



HAL
open science

Élaboration et analyses structurales de verres bioactifs macroporeux

Aurélie Pardini

► **To cite this version:**

Aurélie Pardini. Élaboration et analyses structurales de verres bioactifs macroporeux. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université de Valenciennes et du Hainaut-Cambrésis, UVHC, (France), 2007. Français. NNT : 2007VALE0019 . tel-03001201

HAL Id: tel-03001201

<https://uphf.hal.science/tel-03001201v1>

Submitted on 12 Nov 2020

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

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

Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis

Année 2007

N° 07/21

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITESpécialité: **SCIENCE DES MATERIAUX****ÉLABORATION ET ANALYSES STRUCTURALES
DE VERRES BIOACTIFS MACROPOREUX**

Soutenue le Jeudi 14 juin 2007

par

Aurélie PARDINI**Composition du jury***Rapporteurs***Karine ANSELME**Chargée de recherche au CNRS, Université de
Mulhouse**Gilbert FANTOZZI**

Professeur des Universités, INSA Lyon

*Directrice de thèse***Claudine FOLLET-HOUTTEMANE**Professeur des Universités, Université de
Valenciennes et du Hainaut Cambrésis*Examineurs***Cyrille ALBERT-MERCIER***Co-encadrante*, Maître de conférences,
Université de Valenciennes et du Hainaut
Cambrésis**Francis CAMBIER**Docteur, Directeur du Belgian Ceramic
Research Center (BCRC), Mons (Belgique)**Jean-Christophe HORNEZ***Co-encadrant*, Maître de conférences,
Université de Valenciennes et du Hainaut
Cambrésis**Valérie MONTOUILLOUT**Chargée de recherche au CNRS, Université
d'Orléans**Säïd OBBADE**

Professeur des Universités, Université de Lille 1

REMERCIEMENTS



Ces travaux de recherche ont été menés au sein du Laboratoire des Matériaux et Procédés (LMP) de l'Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, et financés à 100 % par une allocation de recherche de la Région Nord-Pas-de-Calais. Je remercie la Région de m'avoir aidée financièrement à réaliser mon doctorat.



Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Anne LERICHE, Professeur de l'Université de Valenciennes et Directrice du Laboratoire des Matériaux et Procédés, pour son accueil au sein du laboratoire, sa grande disponibilité, son soutien, sa confiance et sa gentillesse.

Je remercie Claudine FOLLET-HOUTEMANE, Professeur de l'Université de Valenciennes et Directrice de ma thèse, de m'avoir accueillie au sein de son équipe « Verre », et de m'avoir aidée à réaliser ce mémoire. Je la remercie également pour la transmission de son savoir puisque qu'elle m'a enseigné la chimie depuis mon entrée à l'Université, et fait partie des enseignants qui donnent envie d'apprendre et d'aller toujours plus loin.

Je remercie également Cyrille ALBERT-MERCIER, Maître de conférences de l'Université de Valenciennes et co-encadrante de cette étude, de m'avoir encadrée durant cette thèse. Je la remercie pour la transmission de ses compétences, particulièrement sur les verres et en Résonance Magnétique Nucléaire.

Je tiens à remercier tout particulièrement Michel DESCAMPS, Ingénieur de Recherche de l'Université de Valenciennes et responsable de l'équipe Biocéramique, qui m'a aidée à réaliser ces travaux. Qu'il me permette de lui faire part de mon admiration pour sa grande compétence, en particulier dans le domaine des biomatériaux. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

Je remercie très sincèrement Jean-Christophe HORNEZ, Maître de Conférences de l'Université de Valenciennes et co-encadrant de cette étude, pour son soutien et sa patience qui m'ont permis d'aboutir à l'objectif de mes travaux de recherche.

Je remercie Karine ANSELME, Chargée de Recherche au CNRS de l'Université de Mulhouse, et Gilbert FANTOZZI, Professeur à l'INSA de Lyon, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse. Je les prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes remerciements vont également à Francis CAMBIER, Directeur du Belgian Ceramic Research Center à Mons (Belgique) d'avoir présidé mon jury de thèse, et de m'avoir fait l'honneur et la joie de m'annoncer la réussite de l'aboutissement de ces années de travail et de ces mois de rédaction et de préparation.

Merci également à Valérie MONTOUILLOUT, Chargée de Recherche au CNRS de l'Université d'Orléans et Saïd OBBADE, Professeur de l'Université de Lille 1, d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse. Qu'ils soient remerciés pour leurs conseils et leur aide dans la finalisation de ce manuscrit.

Nombreuses sont les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail de recherche, je remercie ainsi :

Cédric DUEE, pour toute son aide, et en particulier dans la réalisation des essais de bioactivité *in vitro*. Je le remercie également pour son amitié, sa gentillesse et sa sympathie. Merci d'avoir toujours répondu présent.

Philippe CHAMPAGNE, Maître de Conférences de l'Université de Valenciennes, qui a su trouver les mots qui m'ont permis de prendre confiance en moi et de choisir, à un moment très particulier de ma vie, de continuer mes études et d'arriver là où j'en suis aujourd'hui... Merci infiniment.

Florence BART et Sophie SCHULLER, du CEA (Marcoule), pour leur collaboration lors de cette étude, particulièrement dans la synthèse du verre.

Je tiens également à remercier le Centre Commun de Mesures RMN à l'Université de Lille 1 et plus particulièrement Bertrand REVEL pour son travail lors de l'acquisition des spectres RMN, mais aussi pour sa sympathie et sa gentillesse.

Je remercie très sincèrement Cherry FHAI et Frédéric HILDEBRAND du Groupement de Recherche sur les Biomatériaux de l'Université de Lille 2, pour la réalisation des essais préliminaires de cytocompatibilité *in vitro*. Merci également pour leur aide lors de l'interprétation des résultats et de m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance de thèse.

Gérard MOREAU, Ingénieur de Recherche au laboratoire, pour toutes les mesures EDS et photographies MEB. Merci pour sa patience et sa gentillesse.

Sylvie DAVIERO, Maître de Conférences de l'Université de Valenciennes, pour son aide en Diffraction des Rayons X à haute température.

Jérôme FLORENT, pour son aide à la synthèse des verres, pour sa sympathie et pour tous les moments de rires qui nous ont permis de travailler dans la bonne humeur.

Sandrine CHARDOME et José SIMONS, de l'INISMa (Mons) pour les mesures de Fluorescence X. Merci pour votre gentillesse, et pour votre collaboration.

Francine MONCHAU, pour son aide à la compréhension et à l'interprétation des essais préliminaires de cytocompatibilité.

Christian COURTOIS, Maître de Conférences de l'Université de Valenciennes, pour sa sympathie, son soutien et son aide lors de cette étude.

Eric DUPRET, Informaticien au Laboratoire, et Carole PETIT, Secrétaire du Laboratoire, qui m'ont énormément aidé lors de la réalisation de ce mémoire. Merci beaucoup pour leur patience...

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire, Mimi, Stéphan, Benoît, Corinne, Marc, Mélanie, Jeff, Benjamin, Samuel, Candice, Pascal, Xavier, Pierre, Eric, Hugues, Mohamed, Vincent, Françoise, Isabelle, Jaouide, Philippe, Edouard, pour leur accueil, leur sympathie et la très bonne humeur qui règne tous les jours au laboratoire. Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Je ne pouvais pas terminer ces remerciements sans y glisser une page un peu plus personnelle....

Merci à mon frère, ma famille et mes amis... Merci à toi, Stéphanie, pour ton aide et ton amitié sans limite, qui m'a beaucoup aidé pendant ces longues années et ces longs mois de rédaction...

Merci Papa, Merci Maman ...

Merci de m'avoir donné la possibilité de poursuivre mes études.

Merci de m'avoir soutenue pendant toutes ces années.

Merci Papa pour ton « Qui peut le plus, peut le moins »... Grâce à cela, je vais maintenant pouvoir vendre des bracelets sur la plage...

Merci maman pour ton écoute et ton aide de tous les jours avec notre petite chérie...

Je ne vous remercierai jamais assez...

Merci Lolo

Merci pour ton aide, ton écoute, ton soutien... et la patience que tu as quand je te raconte toutes ces histoires chaque soir...

J'espère que tu liras ce mémoire jusqu'à la dernière page, je sais que tu vas adorer...

Merci pour tout l'amour que vous me portez tous les jours, et pour tout ce que vous faites chaque jour pour moi.

À toi, Marion, ma petite fille chérie... Merci d'être là et de me donner tout cet amour chaque jour... Je t'aime et je te dédie ces quelques pages....



SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : ANALYSES STRUCTURALES PAR RMN-MAS DU ²⁹Si ET DU ³¹P DE VERRES BIOACTIFS DU SYSTEME TERNAIRE SiO₂-CaO-Na₂O DOPES PAR DU PHOSPHORE	4
I. GENERALITES SUR LES VERRES.....	5
I. 1. DEFINITION DU VERRE	5
I. 1. 1. Les formateurs de réseau.....	6
I. 1. 2. Les modificateurs de réseau.....	6
I. 1. 3. Les intermédiaires.....	7
I. 2. NOMENCLATURE UTILISEE POUR DECRIRE LA STRUCTURE DES VERRES	7
I. 2. 1. Nombre d'oxygène non-pontants par tétraèdre	7
I. 2. 2. Entités silicates	8
I. 2. 3. Entités phosphates	9
II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
II. 1. STRUCTURE DES VERRES DE SILICATE CONTENANT P ₂ O ₅	11
II. 1. 1. Influence de P ₂ O ₅ sur la structure de la silice vitreuse	11
II. 1. 2. Influence de P ₂ O ₅ sur la structure de verres de silicates alcalins et/ou alcalino-terreux	11
II. 1. 2. 1. Additions de fortes quantités de P ₂ O ₅ (plus de 10 % molaire)	11
II. 1. 2. 2. Additions de faibles quantités de P ₂ O ₅ (de 1 à 10 % molaires).....	12
II. 1. 2. 2. a. Nature des espèces phosphates.....	12
II. 1. 2. 2. b. Le phosphore est-il lié au réseau silicate ?	14
II. 1. 2. 2. c. Effet de l'addition de P ₂ O ₅ sur le réseau silicate.....	14
II. 1. 2. 2. d. Répartition des cations modificateurs autour des entités phosphates et silicates	16
II. 2. ÉTUDES RELIANT LA STRUCTURE DES VERRES A LEUR BIOACTIVITE	17
III. ELABORATION DE VERRES DU SYSTEME SiO₂ – CaO – Na₂O – P₂O₅.....	26
III. 1. INTRODUCTION ET CHOIX DES COMPOSITIONS	26
III. 2. SYNTHÈSE DES VERRES	27
III. 3. ANALYSES CHIMIQUES DES VERRES	29
III. 4. DETERMINATION DES TEMPERATURES CARACTERISTIQUES DES VERRES	30
IV. ANALYSES STRUCTURALES PAR RMN-MAS DES VERRES DES SERIES PzC1, PzC2, PzB3 ET PzB5	32
IV. 1. CONDITIONS EXPERIMENTALES DES ANALYSES RMN	32
IV. 2. ANALYSES STRUCTURALES PAR RMN-MAS DU ²⁹ Si – ÉTUDE DU RESEAU SILICATE	33
IV. 2. 1. Influence du taux de phosphore sur la structure des verres des séries PzC1 PzC2 PzB3 PzB5	33
IV. 2. 1. 1. Analyses qualitatives des spectres – Evolution du déplacement chimique isotrope des spectres en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres B5, B3, C1 et C2.	33
IV. 2. 1. 2. Analyses quantitatives des spectres ; nature et pourcentages des entités silicates (Q ⁿ) présentes dans le réseau vitreux	37

IV. 2. 2. 3. Discussion.....	41
IV. 2. 2. 3. a. Mise en évidence des réactions de dismutation.....	41
IV. 2. 2. 3. b. Mise en évidence du rôle de P_2O_5 sur la polymérisation du réseau silicate, par l'évolution des pourcentages relatifs des entités silicates.....	42
IV. 2. 2. 3. c. Mise en évidence du rôle de P_2O_5 sur la polymérisation du réseau silicate, par le calcul des rapports NBO/T.....	45
IV. 2. 2. 3. d. Mise en évidence de l'environnement chimique des entités silicates.....	47
IV. 2. 2. Conclusion.....	50
IV. 3. ANALYSES STRUCTURALES PAR RMN-MAS DU ^{31}P – ETUDE DES ENTITES PHOSPHATES.....	51
IV. 3. 1. Analyse qualitative, évolution du déplacement chimique isotrope des spectres en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres B5, B3, C2 et C1.....	51
IV. 3. 2. Analyse quantitative ; détermination de la nature chimique et du pourcentage des entités phosphates présentes dans les verres.....	54
IV. 3. 2. 1. Nature chimique des entités phosphates de la série PzB5.....	54
IV. 3. 2. 2. Nature chimique entités phosphates des séries de verres PzB3, PzC2 et PzC1.....	56
IV. 3. 2. 3. Discussion des résultats.....	58
IV. 3. 2. 4. Évolution du pourcentage relatif des entités phosphates en fonction du taux de phosphore.....	60
IV. 3. 3. Calcul du NBO/T traduisant l'état de polymérisation du réseau vitreux.....	62
IV. 3. 4. Répartition des cations Ca^{2+} et Na^+ autour des entités phosphates en fonction du taux de phosphore.....	64
IV. 3. 4. 1. Série de verres PzB5.....	65
IV. 3. 4. 2. Série de verres PzB3.....	66
IV. 3. 4. 3. Série de verres PzC2.....	67
IV. 3. 4. 4. Série de verres PzC1.....	68
IV. 3. 4. 5. Bilan de la répartition des cations modificateurs autour des entités phosphates.....	68
IV. 4. CONCLUSION.....	69
V. CORRELATION ENTRE LA STRUCTURE DE NOS VERRES ET LEUR BIOACTIVITE.....	71
Références bibliographiques.....	75
<u>CHAPITRE II</u> : ELABORATION D'UN VERRE BIOACTIF MACROPOREUX.....	79
I. BIBLIOGRAPHIE.....	79
I. 1. CLASSIFICATION DES BIOMATERIAUX.....	79
I. 1. 1. Origine humaine.....	79
I. 1. 2. Origine animale.....	79
I. 1. 3. Origine synthétique.....	81
I. 2. VERRES BIOACTIFS.....	83
I. 3. LES MATERIAUX BIOACTIFS MACROPOREUX.....	83
I. 3. 1. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par thermoformage.....	84
I. 3. 2. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par la méthode des mousses-éponges.....	85
I. 3. 3. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par « gelcasting ».....	90
I. 3. 4. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par procédé sol-gel.....	92
I. 3. 5. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par ajout de porogènes.....	94

I. 3. 5. 1. Porogènes liquides	94
I. 3. 5. 2. Porogènes solides.....	95
I. 3. 5. 3. Porogènes solides structurés.....	98
I. 3. 5. 3. a. <i>Élaboration de la structure porogène</i>	100
I. 3. 5. 3. b. <i>Mise en suspension de la poudre de céramique (barbotine)</i>	100
I. 3. 5. 3. c. <i>Imprégnation de l'édifice organique</i>	101
I. 3. 5. 3. d. <i>déliantage</i>	101
I. 3. 5. 3. e. <i>Traitement thermique à haute température</i>	101
I. 3. 6. Bilan de la littérature	104
II. ELABORATION D'UN VERRE BIOACTIF MACROPOREUX.....	106
II. 1. CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES	106
II. 2. PROTOCOLE OPERATOIRE DE BROUAGE DU VERRE	109
II. 2. 1. Choix du matériel de broyage et du solvant	109
II. 2. 1. 1. Essais de broyage réalisés dans l'eau distillée, avec un matériel en alumine (jarre et billes)	109
II. 2. 1. 1. a. <i>Suivi par MEB-EDS de la composition chimique au cours du broyage</i>	110
II. 2. 1. 1. b. <i>Étude par Spectroscopie Infra-Rouge</i>	113
II. 2. 1. 2. Essais de broyage réalisés dans l'éthanol anhydre, avec un matériel en alumine (billes et jarre)	115
II. 2. 1. 3. Essais de broyage réalisés dans l'éthanol anhydre, avec un matériel en agate (billes et jarre)	116
II. 2. 1. 3. a. <i>Suivi par MEB-EDS de la composition chimique au cours du broyage</i>	116
II. 2. 1. 3. b. <i>Étude par Spectroscopie Infra-Rouge</i>	117
II. 2. 2. Analyse granulométrique	119
II. 3. ÉTUDE DE FRITTAGE DU VERRE BIOACTIF	122
II. 3. 1. Dilatométrie des éprouvettes de verre P3C2	122
II. 3. 2. Évolution de la densité relative en fonction de la température de traitement thermique.....	125
II. 3. 3. Recherche des phases cristallines par diffraction des Rayons X.....	127
II. 3. 4. Observation par Microscope Electronique à Balayage	132
II. 4. MISE AU POINT DU PROCEDE D'ELABORATION D'UN VERRE BIOACTIF MACROPOREUX	135
II. 4. 1. Première étape : élaboration de la structure porogène	135
II. 4. 2. Deuxième étape : élaboration de la barbotine	136
II. 4. 2. 1. Mise en suspension dans l'eau distillée	137
II. 4. 2. 2. Mise en suspension dans l'éthanol anhydre absolu.....	140
II. 4. 3. Troisième étape : traitement thermique à basse température : le déliantage	140
II. 4. 4. Quatrième étape : traitement thermique à haute température	142
II. 5. CONCLUSION.....	144
Références bibliographiques.....	145

CHAPITRE III : APPROCHE PRELIMINAIRE DE LA BIOACTIVITE ET DE LA CYTOTOXICITE

I. ESSAIS DE BIOACTIVITE *IN VITRO*

I. 1. MILIEU D'IMMERSION	152
I. 2. EXPERIMENTATION	153

I. 2. 1. Préparation des échantillons.....	154
I. 2. 2. Le volume de SBF	155
I. 2. 3. Le bain thermostaté	156
I. 2. 4. Analyse des surfaces par Spectroscopie Infra Rouge.....	156
I. 2. 5. Analyses des surfaces par EDS.....	160
I. 2. 5. 1. Analyses EDS du verre P3C2 après 11 heures d'immersion dans le SBF	160
I. 2. 5. 1. Analyses EDS de la pastille de vitrocéramique après 6 et 12 heures d'immersion dans le SBF	162
I. 2. 6. Analyse structurale de la vitrocéramique après immersion, par RMN du ²³ Na et du ³¹ P	164
I. 3. CONCLUSION	166
II. APPROCHE BIOLOGIQUE PRELIMINAIRE.....	167
II. 1. BIBLIOGRAPHIE.....	167
II. 2. ÉVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE (METHODE DU CLONAGE).....	168
II. 2. 1. Préparation des échantillons	168
II. 2. 2. Culture cellulaire	169
II. 2. 3. Méthodes expérimentales	170
II. 2. 4. Résultats des tests de cytotoxicité.....	171
II. 2. 5. Discussion.....	171
II. 3. ÉTUDE DE LA CYTOCOMPATIBILITE EN CONTACT DIRECT.....	172
II. 3. 1. Protocole expérimental	173
II. 3. 2. Cellules MC3T3 E1.....	173
II. 3. 3. Prolifération cellulaire.....	174
II. 3. 3. 1. Méthode.....	174
II. 3. 3. 2. Résultats	174
II. 3. 3. 3. Discussion	176
II. 3. 4. Test de la vitalité cellulaire (Blue Alamar).....	177
II. 3. 4. 1. Méthode.....	177
II. 3. 4. 2. Résultats	178
II. 3. 4. 3. Discussion	180
II. 3. 5. Corrélation prolifération et vitalité.....	180
II. 4. ADHESION CELLULAIRE (PARA NITROPHENYL PHOSPHATE : P-NPP).....	181
II. 4. 1. Protocole expérimental du test d'adhésion au pNPP	181
II. 4. 2. Résultats de l'analyse quantitative de l'adhésion.....	182
II. 4. 3. Discussion sur l'analyse quantitative de l'adhésion.....	183
II. 5. CONCLUSION	184
Références bibliographiques.....	186
CONCLUSION GENERALE.....	189
ANNEXES.....	193
Annexe 1 : Principe de la résonance magnétique nucléaire.....	194
Annexe 2 : Spectroscopie de dispersion d'énergie.....	202
Annexe 3 : Etat vitreux et température de transition vitreuse (Tg).....	213
Annexe 4 : Les différentes possibilités d'utilisation des biocéramiques.....	215
Annexe 5 : Diffraction des rayons X en montée de température.....	216
Annexe 6 : Diffraction des Rayons X de la vitrocéramique traitée thermiquement à 900°C.....	217

INTRODUCTION

L. L. Hench¹ a mis au point, en 1969, le premier verre bioactif nommé « 45S5 » permettant une liaison intime avec l'os. Ce verre a une composition chimique massique de 45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O et 6% P₂O₅, et a la propriété de développer à sa surface, lorsqu'il est immergé dans un milieu physiologique, une couche d'HydroxyApatite Carbonatée (HAC), qui fait partie de la famille des apatites cristallisées. Cette couche d'apatite permet ainsi à l'implant de s'accrocher de manière stable au milieu extérieur.

Une étude portant sur les verres bioactifs du système quaternaire SiO₂-CaO-Na₂O dopés au phosphore, a été réalisée dans notre laboratoire, par I. Lebecq et al.². Ces auteurs ont fait varier les taux de silicium, calcium, sodium et phosphore des verres, et ont observé, grâce à la Spectroscopie Infra Rouge, leur influence sur les mécanismes de bioactivité. Leur étude a ainsi permis de relier la composition chimique de certains verres bioactifs à leur bioactivité.

Notre travail a porté, dans un premier temps, à l'étude de la structure des verres synthétisés par I. Lebecq et al.² par la Résonance magnétique Nucléaire (RMN) afin de pouvoir relier la structure et la bioactivité des verres, dans le but de sélectionner le verre "idéal" pour élaborer, dans un second temps, un macroporeux, susceptible d'être mieux adapté pour la réalisation d'implants comme l'ont montré les études réalisées sur les biocéramiques macroporeuses³.

Le premier chapitre est consacré à l'analyse structurale de verres bioactifs du système SiO₂-CaO-Na₂O dopés au phosphore, par des analyses de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du ²⁹Si et du ³¹P. Pour cela, nous avons sélectionné quatre verres du système SiO₂-CaO-Na₂O étudiés par I. Lebecq et al.², et présentant des résultats de bioactivité *in vitro* différents. Ces verres ont ensuite été dopés avec du phosphore.

Les analyses en RMN du ²⁹Si permettent de déterminer la nature et le pourcentage des entités silicates constitutives du réseau vitreux. L'influence du phosphore sur la structure du réseau silicaté a été également étudiée.

Les analyses en RMN du ³¹P permettent d'identifier et de quantifier les entités phosphates présentes dans les verres

Ainsi en établissant la structure de ces bioverres, il est possible de relier leur structure à leur propriété bioactive.

Le deuxième chapitre correspond à la réalisation d'un verre bioactif macroporeux, à porosité contrôlée. La bioactivité des verres étant un phénomène de surface, la macroporosité

engendrerait une colonisation plus rapide, en permettant ainsi aux cellules osseuses d'atteindre le cœur du matériau.

Une étude bibliographique est présentée au début de ce chapitre, et présente les différentes techniques permettant de concevoir des matériaux macroporeux.

Pour réaliser ce macroporeux, nous avons sélectionné un verre dont la structure a été étudiée lors du premier chapitre, et présentant un compromis entre ses bons résultats de bioactivité *in vitro*, et sa facilité d'élaboration en quantité importante. Il s'agit du verre de composition chimique molaire 43,65%SiO₂-22,795%CaO-30,555%Na₂O-3%P₂O₅, dénommé P3C2. Le but de notre étude a été d'utiliser le « *Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée* », brevet³ qui a été mis au point dans notre laboratoire pour des poudres d'HydroxyApatite (HA), ou d'alumine, de granulométrie proche du micron. Ce procédé permet la mise en forme de substituts osseux ayant un volume poreux de 70-80 %, avec un diamètre des pores contrôlé compris entre 10 et 1000 μm. Ce procédé comporte plusieurs étapes. La première étape de ce procédé nécessite l'obtention d'une poudre de verre micrométrique, ainsi il nous a fallu établir un mode opératoire de broyage du verre. Puis la deuxième étape a nécessité une étude de frittage de notre poudre de verre dans l'optique de déterminer le meilleur compromis entre la température de traitement thermique et sa granulométrie.

Le troisième chapitre concerne la bioactivité *in vitro* du bioverre macroporeux élaboré auparavant, c'est-à-dire plongé dans du fluide physiologique simulé (SBF : Simulated body Fluid). Une approche biologique préliminaire a été faite dans le but d'observer si le matériau issu du procédé d'élaboration visant à être utilisé comme substitut osseux, présente bien une cytocompatibilité avec l'organisme humain. Pour cela, des tests de viabilité, de vitalité, de prolifération et d'adhésion des cellules ont été réalisés.

¹ **L. L. Hench**

« Biomaterials : a forecast for the future »

Biomaterials 19 (1988) 1419-1423

² **I. Lebecq, F. Desanglois, A. Leriche et C. Follet-Houttemane**

« Compositional dependence on the *in vitro* bioactivity of invert or traditional bioglasses in the Si-Ca-Na-P System »

Journal of Biomedical Materials Research published online 27 Mars 2007

³ **O. Richard, S. Zarzynski, M. Descamps, P. Hardouin, A. Gallur**

« Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée »

Brevet n° 97 01 309 (1997)

**Chapitre I : ANALYSES STRUCTURALES
PAR RMN-MAS DU ^{29}Si ET DU ^{31}P DE
VERRES BIOACTIFS DU SYSTEME
TERNAIRE $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ DOPES PAR
DU PHOSPHORE**

I. GENERALITES SUR LES VERRES

I. 1. Définition du verre

Le verre possède une structure désordonnée dépourvue d'ordre à longue distance. Contrairement au cristal, il ne présente pas de périodicité tridimensionnelle résultant de la répétition sur des distances notables d'un même motif, la maille élémentaire (Figure 1). Seul peut être mis en évidence un ordre à courte distance qui traduit l'arrangement des voisins atomiques proches d'un atome donné (J. Zarzycki¹).

Nous définissons l'ordre local, ou l'ordre à courte distance, comme l'arrangement des atomes autour de l'élément étudié sur une distance de 0 à 5 Å. L'ordre local inclut les coordinences de l'élément, la nature des premiers et seconds voisins et les distributions des angles et distances de liaisons. Il correspond aux caractéristiques structurales obtenues par les techniques usuelles de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN 1D).

L'ordre à moyenne distance est déterminé par la disposition dans le verre de ces structures locales (par exemple les liaisons ou connectivités entre les polyèdres d'oxydes formateurs de réseau). L'ordre à moyenne distance se rapporte à des distances comprises entre 5 et 20 Å.

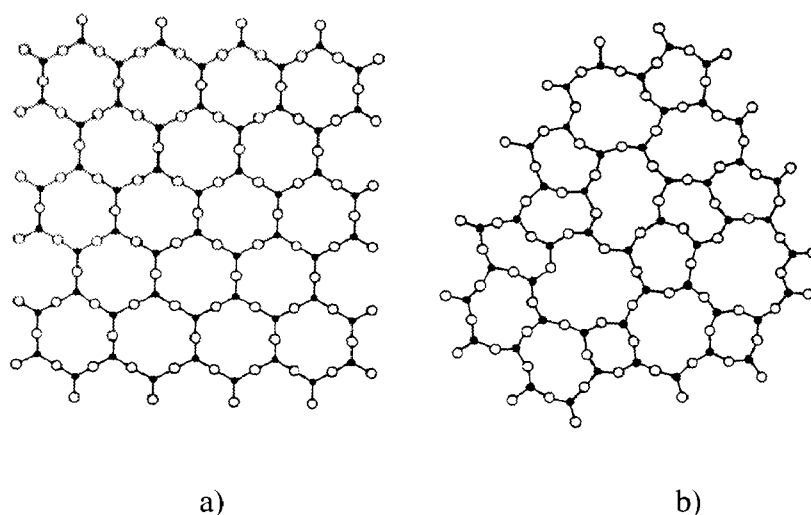


Figure 1 : Représentation schématique plane d'un réseau ordonné de SiO₂ (a) et de la forme vitreuse de ce même composé (b) (Si : • ; O : o) (H. Scholze²).

I. 1. 1. Les formateurs de réseau

Les principaux formateurs de réseau sont les éléments Si, P et B, dont les oxydes (SiO_2 , P_2O_5 et B_2O_3) sont susceptibles de composer à eux seuls une structure vitreuse, par la formation d'un réseau de polyèdres. Par exemple, la silice vitreuse (SiO_2) est constituée d'un réseau de tétraèdres $(\text{SiO}_4)^{4-}$ liés entre eux par leurs oxygènes. Un atome d'oxygène est dit oxygène pontant (ou Bridging Oxygen, BO) lorsqu'il lie deux éléments formateurs.

I. 1. 2. Les modificateurs de réseau

Les modificateurs de réseau sont des éléments ne faisant pas partie du réseau (Figure 2a). Ils s'insèrent dans la structure vitreuse en rompant les liaisons $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ (BO) et en créant des oxygènes non-pontants (ou Non Bridging oxygen, NBO) (Figure 2b).

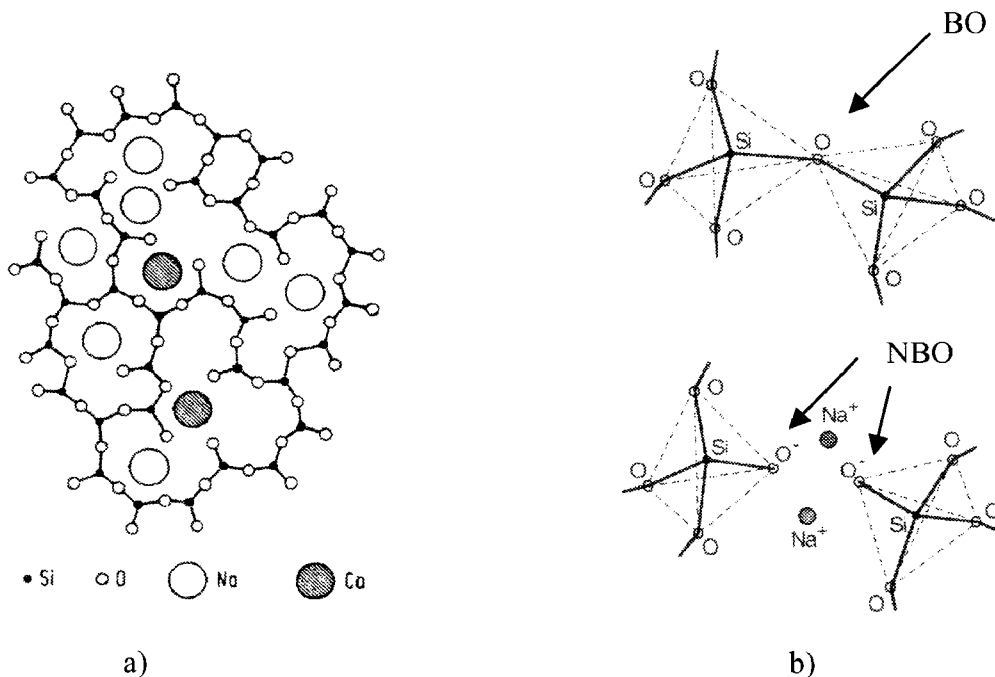


Figure 2 : Représentation de la rupture d'une liaison $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ par insertion de modificateurs Na^+ et Ca^{2+}

I. 1. 3. Les intermédiaires

Les intermédiaires sont, selon leur coordinence, leur concentration et la nature du verre, soit formateur, soit modificateur de réseau. Les principaux éléments susceptibles d'être intermédiaires sont Al, Fe et Ti.

I. 2. Nomenclature utilisée pour décrire la structure des verres

Avant toute description de la structure des verres de silicate, il est nécessaire de détailler la nomenclature employée soit pour nommer les entités silicates selon leur état de polymérisation, soit pour quantifier l'état de condensation du réseau avec le NBO/T. Le vocabulaire utilisé pour décrire les entités phosphates est également précisé.

I. 2. 1. Nombre d'oxygène non-pontants par tétraèdre

Connaissant les rôles structuraux (modificateurs ou formateurs) des éléments présents dans le verre, le rapport NBO/T (Non Bridging Oxygen per Tetrahedron) peut être calculé. Ce rapport du nombre d'atomes d'oxygène non pontants par tétraèdre est compris entre 0 et 4 et permet d'évaluer la condensation, ou la polymérisation, d'un réseau vitreux.

Par exemple, pour des verres de silicates alcalins et/ou alcalino-terreux, le rapport NBO/T se calcule à partir des compositions molaires, en utilisant l'équation 1. Cette équation implique que l'introduction d' $1M_2O$ ou $1MO$ dans des verres génère 2 NBO.

$$\frac{NBO}{T} = 2 \left(\frac{\sum_{\text{alcalins}} M_2O + \sum_{\text{alcalino-terreux}} MO}{SiO_2} \right) \quad \text{Équation 1}$$

I. 2. 2. Entités silicates

Le silicium est placé au centre du tétraèdre $(\text{SiO}_4)^{4-}$, entité élémentaire du réseau silicate. Ce tétraèdre est nommé Q^n , n étant le nombre d'oxygènes pontants. Par exemple, un Q^3 est un tétraèdre de $(\text{SiO}_4)^{4-}$, relié à 3 autres tétraèdres de $(\text{SiO}_4)^{4-}$ (Figure 3).

Les entités silicates Q^n peuvent être classées sur une échelle dont le sens indique la polymérisation du réseau. En effet, des entités silicates Q^4 correspondent à des tétraèdres de $(\text{SiO}_4)^{4-}$ ayant 4 oxygènes pontants (BO), c'est-à-dire un tétraèdre relié par ses quatre sommets à quatre tétraèdres. Il s'agit alors d'une entité très polymérisée et réticulée. A l'inverse, plus la valeur de n diminue, plus l'entité est dépolymérisée. Un Q^0 correspond ainsi à un tétraèdre $(\text{SiO}_4)^{4-}$ isolé.

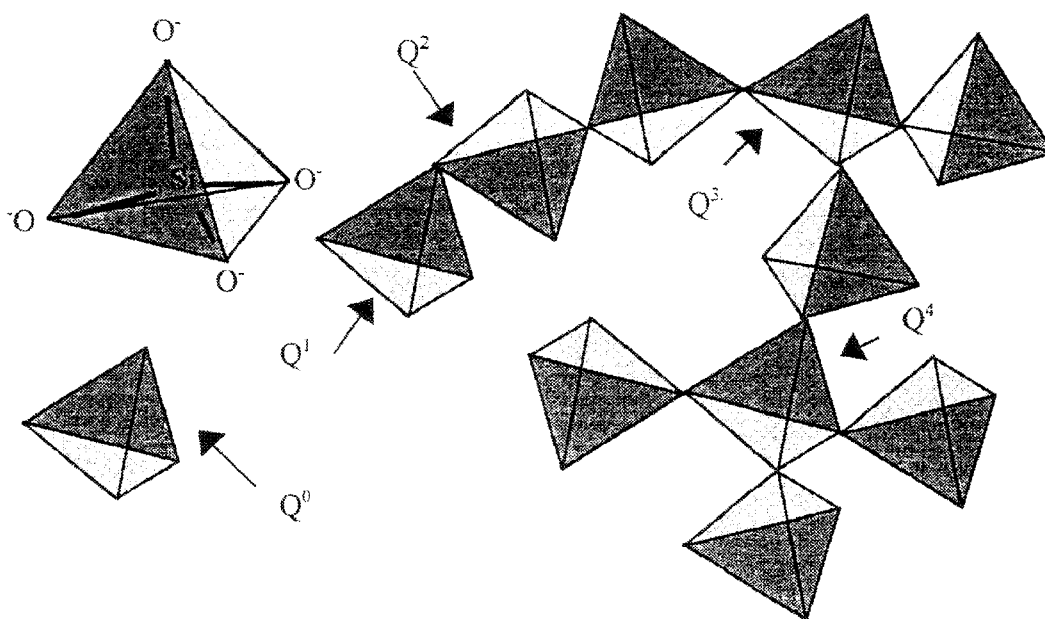


Figure 3 : Nomenclature des tétraèdres ou entités silicates désignés selon leur état de polymérisation

Pour un système simple composant un réseau vitreux de silice, il existe une relation déterminant les pourcentages des entités silicates Q^n , en fonction du taux de SiO_2 (pourcentage molaire), constituant le verre. Cette quantification de ces entités silicates

représentée par la valeur Y, se détermine avec l'équation 2. La Figure 4 représente l'évolution de la valeur Y en fonction du pourcentage molaire de SiO₂.

$$Y = 6 - \frac{200}{\%SiO_2} \quad (\text{Équation 2})$$

De plus pour des taux élevés de SiO₂, les verres sont souvent représentés par une distribution binaire³, c'est-à-dire qu'ils peuvent contenir au maximum deux entités silicates.

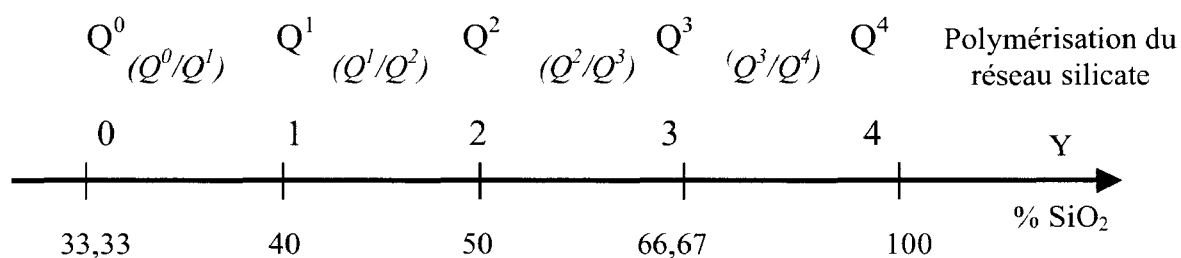


Figure 4 : Evolution de la polymérisation du réseau silicate en fonction du pourcentage de silice pour une distribution binaire

En revanche, d'après H. Maekawa et al.⁴, pour de faibles taux de SiO₂, cette distribution binaire des entités Qⁿ n'est plus vérifiée en raison de réaction de dismutation de site du type $2Q^n \rightleftharpoons Q^{n+1} + Q^{n-1}$. Ces dismutations dépendent également de la nature des cations modificateurs.

I. 2. 3. Entités phosphates

Le phosphore, introduit dans les verres, s'organise également sous forme de tétraèdres liés entre eux par leurs sommets. L'atome de phosphore pentavalent, lié à 4 atomes d'oxygène, est engagé dans une double liaison P = O. La nomenclature précédente (Qⁿ) est parfois utilisée pour décrire les entités phosphates, mais pour éviter la confusion entre entités phosphates et entités silicates, nous utiliserons dans ce mémoire la nomenclature suivante (Figure 5) :

- les orthophosphates sont des tétraèdres (PO₄)³⁻ isolés
- les pyrophosphates sont deux tétraèdres regroupés par un sommet (P₂O₇)⁴⁻

- les métaphosphates sont des chaînes d'au moins 2 tétraèdres reliés par leur sommet.

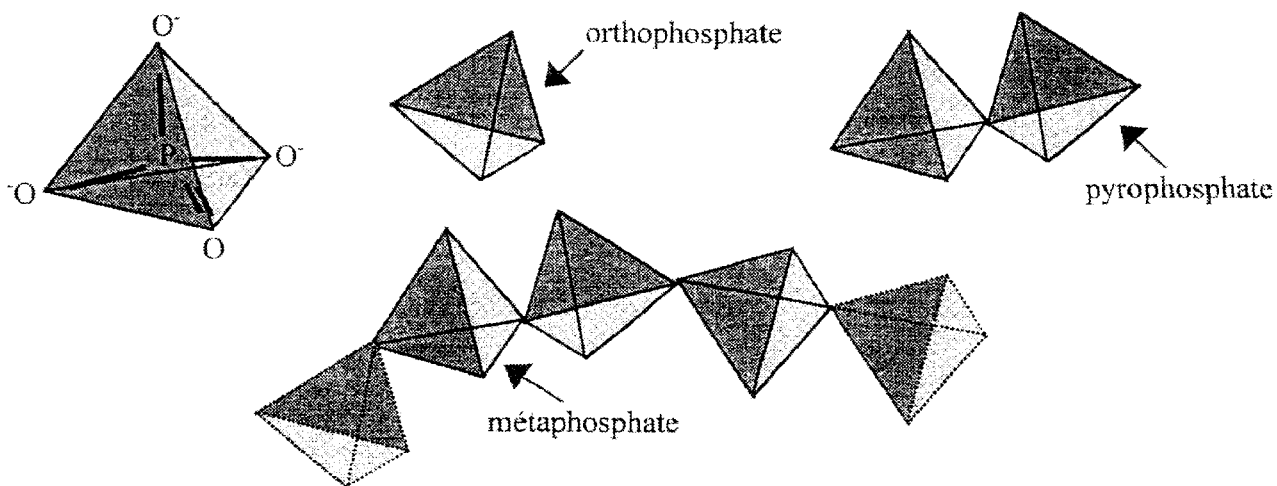


Figure 5 : Nomenclature des entités phosphates désignées selon leur état de polymérisation.

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II. 1. Structure des verres de silicate contenant P_2O_5

II. 1. 1. Influence de P_2O_5 sur la structure de la silice vitreuse

D'après la bibliographie, lorsque le phosphore est introduit en faibles pourcentages dans des verres de silice, il s'insère dans le réseau sous forme de tétraèdres⁵ $(PO_4)^{3-}$ en gardant la double liaison $P = O$. La silice reste également organisée en tétraèdres $(SiO_4)^{4-}$. Cependant, lorsque le taux de P_2O_5 augmente, les unités tétraédriques $(PO_4)^{3-}$ se polymérisent et forment des entités orthophosphates et pyrophosphates. Au-delà de 10 % molaire de P_2O_5 , il se forme des chaînes de polyphosphates, liées au réseau silicate⁶.

II. 1. 2. Influence de P_2O_5 sur la structure de verres de silicates alcalins et/ou alcalino-terreux

II. 1. 2. 1. Additions de fortes quantités de P_2O_5 (plus de 10 % molaire)

D'après la bibliographie, nous avons observé que l'organisation structurale des verres de silicate alcalins et/ou alcalino-terreux était fortement modifiée lorsque le phosphore y était ajouté progressivement. En effet, d'après M. W. G. Lockyer et al.⁷, à partir de 10 % molaires ajoutés, P_2O_5 forme des entités phosphates de plus en plus polymérisées : pyrophosphates puis métaphosphates dont la longueur de chaîne augmente avec le pourcentage de P_2O_5 . Cet ajout de phosphore entraîne également une condensation du réseau silicate et peut atteindre une polymérisation totale, de structure similaire à celle de la silice vitreuse, c'est-à-dire composée essentiellement d'entités silicates Q^4 . Les additions supplémentaires de P_2O_5 entraînent alors l'apparition de liaisons $Si - O - P$.

Ces auteurs ont également constaté que des additions de 40 % molaire de P_2O_5 dans des verres de composition $2SiO_2-Na_2O$ (disilicate de sodium), ou de 30 % molaire dans des verres

de composition $4\text{SiO}_2\text{-1K}_2\text{O}$ (tétrasilicate de potassium), entraînent l'apparition d'un nouveau pic sur les spectres RMN du ^{29}Si vers -212 ppm. Ce déplacement chimique est attribué à un silicium octaédrique (Si(VI)) ayant un environnement chimique proche de celui des atomes de silicium dans les cristaux SiP_2O_7 . De plus, ces spectres présentent également un déplacement chimique vers -35 ppm, prouvant la présence d'atomes de phosphore avec un environnement proche de celui observé dans les cristaux SiP_2O_7 . Les proportions de ces types d'atomes P ou Si(VI) augmentent avec le taux de P_2O_5 .

II. 1. 2. 2. Additions de faibles quantités de P_2O_5 (de 1 à 10 % molaires)

L'analyse structurale des verres contenant des faibles taux de phosphore a été peu investie et encore moins en fonction du taux de phosphore, surtout pour le système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ faisant l'objet de cette étude. Cependant, certaines études portant sur d'autres systèmes peuvent nous renseigner sur l'évolution de la structure des verres lors de faibles ajouts de P_2O_5 .

II. 1. 2. 2. a. Nature des espèces phosphates

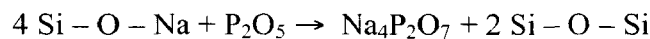
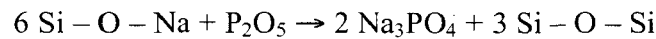
R. Dupree et al.⁸ ont constaté que P_2O_5 , ajouté dans des verres de composition $2\text{SiO}_2\text{-Li}_2\text{O}$, ne s'organise que sous forme d'orthophosphate, quel que soit le taux de phosphore introduit. Par contre, lorsqu'il est ajouté dans des verres $2\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$ et $2\text{SiO}_2\text{-K}_2\text{O}$, le pourcentage relatif des espèces orthophosphates (PO_4^{3-}) diminue alors que celui des pyrophosphates ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) augmente lorsque le taux de P_2O_5 augmente de 1 à 5 mole % P_2O_5 . Ces auteurs avancent alors deux hypothèses afin d'expliquer l'apparition de ces entités pyrophosphates :

- Soit la structure du verre contenant P_2O_5 montre une tendance à la séparation de phase, alors deux réseaux silicates se forment, l'un riche en silice, l'autre riche en entités phosphates.
- Soit il existe un encombrement stérique, moteur de la nature des entités phosphates formées. En effet lorsque le rayon du cation R augmente ($\text{Li} < \text{Na} < \text{K}$), les entités

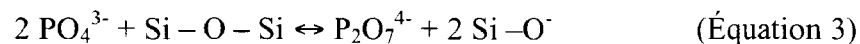
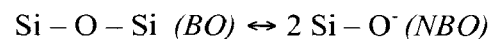
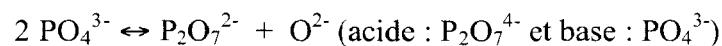
orthophosphates deviennent moins stables que les pyrophosphates.

M. W. G. Lockyer et al.⁹ se sont intéressés à la structure des verres du système quaternaire SiO₂ - CaO - Na₂O - P₂O₅. Ils ont également constaté que pour des verres de composition molaire (38 à 78%) SiO₂ - (10 à 46%) CaO - (4 à 48%) Na₂O avec un taux fixe de phosphore (2,6% P₂O₅), il existait des modifications dans la répartition des phosphates en entités orthophosphates et pyrophosphates selon la composition des verres.

Par exemple, d'après H. Grussaute et al.¹⁰, la formation des complexes orthophosphates et pyrophosphates de sodium dans des verres de silicates de sodium, peut être expliquée par les équations suivantes :



D'après H. Grussaute et al.¹⁰, l'équilibre existant entre ces complexes orthophosphates et pyrophosphates dépend plus précisément de l'acido-basicité des verres. Ces auteurs ont considéré qu'un acide capte des ions O²⁻ et qu'une base libère des ions O²⁻. La réaction acido-basique entre les entités phosphates et silicates s'écrit alors de la manière suivante :



Ainsi, le phosphore introduit en faibles quantités dans des verres alcalins et/ou alcalino-terreux se présente donc dans le verre, sous forme d'entités orthophosphates et pyrophosphates dont la répartition varie avec la nature du cation alcalin, le taux de P₂O₅ et la composition du verre. Cependant, il reste à savoir si ces entités phosphates sont liées au réseau silicate ou non.

II. 1. 2. 2. b. Le phosphore est-il lié au réseau silicate ?

Grâce à la RMN-MAS du ^{31}P , M. W. G. Lockyer et al.⁷ ont observé dans les verres $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ dopés au phosphore, que les liaisons au sein des deux types d'entités phosphates (orthophosphate et pyrophosphate) ne sont pas contraintes par le réseau silicate. En effet les largeurs à mi-hauteur (paramètre qui informe sur la distribution des angles et distances des liaisons) des bandes de résonance associées à ces deux entités phosphates, étaient faibles comparées à celles des entités silicates.

C. Nelson et al.¹¹ ont étudié la structure de verres du ternaire $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$ par Spectroscopie RAMAN. Ces auteurs ont ajouté de 1 à 65 % massiques de P_2O_5 dans trois séries de verres de compositions : 3 $\text{SiO}_2 - 1 \text{Na}_2\text{O}$ (trisilicate de sodium); 2 $\text{SiO}_2 - 1 \text{Na}_2\text{O}$ (disilicate de sodium) et 1 $\text{SiO}_2 - 1\text{Na}_2\text{O}$ (métasilicate de sodium). N'ayant pas observé de bande caractéristique de la liaison Si-O-P , ils ont conclu qu'il n'existait pas de couplage entre les entités phosphates PO_4^{3-} et les tétraèdres de silicate (SiO_4^{4-}), indépendamment du taux de phosphore introduit.

H. Grussaute et al.¹⁰ ont introduit 0,4 à 2,5 % molaires de P_2O_5 dans des verres de composition chimique molaire : (57 à 66,9) $\text{SiO}_2 - (5,3 \text{ à } 35,1) \text{CaO} - (5,1 \text{ à } 41,9) \text{Na}_2\text{O}$ et (50 à 58,7) $\text{SiO}_2 - (4,7 \text{ à } 9,8) \text{TiO}_2 - (35,4 \text{ à } 38) \text{Na}_2\text{O}$. Ils ont constaté que dans ces verres, aucune liaison Si-O-P n'était détectée et que P_2O_5 ne jouait en conséquence pas le rôle d'oxyde formateur.

Ainsi, le phosphore introduit dans les verres de silicate alcalin et/ou alcalino-terreux ne se lie donc pas au réseau silicate. Nous nous sommes alors intéressés aux effets qu'il engendre sur la structure des verres lorsqu'il est introduit toujours en faibles quantités.

II. 1. 2. 2. c. Effet de l'addition de P_2O_5 sur le réseau silicate

C. Nelson et al.¹¹ ont montré, grâce à la Spectroscopie RAMAN, que l'ajout de faibles quantités de phosphore (par exemple 3,4 %) dans des métasilicates de sodium (1 $\text{SiO}_2\text{-1Na}_2\text{O}$),

entraînait une augmentation de l'intensité des bandes significatives des liaisons Si-O-Si, traduisant une polymérisation du réseau silicate. L'apparition de la bande attribuée aux phosphates monomères est observée au même moment, et son intensité augmente avec l'ajout de phosphore. Ces auteurs ont conclu que les entités phosphates s'associent aux NBO de la structure silicate, en formant ainsi des complexes phosphates – sodium.

R. Dupree et al.⁸ ont étudié l'évolution de la structure des verres $1 R_2O - 2 SiO_2$ ($R = Li, Na$ ou K) par RMN du ^{29}Si et du ^{31}P , en fonction du taux de phosphore (de 1 à 5% molaires). Ils ont observé, grâce à la RMN du ^{29}Si , que les entités silicates présentes dans leurs verres étaient des Q^3 et des Q^4 , et que l'ajout de faibles quantités de phosphore induisait une diminution de l'intensité des pics de Q^3 , et une augmentation de l'intensité de la bande associée aux entités Q^4 . Cette observation traduit ainsi une polymérisation du réseau silicate, par l'ajout de P_2O_5 . Ces auteurs ont précisé également que le phosphore s'associait avec une partie des alcalins (R_2O), réduisant ainsi la concentration effective d'alcalins dans la matrice silicate.

M. W. G. Lockyer et al.⁷ ont montré que l'ajout de 5 et 10 % molaire de P_2O_5 dans un verre $80SiO_2-20K_2O$ entraîne des variations structurales lors de l'analyse de ces verres grâce à la RMN du ^{29}Si et du ^{31}P . En effet, le verre non dopé au phosphore, montre en RMN du ^{29}Si , un spectre de résonance asymétrique composé de 50 % d'entités silicates Q^3 et 50 % de Q^4 . Lorsque le phosphore est ajouté dans ce verre, les proportions des entités Q^3 diminuent jusqu'à disparaître, alors que les entités Q^4 atteignent 100 % pour 10 % molaires ajoutés. Ces auteurs ont donc conclu à une polymérisation du réseau silicate avec l'introduction de phosphore.

En conclusion de cette partie, M. W. G. Lockyer et al.⁷ et C. Nelson et al.¹¹ ont montré que les entités phosphates présentes dans les verres alcalins et/ou alcalino-terreux ne sont pas liées au réseau silicate. Ces auteurs ainsi que R. Dupree et al.⁸ ont tous mis en évidence une polymérisation du réseau silicate lors des additions de P_2O_5 dans les verres. Le phosphore s'insère dans les interstices du réseau silicate en s'associant aux cations modificateurs, afin de former des complexes phosphates. L'extraction de ces cations modificateurs libère des NBO, qui vont ensuite engendrer la repolymérisation du réseau silicate.

II. 1. 2. 2. d. Répartition des cations modificateurs autour des entités phosphates et silicates

D'après M. W. G. Lockyer et al.⁹, si le déplacement chimique des Q^n présents dans un verre $SiO_2-CaO-Na_2O$ évolue linéairement avec le rapport $CaO/(CaO+Na_2O)$ entre celui d'un $Q^n(Na^+)$ et d'un $Q^n(Ca^{2+})$, cela signifie alors que ces ions modificateurs se répartissent de façon homogène autour de cette entité Q^n . Par contre si le déplacement chimique de Q^n ne varie pas de façon linéaire avec le rapport $CaO/(CaO+Na_2O)$ mais conserve des valeurs proches de $\delta(Q^n(Na^+))$ ou de $\delta(Q^n(Ca^{2+}))$, l'environnement des Q^n est alors riche soit en Na^+ , soit en Ca^{2+} .

Ces auteurs ont montré une préférence des cations Ca^{2+} et Na^+ à s'associer à certaines entités silicates pour deux verres de composition 47,9 Na_2O - 0 CaO - 49,5 SiO_2 - 2,7 P_2O_5 et 37,9 Na_2O - 10,5 CaO - 48,9 SiO_2 - 2,7 P_2O_5 . En effet, ces auteurs ont observé pour ces deux verres des Q^3 à -86,1 et -86,3 ppm, et des Q^2 à -78,9 et -76,7 ppm avec une incertitude de 0,2 ppm. Ces auteurs ont fait référence à d'autres déplacements chimiques pour des verres de système binaire :

- 1 Na_2O - 1 SiO_2 : $\delta(Q^2) = -76$ ppm
- 45 Na_2O - 55 SiO_2 : $\delta(Q^2) = -75,7$ ppm et $\delta(Q^3) = -86$ ppm
- CaO - SiO_2 : $\delta(Q^2) = -81,5$ ppm

Ainsi, les déplacements chimiques des entités Q^3 étant proches de celles d'un Q^3 dans un verre de silicate de sodium et les déplacements chimiques des entités Q^2 étant proches de celles d'un Q^2 dans un verre de silicate de calcium, ils ont conclu que les entités Q^2 de ces verres avaient une préférence à s'associer aux Ca^{2+} , et que les entités Q^3 avaient tendance à s'associer aux Na^+ .

En revanche, ces mêmes auteurs ont observé une répartition homogène des deux cations Na^+ et Ca^{2+} autour des entités phosphates, grâce à la RMN du ^{31}P . En effet ils ont montré que les entités orthophosphates formées étaient compensées de manière uniforme par Na^+ et Ca^{2+} car leurs déplacements chimiques dépendaient du rapport $CaO/(CaO+Na_2O)$ du verre pour un

taux fixe de phosphore. Ainsi ces entités phosphates ne montrent donc pas d'interactions particulières avec l'un ou l'autre des deux cations.

H. Grussaute et al.¹⁰ ont observé aussi une répartition homogène de Na^+ et Ca^{2+} autour des espèces phosphates pour des verres du système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ dopés au phosphore. Par contre n'ayant pas décomposé leur spectre en RMN du ^{29}Si , ces auteurs n'ont pas pu donner des informations sur la répartition des cations modificateurs autour des entités silicates.

A. R. Jones et al.¹² ont aussi constaté une répartition homogène des Na^+ et Ca^{2+} même dans des verres non dopés au phosphore de composition molaire : (60 à 75%) SiO_2 - (0 à 20%) CaO - (20 à 25%) Na_2O .

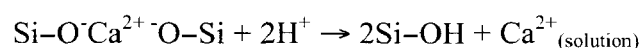
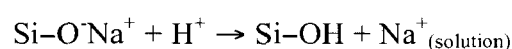
II. 2. Études reliant la structure des verres à leur bioactivité

Avant de présenter les travaux d'auteurs qui ont établi la structure de verres et leur bioactivité, nous rappellerons le mécanisme de formation de l'apatite du verre bioactif 45S5 (46,1 SiO_2 -26,9 CaO -24,4 Na_2O -2,6 P_2O_5 en pourcentages molaires) selon L. L. Hench¹³.

Un verre est dit bioactif lorsqu'immérgé dans du fluide physiologique, il développe à sa surface une couche d'HydroxyApatite cristallisée Carbonatée (HAC, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_2)(\text{OH})_2$). Cette couche est, par sa composition en calcium et phosphore, similaire à la phase minérale de l'os. Elle permet ainsi au matériau d'être utilisé comme implant osseux dans un organisme humain.

Les différentes étapes du mécanisme de bioactivité déterminées sur le verre « 45S5 » sont les suivantes :

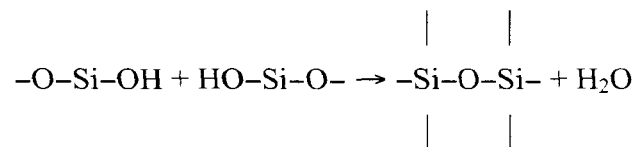
Une première étape de la réactivité de surface du verre correspond à l'échange des ions Na^+ et Ca^{2+} du verre avec les ions H^+ de la solution de fluide physiologique simulé (Simulated Body Fluid : SBF) selon les réactions suivantes :



Cette étape produit alors des groupements silanols à la surface du verre avec un milieu alcalin environnant la surface de l'échantillon.

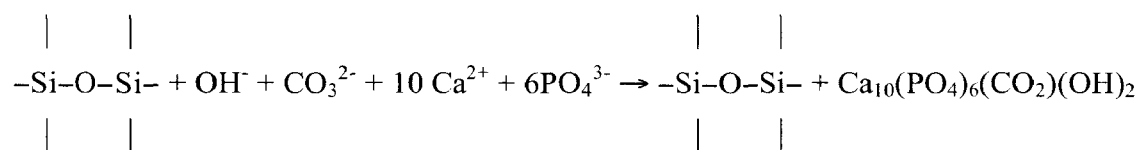
La perte de silice du réseau sous la forme de Si(OH)_4 constitue une deuxième étape de modification de la surface du verre. Elle résulte de la rupture de liaisons Si-O inter tétraèdres et produit de nouveaux groupements silanols à la surface du verre avec un pH basique.

La troisième étape consiste en la condensation des silanols des deux étapes précédentes produisant ainsi une couche riche en silice à la surface du verre appauvrie en cations alcalins et alcalino-terreux à pH alcalin.



Lors de la quatrième étape, le calcium et les phosphates précipitent pour former une couche supplémentaire à la surface du verre. Cette couche est une couche de phosphate de calcium amorphe (CaP amorphe).

La cinquième étape correspond à la cristallisation de la couche de phosphate de calcium amorphe en apatite. En effet les ions OH^- et/ou CO_3^{2-} de la solution s'insèrent et réagissent avec le phosphate de calcium amorphe pour former l'apatite.



Le verre 45S5 développe une couche de HAC semblable à l'apatite biologique dès 12 heures d'immersion dans le SBF.

M. W. G. Lockyer et al.⁹ ont étudié les structures des verres du système $\text{SiO}_2\text{-CaO- Na}_2\text{O}$ dopés tous avec 6% massique de P_2O_5 , par RMN du ^{29}Si , du ^{31}P et du ^{23}Na . Les compositions de leurs verres sont reportées dans le diagramme ternaire (Figure 6). Ce diagramme illustre la réponse bioactive de ces composés d'après L. L. Hench.¹³ La réponse bioactive correspond à

des tests *in vivo* dans des fémurs de rat, et *in vitro* dans du fluide physiologique simulé. Leurs verres synthétisés sont nommés de BG1 à BG13 et sont situés sur les lignes XX et YY. Les compositions BG9 et BG13 produisent des systèmes cristallisés. Les phases cristallines pour BG9 et BG13 sont : α -CaSiO₃, et α -Ca₂SiO₄ plus β -CaSiO₃, respectivement.

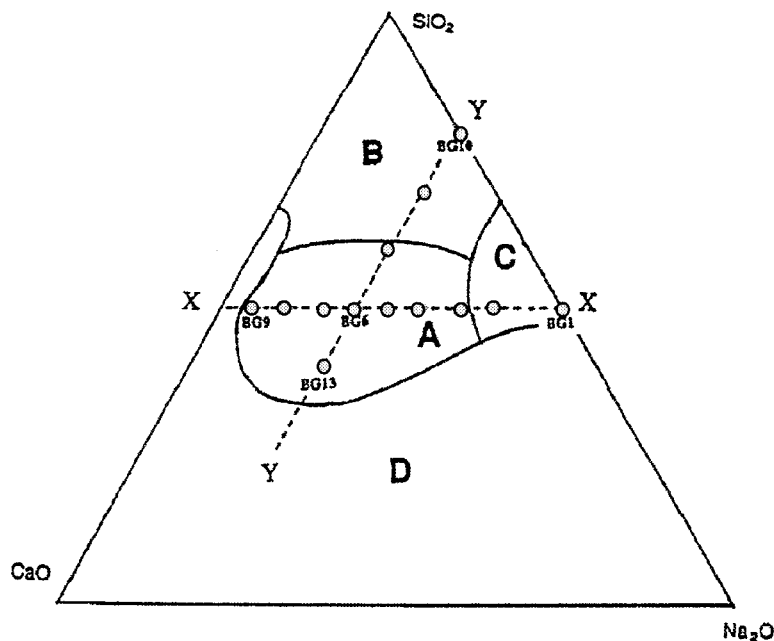


Figure 6 : Diagramme ternaire illustrant les compositions chimiques massiques préparées lors de l'étude de M. W. G. Lockyer et al.⁹, et comparées avec leur réponse biologique. La ligne XX représente la série de verres avec Na₂O substitué par CaO ($49\text{SiO}_2-(1-x)\text{Na}_2\text{O}-x\text{CaO}$ avec $x=0$ à 46). La ligne YY représente la série de verres où SiO₂ est remplacé par CaO ($19\text{Na}_2\text{O}-(1-x)\text{SiO}_2-x\text{CaO}$ avec $x=0$ à 41). Toutes les compositions contiennent 6 % massique de P₂O₅

Quatre domaines de compositions chimiques A, B, C et D de ce diagramme, correspondant à des propriétés bioactives différentes des composés synthétisés, ont été définis par ces auteurs. Ils peuvent être décrits de la façon suivante:

- Les compositions de la région A (BG3 à BG9, BG12 et BG13) ont la particularité de former une forte liaison avec les tissus humains (liaison

observée lors des tests *in vivo* et apparition de la couche d'hydroxyApatite). Cette région correspond ainsi à une zone de bioactivité des verres.

- Les compositions de la région B (BG10 et BG11) sont des verres très riches en SiO₂. Insolubles, elles ne donnent pas lieu à des propriétés bioactives et sont par conséquent inertes.
- Les compositions de la région C (BG1 et BG2) sont connues pour être complètement résorbables et disparaissent complètement après 10 à 30 jours d'implantation.
- La région D correspond à des compositions faibles en taux de SiO₂, (inférieur à 40%), et donne des composés non vitreux et non bioactifs.

La RMN du ²⁹Si leur a permis de montrer que les verres de la ligne XX (BG1 à BG9) étaient tous composés d'entités silicates Q² et Q³. En effet, par exemple pour le verre BG1, ne contenant pas de CaO, ils ont observé que le spectre de résonance magnétique nucléaire contenait deux raies de résonance à -86,3 et à -76,7 ppm. Ces auteurs ont associé ces déplacements chimiques respectivement aux entités silicates Q³(Na) et Q²(Na). Quant aux verres de la ligne YY, ils sont composés essentiellement de Q³ et de Q⁴.

Une étude en RMN du ³¹P du verre BG1 a montré une seule bande de résonance à 15,6 ppm correspondant à un orthophosphate de sodium (Na₃PO₄). La substitution progressive de Na₂O par CaO (BG1 à BG9) entraîne un déplacement chimique de 15,6 à 4,7 ppm. La valeur du déplacement chimique de toutes les résonances des verres XX est située entre les complexes orthophosphate de sodium et orthophosphate de calcium. Pour les verres de la ligne YY, ces auteurs ont observé la présence de deux types de complexes : des orthophosphates et des pyrophosphates.

Les auteurs ont pour chaque région A, B, C et D corréler leur bioactivité à leur structure et ont expliqué de la manière suivante :

- La région A (BG3 à BG9) : les structures de ces verres s'apparentent à une combinaison de métrasilicate de calcium (1 CaO-1 SiO₂ : structure en chaîne constituée de Q²) et de disilicate de sodium (2 SiO₂-1 Na₂O, structure réticulée,

- Q³). Cette proposition de structure provient du fait que ces auteurs ont observé préférentiellement une association des Q³ avec les Na⁺ et des Q² avec les Ca²⁺. Sachant que le disilicate de sodium se dissout facilement pour former un gel de silice, c'est la présence de CaSiO₃ qui contrôle et modère la dissolution de l'ensemble du verre puisqu'elle est moins soluble que le disilicate de sodium. Ces verres contiennent également des complexes de phosphates mixtes.
- La région B (BG10 et BG11) : les structures de ces verres sont comparables à celle du tétrasilicate de sodium (4 SiO₂ - 1 Na₂O) contenant des Q⁴ et des Q³. Cette phase étant faiblement soluble en raison de sa structure très réticulée, justifie que ces verres ne sont pas bioactifs. Ces structures comportent des complexes orthophosphates et pyrophosphates.
 - La région C (BG1 et BG2) : la structure du verre BG1 (sans calcium) s'apparente à une combinaison de métasilicate de sodium (1 SiO₂ - 1 Na₂O, Q²) et de disilicate de sodium (2 SiO₂ - 1 Na₂O, Q³). Ces 2 phases sont très solubles. Lorsque Na₂O est substituée par 10 % molaires de CaO (BG2), le verre contient toujours des Q² et des Q³ avec toutefois une structure disilicate prédominante. Ces verres deviennent alors très réactifs et se dégradent donc rapidement. Ces deux verres contiennent essentiellement des complexes de phosphates de sodium.

M. W. G. Lockyer et al.⁹ ont ainsi établi une relation entre la structure de verres plus exactement avec les entités silicates et leurs propriétés bioactives. En effet dans leur proposition de l'aptitude d'un verre d'être bioactif, ces auteurs n'ont pas fait intervenir les complexes phosphates présents dans leurs verres. De plus ces auteurs n'ont pas quantifié les entités silicates et phosphates présentes dans le réseau vitreux, et n'ont pas étudié l'influence du taux de phosphore dans ces verres sur leurs propriétés bioactives.

O. Peilt et al.¹⁴ ont étudié le mécanisme de bioactivité des verres du domaine quaternaire P₂O₅ - Na₂O - CaO - SiO₂ par Spectroscopie Infra Rouge. Les compositions massiques qu'ils ont sélectionnées sont 1 Na₂O - 2 CaO - 3 SiO₂ (1N2C3S) et 1,5 Na₂O - 1,5 CaO - 3 SiO₂, les verres ont ensuite été dopés jusqu'à 6 % massiques de P₂O₅. Ces derniers ont ensuite été traités thermiquement entre 550°C et 700°C durant 5 à 80 minutes, afin d'obtenir, dans certains cas, des vitrocéramiques. Ces auteurs ont identifié la phase cristalline Na₂Ca₂Si₃O₉

(ICCD 22-1455) dans toutes les vitrocéramiques. Ils ont également réalisé d'autres traitements thermiques plus longs (17 et 34 heures) et à plus haute température (820°C) et ont ainsi montré l'apparition de la phase cristalline $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6$ caractéristique de l'apatite pour les verres contenant 4 et 6 % de phosphore. Ces verres et vitrocéramiques ont ensuite été immergés dans du fluide physiologique simulé (SBF), pendant différents temps. Des analyses par Spectroscopie Infra Rouge de la surface des échantillons étudiés ont permis de déterminer les temps d'apparition de la couche d'Hydroxy Apatite Carbonatée (HAC), caractéristique de leur bioactivité. Ils ont constaté que la cristallisation ralentissait la cinétique de formation de l'apatite, mais n'empêche pas sa formation. En effet, leurs résultats de bioactivité ont montré un temps d'apparition de la couche d'HAC variant entre 8 heures d'immersion pour les verres contenant 6 % de phosphore, et 35 heures pour l'échantillon complètement cristallisé de composition massique $1,07 \text{ Na}_2\text{O} - 2 \text{ CaO} - 3 \text{ SiO}_2$.

Ces auteurs ont ainsi pu corréler l'état de cristallisation des composés (nature et pourcentage de la phase cristalline) avec les résultats de bioactivité *in vitro*.

Un important travail de recherche réalisé dans notre laboratoire portant sur l'influence des quatre composants du verre de L. L. Hench sur la bioactivité des verres du système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (Figure 7) dans lequel du phosphore est introduit en petite quantité (jusqu'à 6 % molaire de P_2O_5), a été réalisé par I. Lebecq et al.¹⁵ Ces auteurs ont également étudié l'influence de P_2O_5 sur la structure des verres grâce à la Spectroscopie Infra Rouge et ont mis en évidence une repolymérisation du réseau silicate. Ils ont pu identifier la présence de liaisons O-P-O dans leurs verres sans toutefois identifier la nature chimique des espèces phosphates en raison du faible pourcentage de phosphore. En outre, aucune quantification des entités silicates Q^n n'a été faite par ces auteurs.

Les verres, étudiés par ces auteurs, correspondent aux compositions chimiques représentées par des points (●) (Figure 7).

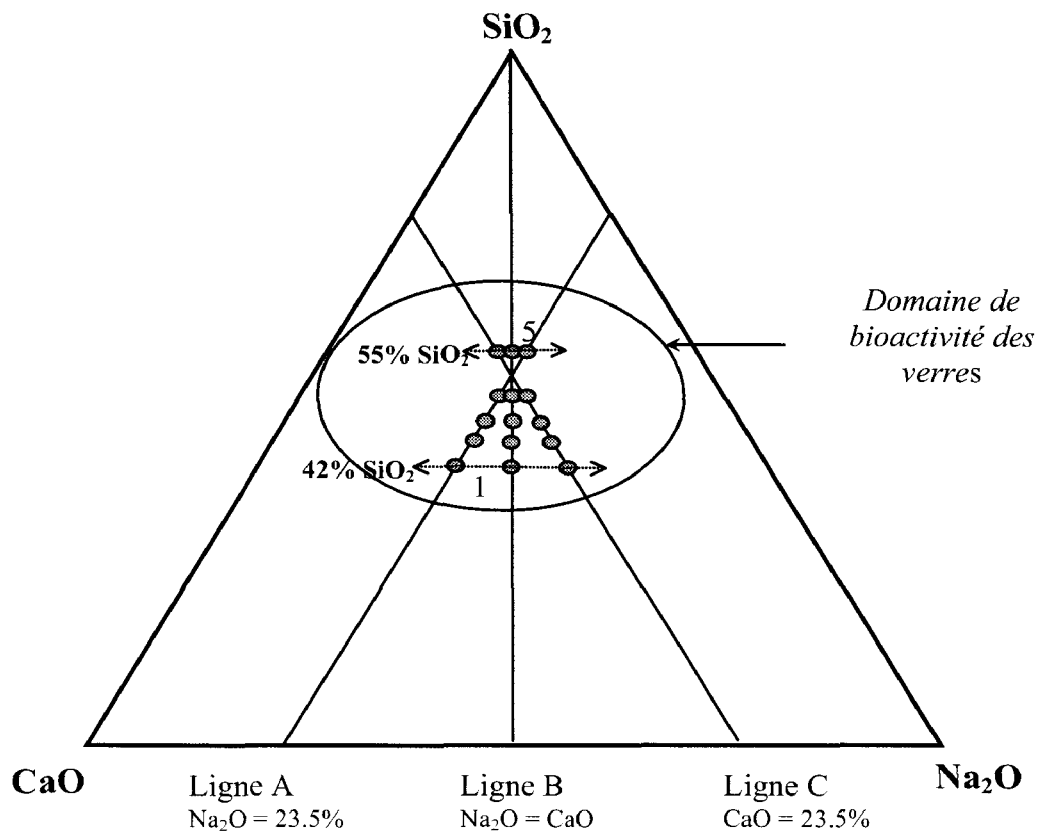


Figure 7 : Compositions molaires des verres étudiés dans le ternaire SiO₂ - CaO - SiO₂ (I. Lebecq et al.¹⁵)

A1 : 42 % SiO₂ – 34,5 % CaO – 23,5 Na₂O et A5 : 55 SiO₂ – 21,5 CaO – 23,5 Na₂O

B1 : 42 % SiO₂ – 29 % CaO – 29 Na₂O et B5 : 55 SiO₂ – 22,5 CaO – 22,5 Na₂O

C1 : 42 % SiO₂ – 23,5 % CaO – 34,5 Na₂O et C5 : 55 SiO₂ – 23,5 CaO – 21,5 Na₂O

Ces auteurs ont ensuite réalisé des essais de bioactivité sur ces verres, en les immergeant dans du fluide physiologique simulé (SBF : Simulated Body Fluid), et en observant le temps d'apparition de la couche d'HydroxyApatite Cristallisée (HAC). Leurs résultats ont montré une grande diversité dans les temps d'apparition de la couche d'HAC (Tableau 1) selon la composition du verre.

Temps d'apparition de la couche HAC	Nom du verre
6 heures	P6A3 - P6B3
8 heures	P6A1 - P4A3
10 heures	P1C1 - P4B3
12 heures	P2C1 - 45S5 - C2
14 heures	P4A1 - P3C2 - P2B3 - P5C2 - P2A3
16 heures	P3C1 - P4C1 - P2A1
22 heures	C1
2 jours	P1C2 - P1B5 - P5B5 - A5 - C5
2,5 jours	B5
3 jours	A1 - B1 - A2 - B2 - A3 - C3 - A4 - B4 - C4
4 jours	B3

Tableau 1 : Temps d'apparition de la couche HAC des verres étudiés par I. Lebecq et al¹⁵

Leur étude a permis de mettre en évidence trois comportements différents de réactivité pour les verres du système $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ dopés au phosphore en présence de SBF, en fonction de la composition du verre et du taux de phosphore.

Pour les verres traditionnels (série B5) contenant plus de 50% de SiO_2 , l'ajout de phosphore améliore peu la bioactivité, le temps d'apparition de l'apatite se situe entre 2 et 3 jours. En effet ces verres possédant une structure tridimensionnelle accentuée par l'ajout de phosphore, il se forme alors rapidement une couche de silice importante à la surface des verres bloquant ainsi la migration des nuclei de phosphate de calcium. L'apatite se forme ainsi essentiellement avec les ions calcium et phosphates du SBF.

Pour les verres inversés contenant un taux de SiO_2 inférieur à 50%, et riches en sodium (séries C1 et C2), l'ajout de phosphore n'améliore que très peu la bioactivité, qui reste toutefois intéressante puisqu'elle est de l'ordre de 14 heures. Les complexes phosphates de sodium qui migrent rapidement à travers le gel de silice, gênent et ralentissent la cristallisation de l'apatite. L'augmentation de leurs concentrations avec le taux de phosphore

introduit dans le verre explique pourquoi le phosphore a peu d'influence sur la bioactivité.

Pour les verres inversés et moins riches en sodium (séries B3, A1 et A3), le phosphore améliore considérablement la bioactivité. En effet, leur bioactivité varie entre 4 jours (sans ajout de phosphore) à 6 heures (avec 6 % P_2O_5). La couche de silice qui serait intermédiaire en épaisseur par rapport aux 2 autres séries, laisse migrer les complexes de phosphates de calcium, et préparent ainsi la cristallisation de l'apatite dans le phosphate de calcium amorphe. Le taux de phosphore améliore la bioactivité car son ajout progressif fait croître la concentration des complexes de phosphate de calcium.

III. ELABORATION DE VERRES DU SYSTEME $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$

III. 1. Introduction et choix des compositions

L'objectif de cette étude est de poursuivre les travaux d'I. Lebecq et al.¹⁵ reliant la composition chimique des verres à leur bioactivité. Nous avons ainsi réalisé l'analyse structurale de ces verres par RMN du ^{29}Si et du ^{31}P , dans le but d'une part de quantifier les entités silicates constitutives du réseau vitreux et les entités phosphates, et d'autre part de corrélérer leur structure à leur bioactivité. Pour cela, nous avons sélectionné quatre verres parmi ceux étudiés par ces auteurs, et ayant des bioactivités bien différentes :

- Les verres C2 et C1 présentent des temps rapides d'apparition de la couche d'HAC (respectivement 12 et 22 heures)
- Le verre B5 (bioactif en 2,5 jours d'immersion dans le SBF) est un verre de bioactivité moyenne
- Le verre B3, bioactif en 4 jours, est un verre de mauvaise bioactivité.

Nous avons ensuite dopé ces quatre verres avec z % de phosphore, z allant de 1 à 6 % (Tableau 2). Le taux de phosphore introduit dans les verres, est défini à l'aide d'une quantité z de P_2O_5 en moles, la composition molaire dans le ternaire a été recalculée à $(100-z)$ % de façon à conserver les rapports molaires initiaux Si/Ca et Si/Na.

Les verres sont alors notés avec P suivi du pourcentage z de P_2O_5 en moles auquel est ajouté leur nom d'origine dans le ternaire. Le verre C1 dans lequel 1 % de P_2O_5 a été introduit sera noté P1C1, il fait partie de la série PzC1 (verre C1 + z % de phosphore).

La quantité maximale de phosphore qui a été possible d'introduire dans nos verres a été 6% molaire de P_2O_5 . En effet, au-delà de cette valeur et voire moins dans certains cas, les composés commencent à se dévitrifier.

Ainsi, en réalisant une analyse structurale par RMN du ^{29}Si et du ^{31}P de ces quatre verres dopés avec du phosphore, il sera alors possible d'évaluer l'influence du phosphore sur la

bioactivité des verres d'un point de vue structural, et d'établir par conséquent avec plus de précisions les mécanismes de formation de l'apatite de ces verres.

nom du verre	Compositions molaires (%)			
	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅
B5	55,000	22,500	22,500	0
P1B5	54,450	22,275	22,275	1
P2B5	53,900	22,050	22,050	2
P3B5	53,350	21,825	21,825	3
P4B5	52,800	21,600	21,600	4
P5B5	52,250	21,375	21,375	5
B3	47,000	26,500	26,500	0
P1B3	46,530	26,235	26,235	1
P2B3	46,060	25,970	25,970	2
P3B3	45,590	25,705	25,705	3
P4B3	45,120	25,440	25,440	4
P5B3	44,650	25,175	25,175	5
P6B3	44,180	24,910	24,910	6
C2	45,000	23,500	31,500	0
P1C2	44,550	23,265	31,185	1
P3C2	43,650	22,795	30,555	3
P5C2	42,750	22,325	29,925	5
C1	42,000	23,500	34,500	0
P1C1	41,580	23,265	34,155	1
P2C1	41,160	23,030	33,810	2
P3C1	40,740	22,795	33,465	3
P4C1	40,320	22,560	33,120	4
P5C1	39,900	22,325	32,775	5
45S5	46,100	26,900	24,400	2,6

Tableau 2 : Compositions nominales chimiques molaires des verres étudiés

III. 2. Synthèse des verres

La synthèse des verres a été réalisée à partir des produits suivants :

- SiO₂ : quartz pur, (Merck),
- CaCO₃ : carbonate de calcium de pureté 99% (Chimie-Plus Laboratoires),
- Na₂CO₃ : carbonate de sodium de pureté 99,9% (Merck),
- (NaPO₃)_n : polyphosphate de sodium pur ou sel de Graham (Merck).

Les réactifs pesés ont été mélangés dans un mortier en agate afin d'homogénéiser l'ensemble. La poudre obtenue a été introduite dans des creusets en platine, inertes à la synthèse, et a été traitée thermiquement pendant 5 heures à 950°C afin d'éliminer les carbonates. Après cette opération, le mélange a été broyé une seconde fois avant d'être mis en fusion à 1400°C, pendant 4 heures. Une trempe à l'air a été ensuite réalisée en coulant le verre en fusion sur une plaque d'acier préchauffée à 250°C afin de limiter les tensions internes du verre créées lors de la trempe et ainsi d'éviter que celui-ci ne se casse lors du refroidissement.

Les verres obtenus ont ensuite été traités thermiquement à une température inférieure à leur température de transition vitreuse, permettant de stabiliser les verres en éliminant les tensions internes créées par la trempe.

La majorité des verres synthétisés sont transparents. Cependant, il a été constaté que les verres P5B5, P6B3 et P4C1 étaient légèrement opalescents. Des analyses par Rayons X ont été réalisées sur ces verres (Figure 8) afin d'identifier la ou les phases responsables de cette opalescence. Une recherche de phase cristalline a été effectuée, mais nous n'avons pas trouvé de composé permettant d'indexer ces pics.

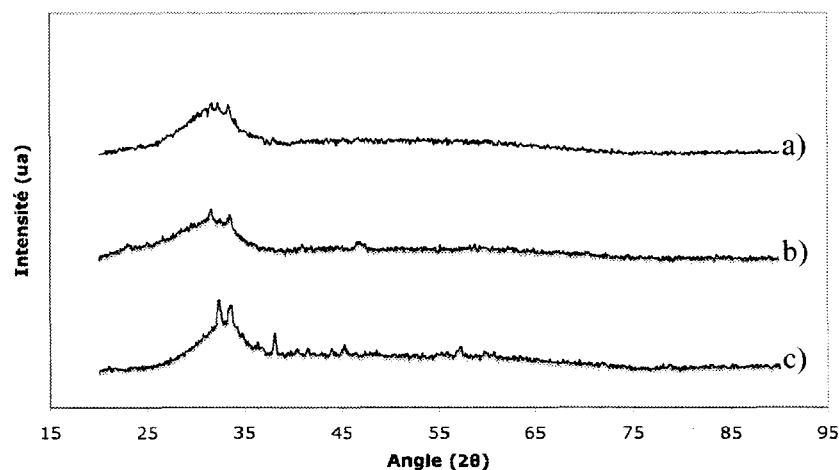


Figure 8 : Diffractogrammes des verres P6B3(a), P5B5(b), et P4C1(c)

III. 3. Analyses chimiques des verres

La composition des verres a été déterminée par microscopie électronique à balayage (MEB) sur des blocs de verre par la technique de spectroscopie de dispersion d'énergie (EDS). (Principe en Annexe 2).

Les éléments dosés sont le silicium, le sodium, le calcium, l'oxygène et le phosphore pour la totalité des verres du système ternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (Tableau 3). Ces valeurs ont été obtenues par des analyses semi-quantitatives des spectres EDS. Les compositions molaires nominales et expérimentales sont assez proches.

verre	Pourcentage molaire théorique (%)				Pourcentage molaire expérimental (%)			
	Si	Na	Ca	P	Si	Na	Ca	P
B5	44,9	36,73	18,37		46,0 ($\pm 0,1$)	36,6 ($\pm 0,2$)	17,4 ($\pm 0,5$)	
P1B5	44,17	36,14	18,07	1,62	45,2 ($\pm 0,2$)	35,7 ($\pm 0,6$)	17,4 ($\pm 0,3$)	1,7 ($\pm 0,2$)
P2B5	43,45	35,55	17,78	3,22	44,5 ($\pm 0,4$)	34,2 ($\pm 0,1$)	17,8 ($\pm 0,3$)	3,5 ($\pm 0,2$)
P3B5	42,74	34,97	17,48	4,81	44,3 ($\pm 0,2$)	34,6 ($\pm 0,2$)	16,3 ($\pm 0,2$)	4,8 ($\pm 0,3$)
P4B5	42,04	34,39	17,2	6,37	42,5 ($\pm 0,2$)	33,0 ($\pm 0,2$)	17,7 ($\pm 0,3$)	6,8 ($\pm 0,05$)
P5B5	41,35	33,83	16,91	7,91				
B3	37,15	41,9	20,95		38,4 ($\pm 0,3$)	42,0 ($\pm 0,3$)	19,6 ($\pm 0,2$)	
P1B3	36,57	41,24	20,62	1,57	34,9 ($\pm 0,3$)	46,2 ($\pm 0,3$)	17,6 ($\pm 0,3$)	1,3 ($\pm 0,3$)
P2B3	35,99	40,59	20,29	3,13	36,7 ($\pm 0,2$)	39,6 ($\pm 0,5$)	20,6 ($\pm 0,2$)	3,1 ($\pm 0,2$)
P3B3	35,42	39,94	19,97	4,66	35,9 ($\pm 0,2$)	39,3 ($\pm 0,2$)	19,9 ($\pm 0,2$)	4,9 ($\pm 0,2$)
P4B3	34,86	39,31	19,65	6,18				
P5B3	34,3	38,68	19,34	7,68	35,0 ($\pm 0,2$)	36,5 ($\pm 0,4$)	20,2 ($\pm 0,2$)	8,3 ($\pm 0,2$)
P6B3	33,75	38,06	19,03	9,17	33,9 ($\pm 0,05$)	37,3 ($\pm 0,4$)	18,9 ($\pm 0,2$)	9,9 ($\pm 0,2$)
C2	34,22	47,91	17,87		34,4 ($\pm 0,2$)	48 ($\pm 0,5$)	17,6 ($\pm 0,2$)	
P1C2	33,7	47,18	17,6	1,51	34,0 ($\pm 0,2$)	47,7 ($\pm 0,2$)	16 ($\pm 0,2$)	2,3 ($\pm 0,2$)
P3C2	32,68	45,75	17,07	4,49	32,7 ($\pm 0,2$)	45,85 ($\pm 0,4$)	16,9 ($\pm 0,2$)	4,6 ($\pm 0,2$)
P5C2	31,68	44,36	16,55	7,41	32,2 ($\pm 0,05$)	44,4 ($\pm 0,4$)	15,5 ($\pm 0,2$)	7,9 ($\pm 0,2$)
C1	31,23	51,3	17,47		33,1 ($\pm 0,4$)	49,7 ($\pm 0,4$)	17,2 ($\pm 0,3$)	
P1C1	30,76	50,54	17,21	1,48	29 ($\pm 0,4$)	53,5 ($\pm 0,3$)	16,2 ($\pm 0,5$)	1,3 ($\pm 0,3$)
P2C1	30,31	49,79	16,96	2,95	32,1 ($\pm 0,7$)	47,8 ($\pm 0,3$)	16,9 ($\pm 0,7$)	3,2 ($\pm 0,3$)
P3C1	29,85	49,05	16,7	4,4	29,9 ($\pm 0,3$)	48,7 ($\pm 0,4$)	16,9 ($\pm 0,2$)	4,5 ($\pm 0,1$)
P4C1	29,4	48,31	16,45	5,83	30,2 ($\pm 0,1$)	47,5 ($\pm 0,4$)	16,1 ($\pm 0,2$)	6,2 ($\pm 0,2$)

Tableau 3 : Compositions molaires atomiques nominales et expérimentales des verres (EDS)

III. 4. Détermination des températures caractéristiques des verres

Certains verres ont été analysés par Analyse Thermique Différentielle (ATD), afin de déterminer leurs températures caractéristiques. Les mesures ont été réalisées avec une cinétique de chauffe de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sur 30 mg de poudre de verre. La température de transition vitreuse (T_g) est obtenue sur la courbe, par un léger changement endothermique de la ligne de base, et la température de cristallisation (T_c) est déterminée par la position du pic exothermique de grande amplitude. Par exemple, l'ATD du verre P3C2 indique un T_g de 509°C , et un T_c de 650°C (Figure 9).

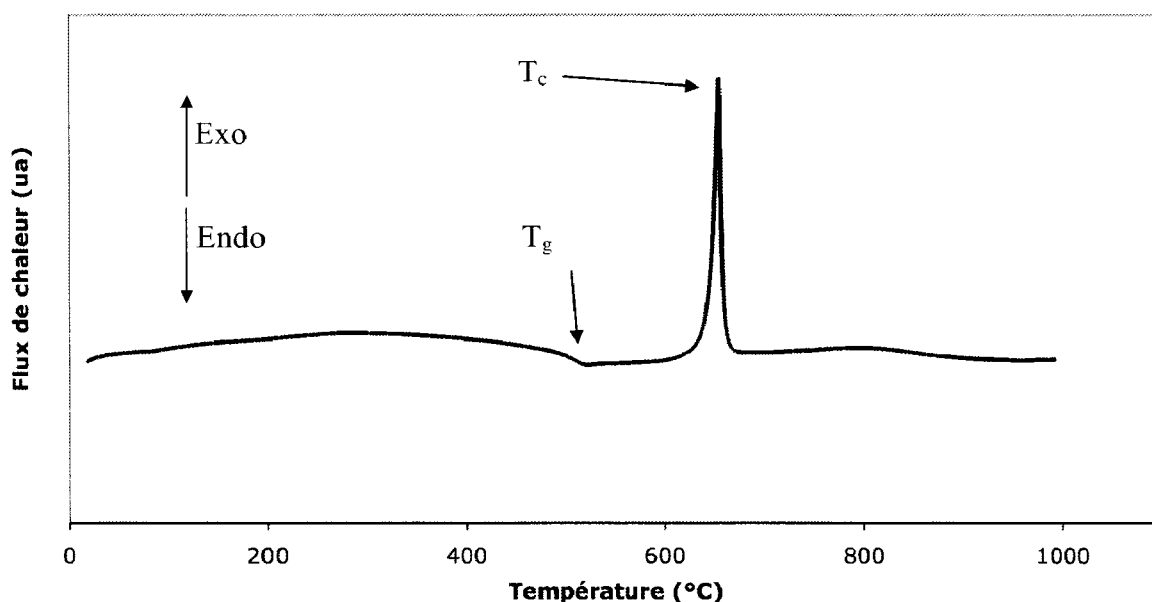


Figure 9 : ATD du verre P3C2 ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

Les ATD ont été réalisées sur une partie des verres synthétisés. Les résultats sont reportés dans le Tableau 4. Nous pouvons remarquer que d'une manière générale, l'ajout progressif de phosphore dans chaque série augmente la température de transition vitreuse.

Verre	T _g (°C)	T _c (°C)
B5	551	705
P1B5	562	730
P2B5	560	790
P3B5	555	800
B3	519	635
P1B3	526	680
P3B3	533	730
P5B3	530	680
C2	490	644
P3C2	509	654
P1C1	443	540
P2C1	478	585

Tableau 4 : Températures de transition vitreuses (T_g) et de cristallisation (T_c) caractéristiques des verres étudiés

IV. ANALYSES STRUCTURALES PAR RMN-MAS DES VERRES DES SERIES PzC1, PzC2, PzB3 ET PzB5

IV. 1. Conditions expérimentales des analyses RMN

Les analyses des verres par RMN-MAS du ^{29}Si et du ^{31}P ont été réalisées au Centre Commun de Mesure RMN de l'Université des Sciences et Techniques de Lille*. Le spectromètre utilisé est un Bruker Avance ASX 100, fonctionnant avec un champ magnétique de 2,35 Tesla, les fréquences de résonance ont été observées à 19,89 MHz pour la RMN du ^{29}Si et de 40,53 MHz pour le ^{31}P . Le temps de relaxation spin-réseau (T1) de l'isotope ^{29}Si étant relativement long, les verres synthétisés ont tous été dopés⁴ par 0,025 % molaire d'un élément paramagnétique Fe_2O_3 afin de réduire ce temps de relaxation. Le temps de relaxation longitudinal des verres (T1) n'a pas été mesuré, toutefois, la valeur du temps de recyclage (D1) a été optimisée. Les composés de références ainsi que les différents paramètres qui ont permis l'acquisition des spectres sont les suivants :

- RMN-MAS du ^{29}Si : le composé de référence est le TétraMéthylSilane (TMS). La rotation à l'angle magique a été effectuée avec une vitesse de 5 kHz. Le signal a été enregistré suite à une impulsion radiofréquence de 2,4 μs avec un angle d'impulsion de 30° et un temps de recyclage optimisé de 5s (D1). Le nombre d'acquisitions effectuées pour chaque spectre est de 2048.
- RMN-MAS du ^{31}P : le composé de référence est une solution à 85% H_3PO_4 . La rotation à l'angle magique a été effectuée avec une vitesse de 5 KHz. Le signal a été enregistré suite à une impulsion radiofréquence de 3 μs avec un angle d'impulsion de 45° et un temps de recyclage optimisé de 10s (D1). Les spectres ont été obtenus après un nombre d'acquisitions soit de 128, soit de 256.

Le nombre d'acquisitions est différent pour la RMN du ^{31}P et pour la RMN du ^{29}Si . Dans le cas de la RMN du ^{31}P , l'obtention des spectres nécessite moins d'acquisitions du fait de son

* Nous remercions Bertrand Revel du CCM de Lille 1, pour sa collaboration lors de cette étude.

abondance naturelle de 100% contrairement à celle du ^{29}Si qui est de 4,71%. Dans les deux cas, une fonction de lissage exponentielle a été appliquée pendant le traitement du signal par transformée de Fourier. Elle est de 30 Hz pour les spectres RMN-MAS du ^{29}Si et de 10 Hz pour les spectres RMN-MAS du ^{31}P . Les spectres obtenus ont ensuite été déconvolués par des pics de forme gaussienne en utilisant le logiciel DMFIT mis en place par D. Massiot¹⁶. Lors de l'évaluation des proportions des entités silicates (Q^n) et des phosphates présentes dans les verres, les bandes de résonance isotropes et les bandes de rotations ont été considérées.

IV. 2. Analyses structurales par RMN-MAS du ^{29}Si – Etude du réseau silicate

IV. 2. 1. Influence du taux de phosphore sur la structure des verres des séries PzC1 PzC2 PzB3 PzB5

IV. 2. 1. 1. Analyses qualitatives des spectres – Evolution du déplacement chimique isotrope des spectres en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres B5, B3, C1 et C2.

Les verres synthétisés, dont les compositions molaires sont précisées dans le Tableau 2 (p27), ont été analysés par RMN-MAS du ^{29}Si .

Pour les verres d'une même série, nous avons superposé les spectres afin d'observer l'évolution des entités silicates Q^n en fonction du taux de phosphore. (Figures 10 à 13).

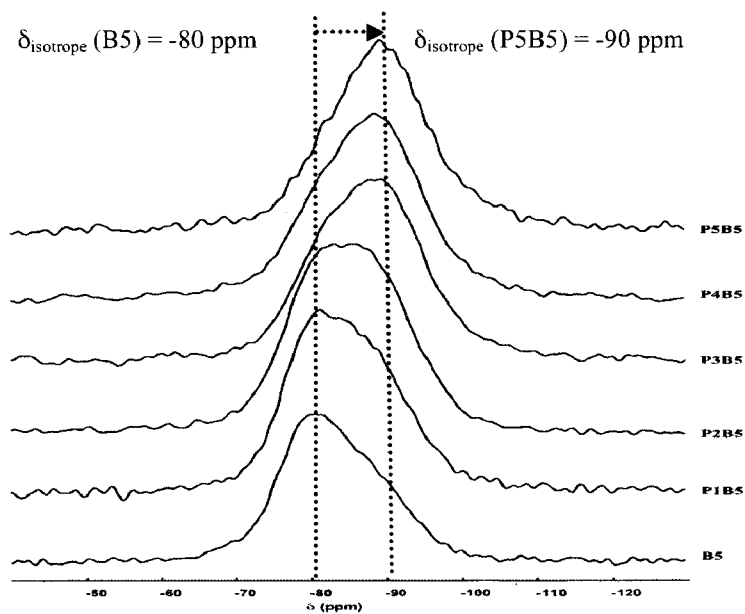


Figure 10 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si de la série PzB5
(B5 : 55 SiO_2 – 22,5 CaO – 22,5 Na_2O)

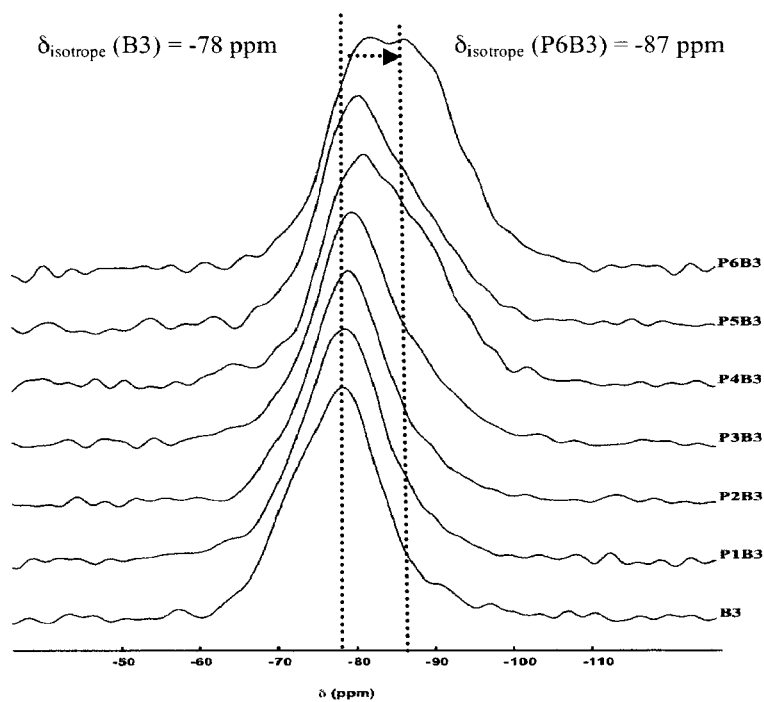


Figure 11 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si de la série PzB3
(B3 : 47 SiO_2 – 26,5 CaO – 26,5 Na_2O)

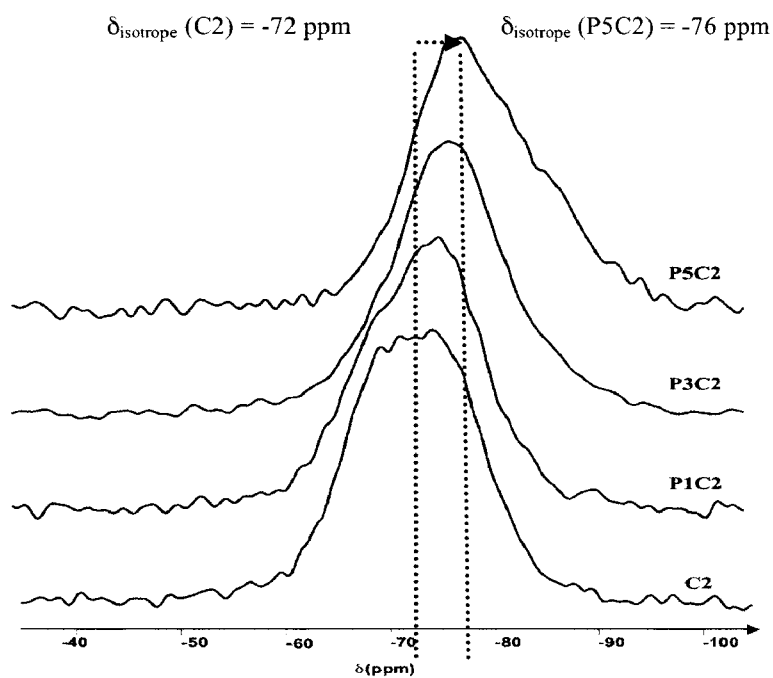


Figure 12 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si de la série PzC2
(C2 : 45 SiO_2 – 23,5 CaO – 31,5 Na_2O)

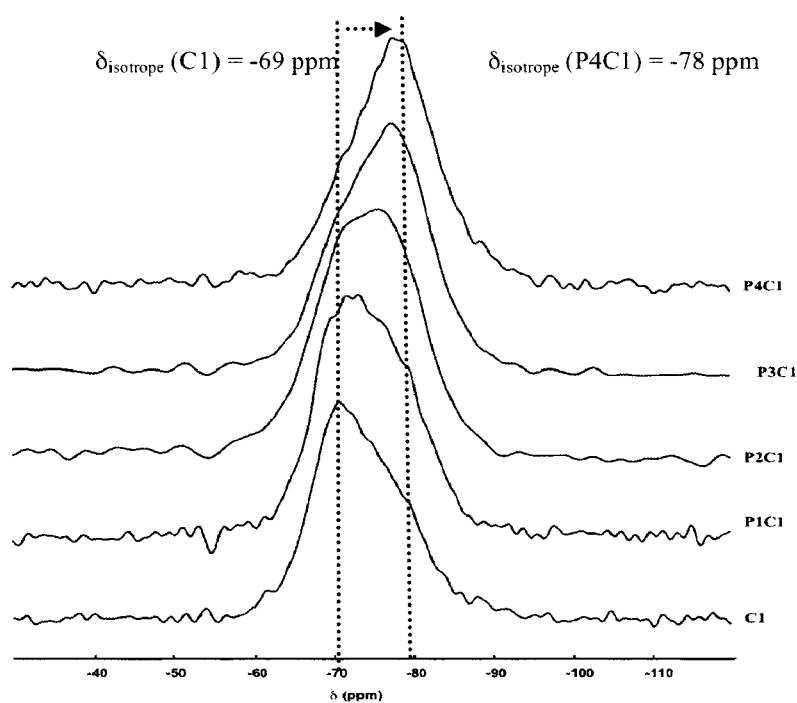


Figure 13 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si de la série PzC1
(C1 : 42 SiO_2 – 23,5 CaO – 34,5 Na_2O)

Premièrement, nous pouvons observer que tous les spectres sont très larges, puisque les largeurs à mi-hauteur sont d'environ 12-15 ppm. M. W. G. Lockyer et al.⁹ ont obtenu des spectres pour des verres du système (47,3-48,7) SiO_2 – (15,6-45,6) CaO – (4,6-33) Na_2O – 2,6 P_2O_5 (% molaire) ayant une largeur à mi-hauteur comprise entre 14,8 et 16,2 ppm. En effet, cet élargissement des spectres résulte du fait que la force du champ électrostatique (Z/a^2 , Z étant la charge du cation et a la distance inter-atomique oxygène – cation) du calcium est plus importante que pour celle du sodium. Cet élargissement de spectres a été également constaté par H. Grussaute et al.¹⁰

Deuxièmement, nous pouvons observer une forme asymétrique des spectres, signifiant l'existence d'au moins deux entités Q^n .

I. Elgayar et al.¹⁷ qui ont étudié la structure des verres 48,46 et 61 % SiO_2 avec un taux de P_2O_5 fixe (1,07 % molaire), ont obtenu également des spectres de résonance légèrement asymétriques avec une raie maximum allant de -79 à -89 ppm et des largeurs à mi-hauteur évoluant de 11 à 16 ppm.

En ce qui concerne la superposition des spectres (Figure 10 à Figure 13), l'ajout de P_2O_5 dans tous les verres entraîne une diminution du déplacement chimique isotrope du massif, sans modifier la base du spectre. L'ajout de phosphore modifie alors considérablement l'ordre à courte distance autour du silicium, démontrant ainsi la variation de l'état de condensation du réseau silicaté.

Cette diminution du déplacement chimique vers des valeurs caractéristiques d'entités silicates de plus en plus polymérisées indique ainsi que le réseau silicate se condense de plus en plus avec le taux de phosphore.

Enfin, nous pouvons remarquer l'absence de liaison $\text{Si} - \text{O} - \text{P}$ dans tous les spectres dont le déplacement chimique se situe entre -33 et -39 ppm¹⁸. Nous pouvons alors affirmer que le phosphore introduit dans nos verres ne se lie donc pas au réseau silicaté comme ont pu l'observer les auteurs M. W. G. Lockyer et al.⁷ et H. Grussaute et al.¹⁰.

IV. 2. 2. 2. Analyses quantitatives des spectres ; nature et pourcentages des entités silicates (Q^n) présentes dans le réseau vitreux

La décomposition de nos spectres a été réalisée à partir de plusieurs gaussiennes, dont la somme doit recouvrir au mieux le spectre initial. Le logiciel détermine alors le déplacement chimique de chaque gaussienne, sa largeur à mi-hauteur, et son aire. Ces données permettent ainsi d'accéder à la proportion d'entités Q^n constitutives du réseau vitreux. Rappelons que «n» est le nombre d'oxygènes pontants (Bridging Oxygens : BO) liés à l'élément étudié. La nomenclature des entités silicatés Q^n est décrite dans la partie bibliographie de ce chapitre I.

Deux exemples de décomposition des spectres des verres P1C1 et P4C1 sont représentés sur la figure 14, elles illustrent ainsi la répartition des proportions d'entités Q^n constitutives du réseau silicate. Pour ne pas surcharger ce chapitre, nous ne présentons que les décompositions des spectres des verres de chaque série avec le plus faible et le plus élevé taux de phosphore.

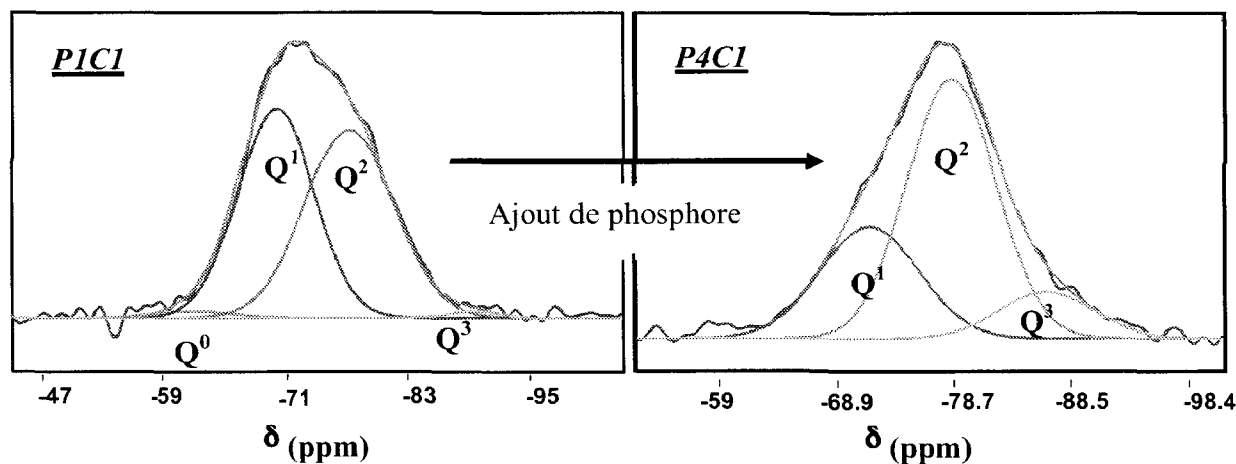


Figure 14 : Décompositions des spectres RMN-MAS du ^{29}Si des verres P1C1 et P4C1

La décomposition de ces deux spectres nous permet d'observer une présence majoritaire d'entités Q^1 et Q^2 pour le verre P1C1, ainsi qu'une présence très minoritaire, voire négligeable, d'entités Q^0 et Q^3 . Par contre, pour le verre P4C1, contenant 3 % molaire de

phosphore supplémentaire, nous observons une nette diminution des entités Q^1 , et inversement une augmentation des entités Q^2 et Q^3 constitutives du réseau silicate.

Les décompositions des spectres {P1B5 et P5B5} et {P1B3 et P6B3} sont représentées par les Figures 15 et 16, respectivement.

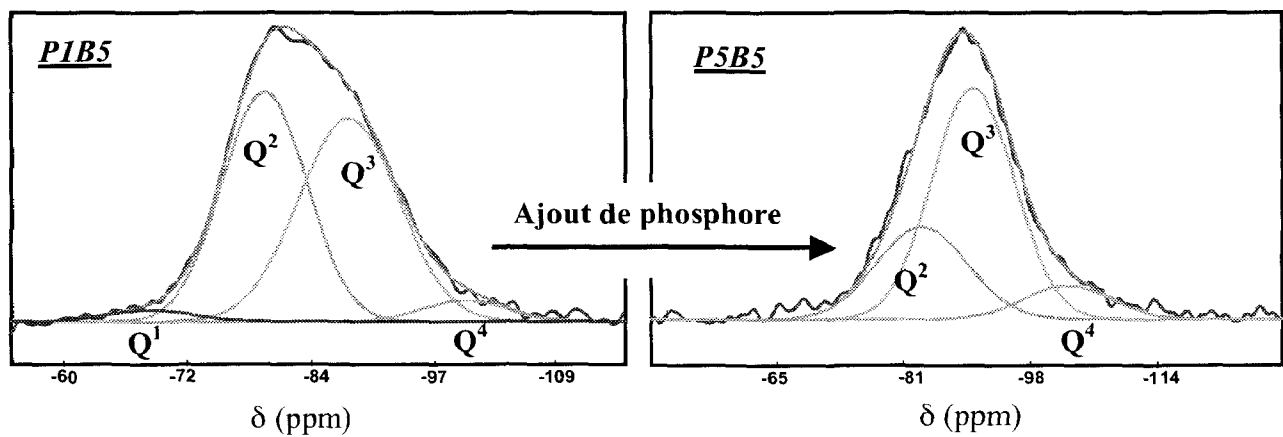


Figure 15 : Décomposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si des verres P1B5 et P5B5

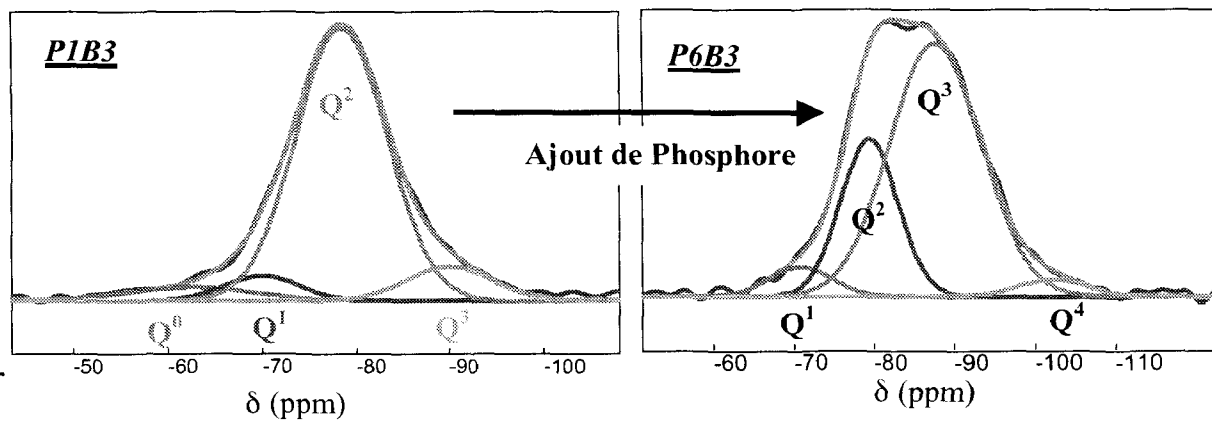


Figure 16 : Décomposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si des verres P1B3 et P6B3

Les verres des séries PzB5 et PzB3 sont majoritairement composés d'entités silicates Q^2 et Q^3 , et on peut observer que l'ajout de phosphore dans ces verres entraîne une diminution de la proportion des entités Q^2 en faveur de la proportion des entités Q^3 et Q^4 .

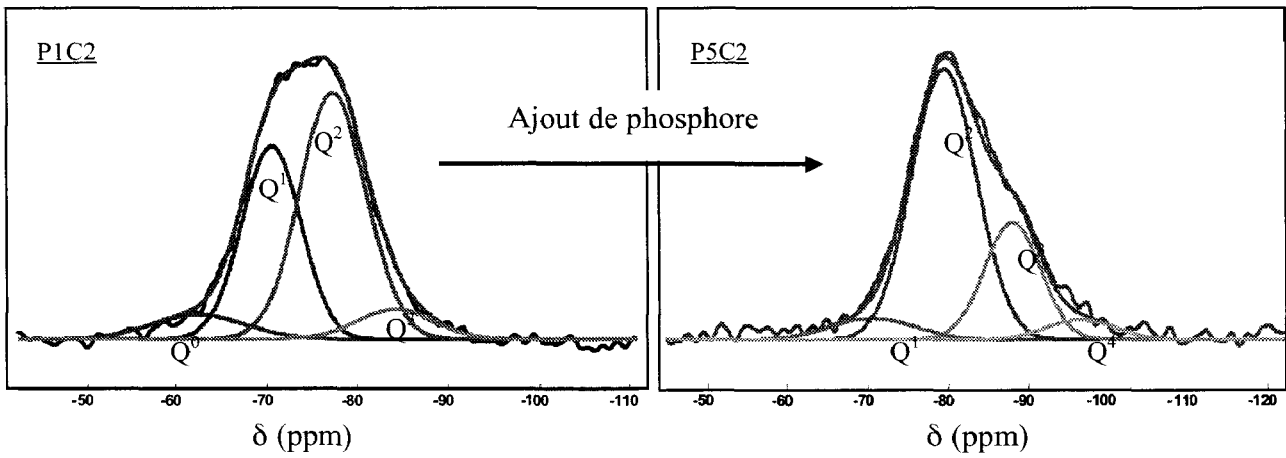


Figure 17 : Décomposition des spectres RMN-MAS du ^{29}Si des verres P1C2 et P5C2

Pour des faibles taux de phosphore, les verres des séries PzC1 et PzC2 sont composés essentiellement d'entités Q^1 et Q^2 . Pour des taux importants en phosphore, les verres sont composés essentiellement d'entités Q^2 et Q^3 .

Les résultats de toutes les décompositions des spectres de nos verres sont reportés dans le tableau 5. Nous avons également ajouté à ce tableau les valeurs de NBO/T calculées à partir des décompositions des spectres, elles seront analysées ultérieurement dans le chapitre (page 45).

Verre	δ isotope (ppm) (± 0.5)					Largeur à mi-hauteur (ppm) (± 0.5)					Pourcentage relatif (%)					NBO/T ^{29}Si RMN (± 0.05)
	Q ⁰	Q ¹	Q ²	Q ³	Q ⁴	Q ⁰	Q ¹	Q ²	Q ³	Q ⁴	Q ⁰ (± 1)	Q ¹ (± 1)	Q ² (± 5)	Q ³ (± 5)	Q ⁴ (± 1)	
B5		-69	-80	-88	-100		10	10	11	10		3	55	39	3	1,58
P1B5		-69	-79	-88	-100		9	11	11	10		2	46	48	4	1,46
P2B5		-69	-80	-89	-100		8	11	10	12		2	42	55	1	1,45
P3B5		-71	-83	-90	-99		11	10	12	12		2	43	45	10	1,37
P4B5		-70	-80	-89	-101			14	12	13		3	22	69	6	1,22
P5B5 *			-84	-90	-102								28	62	10	1,18
B3	-64	-70	-78	-90		9	10	11	10		2	16	74	7		2,11
P1B3	-64	-70	-78	-90		8	9	10	12		3	4	86	7		2,03
P2B3		-70	-79	-89	-99		9	11	12	10		6	77	16	1	1,88
P3B3		-70	-79	-89	-101		9	10	11	9		7	65	27	1	1,78
P4B3		-70	-79	-88	-99		10	12	11	8		3	53	41	3	1,56
P5B3		-69	-79	-87	-99		10	11	11	10		4	42	51	3	1,47
P6B3 *		-70	-79	-88	-103		9	10	10	10		2	28	68	2	1,3
C2	-62	-71	-78	-86							5	38	53	4		2,44
P1C2	-63	-71	-78	-87		9	9	8	8		5	25	60	10		2,35
P3C2	-64	-72	-79	-87		9	10	9	8		3	16	63	18		2,05
P5C2		-70	-80	-88	-97		7	10	10	10		4	64	29	3	1,69
C1	-63	-70	-77	-87		9					5	52	38	5		2,57
P1C1	-62	-70	-77	-89		9	9	10	6		2	47	50	1		2,5
P2C1	-62	-70	-77	-87		7	9	10	6		3	37	58	2		2,41
P3C1	-61	-71	-78	-85		9	9	9	9		2	34	56	8		2,3
P4C1 *		-72	-79	-86			10	9	9			29	60	11		2,18

Tableau 5 : Déplacements chimiques isotropes (δ), pourcentages relatifs des entités Qⁿ, et rapports NBO/T obtenus par RMN du ^{29}Si (* : verres opaques)

Nous observons ainsi qu'au sein de chaque série de verres, les déplacements chimiques des entités silicates Qⁿ ont tendance à diminuer, lorsque que le taux de phosphore augmente. En effet, nous avons constaté par la superposition des spectres d'une même série, que le déplacement chimique isotope diminuait lors de l'ajout de phosphore dans les verres. Les largeurs à mi-hauteur des résonances sont toutes comprises entre 6 et 14 ppm. Très peu d'auteurs ont réalisé la décomposition de leurs spectres ; il est alors difficile de comparer les largeurs à mi-hauteur de nos décompositions avec la bibliographie. En ce qui concerne les pourcentages relatifs des entités Qⁿ, nous observons que les séries PzB5 et PzB3 sont principalement composées d'entités silicates Q² et Q³, que la série PzC1 est principalement composée de Q¹ et de Q². Enfin, la série PzC2 se décompose en majorité de Q¹ et Q² pour un taux de phosphore inférieur à 3 % molaire, puis en une majorité de Q² et Q³, pour z = 5 % molaires.

IV. 2. 2. 3. Discussion

IV. 2. 2. 3. a. Mise en évidence des réactions de dismutation

Après avoir identifié les entités silicates de tous nos verres grâce aux déplacements chimiques, nous avons voulu savoir si ces derniers suivaient ou non une distribution binaire. Pour cela, nous avons calculé l'état de polymérisation Y (cf équation 2 page 9) pour chaque verre, et nous l'avons comparé à chaque valeur expérimentale. Ainsi, si nous prenons comme exemple le verre C1 (contenant 42 % molaire de SiO_2), le calcul de Y nous donne

$$Y = 6 - \frac{200}{42} = 1,2380$$

Cette valeur signifie alors que les espèces présentes dans le verre C1 sont, pour une distribution binaire : 23,8 % de Q^2 et 76,2 % de Q^1 . Or, on constate que le verre C1 contient 4 entités : Q^1 et Q^2 majoritaires, et, Q^0 et Q^3 minoritaires. La présence de Q^0 et Q^3 s'explique par l'existence de la réaction dite de dismutation de site : $2Q^n \Leftrightarrow Q^{n+1} + Q^{n-1}$. En effet dans le cas du verre C1 les espèces majoritaires Q^1 et Q^2 se dismutent de la manière suivante :

- Les Q^1 se dismutent en Q^0 et Q^2 selon la réaction suivante : $2Q^1 \Leftrightarrow Q^2 + Q^0$
- Les Q^2 se dismutent en Q^1 et Q^3 selon la réaction suivante : $2Q^2 \Leftrightarrow Q^3 + Q^1$

Le tableau 6 contient toutes les valeurs de Y qui représentent donc l'état de polymérisation du réseau silicate de nos verres.

H. Maekawa et al.⁴ ont observé également plusieurs entités silicates dans des verres $\text{SiO}_2 - \text{M}_2\text{O}$ contenant entre 20 et 56 % molaires de M_2O avec $M = \text{Li}, \text{Na}$ et K , par RMN du ^{29}Si .

Verre	Compositions molaires (%)				Pourcentages relatif expérimentaux (%)					Pourcentages relatifs pour une distribution binaire (%)					
	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	Q ⁰ (± 1)	Q ¹ (± 1)	Q ² (± 5)	Q ³ (± 5)	Q ⁴ (± 1)	Y	Q ⁰	Q ¹	Q ²	Q ³	Q ⁴
B5	55	22,5	22,5	0		3	55	39	3	2,36		64	36		
P1B5	54,45	22,275	22,275	1		2	46	48	4	2,33		67	33		
P2B5	53,9	22,05	22,05	2		2	42	55	1	2,29		71	29		
P3B5	53,35	21,825	21,825	3		2	43	45	10	2,25		75	25		
P4B5	52,8	21,6	21,6	4		3	22	69	6	2,21		79	21		
P5B5 *	52,25	21,375	21,375	5			28	62	10	2,17		83	17		
B3	47,0	26,5	26,5	0	2	16	74	7		1,74	26	74			
P1B3	46,530	26,235	26,235	1	3	4	86	7		1,70	30	70			
P2B3	46,06	25,97	25,97	2		6	77	16	1	1,66	34	66			
P3B3	45,59	25,705	25,705	3		7	65	27	1	1,61	39	61			
P4B3	45,12	25,44	25,44	4		3	53	41	3	1,57	43	57			
P5B3	44,65	25,175	25,175	5		4	42	51	3	1,52	48	52			
P6B3 *	44,18	24,91	24,91	6		2	28	68	2	1,47	53	47			
C2	45	23,5	31,5	0	5	38	53	4		1,56	44	56			
P1C2	44,55	23,265	31,185	1	5	25	60	10		1,51	49	51			
P3C2	43,65	22,795	30,555	3	3	16	63	18		1,42	58	42			
P5C2	42,75	22,325	29,925	5		4	64	29	3	1,32	68	32			
C1	42	23,5	34,5	0	5	52	38	5		1,24	76	24			
P1C1	41,58	23,265	34,155	1	2	47	50	1		1,19	81	19			
P2C1	41,16	23,03	33,81	2	3	37	58	2		1,14	86	14			
P3C1	40,74	22,795	33,465	3	2	34	56	8		1,09	91	9			
P4C1 *	40,32	22,56	33,12	4		29	60	11		1,04	96	4			

Tableau 6 : Pourcentages relatifs expérimentaux et obtenus dans le cas d'une distribution binaire, des entités Qⁿ constitutives du réseau silicate des verres PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1 (* : verre opalescent)

Ces réactions de dismutation ont été observées pour tous les verres étudiés puisque la plupart contiennent au moins 3 entités silicates.

Il en ressort de ce tableau que nos verres divergent donc d'une distribution binaire indépendamment du taux de silice et que cette divergence est d'autant plus importante que le taux de phosphore augmente.

IV. 2. 2. 3. b. Mise en évidence du rôle de P₂O₅ sur la polymérisation du réseau silicate, par l'évolution des pourcentages relatifs des entités silicates

La figure 18 reporte l'évolution des pourcentages des entités silicates Qⁿ pour les verres des séries PzB5 et PzB3.

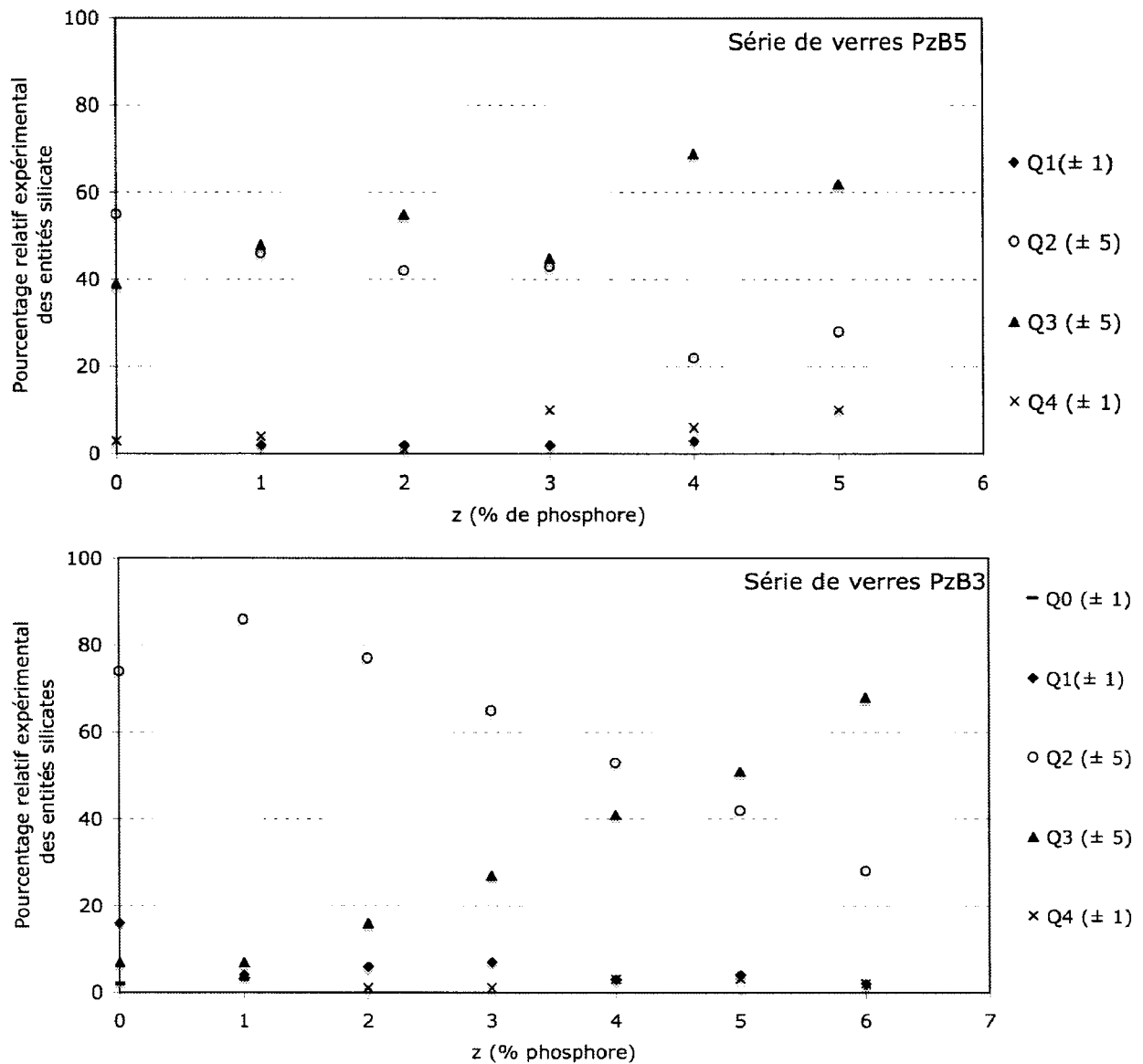


Figure 18 : Evolution des pourcentages relatifs des entités silicates des séries de verres PzB5 et PzB3 en fonction du taux de P_2O_5 introduit

Pour les séries PzB5 et PzB3, les entités silicates majoritaires sont Q^2 et Q^3 , et elles sont associées aux cations modificateurs Ca^{2+} et Na^+ . L'ajout de P_2O_5 dans les deux séries entraîne une modification structurale du réseau silicate. En effet il se forme de plus en plus de Q^3 et de moins en moins de Q^2 lorsque le taux de phosphore augmente, traduisant ainsi une polymérisation du réseau silicate.

Nous ferons remarquer que pour la série PzB3, les proportions d'entités Q^2 sont plus

importantes que les Q³, pour un même taux de P₂O₅ inférieur à 4,5 %. En effet, les verres issus de la série PzB3 étant moins riches en SiO₂, cela explique qu'à un même taux de P₂O₅, le réseau silicate soit moins condensé.

La figure 19 reporte l'évolution des pourcentages des entités silicates Qⁿ pour les verres des séries PzC1 et PzC2.

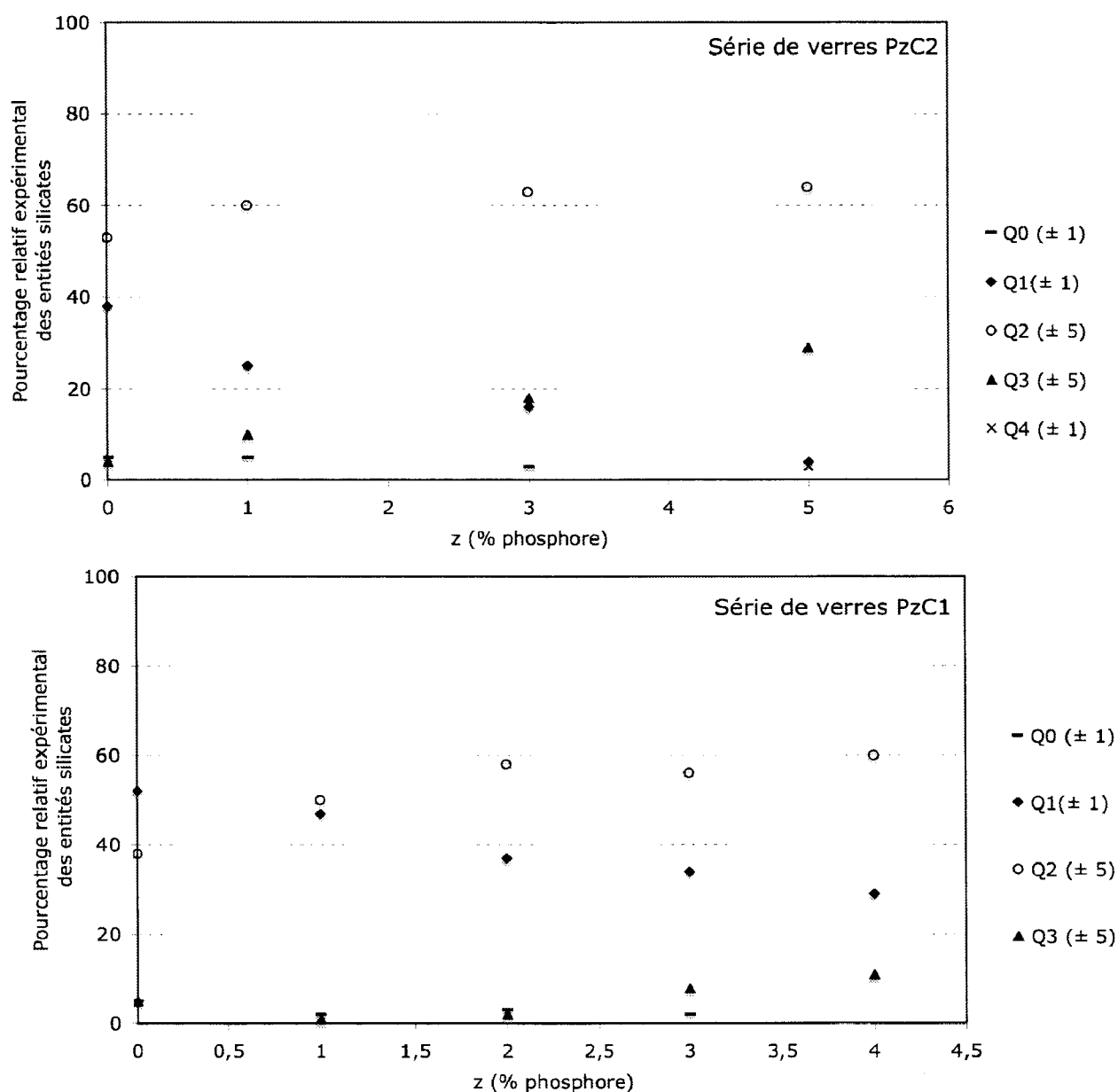


Figure 19 : Evolution des pourcentages relatifs des entités silicates des séries de verres PzC2 et PzC1 en fonction du taux de P₂O₅ introduit

Concernant la série PzC1, nous pouvons observer que les entités Q² augmentent avec le taux de phosphore et inversement pour les Q¹.

Concernant la série PzC2, le pourcentage des entités Q² et Q³ augmente avec le taux de phosphore.

Dans toutes les séries, l'ajout de P₂O₅ dans ces verres entraîne une diminution du pourcentage de l'entité Qⁿ ayant le « n » le plus petit, en faveur de l'entité Qⁿ correspond au « n » supérieur. Ces constatations confirment ainsi que le réseau silicate se condense par ajout de phosphore dans les verres.

IV. 2. 2. 3. c. Mise en évidence du rôle de P₂O₅ sur la polymérisation du réseau silicate, par le calcul des rapports NBO/T

Afin de confirmer effectivement que le réseau se condense par l'ajout de P₂O₅ dans les verres, nous avons calculé le rapport NBO/T, en utilisant les données de la RMN du ²⁹Si (Tableau 5). En effet, l'état de polymérisation peut être déterminé¹⁰ à partir des proportions des entités silicates constitutives du réseau, obtenues par la RMN du ²⁹Si. Pour cela, le rapport du nombre d'oxygènes non pontants par tétraèdre expérimental a été calculé grâce à l'équation 3.

$$\left(\frac{NBO}{T}\right)_{29Si} = \sum (Q^n) * \left(\frac{NBO}{T}\right)_n \quad (\text{Équation 4})$$

avec $\frac{NBO}{T} = 0$ pour les Q⁴ ; $\frac{NBO}{T} = 1$ pour les Q³ ; $\frac{NBO}{T} = 2$ pour les Q² ; $\frac{NBO}{T} = 3$ pour les Q¹ et $\frac{NBO}{T} = 4$ pour les Q⁰, avec Qⁿ représentant la fraction de chaque entité silicate obtenue en RMN du ²⁹Si.

Par exemple, si nous prenons le verre P3B3, la décomposition des spectres RMN du ²⁹Si a donné comme résultat 4 entités silicates dont les proportions sont : 7%Q¹, 65%Q², 27%Q³ et 1%Q⁴. Le calcul de NBO/T se fait donc de la manière suivante : $0 * 4 + 0,07 * 3 + 0,65 * 2 + 0,27 * 1 + 0,01 * 0 = 1,78$.

Le calcul de NBO/T a été réalisé pour l'ensemble de nos verres (Tableau 5, page 40). Nous

avons représenté l'évolution de ce rapport NBO/T en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres des séries étudiées (Figure 20).

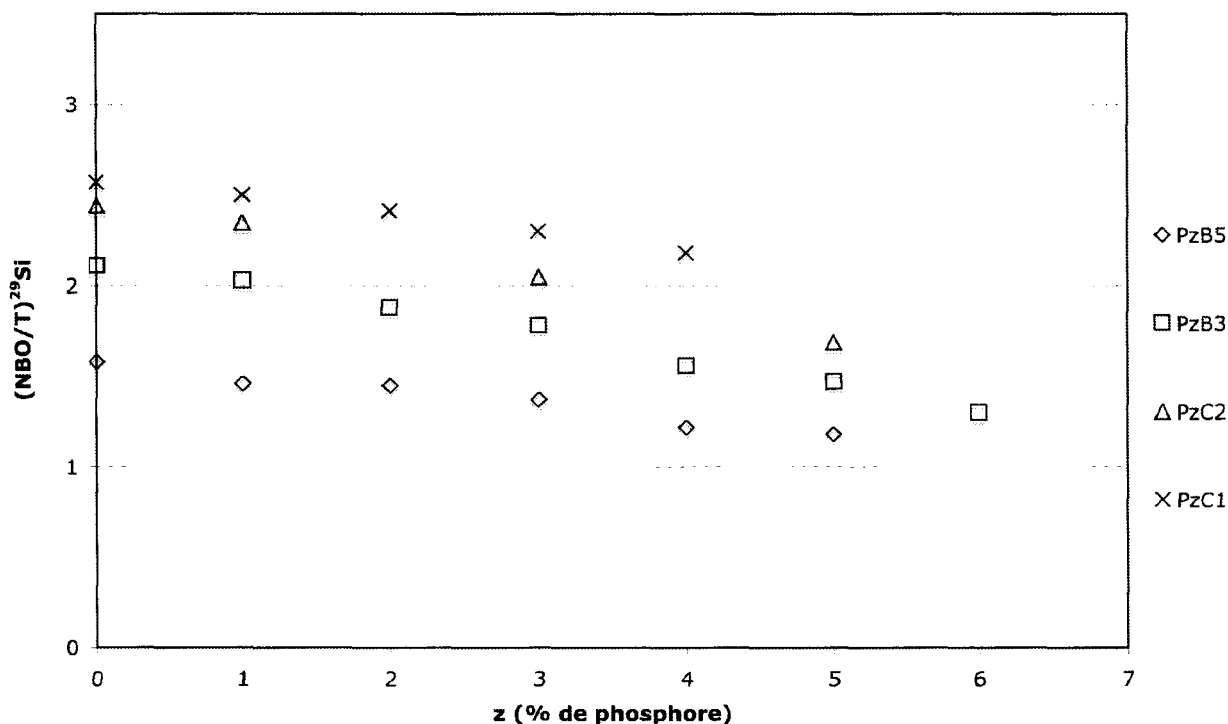


Figure 20 : Evolution du rapport NBO/T obtenu à partir des données de la RMN du ^{29}Si , en fonction du taux de P_2O_5 introduit dans les verres étudiés.

Nous constatons que pour chaque série de verres, le rapport NBO/T diminue lorsque P_2O_5 , augmente, traduisant ainsi une fois de plus, une polymérisation du réseau silicate.

Nous avons donc mis en évidence, que l'augmentation du taux de P_2O_5 dans les verres étudiés entraînait :

- une diminution du déplacement chimique isotrope des spectres RMN du ^{29}Si ,
- une diminution des pourcentages relatifs des entités silicates Q^n ayant les « n » les plus petits, en faveur d'entités Q^n correspond à des « n » supérieurs,
- une diminution du rapport NBO/T obtenu avec les données de la RMN du ^{29}Si .

Ces constatations traduisent ainsi une polymérisation du réseau silicate, lors de ces faibles ajouts de P_2O_5 (1 à 6% molaires). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'environnement chimique de ces entités silicates présentes dans le réseau, afin de déterminer si elles

s'associent préférentiellement aux ions calcium ou aux ions sodium, ou aux deux.

IV. 2. 2. 3. d. Mise en évidence de l'environnement chimique des entités silicates

Afin d'identifier exactement les entités Q^n de nos verres, nous avons reporté dans le tableau 7 les déplacements chimiques de différentes entités Q^n dans des verres de système binaire $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O}$ et $\text{SiO}_2 - \text{CaO}$, et dans des silicates cristallisés issus de la bibliographie.

verre	Déplacement chimique des entités silicates recensés dans la littérature					Références auteurs
	Q^0 (ppm)	Q^1 (ppm)	Q^2 (ppm)	Q^3 (ppm)	Q^4 (ppm)	
50 $\text{CaO} - 50 \text{SiO}_2$			$Q^2(\text{Ca}) = -82,6$	$Q^3(\text{Ca}) = -91,8$		J. Schneider et al. ¹⁹
55 $\text{Na}_2\text{O} - 45 \text{SiO}_2$			$Q^2(\text{Na}) = -76,5$	$Q^3(\text{Na}) = -86$		
55,6 $\text{Na}_2\text{O} - 44,4 \text{SiO}_2$		$Q^1(\text{Na}) = -66,7$	$Q^2(\text{Na}) = -75,5$	$Q^3(\text{Na}) = -85$		H. Maekawa et al. ²⁰
50 $\text{Na}_2\text{O} - 50 \text{SiO}_2$			$Q^2(\text{Na}) = -76$			R. Duprec ³
50 $\text{Na}_2\text{O} - 50 \text{SiO}_2$		$Q^1(\text{Na}) = -67,4$	$Q^2(\text{Na}) = -76$	$Q^3(\text{Na}) = -84,8$		H. Maekawa et al. ²⁰
60 $\text{Na}_2\text{O} - 40 \text{SiO}_2$		$Q^1(\text{Na}) = -67$	$Q^2(\text{Na}) = -76$			A. R. Grimmer et al. ²¹
$\text{Ca}_3\text{Si}_2\text{O}_7$ (cristallisé)		$Q^1(\text{Ca}) = -74,5 \text{ à } -76$				
50 $\text{SiO}_2 - 50 \text{CaO}$	$Q^0(\text{Ca}) = -70$				$Q^4(\text{Ca}) = -110$	M. W. G. Lockyer ²⁶
	$Q^0(\text{Na}) = -65$			$Q^3(\text{Na}) = -89$		
33,33 $\text{Na}_2\text{O} - 66,7 \text{SiO}_2$				$Q^3(\text{Na}) = -90$		R. Duprec ³
SiO_2					$Q^4 = -108,8$	R. Duprec ³
SiO_2 cristallisée					$Q^4 = -107,4$	A. R. Grimmer et al. ²¹

Tableau 7 : Recensement non-exhaustif des déplacements chimiques des entités silicates rencontrées dans la bibliographie³⁻⁷⁻⁹⁻¹⁹⁻²⁰⁻²¹

Afin de mettre en évidence une association préférentielle ou non des entités silicates avec les Ca^{2+} ou les Na^+ , nous avons comparé nos valeurs de déplacement chimique aux données de la bibliographie du Tableau 7 (lignes représentées en pointillés sur les figures 21 et 22). Ainsi pour chaque série, nous avons représenté l'évolution des déplacements chimiques de chaque entité Q^n , obtenue par la décomposition de nos spectres, en fonction du taux de phosphore

introduit dans les verres (Figures 21 et 22).

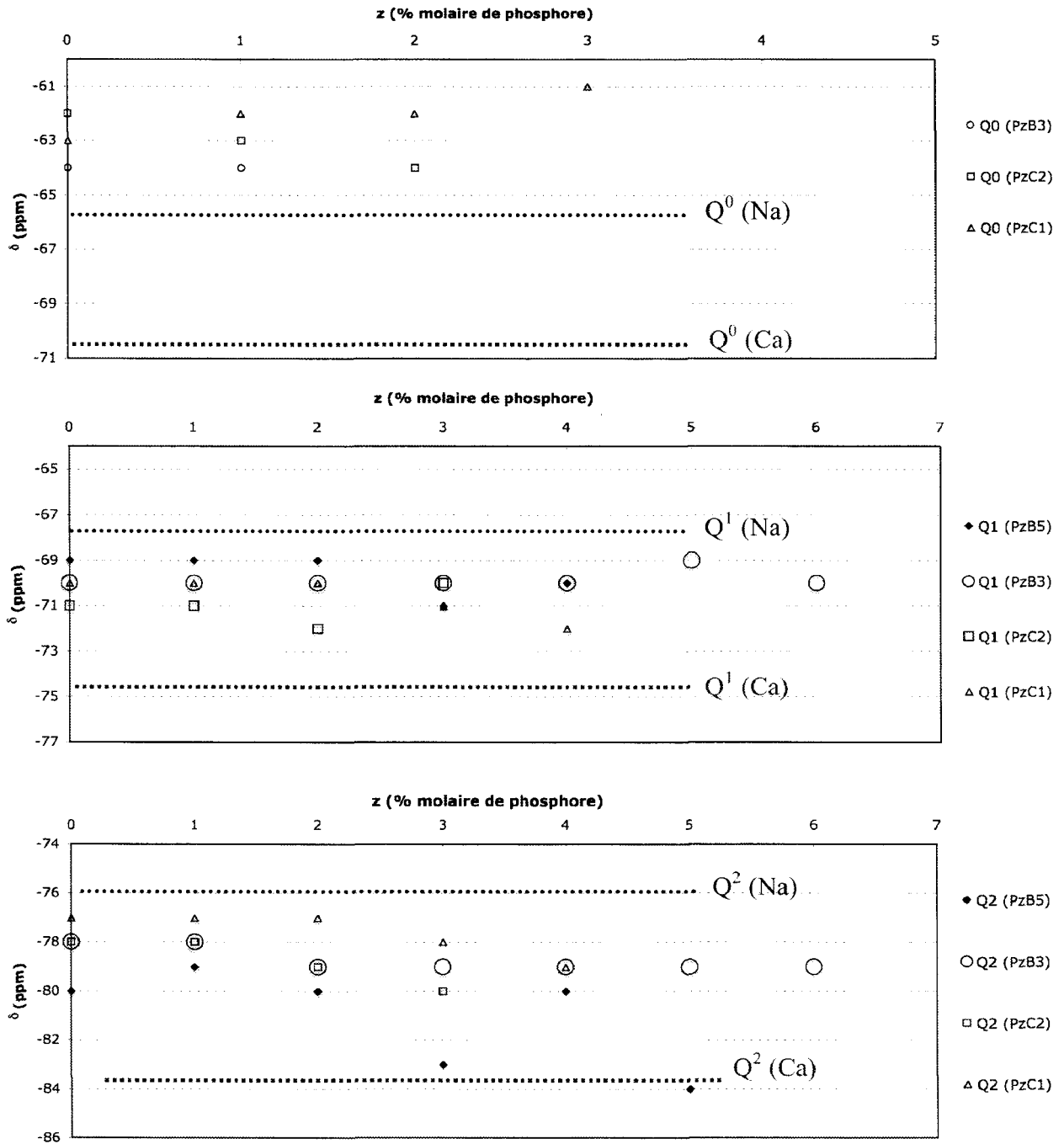


Figure 21 : Evolution du déplacement chimique des entités Q^0 , Q^1 et Q^2 en fonction du taux de P_2O_5 (z%) introduit dans les verres des séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1. ($\Delta\delta = 1$ ppm)

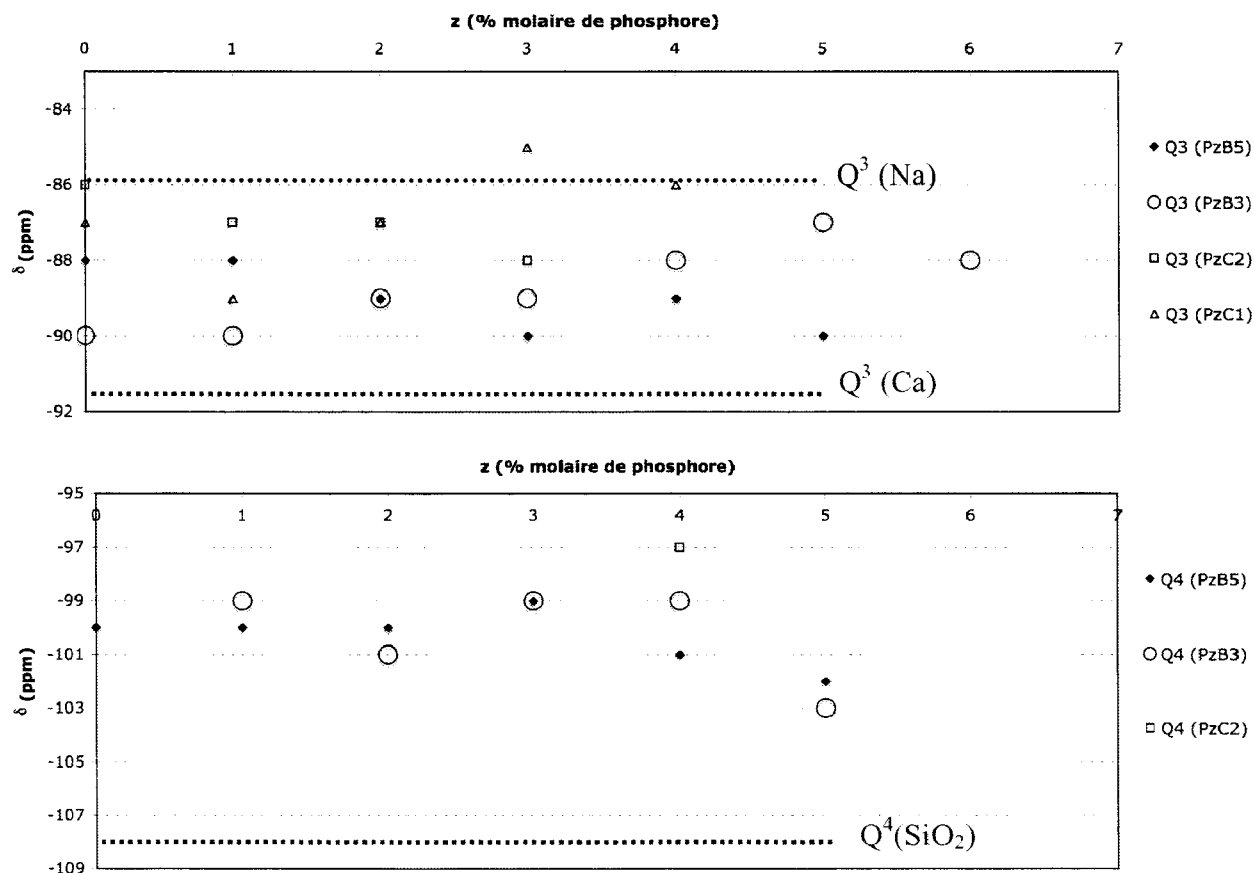


Figure 22 : Evolution du déplacement chimique des entités Q^2 , Q^3 et Q^4 en fonction du taux de P_2O_5 (z%) introduit dans les verres des séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1. ($\Delta\delta = 1$ ppm)

Pour toutes les séries des verres, nous constatons que les déplacements chimiques des entités silicates sont situés entre ceux des $Q^n(\text{Ca})$ et des $Q^n(\text{Na})$ pour $n = 1, 2$ et 3 . Ces entités ont donc des environnements chimiques mixtes en calcium et sodium. L'évolution des déplacements chimiques des entités silicates constatée suite à l'ajout de phosphore, signifie alors que leur environnement chimique est modifié.

Pour certains verres, nous noterons que les déplacements chimiques des entités Q^0 sont proches d'un $Q^0(\text{Na})$, indiquant ainsi la présence d'orthosilicate de sodium (Na_2SiO_4).

Quant aux Q^4 , nos valeurs de déplacements chimiques tendent vers celle de la silice pure, indiquant ainsi dans nos verres des zones très riches en celle-ci.

Toutefois, nous remarquerons que toutes les variations des déplacements chimiques observées ne sont pas linéaires, et qu'il est alors délicat d'affirmer l'existence d'une préférence des

cations Na^+ et Ca^{2+} à s'associer à un type d'entité lorsque le pourcentage de phosphore augmente.

Nous pouvons ainsi affirmer seulement que les entités silicates majoritaires constitutives du réseau silicate des séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1 ont donc des environnements mixtes en Ca^{2+} et Na^+ avec toutefois une modification de leur environnement chimique lorsqu'on augmente le taux de phosphore.

IV. 2. 3. Conclusion

Les spectres obtenus par RMN du ^{29}Si sont complexes pour tous les verres, car certains contiennent jusqu'à quatre entités Q^n en raison de réaction de dismutation de site. Les verres sont très dépolymérisés et ont des structures essentiellement composées de Q^3 et Q^2 pour les verres des séries PzB5 et PzB3, de Q^3 et Q^2 puis de Q^2 et Q^1 selon le taux de phosphore introduit pour les verres de la série PzC2, et de Q^2 et Q^1 pour les verres de la série PzC1. L'ensemble de la structure des verres PzB5 et PzB3 est en accord avec ceux étudiés par M. W. G. Lockyer et al.⁹ et I. Elgayar et al.¹⁷. Par contre, pour les verres PzC1, contenant 42 % molaire de SiO_2 , les comparaisons avec la bibliographie sont difficiles étant donné qu'il existe peu de données structurales sur des verres ayant des faibles taux en silice. En conclusion, à cette étude par RMN-MAS du ^{29}Si , l'ajout de faibles quantités de P_2O_5 dans tous les verres étudiés entraîne une variation du déplacement chimique des espèces silicates, qui traduit donc une modification de leur environnement chimique. Leurs proportions étant également modifiées par ajout de phosphore, en formant davantage d'entités Q^n avec un « n » élevé, signifie ainsi que le réseau silicate se condense. Dans tous les verres, les entités silicates Q^n sont globalement associées aux deux cations modificateurs Ca^{2+} et Na^+ .

IV. 3. Analyses structurales par RMN-MAS du ^{31}P – Etude des entités phosphates

L'étude de la structure des verres des séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1 par RMN du ^{29}Si , a montré que l'ajout de faibles quantités de P_2O_5 (inférieures à 6 % molaire), entraînait une modification structurale du réseau silicate, ainsi que sa polymérisation. L'analyse structurale par RMN du ^{31}P nous a permis de déterminer sous quelle(s) forme(s) se présente le phosphore dans le réseau silicate. Pour cela, chaque verre a été analysé par RMN-MAS du ^{31}P , d'après les conditions opératoires citées précédemment (p 32).

IV. 3. 1. Analyse qualitative, évolution du déplacement chimique isotrope des spectres en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres B5, B3, C2 et C1.

Pour chaque série de verres, les spectres ont été superposés afin de suivre l'évolution du déplacement chimique isotrope en fonction du taux de phosphore dans le verre (Figures 23 à 26).

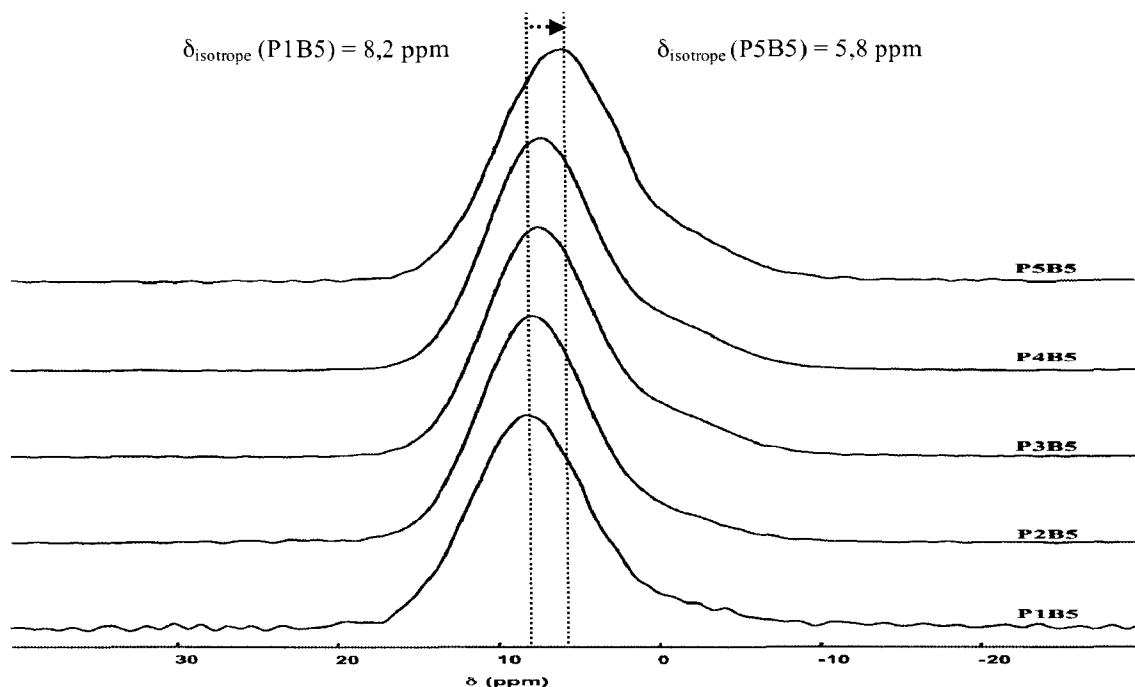


Figure 23 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{31}P de la série PzB5.
 B5 : 55 SiO_2 – 22,5 CaO – 22,5 Na_2O (% molaire)

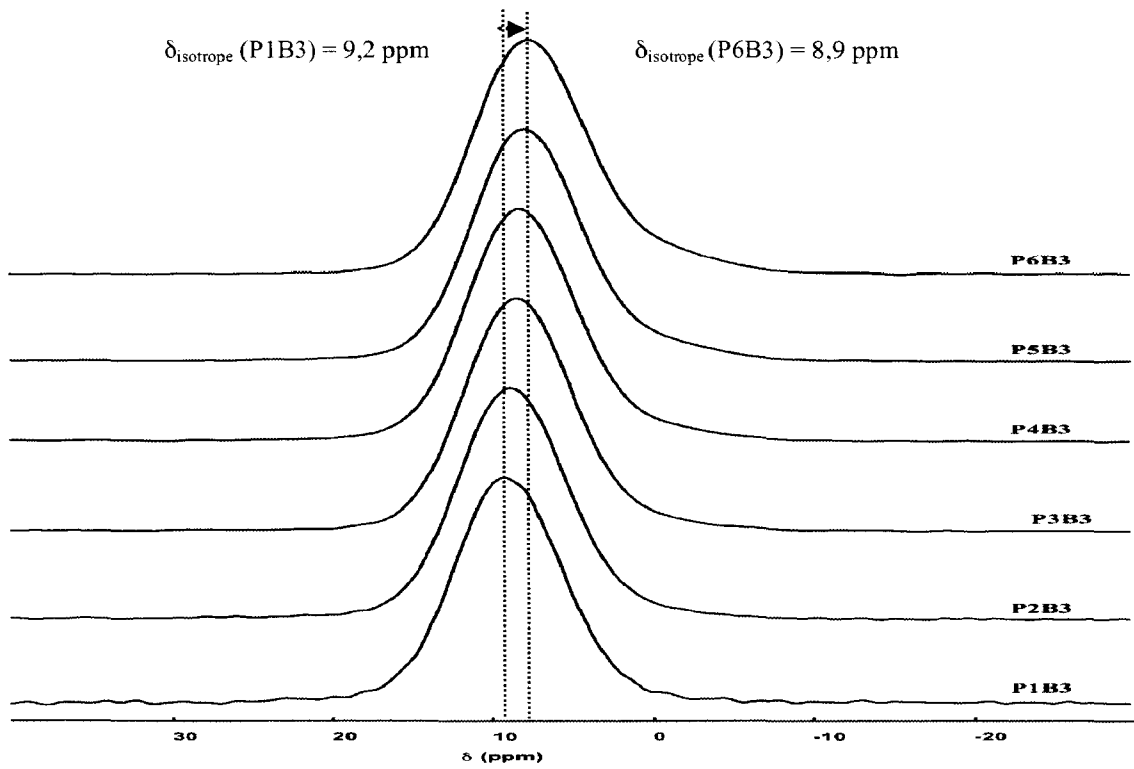


Figure 24 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{31}P de la série PzB3
 B3 : 47 SiO_2 – 26,5 CaO – 26,5 Na_2O (% molaire)

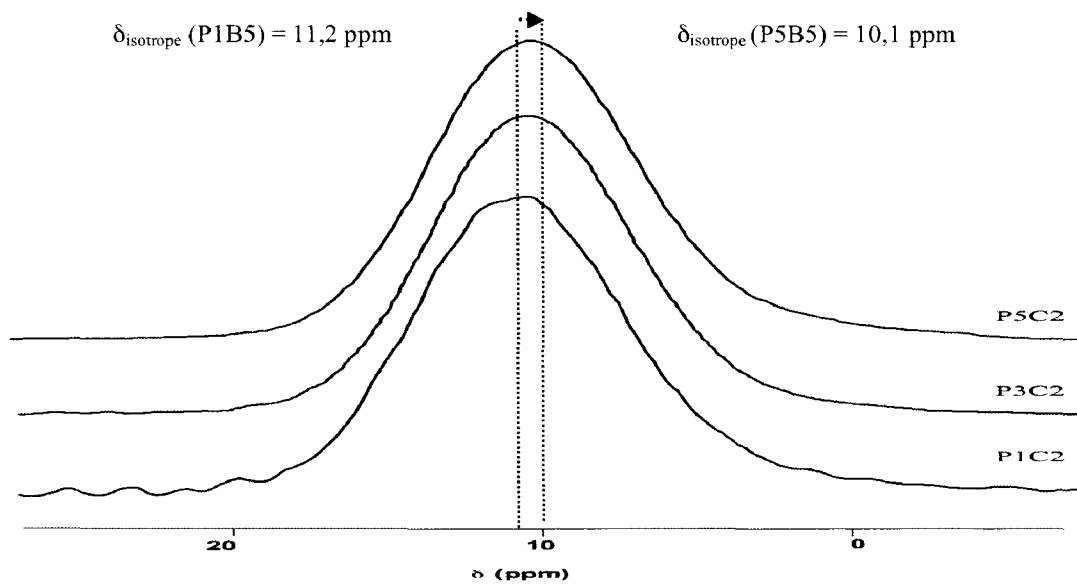


Figure 25 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{31}P de la série PzC2
 C2 : 45 SiO_2 – 23,5 CaO – 31,5 Na_2O (% molaire)

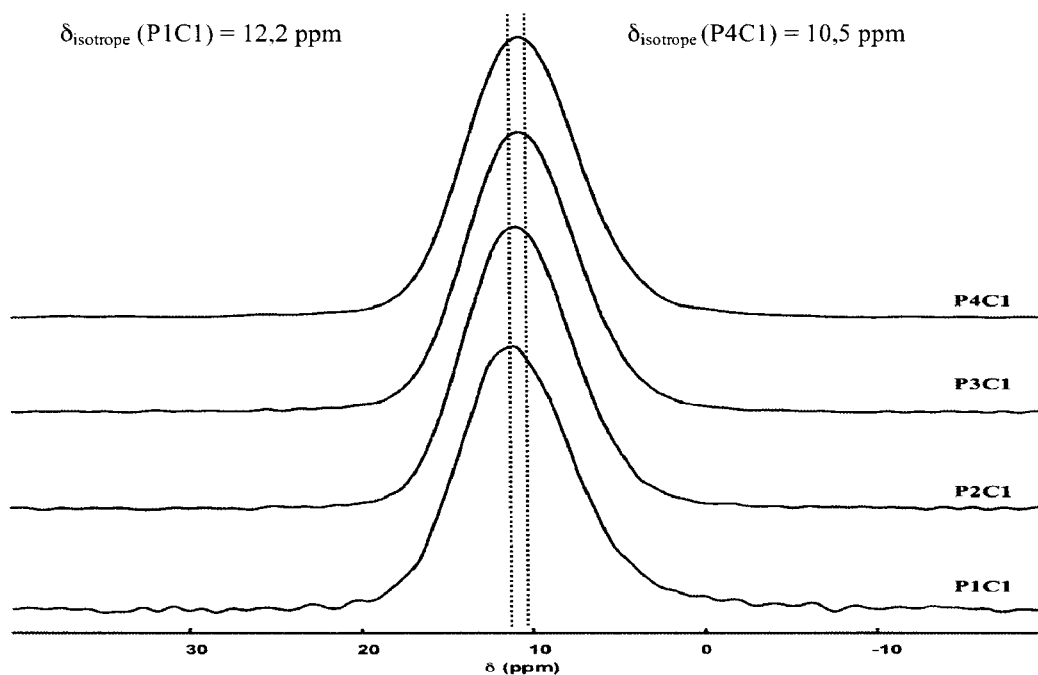


Figure 26 : Superposition des spectres RMN-MAS du ^{31}P de la série PzC1
 C1 : 42 SiO_2 – 23,5 CaO – 34,5 Na_2O (% molaire)

Les spectres obtenus par RMN du ^{31}P ont tous une largeur à mi-hauteur proche de 9 ppm. Ces largeurs à mi-hauteur sont proches des valeurs observées par I. Elgayar et al.¹⁷ sur des verres de compositions molaires 49,46 SiO_2 – 1,07 P_2O_5 – 23,08 à 49,46 CaO – 26,38 à 0 Na_2O , c'est-à-dire de 7,8 ppm. L'observation des superpositions des spectres pour chaque série montre que l'ajout de phosphore entraîne une diminution du déplacement chimique isotrope du massif, signifiant ainsi qu'au sein d'une même série, le phosphore modifie la nature chimique des entités phosphate.

En effet, la variation en déplacement chimique observé est significative (de l'ordre de 1 ppm), elle est ainsi nettement supérieure à l'incertitude de la position des raies ($\pm 0,05$ ppm). De plus, chaque spectre présente une faible asymétrie vers les plus basses fréquences, indiquant l'existence d'au moins deux entités phosphates. Ces spectres ont alors été décomposés afin d'accéder à la nature chimique et à la proportion de ces entités phosphates.

IV. 3. 2. Analyse quantitative ; détermination de la nature chimique et du pourcentage des entités phosphates présentes dans les verres

Afin d'identifier la nature chimique des espèces phosphates présentes dans nos verres, nous avons rassemblé des déplacements chimiques isotropes de phosphates cristallisés issus de la bibliographie (Tableau 8), et nous avons ensuite comparé nos valeurs avec celles issues du tableau 8. Comme pour la RMN du Silicium, nous avons présenté les décompositions des spectres des verres dopés avec le plus faible et le plus élevé taux de phosphore.

Entité phosphate cristallisée		δ (ppm)	Références auteurs
orthophosphate de sodium	Na_3PO_4	14,1	G.D Cody et al. ²²
pyrophosphate de calcium	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	-7	A. R. Grimmer et al. ²³
orthophosphate de calcium	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,4	P. Hartmann et al. ²⁴
pyrophosphate de sodium	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	2	G.D Cody et al. ²²

Tableau 8 : Déplacements chimiques des orthophosphates et pyrophosphates (Na et Ca) cristallisés d'après la littérature²²⁻²³⁻²⁴

IV. 3. 2. 1. Nature chimique des entités phosphates de la série PzB5

La Figure 27 représente la décomposition des spectres obtenus par RMN du ^{31}P , des verres de la série PzB5.

La décomposition du spectre obtenu pour le verre P1B5, montre l'existence de deux raies correspondant à deux entités phosphates. La première raie a un déplacement chimique à 8,2 ppm et la seconde à -1 ppm.

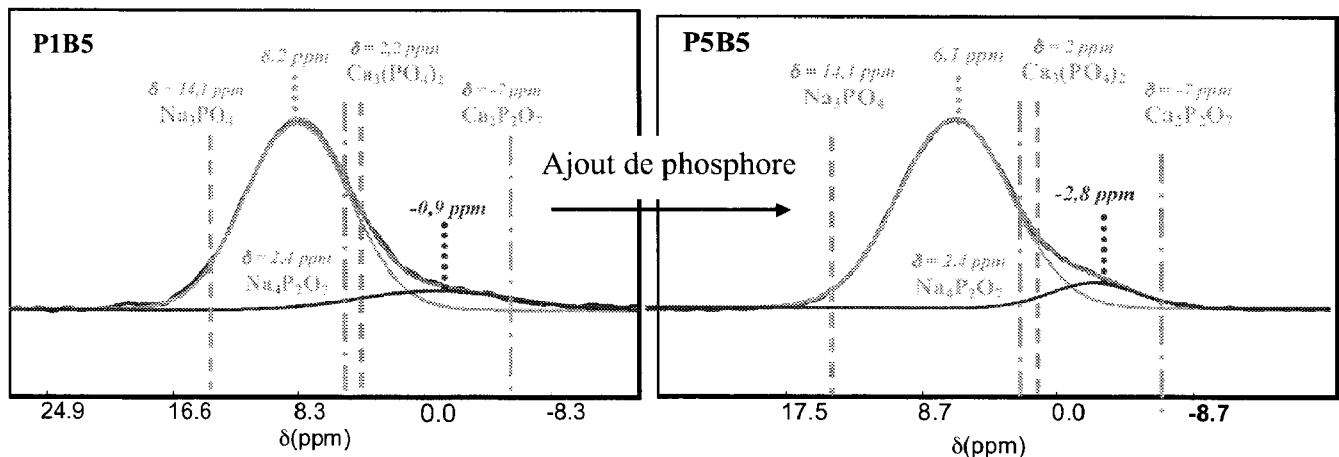


Figure 27 : Décomposition des spectres RMN du ^{31}P des verres P1B5 et P5B5

Le premier déplacement chimique (8,2 ppm) est majoritaire et se situe entre le déplacement chimique de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cristallisé (2,4 ppm) et celui de Na_3PO_4 cristallisé (14,1 ppm). Le phosphore se présente ainsi dans le réseau silicate, sous la forme de complexe orthophosphate, avec un environnement mixte en calcium et sodium.

Le second déplacement chimique se situe entre les pics caractéristiques des $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ et $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ cristallisés, dont les déplacements chimiques sont respectivement 2 ppm et -7 ppm. Il existe ainsi des complexes de pyrophosphates mixtes de calcium et de sodium dans le réseau silicate de ce verre, dont les proportions sont minoritaires.

De la même manière, la décomposition du spectre du verre P5B5 fait apparaître deux raies dont les déplacements chimiques sont 6,2 ppm et -2,9 ppm, et sont associés respectivement à la présence d'orthophosphates et de pyrophosphates.

Toutefois, nous pouvons constater que le déplacement chimique de l'orthophosphate présent dans le verre P5B5 est plus proche de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cristallisé, que pour le verre P1B5. L'ajout progressif de P_2O_5 dans le verre engendre donc un enrichissement en calcium des complexes phosphates mixtes en calcium.

Pour les taux intermédiaires en phosphore, nous avons reporté les résultats des décompositions dans le Tableau 9 page 57.

**IV. 3. 2. 2. Nature chimique entités phosphates des séries de verres
PzB3, PzC2 et PzC1**

Les décompositions des spectres des séries de verres PzB3, PzC2 et PzC1, en fonction du taux de phosphore sont représentées sur les Figures 28 à 30.

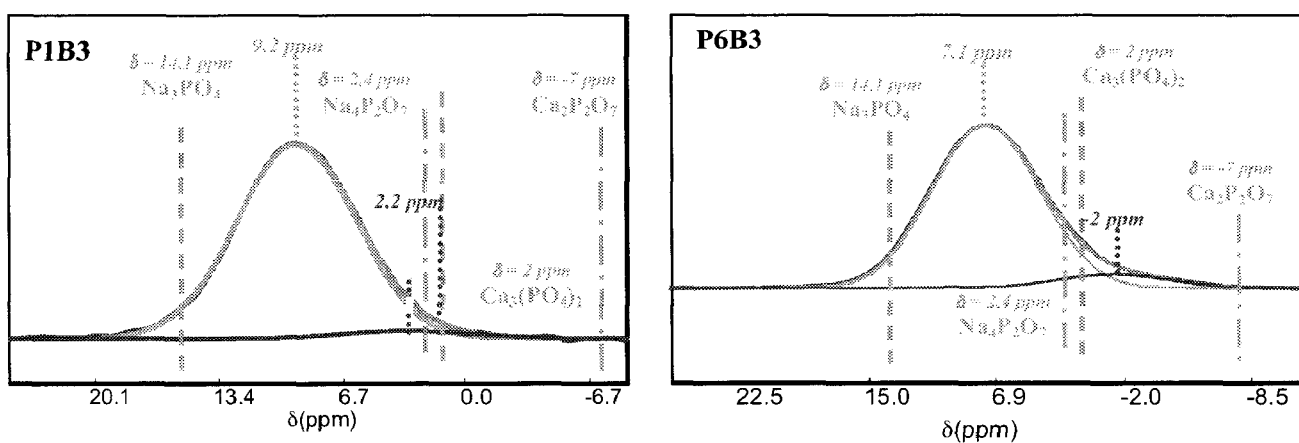


Figure 28 : Décompositions des spectres RMN du ³¹P des verres P1B3 et P6B3

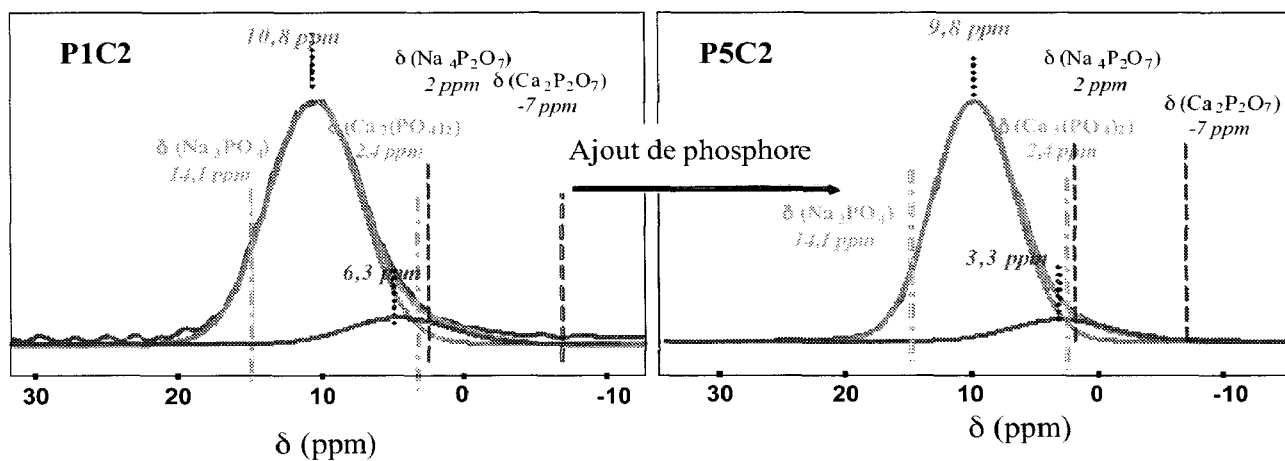


Figure 29 : Décompositions des spectres RMN du ³¹P des verres P1C2 et P5C2

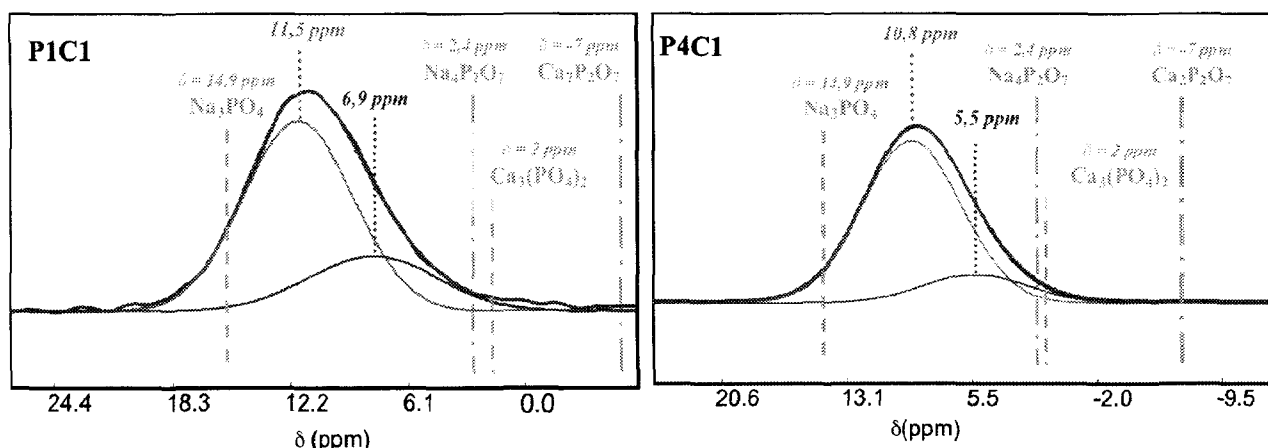


Figure 30 : Décompositions des spectres RMN du ³¹P des verres P1C1 et P4C1

Les décompositions des spectres RMN du ³¹P des verres des séries PzB3, PzC2 et PzC1 font apparaître deux raies de résonance. Les déplacements chimiques des entités phosphates, ainsi que leurs pourcentages relatifs, sont regroupés dans le Tableau 9.

Verre	δ isotrope (ppm)		largeur à mi-hauteur (ppm)		pourcentage relatif (%) (±1)		NBO / T ³¹ P RMN (± 0.02)
	(± 0,05) PO ₄ ³⁻	(± 0,2) P ₂ O ₇ ⁴⁻	(± 0,1) PO ₄ ³⁻	(± 0,2) P ₂ O ₇ ⁴⁻	PO ₄ ³⁻	P ₂ O ₇ ⁴⁻	
P1B5	8,2	-0,9	8,3	9,4	91	9	1,45
P2B5	7,9	-0,2	7,7	8,0	89	11	1,26
P3B5	7,5	-0,5	7,5	8,3	84	16	1,21
P4B5	7,4	-0,7	7,6	8,3	83	17	1,16
P5B5	6,1	-2,8	8,6	5,9	91	9	1,08
P1B3	9,2	2,2	7,6	8,2	97	3	2,22
P2B3	8,9	1	7,7	8,4	96	4	1,95
P3B3	8,6	0,4	7,5	7,5	95	5	1,8
P4B3	8,4	0,8	7,6	7,6	93	7	1,76
P5B3	8,1	0,3	7,4	7,7	92	8	1,5
P6B3	7,1	-2	7,9	9,2	95	5	1,28
	(± 0,1)	(± 0,2)					
	[PO ₄ ³⁻] ₁	[PO ₄ ³⁻] ₂			[PO ₄ ³⁻] ₁	[PO ₄ ³⁻] ₂	
P1C2	10,9	6,3	8,1	8,1	82	18	2,32
P3C2	10,2	5,5	7,4	7,0	89	11	2,05
P5C2	9,8	3,3	8,1	7,0	92	8	1,76
P1C1	11,5	6,9	6,7	7,7	81	19	2,83
P2C1	11,2	6,7	6,5	5,9	87	13	2,25
P3C1	10,8	5,5	6,9	5,4	94	6	2,3
P4C1	10,8	5,5	7,1	6,5	93	7	2,02

Tableau 9 : Déplacements chimiques et pourcentage relatifs des entités phosphates dans les verres des séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1

Il en ressort de ces décompositions qu'il existe deux familles de verres pour lesquelles nous observons des différences concernant la nature chimique des entités phosphates présentes dans nos verres. Les verres PzB5 et PzB3 contiennent des complexes orthophosphates et pyrophosphates, alors que les verres PzC2 et PzC1 contiennent deux types de complexes orthophosphates.

IV. 3. 2. 3. Discussion des résultats

L'évolution des déplacements chimiques obtenus par décomposition des spectres RMN ³¹P en fonction du taux de P₂O₅ ajouté dans le verre, est représentée sur la Figure 31.

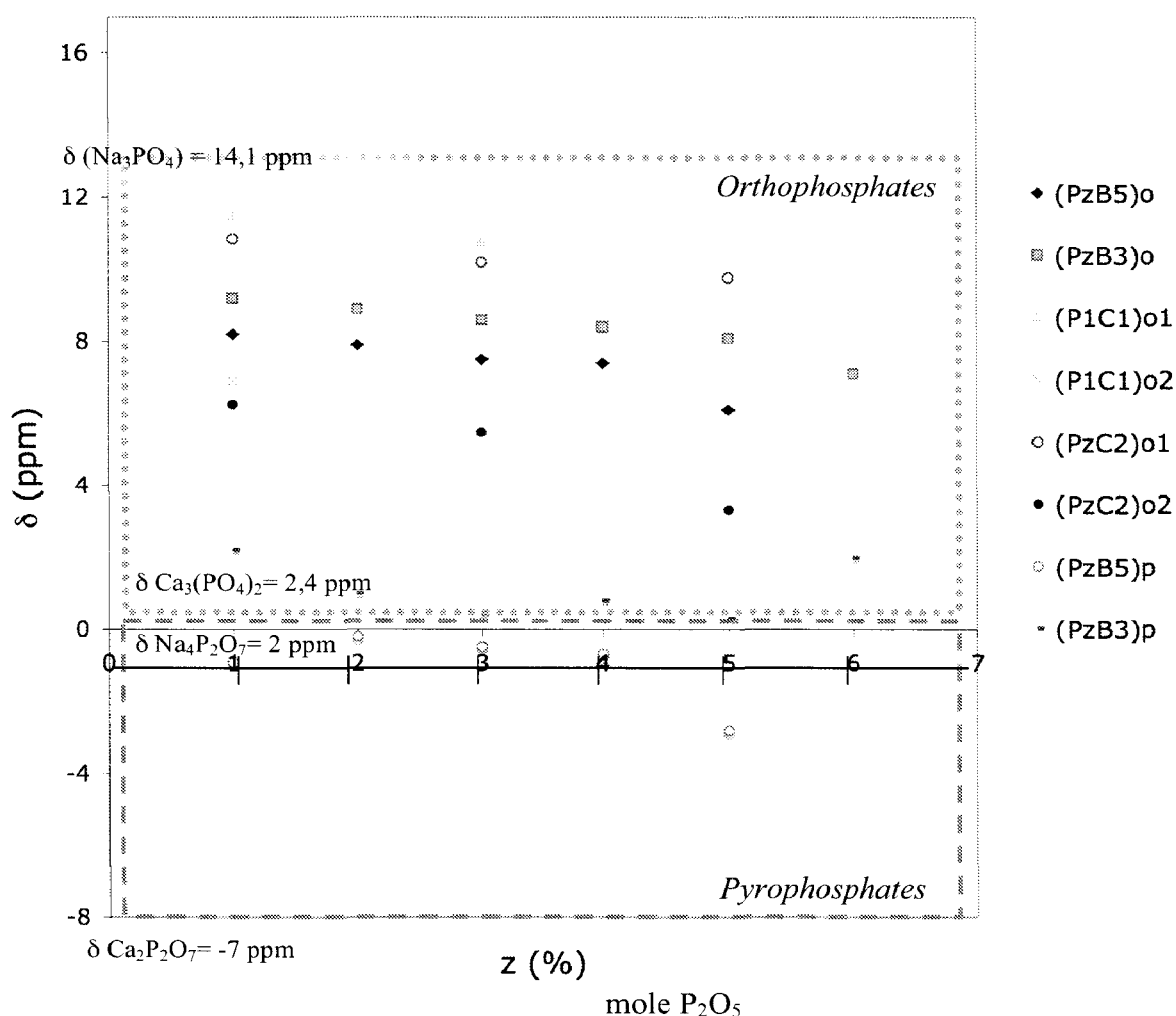


Figure 31 : Evolution des déplacements chimiques des ortho et pyrophosphates en fonction du taux de phosphore introduit dans le verre (z %) (o : orthophosphate ; o1 : orthophosphate majoritaire ; o2 : orthophosphate minoritaire et p : pyrophosphate)

Sur cette figure, sont représentées des zones en pointillés, délimitant les complexes pyrophosphates des complexes orthophosphates. Les limites horizontales de ces zones sont placées aux valeurs des déplacements chimiques des complexes cristallisés Na_3PO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ et $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (Tableau 8 page 54). Les complexes orthophosphates mixtes sont notés $[\text{PO}_4^{3-}; \text{Na}^+; \text{Ca}^{2+}]$, et les complexes pyrophosphates sont notés $[\text{P}_2\text{O}_7^{4-}; \text{Na}^+; \text{Ca}^{2+}]$.

La première raie est toujours majoritaire et se situe, pour tous les verres, entre 6,1 (P5B5) et 11,5 ppm (P1C1), c'est-à-dire, entre les valeurs caractéristiques des complexes orthophosphates cristallisés Na_3PO_4 et $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, indiquant la présence de complexe orthophosphate mixte en sodium-calcium dans ces verres.

La deuxième raie est toujours minoritaire, elle se situe entre -2,5 (P6B3) et 2,2 ppm (P1B3) pour les verres des séries PzB5 et PzB3. Ces valeurs de déplacements chimiques sont caractéristiques des $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ et $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ cristallisés, indiquant ainsi la présence minoritaire de complexes pyrophosphates mixtes de calcium et de sodium dans ces verres.

Concernant les séries des verres PzC1 et PzC2, la deuxième raie a un déplacement chimique se situant entre 5,5 et 6,9 ppm, c'est-à-dire, comme la première raie majoritaire, entre les valeurs caractéristiques des complexes orthophosphates Na_3PO_4 et $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, indiquant la présence minoritaire de complexes orthophosphates mixtes de calcium et sodium dans ces verres. Ces valeurs de déplacement chimique étant plus proches de celle de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ cristallisé (2,4 ppm), ces complexes minoritaires sont enrichis en calcium.

Les ajouts progressifs de P_2O_5 dans chaque série entraînent des modifications structurales au niveau des espèces présentes dans le réseau vitreux, alors que le rapport $\text{CaO} / (\text{CaO} + \text{Na}_2\text{O})$ est constant. Il a été constaté pour toutes les séries des verres que l'ajout progressif de P_2O_5 engendre en général un enrichissement en Ca^{2+} autour des entités phosphates majoritaires, alors que le rapport $\text{CaO}/(\text{CaO}+\text{Na}_2\text{O})$ est constant.

Si nous prenons par exemple un taux identique de phosphore dans les quatre séries de verres (4 % P_2O_5), on constate que les variations en déplacement chimique des entités phosphates

majoritaires sont proches, de l'ordre de 0,9 ppm. Nous obtenons une évolution différente de celle observée par H. Grussaute et al.¹⁰. En effet, ces auteurs n'ont pas constaté de variation dans l'allure de leurs spectres pour les verres : 67 SiO₂ - 28 CaO - 5 Na₂O dopés de 0,4 à 2,4% P₂O₅ et 66,5 SiO₂-16,7 CaO - 16,8 Na₂O dopés jusqu'à 2,78 % P₂O₅. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que leurs verres étant plus riches en silice et moins riches en phosphore comparés aux nôtres, l'effet P₂O₅ sur la structure serait donc moindre.

H. Grussaute et al.¹⁰ ont observé que les largeurs à mi-hauteur de tous leurs spectres obtenus par RMN, étaient quasiment identiques. Ces auteurs ont conclu que les environnements des entités orthophosphates et pyrophosphates (distribution des distances et des angles de liaison) présents dans leurs verres étaient indépendants des compositions des verres étudiés. Ils ne varient ni avec le taux de condensation du verre, ni avec le taux de P₂O₅ introduit.

En ce qui concerne les largeurs à mi-hauteur des complexes phosphates constituant nos spectres, les orthophosphates ont une largeur à mi-hauteur comprise entre 6,5 et 8,6 ppm, et les pyrophosphates entre 5,9 à 9,4 ppm. Les travaux de M. W. G. Lockyer et al.⁹ ont montré que pour leurs verres de compositions molaires (47,3-48,7) SiO₂ – (15,6-45,6) CaO – (4,6-33) Na₂O – 2,6 P₂O₅, les largeurs à mi-hauteur de leurs complexes orthophosphates sont de l'ordre de 6,5-7,5 ppm, et pour le verre BG11 de composition molaire 68,1 SiO₂ – 10,4 CaO – 18,8 Na₂O – 2,6 P₂O₅, la largeur à mi-hauteur de leurs complexes pyrophosphates est proche de 5,7 ppm. Nos valeurs sont donc en accord avec celles des travaux de ces auteurs.

IV. 3. 2. 4. Évolution du pourcentage relatif des entités phosphates en fonction du taux de phosphore

Nous avons tracé l'évolution des pourcentages relatifs des entités [PO₄³⁻] et [P₂O₇⁴⁻] en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres, pour chaque série de verres (Figure 32).

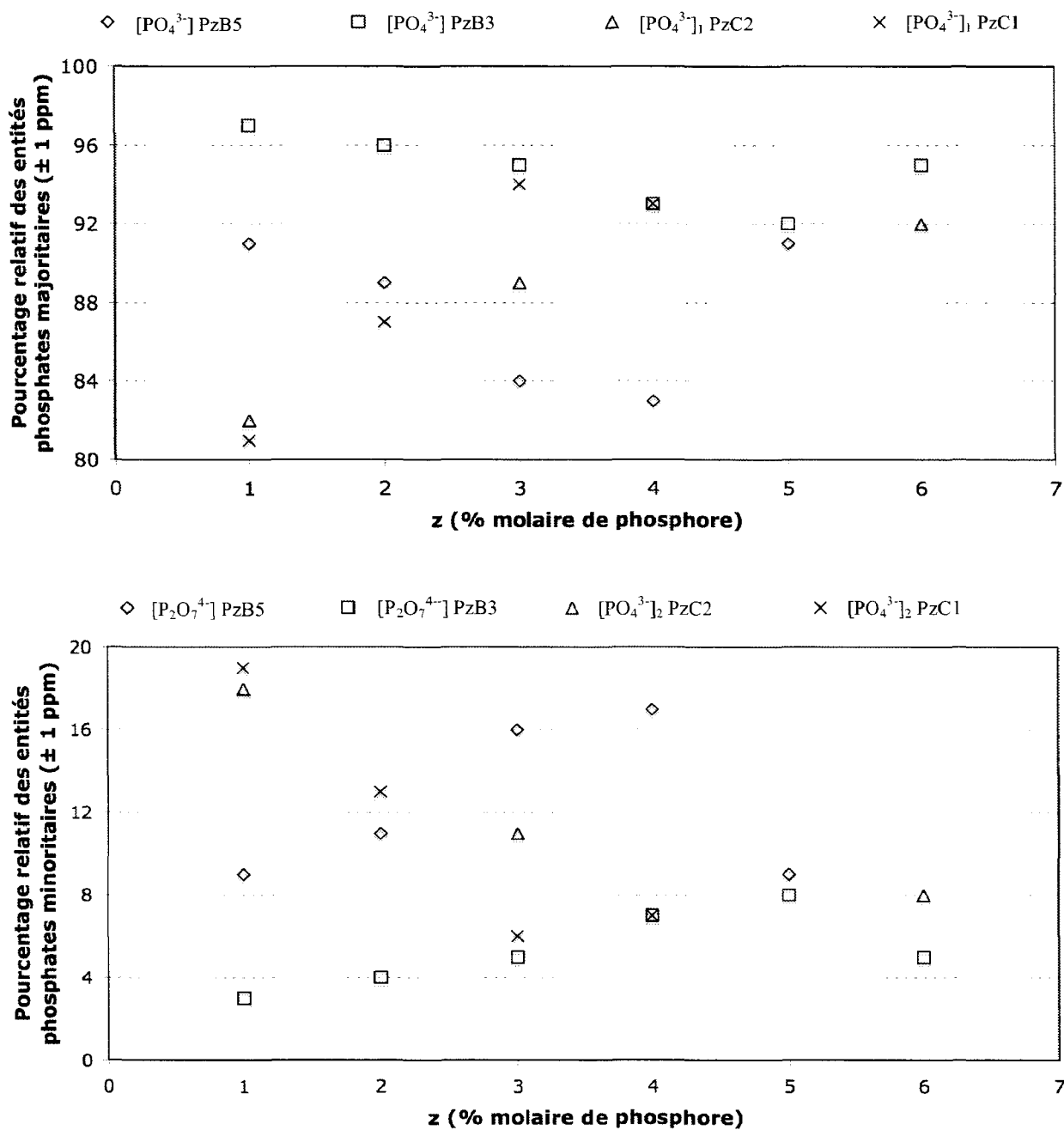


Figure 32 : Evolution du pourcentage relatif des entités phosphates majoritaires et minoritaires présentes dans le réseau vitreux des séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1, en fonction du taux de phosphore introduit dans les verres ($\Delta(\%) = 1 \text{ ppm}$)

Nous observons deux types de variations pour les espèces majoritaires : pour les séries de verres plus riches en SiO₂ (PzB5 et PzB3), le pourcentage relatif des [PO₄³⁻] diminue lorsque

le taux de phosphore augmente dans le verre. À l’opposé, pour les séries moins riches en SiO_2 (PzC2 et PzC1), le pourcentage relatif des $[\text{PO}_4^{3-}]$ diminue avec l’ajout de P_2O_5 .

Inversement, le pourcentage relatif des entités phosphates minoritaires ($[\text{PO}_4^{3-}]$ et $[\text{P}_2\text{O}_7^{4-}]$) augmentent pour les séries PzB5 et PzB3, et diminue pour les séries PzC2 et PzC1, lorsque le taux de phosphore augmente dans le verre.

D’après la réaction de formation des complexes orthophosphates et pyrophosphates décrite dans la partie bibliographique, ($2 \text{PO}_4^{3-} + \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \leftrightarrow \text{P}_2\text{O}_7^{4-} + 2 \text{Si} - \text{O}^-$), plus le verre contient de la silice (SiO_2), c’est-à-dire des oxygènes pontants (BO), plus l’équilibre est déplacé dans le sens de formation des complexes pyrophosphates. Ainsi, les verres des séries PzC2 et PzC1, contenant peu de SiO_2 (40,32 et 44,55 % molaire), ne contiennent pas de complexe pyrophosphate. Contrairement aux séries précédentes, les verres PzB3 et PzB5 possédant un taux plus élevé en SiO_2 (44,18 et 55 % molaire), contiennent deux types de complexes PO_4^{3-} et $\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$.

Au sein d’une série, nous pouvons également vérifier que les proportions des entités pyrophosphates augmentent avec le taux de P_2O_5 , aux dépens des proportions d’orthophosphates.

En effet l’ajout de P_2O_5 engendrant une polymérisation du réseau silicate donc avec plus de liaisons Si-O-Si, l’équilibre de la réaction est alors déplacé dans le sens de la formation de complexes pyrophosphates (cf. réaction page 13)

IV. 3. 3. Calcul du NBO/T traduisant l’état de polymérisation du réseau vitreux

Nous avons calculé le NBO/T à partir des données en RMN du phosphore dans le but de les comparer avec celles issues des données en RMN du silicium, et de vérifier si l’introduction de phosphore engendre effectivement une polymérisation du réseau silicate.

L’état de polymérisation peut être déterminé¹⁰ à partir des compositions molaires des verres, et des données obtenues par la décomposition des spectres de la RMN du ^{31}P , par le calcul du

nombre moyen de NBO par Tétraèdre de SiO_4 , nommé T, et par la relation suivante :

$$\left(\frac{\text{NBO}}{\text{T}}\right)_{31\text{P}} = \frac{2((\% \text{CaO} + \% \text{Na}_2\text{O}) - (3m + 2n)\% \text{P}_2\text{O}_5)}{\% \text{SiO}_2} \quad (\text{Équation 5})$$

Cette équation est valable en considérant que Ca et Na sont des cations modificateurs de réseau, c'est-à-dire que 1 NBO est introduit par atome de sodium (1 Na^+), et 2 NBO sont introduits par atome de calcium (1 Ca^{2+}). Les valeurs « m » et « n » sont obtenues par RMN-MAS du ^{31}P , elles représentent les fractions respectives de complexes orthophosphates (m) et de complexes pyrophosphates (n).

Les calculs du rapport des NBO/T de tous les verres sont reportés dans le Tableau 5. Afin d'observer l'influence du taux de phosphore sur ce rapport, nous avons tracé, comme pour les données de la RMN du ^{29}Si , l'évolution du rapport NBO/T en fonction du taux de P_2O_5 (Figure 33).

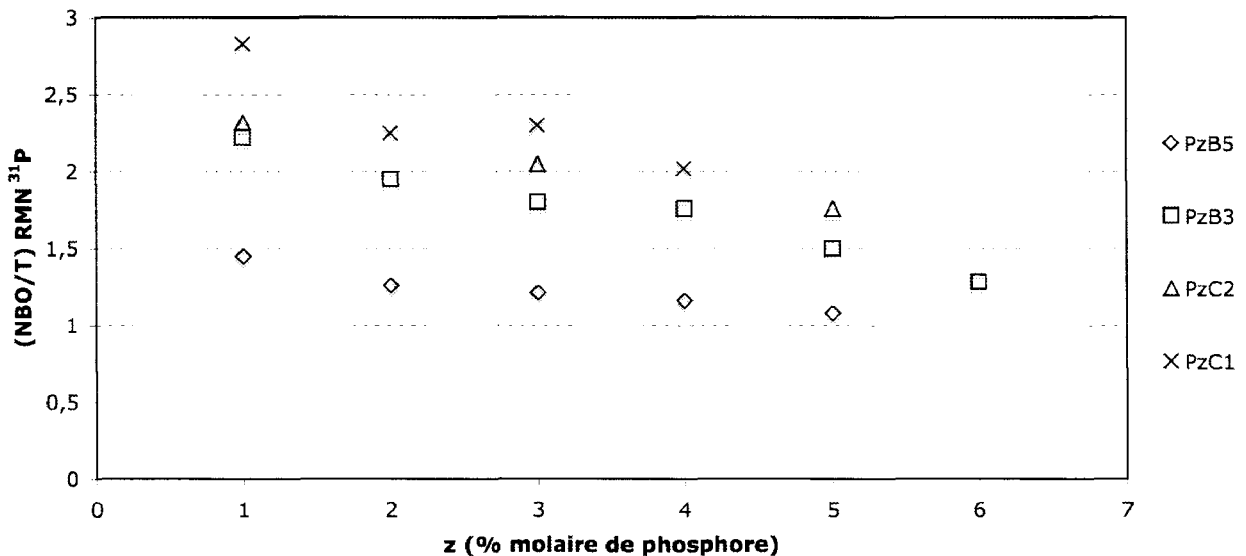


Figure 33 : Evolution du rapport NBO/T calculé à partir des données de la RMN du ^{31}P , en fonction du taux de P_2O_5 introduit dans les verres, pour les séries PzB5, PzB3, PzC2 et PzC1

Pour tous les verres, le rapport NBO/T diminue avec l'ajout de P_2O_5 , indiquant une polymérisation du réseau silicate, et confirme une fois de plus le rôle du phosphore dans la structure des verres de silicate. En effet, le phosphore s'introduit dans les interstices du réseau silicate et s'associe aux ions Ca^{2+} et Na^+ , et afin d'assurer la neutralité des charges du

système, des liaisons Si-O $^-$ (NBO) se condensent pour former des liaisons Si-O-Si (BO) (Figure 34).

Les valeurs de NBO/T obtenues par RMN du ^{29}Si et celles par RMN du ^{31}P , diffèrent légèrement, à cause des réactions de dismutation de site. En effet, la distribution binaire des entités silicates Q^n n'est plus vérifiée pour ces verres, qu'ils soient dopés ou non par le phosphore.

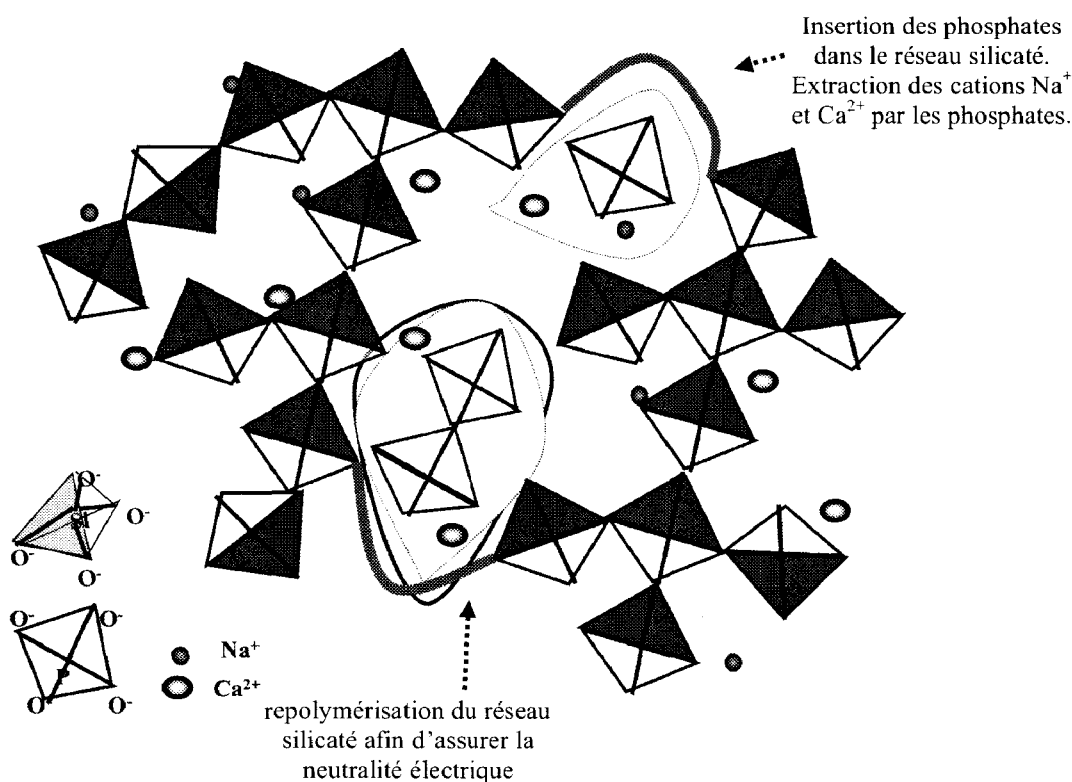


Figure 34 : Représentation schématique de l'insertion des espèces phosphates dans le réseau silicate

IV. 3. 4. Répartition des cations Ca^{2+} et Na^+ autour des entités phosphates en fonction du taux de phosphore

Afin d'accéder à la répartition des Ca^{2+} et Na^+ autour des entités phosphates, nous avons tracé l'évolution des déplacements chimiques des complexes orthophosphates en fonction du

rapport $\text{CaO}/(\text{CaO}+\text{Na}_2\text{O})$ à partir des données de M.H.G. Lockyer et al.⁹ et de H. Grussaute et al.¹⁰, en rappelant que ces auteurs ont travaillé avec un taux fixe de phosphore (Figure 35). Nous pouvons observer que ces points sont tous alignés confirmant ainsi une distribution homogène des cations autour des entités phosphates.

Pour chaque série de verre pour laquelle le rapport $\text{CaO}/(\text{CaO}+\text{Na}_2\text{O})$ est toujours constant quel que soit le taux de P_2O_5 introduit dans nos verres, nous avons reporté ce rapport sur la courbe et observé si effectivement il y avait une distribution homogène des cations Na^+ et Ca^{2+} pour les verres non dopés et dopés au phosphore.

IV. 3. 4. 1. Série de verres PzB5

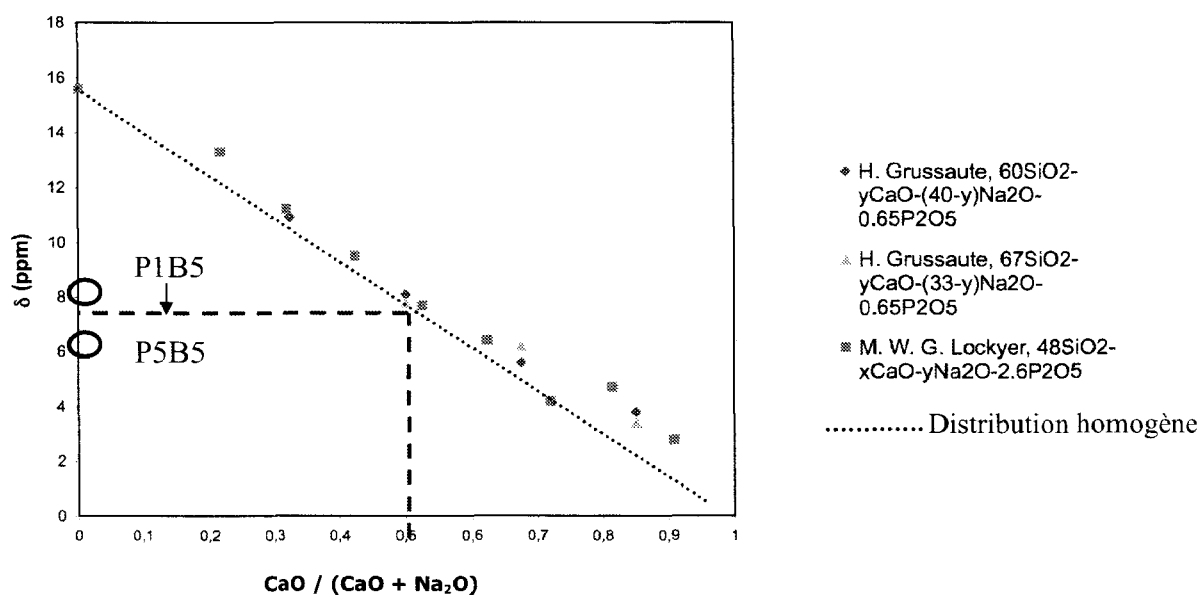


Figure 35 : Evolution des déplacements chimiques des complexes orthophosphates des verres PzB5, en fonction du rapport $\text{CaO}/(\text{CaO} + \text{Na}_2\text{O})$ (M.W.G. Lockyer et al.⁹ et de H. Grussaute et al.¹⁰)

Ainsi, en reportant la valeur du rapport $\text{CaO}/(\text{CaO}+\text{Na}_2\text{O}) = 0,5$ des verres PzB5 sur le graphique (Figure 35), il est possible de lire la valeur attendue du déplacement chimique égale à 8 ppm. Pour $z = 1$, le complexe orthophosphate a un déplacement chimique de 8,2 ppm. Ces

deux valeurs, étant proches (8 et 8,2 ppm), indiquent ainsi pour le verre P1B5, une distribution homogène des cations, c'est-à-dire que les phosphates n'ont pas de préférence particulière à s'associer aux Ca²⁺ ou aux Na⁺.

En revanche, lorsque le pourcentage de P₂O₅ augmente, pour le verre P5B5, la valeur expérimentale de 6 ppm, s'éloigne de la valeur prévue (8 ppm). Ainsi, la distribution des cations modificateurs autour des orthophosphates est de moins en moins homogène lorsque le taux de P₂O₅ augmente dans cette série de verres.

IV. 3. 4. 2. Série de verres PzB3

Pour les verres de la série PzB3, le rapport CaO/(CaO+Na₂O) est égal à 0,5. En reportant cette valeur sur le graphe (Figure 36), il est possible de lire, sur l'axe des ordonnées, un déplacement chimique proche de 8 ppm.

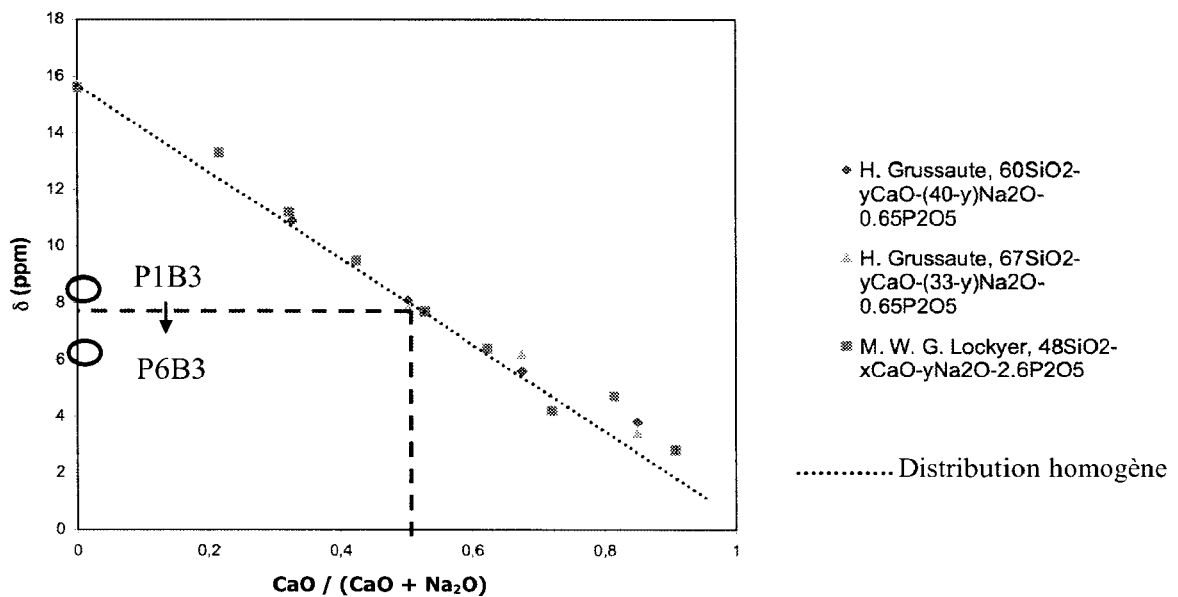


Figure 36 : Evolution des déplacements chimiques des complexes orthophosphates des verres PzB3, en fonction du rapport $\text{CaO}/(\text{CaO} + \text{Na}_2\text{O})$ (M.W.G. Lockyer et al.⁹ et de H. Grussaute et al.¹⁰)

Pour le verre P1B3, la décomposition des spectres indique un déplacement chimique expérimental du complexe orthophosphate de 9,2 ppm. Cette valeur est assez éloignée de 8

ppm ce qui signifie que la répartition des cations modificateurs autour de ce complexe n'est pas homogène. En effet, nous avons montré précédemment que ce complexe était enrichi en sodium. Cependant, l'ajout de phosphore dans le verre nous permet d'observer que les valeurs réelles se rapprochent de 8 ppm et que, par conséquent, la distribution des cations devient de plus en plus homogène.

IV. 3. 4. 3. Série de verres PzC2

Dans le cas de la série PzC2, le rapport $\text{CaO}/(\text{CaO}+\text{Na}_2\text{O})$ est égal à 0,4. En reportant cette valeur sur l'axe du rapport $\text{CaO}/(\text{CaO}+\text{Na}_2\text{O})$, nous obtenons un déplacement chimique de 9,5 ppm (Figure 37). Contrairement aux spectres des séries PzB5 et PzB3, nous avons observé la présence de deux complexes orthophosphates.

Nous constatons que les déplacements chimiques des complexes orthophosphates de la première raie diminuent lorsque l'ajout de phosphore dans le verre augmente, et tendent vers une répartition homogène des cations.

Par contre, la distribution des cations autour des pyrophosphates n'est pas homogène quel que soit le taux de phosphore dans le verre.

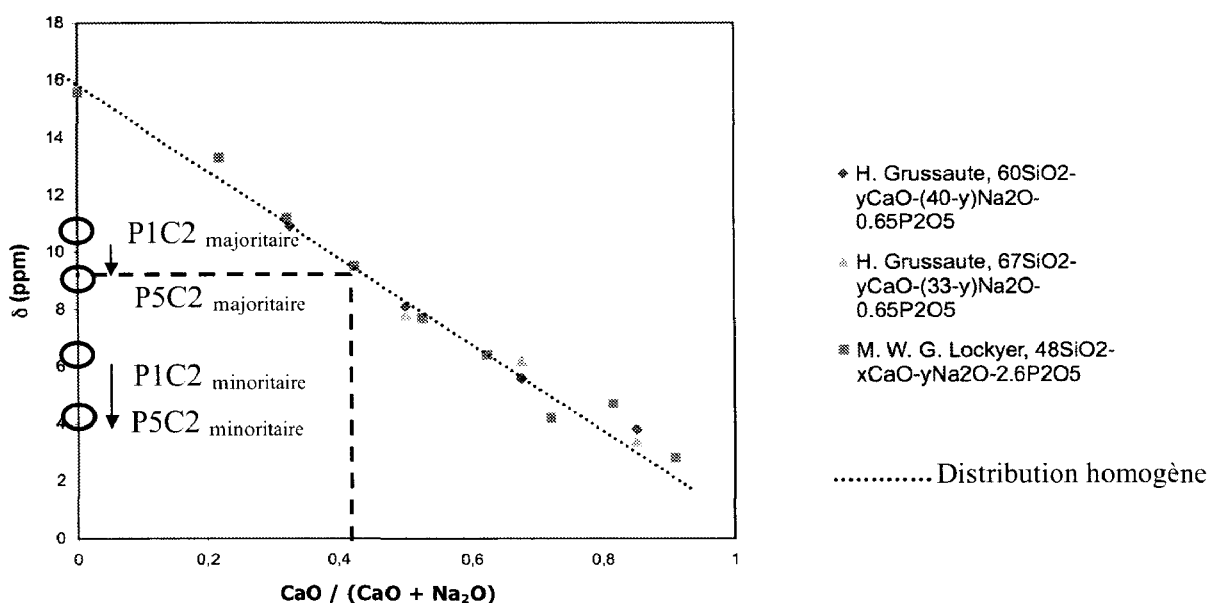


Figure 37 : Evolution des déplacements chimiques des complexes orthophosphates des verres PzC2, en fonction du rapport $\text{CaO}/(\text{CaO} + \text{Na}_2\text{O})$ ((M.W.G. Lockyer et al.⁹ et de H. Grussaute et al.¹⁰)

IV. 3. 4. 4. Série de verres PzC1

La figure 38 représente la variation du déplacement chimique en fonction du taux CaO/CaO+Na₂O sur laquelle nous avons reporté les déplacements chimiques observés pour la série des verres PzC1.

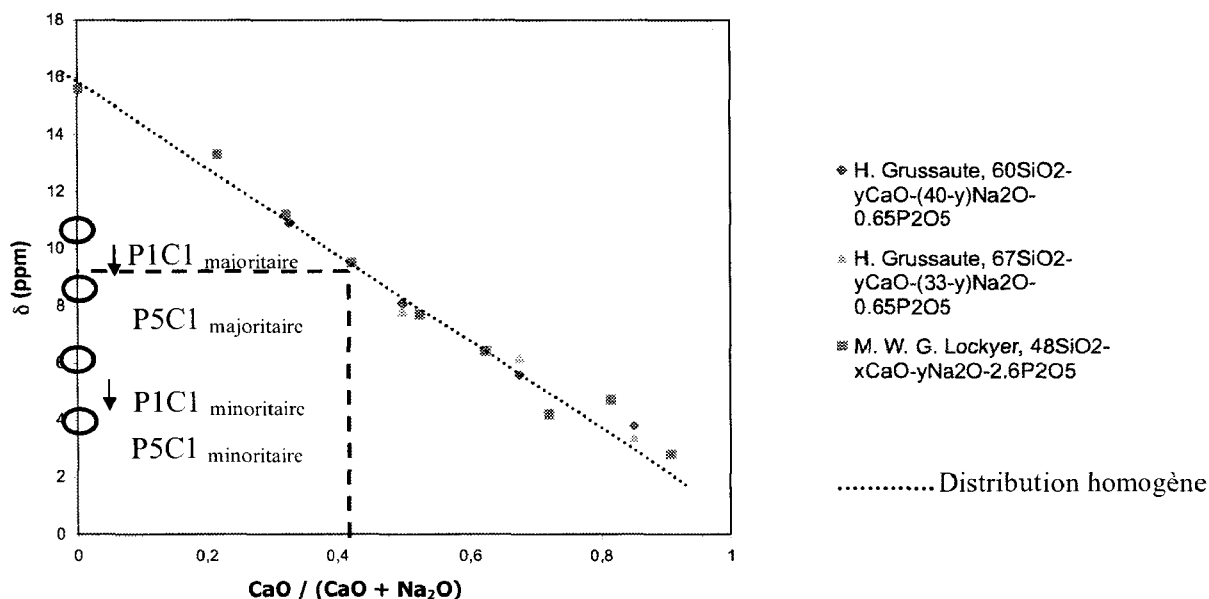


Figure 38 : Evolution des déplacements chimiques des complexes orthophosphates des verres PzC1, en fonction du rapport $\text{CaO}/(\text{CaO} + \text{Na}_2\text{O})$ ((M.W.G. Lockyer et al.⁹ et de H. Grussaute et al.¹⁰)

Nous pouvons faire exactement les mêmes constatations que pour les verres PzC2 à savoir une répartition homogène des cations lorsque le taux de P₂O₅ augmente.

IV. 3. 4. 5. Bilan de la répartition des cations modificateurs autour des entités phosphates

Pour tous les verres, nous avons reporté les différents types de complexes phosphates présents dans ces systèmes, en fonction du taux de phosphore introduit, et la répartition des cations modificateurs autour de ces entités dans le Tableau 10.

	taux de phosphore	complexes othophosphates	complexes pyrophosphates	Répartition des cations modificateurs autour des complexes phosphates
PzB5 (55SiO ₂ -22,5CaO-22,5Na ₂ O-zP ₂ O ₅)	z = 1	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (91%)	[P ₂ O ₇ ⁴⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (9%)	homogène
	z = 5	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (91%)	[P ₂ O ₇ ⁴⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (9%)	non homogène
PzB3 (47SiO ₂ -26,5CaO-26,5Na ₂ O-zP ₂ O ₅)	z = 1	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (97%)	[P ₂ O ₇ ⁴⁻ ; (Na ⁺)] minoritaire (3%)	non homogène
	z = 5	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (95%)	[P ₂ O ₇ ⁴⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (5%)	homogène
PzC2 (45SiO ₂ -23,5CaO-31,5Na ₂ O-zP ₂ O ₅)	z = 1	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (82%) [PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (18%)		non homogène non homogène
	z = 5	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (92%) [PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (8%)		homogène non homogène
PzC1 (42SiO ₂ -23,5CaO-34,5Na ₂ O-zP ₂ O ₅)	z = 1	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (81%) [PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (19%)		non homogène non homogène
	z = 4	[PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] majoritaire (93%) [PO ₄ ³⁻ ; (Ca ²⁺ , Na ⁺)] minoritaire (7%)		homogène non homogène

Tableau 10 : Récapitulatif des différents types de complexes phosphates présents dans les verres, ainsi que la répartition des cations autour de ceux-ci

Si nous comparons les séries entre elles, nous pouvons remarquer qu'il existe deux comportements différents dans la répartition des cations Ca²⁺ et Na⁺ vis-à-vis des entités phosphates en fonction du taux de phosphore introduit. L'ajout progressif de phosphore dans des verres contenant plus de 50 % en silice donne lieu à une distribution des cations de moins en moins homogène, alors que, pour les autres verres contenant des taux de silice inférieurs à 50 %, nous avons le phénomène inverse.

IV. 4. Conclusion

La RMN-MAS du ^{29}Si a montré que les verres bioactifs du système SiO₂ – CaO – Na₂O – P₂O₅ sont des systèmes très dépolymérisés, et que les oxydes modificateurs (CaO et Na₂O) en sont responsables. En effet, ces verres sont constitués de plusieurs entités silicates Qⁿ, ce qui assure la cohésion des verres. Les séries de verres {PzB5} et {PzC1-PzB3} ont des structures

composées majoritairement d'entités respectivement $\{\text{Q}^2 \text{ et } \text{Q}^3\}$ et $\{\text{Q}^1 \text{ et } \text{Q}^2\}$. La série de verres PzC2 se situe entre ces deux distributions des entités silicates. En effet, pour un taux de phosphore inférieur ou égal à 3 %, cette série est principalement composée d'entités silicates $\{\text{Q}^1 \text{ et } \text{Q}^2\}$, au-delà de cette valeur ce sont les entités silicates $\{\text{Q}^2 \text{ et } \text{Q}^3\}$ qui la composent majoritairement.

Les entités silicates de nos verres ont un environnement chimique mixte Ca^{2+} et Na^+ .

L'addition de phosphore dans nos verres entraîne une repolymérisation du réseau silicate. En effet, le phosphore s'insère dans les interstices du réseau silicate et extrait les cations modificateurs Ca^{2+} et Na^+ pour former des complexes phosphates non liés au réseau silicate.

Cependant, il est difficile de savoir s'il existe une distribution préférentielle des modificateurs Ca^{2+} et des Na^+ à s'associer à un type d'entité Q^n , car les variations des déplacements chimiques ne tendent pas toutes dans le même sens.

La RMN-MAS du ^{31}P nous a informé sur la nature des espèces phosphates présentes dans nos verres du système $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$. Le phosphore introduit dans ces verres se présente majoritairement sous la forme de complexes orthophosphates ayant un environnement mixte en calcium et sodium, accompagnés ou non, de la présence minoritaire de complexes pyrophosphates mixtes (calcium et sodium).

Pour les verres des séries PzB5 et PzB3, contenant entre 47 et 55 % molaires de SiO_2 , nous avons observé la présence majoritaire de complexes $[\text{PO}_4^{3-}; \text{Na}^+; \text{Ca}^{2+}]$ et minoritaire de complexes $[\text{P}_2\text{O}_7^{4-}; \text{Na}^+; \text{Ca}^{2+}]$. Ces complexes ont une tendance à s'enrichir en calcium avec l'augmentation du taux de P_2O_5 .

Les verres des séries PzC2 et PzC1 contenant entre 42 et 45 % molaires de SiO_2 , sont composés de deux complexes différents d'orthophosphates, indiquant probablement un début de séparation de phase. Ces deux complexes s'enrichissent également en calcium avec le taux de phosphore.

Pour tous les verres, la distribution des ions Ca^{2+} et Na^+ autour des complexes phosphates diffère, et dépend de la composition chimique du verre en SiO_2 , et du pourcentage de P_2O_5 introduit, pour un rapport $\text{CaO} / (\text{CaO} + \text{Na}_2\text{O})$ fixe.

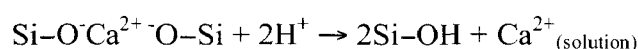
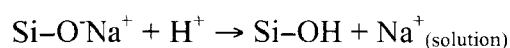
V. CORRELATION ENTRE LA STRUCTURE DES VERRES ET LEUR BIOACTIVITE

Après avoir définis les structures des verres, nous avons essayé, dans cette partie, d'établir une relation entre leur structure et leur bioactivité.

Le Tableau 11 résume les structures des verres ainsi que les valeurs des temps de formation de l'apatite lorsqu'ils sont immergés dans du SBF.

Si nous comparons les temps de bioactivité des verres, avec les données obtenues grâce à la RMN du ^{29}Si , nous observons que les temps d'apparition de la couche d'HAC les plus longs (2,5 ou 2 jours pour les verres B5 et P1B5) correspondent aux structures dont les espèces majoritaires sont Q^2 et Q^3 , c'est à dire les plus condensées. A l'opposé, les temps les plus faibles (10 heures ou 14 heures pour les verres P1C1 et P3C2 respectivement), correspondent à des verres très dépolymérisés contenant majoritairement les entités silicates Q^1 et Q^2 . En effet, les verres riches en SiO_2 sont plus condensés, donc moins solubles lorsqu'ils sont au contact du SBF. Afin de comprendre ce que ces observations peuvent engendrer sur le mécanisme de bioactivité des verres, nous rappelons les premières étapes de ce mécanisme (cf. p17) :

Dans un premier temps, un échange des ions Na^+ et Ca^{2+} du verre avec les ions H^+ de la solution de SBF se produit, selon les réactions suivantes :



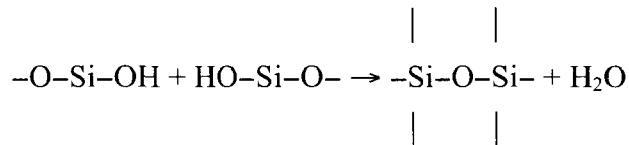
Cette étape produit alors des groupements silanols à la surface du verre avec un milieu alcalin environnant la surface de l'échantillon. Dans un deuxième temps, la perte de silice du réseau sous la forme de $\text{Si}(\text{OH})_4$ se produit, résultant de la rupture des liaisons Si-O inter tétraèdres et produisant de nouveaux groupements silanols à la surface du verre avec un pH basique.

Les deux premières étapes de la formation de l'HAC étant des réactions de dissolution de la surface des verres, la condensation du réseau silicate par ajout de P_2O_5 ralentit considérablement le mécanisme de bioactivité.

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des données de la RMN ainsi que des bioactivités in vitro des verres étudiés

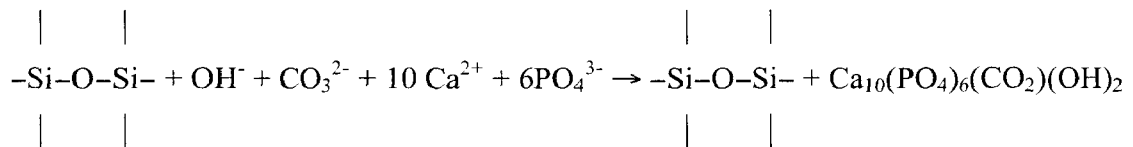
verre	Compositions molaires (%)				RMN ²⁹ Si			RMN ³¹ P		NBO / T ³¹ P RMN (± 0,02)	Répartition des cations autour des entités phosphates majoritaires	Temps d'apparition de la couche HAC, d'après I. Iecbecq et al.
	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	% Q ⁿ majoritaires(+/-1ppm)			% relatif				
					Q ¹	Q ²	Q ³	PO ₄ ³⁻	P ₂ O ₇ ⁴⁻			
B5	55,000	22,500	22,500	0	3	55	39	91	9			2,5 jours
P1B5	54,450	22,275	22,275	1	2	46	48	89	11	1,45	homogène	2 jours
P2B5	53,900	22,050	22,050	2	2	42	55	84	16	1,26		
P3B5	53,350	21,825	21,825	3	2	43	45	83	17	1,21		
P4B5	52,800	21,600	21,600	4	3	22	69	91	9	1,16		
P5B5	52,250	21,375	21,375	5		28	62			1,08	non homogène	2 jours
B3	47,000	26,500	26,500	0	16	74	7	97	3			
P1B3	46,530	26,235	26,235	1	4	86	7	96	4	2,22	non homogène	4 jours
P2B3	46,060	25,970	25,970	2	6	77	16	95	5	1,95		14 heures
P3B3	45,590	25,705	25,705	3	7	65	27	93	7	1,8		
P4B3	45,120	25,440	25,440	4	3	53	41	92	8	1,76		
P5B3	44,650	25,175	25,175	5	4	42	51	95	5	1,5	homogène	10 heures
P6B3	44,180	24,910	24,910	6	2	28	68			1,28		6 heures
C2	45,000	23,500	31,500	0	38	53	4					12 heures
P1C2	44,550	23,265	31,185	1	25	60	10	[PO ₄ ³⁻]	[PO ₄ ³⁻]	2,32	non homogène	2 jours
P3C2	43,650	22,795	30,555	3	16	63	18	82	18	2,05		14 heures
P5C2	42,750	22,325	29,925	5	4	64	29	89	11	1,76	homogène	14 heures
C1	42,000	23,500	34,500	0	52	38	5			2,83	non homogène	22 heures
P1C1	41,580	23,265	34,155	1	47	50	1			2,25		10 heures
P2C1	41,160	23,030	33,810	2	37	58	2	81	19	2,3		12 heures
P3C1	40,740	22,795	33,465	3	34	56	8	87	13	2,02	homogène	16 heures
P4C1	40,320	22,560	33,120	4	29	60	11	94	6			16 heures
								93	7			16 heures

La troisième étape consiste en la condensation des groupements silanols des deux étapes précédentes, produisant ainsi une couche riche en silice à la surface du verre appauvrie en cations alcalins et alcalino-terreux à pH alcalin.



De plus, nous avons montré, grâce à la RMN du ^{31}P , que lorsque P_2O_5 était introduit progressivement dans les verres, les complexes orthophosphates majoritaires constituant le réseau phosphate avaient tendance à s'enrichir en calcium. Ces observations ont un effet sur la quatrième étape du mécanisme de bioactivité qui est la précipitation des phosphates, formant ainsi une couche supplémentaire à la surface du verre : la couche de phosphate de calcium amorphe (CaP amorphe). L'enrichissement en calcium au sein du réseau doit alors aider à accélérer cette étape du mécanisme de bioactivité.

L'étape suivante concerne la cristallisation de la couche de CaP amorphe en apatite selon la réaction :



L'enrichissement en calcium des complexes orthophosphates par ajout de phosphore entraîne par conséquent un enrichissement en sodium du réseau silicate, rendant ainsi ce dernier plus soluble que ce même réseau sans phosphore, et réduit donc le temps de formation de l'apatite.

En effet, pour la série de verres PzC1, nous observons que le temps d'apparition de la couche d'HAC passe de 22 h (C1) à 16 heures (P4C1). Pour la série de verres PzB3, ce temps passe de 4 jours (B3) à 6 h heures (P6B3). En ce qui concerne la série PzB5, le temps d'apparition de la couche d'HAC est de 2,5 jours pour les verres ayant un taux faible de P_2O_5 , et de 2 jours pour le verre P5B5. D'une manière générale, nous pouvons constater que l'introduction de phosphore dans les verres entraîne une diminution du temps d'apparition de la couche d'HAC, avec des effets plus ou moins importants.

Nous avons donc mis en évidence le fait que l'introduction de P_2O_5 dans nos verres de silicate rendait le réseau silicate plus soluble. De plus, cet ajout de P_2O_5 qui engendre un

enrichissement en calcium du réseau phosphate, permet une apparition plus rapide de la couche de CaP amorphe, et donc une réponse bioactive plus rapide.

¹ **J. Zarzycki**

« Les verres et l'état vitreux »

Ed Masson, (1982)

² **H. Scholze**

« Le verre, nature, structure et propriétés »

Institut du verre, (1980)

³ **R. Dupree, D. Holland, P. W. Mc Millan et R. F. Pettifer**

« The structure of soda-silica glasses : a MAS NMR study »

Journal of Non-Crystalline Solids, 68 (1984) 399-410

⁴ **H. Maekawa, T. Maekawa, K. Kawamura et T. Yokokawa**

« The structural groups of alkali silicate glasses determined from ²⁹Si MAS-NMR »

Journal of Non-Crystalline Solids, 292 (2001) 115-126

⁵ **S. G. Kosinski, D. M. Krol, T. M. Duncan, D. C. Douglass, J. B. MacChesney et J. R. Simpson**

« Raman and NMR spectroscopie of SiO₂ glasses co-doped with Al₂O₃ and P₂O₅ »

Journal of Non-Crystalline Solids, 105 (1988) 45-52

⁶ **D. Li, M. E. Fleet, G. M. Bancroft, M. Kasrai, Y. Pan**

« Local structure of Si and P in SiO₂ – P₂O₅ and Na₂O – SiO₂ – P₂O₅ glasses : a XANES study »

Journal of Non-Crystalline Solids, 188 (1995) 181-189

⁷ **M.W.G. Lockyer, D. Holland, R. Dupree,**

« The structure of (5x)P₂O₅.(1-x)K₂O.4(1-x)SiO₂ glasses »

Physics and Chemistry of glasses, 36 n°1 (1995) 22-30

⁸ **R. Dupree, D. Holland et M. G. Mortuza**

« The role of small amounts of P_2O_5 in the structure of alkali disilicate glasses »

Physics and Chemistry of glasses, 29 (1988) 18-21

⁹ **M.W.G. Lockyer, D. Holland, R. Dupree,**

« NMR investigation of the structure of some bioactive and related glasses »,

Journal of Non-Crystalline Solids, 188 (1995) 207-219.

¹⁰ **H. Grussaute, L. Montagne, G. Palavit et J. L. Bernard**

« Phosphate speciation in $Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2$ and $Na_2O-TiO_2-P_2O_5-SiO_2$ glasses »

Journal of Non-Crystalline Solids, 263-264 (2000) 312-317

¹¹ **C. Nelson et D. R. Tallant**

« Raman studies of sodium silicate glasses with low phosphate contents »

Physics and Chemistry of glasses, 25 (1984) 31-38

¹² **A. R. Jones, R. Winter, G. N. Greaves, I. H. Smith**

« MAS NMR study of soda-lime-silicate glasses with variable degree of polymerisation »

Journal of Non-Crystalline Solids, 293-295 (2001) 87-92

¹³ **L. L. Hench**

« Biomaterials : a forecast for the future »

Biomaterials, 19 (1988) 1419-1423

¹⁴ **O. Peitl, E. D. Zanotto, L. L. Hench**

« Highly bioactive $P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2$ glass-ceramics »

Journal of Non-Crystalline Solids, 292 (2001) 115-126

¹⁵ **I. Lebecq, F. Desanglois, A. Leriche et C. Follet-Houttemane**

« Compositional dependence on the in vitro bioactivity of invert or traditional bioglasses in the Si-Ca-Na-P System »

Journal of Biomedical Materials Research published online 27 Mars 2007

¹⁶ D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J-O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan, G. Hoatson

Logiciel DM-Fit

Magnetic Resonance in Chemistry, 40 (2002) 70-76

¹⁷ I. Elgayar, A. E. Aliev, A. R. Boccaccini, R. G. Hill

« Structural analysis of bioactive glasses »

Journal of non-crystalline Solids, 351 (2005) 173-183

¹⁸ R. Dupree, D. Holland et M.G. Mortuza

«Six Coordinated silicon in glasses»

Nature, 328 (1987) 416-417.

¹⁹ J. Schneider, V. R. Mastelaro, E. D. Zanotto, B. A. Shakhmatkin, N. M. Vedishcheva, A. C. Wright et H. Panepucci

«Qⁿ distribution in stoichiometric silicate glasses : thermodynamic calculations and ²⁹Si high resolution NMR measurements »

Journal of Non-Crystalline Solids, 325 (2003) 164-178.

²⁰ H. Maekawa, T. Maekawa, K. Kawamura et T. Yokokawa,

« The structural groups of alkali silicate glasses determined from ²⁹Si MAS-NMR »

Journal of Non-Crystalline Solids, 127 (1991) 53-64.

²¹ A. R. Grimmer, M. Mägi, M. Hähnert, H. Stade, A. Samoson, W. Wieker et E. Lippmaa

« High-resolution solid-state ²⁹Si nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of binary alkali silicate glasses »

Physics and Chemistry of Glasses, 25 (4) (1984) 105-109.

²² **G. D. Cody, B. Mysen, G. Saggi-Szabo et J. A. Tossel**

«Silicate-phosphate interactions in silicate glasses and melts : I. A multinuclear (²⁷Al, ²⁹Si, ³¹P) MAS NMR and ab initio chemical shielding (³¹P) study of phosphorus speciation in silicate glasses »

Geochimica et Cosmochimica Acta 65, (14) (2001) 2395

²³ **A. R. Grimmer**

« Solids state ³¹P NMR of inorganic phosphates »

Journal of Chemical Physics, 89 (1992) 413-421

²⁴ **P. Hartmann, J. Vogel et B. Schnabel**

« NMR study of phosphate glasses and glass ceramics structures »

Journal of Non-Crystalline Solids 176 (1994) 157.

Chapitre 2 : ELABORATION D'UN VERRE BIOACTIF MACROPOREUX

I. BIBLIOGRAPHIE

I. 1. Classification des biomatériaux

La greffe osseuse et le comblement de perte de substance osseuse sont de plus en plus fréquents en chirurgie. Ainsi, depuis plusieurs années, de nombreux produits dénommés de façon générique « comblements osseux » sont mis au point et proposés aux praticiens.

Devant la variété des produits disponibles sur le marché, un classement basé sur leur origine permet de les différencier.

I. 1. 1. Origine humaine

L'os humain est le biomatériau de comblement osseux idéal. Il peut être greffé par autogreffe (un prélèvement osseux est réalisé sur un individu et greffé sur ce même individu) ou par allogreffe (le prélèvement est greffé sur un autre individu). Dans ces deux cas, il est nécessaire de réaliser un prélèvement osseux qui reste toutefois limité et oblige à passer par une première intervention chirurgicale entraînant une augmentation du temps opératoire, un surcoût financier et des soins cliniques supplémentaires pour le patient. En outre, l'allogreffe entraîne des risques de transmission de virus malgré une surveillance bactériologique et virologique étroite.

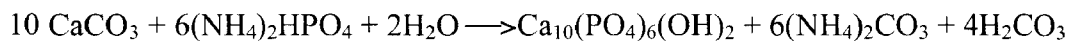
La législation tend aujourd'hui à diminuer ces risques par la limitation des banques d'os et par voie de conséquence la disponibilité des allogreffes. Une circulaire du ministère de la santé du 12/01/95 affirme d'ailleurs que tous les produits d'origine humaine présentent un risque potentiel de contamination infectieuse.

I. 1. 2. Origine animale

La structure poreuse des os des mammifères apporte une seconde possibilité de substituts osseux. L'architecture de ces substituts est très proche de celle de l'os humain. L'hétérogreffe ou la xéno greffe bovine consiste à greffer chez l'homme des tissus provenant d'une espèce animale, généralement bovine. Les matières premières subissent des purifications poussées

afin d'éliminer la majorité des protéines animales sans dénaturer la partie collagénique. Le biomatériau de substitution alors obtenu conserve des propriétés mécaniques élevées. Par exemple, des condyles fémoraux bovins commercialisés sous le nom de Oxbone® présentent un volume poreux compris entre 60 et 70% et une contrainte à la rupture en compression proche de 10 MPa. Cependant, il existe également des risques de transmission à l'homme de maladies virales, et en particulier l'encéphalopathie bovine spongiforme, ce qui explique que ce type de biomatériau soit de moins en moins utilisé par les praticiens. D'une manière générale, les substituts d'origine bovine subissent avant implantation plusieurs étapes de traitement : élimination des débris cellulaires, déprotéinisation plus ou moins complète et spécifique, délipidation, traitement d'inactivation virale et contre les prions, enfin stérilisation finale par irradiation. L'hydroxyapatite biologique peut être obtenue en purifiant des os bovins à très haute température ($T > 1000^{\circ}\text{C}$) avant céramisation et stérilisation.

De la même façon, des procédés thermochimiques appliqués sur des coraux permettent la fabrication de substituts en phosphate de calcium (interpore®). Un traitement hydrothermal d'échange ionique assure la réaction chimique suivante afin de transformer le carbonate de calcium, présent en grande majorité dans le corail, en céramique hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) :



La variété de type de coraux permet d'obtenir des tailles moyennes de pores d'une grande diversité, cependant il existe une hétérogénéité de structure intra lot de fabrication, qui engendre des différences de reproductibilité biologique et mécanique. De bons résultats cliniques sont toutefois obtenus avec ce type de matériau.

1. 1. 3. Origine synthétique

Les différentes contradictions biologiques et les incertitudes sur le risque de contamination possible des produits dérivés ont conduit les industriels à rechercher de nouveaux produits de substitution de ces matériaux en réalisant des substituts osseux synthétiques. Leur élaboration relève des compétences croisées des chimistes, céramistes et biologistes, le but recherché étant de créer, à partir d'une phase synthétique une structure poreuse optimale, permettant un compromis entre une réponse biologique, une invasion osseuse et une bonne tenue

mécanique.

La réactivité des biomatériaux synthétiques dans le corps humain se classifie en trois catégories : ils peuvent être soit inertes, soit actifs, soit résorbables :

Un biomatériau est dit inerte lorsqu'il est stable dans le temps. Dans ce cas, il ne réagit pas avec l'organisme (cas des implants en alumine) car ce dernier l'isole par encapsulation fibreuse.

Un biomatériau actif est caractérisé par des réactions superficielles qui ont lieu au bout de quelques jours avec les tissus de l'organisme et plus tard avec l'os. Une liaison intime s'établit entre l'implant de faible solubilité et l'environnement organique. Bien souvent, une recolonisation osseuse est observée dans le substitut sans que sa structure soit altérée. Cette catégorie de matériaux regroupe la famille des hydroxyapatites $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ denses ou poreuses et les vitrocéramiques (Ceravital, Bioverit)¹

Un biomatériau est résorbable lorsque sa solubilité est telle qu'une dégradation rapide de l'implant se produit dans l'organisme. Il s'agit par exemple du phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ou du sulfate de calcium, mais aussi des bioverres. Le premier verre bioactif a été mis au point par L.L. Hench en 1969¹⁻². Il s'agit d'un verre de composition molaire 46,1 SiO_2 – 26,9 CaO – 24,4 Na_2O – 2,6 P_2O_5 appelé le "45S5 de L.L. Hench" ou Bioglass®. Actuellement, ce verre est utilisé en chirurgie réparatrice dans de nombreuses parties du corps humain dont les osselets de l'oreille, les dents et les hanches.

Quel que soit le type de biomatériau utilisé, les qualités recherchées des substituts restent similaires. En effet, il doit être :

- non toxique,
- mécaniquement stable (pas de fracture ou de déformation excessive)
- insoluble ou résorbable à des différents taux selon les applications
- assimilable par l'organisme et donc ne pas déclencher de mécanisme de rejet.

Les biocéramiques sont déclinables sous diverses variétés de forme et de compositions (HydroxyApatite, TriPhosphateCalcium, mélange HA/TCP). Leur champ d'application est

vaste dès qu'il s'agit d'aider à la reconstruction osseuse d'une partie déficiente du squelette (Annexe 4).

I. 2. Verres bioactifs

Un verre est dit bioactif lorsque, immergé dans le fluide physiologique, il développe à sa surface une couche d'hydroxyapatite cristallisée carbonatée. Cette couche est, par sa composition en calcium et phosphore, similaire à la phase minérale de l'os. Elle permet ainsi au matériau d'être utilisé comme implant osseux dans un organisme humain.

Le premier verre bioactif a été mis au point par L.L. Hench et al. en 1969¹⁻². Les différentes étapes du mécanisme de bioactivité ont été observées par ces auteurs, sur le verre « 45S5 » et sont définies dans le chapitre I.

I. 3. Les matériaux bioactifs macroporeux

Un certain nombre de travaux de recherche sur les matériaux poreux ont été réalisés au début des années 1970, sur des céramiques poreuses³⁻⁴, des matériaux polymériques⁵⁻⁶ et métalliques⁷ et ont montré par essais *in vivo* qu'ils sont des candidats potentiels pour des implants poreux capables de réaliser une reconstruction osseuse. Les substituts osseux en céramique ont une excellente résistance à la corrosion aqueuse, contrairement aux matériaux métalliques.

Différentes techniques permettent de concevoir des matériaux macroporeux à partir de poudre de céramique ou de verre bioactif. Ces procédés sont réalisés soit par voie sèche, soit par voie humide. Ils sont essentiellement basés, soit sur la réplique d'une structure poreuse existante, soit en utilisant des agents porogènes (liquides ou solides), capables de générer une porosité lors du cycle de fabrication. Les techniques de fabrication les plus utilisées sont décrites dans les paragraphes suivants.

1. 3. 1. Elaboration de matériaux bioactifs macroporeux par thermoformage

H. Ylänen et al.⁸ ont travaillé sur des verres bioactifs contenant SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5 , K_2O et MgO . Les verres ont été broyés puis la poudre obtenue est rendue sphérique par pulvérisation dans une flamme d'acétylène oxygène.

Des moules en acier sont percés en utilisant des forés de 4 mm de diamètre. Ces trous cylindriques sont remplis de billes de verre, et l'ensemble est placé dans un four réalisant le traitement thermique à haute température. Le frittage de ces billes a permis d'obtenir un matériau poreux. La porosité des matériaux obtenus est contrôlée en limitant le procédé à l'utilisation d'une classe granulométrique de billes de verre comprise entre 250 et 300 μm . Plusieurs températures ont été testées afin d'optimiser le frittage. Les auteurs ont observé qu'un long frittage à basse température augmente le risque de dévitrification, contrairement à un frittage plus rapide à température plus élevée.

Un verre bioactif non poreux a servi d'étalon afin de comparer les résultats de bioactivité avec les échantillons macroporeux.

Il a été montré que le verre bioactif de composition massique $53 \text{ SiO}_2 - 6 \text{ CaO} - 20 \text{ Na}_2\text{O} - 4 \text{ P}_2\text{O}_5 - 12 \text{ K}_2\text{O} - 5 \text{ MgO}$ ne dévitrifie pas après un traitement thermique de 4 à 6 minutes à 760°C , contrairement au verre bioactif conventionnel, tel le verre de Hench. Les différents temps de frittage à 760°C (4 et 6 minutes) n'influencent pas la porosité obtenue (30 %), ni les résultats de bioactivité. Les essais de bioactivité ont été réalisés en plongeant les échantillons dans du SBF pendant plusieurs semaines, l'apparition des différentes couches caractéristiques du processus de la bioactivité a été observée par spectroscopie Infra Rouge. Il s'avère que le gel de silice apparaît au bout de 3 jours pour l'échantillon poreux, par contre, même au bout de 7 jours, il n'existe toujours pas pour le verre non poreux. En outre, l'épaisseur de la couche d'HydroxyApatite Cristallisée est deux fois plus importante pour le verre poreux que pour le verre massif.

Cette étude a donc montré que le frittage de microbilles de verre bioactif permet d'obtenir une texture rigide et poreuse pour laquelle la surface de contact, plus grande avec le fluide physiologique que pour le verre massif, accélère la bioactivité. Ce procédé a permis d'obtenir un verre bioactif macroporeux à porosité contrôlée et ne cristallisant pas lors du frittage. Cependant, il ne permet pas de contrôler le diamètre d'interconnexions des pores. Les

techniques de fabrication les plus utilisées sont les suivantes.

I. 3. 2. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par la méthode des mousses-éponges

Q. Z. Chen et al.⁹ ont mis au point une technique dite de « polymère-éponge » permettant de réaliser des substituts osseux à base du verre 45S5 de Hench. Le polymère utilisé est une mousse de polyuréthane de porosité moyenne 90% servant de support pour la poudre. La Figure 1 schématise les différentes étapes de ce procédé d'élaboration.

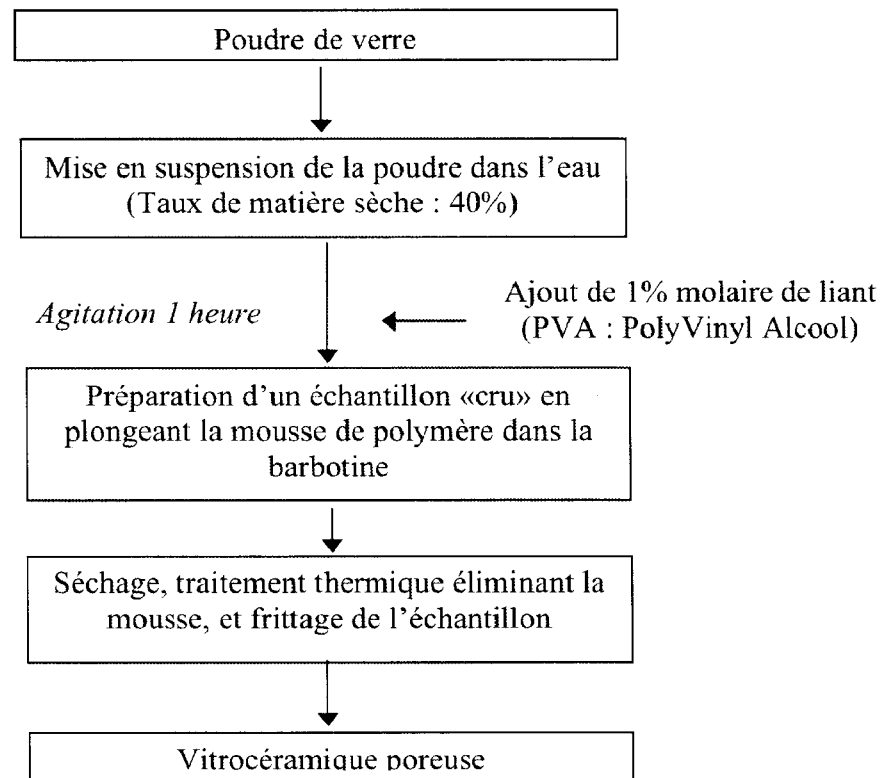


Figure 1 : Méthode d'élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par la méthode de mousse éponge

La mousse de polyuréthane, présentant une structure poreuse, est introduite dans la

barbotine pendant 15 minutes : la suspension de poudre de verre s'infiltré dans les porosités de la mousse de polyuréthane et les particules adhèrent à la surface de la mousse. L'excès de barbotine est évacué en pressant la mousse, laissant ainsi une épaisseur plus ou moins homogène à la surface de la mousse.

Après séchage, le polymère est éliminé par une montée en température assez lente afin de minimiser le risque de création de fissures au niveau de la structure de la vitrocéramique, dû à une élimination trop brutale des agents porogènes. Une fois le polymère complètement éliminé, un frittage est réalisé afin de densifier la structure.

Le cycle de traitement thermique appliqué à la structure lors du procédé est représenté à la Figure 2.

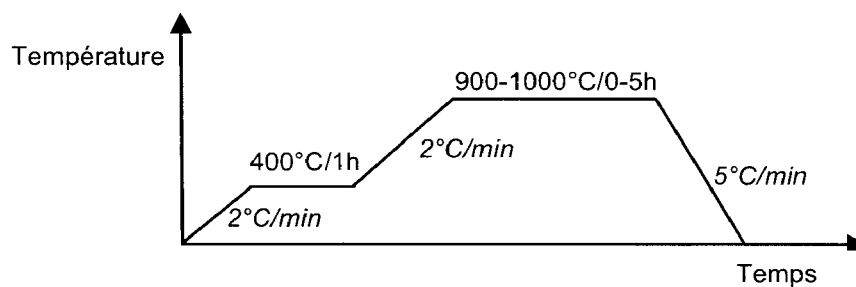


Figure 2 : Cycle de traitement thermique appliqué à la mousse de polymère imprégnée de poudre de verre

Une étude de frittage a montré qu'il existe un maximum de densification lorsque le traitement thermique est réalisé à 1000°C pendant 1 heure. Il a été observé qu'un frittage des particules 45S5 durant 5 heures à 900°C ne densifie pas correctement le matériau, alors que la densification augmente considérablement lorsque le matériau est chauffé entre 950°C et 1000°C. De cette étape de frittage résulte l'apparition de la phase cristalline $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$.

La combinaison d'une très forte densification associée à la présence de la phase cristalline améliore les propriétés mécaniques. La cristallisation n'étant pas totale, une vitrocéramique a été obtenue. Cette étude a montré que cette phase cristalline se transforme en une phase de

phosphate de calcium amorphe après 28 jours d'immersion dans du SBF. Ainsi, la phase cristalline ralentit le processus de formation de la couche d'HydroxyApatite. En effet, pour le verre de Hench, l'apparition de cette couche est observée en 6 heures d'immersion dans le SBF.

Les matériaux obtenus par l'utilisation de ces mousses permettent d'obtenir, après frittage, des macroporosités comprises entre 510 et 720 μm . Des tests de résistance mécanique ont montré que ces structures sont fragiles (0,3 à 0,5 MPa), elles peuvent cependant être utilisées comme comblement osseux dans des parties du corps humain ne nécessitant pas de grande résistance mécanique, l'os spongieux ayant une résistance à la compression comprise entre 0,2 et 4 MPa.

Finalement, ces auteurs ont obtenu une vitrocéramique hautement poreuse, mécaniquement suffisante pour le remplacement d'os spongieux, bioactive et biodégradable, mais dont la porosité n'est pas contrôlée.

J. A. Roether et al.¹⁰ ont également utilisé la méthode des mousses. En effet, le poly(DL-lactide) (PDLA : polymère synthétique : acide propanoïque, 2-hydroxy-, homopolymère [34346-01-5]) est un polymère qui, dissous dans du diméthylcarbonate sous agitation magnétique, donne une mousse. Cette mousse est ensuite versée dans un flacon et refroidie dans de l'azote liquide. Le flacon est connecté à une pompe qui fait le vide et permet la sublimation du solvant à -10°C dans les 48 heures. Le solvant résiduel est ensuite éliminé à température ambiante jusqu'à ce que la mousse atteigne une masse constante.

Cette mousse, de volume poreux environ 9,5 cm³/g, est alors recouverte de particules de Bioglass® de diamètre inférieur à 5 μm par deux techniques :

- Une barbotine contenant 42% massique de particules de Bioglass® dans de l'eau distillée a été réalisée sous agitation pendant 30 minutes. La mousse de PDLA subit un pré-traitement dans de l'éthanol à température ambiante, afin de diminuer son caractère hydrophobe. Elle est ensuite lentement plongée dans la barbotine et immergée pendant 5 minutes. La mousse infiltrée de particules de bioverre est retirée lentement de la barbotine afin d'éviter de l'endommager en l'extrayant trop rapidement. L'ensemble est alors lentement séché à température ambiante pour éviter les microfissures. La Figure 3 représente deux

micrographies de la structure du composite mousse de PDLLA/Bioglass® produit par le procédé par immersion dans la barbotine.

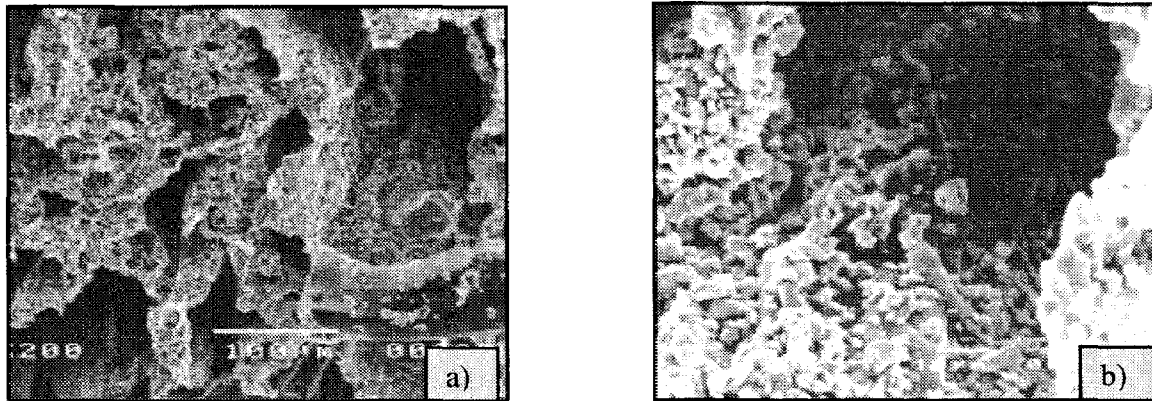


Figure 3 : Micrographie de la structure du composite mousse de PDLLA/Bioglass® produit par immersion

Cette technique a donc permis aux auteurs d'obtenir une couche stable et homogène, car il n'a été observé, par observations microscopiques, aucun déchirement ni décollement. De plus, des micrographies ont montré que les particules se sont également déposées le long de la surface interne de la structure poreuse (Figure 3a) et que la répartition des particules le long des parois est homogène (Figure 3b).

– Une méthode alternative par électrophorèse a permis d'infiltrer la mousse poreuse par les particules de verre. La mousse est préalablement traitée dans de l'éthanol, puis plongée dans une barbotine (42% massique de verre), contenant également des particules de céramique chargées. Le temps de l'électrodéposition a été fixé à 3 secondes avec une tension de 3V. Le composite est ensuite retiré de la barbotine, puis séché à température ambiante. La Figure 4 représente la cellule de déposition par électrophorèse (EDP) contenant la barbotine (particules de verre et de céramique chargée) dans laquelle est plongée la mousse de PDLLA. La Figure 5 représente le matériau obtenu par Electrodeposition.

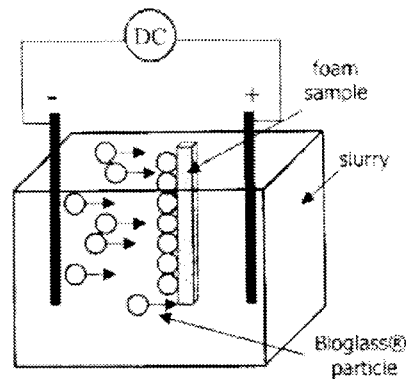


Figure 4 : Cellule d'EDP utilisée pour la fabrication du composite mousse de PDLLA/Bioglass®

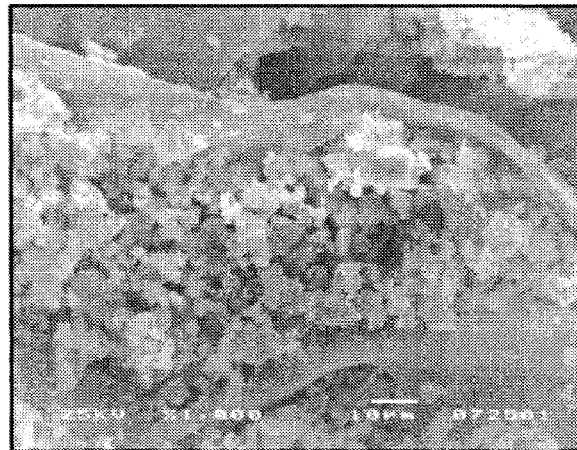


Figure 5 : Micrographie de la structure du composite mousse de PDLLA/Bioglass® produit par électrodéposition.

La Figure 5 montre que le procédé par électrophorèse a entraîné le dépôt d'une couche épaisse à la surface de la mousse, et un remplissage des pores, malgré une faible tension (3V) et un temps court (3s).

La comparaison des résultats obtenus par ces deux procédés a amené les auteurs à conclure sur l'avantage du procédé par immersion dans la barbotine. En effet, la technique de l'électrodéposition ne permet pas de conserver une structure macroporeuse. Par contre, l'immersion dans la barbotine permet de contrôler l'épaisseur de la couche produite par

l'infiltration des particules de Bioglass[®], et d'obtenir ainsi une microstructure plus uniforme. Puisque l'épaisseur et la microstructure de la couche de Bioglass[®] influencent le comportement de dégradation du matériau, une couche stable, d'épaisseur constante, uniforme et reproductible le long des parois des pores est un avantage primordial.

J. J. Blaker et al.¹¹ ont également travaillé sur cette technique de polymère-éponge, à partir du Bioglass[®] et du polymère poly (DL-lactide) (PDLLA). Le verre a été broyé jusqu'à l'obtention d'une granulométrie comprise entre 5 et 20 μm . Cette mousse est remplie avec 2 ou 15% massique de particules de verre bioactif, dans un solvant (diméthylcarbonate). La porosité obtenue montre des micropores d'environ 10 à 50 μm , ainsi que des macropores de 100 μm .

La méthode des mousses éponges permet ainsi d'obtenir des matériaux macroporeux issus de poudre de verre, dont les macroporosités peuvent être variées, mais restent toutefois non contrôlées.

I. 3. 3. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par « gelcasting »

P. Sepulveda et al.¹² ont utilisé la méthode de gelcasting. Le matériau utilisé pour réaliser des substituts macroporeux est l'HydroxyApatite (HA). La Figure 6 résume les différentes étapes de ce procédé d'élaboration.

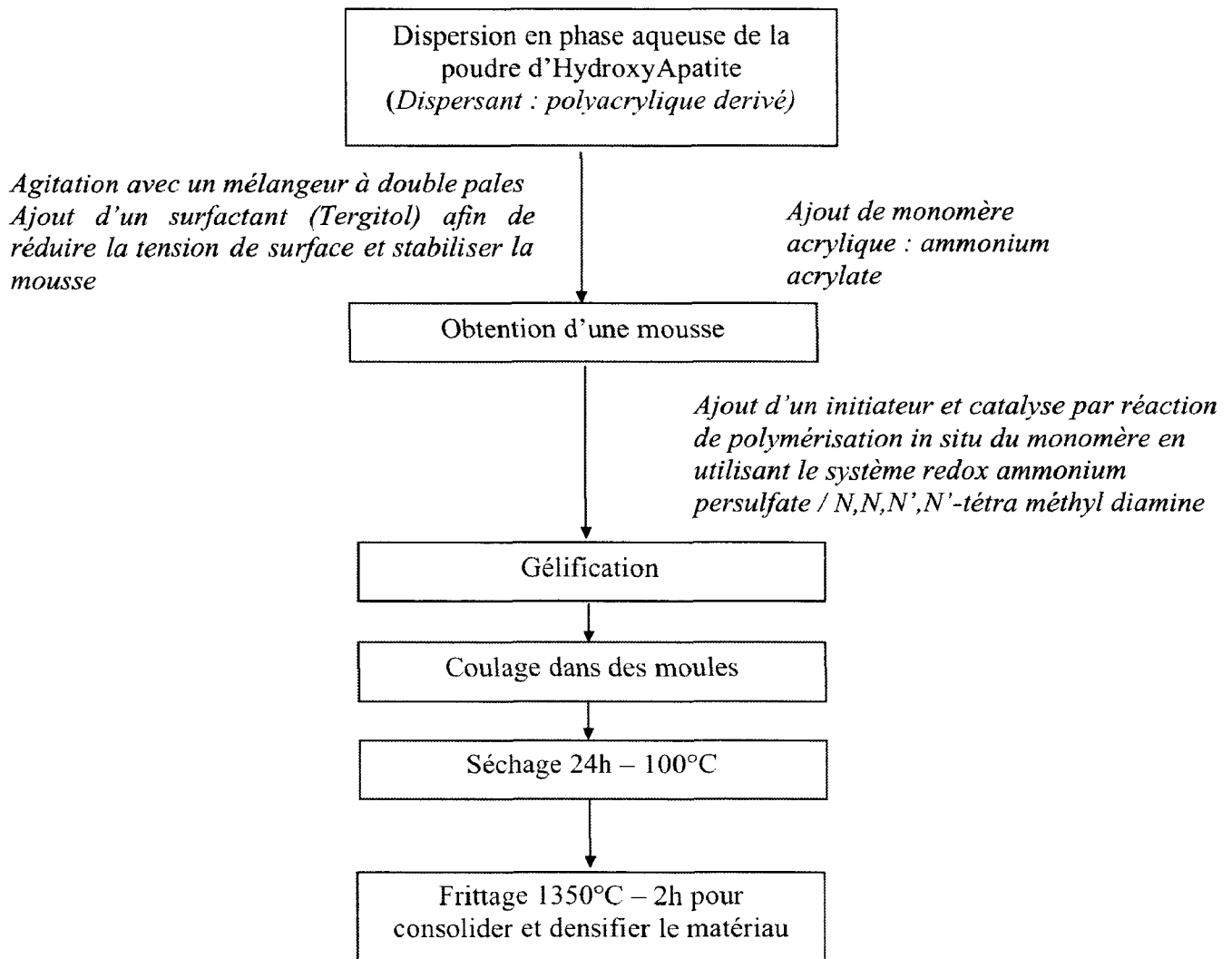


Figure 6 : Synoptique de la fabrication de structure macroporeuse par gelcasting

Ces auteurs ont ainsi élaboré, à l'aide de cette technique, des structures macroporeuses de porosité 80 à 85%, ayant une résistance à la compression comprise entre 1,6 et 5,8 MPa. Ces structures sont composées de différents types de pores dont la taille dépend de la température de frittage :

- des larges pores sphériques résultant des bulles de la mousse (entre 100 et 500 μ m), créées par l'agitation.
- des petits pores sphériques (entre 30 et 120 μ m).

Les diamètres des pores dépendent de la densité du matériau, et donc du frittage appliqué.

Cependant, les auteurs ont montré que le taux de densification des substituts n'influence pas le phénomène de reconstruction osseuse.

1. 3. 4. Élaboration de matériaux bioactifs macroporeux par procédé sol-gel

Des verres bioactifs macroporeux peuvent également être synthétisés par un procédé sol-gel, comme le verre 70S30C (70% de SiO₂ et 30% de CaO) d'après J. R. Jones et al.¹³.

Le protocole d'élaboration est le suivant :

- Le sol est préparé en mélangeant dans l'ordre les réactifs suivants :
 - eau distillée
 - 2N d'acide nitrique
 - tétraéthyl orthosilicate (TEOS)
 - nitrate de calcium
- Ajout de 1% massique de Teepol (détergent contenant un mélange de 15% de surfactant non ionique et 5% ionique), ainsi que 5% volume d'acide fluorhydrique (catalyseur pour accélérer la gélification).
- Lorsque le mélange se rapproche du point de gélification, la mousse est coulée dans des moules cylindriques.
- Les échantillons sont séchés puis stabilisés en réalisant un traitement thermique à 600°C, et enfin refroidis.
- Un frittage a été réalisé à 10°C/min pour différentes températures : 600°C (avec un palier de 1h) et 700, 800, 1000°C (avec un palier de 2h).

Les cylindres obtenus ont une densité moyenne de 0,25. Le matériau densifié est une vitrocéramique dont la phase cristallographique est la forme naturelle de la Wollastonite (β -CaSiO₃). La figure 7 montre la structure des pores aux différentes températures de traitement thermiques :

- 600°C : la structure est composée de macropores de diamètre supérieur à 500 μ m, connectés par des pores « fenêtre » de diamètre inférieur à 200 μ m. L'épaisseur des parois semble être de l'ordre du micron.
- 700°C : peu de changements sont observés. La taille des pores est légèrement inférieure et les parois plus épaisses que lors du frittage à 600°C.

- 800°C et 1000°C : La diminution des diamètres des pores entraîne une porosité maximale de 400µm, ce qui est dû à une augmentation de l'épaisseur des pores de la structure. Les macropores sont bien connectés entre eux et le diamètre d'interconnexions a diminué.

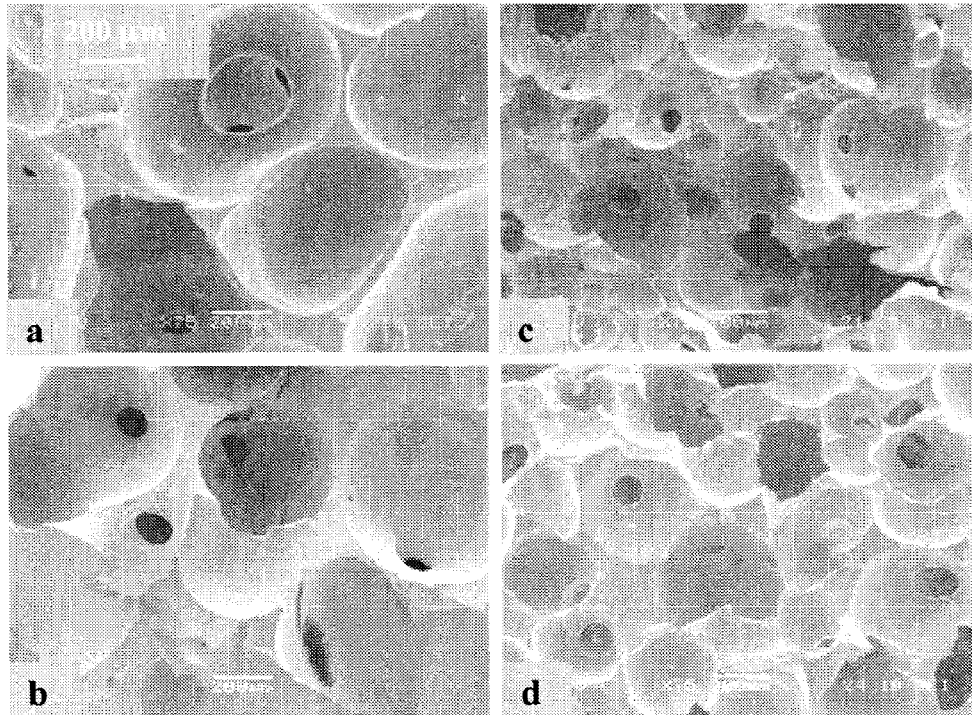


Figure 7: Micrographies SEM du verre 70S30C / mousse frittée aux températures (a) 600°C, (b) 700°C, (c) 800°C, (d) 1000°C

La dévitrification du verre est observée à partir de 800°C par croissance de la wollastonite naturelle β -CaSiO₃. Ce procédé permet d'obtenir une structure hiérarchisée présentant des macropores de diamètre pouvant atteindre 500 µm connectés par des fenêtres de pores ayant des diamètres supérieurs à 100µm, ainsi que des mésopores de 10-20 µm. La résistance à la compression de ces structures peut atteindre 2,26 MPa pour un frittage à une température supérieure ou égale à 800°C. Ces auteurs contrôlent la porosité de la structure en faisant varier les concentrations de tensioactifs et d'agent gélifiant, ainsi que la température de traitement thermique de la mousse.

I. 3. 5. Elaboration de matériaux bioactifs macroporeux par ajout de porogènes

I. 3. 5. 1. Porogènes liquides

M. Navarro et al.¹⁴ ont utilisé un verre de composition molaire 44,5% P₂O₅ - 44,5% CaO - 6% Na₂O - 5% TiO₂, afin de créer un matériau macroporeux en utilisant de l'eau oxygénée H₂O₂.

Le protocole d'élaboration est le suivant :

- le verre a été broyé dans un broyeur planétaire en agate, et tamisé afin de limiter la granulométrie à 30µm.
- la poudre de verre a été mélangée à une solution d'eau oxygénée (10% vol/vol), dans différentes proportions (40 et 60% par rapport au taux de matière sèche)
- le mélange homogénéisé a été coulé dans des moules en téflon placés 2 à 5 heures à 60°C. Cette étape a permis la formation de bulles dans la barbotine, par décomposition de l'eau oxygénée.
- les échantillons ont ensuite été traités thermiquement légèrement au-dessus de la température de transition vitreuse du verre (533°C), c'est-à-dire à 540 et 570°C pendant 2 et 3 heures.
- des cylindres de porosité comprise entre 40 et 55% sont alors obtenus.

Les observations concernant la macroporosité sont reportées dans le Tableau 1.

Pour l'ensemble des essais, il a été observé que la cristallisation augmente avec le temps de frittage et avec la température. Les phases cristallines sont α -CaP₂O₇, δ -Ca(PO₃)₂ et β -Ca₂P₂O₇.

Leur procédé permet donc d'obtenir des vitrocéramiques macroporeuses à partir de poudre de verre. Les porosités sont ouvertes et fermées et la porosité moyenne est de 40 à 55% en fonction du taux massique d'H₂O₂ mélangé au verre. Toutefois, les auteurs n'ont pas pu contrôler la porosité et n'ont pas conservé le caractère vitreux du verre.

Température de frittage - durée - % d'H ₂ O ₂	Observations
540°C – 3h – 40%	Structure principalement formée de longs pores elliptiques résultants de l'interconnection des petits pores Plus haut degré d'interconnection
540°C – 3h – 60%	Prédominance de larges pores elliptiques et de pores arrondis Diamètre des pores >500µm
540°C – 2h – 40% ou 60%	Particules de verre à peine densifiées
570° - 2h ou 3h – 40 ou 60%	Structure principalement formée de longs pores elliptiques dus à l'interconnection de petits pores Plus haut degré d'interconnection Diamètre des pores >500µm

Tableau 1 : Observation des différents échantillons après frittage

I. 3. 5. 2. Porogènes solides

Les agents porogènes solides utilisés se présentent sous différentes formes (poudres, billes ou fibres) et proviennent de plusieurs origines :

- origine naturelle : l'amidon de pomme de terre, la cire ou la cellulose,
- origine synthétique : les polymères (polyéthylène, polyester)
- origine organique : camphre, menthol, paraffine

M. H. Prado da Silva et al.¹⁵ ont élaboré des matériaux bioactifs macroporeux issus de bioverres et d'HydroxyApatite. Ces matériaux ont été brevetés et sont connus sous le nom de GR-HA¹⁶ (Glass Reinforced-HydroxyApatite). Il s'agit d'un mélange de poudre de bioverre de composition molaire 75P₂O₅-15CaO-10CaF₂, et d'HydroxyApatite (HA : (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) préparé par voie humide dans de l'éthanol anhydre et mélangé pendant 12 heures au broyeur planétaire. Leur procédé d'élaboration repose sur l'addition de porogènes formant des petits

pores (amidon de pomme de terre) et de larges pores (coque d'amande et billes de cire). Le schéma de la figure 8 regroupe les différentes étapes de leurs procédés.

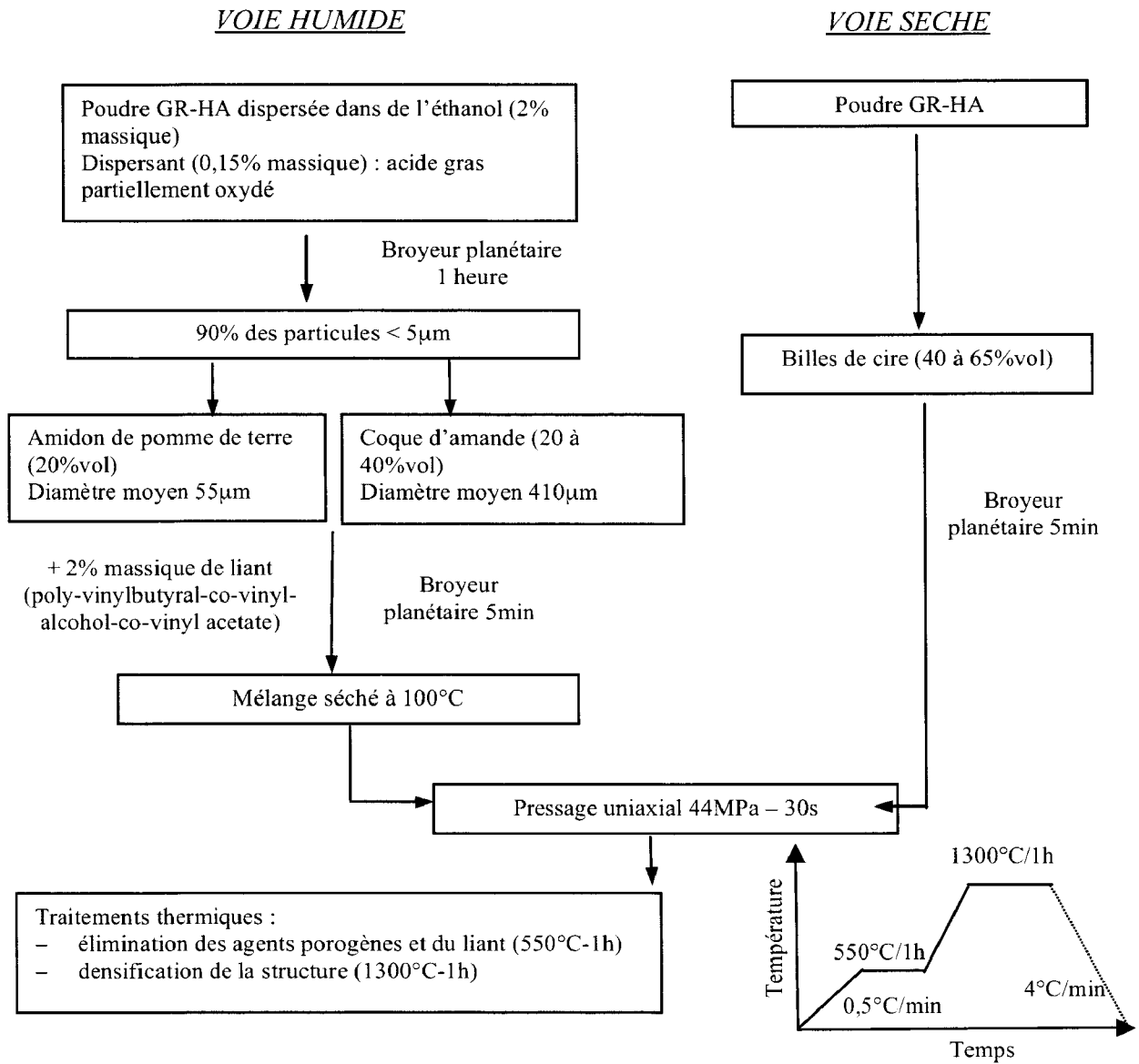


Figure 8 : Synoptique des différentes étapes d'élaboration de matériaux bioactifs macroporeux

Lorsqu'un verre composé de phosphate de calcium est mélangé à de l'Hydroxyapatite et que l'ensemble est densifié, les phases réagissent entre elles pour donner du β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) ou le α -Tricalcium Phosphate (α -TCP) plus soluble que l'HA.

Ces deux techniques ont permis à ces auteurs d'obtenir des matériaux macroporeux, dont le diamètre des pores dépend de la voie utilisée :

– la voie sèche permet ainsi d'obtenir des pores larges et interconnectés, dont la majorité ont un diamètre inférieur à 100 μm . La Figure 9 représente les photographies obtenues par microscope électronique à balayage (MEB) d'un matériau macroporeux obtenu par voie sèche. Cette figure montre que 40% en volume de billes de cire permet d'obtenir des macropores dans la structure, dont plus de 90% ont un diamètre supérieur à 236 μm et une majorité de 410 μm en moyenne.

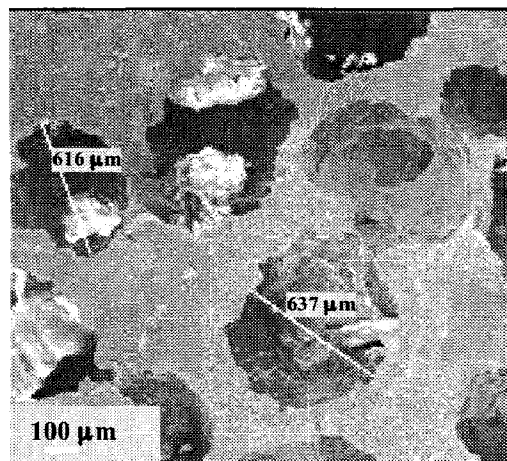


Figure 9 : Image MEB d'un macroporeux issu du procédé par voie sèche avec 40% en volume de billes de cire

– la voie liquide permet d'obtenir des micropores ($< 3 \mu\text{m}$ de diamètre) créés par l'amidon de pomme de terre, ainsi que des larges pores elliptiques dont la longueur du plus grand axe est inférieure à 50 μm . (Figure 10)

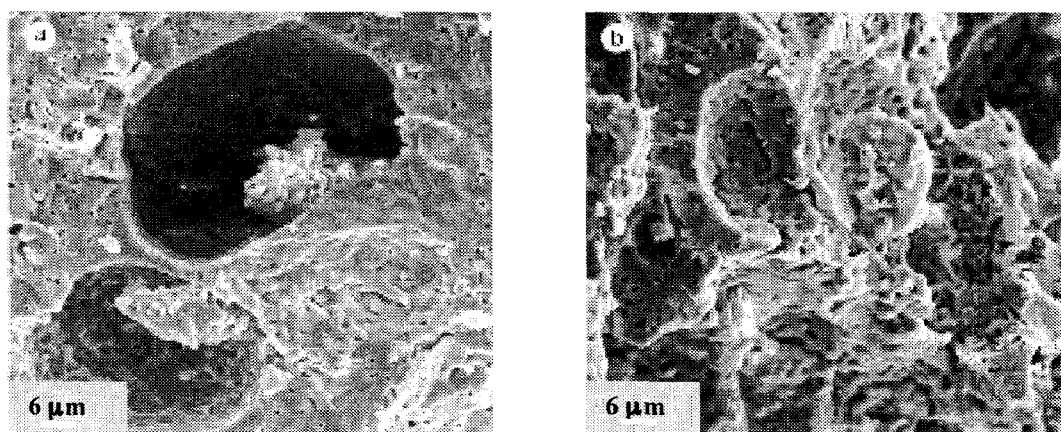


Figure 10 : Image MEB (a) : échantillon préparé avec 20 % en volume d'amidon de pomme de terre et 20 % en volume de croûte d'amande (b) : échantillon préparé avec 40 % en volume d'amidon de pomme de terre et 20 % en volume de croûte d'amande

Pour l'échantillon macroporeux préparé avec 20 % en volume d'amidon de pomme de terre et 20 % en volume de croûte d'amande (Figure 10a), deux types de pores sont créés : des larges pores et des petits pores inférieurs à 2 μm . L'utilisation d'une importante quantité d'amidon de pomme de terre (Figure 10b) produit beaucoup de petits pores, de diamètre inférieur à 3 μm .

Ces auteurs ont ainsi observé que la proportion et la nature des agents porogènes utilisés dans ces procédés par voie humide ou solide, permettent d'obtenir des porosités différentes (petits pores sphériques de diamètre inférieur à 3 μm , pores elliptiques de longueur d'axe inférieur à 50 μm). Cependant, la porosité des matériaux n'est pas rigoureusement contrôlée et ce dernier est complètement cristallisé (HA, α -TCP ou β -TCP).

I. 3. 5. 3. Porogènes solides structurés

Le « procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée »¹⁷, développé au Laboratoire des Matériaux et Procédés, et déposé par la société Biocétis, permet de réaliser des structures poreuses à partir de poudre

d'HydroxyApatite, de TCP ou d'alumine. La Figure 11 résume les différentes étapes d'élaboration de ces substituts osseux.

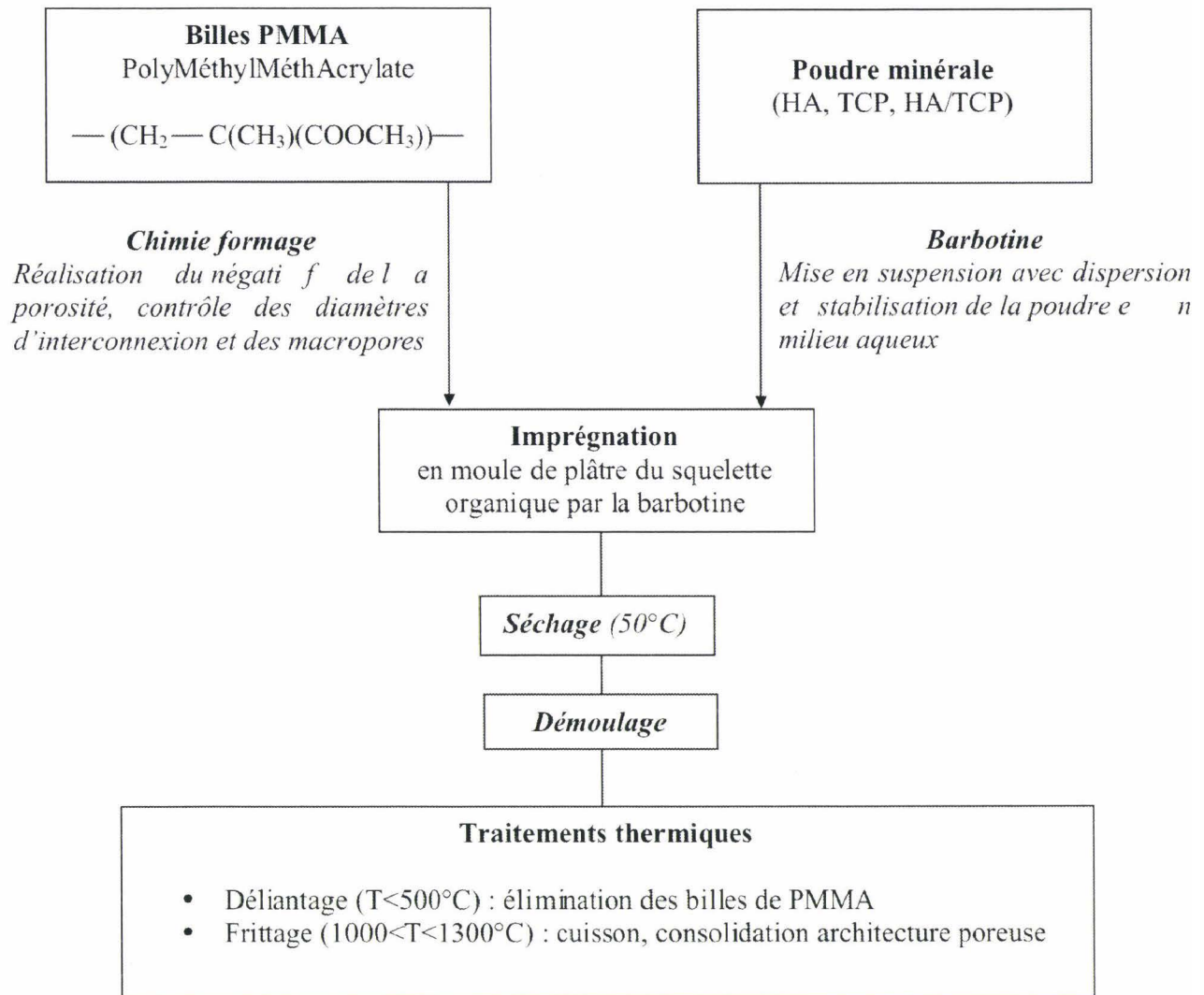


Figure 11 : Synoptique de l'élaboration de la biocéramique poreuse

Le concept de ce procédé est fondé sur l'imprégnation par une suspension de poudre d'un édifice constitué de billes polymériques soudées les unes aux autres. Lors du déliantage, l'élimination thermique de ces billes va générer la macroporosité de la céramique ainsi qu'une interconnexion entre les macropores, dont la dimension dépendra de l'amplitude du pontage entre les billes. La céramique macroporeuse est élaborée en suivant les quatre étapes suivantes:

I. 3. 5. 3. a. Elaboration de la structure porogène

La structure porogène est d'abord préparée à partir de billes de PolyMéthylMéthAcrylate (PMMA), polymère plastique, de structure amorphe. Le protocole est le suivant :

- les billes de PMMA sont tamisées afin d'obtenir la distribution granulométrique recherchée.
- une masse de billes est introduite dans un moule métallique.
- un solvant organique est ensuite introduit dans le moule métallique afin de dissoudre la surface des billes de PMMA et de réaliser un pontage entre celles-ci.
- un capteur de déplacement mesure le retrait de l'édifice organique situé dans le moule métallique. Lorsque le retrait désiré est atteint, la réaction de dissolution est arrêtée.
- un séchage est ensuite réalisé.

Une étude¹⁸ a été réalisée, permettant de corrélérer le retrait de l'édifice organique au diamètre de pontage entre les billes de PMMA. Cette préforme en billes de PMMA correspond au négatif de la structure macroporeuse souhaitée à partir de la poudre de matériau. Pour cela, cet édifice organique est imprégné par une barbotine de poudre de céramique micrométrique.

I. 3. 5. 3. b. Mise en suspension de la poudre de céramique (barbotine)

La préparation de la suspension de poudre céramique comprend les étapes suivantes

- dispersion (30 minutes au broyeur planétaire) de 70% en masse de poudre de matériau de granulométrie de l'ordre du μm dans de l'eau à l'aide d'un dispersant (polyméthacrylate d'ammonium ou DarvanC).
- Ajout de 4% de liant (latex en émulsion) et 0,1% d'agent mouillant (Dynol) par rapport au taux de matière sèche.

I. 3. 5. 3. c. Imprégnation de l'édifice organique

L'édifice organique en billes de PMMA est imprégné avec la barbotine. Pour cela, la poudre en suspension est coulée sur l'édifice organique, placé dans un moule de plâtre, permettant d'absorber le solvant, et d'obtenir un «cru».

I. 3. 5. 3. d. déliantage

Le cru est ensuite séché puis délianté d'après le cycle de traitement thermique de la Figure 12. Sous l'effet de la chaleur, les chaînes de PMMA dépolymérisent et s'éliminent, laissant des macropores dans la structure.

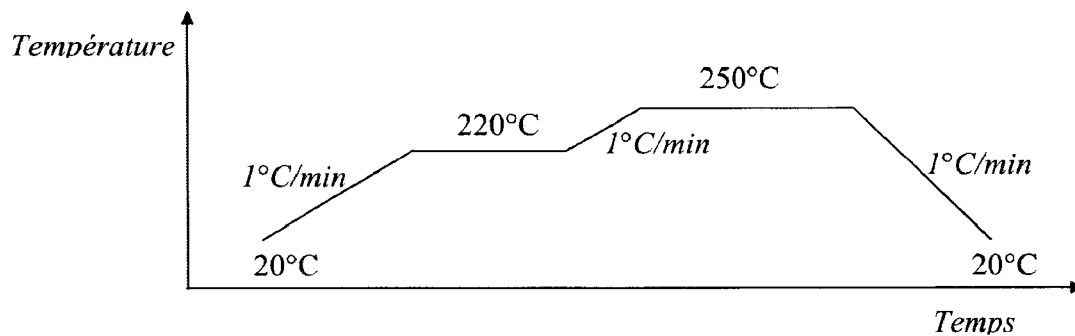


Figure 12 : Cycle de traitement thermique à basse température

I. 3. 5. 3. e. Traitement thermique à haute température

Afin de consolider le matériau délianté, celui-ci subit un traitement thermique de densification à 1400°C pendant 3 heures. Le cycle de frittage est présenté à la Figure 13.

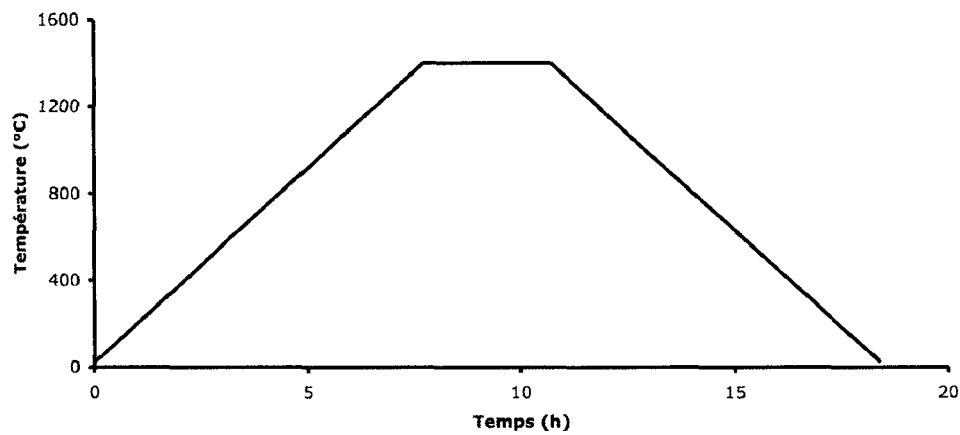
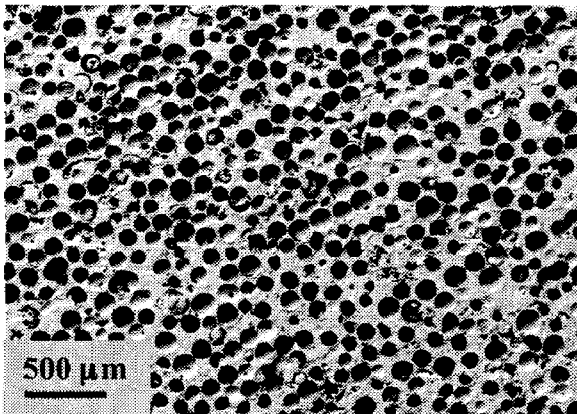
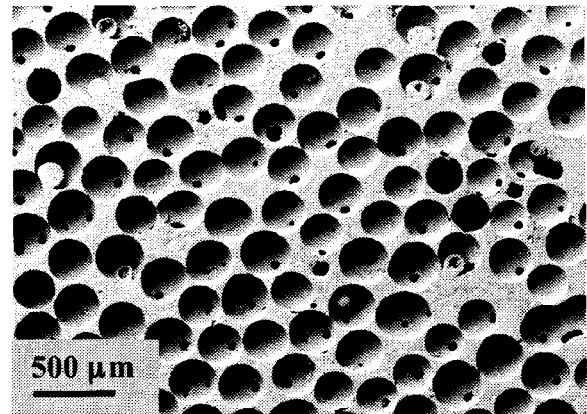


Figure 13 : Cycle de frittage

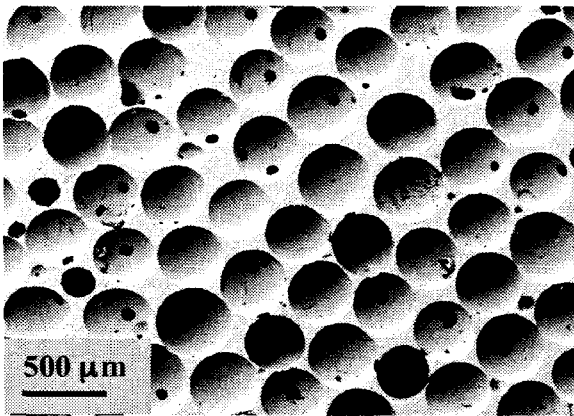
L'originalité de cette technique est d'élaborer des céramiques macroporeuses à porosité rigoureusement contrôlée. En effet, le diamètre des pores dépend directement de la taille des billes de PMMA utilisées et le diamètre des interconnexions est fonction du diamètre de pontage de la structure porogène réalisée précédemment. La Figure 14 représente les photographies MEB de quatre matériaux obtenus par ce procédé, ayant des porosités différentes (100-200, 300-400, 500-600 et 700-800 μm).



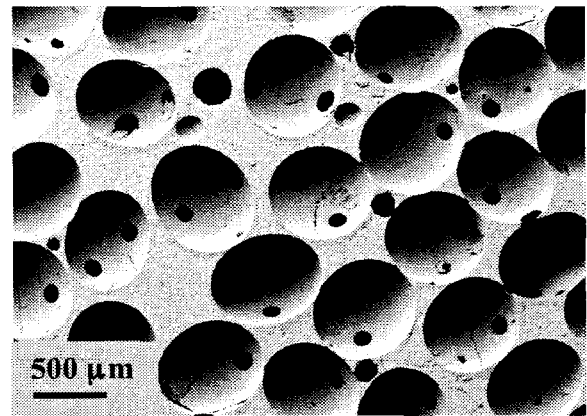
Diamètre de pore = 100-200 μm



Diamètre de pore = 300-400 μm



Diamètre de pore = 500-600 μm



Diamètre de pore = 700-800 μm

Figure 14 : Photographies MEB de structures macroporeuses en alumine à différentes porosités contrôlées

La Figure 15 représente les photographies MEB de quatre matériaux obtenus par ce procédé et ayant des diamètres d'interconnexions différents (110, 180, 240, et 280 μm).

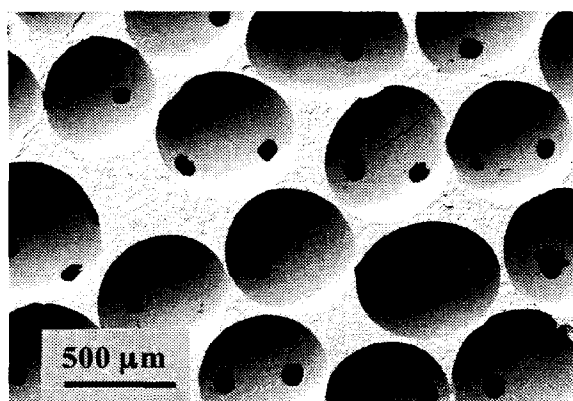
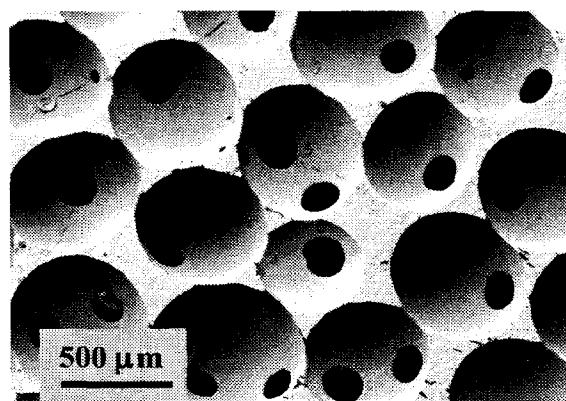
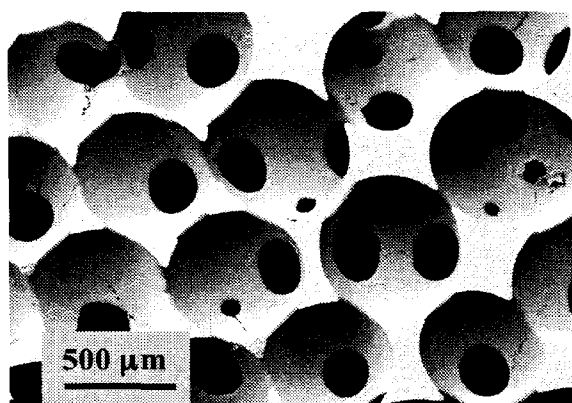
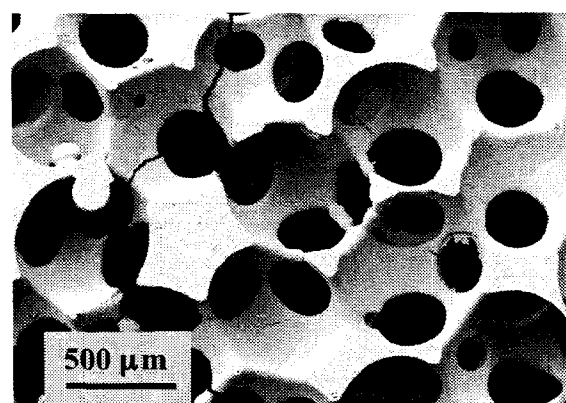
Diamètre de l'interconnexion = 110 μm Diamètre de l'interconnexion = 180 μm Diamètre de l'interconnexion = 240 μm Diamètre de l'interconnexion = 280 μm

Figure 15 : Photos MEB d'une structure macroporeuse en alumine avec des diamètres d'interconnexion contrôlés (110, 180, 240, et 280 μm)

1. 3. 6. Bilan de la littérature

En conclusion, le Tableau 2 résume les différentes techniques répertoriées dans la bibliographie et permettant de réaliser des matériaux bioactifs macroporeux, ainsi que les données les caractérisant (porosité, résistance à la compression, taille des pores).

Technique	Matériau	Porosité (%)	Taille des pores (mm)	Pores ouverts (O) ou fermés (F)	Force de compression (MPa)	Références auteurs
Polymère-éponge	45S5 Bioglass [®]	89-92	510-720	O	0,27-0,42	Q. Z. Chen ⁹
	45S5 Bioglass [®]	85-97,5	10-50 et 100	O	0,01-0,175	J. J. Blaker ¹¹
	verre-HA	86	420-560	O	0,21	S. Callcut ¹⁹
	HA	70-77	490-1130	O	0,55-5	X. Miao ²⁰
	β-TCP+HA	73	200-400	O	9,8	H. R. R. Ramay ²¹⁻²²
	45S5 Bioglass [®]		>100mm et 20-30	O		J. A. Roether ¹⁰
Gel casting/mousses	HA	80 – 85	100-500 et 30-120	O		P. Sepulveda ¹²
	Verre bioactif (70S30C)	70-95	>600	O-F	0,5-2,5	J. R. Jones ¹³
Addition de porogènes solides	GR-HA	20,8-59,2	0,1- 1000	O-F		M. H. Prado da Silva ¹⁵
Addition de porogènes solides architecture contrôlée	HA, TCP, alumine	70 - 80	10 - 1000	O - F	1 - 25	Brevet ¹⁷
Addition de porogènes liquides	Verre bioactif	40 à 55%	De 20 à 500 et >500mm	O-F		M. Navarro ¹⁴

Tableau 2 : résumé de la littérature – Techniques d'élaboration de matériaux macroporeux d'après les références 9-10-11-12-13-14-19-20-21 et 22

Pour élaborer le verre macroporeux, le procédé mis au point sur une céramique macroporeuse¹⁷ a été choisi, le laboratoire maîtrisant parfaitement ce type de mise en forme. De plus, c'est celui qui permet de fabriquer des matériaux à architecture contrôlée (taille des pores, des interconnexions et forme des matériaux).

II. ELABORATION D'UN VERRE BIOACTIF MACROPOREUX

L'élaboration d'un verre bioactif macroporeux passe par plusieurs étapes.

La première étape consiste à obtenir une poudre de verre de granulométrie proche du micromètre. Il a donc fallu mettre au point un processus de broyage adapté à ce type de matériau tout en s'affranchissant des problèmes de pollution du verre par le matériel de broyage et en vérifiant l'inertie du solvant vis-à-vis du matériau.

La deuxième étape passe par l'élaboration d'une barbotine apte à imprégner la structure d'un édifice organique.

Il faut ensuite éliminer le squelette organique par un traitement thermique de déliantage à basse température (250°C), puis densifier le verre à haute température afin de densifier les parois du verre. Pour cela, il a fallu optimiser les conditions de frittage.

Pour commencer, il nous a paru indispensable de rappeler les caractéristiques physico-chimiques du verre utilisé lors de cette étude.

II. 1. Caractérisations physico-chimiques

Le verre bioactif utilisé dans ces travaux de recherche, nommé P3C2, a une composition molaire chimique de 43,65 SiO₂ - 22,795 CaO - 30,555 Na₂O - 3 P₂O₅. Le verre obtenu par le protocole d'élaboration des verres, est analysé par un microscope électronique à balayage (MEB) couplé à un spectromètre par dispersion d'énergie (EDS) afin de vérifier sa composition chimique. Les résultats figurent dans le chapitre I.

Afin de vérifier le caractère amorphe de ce verre, une diffraction des Rayons X du verre P3C2 a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre automatique Siemens D5000 (Figure 16).

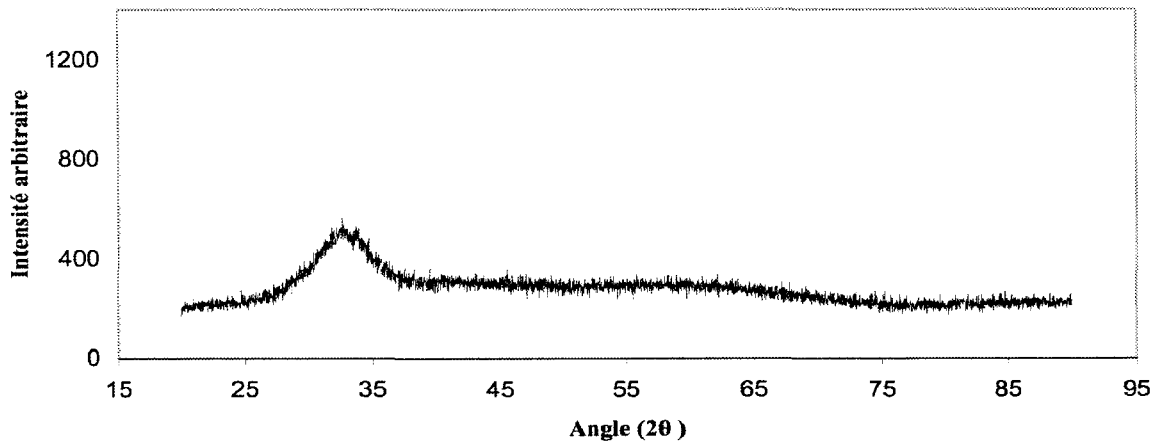


Figure 16 : Diffraction des Rayons X du verre P3C2

Le diffractogramme du verre montre une large raie pour une valeur de 2θ comprise entre 26° et 38° avec un maximum à environ 33° . Cette raie est caractéristique de la présence de silice dans le verre⁹⁻¹³. L'absence de raie fine ainsi que l'allure du diffractogramme indique que le verre P3C2 est totalement amorphe.

Des analyses thermiques différentielles (ATD) ont été réalisées sur de la poudre de verre P3C2 de granulométrie $2,5 \mu\text{m}$. Dans la littérature¹³, ces analyses sont généralement réalisées avec des cinétiques de chauffage de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. La courbe ATG a été obtenue à partir de cette vitesse de chauffe de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ pour 30 mg de poudre de verre.

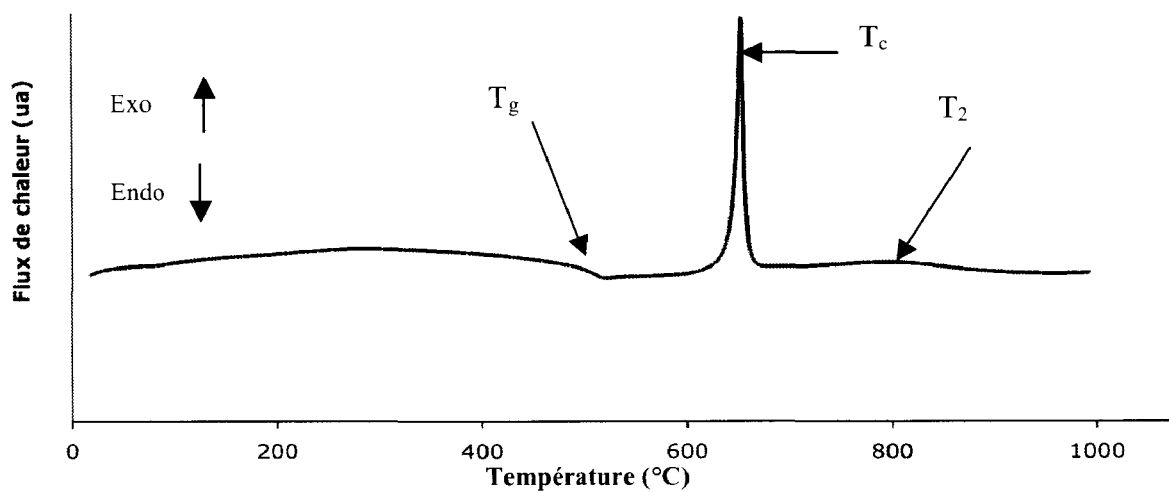


Figure 17 : ATD du verre P3C2 ($10^\circ\text{C}/\text{min}$)

Conformément à la littérature, le changement de la ligne de base observé à 509°C est attribué à la température de transition vitreuse T_g (cette température correspond au passage de la structure figée du solide vitreux à une structure mobile) et le pic exothermique correspond à la température de cristallisation T_c (=650°C). Ces valeurs peuvent être comparées à celles répertoriées pour des bioverres de composition 45SiO₂ - 24,5CaO - 24,5Na₂O - 6P₂O₅ (Bioglass®) par H. A. El Batal et al.²³. En effet, les auteurs ont noté un premier effet endothermique vers 499-550°C et un effet exothermique dans un domaine de température compris entre 689 et 883°C pour une vitesse de chauffe de 10°C/min.

Lors de l'étude du verre de Hench par L. Lefebvre et al.²⁴, les auteurs, en plus de la température vitreuse T_{g1} égale dans leur cas à 550°C et de la température de cristallisation T_c (=610°C), ont mis en évidence un deuxième changement de la ligne de base à la température de 850°C qu'ils ont appelé T_{g2} . Dans notre étude, nous constatons également un léger changement de la ligne de base à la température 830°C que nous allons noter T_2 .

La suite de l'étude nécessite une cinétique de montée en température de 3°C/min. Afin de connaître les températures caractéristiques du verre dans ces conditions expérimentales, nous avons réalisé une ATD à cette vitesse de chauffe (Figure 18).

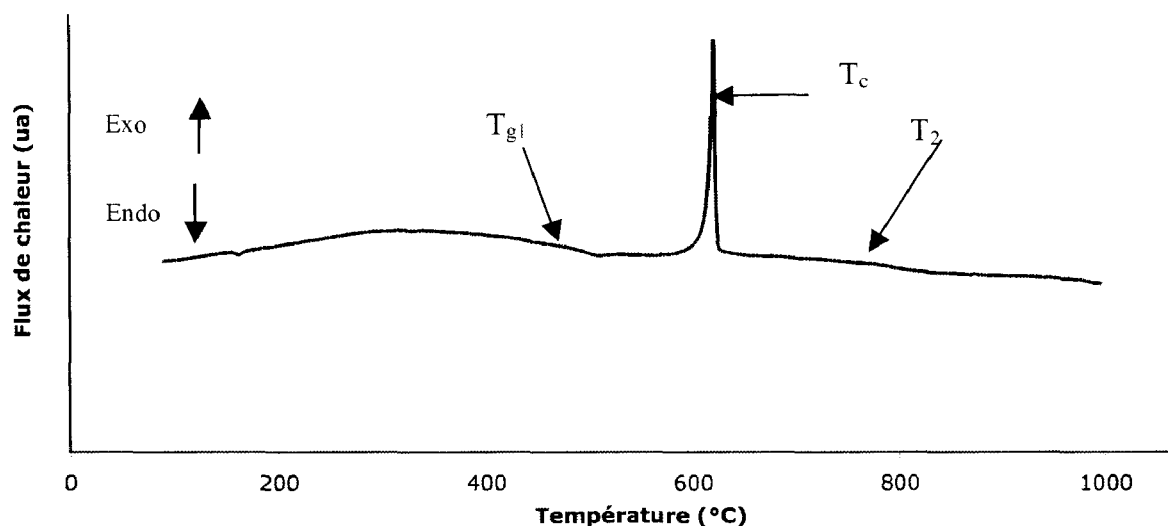


Figure 18 : ATD du verre P3C2 (3°C/min)

Les résultats des ATD (Figure 17 et Figure 18) sont regroupés dans le Tableau 3 et montrent que les températures de transition vitreuse et de cristallisation apparaissent à des températures plus faibles

lors de la montée en température réalisée avec une vitesse de chauffe de 3°C/min.

	Vitesse de chauffe	
	3°C/min	10°C/min
T _g (°C)	490	509
T _c (°C)	605	650
T ₂ (°C)	790	830

Tableau 3 : Températures caractéristiques du verre P3C2

II. 2. Protocole opératoire de broyage du verre

Le procédé d'élaboration de céramiques macroporeuses à porosité contrôlée a été mis au point, au laboratoire, sur des poudres phosphocalciques de granulométrie micrométriques¹⁷.

Afin de se rapprocher au maximum des conditions opératoires de ce procédé, un protocole de broyage a été réalisé pour le verre P3C2. Cette mise au point passe par le meilleur choix du matériel de broyage et du solvant. L'utilisation de la Spectroscopie de Dispersion d'Energie (E.D.S.) permet de contrôler la pollution éventuelle du verre par cette étape de broyage.

II. 2. 1. Choix du matériel de broyage et du solvant

II. 2. 1. 1. Essais de broyage réalisés dans l'eau distillée, avec un matériel en alumine (jarre et billes)

Le procédé mis au point au laboratoire sur les céramiques macroporeuses est basé sur l'eau. Il était alors important de vérifier si l'eau convenait à la réalisation du broyage de la poudre de verre, car l'utilisation d'un autre solvant implique une complète réadaptation de ce protocole.

II. 2. 1. 1. a. Suivi par MEB-EDS de la composition chimique au cours du broyage

Nous avons ainsi réalisé un broyage du verre dans une jarre en alumine, équipée de billes en alumine, en phase aqueuse. Des prélèvements de la suspension ont été effectués au cours du broyage, et ont été analysés par EDS. Les résultats ont permis d'analyser qualitativement et semi-quantitativement leur composition chimique.

Les figures suivantes (Figure 19 et 20) représentent les spectres obtenus par EDS, du verre après respectivement 1 heure et 6 heures de broyage.

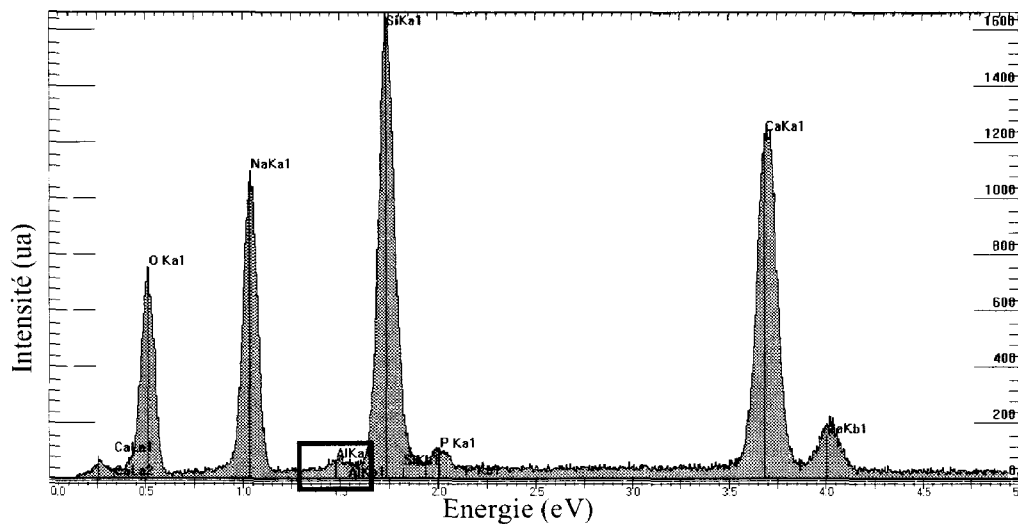


Figure 19 : EDS du verre P3C2 après 1 heure de broyage

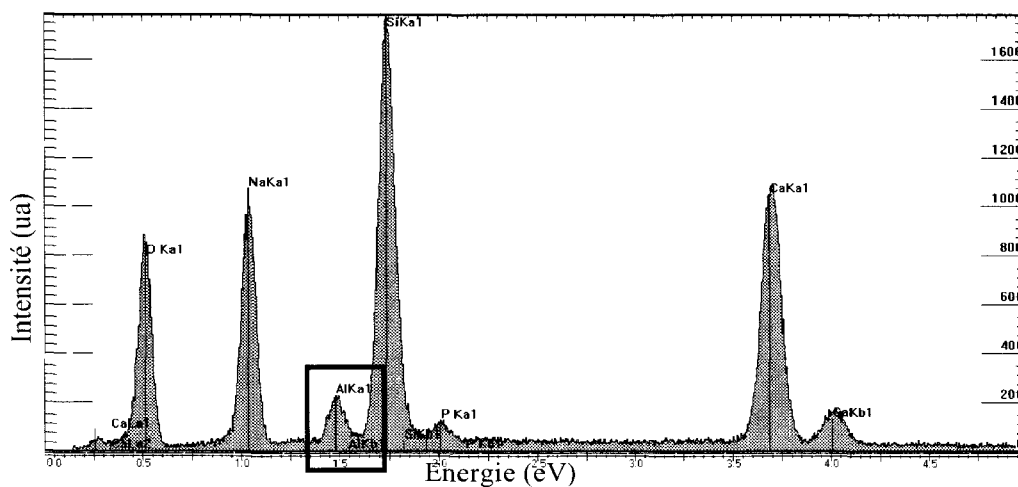


Figure 20 : EDS du verre P3C2 après 6 heures de broyage

Ces spectres présentent les pics caractéristiques des éléments calcium, silicium, sodium, oxygène et phosphore présents dans le verre. Un pic d'aluminium est également observé vers 1,5 eV, d'intensité plus importante au bout de 6 heures de broyage qu'après 1 heure. Ce pic indique une pollution par l'alumine de la poudre de verre lors du broyage.

Les éléments chimiques présents dans le verre (calcium, silicium, sodium, phosphore et aluminium) ont été dosés par une analyse semi-quantitative des spectres obtenus par EDS, l'oxygène étant pris comme complément à 100 %. Les pourcentages atomiques de ces éléments chimiques sont représentés sur la Figure 21 à différents temps de broyage.

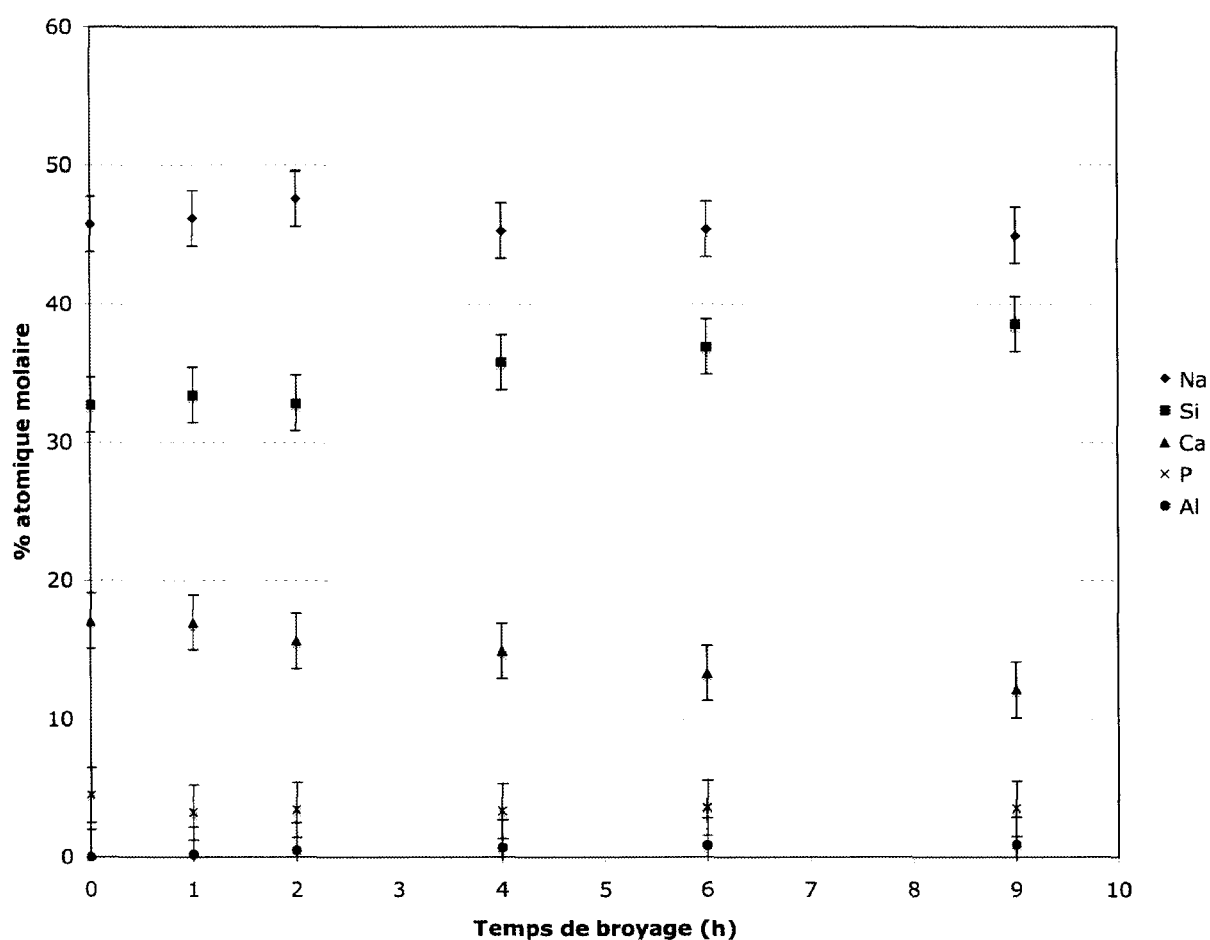


Figure 21 : Evolution du pourcentage atomique des éléments chimiques Si, Ca, Na, P et Al en fonction du temps de broyage (jarre et billes : alumine – solvant : eau)

Cette figure montre que les pourcentages atomiques de sodium, calcium et phosphore diminuent lorsque le temps de broyage augmente.

L'évolution des pourcentages atomiques de silicium, sodium, calcium et phosphore et aluminium en fonction du temps de broyage, ainsi que la variation calculée entre les pourcentages atomiques du verre initial (t=0h) et ceux de la poudre de verre broyée 9 heures sont rassemblés dans un tableau récapitulatif (Tableau 4).

Temps (h)		0	1	2	4	6	9	variation (%)
% atomique ± 2%	Na	45,75	46,17	47,60	45,26	45,39	44,92	-1,8 %
	Si	32,68	33,39	32,82	35,79	36,88	38,53	+17,9 %
	Ca	17,07	16,98	15,64	14,90	13,31	12,12	-29 %
	P	4,49	3,25	3,43	3,35	3,57	3,51	-22 %
	Al	0	0,22	0,51	0,70	0,85	0,92	

Tableau 4 : Pourcentages atomiques des éléments O, Na, Si, Ca et P et Al au cours du broyage (solvant : eau)

En ce qui concerne le taux de pollution par la jarre en alumine en fonction du temps de broyage, le pourcentage atomique d'aluminium dans le verre augmente au cours du broyage, et atteint 0,92 % après 6 heures de broyage (Tableau 4). Cette augmentation met en évidence la pollution du verre par l'alumine.

Le pourcentage atomique en sodium varie de 45,75 % à 44,92 % après 9 heures de broyage, ce qui correspond à une perte d'environ 1,8 %. Le pourcentage atomique en silice augmente d'approximativement 17,9 %, et les pourcentages atomiques en calcium et phosphore diminuent respectivement d'environ 29 et 22 %. Cette perte montre que le verre réagit avec l'eau, la poudre finale obtenue au terme du broyage n'a plus la même composition chimique molaire que le verre initial, et peut donc avoir des propriétés physico-chimiques différentes.

Afin d'observer les variations structurales que le broyage en milieu aqueux entraîne sur le réseau vitreux, nous avons réalisé une étude par spectroscopie Infra-Rouge, de prélèvements effectués au cours du broyage du verre.

II. 2. 1. 1. b. Étude par Spectroscopie Infra-Rouge

Afin de distinguer les liaisons chimiques présentes dans le verre et leurs modifications au cours du broyage, une étude par Spectroscopie Infra-Rouge a été réalisée sur le verre broyé en présence d'eau. Les spectres obtenus sont comparés au spectre du verre initial.

Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre Infra Rouge à transformée de Fourier (IRTF) Paradon 1000 Pc Perkin Elmer. Une presse hydraulique permet de réaliser les pastilles à base de poudre de verre et de KBr.

La Figure 22 représente le spectre Infra Rouge du verre P3C2 avant broyage.

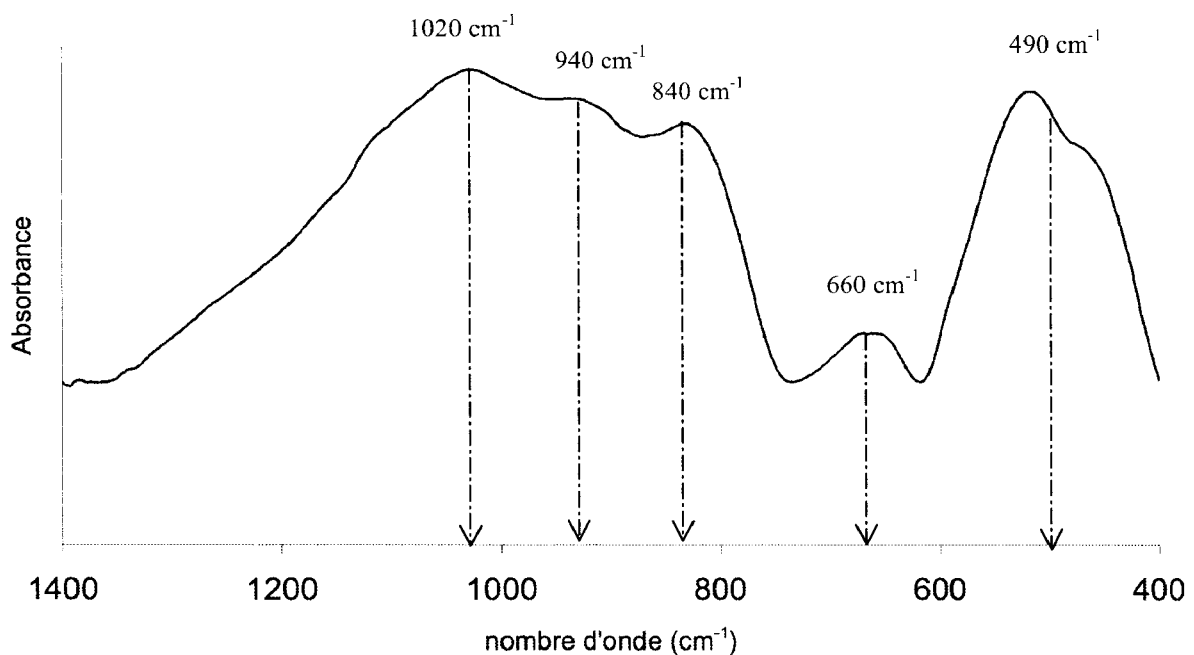


Figure 22 : Spectre IFTR du verre P3C2

Afin de simplifier la discussion, nous avons noté BO (Bridging Oxygens) les oxygènes engagés dans une liaison avec des atomes de silicium, et NBO (Non Bridging Oxygens), les oxygènes engagés dans une liaison avec un atome de silicium et une liaison ionique avec Na^+ ou Ca^{2+} .

D'après les travaux de recherche d'I. Lebecq et al.²⁵, la bande située à 1020 cm^{-1} , est attribuée à

une vibration d'élongation asymétrique de la liaison Si-O dans des tétraèdres SiO_4 ($\nu_{\text{as Si-O}}$), reliés entre eux par les 4 oxygènes (4BO). La deuxième bande à 940 cm^{-1} correspond à une vibration d'élongation de liaison Si-O dans des unités SiO_4 ($\nu_{\text{Si-O}}$) avec deux oxygènes non pontés (2NBO). L'épaule à 840 cm^{-1} est attribuable à la vibration d'élongation de Si-O dans SiO_4 avec 2NBO. La troisième bande à 660 cm^{-1} correspond à une vibration d'élongation symétrique de la liaison Si-O ($\nu_{\text{s Si-O}}$) dans les tétraèdres SiO_4 avec les 4 oxygènes pontés (4BO). Enfin, la bande à 490 cm^{-1} indique une vibration de déformation angulaire Si-O-Si entre les tétraèdres SiO_4 ($\delta_{\text{Si-O-Si}}$).

Le réseau vitreux est principalement un réseau de silice où le phosphore est présent en trop petite quantité, ce qui explique l'absence de bandes correspondant aux vibrations des liaisons P-O. Cependant, un léger épaulement est observable sur certains spectres à 590 cm^{-1} pour des taux de phosphore légèrement plus importants, pouvant être attribué à une vibration de déformation asymétrique mettant en jeu un groupement P-O ($\delta_{\text{as P-O}}$).

La Figure 23 rassemble les spectres obtenus sur des échantillons prélevés après différents temps de broyage.

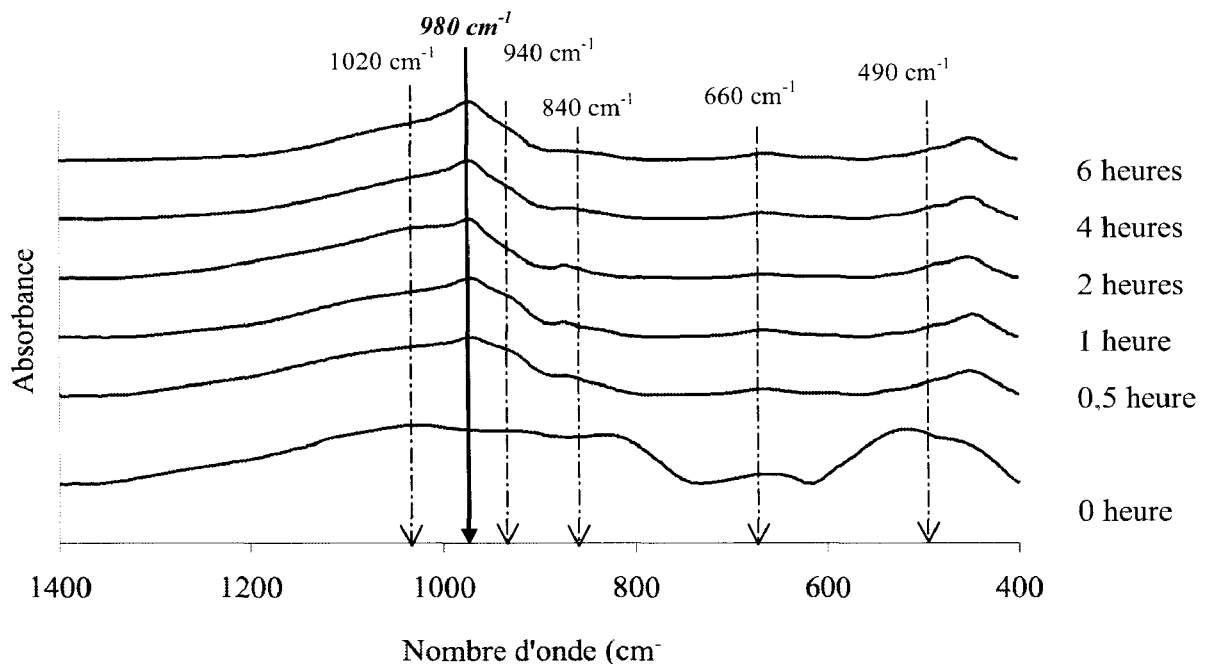


Figure 23 : Spectres IFTR du verre P3C2 en fonction du temps de broyage (Solvant : eau distillée)

L'analyse de la figure montre que dès le début du broyage, l'intensité de certains pics diminue ce qui signifie que des liaisons du verre disparaissent progressivement. Cette diminution est due aux ruptures des liaisons lors du broyage. En effet, la bande située à 1020 cm^{-1} , attribuée à une vibration d'élongation asymétrique de la liaison Si-O dans des tétraèdres SiO_4 reliés entre eux par les 4 BO, a tendance à diminuer au cours du broyage ce qui montre que le verre contient de moins en moins de liaison Si-O. L'intensité de la bande située à 840 cm^{-1} a tendance également à diminuer, ce qui montre que le broyage entraîne une diminution du nombre de liaisons Si-O située dans les tétraèdres SiO_4 avec 2NBO. Les bandes situées à 660 cm^{-1} et 490 cm^{-1} diminuent aussi en intensité au cours du broyage signifiant respectivement la diminution du nombre de liaison Si-O avec les 4 BO, et la diminution des liaisons Si-O-Si entre les tétraèdres SiO_4 . L'apparition de certaines bandes notamment vers 980 cm^{-1} témoigne la formation de liaisons dans le verre. Il s'agit d'une bande de vibration d'élongation de Si-OH ($\nu_{\text{Si-OH}}$) attestant la présence de groupement silanols correspondant à la formation d'un gel de silice.

Cette transformation du verre en gel de silice au cours du broyage en phase aqueuse est un réel problème pour la suite du procédé d'élaboration de verre bioactif macroporeux. La structure du verre, ainsi que sa composition, est modifiée et transformée en gel. De plus, ce gel, lors du broyage, a tendance à durcir et à former des blocs lors du séchage. Ces blocs sont alors difficiles à mettre en solution pour l'étape suivante de l'élaboration du verre macroporeux.

À ce stade de l'étude, il a fallu choisir un autre solvant. D'autres solvants ont été testés : l'acétone, l'alcool à 95% et l'alcool anhydre. L'acétone et l'alcool à 95% ont conduit à des meilleurs résultats que ceux obtenus avec l'eau distillée. Cependant, la formation d'un gel de silice est observée pour des longs temps de broyage. Par contre, l'étude réalisée avec l'éthanol anhydre n'a pas présenté ce type de problème. C'est pourquoi, ce solvant a été choisi pour les autres essais de broyage.

II. 2. 1. 2. Essais de broyage réalisés dans l'éthanol anhydre, avec un matériel en alumine (billes et jarre)

Des essais de broyage ont été effectués en utilisant une jarre et des billes en alumine dans de l'éthanol anhydre. Les poudres broyées ont été analysées par EDS afin d'évaluer qualitativement et semi-quantitativement la pollution du matériau par l'alumine.

Une analyse semi-quantitative du taux d'aluminium présent dans la poudre de verre broyée a permis de déterminer un pourcentage atomique molaire de 1,2 % après 6 heures de broyage. Le taux de pollution par l'aluminium dû à l'utilisation de matériel en alumine lors du broyage est similaire pour le broyage à l'eau et à l'éthanol anhydre.

Afin d'éviter cette pollution, nous nous sommes équipés d'une jarre et de médias de broyage en agate. En effet, le coefficient d'usure de l'agate est beaucoup plus faible que celui de l'alumine, et, de plus, l'agate est composée exclusivement de silice.

II. 2. 1. 3. Essais de broyage réalisés dans l'éthanol anhydre, avec un matériel en agate (billes et jarre)

Un suivi du pourcentage atomique de chaque élément chimique constituant le verre a été réalisé par EDS, sur plusieurs échantillons prélevés au cours du broyage, afin de contrôler le niveau de pollution et d'observer les éventuelles modifications.

II. 2. 1. 3. a. Suivi par MEB-EDS de la composition chimique au cours du broyage

La Figure 24 représente l'évolution du pourcentage atomique des éléments chimiques Si, Ca, P et Na pour plusieurs échantillons prélevés au cours d'un broyage, réalisé avec de l'éthanol anhydre.

Cette figure montre que les pourcentages atomiques des éléments chimiques présents dans le verre restent constants au cours du broyage utilisant l'éthanol anhydre comme solvant. Nous avons cependant réalisé des analyses par Spectroscopie Infra-Rouge, comme lors du broyage en phase aqueuse, afin de vérifier que le broyage n'entraînait pas de modifications structurales.

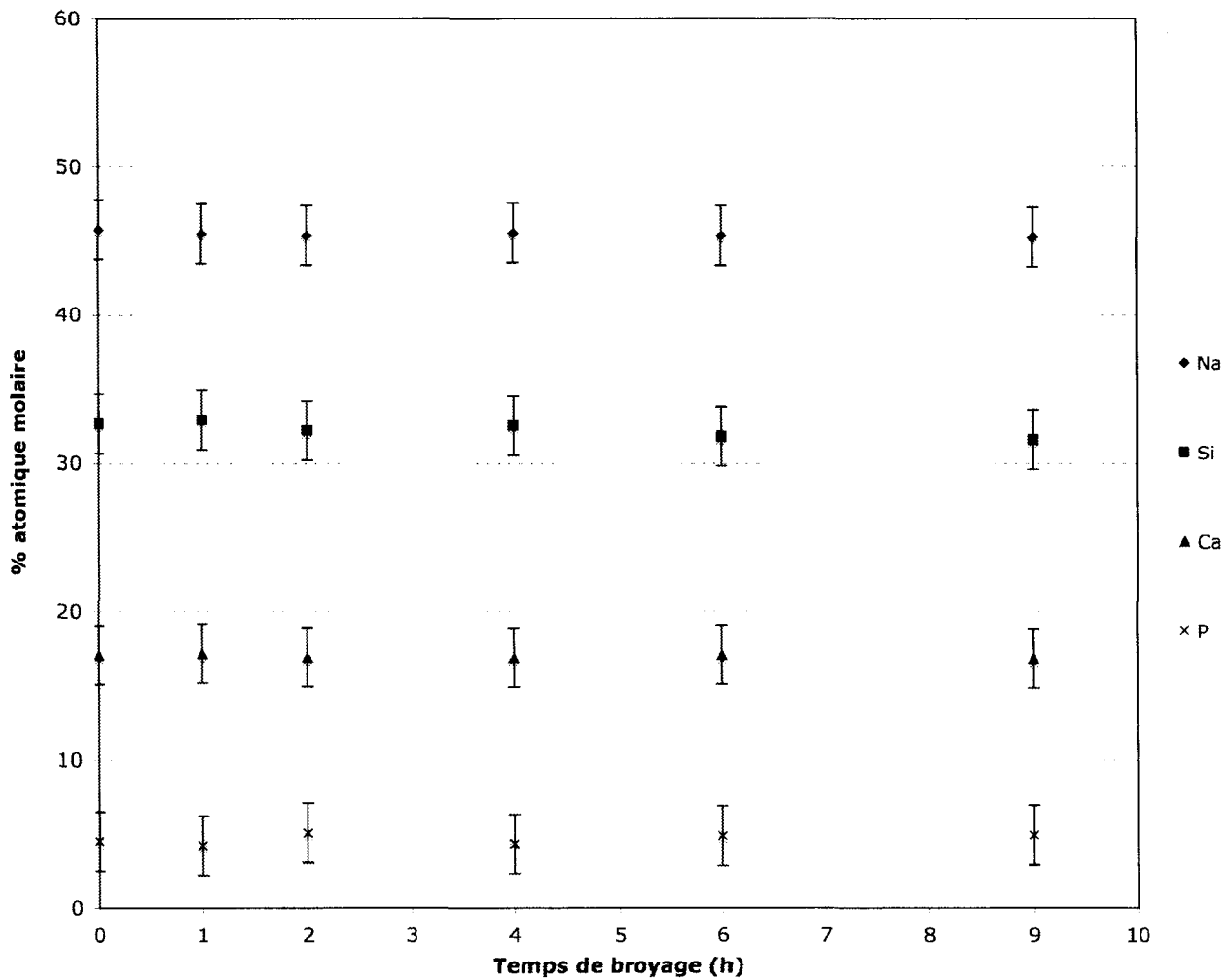


Figure 24 : Evolution du pourcentage atomique des éléments chimiques Si, Ca, P et Ca en fonction du temps de broyage (jarre et billes : agate – solvant : éthanol anhydre)

II. 2. 1. 3. b. Étude par Spectroscopie Infra-Rouge

La Figure 25 représente la superposition des spectres Infra-Rouge du verre P3C2 en fonction du temps de broyage à l'éthanol anhydre.

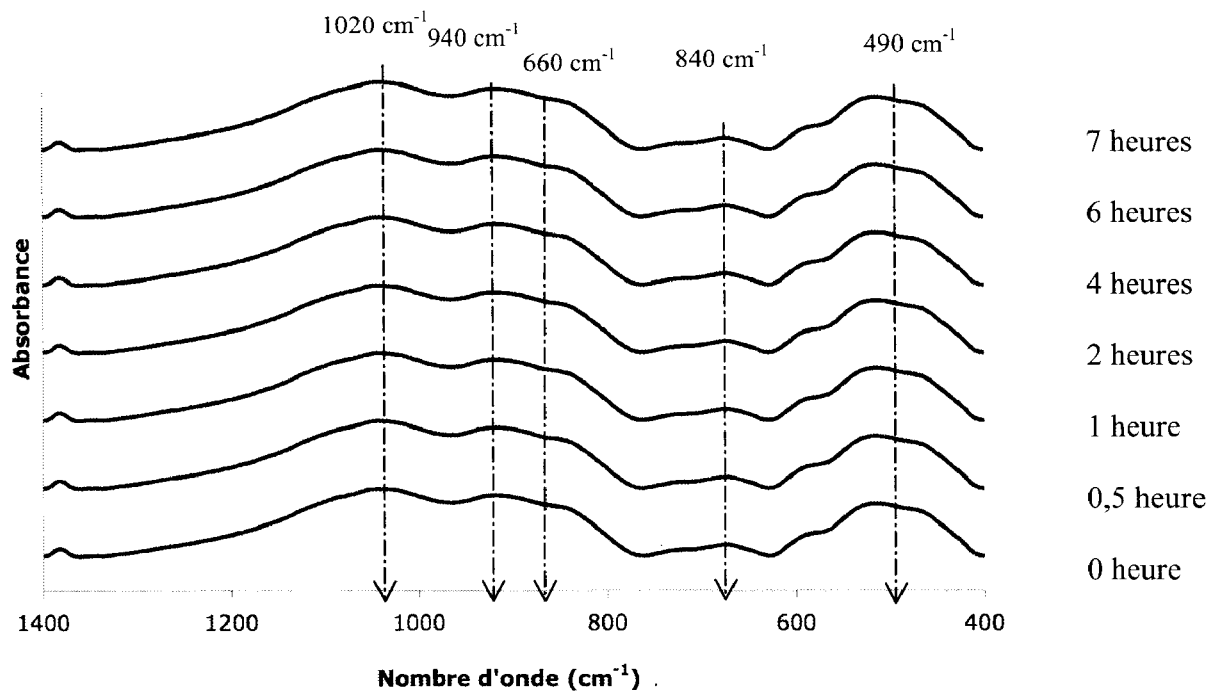


Figure 25 : Spectres IFTR du verre en fonction du temps de broyage
(Solvant : éthanol anhydre)

La figure 25 montre qu'il n'y a pas de variations d'intensité entre les différents spectres, et que contrairement au broyage en milieu aqueux, aucune bande supplémentaire n'apparaît. Le broyage à l'éthanol anhydre permet donc de conserver la composition chimique du verre P3C2 au cours du broyage, et sera donc sélectionné pour la suite de l'étude.

En conclusion à ces différentes études, l'utilisation de matériel en alumine (billes et jarre) pollue le verre de façon non négligeable. En ce qui concerne le broyage en milieu aqueux et l'utilisation de matériel (jarre et billes) en alumine, les analyses par EDS et Spectroscopie Infra-Rouge ont montré une variation très importante de la composition chimique du verre. En effet, le verre P3C2 de composition chimique molaire $43,65 \text{ SiO}_2 - 22,795 \text{ CaO} - 30,555 \text{ Na}_2\text{O}$ et $3 \text{ P}_2\text{O}_5$ donne une poudre de composition chimique molaire $48,32 \text{ SiO}_2 - 13,80 \text{ CaO} - 35,94 \text{ Na}_2\text{O}$ et $1,94 \text{ P}_2\text{O}_5$, après 9 heures de broyage dans de l'eau. Par contre, l'utilisation de l'éthanol anhydre comme solvant a montré que la composition chimique molaire initiale du verre P3C2 est conservée après 9 heures de broyage. Il n'a donc pas été observé de pollution dans le verre.

Pour la suite de l'étude, le broyage a été réalisé dans du matériel (jarre et billes en agate) avec l'éthanol anhydre comme solvant.

L'analyse granulométrique a permis, dans la suite de l'étude, d'évaluer l'influence de la durée du broyage sur la taille des particules de la poudre de verre.

II. 2. 2. Analyse granulométrique

En tenant compte des conclusions sur les essais préliminaires, un protocole de broyage a été mis au point afin de travailler dans des conditions identiques pour chaque broyage et obtenir ainsi un maximum de reproductibilité dans la répartition granulométrique de la poudre de verre. Le procédé est le suivant :

- le verre synthétisé est broyé grossièrement par un concasseur afin d'obtenir un verre sous forme pulvérulente.
- un tamisage permet de ne conserver que les particules de diamètre inférieur à 800 μm . La Figure 26 représente une micrographie de la poudre de verre tamisée.
- la poudre de verre est ensuite réduite par broyage planétaire. Le matériel utilisé est une jarre et un mélange de billes en agate. La poudre de verre est introduite dans la jarre, avec le solvant (alcool anhydre absolu), dans des proportions massiques 50/50. La poudre est broyée plusieurs heures, à la vitesse de rotation de 300 tr/min.
- le mélange est ensuite filtré et séché dans une étuve à 60°C.



Figure 26 : Micrographie MEB de la poudre de verre concassée puis tamisée à 800 μm .

Lors du broyage, différents prélèvements sont analysés par diffraction laser (Mastersizer MALVERN 2000) afin de déterminer la répartition granulométrique de la poudre de verre en fonction du temps de broyage. Un suivi de la granulométrie moyenne de la poudre de verre a été réalisé afin d'obtenir plusieurs classes granulométriques de poudres de verre. La Figure 27 présente l'évolution de la taille moyenne des particules de verre en fonction du temps de broyage.

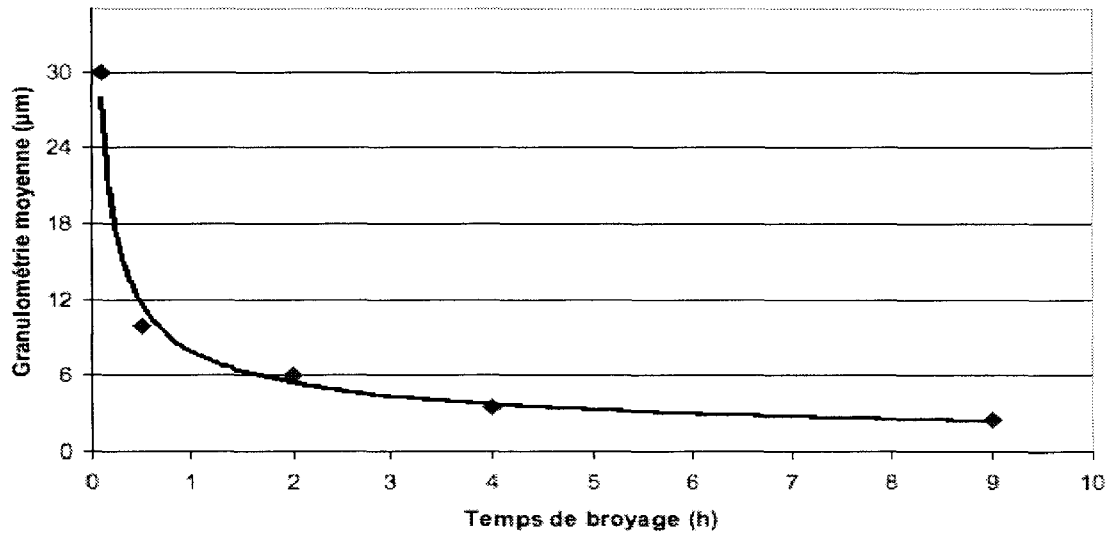


Figure 27 : Granulométrie de la poudre de verre en fonction du temps de broyage

Cette étude a permis de déterminer la durée de broyage nécessaire pour obtenir des poudres avec une granulométrie moyenne désirée.

Ainsi, cinq répartitions granulométriques ont été mises en évidence, et trois d'entre elles ont été sélectionnées pour la suite de l'étude : $d(50) = 30, 10$ et $2,5 \mu\text{m}$ (Tableau 5).

Temps de broyage (h)	0,5	1	2	4	9
Granulométrie moyenne ($d(50) \mu\text{m}$)	30	10	6	3,5	2,5

Tableau 5 : Granulométrie de la poudre de verre en fonction de la durée du broyage

La poudre la plus fine qu'il est possible d'obtenir par ce protocole est une poudre de verre de granulométrie moyenne $2,5 \mu\text{m}$. Les Figures 28 et 29 représentent respectivement la répartition

granulométrie et la morphologie de la poudre de verre après 9 heures de broyage. La micrographie MEB montre une large répartition granulométrique de la poudre de verre après broyage. La surface spécifique de cette poudre de verre a été mesurée et est égale à $2,12 \text{ m}^2/\text{g}$.

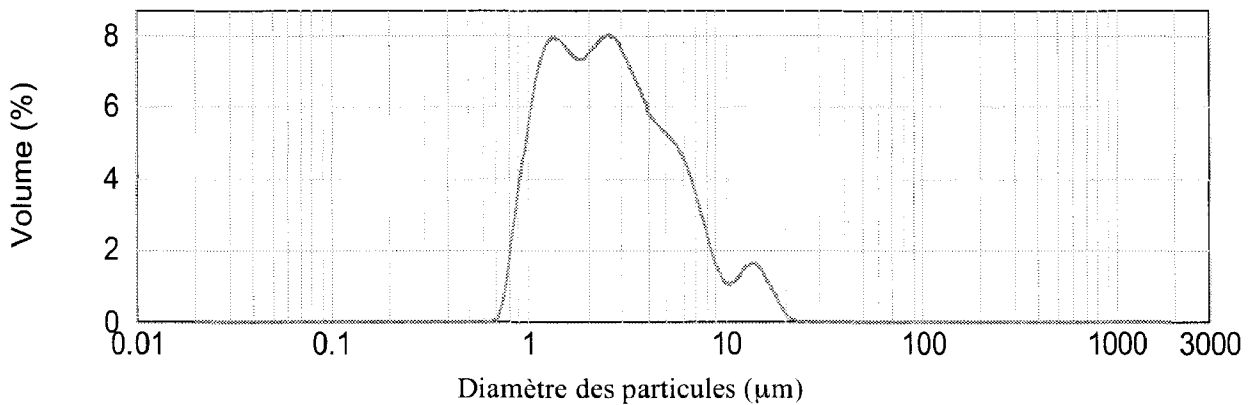


Figure 28: Répartition granulométrique de la poudre de verre après 9 heures de broyage

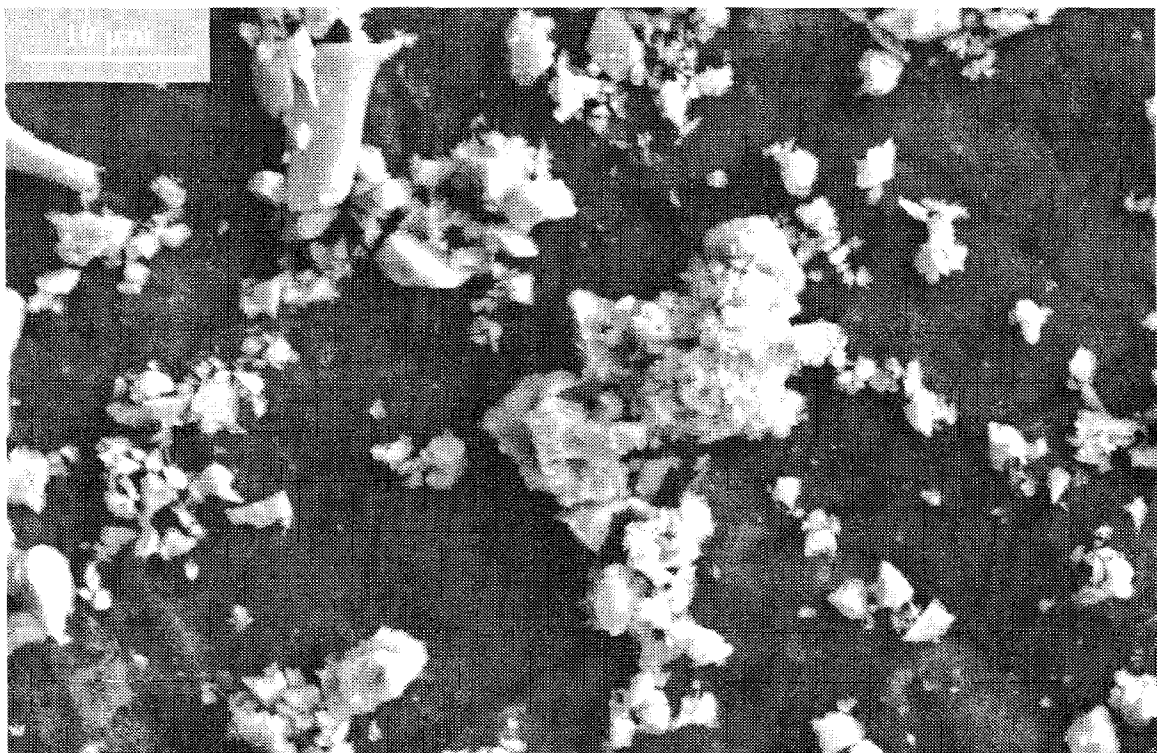


Figure 29 : Micrographie MEB de la poudre de verre après 9 heures de broyage ($2,5 \mu\text{m}$)

II. 3. Étude de frittage du verre bioactif

Afin de réaliser l'étude de frittage, nous avons utilisé deux techniques :

- la mesure du retrait des échantillons lors du frittage par dilatométrie
- la mesure de la densification lors du frittage, par mesure de la densité relative

En effet, D. C. Clupper et al.²⁶ ont réalisé des mesures de densification de pastilles réalisées à partir de poudre de verre 45S5 et frittées à différentes températures, et L. Lefebvre et al.²⁴ ont étudié le frittage de leur matériau issu de poudre de verre 45S5, par dilatométrie.

II. 3. 1. Dilatométrie des éprouvettes de verre P3C2

L'étude de frittage a été menée sur des éprouvettes réalisées à partir de poudre de verre de différentes répartitions granulométriques, soit : 2,5 ; 10 et 30 μm . L'aptitude au frittage de ces échantillons a été analysée par dilatométrie. Les éprouvettes sont réalisées par coulage en moule de plâtre, d'une barbotine contenant 70 % massique de matière sèche dans de l'éthanol anhydre. Après démoulage, les éprouvettes sont séchées à 35°C et ajustées à des dimensions de 1cm de diamètre et 1cm de longueur. Des mesures de dilatométrie ont alors été réalisées sur chacune de ces éprouvettes. L'appareil utilisé est un dilatomètre Netzsch Dil 402C. Le cycle thermique appliqué correspond à une montée en température jusqu'à 1050°C, avec une vitesse de chauffe de 3°C/min, suivi d'un palier de 3 heures à 1050°C et enfin, à partir de cette température, une descente jusqu'à l'ambiante avec une cinétique de 3°C/min.

Les dilatométries des différents échantillons sont regroupées sur la Figure 30. Les températures caractéristiques du verre, reportées sur la figure, sont issues des mesures réalisées par ATD faites avec la même vitesse de 3°C/min, soit :

Température de transition vitreuse 1: ($T_g - 3^\circ\text{C}/\text{min}$) : 490°C

Température de cristallisation : ($T_c - 3^\circ\text{C}/\text{min}$) : 605°C

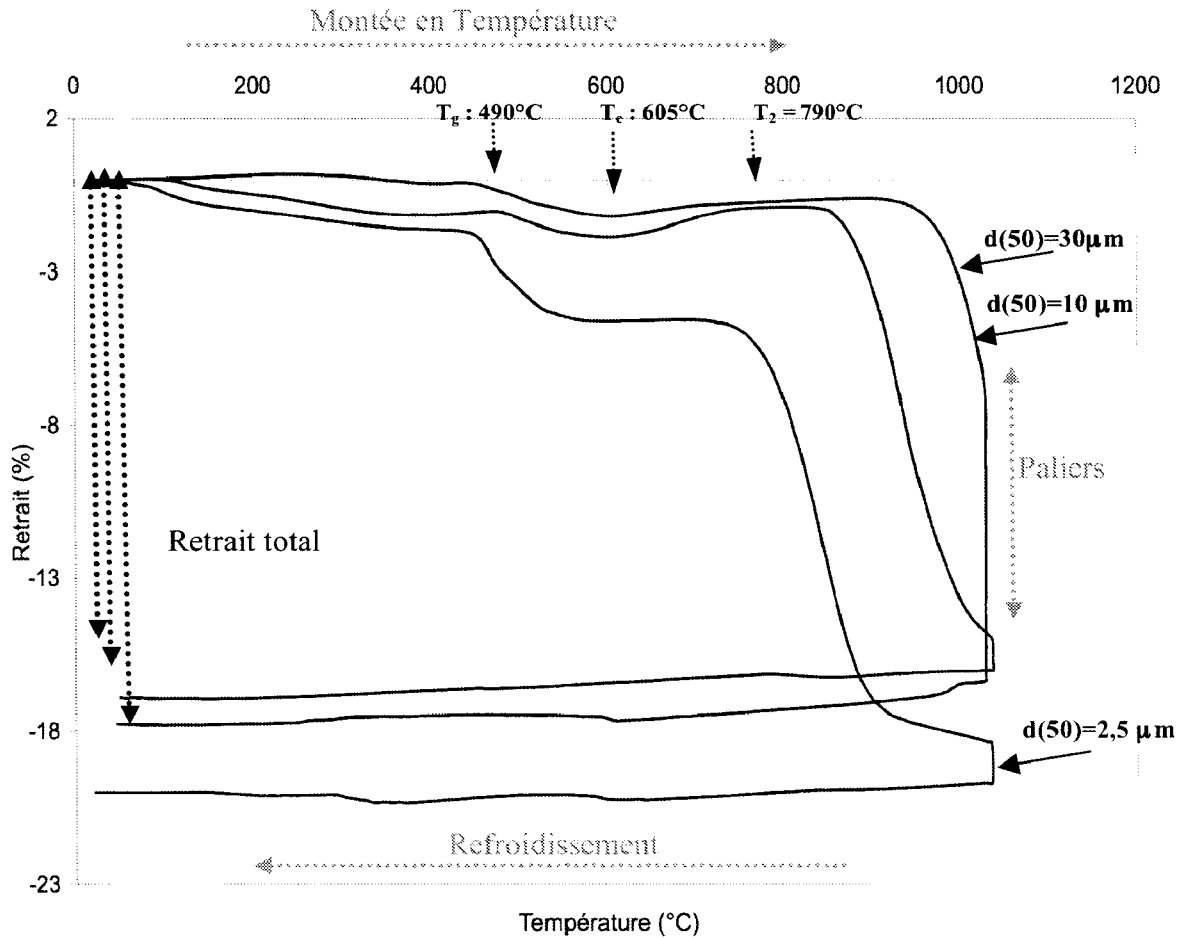


Figure 30 : Courbes de dilatométrie d'une éprouvette de verre P3C2 – granulométrie moyenne de la poudre : 30 μm – 10 μm et 2,5 μm

L'observation des résultats de dilatométrie montre que le retrait s'effectue en trois étapes. La première étape commence dans le domaine de transition vitreuse du verre. La deuxième étape correspond à un palier sur lequel le retrait n'évolue plus en fonction de la température de traitement thermique. Cette étape intervient lors du domaine de cristallisation du verre. Et enfin, une troisième étape montre un second retrait, plus intense que le premier, et qui commence après le passage du domaine de cristallisation du verre.

L. Lefebvre et al.²⁴ ont également observé ce phénomène, et ont montré que les étapes de retrait correspondent effectivement aux domaines de transition vitreuse, et que le domaine où le retrait n'évolue plus correspond au domaine de cristallisation du Bioglass[®]. En effet, pour le verre bioactif

45S5, le deuxième retrait d'amplitude beaucoup plus importante que pour le premier retrait, correspondrait, selon les auteurs, à une seconde transition vitreuse dans un domaine de température proche de 850°C. Les différentes étapes du frittage a été observé lors de cette étude et a montré que le frittage des particules de verres se produisait essentiellement dans les domaines de transition vitreuse et que la cristallisation avait tendance à ralentir, voire bloquer la densification. Il a également été observé que l'augmentation de la vitesse de chauffe avait pour effet de décaler les températures de transformation du matériau vers les plus hautes températures, d'augmenter le premier retrait par rapport au second et de diminuer le retrait total du matériau.

Comme il a été rappelé au début de cette étude, les analyses thermiques différentielles du verre P3C2, réalisées avec une vitesse de chauffe de 3°C/min, ont montré l'existence d'une température de transition vitreuse à 490°C, qui correspond au début du premier retrait. Il s'agit d'un frittage par écoulement visqueux, qui est stoppé par le phénomène de cristallisation. En effet, l'ATD a montré que le T_c était situé vers 605°C. Le second retrait correspond au frittage de la vitrocéramique.

Cependant, un très léger changement de la ligne de base a été observé à 790°C, pouvant être attribué à une température de transition vitreuse du verre résiduel. Sur les courbes de dilatométrie (Figure 30), cette température correspond au début du second retrait, pour les poudres de granulométrie inférieure à 10 μm . Par contre, pour les granulométries moyennes de 10 et 30 μm , le second retrait débute à des températures légèrement supérieures. En effet, la littérature²⁷ montre que les températures caractéristiques du verre obtenues par ATD, peuvent différer selon leur granulométrie. Une poudre de granulométrie plus importante (30 μm) a des températures caractéristiques légèrement supérieures à celles de la poudre de granulométrie de l'ordre du micron. Ceci peut expliquer que, pour les courbes dilatométriques des poudres de granulométrie 30 et 10 μm , le second retrait ne démarre pas à 790°C, mais vers 840°C.

Ces résultats confirment que la température de début de frittage est d'autant plus basse que la taille des grains est petite, avec un retrait plus important. De plus, la température maximale de densification est comprise entre 800°C et 1000°C, pour le cycle thermique suivant : vitesse de chauffe et de refroidissement 3°C/min et isotherme de 3h à la température de frittage. Cependant, des essais de frittage ont été réalisés entre 500 et 1100°C, afin de suivre d'une part la densification du matériau, et d'autre part la cristallisation, dans cette gamme de température.

II. 3. 2. Évolution de la densité relative en fonction de la température de traitement thermique

Les densités relatives ont été mesurées par pesée hydrostatique sur des éprouvettes ayant suivi le cycle de température suivant :

- montée en température de l'ambiante jusqu'à la température de frittage avec une vitesse de 3°C/min
- palier à la température de frittage pendant 3 heures
- descente en température à partir de la température de frittage jusqu'à l'ambiante avec une vitesse de 3°C/min.

La température de frittage varie de 500°C à 1100°C. Les éprouvettes sont préparées à partir de poudres de granulométrie variant de 2,5 ; 10 et 30 µm.

La densité de la poudre de verre initiale (d_{in}), de granulométrie 2,5 µm, est mesurée à l'aide d'un ultrapicnomètre automatique.

Plusieurs mesures ont également été effectuées sur de la poudre de verre frittée à différentes températures. Le Tableau 6 regroupe les valeurs de densité obtenues.

Température (°C)	densité ($\Delta d = 8 \cdot 10^{-2}$)				densité moyenne
					($\Delta d = 8 \cdot 10^{-2}$)
P3C2	2,79	2,78	2,77	2,78	2,78
500	2,90	2,91	2,89	2,92	2,88
600	2,91	2,90	2,87	2,91	2,90
700	2,89	2,90	2,88	2,91	2,89
800	2,89	2,91	2,91	2,91	2,90
900	2,88	2,92	2,90	2,91	2,90
1000	2,89	2,91	2,89	2,91	2,90
1050	2,89	2,90	2,91	2,88	2,90
1100	2,89	2,90	2,91	2,92	2,90

Tableau 6 : Densités initiales de la poudre de verre P3C2 et des poudres de matériaux obtenues après les traitements thermiques à différentes températures

Ces mesures de densités sont relativement homogènes compte tenu de l'incertitude de la mesure de l'ultrapicnomètre. Il est à noter que la densité de la poudre de verre est de 2,78 et que la densité des

poudres ayant subi des traitements thermiques entre 500 et 1100°C est de l'ordre de 2,90. Les densités relatives des différentes éprouvettes de poudre de verre densifiées ont été mesurées par pesée sous eau et calculées à partir de la relation suivante :

$$d(\%) = \frac{M_s \times 100}{(M_h - M_e) \times d_{in}}$$

- M_s : masse de l'échantillon sec
- M_e : masse de l'échantillon dans l'eau
- M_h : masse de l'échantillon humide
- d_{in} : densité initiale

Ce calcul a été réalisé pour toutes les éprouvettes frittées. La Figure 31 présente l'évolution de la densité relative du matériau en fonction de la température de traitement thermique.

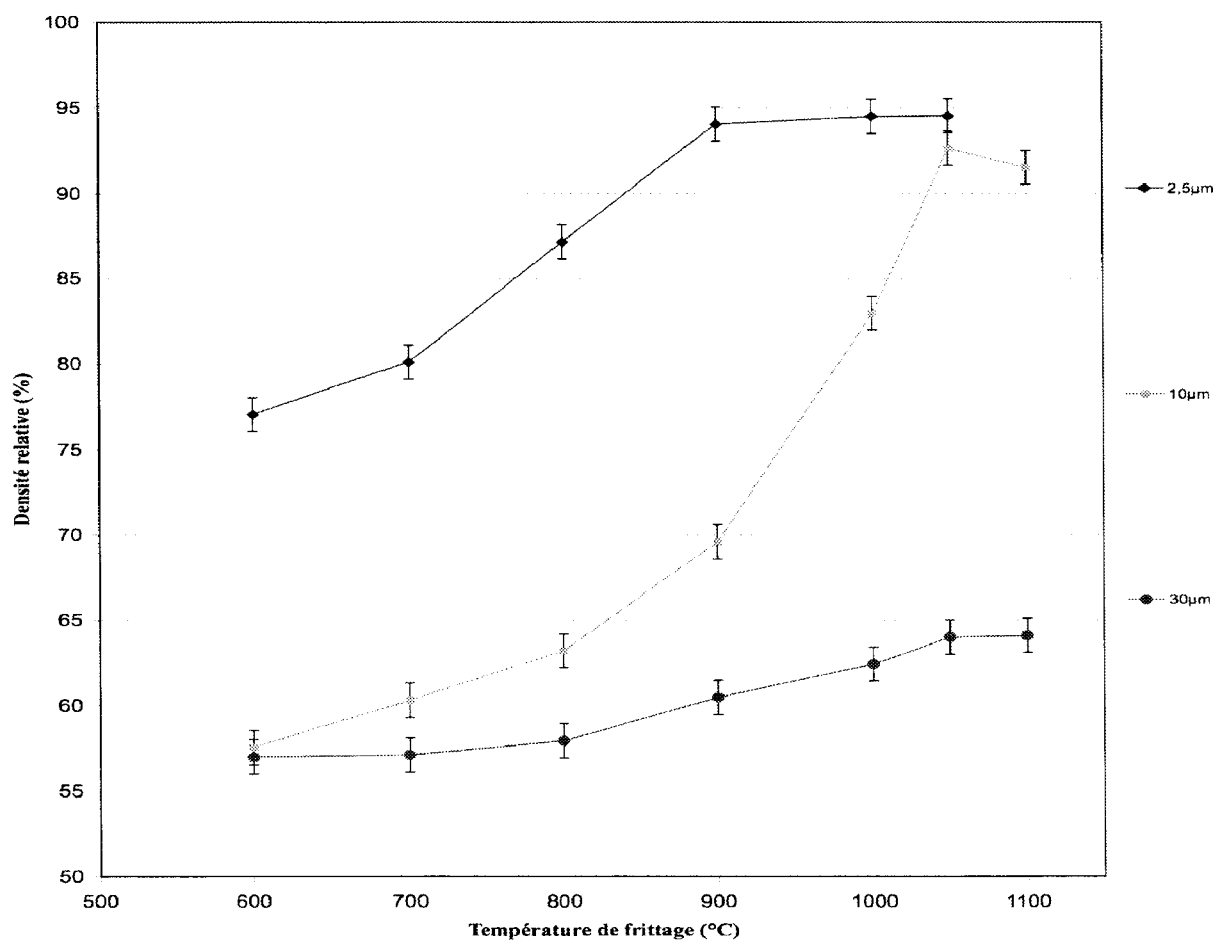


Figure 31 : Evolution de la densité relative du matériau en fonction de la température de frittage

Pour l'échantillon ayant une granulométrie moyenne de 30 μm , la densité relative du matériau augmente lentement avec la température de frittage et le maximum de densité relative est de 64% pour une température de frittage de 1050°C (Figure 31).

Lorsque la granulométrie de la poudre diminue, la densité relative augmente progressivement et atteint, pour la granulométrie moyenne de 2,5 μm , une densité relative de 94 %. En effet, pour la poudre de verre de 2,5 μm , la densité relative augmente beaucoup plus rapidement. En effet, à 600°C, elle correspond déjà à 77 %, contrairement aux autres granulométries pour lesquelles elle ne dépassait pas 60% à cette température et atteint son maximum (94 %) à 900°C.

En conclusion, la meilleure valeur de densité relative correspond à 94% et est obtenue pour une granulométrie de 2,5 μm et une température de frittage de 900°C. Cette température est située dans l'intervalle de température déterminée par l'étude du frittage par dilatométrie, soit entre 800°C et 1050°C. Les deux techniques sont par conséquent complémentaires et permettent de déterminer les granulométries induisant un frittage à une température la plus basse possible.

L'étude de frittage étant réalisée d'un point de vue physique, nous nous sommes ensuite intéressés à la phase cristalline apparue lors des traitements thermiques. Pour cela, nous avons utilisé la diffraction des Rayons X.

II. 3. 3. Recherche des phases cristallines par diffraction des Rayons X

L'étude du frittage met en évidence des températures de densification maximale de nos échantillons supérieures à la température de cristallisation du verre.

Certains auteurs ont également observé la dévitrification de verre bioactifs. L. Lefebvre et al.²⁴ ont réalisé une étude par diffraction des Rayons X de la poudre de verre (Bioglass®). Les températures de traitement thermique ont été choisies entre 550°C et 950°C. Il a été observé un début de dévitrification du verre à partir de 600°C, ce qui concorde avec la température de cristallisation déterminée par ATD (610°C). La phase cristalline principale identifiée est $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$. Ils ont également constaté l'apparition d'une phase secondaire cristallisée, à partir de 800°C. Il s'agit de la silicorhenanite $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$. Cette phase est isostructurale à l'apatite, et n'a jamais été identifiée précédemment pour des traitements thermiques courts du Bioglass® à 800°C.

D. C. Clupper et al.²⁸ ont étudié la dévitrification du verre de Hench et ont montré par l'analyse des

diffractogrammes, que la phase cristalline qui se développe dans le verre lorsque celui-ci subit un traitement thermique, est le silicate de calcium et de sodium $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$.

H. A. El Batal et al.²³ ont déterminé les phases cristallines présentes dans des vitrocéramiques issues de poudre de verre bioactif traitées thermiquement. Ces verres sont constitués de SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5 et deux d'entre eux contiennent du bore (Tableau 7).

verre	pourcentage massique				
	SiO_2	CaO	Na_2O	P_2O_5	B_2O_3
(1)	45	24,5	24,5	6	
(2)	43	28	22	7	
(3)	50	22	22	6	
(4)	55	19,5	19,5	6	
(5)	40	24,5	24,5	6	5
(6)	30	24,5	24,5	6	15

Tableau 7 : Compositions massiques des bioverres étudiés (H. A. El Batal et al.²³)

L'analyse de ces diffractogrammes ont montré que les deux phases cristallines présentes dans toutes ces vitrocéramiques sont le silicate de calcium et de sodium $\text{Na}_2\text{Ca}_2(\text{SiO}_3)_3$ (ICDD n° : 1-1078), et silicate de calcium et de sodium $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (ICDD n° : 12-0671). Pour le verre (4), il a également été observé la présence de phases cristallines additionnelles pouvant être attribuées au phosphate de calcium $\text{Ca}_4\text{P}_6\text{O}_{19}$ (ICDD n° : 15-0177), et au calcium silicate CaSiO_3 , appelé aussi wollastonite (ICDD n° : 42-0550). Il reste cependant à ces auteurs des incertitudes sur l'indexation de certains pics minoritaires, tel que celui se situant vers un 2θ proche de 21° .

C'est pourquoi, une analyse par diffraction des Rayons X a été réalisée sur des échantillons de poudre ayant subi le même cycle de température que celui réalisé lors du frittage des éprouvettes, ceci afin d'identifier la phase cristalline apparue et sa température de formation. La Figure 32 représente la superposition des diffractogrammes obtenus aux différentes températures de frittage.

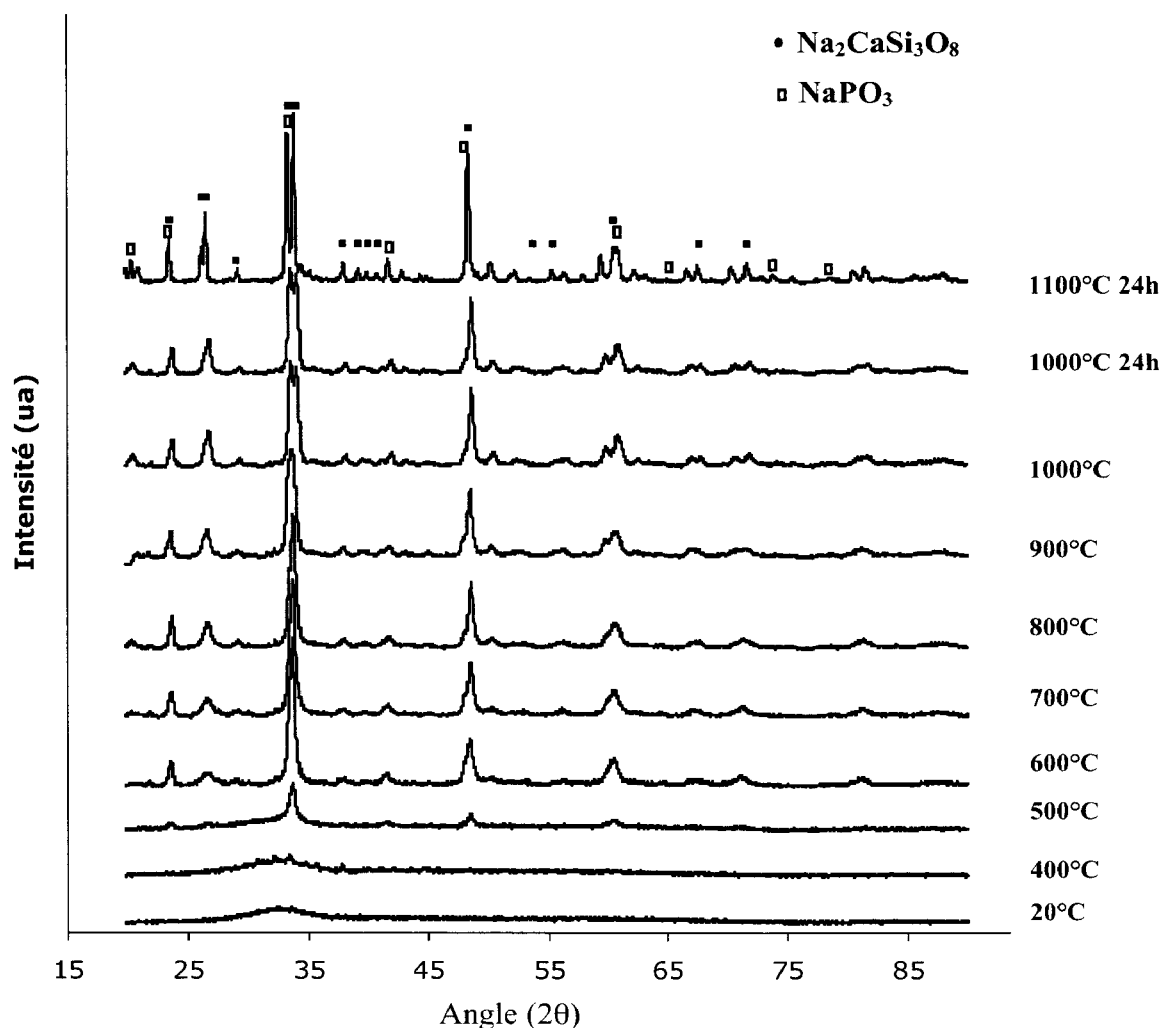


Figure 32 : Diffractogrammes des Rayons X du verre P3C2 aux différentes températures de frittage

Cette figure montre que les échantillons portés jusqu'à une température maximale de 400°C ont une structure amorphe. Des pics cristallographiques apparaissent à partir de 500°C, cette température correspond à une dévitrification du verre. La phase cristalline principale mise en évidence par la technique de diffraction des Rayons X correspond à la phase cristalline $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (ICDD n° : 12-0671). Certains pics notamment celui se situant vers un angle 2θ proche de 21 correspondent à une phase secondaire et minimale : Na_3PO_4 (ICDD n° : 031-1318). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par H. A. El Batal et al.²³. Les phases cristallines $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ et $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ observées pour le verre de Hench n'ont pas été mises en évidence lors de notre étude. Une indexation des pics du diffractogramme traité thermiquement 3 heures à 900°C est détaillée en

annexe 6.

Nous avons ensuite réalisé une analyse par RMN du ^{29}Si , afin de comparer la structure du réseau silicate avant et après un traitement thermique de 24 heures à 1000°C (Figure 33).

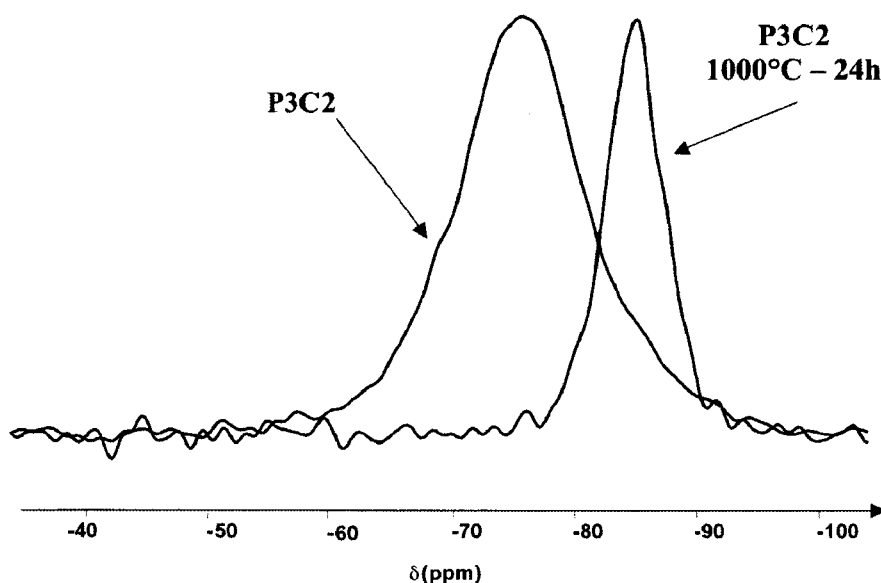


Figure 33 : Superposition des spectres RMN du ^{29}Si du verre P3C2 et de la poudre de verre ayant subi un traitement thermique de 24 heures à 1000°C

Cette analyse RMN du ^{29}Si indique que le déplacement chimique isotrope est de -76 ppm pour le verre P3C2, et se situe à -86 ppm pour le verre traité thermiquement 24 heures à 1000°C . Le réseau silicate s'est donc polymérisé, et la largeur à mi-hauteur du spectre de la poudre de verre traitée thermiquement est de l'ordre de 10 ppm. Le verre P3C2 ayant une largeur à mi-hauteur proche de 13 ppm, le spectre de la poudre de verre est toujours significatif d'une phase amorphe présente dans le composé. En effet, A. R. Jones et al.²⁹ ont réalisé des traitements thermiques de dévitrification sur des verres de silicate $(\text{CaO})_x(\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_7)$ avec x allant de 0 à 1. Ils ont vérifié, grâce à la RMN du ^{29}Si , qu'une phase amorphe était présente dans le matériau. En effet, en comparant le spectre du verre initial avec le spectre du composé dévitrifié, ces auteurs ont observé que la largeur à mi-hauteur avait diminué d'environ 40 % pour le composé traité thermiquement. Ils ont ainsi conclu qu'une phase vitreuse était toujours présente dans leur matériau.

Une analyse par RMN du ^{31}P a également été réalisée sur le verre P3C2 traité thermiquement. En superposant le spectre du verre P3C2 avec le spectre de ce dernier (Figure 34), nous observons que le traitement thermique a entraîné une augmentation du déplacement chimique isotrope du massif.

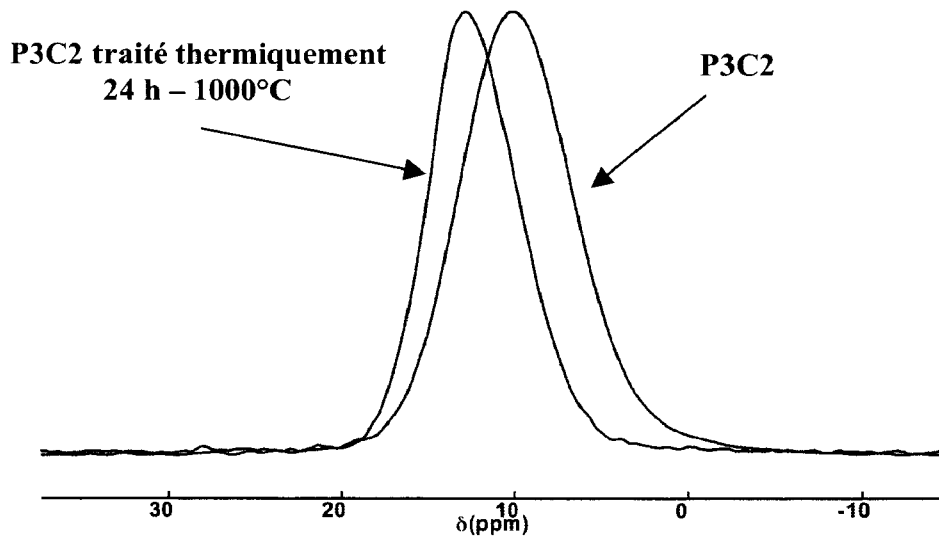


Figure 34 : Superposition des spectres RMN du ^{31}P du verre P3C2 et de la poudre de verre ayant subi un traitement thermique de 24 heures à 1000°C

Le spectre du verre P3C2 a une largeur à mi-hauteur de 7,7 ppm, et le spectre du verre P3C2 traité thermiquement 6,2 ppm. La largeur à mi-hauteur a donc diminué par rapport au verre initial, mais ces valeurs sont proches et toutes les deux caractéristiques d'une phase amorphe. Cette diminution est cependant significative de la dévitrification du verre. En effet, M. W. G. Lockyer et al.³⁰ ont étudié une série de verres $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - 6\text{P}_2\text{O}_5$, dont deux présentaient les phases cristallines $\alpha\text{-CaSiO}_3$ et une combinaison de $\alpha\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ et $\beta\text{-CaSiO}_3$ pour les composés respectifs BG9 (47 $\text{SiO}_2 - 42,3 \text{ CaO} - 4,7 \text{ Na}_2\text{O} - 6 \text{ P}_2\text{O}_5$) et BG13 (37,6 $\text{SiO}_2 - 37,6 \text{ CaO} - 18,8 \text{ Na}_2\text{O} - 6 \text{ P}_2\text{O}_5$). L'analyse RMN du ^{31}P de ces deux composés ont donné des spectres ayant des largeurs à mi-hauteur de 6,5 (BG9) et 8,7 (BG13). Ces auteurs ont conclu que ces composés pouvaient être assimilés à des verres, ce qui confirme que dans notre cas, le verre P3C2 traité thermiquement 24 heures à 1000°C contient toujours une phase vitreuse

En conclusion à l'étude de frittage, le maximum de densification a été obtenu pour une poudre de

verre de granulométrie 2,5 μm à une température de frittage comprise entre 900 et 1050°C. L'analyse des échantillons, par diffraction des Rayons X, montre qu'à partir de 500°C, le verre se dévittrifie pour donner en majorité la phase cristalline $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (ICDD n° : 12-0671), et que le caractère amorphe du verre diminue proportionnellement à l'augmentation de la température de frittage. Ainsi pour limiter la dévittrification, tout en densifiant un maximum, un compromis a été fixé. C'est pourquoi, la suite de l'étude a été réalisée avec une granulométrie moyenne de la poudre de 2,5 μm et une température de frittage de 900°C.

II. 3. 4. Observation par Microscope Electronique à Balayage

Afin de visualiser l'état de surface des matériaux après traitement thermique, une analyse a été réalisée par Microscope Electronique à Balayage sur les éprouvettes traitées à 600, 800, 900 et 1050°C (Figures 35 à 38).

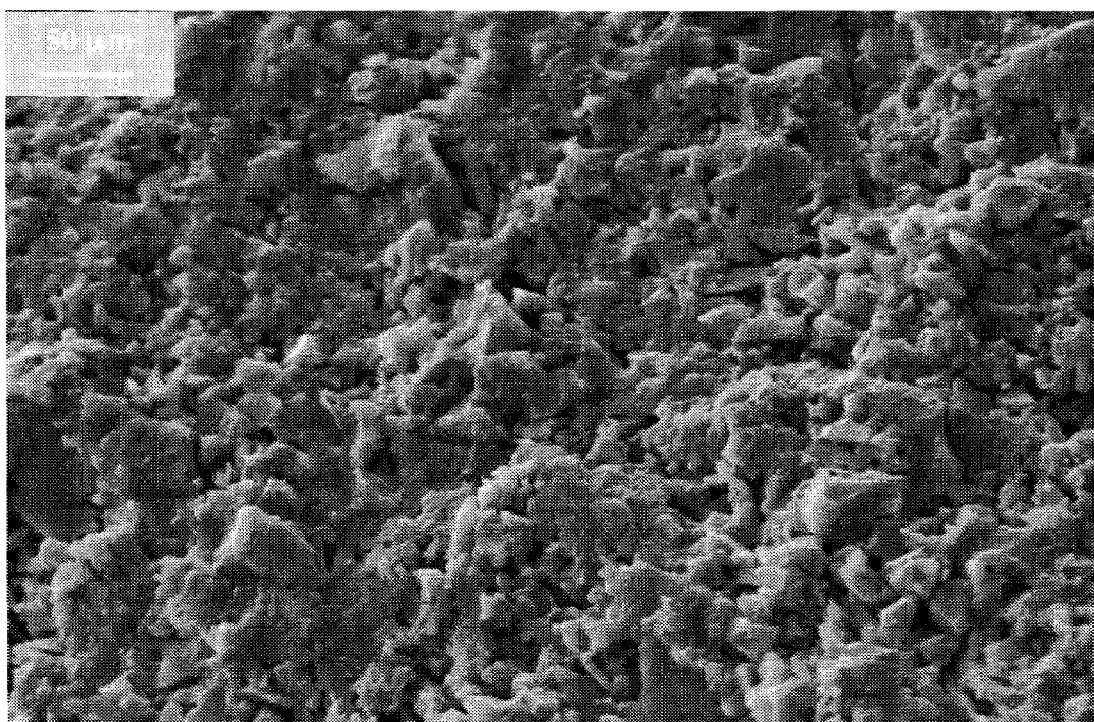


Figure 35 : Micrographie d'une éprouvette de verre fritté à 600°C

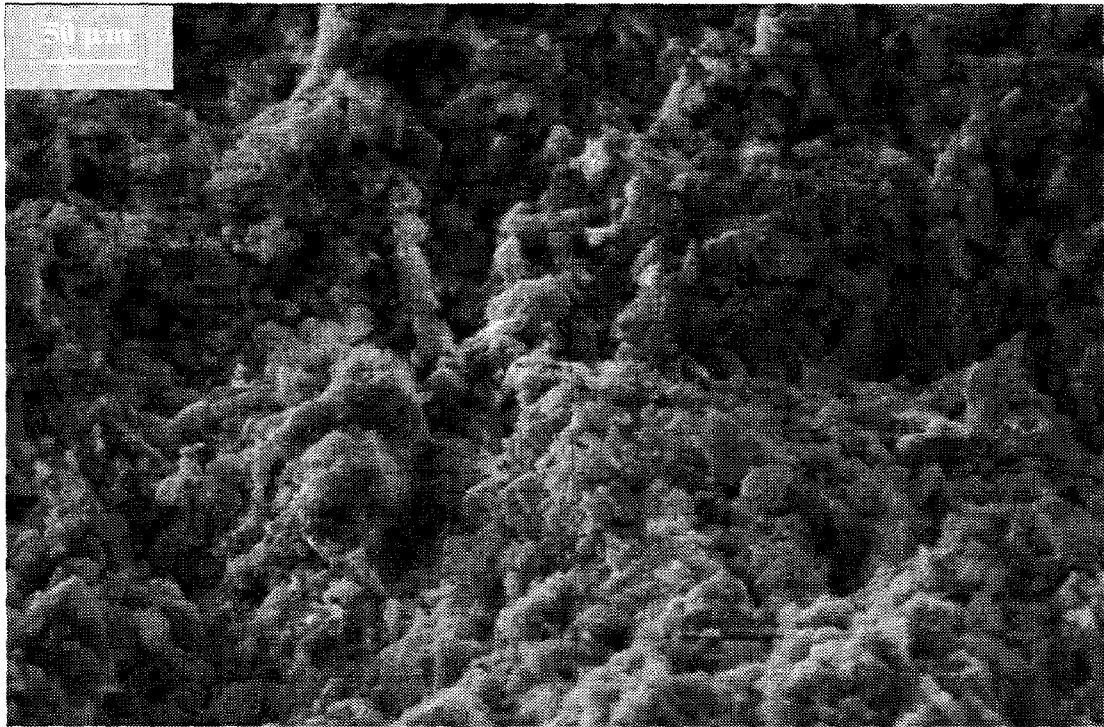


Figure 36 : Micrographie d'une éprouvette de verre fritté à 800°C

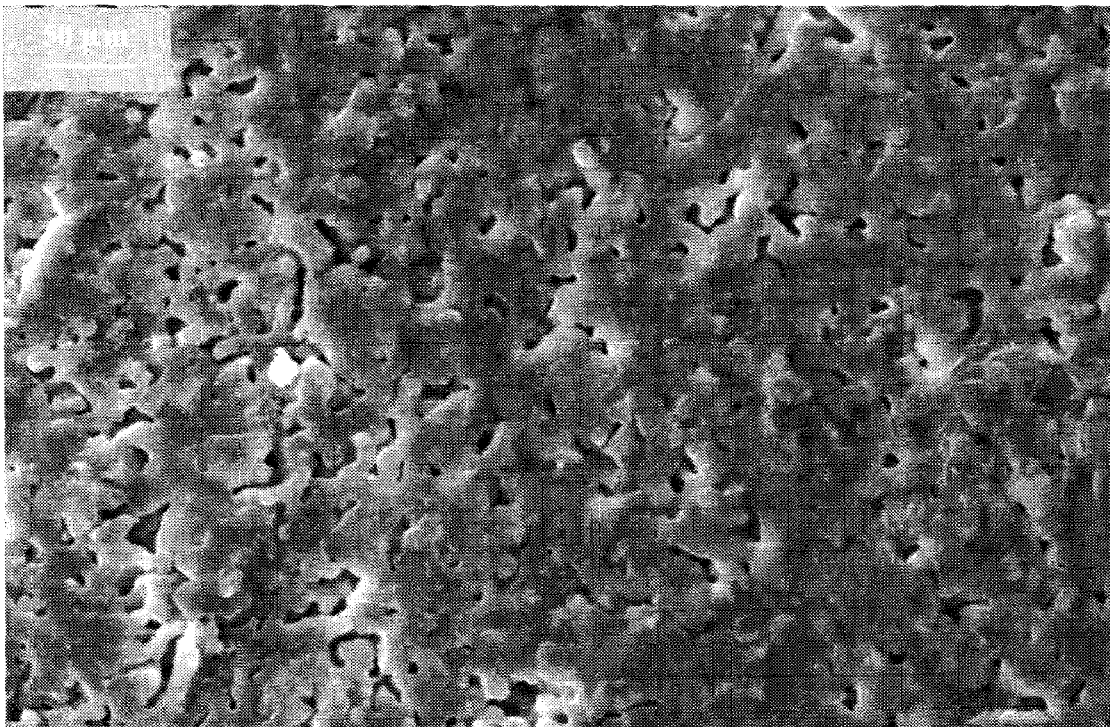


Figure 37 : Micrographie d'une éprouvette de verre frittée à 900°C

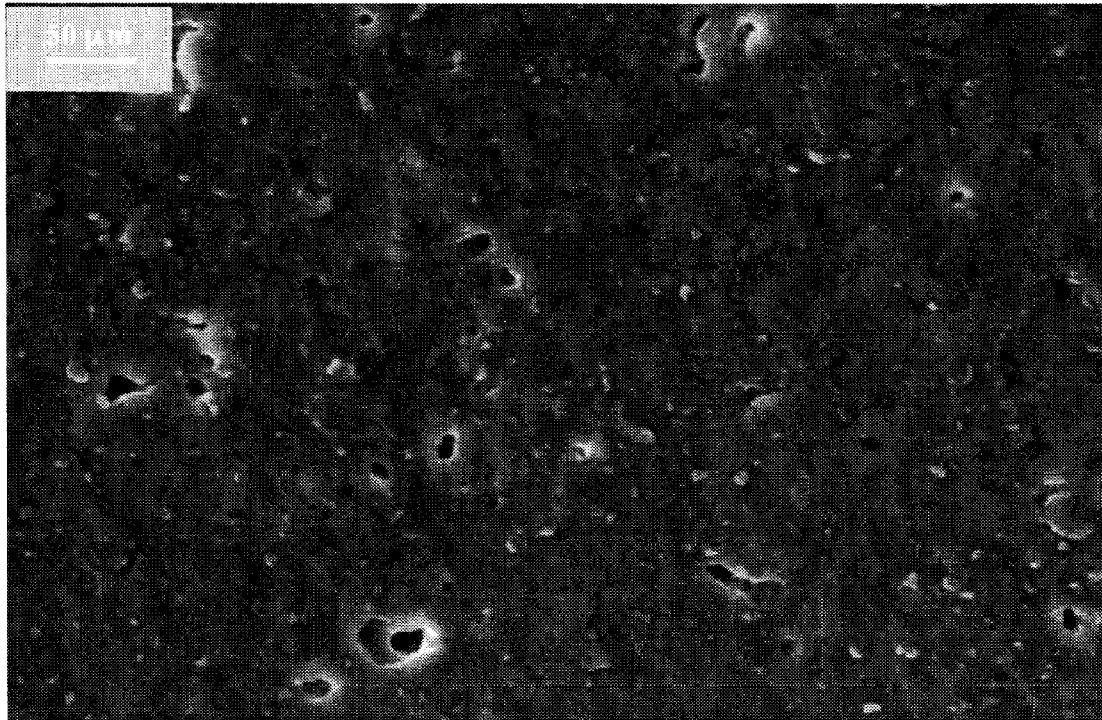


Figure 38 : Micrographie d'une éprouvette de verre frittée à 1050°C

L'éprouvette de verre fritté à 600°C (Figure 35) montre un état de surface granuleux. Les particules de verre se sont effectivement assemblées les unes aux autres. Le traitement thermique à 800°C (Figure 36) induit un frittage de la vitrocéramique par écoulement visqueux, cependant, un aspect granuleux est toujours visible. Pour les traitements thermiques à 900 et 1050°C (Figures 37 et 38), la surface de l'éprouvette est visiblement moins granuleuse. Une cohésion plus importante entre les grains est ainsi observée, qui se caractérise par une diminution de la porosité de surface d'autant plus importante que la température de frittage est élevée.

Les conditions de frittage de la poudre de bioverre P3C2 étant optimisées, il est maintenant possible de s'intéresser au procédé d'élaboration d'un verre bioactif macroporeux.

II. 4. Mise au point du procédé d'élaboration d'un verre bioactif macroporeux

Le procédé comporte plusieurs étapes :

- 1^{ère} étape : élaboration de la structure porogène
- 2^{ème} étape : élaboration de la barbotine et imprégnation de la structure porogène
- 3^{ème} étape : élimination thermique de la structure porogène
- 4^{ème} étape : frittage du macroporeux

II. 4. 1. Première étape : élaboration de la structure porogène

La structure porogène a été élaborée en suivant le descriptif établi pour préparer une céramique macroporeuse¹⁷. Elle est préparée à partir de billes de Polyméthylméthacrylate (PMMA), polymère plastique, de structure amorphe. Cette technique de mise en forme, appelée aussi chimie-formage, permet d'obtenir toute forme désirée. Le protocole est le suivant :

- les billes de PMMA sont tamisées afin d'obtenir la distribution granulométrique recherchée.
- une masse de billes est introduite dans un moule métallique équipé d'un piston relié à un capteur de déplacement.
- un solvant organique est ensuite introduit dans le moule métallique afin de dissoudre la surface des billes de PMMA et de réaliser un pontage entre celles-ci.
- un capteur de déplacement mesure le retrait (Δ) de l'édifice organique situé dans le moule métallique. Lorsque le retrait désiré est atteint, la réaction de dissolution est stoppée.
- un séchage est ensuite nécessaire afin d'éliminer les traces de solvant.

Une étude a été réalisée au laboratoire¹⁸, permettant de corréler le retrait de la charpente au diamètre de pontage entre les billes de PMMA. La Figure 39 représente différentes structures porogènes en billes de PMMA obtenue avec des retraits de 190, 1600, 2700 et 3800 μm . Ce protocole permet ainsi de réaliser des édifices porogènes à architecture structurée dont le diamètre des billes de PMMA et le diamètre d'interconnection sont rigoureusement contrôlés. Ainsi pour cette étude et

afin de travailler dans des conditions opératoires similaires, le retrait a été fixé à $400\mu\text{m}$, ce qui permet d'obtenir un diamètre d'interconnexions de $130\mu\text{m}$, à partir de billes de PMMA de diamètre compris entre 500 et $600\mu\text{m}$. Cette préforme en billes de PMMA correspond au négatif de la structure macroporeuse du matériau final. Une fois la préforme en billes de PMMA réalisée, cette dernière est imprégnée avec la barbotine.

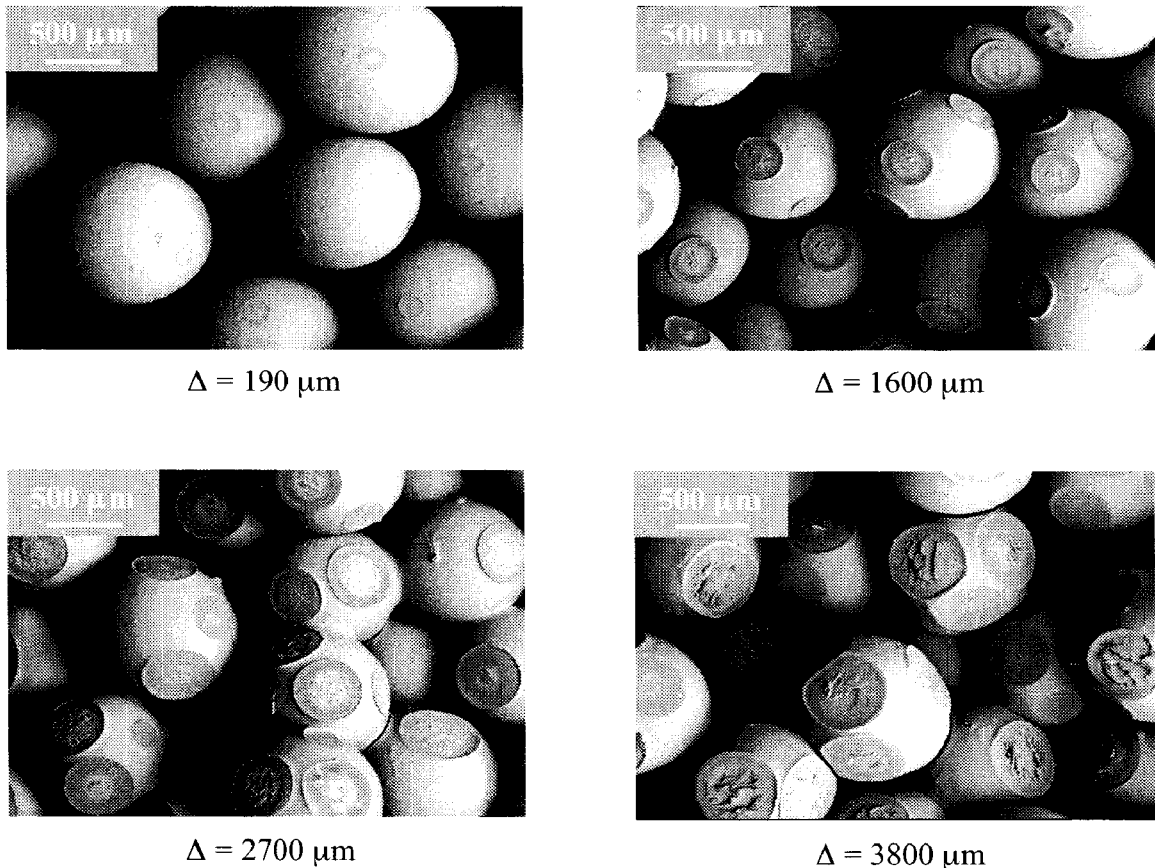


Figure 39 : Micrographies de différentes structures porogènes en billes de PMMA de diamètre $600-700\mu\text{m}$ (Δ : retrait= $190, 1600 ; 2700$ et $3800\mu\text{m}$)

II. 4. 2. Deuxième étape : élaboration de la barbotine

La barbotine correspond à la mise en suspension, dans un solvant, de la poudre de verre. Elle est ensuite utilisée pour imprégner la structure porogène. La procédure expérimentale d'imprégnation

impose certaines contraintes qui peuvent être décrites de la manière suivante :

- les édifices polymériques constitués des billes de PMMA préformées sont placés dans des moules de plâtre. Les dimensions internes de ces moules (1,1 cm de diamètre) sont ajustées à celles des édifices polymériques (1 cm de diamètre).
- après la mise en place du squelette de PMMA dans le moule en plâtre, une réserve plastique est placée sur la pièce. Cette dernière permet d'alimenter en continu les interstices du squelette polymérique par la suspension. La faible viscosité de la barbotine autorise un remplissage homogène et total de la matrice organique. La porosité intrinsèque du plâtre permet par des mécanismes de dépression et de succion capillaires d'éliminer le solvant de la suspension. La poudre de verre reste alors prisonnière des cavités interstitielles de l'édifice polymérique.
- des durées de chimie-formage longues génèrent des cavités interstitielles de faibles dimensions et donc d'accès difficile pour la suspension. Il est donc utile d'ajuster la viscosité de la suspension en fonction du type d'édifice polymérique à imprégner.

C'est pourquoi, la barbotine doit être à la fois assez fluide pour imprégner correctement l'édifice organique en billes de PMMA et avoir le taux de matière sèche suffisamment élevé pour obtenir une bonne densification du matériau.

Selon la littérature¹⁷, la formulation de la barbotine devrait correspondre à 70% de matière sèche dans de l'eau distillée avec 1% de dispersant : DVC (ammonium polyméthacrylate). La dispersion est réalisée dans un mélangeur planétaire pendant 30 minutes. Ensuite, 4% de liant (latex en émulsion) est ajouté à la suspension. L'ensemble est ensuite mélangé pendant 10 min dans un bûcher à l'aide d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique.

Chaque paramètre de ce protocole a été testé afin d'observer son influence sur la viscosité de la barbotine et donc sur l'imprégnation du squelette polymérique.

II. 4. 2. 1. Mise en suspension dans l'eau distillée

Afin de pouvoir utiliser les mêmes dispersants, liant et agent mouillant que lors de l'élaboration des

céramiques macroporeuses¹⁵ et bien qu'il ait été montré que le verre réagissait chimiquement avec l'eau en formant un gel de silice lors du broyage effectué avec une vitesse du broyeur de 300 tr/min, nous avons réalisé des essais de mise en suspension du verre avec l'eau comme solvant.

Dans ce cas, nous n'avons pas observé de formation de gel dans la suspension. Cependant, afin de le vérifier scientifiquement, des analyses par spectroscopie Infra Rouge ont été réalisées.

Une poudre de verre de granulométrie 2,5 μm à 30 minutes, puis à 1 heure de mise en suspension dans la jarre (100 tr/min) a été analysé par Spectroscopie Infra Rouge. Les deux spectres obtenus ont été comparés au spectre Infra Rouge de la poudre de verre issue du broyage, qui n'a pas été au contact de l'eau. La Figure 40 représente la superposition des spectres obtenus à 0, 30 minutes et 1 heure de barbotine.

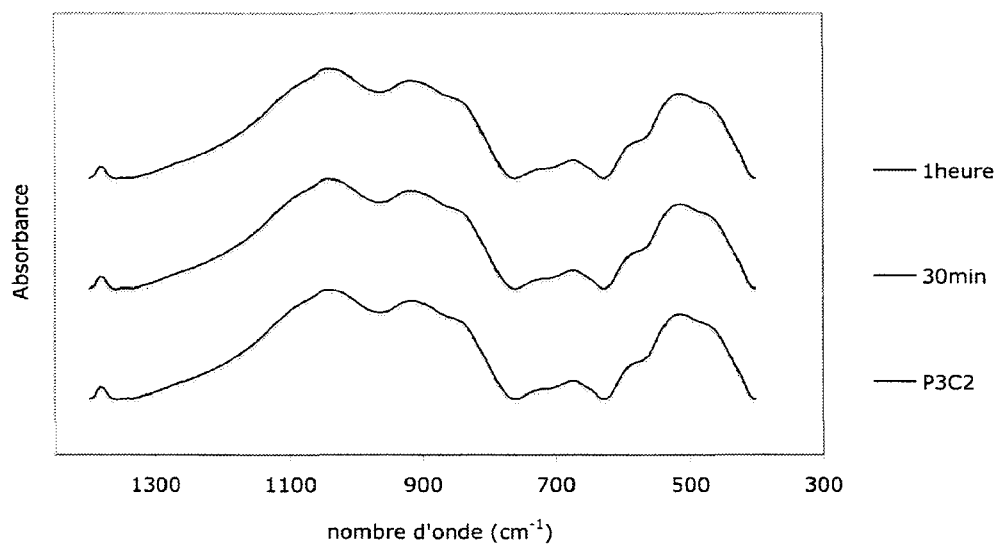


Figure 40 : Analyse IFTR de la poudre de verre P3C2 initiale, puis à 30 min et 1h de dispersion.

La comparaison de ces trois spectres montre qu'aucune variation structurale significative n'est observée lors de la mise en suspension de la poudre de verre dans de l'eau. Ce comportement peut être expliqué par le fait que la vitesse de rotation du broyeur planétaire n'est que de 100 tours/min au lieu de 300 tours/min lors du broyage et que le nombre de billes utilisées, lors de la dispersion de la barbotine, est beaucoup plus petit (2/3 de billes dans la jarre pour le broyage et 1/5 lors de la dispersion). La pollution éventuelle par la jarre en alumine a été également vérifiée par E.D.S. (Figure 41). Le spectre ne présente de pic significatif de l'aluminium à 1,48 keV, ce qui nous

indique que la dispersion dans la jarre en alumine n'a pas pollué la barbotine.

L'utilisation d'eau distillée ainsi que l'utilisation d'une jarre en alumine ne pose pas de problème, ni de pollution, ni de modification structurale, lors de la mise en suspension de la poudre de verre.

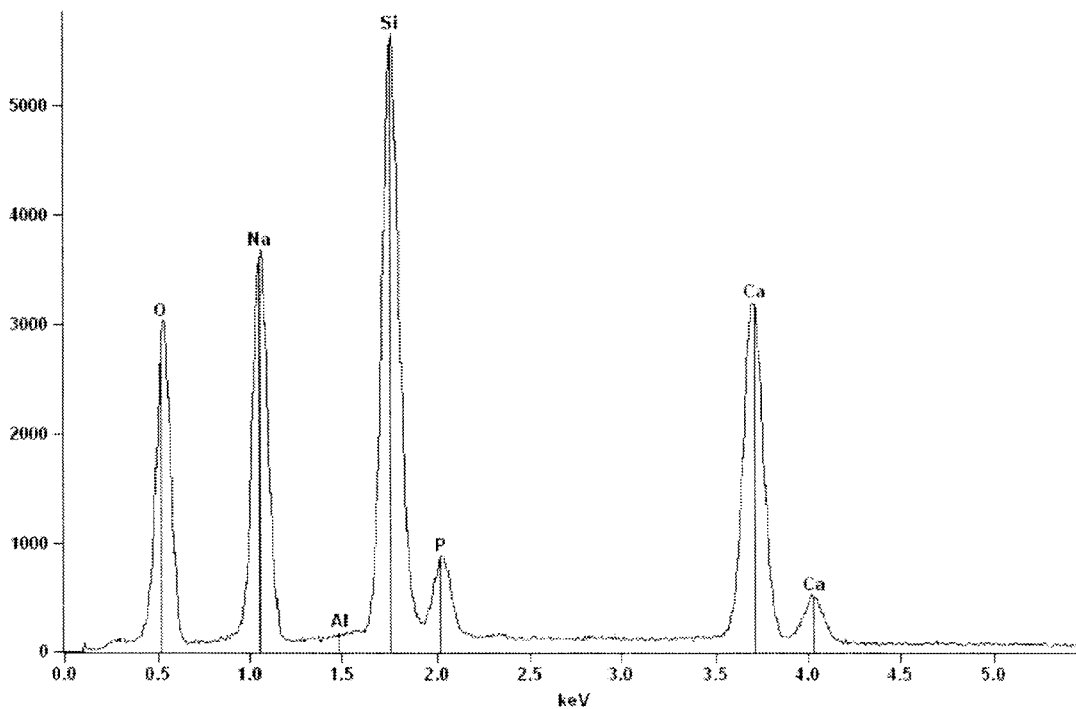


Figure 41 : Analyse qualitative par EDS de la poudre de verre après dispersion

Des barbotines contenant de la poudre de verre de granulométrie égale à 2,5 μm , de l'eau distillée ont été préparées avec 1% de dispersant : DVC (ammonium polyméthacrylate). La dispersion est réalisée dans un mélangeur planétaire pendant 30 minutes. Ensuite, 4% de liant (latex en émulsion) sont ajoutés à la suspension.

L'ensemble est ensuite mélangé pendant 10 min dans un bûcher à l'aide d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique. L'imprégnation des édifices organiques est mauvaise car la viscosité de la barbotine était trop élevée, pour un taux de matière sèche de 45% massique. Ce taux est trop faible et ne permet pas une bonne densification du matériau dans la suite du protocole. C'est pourquoi, des essais de mise en suspension dans l'alcool anhydre ont été réalisés sachant que ce solvant est inerte vis-à-vis du verre.

II. 4. 2. 2. Mise en suspension dans l'éthanol anhydre absolu

A ce stade du travail, il a été nécessaire de faire un travail bibliographique pour trouver le bon dispersant et le bon liant. En effet, tout le travail réalisé lors de la mise au point du protocole pour les céramiques macroporeuses¹⁵ ne pouvait pas être utilisé. Des publications³¹ font référence à l'ester phosphorique. C'est, par conséquent, ce dispersant que nous avons choisi. Une imprégnation des édifices organiques a été réalisée à l'aide de suspensions de formulation suivante :

- poudre de verre de granulométrie moyenne 2,5 μm avec des taux de matière sèche variant de 40 à 80 % massique
- solvant : alcool anhydre absolu
- dispersant : Ester Phosphorique (0,8% massique³¹ par rapport au taux de matière sèche)

L'imprégnation des édifices organiques avec la barbotine a été possible jusqu'à un taux de matière sèche égale à 75%. Ce taux obtenu correspond à ceux préconisés par les différents auteurs¹⁷. Des cycles de déliantage ont été ensuite réalisés sur ces différents échantillons afin d'évaluer leur tenue mécanique lors de ce traitement.

II. 4. 3. Troisième étape : traitement thermique à basse température : le déliantage

L'édifice organique imprégné de la barbotine est séché puis subit un traitement thermique sous air à basse température d'après le cycle thermique de la Figure 42. Sous l'effet de la chaleur, les chaînes de PMMA dépolymérisent et s'éliminent. La macroporosité du substitut osseux est ainsi générée par la disparition du squelette polymérique.

La montée en température doit se faire de façon suffisamment lente pour ne pas détruire la structure avec une élimination trop brutale de la phase organique.

Les résultats d'imprégnation et de déliantage réalisés avec l'alcool anhydre sont regroupés dans le Tableau 8.

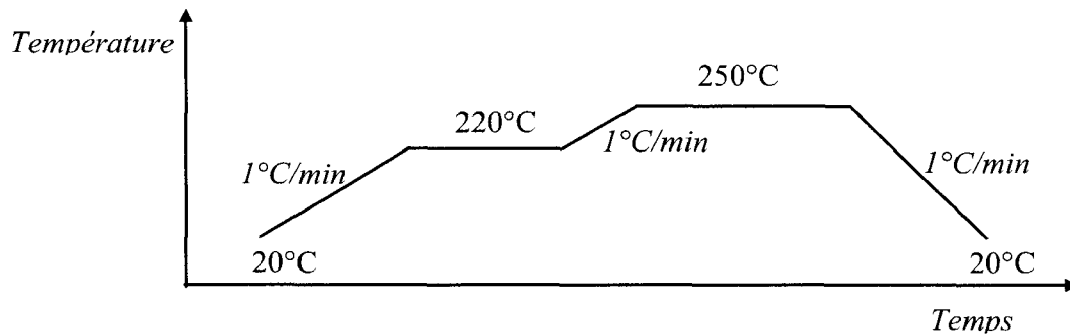


Figure 42 : Cycle de déliantage appliqué aux éprouvettes

taux de matière sèche	50	60	70	75	80
granulométrie moyenne (μm)					
2,5	éclatement des éprouvettes lors du déliantage		imprégnation et déliantage corrects		imprégnation impossible
3,5					
6					
10					
30					

Tableau 8 : Observations sur l'imprégnation et le déliantage des édifices organiques.

L'imprégnation des édifices organiques en billes de PMMA est possible avec des barbotines contenant jusqu'à 75% massique de matière sèche. Les éprouvettes contenant moins de 70% massique de poudre de verre se détériorent lors du cycle de traitement thermique à basse température. Des essais de déliantage avec une cinétique de chauffe plus lente ($0,5^\circ\text{C}/\text{min}$) n'ont pas permis d'améliorer la tenue de ces échantillons.

La Figure 43 est une photographie, obtenue par MEB, d'une structure macroporeuse issue de poudre de verre, après un cycle de traitement thermique à basse température.

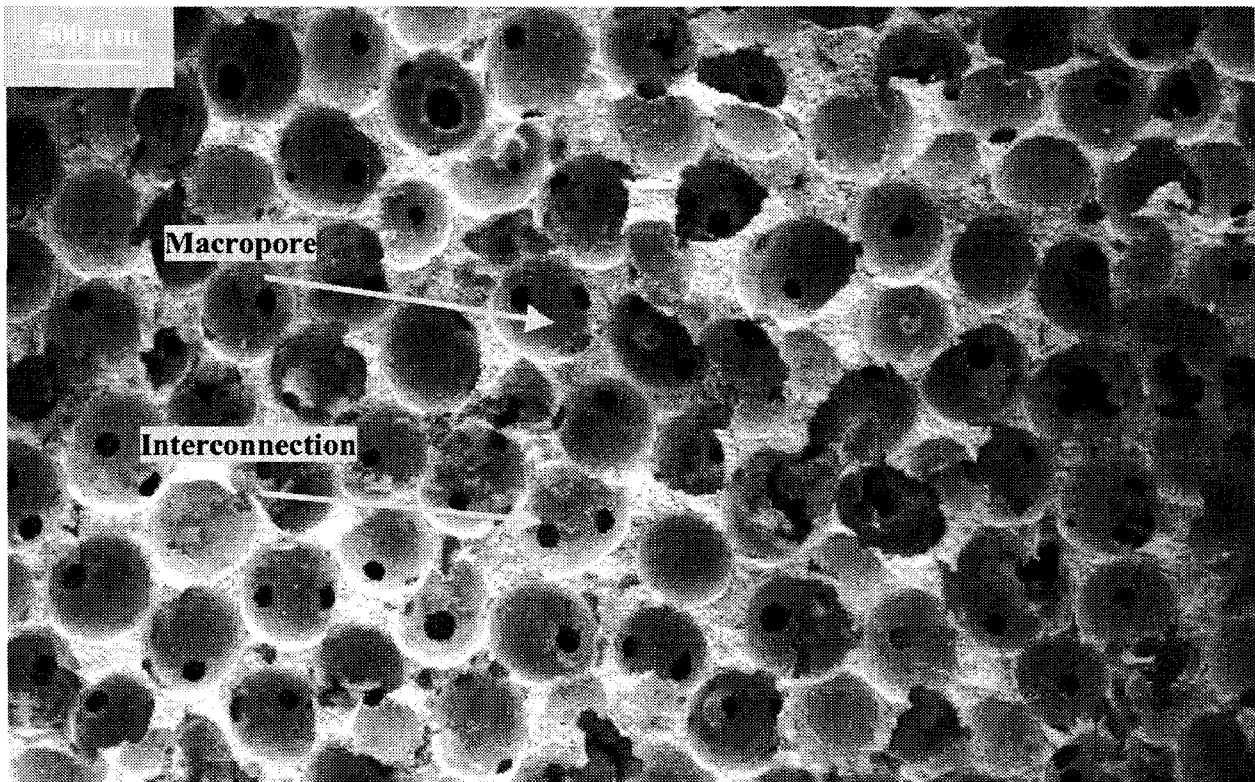


Figure 43 : Observation MEB d'une structure macroporeuse issue du verre P3C2 après déliantage.

Cette figure visualise la structure macroporeuse créée par les billes de PMMA et les interconnexions entre chaque pore. Le déliantage a permis d'obtenir une structure macroporeuse qui doit subir d'autres traitements thermiques à haute température afin de la densifier.

II. 4. 4. Quatrième étape : traitement thermique à haute température

Afin de consolider le matériau délianté, la structure macroporeuse subit ensuite un traitement thermique de densification. Celui-ci est réalisé en suivant le cycle thermique utilisé pour l'étude de frittage : une montée à la température de 900°C, avec une vitesse de 3°C/min, un maintien à 900°C pendant 3 heures et une descente en température jusqu'à l'ambiante avec, également, une vitesse de 3°C/min. La micrographie du matériau obtenu (Figure 44) montre une structure macroporeuse, à porosité contrôlée. Les interconnexions, de diamètre moyen 130 µm et les macropores, de diamètre moyen 490 µm, sont bien observables, la dimension des macropores est homogène, ainsi que celle des interconnexions.

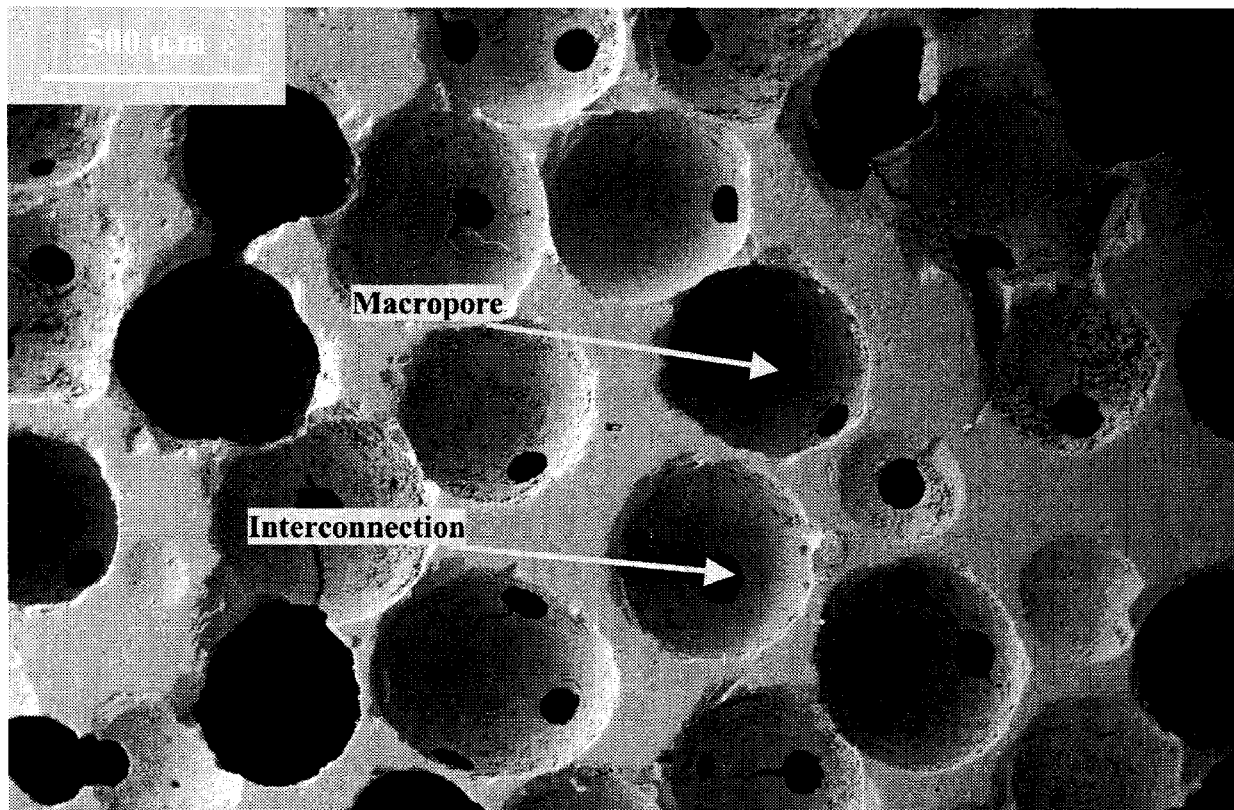


Figure 44 : Biomatériau macroporeux obtenu à partir du bioverre (frittage 900°C)

Ces étapes d'élaboration permettent ainsi d'obtenir une structure macroporeuse à partir de poudres de bioverre.

Le matériau obtenu est une vitrocéramique à porosité contrôlée. La phase cristalline majoritaire présente est $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (ICDD n° : 12-0671), et la phase minoritaire Na_3PO_4 (ICCD n° : 31-1318). La taille des interconnexions de ce matériau est de 130 µm et le diamètre moyen des macropores est de 490 µm. Des mesures ont été réalisées sur ces échantillons et ont montré que le volume poreux était de l'ordre de 67 %.

II. 5. Conclusion

Le broyage du verre P3C2 a donc été réalisé dans un broyeur planétaire avec une jarre et des médias de broyage en agate, en phase organique en utilisant de l'éthanol anhydre. Cela a permis d'obtenir une poudre de verre non polluée et de granulométrie moyenne 2,5 μm . Cette poudre est ensuite mise en suspension dans de l'éthanol anhydre avec 0,8 % massique d'ester phosphorique, afin de réaliser une barbotine. Un squelette polymérique (billes de PMMA) à architecture rigoureusement contrôlée (diamètre des billes et diamètre d'interconnexions) est ensuite imprégné de cette suspension, puis des traitements thermiques sont appliqués au matériau dans le but d'éliminer le PMMA et de densifier la structure. Ces différentes étapes ont ainsi permis d'obtenir un matériau macroporeux issu de poudre de verre bioactif. Une étude de frittage a montré que le maximum de retrait et de densification est obtenu pour des températures de traitements thermiques comprises entre 700 et 1000°C. Les diffractogrammes montrent que le verre dévitrifie lors du procédé d'élaboration. La phase cristalline majoritaire indexée correspond à $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (ICDD n° : 12-0671) et la phase cristalline minoritaire est Na_3PO_4 (ICDD n° : 31-1318). Ce procédé nous permet donc d'obtenir une vitrocéramique macroporeuse à porosité contrôlée. Des analyses par RMN du ^{29}Si ont permis de montrer que ce matériau a conservé un caractère vitreux, ce qui le classe dans la catégorie des vitrocéramiques.

La vitrocéramique macroporeuse issue de ce procédé n'a plus les mêmes caractérisations physico-chimiques que le verre initial. Nous nous sommes alors intéressés au caractère bioactif de la vitrocéramique. Le chapitre suivant concerne les essais de bioactivité *in vitro* de la vitrocéramique et du verre initial, ainsi qu'une étude préliminaire de leur cytocompatibilité.

¹ **L. L. Hench**

« Biomaterials : a forecast for the future »

Biomaterials, 19 (1988) 1419-1423

² **L. L. Hench**

« Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics »

Journal of Non-Crystalline Solids, 292 (2001) 115-126

³ **J. J. Klawitter, A. M. Weinstein**

« The status of porous materials to obtain direct skeletal attachment by tissue ingrowth »

Acta Orthopaedica Belgica, 40 (1974) 755-765.

⁴ **E. W. White, J. N. Weber, D. M. Roy, E. L. Owen, R. T. Chiroff, R. A. White**

« Replamineform porous biomaterials for hard tissue implant application »

Journal of Biomedical Materials Research, 9 (1975) 23-27.

⁵ **J. J. Klawitter, J. G. Bagwell, A. M. Weinstein, B. W. Sauer**

« An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene »

Journal of Biomedical Materials Research, 10 (1976) 311-23.

⁶ **H. J. Cestero Jr, K. E. Salyer, I. R. Toranto**

« Bone growth into porous carbon, polyethylene, and polypropylene prostheses »

Journal of Biomedical Materials Research, 9 (1975) 1-7.

⁷ **H. Palich W**

« Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic implants »

Journal of Biomedical Materials Research, 4 (1970) 571-577.

⁸ **H. Ylänen, K. H. Karlsson, A. Itälä, H. T. Aro**

« Effect of immersion in SBF on porous bioactive bodies made by sintering bioactive glass microspheres »

Journal of Non-Crystalline Solids, 275 (2000) 107-115.

⁹ **Q. Z. Chen, I. D. Thompson, A. R. Boccaccini**

« 45S5 Bioglass[®]-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering »

Biomaterials, 27 (2006) 2414-2425.

¹⁰ **J. A. Roether, A. R. Boccaccini, L. L. Hench, V. Maquet, S. Gautier, R. Jérôme**

« Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass[®] for tissus engineering applications »

Biomaterials, 23 (2002) 3871-3878.

¹¹ **J. J. Blaker, V. Maquet, R. Jérôme, A. R. Boccaccini, S. N. Nazhat**

« Mechanical properties of highly porous PDLA/Bioglass[®] composite foams as scaffolds for bone tissue engineering »

Acta Biomaterialia, 1 (2005) 643-652

¹² **P. Sepulveda, A. H. Bressiani, J. C. Bressiani, L. Meseguer, B. König, Jr**

« In vivo evaluation of hydroxyapatite foams »

Journal of Biomedical Materials Research, 62 (2002) 587-592.

¹³ **J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, L. L. Hench**

« Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissus engineering »

Biomaterials, 27 (2006) 964-973.

¹⁴ **M. Navarro, S. del Valle, S. Martinez, S. Zeppetelli, L. Ambrsio, J. A. Planell, M. P. Ginebra,**

« New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration »

Biomaterials, 25 (2004) 4233-4241.

¹⁵ **M.H. Prado da Silva, A.F. Lemos, I.R. Gibson, J.M.F. Ferreira, J.D. Santos,**

« Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives »

Journal of Non-Crystalline Solids, 304 (2002) 286-292

¹⁶ **J. C. Knowles, J. D. Santos, G. W. Hastings**

« Glass reinforced Hydroxyapatite Composites »

Brevet n° 00 68 164 (2000).

¹⁷ **O. Richard, S. Zarzynski, M. Descamps, P. Hardouin, A. Gallur**

« Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée »

Brevet n° 97 01 309 (1997)

¹⁸ **M. Descamps, P. Hardouin, J. Lu, F. Monchau**

« Procédé de contrôle de la coalescence des particules formant un édifice, notamment destiné à être utilisé dans la fabrication de produits à pores interconnectés, par exemple, implant osseux »

Brevet n° 02 08 1408 (2002)

¹⁹ **S. Callcut, J. C. Knowles**

« Correlation between structure and compressive strength in a reticulate glass-reinforced hydroxyapatite foam »

Journal of Materials Science : Materials in Medicine, 13 (2002) 485-9

²⁰ **X. Miao, W. K. Lim, X. Huang, Y. Chen**

« Preparation and characterization of interpenetrating phased TCP/HA/PLGA composites »

Materials letters, 59 (2005) 4000-4005.

²¹ **H. R. Ramay, M. Zhang**

« Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods »

Biomaterials, 24 (2003) 3293-3302

²² **H. R. Ramay, M. Zhang**

« Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering »

Biomaterials, 25 (2004) 5171-5180

²³ **H. A. El Batal, M. A. Khalil, A. Soltan Monem et Y. M. Hamdy**

« Characterization of some Bioglass ceramics »

Materials Chemistry and Physics, 80 (2003) 599-609

²⁴ **L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache et A. Govin**

« Transformations structurales du verre bioactif 45S5 lors de traitements thermiques »

Proceeding Matériaux 2006, Dijon, France, cd-rom

²⁵ **I. Lebecq, F. Desanglois, A. Leriche et C. Follet-Houttemane**

« Compositional dependence on the in vitro bioactivity of invert or traditional bioglasses in the Si-Ca-Na-P System »

Journal of Biomedical Materials Research published online 27 Mars 2007

²⁶ **D. C. Clupper, L. L. Hench et J. J. Mecholsky**

« Strength and toughness of tape cast bioactive glass 45S5 following heat treatment »

Journal of the European Ceramic Society, 24 (2004) 2929-2934

²⁷ **A. Leriche**

« Contribution à l'étude de frittage de verre »

Mémoire de stage de Licence, Université d'état de Mons (1980-1981)

²⁸ **D. C. Clupper, L. L. Hench**

« Crystallization kinetics of tape cast bioactive glass 45S5 »

Journal of Non-Crystalline Solids, 318 (2003) 43-48.

²⁹ **A. R. Jones, R. Winter, G. N. Greaves, I. H. Smith**

« MAS NMR study of soda-lime-silicate glasses with variable degree of polymerisation »

Journal of Non-Crystalline Solids, 293-295 (2001) 87-92

³⁰ **M. W. G. Lockyer, D. Holland, R. Dupree**

« NMR investigation of the structure of some bioactive and related glasses »

Journal of Non-Crystalline Solids, 188 (1995) 207-219

³¹ **M. Descamps, M. Mascart et B. Thierry**

« How to control cracking of tape-cast sheets »

American Ceramic Society Bulletin, 74, n°3 (1995) 89-92

**Chapitre 3 : APPROCHE
PRELIMINAIRE DE LA BIOACTIVITE
ET DE LA CYTOCOMPATIBILITE**

Le chapitre précédent a abouti à l'élaboration d'une vitrocéramique macroporeuse à porosité contrôlée. Nous avons, grâce à la diffraction des Rayons X, mis en évidence que la phase cristalline principale présente dans la vitrocéramique était $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ (ICDD 12-0671). L'objectif est d'utiliser cette vitrocéramique comme implant, matériau de comblement osseux, ou de recouvrement. Aussi, il est indispensable de s'assurer de son caractère bioactif. Pour cela, il existe deux possibilités pour tester la bioactivité d'un matériau:

- une étude *in vitro*, correspondant à l'immersion d'un échantillon massif ou pulvérulent dans une solution reproduisant la partie minérale du plasma humain (37°C, pH voisin de 7). La bioactivité est alors contrôlée par la présence d'une couche d'apatite cristallisée à la surface de l'échantillon.
- une étude *in vivo*, nécessitant la préparation et la mise en forme du substitut osseux, ainsi que son implantation en milieu vivant. La bioactivité est alors validée par une liaison stable entre les tissus hôtes et le matériau.

O. P. Filho et al.¹ ont étudié l'effet de la cristallisation sur la formation de la couche d'apatite sur le verre bioactif 45S5. Ces auteurs ont réalisé des traitements thermiques permettant de cristalliser partiellement ou totalement le verre. Un traitement thermique de 150 heures à 550°C entraîne une dévitrification totale du 45S5 et la présence de la phase cristalline $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$. En faisant varier la durée et la température du traitement thermique, ces auteurs obtiennent des volumes de cristallisation dont les taux s'étendent de 8 à 100%. Ils plongent ensuite ces matériaux dans du Fluide Physiologique Simulé (SBF) pendant 20 heures et 40 heures. Des analyses Infra rouge réalisées sur les surfaces des matériaux leur ont ensuite permis d'observer l'apparition ou non de la couche d'Hydroxyapatite carbonatée (HAC). Les échantillons immergés pendant 20 heures ne contiennent l'HAC que s'ils ont un pourcentage cristallisé inférieur ou égal à 36 % en volume. Par contre, après 40 heures d'immersion, ils ont tous réagi et formé la couche d'HAC, quel que soit le taux de cristallisation. Ces auteurs ont donc conclu que la cristallisation du 45S5, même totale, n'empêchait pas l'apparition de la couche d'HAC, mais ralentissait considérablement le mécanisme de bioactivité *in vitro*.

I. ESSAIS DE BIOACTIVITE *IN VITRO*

Nous avons ainsi réalisé des essais de bioactivité *in vitro* en immergeant le verre P3C2 et la vitrocéramique dans du SBF afin d'observer les temps d'apparitions de l'HAC et de déterminer si la présence de la phase cristalline ralentit ou accélère ce temps d'apparition, ou si elle rend le matériau inerte.

T. Kokubo et al.² ont montré que l'immersion du matériau dans du liquide physiologique contenant les mêmes ions à la même concentration que le plasma humain, reproduisait les changements structuraux de la surface du matériau implanté *in vivo*. La couche d'apatite cristallisée formée par les réactions de surface permet l'accrochage de l'implant à l'os vivant *in vivo*.

I. 1. Milieu d'immersion

Le milieu d'immersion utilisé est une solution qui contient la partie minérale du plasma humain, le SBF (Simulated Body Fluid), puisqu'il s'approche de la composition chimique du fluide physiologique réel, mais présente l'avantage de ne pas contenir de protéines. En effet, d'après K. D. Lobel et al.³, l'adsorption des protéines du plasma est une des premières étapes intervenant lors de l'implantation d'un matériau dans le corps humain. Le SBF contient ainsi les éléments nécessaires à la réactivité des échantillons et à la formation des couches formant des liaisons à l'os. Il est préparé dans des conditions similaires à celui élaboré dans les travaux de T. Kokubo et al.⁴, avec les produits pulvérulents suivants, finement broyés et mélangés à de l'eau déminéralisée :

- NaCl, de chez Carlo Erba ; chlorure de sodium de pureté 99,5% minimum,
- NaHCO₃, de chez Riedel-de Hæn ; hydrogénocarbonate de sodium de pureté 99,7% minimum,
- KCl, de chez Carlo Erba ; chlorure de potassium de pureté 99% minimum,

- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, de chez Merck ; hydrogénophosphate de potassium trihydraté de pureté 99,5% minimum,
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, de chez Merck ; chlorure de magnésium hexahydraté de pureté 99,5% minimum,
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, de chez Riedel-de Hæn ; chlorure de calcium dihydraté de pureté 99% minimum,
- Na_2SO_4 , de chez Chimie Plus Laboratoires ; sulfate de sodium de pureté 99% minimum.

Le Tableau 1 résume les concentrations des ions présents dans le SBF.

Ions	Concentrations en mmol/l	
	S.B.F.	Plasma humain
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	147,8	103,0
HCO_3^-	4,2	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5
pH	7,25-7,42	7,24-7,40

Tableau 1 : Compositions molaires du SBF

Le mélange est ensuite tamponné à pH normal du plasma humain (pH = 7,42) à l'aide de trishydroximéthylaminométhane de chez Carlo Erba, de concentration 50 mmol/l et d'acide chlorhydrique de chez Carlo Erba, à 45 mmol/l et complété avec de l'eau déminéralisée. Il est conservé une semaine maximum sous agitation permanente.

I. 2. Expérimentation

L'idée est de maintenir une surface de contact entre le verre et le fluide physiologique,

toujours constante. En effet, pour que les mesures soient reproductibles, il faut maintenir un rapport surface du verre (S) sur volume de SBF (V) constant.

1. 2. 1. Préparation des échantillons

Afin de réaliser les tests *in vitro*, et que les résultats soient reproductibles et comparables entre les différents tests, les échantillons doivent être strictement identiques entre eux. Ils doivent être issus de la même granulométrie de poudre de verre, élaborés dans les mêmes conditions opératoires, et avoir des surfaces identiques entre eux. En effet, les travaux de I. Lebecq et al.⁵ ont montré que la surface en contact entre l'échantillon et le fluide physiologique devait être constant, afin de maintenir un rapport surface de l'échantillon (S) sur le volume de SBF (V) constant. Pour cela, la préparation des pastilles s'est faite de la façon suivante :

- De la poudre de verre de granulométrie 2,5 μm , obtenue après 9 heures de broyage, est mélangée avec de l'éthanol anhydre dans des proportions de 70% de matière sèche.
- Le mélange est dispersé 40 minutes (100 tours/min).
- La barbotine est coulée dans des moules cylindriques de 16 mm de diamètre et de 2 mm de hauteur, sur un support en plâtre, permettant ainsi l'élimination du solvant.
- La pastille est ensuite démoulée, séchée à l'ambiante pendant 24 heures, puis densifiée à 900°C avec une cinétique de chauffe de 3°C/min, un maintien 3 heures à cette température, puis une descente à 3°C/min. Les pastilles de vitrocéramique obtenues ont alors toutes les mêmes dimensions : un diamètre de 14,5 mm et une épaisseur de 1,7 mm.
- Ces pastilles sont alors déposées au fond de moules cylindriques de diamètre égal à 3 cm et de hauteur 1,3 cm maximum. Une résine époxy est ajoutée à froid afin de remplir le moule et de recouvrir totalement la pastille.
- Après durcissement, la face inférieure du cylindre résine ainsi que la pastille sont polies, afin d'obtenir une surface plane. Pour avoir toujours le même état de surface, le polissage a toujours été réalisé dans les mêmes conditions, c'est-

à-dire avec du papier SiC 1200 à une vitesse de rotation de 200 tr/min pour la vitrocéramique et 500 tr/min pour le verre massif. D'autres polissages ont été réalisés, mais une vitesse de rotation de la polisseuse plus élevée ou un papier SiC plus gros entraînent des fissurations dans la pastille.

Des pastilles de géométrie identiques ont été préparées directement à partir du verre afin de comparer les temps d'apparition de l'HAC de la vitrocéramique et du verre P3C2.

Pour cela, le verre a été soit coulé lors de la synthèse, dans un moule en acier préchauffé ayant les dimensions de 14,5 mm (diamètre des pastilles après frittage), soit coulé sous forme d'un plus gros bloc qui a été ensuite usiné jusqu'à obtenir les dimensions désirées.

Afin de réaliser ces essais de bioactivité *in vitro* sur la vitrocéramique macroporeuse élaborée lors du chapitre II, nous avons dû immerger le matériau tel quel dans le SBF, sans le mettre en résine. En effet, les macropores permettent à la résine de s'insérer au cœur du matériau, ce qui le rend inutilisable pour la suite de l'étude. Cet essai donnera simplement une indication sur l'apparition de l'HAC, mais nous ne pourrons pas comparer ces résultats à ceux obtenus sur le verre P3C2 et sur la pastille de vitrocéramique.

I. 2. 2. Le volume de SBF

Les pastilles ainsi préparées et mises en résine sont alors prêtes pour réaliser les essais de bioactivité en les plongeant dans le SBF. Le rapport S / V (surface sur volume) devant être constant, et la surface l'étant, il faut alors fixer le volume de SBF utilisé par essai, afin de garantir un maximum de reproductibilité dans le procédé. Le but est d'apporter à l'échantillon les quantités d'ions qu'il recevrait dans le milieu naturel à savoir un flux constant en calcium et phosphore nécessaire aux réactions de surface. D'après I. Lebecq et al.⁵, deux types de manipulations sont alors possibles, soit utiliser des volumes de SBF constants, renouvelés régulièrement par changement de la solution, soit d'utiliser des volumes de fluides plus importants, qui ne subiront qu'une modification de concentration négligeable.

Notre choix s'est donc porté sur la deuxième possibilité, c'est-à-dire de travailler sur un volume plus important : 60 mL de SBF par essai. Ce volume permet donc une plus grande reproductibilité car il ne nécessite pas d'étapes intermédiaires comme le renouvellement de la

solution au cours de la manipulation.

1. 2. 3. Le bain thermostaté

Pour reproduire entièrement le milieu humain vivant, il faut non seulement un plasma de synthèse, mais aussi la température normale du corps humain. Pour cela, un bain thermostaté a été utilisé et fixé à une température de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Il correspond à un thermostat à immersion adapté à un aquarium dans lequel sont placés, pendant différentes durées, des récipients fermés et étanches en polystyrène qui eux-mêmes vont contenir les 60mL de SBF et la pastille insérée dans la résine.

1. 2. 4. Analyse des surfaces par Spectroscopie Infra Rouge

Les échantillons sont immergés dans le SBF pendant des durées maximales de 24 heures.

Après immersion, ils sont rincés à l'eau déminéralisée puis séchés dans un dessiccateur.

- La surface des échantillons est grattée afin de recueillir un peu de poudre dans le but de réaliser des pastilles de KBr pour les analyser par spectroscopie Infra-Rouge.
- Afin de compléter cette analyse, une coupe transversale du bloc est effectuée pour pouvoir observer la réactivité de la pastille. Les modifications de surface sont observées au Microscope Electronique à Balayage suivies d'une analyse EDS. Trois états de surface peuvent être mis en évidence par microscopie :
 - La formation d'une couche de gel de silice amorphe,
 - La précipitation d'une couche de phosphate de calcium amorphe (CaP amorphe),
 - Le développement d'une couche d'Hydroxyapatite cristallisée carbonatée (HAC).

Le temps que met le verre pour former sa couche d'apatite cristallisée définit sa bioactivité. Plus la formation sera rapide, plus le verre sera bioactif.

Les spectres Infra Rouge du verre P3C2 massif aux différents temps d'immersion, avec un polissage de 500 tr/min ont été traités et sont reportés sur la Figure 1.

Verre P3C2

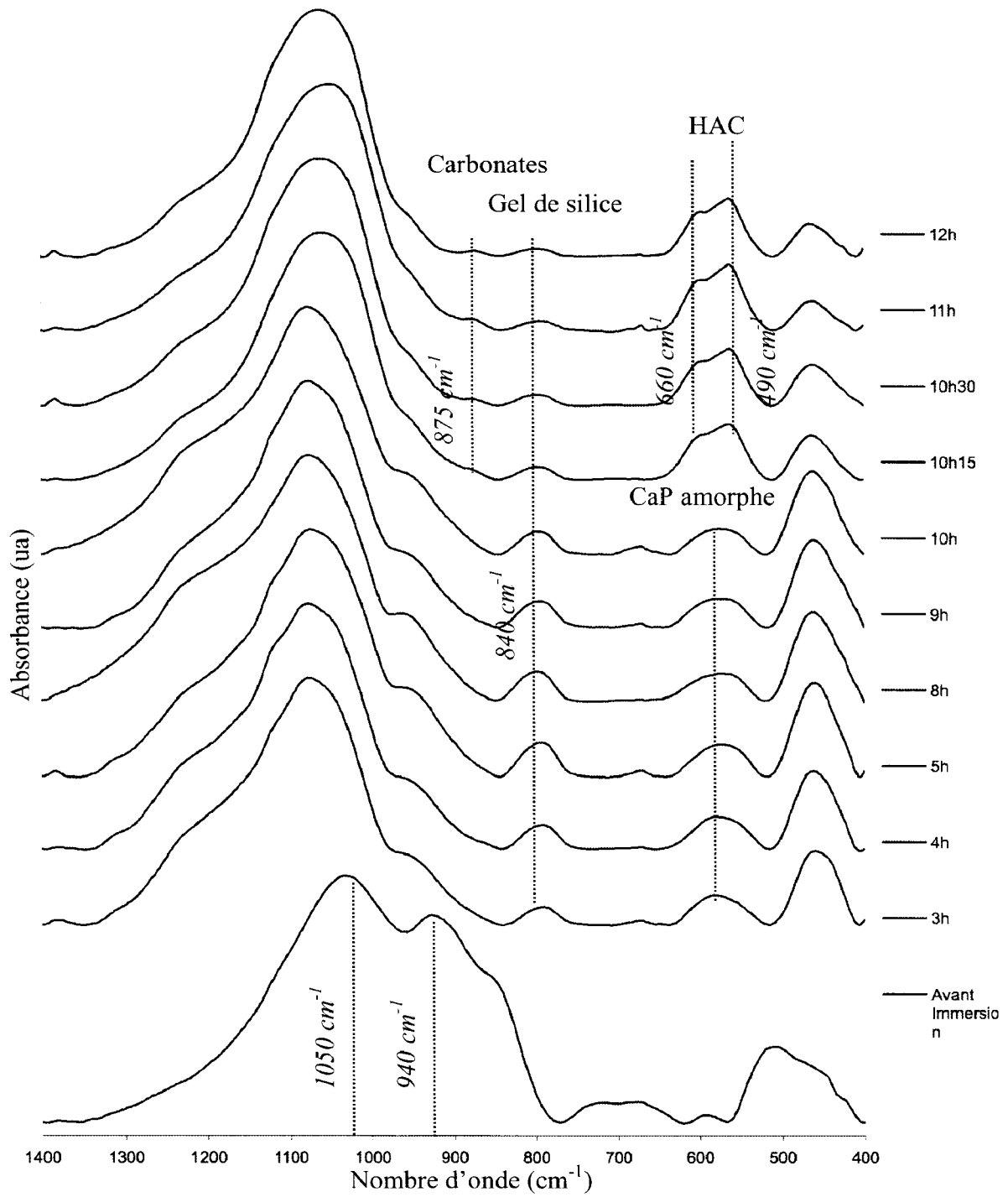


Figure 1 : Spectres Infra Rouge du verre P3C2 (polissage 1200)

Avant immersion dans le SBF, les bandes situées à 1050 et 940 cm^{-1} correspondent respectivement à une vibration d'élongation asymétrique de la liaison Si-O avec 4 oxygènes pontants ($\nu_{\text{Si-O}}$) (4BO) et à une vibration d'élongation de liaison Si-O dans des unités SiO_4 ($\nu_{\text{Si-O}}$) avec deux oxygènes non pontés (2NBO). Ces bandes diminuent lors de l'immersion dans le SBF. De plus, l'épaule à 840 cm^{-1} avant immersion, attribuable à la vibration d'élongation de Si-O dans SiO_4 avec 2NBO, diminue également et tend à disparaître. La troisième bande à 660 cm^{-1} correspond à une vibration d'élongation symétrique de la liaison Si-O ($\nu_{\text{s Si-O}}$) dans les tétraèdres SiO_4 avec les 4 oxygènes pontés (4BO), et la bande à 490 cm^{-1} indique une vibration de déformation angulaire Si-O-Si entre les tétraèdres SiO_4 ($\delta_{\text{Si-O-Si}}$). Ces deux dernières diminuent fortement lors de l'immersion dans le SBF. Il faut noter, qu'à 3 heures d'immersion, le réseau silicate se dépolymérise, ce qui est confirmé par l'apparition à 3 heures d'immersion d'une bande située à 790 cm^{-1} , attribuable à la vibration d'élongation symétrique des liaisons Si-O tétra, correspondant ainsi à la formation d'un gel de silice. Cette formation du gel de silice est précédée par un relargage des Ca^{2+} et des Na^+ dans la solution, et après 3 heures d'immersion, il est à noter que le CaP amorphe est déjà formé à la surface du verre. De plus, à 10h15 d'immersion dans le SBF, il apparaît vers 890 cm^{-1} , une bande caractéristique de la vibration d'élongation C-O, correspondant à l'apparition des carbonates. Enfin, sur le spectre à 10h15 d'immersion, un dédoublement de la bande initialement située à 590 cm^{-1} , en deux bandes situées à 560 et 600 cm^{-1} est observé. Ces deux valeurs sont caractéristiques de la vibration angulaire de la liaison O-P-O prouvant ainsi la formation de l'HAC. La bande caractéristique de la présence de carbonates située à 875 cm^{-1} indique que ces derniers sont venus s'insérer dans la couche de CaP amorphe afin de former l'HAC. Le verre massif P3C2 développe ainsi sa couche d'HAC en 10h15 d'immersion dans le SBF.

Cette étude a également été réalisée sur les pastilles de vitrocéramique densifiées, afin de comparer les modifications que le broyage et le frittage peuvent engendrer sur la bioactivité du matériau. La Figure 2 représente la superposition des spectres IR obtenus sur les pastilles de vitrocéramique, à différents temps d'immersion dans le SBF.

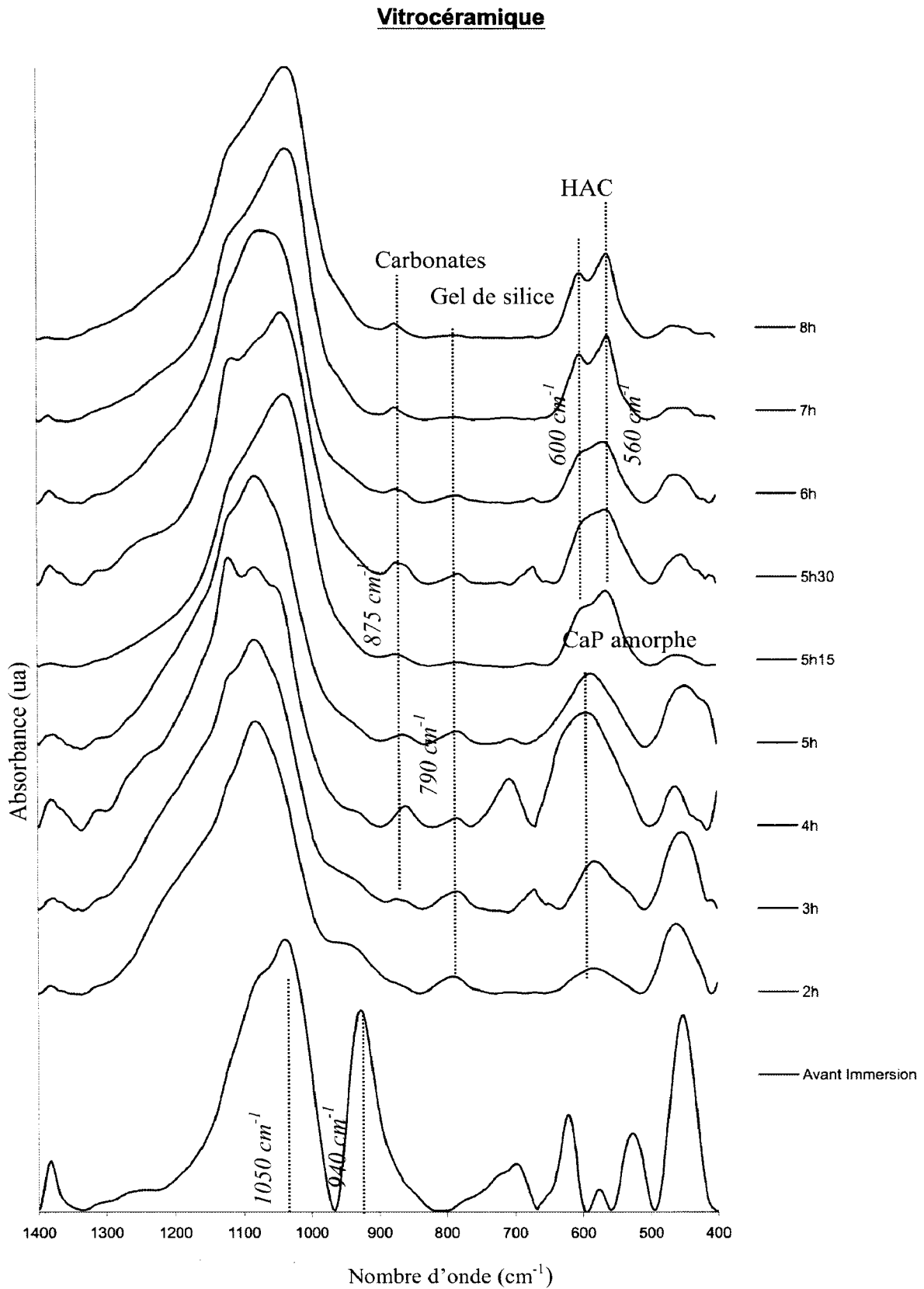


Figure 2 : Spectres Infra Rouge des pastilles vitrocéramiques (polissage : 320 tr/min)

La Figure 2 nous indique que le gel de silice est formé à partir de 2 heures d'immersion dans le SBF, et que le dédoublement de la bande caractéristique du CaP amorphe apparaît au bout de 5h15. Les pastilles de vitrocéramique ont donc une couche d'HAC qui apparaît après 5h15 d'immersion dans le SBF au lieu des 10h15 nécessaires pour le verre P3C2.

Ces essais démontrent une meilleure bioactivité *in vitro* de la vitrocéramique comparée au verre P3C2 dans le SBF. Ces observations peuvent être expliquées par l'état microporeux de la pastille de vitrocéramique permettant au fluide physiologique de circuler dans le matériau, et ainsi d'augmenter considérablement la surface de contact entre le SBF et le matériau.

En ce qui concerne les essais d'immersion dans le SBF de la vitrocéramique macroporeuse, nous n'avons pas réussi à déceler l'HAC sur les spectres Infra Rouge. En effet, la surface du matériau est très fine, et il est difficile de la gratter et de récupérer une fine, couche sans gratter le verre. Afin de mettre en évidence la formation de la couche d'HAC, des analyses EDS sur le verre et sur la vitrocéramique ont été effectuées.

1. 2. 5. Analyses des surfaces par EDS

Des micrographies de coupes transversales des pastilles de vitrocéramique après 6 et 12 heures d'immersion dans le SBF, ainsi que du verre P3C2 après 11 heures d'immersion, ont été réalisées afin de visualiser les différentes couches résultant du mécanisme de formation de l'Hydroxyapatite.

1. 2. 5. 1. Analyses EDS du verre P3C2 après 11 heures d'immersion dans le SBF

La micrographie, obtenue par Microscope Electronique à Balayage (MEB), du verre P3C2 (Figure 3) est discutée selon une ligne de profil, sur laquelle figurent les points 1 à 4.

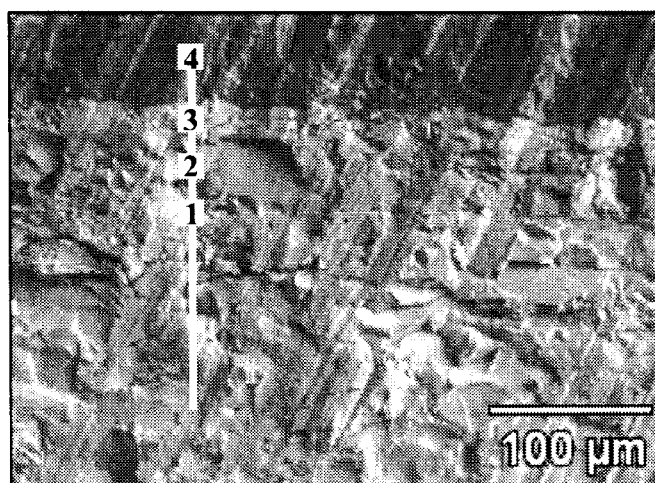


Figure 3 : Coupe transversale du verre P3C2 à 11 heures d'immersion dans le SBF

Quatre domaines, peuvent être distingués sur la micrographie (Figure 3).

- La première couche à en bas correspond au verre (point 1)
- La deuxième, juste au-dessus doit correspondre à la couche de gel de silice (point 2)
- La troisième devrait être l'HAC cristallisée (point 3)
- Enfin, la dernière est la résine d'enrobage du bloc (point 4)

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons réalisé des analyses semi-quantitatives par EDS sur ces différents points (Tableau 2).

	Composition chimique molaire (%)			
	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅
avant immersion	43,56	22,19	31,23	3,02
point 1	43,01	22,53	31,13	3,33
point 2	60,9	20,6	10,34	8,16
point 3	22,34	47,64	14,11	15,91

Tableau 2 : EDS du verre à différents points de la coupe transversale, à différents temps d'immersion dans le SBF (incertitude de 1 % sur la mesure)

D'après ces résultats d'EDS (Tableau 2), nous observons, pour le point 1 correspondant à la partie du verre de la micrographie, que la composition du verre a peu changé. Les premières étapes de réactivité (relargage de Na_3PO_4 et hydrolyse du verre en surface) ont peu modifié la composition du verre.

En ce qui concerne le point 2, le taux de SiO_2 est passé de 43,56 % molaire avant immersion, à 60,9 % molaire. Ce taux élevé confirme donc que le point 2 correspond à la couche du gel de silice. Il est à noter la présence dans cette couche, de calcium, sodium et phosphore, ce qui, d'après les travaux de I. Lebecq et al.⁵, est dû à la migration des complexes phosphates des cations modificateurs (Ca^{2+} et Na^+) du verre vers le milieu extérieur.

L'analyse de la composition du 3^{ème} point montre une forte augmentation des taux de calcium et de phosphore, et un rapport Ca/P proche de 1,5. Ces observations confirment bien que le point 3 se situe dans la couche de phosphate de calcium, appelé Hydroxyapatite carbonatée (HAC).

I. 2. 5. 1. Analyses EDS de la pastille de vitrocéramique après 6 et 12 heures d'immersion dans le SBF

De la même façon que pour le verre P3C2, nous avons réalisé une micrographie MEB sur la coupe transversale de la vitrocéramique immergée dans le SBF (Figure 4).

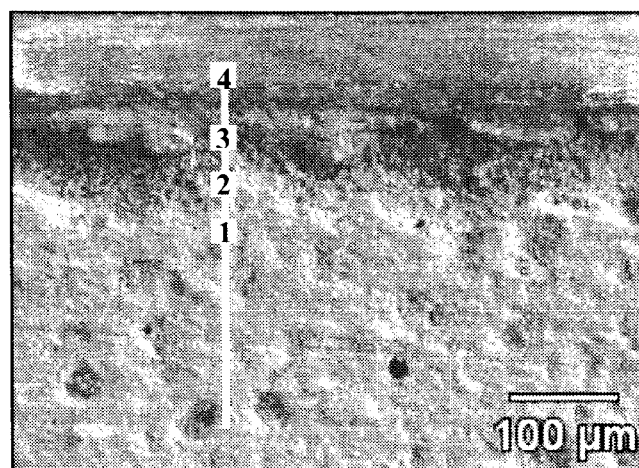


Figure 4 : Coupe transversale de la vitrocéramique à 6 heures d'immersion dans le SBF

Contrairement à la photographie de la coupe transversale du verre P3C2 (Figure 3), nous ne distinguons pas les différentes couches significatives du mécanisme de bioactivité. Nous avons cependant réalisé des analyses semi-quantitatives par EDS à 3 points de la pastille (Tableau 3).

Temps d'immersion dans le SBF		% atomique molaire		
		plusieurs points pris à la surface de la pastille		
vitrocéramique	SiO ₂ (≈ 4)	46,03		
	CaO (≈ 3)	25,07		
	Na ₂ O (≈ 3)	25,13		
	P ₂ O ₅ (≈ 1)	3,76		
		point 1	point 2	point 3
6 heures	SiO ₂ (≈ 4)	48,44	47,29	50,82
	CaO (≈ 3)	25,83	23,89	24,51
	Na ₂ O (≈ 3)	22,20	25,00	20,47
	P ₂ O ₅ (≈ 1)	3,53	3,82	4,21
12 heures	SiO ₂ (≈ 4)	48,97	49,86	53,40
	CaO (≈ 3)	22,70	21,20	20,46
	Na ₂ O (≈ 3)	24,69	25,41	22,40
	P ₂ O ₅ (≈ 1)	3,64	3,53	3,74

Tableau 3 : EDS de la vitrocéramique à différents points de la coupe transversale, à différents temps d'immersion dans le SBF (incertitude de 1% sur la mesure)

Les compositions molaires atomiques des points 1 et 2 ne semblent pas varier, contrairement au verre P3C2 dense. Cependant, pour le point 3, le taux molaire de SiO₂ augmente légèrement, et celui de CaO diminue, correspondant à une lixiviation des ions Ca²⁺, c'est-à-dire à une dissolution du verre s'accompagnant d'une perte de calcium.

Ces analyses EDS ne nous ont pas permis d'observer la couche d'HAC mise en évidence par la spectroscopie Infra rouge, cette couche étant certainement de trop faible épaisseur pour la visualiser.

Une autre technique a donc été réalisée afin de mettre en évidence la formation de la couche d'HAC : la RMN du ²³Na et du ³¹P, sur la vitrocéramique macroporeuse après une immersion

de 7 jours dans le SBF.

I. 1. 6. Analyse structurale de la vitrocéramique après immersion, par RMN du ^{23}Na et du ^{31}P

La Figure 5 correspond au spectre RMN du ^{23}Na de la vitrocéramique, après 7 jours d'immersion dans le SBF. Les analyses des verres par RMN-MAS du ^{23}Na ont été réalisées sur spectromètre Brüker AVANCE 400 (9.4T). La fréquence de résonance a été observée à 105,8 MHz. Le composé de référence est du chlorure de sodium (NaCl) en solution saturée. La rotation à l'angle magique a été effectuée avec une vitesse de 10 kHz. Le signal a été enregistré suite à une impulsion radiofréquence de 1 μs , et un temps de relaxation de 5s. Le nombre d'acquisitions effectuées pour ce spectre est de 128.

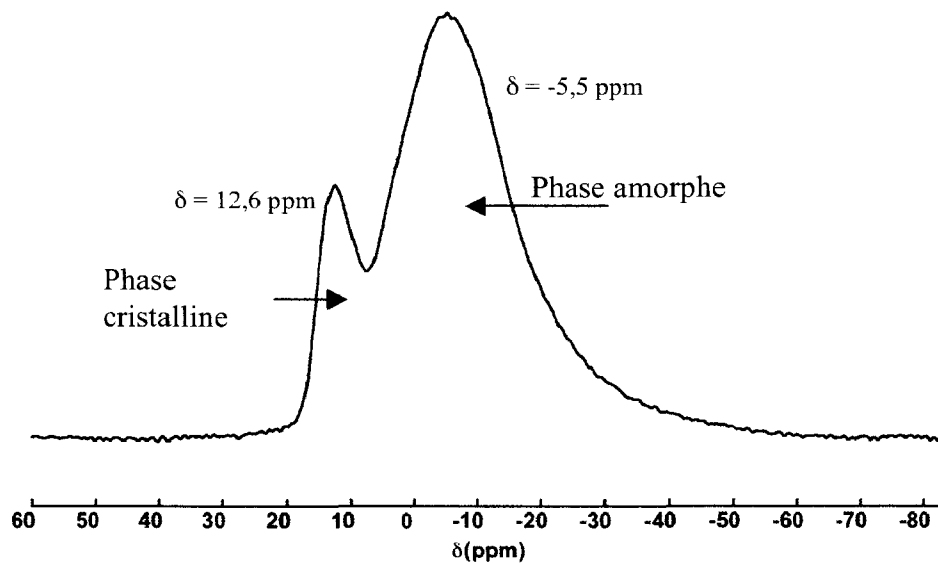


Figure 5 : Spectre RMN du ^{23}Na de la vitrocéramique macroporeuse après 7 jours d'immersion dans le SBF

Le spectre RMN du ^{23}Na de la vitrocéramique macroporeuse après 7 jours d'immersion dans le SBF montre deux composantes.

- la première est située à 12,5 ppm et a une largeur à mi hauteur de 6,1 ppm
- la deuxième est située à -5,5 ppm et a une largeur à mi-hauteur de 21,5 ppm.

A. R. Jones et al.⁶ ont réalisé des analyses RMN du ^{23}Na et du ^{29}Si , le verre $\text{CaO}(\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_7)$ ayant subi un traitement thermique de dévitrification (660°C pendant 24 heures avec une

cinétique de chauffe de 40°C/min). Ces auteurs ont comparé le spectre du verre initial (amorphe), avec son équivalent dévitrifié. Ils ont ainsi montré, dans un premier temps et grâce à la RMN du ^{23}Na , que le composé traité thermiquement contenait une phase amorphe, et une phase cristalline. De plus, le spectre obtenu par RMN du ^{23}Na du verre traité thermiquement est similaire au spectre que nous avons obtenu pour notre composé immergé 7 jours dans le SBF. Ces auteurs ont ainsi attribué leur raie fine située vers 26 ppm à une phase cristalline, et leur pic plus large et situé vers 5 ppm, à une phase vitreuse. Nous pouvons donc en déduire que notre pic situé à 12,5 ppm, dont la largeur à mi-hauteur est de 6,1 ppm, est attribuable à une phase cristalline, et que notre pic situé à -5,5 ppm et dont la largeur à mi-hauteur est de 21,5 ppm, est attribuable à une phase amorphe.

La vitrocéramique macroporeuse après 7 jours d'immersion dans le SBF a également été analysée par RMN du ^{31}P . La figure 6 représente la superposition des spectres RMN du ^{31}P du verre P3C2, de la vitrocéramique P3C2 ayant subi un traitement thermique de 1000°C pendant 24 heures, et enfin, de la vitrocéramique macroporeuse plongée 7 jours dans le SBF.

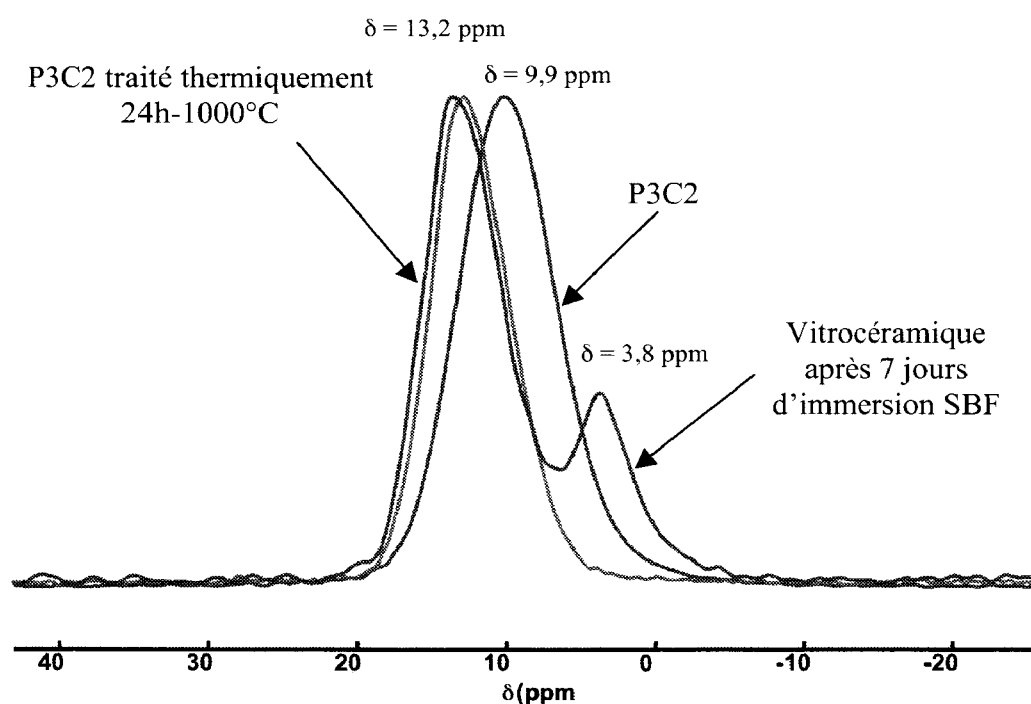


Figure 6 : Superposition des spectres RMN du ^{31}P du verre P3C2, de P3C2 traité thermiquement (24h-1000°C), et vitrocéramique macroporeuse après 7 jours d'immersion dans le SBF.

Le spectre RMN du ^{31}P issu de la vitrocéramique immergée dans le SBF présente deux composantes. La première est située à 13,2 ppm avec une largeur à mi-hauteur de 6,2 ppm, et la seconde est située à 3,5 ppm avec une largeur à mi hauteur de 4,4 ppm.

S. Hayakawa et al.⁷ ont analysé grâce à la RMN du ^{31}P , les structures de l'Hydroxyapatite et de l'Hydroxyapatite cristallisée et celle d'un verre $50\text{CaO}-50\text{SiO}_2$ ayant été immergé dans du SBF. Ces auteurs ont obtenu des spectres ayant un déplacement chimique isotrope situé à 2,7 ppm et une largeur à mi-hauteur de 1,4 ppm pour l'Hydroxyapatite, et un δ égal à 2,8 ppm avec une largeur à mi-hauteur de 0,5 ppm pour l'Hydroxyapatite cristallisé. En ce qui concerne l'apatite développée à la surface de leur verre, l'apatite résonne à 2,8 ppm avec une largeur à mi-hauteur de 3 ppm. Ces auteurs ont déterminé également les déplacements chimiques de deux autres familles d'apatites A et B correspondant à des carbonatohydroxyapatites : les déplacements évoluent entre 2,8 et 5,5 ppm. Cette variation de déplacement chimique est due à des pourcentages massiques différents de carbonate. Nous pouvons alors supposer que notre raie à 3,5 ppm est associé à la présence d'une carbonatohydroxyapatite, qui serait en outre très mal cristallisée en raison de la valeur élevée de largeur mi-hauteur de la bande de résonance.

I. 3. Conclusion

Cette étude de bioactivité *in vitro* nous a donc permis de mettre en évidence un temps d'apparition de l'HAC de 10h15 pour le verre P3C2, et de 5h15 pour la vitrocéramique. Grâce aux analyses EDS et de micrographies MEB des faciès de rupture des échantillons, nous avons pu distinguer correctement pour le verre P3C2 les couches caractéristiques du mécanisme de bioactivité (gel de silice, et formation de l'apatite). En revanche, ces couches n'ont pas pu être observées sur la pastille de vitrocéramique car la couche d'apatite devait être trop fine. Une analyse structurale de la vitrocéramique par RMN du ^{31}P nous a permis d'identifier la présence d'apatite mal cristallisée et contenant beaucoup de carbonates dans la vitrocéramique macroporeuse après 7 jours d'immersion dans le SBF. Enfin une analyse par RMN du ^{23}Na nous a permis de confirmer encore l'existence d'une phase vitreuse dans la vitrocéramique après avoir été immergée dans du fluide physiologique simulé.

II. APPROCHE BIOLOGIQUE PRELIMINAIRE

Le biomatériau idéal doit être parfaitement biocompatible : c'est-à-dire que le matériau et ses produits de dégradation ne doivent pas provoquer de réactions inflammatoires allergiques⁸, immunitaires et qu'ils doivent être non toxiques, non mutagènes et non carcinogènes⁹.

Beaucoup d'expériences en rapport avec les implants céramiques et leur potentiel ostéogénique ne peuvent pas être comparées avec fiabilité, car les diverses méthodes de fabrication induisent différentes réactivités chimiques à la surface du matériau. Les matériaux ayant des compositions chimiques similaires n'ont pas forcément les mêmes effets biologiques. Toute évaluation d'un nouveau biomatériau doit inclure des tests de biocompatibilité. Les techniques de biologie cellulaire sont intéressantes car elles sont simples à mettre en œuvre et surtout reproductibles.

Les tests de cytocompatibilité consistent à déterminer l'influence d'un matériau sur la viabilité cellulaire et sont appliqués en respectant les normes et directives européennes, "Biological evaluation of medical devices - Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods".

Ces tests permettent d'évaluer le comportement de cultures de cellules (correspondant à l'implantation du dispositif médical), par diverses analyses telles que la prolifération, l'adhésion ou la migration cellulaire.

II. 1. Bibliographie

Des essais de cytocompatibilité¹⁰ ont été réalisés sur le verre 45S5, qui est l'un des bioverres les plus étudiés, et ont montré que ce verre cause une alcalinisation extra et intra-cellulaire. Cette variation de pH est due à la dissolution de surface du verre, et à un enrichissement du milieu en cations Ca^{2+} et Na^+ , ainsi qu'un appauvrissement en ions H^+ . Il a été montré que le 45S5 n'a pas d'effet sur la viabilité des ostéoblastes, et n'affecte pas leur prolifération.

I. Lebecq et al.⁵ ont également réalisé des essais de cytocompatibilité sur les verres C1 et P1C1 de composition chimique molaire respectivement $42 \text{ SiO}_2 - 23,5 \text{ CaO} - 34,5 \text{ Na}_2\text{O}$ et $41,58 \text{ SiO}_2 - 23,265 \text{ CaO} - 34,155 \text{ Na}_2\text{O} - 1 \text{ P}_2\text{O}_5$. Ces auteurs ont constaté que ces verres

n'étaient pas particulièrement favorables à la repousse osseuse, compte tenu de leur composition. En effet, les verres sont très riches en sodium, ce qui induit une très grande solubilité et rend par conséquent l'environnement *in vitro* trop agressif pour les cellules.

Les tests de cytotoxicité *in vitro* sont définis par des normes internationale et européenne ISO 10993-5 et EN 30993-5¹¹ qui proposent une gamme de tests dont le choix dépend de la nature des éprouvettes à évaluer, du site potentiel d'utilisation et de la nature de l'emploi du biomatériau.

Les tests retenus sont les suivants :

- l'évaluation de la cytotoxicité, en mesurant la viabilité cellulaire,
- l'étude de la cytocompatibilité en contact direct, dont plusieurs critères sont pris en compte :
 - la prolifération cellulaire
 - la vitalité cellulaire
- l'adhésion cellulaire

Les essais biologiques réalisés lors de cette étude ont été effectués au Groupe de Recherche sur les Biomatériaux de la faculté de Médecine de Lille 2.*

II. 2. Évaluation de la viabilité cellulaire (méthode du clonage)

Les tests de cytotoxicité consistent à déterminer l'influence d'un matériau sur la viabilité cellulaire.

La survie cellulaire a été étudiée à partir de cellules épithéliales L132 reconnues pour leur aptitude à cloner et couramment utilisées pour ce test.

Cette étude de cytocompatibilité a été réalisée sur le verre P3C2 pour évaluer sa cytotoxicité.

II. 2. 1. Préparation des échantillons

La poudre de verre P3C2 est obtenue après un broyage planétaire du verre massif, en utilisant

* Nous remercions Mademoiselle Cherry Fchai et Monsieur Frédéric Hildebrand, pour leur collaboration lors de cette étude.

l'alcool anhydre comme solvant. Le diamètre moyen des poudres, mesuré par granulométrie laser, est de l'ordre de 2,5 μm (Figures 28 et 29 page 117)

La poudre de verre est ensuite stérilisée par exposition aux rayons ultraviolets pendant 1h30.

II. 2. 2. Culture cellulaire

Les tests biologiques sont réalisés suivant la norme ISO 10993-5/EN 30993-5¹¹. Pour améliorer la reproductibilité des mesures, les cellules de la lignée d'origine sont initialement congelées dans 5 tubes cryogéniques, en prévision d'une étude complémentaire.

Pour le test de cytotoxicité, les Cellules L132 : (ATCC-CCL 5, cellules épithéliales embryonnaires de poumon humain) seront utilisées. Elles sont cultivées et subissent des repiquages réguliers dans le Milieu Eagles (MEM, no 2011, Eurobio) supplémenté avec 5% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF).

Les colonies formées par les cellules épithéliales L132 sont denses et très bien délimitées (Figure 7).

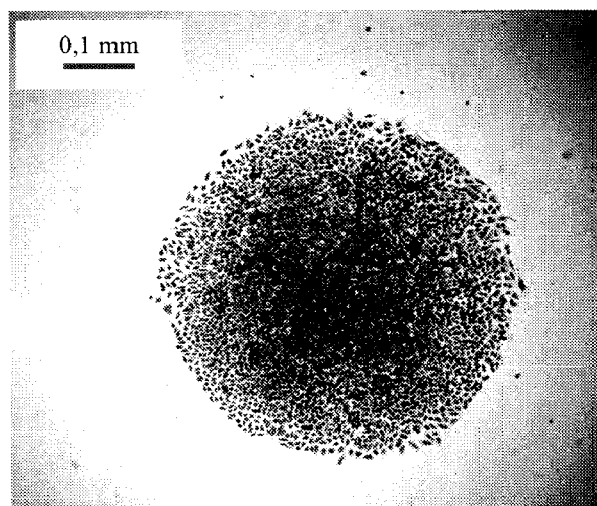


Figure 7 : Aspect d'une colonie de cellules épithéliales L132, formée après 10 jours de culture

II. 2. 3. Méthodes expérimentales

Ce test consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et par conséquent la concentration létale 50% (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies¹²⁻¹³⁻¹⁴.

Pour ce test, nous utilisons la lignée cellulaire L132. Ces cellules sont très sensibles aux substances toxiques et réagissent avec une reproductibilité très constante¹⁵. Le témoin négatif est le Polytétrafluoroéthylène (PTFE) (réf. Goodfellow FP3060010) taille moyenne des particules : 6-9 µm. Le témoin positif est le nickel pur en poudre.

Les cellules poussent dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, Costar) à la densité initiale de 300 à 800 cellules/boîte de façon à obtenir en moyenne 100 colonies par boîtes en fin d'expérience. Les cellules sont incubées pendant 12 jours dans une étuve saturée en humidité, à 5% de CO₂ à 37°C dans 5 mL de milieu MEM supplémenté par 10% (v/v) de SVF.

L'exposition est continue et les concentrations sont variables, allant de 25 à 400 µg/mL pour le bioverre P3C2 et de 5 à 80 µg/mL pour le Nickel. Au moins 6 expériences ont été réalisées pour chaque concentration. Le milieu de culture n'a jamais été renouvelé pendant la durée de l'expérience. Chaque expérience comporte 3 boîtes pour chaque concentration. En fin d'expérience, les cellules sont fixées et colorées avec le Cristal Violet. La survie des cellules exposées est calculée par rapport aux cultures témoins (100%). Ceci permet d'établir la concentration létale 50%, un critère précis pour la comparaison de l'effet cytotoxique de différentes substances¹⁴. Une classification par ordre de cytotoxicité en résulte.

L'effet relatif de clonage (ERC) est calculé selon les formules suivantes et exprimé en % par rapport à la culture contrôle (concentration = 0 µg/mL)

$$(1) \quad \text{Culture contrôle} \quad C : \frac{\text{nombre de colonies} \times 100}{\text{nombre de cellules ensemencées}} = X_C\%$$

$$(2) \quad \text{Culture exposée} \quad E : \frac{\text{nombre de colonies} \times 100}{\text{nombre de cellules ensemencées}} = X_E\%$$

$$(3) \quad \text{ERC} (\%) = \frac{X_E \times 100}{X_C}$$

II. 2. 4. Résultats des tests de cytotoxicité

Les courbes de viabilité (Figure 8) ont été effectuées sur le verre P3C2 et comparées au nickel pris comme témoin positif.

Pour le verre P3C2, la viabilité reste constante à 100% jusqu'à 200 $\mu\text{g/mL}$. Cependant il a été possible de déterminer la LC50 pour une très forte concentration de 400 $\mu\text{g/mL}$ de poudre.

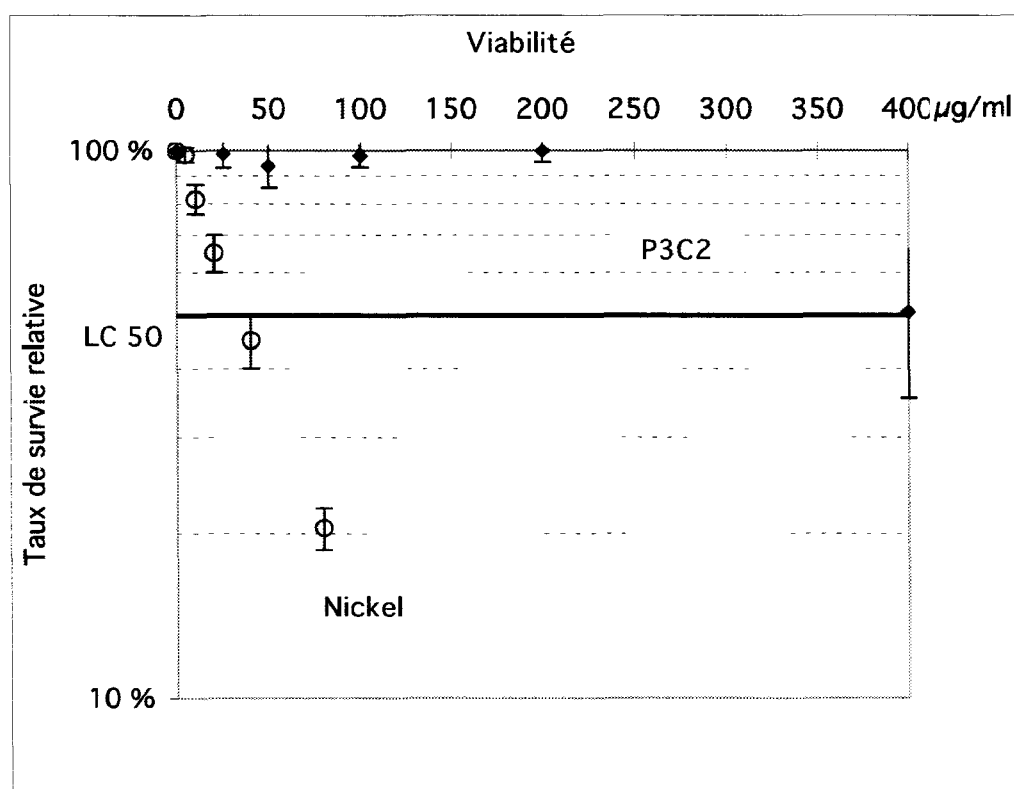


Figure 8 : Survie des cellules L132 établie par la méthode du clonage en présence de poudre de verre P3C2 (n=6 nickel : témoin positif).

II. 2. 5. Discussion

Le principal atout de ce test est de fournir des résultats spécifiques de la cytotoxicité du produit testé sans dépendre de l'architecture ou de l'état de surface des échantillons. En effet, la poudre fine n'induit pas de rugosité ou d'autres facteurs pouvant interférer sur le

comportement cellulaire. De plus, la taille des poudres est inférieure à 50 μm , comme recommandé par la norme¹¹, ce qui permet :

- de présenter une surface spécifique importante et par conséquent de rendre la poudre plus réactive
- de travailler avec des grains inférieurs à 50 μm , susceptibles d'être phagocytés par les ostéoblastes, ce qui permet une évaluation intracellulaire de la toxicité du matériau.
- de déterminer, dans le cas de substances toxiques, la concentration qui provoque la mort de 50 % des cellules exposées : concentration létale 50 % ou LC50.

La poudre de verre montre une parfaite cytotocompatibilité, identique aux témoins, avec une survie cellulaire de 100 % pour une concentration allant jusque 200 $\mu\text{g/mL}$. Le Nickel, témoin positif, montre une cytotoxicité relative avec une LC50 de 35 $\mu\text{g/mL}$ en utilisant les cellules épithéliales. Toutefois, pour une concentration extrême de 400 $\mu\text{g/mL}$, une chute de la viabilité est nettement montrée et plusieurs hypothèses sont envisagées :

- la forte concentration en poudre de verre (400 $\mu\text{g/mL}$), de faible densité (2,78) par rapport au nickel (8,90) génère une quantité de particules 3 fois supérieure à celle du nickel. Ces nombreux grains vont provoquer un encombrement stérique qui pourrait gêner la croissance des clones.
- une concentration seuil des produits d'extraits, peut également expliquer cette chute de viabilité. En effet, un relargage trop important d'ions, comme par exemple le calcium, qui n'est pas toxique pour de faibles concentrations, pourrait à très forte concentration, devenir toxique *in vitro* pour les cellules.

Ces premiers essais étant très encourageants sur le verre pulvérulent, nous avons entrepris une étude plus approfondie, permettant de mettre en contact direct le matériau massif (verre et vitrocéramique) avec les cellules cibles : les ostéoblastes.

II. 3. Étude de la cytotocompatibilité en contact direct

Dans cette approche, deux tests ont été retenus :

- la prolifération cellulaire (nombre de cellules), qui permet de suivre la croissance cellulaire
- la vitalité cellulaire, test bleu Alamar, qui permet de suivre l'activité cellulaire.

II. 3. 1. Protocole expérimental

Des pastilles sont réalisées à partir de la poudre de verre P3C2, dans les mêmes conditions opératoires que lors de l'étude de bioactivité *in vitro*, c'est-à-dire par le coulage d'une suspension de poudre de verre dans un tube cylindrique servant de moule, et posé sur un support en plâtre. Celles-ci ne sont pas mises en résine, les deux faces sont polies sur papier SiC G1200 afin d'obtenir des surfaces rigoureusement planes, puis frittées à 900°C (cinétique de chauffe 3°C/min - palier 3 heures).

Avant mise en culture, une stérilisation à chaud au Poupinel est réalisée à 180°C pendant 2 heures.

Ces matériaux seront utilisés comme comblement osseux, c'est pourquoi les cellules ostéoblastiques ont été retenues comme cellules cibles.

II. 3. 2. Cellules MC3T3 E1

La lignée cellulaire utilisée correspond aux cellules MC3T3-E1 subclones 14 : (ATCC-CRL 2594, cellules pré-ostéoblastiques embryonnaires de souris), maintenues en survie par des repiquages réguliers dans un mélange de milieux de culture 50/50 % en volume :

- 50% MEM Alpha Médium avec Glutamax 1 (Gibco) (500 mL) à 10%(v/v) de Sérum de veau Fœtal (Eurobio) décomplémenté (30 minutes à 56°C)
- 50% DMEM modifié par Dulbecco avec Glutamax 1 (Gibco) (500 mL) à 10% (v/v) de Sérum de veau nouveau né (Eurobio) décomplémenté (30 minutes à 56°C)

II. 3. 3. Prolifération cellulaire

II. 3. 3. 1. Méthode

Les tests de prolifération sont réalisés dans des boîtes de culture à 24 puits de 15 mm de diamètre (Costar). Les boîtes sont en polystyrène et correspondent aux standards internationaux et européens (ISO 10993-5 / EN 30993-5)¹¹. Les échantillons à tester sont préalablement stérilisés à 180°C. Toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Trois échantillons de chaque matériau sont disposés au fond des puits. L'essai comprend également trois témoins positifs constitués par des pastilles de nickel pur et trois témoins négatifs représentés par le fond du puits en polystyrène de la boîte de culture.

Afin d'inoculer sur les éprouvettes des cellules en phase exponentielle de croissance, nous effectuons un repiquage 48 heures avant le test.

Les cellules sont placées sur les échantillons à une densité de 5700 cellules/cm², soit environ 10000 cellules par puit dans 1 mL de milieu de culture. Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 3 et 6 jours.

A la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours), les cellules sont détachées des échantillons avec 0,3 mL de trypsine (0,1% p/v) dans la solution de Hank's sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Le détachement s'effectue à 37°C pendant 5 minutes.

Les échantillons sont douchés à l'aide de 0,7 mL d'EDTA (1/5000) pour bien détacher les cellules du matériau. La suspension de 1 mL ainsi obtenue est homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur par des opérations aspiration/rejet répétées.

La suspension cellulaire obtenue est comptée dans 8 mL d'Isoton à l'aide d'un compteur cellulaire Coulter Z1 (Coultronics). Chaque suspension cellulaire est comptée 3 fois.

II. 3. 3. 2. Résultats

La prolifération cellulaire se caractérise par l'augmentation du nombre de cellules. Cette méthode est basée sur le comptage du nombre de cellules après culture directement sur les échantillons testés qui permet d'établir, par rapport aux témoins négatifs, une cytotoxicité relative du matériau étudié.

Les échantillons de verre P3C2 et de vitrocéramique ont été testés par la méthode de prolifération ou croissance cellulaire en contact direct, à deux temps d'exposition différents : 3 et 6 jours (Figures 9 et 10). Le taux de prolifération relative obtenu pour les différents échantillons est exprimé en % par rapport au témoin négatif.

Pour les échantillons de verre P3C2 et de vitrocéramique, lorsque la prolifération à 3 jours est inférieure à 20%, la croissance cellulaire à 6 jours diminue encore davantage.

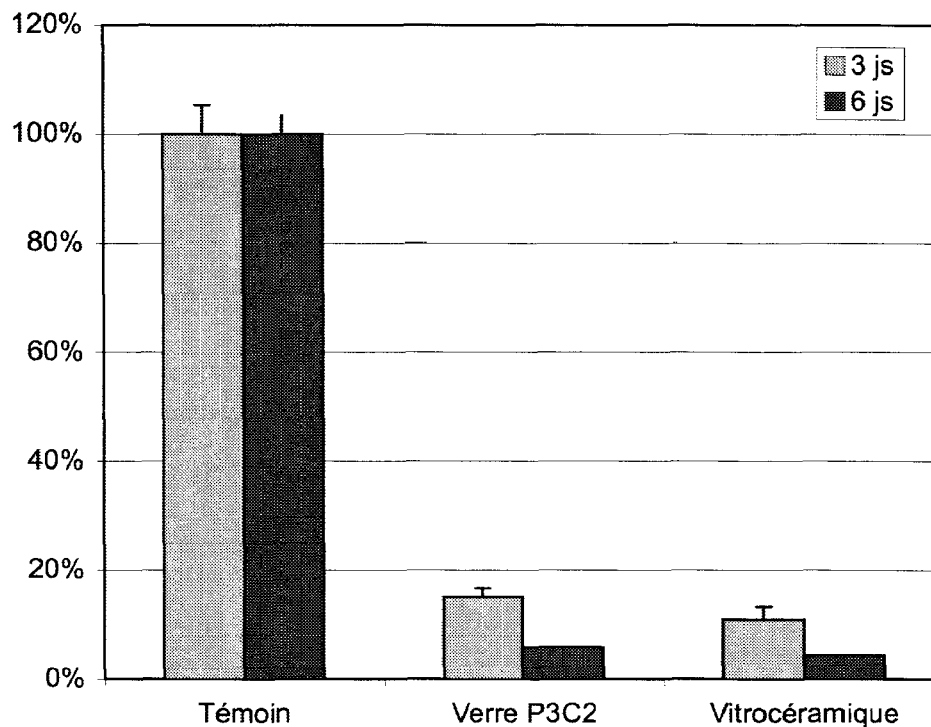


Figure 9 : Prolifération relative de cellules MC3T3-E1 en contact direct avec les pastilles de verre et de vitrocéramique (n=2).

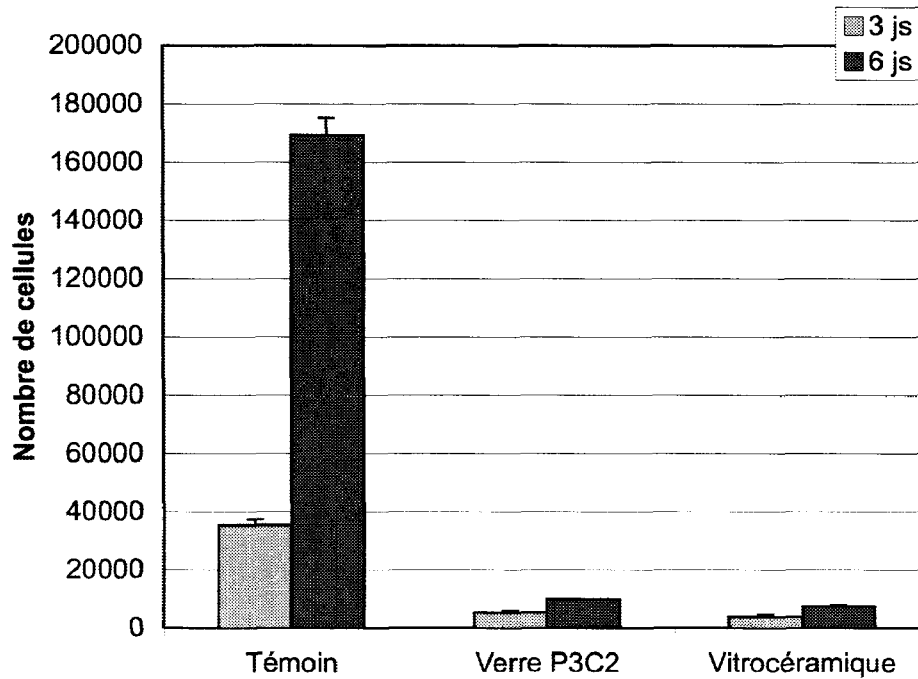


Figure 10 : Proliférations de cellules MC3T3-E1 en contact direct avec les pastilles de verre et de vitrocéramique ($n=2$).

Dans tous les cas, le nombre de cellules dénombrées après 6 jours de culture sans renouvellement de milieu est toujours supérieur à la quantité de cellules dénombrées après 3 jours (Figure 10). Cette remarque est valable aussi bien pour le verre que pour la vitrocéramique.

La prolifération cellulaire au contact de la vitrocéramique testée n'est pas significativement inférieure à celle mesurée pour le verre P3C2. Par contre, pour les 2 échantillons, le taux de prolifération relatif diminue de façon conséquente, après 6 jours de culture (Figure 9).

II. 3. 3. 3. Discussion

Les échantillons testés stimulent moins que le témoin la prolifération des ostéoblastes, en particulier pour des durées de culture plus longues, mais aucune cytotoxicité n'est mise en évidence.

Cette diminution de la cinétique de prolifération pourrait être due à une adhésion moins aisée des cellules sur ce substrat.

Afin de mieux comprendre la cinétique de prolifération ou croissance cellulaire, un second test de cytocompatibilité en contact direct, exprimant la vitalité ou l'activité cellulaire est réalisé : le test au "Bleu Alamar".

II. 3. 4. Test de la vitalité cellulaire (Bleu Alamar)

Ce test de fonction cellulaire consiste à quantifier la vitalité cellulaire par dosage colorimétrique. Le réactif Bleu Alamar (Interchim) incorpore un indicateur de croissance colorimétrique et fluorescent basé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire. Le système comprend un indicateur de l'oxydation/réduction qui devient fluorescent et change de couleur en réponse à la réduction chimique du milieu de culture. Cette transformation n'est possible que par des cellules vivantes. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité cellulaire. L'indicateur du taux d'oxydo-réduction relatif au métabolisme cellulaire indique des changements clairs et stables. De plus, ce test a la particularité de ne pas être destructif puisqu'une toxicité minimale sur la vie cellulaire a été démontrée, ce qui permet également de poursuivre la culture après l'expérience.

II. 3. 4. 1. Méthode

Les cellules sont déposées sur les éprouvettes d'une épaisseur de 1-2 mm et d'un diamètre de 14,9 mm placées dans des plaques à 24 puits. La période de culture est de 3 et 6 jours sans renouvellement de milieu. Le réactif est ajouté directement sur les cellules après culture. Le taux de vitalité relatif est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules témoins placées sur le fond des puits. Six expériences séparées sont effectuées sur trois échantillons pour chaque période d'exposition. Comme témoin positif, nous proposons des éprouvettes en Nickel pur dont nous connaissons la cytotoxicité.

Les cellules MC3T3-E1 sontensemencées dans des plaques multipuits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar) contenant les échantillons, à la densité initiale de 10.000 cellules/puits (5 700 cellules/cm²). Les cellules sont préalablementensemencées dans des boîtes de culture 48 heures avant le test afin que celles-ci se trouvent dans une phase exponentielle de croissance pour la manipulation.

Pour la préparation du Bleu Alamar, le protocole est le suivant :

- Prélever 1,2 mL de solution mère de Bleu Alamar (Interchim Ref. : UP669413)
- Compléter pour obtenir 30 mL avec du tampon phosphate
- Filtrer avec un filtre 0,22 µL
- Répartir environ 3 mL par tube
- Conserver au congélateur
- Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 3 et 6 jours. Nombre d'expériences : n = 2 pour 3 et 6 jours.

À la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours), les cellules subissent le protocole suivant :

- Ajouter dans chaque puits 10% en volume de Bleu Alamar dans le milieu de culture
- Placer dans l'étuve à 37°C pendant 3 heures
- Mesurer l'absorbance par spectrométrie, longueur d'onde = 560 nm
- Prendre un blanc avec du milieu de culture sans Bleu Alamar (B. A.)
- Dilution : 1 mL de milieu + 100 µL B.A. + 2 mL eau = 3,1 mL

Après réaction, le mélange milieu de culture / Bleu Alamar est récupéré et transféré dans une nouvelle plaque multipuits en prenant soin de la préserver de la lumière. Les mesures de fluorescence sont effectuées à l'aide d'un lecteur de fluorescence (Fluorocount – Packard).

II. 3. 4. 2. Résultats

Les échantillons de verre P3C2 et de vitrocéramique ont été testés en contact direct par la méthode de viabilité cellulaire avec le réactif Bleu Alamar, à deux temps d'exposition différents : 3 et 6 jours.

Sur les deux échantillons de verre et de vitrocéramique (Figure 11) la viabilité reste constante avec une légère augmentation pour la vitrocéramique entre 3 et 6 jours. La faible quantité de cellules ayant pu adhérer au support présente donc une vitalité qui ne se dégrade pas au cours du temps. Afin de compléter ces résultats, nous avons rapporté la vitalité par unité cellulaire

(Figure 12). Nous pouvons alors constater que ce rapport est beaucoup plus important que pour le témoin.

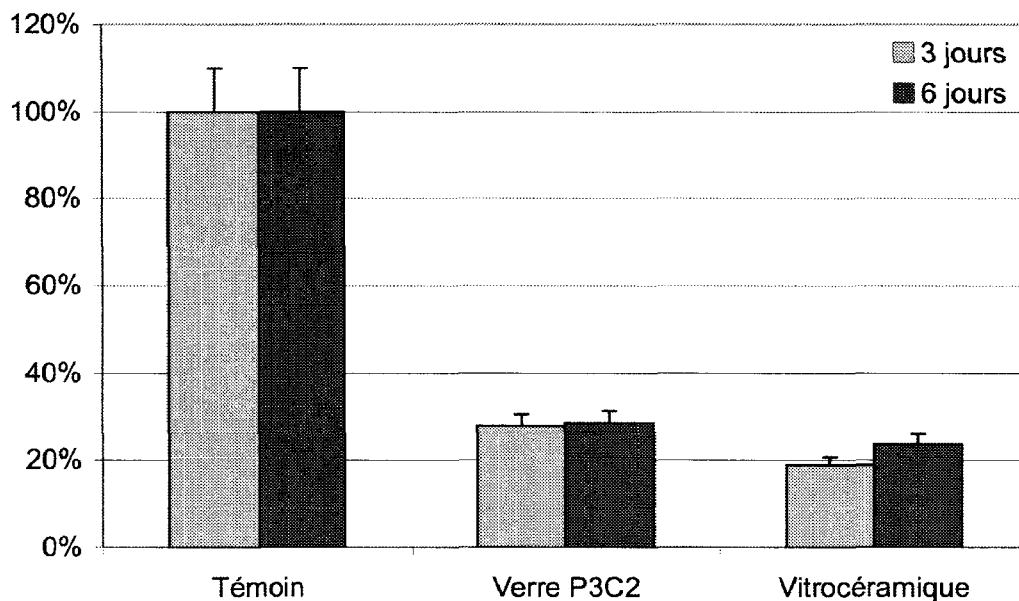


Figure 11 : Vitalité des cellules MC3T3-E1 en contact direct avec les pastilles de verre et de vitrocéramique (n=1).

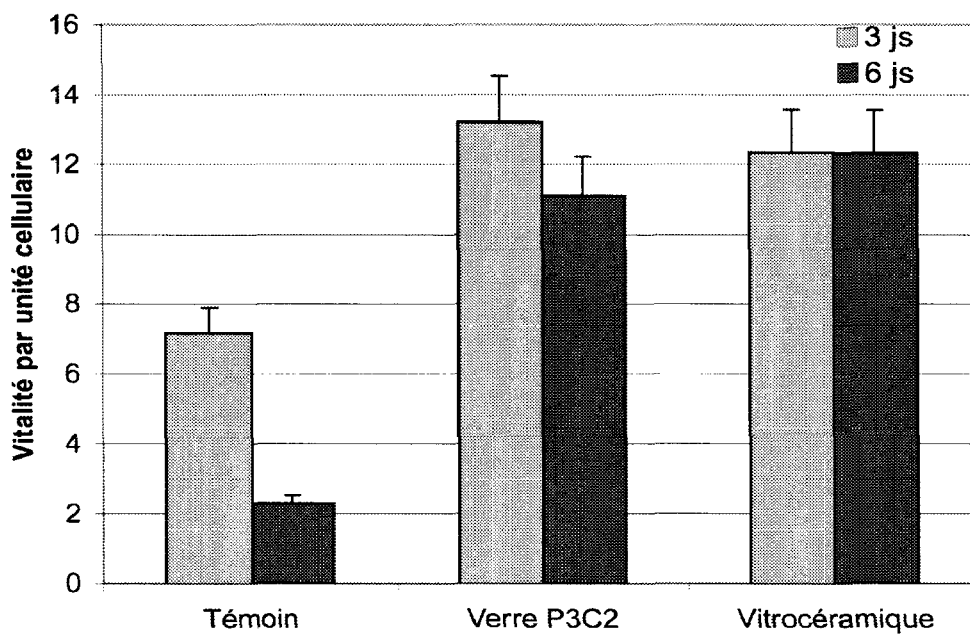


Figure 12 : Rapport de la vitalité cellulaire par unité de cellules pour le verre P3C2 et pour la vitrocéramique

II. 3. 4. 3. Discussion

Après 3 et 6 jours de culture, l'activité des ostéoblastes sur le verre et la vitrocéramique est relativement faible (Figure 11), avec des taux compris entre 19 et 29 %. À nouveau, le verre présente des résultats sensiblement meilleurs que la vitrocéramique.

Si la culture est prolongée, sans changement de milieu, l'activité cellulaire sur les deux supports est légèrement supérieure à celle obtenue à 3 jours.

Cependant, en rapportant la vitalité par unité de cellule (Figure 12), nous observons que celle-ci est doublée, voire triplée par rapport à celle du témoin. Les cellules sont donc toujours présentes sur l'échantillon, et possèdent toujours une très bonne vitalité. Nous pouvons donc supposer une reprise de la prolifération cellulaire pour des périodes d'incubation plus longues sur ces matériaux.

II. 3. 5. Corrélation prolifération et vitalité

L'activité cellulaire, comme la prolifération cellulaire, au contact des matériaux à tester est relativement faible. Dans les deux cas, une réponse sensiblement meilleure est obtenue sur le verre.

Il faut rappeler que la durée d'exposition des cellules est de 6 jours sans renouvellement de milieu et elles sont donc en contact avec les produits de dégradation des substrats et d'éventuelles modifications du pH des milieux de culture.

Rappelons qu'un gel de silice se forme rapidement à la surface des deux matériaux. Cette modification de surface pourrait induire des effets sur l'adhésion cellulaire et pourrait expliquer les faibles taux obtenus pour l'activité et les proliférations cellulaires par rapport aux témoins. Pour mieux comprendre ces différences, une étude de l'adhésion des ostéoblastes est investie sur ces deux matériaux. En effet, une déficience de l'adhésion cellulaire pourrait provoquer l'apoptose des cellules et par conséquent des écarts de prolifération.

II. 4. Adhésion cellulaire (para nitrophényl phosphate : *p*-NPP)

In situ, les cellules interagissent entre elles et avec leur environnement pour constituer les tissus. Le phénomène d'adhésion cellulaire régit cette activation. Les cellules sont capables de sécréter des macromolécules qui jouent un rôle au niveau de l'adhésion et de la migration cellulaire.

Ces macromolécules forment un enchevêtrement complexe : la matrice extracellulaire. Elles sont interdépendantes et régulent le comportement des cellules à leur contact de manière active et complexe et influencent leur développement, leur migration, leur prolifération et leur fonction métabolique.

L'implantation d'un matériau dans l'organisme implique un contact étroit entre les cellules et le substrat. C'est pourquoi, nous avons quantifié l'adhésion ostéoblastique sur nos deux matériaux massifs par la méthode *p*-NPP.

II. 4. 1. Protocole expérimental du test d'adhésion au *p*-NPP

Ce test de fonction cellulaire consiste à quantifier l'adhésion cellulaire par dosage colorimétrique. Le nombre de cellules ayant adhéré est déterminé par la méthode de dosage du *para* nitrophényl phosphate *p*-NPP (Sigma). Ce composé est dégradé par les phosphatases produites par les cellules et libère le *para* nitrophényl phosphate qui émet à une longueur d'onde de 405 nm. La densité optique lue à cette longueur d'onde est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les cellules sont cultivées dans des plaques à 24 puits sur les éprouvettes d'une épaisseur de 1-2 mm et d'un diamètre de 14,9 mm. La période de culture est de 30, 60 et 120 min sans changement de milieu. Le réactif est ajouté directement sur les cellules après culture. Le taux d'adhésion est exprimé en absorbance. Six expériences séparées seront effectuées sur deux échantillons pour chaque période d'exposition. Comme témoin positif, nous proposons des éprouvettes en nickel pur dont nous connaissons la cytotoxicité.

Les cellules MC3T3-E1 sontensemencées dans des plaques multipuits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar) contenant les échantillons, à la densité initiale de 40000 cellules/puits

(22800 cellules/cm²). Les cellules sont préalablementensemencées dans des boîtes de culture au moins 48 heures avant le test. Le milieu de culture est le MEM de Eagle (Eurobio), supplémenté par 5% (v/v) de sérum de veau (Eurobio). Le milieu contient 0,1 g/L de streptomycine et 100 UI/mL de pénicilline comme antibiotiques.

La préparation du *p*-NPP (para-nitrophenyl phosphate) suit le protocole suivant :

- Faire une solution à 3 mg/mL de *p*-NPP (Sigma Ref. : N4645-5G, 023K5326) dans solution tampon d'acétate pH 5,5
- Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 30, 60 et 120 minutes.
- À la fin des périodes d'incubation (30, 60 et 120 min) des cellules, le milieu est prélevé
- Ajouter dans chaque puits 300 µL de solution de *p*-NPP
- Placer dans l'étuve à 37°C pendant 3 heures
- Arrêter la réaction avec 150 µL de soude à 1 N

Après réaction, le mélange *p*-NPP/soude est récupéré et transféré dans une nouvelle plaque multipuits à fond transparent en prenant soin de la préserver de la lumière. Les mesures de l'absorbance sont effectuées à l'aide d'un lecteur spectroscopique (ELISA).

II. 4. 2. Résultats de l'analyse quantitative de l'adhésion

Les échantillons de verre P3C2 et de vitrocéramique ont été testés par la méthode d'adhésion cellulaire (*p*-NPP) en contact direct, à trois temps d'exposition différents : 30, 60 et 120 minutes.

Une différence significative de l'adhésion sur les échantillons est observée par rapport au témoin négatif. En effet, dès les 30 premières minutes, il est à noter une adhésion de 50 à 63 % par rapport aux témoins (Tableau 4).

Ratio par rapport aux témoins	30 min	60 min	120 min
Verre P3C2	50 %	35 %	26 %
Vitrocéramique P3C2	63 %	40 %	34 %

Tableau 4 : Pourcentages d'adhésion des ostéoblastes en fonction du témoin.

Sur les deux échantillons (Figure 13) la densité optique n'évolue plus au-delà des 30 premières minutes de contact. Sur le témoin, au contraire, l'évolution de l'attachement cellulaire est nettement visible.

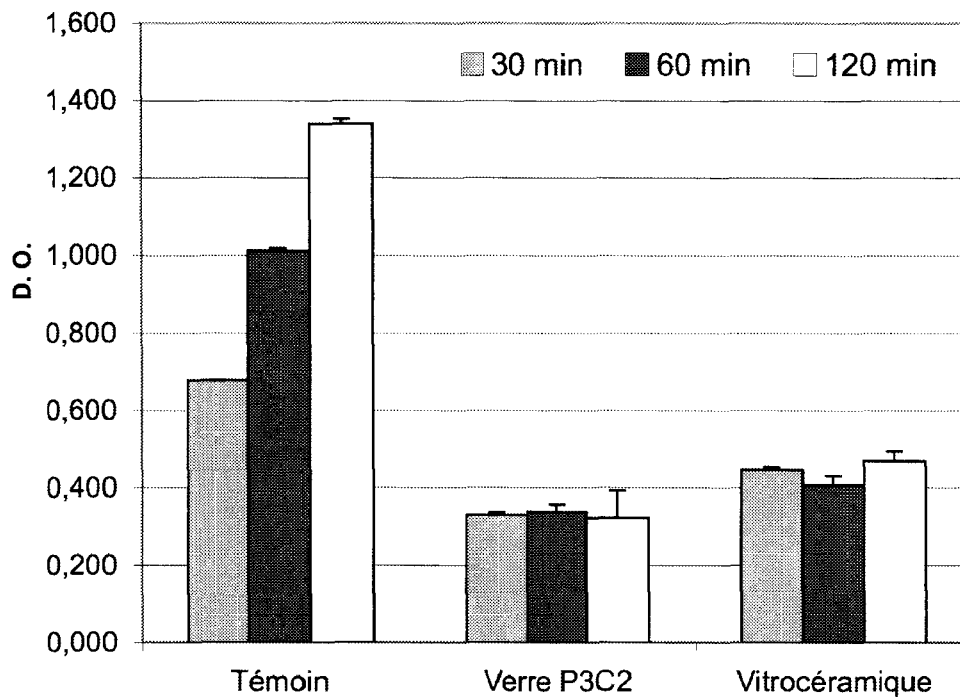


Figure 13 : Adhésion des cellules MC3T3-E1 en contact direct avec les pastilles de verre et de vitrocéramique (n=1)

II. 4. 3. Discussion sur l'analyse quantitative de l'adhésion

L'adhésion des cellules sur le verre et sur la vitrocéramique n'évolue quasiment pas entre 30

et 120 minutes. Cependant, certaines cellules, les plus saines, ont adhéré. En effet, après chaque repiquage, certaines cellules sont abîmées par la centrifugeuse, notamment les cellules en division. Ces cellules ont des difficultés à s'accrocher à la surface du matériau. Dans une culture normale, le support est neutre et ne va pas empêcher l'adhésion des cellules. Les cellules abîmées récupèrent et prolifèrent une fois qu'elles sont réparées. L'adhésion étant un phénomène d'état de surface, le manque d'adhésion peut être expliqué par la présence du gel de silice qui se crée lorsque le verre ou la vitrocéramique sont en contact avec le fluide physiologique simulé. En effet, la forme gel est extrêmement active, ce qui ne favorise pas l'adhésion des cellules à la surface. De ce fait, le manque de stabilité de surface et le léger changement de pH du milieu de culture ne sont pas favorables à l'adhésion des cellules. C'est ce qu'ont constaté I. Lebecq et al.⁵, pour leurs verres C1 et P1C1 qui n'étaient pas particulièrement favorables à la repousse osseuse, ce qui pouvait être expliqué par un changement de pH du milieu physiologique, celui-ci devenant trop basique à leur contact. Par conséquent, ce type de comportement empêche les ostéoblastes de se développer correctement.

Notons également que le pourcentage d'adhésion des cellules sur le verre est sensiblement plus faible que celui obtenu sur la vitrocéramique. En effet, le verre est dense, alors que la vitrocéramique, se présentant sous forme de pastilles réalisées à partir de poudre de verre, présente une certaine porosité. Cette porosité entraîne un état de surface plus rugueux que le verre massif, ce qui facilite probablement l'adhésion des cellules.

II. 5. Conclusion

Pour commencer, notre étude s'est portée sur l'évaluation de la cytotoxicité du verre. Les tests préliminaires de cytocompatibilité ont donc permis de vérifier que la vitrocéramique issue du verre P3C2 ainsi que ce verre, ne présentaient pas de caractère cytotoxique. En effet, la viabilité du verre P3C2 reste constante (100%) sans aucun effet cytotoxique pour une forte concentration de 200 µg/mL de poudre de verre.

Les tests de prolifération et l'activité cellulaire en contact direct avec le verre et la vitrocéramique ont ensuite été réalisés. Les résultats sont faibles, mais la vitalité des ostéoblastes est très correcte attestant que la fonction cellulaire n'est pas atteinte.

En effet, la très grande réactivité du verre et de la vitrocéramique au contact des milieux

biologiques engendre une libération ionique importante. La surface des matériaux s'en trouve profondément modifiée avec formation d'une couche instable de gel de silice. Cet état de surface ne semble pas permettre une bonne adhésion des cellules MC3T3-E1 ; ce qui par conséquent, limite leur prolifération. La fraction de cellules ayant pu adhérer au support a quant à elle une vitalité bien supérieure aux cellules témoin. Cette très grande vitalité pourrait laisser supposer une reprise de la prolifération lorsque la surface de la vitrocéramique se sera stabilisée. Cette supposition reste à confirmer par la réalisation d'essais *in vitro* après stabilisation de la surface.

Ces tests préliminaires réalisés *in vitro* sur des temps courts (3 jours et 6 jours) nous suggèrent donc plusieurs perspectives pour mieux appréhender la cytocompatibilité de ces matériaux actifs. Pour améliorer les résultats, il faudrait étudier les interactions milieu biologique-matériau à travers le caractère hydrophile/hydrophobe du matériau, les charges de surface mais également la rugosité du substrat au contact du milieu de culture.

Un dosage des ions présents dans les milieux de culture (exposés pendant 10 jours à la poudre de verre) permettrait de mettre en évidence une éventuelle toxicité par excès ionique (hypernatrémie ou hypercalcémie). De plus, il serait nécessaire d'étudier, sur des temps courts la cinétique d'apparition de la couche de silice sur les matériaux massifs, car les phénomènes de surface apparaissent très rapidement (moins de 30 minutes). Des caractérisations physico-chimiques complémentaires pourront être engagées, comme la mesure de l'énergie de surface (méthode de l'angle de goutte) ou l'analyse de la rugosité de surface après immersion dans le milieu de culture et apparition du gel de silice. Sur le plan biologique, les tests pourraient être effectués après stabilisation de la surface (apparition de la couche d'HA ou par dépôt de protéines en surface). Une étude des attaches focales visualisées par LASER confocal pourrait aider à l'interprétation des phénomènes d'adhésion. Dans tous les cas, des tests avec une durée d'exposition cellulaire prolongée et un changement de milieux seraient susceptibles de confirmer l'intérêt présenté par des bioverres macroporeux en tant que substituts osseux.

¹ **O. Peitl Filho, G. P. La Torre et L. L. Hench**

« Effect of crystallisation on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5 »
Journal of Biomedical Material Research, vol. 30 (1996) 509-514.

² **T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi et T. Yamamuro**

« Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W »
Journal of Biomedical Materials Research, 24 (1990) 721-734

³ **K. D. Lobel et L. L. Hench**

« In vitro adsorption and activity of enzymes on reaction layers of bioactive glass substrate »
Journal of Biomedical Materials Research, 39 (1998) 575-579

⁴ **T. Kokubo, H. Takadama**

« How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity ? »
Biomaterials, 27 (2006) 2907-2915

⁵ **I. Lebecq**

« Etude de bioverres à base de SiO₂, CaO, Na₂O non dopés et dopés par le phosphore »
Thèse de doctorat, Université de Valenciennes et du Hainaut Cambrésis, (2002)

⁶ **A. R. Jones, R. Winter, G. N. Greaves, I. H. Smith**

« MAS NMR study of soda-lime-silicate glasses with variable degree of polymerisation »
Journal of Non-Crystalline Solids 293-295 (2001) 87-92

⁷ **S. Hayakawa, A. Osaka**

« Biomimetic deposition of calcium phosphates on oxides soaked in a simulated body fluid »
Journal of Non-Crystalline Solids 263-264 (2000) 409-415

⁸ **D. Heymann**

« Qu'est ce qu'une cytokine? Perspectives d'applications aux substituts osseux »

Actualités en Biomatériaux, Romillat, Paris 4 (1998) 165-172

⁹ **C. Veron, M. Chanavaz, J. Ferri, M. Donazzan, H. F. Hildebrandt**

« A panorama of current materials for osseous applications in maxillofacial surgery and oral implantology »

Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillofaciale, 96 n°4 (1995) 274-81

¹⁰ **L. L. Hench**

« Bioactive glasses and glass-ceramics : a perspective »

Handbook of bioactive ceramics, Boca Raton – Ann Arbor – Boston : ed. CRC Press, vol.1 (1990) 125-134

¹¹ **Norme ISO 10993-5 (EN 30993-5, NF S 99-505).**

« Evaluation biologique des dispositifs médicaux » Partie 5 : Essais concernant la cytotoxicité : Méthodes *in vitro.*, (1994)

¹² **H. F. Hildebrandt, M. Collyn-D'Hooghe, P. Shirali, C. Bailly et J. P. Kerckaert**

« Uptake and biological transformation of β NiS and Uptake and biological transformation of β NiS and α Ni₃S₂ by human embryonic pulmonary epithelial cells (L132) in culture »

Carcinogenesis, 11 (1990) 1943-1950

¹³ **T. T. Puck et P. I. Markus**

« A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture : the use of X irradiated cells to supply conditioning factors »

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 41 (1955) 432-437

¹⁴ **N. P. Ziats, K. M. Miller et J. M. Anderson**

« *In vitro* and *in vivo* interactions of cells with biomaterials »

Biomaterials, 9 (1988) 5-13

¹⁵ **H. F. Hildebrand, I. Floquet, A. Lefevre, C. Veron**

« Biological and hepatotoxic effects of palladium. An overview on experimental investigations and personal studies »

The International Journal of Risk and Safety in Medicine, 8 (1996) 149-167

CONCLUSION

L'analyse structurale de verres bioactifs des systèmes ternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ et quaternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, a été réalisée dans le but de la relier à leur bioactivité dont les résultats *in vitro* étaient déjà connus¹.

Les quatre verres étudiés du ternaire ont respectivement pour composition : 42% SiO_2 -23,5% CaO -34,5% Na_2O pour celui dénommé C1, 45% SiO_2 -23,5% CaO -31,5% Na_2O pour celui dénommé C2, 47% SiO_2 -26,5% CaO -26,5% Na_2O pour celui dénommé B3 et 55% SiO_2 -22,5% CaO -22,5% Na_2O pour celui dénommé B5. Le taux de P_2O_5 introduit varie de 1 à 5 % molaires, pour C1, C2 et B5. Pour le verre B3, il varie de 1 à 6% molaires. Lorsque P_2O_5 est additionné, la dénomination du verre est celle du verre d'origine à laquelle le préfixe Pz est ajouté, z correspondant au taux de phosphore.

Une étude structurale de ces verres a été réalisée par RMN du ^{29}Si et du ^{31}P .

La RMN du ^{29}Si nous a informés sur la structure du réseau silicate. Elle a permis de quantifier les entités silicates constitutives du réseau vitreux. Nous avons constaté que les verres étaient principalement constitués d'entités silicates Q^1 et Q^2 pour les verres PzC2 et PzC1, et Q^2 et Q^3 pour les verres PzB3 et PzB5 (verres plus riches en silicium). Toutefois, nous avons noté la présence d'autres entités silicates minoritaires dans nos verres, provenant de réactions de dismutation. Ainsi ces verres étudiés présentent des structures très dépolymérisées. Les données de la RMN du ^{29}Si nous ont permis aussi de déterminer l'état de polymérisation du réseau silicate en fonction du pourcentage de phosphore introduit dans nos verres. Nous avons constaté au sein de chaque série de verre, que l'ajout progressif de phosphore engendrait une polymérisation de plus en plus importante du réseau silicate. La RMN nous a précisé également que l'environnement chimique des entités silicates principales étaient mixtes : présence des deux cations modificateurs (Ca^{2+} et Na^+).

La RMN du ^{31}P a montré que l'ajout de phosphore dans les verres modifiait légèrement la nature chimique des entités phosphates. L'absence de liaison Si-O-P dans nos verres confirme que le phosphore contribue à lier les entités silicate, sans se lier au réseau silicate et que sa présence entraîne donc une polymérisation du réseau silicate. La RMN du ^{31}P nous a permis de déterminer la nature et le pourcentage des entités phosphates présentes dans nos

verres. En effet, les espèces majoritaires (plus de 90 %) présentes dans tous les verres sont des complexes orthophosphates mixtes (calcium et sodium). Les espèces minoritaires sont, pour les séries PzB5 et PzB3, des pyrophosphates mixtes, et pour les séries PzC2 et PzC1, des orthophosphates mixtes. La répartition des cations Ca^{2+} et Na^+ autour des complexes orthophosphates a été également étudiée. Pour tous les verres, nous avons remarqué que les complexes orthophosphates majoritaires avaient tendance à s'enrichir en calcium lorsque le taux de P_2O_5 dans les verres augmentait.

L'analyse structurale de ces verres et le lien avec leur bioactivité a permis de sélectionner un verre, le meilleur candidat, pour l'élaboration d'un bioverre macroporeux en transposant un procédé mis au point pour l'élaboration *de substituts osseux synthétiques à partir de poudres de céramiques*². Nous avons choisi le verre de composition molaire 43,65% SiO_2 -22,795% CaO -30,555% Na_2O -3 P_2O_5 , dénommé P3C2 pour son bon compromis entre les résultats de bioactivité *in vitro* et sa facilité d'élaboration en quantité importante, nécessaire à la réalisation de la suite de l'étude. Nous avons mis au point un mode opératoire de broyage de ce verre, dans le but d'obtenir une poudre de verre micrométrique. Le broyage doit s'effectuer exclusivement avec de l'éthanol anhydre comme solvant à l'aide de jarre et médias en agate. Le protocole de broyage nous a permis d'obtenir une poudre de verre non polluée de granulométrie moyenne autour de 2,5 μm après 9 heures de broyage planétaire. Nous avons ensuite réalisé une suspension de poudre de verre dans de l'éthanol anhydre, avec un taux de matière sèche de 70 % massique et 0,8 % massique d'ester phosphorique (dispersant). Cette barbotine est coulée sur un édifice constitué de billes de PMMA (Polyméthylméthacrylate) à architecture rigoureusement contrôlée (taille des billes et des interconnexions). Le matériau obtenu a ensuite été traité thermiquement à basse température (250°C) afin d'éliminer la structure porogène, puis densifié à 900°C pendant 3 heures, avec une cinétique de chauffe de 3°C/min. Nous avons effectué une analyse par diffraction des Rayons X en fonction de la température afin d'observer l'évolution cristallographique de ce matériau. Cette analyse nous a révélés que le verre cristallisait à partir de 500°C en $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$. Toutefois des analyses en RMN du ^{31}P et du ^{29}Si sur ce verre traité thermiquement à 900°C ont mis en évidence qu'une partie vitreuse subsistait dans ce matériau, et que ce dernier pouvait être par conséquent assimilé à une vitrocéramique.

Le procédé nous a permis d'élaborer une vitrocéramique macroporeuse dont les parois des cavités ont une densité relative de 95%. La taille des interconnexions est d'environ 130 μm , et le diamètre moyen des macropores de 490 μm , le volume poreux étant de l'ordre de 67 %.

Afin de vérifier l'application de ce matériau en tant que substitut osseux, des tests de bioactivité *in vitro* ont été réalisés sur le verre initial P3C2 et sur la vitrocéramique issue du verre P3C2. Les analyses Infra Rouge sur les surfaces des échantillons préalablement plongés dans du fluide physiologique simulé (SBF) ont montré que la vitrocéramique développe plus rapidement sa couche d'Hydroxyapatite carbonatée (HAC) que le verre. En effet, l'apatite s'est formée après 10h15 d'immersion pour le verre et seulement 5h15 pour la vitrocéramique. Les essais préliminaires de cytocompatibilité ont montré que ces deux matériaux (verre P3C2 et vitrocéramique $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$) sont bien cytocompatibles, même s'ils ne présentent pas de bons résultats d'adhésion et de prolifération cellulaire. En effet, l'adhésion cellulaire est un mécanisme nécessitant un état de surface approprié que ne présentent apparemment pas le verre et la vitrocéramique. Cependant, le rapport de la vitalité cellulaire par unité de cellule, montre que les cellules ayant adhéré ont conservé toute leur vitalité, ce qui prouve que les matériaux sont bien cytocompatibles.

En perspective, nous envisageons de tester la résistance mécanique à la compression de la vitrocéramique macroporeuse élaborée, afin de se situer par rapport aux autres biocéramiques macroporeuses citées dans la littérature. Il serait intéressant d'adapter ce procédé à d'autres compositions chimiques de verres bioactifs, afin de trouver éventuellement des compositions encore plus bioactives. De plus, d'autres verres étudiés lors du premier chapitre présentent des domaines de température entre la température de transition vitreuse et la température de cristallisation plus étendus. Des traitements thermiques adaptés à ces verres devrait permettre un contrôle du taux de dévitrification. En ce qui concerne les résultats issus de l'approche biologique préliminaire, d'autres essais sont prévus comme le dosage des ions relargués lors des essais de cytocompatibilité, des micrographies des échantillons afin d'observer l'adhésion des ostéoblastes à la surface et d'adapter l'état de surface du substrat.

¹ **I. Lebecq, F. Desanglois, A. Leriche et C. Follet-Houttemane**

« Compositional dependence on the *in vitro* bioactivity of invert or traditional bioglasses in the Si-Ca-Na-P System »

Journal of Biomedical Materials Research published online 27 Mars 2007

² **O. Richard, S. Zarzynski, M. Descamps, P. Hardouin, A. Gallur**

« Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée »

Brevet n° 97 01 309 (1997)

ANNEXES

ANNEXE 1

Principe de la Résonance Magnétique Nucléaire

1. RMN 1D

La technique de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permet de déterminer la structure à courte distance, c'est-à-dire connaître l'arrangement des atomes autour d'un élément donné sur une distance de 0 à 5 Å.

Nous avons utilisé la RMN du solide pour les noyaux ^{29}Si et ^{31}P lors de notre étude sur les verres du système ternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$ et du système quaternaire $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$.

1. 1. Principe

Selon sa description en mécanique classique, la résonance magnétique nucléaire est le résultat d'une interaction entre le moment dipolaire d'un noyau donné μ et un champ magnétique H_0 .

Le moment dipolaire précesse autour du champ à une fréquence ν_0 donnée par la relation :

$\nu_0 = (\gamma H_0)/(2\pi)$ où γ est le rapport gyromagnétique propre au noyau observé, et ν_0 est la fréquence de Larmor, dans le domaine des radiofréquences.

ν_0 peut être mesuré par absorption d'un champ radiofréquence oscillant dans le plan perpendiculaire au champ magnétique H_0 .

La description quantique de la résonance magnétique nucléaire fait intervenir le spin I du noyau. Seuls les noyaux possédant un spin non entier sont actifs en RMN. Les niveaux d'énergie du noyau sont donnés par la relation :

$E_m = (\gamma h m H_0) / (2\pi)$, h étant la constante de Planck et m , nombre quantique, peut prendre les valeurs entre $-I$ et $+I$. E_m peut prendre $2I+1$ niveaux d'énergie.

Le noyau peut passer de son niveau d'énergie à un niveau d'énergie plus élevé par l'absorption d'un photon. Cette radiation est caractérisée par la fréquence $\nu = (\gamma H_0) / (2\pi)$, égale à la fréquence de Larmor décrite dans la théorie classique de la RMN.

La spectroscopie RMN actuelle détermine par la méthode pulsée, pour un type d'élément choisi (^{29}Si , ^{31}P , ^1H , ^{27}Al ,...), les fréquences de résonance ν caractéristiques des noyaux présents dans l'échantillon. Ces noyaux sont portés aux niveaux d'énergie les plus élevés suite à l'application d'un champ radiofréquence (RF) pendant environ $1\mu\text{s}$. Le signal radiofréquence émis est recueilli en fonction du temps, il est enregistré suite à une impulsion radiofréquence.

Le nombre d'acquisitions effectuées pour chaque spectre varie entre 1000 et 2000. Le délai entre deux acquisitions dépend du système de verre étudié, car il dépend du temps de relaxation de spin du noyau étudié. Traité par transformée de Fourier, il permet d'accéder au spectre dans le domaine des fréquences.

Le paramètre utilisé pour décrire les fréquences de résonance est le déplacement chimique. Il est noté δ et correspond à la différence relative entre la fréquence de résonance (ν) du noyau considéré dans l'échantillon et dans un composé de référence (ν_{ref}) :

$$\delta = (10^6(\nu - \nu_{\text{ref}})) / (\nu_{\text{ref}})$$

δ s'exprime en ppm (partie par millions). Dans le cas de la RMN du ^{29}Si , ν_{ref} est la fréquence du tétraméthylsilane, et dans le cas de la RMN du ^{31}P , ν_{ref} est la fréquence du composé H_3PO_4 .

L'environnement électronique du noyau observé joue sur le champ magnétique H présent autour de ce noyau, donc sur la fréquence de résonance et le déplacement chimique. Inversement, la valeur de δ permet d'accéder à l'environnement chimique du noyau.

Plusieurs interactions influent sur les valeurs des déplacements chimiques :

L'anisotropie de déplacement chimique (Chemical Shift Anisotropie ou CSA). Elle est due à l'effet d'écran des électrons sur le noyau étudié. Cette interaction est sensible à la géométrie et à la nature des atomes entourant le noyau considéré. Elle est proportionnelle au champ appliqué H_0 .

Les interactions dipolaires homonucléaires ou hétéronucléaires. Elles sont dues au champ magnétique local créé par un spin i sur son proche voisin j . Ce champ local vient s'ajouter vectoriellement à H_0 . Cette interaction est proportionnelle aux rapports gyromagnétiques des noyaux et à $(r_{ij})^{-3}$, r_{ij} étant la distance internucléaire.

Les couplages J . Le couplage indirect (ou scalaire) a lieu par l'intermédiaire des liaisons chimiques.

Pour les noyaux de spins $I \geq 1$, les interactions quadripolaires. Elles sont dues à la dissymétrie des charges composant les noyaux. C'est une interaction entre le moment quadripolaire électrique du noyau et le gradient de champ électrique présent autour de ce noyau.

Dans le cas d'un échantillon solide, ces quatre interactions induisent des raies très larges sur les spectres de fréquence. Les trois premières de ces interactions ainsi que les effets quadripolaires au premier ordre peuvent être masqués en mettant mécaniquement l'échantillon en rotation à l'angle dit magique ($54,7^\circ$ par rapport au champ magnétique H_0). C'est la technique de la RMN-MAS (Magic Angle Spinning). La fréquence de rotation doit être de l'ordre de largeur de la raie dans le domaine des fréquences (quelques kilohertz). La rotation à l'angle magique est effectuée dans notre étude, avec une vitesse de 5000 Hz. Les interactions quadripolaires au deuxième ordre restent actives.

1. 2. Caractérisation de la structure à courte distance des verres

En RMN MAS du solide et pour des noyaux de spin $I = 1/2$ (par exemple ^{31}P , ^{29}Si), le déplacement chimique d'un site reste influencé par plusieurs facteurs modifiant l'environnement électronique du noyau :

- La coordinence. Selon la coordinence du noyau de silicium, il existe une différence de déplacement chimique d'environ 100 ppm : les déplacements chimiques ^{29}Si de Si(VI) et Si(IV) se situent respectivement entre -140 à -220 ppm et entre -60 et -130 ppm.
- La nature des premiers voisins (^{29}Si : quartz SiO_2 , $\delta = -107$ ppm)
- Les distances entre les angles des liaisons.
- L'état de polymérisation : dans le cas des entités silicates, les déplacements chimiques ^{29}Si des Q^n , $n = 0, 1, 2, 3$ ou 4 diminuent de 10 ppm quand n augmente d'une unité. Les déplacements chimiques ^{31}P des orthophosphates, pyrophosphates ou métaphosphates diffèrent également entre eux de 10 ppm. Des effets tels que n passant de 3 à 5 peuvent entraîner une superposition des ces pics.
- La deuxième sphère de coordination : par exemple, le remplacement de Si-O-Si par Si-O-Al augmente le déplacement chimique de 5 ppm. Celui de $\text{Si-O}^- \text{Na}^+$ par $\text{Si-O}^- \text{Ca}^{2+}$ diminue δ d'environ 2 ppm.
- La troisième sphère de coordination : le déplacement chimique ^{29}Si d'une entité Q^n dépend du type de Q^n auxquels elle est liée : δ diminue lorsque l'état de polymérisation de Q^n augmente.

Des informations quantitatives sont obtenues à partir des spectres RMN puisque l'intensité d'un pic est directement proportionnelle au nombre de noyaux à l'origine du signal. Pour les spins $I = \frac{1}{2}$, les temps de relaxation peuvent être très longs et avant toute exploitation quantitative, il faut veiller à ce que la relaxation n'affecte pas le résultat

Pour pallier à ce problème, nos verres ont été dopés par 0,025% molaire d'oxyde ferrique Fe_2O_3 . Le temps de relaxation étant diminué, le temps de l'expérience l'est également.

Nos spectres ont été acquis au Centre Commun de Mesures RMN à l'Université de Lille1, sur un spectromètre Avance Brüker ASX100.

Les spectres obtenus ont été décomposés à l'aide du logiciel DM-FIT 2002¹.

2. RMN 2D

2. 1. RMN 2D liquide²

Depuis l'apparition de la technique de RMN impulsionnelle dans les années 1970, beaucoup de progrès ont été réalisés grâce à l'évolution de l'informatique, ce qui a permis de généraliser la transformée de Fourier, et grâce à la découverte de la supraconductivité. Dès lors, des champs magnétiques très intenses, très stables et d'une excellente homogénéité ont pu être obtenus. L'étude des structures des macromolécules d'intérêt biologique a connu alors un formidable essor grâce au développement des techniques 2D (COSY, NOESY, XHCORR, etc.). C'est en effet grâce à ces séquences que la spectroscopie RMN est devenue une méthode générale de détermination des distances internucléaires et donc complémentaire à la cristallographie par Rayon X.

2. 1. 1. Principe

L'expérience de RMN à deux dimensions repose sur une succession de trois intervalles de temps : préparation, évolution et détection. Dans un certain nombre d'expériences s'y ajoute une autre période avant la détection : le temps de mixage (Figure 1).

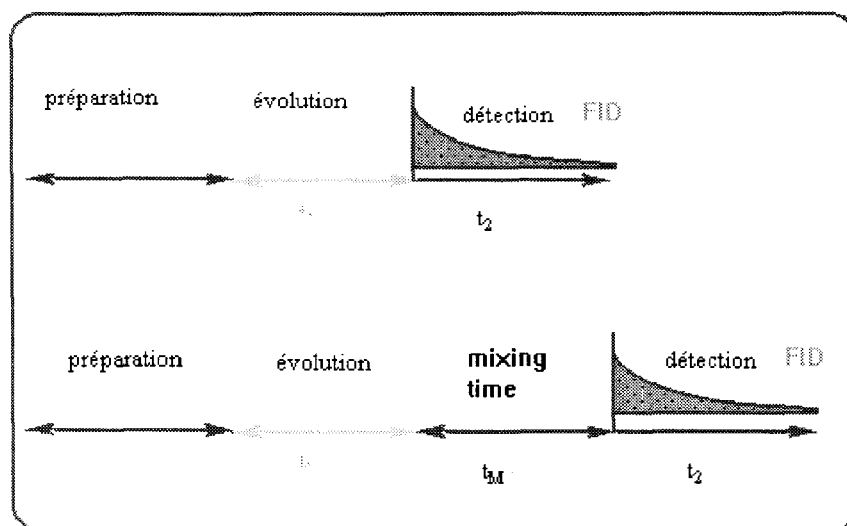


Figure 1 : Schématisation des intervalles de temps pour une expérience de RMN 2D

2. 1. 2. Quelques séquences de RMN 2D liquide

Le tableau 1 résume le rôle de quelques séquences de RMN 2D homonucléaires et hétéronucléaires. En fonction des expériences, les informations obtenues sur les dimensions F1 et F2 sont soit le déplacement chimique du noyau étudié X : (δ_X) ou la constante de couplage ${}^nJ_{XX}$ avec n le nombre de liaisons entre chaque atome étudié.

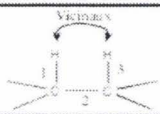
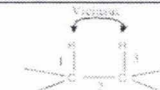


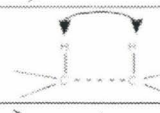
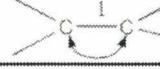
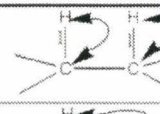

Noms des expériences:	Informations obtenues sur la dimension F ₂	Informations obtenues sur la dimension F ₁	Exemples de liaisons étudiées.
Corrélations Homonucléaires			
2D Homonucléaire J-résolue	δ_H	J_{HH}	 ${}^nJ_{HH} (n \leq 3)$
COSY 45 et 90 COSY DQF TOCSY (Couplage Scalaire)	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 ${}^nJ_{HH} (n \leq 3)$
COSY L.R. TOCSY	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 ${}^nJ_{HH} (n > 3)$
COSY avec un Relais Homonucléaire	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 ${}^nJ_{HH} (n > 3)$
NOESY ROESY (Couplage Dipolaire)	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 N.O.E
2D-Inadéquate	δ_C, J_{CC}	δ_C, J_{CC}	 ${}^1J_{CC}$
Corrélations Hétéronucléaires			
XHCORR, 2D J-résolue HSQC (inverse)	δ_C	δ_H, J_{CH}	 ${}^1J_{CH}$
Long-Range XCORFE, COLOC, HSBC (inverse)	δ_C	δ_H, J_{CH}	 ${}^nJ_{CH} (n > 1)$

Tableau 1 : Rôles des différentes séquences de RMN 2D homonucléaires et hétéronucléaires

Grâce à toutes ces techniques, la RMN ne se limite plus aujourd'hui à donner une structure à courte distance. De nombreuses techniques permettent de sonder jusqu'à 4 liaisons chimiques.

2. 2. RMN 2D solide³

Des moyens permettent également d'obtenir des spectres haute résolution par l'intermédiaire d'expériences multidimensionnelles combinant la rotation de l'échantillon et la manipulation du système de spin par des impulsions radiofréquences. Ces méthodes reposent toutes sur la génération d'un écho de transfert de cohérence corrélant deux dimensions dans lesquelles les poids relatifs des déplacements quadrupolaires de second ordre sont différents avec des formes de raie semblables à un facteur d'échelle près. Il existe trois expériences de ce type :

- L'expérience **DAS** (Dynamic Angle Spinning), décrite à la fin de années 80, corrèle deux spectres obtenus pour des angles de rotation différents. Cette expérience nécessite l'utilisation d'une sonde spécifique permettant de changer l'angle de rotation durant un temps de mélange aux cours de la séquence d'impulsion. L'expérience DAS est une expérience techniquement difficile du fait du délai nécessaire pour le basculement d'un angle à l'autre, ce qui lui rend inaccessible des noyaux très abondants ou relaxant rapidement comme l'aluminium. L'expérience DAS a, en particulier été beaucoup utilisée pour la caractérisation structurale de systèmes vitreux par l'étude de la signature de ^{17}O après enrichissement isotopique.
- L'expérience dite **MQ-MAS** (Multi Quantum – Magic Angle Spinning), décrite pour la première fois en 1995 par L. Frydman⁴, corrèle les spectres de la transition centrale (habituellement observé dans les expériences à une dimension) au spectre d'une transition multiquanta symétrique, inobservable directement. Bien que plus complexe dans son concept, elle peut être réalisée avec une sonde MAS et un spectromètre standard. De plus, elle évite le temps de mélange nécessaire au changement d'angle de l'expérience DAS, ce qui rend accessible des noyaux d'intérêt primordial en science des matériaux comme l'aluminium (^{27}Al).
- L'expérience dite **STMAS** (Satellite Transition Magic Angle Spinning), décrite en 2000 par Z. Gan⁵, corrèle le spectre des transitions externes du noyau quadripolaire au spectre de la transition centrale. Elle peut être réalisée avec du matériel standard mais bénéficie particulièrement des forces de vitesse de rotation, tout en restant très sensible au réglage de l'angle magique.

Ces méthodes multidimensionnelles sont rapidement devenues incontournables et ont permis de progresser considérablement dans la description structurale de systèmes vitreux ou amorphes comme cristallins à base d'alumino-silicates ou d'alumino-phosphates par exemple et ainsi dans la compréhension de leurs propriétés particulières.

¹ **D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J-O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan et G. Hoatson**

Logiciel DM-Fit

Magnetic Resonance in Chemistry, 40 (2002) 70-76

² **M. Bria et P. Watkin**

« La Spectroscopie de RMN liquide 2D ou l'aide à la détermination structurale de petites molécules organiques »

<http://cri.univ-lille.fr/lcom/RMN2D/index1.htm>

³ **D. Massiot**

« Progrès récents de la résonance magnétique nucléaire du solide pour la caractérisation structurale de matériaux »

Spectra analyse, 21 (2002) 224

⁴ **L. Frydman, J. S. Harwood**

J. Am. Chem. Soc, 117 (1995) 5367

⁵ **Z. Gan**

« Isotropic NMR spectra of half-integer quadrupolar nuclei using satellite transitions and magic-angle-spinning »

J. Am. Chem. Soc., 122 (2000) 3242-3243

ANNEXE 2

Spectroscopie de Dispersion d'Énergie (EDS)

1. Introduction

La microanalyse X consiste à analyser le spectre de rayons X émis par un échantillon lorsque celui-ci est bombardé par un faisceau d'électrons monoénergétiques. À partir de ce spectre, il est possible d'effectuer une analyse aussi bien qualitative que quantitative de la zone analysée. Le volume analysé est déterminé par la profondeur de pénétration des électrons dans l'échantillon qui dépend de leur énergie et de la composition chimique de la cible (échantillon).

Associée à la microscopie électronique à balayage (MEB), la microanalyse X permet de corréler des informations relatives à la composition chimique d'une zone ou d'un point de l'échantillon aux observations faites au microscope.

L'analyse EDS (Energy Dispersive Spectroscopy : Spectroscopie de dispersion d'énergie) repose sur la mesure directe de l'énergie de photons X par l'intermédiaire d'un semi-conducteur.

Les radiations électromagnétiques peuvent être caractérisées à la fois par leur longueur d'onde λ et par leur énergie E . La relation de Planck relie ces deux grandeurs.

$$\text{Nous avons } \lambda = \frac{hc}{E} \text{ d'où } E \text{ (keV)} = \frac{12,4}{\lambda(\text{\AA})},$$

avec la constante de Planck : $h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s, et la vitesse de la lumière : $c = 3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹.

2. Mécanisme d'émission des Rayons X caractéristiques

Sous l'effet d'un faisceau d'électrons, un échantillon cible est le siège d'un grand nombre d'interactions rayonnement – matière. Ces interactions se manifestent par l'émission

d'électrons et d'un certain nombre de rayonnements électromagnétiques dont l'émission X et le rayonnement de freinage.

Chaque type d'émission, particule ou rayonnement, fournit des informations sur l'échantillon. Les émissions X caractéristiques contiennent ainsi des informations relatives à la composition chimique de l'échantillon.

2-1 : Le fond continu

Egalement appelé Bremsstrahlung (radiation de freinage), ce fond continu témoigne de l'énergie perdue par les électrons primaires lors de leur cheminement dans la matière alors qu'ils se trouvent ralentis lors de leur passage au voisinage des noyaux des atomes de la cible. Cette perte d'énergie ou ralentissement est à l'origine de l'émission d'un rayonnement X dont l'énergie est indépendante du matériau traversé.

Etant donné que l'électron est susceptible de céder tout ou une partie de son énergie, la distribution énergétique des rayons X émis constitue un spectre continu.

La limite inférieure du continuum est zéro.

La limite supérieure du continuum est donc fixée par la tension d'accélération du canon à électrons E_0 .

Le spectre RX est donc limité par la longueur d'onde minimale λ_0 (eV) = $12,4 / E_0$.

Finalement, une petite perte est plus probable qu'une forte perte, elle-même plus probable qu'une perte totale d'énergie. En première approximation, l'intensité devrait être croissante vers les basses énergies. En réalité, les rayons X de plus faibles énergies sont pour la plupart absorbés par l'échantillon, ce qui conduit à une distribution en cloche qui est représentée sur la Figure 1.

Le rayonnement de freinage est la principale source de fond continu dans un spectre X excité par un faisceau électronique.

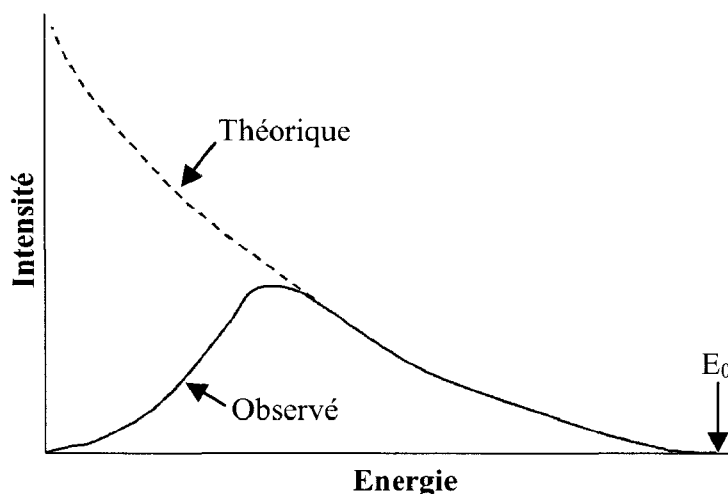


Figure 1 : Rayonnement de freinage, intensité du bruit de fond en fonction de l'énergie

2. 2. Émission des RX caractéristiques

2. 2. 1. Mécanisme d'émission des raies caractéristiques

Dans un atome, le mouvement d'un électron est confiné sur des niveaux d'énergie discrets. Ces niveaux sont notés K, L, M... par énergie croissante du niveau.

En l'absence d'interactions, un atome peut rester indéfiniment dans un état stable appelé état fondamental.

Sous l'effet d'une excitation par rayonnement X ou faisceau d'électrons, il peut y avoir éjection d'un électron d'un niveau profond en y laissant une lacune. C'est le processus d'ionisation. L'atome se trouve alors dans un état d'énergie plus élevé appelé état excité.

Pour revenir à un état de plus basse énergie donc un état énergétique plus stable (état final), un électron d'une couche moins liée vient combler cette lacune. C'est le processus de relaxation ou de désexcitation.

En général, le processus le plus probable est une succession de transformations où, lors de chacune d'elles, un électron saute d'un niveau énergétique supérieur vers un niveau d'énergie inférieur.

De chacune des transitions résulte une perte d'énergie spécifique : la différence d'énergie entre les deux niveaux d'énergie considérés. L'atome peut se désexciter suivant deux

processus différents. Un processus non radiatif par émission d'un autre électron ou un processus radiatif, l'énergie s'échappe sous forme de radiation électromagnétique ou photon X, dans le cas des transitions très énergétiques mettant en jeu des niveaux atomiques profonds. L'énergie seule indique la nature de l'élément émetteur, d'où le nom d'émission caractéristique. Et il y a compétition entre les deux processus, chacun ayant une certaine probabilité de se produire lorsqu'une lacune est créée en couche profonde. La probabilité de désexcitation par émission X augmente pour des éléments de numéro atomique (Z) croissant.

Les spectroscopistes ont adopté une nomenclature simplifiée (la notation de Siegbahn) pour repérer les Rayons X. Ainsi, le nom de chaque série est déterminé à partir de la couche électronique d'où s'est initialement échappé l'électron et de la couche d'où provient l'électron qui va combler la couche incomplète. Par exemple, si un électron de la couche K est expulsé et remplacé par un électron de la couche L, il y a émission d'un rayonnement X de la série K_{α} . Si un électron de la couche K est expulsé et remplacé par un électron de la couche M, il y a émission d'un rayonnement X de la série K_{β} , et ainsi de suite.

En raison de la complexité de la structure électronique, la nomenclature devient plus complexe quand l'expulsion initiale se produit sur un niveau externe. Les microanalystes ne sont en général concernés que par les rayons X des séries K, L et M.

Cependant, seules certaines transitions sont possibles et doivent respecter les règles de sélection énoncées par la mécanique quantique. Les valeurs des longueurs d'onde et des énergies caractéristiques pour chaque élément sont données dans des tables (ASTM) dont l'usage est indispensable en spectroscopie des rayons X.

En première approximation, on peut considérer que l'excitation est localisée au niveau des couches profondes de l'atome et qu'elle n'est donc pas affectée par les liaisons chimiques.

L'énergie d'une raie peut être exprimée par la loi empirique de Moseley :

$$E = C_1 (Z - C_2)^2$$
 où C_1 et C_2 sont des constantes définies pour chaque raie, Z le numéro atomique de l'élément et E l'énergie de la transition. Lorsque l'on connaît la transition, on peut attribuer une raie à un élément.

Pour les éléments légers, l'existence des liaisons chimiques a pour conséquence de déplacer les raies par rapport des raies de l'élément pur. Ce décalage est faible.

2. 2. 2. Intensité des raies caractéristiques X

L'intensité des rayons X émis dépend, pour des conditions d'excitation comparables, de plusieurs facteurs. Le premier est le numéro atomique, aussi bien celui de l'atome émetteur que le numéro atomique moyen de la zone de l'échantillon exposée.

Deux facteurs sont directement liés à la nature de l'atome émetteur.

Le premier exprime la probabilité d'une ionisation de l'atome sous certaines conditions, la probabilité de créer une lacune sur un niveau profond, il correspond à la section efficace d'ionisation.

Le second exprime la probabilité qu'une ionisation, une fois créée, puisse produire une émission X caractéristique au cours du retour à un état énergétique plus stable, il correspond au rendement de fluorescence X. Le rendement en rayons X est faible pour les éléments légers ($Z < 10$), il croît rapidement avec le numéro atomique et devient important pour des éléments lourds en particulier au niveau de la série K.

L'allure générale d'un spectre de rayonnement X pour un élément donné est directement lié aux probabilités respectives pour les transitions. Les raies de la série K sont les plus probables, donc les plus intenses. Pour les éléments lourds, il est parfois plus intéressant d'utiliser les raies L car les raies K sont trop intenses. Ces probabilités sont approximativement constantes dans une même série pour des éléments différents.

3. Les spectromètres à dispersion d'énergie, appareillage

L'appareil utilisé est un microscope Hitachi S-3500N à pression variable équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie Kevex.

3. 1. Montage et détecteurs

La Figure 2 représente le montage d'un spectromètre à dispersion d'énergie. Il comprend une source électronique qui fait partie d'un microscope électronique couplé au système de dispersion d'énergie qui comporte un détecteur.

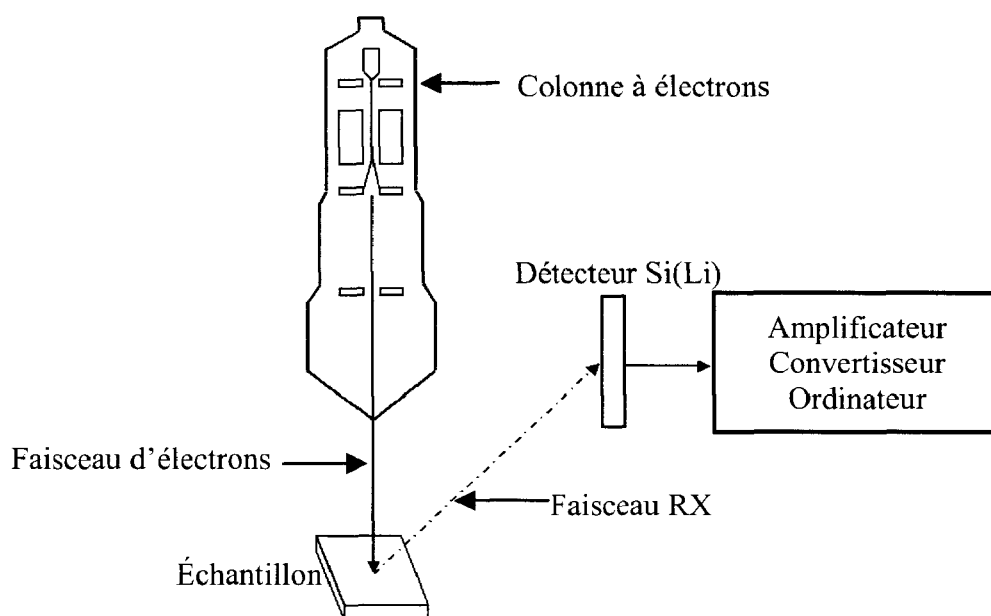


Figure 2 : Le spectromètre à dispersion d'énergie

Il existe plusieurs types de détecteurs, les plus courants étant constitués d'une diode Si(Li). Par effet photoélectrique, des électrons de même énergie que les photons incidents sont créés dans la diode. Ces photoélectrons créent des paires électron - trou dans le silicium et le nombre de ces paires est proportionnel à l'énergie de chaque photon. Si la diode est polarisée, le champ électrique établi dans la diode est de 100 à 1000 V, elle devient un détecteur car les porteurs créés se déplacent dans le champ électrique et ces charges électriques sont collectées aux bornes du détecteur.

Même parfaitement pur, un cristal de silicium présente une certaine conductivité due au mouvement des électrons par agitation thermique dans le gap de la bande de conduction et la bande de valence. Pour réduire ce courant de fuite, les détecteurs sont refroidis par azote liquide.

Les détecteurs sont en général isolés de la chambre d'observation par des fenêtres qui évitent la contamination de la surface. La nature et l'épaisseur de cette fenêtre influencent directement la qualité de la mesure et peuvent atténuer le signal de certains éléments. Les fenêtres les plus répandues sont constituées de Si_3N_2 .

3. 2. Géométrie du spectromètre à dispersion d'énergie

Le détecteur parfait serait sphérique avec le point d'émission X en son centre. Comme les détecteurs sont des disques, on définit un angle solide de détection (Ω) qui est fonction de la surface du disque (S), de la distance entre le détecteur et l'échantillon (r) et de l'angle d'émergence de l'émission donc de l'angle θ que fait le détecteur par rapport à l'émission.

$$\text{Nous avons : } \Omega = \frac{S \cos \theta}{r^2}.$$

Le second paramètre à considérer est l'angle d'émission. Les constructeurs placent la diode de façon à former un angle supérieur à 30°.

4. Analyse

4. 1. Analyse qualitative

Il est possible de faire une analyse ponctuelle de toute la gamme des énergies pour accéder à la composition d'une zone précise de l'échantillon (en pratique tous les éléments à partir du Bore sont observés).

Il nous est également possible de réaliser une cartographie qui consiste à balayer une large zone de la cible et à compter les photons X d'une énergie donnée. Une image de la répartition d'un ou plusieurs éléments dans le matériau est alors obtenue. Au niveau de l'identification des éléments et pour des éléments majeures, la recherche est aisée. Pour des éléments mineurs légers (< 10 % masse) et les éléments à l'état de traces (0,5 %), il faut tenir compte des recouvrements possibles des raies.

4. 2. Analyse quantitative

Sous l'impact d'un faisceau électronique, une cible émet toutes les raies X des éléments la constituant, leurs seuils d'excitation étant inférieurs à la tension accélératrice des électrons incidents.

L'analyse du rayonnement X permet non seulement de déterminer les éléments présents dans la cible, mais aussi sa composition chimique.

Il existe deux types d'analyses : l'analyse quantitative avec témoins et l'analyse quantitative sans témoin (ou analyse semi quantitative).

4. 2. 1. Analyse quantitative sans témoin

Lorsque l'on ne dispose pas de témoin pur ou allié correspondant aux éléments dont on veut déterminer la concentration dans l'échantillon analysé, il est possible d'effectuer une analyse quantitative sans témoin. Dans ce cas, il faut considérer les rapports d'intensité des différentes raies caractéristiques du spectre X de l'échantillon, entre elles.

Il faut alors tenir compte de paramètres supplémentaires liés à la raie elle-même, ceux-ci ne s'annulant plus lorsque l'on fait le rapport des intensités d'une raie caractéristique enregistrée pour l'échantillon analysé et pour un échantillon témoin. Ces paramètres sont : le poids des raies, le rendement de fluorescence des niveaux, la section efficace d'ionisation.

Le poids des raies d'émission X sont les intensités relatives des raies d'une même série pour un élément donné. En effet, les intensités relatives des raies d'une même série d'un élément A dépendent de son numéro atomique. Ceci est vrai en particulier pour les éléments de numéro atomique inférieur à 20, c'est à dire avant le calcium dans la classification périodique.

En ce qui concerne les raies K, des mesures ont été faites, mais les valeurs, pour les éléments plus légers que le calcium, sont mal connues. Pour les raies des séries L et M, peu de mesures sont disponibles. Ce fait justifie que ces raies ne soient pas utilisées pour effectuer des analyses quantitatives sans témoin.

Le rendement de fluorescence a été mesuré pour les niveaux K pour beaucoup d'éléments. Pour les niveaux L ou M, les valeurs sont mal connues.

La section efficace d'ionisation est nécessaire pour calculer le nombre moyen d'ionisation. Sa valeur peut être obtenue en utilisant diverses formules de la littérature. Suivant les formules utilisées, les résultats obtenus peuvent être assez différents.

En plus de ces paramètres physiques liés aux éléments à analyser, il faut tenir compte du rendement du détecteur et de l'angle solide de détection des rayons X. Il est mesurable ou calculable pour une diode bien collimatée.

L'analyse quantitative sans témoin est parfaitement adaptée au spectromètre à dispersion d'énergie. Elle permet d'obtenir très rapidement une estimation de la composition de l'échantillon pour la zone bombardée, même si l'intensité du faisceau électronique n'est pas bien stabilisée. Cependant, le calcul des concentrations sans témoin ne peut être envisageable que pour les raies K.

4. 3. Limites de détection

Elle est liée à la statistique de comptage et dépend du détecteur. Elle dépend aussi du numéro atomique des atomes de l'échantillon. Le seuil varie de 0,01 % à 1 % en masse pour les éléments légers.

5. Pratique de la microanalyse X EDS

5. 1. Considérations géométriques

L'efficacité de collection des rayons X est contrôlée par la géométrie échantillon – détecteur. Les deux grandeurs affectant le nombre de photons atteignant le détecteur sont l'angle solide et l'angle de take-off.

5. 1. 1. Angle solide

L'angle solide Ω a été défini au paragraphe 3.2.

Nous avons $\Omega = \frac{S \cos \theta}{r^2}$, S : surface du disque, r : distance entre le détecteur et l'échantillon,

θ : angle d'émergence de l'émission.

Ainsi, une plus grande efficacité de détection sera obtenue pour une surface de détecteur plus importante que pour une distance échantillon – détecteur donnée ou pour une distance échantillon – détecteur plus faible dans le cas d'une surface de détecteur donnée.

Le fait de rapprocher le détecteur de l'échantillon est donc un moyen d'augmenter le taux de comptage.

5. 1. 2. Angle "take-off"

L'angle "take-off" (ou TOA) est l'angle entre la surface de l'échantillon et la direction du rayonnement X émis en profondeur en un point de l'échantillon. Pour un TOA faible, le chemin parcouru par le rayonnement X sera plus important que pour un TOA élevé. La photoabsorption (absorption des photons X par les atomes de la cible) sera donc plus importante dans le premier cas que dans le second.

Le minimum de photoabsorption est obtenu pour un TOA égal ou supérieur à 30°. C'est pour cette raison qu'il est préférable de travailler avec un TOA de l'ordre de 30°. Dans le cas d'une analyse quantitative sans témoin, le TOA doit être déterminé avec précision pour effectuer la correction de photoabsorption.

5. 1. 3. Inclinaison de l'échantillon

L'inclinaison de l'échantillon permet d'analyser un volume plus proche de la surface.

5. 2. Tension d'accélération

La tension d'accélération va déterminer, pour un échantillon donné, le volume analysé et donc la résolution spatiale de l'analyse.

Dans le cas où la composition de l'échantillon est connue, la tension d'accélération doit être choisie de façon qu'elle soit deux fois supérieure au seuil d'absorption de la raie la plus énergétique à analyser.

La valeur de la tension d'accélération peut affecter le rapport d'intensité des raies d'un même élément.

5. 3. Analyse quantitative sans témoin

Dans ce cas, il n'y a pas de problème particulier lié aux conditions expérimentales, puisque les rapports d'intensité s'effectuent pour des pics d'un même spectre. Il faudra éviter de considérer des raies de séries différentes (voir paragraphe 4. 2.).

Etant donné que les rapports d'intensité sont calculés pour un même spectre, l'analyse quantitative sans témoin fournira toujours des concentrations normalisées à 100. Il n'y a pas moyen de vérifier que des éléments aient pu être oubliés.

ANNEXE 3

État vitreux et température de transition vitreuse (T_g)

La manière classique de produire un verre consiste à refroidir un liquide suffisamment rapidement pour que la cristallisation n'ait pas le temps de se produire. L'accroissement continu de la viscosité lorsque la température diminue a pour résultat un figeage progressif du liquide jusqu'à sa solidification finale.

Pour étudier ce processus avec plus de précision, il est commode de suivre l'évolution d'une variable thermodynamique, telle que par exemple le volume V , l'enthalpie (H) ou la capacité calorifique à pression constante (C_p), en fonction de la température (Figure 1).

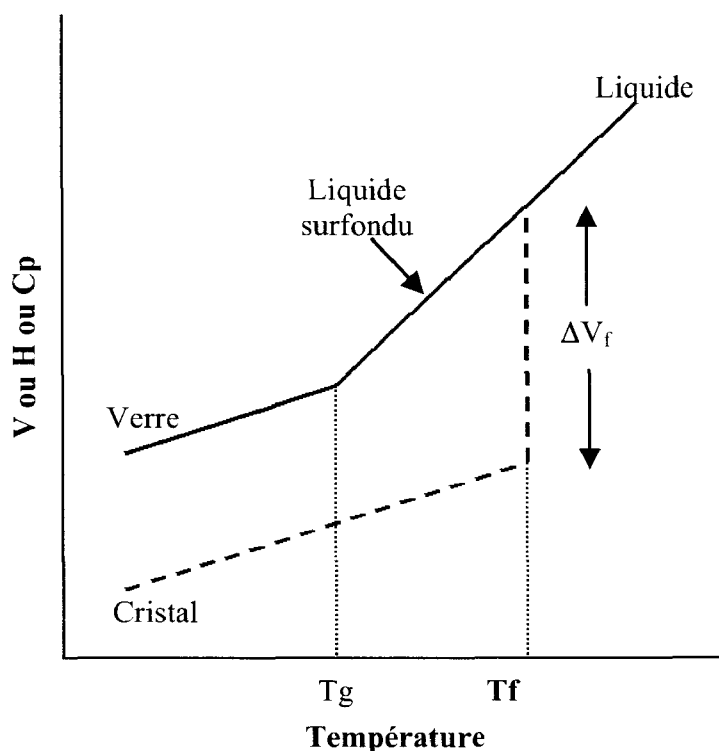


Figure 1 : Variation du volume, enthalpie ou capacité calorifique en fonction de la température

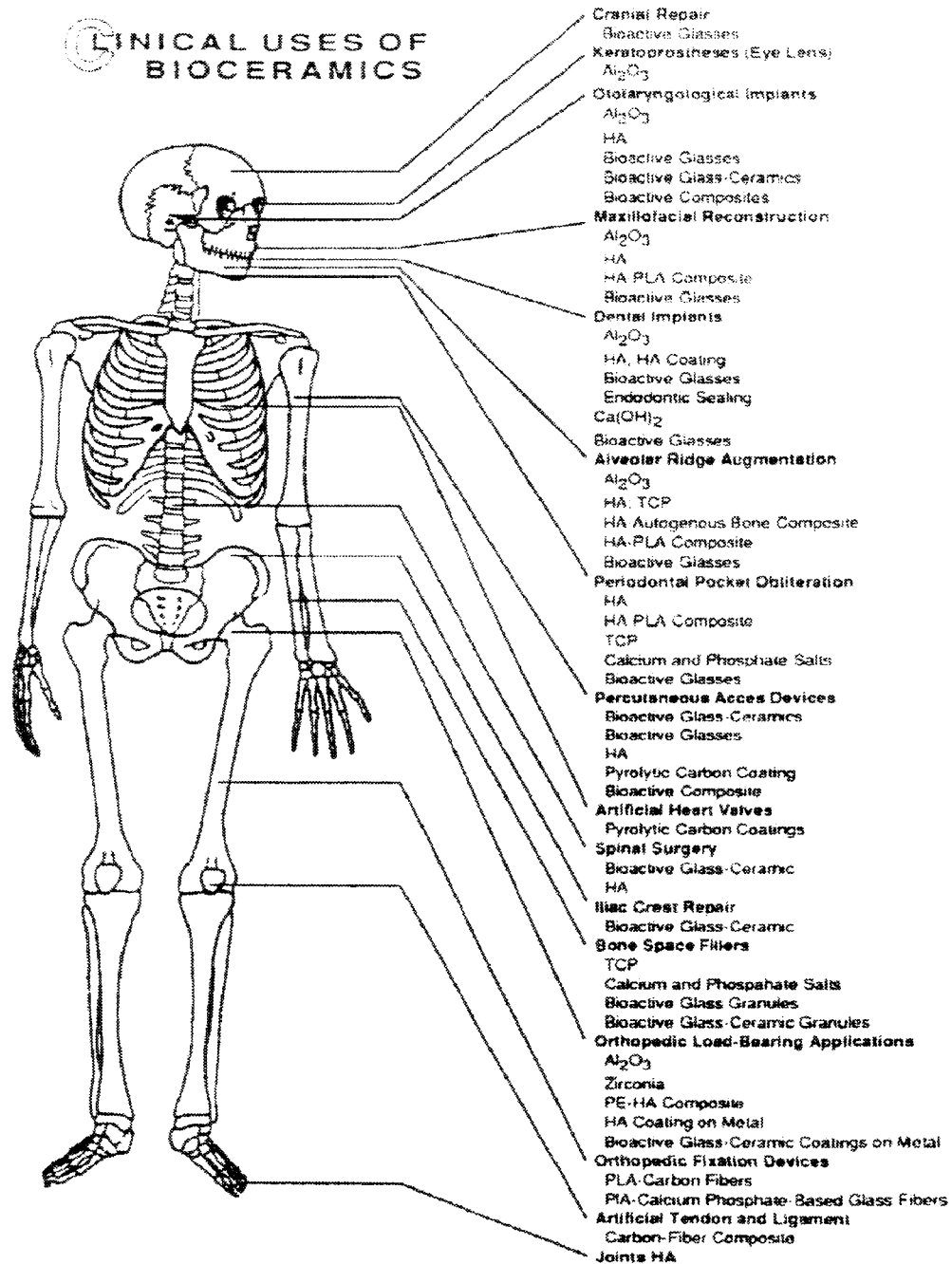
En partant d'un liquide à température élevée, l'abaissement de température provoque d'abord une contraction. Lorsque l'on atteint le point de solidification (ou de fusion) T_f , deux phénomènes peuvent se produire, ou bien le liquide cristallise, ce qui a pour effet d'introduire une discontinuité ΔV_f (généralement une contraction) dans la courbe, ou bien la cristallisation peut être évitée, le liquide passant à l'état surfondu. Dans ce cas, le point représentatif décrit une portion de courbe prolongeant celle du liquide, l'extrapolation se faisant sans discontinuité au passage par la température T_f . Tout se passe alors comme si le système ignorait le point de fusion.

Dans le premier cas, à la fin de la cristallisation, lorsque la température continue de baisser, le solide cristallin se contracte de nouveau, la pente de la courbe étant toutefois inférieure à celle du liquide initial (environ 1/3). Dans le deuxième cas, l'abaissement de la température provoque d'abord une contraction du liquide surfondu avec un coefficient identique à celui du liquide primitif, puis à partir d'une certaine température notée T_g , la pente de la courbe diminue pour devenir voisine de celle du solide cristallin. Ce coude dans la courbe de refroidissement marque le passage du liquide surfondu au verre, la température T_g étant appelée température de transition ou de transformation vitreuse. La viscosité du liquide décroît continuellement lorsque la température s'abaisse, le passage par T_g correspond à une viscosité voisine de 10^{13} poises (soit 10^{12} Poiseuilles = $10^{12} \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1} = 10^{12} \text{ Pa.s}$).

Si à la place de V , on considère d'autres variables physiques permettant de caractériser le système (coefficient de dilatation, masse volumique, indice de réfraction...), on constate dans tous les cas une continuité entre le liquide et le liquide surfondu au passage par T_f mais par contre un accident dans la courbe permettant de situer T_g .

ANNEXE 4

Les différentes possibilités d'utilisation des biocéramiques¹

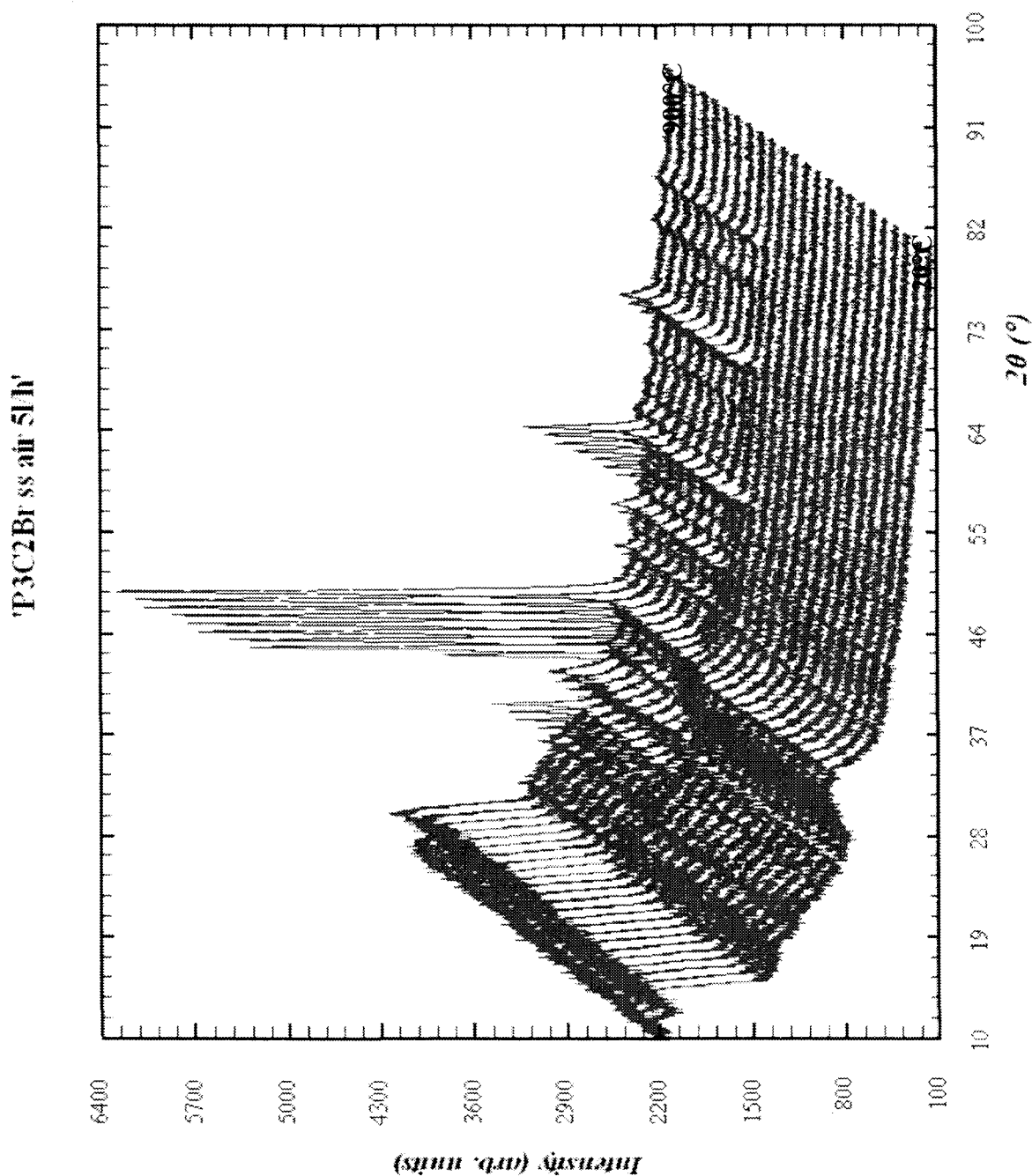


¹ L. L. Hench, J. Wilson

« An introduction to bioceramics »

Advanced series in ceramics, Vol 1, ed world scientific (1993)

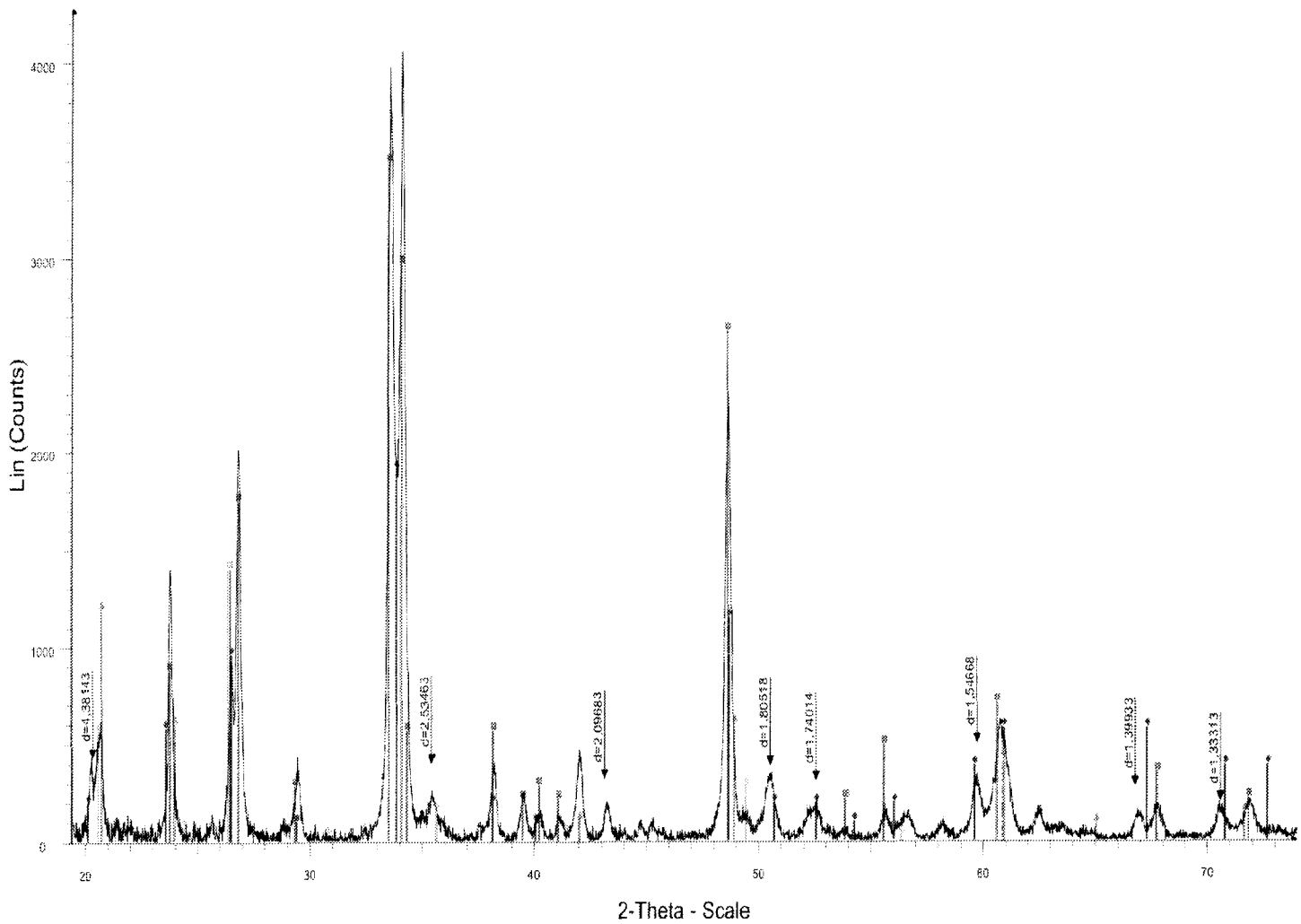
ANNEXE 5

Diffraction des Rayons X en montée de température¹

¹ Nous remercions Sylvie Daviero Maître de conférence à l'Université de Valenciennes, pour sa collaboration lors de cette étude. Cette mesure a été réalisée à l'UCCS, UMR CNRS 8181 de l'Université de Lille 1.

ANNEXE 6

Diffraction des rayons X de la vitrocéramique traitée thermiquement à 900°C



P3C2Br ss air 5rh - File: P3C2BrRetAmb.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 10.000 ° - End: 80.007 ° - Step: 0.015 ° - Step time: 102.3 s - Temp: 27 °C - Time Started: 7493 s - 2-Theta: 10.000 ° - Theta: 5.000 ° - Chi: 0.00 ° - Phi: 0
 Operations: Enh: Background 0.000, 1.000 | Import
 00-012-0671 (Q) - Sodium Calcium Silicate - Na₂CaSi₃O₈ - Y: 85.97 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 -
 00-001-1078 (Q) - Sodium Calcium Silicate - Na₂Ca₂(SiO₃)₃ - Y: 46.92 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 -
 00-031-1318 (I) - Sodium Phosphate - gamma-Na₃PO₄ - Y: 41.87 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Cubic - a 7.44480 - b 7.44400 - c 7.44400 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Face-centered - Fm-3m (225) - 4 - 412 495 -
 00-034-1382 (Q) - Silicon Oxide - SiO₂ - Y: 34.38 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 -

Résumé : *Elaboration et analyses structurales de verres bioactifs macroporeux.*

Le travail porte sur l'étude de verres bioactifs à base de SiO_2 , CaO , Na_2O et P_2O_5 et se décompose en trois parties.

Afin de relier la structure et la bioactivité, une étude structurale de ces verres a été réalisée par RMN du ^{29}Si et du ^{31}P . Cette étude a permis de montrer que l'ajout progressif de phosphore engendre une polymérisation progressive du réseau silicate et modifie légèrement la nature chimique des entités phosphates.

La deuxième partie concerne l'élaboration d'un verre bioactif macroporeux à porosité contrôlée en transposant le « *Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée* » au verre $43,65\text{SiO}_2-22,795\text{CaO}-30,555\text{Na}_2\text{O}-3\text{P}_2\text{O}_5$. Cependant, la densification par traitement thermique engendre la cristallisation partielle du verre. La RMN du ^{23}Na a permis de confirmer la formation d'une vitrocéramique.

La troisième partie concerne l'évaluation de la bioactivité *in vitro* ainsi que des essais préliminaires de cytocompatibilité du verre initial et de la vitrocéramique correspondante. Les analyses Infra Rouge réalisées sur les surfaces des échantillons plongés dans du fluide physiologique simulé (SBF) ont montré que la vitrocéramique est plus bioactive que le verre : l'apatite s'est formée après 5h15 d'immersion pour la vitrocéramique contre 10h15 pour le verre. Les tests de cytocompatibilité ont mis en évidence une non cytotoxicité du verre et de la vitrocéramique.

Cette étude a ainsi permis de corrélérer la structure des verres à leur bioactivité. À partir d'un verre très bioactif, il a également été possible d'élaborer une vitrocéramique macroporeuse à porosité contrôlée, avec de meilleurs résultats de bioactivité *in vitro*.

Mots Clés :

Bioverres, bioactivité
Verres silicatés de calcium et sodium avec ou sans phosphore
Macroporosité
Hydroxyapatite carbonatée (HAC)

Vitrocéramique
Spectroscopie Infra Rouge
Cytocompatibilité
RMN ^{29}Si , RMN ^{31}P

Abstract : *Elaboration and Structural Analysis of macroporous bioactive glasses*

The work concerns the study of bioactive SiO_2 , CaO , Na_2O and P_2O_5 glasses and presents three parts.

In order to connect the structure and the bioactivity, a structural study of these glasses was carried out by ^{29}Si and ^{31}P NMR. The study allowed to show that the progressive phosphorus addition generates an increasingly important polymerization of the silicate network and modifies slightly the phosphate entities chemical nature.

The second part relates the macroporous bioactive glass elaboration with controlled porosity by transposing the « *Procédé d'élaboration de substituts osseux synthétiques d'architecture poreuse parfaitement maîtrisée* » to $43.65\text{SiO}_2-22.795\text{CaO}-30.555\text{Na}_2\text{O}-3\text{P}_2\text{O}_5$ glass. However, the densification by heat treatment generates a partial crystallization of the glass. The ^{23}Na NMR confirms the glass-ceramic formation.

The third part relates to the *in vitro* bioactivity evaluation as well as preliminary cytocompatibility tests of for the initial glass and the corresponding glass-ceramic. The Infra Red analysis, made on the samples plunged in simulated body fluid (SBF), showed that the glass-ceramic is more bioactive than the glass: apatite was formed after 5h15 immersion for glass-ceramic against 10h15 for glass. The cytocompatibility tests put in evidence no cytotoxicity of the glass-ceramic.

This study thus allowed to correlate the glasses structure to their bioactivity. From a very bioactive glass, it was also possible to elaborate a macroporous vitreous ceramic with controlled porosity and with better *in vitro* bioactivity results.

Key words :

Bioglasses, bioactivity
Silicate glasses of calcium and sodium with or without phosphorus
Macroporosity
Hydroxycarbonate apatite (HCA)

Glass-ceramic
Infra Red spectroscopy
Cytocompatibility
 ^{29}Si NMR, ^{31}P NMR

Bibliothèque Universitaire de Valenciennes



00900388