413–31.
- ROTHWELL, W.P. AND YESINOWSKIT, J.P. 1980. High-resolution variable-temperature ^{31}P NMR of solid calcium phosphates. .
- ROWLEY, J. A, MADLAMBAYAN, G., AND MOONEY, D.J. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20, 1, 45–53.
- RUHÉ, P., KROESE-DEUTMAN, H., WOLKE, J., SPAUWEN, P., AND JANSEN, J. 2004. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in carnial defects in rabbits. *Biomaterials* 25, 2123–2132.
- SARDA, S., FERNÁNDEZ, E., NILSSON, M., BALCELLS, M., AND PLANELL, J. A. 2002. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent. *Journal of Bomedical Materials Research* 61, 4, 653–9.
- SASAKI, T., ISHIBASHI, Y., KATANO, H., NAGUMO, A., AND TOH, S. 2005. In vitro elution of vancomycin from calcium phosphate cement. *The Journal of arthroplasty* 20, 8, 1055–9.
- SATO, M. AND MATSUDA, S. 1969. Structure of vaterite and infrared spectra. *Zeitschrift für Kristallographie* 129, 405–410.
- SAWADA, K. 1997. The mechanisms of crystallization and transformation of calcium carbonates. *Pure and Applied Chemistry* 69, 5, 921–928.
- SCHINDLER, A.K. 2004. Prediction of concrete setting. *Proceedings of the RILEM International Symposium on Advances in Concrete through Science and Engineering*, 1–14.
- SCHOFIELD, P.F., KNIGHT, K.S., VAN DER HOUWEN, J.A.M., AND VALSAMI-JONES, E. 2004. The role of hydrogen bonding in the thermal expansion and dehydration of brushite, di-calcium phosphate dihydrate. *Physics and Chemistry of Minerals* 31, 9, 606–624.
- SERRAJ, S., MICHAÏLESCO, P., MARGERIT, J., BERNARD, B., AND BOUDEVILLE, P. 2002. Study of a hydraulic calcium phosphate cement for dental applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13, 1, 125–31.
- SHANNON, R. 1976. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A* 32, 5, 751–67.

- SHIRKHAZADEH, M., AZADEGAN, M., AND LIU, G.Q. 1995. Bioactive delivery systems for the slow release of antibiotics: incorporation of Ag⁺ ions into micro-porous hydroxyapatite coatings. *Materials Letters* 24, 1-3, 7–12.
- SINGH, B., DUBEY, A.K., KUMAR, S., SAHA, N., BASU, B., AND GUPTA, R. 2011. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of wet chemically prepared Ca_{10-x}Ag_x(PO₄)₆(OH)₂ (0.0≤x≤0.5) hydroxyapatites. *Materials Science and Engineering: C* 31, 7, 1320–1329.
- SOLCHAGA, L.A., DENNIS, J.E., GOLDBERG, V.M., AND CAPLAN, A.I. 1999. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *Journal of Orthopaedic Research* 17, 205–213.
- SPADARO, J., WEBSTER, D., AND BECKER, R. 1979. Silver Polymethyl Methacrylate Antibacterial Bone Cement. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 143, 266–70.
- SPANN, N., HARPER, E.M., AND ALDRIDGE, D.C. 2010. The unusual mineral vaterite in shells of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* from the UK. *Die Naturwissenschaften* 97, 8, 743–51.
- STEPKOWSKA, E.T. 2005. Hypothetical transformation of Ca(OH)₂ into CaCO₃ in solid-state reactions of Portland cement. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 80, 727–733.
- SUGAWARA, A., ASAOKA, K., AND DING, S.-J. 2013. Calcium phosphate-based cements: clinical needs and recent progress. *Journal of Materials Chemistry B* 1, 8, 1081.
- TADIER, S. 2009. Etude des propriétés physico-chimiques et biologiques de ciments biomédicaux à base de carbonate de calcium : apport du procédé de co-broyage. *Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse*.
- TADIER, S., BAREILLE, R., SIADOUS, R., ET AL. 2012. Strontium-loaded mineral bone cements as sustained release systems: Compositions, release properties, and effects on human osteoprogenitor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100B, 2, 378–390.
- TADIER, S., LE BOLAY, N., GIROD FULLANA, S., REY, C., AND COMBES, C. 2009. Control of the injectability of calcium carbonate-calcium phosphate mixed cements for bone reconstruction. *Key Engineering Materials* 396-398, 225–8.
- TAHARA, Y. AND ISHII, Y. 2001. Apatite cement containing cis-diamminedichloroplatinum implanted in rabbit femur for sustained release of the anticancer drug and bone formation. *Journal of Orthopaedic Science* 6, 6, 556–565.
- THAI, V.V. AND LEE, B.-T. 2010. Fabrication of calcium phosphate-calcium sulfate injectable bone substitute using hydroxy-propyl-methyl-cellulose and citric acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21, 6, 1867–74.
- TORTET, L. 1997. Study of protonic mobility in CaHPO₄·2H₂O (Brushite) and CaHPO₄ (Monetite) by infrared spectroscopy and neutron scattering. *Journal of Solid State Chemistry* 132, 1, 6–16.
- TRPKOVSKA, M., ŠOPTRAJANOV, B., AND MALKOV, P. 1999. FTIR reinvestigation of the spectra of synthetic brushite and its partially deuterated analogues. *Journal of Molecular Structure* 480-481, 661–666.

- TURNER, G.L., SMITH, K.A., KIRKPATRICK, R.J., AND OLDFIELD, E. 1986. Structure and Cation Effects on Phosphorus-31 NMR Chemical Shifts and Chemical-Shift Anisotropies of Orthophosphates. *Journal of Magnetic Resonance* 70, 408–415.
- VANDECANDELAERE, N. 2012. Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées. *Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse*.
- VECHT, A AND IRELAND, T.G. 2000. The role of vaterite and aragonite in the formation of pseudo-biogenic carbonate structures: implications for Martian exobiology. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 15, 2719–25.
- VILAMITJANA-AMEDEE, J., BAREILLE, R., ROUAIS, F., CAPLAN, A.I., AND HARMAND, M.F. 1993. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 29, 9, 699–707.
- WAGONER JOHNSON, A.J. AND HERSCHLER, B. A. 2011. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomaterialia* 7, 1, 16–30.
- WALKER, M., HOBOT, J. A, NEWMAN, G.R., AND BOWLER, P.G. 2003. Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethyl cellulose (AQUACEL) and alginate dressings. *Biomaterials* 24, 5, 883–90.
- WANG, J. AND BECKER, U. 2009. Structure and carbonate orientation of vaterite. *American Mineralogist* 94, 380–386.
- WANG, J. AND BECKER, U. 2012. Energetics and kinetics of carbonate orientational ordering in vaterite calcium carbonate. *American Mineralogist* 97, 1427–1436.
- WANG, L. AND NANCOLLAS, G.H. 2008. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical Reviews* 108, 11, 4628–69.
- WANG, M. 2003. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 24, 13, 2133–2151.
- WANG, X., YE, J., AND WANG, H. 2006. Effects of additives on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate bone substitute material. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 78, 2, 259–264.
- WEHRMEISTER, U., JACOB, D.E., SOLDATI, A. L., LOGES, N., HÄGER, T., AND HOFMEISTER, W. 2011. Amorphous, nanocrystalline and crystalline calcium carbonates in biological materials. *Journal of Raman Spectroscopy* 42, 5, 926–935.
- WININGER, D.A. AND FASS, R.J. 1996. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 12, 2675–2679.
- WOLFF, K., SWAID, S., NOLTE, D., BÖCKMANN, R.A., HÖLZLE, F., AND MÜLLER-MAI, C. 2004. Degradable injectable bone cement in maxillofacial surgery : indications and clinical experience in 27 patients. *Otolaryngology Head And Neck Surgery* 5182, 71–79.

- WU, F., WEI, J., GUO, H., CHEN, F., HONG, H., AND LIU, C. 2008. Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 4, 6, 1873–84.
- XU, H.H.K. AND QUINN, J.B. 2002. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity. *Biomaterials* 23, 1, 193–202.
- XU, H.H.K. AND SIMON, C.G. 2005. Fast setting calcium phosphate - chitosan scaffold : mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* 26, 1337–48.
- YAMAGUCHI, T. AND MURAKAWAN, K. 1981. Preparation of spherical CaCO₃ (vaterite) powder and transition to calcite in water. *Journal of the Society of Materials Science* 30, 336, 856–860.
- YI, Z., YE, J., KIKUGAWA, N., ET AL. 2010. An orthophosphate semiconductor with photooxidation properties under visible-light irradiation. *Nature Materials* 9, 7, 559–64.
- YOUNGER, E.M. AND CHAPMAN, M.W. 1989. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of Orthopaedic Trauma* 3, 3, 192–195.
- ZIMMERMANN, G. AND MOGHADDAM, A. 2011. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 42 Suppl 2, S16–21.
- ZREIKI, J. 2009. Comportement du béton au jeune âge dans les structures massives. Application au cas de réparation des ouvrages. *Thèse, Ecole Normale Supérieure de Cachan*.

Annexes

1 Données physico-chimiques

1.1 Les phosphates de calcium

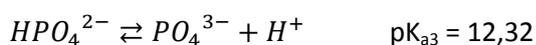
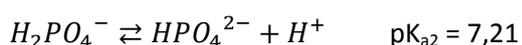
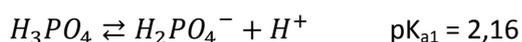
Principaux phosphates de calcium utilisés comme biomatériaux				
Nom et formule chimique	Abréviations	Maille cristalline	Densité ρ	Utilisations
Phosphate monocalcique monohydraté $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MCPM	Triclinique	2,23	En solution : phase liquide de certains ciments
Phosphate monocalcique anhydre $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	MCPA	Triclinique	2,57	En solution : phase liquide de certains ciments
Phosphate dicalcique dihydraté $\text{Ca HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD brushite	Monoclinique	2,30	Ciments, dépôts, composites
Phosphate dicalcique anhydre Ca HPO_4	DCPA monétite	Triclinique	2,93	Ciments, dépôts, composites
Phosphate tricalcique amorphe $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	ATCP (ACP)	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ clusters, symétrie S_6	-	Ciments, dépôts, composites
Phosphate octocalcique (1) $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP (OCPT)	Triclinique	2,67	Ciments
Phosphate tricalcique β $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β -TCP	Rhomboédrique	3,07	Ciments, biocéramiques résorbables, composites
Phosphate tricalcique α $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	α -TCP	Monoclinique	2,86	Ciments, biocéramiques résorbables, composites
Phosphate tétracalcique $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP (ou TeTCP)	Monoclinique	3,05	Ciments
Hydroxyapatite phosphocalcique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HA	Hexagonal (2)	3,16	Ciments, dépôts, céramiques, composites

(1) D'autres formes du phosphate octocalcique existent (amorphe, apatitique).
(2) L'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique est monoclinique à température inférieure à 211,5 °C, cependant dans les biomatériaux, c'est essentiellement la forme hexagonale qui est observée, probablement stabilisée par des impuretés à l'état de traces.

Tableau A.1 – Principaux phosphates de calcium utilisés comme biomatériaux [Combes 2013]

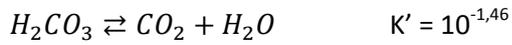
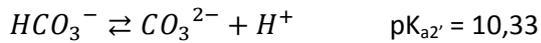
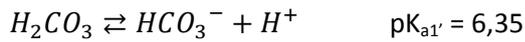
1.2 Equilibres ioniques en solution

Ions phosphates, à 25°C : ^[77]



⁷⁷ [Handbook of Chemistry and Physics – 92nd edition, 2011-2012]

Ions carbonates, à 25°C : [77]



1.3 Solubilité de différents sels de calcium et d'argent

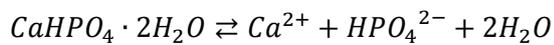
Apatite - $Ca_5(PO_4)_3(OH)$:



$$K_s = [Ca^{2+}]^5 [PO_4^{3-}]^3 [OH^-]$$

$$\log K_{sAp} = -8219,41/T - 1,6657 - 0,098215T \quad [\text{Elliott 1994}]$$

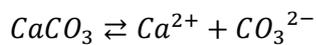
Brushite - $CaHPO_4 \cdot 2 H_2O$:



$$K_{sB} = [Ca^{2+}] [HPO_4^{2-}]$$

$$\log_e K_{sB} = -8403,5/T + 41,863 - 0,09678T \quad [\text{Elliott 1994}]$$

Vatérite - $CaCO_3$:



$$K_{sV} = [Ca^{2+}] [CO_3^{2-}]$$

$$\log K_{sV} = -172,1295 - 0,077993T + 3074,688/T + 71,595 \log T \quad [\text{Plummer 1982}]$$

Principaux sels d'argent :

sels	M (g.mol ⁻¹)	Solubilité (g/100g H ₂ O)	Solubilité (g/L de sel)	Solubilité (mol/L d'Ag)	Solubilité (g/L d'Ag)
Ag ₃ PO ₄	418,58	0,00065 ^(19.5°C)	6,5.10 ⁻³ (19.5°C)	4,59.10 ⁻⁵	4,95.10 ⁻³
Ag ₂ CO ₃	275,75	0,0036 ^(20°C)	3,6.10 ⁻² (20°C)	2,62.10 ⁻⁴	2,83.10 ⁻²
AgNO ₃	169,87	234 ^(25°C)	2340 ^(25°C)	13,77	1485
AgCl	143,32	0,00019 ^(25°C)	1,9.10 ⁻³ (25°C)	1,33.10 ⁻⁵	1,43.10 ⁻³

Tableau A.2 – Solubilité de différents sels d'argent [77]

2 Techniques de caractérisation

2.1 Diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) a été réalisée sur des composés pulvérulents ou après broyage des ciments dans un mortier en agate. La poudre a été tassée dans un porte-échantillon circulaire ($S \approx 150 \text{ mm}^2$) de manière à obtenir une surface plane. Une attention particulière a été portée sur la préparation des analyses de la brushite, pour ne pas accentuer l'orientation préférentielle déjà très marquée due à une morphologie en plaquettes.

Les diagrammes ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre à compteur courbe *CPS 120 INEL*, avec une anticathode au cobalt ($\lambda_{\text{Co}} = 1,7903 \text{ \AA}$, moyenne pondérée de $K_{\alpha 1}$ et $K_{\alpha 2}$). Notons que les diagrammes ainsi obtenus présentent donc un décalage des angles 2θ par rapport aux diagrammes les plus courants dans la littérature, obtenus avec une anticathode au cuivre.

Le temps d'acquisition a été de 1 h 30, sur un échantillon en rotation.

2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les échantillons à analyser (poudres réactives ou morceaux de ciments) ont d'abord été placés sur des plots, le tout rendu conducteur par du scotch carbone et une métallisation à l'argent avant d'être analysés.

Leur caractérisation morphologique et microstructurale a ensuite été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO-435VP, équipé d'un détecteur à électrons secondaires et d'un détecteur à électrons rétrodiffusés.

2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Pour l'analyse par spectroscopie infrarouge, 1 à 2 mg de produits ont été dispersés dans environ 300 mg de bromure de potassium KBr à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate, puis la poudre a été mise en forme de pastille à l'aide d'une presse (P = 8 t).

Les analyses ont été réalisées, en transmission, grâce à un spectromètre *Perkin Elmer, Nicolet 5700*, dans la gamme spectrale 4000 – 400 cm⁻¹ par l'accumulation de 64 scans d'acquisition, avec une résolution de 4 cm⁻¹.

2.4 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide

Les différentes analyses RMN ont été réalisées lors d'un séjour d'un mois à l'Université de Varsovie, en Pologne (septembre – octobre 2012, bourse de mobilité BQR SMI INPT), en collaboration avec le groupe du Pr. Waclaw Kołodziejcki (Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy of the Medical University of Warsaw).

Les spectres RMN ¹H, ³¹P et ¹³C ont été enregistrés à 25 °C sur un spectromètre *Bruker Avance 400WB* (160 MHz pour ³¹P, 400 MHz pour ¹H, 100 MHz pour ¹³C). Les échantillons ont été placés dans des rotors de 4 mm, auxquels a été appliquée une rotation à l'angle magique (MAS) de 7 kHz. Les déplacements ont été déterminés à partir de références externes : le tétraméthylsilane (TMS) pour le proton et le carbone et une solution à 85 % H₃PO₄ pour le phosphore.

Deux types d'expériences ont été effectuées : les analyses MAS-¹H, MAS-³¹P ou MAS-¹³C « classiques », dont l'acquisition a été réalisée après une unique impulsion et les analyses en polarisation croisée CP-MAS ³¹P et CP-MAS¹³C, consistant en un contact ¹H → ³¹P ou ¹H → ¹³C permettant le transfert d'aimantation du proton vers le phosphore ou le carbone. Les paramètres utilisés sont les suivants :

	Délai de recyclage (s)	Nombre de scans	Temps de contact (ms)
MAS ³¹ P	200	32	
CP-MAS ¹ H → ³¹ P	10	32	1
MAS ¹³ C	180	128	
CP-MAS ¹ H → ¹³ C	30	600	4
MAS ¹ H	10	32	

Tableau A.3 – Paramètres des analyses par RMN du solide

2.5 Analyse thermogravimétrique

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées à l'air sur quelques dizaines de milligrammes à l'aide d'un analyseur ATG/ATD *Setaram Setsys Evolution*.

2.6 Aiguilles de Gillmore

Le temps de prise des ciments a été évalué à l'aide de la méthode des aiguilles de Gillmore (norme ISO 9917-1:2007). L'appareil est constitué de deux aiguilles : la première (113,4 g ; $\varnothing = 2,12$ mm) mesure le « temps de prise initial », la deuxième (453,6 g ; $\varnothing = 1,06$ mm) estime le « temps de prise final ». Ces aiguilles sont posées manuellement à différents temps sur la surface de du ciment, préalablement mis en forme de manière à présenter une surface plane. La prise « initiale » et « finale » est effective lorsque la première ou la deuxième aiguille, respectivement, ne fait plus de marque sur le ciment (estimation visuelle).

2.7 Mesures de surfaces spécifiques

La mesure de la surface spécifique de poudres a été effectuée à l'aide d'un appareil *Quantachrom*, par la méthode monopoint Brunauer-Emmett-Teller (BET).

La méthode est basée sur l'étude du cycle d'adsorption-désorption d'azote à la surface de l'échantillon, réalisé grâce à la circulation d'un mélange gazeux He/N₂. Dans un premier temps, l'échantillon est refroidi à l'aide d'azote liquide. L'hélium permet alors de calculer le volume non occupé par l'échantillon dans le tube hermétiquement fermé (volume mort) et l'azote s'adsorbe à la surface de la poudre. Dans un second temps, le bain réfrigérant se retire et le tube est chauffé, ce qui entraîne la désorption du gaz de la surface de la poudre. La surface mesurée ramenée à la masse de poudre introduite permet d'évaluer la surface spécifique (m².g⁻¹), qui correspond à l'ensemble de la surface accessible par les molécules d'azote, porosité ouverte comprise.

2.8 Porosimétrie à mercure

La porosité a été évaluée à l'aide d'un porosimètre à mercure *Autopore 94XX, Micrometrics*. L'appareil mesure le volume de mercure qui pénètre dans les pores en fonction de la pression appliquée.

2.9 Granulométrie Laser

Les mesures de granulométrie ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre de type *Malvern Mastersizer 2000* équipé d'un accessoire de dispersion en voie sèche (*Scirocco*). Elle est basée sur la diffraction d'un faisceau laser par les particules, maintenues en constante circulation afin que chaque particule passe au moins une fois devant le faisceau laser durant la mesure.

Notons que la théorie mathématique admise considère la lumière dispersée par l'échantillon comme des sphères opaques à la lumière.

3 Synthèses

3.1 Apatite

Une apatite nanocristalline carbonatée a été utilisée comme composé standard dans la décomposition des spectres FTIR pour modéliser l'apatite formée au cours de la prise. Elle a été synthétisée à partir d'une solution de nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et d'une solution contenant des phosphates $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ et des carbonates $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ (Tableau A.4). La solution de calcium a été versée rapidement dans la solution de phosphate/carbonate. Le précipité blanc immédiatement formé a ensuite été laissé à maturation, sans agitation, pendant 48 h puis filtré sur Büchner, lavé avec 2 litres d'eau désionisée et lyophilisé. Une douzaine de grammes de poudre a été obtenue.

	m_{sel} (g)	V_{eau} (mL)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	26,1	350
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	45,0	800
$(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$	45,0	

Tableau A.4 – Réactifs engagés dans la synthèse de l'apatite

3.2 Vatérite enrichie en carbone ^{13}C

La vatérite enrichie en carbone ^{13}C a été synthétisée de manière similaire à la vatérite « classique » (chapitre 2 - § 1.1), à partir des réactifs présentés dans le Tableau A.3. Le carbonate de sodium décahydraté a été remplacé par un carbonate de sodium anhydre Na_2CO_3 (^{13}C , 99 % *Cambridge Isotope Laboratories Inc.*).

	m_{sel} (g)	V_{eau} (mL)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,88	20
$\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$	4,29	40

Tableau A.5 – Réactifs engagés dans la synthèse de la vatérite enrichie en ^{13}C

4 Etude complémentaire sur la synthèse de la vatérite

Lors de la synthèse de la vatérite, la vitesse d'addition de la solution de calcium dans la solution d'ions carbonate est un paramètre clef conditionnant les caractéristiques de la poudre obtenue. Nous avons ainsi synthétisé différents lots de vatérite avec des débits allant de $11 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ à $24 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

La pureté des différents lots de vatérite a été vérifiée par DRX. Leur cristallinité a été évaluée en appliquant la formule approchée de Scherrer à la raie 102, raie la plus intense des diffractogrammes obtenus par DRX. Nous en déduisons un ordre de grandeur de la taille des cristallites $t_{Scherrer}$ (en nm) définie ainsi :

$$t_{Scherrer} = \frac{k \cdot \lambda_{Co}}{(b_{hkl} - b_{inst}) \cdot \cos \theta_{hkl}}$$

avec k facteur correctif égal à 0,89 ;

λ_{Co} la longueur d'onde de l'anticathode de cobalt ($\lambda_{Co} = 0,17903 \text{ nm}$)

b_{hkl} la largeur à mi-hauteur de la raie d'indices hkl

b_{inst} la largeur instrumentale ($b_{inst} = 2,8 \cdot 10^{-3} \text{ rad}$)

θ_{hkl} l'angle de diffraction de la raie hkl (en rad)

Les différents lots de vatérite ont présenté des tailles de cristallites comprises entre 28 nm et 38 nm, même ordre de grandeur que ce que l'on peut trouver dans la littérature pour une double décomposition de CaCl_2 et Na_2CO_3 ($t = 25\text{-}35 \text{ nm}$ pour une concentration finale de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en Ca^{2+} et CO_3^{2-} au lieu de $0,66 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans notre cas) [Brečević 1996]. Comme le montre la Figure A.1.a, l'augmentation de la vitesse d'addition de la solution de calcium (S-Ca) dans la solution d'ions carbonate (S- CO_3) conduit à une diminution linéaire de la taille de cristallites.

D'autre part, une diminution de cette taille de cristallites est associée à une nette augmentation de la surface spécifique de la poudre (cf. Annexe 2.7), de $3 - 4 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ pour des tailles de $38 - 40 \text{ nm}$ à $24 - 30 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ pour $26 - 29 \text{ nm}$ (Figure A.1.b).

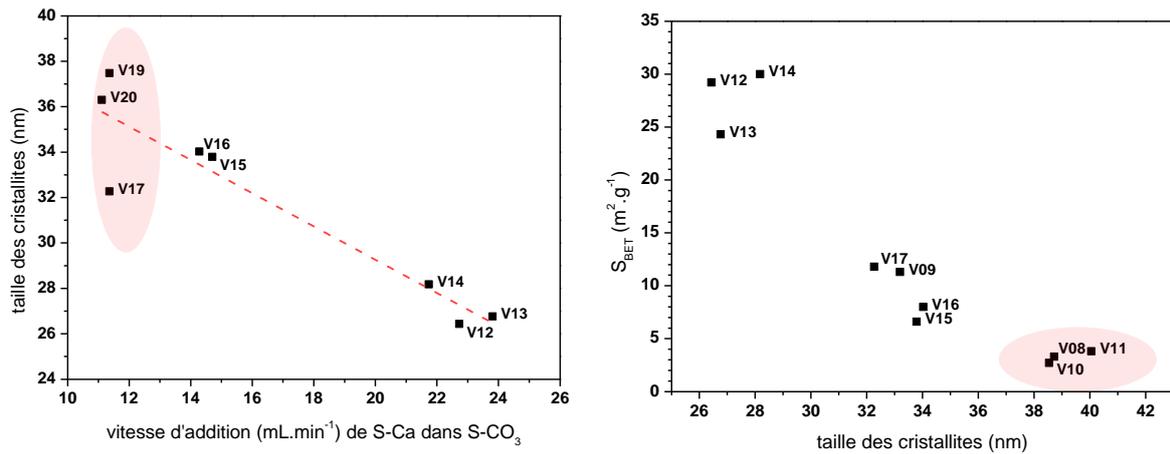


Figure A.1 – (a) Taille des cristallites de différents lots de vatérite synthétisés en fonction de la vitesse d'addition de la solution de calcium (S-Ca) dans la solution d'ions carbonate (S-CO₃) ; (b) Surface spécifique de différents lots de vatérite en fonction de la taille de leurs cristallites. Les zones en rouge correspondent aux lots de vatérite utilisés pour la préparation des ciments présentés dans cette thèse.

Il apparaît donc que lorsque la vitesse d'addition de S-Ca dans S-CO₃ augmente, un mécanisme de nucléation est favorisé, conduisant un nombre important de germes de petite taille. Au contraire un goutte à goutte plus lent favorise la croissance des particules et permet aux atomes de se réarranger avec une meilleure cristallinité. La surface spécifique mesurée S_{BET} est en accord avec ce mécanisme puisqu'elle est d'autant plus élevée que les cristallites sont de petites tailles.

Ainsi, une vitesse d'addition de S-Ca dans S-CO₃ plus élevée qui conduit à une poudre de vatérite de cristallinité plus faible et de surface spécifique plus grande devrait présenter une plus grande réactivité dans une réaction de dissolution-reprécipitation comme celle qui intervient dans la prise du ciment que nous avons étudiée dans le cadre de ces travaux de thèse. Néanmoins pour des raisons d'homogénéité dans les résultats de cette thèse, nous avons choisi de conserver une vitesse plus basse (entre 12 et 15 mL.min⁻¹) correspondant au protocole mis en place dans un premier temps de l'étude pour des contraintes matérielles.

RÉSUMÉ

Ce travail porte sur la recherche et le développement d'un matériau de substitution osseuse permettant une implantation par chirurgie mini invasive, limitant les infections post-opératoires et dont la résorbabilité serait adaptée à la cinétique de régénération osseuse. Nous nous sommes intéressés à un ciment à base de carbonate et de phosphate de calcium (CaCO_3 - CaP) dont la réaction de prise conduit à la formation d'une apatite nanocristalline analogue au minéral osseux.

Dans une première partie la cinétique de prise et le produit de réaction ont été caractérisés par différentes techniques, notamment la diffraction des RX et les spectroscopies FTIR et RMN du solide. Un sel d'argent – Ag_3PO_4 ou AgNO_3 , choisis pour leurs propriétés antibactériennes – a été ensuite introduit dans la formulation. Son effet sur la cinétique de la réaction chimique de prise a été mis en évidence par traitement des spectres FTIR et RMN et un mécanisme réactionnel original impliquant les ions argent et nitrate dans la formation de l'apatite a été proposé. L'ajout d'un polysaccharide, la carboxyméthylcellulose (CMC), dans la phase solide du ciment a montré une très nette amélioration de l'injectabilité de la pâte, avec la disparition du phénomène de séparation des phases qui limite généralement l'injectabilité des ciments minéraux. La résistance à la compression et le module élastique des ciments composites ont été par ailleurs augmentés, parallèlement à une diminution de leur porosité.

Différentes études in vitro en présence de cellules ou de bactéries ont enfin été réalisées et ont mis en évidence respectivement la cytocompatibilité des différentes compositions de ciments étudiées et le caractère antibactérien de ces matériaux à partir d'une certaine concentration en argent. L'implantation in vivo de compositions choisies a présenté des résultats très prometteurs quant à la résorbabilité d'un ciment composite CaCO_3 - CaP/CMC/Ag et à la néoformation osseuse.

ABSTRACT

The present work concerns research and development of a material for bone substitution, enabling implantation through a mini-invasive surgery, limiting post-operative infections and whose resorbability is adapted to bone regeneration kinetics. This study focused on a calcium carbonate and phosphate based cement (CaCO_3 - CaP), whose setting reaction leads to the formation of a nanocrystalline apatite, similar to bone mineral.

First, the setting kinetics and the reaction products were characterised using different techniques, especially X-ray diffraction and FTIR and solid-state NMR spectroscopies. A silver salt – Ag_3PO_4 or AgNO_3 , chosen for their antibacterial properties – was then introduced in the formulation. Its effect on the setting reaction kinetics was revealed by data processing of FTIR and NMR spectra and an original reaction mechanism which involves silver and nitrates in the formation of apatite was proposed. The addition of a polysaccharide, carboxymethylcellulose (CMC), in the solid phase of the cement showed a clear improvement of the injectability of the paste, preventing the occurrence of filter-pressing phenomenon, often limiting the injectability of mineral cements. The resistance to compressive strength and elastic modulus of the composite cement were also improved together with a decrease in their porosity.

Different in vitro studies were carried out in the presence of cells or bacteria and demonstrated the cytocompatibility of different cement compositions and their antibacterial properties starting at a certain silver concentration, respectively. In vivo implantation of selected compositions showed promising results concerning resorbability of a composite CaCO_3 - CaP/CMC/Ag cement and the associated bone neoformation.