

Titre: Caractérisation physico-chimique et cytotoxique des poudres
Title: composites d'hydroxyapatite/ $A1_2O_3$ pour applications orthopédiques

Auteur: Laura Mery Epure
Author:

Date: 2006

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Epure, L. M. (2006). Caractérisation physico-chimique et cytotoxique des poudres
Citation: composites d'hydroxyapatite/ $A1_2O_3$ pour applications orthopédiques [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/7811/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/7811/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** L'Hocine Yahia, & Merhi Yahye
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET CYTOTOXIQUE
DES POUDRES COMPOSITES D'HYDROXYAPATITE/ Al_2O_3
POUR APPLICATIONS ORTHOPÉDIQUES

Laura Mery EPURE
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
AOÛT 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-25541-4
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-25541-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET CYTOTOXIQUE
DES POUDRES COMPOSITES D'HYDROXYAPATITE/ Al_2O_3
POUR APPLICATIONS ORTHOPÉDIQUES

Présenté par : EPURE Laura Mery

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. BUREAU Martin, Ph.D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. MERHI Yahye, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. ASSAD Michel, Ph.D., membre

Remerciements

Mes premiers mots de reconnaissance vont naturellement vers mon directeur de recherche, Prof. L'Hocine Yahia. Je remercie de m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche, de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce programme de maîtrise. Merci pour votre disponibilité et pour la confiance que vous m'avez accordée en me laissant une impressionnante liberté de travail et de décision.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Dr. Yahye Merhi de l'Institut de Cardiologie, co-directeur, pour son accueil chaleureux, pour la place qu'il m'a réservée au sein de son Laboratoire de Pathologie Expérimentale et pour ses précieux conseils.

Je suis honorée que Dr. Martin Bureau ait accepté d'assumer la fonction de Président du jury pour l'évaluation de ce mémoire.

Je remercie Dr. Michel Assad pour l'intérêt qu'il a porté à ces travaux et pour avoir accepté la fonction d'examineur externe dans le jury d'évaluation.

Merci à tous les membres du LIAB, et en particulier :

Caroline, pour ton énorme disponibilité et ton aide soutenue. Merci de m'avoir appris à travailler dans les « règles de l'art » et merci d'avoir lu et corrigé mes « textes plates ».

Sashka, pour tout ton aide dans le boulot et surtout pour ton écoute dans les moments de doute, ton soutien et ton amitié.

Suzanne pour ton aide plus que significative dans la rédaction en anglais de l'article.

Stefania, pour la solidarité, les conseils, le modèle que tu donnes à suivre.

Je n'oublierai pas non plus tous les autres collègues du laboratoire avec lesquels j'ai pu faire un bout de chemin : Aziza, Fatiha, Mariam, Pierre, Habiba, Rommy, Fouad, Maurad, Daniel, Haisam, et Jean-François. Merci de m'avoir supportée jusqu'aux dernières heures de ce travail.

Un merci tout spécial au personnel du laboratoire du CM² et particulièrement Éric Duchesne et Benoît Julien pour leur aide technique au microscope et aux rayons X. Un grand merci à Madame Marta Ghitescu, pour l'aide qu'elle m'a apporté pendant les travaux de biocompatibilité à l'ICM, pour la clé qu'elle m'a empruntée tous les week-ends et pour son photospectromètre magique.

Enfin, je garde mes derniers remerciements, les plus sensibles et tendres, à Dan qui a supporté avec héroïsme toutes mes angoisses. Merci pour ta patience, ton soutien et ta compréhension.

Montréal, août 2006

Résumé

L'hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) est un biomatériau de substitution osseuse destiné à faciliter la réossification d'un défaut osseux ne pouvant cicatriser sans apport extérieur. Elle est souvent utilisée en blocs pour remplacer l'os, lorsque la cicatrisation naturelle est impossible ou trop lente ou comme revêtement à la surface des prothèses. Malgré cela, la limitation principale de l'HA est déterminée par son comportement fragile lié à sa basse ténacité sous chargement mécanique. Pour améliorer ses propriétés mécaniques, différents agents de renforcement sont utilisés. La conception des composites HA/ Al_2O_3 permet de combiner adéquatement les propriétés des constituants et d'apporter des améliorations significatives de la résistance mécanique et de la ténacité de l'HA.

Les caractéristiques finales d'une céramique reposent sur l'histoire de fabrication vécue durant la synthèse et durant sa transformation thermique en « produit fini » fritté. L'HA est un matériau susceptible de se décomposer à haute température. Cette décomposition peut générer des produits de dégradation qui dans le cas des composites réagissent aux températures de frittage avec le renfort altérant aussi les caractéristiques du composite. Donc la compréhension des mécanismes physico-chimiques intervenant lors de l'étape de frittage est nécessaire à son optimisation et passe par l'étude de la stabilité thermique des composés (Landi et al. 2000; Tadic et al. 2002). En collaboration avec l'Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciencias Tecnológicas du Brésil, nous avons élaboré par la méthode de précipitation des composites céramiques HA/ Al_2O_3 avec plusieurs teneurs en renfort (5, 10, 20 et 30%). La précipitation de l'HA offre un bon contrôle structural en jouant sur les paramètres de synthèse. De plus, cette méthode permet la nucléation de l'HA sur les particules du renfort améliorant ainsi l'adhérence matrice/renfort. Les céramiques sont soumises à deux traitements thermiques (900 et 1300°C). Pour étudier l'effet de la variation du renfort dans les matériaux céramiques, et l'effet de la température du traitement thermique nous avons comparé les

transformations chimiques et structurales qui surviennent après la calcination et le frittage des composites HA/Al₂O₃ avec celles de l'HA sans renfort.

Les résultats démontrent que indépendamment de la présence du renfort, l'HA subit une décomposition aux deux températures de traitement. Cette décomposition est plus accentuée dans le cas du frittage. On observe aussi que l'HA évolue morphologiquement et structurellement sans interaction chimique avec l'Al₂O₃. Par contre, à 1300°C le renfort réagit avec les produits de décomposition de l'HA formant des aluminates de calcium. Ces nouveaux produits ont des caractéristiques très spécifiques qui en milieu biologique peuvent affecter les propriétés du composite en tant que biomatériau orthopédique.

Le frittage permet de densifier l'HA et de faire de fortes connections entre les grains de poudre pour avoir une structure stable en milieu biologique. Nous avons calculé par diffraction des rayons X, pour chaque composite, la taille moyenne de la cristallite le long des axes c et a. Cette technique nous a permis d'évaluer la transformation de la maille d'HA avec la température de traitement et avec l'augmentation de la teneur d'Al₂O₃. Les résultats démontrent une tendance à la cristallisation de façon préférentielle selon l'axe c de la structure de l'HA ; tendance qui est inhibée par la présence du renfort et la température de traitement. Donc, la présence du renfort modifie la forme des cristaux et rend la structure cristalline plus homogène et fine avec des changements de forme dans toutes les directions. Ces changements augmentent avec l'élévation de la température.

La méthode de précipitation a permis de recouvrir les particules d'Al₂O₃ par une couche d'HA d'épaisseur variable qui demeure aussi à la surface des particules de renfort après les traitements thermiques, suggérant une adhérence adéquate entre le renfort et la matrice. La morphologie de cette couche d'HA évolue avec la température de traitement mais n'est pas influencée par la concentration de l'Al₂O₃. Toutefois, la formation de

différentes phases hydratées d'aluminates de calcium à proximité des particules de renfort peut amener en milieu biologique à une dégradation préjudiciable de la structure du composite. Les études de biocompatibilité montrent une toxicité due à la concentration élevée d'ions relargués en milieu biologique par dégradation. Malheureusement, en raison des limites de cette étude il n'a pas été possible d'établir avec certitude la concentration des ions responsables de la cytotoxicité. Nous supposons que la grande surface utilisée pour les extractions exagère les conditions et la cinétique d'extraction par rapport aux conditions naturelles biologiques.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence les transformations (chimiques, structurales et microstructurales) qui surviennent lorsque des traitements thermiques à hautes températures sont appliqués aux composites d'HA/Al₂O₃. Nous avons contribué à la compréhension de la complexité des mécanismes développés entre le renfort (Al₂O₃) et la matrice (HA) durant le frittage ainsi que leur effet sur la biocompatibilité des composites.

Abstract

Hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) is a bone substitution biomaterial intended to facilitate the ossification of a bone defect unable to heal without external contribution. It is used under two different forms: a dense one when natural cicatrisation is too slow or impossible; and as a hip prosthesis coating. However, HA principal limitation is its fragile behaviour related to its low tenacity under mechanical loading. To improve HA mechanical properties, various agents of reinforcement are used. The HA/ Al_2O_3 composite conception combines adequately the properties of the components in order to significantly improve the mechanical strength and tenacity of HA.

The final properties of the "finished product ceramics" are determined largely by the synthesis and thermal transformation involved throughout the fabrication processes. The HA is a material likely to decompose at high temperature. This decomposition can generate different degradation products, which at sintering temperatures can react with the reinforcement deteriorating the characteristics of the composite. Thus the comprehension of the physicochemical mechanisms intervening at the time of the stage of sintering is necessary to its optimization and passes by the study of the thermal stability of the compounds (Landi et al. 2000; Tadic et al. 2002). In collaboration with Universidade C Estado de Santa Catarina, Central of Ciencias Tecnologicas of Brazil, we worked out by the method of precipitation of the ceramic composites HA/ Al_2O_3 with several contents of reinforcement (5, 10, 20 and 30%). The precipitation of the HA offers a good structural control while exploiting the parameters of synthesis. Moreover, this method allows the nucleation of the HA on the particles of the reinforcement improving adherence matrix/reinforcement thus. Ceramics is subjected to two heat treatments (900 and 1300°C). To study the effect of the variation of the reinforcement in ceramic materials, and the effect of the temperature of the heat treatment we compared the chemical and structural conversions which occur after the calcination and the sintering of the HA/ Al_2O_3 composites with those of the HA without reinforcement.

The results show that independently of the presence of the reinforcement, the HA undergoes a decomposition at the two temperatures of treatment. This decomposition is accentuated in the case of sintering. It is also observed that the HA evolves morphologically and structurally without chemical interaction with Al_2O_3 . On the other hand, at 1300°C the reinforcement reacts with the decomposition products of HA forming different calcium aluminates. These new products have very specific characteristics which in biological environment can affect the properties of the composite as orthopedic biomaterials.

Sintering allows a densification of the HA with strong connections between the powder grains for a stable structure in biological environment. For each composite we calculated by X-rays diffraction the average size of crystallite along the axes *c* and *a*. This technique permitted to evaluate the transformation of the HA crystallite with the temperature of treatment and the increase in the Al_2O_3 behavior. The results show a crystallization tendency into a preferential direction: the *c* axis of the HA structure, tendency which is inhibited by the presence of the reinforcement phase and the treatment temperature. Therefore, the presence of the reinforcement modifies the shape of the crystals and makes the crystalline structure more homogeneous and fine with shapes changes in all the directions. These changes increase with the increasing temperature.

The precipitation method permitted to cover the Al_2O_3 particles of a variable thickness layer of HA which also remains on the surface of the reinforcement particles after the heat treatments suggesting an adequate adherence between the reinforcement and the matrix. Moreover, the morphology of this HA layer evolves with the treatment temperature but is not influenced by the Al_2O_3 concentration. However, the formation of different hydrated phases of calcium aluminates near the reinforcement particles can bring the structure of the composite at a prejudicial degradation in the biological environment. Finally, the biocompatibility studies show toxicity due to the high concentration of ions released in biological environment by degradation. Unfortunately,

by the limits of this study it was not possible to establish with certainty the concentration of the ions responsible for this cytotoxicity. Moreover, compared to the natural biological conditions, we suppose that the big surface used for the extractions exaggerates the conditions and the kinetics of extraction.

In conclusion, this study made it possible to underline the transformations (chemical, structural and microstructural) which occur when thermal treatments at high temperature are applied to the composites of HA/ Al_2O_3 . We contributed at the comprehension of the complexity of the mechanisms developed between the reinforcement (Al_2O_3) and the matrix (HA) during sintering and also the composites effect on the biocompatibility.

Table des matières

Remerciements	iv
Résumé	vi
Abstract	ix
Table des matières	xii
Liste des tableaux	xv
Liste des figures	xii
Liste des annexes	xviii
Liste des sigles et abréviations	xix
Avant propos	1
CHAPITRE 1: Introduction	2
CHAPITRE 2: Revue de la littérature	4
2.1 Généralités	4
2.1.1 Les biomatériaux	4
2.1.2 Les biomatériaux orthopédiques et leurs exigences	5
2.1.2.1 La biocompatibilité des biomatériaux orthopédiques	6
2.1.2.2 Les propriétés mécaniques des biomatériaux orthopédiques	7
2.1.3 L'approche biomimétique ou bioinspirée	8
2.2 Les apatites	11
2.2.1 Les apatites biologiques	11
2.2.1.1 Généralités	11
2.2.1.2 La phase minérale de l'os	12
2.2.2 Les apatites synthétiques	16
2.2.2.1 Généralités	16
2.2.2.2 La synthèse de l'HA	24
2.2.2.3 Le frittage de l'HA	32
2.3 Les composites à base d'HA	43
2.3.1 Généralités	43
2.3.2 Les problèmes associés aux composites à base d'HA	46
2.3.3 Les composites à matrice d'HA et renfort Al ₂ O ₃	48

2.3.3.1 Le renfort d'Al ₂ O ₃	48
2.3.3.2 La matrice d'HA	50
2.4 Conclusion.....	53
CHAPITRE 3: Objectifs.....	54
3.1 Objectif général	54
3.2 Objectifs spécifiques	54
CHAPITRE 4: Matériel et méthodes	55
4.1 Synthèse de la matrice d'HA et des composites HA/Al₂O₃.....	55
4.1.1 Matériel	55
4.1.2 Méthode expérimentale pour l'élaboration des composites.....	56
4.1.2.1 L'élaboration de la matrice d'HA	56
4.1.2.2 L'élaboration des composites HA/Al ₂ O ₃	56
4.2 Études de caractérisation	58
4.2.1 Identification des phases par diffraction des rayons X	58
4.2.2 Taille des cristallites déterminées par diffraction des rayons X	60
4.2.3 Identification et analyse de la composition élémentaire superficielle des particules par spectroscopie de photoélectrons X (XPS).....	63
4.2.4 La morphologie des poudres par MEB-EDS	66
4.3 Étude de cytotoxicité.....	67
4.3.1 La lignée cellulaire.....	68
4.3.2 Préparation des échantillons.....	69
4.3.2.1 Stérilisation	69
4.3.2.2 Extraction	69
4.3.3 Le test MTT de viabilité cellulaire.....	70
CHAPITRE 5: The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: morphological, chemical and cytotoxic evaluation	72
5.1 Abstract.....	75
5.2 Introduction.....	76
5.3 Materials and methods	78
5.3.1 Sample preparation.....	78
5.3.1.1 Preparation of hydroxyapatite	78
5.3.1.2 Preparation of hydroxyapatite/Al ₂ O ₃ composites	79

5.3.2 Powder characterization	80
5.3.2.1 X-ray diffraction (XRD) and data analysis	80
5.3.2.2 Scanning electron microscopy in combination with energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDX)	81
5.3.2.3. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).....	81
5.3.3 Cytotoxicity evaluation	82
5.3.3.1 Cell culture	82
5.3.3.2 Preparation of the extracts.....	82
5.3.3.3 MTT assay.....	82
5.4 Results and discussion	84
5.4.1 Phase composition dependence on sintering temperature and of Al ₂ O ₃ concentration.	84
5.4.1.1 Phase composition variations as determined by XRD	84
5.4.1.2 X-ray Photoelectron Spectroscopic (XPS) analysis	87
5.4.2 Morphologic evaluation of powder samples	92
5.4.3 Cytotoxicity evaluation	97
5.5 Conclusions	102
5.6 Acknowledgements.....	102
5.7 References	103
5.8 Résultats supplémentaires	107
CHAPITRE 6: Discussion générale.....	111
CHAPITRE 7: Conclusion et Perspectives	120
Références	122
Annexes :	140

Liste des tableaux

Tableau 2.1: Les biomatériaux orthopédiques répondent à deux grandes classes: les implants et les substituts osseux.....	5
Tableau 2.2: Les principaux CaP	19
Tableau 2.3: Les principales méthodes de synthèse de l'HA	27
Tableau 4.1 : La codification des échantillons.....	57
Tableau 4.2 : Les fiches de référence pour l'indexation des diffractogrammes de composites.....	59
Table 5.1 : Samples notation.....	80
Table 5.2 : Peak position, surface composition, and calculation of the Ca/P ratio for the HA/Al ₂ O ₃ composites as determined by XPS.....	88
Tableau 6.1: L'ordre et la température de cristallisation des aluminates de calcium et les réactions chimiques.....	113
Tableau 6.2 : Le rapport CaO/Al ₂ O ₃ des aluminates de calcium:	114

Liste des figures

Figure 2.1 : Organisation structurale de l'os.....	11
Figure 2.2 : La maille élémentaire cristalline hexagonale de l'HA: l'arrangement des atomes dans la structure et les tunnels hexagonaux occupés par les ions OH.	12
Figure 2.3 : L'apatite biologique	15
Figure 2.4 : Les isothermes de solubilité des CaP à 37°C pour un système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$	17
Figure 2.5 : Le cristal tridimensionnel d'HA	22
Figure 2.6 : L'évolution du facteur de forme des cristallites en fonction de la température de synthèse et l'évolution de l'aire de surface spécifique (Sw) en fonction de la température de synthèse.	30
Figure 2.7 : Nanocristaux d'HA synthétisés à différentes températures de réaction (a) 35°C; (b) 85°C. (c) synthétisés avec le $V_{\text{add}} = 2400$ ml/minute	31
Figure 2.8 : Diagramme de phase du système $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ établie pour $P_{\text{H}_2\text{O}} = 500$ mmHg $T_1 = 1360^\circ\text{C}$, $T_2 = 1550^\circ\text{C}$	33
Figure 2.9 : L'influence du temps de cycle de frittage sur la taille de grains et la densité de l'HA.....	37
Figure 2.10 : L'influence de la température de frittage sur la taille de grains et la densité de l'HA	38
Figure 2.11 : La morphologie (a) de la poudre de départ et (b) de la surface de l'HA après 1.5 h de calcination à 940°C	38
Figure 2.12 : La morphologie de la surface de l'HA après 1.5 h de frittage à (a) 1000°C , (b) 1050°C , (c) 1100°C , (d) 1150°C et (e) 1215°C	39
Figure 2.13 : Résistance à la traction en fonction du module élastique de divers matériaux naturels et synthétiques	43
Figure 4.1 : Montage pour le séchage du précipité	57
Figure 4.2 : Le principe de la diffraction des rayons X.....	59
Figure 4.3 : La taille des cristallites déterminées par diffraction des rayons X	60

Figure 4.4 : Largeur à mi-hauteur β (FWHM)	61
Figure 4.5 : Le principe de la spectroscopie de photoélectrons X	64
Figure 4.6 : Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon.	66
Figure 4.7 : Le clivage du cycle de tétrazolium qui transforme le MTT en formazan ...	68
Figure 4.8 : Les étapes du test MTT.....	71
Figure 5.1 : XRD patterns of HA/Al ₂ O ₃ composites.....	85
Figure 5.2 : XPS (a) C1s spectrum and (b) O1s of 900 °C heat-treated 10% Al ₂ O ₃ composite.	90
Figure 5.3 : SEM micrograph of the HA ₁ powder heated at 900°C and HA ₂ powder heated at 1300°C.	93
Figure 5.4 : SEM micrograph of HA/5%Al ₂ O ₃ heated at 900°C.....	94
Figure 5.5 : SEM micrograph of HA/5%Al ₂ O ₃ heated at 1300°C.....	95
Figure 5.6 : Effect of diluted (10%, 50%) and undiluted extracts (100%) of composite samples obtained after 24h, 48h and 72h of incubation on cell viability evaluated by MTT test.....	99
Figure 5.7 : Morphological analysis of L929 cultured for 48 h in the presence of undiluted extracts..	101
Figure 5.8 : L'évolution de la taille moyenne des cristallites de l'HA en fonction de la teneur en Al ₂ O ₃ pour les composites traités à 900°C.....	108
Figure 5.9 : L'évolution de la taille moyenne des cristallites de l'HA en fonction de la teneur en Al ₂ O ₃ pour les composites traités à 1300°C.....	109
Figure 5.10 : Le déplacement angulaire pour les pics de Bragg (002), (211), (300)	110
Figure 6.1 : Le diagramme binaire Al ₂ O ₃ -CaO et les aluminates de calcium dans le sens des teneurs en Al ₂ O ₃ croissante	114

Liste des annexes

Annexe 1 : Les micrographies MEB ont été réalisées à une tension de 15keV pour les 8 composites.....	140
Annexe 2 : La forme et la taille des produits de dégradation pour différents matériaux et à différentes dilutions.....	141
Annexe 3 : Les spectres XPS généraux de survol obtenus pour tous les composites ...	144

Liste des sigles et abréviations

AC	Aluminate de calcium
Al ₂ O ₃ -α	Corundum synthétique
BE	Énergie de liaison (<i>Binding Energy</i>)
C ₃ A	Aluminate tricalcique: Ca ₃ Al ₂ O ₆ (<i>Tricalcium aluminate</i>)
CA	Monoaluminate de calcium: CaAl ₂ O ₄ (<i>Calcium monoaluminate</i>)
CA ₂	Dialuminate de calcium: CaAl ₄ O ₇ (<i>Calcium dialuminate</i>)
CaO	Oxyde de calcium: CaO (<i>Calcia</i>)
CaP	Phosphates de calcium (<i>Calcium phosphates</i>)
CDT	Coefficient de dilatation thermique
DCPA	Phosphate dibasique anhydre (monétite)
DCPD	Phosphate dibasique dihydraté (brushite)
DMEM	Milieu de culture de Eagle modifié Dulbecco (<i>Dulbecco modified Eagle Medium</i>)
E	Module de Young
ESD (<i>EDX</i>)	Spectromètre à énergie dispersive (<i>Energy Dispersive X-ray</i>)
FBS	Sérum fœtal de bovin (<i>Fœtal Bovine Serum</i>)
F _s	Facteur de forme
FWHM	Largeur à mi-hauteur (<i>full width at half maximum</i>)
HA	Hydroxyapatite (Ca) ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
HIP	Compression isostatique à chaud
HP	Compression à chaud
JCPDS (<i>ICDD</i>)	Joint Committee of Powder Diffraction Standard (<i>International Centre for Diffraction Data</i>)
K _c	Ténacité à la rupture
K _s	Coefficient de solubilité
L-929	Cellules fibroblastiques CCL 1 NCTC clone 929 souche L, de tissu

	conjonctif de souris
MCP	Phosphate monocalcique anhydre
MCPM	Phosphate monocalcique monohydraté
MEB (<i>SEM</i>)	Microscopie électronique à balayage (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
MEC	Matrice extracellulaire
MTT	Bromure du tetrazolium 3(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl)
OCP	Phosphate octocalcique $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6,5\text{H}_2\text{O}$
OXA	Oxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$
PE	Polyéthylène
PHA	Hydroxyapatite précipitée
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
S_w	Aire de surface spécifique
TCP (α , β)	Phosphate tricalcique α et β : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (<i>Tricalcium phosphate</i>)
TCPam ou ACP	Phosphate tricalcique amorphe $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, n\text{H}_2\text{O}$
TCPM	Phosphate tétracalcique monoxide $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$
TMC	Taille moyenne des cristallites
TTCP	Tetracalcium phosphate
V_{add}	Vitesses d'addition de l'acide
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X (<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
XRD	Diffraction des rayons X (<i>X Ray Diffraction</i>)
ZPS	Zirconium partiellement stabilisé

Avant propos :

« 2000-2010 LA DECENNIE DES OS ET DES ARTICULATIONS »

Les affections musculo-squelettiques, telles que les maladies articulaires, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, les douleurs de dos, les affections rachidiennes, les traumatismes graves des membres et les affections invalidantes des enfants, touchent aujourd'hui des centaines de millions de personnes dans le monde. Ces affections représentent la cause la plus fréquente de douleurs prolongées et sévères, d'incapacités physiques et de morbidité. Cette situation va s'aggraver de façon considérable à cause du doublement prévu du nombre de personnes âgées de plus de 50 ans d'ici 2020. Voilà quelques exemples qui permettent d'illustrer l'ampleur du problème: les douleurs de dos viennent au second rang des causes d'arrêt de travail pour maladie ; 25 % des dépenses de santé dans les pays en voie de développement seront consacrées à la prise en charge des personnes victimes de traumatismes en 2010 ; les fractures liées à l'ostéoporose ont presque doublé en nombre durant la dernière décennie ; un tiers des femmes de plus de 50 ans présenteront une fracture ostéoporotique ; les maladies des articulations représentent la moitié de l'ensemble des affections chroniques chez les personnes de plus de 65 ans.

Les troubles de l'appareil musculo-squelettique représentent un problème de santé de longue durée. Plus de 20 % des Canadiens déclarent être touchés par ces symptômes avoir des problèmes de santé musculo-squelettique. Au Canada, les affections musculo-squelettiques sont la principale cause d'incapacité de mouvement et entraînent environ 39% des coûts d'invalidité (17,8 milliards de dollars par année) de longue durée (Arthroscopie, 1998), occupant ainsi le deuxième rang parmi les quatre maladies les plus coûteuses au Canada. L'incidence marquée des maladies d'ordre musculo-squelettique a créé un marché considérable pour les dispositifs orthopédiques. Les ventes mondiales s'élevaient à 10.5 milliards en 1999. Le marché potentiel pour les traitements et l'appareillage orthopédique est en pleine croissance, ce qui est dû au vieillissement de la population des pays économiquement développés, plaçant ainsi le secteur orthopédique en deuxième place derrière le secteur cardiovasculaire (Suchanek and Yoshimura 1998).

CHAPITRE 1: Introduction

Le développement des matériaux avancés pour les applications biomédicales est parmi les plus importants problèmes qui se posent actuellement dans l'ingénierie des matériaux. Ce domaine concerne le développement et la sélection de matériaux appropriés pour leur implantation dans le corps humain.

Si, à l'origine, la plupart des systèmes implantés possédaient des propriétés restauratrices de manière passive et inerte, aujourd'hui, l'utilisation des biomatériaux ne s'arrête plus à la simple fonction mécanique. Souvent, un biomatériau est implanté dans les tissus biologiques de façon permanente et on lui demande de remplir pleinement son rôle sans aucune possibilité d'entretien. Ainsi, quelle que soit leur origine (naturelle ou synthétique), ou leur fonction (permanente ou temporaire), les biomatériaux doivent répondre à de nombreux critères de biocompatibilité, biofonctionnalité et biodurabilité, obligeant ainsi le développement d'une approche plus réfléchie. L'objectif général est de développer et d'élaborer des matériaux compatibles avec le milieu physiologique afin d'élaborer des dispositifs plus performants. Reproduire les caractéristiques fonctionnelles du tissu à remplacer est un défi encore incomplètement maîtrisé, quel que soit le matériau.

L'os est un des tissus dont la demande de reconstruction et de remplacement est très élevée. En orthopédie la quête de nouveaux matériaux (de comblement et de remplacement osseux) est permanente du fait de leur utilisation fréquente en chirurgie orthopédique et en chirurgie réparatrice. Lors d'une perte de substance osseuse, on utilise des matériaux de substitution du tissu osseux destinés à faciliter la réossification d'un défaut ne pouvant se cicatriser sans apport extérieur. En cas de pertes osseuses importantes, l'implantation de blocs volumineux de biomatériaux engendre des complications quant à la réhabilitation osseuse. L'idée de base est d'élaborer et d'utiliser un matériau de remplacement pouvant reproduire la composition et le caractère anisotrope de l'os et permettant d'offrir simultanément une bonne biocompatibilité à long terme et une ostéointégration adéquate.

Ainsi, le remplacement des tissus osseux exige des matériaux biocompatibles possédant des caractéristiques spécifique propres (par exemple : propriétés mécaniques compatibles avec le tissu récepteur). L'hydroxyapatite (HA) est un matériau dont la structure cristalline est proche de celle de l'os humain qui démontre une excellente biocompatibilité. Malgré cela, la limitation principale de l'HA est déterminée par son comportement fragile lié à sa basse ténacité sous chargement mécanique. Ainsi est née l'idée d'utiliser différents agents de renforcement pour améliorer ses propriétés mécaniques. Les études démontrent que l'addition d'alumine (Al_2O_3) est une méthode efficace pour augmenter en même temps la résistance mécanique et la ténacité de la matrice (HA). Pourtant le processus de renforcement de l'HA soulève de nombreux problèmes quand une association inadaptée est réalisée entre l'HA et la phase de renfort. L'adition de nouvelles phases (le renfort) dans la structure de l'HA peut favoriser l'apparition de modifications majeures dans sa structure. Ces modifications se reflètent ultérieurement dans toutes les propriétés du composite final et souvent sont non désirées dû à leur effet néfaste.

Notre étude se positionne donc dans ce contexte. Nous avons étudié l'évolution chimique et morphologique de la matrice (HA) de quatre composites, possédant différentes concentrations de renfort (5, 10, 20 et 30% en pourcentage volumique), avec deux températures de traitement thermique différentes (900 pour la calcination et 1300°C pour le frittage). Les résultats obtenus sont comparés avec la matrice seule (HA) synthétisée aux mêmes conditions que les composites. Des études préliminaires de cytotoxicité nous ont permis d'évaluer, dans un premier temps, leur éventuel potentiel biologique. Cette étude va donc permettre d'évaluer le rôle de la teneur du renfort d' Al_2O_3 et de la température du traitement thermique (calcination et frittage) sur la stabilité chimique et la morphologie de la matrice (HA) ainsi que sur la biocompatibilité du composite.

CHAPITRE 2: Revue de la littérature

2.1 Généralités

2.1.1 Les biomatériaux

Les principales caractéristiques des tissus vivants sont la capacité de croître, de se régénérer et de s'autoréparer. En cas de lésions tissulaires, quelle que soit leur origine (traumatique, tumorale, dégénérative, métabolique, etc.), l'une ou plusieurs de ces caractéristiques sont perdues et nous confronte ainsi au problème de réparation des systèmes biologiques complexes.

Un biomatériau est un matériau qui soutient ou remplace les fonctions des cellules ou des tissus humains. Il est appelé à travailler simultanément sous contrainte biologique, mécanique, chimique et biochimique. Le terme de « biomatériau » a été redéfini à plusieurs reprises pour s'adapter à l'évolution des types de matériaux (Von Recum et al. 1999). La plus précise et la plus satisfaisante définition a été soumise en 1982 lors de la *National Institutes of Health Consensus Conference* (Bruck 1990): «Un biomatériau est un matériau d'origine naturelle ou synthétique, utilisé seul ou combiné avec un principe actif, comme partie intégrante d'un dispositif, pour le traitement, l'accroissement ou le remplacement de tissus ou organes, sans causer de dommage aigu ou chronique à son hôte, tout en assurant son efficacité biologique et/ou physique prévue, pendant sa durée de service *in vivo*.»

Le remplacement des tissus vivants dont les propriétés physiques sont le résultat de millions d'années d'évolution et d'optimisation est un grand défi que les systèmes implantés doivent relever. En conséquence, les biomatériaux représentent inévitablement un compromis par rapport aux « matériaux » qu'ils sont chargés de remplacer.

Beaucoup de thérapies chirurgicales font appel à des biomatériaux; on peut mentionner, par exemple, les traitements chirurgicaux des traumatismes, les problèmes cardiovasculaires, ophtalmologiques, urologiques ou articulaires, les tumeurs, les maladies dégénératives, etc. C'est la raison pour laquelle les biomatériaux représentent un marché

mondial important et en pleine croissance. La commission européenne estime ce marché mondial à 25 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 5 à 7 %. La part orthopédique des biomatériaux est évaluée au niveau mondial à 8 milliards d'euros avec un taux de croissance annuel de 7 %.

2.1.2 Les biomatériaux orthopédiques et leurs exigences

La physiologie osseuse est très spécifique et varie considérablement en fonction des sites auxquels nous nous adressons. De ce fait, les biomatériaux à usage orthopédique doivent être conçus de manière adaptée à la physiologie du site qu'ils souhaitent reconstruire (Tableau 1). Certains seront destinés à avoir seulement une fonction morphologique (les substituts osseux utilisés comme apport de greffe osseuse), d'autres devront être plus adaptés aux fonctions traditionnelles osseuses telles que le soutien implantaire ou le remplacement de sites à fortes contraintes mécaniques (les implants utilisés pour les arthroplasties et les ostéosynthèses). Pourtant, peu importe leur fonction morphologique, la biocompatibilité, les propriétés mécaniques appropriées et la reproductibilité constituent les principaux points du cahier des charges que doit remplir un biomatériau orthopédique de synthèse.

Tableau 2. 1: Les biomatériaux orthopédiques répondent à deux grandes classes: les implants et les substituts osseux.

Rôle de l'implant	Rôle du biomatériau
combler des défauts de taille importants de l'os (tumeur, vieillissement)	régénération rapide des tissus le comportement du matériau dans le système biologique est important
fixer les os entre eux lors de fracture (clous, vis, plaques)	régénération rapide des tissus des matériaux sans influence particulière sur l'os.
remplacer des parties non fonctionnelles (prothèses, remplacement d'os et de dents)	Les tissus osseux nouvellement formés doivent être en mesure de «traverser» l'implant, ce qui présuppose un comportement adéquat du matériau utilisé

2.1.2.1 La biocompatibilité des biomatériaux orthopédiques est une condition indispensable à leur usage et caractérise l'affinité d'un matériau d'implantation avec le tissu vivant. Elle repose sur une bonne intégration tissulaire osseuse et immunitaire évitant en même temps l'infection. Puisque la surface d'un biomatériau est la première qui entre en contact avec les tissus vivants, le plus grand intérêt des études de biocompatibilité se situe au niveau de cette région d'interaction, appelé *interface* (Davies and Baldan 1997), tout en tenant compte de l'effet réciproque matériau/hôte.

i) L'effet du matériau sur l'hôte

L'os est un tissu vivant dynamique qui subit un remodelage continu. Le résultat de ce remodelage est la formation continue d'interfaces entre le nouvel os (ostéoïde) et le tissu osseux précédent (McClintic 1975). Dans ce contexte, l'implantation d'un biomatériau peut causer des événements curatifs différents de ceux observés dans les conditions naturelles de guérison de l'os (Davies and Baldan 1997) puisque les cinétiques de minéralisation et de déminéralisation de la matrice osseuse interagissent cette fois avec les réactions de surface spécifiques aux matériaux d'implantation (la dégradation, la corrosion, etc.) (Plenk 1998). En conséquence, les propriétés physicochimiques des matériaux prothétiques jouent un rôle essentiel dans la réponse osseuse à l'interface os/implant (Steflik et al. 1997).

En fonction de ces propriétés physicochimiques, plusieurs niveaux d'intégration peuvent être réalisés allant de l'encapsulation dans un cocon de tissu conjonctif afin de l'isoler du reste de l'organisme jusqu'à la formation de liaisons directes plus raffinées au tissu biologique. Une bonne ostéointégration est assurée par des matériaux dont les constituants influencent activement les cellules osseuses environnantes à former une interdigitation avec la surface de l'implant par l'intermédiaire d'une couche interfaciale caractéristique avec des composants de la matrice extracellulaire organique (Yamamuro et al. 1990; Davies 1991). Actuellement, toutes les études visent à améliorer les propriétés de cette interface (Davies 1991; Sennerby 1991) et ensuite l'intégration des biomatériaux dans le tissu osseux.

ii) L'action de l'hôte sur le matériau (dégradation)

Tout comme l'implantation d'un matériau est considérée comme une agression sur l'hôte, la réaction inflammatoire de l'hôte peut être aperçue comme une agression sur l'implant. L'environnement physiologique de l'hôte présente des forces capables d'endommager et même de détruire la structure du matériau (Von Recum et al. 1999). Par exemple, le liquide extracellulaire contient des molécules (électrolytes et enzymes) initiateurs de la corrosion, de l'abrasion et de la dégradation de la surface des matériaux. De plus, les protéines sériques adhésives absorbées à cette même surface peuvent aussi déclencher des réactions oxydantes et hydrolytiques sur le matériau. Toutes ces réactions modifient non seulement les caractéristiques de surface, mais aussi les propriétés chimiques et mécaniques du matériau altérant ainsi sa stabilité (Von Recum et al. 1999). En conséquence, toutes les caractéristiques du matériau sont alors à prendre sérieusement en considération parce qu'elles seront mises à l'épreuve dans la phase aiguë de l'inflammation et seront les initiatrices responsables de diverses réactions au niveau cellulaire (Tesk 2001).

2.1.2.2 Les propriétés mécaniques des biomatériaux orthopédiques.

Un autre aspect qui peut influencer la réponse osseuse à l'interface os/implant est l'effet de l'implant sur le remodelage osseux (Steflik et al. 1997). Le tissu osseux normal, non lésé, présente une capacité d'adaptation aux contraintes mécaniques, limitant ainsi les détériorations structurales. Il modifie sa taille et sa forme afin de s'accommoder à de nouvelles charges mécaniques. Idéalement, un implant osseux devrait montrer une réponse identique au chargement mécanique en tant que l'os. Un problème fréquemment rencontré avec les matériaux actuels d'implantation est que leur module de Young¹ (E) est amplement supérieur à celui de l'os cortical humain. Selon le principe de répartition des charges de la théorie de composites (matériau/os), si un implant avec un module de Young élevé est introduit dans l'os, ce dernier sera soumis à un effort mécanique réduit,

¹ Le module d'Young (E) est le paramètre reliant la déformation du matériau à la contrainte mécanique qui en est responsable.

conduisant ainsi à une perte du support osseux (résorption). De plus, la présence d'un implant perturbe la répartition des charges sur l'os et aboutit à des contraintes multidirectionnelles. Le transfert de ces contraintes occasionne à l'interface biomatériau/os des modifications quantitatives et qualitatives. Le choix d'un biomatériau n'est pas donc univoque mais dépend du volume à combler du site, des contraintes biomécaniques et des conditions locales d'implantation et enfin du but recherché.

On peut conclure que les biomatériaux orthopédiques doivent posséder à la fois des propriétés structurales adaptées à la fonction attendue et des propriétés superficielles capables d'établir des relations positives à l'interface matériau/os. Lorsque ces deux conditions sont réunies, une interaction optimale entre le biomatériau et le tissu hôte aura lieu (Ramakrishna et al. 2001).

Enfin, la réponse d'un hôte à un matériau présente une grande variabilité. Les facteurs qui déterminent cette réponse ne dépendent pas uniquement du matériau. En effet tous les individus ne réagissent pas de la même manière devant un biomatériau. Il ne semble cependant pas exister à ce jour de test permettant de prédire la tolérance d'un individu pour un biomatériau donné.

2.1.3 L'approche biomimétique ou bioinspirée

Les matériaux trouvés dans la nature combinent plusieurs propriétés (sophistication, miniaturisation, organisation hiérarchique, résistance et adaptabilité) qui sont souvent des sources d'inspiration pour la fabrication de nouveaux biomatériaux (Sanchez et al. 2005). Le biomimétisme est un nouveau champ de recherche qui étudie la structure, les fonctions et l'optimisation des matériaux et des systèmes biologiques comme modèles d'inspiration pour la conception des matériaux de remplacement synthétiques (Green et al. 2002). Il réunit les biologistes et les ingénieurs dans leurs essais conjoints afin de produire des matériaux "bioinspirés" pour la réparation ou le remplacement d'importantes parties d'organes (Green et al. 2002). Dans beaucoup de cas, les stratégies biomimétiques ne se mettent pas à copier directement les structures biologiques mais ils visent à soustraire les principaux concepts des systèmes biologiques qui peuvent être

adaptés ainsi dans un contexte synthétique (Kuhn et al. 1996). Les matériaux synthétiques biomimétiques sont invariablement moins complexes que leurs contreparties biologiques et jusqu'à maintenant, les architectures hiérarchiques complexes comme celles observées dans l'os restent en dehors des technologies courantes (Green et al. 2002).

Les approches biomimétiques les plus simples impliquent la conception des systèmes à composants simples qui imitent seulement la chimie du matériau biologique visé (mimétisme de la composition). Cependant, des niveaux croissants de complexité sont demandés pour les approches biomimétiques de fabrication des biominéraux qui possèdent des propriétés fonctionnelles basées sur l'arrangement et sur l'interaction des composants multiples. Ces nouvelles approches biomimétiques exigeront des méthodes innovatrices et des nouvelles stratégies de synthèse chimique des matériaux.

Pour fabriquer des matériaux biomimétiques complexes avec une organisation structurale et morphologique adéquates, les méthodes chimiques doivent être contrôlées au niveau moléculaire et macroscopique. Par exemple, les composites inorganiques/organiques avec une structure multicouche semblable à celle du nacre ont été obtenus par procédés de fabrication impliquant des matrices organiques et l'auto-organisation (Aksay et al. 1996; Almqvist et al. 1999).

Pour la plupart des applications, seulement une reconstitution partielle de la fonction biologique est exigée (essentiellement reliée aux fonctions de base du tissu). En conséquence, le mimétisme de la composition, de la structure et de la microstructure des tissus naturels ne sont pas nécessaires. Puisque les matériaux synthétiques ne peuvent généralement pas accomplir toutes les fonctions biologiques, dans la plupart des cas, l'organisme hôte devra s'adapter également à la présence d'un matériau de substitution étranger ainsi qu'à ses fonctions biologiques disparues ou modifiées.

Les substituts osseux sont un des exemples de la nécessité d'une démarche de biomimétisme dans la réalisation de biomatériaux. Aujourd'hui, les substituts osseux de nouvelle génération sont développés avec une étude approfondie de la structure osseuse, de sa composition chimique et des processus de croissance « gérés par des mécanismes

physico-chimiques et cellulaires ». En effet, le concept de biomimétisme, et particulièrement le mimétisme de la composition, est fréquemment invoqué pour justifier l'utilisation des phosphates de calcium dans les applications orthopédiques (Sanchez et al. 2005).

Ce chapitre a permis une compréhension de la physiologie osseuse et du réseau de phénomènes d'interactions qui s'active après une implantation et durant la séquence de la guérison osseuse. Parallèlement, il nous offre une vision large de l'ensemble des exigences physicochimiques et biomécaniques des biomatériaux par rapport aux composantes cellulaires et humorales de l'hôte pour pouvoir développer des matériaux capables de mieux s'adapter et s'intégrer dans les tissus hôtes.

2.2 Les apatites

2.2.1 Les apatites biologiques

2.2.1.1 Généralités

Le tissu osseux est constitué d'une matrice solide déformable (matrice extracellulaire MEC) saturée par un fluide interstitiel (~9%) dont la teneur en eau est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation (Banks 1993). Cette matrice est comparable à un matériau « composite » naturel qui comporterait une partie organique non rigide (~22%) composée essentiellement de fibres de collagène de type I inscrites dans une matrice minérale (~69%) déposée sous forme de cristaux de structures variables, associés et orientés parallèlement aux fibres de collagène (Figure 2.1) (Driessens 1980). C'est la MEC, au travers de sa microstructure et de la combinaison judicieuse d'éléments organiques et inorganiques, qui confère à l'os l'essentiel de ses propriétés de résistance et de durabilité mécanique (Fawcett 1994).

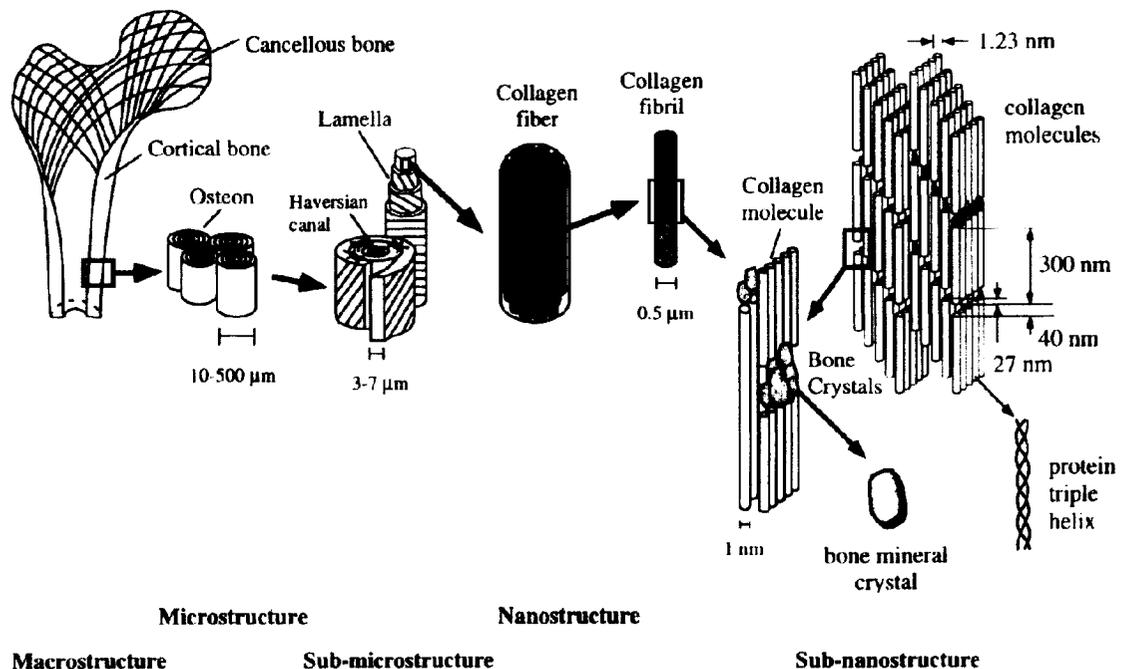


Figure 2.1 : Organisation structurale de l'os (MEC) (Rho et al. 1998)

2.2.1.2 La phase minérale de l'os

Les premières informations concernant la composition chimique des tissus calcifiés datent de 1771 quand Scheele nota que le phosphate de calcium était présent dans l'os. Au XIX^{ème} siècle, des études de diffraction de rayons X montrèrent que la fraction minérale des tissus calcifiés était un phosphate de calcium de structure apatitique. En 1984, Legros démontra que la phase minérale du tissu osseux diaphysaire est constituée d'une apatite carbonatée de type B mal cristallisée (LeGros 1984). Ces cristaux apatitiques de la phase minérale de l'os sont souvent comparés à l'hydroxyapatite (HA) (Figure 2.2) $[(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ à cause de leur ressemblance sur les plans cristallographiques et chimiques avec les minéraux de type apatitique² (Rey 1995).

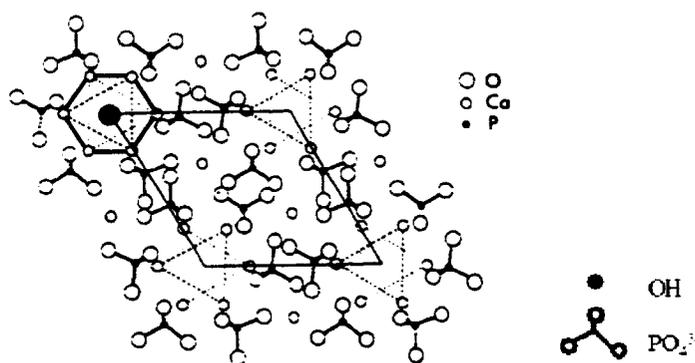
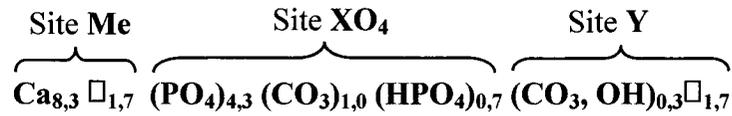


Figure 2.2 : La maille élémentaire cristalline hexagonale de l'HA : l'arrangement des atomes dans la structure et les tunnels hexagonaux occupés par les ions OH (non visible) (Young 1975b)

2.2.1.2.1 La structure chimique de l'apatite biologique

En 1986, à la suite d'analyses structurales et chimiques, Legros décrivait la phase minérale de l'os périostique animal (comparable à l'os cortical) par le modèle suivant (LeGros et al. 1986):

² Une structure cristalline hexagonale (groupe spatial $P_{63/m}$) de formule générique : $Me_{10}(XO_4)_6Y_2$, avec : **Me** cation métallique, **XO₄** groupement anionique et **Y** un anion, tous de charges variées, susceptible d'un grand nombre de substitutions en laissant inchangée la structure cristallographique (Young 1975; LeGros et al, 1980).



L'apatite biologique est une apatite phosphocalcique³ non-stœchiométrique, poly-substituée⁴ au site XO₄ en proportion de 70 % par des ions phosphate trivalents (PO₄³⁻) et en proportion de 30 % par des ions carbonate (CO₃²⁻) ou hydrogénophosphate (HPO₄²⁻) (LeGros et al. 1986). Le site Y est généralement occupé par deux ions très mobiles : carbonate (CO₃²⁻) et hydroxyde (OH⁻), tandis que des cations magnésium (Mg²⁺) ou sodium (Na⁺) peuvent se substituer à l'ion calcium (Ca²⁺) (site Me) (LeGros et al. 1986). Il a été également démontré que chaque structure osseuse possède sa propre composition chimique et cette dernière peut évoluer au sein de la même structure (Young 1975a; Sodek et al. 2000). Par exemple, pour le même individu, les tissus osseux jeunes avec un rythme accéléré de renouvellement, contiennent une apatite mal cristallisée (avec un rapport Ca/P faible ~1.33), relativement soluble, et riche en carbonates (CO₃²⁻). Les tissus osseux âgés ou avec une vitesse de renouvellement réduite, comme les os plats du crâne, contiennent des apatites plus cristallisées avec un rapport Ca/P qui tend vers celui de l'HA stœchiométrique (1,67) (Sodek et al. 2000). Les dents (surtout l'émail) possèdent une proportion supérieure de phase inorganique (plus de 97%) que les autres os du squelette. Ils sont constitués de larges cristaux d'apatites partiellement fluorée (les ions fluorures se substituent jusqu'à 10 % aux ions hydroxydes) conférant une meilleure résistance à la dissolution (Young 1975a). La maille élémentaire de la fluoroapatite (Ca₁₀(PO₄)₆F_x(OH)_{2-x}) est semblable à celle de l'HA mais avec un volume sensiblement plus restreint à cause de la taille légèrement plus faible de l'ion F⁻ par rapport au groupement OH⁻ (Beever and Mc Intyre 1945). Il a également été démontré que les différents teneurs ioniques au sein des tissus osseux évoluent avec l'âge du sujet (LeGros 1984).

³ Les ions Ca²⁺ s'inscrivent dans les sites Me de la structure

⁴ La polysubstitution génère la présence de lacunes notées \square_x (non-stœchiométrie) sur les sites Me et Y.

2.2.1.2.2 La formation de l'apatite biologique (la biominéralisation)

La minéralisation de l'apatite biologique implique la nucléation et la croissance des cristaux d'apatite à partir des ions Ca^{2+} et PO_4^{4-} en solution. Les conditions de minéralisation dépendent de la concentration et de la solubilité des ions considérés. Quand les concentrations des ions atteignent un certain seuil, la nucléation est déclenchée par un transfert du calcium et du phosphate, du milieu extracellulaire aux sites de nucléation avec l'apparition des premières mailles du réseau cristallin. Grâce à un certain modèle dont l'organisation est adaptée à la configuration ionique du cristal, les ions s'y fixent et se réarrangent entre eux pour former une maille cristalline.

Après la précipitation initiale des cristaux d'HA, leur taille augmente rapidement par accrétion⁵ et ils confluent vers d'autres foyers de cristaux engendrant une minéralisation progressive de l'ostéoïde. Ces inductions en chaîne provoquent une précipitation massive et brusque de sels minéraux. Lorsque les cristaux atteignent une taille suffisante, le dépôt se ralentit considérablement. Plusieurs observations ont conduit aussi à penser que les interactions entre les protéines de la MEC et la matrice minérale dans le tissu osseux sont par ailleurs corrélées au processus de biominéralisation (Sommer et al. 1996; Sodek et al. 2000).

2.2.1.2.3 La structure de l'apatite biologique

Le cristal d'apatite biologique carbonaté a l'aspect d'une aiguille hexagonale (Figure 2.3A) dont les atomes sont organisés en ensembles répétés régulièrement dans les trois dimensions de l'espace. La maille cristalline (Figure 2.3C) est un parallélépipède qui se définit par trois axes et trois angles. Trois mailles s'agencent en formant un prisme droit à base hexagonale. Une série de prismes s'associe en un cristal (Figure 2.3B). Les cristaux sont tassés les uns contre les autres, fixés entre eux sur les fibres de collagène, et orientés parallèlement autour des ces fibres (Figure 2.3D). Ainsi la phase organique est entièrement emprisonnée dans la masse cristalline assurant la minéralisation de

⁵ Formation de nouvelles mailles sur chaque face de première maille qui à leur tour induisent la formation de nouvelles mailles

l'ostéoïde. La configuration tridimensionnelle de l'apatite confère une grande surface spécifique d'échange (2m^2 par gramme de cristal) entre le cristal d'apatite et le liquide interstitiel (Banks 1993).

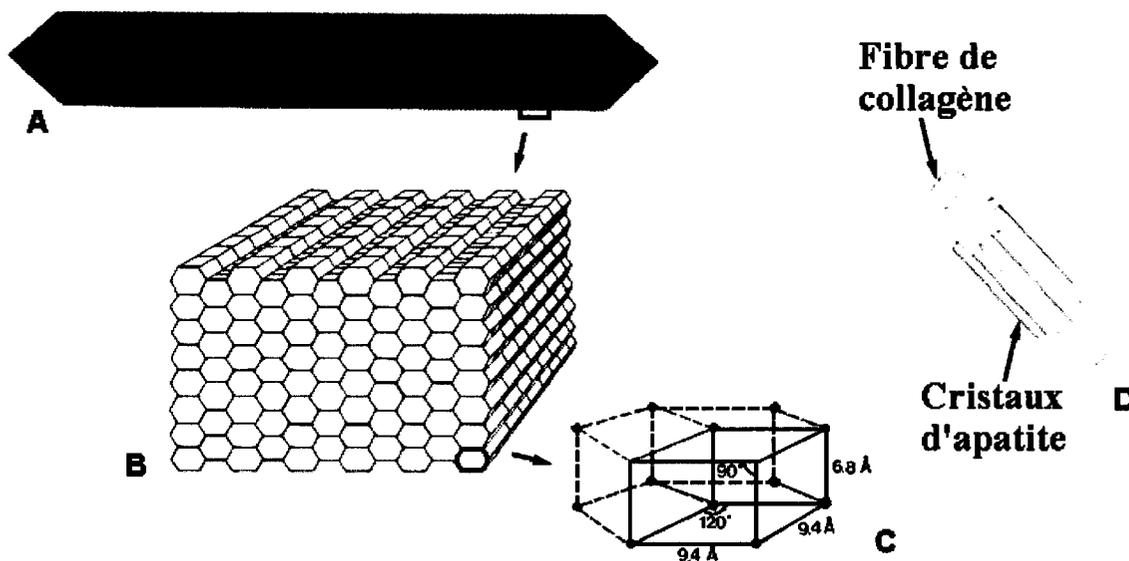


Figure 2.3 : La structure de l'apatite biologique : (A) Le cristal d'HA a l'aspect d'une aiguille hexagonale ; (B) Une série de mailles s'associe en un cristal d'HA ; (C) La maille du cristal d'HA ; (D) La phase organique est entièrement emprisonnée dans la masse cristalline (Rho et al. 1998)

2.2.1.2.4 Les fonctions de l'apatite biologique

Dans l'organisme humain l'apatite biologique assurent deux fonctions principales: une fonction mécanique et une fonction physiologique. Au niveau mécanique, l'HA doit permettre aux tissus durs d'atteindre une certaine rigidité et donc de supporter des contraintes généralement complexes et élevées. Cette rigidité est influencée par le degré de minéralisation et la structure des cristaux apatitiques de la phase inorganique (Fawcett 1994).

La fonction physiologique est associée au métabolisme du phosphore et du calcium. Ils constituent pour l'organisme une réserve en calcium, en phosphore ainsi qu'en de nombreux éléments (e-g. oligoéléments) qui entrent pour une part mineure dans la composition des phosphates biologiques.

2.2.2 Les apatites synthétiques

2.2.2.1 Généralités

L'os en tant qu'organe peut développer des interfaces tissulaires osseuses ou fibreuses suite au contact avec les matériaux orthopédiques (Steflik et al. 1997). De plus, le côté biologique de l'interface os/biomatériau est grandement plus dynamique que le côté du matériau puisque non seulement les cellules, mais aussi la MEC de l'os interviennent avec l'implant (Plenk 1998). Durant la minéralisation osseuse, le phosphate de calcium présent dans la phase minérale de l'os naturel précipite à l'interface biomatériau/os, phénomène qui est responsable de la formation à cette interface d'une liaison chimique entre l'apatite biologique (associée au collagène) de la MEC et l'implant.

Tous les matériaux prothétiques semblent détenir une chimie de surface dynamique qui induit des changements histologiques positifs ou négatifs du côté biologique de l'interface. Malheureusement, une interface matériau/tissu possédant des bonnes caractéristiques pour les interactions cellule/matériau (adhésion, prolifération ou expression) ne conduit pas nécessairement à une bonne interaction tissu/matériau. Donc, un biomatériau orthopédique doit posséder des caractéristiques qui lui permet de promouvoir l'adhérence et des fonctions de régulation de nombreux processus cellulaires au sein du tissu osseux, en accélérant le processus de guérison et en assurant une meilleure ostéointégration (Yamamuro et al. 1990; Davies 1991).

2.2.2.1.1 Les phosphates de calcium

Les phosphates de calcium (CaP) synthétiques forment une famille de composés chimiques de structure et de compositions variables (Brown et al. 1987; Johnsson and Nancollas 1992; Schmitt 2000). Ils forment une classe privilégiée de biomatériaux grâce à leur bonne biocompatibilité, biodégradabilité et bioréactivité avec le tissu osseux. Ces matériaux ont une composition chimique voisine de celle de la phase inorganique du tissu naturel (contiennent du calcium (Ca^{2+}) et des groupements phosphate (PO_4^{3-})), ce qui leur permettent d'interagir aisément avec l'environnement biologique et d'établir des

liaisons fortes avec la MEC du tissu osseux (Frayssinet et al. 1993). De plus, par dégradation, ils libèrent des constituants calciques et phosphates, facilitant et amplifiant l'ostéoconduction ainsi que l'attachement os/implant (Yamamuro et al. 1990). Ils peuvent apparaître sous différentes formes : hydrates, hydroxydes ou anhydres et sont habituellement décrits par le rapport stœchiométrique des deux éléments chimiques principaux calcium/phosphate (Ca/P).

L'hydrosolubilité des CaP permet de prédire leur comportement *in vivo* (Driessens and Verbeeck 1988). Les isothermes de solubilité des CaP à pH = 7.0 (Figure 2.4) ont permis de classer ces composés par ordre décroissant de vitesse de dégradation *in vivo* comme suit (voire Tableau 2.2 pour les abréviations) (Verecke and Lemaître 1990):



Pourtant, un CaP de solubilité élevée est très réactif et peut développer par un phénomène de surface des couches de CaP faiblement soluble réduisant ainsi sa vitesse de dégradation (Driessens 1989).

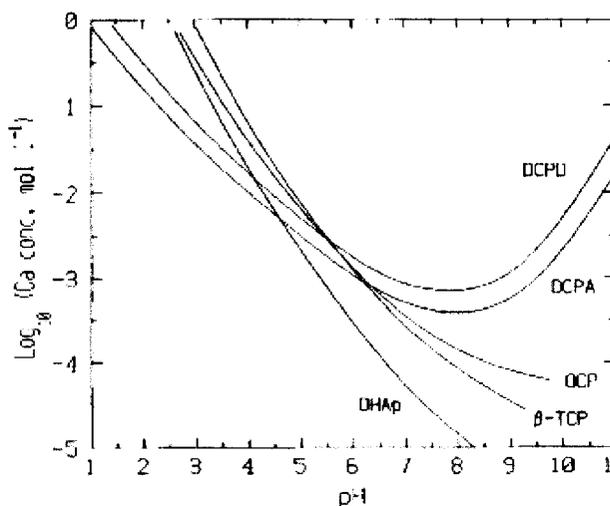


Figure 2.4 : Les isothermes de solubilité des CaP à 37°C pour un système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$. La solubilité est exprimée en quantité total d'ions de calcium contenus en solution (Verecke and Lemaître 1990).

Les principaux CaP sont répertoriés dans le Tableau 2.2. Ils sont listés dans le sens de basicité accrue, qui coïncide avec la diminution de solubilité en milieu physiologique. Parmi tous ces CaP, les principaux composés phosphocalciques souvent rencontrés dans l'étude des substituts osseux sont le TCP et l'HA.

2.2.2.1.2 Le TCP (β - et α -) et son intérêt biologique

Le TCP cristallise à haute température sous trois variétés polymorphes. La forme β -rhomboédrique est la plus utilisée pour la fabrication de substituts osseux due à sa vitesse de résorption « adaptée » à la vitesse de croissance osseuse et à sa stabilité thermodynamique à la température ambiante ($T > 1180^\circ\text{C}$) (Mathew et al. 1977; Royer et al. 1993; Tampieri et al. 1997; Raynaud et al. 2002a; Raynaud et al. 2002b). La phase α -monoclinique est beaucoup plus soluble et plus biodégradable que la phase β -. Le α -TCP est thermodynamiquement stable à haute température ($1120^\circ\text{C} < T < 1470^\circ\text{C}$) mais elle devient métastable⁶ au dehors de cet intervalle (Mathew et al. 1977). Cette phase est souvent le composant principal de la plupart des ciments apatitiques. La phase $\bar{\alpha}$ est généralement très difficile à observer en raison de sa faible concentration et de son domaine très élevé de stabilité thermique ($T > 1470^\circ\text{C}$) (Mathew et al. 1977).

Malgré une excellente intégration osseuse, la résorption du TCP reste très variable et toujours bien moindre que celle prévue au début. De plus, il semble qu'à partir d'un moment donné cette résorption s'arrête (Bonnevialle et al. 2002; Galois et al. 2002). Un autre problème rencontré avec cette céramique est sa faible contrainte à la rupture, en particulier lorsque les processus de résorption sont enclenchés. De ce fait, le TCP est utilisé seulement comme apport de greffe osseuse synthétique pour les reconstructions osseuses ne subissant aucune charge mécanique importante et avec un remplacement progressif de la masse osseuse.

⁶ possède une stabilité apparente hors des conditions définies par le diagramme d'équilibre

Tableau 2.1: Les principaux CaP

Nom	Abréviation	Formule Chimique	Ca/P	Références
Phosphate monocalcique anhydre	MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,50	(Bohner 2000)
Phosphate monocalcique monohydraté	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50	(Lemaître et al. 1987)
Phosphate dibasique anhydre (monétite)	DCPA	CaHPO_4	1,00	(Getter et al. 1972; Bohner 2000)
Phosphate dibasique dihydraté (brushite)	DCPD	$\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	(de Groot 1985)
Phosphate octocalcique	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	(Tung and Brown 1985)

Tableau 2. 2 : Les principaux CaP (suite)

Nom	Abréviation	Formule Chimique	Ca/P	Références
Phosphate tricalcique amorphe	TCPam ou ACP	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6, n\text{H}_2\text{O}$	1,50	(Zahidi et al. 1985)
Phosphate tricalcique α et β	TCP (α, β)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	Voir chapitre : 2.2.2.1.2 Le TCP (β - et α -)
Hydroxyapatite précipitée	PHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,50-1,67	Un CaP ayant une chimie complexe due à son rapport molaire Ca/P variable. Sa solubilité est variable en fonction de la méthode de synthèse et augmente avec la diminution du rapport molaire de Ca/P, de la cristallinité, et de la taille des cristallites. Les cristallites sont nanométriques mal cristallisées très semblables à l'apatite biologique. La différence principale de l'apatite biologique est l'absence de substitutions de carbonate et de magnésium dans la structure.
Hydroxyapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Voir chapitre : 2.2.2.2 L'HA phosphocalcique
Oxyapatite	OXA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67	Une phase difficile à détecter obtenue par la décomposition partielle de l'HA ($T > 900^\circ\text{C}$).
Phosphate tétracalcique monoxyde	TCPM	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,00	Le CaP le plus basique connu, biocompatible avec une très faible biodégradabilité et sans aucun intérêt biologique.

2.2.2.1.3 L'HA et son intérêt biologique

De tous les composés phosphocalciques, l'HA est la plus étudiée (Figure 2.5). Sa composition peut varier dans un domaine dont le rapport Ca/P varie entre 1,33 et 1,67 quoique seulement le rapport Ca/P = 1,67 définit l'HA stœchiométrique de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Les HA sont généralement préparées par mélange de solutions aqueuses de phosphore et de calcium par des méthodes de précipitation. Les expériences montrent que les HA précipitées spontanément sont non-stœchiométriques, avec un rapport Ca/P inférieur à 1.67, appelés apatites déficientes (les composés PHA et OCP du Tableau 2.2) possédant des lacunes en site cationique (Ca^{2+}) ou anionique (OH^-) (LeGeros 1991). Leur maturation en milieu aqueux conduit par la suite à une évolution de l'apatite vers une phase de plus en plus stœchiométrique et de moins en moins soluble : $K_s^7 = 2.2 \cdot 10^{-117}$ (mol.L^{-1})⁹ à 25 °C et $K_s = 5.5 \cdot 10^{-118}$ (mol.L^{-1})⁹ à 37°C (Mc Dowell et al. 1977; LeGeros 1991).

Grâce à ses propriétés remarquables d'adsorption de molécules organiques (alcools, acides aminés, protéines) (Elliott 1994), l'HA est utilisée en chromatographie pour séparer des composés biologiques et en catalyse hétérogène solide-gaz (déshydratation d'alcools, substitutions) (Kawasaki et al. 1986). Grâce à sa ressemblance aux cristaux d'apatite biologique et aux excellentes propriétés de biocompatibilité, de bioactivité et d'ostéoconduction (favorise la repousse osseuse), elle s'avère être une céramique appropriée pour les dents ou les os artificiels en trouvant des nombreuses applications dans le domaine orthopédique (Gross and Berndt 1991). Malheureusement, en raison de la basse fiabilité, particulièrement dans des environnements aqueux⁸, et des faibles propriétés mécaniques⁹, l'HA ne peut pas être utilisée dans le cas de contraintes importantes. Son application médicale est limitée à de petits implants sans sollicitation mécanique importante ou à des applications sous forme de poudre ou de revêtements de prothèses (Aoki 1991; Hench 1991). De plus, le comportement de l'HA en milieu

⁷ ou K_s représente le coefficient de solubilité

⁸ Module de Weibull faible, $m = 5-12$ (Hench 1991)

⁹ Ténacité à la rupture basse $K_{Ic \text{ HA}} = 1.0 \text{ MPa/m}^{1/2}$ comparativement au $K_{Ic \text{ os humain}} = 2-12 \text{ MPa/m}^{1/2}$ - direction de mesure non spécifiée (Hench 1991)

biologique, et plus particulièrement sa réponse face à l'activité cellulaire, s'éloigne de celui de l'apatite biologique naturelle.

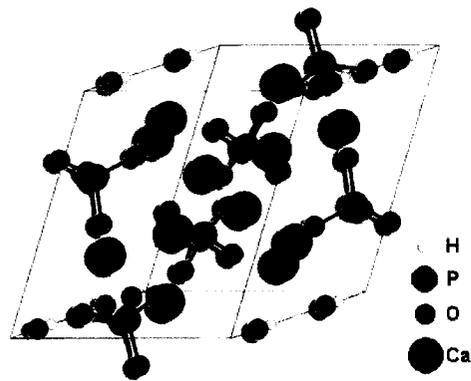


Figure 2.5 : Le cristal tridimensionnel d'HA

Depuis plusieurs années, la principale application clinique de l'HA est le recouvrement des implants métalliques bioinertes. Des expériences *in vitro* et des observations *in vivo* ont démontré que les métaux et les alliages sont source de nombreux irritants chimiques (Coleman et al. 1974; Pulpura and Kohn 1992; Davies and Baldan 1997; Woodward 1999). Ils peuvent libérer des constituants, tels que les ions, susceptibles de provoquer une réaction immunitaire à médiation cellulaire (Remes and Williams 1992) augmentant ainsi le risque d'infection au site d'implantation (Coleman et al. 1974; Woodward 1999) et conduisant à l'encapsulation de l'implant dans du tissu fibreux dense. Cette couche biologique empêche une distribution appropriée de l'effort mécanique pouvant causer la défaillance de l'implant.

Les revêtements d'HA offrent une phase biocompatible et une intégration complète implant/tissu. Ce concept de recouvrement avec l'HA combine l'excellente biocompatibilité et bioactivité de l'HA avec les avantages mécaniques des alliages métalliques.

Les revêtements d'HA accomplissent plusieurs fonctions :

- favorisent une fixation rapide et stable implant/os en réduisant au minimum les effets adverses sur l'environnement biologique

- jouent un rôle de barrière en diminuant la libération des ions métalliques de l'implant dans le corps et en protégeant la surface métallique de l'attaque biologique et
- augmentent l'ostéointégration dans le cas des implants poreux métalliques (Cheang and Khor 1996).

Ces revêtements d'HA sont fabriqués par diverses méthodes de dépôt et varient de 40 μ m à 200 μ m d'épaisseur (Suchanek and Yoshimura 1998). D'ailleurs, cette épaisseur doit être assez grande pour résister à la résorbabilité de l'HA, qui peut atteindre 15-30 μ m par année (de Groot 1993). D'une part, la teneur en ions métalliques libérés par le substrat dans le corps est inversement proportionnelle à l'épaisseur du revêtement d'HA (Sousa and Barbosa 1995; Sousa and Barbosa 1996).

D'autre part, les revêtements d'HA ne devraient pas contenir d'impuretés de fabrication, tels que : d'autres phosphates de calcium (Tableau 2.2), du phosphate de calcium amorphe, ou du CaO. Ces impuretés, facilement formées durant la fabrication (van Dijk et al. 1996), diminueront la stabilité chimique et augmenteront la dégradation du revêtement (Shirkhanzadeh et al. 1994).

Ces revêtements d'HA ont été appliqués non seulement aux métaux (l'alliage de Ti ou l'alliage Ca-Cr-Mo) mais également aux implants de carbone, aux céramiques frittées de ZrO₂ et d'Al₂O₃, et même aux polymères (i.e. polyméthacrylate de méthyle PMMA) (Suchanek and Yoshimura 1998).

Sous forme dense ou poreuse, l'HA est actuellement utilisée pour des applications sans sollicitation mécanique importante : les implants dentaires renforcés par une âme métallique, l'augmentation de la crête alvéolaire, les osselets de l'oreille (application O.R.L), la reconstruction maxillo-faciale, et des dispositifs d'accès percutané pour la dialyse péritonéale continue ambulatoire, pour la surveillance de la pression artérielle et de la glycémie (Suchanek and Yoshimura 1998; Orlovskii et al. 2002).

2.2.2.2 La synthèse de l'HA

2.2.2.2.1 Les étapes de la synthèse de l'HA

Pour tous les types d'applications, le procédé d'élaboration de l'HA débute par la synthèse de *poudres spécifiques*. La poudre obtenue peut être directement déposée à la surface des implants par diverses techniques dans le but d'obtenir des revêtements d'HA ou peut être mise en forme dans le but d'obtenir une pièce céramique (Burgess et al. 1999; Tadic et al. 2002). Le passage de l'HA préformé à l'HA dense se fait par un traitement thermique à haute température appelé frittage¹⁰. Le frittage représente l'ensemble des phénomènes produits lors de la consolidation et de la densification. Ceci permet de transformer la poudre en une masse homogène avec la formation de nouvelles liaisons entre les particules (Landi et al. 2000; Bernache-Assollant et al. 2003). C'est un procédé qui influence la stabilité des phases et la densification de l'HA, et qui a des conséquences sur les propriétés physico-chimiques, la composition et les propriétés mécaniques du produit final. Donc, le but du frittage est d'adapter les caractéristiques physiques, chimiques et éventuellement structurales de l'HA à l'application visée (Raynaud et al. 2002a; Raynaud et al. 2002b; Bernache-Assollant et al. 2003; Destainville et al. 2003).

Après le frittage, l'HA n'est pratiquement jamais un matériau en état d'équilibre thermodynamique¹¹. Sa structure finale est en relation étroite avec la structure de la poudre de départ, ainsi qu'avec « l'histoire » de fabrication thermique subie par la poudre durant sa transformation en « produit fini » fritté. La compréhension des mécanismes physico-chimiques intervenant lors de l'étape de frittage est nécessaire à son optimisation et passe par l'étude de la stabilité thermique des composés (Landi et al. 2000; Tadic et al.

¹⁰ Les températures appliquées sont normalement inférieures à la température de fusion du constituant principal.

¹¹ Les différents états d'un matériau représentent les diverses **phases** contenues dans le matériau et qui peuvent changer en fonction des conditions imposées à ce « **système thermodynamique** ». Pour des conditions fixées, il faut un certain temps de maintien à haute température pour stabiliser le système dans un état apparemment définitif, qui s'identifie à l'**équilibre thermodynamique stable** du système. Pour réaliser l'équilibre, il est nécessaire que tous les atomes des constituants puissent se déplacer à l'intérieur de toutes les phases : c'est ce que l'on appelle la **diffusion chimique**. Dans les phases cristallisées pour la diffusion chimique il faut dépasser une certaine « température de diffusion » pour obtenir le mouvement interne des atomes, qui s'effectue par permutation sur les sites vacants du réseau cristallin. En pratique, l'état d'équilibre est rarement complètement atteint et les phases solides qui le constituent ne présentent pas une composition homogène.

2002). Donc un intérêt considérable est porté aux méthodes de synthèse de poudres spécifiques qui est une étape importante et obligatoire pour la mise en œuvre d'une céramique.

2.2.2.2.2 Synthèse et propriétés de poudres spécifiques d'HA

Un certain nombre de combinaisons entre le calcium et les précurseurs de phosphore peut être utilisé pour la synthèse de l'HA. Ces méthodes de préparation ont été classifiées selon le type de réaction chimique et toutes exigent un rapport molaire correct de 1.67 entre le Ca et le P dans le produit final (Orlovskii et al. 2002). Les diverses réactions de synthèse (hydrolyse, polycondensation, etc.) ainsi que les différentes températures exigées pour former la structure apatitique dépendent en grande partie de la nature chimique des précurseurs. Deux grands types de réactions sont généralement utilisés : la réaction en phase solide (voie sèche) (Cao and Hench 1996) et la précipitation en milieu aqueux (voie humide) (Orlovskii et al. 2002) qui, à son tour, est divisée en plusieurs groupes : réactions de précipitations, hydrothermales (Monma 1980) et d'hydrolyse. On trouve aussi des méthodes alternatives de synthèse dont la méthode sol-gel, en flux, l'électro-cristallisation, l'irradiation micro-onde, mécano-chimique, et la lyophilisation (Orlovskii et al. 2002). Le Tableau 2.3 résume les principales méthodes de synthèse de l'HA utilisées dans la littérature.

Chaque méthode de synthèse conduit à des composés de pureté, de stœchiométrie, de cristallinité et de grandeurs structurales (la taille et la forme de la cristallite) différentes. Ces propriétés cristallographiques sont importantes puisqu'elles déterminent ensuite les performances *in vitro* et *in vivo* (bioactivité, biocompatibilité, stabilité chimique et physique, propriétés mécaniques, etc.) de l'HA (Kumar et al. 2004). Ainsi le procédé de synthèse choisi est essentiel et il décidera de ses propriétés ultérieures d'utilisation. Par exemple, les poudres élaborées par des **réactions en phase solide** sont bien cristallisées (Cao and Hench 1996) avec de bonnes aptitudes au frittage. Dans le cas des **réactions de précipitation**, on obtient de cristaux de taille nanométrique sous forme d'aiguille, de bâtonnets ou équiaxiques. Leur cristallinité et le rapport Ca/P dépend fortement des

conditions de synthèse et sont généralement plus réduits que pour l'HA stœchiométrique et, bien cristallisée. Les *techniques hydrothermales* offrent des produits avec un haut degré de cristallinité et un rapport Ca/P proche de celui de l'HA stœchiométrique (1.67). Ils sont constitués de cristaux de taille variant du nanomètre à millimètre. L'HA obtenue par *hydrolyse* est non stœchiométrique avec des microcristaux sous forme d'aiguilles et d'ailettes.

Tableau 2.2: Les principales méthodes de synthèse de l'HA

Procédé		Réactifs	Références	
<i>processus chimiques par voie humide</i>	<i>précipitation et coprécipitation en solution aqueuse</i> (méthode par double décomposition)			<p>Cette technique permet également d'obtenir des apatites mixtes (contenant deux cations différents) avec une maîtrise du rapport Me1/Me2. Exige de basses températures de réaction <100°C. Les inconvénients de la méthode : la mise en œuvre nécessite beaucoup de matériel, et la vitesse de synthèse lente.</p>
	<i>réaction hydrothermale</i>	<p>Les réactifs de départ spécifique sont le CaCO₃ et le phosphate d'ammonium ou le Ca(NO₃)₂ et le (NH₄)₂HPO₄ en ammoniac aqueux (NH₄OH).</p>	<p>permet d'obtenir une meilleure cristallinité des poudres comparées aux méthodes classiques par précipitation. Ce procédé implique des réactions aux températures et aux pressions élevées exigeant un équipement coûteux (Elliott 1994; Zhang and Gonsalves 1997; Orlovskii et al. 2002).</p>	<p>un autre phosphate de calcium (phosphate tricalcique, monérite, brushite, ou octacalcium phosphate)</p>
	<i>hydrolyse</i>		<p>exige généralement de basses températures de réaction (<100°C)</p>	

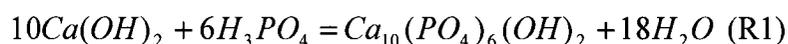
Tableau 2.3 : Les principales méthodes de synthèse de l'HA (suite)

Procédé		Réactifs	Références
<i>réaction en phase solide</i> (voie sèche)	<i>calcination, pyrolyse</i>		
<i>procédé sol-gel</i>	<p>consiste à chauffer à 1000-1300°C un mélange réactionnel homogène, constitué des divers sels des cations et des anions, dans un rapport Me/XO₄ égal à 1,67. Les vapeurs d'eau sont utilisées comme source des groupes OH (Orlovskii et al. 2002).</p> <p>basé sur la polymérisation de précurseurs de type alcoxydes de phosphore et de calcium M(OR)_n dans lesquels l'atome (M) est entouré de groupements OR où R est un groupement alkyle simple (méthyle CH₃ ou éthyle C₂H₅).</p>	<p>Ca₃(PO₄)₂ et CaCO₃, Ca₂P₂O₇ et CaCO₃, CaHPO₄ et CaO Ca(OH)₂ et CaCO₃ ou CaHPO₄ et CaCO₃ Ca₃(PO₄)₂ et CaO</p> <p>Ca(NO₃)₂·4H₂O et PO(CH₃O)₃ Ca(NO₃)₂·4H₂O et PO(C₂H₅O)₃ CaCl₂ et Na₂HPO₄ Ca(NO₃)₂ et (NH₄)₂HPO₄ Ca(NO₃)₂·4H₂O et NH₄H₂PO₄</p>	<p>Liu et al, 2002 Hsieh et al, 2001 Andersson et al, 2005 Slosarczyk et al., 1996; Mortier et al, 1989; Barinov et Komlev, 2001 Gan et Pilliar, 2004</p>
<i>réaction en sels fondus</i>		<p>permet une mise en forme aisée des matériaux (films denses, poudres ultrafines...) avec de nombreuses applications</p> <p>permet de se rapprocher des conditions de synthèse de certaines apatites naturelles</p>	

2.2.2.2.3 Les réactions de précipitation acide-base

Parmi toutes ces méthodes de synthèse, *les précipitations en milieu aqueux* semblent les plus intéressantes et les plus faciles puisqu'elles demandent de basse température de synthèse et un coût réduit. De plus, elles permettent, à partir de conditions de synthèse, de mieux contrôler et optimiser les propriétés du produit final. La poudre obtenue est fine, homogène de haute pureté avec un contrôle de la texture beaucoup plus facile que dans les synthèses à hautes températures. Par contre, à cause de leur surface spécifique élevée, les poudres précipitées ont une grande tendance d'agglomération au cours du séchage ce qui entraîne une étape de broyage avant l'utilisation (Orlovskii et al. 2002).

La préparation de l'HA par précipitation en solution aqueuse peut être effectuée à partir de nombreux précurseurs de calcium et de phosphore. Parmi les différentes méthodes de précipitation, la synthèse par précipitation acide-base selon la réaction (R1) est très populaire en raison de la facilité de préparation et du niveau relatif de reproductibilité (Orlovskii and Barinov 2001). De plus, la réaction de précipitation (R1) est simple obtenant l'eau en tant que « sous-produit » de synthèse et ayant des conditions de synthèse facilement contrôlables (température de synthèse, vitesse d'addition de l'acide, durée de vieillissement, etc.) (Patel et al. 2001).



Les conditions de précipitation, influencent la morphologie et la pureté de la phase du produit final (HA). Ces paramètres de synthèse contrôleront la réaction de précipitation et la formation des cristaux apatitiques.

i) La température de synthèse

La forme et la taille des cristallites sont sensiblement influencées par la température de synthèse (Figure 2.6). Les basses températures de synthèse mènent à la formation des monocristaux en forme d'aiguille (Figure 2.7a). Leur forme devient plus arrondie (une croissance de taille) en augmentant la température de synthèse (Figure 2.7b). Les cristallites de taille maximale (Figure 2.6a) sont obtenus à une « température de

transition » (60°C) quand l'accroissement monocristallin s'arrête et quand la vitesse de formation des germes cristallins (la vitesse de nucléation) devient supérieure à leur vitesse de croissance. Au-dessus de cette température les produits de synthèse sont polycristallins (Bouyer et al. 2000). D'ailleurs, les vitesses d'addition de l'acide quasi-instantanés ($V_{\text{add}} = 2400$ ml/minute) mènent à une morphologie des particules d'HA différente et de type fibre (Figure 2.7c).

La température de synthèse se reflète aussi dans la surface spécifique des nanoparticules d'HA. De plus, à la même « température de transition » (60°C), lorsque les cristallites ont atteint leur taille maximale, on peut observer une forte diminution de l'aire de surface spécifique (S_w) (Figure 2.6b). En conclusion, l'augmentation de la température de synthèse limite la surface spécifique ainsi que le facteur de forme (Fs).

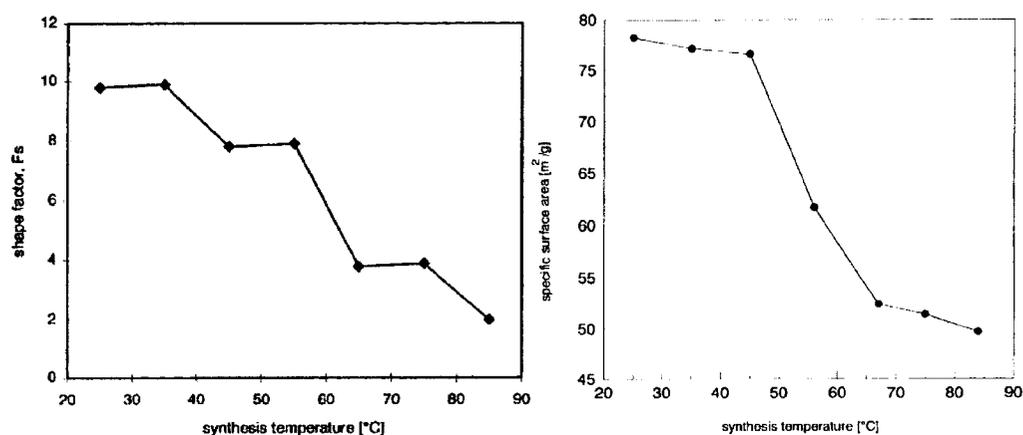


Figure 2.6 : (a) L'évolution du facteur de forme (Fs est le rapport longueur/largeur) des cristallites en fonction de la température de synthèse; (b) L'évolution de l'aire de surface spécifique (S_w) en fonction de la température de synthèse (Bouyer et al. 2000).



Figure 2.7 : Nanocristaux d'HA synthétisés à différentes températures de réaction (a) 35°C; (b) 85°C. (c) synthétisés avec le $V_{add} = 2400$ ml/min (Bouyer et al. 2000)

ii) La vitesse d'addition de l'acide phosphorique

Le problème fréquemment rencontré durant les synthèses d'HA à basse température est la présence de la phase résiduelle d'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$). Quand l'acide est introduit à des vitesses élevées, le pH du mélange réactionnel diminue menant à la dissociation incomplète de l'acide. En absence d'ions PO_4^{3-} , la formation de la structure d'HA n'est pas complète. Dans ces conditions l'HA synthétisée peut contenir une fraction de dihydrogenophosphate (H_2PO_4^-) ou des ions hydrogenophosphate (HPO_4^{2-}) substitués aux ions phosphate (PO_4^{3-}) pouvant ainsi expliquer la présence de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ résiduel. Par conséquent, la vitesse d'addition de l'acide influence la pureté du produit final et la valeur du pH à la fin de la réaction est un bon indicateur de la teneur en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ résiduel. Pour éviter la présence de cette phase non désirée, la vitesse d'addition de l'acide devrait être maintenue à une valeur basse (Bouyer et al. 2000).

En conclusion, les conditions favorables de la synthèse de l'HA pur et monocristallin nécessitent une température de réaction plus basse que 60°C couplée à une vitesse modérée d'addition H_3PO_4 supposant un pH raisonnablement élevé à la fin de la réaction ($\text{pH} > 10$). D'ailleurs, la durée de synthèse est définitoire du taux de cristallinité de l'HA (Landi et al. 2000).

2.2.2.3 Le frittage de l'HA

Le frittage de l'HA permet de faire les connections entre les grains de poudre. Ces connexions doivent être fortes pour avoir une structure stable en milieu biologique. Donc, un bon contrôle du cycle de frittage s'avère essentiel dans l'optique d'une utilisation médicale future.

Dans le cas des apatites, la problématique majeure associée au frittage est de pouvoir densifier le matériau avant sa décarbonatation afin d'éviter l'apparition de phases secondaires indésirables telles que le CaO ou le CaCO₃. En fait, c'est le rapport molaire de Ca/P qui doit être très proche de la valeur théorique (1.67) afin d'éviter ces décompositions chimiques de l'HA qui peuvent ultérieurement affecter la densification (Landi et al. 2000).

2.2.2.3.1 Le comportement thermique des HA

Pendant les opérations de calcination et de frittage, plusieurs stades sont atteints (Figure 2.8).

De 25 à 200°C, l'HA stoechiométrique (Ca/P = 1.67) subit une perte réversible d'eau adsorbée ou liée faiblement sans effet sur les paramètres du réseau.

De 200 à 400°C, il y a perte irréversible d'eau du réseau cristallin, avec une contraction de ce dernier (Rey 1995). Cette eau est présente seulement dans le cas d'apatites préparées en solution aqueuse (Kohn 2003).

À 800°C et plus, on rencontre une déshydratation réversible totale ou partielle influencée par la pression partielle d'eau. Selon cette réaction à l'équilibre (R2) de l'oxyhydroapatite est formée.



Si de l'eau est ajoutée, la réaction est favorisée vers la gauche et stabilise l'hydroxyapatite de calcium. Cette structure est conservée jusqu'à 1100°C (Rey 1995). La pression partielle de l'eau influence aussi la densification, le grossissement du grain et les propriétés mécaniques de l'apatite (Janot and Ilschner 2001).

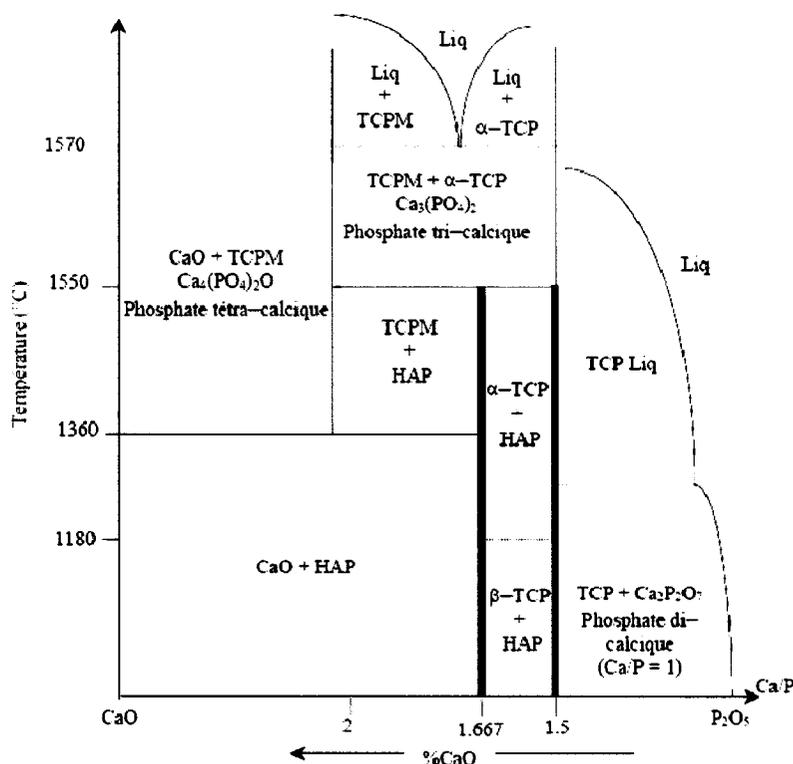
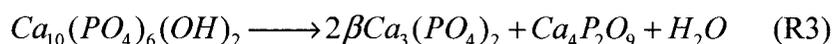


Figure 2.8 : Diagramme de phase du système CaO-P₂O₅-H₂O établie pour P_{H₂O} = 500 mmHg T₁ = 1360°C, T₂ = 1550°C (Riboud 1973).

Si $x = 1$, dans la réaction R2, on obtient de l'oxyapatite très réactive qui se réhydrate à 800°C et moins pour obtenir de nouveau l'oxyhydroapatite. On obtient aussi cette forme si la réaction est soumise à une pyrolyse (décomposition due à la chaleur) sous vide ou en présence de gaz secs. Entre 1100 et 1300°C, il y a décomposition de l'hydroxyapatite (R3) en β -TCP et phosphate tétracalcique (TTCP).



Au dessus de ces température le β -phosphate tricalcique devient de phase α . Cette phase est conservée lors du refroidissement (Rey 1995).

Les mêmes types de transformations ont lieu avec l'HA non-stoechiométrique, mais elles sont influencées par le ratio Ca/P (Kohn 2003). Notons que pour des ratios Ca/P inférieurs à 1.65, l'apparition d'inclusions α et β -TCP bloque la densification de

l'hydroxyapatite. Dans le cas où le calcium est trop élevé ($\text{Ca/P} > 1.67$), il y a apparition de l'oxyde de calcium pendant le frittage. Alors, la céramique devient davantage instable au contact de l'humidité (Janot and Ilschner 2001).

2.2.2.3.2 Stabilité de l'HA à haute température

La stabilité des phases dépend essentiellement de l'environnement et de la température de frittage. Tous les résultats concernant la décomposition de l'HA au cours du frittage sont incertains quant à la température minimale de décomposition, dus à l'ampleur, ainsi qu'aux produits réels de décomposition. Quelques résultats montrent que l'HA stœchiométrique est stable jusqu'à 1200°C sous air ou dans un environnement humide (Wang and Chaki 1993; Zhou et al. 1993; Arita et al. 1995; Van Landuyt et al. 1995). D'autres auteurs ont rapporté que l'HA ne se décompose qu'à 1400°C (Muralithran and Ramesh 2000) ou entre 1350 et 1500°C après un processus graduelle de dehydroxylation en deux étapes : à 900°C et à 1300 - 1400°C (Landi et al. 2000). D'autres études trouvent que l'HA peut commencer à se décomposer en phases secondaires à 1300°C lors de périodes de frittage assez longues (8 heures) (Van Landuyt et al. 1995).

Les traitements thermiques sous vide mènent à la décomposition de l'HA, alors que les traitements sous pression partielle d'eau élevée empêchent les réactions de décomposition (Suchanek and Yoshimura 1998). De plus, la présence d'eau empêche la densification de l'HA et accélère le grossissement des grains pendant le frittage (Bernache-Assollant et al. 2003). En résumé, la décomposition de l'HA commence avant 1550°C (voir digramme de phase – Figure 2.8) et dépend en fait du temps de palier à haute température et de la pression de vapeur d'eau.

Il a été déjà signalé la formation du CaO lors du frittage de l'HA avec un rapport molaire de Ca/P supérieur à la valeur théorique (1.67) (Suchanek and Yoshimura 1998). La présence du CaO diminue la résistance mécanique et produit la décohésion interne du matériau. En fait, il s'agit d'une décohésion due aux contraintes provoquées par la formation et la transformation du $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en CaCO_3 avec les changements de volume respectif (Ruys et al. 1995; Suchanek and Yoshimura 1998).

Si le rapport molaire de Ca/P de l'HA est inférieur à 1.67, l' α - ou β -TCP peuvent être formés (Chilar and Trunec 1997; Landi et al. 2000). La présence du TCP gêne le frittage à températures élevées, causant une décroissance de la densité du matériau et augmentant la biodégradabilité de l'HA en dégradant ses propriétés mécaniques (augmentation de la susceptibilité à la propagation lente de la fissure).

Généralement, le processus de décomposition lui-même peut avoir une influence négative sur la densification de l'HA due à la formation des nouvelles phases et à l'évaporation de l'eau, diminuant en conséquence la résistance mécanique (Wang and Chaki 1993). Pourtant, le rapport Ca/P n'influence pas de manière significative le grossissement de grains de l'HA (Suchanek and Yoshimura 1998).

2.2.2.3.3 La stabilité de l'HA en milieu physiologique

Théoriquement, les HA stœchiométriques (Ca/P = 1.67) sont « permanents » (non dégradables), mais d'un point de vue biologique cette notion est très arbitraire et n'existe pas dans un sens absolu (Bruck 1990). La distinction entre un matériau « permanent » et un matériau dégradable peut se faire en évaluant leur dégradation à échelle temporelle (Bruck 1990; Gopferich 1996). C'est à partir de cette évaluation que la biodégradabilité s'établit comme étant une relation temporelle entre la vitesse de dégradation et la durée d'utilisation (Gopferich 1996).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la vitesse de dégradation d'ailleurs très lente de l'HA. La présence de phases étrangères solubles, une basse cristallinité de l'HA et une grande aire de contact avec les tissus suite à l'implantation sont les principaux facteurs qui font varier la vitesse de dégradation de l'HA en milieu physiologique (Ducheyne and Hastings 1984; LeGeros 1993). Par exemple, la dégradabilité de l'HA est étroitement reliée à sa solubilité en milieux aqueux. Plus la cristallinité est grande, plus la structure hexagonale est stable et plus le caractère soluble est faible (LeGeros 1993). L'aire de contact avec les tissus joue aussi un rôle important sur la dégradation car les ions de surface sont retenus moins fortement que les ions profondément liés. Plus cette aire de

contact est grande plus la solubilité est grande. Donc les HA frittées denses se dégradent moins vite (Ducheyne and Hastings 1984).

Enfin, il faut aussi toujours se soucier de molécules actives instables (protéines ou peptides) ou de cellules sensibles (ostéoblastes ou ostéoclastes) quand elles sont impliquées dans un environnement en perpétuelle évolution chimique dû à la dégradation. Donc, la stabilité en milieu physiologique de l'HA est garantie par sa pureté phasique et par un taux de cristallinité élevé.

2.2.2.3.4 Les substitution ioniques dans la structure de l'HA

La déviation du rapport molaire Ca/P par rapport à sa valeur théorique n'implique pas nécessairement la présence de TCP (de Groot 1980). En fait, la substitution des ions PO_4^{3-} par les ions HPO_4^{2-} ou CO_3^{2-} ainsi que le remplacement des ions OH^- par les ions carbonate CO_3^{2-} peut être la cause des déviations de Ca/P (Doi et al. 1995).

La substitution des ions PO_4^{3-} et/ou des ions OH^- par les ions carbonate CO_3^{2-} (un contaminant très commun de l'HA à basse cristallinité) engendre des perturbations dans la structure apatitique qui conduisent à une augmentation de la solubilité du composé par rapport à celle de l'HA (Doi et al. 1995). De plus, cette substitution n'a aucun effet sur l'aptitude au frittage ou sur le grossissement des grains pendant le frittage (Doi et al. 1995). Ces substitutions ioniques dans le réseau de l'HA affectent significativement les performances de la céramique, influençant non seulement les conditions de traitement, mais également en changeant les propriétés chimiques de l'HA et sa stabilité en milieu physiologique (Knowles et al. 1996).

2.2.2.3.5 La microstructure de l'HA après frittage

Les caractéristiques morphologiques des poudres spécifiques d'HA (taille de particule, cristallinité, etc.) sont le résultat d'un choix adéquat de conditions de synthèse et elles représentent les paramètres définissant l'aptitude au frittage de la poudre. D'autres part, les microstructures obtenues lors du frittage varient en fonction du cycle de frittage et en donnant les propriétés du produit final. En conclusion, pour avoir une HA avec des

propriétés satisfaisantes (microstructure, propriétés physico-chimiques et mécaniques), il faut choisir des conditions adéquates de synthèse (voire le paragraphe 2.2.2.4.2) et un cycle de frittage approprié.

Il existe un domaine favorable de température de 1000-1300°C où le frittage de l'HA s'achève en évitant la coalescence (De With et al. 1981; Raynaud et al. 1998; Muralithran and Ramesh 2000). Un grossissement des grains, relativement important, peut se produire pendant de longues périodes de plateau thermique (Figure 2.9a) (Halouani et al. 1994) ou lors de la montée en température (Figure 2.10a) (Akao et al. 1981; Halouani et al. 1994). Cette tendance générale de l'accroissement de la taille des grains avec la température de frittage a été aussi observée par d'autres auteurs (De With et al. 1981; Raynaud et al. 1998; Muralithran and Ramesh 2000). Pourtant la densification de l'HA s'améliore par un traitement de H.I.P (« Hot Isostatic Pressing »). Par exemple, à 1200°C, une densité de 99.5% est acquise pour une taille de grains relativement faible (0,4 μm) (Figure 2.10) (Halouani et al. 1994).

En conclusion, pour obtenir des grains fins, un cycle rapide de frittage dans un domaine de température de 1000-1300°C s'avère préférable à un cycle lent de frittage (Ababou 1994). D'ailleurs, une meilleure densification est observée pour les poudres d'HA possédant un faible cristallinité (Landi et al. 2000).

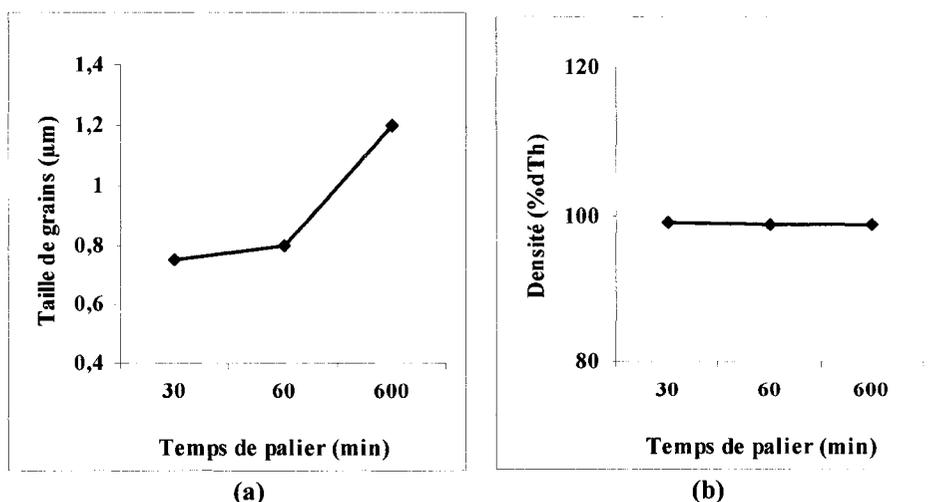


Figure 2.9 : L'influence du temps de cycle de frittage sur (a) la taille de grains et (b) la densité de l'HA (adapté après (Halouani et al. 1994))

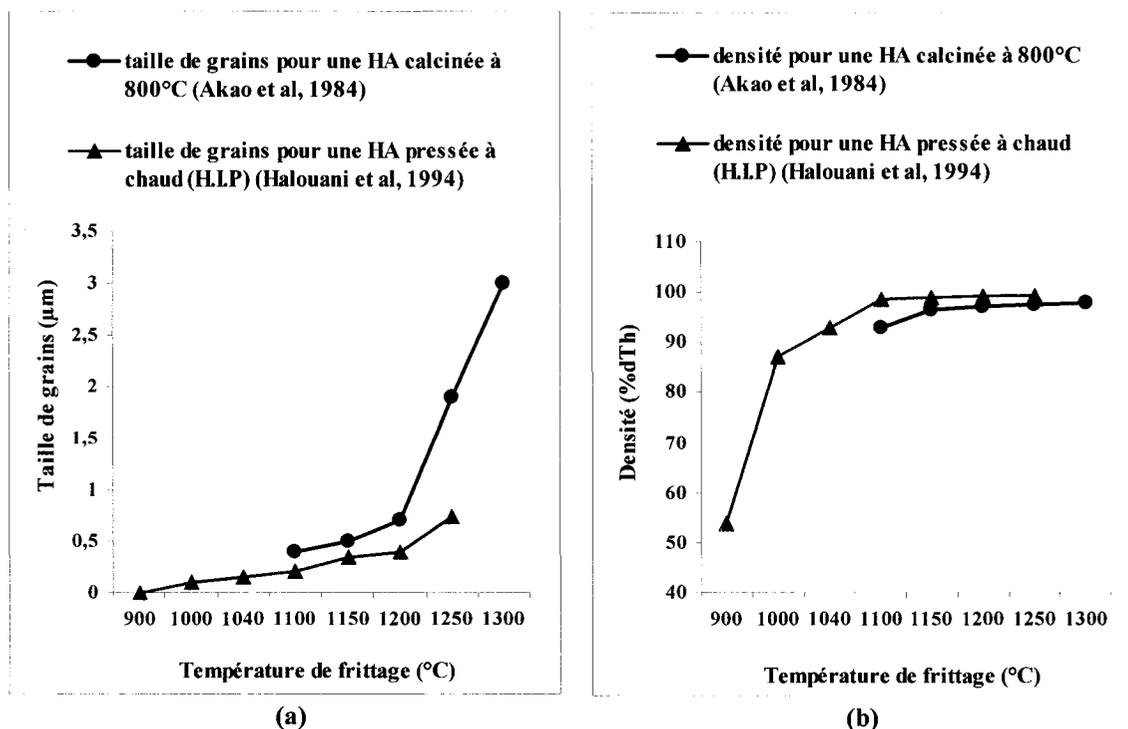


Figure 2.10: L'influence de la température de frittage sur (a) la taille de grains et (b) la densité de l'HA (adapté après (Akao et al. 1981) et (Halouani et al. 1994))

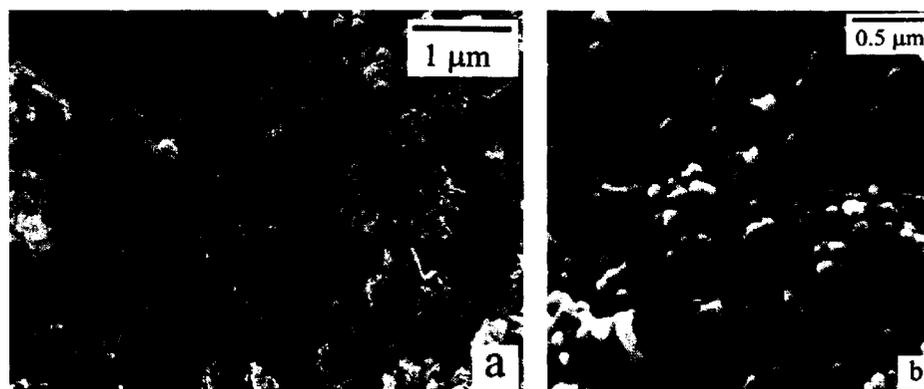


Figure 2.11 : La morphologie (a) de la poudre de départ (paramètres de synthèse : précipitation acide-base, température de synthèse = 95°C, vitesse d'addition de l'acide non-spécifiée, durée de synthèse 24 h; rapport Ca/P = 1.66, Sw = 15 m²/g, taux de cristallinité = 80%) et (b) de la surface de l'HA après 1.5 h de calcination à 940°C (Landi et al. 2000).

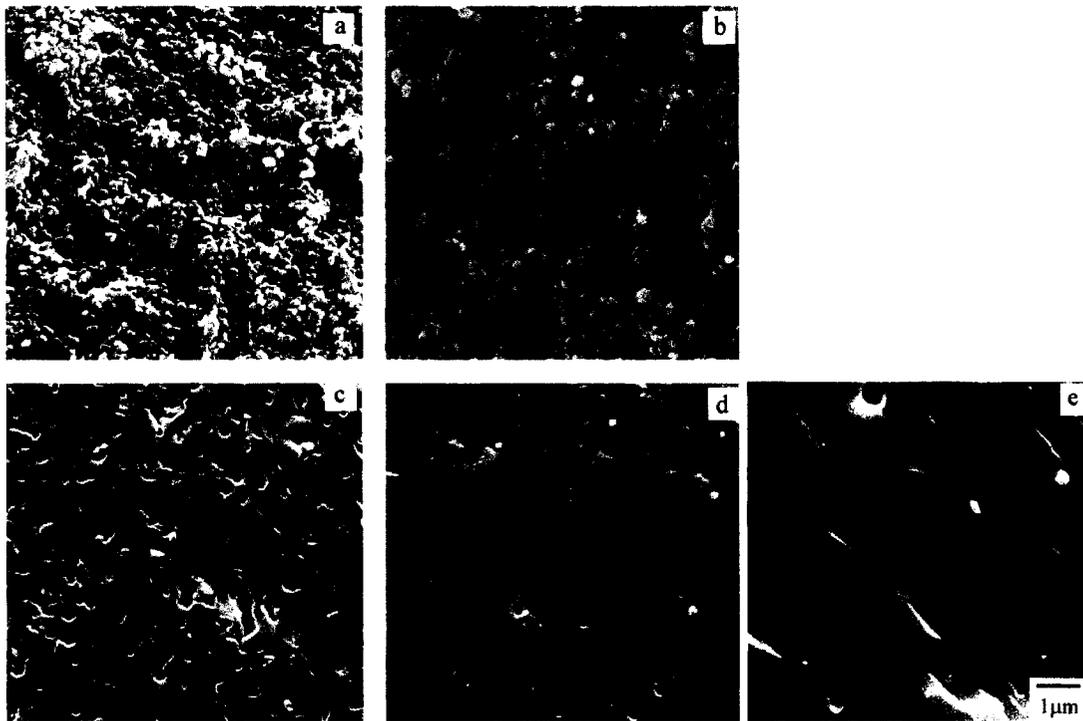


Figure 2.12: La morphologie de la surface de l'HA (conditions de synthèse spécifiées dans la Figure 11) après 1.5 h de frittage à (a) 1000°C, (b) 1050°C, (c) 1100°C, (d) 1150°C et (e) 1215°C (Landi et al. 2000).

Un suivi de la microstructure de l'HA (Figure 2.11) entre 1000 et 1250°C (Figure 2.12) permet d'observer l'évolution morphologique de l'HA en fonction de la température. Selon les observations, le phénomène de coalescence intervient entre 1050 et 1100°C (Figure 2.12b et c) tandis que le grossissement de grains se produit entre 1100 et 1215°C (Figure 2.12c d, et e). Signalons aussi qu'un traitement de calcination à des températures situées entre 940-1000°C retardera le frittage à basse température (Landi et al. 2000).

2.2.2.3.6 La biocompatibilité de l'HA

La biocompatibilité de l'HA dense ou poreuse a été confirmée par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Yoshikawa and Myoui 2005; Kaito et al. 2006). Pourtant, il existe des résultats incertains quant à la biocompatibilité de l'HA pulvérulente. Plusieurs analyses histologiques de tissus péri-prothétiques (prothèses recouvertes d'HA) ont identifié le

relargage des particules d'HA issues des revêtements de prothèses comme une cause fréquente d'ostéolyse. Je cite les articles les plus pertinentes qui relatent ce sujet (Bloebaum and DuPont 1993; Bloebaum et al. 1994; Bloebaum et al. 1997). Ce phénomène est expliqué par le fait que les revêtements d'HA constituent un mélange de particules bien cristallisées d'HA dispersées dans une phase amorphe de CaP. La dissolution plus rapide de cette phase amorphe lors du remodelage osseux conduit au relargage de particules d'HA possédant des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques différentes. La phagocytose de ces débris d'HA donne naissance à un nombre important de stimulus pour la production de divers médiateurs d'inflammation (cytokines et métalloprotéinases) (Bloebaum et al. 1994). Ces protéines sont en partie responsables de l'inflammation et de l'altération de la MEC conduisant localement au processus d'ostéolyse (Haynes et al. 1993). En effet, selon leurs caractéristiques, les particules relarguées peuvent influencer la biocompatibilité du matériau ayant un effet plus ou moins toxique.

i) L'effet de la température de traitement thermique de l'HA

Les traitements thermiques peuvent causer des changements majeurs dans la morphologie de l'HA tels qu'un grossissement des grains accompagné d'une augmentation de la surface spécifique et de la cristallinité. Toutes ces modifications offrent une surface de contact et des phénomènes de dissolution/précipitation plus grands entre les cellules et les particules d'HA traitées thermiquement par rapport aux particules non traitées, augmentant ainsi le risque de toxicité au niveau cellulaire (Laquerriere et al. 2001).

Plusieurs études confirment l'idée que plus le traitement thermique est important plus les cellules sont altérées dans leur structure et leur fonctionnement (Nagase et al. 1993; Prudhommeaux et al. 1996; Laquerrierea et al. 2005). Des résultats incertains par rapport aux résultats antérieurs sont obtenus par Fukuchi et al. (Fukuchi and Akao 1995) et Harada et al. (Harada et al. 1996) qui suggèrent que l'HA frittée est plus adaptée en terme de biocompatibilité. D'ailleurs, une faible influence de la température sur la réponse inflammatoire à été rapporté (Laquerrierea et al. 2005).

ii) L'effet de la taille des particules d'HA

Dans la littérature, il existe certains résultats douteux concernant l'effet de la taille des particules d'HA sur les cellules. Ceci est dû au fait que les auteurs ne se sont pas souciés de la forme des particules, ou ils n'ont pas utilisé une méthode de rapport de surface pour leurs expériences. Par exemple, les études effectuées sur des particules d'HA sphériques ont relevé que les particules possédant une taille phagocytables induisent des réactions immunitaires cellulaires nettement plus importantes que les particules de taille non-phagocytables (Laquerriere et al. 2003; Laquerriere et al. 2004b). Cependant les particules non-phagocytables sont les plus susceptibles d'entraîner une dégradation rapide de la MEC (Laquerriere et al. 2004a). En utilisant des particules de forme irrégulière, les essais démontrent que, peu importe la taille des particules (phagocytale ou non), les réponses cellulaires induites sont presque identiques (Sun et al. 1999). Des résultats comparables sont obtenus par Harada et al. (Harada et al. 1996) avec des particules d'HA broyées ou non broyées. Malard et al. (Malard et al. 1999) observent une diminution de la réponse inflammatoire *in vivo* en diminuant la taille des particules d'HA et la prolifération des fibroblastes est davantage inhibée par la présence de grosses particules d'HA (Sun et al. 1997).

En conclusion, il existe une taille spécifique pour laquelle les particules d'HA semblent être néfastes pour les cellules. Pourtant, la taille des particules ne peut pas expliquer à elle seule l'effet au niveau cellulaire puisque phagocytale ou non, de forme sphérique ou irrégulière, les particules induisent des réactions différentes.

iii) Influence de la forme des particules d'HA

Tous les travaux portés sur l'inhalation de particules montrent que les particules sous forme d'aiguille sont les plus toxiques et que cette forme cause des dommages mécaniques à la surface cellulaire (Guthrie 1997; Blake et al. 1998). Malheureusement, pour les particules d'HA peu d'études se sont intéressées à ce paramètre. Généralement, lors du processus de biodégradation les particules d'HA relarguées peuvent avoir différentes formes en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. Une étude

comparative sur des particules de taille phagocytable mais de formes diverses a montré que parmi les particules étudiées (sphériques, irrégulières ou aiguilles), celles sous forme d'aiguille sont les plus nocives pour les cellules, induisant la plus forte réponse inflammatoire et l'effet le plus toxique pour les cellules (Laquerriera et al. 2005). Il apparaît donc qu'en plus de la température de traitement, la forme des poudres est aussi importante pour la réponse cellulaire.

En conclusion, les cellules semblent être sensibles à la présence de poudres d'HA et leur effet toxique varie en fonction des caractéristiques de cette dernière. D'un point de vue toxique, le relargage de particules sous forme d'aiguille ou de taille phagocytable est très nuisible à l'implantation. Par exemple, les particules sphériques de taille non-phagocytées sont moins néfastes pour l'implantation que celles de taille phagocytable. D'ailleurs, pour les particules de la même forme, la température de frittage est directement proportionnelle à la toxicité (Laquerriera et al. 2005). D'un point de vue inflammatoire, la production de cytokines pro-inflammatoires n'est pas influencée par la température de traitement ou par la taille des poudres. Pourtant, de faibles variations dans la production de cytokines ont été détectées seulement pour les particules sphériques de différentes tailles, donc le facteur de forme intervient seulement pour les poudres sphériques.

2.3 Les composites à base d'HA

2.3.1 Généralités

Par rapport aux biomatériaux synthétiques, les tissus osseux sont des structures complexes qui possèdent un grand éventail de propriétés mécaniques (Figure 2.13) (Mano et al. 2004). Malgré ses excellentes propriétés d'ostéointégration, l'HA comporte des caractéristiques mécaniques inadéquates pour le remplacement permanent de l'os. Plusieurs études ont été effectuées afin d'améliorer les propriétés mécaniques de l'HA dense. D'autres recherches ont étudié les effets des poudres spécifiques et des paramètres de traitement sur la densification et sur les propriétés mécaniques. En dépit des résultats scientifiques obtenus, les améliorations des propriétés mécaniques de l'HA monolithique sont encore insatisfaisantes.

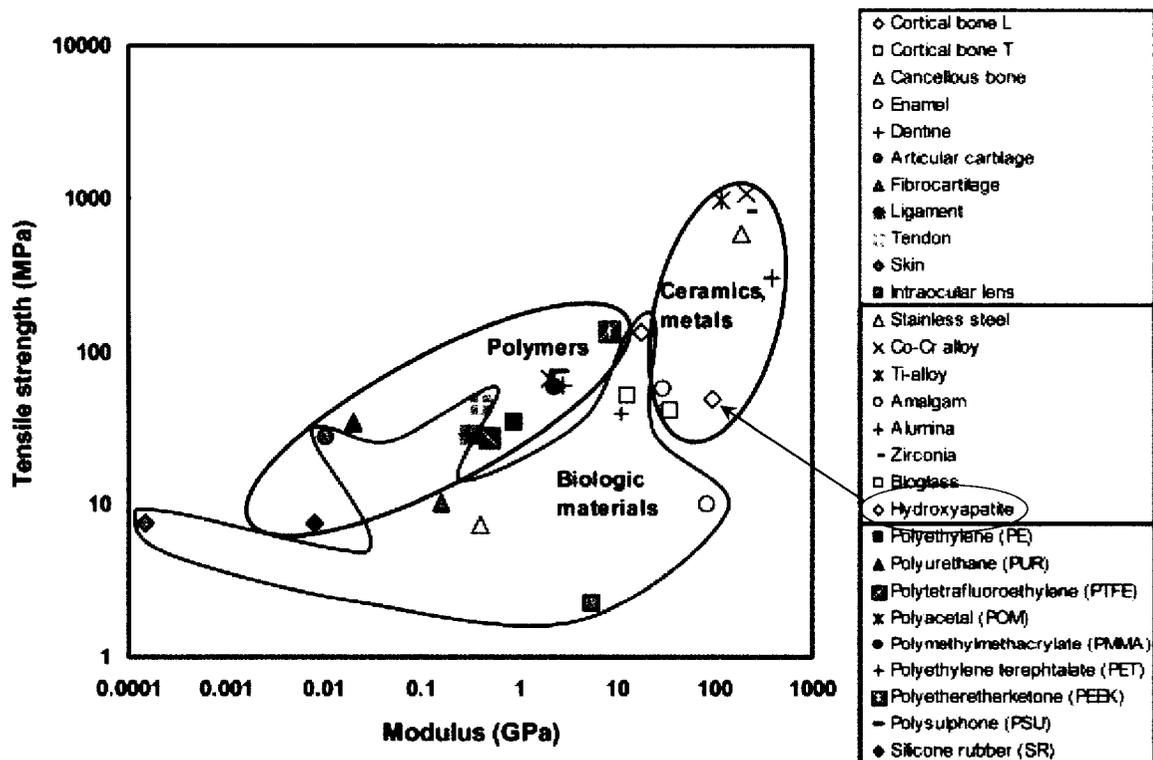


Figure 2.13: Résistance à la traction en fonction du module élastique de divers matériaux naturels et synthétiques (Mano et al. 2004)

Étant donné les propriétés mécaniques relativement faibles de l'HA, il s'est avéré nécessaire d'introduire des phases secondaires (polymères, métaux, ou céramiques) en tant qu'agents de renforcement. La Figure 2.13 illustre le potentiel de combiner l'HA à d'autres matériaux afin d'en améliorer ses performances mécaniques et d'obtenir des structures composites capables de reproduire les caractéristiques de l'os. Actuellement, des scientifiques se penchent sur les matériaux composites à base d'HA concentrent leur attention sur de nombreuses recherches qui permettent de combiner de façon anisotrope la rigidité de l'HA et la résistance mécanique du renfort. De plus elles offrent un plus grand potentiel de biocompatibilité structurale¹² que les matériaux homogènes.

Le comportement mécanique des composites est largement influencé par le type et la nature du renfort (Li and Gao 2003). Dépendamment du renfort utilisé, la ténacité à la rupture¹³ (K_c) des composites d'HA peut varier de 1.4 à 3.9 MPa/m² (Sanchez et al. 2005). Il est intéressant de noter que la meilleure ténacité à la rupture ($K_c=6-7.4$ MPa/m²) a été obtenue pour un composite HA/20-30% fibres longues d'alliage FeCr (DeWith and Corbijn 1989). Dans les dernières années, plusieurs types de renfort ont été utilisés pour augmenter les propriétés mécaniques de l'HA : particules, plaquettes, fibres longues, zirconium partiellement stabilisé (ZPS), dispersoïdes métalliques, et nanoparticules (nanocomposites) (Lopes et al. 1999; Li and Gao 2003; Sanchez et al. 2005).

Certains renforts métalliques, tels que l'acier inoxydable sous forme de fibres coupées, se sont avérés efficaces en augmentant la résistance mécanique et la ténacité à la rupture de la matrice d'HA. Malheureusement, la plupart des métaux (CoCr et les alliages à base de Ti) ne sont pas des renforts adéquats à cause des réactions d'interaction avec l'HA (Suchanek and Yoshimura 1998). De plus, les renforts métalliques posent de multiples

¹² La biocompatibilité structurale résulte d'une adéquation entre toutes les propriétés de la structure du matériau et les systèmes biologiques.

¹³ K_c (MPa/m²) (fracture toughness) est le facteur d'intensité de contrainte critique, ou ténacité, qui mesure la résistance à la rupture d'un matériau comportant une fissure. Une fissure devient instable et se propage catastrophiquement sous une contrainte tangentielle quand l'intensité de contrainte K atteint la valeur de la ténacité K_c .

problèmes dus à la corrosion, à l'usure, et/ou aux réactions tissulaires indésirables. L'addition excessive de métaux pourrait en outre réduire la biocompatibilité du matériau composite. En conséquence, on s'attend à ce que la biocompatibilité du composite HA/métal soit nettement plus inférieure à celle de l'HA pure. De plus, il a été démontré que la bioactivité de l'HA renforcé avec des matériaux bioinertes est inférieure à la bioactivité de l'HA pur (Lopes et al. 1999; Li and Gao 2003).

Une approche très intéressante pour améliorer la fiabilité et pour diminuer la rigidité de l'HA est la fabrication des composites HA/polymères. Au début des années 80, Bonfield et collaborateurs (Hench 1991; Guild and Bonfield 1993) proposent un composite possédant une phase polymérique malléable de type polyéthylène (PE), et une phase rigide d'HA. L'idée de base était de développer un matériau semi cristallin (HA/PE) pouvant conférer un caractère anisotrope similaire à celui de l'os. Les études ont révélé que le module de Young et la bioactivité du composite augmentent lorsque la fraction volumique de l'HA dans le composite augmente. Malheureusement, la bioinertie du PE est susceptible de réduire les capacités d'ostéointégration du composite (Ward et al. 1997). L'utilisation d'une phase polymérique biodégradable (comme par exemple le poly(L-lactide)) permet d'éviter les inconvénients dus à la présence d'une phase inerte telle que le PE. Pourtant, plusieurs études (Athanasίου et al. 1996; Ignatius and Claes 1996) indiquent une toxicité causée par les produits générés lors de la dégradation.

D'autres études ont été consacrées à la fabrication de composites HA/collagène (Wang et al. 1995; Doi et al. 1996). Ce mélange biphasé offre une composition chimique semblable à celle du tissu osseux avec une meilleure ostéoconduction que celle de chacune de ses phases. Malgré cela, leurs propriétés mécaniques restent encore insuffisantes et limitent l'application du composite pour comblement osseux.

Mêmes si les composites d'HA avec des renforts polymériques offrent des propriétés mécaniques plus élevées que l'HA monolithique, pour toutes les raisons décrites ci-dessus, les scientifiques ne leur ont pas trouvé de larges applications comme implants subissant d'importantes charges mécaniques.

Les limites des renforts métalliques et polymériques ont orientées les recherches vers les renforts céramiques. La résistance élevée à l'usure et à la corrosion des céramiques ont permis de les considérer comme les plus adéquates pour le renfort. Par ailleurs, leur excellente biocompatibilité permet de prévoir une meilleure acceptation des composites HA/céramiques par les tissus environnants en comparaison aux composites HA/métal ou HA/polymère. En conséquence, beaucoup de matériaux céramiques, tels que ZrO_2 , Al_2O_3 et SiC, ont été utilisés en tant qu'agents de renfort pour la matrice d'HA (Lopes et al. 1999; Li and Gao 2003). Par exemple, le renfort en ZPS améliore la résistance mécanique et la ténacité à la rupture mais des précautions doivent être prises pour éviter des réactions indésirables entre l'HA et le ZrO_2 pendant le processus de fabrication (Li and Gao 2003; Kong et al. 2005). Les nouveaux verres se sont avérés aussi efficaces, surtout pour l'augmentation de la résistance mécanique de l'HA plutôt que pour l'amélioration de la ténacité à la rupture (Lopes et al. 1999). La résistance mécanique et la ténacité du composite sont également améliorées par l'utilisation de plaquettes ou de particules fines d' Al_2O_3 et de SiO_2 . Cependant, il ne s'agit que d'une amélioration minimale des propriétés mécaniques dus aux « problèmes associés » (Ji and Marquis 1992).

2.3.2 Les problèmes associés aux composites à base d'HA

Généralement, les propriétés des composites sont déterminées en grande partie par la microstructure et les propriétés d'interfaces renfort/matrice. En effet, cette interface contrôle le transfert de charge et la résistance à la fissuration lors d'un chargement mécanique.

L'avantage du concept de composite à matrice d'HA reste l'augmentation de la résistance mécanique et de la ténacité à la rupture (K_c) de l'HA. Cependant, l'introduction d'une phase de renfort chimiquement différente dans la matrice d'HA peut mener à des effets non désirés tels que la diminution de la stabilité de la matrice favorisant ainsi la microfissuration et la décomposition chimique de l'HA avec la formation du TCP et/ou du CaO.

La microfissuration a été expliquée par le *coefficient de dilatation thermique* (CDT). De part sa nature, un composite est soumis à des contraintes internes lorsque la température varie. Il s'agit de contraintes thermomécaniques dues à la différence de coefficient de dilatation thermique et/ou du module d'Young entre la matrice et les renforts. Généralement, les coefficients de dilatation des céramiques sont inférieurs à ceux des métaux. L'HA est un cas particulier. Son coefficient de dilatation est largement supérieur à celui de la plupart des matériaux (Choi et al. 1998). Quand le CDT d'une particule de renfort est différent de celui de la matrice d'HA, une contrainte tangentielle est développée autour de la particule générant une contrainte résiduelle à l'interface, plus grande que la résistance à la traction de la matrice conduisant alors à la microfissuration autour des particules. Par ailleurs, l'énergie stockée à l'intérieur et autour d'une particule de renfort est proportionnelle au volume de la particule. En conséquence, les fissures apparaissent lorsque le rayon des particules dépasse un rayon critique.

Dans le cas d'un processus de décomposition, la présence du TCP ou du CaO dans la matrice d'HA augmente la biodégradabilité et la susceptibilité de propagation lente de la fissure. De plus, ce processus de décomposition peut avoir une influence négative sur la densification du composite. Le phénomène est dû à la formation d'une nouvelle phase et à l'évaporation de l'eau, diminuant ainsi la résistance mécanique.

Un autre inconvénient du concept de composite à matrice d'HA est lié au processus d'élaboration. Il est difficile de densifier les composites à base d'HA par frittage sans pression. Pour cette raison, leur élaboration exige des techniques de fabrication complexes et exigeantes, telles que la compression à chaud (HP) et/ou la compression isostatique à chaud (HIP). Pour surmonter ce problème de densification, des additifs de frittage sont également utilisés. Les additifs permettent d'augmenter la densification de la matrice de l'HA malgré sa décomposition avec la formation subséquente de TCP ou de CaO.

2.3.3 Les composites à matrice d'HA et renfort Al_2O_3

Généralement, le composite HA/ Al_2O_3 est conçu de manière telle qu'une combinaison des meilleures caractéristiques de chacun de ses composants est accomplie (Gasser 2000; Ramakrishna et al. 2001). Les caractéristiques du composite dépendent des propriétés de ses matériaux constitutifs, de la concentration (la fraction volumique) et de l'orientation du renfort. Une variabilité des propriétés des constituants, une distribution non uniforme du renfort dans le volume ou des imperfections du processus de fabrication peuvent créer des concentrations de contraintes au sein de la matrice affectant ainsi ces propriétés mécaniques. Donc, l'élaboration de composites sollicite des processus de fabrication complexes et exigeants. D'ailleurs, la matrice doit être compatible (une adhérence adéquate) avec le renfort et doit détenir une masse volumique faible pour pouvoir former un composite dont les propriétés mécaniques sont élevées. Une adhérence insuffisante engendre une pénétration des fluides biologiques dans la structure du composite, engendrant une dégradation subséquente non souhaitée.

2.3.3.1 Le renfort d' Al_2O_3

Un renfort d' Al_2O_3 permet d'apporter des améliorations significatives de la résistance mécanique et de la ténacité K_c de l'HA (Gautier et al. 1999). Dans ce contexte, un intérêt considérable a été suscité par les phénomènes mécaniques développés au niveau microscopique à l'interface matrice HA/renfort Al_2O_3 et leur influence sur les propriétés mécaniques de la matrice. Plusieurs études sont développées afin de déterminer les paramètres influents les plus efficaces agissant sur le mécanisme de renforcement de l' Al_2O_3 .

2.3.3.2.1 Particules de renfort d' Al_2O_3 de petite taille (0,5 μm)

La résistance mécanique de la matrice est considérablement améliorée par l'addition des petits volumes de renfort d' Al_2O_3 de petite taille et cette amélioration est plus significative pour des températures de frittage plus élevées (Gautier et al. 1999). Les

concentrations plus grandes d' Al_2O_3 , amènent à une réduction de la résistance mécanique probablement à cause de la densification insuffisante des échantillons. Elle reste toutefois supérieure à la résistance mécanique de la matrice d'HA. D'autre part, les températures de frittage supérieures à 1200°C ne sont pas souhaitables à cause de la croissance anormale des grains (créant une décohésion du réseau) et de la décomposition de l'HA. Lorsque la microstructure et la taille moyenne des grains de la matrice restent inchangées par l'addition d' Al_2O_3 , l'augmentation de la résistance mécanique du composite est probablement due à une forte adhérence entre HA et l' Al_2O_3 (sans aucune microfissure).

2.3.3.2.2 La taille des particules du renfort

Les contraintes développées dans la matrice autour des particules de renfort favorisent la fissuration. L'énergie stockée autour d'une particule de petite taille est plus faible que l'énergie stockée autour d'une particule de grande taille (Choi et al. 1998). La probabilité de microfissuration autour des petites particules reste donc mineure. L'utilisation de grandes particules de renfort peut avoir un effet défavorable pour la matrice induisant une fragilité du système par la formation de microfissures autour des particules en dépit du processus de durcissement de la matrice. Ce phénomène est plus accentué pour des fractions volumiques importantes de renfort.

2.3.3.2.3 Plusieurs phases de renfort (Al_2O_3 + particules métalliques)

Une ténacité plus élevée de la matrice pourrait être obtenue en additionnant simultanément deux phases de renfort de tailles différentes. Par contre les composites, constituées de plusieurs phases, présentent une probabilité plus élevée de déclenchement de réactions inflammatoires chroniques (Choi et al. 1998).

2.3.3.2.4 La forme du renfort d' Al_2O_3

Contrairement à la théorie qui souligne une supériorité de l'inhibition à la propagation de la fissure pour les renforts lamellaires (par rapport aux renforts sphériques), les études ont démontré que le renfort lamellaire offre à la matrice (HA) un durcissement structural

faible (Gautier et al. 1999). D'ailleurs, une comparaison entre les plaquettes et les particules sphériques d' Al_2O_3 permet de conclure que pour développer des mécanismes dispersifs d'énergie, les particules lamellaires d' Al_2O_3 ne sont pas plus efficaces que les particules sphériques. En conséquence, un durcissement plus élevé aurait été prévu avec l'utilisation des plaquettes.

2.3.3.2.5 L'orientation du renfort (plaquettes d' Al_2O_3)

L'anisotropie géométrique des plaquettes d' Al_2O_3 peut provoquer la déviation de la fissure et ainsi engendrer une propagation de fissure en mode II¹⁴ le long des lamelles moins néfaste qu'en mode I¹⁵. Pour être vraiment efficace, cette morphologie de particules exige une orientation préférentielle des plaquettes dans des plans parallèles avec une déviation angulaire en dessous de 30° (Gautier et al. 1999).

Donc une comparaison entre les particules sphériques et les plaquettes d' Al_2O_3 permet de conclure que la forme des particules ne joue pas un rôle essentiel sur le durcissement de la matrice mais le renfort fibreux permet de renforcer le matériau dans des directions préférentielles (Gautier et al. 1999).

En conclusion, les mécanismes de renforcement dépendent fortement de plusieurs facteurs dont le choix de la taille et de la forme des particules d' Al_2O_3 ce qui apparaît déterminant dans l'élaboration des composites HA/ Al_2O_3 .

2.3.3.2 La matrice d'HA

2.3.3.3.1 La décomposition matricielle

L'instabilité thermique de l'HA à haute température (paragraphe 2.2.2.3.2) pose un problème majeur quant à la fabrication des composites à base d'HA vu qu'elles sont souvent élaborées à des températures relativement élevées. De plus, certaines techniques d'élaboration requièrent également l'application de hautes pressions. Dans ces conditions, une décomposition de l'HA peut apparaître et des réactions chimiques peuvent se

¹⁴ Propagation de la fissure le long de la plaquette en direction parallèle aux contraintes de tension

¹⁵ Propagation de la fissure en direction perpendiculaire aux contraintes de tension

développer rapidement à l'interface entre la matrice et le renfort. Ces interactions donnent lieu à de profondes modifications de la nature chimique et microstructurale. Bien évidemment, ces modifications se reflètent directement sur les caractéristiques mécaniques et sur la biocompatibilité. Pour éviter ces réactions chimiques indésirables il faut arriver à contrôler de manière rigoureuse ces réactions chimiques d'interface au cours de l'élaboration.

D'ailleurs, la présence du TCP ou du CaO dans la matrice d'HA lors de la décomposition matricielle n'augmente pas seulement la biodégradabilité mais peut aussi déclencher des réactions chimiques avec la phase de renfort. Ces réactions chimiques à hautes températures (1300°C) ont été observées non seulement avec l' Al_2O_3 (Ji and Marquis 1992) mais aussi avec d'autres agents de renfort céramiques (ZrO_2 , ZPS) (Kumar et al. 2003) ou métalliques (Ti) (Ning and Zhou 2002).

2.3.3.3.2 Calcination, la réponse aux problèmes de décomposition matricielle

Pour améliorer les propriétés mécaniques du composite HA/ Al_2O_3 , il est nécessaire d'améliorer le processus de mélange et de diminuer la réaction entre la matrice (HA) et le renfort (Al_2O_3). Le but est ainsi de transformer la structure de l'HA dans une structure plus stable avec une meilleure cristallisation et une croissance granulaire. Ceci permet d'éviter la décomposition de l'HA en des phases secondaires indésirables et de prévenir les éventuelles réactions entre les matériaux constituants du composite (HA et Al_2O_3). Dans ce contexte, Kim et al. (2002) proposent un traitement de calcination de la matrice d'HA, avant la préparation du composite, qui à son avis s'avère efficace pour obtenir un composite avec une matrice fine et homogène sans aucune contrainte résiduelle.

Selon ses résultats, le traitement de calcination a transformé l'HA dans une poudre parfaitement cristallisée avec un grossissement des grains et une surface spécifique 4 fois plus petite. Généralement dans une telle structure, la possibilité de fissuration est relativement faible. D'ailleurs, la diminution de la surface spécifique de l'HA a un effet positif sur la résistance mécanique du composite en diminuant la réaction entre l'HA et l' Al_2O_3 (Lopes et al. 1999; Kim et al. 2002). En contrepartie, l'HA non calcinée possède

une microstructure non uniforme causée par les agglomérats dans la poudre de la matrice (HA). Ces irrégularités structurales non uniformes inhibent la propagation de la fissure, ce qui entraîne une ténacité K_{Ic} de l'HA non calcinée élevée (2,3 MPa/m²) (Kim et al. 2002).

En conclusion, une comparaison calcination/non calcination permet d'observer que la ténacité K_{Ic} élevée de l'HA est indépendante du processus de calcination, et que le raison le plus plausible pour un traitement de calcination reste seulement la diminution de la surface spécifique avec son effet sur la stabilité thermique matrice/renfort (Kim et al. 2002).

2.4 Conclusion

Les propriétés mécaniques inadéquates de l'HA peuvent être considérées comme un obstacle majeur à son utilisation clinique à grande échelle comme matériaux de comblement osseux. Les études démontrent que l'addition d' Al_2O_3 comme agent de renforcement est une méthode efficace pour améliorer les propriétés mécaniques de l'HA. Pourtant, notre revue bibliographique nous a permis d'évaluer la complexité et les difficultés potentielles rencontrées lors du processus de renforcement de l'HA. Les composites sont des matériaux élaborés à partir de mélanges de deux ou plusieurs phases. Donc, il faudra toujours tenir compte du fait que l'élaboration de la structure composite est directement liée à celle des matériaux constitutifs (la matrice et le renfort) et que leurs caractéristiques sont le résultat d'interactions qui apparaissent lors de cette association.

Par exemple, les propriétés de la matrice d'HA sont en relation avec «l'histoire thermique» de la poudre spécifique: le processus de fabrication, les paramètres d'élaboration, la température de calcination, le cycle de frittage, etc. Les mécanismes de renfort dépendent de plusieurs facteurs dont le choix de la taille, de la forme de la fraction volumique et de l'orientation des particules de renfort d' Al_2O_3 qui apparaissent déterminantes dans l'élaboration des composites. Un autre paramètre important qui peut affecter le processus de renfort est la stabilité chimique de l'HA au cours du frittage. La décomposition thermique que l'HA peut subir aux températures élevées, associée à la réactivité chimique du renfort aux mêmes températures, conduit à des réactions chimiques entre les deux constituants et la formation de nouvelles phases.

Des nombreux facteurs sont à prendre sérieusement en considération dans le processus de renforcement de l'HA. L'évaluation et l'amélioration du procédé reposent principalement sur la connaissance complète des matériaux utilisés, depuis la poudre (voir les précurseurs) jusqu'au produit fini, avant et après frittage. Ainsi un champ complet d'investigation s'ouvre en élaboration, mais surtout en caractérisation des composites à base d'HA.

CHAPITRE 3: Objectifs

3.1 Objectif général

En collaboration avec Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas du Brésil, nous proposons dans ce travail de synthétiser par précipitation des composites HA/Al₂O₃ avec différentes fractions volumiques (95/5%, 90/10%, 80/20% et 70/30%) et d'évaluer le potentiel de ces composites en tant que biomatériaux.

3.2 Objectifs spécifiques

La préparation et la caractérisation des poudres spécifiques précipitées sont prises en charge par nos collaborateurs du Brésil. L'étude qui nous revient porte sur l'influence de la variation volumique de renfort sur les caractéristiques chimiques, morphologiques et la cytotoxicité des poudres calcinées à 900°C puis frittées à 1300°C.

- 1. Caractérisation chimique :** Déterminer les phases cristallines des produits finaux et évaluer la stabilité thermique de la matrice d'HA et du composite lors de la variation volumique du renfort et de la température de traitement.
- 2. Caractérisation morphologique :** Déterminer la taille moyenne des cristallites (TMC) de l'HA et analyser les changements géométriques de la maille de HA qui surviennent lors du frittage et de la variation volumique de renfort. Comparer la morphologie des poudres composites et évaluer leur changement en fonction de la variation volumique de renfort et de la température de traitement.
- 3. Biocompatibilité :** Évaluer de la cytotoxicité des composites *in vitro* par le biais d'un test de viabilité cellulaire (MTT) et déterminer l'effet de la variation volumique de renfort et de la température de traitement sur la toxicité des matériaux.

CHAPITRE 4: Matériel et méthodes

Ce chapitre présente la synthèse des composites ainsi que les méthodes utilisées pour leur caractérisation chimique, morphologique et cytotoxique.

4.1 Synthèse de la matrice d'HA et des composites HA/Al₂O₃

Le choix de la méthode de synthèse s'est orienté vers la précipitation acide-base dans des conditions de pH et de température contrôlées. La méthode utilise la réaction entre l'oxyde de calcium (CaO) et l'acide phosphorique (H₃PO₄) aqueux. L'intérêt de cette voie de synthèse est double. Le premier est qu'elle offre de multiples possibilités dans l'ajustement des paramètres de synthèse et donc dans le contrôle de l'état final de la poudre. Le second est la nucléation directe de l'HA sur les particules du renfort pour élaborer des interfaces particules/matrice fortes (Tampieri et al. 2003). Ceci permet un bon transfert de charge entre la matrice et les renforts, ce qui améliore les propriétés mécaniques du composite.

4.1.1 Matériel

Les réactifs de départ utilisés pour la préparation de la matrice d'HA sont:

- Le H₃PO₄ avec une pureté de 95% a été fourni par le laboratoire RIEDEL-DE HAËN – Germany.
- La poudre de CaO a été obtenue par la calcination du CaCO₃ à 900°C pendant 2h: $\text{CaCO}_3 \rightleftharpoons \text{CaO} + \text{CO}_2$. La poudre de CaCO₃ d'une pureté de 98% a été fournie par le laboratoire LABSYNTH Ltda (Brésil).

Pour le renfort d'Al₂O₃-α nous avons utilisé la poudre DISPERAL P3 avec une pureté de 71,1% de alumina anhydre lot. N° 10388, fournie par la Association Germany CONDEA CHIMIE – RFA.

4.1.2 Méthode expérimentale pour l'élaboration des composites

La synthèse d'HA nécessite à priori d'utiliser des réactifs en proportions stoechiométriques. Cette stoechiométrie est contrôlée par le rapport Ca/P des réactifs. Donc, la matrice de l'HA est élaborée à partir d'un mélange en solution dont le rapport molaire des réactifs CaO/H₃PO₄ est égal à 1,67.

4.1.2.1 L'élaboration de la matrice d'HA

La dissolution des réactifs de départ se fait dans de l'eau distillée (pH =7). Premièrement la poudre de CaO est incorporée sous agitation dans l'eau distillée et maintenue pendant 2 h sous agitation continue (540 rpm). Ainsi la répartition est homogène. Par la suite, la solution de H₃PO₄ est ajoutée à débit contrôlé (2 ml/min).

4.1.2.2 L'élaboration des composites HA/Al₂O₃

Pour l'élaboration des composites, nous avons d'abord incorporé la poudre de renfort (Al₂O₃- α) dans l'eau distillée sur une source d'ultrasons pendant 10min pour assurer la désagglomération et une bonne dispersion des particules d'Al₂O₃- α dans la solution liquide. Cette suspension est ensuite placée sous agitation mécanique (540 rpm) et la poudre de CaO est incorporée dans la solution colloïdale contenant le renfort. Le H₃PO₄ est ajouté en suivant la même procédure que celle utilisée pour la matrice d'HA (paragraphe 4.1.2.1).

Les solutions colloïdales obtenues aux paragraphes 4.1.2.1 et 4.1.2.2 sont maintenues 24 h sous agitation. Un régulateur de pH a permis de contrôler et réguler le pH des ces solutions à chaque 20 min. Après les 24 h d'agitation, le précipité est récupéré et placé dans un ballon en verre fixé à un évaporateur rotatif et partiellement submergé dans un bain d'huile réglé à 70°C (Figure 4.1). La vitesse de rotation du ballon est réglée à 8 rpm et le ballon est maintenu en rotation pendant 4 h. Lorsque la synthèse est terminée, la poudre sèche est récupérée, broyée, tamisée à 140 μ m et calcinée à 900°C pendant 2 h.

Après le cycle de calcination, la poudre est refroidie jusqu'à 25°C et soumise à un nouveau traitement thermique à 1300°C pendant 2 h.

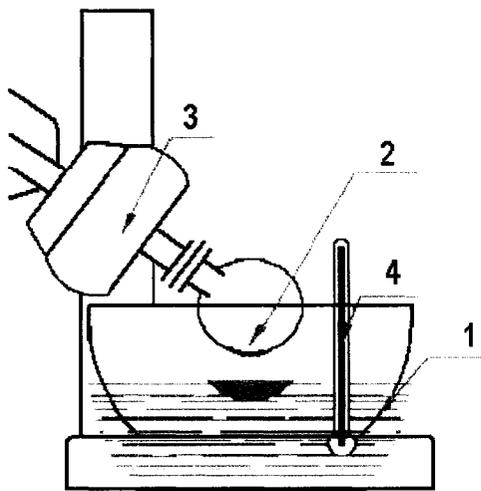


Figure 4.1 : Montage pour le séchage du précipité (1-Bain d'huile, 2-Ballon en verre, 3-Moteur d'entraînement rotatif, 4-Thermomètre)

L'équation de la réaction globale est :



ou l'hydroxyde de calcium Ca(OH)_2 est formée par la hydratation du CaO .

Nous avons élaboré quatre composites $\text{HA/Al}_2\text{O}_3$ (95/5%, 90/10%, 80/20% et 70/30%) pour chaque température de traitement (900°C et 1300°C). La matrice seule (HA) a été considérée comme le matériau de contrôle dans nos évaluations. Pour simplifier les analyses, les échantillons sont codifiés de la façon illustrée au Tableau 4.1:

Tableau 4.1 : La codification des échantillons

	Al_2O_3	temp		Al_2O_3	temp
HA_1	-	900°C	HA_2	-	1300°C
$\text{HA}_1\text{A5}$	5%	900°C	$\text{HA}_2\text{A5}$	5%	1300°C
$\text{HA}_1\text{A10}$	10%	900°C	$\text{HA}_2\text{A10}$	10%	1300°C
$\text{HA}_1\text{A20}$	20%	900°C	$\text{HA}_2\text{A20}$	20%	1300°C
$\text{HA}_1\text{A30}$	30%	900°C	$\text{HA}_2\text{A30}$	30%	1300°C

4.2 Études de caractérisation

Les études de caractérisation sont divisées en trois parties : l'identification des phases, la caractérisation de la morphologie des particules et la détermination de la taille des cristallites.

4.2.1 Identification des phases par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est une méthode d'identification des phases d'un composé cristallin. Elle donne des informations sur la pureté, la cristallinité et la valeur des paramètres cristallographiques.

La méthode générale consiste à bombarder l'échantillon avec des rayons X, et à enregistrer l'intensité de rayons X diffusés selon leur orientation dans l'espace (Figure 4.2b). La courbe obtenue, $I = f(2\theta)$ intensité des rayons X émise par l'échantillon en fonction de l'angle de déviation 2θ du faisceau incident, représente le *diffractogramme* caractéristique de l'échantillon (Figure 4.2c).

La position en 2θ d'un pic est imposée par la structure cristallographique, tandis que la surface nette du pic est imposée par la proportion de phase (détection limite 5%) dans l'échantillon, par l'absorption des rayons X par l'échantillon, et par l'orientation des cristallites.

Les échantillons, sous forme de poudre compactée, sont placés dans un porte-échantillon en aluminium. Les diffractogrammes sont enregistrés avec la radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5405945 \text{ \AA}$) sur un diffractomètre Philips X'Pert MRD type Bragg-Brentano (Figure 7.2a) dans le domaine angulaire 20° - 90° (en 2θ) avec une fente de divergence de 1° . Le pas est fixé à $0,02^\circ$ (en 2θ) avec un temps de comptage de 5s. L'identification de phase a été accomplie avec le logiciel X'Pert HighScore, par comparaison du diffractogramme enregistré avec les fiches (diffractogrammes de composés de référence) références stockées dans la base de donnée informatisée JCPDS (Joint Committee of Powder Diffraction Standard). Les numéros des fiches utilisées sont donnés dans le Tableau 4.2

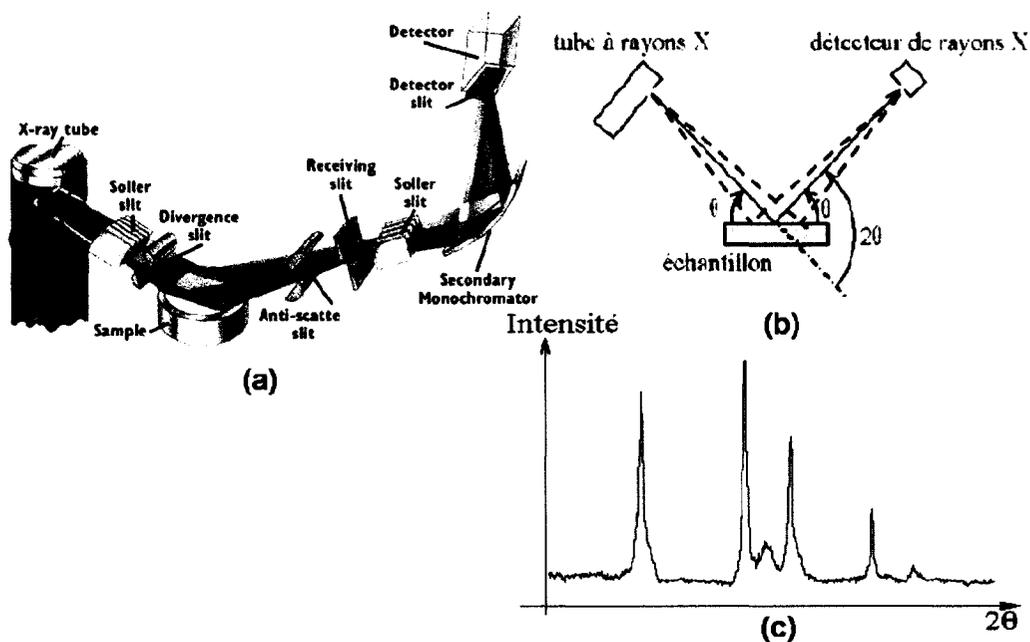


Figure 4.2 : Le principe de la diffraction des rayons X : (a) montage de type Bragg-Brentano, (b) les angles dans le montage de Bragg-Brentano - 2θ est la déviation du faisceau ; (c) diffractogramme : mesure de l'intensité en fonction de l'angle 2θ de déviation

Tableau 4.2 : Les fiches de référence pour l'indexation des diffractogrammes de composites.

Nature du composé	N° fiches PDF
HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	09-0432
Calcia: CaO	37-1497
Corundum, syn : $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}\alpha$	43-1484
Calcium Aluminum Oxide : CaAl_2O_4	34-0440
Tricalcium aluminate: $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$	38-1429
Calcium Aluminum Oxide: CaAl_4O_7	23-1037

4.2.2 Taille des cristallites déterminées par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet aussi d'avoir accès à des informations physiques sur les cristaux, notamment leur taille et leur orientation.

Les rayons X, pour une déviation 2θ donnée, proviennent de la diffraction de certaines cristallites. Ce sont les cristallites dont les plans (hkl) correspondent à l'angle de déviation 2θ . Donc, chaque pic provient de cristallites orientées de manière différente et peut être associé à un plan atomique imaginaire désigné par les indices de Miller (hkl) (Figure 4.3).

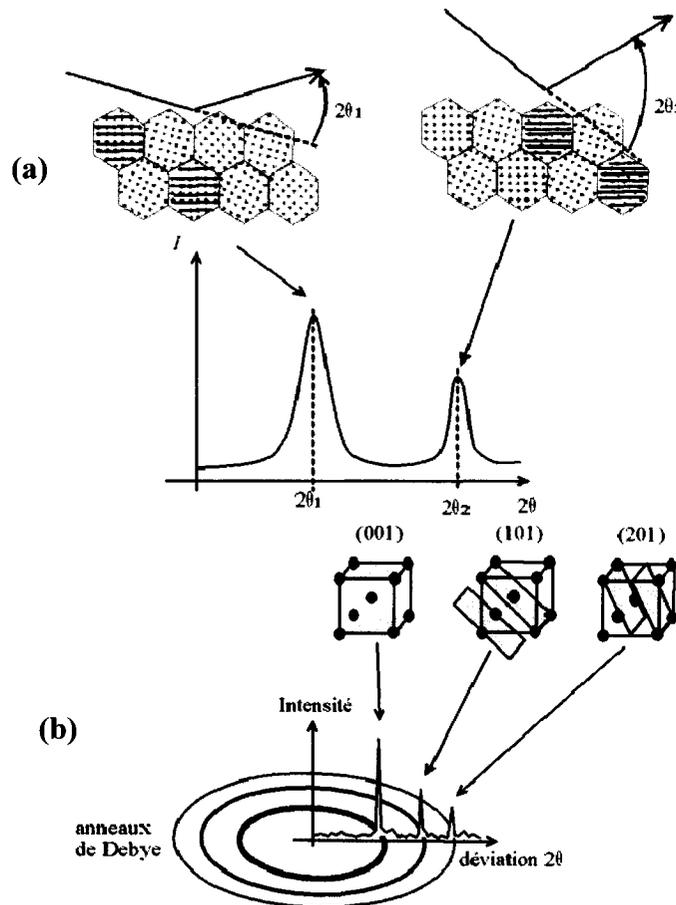


Figure 4.3 : La taille des cristallites déterminées par diffraction des rayons X : (a) Cristallites diffractantes- les plans (hkl) sont surlignés par des traits noirs ; (b) Indexation des pics : association d'un pic de diffraction et d'un plan (hkl)

Pour une surface donnée, un pic peut être plus ou moins large (étalé), donc plus ou moins haut. On caractérise la largeur d'un pic par sa largeur à mi-hauteur β (*full width at half maximum* FWHM), c'est-à-dire la largeur du pic à mi-chemin entre la ligne de fond

continue et le sommet du pic (Figure 4.4). β est déterminée par deux paramètres de l'échantillon : les microcontraintes résiduelles et la taille des cristallites.

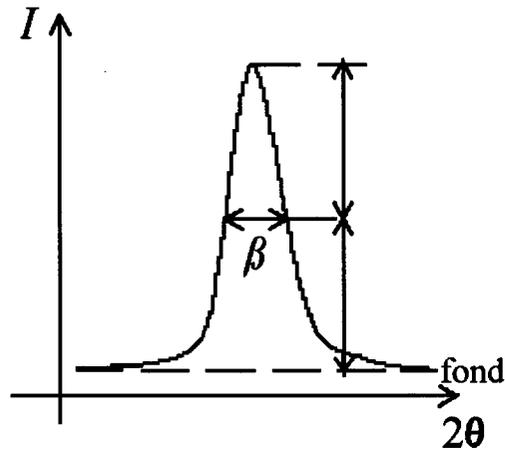


Figure 4.4 : Largeur à mi-hauteur β (FWHM)

La taille moyenne des cristallites peut être estimée à partir de la largeur à mi-hauteur des pics les plus intenses dans la direction normale aux plans hkl en appliquant la formule de Debye-Scherrer (Eq.1) (Klug and Alexander 1974; Bouyer et al. 2000):

$$D_{(hkl)} = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Eq.1})$$

où :

$D_{(hkl)}$ est la taille moyenne des cristallites (nm) (direction perpendiculaire au plan (hkl))

k est un facteur de forme (selon la forme supposée du cristallite) ; $k_{\text{HA}} = 0,89$

λ est la longueur d'onde $\text{CuK}\alpha$ des rayons X (0,154060 nm)

β est la largeur à mi-hauteur pour le pic pris en considération (rad)

θ est l'angle de diffraction correspondant au pic du plan (hkl) considéré (degré).

Les erreurs de mesure dues aux imperfections du diffractomètre ont été corrigées avec l'équation de Warren (Eq.2) (Klug and Alexander 1974; Markovic et al. 2004).

$$\beta^* = (\beta^2 - \beta_{inst}^2)^{1/2} \quad (\text{Eq.2})$$

où:

β^* est la contribution de la taille de cristallite sur la largeur à mi-hauteur (rad), c'est-à-dire la largeur à mi-hauteur du pic de la phase analysée

β_{inst} est l'élargissement instrumental, c'est-à-dire le largeur à mi-hauteur du pic de l'étalon interne (rad).

β_{inst} a été déterminée sur un monocristal de NaCl en utilisant la même fente de divergence de 1° , pour $2\theta = 32,153^\circ$ et pour un pas fixé à $0,02^\circ$ (en 2θ). Cet élargissement a été évalué à $\beta_{inst} = 0,0638$ (degré). En conséquence, pour tous les pics, la largeur à mi-hauteur a été corrigée avec la contribution de l'instrumentation de mesure en utilisant Eq.(2).

Le logiciel Grams/AI version 7 a été utilisé pour ajuster l'ensemble des pics de diffraction (déconvolution) à l'aide d'une fonction de type Lorentzien. La fonction de déconvolution est utilisée pour estimer la contribution réelle de chaque pic se recouvrant lors de l'analyse de spectres mal résolus. Pour certaines réflexions, le raffinement a nécessité un modèle proposant deux pics distincts mais très proches.

La largeur à mi-hauteur extraite de tous ces ajustements a été exploitée afin d'obtenir le paramètre de maille.

4.2.3 Identification et analyse de la composition élémentaire superficielle des particules par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie des photoélectrons, couramment appelée *XPS* (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*), est un outil performant pour caractériser l'extrême surface de tout matériau solide (Cheetham and Day 1987; Prutton 1994).

Cette technique est basée sur l'effet photoélectrique découvert par Einstein (Figure 4.5c). Soumis à un flux de photons X suffisamment énergétiques, le matériau émet des électrons de coeur qui sont analysés en nombre (aspect quantitatif) et en énergie (identification des éléments et espèces chimiques). En effet, chaque électron est associé à une énergie cinétique E_k par la relation (Eq.3):

$$E_k = h\nu - E_b - \phi_{sp} - E_c \quad (\text{éq.3})$$

où: $h\nu$ est l'énergie du photon X monoénergétique incident (environ 1 à 2 KeV) ;

E_b , l'énergie de liaison de l'électron dans l'atome; caractéristique de l'atome duquel il provient et du type de liaison dans lequel cet atome est impliqué;

E_c , le travail exercé par l'électron pour échapper à l'attraction de la surface chargée de l'atome et

ϕ_{sp} , la fonction de travail spectrométrique, liée à la configuration de l'appareil.

L'XPS permet de mesurer le nombre de photoélectrons émis dans un intervalle d'énergie en fonction de l'énergie de liaison des électrons. Chaque élément chimique étant caractérisé par un spectre unique, cette méthode spectroscopique permet d'analyser précisément la nature chimique d'un matériau donné. Des analyses semi-quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur la surface des pics. L'identification de l'état chimique d'un élément peut être obtenue à partir de la mesure exacte de la position des pics. Pour l'XPS la direction d'éjection n'a aucune importance, seulement l'information énergétique est importante.

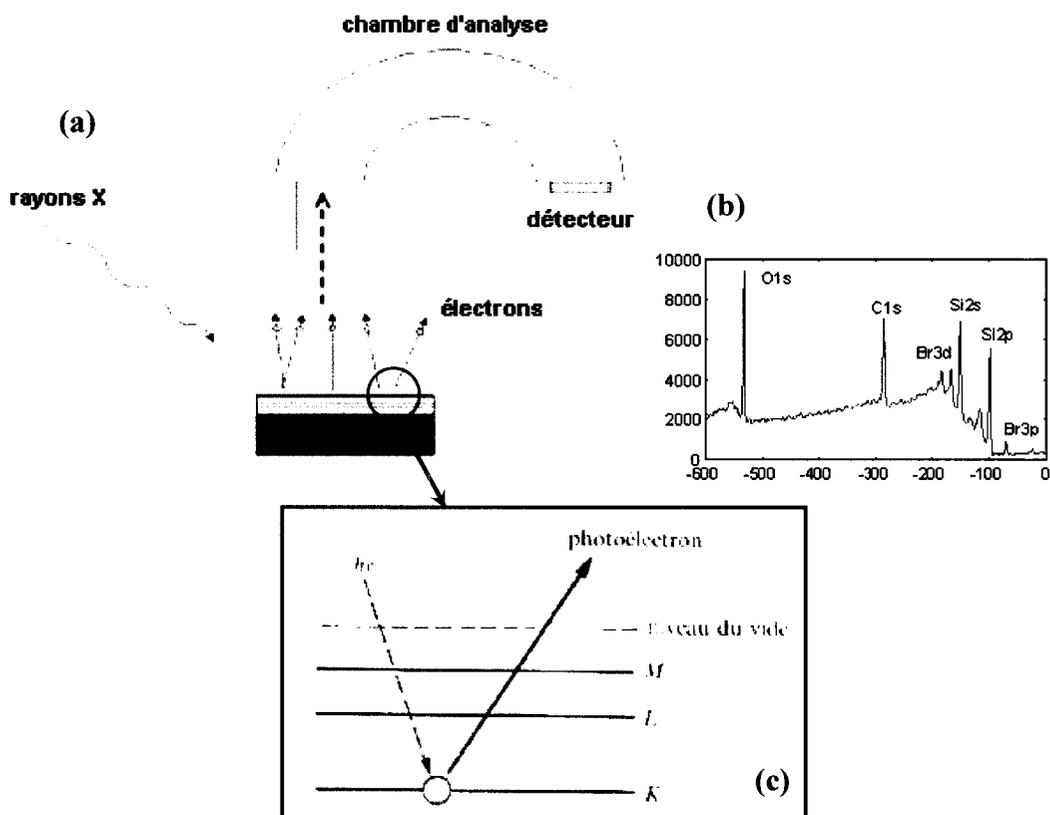


Figure 4.5 : Le principe de la spectroscopie de photoélectrons X : (a) Montage de type XPS (b) Spectre XPS : à chaque pic correspond une énergie de liaison qui est propre à une espèce donnée (c) Les étapes de l'effet photoélectrique : l'excitation d'un électron situé sur une couche intermédiaire des atomes de surface de l'échantillon ; l'absorption d'un photon avec éjection d'un électron de la couche électronique *K* d'un atome ; l'émission dans le vide d'un photoélectron, afin de retrouver son état de stabilité initial

La surface du matériau est analysée sur une profondeur d'environ 50 Å. En réalité les rayons X pénètrent plus profondément dans l'échantillon (jusqu'à environ 1 µm), mais les photoélectrons émis par les couches plus profondes perdent de leur énergie cinétique par des collisions inélastiques à l'intérieur du matériau. Leur contribution n'est alors soit pas collectée, soit en partie, ce qui correspond au bruit de fond du spectre.

Les informations collectées par l'analyse XPS nous a permis :

- d'effectuer une analyse de la composition élémentaire superficielle, c'est-à-dire d'identifier tous les éléments (sauf H et He) et de déterminer leur concentration atomique (détection limite 0,1%) ;
- d'identifier les éléments non détectés par l'analyse XRD à cause de la limite de détection de la méthode (5%);
- de déterminer la nature des liaisons, l'environnement local et le degré d'oxydation des éléments.

Les mesures XPS ont été réalisées sur un système (Figure 4.5a) Escalab MKII de VG à double anode Mg ($K_{\alpha} = 1253,6$ eV) et Al ($K_{\alpha} = 1486,6$ eV). Seule, la radiation d'Al a été utilisée puisqu'elle permet une meilleure résolution des pics. La source était réglée à une puissance de 300 Watts (courant d'émission de 20 mA et une tension de 15 kV). Une pression inférieure à 5×10^{-9} Torr était maintenue dans la chambre d'analyse. L'utilisation d'une fente de 15 mm x 6 mm à la sortie de l'analyseur hémisphérique a permis d'étudier une surface couvrant 3 mm x 2 mm sur l'échantillon et un angle de sortie de 0° des photoélectrons a permis de sonder une épaisseur d'une 50 Å. Ces conditions expérimentales sont demeurées constantes tout au long de l'analyse.

L'analyse XPS a débuté par l'identification des différentes espèces présentes sur le spectre général de survol (Figure 4.5 b). Ce survol est obtenu en balayant l'énergie de l'analyseur de 0 à 1200 eV en énergie de liaison (B.E.) avec un pas de 1,0 eV.

Les déplacements chimiques en énergie d'un pic nous conduisent à identifier différents groupements chimiques d'un même élément. Les régions correspondantes aux éléments P, C, O et Ca ont fait l'objet d'une acquisition de spectre en haute résolution, c'est-à-dire un balayage d'environ 20 eV avec un pas de 0,5 eV autour de chaque pic de l'élément analysé. Le temps d'acquisition est augmenté et l'énergie de passage de l'analyseur est diminuée, ceci dans le but d'accroître la résolution en énergie. L'échelle d'énergie est corrigée par rapport au pic d'hydrocarbure de carbone à 285,0 eV pour compenser les effets de charge. Parce que seulement les pics de P, C, O et Ca ont été analysés, l'identification des éléments ne tient pas compte d'autres éléments présents dans les échantillons.

4.2.4 La morphologie des poudres par MEB-EDS

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode qui permet l'observation d'un échantillon à des grossissements avec une profondeur de champ importante. MEB repose sur l'irradiation de l'échantillon par un faisceau d'électrons focalisé d'énergie de quelques keV (5 à 20 keV) et la détection d'électrons réémis par l'échantillon (Figure 4.6). Les informations collectées avec une image MEB permettent de visualiser la morphologie des échantillons avec une résolution qui peut aller jusqu'à l'ordre de la dizaine de nanomètres. La différence énorme dans les longueurs d'onde des photons (4000 à 7000 Å) et des électrons accélérés (environ 0,12 Å) est à l'origine de cette différence de résolution entre la microscopie photonique et MEB.

MEB a une application limitée aux éléments conducteurs et pour les non conducteurs, i.e. les isolants, on a recours à la déposition d'un élément métallique à la surface des échantillons (Au, Al, ou alliage Au-Pd). Cette déposition est faite dans le but d'éviter l'accumulation de charges à partir du faisceau électronique incident.

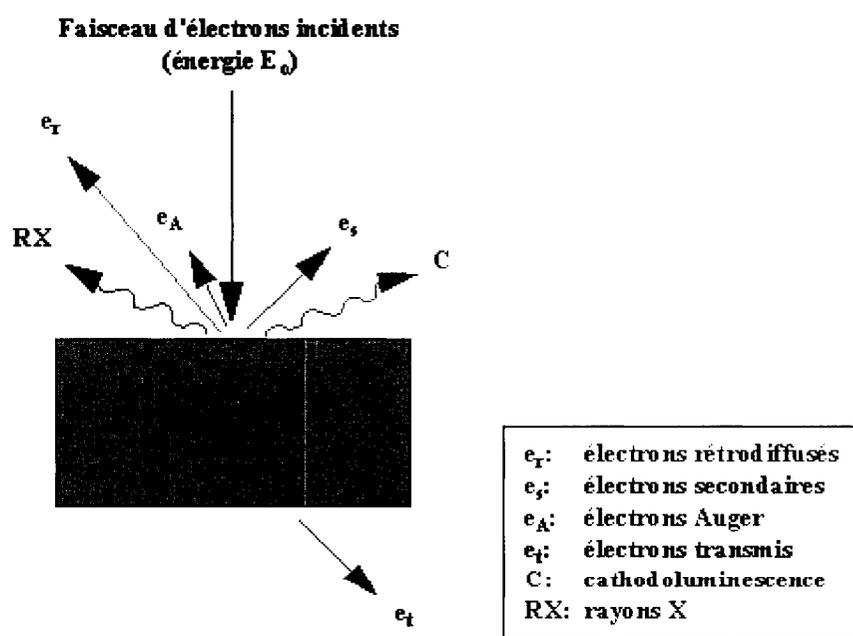


Figure 4.6: Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon.

La morphologie et la texture des poudres sont mises en évidence par un MEB de type JSM 840 (JEOL, Japon) équipé d'un spectromètre à énergie dispersive ESD (Link AN10/55 S, England) à une tension de 10 keV. Les poudres sont déposées sur une pastille adhésive en carbone puis métallisées à l'or pour pouvoir être observées.

L'analyse chimique par ESD consiste en une détection de ces photons en utilisant un détecteur solide Si-Li. L'énergie de ces photons X est caractéristique des atomes dont ils sont issus, d'où la possibilité de réaliser des analyses élémentaires.

4.3 Étude de cytotoxicité

Les biomatériaux placés en contact avec des tissus vivants peuvent être à l'origine des effets toxiques provoqués par le matériau lui-même ou par ses produits de dégradation sur les cellules par contact direct ou indirect. La cytotoxicité permet d'évaluer cet effet toxique et c'est la question de base à laquelle il faut répondre dans le processus d'étude de la biocompatibilité. Généralement, les substances toxiques agissent aux niveaux cellulaires et sous-cellulaires affectant plusieurs fonctions de la cellule. La perte de viabilité cellulaire est l'une des conséquences critiques d'un biomatériau toxique.

Il existe plusieurs méthodes d'études de la cytotoxicité. Les plus nombreuses et les plus employées sont les méthodes qui quantifient les perturbations de la perméabilité de la membrane cellulaire comme conséquence de la toxicité. Ces méthodes utilisent des colorants qui, en fonction de leurs caractéristiques, pénètrent dans les cellules vivantes ou mortes. La proportion relative des cellules colorées (ou non) reflète la viabilité de l'ensemble de la population cellulaire comme indicateur indirect de toxicité du matériau.

Parmi tous les colorants utilisés, le sel hydrosoluble MTT (le bromure du tétrazolium 3(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényl) est très efficace pour la quantification de la viabilité cellulaire et permet de mesurer les capacités métaboliques des cellules (notamment l'activité du succinate de déshydrogénase une enzyme de la membrane interne de la mitochondrie) après leur exposition aux substances toxiques. La méthode, décrite pour la première fois par Mossmann en 1983 (Mossmann 1983), et basée sur la

capacité du succinate de déshydrogénase des cellules métaboliquement actives, de transformer par clivage¹⁶ le MTT de couleur jaune en cristaux de formazan bleus insolubles dans l'eau (Figure 4.7).

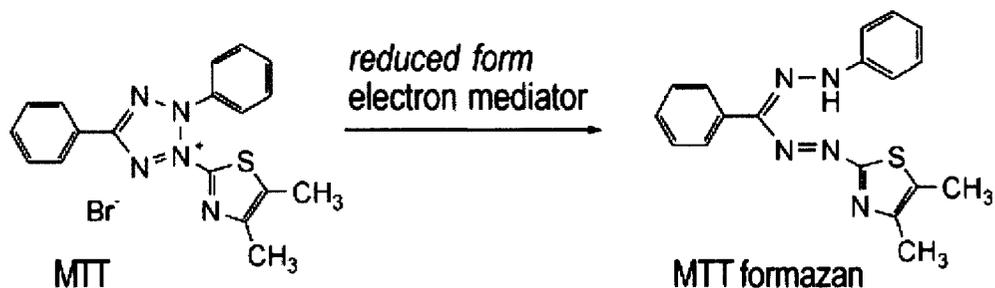


Figure 4.7 : Le clivage du cycle de tétrazolium qui transforme le MTT en formazan

Les membranes cellulaires sont imperméables au formazan, en le stockant sous forme des cristaux à l'intérieur des cellules vivantes. Par conséquent, cette quantité du formazan accumulée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans la culture.

4.3.1 La lignée cellulaire

Les cellules utilisées pour le test MTT sont des cellules fibroblastiques CCL 1 NCTC clone 929 (souche L, de tissu conjonctif de souris) (ATCC). C'est la lignée **L-929**. C'est une lignée qui figure parmi celles recommandées par les normes standard (ANSI/AAMI/ISO 10993-5 1999).

Les fibroblastes L929 sont cultivés à 37°C en atmosphère humide (à 95/5% : O₂/CO₂) dans leur milieu d'entretien : milieu de culture de Eagle modifié Dulbecco «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) additionné de 3,7 g/l de bicarbonate de sodium (Sigma), 1% pénicilline (100U/ml)/ streptomycine (100ng/ml) (Gibco Laboratories) et 10% de sérum de veau foetal (FBS; Gibco Laboratories) inactivé par la chaleur à 56°C pendant 30 min.

¹⁶ par coupure du cycle de tétrazolium

4.3.2 Préparation des échantillons

Pour notre étude nous avons opté pour la méthode de contact indirect pour réduire les risques de dommages mécaniques par les matériaux mis directement en contact avec les cellules et pour estimer les effets des produits de relargage (dégradation) des matériaux.

4.3.2.1 Stérilisation

Nous avons choisi la stérilisation au gaz oxyde d'éthylène se déroulant à basse température (60°C). Étant donné les risques inhérents à cette méthode, nous avons soumis les poudres à une aération pendant 7 jours pour éliminer les risques de toxicité liés aux résidus.

4.3.2.2 Extraction

La méthode de contact indirect fait appel aux extraits. En fonction de la forme et de la nature des matériaux, les normes ANSI/AAMI recommandent des rapports surface/volume d'extractant ou poids/volume. En nous basant sur ce rapport nous avons pu déterminer la quantité de matériau nécessaire par volume de milieu de 0,1 g/ml pour effectuer le test de cytotoxicité.

L'extraction s'est effectuée en immergeant les matériaux dans un milieu d'extraction pendant 120 h à 37°C (conformément aux spécifications ANSI/AAMI/ISO10993-5, 1999) sous agitation continue (250 rpm) pour simuler au maximum les conditions physiologiques et l'environnement dynamique du corps humain. Le milieu d'extraction utilisé est constitué du milieu de culture d'entretien habituel (décrit au paragraphe 4.3.1) mais sans addition du sérum. Celui-ci est rajouté dans le milieu juste avant l'utilisation (avant d'être mis en contact avec les cellules). En parallèle un milieu de culture de contrôle a été préparé en gardant les mêmes conditions. À la fin de la durée d'extraction les extraits sont filtrés (taille de pore de 0,45 µm) pour éliminer la présence éventuelle de particules solides du matériau. En plus des extraits originaux (100%), différentes dilutions dans des rapports 1/2 et 1/10 ont été utilisées. Ceci est fait afin de déterminer si les extraits sont toxiques en dessous des concentrations suggérées par les normes.

4.3.3 Le test MTT de viabilité cellulaire

Le test MTT est réalisé dans des plaques de 96 puits (Starsted). Les fibroblastes L929 sont ensemencés à une densité cellulaire de 5×10^4 cellules/puit dans du milieu d'entretien. Elles sont ensuite incubées 24 h à 37°C en atmosphère humide dans leur milieu afin de leur laisser le temps d'adhérer au fond des puits. Après 1 jour, quand les cellules ont atteint une confluence de 80%, le milieu dans lequel elles ont été incubées est remplacé par les différents extraits ou par du milieu frais (pour les puits de contrôle). Les plaques de culture sont ensuite placées à 37°C et incubées à nouveau pendant 24 h, 48 h et 72 h. Quatre puits sont utilisés pour chaque dilution de chaque matériau. Dix puits contrôles (sans traitement) sont utilisés à titre comparatif. Après chaque temps d'incubation les extraits sont remplacés par 200 µl de solution MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de concentration 0,5 mg/ml (0,1 mg/puit) et laissés incuber pendant encore 4 h à 37°C. Après la métabolisation du MTT, le surnageant est aspiré et 150 µl d'isopropanol acidifié (0,04 N HCl dans l'isopropanol) sont ajoutés dans chaque puit afin de dissoudre les cristaux de formazan. La quantité de cristaux de formazan est quantifiée par un spectrophotomètre (Power Wavex340, Model EL800, BioTek Instruments Inc., VT, USA) en utilisant un filtre à 570 nm avec une référence à 690 nm. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences effectuées en quadruplicata afin de s'assurer de leur reproductibilité. La cytotoxicité d'un échantillon est calculée comme pourcentage (%C) de la viabilité cellulaire des puits de contrôle (cellules non-traitées) (Eq.4) (Zhao et al. 2004).

$$\% C = \frac{OD_{\text{échantillon}}}{OD_{\text{contrôle}}} \times 100\% \quad (4)$$

où:

$OD_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance des puits avec l'extrait du matériau d'essai et

$OD_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance des puits de contrôle

Les données numériques sont analysées statistiquement en utilisant le test t de Student et la différence est considérée comme étant significative pour $p < 0,05$.

Les étapes du test MTT sont résumées dans le schéma ci-dessous (Figure 4.8) :

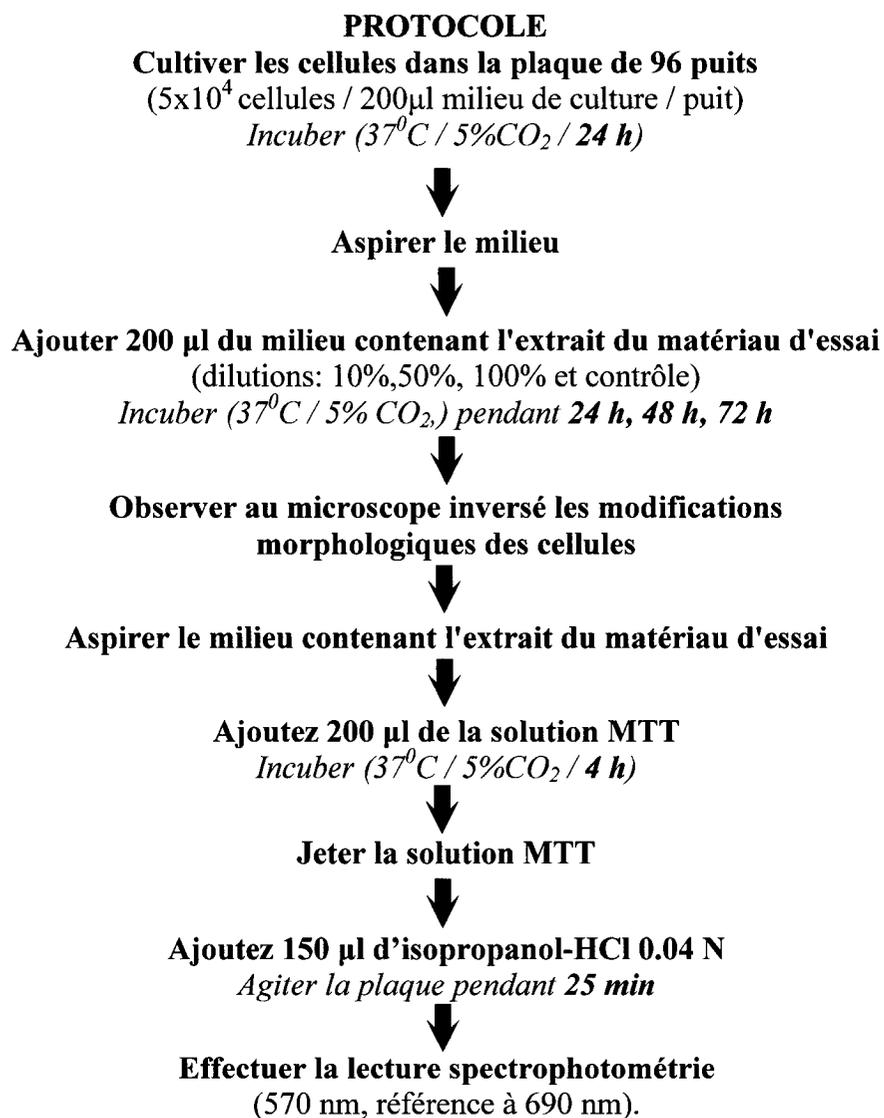


Figure 4. 8 : Les étapes du test MTT

CHAPITRE 5: The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: morphological, chemical and cytotoxic evaluation

Généralement, une poudre se caractérise par sa morphologie (forme et taille des cristaux), sa texture, sa composition chimique et sa structure. Quatre composites pulvérulents avec diverses fractions volumiques HA/Al₂O₃ de 95/5%, 90/10%, 80/20% et 70/30% ont été synthétisés par la méthode de précipitation acide-base (méthode Tagai et al. en 1981). La matrice d'HA a été préparée par la même méthode pour servir de poudre de référence. Ainsi la caractérisation de la poudre de référence permettra une évaluation du rôle de chaque paramètre étudié en tenant compte des changements dus au frittage de l'HA ou à l'ajout du renfort.

Ce chapitre contient les résultats obtenus durant ce projet sous forme d'un article intitulé « The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: morphological, chemical and cytotoxic evaluation », accepté au *Journal of Biomedical Material Research Part A* en août 2006. L'article traite une évaluation de l'effet de la température de calcination ou de frittage et de l'effet de la teneur en Al₂O₃ (variant entre 5 et 30%) sur la chimie, la morphologie et la cytotoxicité des composites. Quelques résultats supplémentaires d'analyse portent sur l'effet de la concentration du renfort sur taille des cristallites figurent après l'article dans une deuxième section (paragraphe 5.8).

The effect of varying Al₂O₃ percentage in hydroxyapatite/Al₂O₃ composite materials: morphological, chemical and cytotoxic evaluation

LM Epure^{1,2}, S Dimitrievska^{1,2}, Y Merhi², and L'H Yahia¹

¹Laboratoire d'Innovation et d'Analyse de Bioperformance-LIAB - Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Institut de cardiologie, Laboratoire de Pathologie Expérimentale, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author:

Laura Mery Epure

Biomedical Engineering Institute

Ecole Polytechnique of Montreal

C.P. 6079, succursale Centre-ville

Montreal (Québec); H3C 3A7, Canada

E.mail addresses: laura-mery.epure@polymtl.ca

Tel. : 1 514 340 4711 ext. 4968; Fax.: 1 514 340 4611

Co-authors

L'Hocine Yahia

*Biomedical Engineering Institute, Biomechanics and Biomaterials Research Group,
Ecole Polytechnique, C.P. 6079, succursale Centre-ville,*

Montréal, (Québec), Canada, H3C 3A7,

lhocine.yahia@polymtl.ca

Tel. : 1 514 340 4711 ext. 4378; Fax.: 1 514 340 4611

Sashka Dimitrievska

*Biomedical Engineering Institute, Biomechanics and Biomaterials Research Group,
Ecole Polytechnique, C.P. 6079, succursale Centre-ville,*

Montréal, (Québec), Canada, H3C 3A7,

sashkablue@hotmail.com

Yahye Merhi

*Institut de cardiologie, Laboratoire de Pathologie Expérimentale
5000, rue Bélanger, Montréal (Québec) HIT 1C8*

yahye.merhi@icm-mhi.org

5.1 Abstract

Hydroxyapatite (HA) and HA-alumina (HA/Al₂O₃) composites, with Al₂O₃ contents of 5, 10, 20 and 30%, were synthesized using a wet precipitation method and sintered at 900°C and 1300°C. We investigated the effect of sintering temperature and relative concentration of HA and Al₂O₃ on the chemical composition, surface morphology and cytotoxicity of the composite powders. The XRD results show that in the 1300°C composites, HA partially decomposed into CaO which combined with Al₂O₃ to form different calcium aluminates. For the 900°C composites the CaO phase was not detected, though a Ca/P ratio larger than 1.67 measured by XPS suggests that CaO was present in trace amounts. SEM-EDX analysis indicated that the HA microstructure was affected by the sintering temperature, and this HA is present on the surface of Al₂O₃ particles. The cytotoxicity of the composites was assessed indirectly using the MTT assay. The short-term effect of leachables was quantified by exposing a L929 mouse fibroblast cell line to the degradation products released by the composites after immersion in the cell culture medium. Degradation products were less toxic to L-929 at lower extract concentrations (10%, 50%) than at 100% concentration. Cell viability was also influenced by leachable size.

Authors Keywords: hydroxyapatite; composite; biocompatibility; cytotoxicity;

5.2 Introduction

Synthetic Hydroxyapatite (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, is the manmade analogue of the chemical and crystallographic mineral component of bones and hard tissues [1]. In contrast to “inert” materials, HA develops a direct, adherent and strong bond with bone tissue. This property, termed bioactivity, also leads to high osseointegration which places HA as the preferred material in bone regeneration. However, despite its good biocompatibility and bioactivity, the insufficiently high mechanical strength of HA restricts its application to small unloaded implants, surface-coated materials and low-loaded implants. Thus, the use of solid HA requires an appropriate method of material toughening. Despite the many investigations and the important scientific findings on how to improve the mechanical properties of dense HA by modifying the processing parameters, the improvements in HA mechanical characteristics are not satisfactory [2]. Consequently, the new trend in improving HA mechanical characteristics has shifted to the development of synthetic HA substitute in a composite form. The addition of a second mechanically resistant phase as reinforcement agent, such as a polymer, metal and ceramic, greatly increases the fracture toughness of HA ceramic matrix [2,3]. However, metals are not suitable as reinforcement agents due to the excessive corrosion reaction with HA, and undesirable reactions with tissues (increased levels of metal ions at implant tissues) [4]. On the other hand, compared to monolithic HA, the HA-polymer composite has shown to improve the mechanical characteristics; still, the presence of an inert polymer decreases the ability to bond to the bone [2] while the presence of a biodegradable polymer can compromise the biocompatibility due to the toxicity of the polymer biodegradation products [2,5,6]. For these reasons the application of the HA-polymer composite is limited to only special cases. Lastly, the reinforcement of HA matrices with ceramic particles revealed to have considerable potential for improving the mechanical properties [7]. Among the many ceramics used in orthopaedics, alumina (Al_2O_3) is classified as a bioinert material with excellent friction and wear properties as well as minimal tissue reaction [8]. Therefore a composite system of the two components, HA and Al_2O_3 , has potential as a synthetic biomaterial for hard tissues replacement

because of its combined benefits: the osteoconductivity and bioactivity of HA and the excellent mechanical properties of Al_2O_3 .

Until now most of the attention has been paid to composites preparation by mechanical composite mixtures: the reinforcement particles are incorporated in a HA matrix and a hot-pressed process is applied [9,10,11,12]. During high-temperature/high-pressure processes, chemical reactions can occur either inside the HA matrix itself or in the vicinity of the particles embedded in the matrix phase [13]. The mechanical properties of the composite are associated with the bonding strength between the component phases. Therefore, a chemical reaction at the matrix-reinforcement interface could mechanically increase the interfacial bond in spite of new phases formation [12,13]. On the contrary, at high temperatures, the presence of other phases in the HA matrix could accelerate the non-reversible formation of bioresorbable calcium phosphates, such as tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) and tetracalcium phosphate (TTCP) [10]. Moreover, when the conventional mixture technique was used, the composites were not well organized in terms of structural and morphological features [12]. In addition, the HA/ Al_2O_3 system was characterized by the strong chemical stability and inertness of alumina with no diffusion zones between matrix and fibers, indicating a weak chemical bond matrix/reinforcement [13].

Therefore, in order to chemically preserve the HA matrix and to avoid undesirable side reactions between the reinforcement and the matrix, relatively low sintering temperatures are desirable during the composites fabrication [14]. Generally, wet-chemical synthetic routes offer low-cost, low-temperature and simple synthesis method, in addition to a high quality resulting powder useful for applications in the reconstruction of hard tissue [15]. Recently, HA-based composite made by a precipitation of HA revealed to be efficient in obtaining a composite system with an ordered structure [16].

The objective using Al_2O_3 as reinforcement is to provide a superior mechanical stability to pure HA, but does not compromise the biocompatibility or the osteointegration properties of HA. While the HA precipitation in the HA/ Al_2O_3 system was the object of a previous work [17], the focus of this study is to investigate the effect of sintering

temperature and relative concentration of HA and Al_2O_3 on the chemical composition, surface morphology and cytotoxicity of the composite powders.

To evaluate the complete phase composition of our samples (in terms of chemical composition), X-ray diffraction (XRD) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis were applied. We then applied scanning electron microscopy in combination with energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDX) in order to morphologically and chemically assess the distribution homogeneity of the composites identified by XRD and XPS. Finally, the cytotoxicity (i.e., biocompatibility) of the composites was assessed indirectly using the MTT assay based on a method by Mosmann et al [18]. Even though HA is usually assumed to be completely biocompatible, we chose to assess its biocompatibility because recent reviews [1,15] have indicated that the biological behavior of HA actually depends on its chemical and phase composition, microstructure, and many other factors. Furthermore, it is absolutely necessary to verify the biocompatibility of HA composites because the introduction of foreign materials could compromise the biocompatibility of this ceramic.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Sample preparation

Composite powders of a weight matrix/fiber ratio of 95:5; 90:10; 80:20; 70:30, containing hydroxyapatite as matrix phase and particles of alumina as reinforcement were processed at two sintering temperatures: 900°C and 1300°C. HA powder was also prepared without the addition of Al_2O_3 as standard material.

5.3.1.1 Preparation of hydroxyapatite

The HA was prepared using the precipitation reaction between calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) and orthophosphoric acid (H_3PO_4) following the reaction (R1) of Tagai and Aoki [19,20]:



Ca(OH)_2 solution was obtained through the hydration of CaO , made via the calcination of CaCO_3 (Labsynth Ltda., Brazil) at 900°C for 2 h, in stoichiometric amount of deionized water according to Ca/P atomic ratio of 1.67 and stirred at 540 rpm. The stirring was maintained during the addition of the Ca and for 2 h thereafter. A solution of H_3PO_4 was prepared by diluting the H_3PO_4 (95% purity, Riedel-de-Haen Lab., Germany) in distilled water. The acid solution was added to Ca(OH)_2 suspension at a rate of 2 ml/min and the Ca/P ratio maintained at 1.67. The suspension obtained was stirred for 24 h after the acid had been added. The pH was checked at each 20 min during the precipitation process and maintained constant until the end of the process.

For drying, the resulting precipitates were placed for 4 h under continuous rotation (8 rpm) in an oil bath set at 70°C . The dried powder with 6% humidity was submitted to calcination at 900°C for 2 h. After cooling to 25°C , a portion of the powder was subjected to a sintering step at 1300°C for 2 h.

The notations used to characterize the hydroxyapatite samples are HA1 and HA2 and represent hydroxyapatite sintered at 900°C and 1300°C , respectively (see Table 1).

5.3.1.2 Preparation of hydroxyapatite/ Al_2O_3 composites

For the composites (95HA/5 Al_2O_3 , 90HA/10 Al_2O_3 , 80HA/20 Al_2O_3 and 70HA/30 Al_2O_3 (wt%) the Al_2O_3 - α powder (Dispersal P₃ powder 71.1% anhydrous alumina, Condea Chimie-RFA, Germany) used as reinforcement was added previously in the CaO suspension in order to obtain a homogeneous distribution and to avoid the large agglomerates of particles in the HA matrix.

First, stoichiometric amounts (5 wt%, 10 wt%, 20 wt% or 30 wt%) of Al_2O_3 were dropped into deionized water and homogenized for 10 min with an ultrasonic-homogenizer. Then, CaO was added to Al_2O_3 suspension according to Ca/P atomic ratio of 1.67 and stirred at 540 rpm for 2 h. The addition of H_3PO_4 solution in $\text{Ca(OH)}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ composite suspension was obtained in the same conditions described forward for the HA

matrix. The suspension obtained was stirred for 24 h and the pH was monitored at each 20 min during the precipitation process and it was maintained at the estimated level until the end of the process.

For drying, the resulting precipitates were placed for 4 h under continuous rotation (8 rpm) in an oil bath set at 70°C. The dried powder with 6% humidity was submitted to calcination at 900°C for 2 h. After cooling to 25°C, a portion of the powder was subjected to a sintering step at 1300°C for 2 h.

The notations used to characterize the samples (Table 5.1) were HA1AX and HA2AX where HAA denotes the composite hydroxyapatite-Al₂O₃, X is the content of Al₂O₃ (%wt), and 1 and 2 represent the calcination temperatures 900°C and 1300°C, respectively.

Table 5. 1: Samples notation

	Al ₂ O ₃	temp		Al ₂ O ₃	temp
HA ₁	-	900°C	HA ₂	-	1300°C
HA ₁ A5	5%	900°C	HA ₂ A5	5%	1300°C
HA ₁ A10	10%	900°C	HA ₂ A10	10%	1300°C
HA ₁ A20	20%	900°C	HA ₂ A20	20%	1300°C
HA ₁ A30	30%	900°C	HA ₂ A30	30%	1300°C

5.3.2 Powder characterization

5.3.2.1 X-ray diffraction (XRD) and data analysis

X-ray diffraction (XRD) was used to characterize the phase composition of all the samples. XRD patterns were recorded on a Bragg–Brentano type Philips X’Pert MRD diffractometer using CuK α radiation having a wavelength $\lambda = 0.15405945$ nm, generated under an accelerating potential of 50 kV and a beam current of 40 mA. Scan parameters included a scan range from 20° to 90° (2θ), a step size of 0.02°, a step time of 5 s and a detector slit of 1°. Phase identification was accomplished by X’Pert HighScore software

package, which includes an automated search-match function that compares the sample pattern with the JCPDS [Joint Committee of Powder Diffraction Standard] database.

5.3.2.2 Scanning electron microscopy in combination with energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDX)

The particle morphology of the HA-composites was examined by scanning electron microscopy (SEM) (JEOL, JSM 840 model) equipped with a Link AN10/55 S (Link Analytical, England) energy dispersive spectrometer unit. The EDX spectra were observed with Kontron Electronic GmbH (KS 3000) program. The samples were mounted on conducting carbon tape and pre-coated with gold/palladium thin film for 4 min at 25 mA under argon atmosphere using a Technics Hummer II sputter coater.

The SEM samples were examined at magnifications between 200x and 13000x using an accelerating voltage of 15 kV. EDX was used to determine their chemical surface composition with approximate $1\mu\text{m}^2$ resolution and source energy of 10 keV. Three runs on different spots on each specimen were made. Samples photographs were chosen to demonstrate differences in particles morphology.

5.3.2.3. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to determine the chemical composition of the composites surface. XPS measurements were acquired on an ESCALAB MKII spectrometer (VG Instruments) using non-monochromatised Al K_{α} radiation ($h\nu = 1486.6$ eV) from a twin Mg/Al anode operating at 15 kV and 300 W. The operating system pressure during the scans was $\sim 8 \times 10^{-9}$ Torr over a sample area of 3×2 mm². For each sample, the survey spectra (0–1200 eV) were recorded at pass energy of 50 eV and for the high-resolution scans for the elements of interest O 1s, C 1s and Ca 2p, at 20 eV. The resolution of the spectrometer was 1 eV for survey scans and 0.5 eV for high-resolution scans. All the spectra have been corrected for sample charging, with the adventitious C1s peak (285 eV) used as an internal reference.

5.3.3 Cytotoxicity evaluation

5.3.3.1 Cell culture

L929 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) mouse fibroblasts, is one of the recommended cell lines with optimum sensitivity for biocompatibility testing and is frequently used for biomaterials cytotoxicity testing [21,22]. L-929 cells were cultured at 37°C in a 95-5% O₂- CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), supplemented with 3.7 g/L of sodium bicarbonate, 10% heat-inactivated (56°C for 30 min) foetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories) and 1% penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 ng/ml) (Gibco Laboratories).

5.3.3.2 Preparation of the extracts

Extracts were obtained from the material samples in agreement with the ISO specification (10993-5) governing *in vitro* tests [23]. Equal amounts (1 g) of each sample were sterilized by ethylene oxide. After 7 days of aeration to eliminate the toxic risks due to sterilization chemical residues, each sample was immersed in DMEM serum free at a ratio of 0.1 g/ml and incubated for 120 h at 37°C under constant shaking at 250 rpm. Control culture medium without biomaterial was prepared in parallel in the same conditions. This is an advised procedure for biomaterials extraction in order to obtain the major toxic leachables and simulate better the short-term effect of the degradation products under conditions similar to the dynamic environment of human body. The extracts obtained were filtrated (0.45 µm pore size) to eliminate the possible presence of composites solid particles. Samples extracts were stored at -80°C until MTT assay was performed. The extracts were used undiluted (100%) and in two dilutions (50% and 10%) and supplemented with 10% FBS before using.

5.3.3.3 MTT assay

The MTT cytotoxicity assay allows the detection of cytotoxicity or cell viability following exposure to toxic substances. The MTT assay is based on the protocol

described for the first time by Mossmann (1983) [18] and founded on the ability of living cells to convert a water-soluble yellow dye, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) into purple formazan crystals by cleavage of the tetrazolium ring by succinate dehydrogenase within the mitochondria. The formazan product is impermeable to the cell membranes and it accumulates in healthy cells [24]. Upon addition of acidified isopropanol, the membrane is lysed and the purple product resulting from formazan crystals dissolution is released. The optical density is then measured for each sample and compared to the optical density of the negative control. Therefore, the quantity of the formazan product is directly proportional to the number of living cells in culture.

Briefly, L-929 fibroblasts cells were seeded in 96-well plate (200 μ l/well at a density of 2.5×10^5 cells/ml) and allowed to adhere. After 24 h, culture medium was aspirated and replaced (200 μ l/well) either by fresh medium or undiluted extracts or control and incubated for 24, 48 or 72 h at 37°C in a humidified CO₂ atmosphere. After the incubation periods, the extracts were removed and each well was treated with 200 μ l of MTT solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at the final concentration 0.5 mg/ml. Plates were further incubated for 4 h at 37°C when the medium was discarded and replaced by 150 μ l/well of acidified isopropanol. After formazan MTT solubilization (25 min) the optical densities (*OD*) of the wells were measured with a spectrophotometer at 570 nm (Model EL800, Biotech, USA).

All experiments were carried out 3 times and 4 wells per sample were used in each experiment. The data were confirmed to be reproducible. Cytotoxicity was calculated as the percentage of cell viability (%*C*) of control cells (Eq.1) [25].

$$\% C = \frac{OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100\% \quad (1)$$

All reported values are the means of triplicate experiences. Numerical data were analyzed statistically using Student t tests. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

5.4 Results and discussion

5.4.1 Phase composition dependence on sintering temperature and of Al₂O₃ concentration.

5.4.1.1 Phase composition variations as determined by XRD

XRD analysis was used to obtain information on the different phases present in the 900 and 1300°C sintered composite powders. All the X-ray diffraction patterns of HA/Al₂O₃ composites are shown in Figure 5.1.

The XRD patterns presented in Figure 5.1 reveal important information on the composition of the powder samples. Firstly, all peaks belonging to the HA hexagonal structure ($a = 9.418 \text{ \AA}$, $c = 6.884 \text{ \AA}$) of the P6₃/m symmetry group (JCPDS pattern 09-0432), were clearly identified in all our X-Ray patterns (peaks numerated 1). This trend indicates an HA presence in all samples, regardless of the different ratios of HA and Al₂O₃.

At 900°C, for all the composites a second phase is present: Al₂O₃ (peaks 5). The Al₂O₃ concentration steadily increases from 5% to a maximum of 30%; therefore, the peaks representatives to Al₂O₃ grow significantly in intensity as well. The representative peaks of Al₂O₃ as described by JCPDS (10-0173) and identified in our patterns are the following: 100% intensity peak, corresponding to the (1 1 3) Miller's plane, at 43.2°; 90% intensity peak, corresponding to the (1 0 4) Miller's plane, at 34.9° and lastly the 80% intensity peak, corresponding to the (1 1 6) Miller's plane, at 57.5° (all angles refer to the 2 θ scale).

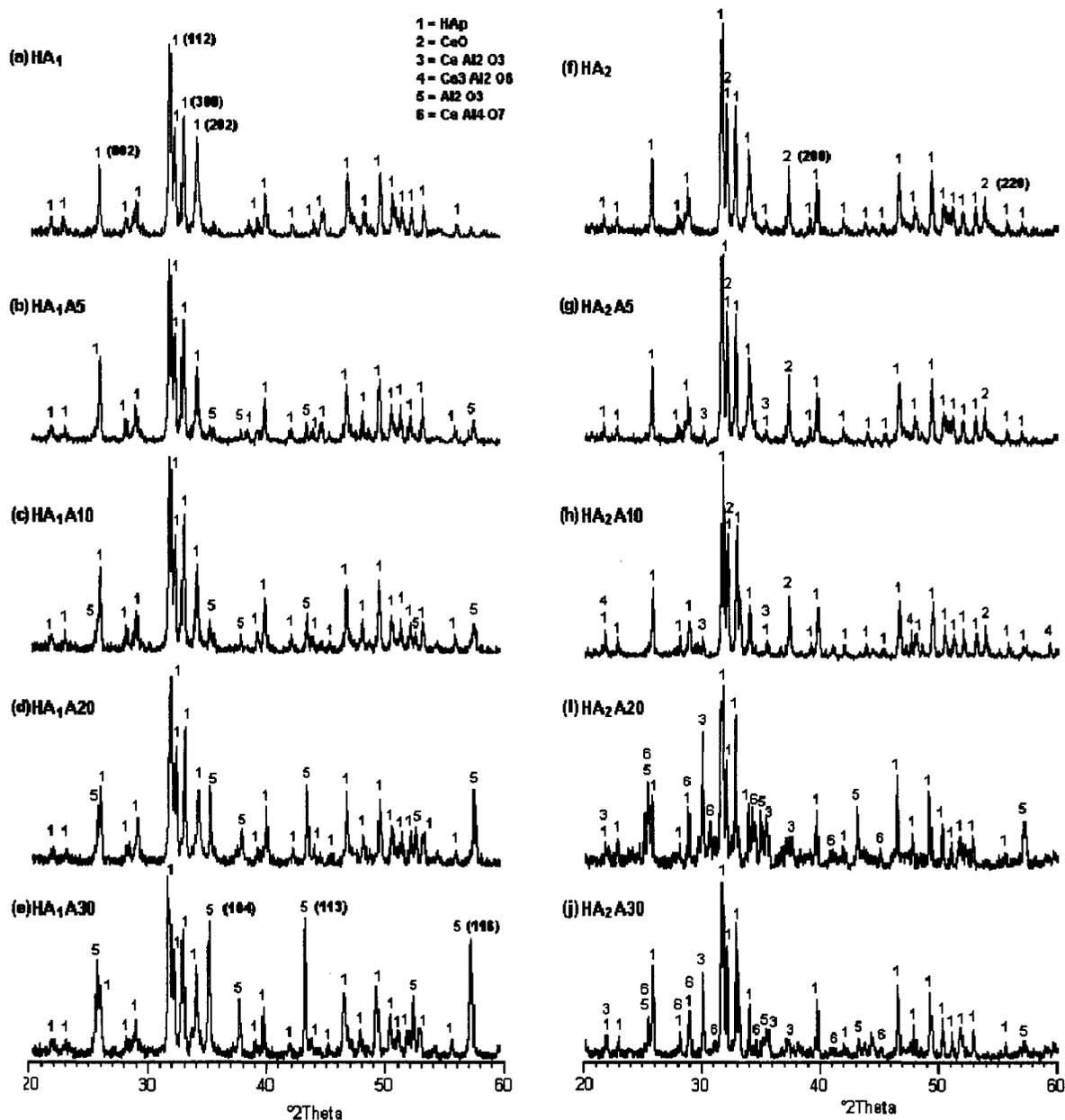


Figure 5.1: XRD patterns of HA/ Al_2O_3 composites obtained at: 900°C for (a) HA matrix alone, (b) HA with 5wt% Al_2O_3 , (c) HA with 10wt% Al_2O_3 , (d) HA with 20wt% Al_2O_3 , and (e) HA with 30wt% Al_2O_3 ; and at 1300°C for (f) HA matrix alone, (g) HA with 5wt% Al_2O_3 , (h) HA with 10wt% Al_2O_3 , (i) HA with 20wt% Al_2O_3 , and (j) HA with 30wt% Al_2O_3 .

Upon sintering at 1300°C, the presence of two new peaks at 37.376° and 53.928° are detected only for the HA₂, HA₂A5 and HA₂A10 samples. Their correspondence to calcium oxide (CaO- peaks 2 - Lime JCPDS 37-1497) indicates a partial decomposition of HA at 1300°C. The complete identification of the two peaks is as follows: the 100% intensity peak at 37.376° corresponds to the (2 0 0) Miller's plane and the 54% intensity peak at 53.928°, corresponds to the (2 2 0) Miller's plane (all angles refer to the 2θ scale). The presence of CaO is no longer detected by XRD analysis for the composites with alumina content equal or greater than 20%, i.e. HA₂A20 and HA₂A30 samples. Hence, an inverse correlation between the Al₂O₃ quantities and the presence of CaO can be made. For the composites where the CaO is present, the Al₂O₃ is not detectable and vice versa. It should be noted that the literature presents ambiguous data about the minimum decomposition temperature of HA during sintering, as well as products of the decomposition itself. Some results indicated that stoichiometric HA is stable in dry or moist air up to 1200°C and does not decompose; other authors report that stoichiometric HA, after a dehydroxylation process, starts to decompose into secondary phases at temperature in the range of 1350-1500°C [26].

Our XRD experimental results showed that the formation of large quantities of CaO occurred only during the 1300°C heating regime since at 900°C no signs of HA decomposition are evident. Moreover, the partial decomposition of HA to CaO seems to occur without the chemical implication of Al₂O₃, as supported by the observation that the HA matrix alone sintered at 1300°C resulted in CaO formation.

The composites with 0%, 5% and 10% Al₂O₃ indicated a considerable amount of CaO while the composites with superior Al₂O₃ concentration resulted in undetectable amounts of CaO. Therefore, when the Al₂O₃ concentration surpasses 10% (samples: HA₂A20 and HA₂A30) the trend of CaO formation inverts. This noticeable reduction in CaO formation is associated with a reaction between Al₂O₃ and CaO to produce new phases, namely CaAl₄O₇ and CaAl₂O₄ (peaks 3 and 4 in Figure 5.1). Therefore, since no formation of other calcium phosphate phases were observed during the HA decomposition and since CaO formation also occurred in the absence of Al₂O₃ phase, it is

safe to conclude that thermal energy alone leads to partial conversion of HA into crystalline CaO.

As previously mentioned, the formation of the new phases (i.e. CaAl_4O_7 , CaAl_2O_4 and $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$) is a concern because it may compromise the mechanical strength and integrity of the composite system. The fact that we observed more than one phase is not entirely unexpected because it has been proven [27] that more than one phase occurs in a single reaction and each phase takes part in several reactions. However, this multiple reaction phenomena should be considered further because it (formation of new phases) may be difficult to control by sintering temperature or other process parameters.

The formation of calcium aluminates was also confirmed by Ji and Marquis [28]. Investigating an Al_2O_3 (20 wt %) reinforced hydroxyapatite composite, the authors reported the partial decomposition of HA into α -TCP and CaO during sintering, and the further reaction of Al_2O_3 with CaO with the production of two new phases: CaAl_2O_4 and CaAl_4O_7 .

5.4.1.2 X-ray Photoelectron Spectroscopic (XPS) analysis

The main purpose of XPS examination was to detect phases that may have been overlooked by XRD. XPS is more sensitive; it measures the elemental composition of the sample surface, identifies the chemical state of surface species and allows the relative quantification of elements [29]. The core level binding energy (BE) values of the most important XPS peaks and the relative chemical composition of the sample surfaces are tabulated in Table 5.2.

Table 5.2: Peak position, surface composition, and calculation of the Ca/P ratio for the HA/Al₂O₃ composites as determined by XPS (TV = theoretical value, BE = binding energy)

Composition (at%)									
	Ca	P	O	C	Al	Si	Ca/P	Ca/O	P/O
BE (eV)	347.5±0.5	133.5±0.5	531.5±0.5	285.5±0.5	74	99.5±0.5			
HA (TV)	23.8	14.3	61.9	-	-	-	1.67	0.38	0.23
HA ₁	17.37	9.97	60.72	11.94	-	-	1.74	0.29	0.16
HA ₂	16.27	5.78	53.69	24.25	-	-	2.81	0.30	0.11
900°C composites									
HA ₁ A5	15.95	9.36	57.74	16.95	-	-	1.70	0.28	0.16
HA ₁ A10	15.94	9.26	58.37	15.84	-	-	1.72	0.27	0.16
HA ₁ A20	15.79	7.01	60.13	15.29	-	-	2.25	0.26	0.12
HA ₁ A30	16.25	7.60	61.94	14.20	-	-	2.14	0.26	0.12
1300°C composites									
HA ₂ A5	15.52	4.58	57.84	22.05	-	-	3.39	0.27	0.08
HA ₂ A10	15.29	6.62	55.89	22.20	-	-	2.31	0.27	0.12
HA ₂ A20	14.95	7.57	54.04	16.31	4.54	6.59	1.98	0.28	0.14
HA ₂ A30	12.62	7.4	54.58	18.40	2.33	4.66	1.71	0.23	0.14

Composition

As shown in the survey scans (Table 5.2) the only elements detected on the 900°C heat-treated samples were C, Ca, P and O. The BE for Ca2p, P2p and O1s recorded for all samples were typical of HA [30]. Besides carbon that was present in all the samples, no other contaminant element was detected. However, the carbon contamination level (atomic concentration from 11.94 to 24.25%) is typical for "adventitious carbon" contamination which exists on the surface layer due to adsorption of impurity hydrocarbons (normal for all samples exposed to atmospheric conditions) [31]. For the 1300°C heat-treated samples, the dominant signals are also from C, Ca, P, and O. However, for the HA₂A20 and HA₂A30 samples the presence of the two new peaks, Al 2p at 74 eV and Si 2p at 99 eV, were also observed. The BE for Al 2p peak at 74 eV, denotes the presence of Al₂O₃ [30,32].

As opposed to the XRD spectra (Figure 1) where the aluminium peak is observed, the XPS survey scans indicate that all the samples sintered at 900°C show only the presence

of HA. Seeing that the analytical depth of XRD is in the micrometer range [33] and the depth of XPS is no more than 100 Å [34], this discrepancy suggests that the surface of the Al₂O₃ particles was completely covered by a HA layer.

For the HA₂A20 and HA₂A30 samples, silicon traces were detected (Si 2p at 99 eV). Because Al was also detected in both cases, this was attributed to contamination of the aluminum, though further investigation must be made to confirm this hypothesis.

In order to determine the chemical bonds in which the detected elements were implicated, we examined a high resolution scan of the Ca 2p, C 1s, P 2p and O 1s peaks of the XPS spectrum for the HA₁A10 sample. The O 1s and C 1s core-level spectra can be deconvoluted into two and five individual peaks, respectively, as shown in Figure 2 (a and b). The two components of the deconvoluted O 1s peak are one centered at 531.6 eV and a second one of minor intensity centered at 532.5 eV. The peak at 531.6 eV in Figure 2 could be attributed to Al-O bonds in the Al₂O₃ phase or to hydroxyl and phosphate groups (OH⁻, PO₄³⁻), being characteristic of apatite [35]. Since the intensity of Al peak is not present in the HA₁A10 XPS scan, this peak is probably due to the contribution of the hydroxide and phosphate groups and not to the Al-O bond. The other peak at 532.5 eV can be assigned to adsorbed water vapor (H₂O).

The C 1s spectrum of the mentioned sample is shown in Figure 2b and comprises five peaks after deconvolution. The highest peak at 285.7 eV and the lowest peak at 285 eV correspond to aliphatic carbon atoms of "adventitious carbon" [35]. The deconvoluted C 1s peak at 290.5 eV corresponds to the carbonate group CO₃²⁻. Carbonate is an impurity that is commonly incorporated into various synthetic calcium phosphates during synthesis, due to the presence of CO₂ in air and solutions [36]. In addition, the carbonates are not considered to be toxic due to their constant presence in the biological calcium phosphates [37]. The peaks at 286.5 eV and 289.6 eV may be attributed to surface carbon bound to atmospheric oxygen, i.e. C-O and C=O, respectively [38]. The P 2p spectrum (not shown here) consists of one symmetric signal centered at 133.6 eV, which confirms its stable form in apatite [39]. At high-resolution the Ca 2p spectrum is a doublet with Ca

2p_{3/2} at 347.9 and Ca 2p_{1/2} at 351.5 eV, which are characteristic of the bond energy of CaO or CaCO₃.

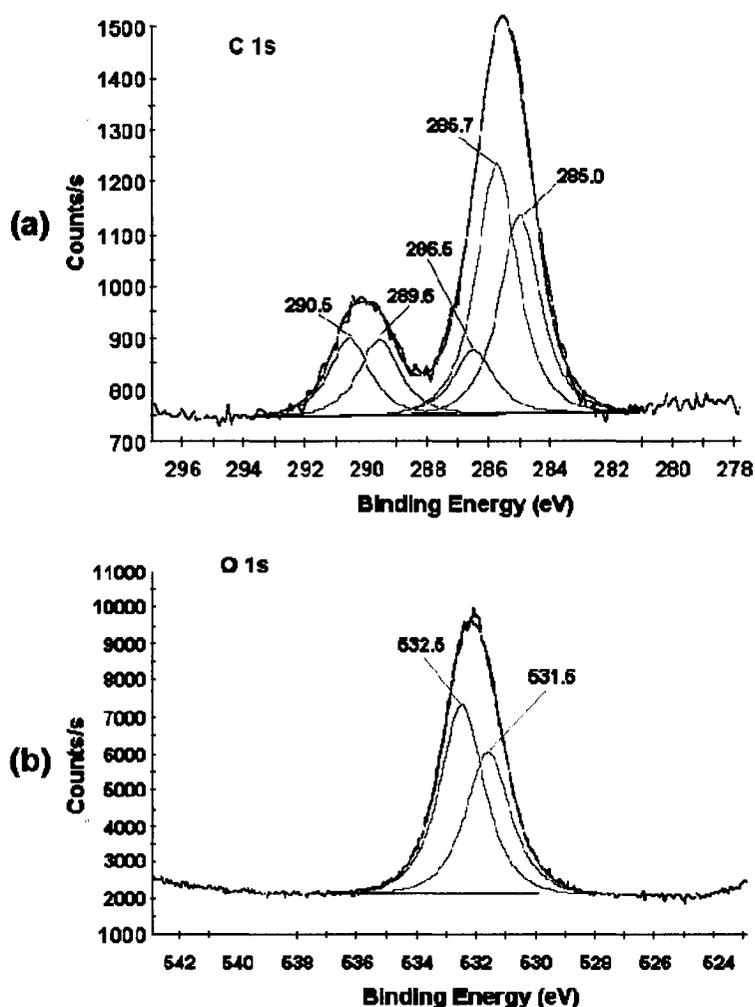


Figure 5.2: XPS (a) C1s spectrum and (b) O1s of 900 °C heat-treated 10% Al₂O₃ composite.

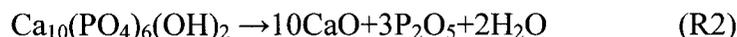
Ca/P, Ca/O and P/O Ratios

The Ca/P, Ca/O and P/O ratios are an important parameter since they provide identification of the different calcium phosphates phases present and indicate their mole fractions. Firstly, the Ca/P ratio gives information about the HA composition and its secondary phases. This information is obtained by comparing the theoretical value (TV)

of the stoichiometric HA, shown in Table 5.2, (obtained from the chemical formula) with the experimentally obtained values. Briefly, HA with a Ca/P ratio that exceeds the theoretical value (stoichiometric HA: 1.67 Ca/P ratio) is known to decompose upon heating into HA and CaO [28]. On the other hand, when the Ca/P molar ratio of HA is lower than 1.67, β - or α -tricalcium phosphate (TCP) may form [26].

The other two ratios calculated are the Ca/O and P/O because the Ca/O ratio indicates the oxygen excess in the samples while the P/O ratio indicates the eventual loss of phosphate from the surface. The Ca/P Ca/O and P/O atomic ratios were calculated and presented in Table 5.2.

The values of the ratios suggest that the P levels varied greatly between samples. The variations in the phosphorus level could be correlated with the presence of CaO in the samples. For samples with similar levels of Ca, those with lowest proportion of P (5.78 at% for HA₂, 4.58 at% for HA₂A5 and 6.62 at% for HA₂A10) are the same that contained CaO, as detected by the XRD analysis. Since there are no differences in the Ca level, a decrease in the P level is probably caused by the loss of P during the partial conversion of HA into CaO at 1300°C. This process can be expressed by the reaction (R2) [40]:



Because P₂O₅ sublimates at 300°C, there is no presence of P₂O₅ crystalline phase in the samples at the temperatures above 300°C [40]. This could explain the low P levels, the decreasing P/O ratios and the larger Ca/P ratios for these samples, supporting at the same time the earlier hypothesis that there is partial HA decomposition of the samples that underwent the 1300°C treatment.

For all the 900°C samples, the Ca/P ratio is superior to the theoretical value 1.67. However, the Ca/P ratios of the HA₁, HA₁A5 and HA₁A10 are slightly larger (~1.7) than the theoretical value and lower than Ca/P ratio of the HA₁A20 and HA₁A30 (~2.2). Although the Ca/P ratio value is very close to that of the stoichiometric HA, the decrease of P/O ratio indicates a loss of phosphate from the surface. Based on the Ca/P ratio

measured by XPS, and considering that XRD may not be able to show the presence of minor phases at small percentages, it appears that the 900°C HA/Al₂O₃ composites contains small amount of CaO. Thus the formation of CaO occurred also during the 900°C heating regime.

For all the composites in which Al was not detectable by XPS analysis (i.e. HA₁A5, HA₁A10, HA₁A20, HA₁A30, HA₂A5 and HA₂A10), the Ca level was relatively constant. The lack of Al could be explained by the presence of a HA layer at the surface of the Al₂O₃ particles. If this HA coating is thicker than 100 Å (analytical depth of XPS) then the underlying Al would not be detectable by this technique.

In the case of HA₂A20 and HA₂A30 samples, the Ca/P ratio was lower than expected. It was noted that for these same samples, Al was detected. A significant decrease of the Ca proportion for these samples was simultaneously observed. Since there are no changes in the proportion of P and O for these two samples, only the change in Ca level can be responsible for the decreased Ca/P ratio. Moreover, the analysis shows that (Ca+Al)/P stays approximately constant (≈ 2). This result confirms the coexistence of HA and calcium aluminates in these samples, as already detected by XRD analysis.

5.4.2 Morphologic evaluation of powder samples

The influence of the sintering temperature and the %Al₂O₃ concentration on the microstructure in the HAp/Al₂O₃ composites was studied by SEM. EDX coupled with SEM was applied to associate the elemental composition with the morphological features of an area.

The SEM micrographs of the HA alone, obtained by both heating processes (900 and 1300°C), are shown in Fig. 5.3(a-b). Although the SEM and the EDX tests were performed for all composites samples, only the results for the HA/5%Al₂O₃ at 900°C (Fig. 5.4) and 1300°C (Fig. 5.5) composite are presented, because the other samples had an identical morphology for the same heating temperatures. Thus, the microphotographs selected in Fig. 5.4 and 5.5 are representative of all other composites sintered at 900°C and 1300°C respectively.

Fig. 5.4 and 5.5 shows the SEM morphologies of HA₁A5 and HA₂A5 composite particles. The images present general features of each sample. In each figure, two areas of interest are magnified further; these are referred to as Areas 1 to 4. Note that these areas were selected because their morphologies are obviously different. The elemental compositions of spots within the Areas 1 to 4 were analyzed by EDX (Fig. 5.4c, e and f, Fig. 5.4c, e and f).

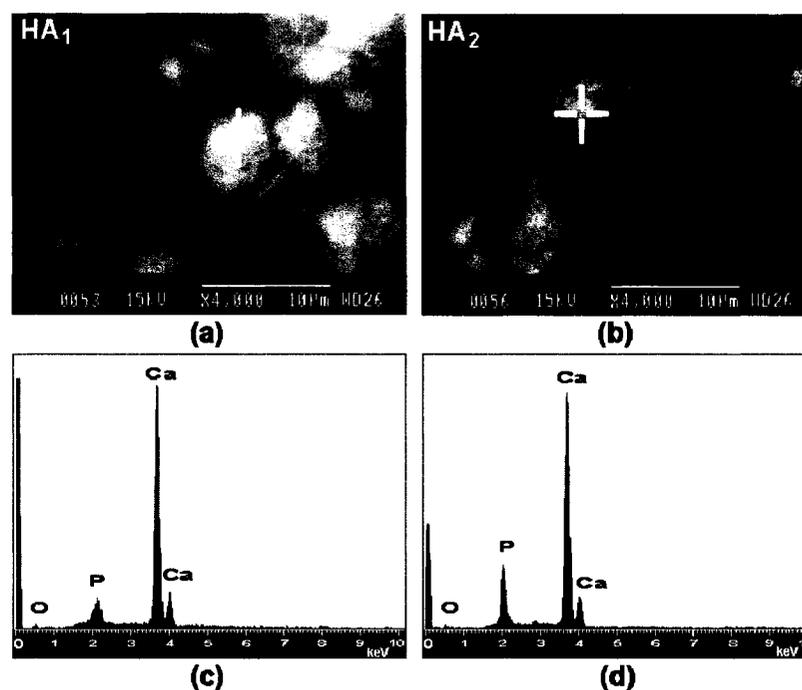


Figure 5.3: (a) SEM micrograph of the HA₁ powder heated at 900°C (original magnification x4000); (b) SEM photograph of HA₂ powder heated at 1300°C (original magnification x4000); (c) EDX spot analysis of the HA₁ sample shown in (a); (d) EDX spot analysis of the HA₂ samples shown in (b).

At 900°C the HA₁ powder was composed of crystals with a high tendency to agglomerate (Fig 5.3a). By increasing the sintering temperature to 1300°C these crystals sintered together resulting in fused particles of HA₂ (Fig 5.3b).

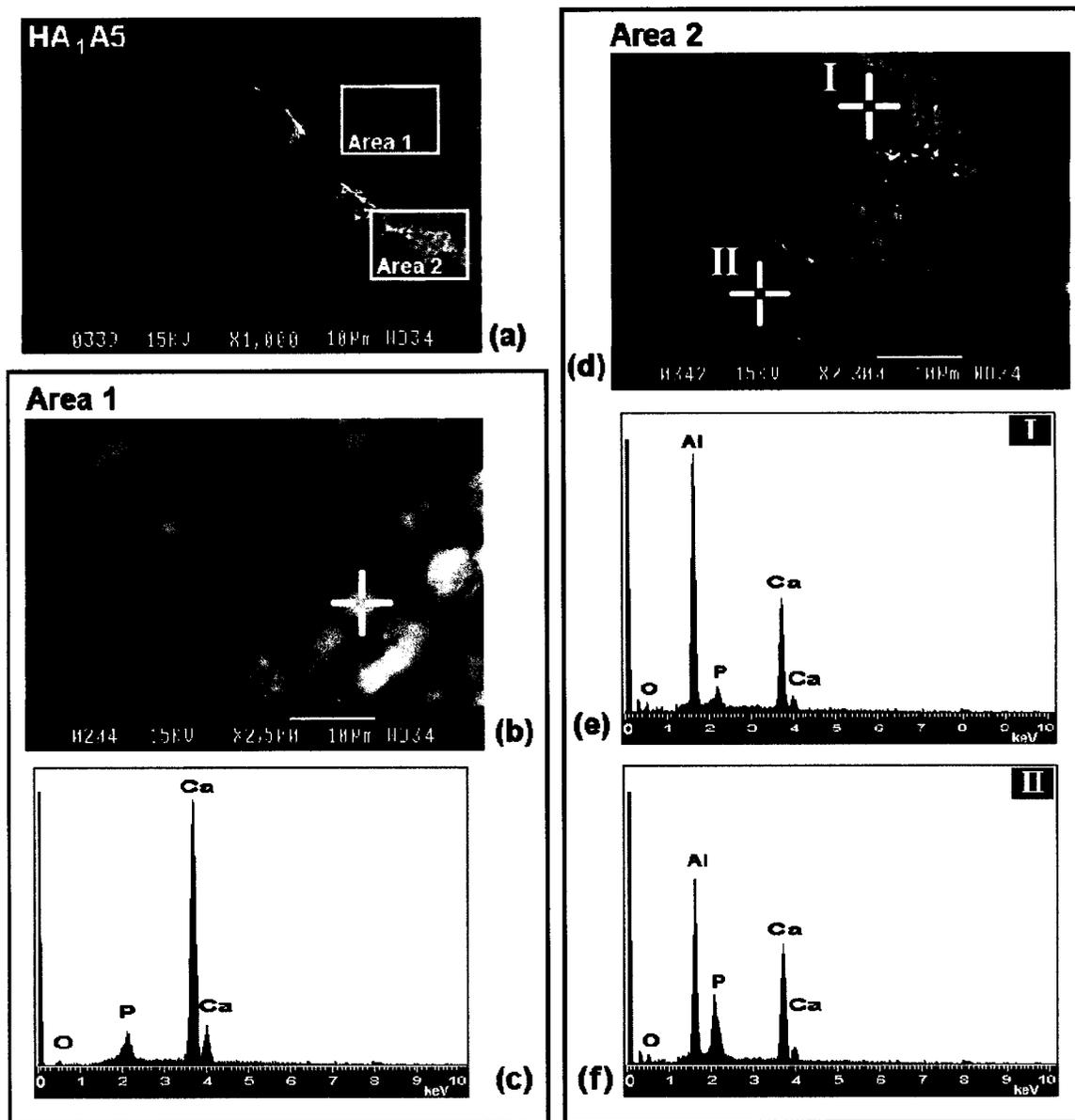


Figure 5.4: (a) SEM micrograph of HA/5%Al₂O₃ heated at 900°C, general view (original magnification x1000); (b) SEM micrograph of HA particle, selected Area 1; (c) EDX analysis of the HA particle Al₂O₃ in spot; (d) SEM micrograph of Al₂O₃ particle, selected Area 2; (e) EDX analysis of the Al₂O₃ particle in spot I; (f) EDX analysis of the Al₂O₃ particle in spot II.

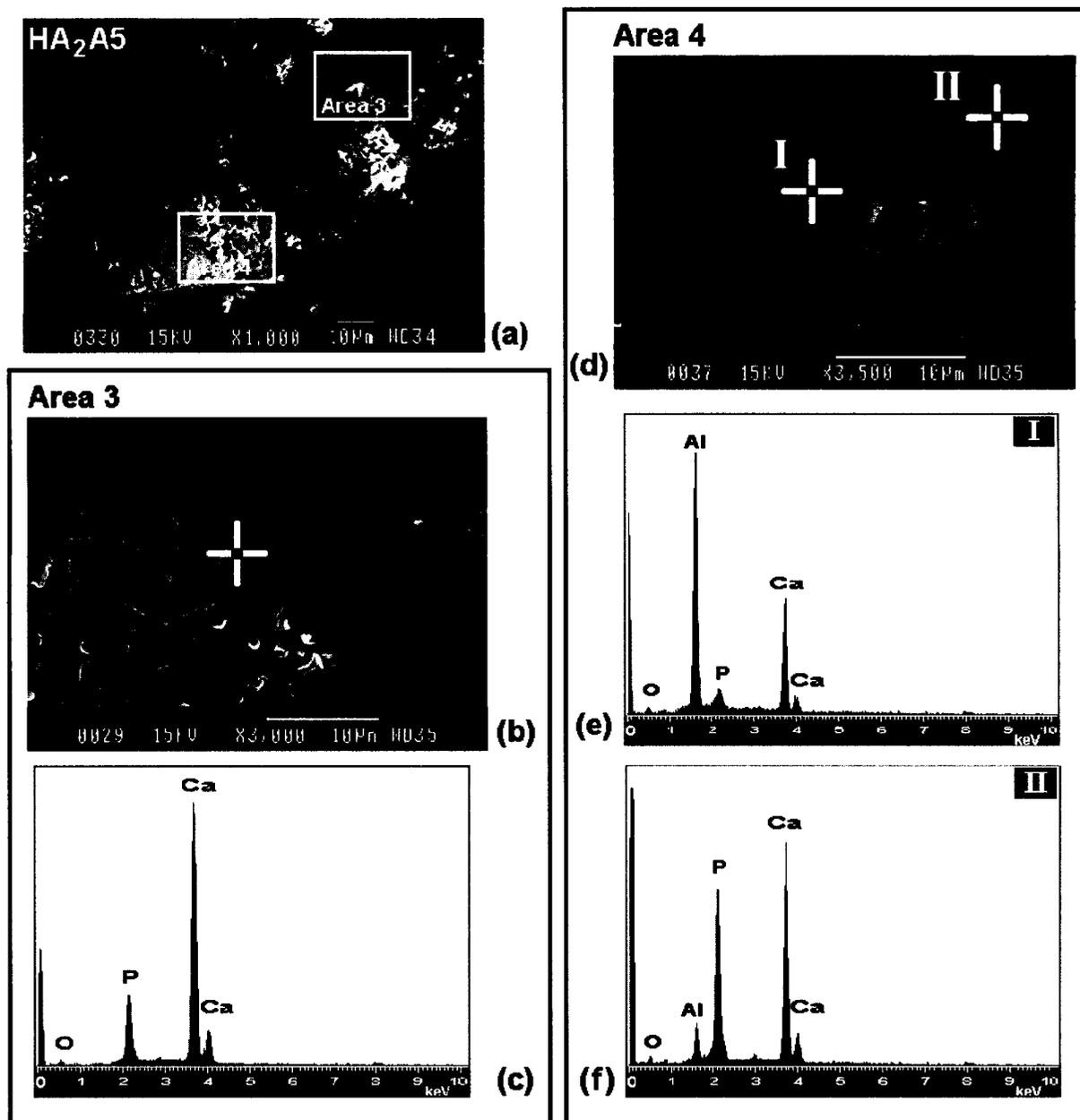


Figure 5.5 : SEM micrograph of HA/5%Al₂O₃ heated at 1300°C, general view (original magnification x1000); (b) SEM micrograph of HA particle, selected Area 3; (c) EDX analysis of the HA particle in spot; (d) SEM micrograph of Al₂O₃ particle, selected Area 4; (e) EDX analysis of the Al₂O₃ particle in spot I; (f) EDX analysis of the Al₂O₃ particle in spot II.

For the composite samples, two distinct morphologies could be observed in their structure (Areas 1-4). The first morphological feature was a granular aggregation corresponding to the HA particles (Area 1 of Fig. 5.4 and Area 3 of Fig. 5.5). The second was a mixture of irregular shaped particles (Al_2O_3) embedded partially or totally within the same granular structure (Area 2 of Fig. 5.4 and Area 4 of Fig. 5.5). The second morphology is shown at higher magnification in Fig. 5.4d and 5.5d. For the samples heated at 900°C , the surface of the HA particle (Fig. 5.4b) appeared to be composed of very small crystals. For the samples sintered at 1300°C , the HA particle (Fig. 5.5b) appeared to have a fused surface, giving the appearance of a smooth surface with globular aggregates. Compared with the samples containing only HA (HA_1 and HA_2 in Fig. 5.3) it can be seen that the HA morphology is not affected by the content of Al_2O_3 in the samples, yet the HA phase undergoes a clear change in morphology with increasing calcination temperature.

The EDX spectra of the HA matrix (Fig. 5.2c and 5.2d) showed characteristic peaks at 1.5, 1.8, and 3.75 keV, corresponding to elements oxygen, phosphorous, and calcium, which describe the characteristic constituents of HA. The composition of both HA_1 and HA_2 powder revealed significant amounts of Ca, P and O.

Since two distinct morphologies were observed in the composites structure, the EDX measurements were made for each morphology. To check the reproducibility of the results the measurements for each morphology were repeated at different spots (not shown).

Figures 5.4e and 5.4f show the EDX spectra of the spots I and II in the selected Area 2 of the $\text{HA}_1\text{A}10$ composite synthesized at 900°C . The Al_2O_3 particle is assumed to be at these spots judging by the morphology. In addition to aluminum (Al) and oxygen (O), we also detected calcium (Ca) and phosphorus (P), confirming the presence of HA on the Al_2O_3 particle as observed by SEM. Moreover, EDX measurements carried out on different spots regions of the Al_2O_3 particle revealed variations in Ca, P and Al peak intensities. A difference in the thickness of the HA at the surface is thought to be responsible for these variations.

At 1300°C, the EDX results indicate the presence of HA on the surface of the Al₂O₃ particles, despite that SEM suggest the absence of HA at this spot. In particular, small amounts of Ca and P at 10 keV (Fig. 5.5e) representing HA was detected, supporting the XPS results. Furthermore, as was observed for the Al₂O₃ particles of 900°C composites, the thickness of the HA was not uniform, as evidenced by the variation in Ca, P and Al peak intensities at different regions of the same particle.

5.4.3 Cytotoxicity evaluation

Generally, biomaterials display variable behaviors in biological systems. The toxic effect of new biomaterials on cells is considered to be one of the most important parameters to be evaluated. Generally, toxic substances act at cellular and sub-cellular levels affecting more than a few cellular functions [24]. Loss of cellular viability is one of the critical consequences of a toxic biomaterial.

In our study, the MTT assay is used to determine the toxicity of the leachables at the cellular level by measuring the activity of mitochondrial enzymes. The signal generated is dependent on the degree of activation of the living cells [24]. The short-term effect of leachables from HA composites was quantified by exposing L929 cells to the degradation products released by the samples after immersion in culture medium. The results are expressed as a percentage of cell survival compared to the negative control. For the undiluted extracts of the samples HA₂A10 and HA₂A20 the results were not reliable because the excessive amount of leachables interfered with the spectrophotometric assay. For this reason the results for these two samples (at 100% extract concentration for all the incubations times) were excluded from our analysis.

The cell survival following contact with the extracts is reported in Fig.6. The MTT assay revealed that the 10% dilution extracts from all materials and for all the incubations times did not appear to affect cell viability while 50% dilution extracts affect the cell viability to different extents. For instance, at 900°C, only the composite with the highest concentration of Al₂O₃ (HA₁A30) decreased cell viability (about 40% after 72 h) at 50% extract dilution. On the contrary, at 1300°C three of the four composites samples, those

having the highest concentrations of Al_2O_3 ($\text{HA}_2\text{A10}$, $\text{HA}_2\text{A20}$, $\text{HA}_2\text{A30}$) induced the highest percentage of cell death (about 60% or more after 72 h) at 50% extract dilution. The undiluted extracts from all materials are toxic at all times tested.

After 48h the L929 cells were analyzed microscopically at 20 X magnification (Fig. 5.7). The morphology of the control (untreated cells) was characteristic of healthy fibroblasts. They were homogeneously distributed in the culture field with intact membranes and had homogenous or slightly granulated cellular contents (Fig. 5.7a). However, the cells incubated with composite extracts are highly damaged. Although the cells remained attached there was a substantial cell reduction and a complete cell lysis. For the cells incubated with extracts from HA_1 , HA_2 , $\text{HA}_1\text{A5}$, $\text{HA}_1\text{A10}$, $\text{HA}_1\text{A20}$ and $\text{HA}_1\text{A30}$ (Fig. 5.7 b, c, d, f, h, j), breaks in the cell walls and loss of cytoplasm can be observed. For the $\text{HA}_2\text{A5}$ and $\text{HA}_2\text{A30}$ samples all cells appear non-viable whereas for the $\text{HA}_2\text{A10}$ and $\text{HA}_2\text{A20}$ samples the cellular morphology was difficult to analyze because the excessive amount of degradation products.

Following the analysis of Figure 5.7, two main trends become evident. A dependency of the toxic leachables morphology on the sintering temperature is the first evident trend. At the lower sintering temperature of 900°C the leachables are in the microscopic dimensions (~ 5 to $10 \mu\text{m}$). As the temperature is increased to 1300°C the leachables seem to disappear. However, the observation that the cell viability is low suggests that toxic leachables are actually present. This is most evident in Figures 5.7e, 5.7g and 5.7i , where the leachables from the composite sintered at 1300°C manifest themselves as black clouds instead of round spheres as for the same composite at 900°C (Fig. 5.7d, 5.7f, and 5.7h). However, note that this dependency of leachable size is only noticeable for samples containing Al_2O_3 . This implies that the degradation product features depend on chemical composition as well as temperature. This leads to the second observable trend. When the alumina phase is added to the HA matrix we see a dependency of degradation particles morphology on the alumina concentration. In particular, the particles decrease in size proportional to the increase in alumina concentration.

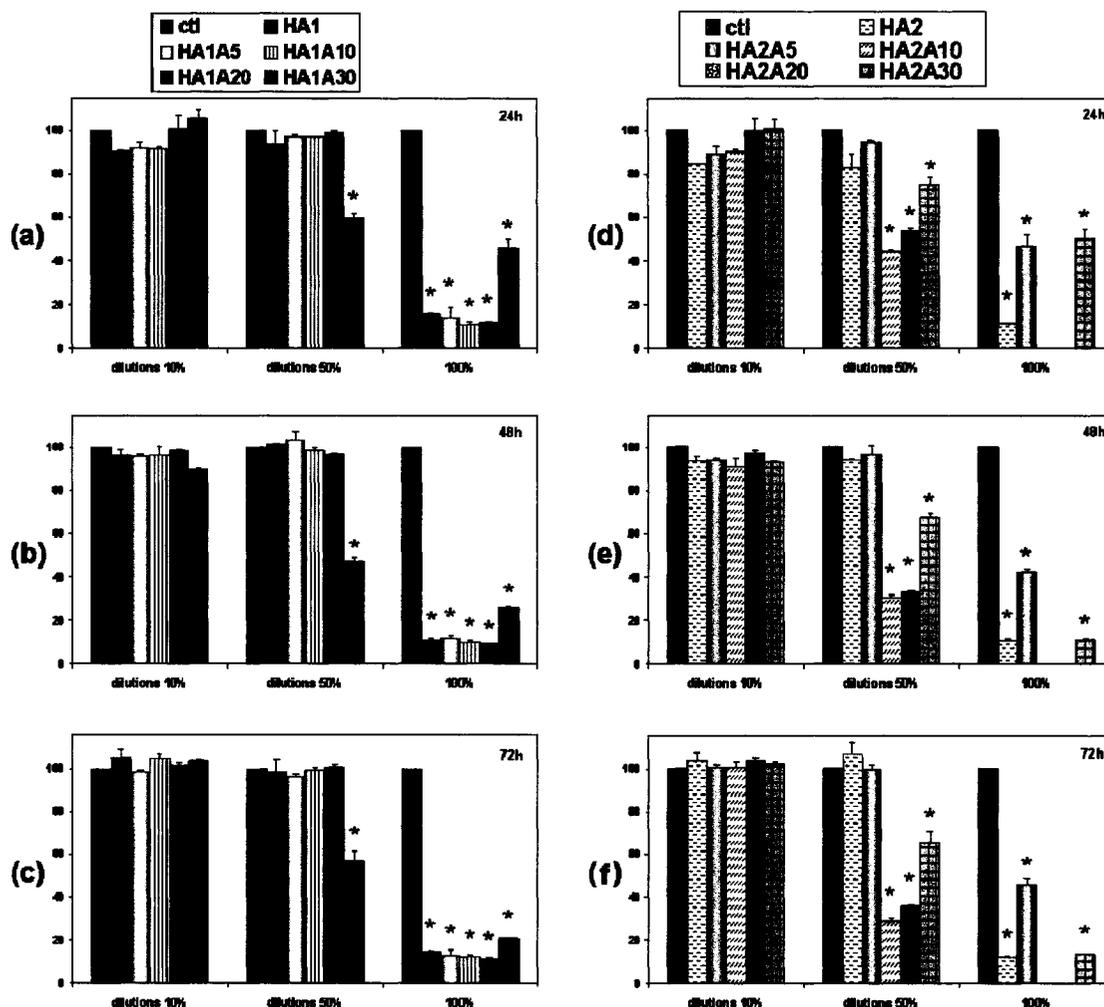


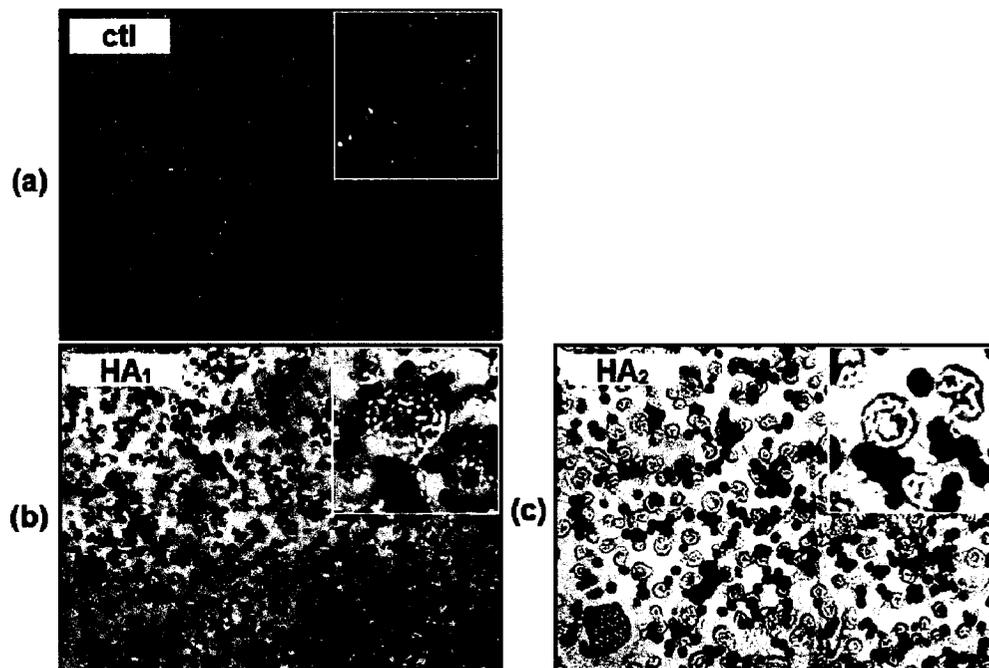
Figure 5.6: Effect of diluted (10%, 50%) and undiluted extracts (100%) of composite samples obtained after 24h, 48h and 72h of incubation on cell viability evaluated by MTT test: 900°C composites samples after (a) 24h (b) 48h and (c) 72h and for 1300°C composites samples after (d) 24h (e) 48h and (f) 72h. The data are expressed as a percentage of the untreated cells. Each graph averages result from at least three measurements. * $P < 0.05$ Student T-test.

It is possible that the cell behavior and viability was influenced by the pH. An acidic pH (lower than the physical pH of cells) can cause a toxic response [5]. However, no pH changes of the extraction medium were detected during extraction. Therefore, the pH of

the extraction medium is not responsible for the toxicity observed for the undiluted samples.

Based on the microscopic observations and on the results obtained for the 50% dilution extract, a relationship could be seen between the size of the leachables and the toxicity. At this concentration the leachables of nanometric size induce a cellular death while those of micrometric size did not seem to significantly affect cell viability. For the 10% concentration, neither the nano- nor micro-sized leachables are toxic. However, regardless of the size of the leachables, the toxicity is roughly the same for all undiluted composites, which suggests that at high concentration of leachables the effect of size is less critical to toxicity.

In summary, there are several factors that can contribute to the toxicity of degradation products of composites. The toxicity of HA composites should be confirmed using additional tests. The cytotoxicity tests with extracts should be complemented with direct contact tests since the materials may display differences in cytotoxicity depending on cell-material contact.



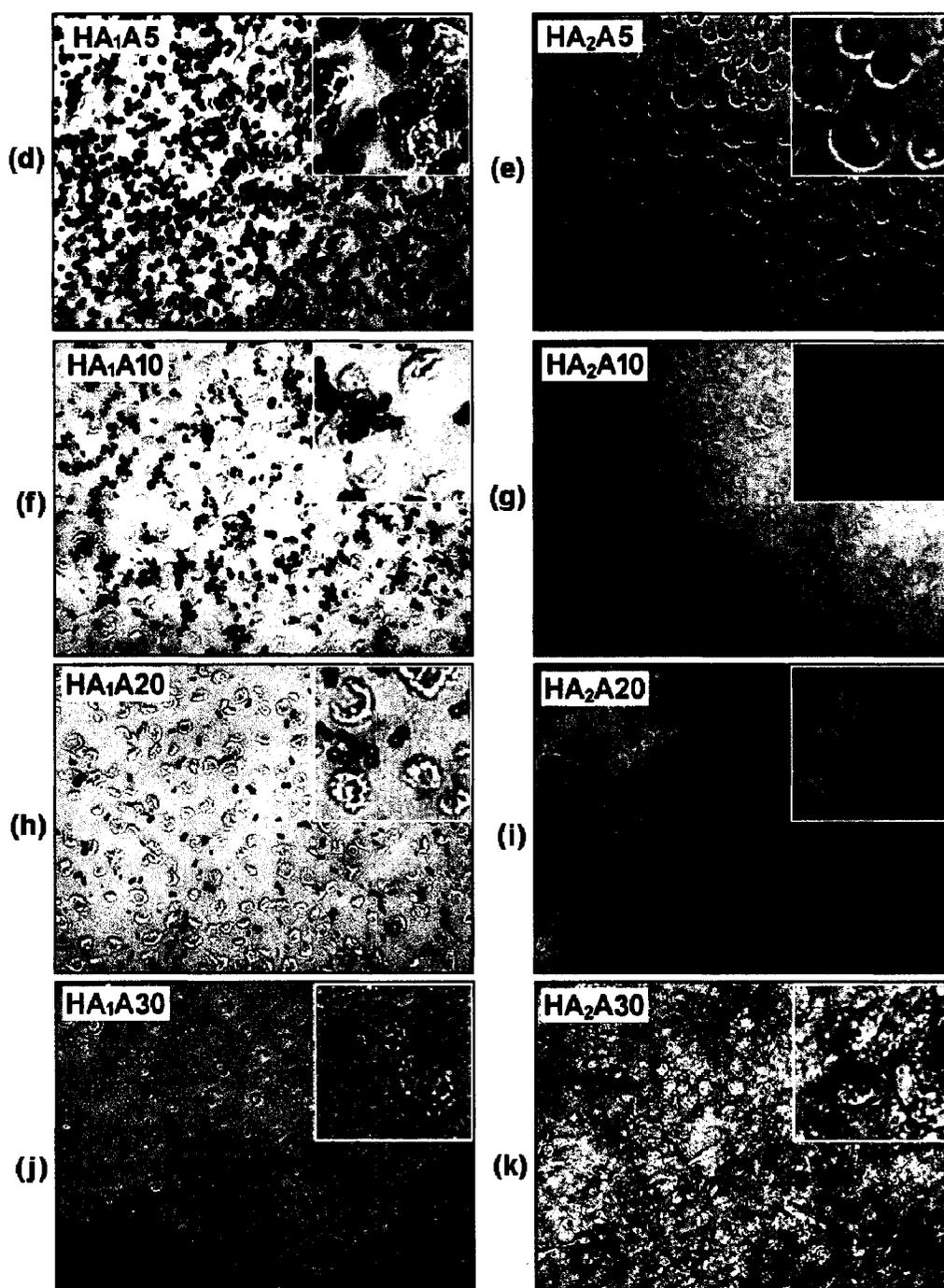


Figure 5.7: Morphological analysis of L929 cultured for 48 h in the presence of undiluted extracts. Cell culture observed by inverted microscope in the phase contrast mode at magnification $20\times$ and at high magnification $40\times$ (the square in the upper corner). (a): control, (b): HA₁, (c): HA₂, (d): HA₁A5, (e): HA₂A5, (f): HA₁A10, (g): HA₂A10, (h): HA₁A20, (i): HA₂A20, (j): HA₁A30, (k): HA₂A30.

5.5 Conclusions

Powders of HA/Al₂O₃ composites with varying concentrations of the reactants were synthesized using a wet precipitation method and sintered at two different temperatures (900°C and 1300°C). We studied the effects of alumina on the phase composition, microstructure and cytotoxicity of HA/Al₂O₃ composite powders. The main phases of the ceramic powders were hydroxyapatite, Al₂O₃, CaO, CaAl₄O₇, CaAl₂O₄ and Ca₃Al₂O₆, depending on the alumina content and the sintering temperature. The results indicated that for the 1300°C composites, the content of the CaO phase decrease with increasing concentrations (5-30%) of alumina. Some Al₂O₃ reacted partially or totally with CaO decomposed from the HA to form different calcium aluminates (CaAl₄O₇, CaAl₂O₄ and Ca₃Al₂O₆). For the 900°C composites the CaO phase was not detectable by XRD analysis. For both sintering temperatures, SEM analysis revealed two distinct morphologies, a granular aggregation corresponding to HA particles and a mixture of irregular shaped particles (Al₂O₃) embedded within this HA granular structure. At 900°C the HA structure consisted of agglomerates of crystals. At 1300°C these crystals sintered together resulting in fused particles. Cytotoxicity tests using extracts indicated an important dependency of the material toxicity on the size and concentration of leachables. At 1300°C the composite degradation products were nano-sized, which rendered them more toxic than the 900°C composites at the 50% dilutions. Direct contact experiments in vitro will be necessary to confirm the toxic effect of HA composites observed in this study.

5.6 Acknowledgements

The authors are grateful for the preparation of the materials by Dr. NHA Camargo of Universidade do Estado de Santa Catarina ; Dr. Georges Dénès of Concordia University for his XRD chemical analysis assistance and Susan K. Tam of École Polytechnique de Montréal for her critical review of the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC).

5.7 References:

- [1] Osaka A, Miura Y, Takeuchi K, Asada M, Takahashi K. Calcium hydroxyapatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *J Mater Sci Mater Med* 1991;2:51–5.
- [2] Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Biomed Mater Res* 1998;13:94–117.
- [3] Silva VV, Domingues RZ. Hydroxyapatite-zirconia composites prepared by precipitation method. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:907-10.
- [4] Hench LL, Ethridge EC. *Biomaterials. An interfacial Approach* (Academic Press, New York, 1982).
- [5] Marques AP, Cruz HR, Coutinho OP, Reis RL. Effect of starch-based biomaterials on the in vitro proliferation and viability of osteoblast-like cells, *J Mater Sci: Mater Med* 2005;16:833–42.
- [6] Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;17:93–102.
- [7] Gautier S, Champion E, Bernache-Assollant D. *Proceedings of 4th Euroceramics, 1995*, edited by A. Ravaglioli (1995), Vol. 8 (Biomaterials):201–8.
- [8] Willmann G, *Bioceramics in orthopaedics: what did we learn in 25 years?*. *Med Orth Tech* 2000;120:10–6.
- [9] Gautier S, Champion E, Bernache-Assollant D. Toughening characterization in alumina platelet-hydroxyapatite matrix composites. *J Mater Sci: Mater Med* 1999;10:533–40.
- [10] Kong YM, Bae CJ, Lee SH, Kim HW, Kim HE. Improvement in biocompatibility of ZrO_2 - Al_2O_3 nano-composite by addition of HA. *Biomaterials* 2005;26:509–17.
- [11] Li J, Fartash B, Hermansson L. Hydroxyapatite-alumina composites and bone-bonding. *Biomaterials* 1995;16:417–22.

- [12] Dorner-Reisel A, Klemm V, Irmer G, Muller E. Nano- and microstructure of short fibre reinforced and unreinforced hydroxyapatite. *Biomed Tech (Berl)* 2002;47 Suppl 1 Pt 1:397–400.
- [13] Knepper M, Milthorpe BK, Moricca S. Interdiffusion in short-fibre reinforced hydroxyapatite ceramics. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:589–96.
- [14] Wei M, Ruys AJ, Milthorpe BK, Sorrell CC. Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles: Effects of precipitation method on electrophoretic deposition. *J Mater Sci: Mater Med* 2005;16:319–24.
- [15] Orlovskii VP, Komlev VS, Barinov SM. Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics, *Inorganic materials* 2002;38:973–84.
- [16] Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: Characterization and antibiotic drug release, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:686–98.
- [17] Karvat F, Camargo NHA, Soares C, Bellini OJ, Silva RF, Tomiyama M, Folgueras MV, Gemeli E. Elaboração e Caracterização de um Biomaterial Compósito a partir de uma Matriz Fosfato de Cálcio/ Al_2O_3 - α . para Aplicação Como Implante e Restituição Óssea. *Revista Matéria* 2005;10:43–50.
- [18] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [19] Akao M, Aoki H, Kato K. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. *J. Mater Sci* 1981;16, 809–12.
- [20] Tagai H, Akoi H. Preparation of synthetic hydroxyapatite and sintering of apatite ceramics: Mechanical properties of biomaterials, Chapter 39, edited by G.W. Hastings and D.F. Williams (John Wiley & Sons Ltd, 1987):213.
- [21] Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI. Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *J Mater Sci: Mater Med* 2000;11:523–31.
- [22] Markovic M, Fowler BO, Tung MS. Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J Res Natl Inst Stand Technol* 2004; 109:553–68.

- [23] ANSI/AAMI/ISO 10993-5:1999 Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
- [24] Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2005;160:171-7.
- [25] Zhao K, Cheng XR, Chao YL, Li ZA, Han GL. Laboratory evaluation of a new denture adhesive. *Dent Mater* 2004;20:419-24.
- [26] Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S. Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. *J Eur Ceram Soc* 2000;20:2377-87.
- [27] Kuzmenko VV, Uspenskaya IA, Rudnyi EB. Simultaneous assessment of thermodynamic functions of calcium aluminates. *Bulletin des Societes Chimiques Belges* 1997;106:235-43.
- [28] Ji H, Marquis PM. Preparation and characterization of Al₂O₃ reinforced hydroxyapatite. *Biomaterials* 1992;13:744-8.
- [29] Briggs D, Seah MP, *Practical Surface Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1990.

- [30] NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, NIST Standard Reference Database 20, Version 3.4 (Web Version).
- [31] Milella E, Cosentino F, Licciulli A, Massaro C. Preparation and characterisation of titania/ hydroxyapatite composite coatings obtained by sol-gel process. *Biomaterials* 2001;22:1425–31
- [32] Lin L, Lin W, Zhu YX, Zhao BY, Xie YC. Uniformly Carbon-Covered Alumina and Its Surface Characteristics, *Langmuir* 2005;21:5040–6.
- [33] Ress HR, Faschinger W, Landwehr G. Depth-dependent x-ray diffraction using extremely asymmetric reflections *J Phys D: Appl Phys* 1998;31:3272–8.
- [34] Chusuei CC, Goodman DW, X-Ray Photoelectron Spectroscopy, *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, Third Edition, Volume 17, 2002, Academic Press.
- [35] Lu HB, Campbell CT, Graham DJ, Ratner BD. Surface characterization of hydroxyapatite and related calcium phosphate by XPS and ToF-SIMS. *Anal Chem* 2000;72:2886–94.
- [36]. Palchik NA, Grigoreva TN, Stolpovskaya VN, Arkhipenko DK, Moroz TN. *Russ. J. Appl. Chem.* 1997, 70, 1513-1516.
- [37] LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002;395:81-98.
- [38] Plyuto IV, Shpak AP, Babich IV, Plyuto YV, Sharanda LF, Stoch J, Moulijn JA. XPS characterization of carbon-coated alumina support. *Surf Interface Anal* 1999, 27, 911–14.
- [39] Feng B, Chen JY, Qi SK, He L, Zhao JZ, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity. *J Mater Sci: Mater Med* 2002;13:457–64.
- [40] Kim H, Camata RP, Vohra YK, Lacefield WR. Control of phase composition in hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic thin coatings for biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med* 2005;16:961–6.

5.8 Résultats supplémentaires

Un objectif important de nos études était d'étudier l'influence de la teneur en Al_2O_3 et de la température de traitement thermique sur la taille moyenne des cristallites (TMC). La taille des cristallites a été calculée à l'aide de la formule de Scherrer pour les trois raies caractéristiques de l'HA : 002 (pic de Bragg situé à $2\theta = 25.8^\circ$ d'intensité 42%), 300 (pic de Bragg situé à $2\theta = 32.9^\circ$ intensité 100%) et 211 (pic de Bragg situé à $2\theta = 31.8^\circ$ d'intensité 55%). Les valeurs obtenues sont récapitulées dans les Tableaux 5.3 et 5.4.

Pour HA_1 et HA_2 , les résultats montrent que selon les directions (002) et (211), les dimensions moyennes atteignent respectivement 51nm et 35nm sans modification importantes de taille en fonction de la température de traitement. Selon la direction (300), on obtient une légère augmentation de taille indiquant une évolution du cristal d'HA le long de l'axe a. Le TCM plus élevée selon la direction (002) indique que, peu importe la température de traitement, la cristallite d'HA a une forme aciculaire.

Pour les composites traités à 900°C , une diminution de la TMC est observée. Cette diminution a lieu quelle que soit la position ou les indices de Miller des différents pics. Les résultats obtenus suggèrent que plus la teneur en Al_2O_3 est élevée plus la taille moyenne de cristallites de l'HA est petite. Il apparaît que le traitement de frittage à 1300°C induit une augmentation importante de la taille moyenne des cristallites. TMC évolue de la même façon pour tous les composites de la série. Plus la composition est riche en Al_2O_3 , plus le cristal d'HA est grand. Cette augmentation de la TMC est une conséquence de la présence d' Al_2O_3 dans la matrice d'HA corrélée avec une augmentation de la taille lors du frittage à 1300°C . La présence du renfort affecte aussi la forme du cristal d'HA. Par rapport à la matrice (HA) seule, le TMC de l'HA selon la direction (002) est réduit considérablement indiquant pour toutes les composites un arrondissement de la forme du cristal.

Comme le montre la Figure 5.10, pour tous les composites (à 900°C et à 1300°C), il existe un faible déplacement angulaire des pics en fonction de la teneur en Al_2O_3 . Ce décalage des pics peut être expliqué par une déformation de la maille élémentaire d'HA

dû à la contrainte résiduelle dans le matériau. Puisque le décalage est vers la droite nous pensons que des contraintes de compression induisent ces déformations de la maille cristalline.

Tableau 5.3 : Taille moyenne des cristallites dans la direction normale aux plans (002), (300) et (211) pour les composites traités à 900°C

Spécimens	Taille moyenne des cristallites dans la direction normale aux plans (nm)		
	002	300	211
HA ₁	51.43±5.65	31.33±1.02	35.06±0.76
HA ₁ A5	43.39±1.28	34.64±0.30	34.24±0.20
HA ₁ A10	41.26±3.40	34.52±0.53	32.38±1.33
HA ₁ A20	40.64±4.00	32.18±0.98	29.91±0.64
HA ₁ A30	38.90±2.68	28.81±0.53	28.30±0.41

*Moyenne ± Ecartype a été calculée avec le logiciel GRAMS AI/ version 7

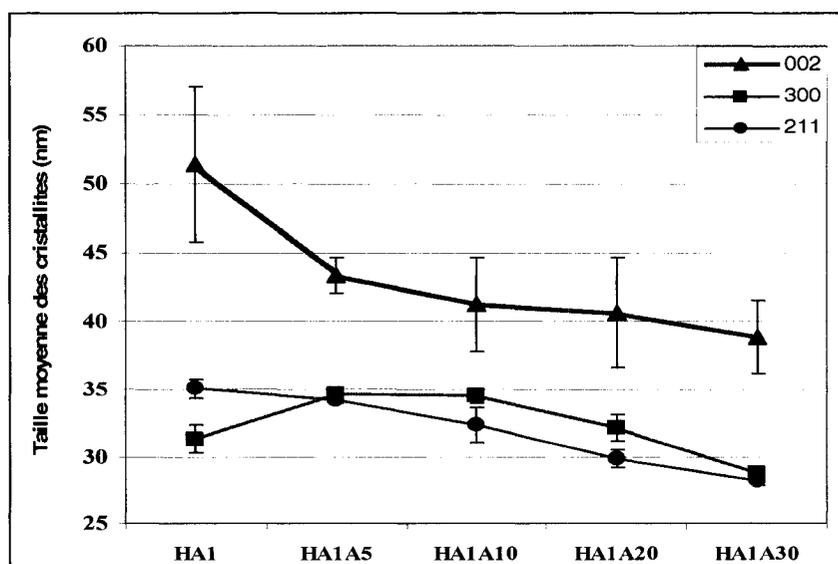


Figure 5.8 : L'évolution de la taille moyenne des cristallites de l'HA en fonction de la teneur en Al₂O₃ pour les composites traités à 900°C

Tableau 5.4 : Taille moyenne des cristallites dans la direction normale aux plans (002), (300) et (211) pour les composites traités à 1300°C

Spécimens	Taille moyenne des cristallites dans la direction normale aux plans (nm)		
	002	300	211
HA ₂	51.61±6.15	33.98±1.24	35.90±0.83
HA ₂ A5	37.60±2.74	35.41±1.64	38.58±0.90
HA ₂ A10	43.22±6.28	36.24±3.20	39.70±1.83
HA ₂ A20	44.12±8.39	38.90±2.67	42.35±2.81
HA ₂ A30	45.04±5.74	42.22±3.97	43.36±2.07

*Moyenne ± Ecartype a été calculée avec le logiciel GRAMS AI/ version 7

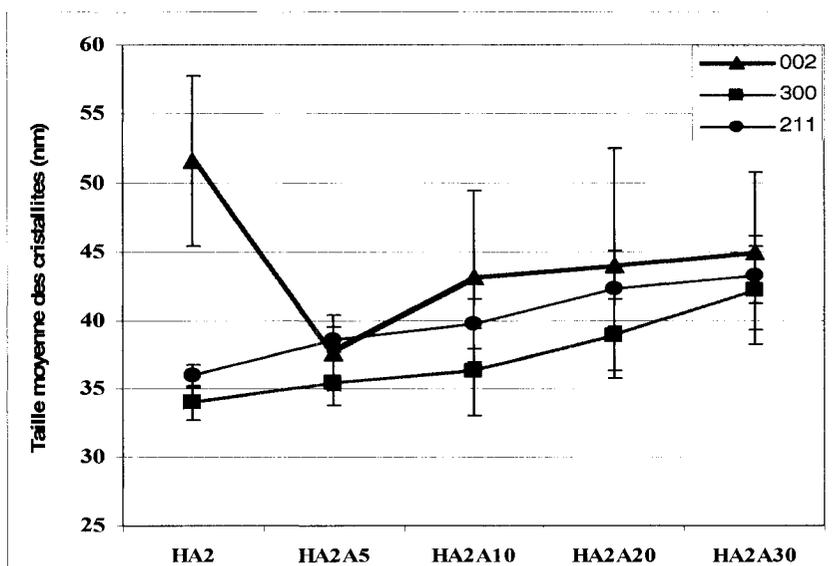


Figure 5.9 : L'évolution de la taille moyenne des cristallites de l'HA en fonction de la teneur en Al₂O₃ pour les composites traités à 1300°C

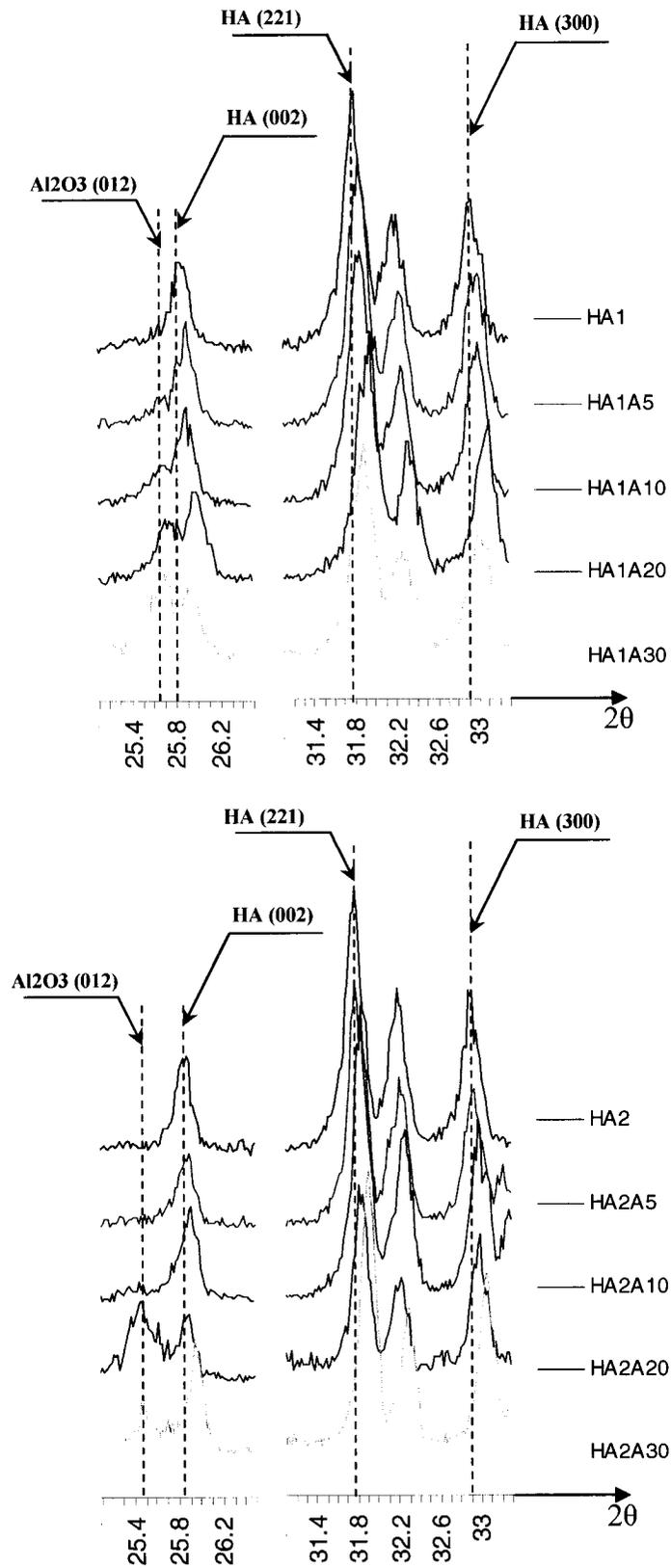


Figure 5.10 : Le déplacement angulaire pour les pics de Bragg (002), (211), (300)

CHAPITRE 6: Discussion générale

Le frittage constitue une étape majeure dans le procédé d'élaboration des céramiques massives ou macroporeuses qui permet de concevoir des matériaux adaptés à leur fonction et à leur utilisation. L'étude de la stabilité thermique des poudres est nécessaire pour mettre en évidence les transformations chimiques ou morphologiques qui ont lieu dans les céramiques au cours du frittage et qui peuvent ainsi affecter les propriétés du composite en tant que biomatériau à usage orthopédique.

La synthèse en milieu aqueux, à partir d'acide phosphorique et d'oxyde de calcium en proportion équimolaire, permet d'obtenir des poudres d'HA avec des caractéristiques bien contrôlées par les paramètres de synthèse (vitesse de précipitation, vitesse d'addition de l'acide, température et durée de synthèse). L'introduction d'une phase différente pour le renfort peut produire des changements chimiques ou morphologiques majeurs dans la structure de l'HA. La difficulté principale liée au frittage de l'HA est son instabilité à hautes températures. Dans le cas d'une céramique composite à base d'HA, le cycle de frittage est susceptible d'entraîner la décomposition de l'HA et d'initier des réactions chimiques non désirées entre le renfort et les produits de décomposition, ce qui entraîne la formation de nouvelles phases.

Au cours de cette étude nous avons évalué l'effet de la température de calcination, de frittage et l'effet de la teneur en Al_2O_3 (variant entre 5 et 30%) sur la composition, les phases, la morphologie et la cytotoxicité des composites. Dans un premier temps nous avons procédé à l'analyse chimique par XRD. Ceci a permis de déterminer les phases cristallographiques et de calculer la taille moyenne des cristallites formées lors des traitements thermiques. L'analyse XRD a été complétée par l'XPS pour une identification de tous les éléments présents en surface et une évaluation des impuretés ou composés minoritaires mesure de la quantité des éléments à teneurs faibles, qui n'entrent pas dans la zone de détection du XRD. Le MEB associé à l'analyse EDX a permis de compléter les études morphologiques. Dans la dernière partie de notre étude, la

cytotoxicité des composites a été évaluée *in vitro* par la méthode de contact indirect sur la lignée cellulaire L929. Ces évaluations nous ont permis de mieux rendre compte l'instabilité de l'HA et d'accéder à une meilleure compréhension de la chronologie des séquences de transformations structurales dans les composites ainsi que leur effet sur la biocompatibilité.

Les analyses XRD montrent que la phase majoritaire détectée sur tous les diffractogrammes, indépendamment de la température ou de la teneur en Al_2O_3 , est la structure hexagonale bien cristallisée de l'HA. Cette phase est accompagnée par des quantités variables de CaO. Toutefois, ce dernier n'est pas observable sur tous les diffractogrammes XRD des poudres calcinées ou frittées. À 900°C seulement l'analyse élémentaire (XPS) permet de confirmer sa présence en faibles quantités par des petits écarts de la valeur stœchiométrique du rapport Ca/P (i.e. équivalent à environ 2% de CaO pour l' HA_1 (Raynaud et al. 2002a)) (Tableau 5.2). Après le frittage la quantité de CaO augmente, et devient détectable aux XRD (>5%) indiquant une formation supplémentaire du CaO lors du frittage. Cette formation de CaO pourrait provenir soit de la décomposition à haute température de l'HA, soit de la présence de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ résiduel lors de la synthèse, qui habituellement à $T > 600^\circ\text{C}$ se transforme en CaO. En tenant compte du fait que 1300°C est la température critique pour la décomposition de l'HA (Wang and Chaki 1993; Zhou et al. 1993; Arita et al. 1995; Van Landuyt et al. 1995) et que la quantité de CaO dans les poudres frittées augmente par rapport à la quantité de CaO présente dans les poudres après calcination nous présumons qu'à 900°C le CaO provient du $\text{Ca}(\text{OH})_2$ résiduel de synthèse, et qu'à 1300°C l'origine du CaO est la décomposition thermique de l'HA.

La phase d' $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-}\alpha$ du renfort est clairement identifiable dans tous les composites calcinés. Cependant, après le frittage elle semble avoir disparu laissant place aux différents aluminates de calcium (AC). Ces nouvelles phases (Figure 6.1) sont attribuables à une réaction à hautes températures ($T > 1000^\circ\text{C}$) entre le CaO et le renfort (Tableau 6.1). D'ailleurs, la nature et la proportion relative de ces AC dans le produit

final dépendent du rapport du mélange $\text{CaO}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (Tableau 6.2) (Criado et al. 1976). Parce que dans les composites ce rapport ($\text{CaO}/\text{Al}_2\text{O}_3$) augmente au fur et à mesure de l'élévation de la teneur en renfort, cette variation explique la présence de différents AC plus ou moins riches en Al_2O_3 dans chaque composite fritté. Donc, vers 1000°C le monoaluminate de calcium (CA) cristallise suite à la réaction entre CaO et Al_2O_3 . Pour les composites à faible teneur en renfort (5% et 10%) dont le rapport $\text{CaO}/\text{Al}_2\text{O}_3$ est supérieur à 1, ce CA nouvellement formé réagit avec le CaO jusqu'à sa consommation complète accompagné par la formation du tricalcium aluminate (C_3A). Pour les composites à teneur élevée de renfort (20% et 30%), quand celle-ci dépasse le contenu en CaO , le CA et Al_2O_3 se frittent vers 1100°C et réagissent ensuite entre 1200°C et 1400°C pour former CA_2 .

Tableau 6.1: L'ordre et la température de cristallisation des aluminates de calcium et les réactions chimiques

T ($^\circ\text{C}$)	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600
Al_2O_3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
$\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3$		(1) ++	+++	++	+			
$3\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3$		(2) ++	+++	++	+			
$\text{CaO}.2\text{Al}_2\text{O}_3$			(3) +	++	+++	++	+	
$\text{CaO}.6\text{Al}_2\text{O}_3$					(4) +	++	+++	+++

(+) faible, (++) moyenne et (+++) forte

(1) Cristallisation du CA (CaOAl_2O_3)

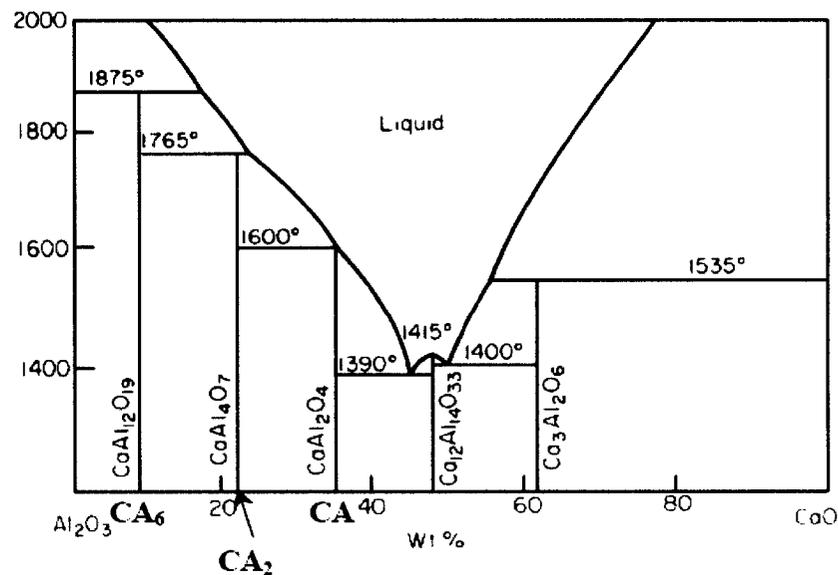
(2) $\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3 + 2\text{CaO} \rightarrow 3\text{CaOAl}_2\text{O}_3$

(3) $\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{Al}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{CaO}_2\text{Al}_2\text{O}_3$ (CA_2)

(4) $\text{CaO}.2\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{Al}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{CaO}_6\text{Al}_2\text{O}_3$ (CA_6)

Tableau 6.2 : Le rapport CaO/Al₂O₃ des aluminates de calcium (Criado et al. 1976):

Phase	% massique	
	CaO	Al ₂ O ₃
C	100	
C ₁₂ A ₇	48,6	51,4
CA	35,4	64,6
CA ₂	21,7	78,3
CA ₆	8,4	91,6
A		100

**Figure 6.1** : Le diagramme binaire Al₂O₃-CaO et les aluminates de calcium dans le sens des teneurs en Al₂O₃ croissante : C₃A (Ca₃Al₂O₆), C₁₂A₇ (Ca₁₂Al₁₄O₃₃), CA (CaAl₂O₄), CA₂ (CaAl₄O₇) et CA₆ (CaAl₁₂O₁₉) (Lea and Desch 1956)

Ces AC formés sont des phases anhydres plus ou moins susceptibles de s'hydrater à basse température (de 4°C à 50°C) en présence d'eau. Chacun possède sa propre hydroréactivité qui peut varier en présence d'une autre phase d'AC. De plus leur degré d'hydratation et la nature des phases hydratées formées dépendent de la nature des AC présents dans les composites, de leur proportion relative et de la température d'hydratation (Gessner et al. 1990). Par exemple, la phase pure CA₂ s'hydrate très lentement, mais son hydratation est accélérée en présence de CaO, à des pH élevés et par l'augmentation de la concentration

des produits hydratés et la présence de CA. L'aluminate tricalcique (C_3A) et le CA se dissolvent rapidement et leur degré d'hydratation est accéléré par la présence d'une quantité importante de CA_2 (Moehmel et al. 1997). En tenant compte de la chimie de ces composites on s'attend donc à une hydratation rapide en milieu biologique pour tous les composites frittés due à la présence des AC.

Le mécanisme d'hydratation se déroule en trois étapes et se produit par le biais du mécanisme de solubilisation/précipitation tel que décrit dans le cas des ciments portland (Scrivener and Taylor 1990; Cottin 1991): la dissolution rapide des phases anhydres, la précipitation massive des hydrates lorsque la saturation de la solution en ions Ca^{2+} et $Al(OH)^4-$ devient importante et finalement une baisse des concentrations en ions Ca^{2+} et en $Al(OH)^4-$ qui due à la précipitation des hydrates arrête la réaction de hydratation des AC. Les durées de la sursaturation sont généralement longues et dépendent de la nature des composés anhydres et de la température. Donc, la réaction d'hydratation elle même en tant que telle et les périodes d'hydratation lentes des AC induisent une variation continue de la chimie et de la structure du composite qui pourraient affecter par la suite la biocompatibilité ou les propriétés biomécaniques du composite. Actuellement les AC, et notamment le CA, ont trouvé une application biomédicale comme produits destinés à la réparation des tissus durs comme ciment restaurateur dentaire alternatif de l'amalgame et de la résine (Engqvist et al. 2004; Sunnegardh-Gronberg et al. 2004). Malgré ses capacités biologiques il montre un taux d'échec clinique inacceptable pour des restaurations dentaires du à son temps de prise lent (135 min) et sa basse résistance en compression (46,33 MPa après 24 h) ce qui le rend ainsi inutilisable pour des applications orthopédiques (Oh et al. 2000; Oh et al. 2002).

En conclusion, les modifications chimiques lors du frittage semblent inacceptables d'un point de vue mécanique même si elles n'altèrent pas la biocompatibilité. Par contre cette hypothèse devrait être vérifiée.

L'observation de la morphologie des poudres montre que la poudre d'HA calciné est formée d'agglomérats sphériques avec un aspect très aéré alors que la poudre d'HA fritté présente un aspect plus compact et granuleux. Cette apparence agglomérée de la poudre d'HA est caractéristique pour les poudres obtenues par précipitation. Les micrographies des différentes poudres composites (Annexe B, Figures 5.4 et 5.5) montrent une évolution de la morphologie de l'HA selon la température de traitement thermique mais aucune modification n'est pas observée lorsque la teneur du renfort varie.

De plus, sur les micrographies MEB les particules d' Al_2O_3 sont recouvertes par une couche d'HA d'épaisseur variable. La présence de cette couche est confirmée par les résultats XPS qui ne détectent la présence des quantités variables d'Al que dans certains composites. La variation de l'épaisseur de la couche est confirmée par des analyses EDX à différents points de la surface de la même particule. Par contre cette analyse n'a pas permis d'identifier les phases d'AC et leur morphologie.

En conclusion, la méthode de synthèse permet une précipitation de l'HA à la surface du renfort qui peut assurer une adhérence entre le renfort et la matrice. Cependant, lors du frittage une réaction chimique entre le CaO et le renfort d' Al_2O_3 peut avoir lieu à proximité des particules de renfort incorporées dans la phase matricielle. La formation des différentes phases hydratées d'AC à cette interface résulte en une pénétration des fluides biologique dans la structure du composite (entre la matrice et le renfort), engendrant ainsi une dégradation subséquente non désirée et pouvant compromettre les propriétés mécaniques et la biocompatibilité des composites. Toutefois, on suggère des études approfondies pour déterminer l'adhérence et la zone d'interdiffusion matrice/renfort. Nous suggérons aussi des études de dégradation pour observer la structure du composite lorsque une dégradation survienne.

L'élargissement des pics de diffraction des rayons X donne accès à la taille des cristallites dans une direction perpendiculaire au plan cristallin relatif au pic considéré. Tant à 900°C qu'à 1300°C, on obtient une HA bien cristallisée avec le pic correspondant à la famille des plans (002), situé à 25.9° avec un profil beaucoup moins large que les autres pics

d'HA. Ceci montre une tendance de cristallisation préférentielle selon l'axe c de la structure de l'HA. Cependant, en présence de la phase de renfort, les cristaux d'HA perdent la tendance à croître suivant l'axe c. Ce phénomène est plus évident pour les composites frittés. Les particules adoptent une forme plus régulière et sphérique et la tendance à la croissance orientée des cristaux suivant l'axe c s'estompe.

En conclusion, la présence du renfort modifie la forme des cristaux et rend la structure cristalline plus homogène et fine. Les changements de forme s'effectuent dans toutes les directions et augmentent avec l'élévation de la température. Après le frittage, les cristallites sont presque sphériques (facteur de forme de 1.1) d'une dimension moyenne de 43 nm. Aux deux températures, l'ajout d'une seconde phase change largement la dimension selon l'axe c des cristallites et l'augmentation de la concentration du renfort entraîne après le frittage une légère augmentation de la dimension du cristal.

Pour l'évaluation de la cytotoxicité nous avons utilisé la méthode de contact indirect qui permet d'estimer la toxicité d'un matériau *in vitro* par l'intermédiaire de ses produits de dégradation. Généralement, ces produits de dégradation sont relargués après l'implantation du matériau et peuvent causer des dommages cellulaires et tissulaires; en dose suffisante, ils sont toxiques pour les cellules. De plus, dans des mêmes conditions biologiques ils peuvent être plus toxiques que le matériau lui-même.

En tenant compte de la composition chimique des poudres nous présumons deux mécanismes de dégradation en milieu biologique: la dissolution rapide du CaO avec la libération des ions Ca^{2+} et l'hydratation des CA avec la libération des ions Ca^{2+} et Al^{3+} . Les ions Ca^{2+} cause une augmentation localisée du pH par la formation du $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dans un microenvironnement riche en phosphore. La sursaturation du milieu en ions Ca^{2+} conduit à la précipitation immédiate de l'apatite carbonatée, et la saturation en ions $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ conduit à la précipitation massive des hydrates et à la formation de gels d'alumine. Quand les concentrations ioniques diminuent ces réactions de précipitation s'arrêtent. Malheureusement nous ne pouvons donner aucune information au niveau de la

nature chimique des produits d'extraction car cette analyse n'a pas fait l'objet de notre étude.

Les observations à l'échelle microscopique (Figure 5.7 et Annexe 2) montrent pour tous les matériaux une dégradation importante avec le relargage d'une grande quantité de produits de dégradation (« leachables »). De plus, pour les céramiques calcinées ces produits de dégradation ont une forte tendance à l'agglomération. Cette agglomération est aussi retrouvée pour la matrice seule d'HA frittée. Par contre, dans le cas des composites frittés l'aspect « nuageux » de ces produits de dégradation peut être relié à la présence des AC et leur hydratation avec la formation des gels d'alumine. Donc, la dégradation qui survient en milieu biologique est variable en fonction de la composition chimique (la teneur en CaO ou AC) et permet de confirmer notre hypothèse antérieure de décomposition. Comme nous l'avons déjà suggéré, il reste à confirmer par des analyses plus approfondis la nature chimique de ces produits de dégradation.

Il existe plusieurs mécanismes de cytotoxicité qui ont comme résultat la mortalité cellulaire. Citons en exemple l'action des substances toxiques qui implique une élévation de composés oxygénés dans la cellule, ce qui entraîne le stress oxydatif. Tous ces agents génèrent des intermédiaires réactifs (i.e. le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'ion superoxyde) capables d'endommager les constituants des cellules et induire la toxicité. Généralement l'aluminium s'attaque à une fonction vitale de la cellule : la production d'énergie. Il peut s'accumuler dans de nombreux organes (le cerveau, les glandes parathyroïdes, les reins et les poumons) et y provoquer des dégâts. Il peut aussi s'accumuler dans les os. Des études *in vitro* suggèrent que des ions Al^{3+} en concentrations sous-létales peuvent affecter la prolifération et les fonctions des ostéoblastes et ils peuvent interférer dans le dépôt minéral normal d'ostéoïde (Morais et al. 1998; Kuroda et al. 2003).

Un deuxième mécanisme de cytotoxicité est le dommage mécanique du matériau ou des ces produits de dégradation qui en contact avec les cellules génère un stress mécanique au niveau de la membrane cellulaire. En regardant la Figure 5.7 et l'Annexe 2 nous pouvons observer les grandes agglomérations de particules de dégradation autour des cellules.

Nous pensons donc que la cytotoxicité enregistrée serait plus liée à la pression exercée par les particules sur les cellules qu'à un effet de toxicité des ions Al^{3+} . Il reste cependant à confirmer cette hypothèse.

D'autre part, dans le cas de la méthode de contact indirect les normes standard (ANSI/AAMI/ISO 10993-5 1999) recommandent différents rapports matériau/volume d'extractant. La plupart des études de viabilité cellulaire sur de nanoparticules sont effectuées avec des concentrations entre 10-100 $\mu g/ml$ (Li et al. 1993; Pioletti et al. 2000; Ehara et al. 2003; Pezzatini et al. 2006). Dans notre cas le rapport poids/volume d'extractant utilisé pour les extraits est de 100 mg/ml, donc 10^3 fois plus grand, et nous pensons que la toxicité est aussi due à l'effet de surdosage.

En conclusion, nous considérons que les conditions d'extraction sont exagérées et ne reflètent pas les conditions cliniques. Pour les applications finales (sous forme massive avec de fortes liaisons entre les particules céramiques) la surface d'extraction est moins petite que dans le cas de la poudre. Toutefois, les résultats montrent qu'une dégradation à grande échelle des composites pose de sérieux risques biologiques. De plus, la présence des AC autour des particules de renfort enrobées dans la matrice peut avoir un effet négatif à long terme. La dégradation lente de l'HA et l'hydratation progressive des AC peuvent avoir comme résultat le relargage de la particule de renfort dans l'environnement biologique qui à long terme font l'objet d'une phagocytose, mécanisme initiateur de l'ostéolyse macrophagique (Coleman et al. 1974; Petit et al. 2006).

CHAPITRE 7: Conclusion et Perspectives

Au cours de ce projet nous avons étudié l'ensemble des transformations de phases, morphologiques et cristallographiques susceptibles de se développer dans les composites céramiques HA/Al₂O₃ au cours des traitements thermiques en variant la teneur du renfort (Al₂O₃). Ces modifications nous ont permis par la suite de comprendre le comportement *in vitro* des composites et estimer leur future bioperformance. Les résultats obtenus démontrent une décomposition matricielle avec la formation du CaO pour les deux traitements thermiques et indépendamment de la teneur du renfort. En considérant les mécanismes de dissolution du CaO en milieu biologique, cette décomposition pourrait être interprétée comme une caractéristique positive stimulatrice à la formation de l'ostéoïde *in vivo*. Malgré cela, le CaO réagit à hautes températures avec la phase du renfort formant plusieurs AC comme produits secondaires de réaction. Ces AC peuvent jouer par la suite un rôle important dans les propriétés mécaniques et la biocompatibilité des composites.

La morphologie de la matrice dépend seulement de la température de traitement thermique. Pourtant la taille et la forme des cristaux d'HA sont influencées également par la température et par la présence de différents teneurs du renfort. La cytotoxicité observée seulement pour les extraits non-dilués indique une toxicité dose dépendante et la cause principale de cette toxicité semble être plus d'origine mécanique. Malheureusement, les études *in vitro* sont des études dans un système fermé qui souvent ne reflète par toutes les conditions d'un système biologique ouvert mais qui peut donner une idée générale des phénomènes biologiques.

Il reste cependant plusieurs points à éclaircir :

- Il faudrait tout d'abord envisager des tests de dégradation pour déterminer la nature exacte des produits de dégradation et pour analyser l'évolution de la structure et la morphologie des composites lors de la biodégradation.
- Des tests mécaniques avant et après la dégradation/hydratation des aluminates de calcium pourrait élucider leur effet sur les propriétés mécaniques des composites.
- Des tests de biocompatibilité de contact direct et indirect sur les matériaux en forme massive pour confirmer l'idée d'un surdosage dans le cas des poudres.
- Il faudrait améliorer la méthode de synthèse pour éliminer les produits résiduels de réaction et pour éviter la décomposition chimique de l'HA à hautes températures ce qui pourrait diminuer la formation éventuelle d'aluminates de calcium.

Références

Ababou A (1994) Etude expérimentale et théorique du préfrittage et du frittage de l'hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. In. Université de Limoges

Aizawa M, Hanazawa T, Itatani K, Howell FS, Kishioka A (1999) Characterization of Hydroxyapatite Powders Prepared by Ultrasonic Spray-Pyrolysis Technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 34:2865 - 2873

Akao M, Aoki H, Kato K (1981) Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. *J. Material Science* 6:809-812

Aksay IA et al. (1996) Biomimetic Pathways for Assembling Inorganic Thin Films. *Science* 273:892-898

Almqvist N, Thomson NH, Smith BL, G.D. M, Hansma PK (1999) Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. *Mater Sci Eng C* 7:34-43

ANSI/AAMI/ISO 10993-5 (1999) Évaluation biologique des dispositifs médicaux Partie5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro

Aoki H (1991) Science and Medical Applications of Hydroxyapatite. JAAS, Tokyo

Arita IH, Castano VM, Wilkinson DS (1995) Synthesis and processing of hydroxyapatite ceramic tapes with controlled porosity. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 6:19-23

Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM (1996) Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 17:93-102

Banks WJ (1993) Supportive Tissues - Bone, *Applied Veterinary Histology*. Mosby Year Book Inc, 3rd Edition, pp107-26, Baltimore

Beevers CA, Mc Intyre DB (1945) The atomic structure of fluor-apatite and its relation to that of tooth and bone materials. *Mineralogical Magazine* 27:254-257

Bernache-Assollant D, Ababou A, Champion E, Heughebaert M (2003) Sintering of calcium phosphate hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ I. Calcination and particle growth *Journal of the European Ceramic Society* 23:229 - 241

Blake T et al. (1998) Effect of fiber length on glass microfiber cytotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 54:243-259

Bloebaum RD, Beeks Dorr LD, Savory CG, DuPont JA, Hofmann AA (1994) Complications with hydroxyapatite particulate separation in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 298:19-26

Bloebaum RD, DuPont JA (1993) Osteolysis from press-fit hydroxyapatite-coated implant. *J Arthroplasty* 8:195-202

Bloebaum RD, Zou L, Bachus KN, Shea KG, Hofmann AA, Dunn HK (1997) Analysis of particulates in acetabular components from patient with osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 338:109-118

Bohner M (2000) Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4:37-47

Bonnevialle P, Abid A, Mansat P, Verhaeghe L, Clement D, Mansat M (2002) Ostéotomie tibiale de valgisation par addition médiale d'un coin de phosphate tricalcique. *Rev Chir Orthop* 88:486-492

Bouyer E, Gitzhofer F, Boulos MI (2000) Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension. *J Mater Sci Mater Med* 11:523-531

Brown WE, Eidelman N, Tomazic B (1987) Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv Dent Res* 1:306-313

Brown WE, Epstein EF (1965) Crystallography of tetracalcium phosphate. *Journal of Research of the National Bureau of Standard-A Physics and Chemistry* 69A:547-551

Bruck SD (1990) Materials or biomaterials ? . *The International Journal of Artificial Organs* 13 469-471

Burgess AV, Story BJ, La D, Wagner WR, LeGeros JP (1999) Highly crystalline MP-1 hydroxylapatite coating. Part I: In vitro characterization and comparison to other plasma-sprayed hydroxylapatite coatings. *Clin Oral Implants Res* 10:245-256

Cao W, Hench LL (1996) Bioactive materials. *J. Ceram. Int.* 22:493-507

Cheang P, Khor KA (1996) Addressing processing problems associated with plasma spraying. *Biomaterials* 17:537-544

Cheetham AK, Day P (1987) X-ray photoelectron spectroscopy and related methods, in *Solid State Chemistry Techniques*. Oxford University Press, New York : pp 84-120

Chilar J, Trunec M (1997) Sintering and thermal decomposition of hydroxyapatite bioceramics. *Bioceramics* 10:183-186

Choi JW, Kong YM, Kim HE, Lee IS (1998) Reinforcement of Hydroxyapatite Bioceramic by Addition of Ni_3Al and Al_2O_3 . *J. American Ceramic Society* 81:1743-1748

Coleman DL, King RN, Andrade JD (1974) The foreign body reaction: a chronic inflammatory response. *J Biomed Mater Res* 8:199-211

Constantz BR et al. (1995) Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 267:1796-1799

Cottin B (1991) The first reactions in cement hydration. *Proceedings of the international RILEM Workshop On Hydration and Setting of Cements*, Ed. A. Nonat et J.C. Mutin, Dijon, France

Criado E, Estrada DA, De Aza S (1976) Dilatometric study of the formation of CA_2 and CA_6 in cements and refractory concretes. Bull. Sp. Ceram. Glass Soc 15:319-321

Davies JE (1991) The Bone-Biomaterials Interface. University of Toronto Press, Toronto: 285-94

Davies JE, Baldan N (1997) Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. J Biomed Mater Res 36:429-440

de Groot K (1980) Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. Biomaterials 1:47-50

de Groot K (1985) Degradable Ceramics. In: Williams DF, ed. Biocompatibility of tissues analogs. Boca Raton, FL, USA: CRC Press :199-222

de Groot K (1993) Application of Porous Bioceramics in Surgery Materials Technology 8:12-15

De With G, van Dijk HJ, Hattu N, Prijs K (1981) Preparation, microstructure and mechanical properties of dense polycrystalline hydroxyapatite. J Material Science 16:1592-1598

Destainville A, Champion E, Bernache-Assollant D, Laborde E (2003) Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic-tricalcium phosphate. Mater. Chem. and Phys. 80:269-277

DeWith G, Corbijn AJ (1989) Metal fibre reinforced hydroxyapatite ceramics. J Mater Sci 24:3411-3413

Doi Y, Horiguchi T, Moriwaki Y, Kitago H, Kajimoto T, Iwayama Y (1996) Formation of apatite - collagen complexes Journal of Biomedical Materials Research 31:43-49

Doi Y et al. (1995) Pyrolysis-gas chromatography of carbonate apatites used for sintering. J Biomed Mater Res 29:1451-1457

Driessens F (1989) Is the solubility product of synthetic calcium phosphates a good predictor for their biodegradability? In: Width G, Terpstra R, eds Euro-Ceramics, 1st ECERS, Metselaar. Amsterdam: Elsevier: 820-32

Driessens F, Verbeeck R (1988) Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates. In: de Putter C, de Lange GL, de Groot K, Lee AJC, eds. Implant materials in biofunction. Advances in Biomaterials. Amsterdam: Elsevier :48-52

Driessens FCM (1980) The mineral in bone, dentin and tooth enamel, . Bulletin des sociétés chimiques Belges 89:663-689

Ducheyne P, Hastings WG (1984) Metal and ceramic biomaterials, Chap. 6. CRC Press inc., Boca Raton, pp 143-161

Ehara A, Ogata K, Imazato S, Ebisu S, Nakano T, Umakoshi Y (2003) Effects of alpha-TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization. Biomaterials 4:831-836

Elliott JC (1994) Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphate. Elsevier Editor, Studies in Inorganic Chemistry 18, Amsterdam, London, New York, Tokyo

Engqvist H et al. (2004) Transmittance of a bioceramic dental restorative material based on calcium aluminate. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 69:94-98

Fawcett DW (1994) Bone A textbook of histology, Chapman & Hall, New York : 194-233.

Feenstra L, Groot K (1983) Bioceramics of Calcium Phosphate. Boca Raton : CRC

Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A (1993) Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials* 14:423-429

Fukuchi N, Akao M (1995) Effect of hydroxyapatite microcrystals on macrophage activity. *Biomed Mater Eng* 54:219-231

Galois L, Mainard D, Delagoutte JP (2002) Beta-tricalcium phosphate ceramic as a bone substitute in orthopaedic surgery. *Int Orthop* 26:109-115

Gasser B (2000) About composite materials and their use in bone surgery. *Injury, Int. J. Care Injured* S-D:48-53

Gautier S, Champion E, Bernache-Assollant D (1999) Toughening characterization in alumina platelet-hydroxyapatite matrix composites. *J Mater Sci Mater Med* 10:533-540

Gessner W, Moehmel S, Bier TA (1990) Effects of the alumina quality on hydration and thermal behaviour of calcium aluminate/alumina mixes. Conference on Calcium Aluminate Cements, Proceedings of the international symposium, R.J. Mangabhai Ed., Londres

Getter L et al. (1972) Three biodegradable calcium phosphate slurry implants in bone. *J Oral Surg* 30:263-268

Gopferich A (1996) Mechanism of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17:103-114

Green D, Walsh D, Mann S, Oreffo RO (2002) The potential of biomimesis in bone tissue engineering: lessons from the design and synthesis of invertebrate skeletons. *Bone* 30:810-815

Gross KA, Berndt CC (1991) Thermal spraying of hydroxyapatite for bioceramics application. *Key Engineering Materials* 53:124-129

Guild FJ, Bonfield W (1993) Predictive modelling of hydroxyapatite-polyethylene composite. *Biomaterials* 14:985-993

Guthrie JGD (1997) Mineral properties and their contributions to particle toxicity. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5:1003-1011

Halouani R, Bernache-Assollant D, Champion E (1994) Microstructure and related mechanical properties of hot pressed hydroxyapatite ceramics. *J. Mater. Sci.: Materials in medicine* 5:563-568

Harada Y et al. (1996) Differential effects on different formes of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in-vitro. *J Biomed Mater Res* 31:19-26

Haynes DR, Roger SD, Hay S, Percy MJ, Howie DW (1993) The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. *J Bone Jt Surg* 75A:825-834

Hench LL (1991) Bioceramics : from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 74:1487-1510

Ignatius AA, Claes LE (1996) In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17:831-839

Janot C, Ilschner B (2001) *Traité des matériaux* Presses Polytechnique & Université Romandes, Lausanne, chap.11: 300-14

Ji H, Marquis PM (1992) Preparation and characterization of Al₂O₃ reinforced hydroxyapatite. *Biomaterials* 13:744-748

Johnsson MS, Nancollas GH (1992) The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 3:61-82

- Kaito T, Mukai Y, Nishikawa M, Ando W, Yoshikawa H, Myoui A (2006) Dual hydroxyapatite composite with porous and solid parts: Experimental study using canine lumbar interbody fusion model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 30
- Kawasaki T, Kobayashi W, Ikeda K, Takahashi S, Monma H (1986) High-performance liquid chromatography using spherical aggregates of hydroxyapatite micro-crystals as adsorbent. *Eur J Biochem* 157:291-295
- Kim S, Kong YM, Lee IS, Kim HE (2002) Effect of calcinations of starting powder on mechanical properties of hydroxyapatite-alumina bioceramic composite. *J Mater Sci Mater Med* 13:307-310
- Klug HP, Alexander LE (1974) *X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials*. 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York : pp.618-708
- Knowles JC, Gross K, Berndt CC, Bonifield W (1996) Structural changes of thermally sprayed hydroxyapatite investigated by Rietveld analysis. *Biomaterials* 17:639-645
- Kohn DH (2003) *Std. Handbook of biomedical engineering & design*, chap. 13.3.2. Myer Kutz
- Kokubo T (1995) *Potential of Ceramic as Biomaterials*. Ceramics and Society, Brook, R.J. Faenza : Techna
- Kong YM, Bae CJ, Lee SH, Kim HW, Kim HE (2005) Improvement in biocompatibility of $ZrO_2-Al_2O_3$ nano-composite by addition of HA. *Biomaterials* 26:509-517
- Kuhn LT, Fink DJ, Heuer AH (1996) *Biomimetic strategies and materials processing*. S. Mann, Editor, *Biomimetic Materials Chemistry*, VCH, Weinheim, pp. 315-336
- Kumar R, Cheang P, Khor KA (2003) Radio frequency (RF) suspension plasma sprayed ultra-fine hydroxyapatite (HA)/zirconia composite powders. *Biomaterials* 24:2611-2621

Kumar R, Prakash KH, Cheang P, Khor KA (2004) Temperature driven morphological changes of chemically precipitated hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir* 20:5196-5200

Kuroda S, Takeda S, Nakamura M (2003) Effects of six particulate metals on osteoblast-like MG-63 and HOS cells in vitro. *Dent Mater J* 22:507-520

Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S (2000) Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites. *J. of the European Ceramic Society* 20:2377-2387

Laquerriere P et al. (2004a) MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in presence of different hydroxyapatite : importance of particle physical characteristics. *Biomaterials* 25:2515-2524

Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M (2003) Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 24:2739-2747

Laquerriere P et al. (2004b) Influence of Hydroxyapatite Particle Characteristics on the [K]/[Na] ratio : a Human Monocytes In Vitro Study. *Colloid Surf B* 33:49-55

Laquerriere P et al. (2001) Effect of Hydroxyapatite sintering temperature on intracellular ionic concentrations of monocytes: a tem-cryo-X-ray microanalysis study. *J Biomed Mater Res* 58:238-246

Laquerriera P et al. (2005) Effect of the physicochemical characteristics of hydroxyapatite on the cell behaviour. *ITBM-RBM* 1:200-205

Lea FM, Desch CH (1956) *The chemistry of cement and concrete*. 2th Ed. Edward, Arnold, London:52

LeGeros RZ (1991) Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 15:1-201

LeGeros RZ (1993) Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater* 14:65-88

LeGros R (1984) Apport de la physico-chimie à l'étude de la phase minérale des tissus calcifiés In. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse

LeGros R, Balmain N, Bonel G (1986) Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone. *J Chem Res Synop* 1:8 - 9

Lemaître J, Mirtchi A, Mortier A (1987) Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels* 9:141-146

Li J, Liu Y, Hermansson L, Soremark R (1993) Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts in vitro. *Clin Mater* 2:197-201

Li W, Gao L (2003) Fabrication of HAp-ZrO₂ (3Y) nano-composite by SPS. *Biomaterials* 24:937-940

Lopes MA, Monteiro FJ, Santos JD (1999) Glass-reinforced hydroxyapatite composites: secondary phase proportions and densification effects on biaxial bending strength. *J Biomed Mater Res* 48:734-740

Malard O et al. (1999) Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption and inflammatory reactions : preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res* 46:103-111

Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL (2004) Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Composites Science and Technology* 64:789-817

Markovic M, Fowler BO, Tung MS (2004) Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *J. Res Natl Inst Stand Technol* 109:553-568

Mathew M, Schoroder LW, Dickens B, Brown WE (1977) The crystal structure of α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *Acta crystallographia*:1325-1333

Mc Dowell H, Gregory TM, Brown WE (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. *J. of Res. Nat. Bur. Stand.* 81:273-281

McClintic JR (1975) *Basic Anatomy and Physiology of the Human Body*. John Wiley and Sons Inc.

Moehmel S, Gessner W, Müller D, Bier T (1997) The behaviour of CA/CA2 cements during hydration and thermal treatment. *Proceedings of 5th UNITECR, Nouvelle Orléans, USA*, 3 1273-1282

Monma HJ (1980) Processing of Synthetic Hydroxyapatite. *J.Ceram. Soc. Jpn Dent. Res.* 8:97-102

Morais S, Sousa JP, Fernandes MH, Carvalho GS, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA (1998) Decreased consumption of Ca and P during in vitro biomineralization and biologically induced deposition of Ni and Cr in presence of stainless steel corrosion products. *J Biomed Mater Res* 42:199-212

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63

Muralithran G, Ramesh S (2000) The effect of sintering on the properties of hydroxyapatite. *Ceramics International* 26:221-230

Nagase M, Nishiya H, Abe Y (1993) The effect of crystallinity on hydroxyapatite-induced production reactive oxygen metabolites by polymorphonuclear leukocytes. *FEBS* 3:247-250

Ning CQ, Zhou Y (2002) In vitro bioactivity of a biocomposite fabricated from HA and Ti powders by powder metallurgy method. *Biomaterials* 23:2909-2915

Oh SH, Choi SY, Lee YK, Kim KN (2000) The loss bone regeneration materials based on high alumina cement: The influence in simulated body fluid and artificial saliva. 52nd PCRM Meet Am Ceram Soc 36

Oh SH, Choi SY, Lee YK, Kim KN (2002) Preparation of calcium aluminate cement for hard tissue repair: Effects of lithium fluoride and maleic acid on setting behavior, compressive strength, and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research* 62:593-599

Orlovskii VP, Barinov SM (2001) Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Matrix Ceramics: A Survey. *Russian Journal of Inorganic Chemistry* 46:129-149

Orlovskii VP, Komlev VS, Barinov SM (2002) Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials* 38:973-984

Patel N, Gibson IR, Ke S, Best SM, Bonfield W (2001) Calcining influence on the powder properties of hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 12:181-188

Petit A, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Huk OL (2006) Effect of bisphosphonates on the stimulation of macrophages by alumina ceramic particles: a comparison with ultra-high-molecular-weight polyethylene. *J Mater Sci Mater Med* 17:667-673

Pezzatini S et al. (2006) The effect of hydroxyapatite nanocrystals on microvascular endothelial cell viability and functions. *J Biomed Mater Res A* 76:656-663

Pioletti DP et al. (2000) The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials* 21:1103-1114

Plenk HJ (1998) Prosthesis-Bone Interface. Department for Bone and Biomaterials Research, Histological-Embryological Institute, University of Vienna, Vienna, Austria: 350-5

Prudhommeaux F et al. (1996) Variation in the inflammatory properties of basic calcium phosphate crystals according to crystal size. *Arthritis Rheum* 39:1319-1326

Prutton M (1994) Introduction to Surface Physics. Oxford University Press

Pulapura S, Kohn J (1992) Trends in the development of bioresorbable polymers for medical applications. *J Biomater Appl* 6:216-250

Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW (2001) Biomedical applications of polymer-composite materials: a review *Composites Science and Technology* 61:1189-1224

Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Tetard D (1998) Dynamic fatigue and degradation in solution of hydroxyapatite ceramics. *J Mater Sci Mater Med* 9:221-227

Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D (2002a) Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. *Biomaterials* 23:1073-1080

Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P (2002b) Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials* 23:1065-1072

Remes A, Williams DF (1992) Immune response in biocompatibility. *Biomaterials* 13:731-743

Rey C (1995) Du minéral osseux aux biomatériaux, un biominéral particulier: l'apatite. *L'actualité chimique*:41-45

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P (1998) Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 20:92-102

Riboud PV (1973) Composition et stabilité des phases à structure d'apatite dans le système CaO-P₂O₅-oxyde de fer H₂O à haute température. Annales de Chimie, tome 8:381 -390

Royer A, Viguié JC, Heughebaert M, Heughebaert JC (1993) Stoichiometry of hydroxyapatite: influence on the flexural strength. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 4:76-82

Ruys AJ, Brandwood A, Milthorpe BK, Dickson MR, Zeigler KA, Sorrell CC (1995) The effects of sintering atmosphere on the chemical compatibility of hydroxyapatite and particulate additives at 1200°C. J. Mat. Sci.: Mat. in Med. 6:297-301

Sanchez C, Arribart H, Guille MM (2005) Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. Nat Mater 4:277-288

Schmitt M (2000) Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphate de calcium. In: Ecole Doctorale de Chimie/Biologie, Faculté de Chirurgie Dentaire. Université de Nantes, France

Scrivener K, Taylor HFW (1990) Microstructural development in pastes of a calcium aluminate cement. Conference on Calcium Aluminate Cements, Proceedings of the international symposium, R.J. Mangabhai Ed., Londres

Sennerby L (1991) On the bone tissue response to titanium implants. In: University of Gothenburg, Sweden; PhD Thesis

Shirkhanzadeh M, Azadegan M, Stack V, Schreyer S (1994) Fabrication of pure Hydroxyapatite and Fluoridated-Hydroxyapatite Coatings by Electrocrystallisation. Materials Letters 18:211-214

Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000) Osteopontin. Crit Rev Oral Biol Med 11:279-303

Sommer B, Bickel M, Hofstetter W, Wetterwald A (1996) Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone* 19:371-380

Sousa SR, Barbosa MA (1995) The effect of hydroxyapatite thickness on metal ion release from stainless steel substrates *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 6:818-823

Sousa SR, Barbosa MA (1996) Effect of hydroxyapatite thickness on metal ion release from Ti₆Al₄V substrates. *Biomaterials* 17:397-404

Steflik DE, Corpe RS, Lake FT, Sisk AL, Parr GR, Hanes PJ (1997) Composite morphology of the bone and associated support-tissue interfaces to osseointegrated dental implants: TEM and HVEM analyses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12:443-453

Suchanek W, Yoshimura M (1998) Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Material Research* 13:94-117

Sun JS, Lin FH, Hung TS, Tsuang YH, Chang WHS, Liu HC (1999) The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res* 45:311-321

Sun JS, Tsuang YH, Chang WHS, Li J, Liu HC, Lin FH (1997) Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials* 18:686-690

Sunnegardh-Gronberg K, van Dijken JW, Lindberg A, Horstedt P (2004) Interfacial adaptation of a calcium aluminate cement used in class II cavities, in vivo. *Clin Oral Investig.* 8:75-80

Tadic D, Peters F, Epple M (2002) Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. *Biomaterials* 23:2553-2559

Tampieri A, Celotti G, Landi E, Sandri M, Roveri N, Falini G (2003) Biologically inspired synthesis of bone-like composite: self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals. *J Biomed Mater Res A* 67:618-625

Tampieri A, Celotti G, Szontagh F, Landi E (1997) Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity. *J Mater Sci Mater Med* 8:29-37

Tesk JA (2001) NIST workshop on reference data for the properties of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research* 58:463-466

Tung MS, Brown WE (1985) The role of octacalcium phosphate in subcutaneous heterotopic calcification. *Calcif Tissue Int* 37:329-331

Turova NY, Yanovskaya MI (1983) Synthesis of Hydroxyapatite Crystals. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Neorg. Mater.* 19:693

van Dijk K, Schaeken HG, Wolke JG, Jansen JA (1996) Influence of annealing temperature on RF magnetron sputtered calcium phosphate coatings. *Biomaterials* 17:405-410

Van Landuyt P, F. L, Keustermans JP, Streydio JM, Munting E (1995) The Influence of High Sintering Temperatures on the Mechanical Properties of Hydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 6:8-13

Vereecke G, Lemaître J (1990) Calculation of the solubility diagrams in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$. *J.Crystal Growth* 104:820-832

Von Recum AF, Jenkins ME, Von Recum HA (1999) Introduction: Biomaterials and Biocompatibility, Dans *Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials* (Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., LaBerge M., et Lawrence W.H., Eds). 2nd edition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 1-8

Wang PE, Chaki TK (1993) Sintering Behavior and Mechanical Properties of Hydroxyapatite and Dicalcium Phosphate. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 4

Wang RZ, Cui FZ, Lu HB, Wen HB, Ma CL, Li HD (1995) Synthesis of nanophase hydroxyapatite/collagen composite *Journal of Materials Science Letters* 14

Ward IM, Bonfield W, Ladizesky NH (1997) The development of load-bearing bone substitute materials. *Polymer International* 43:333-337

Woodward SC (1999) Evaluation by light microscopy. Dans *Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials*. Von Recum A.F., Anderson J.M., Ash S.R., Cooke F.W., Gross U.M., LaBerge M., et Lawrence W.H., Eds. 2nd Edition: Taylor & Francis, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 599-612.

Yamamuro T, Hench LL, Wilson J (1990) *Handbook of Bioactive Ceramics*. Vols.1 and 2, Eds. CRC, Boca Raton, FL: CRC Press

Yoshikawa H, Myoui A (2005) Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 8:131-136

Young RA (1975a) Some aspects of crystal structural modeling of biological apatites. *Coll. Intern. CNRS, Paris*, 230, 21-39

Young RA (1975b) Biological apatite vs hydroxyapatite at the atomic level. *Clin Orthop Relat Res*:249-262

Yubao L, de Groot K, de Wijn J, Klein CPAT, Meer SVD (1994 a) Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment. *J Mater Sci Mater Med* 5:326-331

Zahidi E, Lebugle A, Bonel G (1985) Sur une nouvelle Classe de Matériaux pour Prothèses osseuses ou dentaires. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 4:523-527

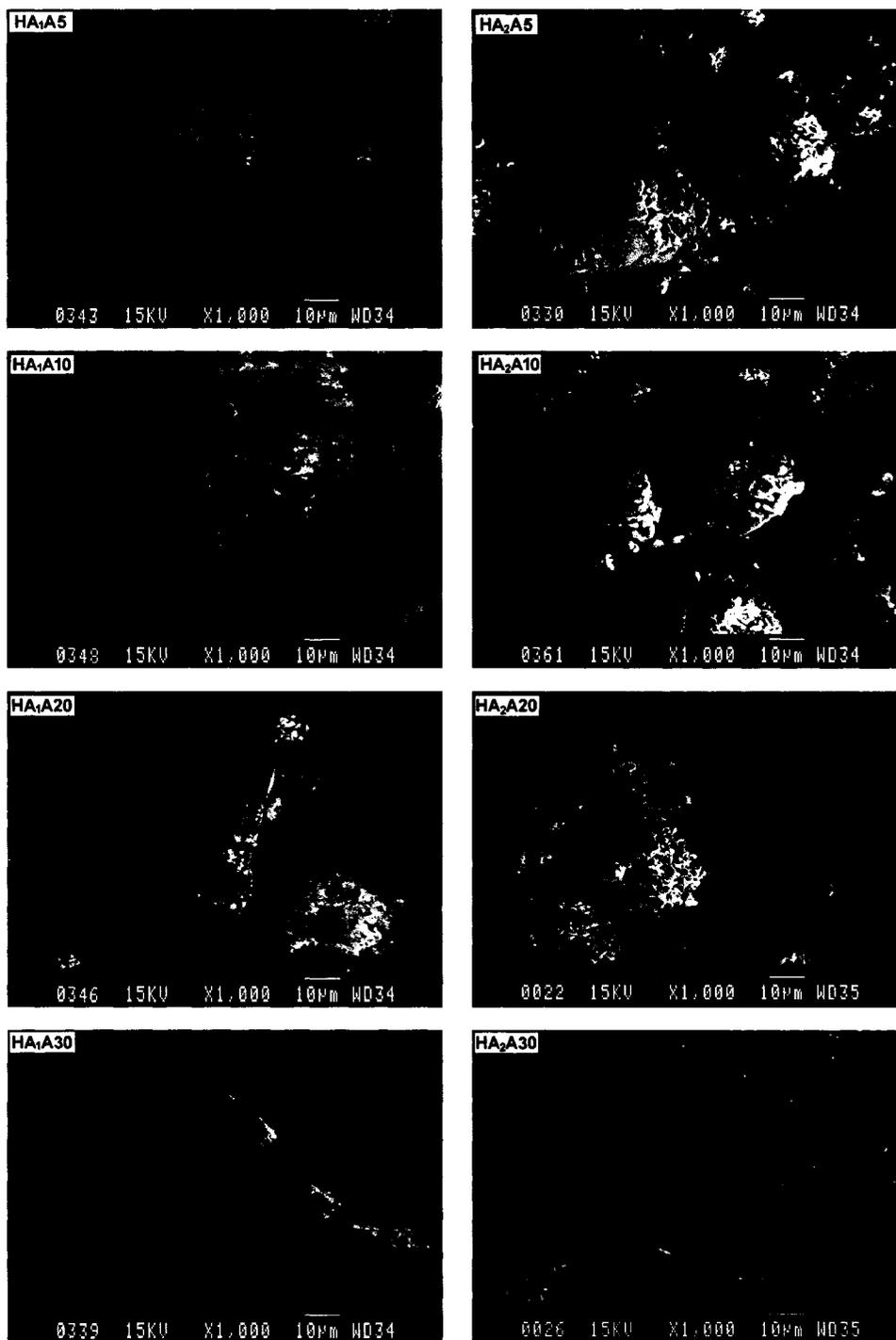
Zhang S, Gonsalves KE (1997) Preparation and Characterization of Thermally Stable Nanohydroxyapatite. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 8:25-28

Zhao K, Cheng XR, Chao YL, Li ZA, Han GL (2004) Laboratory evaluation of a new denture adhesive. *Dent Mater* 20:419-424

Zhou J, Zhang X, Chen J, Zeng S, De Groot K (1993) High temperature characteristic of synthetic hydroxyapatite. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 4:83-85

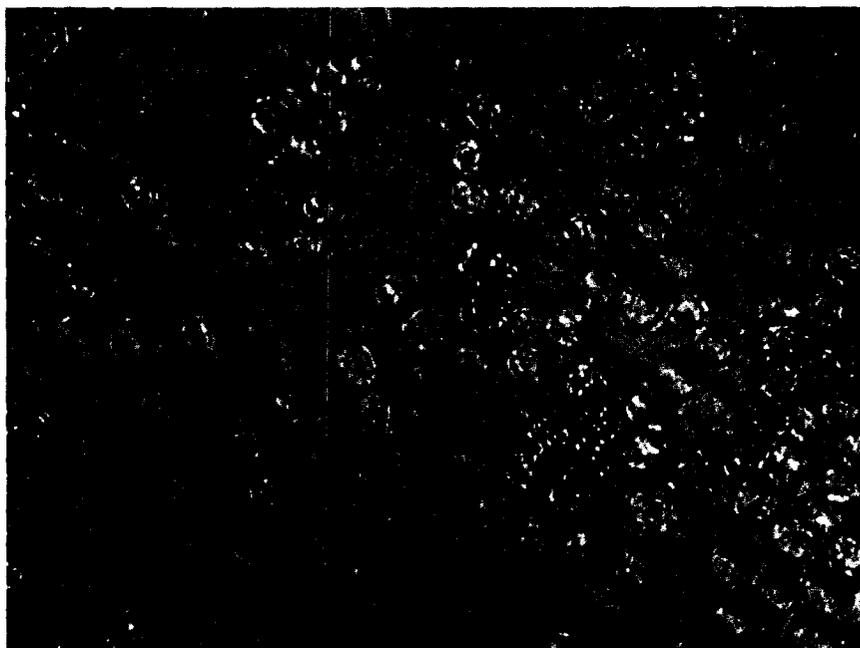
Annexes :**Annexe 1 :**

Les micrographies MEB ont été réalisées à une tension de 15keV pour les 8 composites.

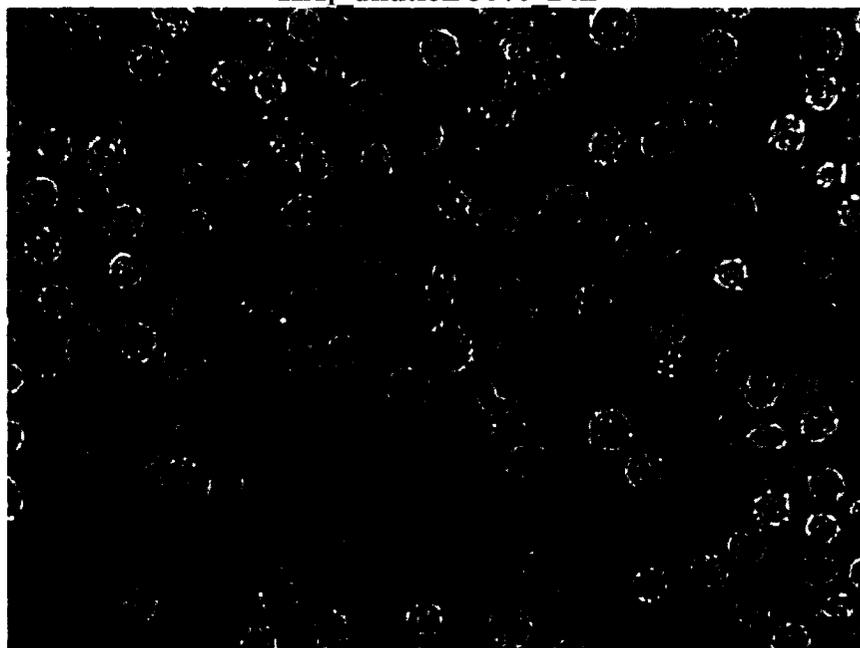


Annexe 2

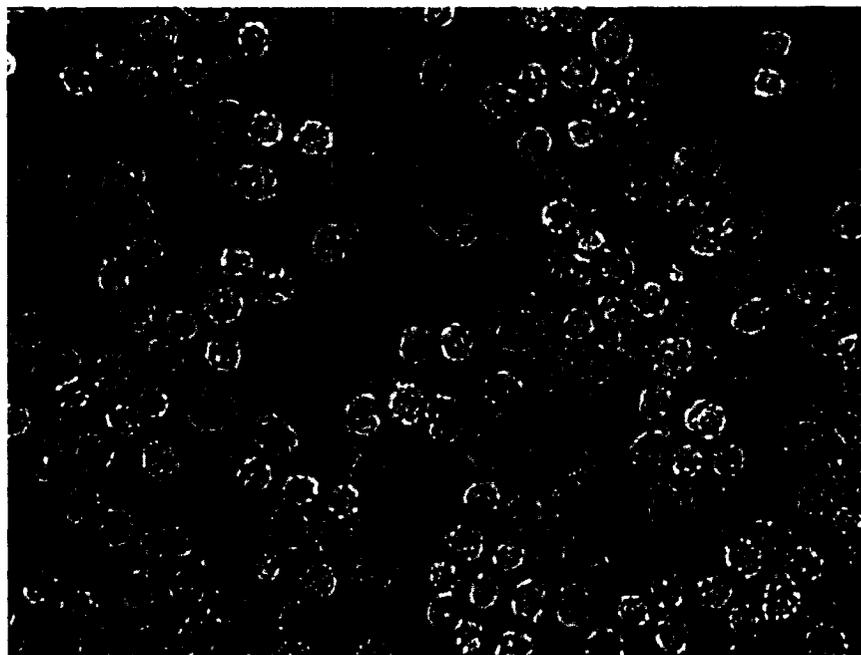
Quelques images prises avec le microscope à fort grossissement pour montrer la forme et la taille des produits de dégradation pour différents matériaux et à différentes dilutions.



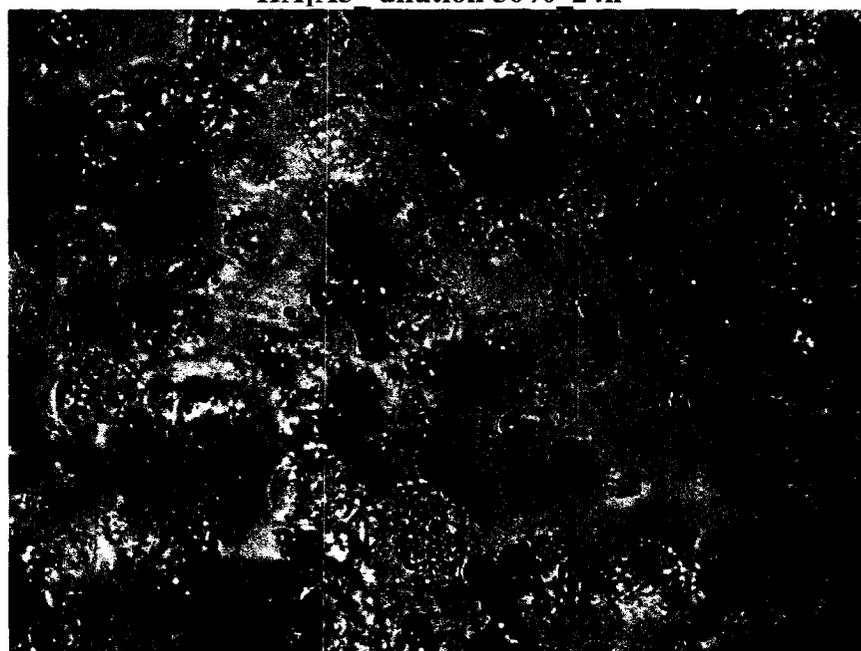
HA₁ dilution 50% 24h



HA₂ dilution 10% 24h



HA₁A5 dilution 50% 24h



HA₁A5_ dilution 100%_24h



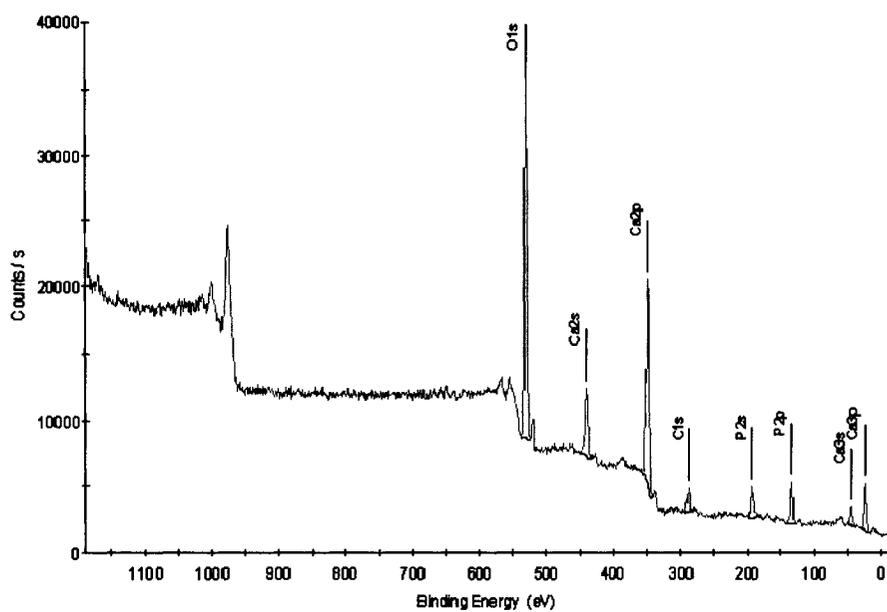
HA₂A5 dilution 100% 24h



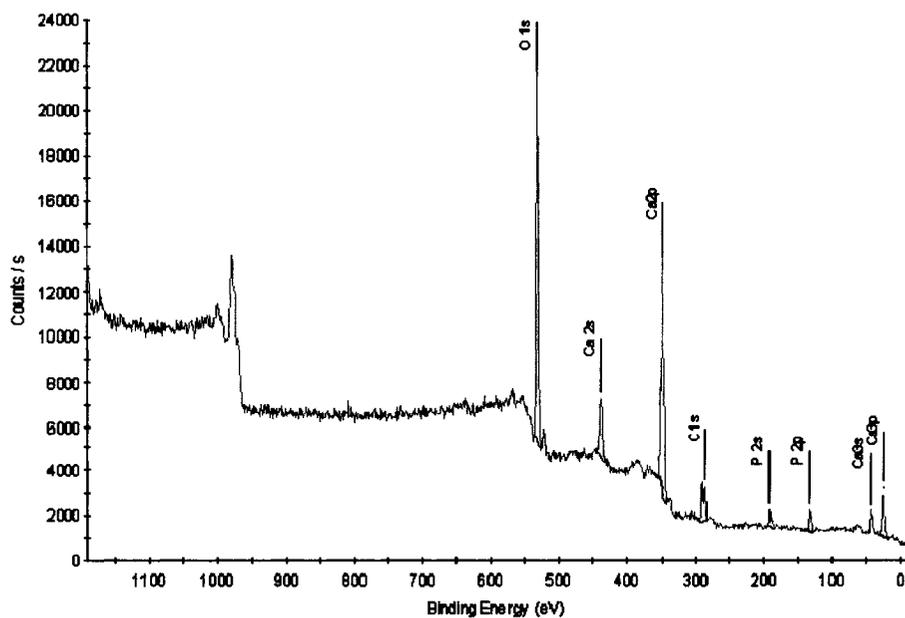
HA₁A20_ dilution 100%_24h

Annexe 3

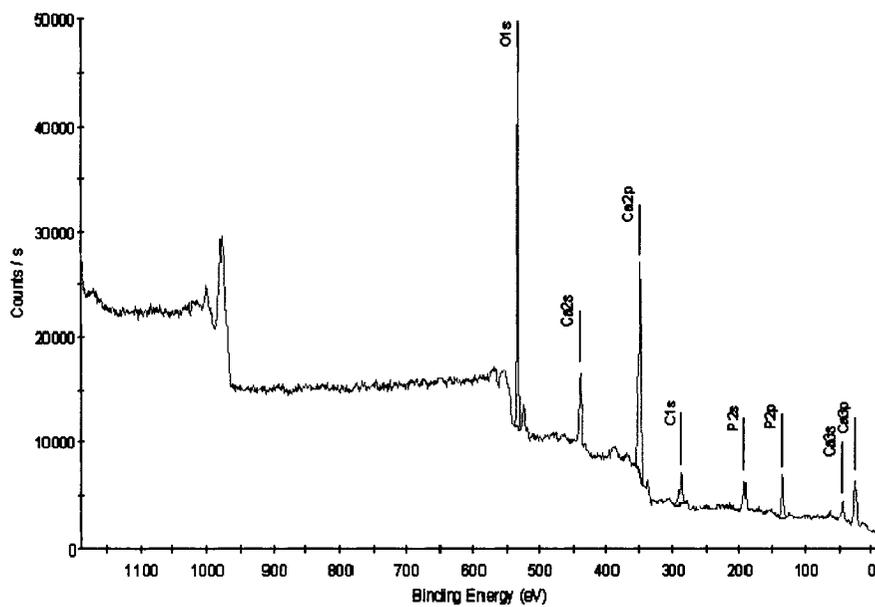
Les spectres XPS généraux de survol obtenus pour tous les composites en balayant l'énergie de l'analyseur de 0 à 1200 eV en énergie de liaison avec un pas de 1.0 eV.



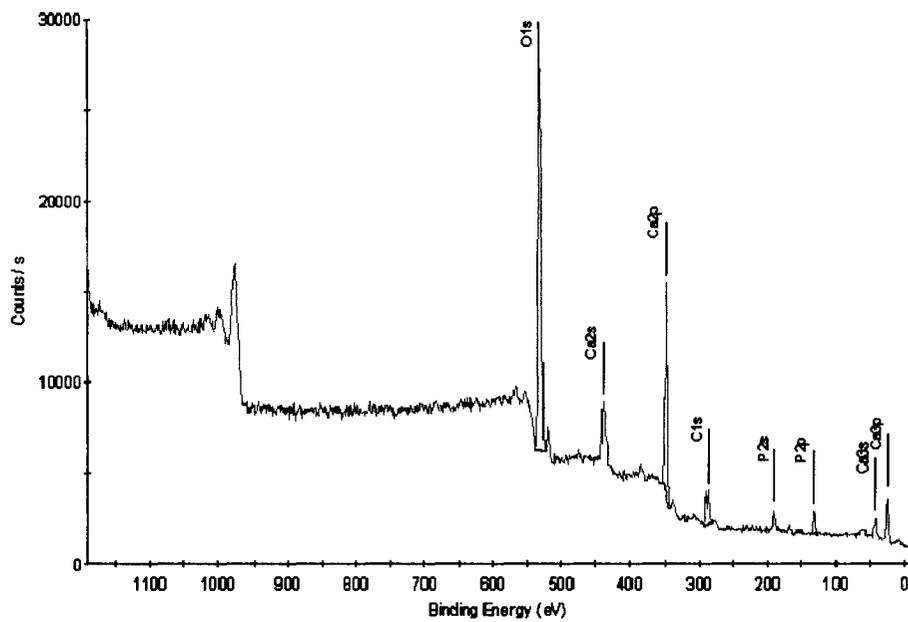
Le spectre XPS pour HA₁ (900°C)



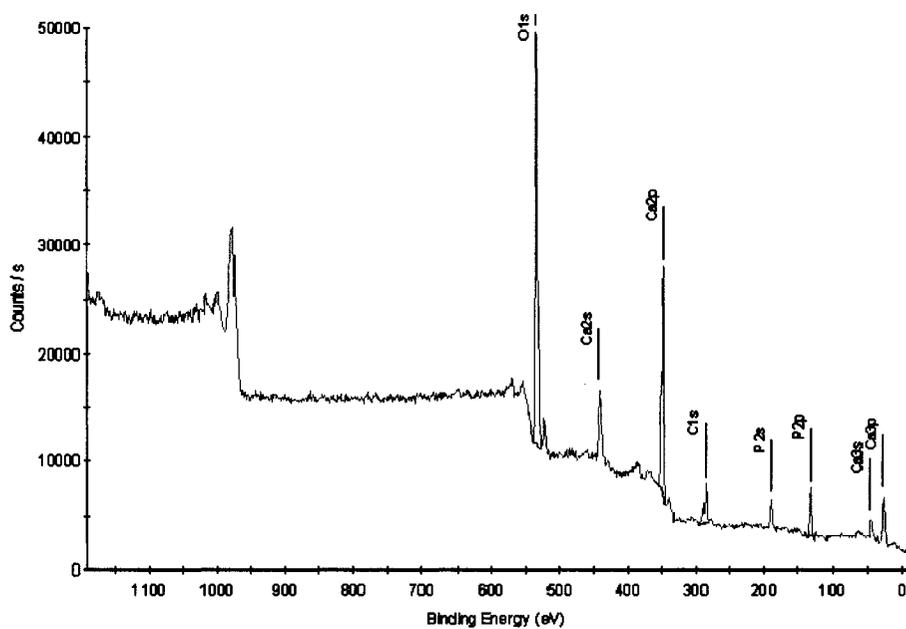
Le spectre XPS pour HA₂ (1300°C)



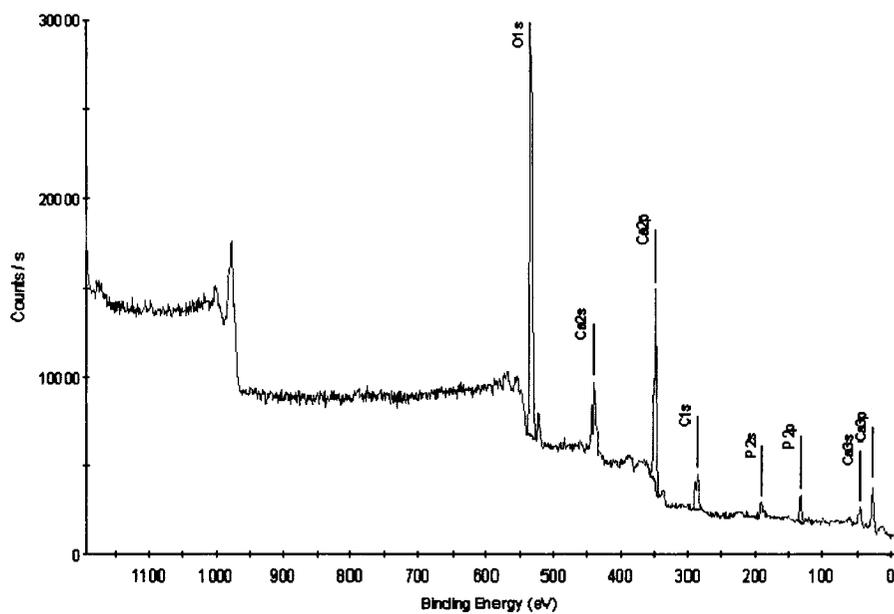
Le spectre XPS pour HA₁A5 (5% Al₂O₃; 900°C)



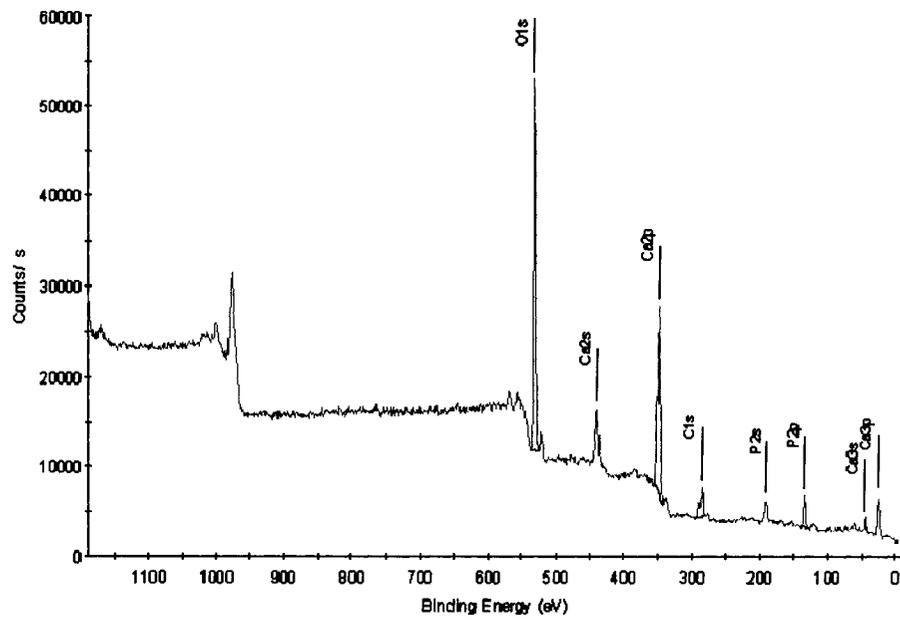
Le spectre XPS pour HA₂A5 (5% Al₂O₃; 1300°C)



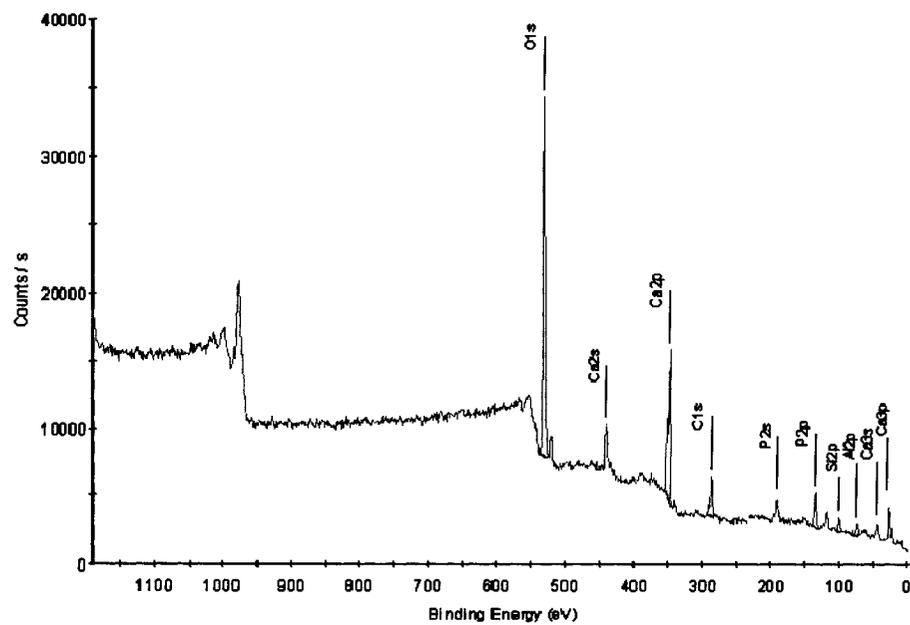
Le spectre XPS pour HA₁A10 (10% Al₂O₃; 900°C)



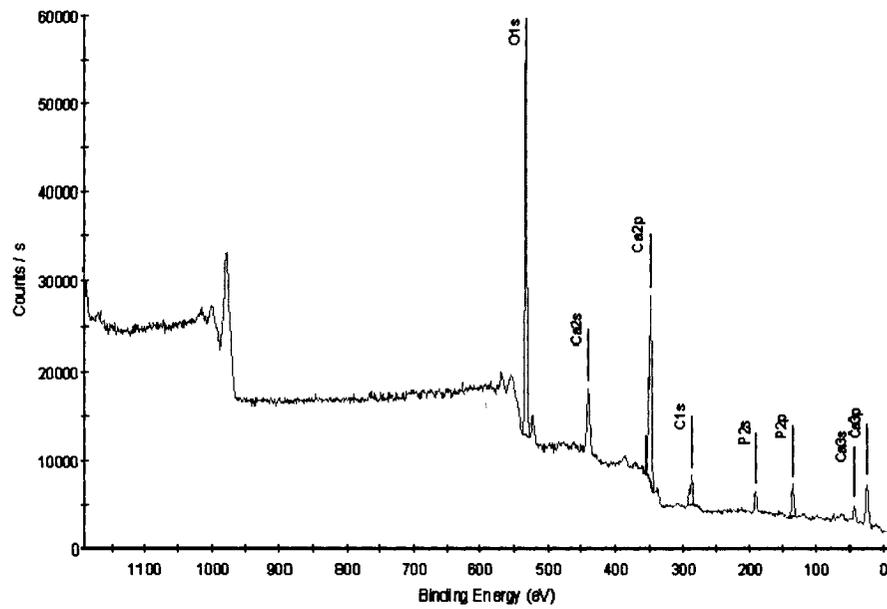
Le spectre XPS pour HA₂A10 (10% Al₂O₃; 1300°C)



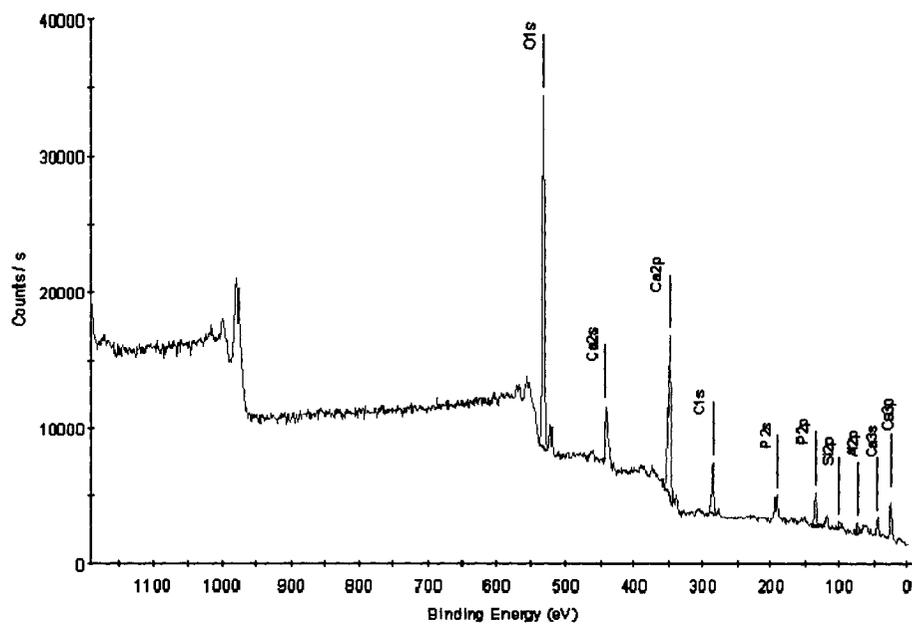
Le spectre XPS pour **HA₁A₂₀** (20% Al₂O₃; 900°C)



Le spectre XPS pour **HA₂A₂₀** (20% Al₂O₃; 1300°C)



Le spectre XPS pour **HA₁A₃₀** (30% Al₂O₃; 900°C)



Le spectre XPS pour **HA₂A₃₀** (30% Al₂O₃; 1300°C)