

UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR D'ODONTOLOGIE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANTES

Formation ou école doctorale : Chimie Biologie
Discipline : Chimie des matériaux
Spécialité : Biomatériaux

présentée et soutenue publiquement par

Laëtitia OBADIA

Le 5 Novembre 2004

Synthèse et caractérisation de phosphates de calcium d'intérêt biologique :

- ~ **Structure et propriétés de phosphates tricalciques β dopés au sodium**
- ~ **Formation d'apatites non stoechiométriques par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté**

JURY

Président : Mme le Professeur Maria Vallet REGI

Rapporteurs	Pr Maria VALLET-REGI	Professeur des Universités (Madrid)
	Pr Christian REY	Professeur des Universités (Toulouse)
Examineurs	Dr Bruno ALONSO	Chargé de Recherche CNRS (Orléans)
	Dr Philippe DENIARD	Chargé de Recherche CNRS (Nantes)
Membre invité	Dr Guy DACULSI	Directeur de Recherche INSERM (Nantes)
Directeur	Dr Jean-Michel BOULER	Maître de Conférence des Universités (Nantes)
Co-directeur	Dr Bruno BUJOLI	Directeur de Recherche CNRS (Nantes)

UNIVERSITÉ DE NANTES					
PRÉSIDENT		M. François RESCHE			
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE					
DOYEN		M. Bernard GIUMELLI			
ASSEESSEURS		M. Henri HAMEL M. Alain DANIEL M. Alain JEAN			
PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD					
M.	Wolf	BOHNE	M.	Henri	HAMEL
M.	Alain	DANIEL	M.	Luc	HAMEL
Mme	Christine	FRAYSSÉ	M.	Alain	JEAN
M.	Bernard	GIUMELLI	M.	Olivier	LABOUX
			M.	Jean- Albert	POUÉZAT
MAÎTRES DE CONFÉRENCES PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD			ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES DES CSERD		
M.	Gilles	AMADOR del VALLE	M.	Jean-François	BREMONT
M.	Yves	AMOURIQ	M.	Stéphane	CARBONNELLE
Mlle	Valérie	ARMENGOL	Mlle	Cécile	DUPAS
M.	Léon Philippe	CLERGEAU	M.	Christophe	DURAND
Mme	Sylvie	DAJEAN-TRUDAUD	M.	Valéry	GUENNEGUES
M.	Joël	DENIAUD	M.	Michel	GUYOT
M.	Alain	HOORNAERT	Mme	Madline	HOUCHMAND-CUNY
M.	Saïd	KIMAKHE	M.	Laurent	LE GUEHENNEC
M.	André	LAGARDE	Mme	Françoise	LENOIR/EYHARTS
M.	Pierre	LE BARS	Mme	Myriam	LERAY/GRALL
M.	Philippe	LEMAÎTRE	Mlle	Emmanuelle	LEROUXEL
M.	Henri	LOGET	Mme	Serena	LOPEZ-CAZAUX
M.	Dominique	MARION	Mlle	Valérie	MOYENCOURT
M	Marc -Henri	NIVET	Mlle	Elisabeth	ROY
M.	Stéphane	RENAUDIN	M.	Christian	VERNER
M.	Michel	ROUVRE			
M.	Armand-Assem	SOUeidAN			
M.	François	UNGER			
M.	Pierre	WEISS			
M.	Jean-Michel	BOULER	M.	Zahi	BADRAN
(Maître de conférence des universités)			(Assistant Associé des Universités)		
			M.	Justin	N'GORAN KOFFI
			(Assistant Associé des Universités)		
			Melle	Laëtitia	OBADIA
			(Assistant Associé des Universités)		
			M.	Afchine	SAFFARZADEH
			(Assistant Associé des Universités)		

Situation au 15/10/04

AVANT-PROPOS

A Sébastien, qui m'a soutenue durant tous ces instants difficiles, pour ses encouragements et la patience dont il a fait preuve ...

A tous mes proches, pour ces moments que je ne leur ai pas consacrés...

Ce travail a été effectué au sein de l'Equipe Mixte INSERM 99-03 dirigée par Monsieur Guy Daculsi. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements, pour m'avoir accueillie et avoir accepté de juger ce travail.

Madame Maria Vallet Regi, Professeur à l'université de Madrid, m'a fait un grand honneur en acceptant d'être rapporteur de ce travail, et de présider ce jury de thèse. Je suis très sensible à cette preuve d'intérêt et lui adresse mes sincères remerciements.

Monsieur Christian Rey, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique de Toulouse a accepté d'être rapporteur de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes respectueux remerciements.

Je tiens à remercier Bruno Alonso, Chargé de Recherche CNRS au Centre de Recherches sur les Matériaux à Haute Température d'Orléans, pour sa collaboration et sa disponibilité, et pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

J'exprime également toute ma reconnaissance à Philippe Deniard, Chargé de Recherche CNRS à l'Institut des Matériaux de Nantes, pour m'avoir fait le grand honneur de participer à ce jury de thèse. Je le remercie vivement pour la collaboration que nous avons eue, pour son soutien, sa disponibilité et pour m'avoir si pédagogiquement initiée à l'affinement par la méthode de Rietveld.

Je remercie également Bruno Bujoli, Directeur de Recherche CNRS au Laboratoire de Synthèse Organique de Nantes, pour avoir co-dirigé ce travail et pour m'avoir apporté tout son soutien au cours de ces trois années de recherche. Je le remercie pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, ainsi que sa sympathie.

Je tiens à remercier sincèrement Jean-Michel Bouler, Maître de Conférence des Universités de Nantes (EMI 99-03), d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir soutenue et motivée durant toutes ces années de recherche. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée, de sa disponibilité (et patience !), de son écoute. Il fut sans conteste à l'origine de ma motivation pour la Recherche. Qu'il trouve ici le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

Cette étude est l'aboutissement d'un travail d'équipe qui a regroupé divers laboratoires, je tiens à remercier en particulier Dominique Massiot (directeur de recherche CNRS, CRMHT, Orléans) ainsi que Stéphane Jobic (Directeur de Recherche CNRS, Laboratoire de Chimie du Solide, IMN, Nantes) pour la collaboration fructueuse entretenue avec leur laboratoire et les discussions scientifiques enrichissantes qui ont fait avancer ce travail.

Mes remerciements vont également à Thierry Rouillon, Ingénieur d'étude, pour son implication et sa contribution à ce travail particulièrement dans le domaine de la diffraction des rayons X.

Je veux associer à ces remerciements l'ensemble des ingénieurs et techniciens qui ont apportés leur contribution à la construction de ce mémoire.

Je tiens à remercier l'ensemble du Laboratoire de Galénique et en particulier Christian Merle pour les enrichissantes discussions au cours de ces années de recherche.

Enfin, je souhaite vivement remercier les membres de l'Equipe INSERM 99-03 « Vive les Biomats » (passés ou présents) qui m'ont permis de passer ces longues années dans une ambiance excellente :

Mireille, pour tous ces déjeuners (et ces délicieux panini), ces pauses chocolats indispensables lors des p'tits moments de blues ... Pour cela et plus encore, je la remercie ; Géraldine (pour les manipes sur le β -TCP sodé) ; Ibrahim (compagnon de manipes) ; Marion & Séverine (pour les manipes de culture cellulaire) ; Jéré ; Les deux Pierre ; Polo (roi incontesté du MEB) ; Gaël (fournisseur officiel du labo) ; Sylvie (pour ses encouragements) ; Xavier (séjour à Grenoble mémorable) ; Shine - Shine ; Isabelle ; Claire ; Damien (ne désespère pas, un jour tu me battras au tennis) ; Pascal (merci pour cette co-présentation à la journée RMN Bassin Parisien) ; Samia ; Hélène ; Béné(s) ; Gilles(s) ; Dave ; Marco ; Olivier(s) ; Tony ; Serge ; Laure ; Manue ; Julia ; François ; Antoine ; Assem ; Cécile ; Laurent ; Borhane ; Abed

Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de la
Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises
dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur
donner aucune approbation, ni improbation.

Outre la rédaction cette thèse, nous avons contribué à la rédaction des 6 publications internationales suivantes :

1 - *Surface potential and osteoblast attraction to calcium phosphate compounds is affected by selected alkaline hydrolysis processing*

I. Smith, M. Baumann, **L. Obadia**, J.-M. Bouler

J Mat Sci: Mater Med, 15 (8): 841-846, **2004**

2 - *Synchrotron X-ray microtomography (on a micron scale) provides three-dimensional imaging representation of bone ingrowth in calcium phosphate biomaterials*

P. Weiss, **L. Obadia**, D. Magne, X. Bourges, C. Rau, W. Timm, I. Khairoun, J. M. Bouler, D. Chappard, O. Gauthier, G. Daculsi.

Biomaterials, 24(25):4591-4601, **2003**

3 - *Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin*

L. Obadia, G. Amador, G. Daculsi and J.-M. Bouler

Biomaterials, 24; 1265-1270, **2003**.

4 - *Calcium-deficient apatite: a first in vivo study concerning bone ingrowth*

B. Bourgeois, O. Laboux, **L. Obadia**, O. Gauthier, E. Betti, E. Aguado, G. Daculsi, J.M. Bouler
J Biomed Mater Res, 64A: 402-408, **2003**

5 - *Non-invasive bone replacement using a new injectable calcium phosphate biomaterial*

O. Gauthier, I. Khairoun, J. Bosco, **L. Obadia**, X. Bourges, C. Rau, D. Magne, J.M. Bouler, E. Aguado, G. Daculsi and P. Weiss

J Biomed Mater Res, 66A, 47-54, **2003**

6 - *Calcium deficient apatite: an in vitro model for vancomycin controlled release*

L. Obadia, G. Amador, G. Daculsi, and J.-M. Bouler

Key engineering materials, vols. 218-220, 179-182, **2002**

Liste des abréviations

CDA	Apatite Déficiente en Calcium (Calcium Deficient Apatite)
HA	Hydroxyapatite
β -TCP	Phosphate Tricalcique β (β Tricalcium Phosphate)
DCPD	Phosphate dicalcique dihydraté (Dicalcium Phosphate Dihydrate)
DRX	Diffraction des Rayons X
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
IR	Infrarouge
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
ALP	activité Phosphatase ALcaline (ALcaline Phosphatase)
MTS	Sel de Méthyl Tétrazolium (Methyl Tretrazodium Salt)

Sommaire

Président : Mme le Professeur Maria Vallet REGI	0
Sommaire	9
Introduction générale	12
Chapitre 1 : Généralités	15
1.1 L'os et ses substituts	16
1.1.1 L'Os	16
1.1.2 Les greffes osseuses	18
1.1.3 Les substituts osseux synthétiques : les phosphates de calcium	19
1.2 L'hydroxyapatite (HA)	21
1.2.1 Structure cristallographique de l'hydroxyapatite	22
1.2.2 Substitutions ioniques	23
1.3 Le phosphate tricalcique	26
1.3.1 Structure cristallographique du β -TCP	27
1.3.2 Substitutions ioniques	29
1.4 Voies de synthèse des BCP	30
1.4.1 Voie sèche : mélange solide / solide, calcination	31
1.4.2 Voie humide : synthèse du précurseur CDA, calcination.	31
1.4.2.1 Décomposition / précipitation	32
1.4.2.2 Hydrolyse	33
1.4.2.3 Voie sol-gel	34
1.5 Mise en forme / frittage des CDA	34
1.5.1 Mise en forme	34
1.5.2 Frittage	34
1.6 Caractérisation des phosphates de calcium	36
1.6.1 Diffraction des rayons X	36
1.6.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	38
1.6.2.1 Principe	38
1.6.2.2 Spectroscopie d'absorption infrarouge et phosphates de calcium	39
1.6.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	41
1.6.3.1 Principe	41
1.6.3.2 Application à l'étude des phosphates de calcium	44
1.6.4 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	45
1.6.5 Microscopie Electronique à Transmission (MET)	47
1.6.6 BET : surface spécifique	47
1.6.7 Spectrométrie d'absorption atomique	48
1.6.8 Pycnométrie à hélium (densité)	48
1.6.9 Normes	49

Chapitre 2 : Structure et propriétés de phosphates tricalciques β dopés au sodium -----50

2.1 Structure du β -TCP : environnement des ions PO_4^{3-} à courte distance-----51

2.1.1 Matériels et méthodes -----51

2.1.1.1 Synthèse des β -TCP----- 51

2.1.1.2 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)----- 53

2.1.1.3 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) ----- 53

2.1.1.4 Densité (pycnométrie à hélium) ----- 54

2.1.1.5 Spectrométrie d'absorption atomique ----- 54

2.1.1.6 Diffraction des Rayons X (DRX) ----- 54

2.1.1.7 Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P)----- 56

2.1.2 Résultats / discussion -----57

2.1.2.1 Synthèses ----- 57

2.1.2.2 Observation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ----- 57

2.1.2.3 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) ----- 58

2.1.2.4 Densité----- 61

2.1.2.5 Analyse élémentaire ----- 61

2.1.2.6 Diffraction des Rayons X (DRX) ----- 63

2.1.2.7 Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P)----- 65

2.1.2.8 Structure du β -TCP ----- 66

2.1.2.9 Valence des ions Ca^{2+} dans la structure du β -TCP----- 74

2.2 Etude de β -TCP avec différents taux de substitution en sodium -----75

2.2.1 Matériels et méthodes -----75

2.2.1.1 Synthèse et mise en forme----- 75

2.2.1.2 Absorption Atomique (dosage du sodium) ----- 77

2.2.1.3 Diffraction des Rayons X (DRX) ----- 77

2.2.1.4 Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P)----- 78

2.2.1.5 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) ----- 78

2.2.1.6 Propriétés mécaniques ----- 78

2.2.1.7 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)----- 80

2.2.1.8 Porosité Mercure----- 80

2.2.1.9 Solubilité ----- 81

2.2.1.10 Cytocompatibilité ----- 81

2.2.2 Résultats / discussion -----83

2.2.2.1 Pureté des β -TCP ----- 83

2.2.2.2 Synthèses ----- 84

2.2.2.3 Résonances Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P) ----- 84

2.2.2.4 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) ----- 87

2.2.2.5 Diffraction des rayons X (DRX)----- 89

2.2.2.6 Propriétés mécaniques ----- 90

2.2.2.7 Porosité / compacité ----- 91

2.2.2.8 Solubilité des β -TCP----- 97

2.2.2.9 Cytocompatibilité ----- 98

Chapitre 3 : Formation d'apatites phosphocalciques par hydrolyse en milieu ammoniacal : influence de la température, du temps et de la pression autogène -----	102
3.1 Introduction -----	103
Calcium deficient apatites synthesized by ammonia hydrolysis of DiCalcium Phosphate Dihydrate: influence of temperature, time and pressure. (J Biomed Mater Res, soumis à publication) -----	105
3.2 Discussion / Conclusion-----	132
Chapitre 4 : Hydrolyse en milieu basique de DCPD par voie NH₄OH ou NaOH	136
4.1 Introduction -----	137
4.2 Matériels et méthodes-----	139
4.2.1 Synthèses-----	139
4.2.2 Caractérisation-----	141
4.2.2.1 Pureté-----	141
4.2.2.2 Rapport Ca/P-----	142
4.2.2.3 Paramètres de maille-----	143
4.2.2.4 Morphologie des cristallites -----	143
4.2.2.5 Surface spécifique-----	143
4.2.2.6 Densité vraie-----	143
4.2.2.7 Taille des cristallites-----	143
4.3 Résultats -----	145
4.3.1 Pureté des CDA / BCP -----	145
4.3.1.1 Spectroscopie d'absorption infrarouge -----	145
4.3.1.2 Diffraction des Rayons X-----	149
4.3.2 Rapport Ca/P-----	150
4.3.2.1 Influence de la température (Ca/P + pH)-----	150
4.3.2.2 Influence de la concentration de la base-----	152
4.3.3 Paramètres de maille-----	153
4.3.4 Caractérisation des cristaux-----	154
4.3.4.1 Morphologie : MEB-----	154
4.3.4.2 Surface spécifique : BET-----	156
4.3.4.3 Densité : pycnométrie à hélium -----	157
4.3.4.4 Taille des cristallites (CDA) : DRX-----	158
4.4 Discussion -----	160
Conclusion générale -----	164
Références bibliographiques-----	167
Annexe -----	179
Liste des figures et tableaux-----	182

Introduction générale

Le tissu osseux est un organe de composition chimique complexe. Il est admis que la phase minérale de l'os est assimilable à une apatite non stoechiométrique carbonatée mal cristallisée. Suite à des déficits osseux d'origines traumatiques ou pathologiques, la chirurgie fait fréquemment appel à des substituts synthétiques pour remplacer cet os manquant.

Parmi ces matériaux, certains phosphates de calcium, grâce à leur composition chimique proche des phases minérales de l'os, possèdent des propriétés biologiques fondamentales adaptées pour être utilisés comme matériaux de substitution osseuse. L'hydroxyapatite (HA : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et le phosphate tricalcique β (β -TCP : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sont très utilisés : l'HA parce que cet orthophosphate de calcium est connu pour favoriser la précipitation *in vivo* d'apatites et le β -TCP pour son caractère plus résorbable. C'est pourquoi les biocéramiques en phosphates de calcium biphasés (BCP), associant ces deux composés sont très employées comme substituts osseux. En effet, en adaptant les proportions d'HA et de β -TCP, il est possible de contrôler la bioactivité des BCP et donc la cinétique de résorption - substitution osseuse [Daculsi, 1989a; Daculsi, 1989b; LeGeros, 1991; Yamada, 1997].

Le développement de ces phosphates de calcium requiert donc des modes de synthèse qui permettent la maîtrise et le contrôle de leur composition chimique. En outre, afin de rendre ces biomatériaux plus biofonctionnels, les solutions recherchées visent à augmenter les propriétés mécaniques des matériaux phosphocalciques et à améliorer leur bioactivité.

L'objectif de ce travail a été d'étudier un mode de synthèse original d'apatites non stoechiométriques de rapports Ca/P contrôlables ainsi que d'approfondir les connaissances fondamentales sur les structures cristallographiques des BCP et plus particulièrement de la phase β -TCP.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la structure du β -TCP et notamment à la possibilité d'incorporer l'ion sodium au sein de la maille de ce composé.

Nous avons également déterminé l'impact que pouvait avoir l'incorporation de cet ion sur les propriétés mécaniques et sur la cytocompatibilité du β -TCP.

Les BCP peuvent être élaborés par différentes méthodes de synthèse. L'une des plus étudiées est la décomposition thermique d'apatites phosphocalciques non stoechiométrique déficientes en calcium (CDA). Les propriétés biologiques des BCP sont corrélées au rapport Ca/P des CDA, qui est gouverné par les paramètres de synthèse.

Nous nous sommes attachés à synthétiser des CDA de rapports Ca/P variables par une méthode peu décrite dans la littérature : l'hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté (DCPD).

En utilisant la méthode des plans d'expériences, nous avons étudié l'impact des paramètres expérimentaux (temps de réaction, température de synthèse et pression autogène) sur la nature des apatites formée (rapport Ca/P, taille des cristallites).

De plus, une étude a été réalisée sur l'influence de la base utilisée (NH_4OH ou NaOH) et notamment du contre ion (NH_4^+ , Na^+) ainsi que des différents paramètres de synthèse (température de synthèse (50 à 200°C), temps de réaction (4 à 18 h)) sur la nature des CDA obtenues (substitution en ions Na^+ , HPO_4^{2-} et CO_3^{2-} , paramètres de maille, rapport Ca/P, taille des cristallites déterminée par affinement de diagrammes de diffraction des rayons X par la méthode de Rietveld, morphologie des cristallites, surface spécifique, densité).

Chapitre 1 : Généralités

1.1 L'os et ses substituts

1.1.1 L'Os

Le tissu osseux est un composite constitué d'une fraction minérale, qui lui confère ses propriétés de rigidité et de solidité, et d'une fraction organique qui lui permet de garder un certain degré d'élasticité. Il apporte à l'organisme une fonction de soutien, de protection des organes vitaux ainsi qu'une réserve en ions pour l'organisme.

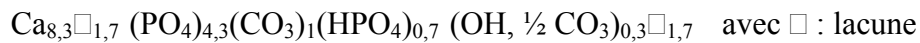
La composition chimique de l'os est complexe et dépend du type d'os ainsi que de l'âge de l'individu. La partie minérale (65% de la masse de l'os) est essentiellement constituée de phosphates de calcium. Il est admis que cette phase minérale est une apatite carbonatée mal cristallisée proche de l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) partiellement substituée par des ions tels que CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , ou encore Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , F^- et contenant également de nombreux éléments traces (Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , ...) Tableau 1-1.

	Os	Dentine	Email
Composition			
Calcium	34,8	35,1	36,5
Phosphore	15,2	16,9	17,7
Rapport Ca/P	1,71	1,61	1,63
Carbonate	7,4	5,6	3,5
Sodium	0,9	0,6	0,5
Magnésium	0,72	1,23	0,44
Chlore	0,13	0,01	0,30
Pyrophosphates	0,07	0,10	0,022
Potassium	0,03	0,05	0,08
Fluor	0,03	0,06	0,01
Phase inorganique (minéral)	65,0	70,0	97,0
Phase organique	25,0	20,0	1,5
H ₂ O adsorbée	10,0	10,0	1,5
Eléments traces : Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , ...			
Paramètres de maille			
a = b	9,41	9,421	9,441
c	6,89	6,887	6,880

Tableau 1-1 : Composition des apatites (os, dentine, email) chez l'adulte

[LeGeros, 1981]

En ne prenant en considération que les éléments majoritaires, l'une des compositions possible du minéral osseux peut être représentée par une apatite déficiente en calcium substituée de formule :



L'os est en perpétuel renouvellement. Le remodelage osseux - processus physiologique qui permet le renouvellement de la matrice osseuse - fait principalement intervenir deux types de cellules :

- ~ les ostéoclastes : Cellules chargées de la résorption du tissu osseux calcifié. Ce sont des cellules multinucléées de 20 à 100 μm de diamètre ;
- ~ les ostéoblastes : Cellules chargées de la synthèse de la matrice osseuse et qui participent également à sa calcification. Ce sont des cellules mononucléées de 20 à 30 μm de diamètre.

Le remodelage osseux suit un cycle fonctionnel de 5 étapes (*Figure 1-1*) :

1. La phase de quiescence : à l'état latent, des cellules bordantes recouvrent la majorité de la surface osseuse empêchant l'accès aux ostéoblastes ;
2. La phase d'activation : les précurseurs mononucléés des ostéoclastes se placent le long de la surface osseuse recouverte de cellules bordantes ;
3. La phase de résorption : les ostéoclastes résorbent l'os ;
4. La phase d'inversion : les ostéoclastes ayant terminé de former des lacunes sont remplacés par les cellules mononucléées, précurseurs ostéoblastiques ;
5. La phase de formation : les ostéoblastes comblent les cavités en apposant une nouvelle matrice osseuse.

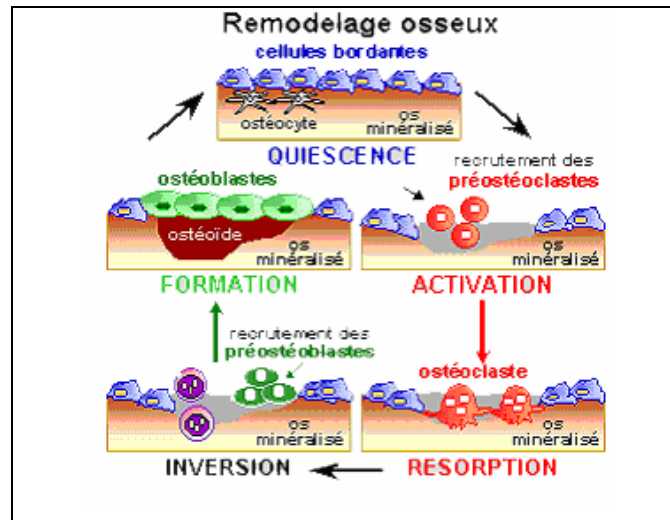


Figure 1-1 : Schéma du remodelage osseux

Suite à des déficits osseux d'origine traumatique ou pathologique, les chirurgiens sont amenés à remplacer cet os manquant par des greffes ou différents matériaux de substitution.

Le substitut osseux choisi doit présenter des caractéristiques essentielles :

- ~ Etre biocompatible ;
- ~ Etre bioactif, c'est à dire être biodégradable et donc, à terme, être substitué par un os néoformé ;
- ~ Etre biofonctionnel, c'est à dire avoir des propriétés mécaniques suffisantes pour une mise en place facile.

1.1.2 Les greffes osseuses

Les techniques de greffes sont couramment utilisées pour le comblement de pertes osseuses. On distingue trois types de greffes en fonction de leur origine :

- ~ Les *autogreffes* provenant du sujet lui-même reste le matériau de choix pour la reconstruction de perte de substance osseuse car elles ont un grand potentiel ostéogénique et n'induisent pas de réponse immunitaire de rejet. Cependant, elles nécessitent l'ouverture, souvent douloureuse, d'un site de prélèvement et les quantités d'os disponibles sont limitées ;
- ~ Les *allogreffes* provenant d'un individu de la même espèce sont disponibles en grande quantité. Néanmoins, elles peuvent être à l'origine de réactions inflammatoires et de risques de rejet ;

- ~ Les *xénogreffes* sont d'origine animale, souvent bovine. Elles nécessitent un traitement de déprotéinisation.

Les risques de transmission virale (SIDA, hépatite,...) et de prions posent de nombreux problèmes sur l'utilisation en toute sécurité des allogreffes et xénogreffes. Leur efficacité est également très limitée.

Afin de pallier les problèmes inhérents aux greffes osseuses, des substituts osseux de synthèse ont été développés. Ils représentent en effet une alternative intéressante de par leur innocuité microbiologique et leur abondance.

1.1.3 Les substituts osseux synthétiques : les phosphates de calcium

Les substituts osseux en phosphates de calcium sont utilisés depuis de nombreuses années [Nery, 1975; Jarcho, 1976; Jarcho, 1981]. Parmi eux, voici, listés dans le Tableau 1-2, les principaux phosphates de calcium d'intérêt biologique.

Composé	Abréviation usuelle	Formule brute	Rapport Ca/P	Solubilité à 25 °C, - log (K _s)
Phosphate dicalcique dihydraté	DCPD	CaHPO ₄ , 2 H ₂ O	1	6,59
Phosphate dicalcique anhydre	DCPA	CaHPO ₄	1	6,90
Phosphate octocalcique	OCP	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆	1,33	96,6
Phosphate tricalcique	TCP	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	α : 25,5 β : 28,9
Hydroxyapatite	HA ou OHAp	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	51
Phosphate tétracalcique	TTCP	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2	38-44

Tableau 1-2 : Différents orthophosphates de calcium d'intérêt biologique

Pour une utilisation comme matériaux de substitution osseuse, on utilise principalement les céramiques phosphocalciques suivantes :

- ~ l'hydroxyapatite (HA), proche structurellement des apatites biologiques ;
- ~ le phosphate tricalcique β (β-TCP) ;
- ~ les Phosphates de Calcium Biphases (BCP : Biphasic Calcium Phosphates) composés d'un mélange d'HA et de β-TCP. Ils présentent l'avantage de combiner

les propriétés physico-chimiques des deux composés : la dissolution du β -TCP permet d'obtenir une sursaturation locale en ions calcium et phosphate et la nucléation de l'HA permet de favoriser la précipitation d'apatites biologiques [Daculsi, 1997]. En adaptant les proportions d'HA et de β -TCP, il est possible de contrôler la bioactivité des BCP et donc la cinétique de résorption - substitution osseuse [Daculsi, 1989a; Yamada, 1997].

Ces derniers sont très utilisés depuis de nombreuses années en chirurgie humaine comme matériaux de substitution osseuse [Daculsi, 2003]. En effet, de par leur composition chimique très proche des phases minérales osseuses, ils possèdent des propriétés biologiques fondamentales adaptées pour servir de matériaux de substitution osseuse :

- ~ La biocompatibilité : capacité du matériau à être toléré par les tissus environnants ;
- ~ La bioactivité : capacité à promouvoir des échanges chimiques avec les tissus vivants. Elle se traduit au niveau des micropores par un phénomène de dissolution / précipitation de cristaux d'apatite carbonatée à la surface du matériau [Daculsi, 1989a; Daculsi, 1990a; Daculsi, 1989b; LeGeros, 1992]. Au niveau des macropores, les interactions entre les cellules et la céramique se traduisent par la dégradation du phosphate de calcium. Ces phénomènes de dissolution et de dégradation mettent en évidence la biodégradabilité des phosphates de calcium [LeGeros, 1993; Malard, 1999; Yamada, 1997; Yamada, 1994] ;
- ~ L'ostéoconduction : celle-ci se traduit, à l'échelle tissulaire, par des interactions entre le matériau et les tissus environnants. Il en résulte la formation d'un tissu osseux néoformé au contact de la céramique [Gauthier, 1998].

Les BCP sont ainsi très largement utilisés pour diverses applications cliniques telles que les réparations de défauts osseux périodontal [Ellinger, 1986], diverses applications orthopédiques [Daculsi, 1990c; Passuti, 1989], ainsi que la chirurgie orale et maxillo-faciale [Daculsi, 1999].

Afin d'obtenir un substitut osseux efficace pouvant être dégradé par les cellules osseuses et donc être remplacé par de l'os, il faut une structure poreuse adaptée [Daculsi, 1990b].

La norme IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) définit trois classes de pores :

- ~ Les micropores : pores de diamètres inférieurs à 2 nm ;
- ~ Les mésopores : pores de diamètres compris entre 2 et 50 nm ;
- ~ Les macropores : pores de diamètres supérieurs à 50 nm.

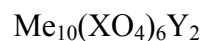
Dans le domaine des biomatériaux, les classes de pores diffèrent de la norme IUPAC. Au sein des biomatériaux, on peut trouver :

- ~ une microporosité – diamètre des pores inférieur à 10 μm – qui permet la diffusion des fluides biologiques et les échanges ioniques – Ca^{2+} et PO_4^{3-} ;
- ~ une macroporosité – diamètre des pores supérieur à 100 μm – qui permet la colonisation de l'implant par les cellules.

Un des inconvénients des céramiques phosphocalciques macroporeuses est leur fragilité et leur faible résistance mécanique qui limitent leur utilisation isolée en cas de contrainte importante (leur résistance en flexion ou en torsion est encore plus faible qu'en compression). Ainsi, il est nécessaire d'optimiser les propriétés mécaniques des substituts osseux en phosphates de calcium. Cependant, ceci ne doit pas se faire au détriment de leurs propriétés d'ostéoconduction liées aux macropores [Gauthier, 1998]. Un compromis doit donc être trouvé entre porosités et propriétés mécaniques. Afin de rendre ces biomatériaux plus biofonctionnels, les solutions recherchées visent à augmenter les propriétés mécaniques des matériaux phosphocalciques et à améliorer leur bioactivité.

1.2 L'hydroxyapatite (HA)

Le terme « apatite » définit une famille de solides ioniques cristallisant dans le système hexagonal (groupe d'espace $\text{P6}_3/\text{m}$) et de formule générale :



avec Me : cation bivalent

XO₄ : anion trivalent

Y : anion monovalent

Les apatites phosphocalciques qui entrent dans la constitution des tissus calcifiés peuvent être décrites à partir de l'HA. L'HA a pour formule brute $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et un rapport Ca/P atomique égal à 1,667.

1.2.1 Structure cristallographique de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite cristallise dans le système hexagonal (groupe d'espace $P6_3/m$). Les paramètres de maille sont : $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$ [Kay, 1964]. La maille contient 10 atomes de calcium, 6 tétraèdres PO_4 et deux groupements hydroxyle (Figure 1-2).

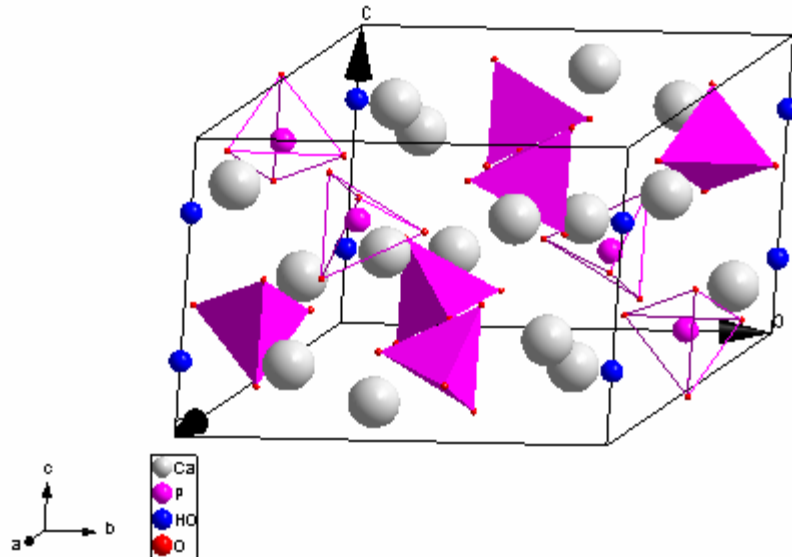


Figure 1-2 : Représentation schématique de la maille élémentaire de l'hydroxyapatite

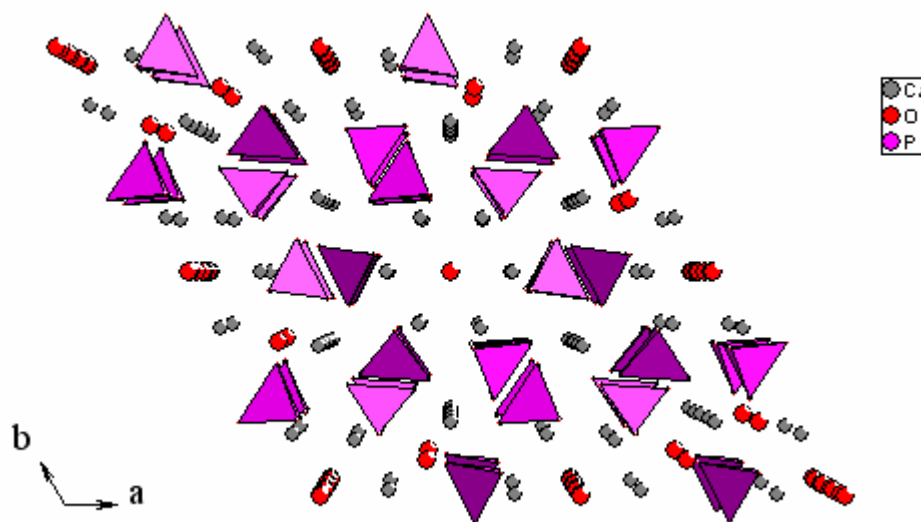


Figure 1-3 : Représentation schématique de l'hydroxyapatite sur le plan (001)

Au sein de la structure de l'hydroxyapatite, il y a deux sites de calcium cristallographiquement différents (Ca(1) et Ca(2)), un site de phosphore et quatre sites d'oxygène cristallographiquement différents (O(1), O(2), O(3) et O(4)).

L'assemblage des ions PO_4^{3-} se présente sous la forme d'un nid d'abeille qui confère au réseau apatitique une grande stabilité. Cet assemblage parallèle à l'axe c contient deux types de tunnels ouverts (Figure 1-3).

Le premier type de tunnel est occupé par les ions calcium Ca(1) en côte 0 et $\frac{1}{2}$ de la maille. Il y a 4 atomes Ca(1) par maille.

Le second type de tunnel est bordé par des atomes d'oxygène et les 6 autres ions calcium Ca(2) en côte $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ qui forment deux triangles par maille. Ce deuxième type de tunnel est occupé sur son axe par les ions OH^- à raison de deux par maille, situés approximativement à la hauteur des Ca(2). Ces tunnels (de diamètre supérieur à celui des tunnels de premier type) confèrent au réseau d'apatite des propriétés d'échangeur d'ions.

1.2.2 Substitutions ioniques

Sans modification notable, cette structure peut décrire des solides de composition et de stoechiométrie très variables. Si on se limite aux apatites phosphocalciques, la définition couvre des composés allant de la fluoroapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), minéral naturel apatitique le plus abondant, aux apatites biologiques, constituants minéraux principaux des os et des dents en passant par l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$), apatite phosphocalcique stœchiométrique la plus proche des apatites biologiques.

Dans la structure de l'hydroxyapatite, les ions Ca^{2+} peuvent être substitués par des cations bivalents (Mg^{2+} [Ben Abdelkader, 2001; LeGeros, 1989a], Sr^{2+} [Badraoui, 2000; Christoffersen, 1997; Heijligers, 1979; Lacout, 1998], Ba^{2+} [Laghzizil, 2001b], Pb^{2+} [Hadrich, 2001; Laghzizil, 2001b], Ag^{2+} [Badrou, 1998], Zn^{2+} [Bigi, 1995]...), les ions OH^- par des anions monovalents (Cl^- , F^- [Jha, 1997; Rodriguez-Lorenzo, 2003; Wei, 2003], Br^- , I^-) et les ions PO_4^{3-} par des anions trivalents (VO_4^{3-}).

Des substitutions d'ions par des ions de charge différente peuvent avoir lieu, mais nécessitent une compensation de charge pour respecter l'électroneutralité du composé. Celle-ci peut se traduire par la création de lacunes en ions de charge opposée. Par exemple, la substitution des ions PO_4^{3-} par des ions HPO_4^{2-} peut entraîner la formation d'une lacune en ion calcium et d'une lacune en ion OH^- . Des apatites déficientes en calcium de formule $\text{Ca}_{10-x}\square_x(\text{PO}_4)_{6-y}(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{2-z}\square_z$ peuvent ainsi être obtenues.

Certains ions comme les ions carbonates peuvent se substituer aux ions OH^- et / ou aux ions PO_4^{3-} [LeGeros, 1981; Montel, 1971]. Les apatites carbonatées ont été classées en fonction des ions auxquels les CO_3^{2-} se substituaient :

- ~ ions PO_4^{3-} , apatite carbonatée de type B. Elles sont préparées par des synthèses en milieu aqueux (cf paragraphe 1.4.2) par coprécipitation [LeGeros, 1967; LeGeros, 1986b], par hydrolyse de phosphates de calcium acide [Chickerur, 1980; LeGeros, 1989b].
- ~ ions OH^- , apatite carbonatée de type A. Elles sont préparées par mélange solide / solide à haute température (cf paragraphe 1.4.1), sous atmosphère contrôlée (flux de CO_2) ;
- ~ ions PO_4^{3-} et OH^- , apatite carbonatée de type AB.

La neutralité du composé lors d'une substitution d'ion par un ion de charge différente peut également se faire par une autre substitution d'un ion de charge opposée. Par exemple la substitution de Ca^{2+} par Na^+ est facilitée par la substitution d'un ion PO_4^{3-} par un ion CO_3^{2-} . L'équilibre des charges est alors respecté sans la création de lacune. Le taux de Na^+ dans des apatites de synthèse ne dépasse pas les 1% (même si la concentration est élevée). Mais en présence de CO_3^{2-} , environ 7% de Na^+ peuvent être incorporés [LeGeros, 1981]. Plus la concentration en ions carbonates est élevée dans la solution, plus le taux d'incorporation de sodium dans l'apatite est grand [De Maeyer, 1996]. Dans ce type d'apatite carbonatée de type B, le sodium se substitue préférentiellement aux atomes de calcium de type Ca(2) [El Feki, 2000; El Feki, 1999].

Il existe d'autres exemples de substitutions couplées au sein de l'hydroxyapatite :

- ~ substitution d'ions PO_4^{3-} et OH^- par des ions SiO_4^{4-} [Botelho, 2002] ;
- ~ substitution d'ions Ca^{2+} par un ion Al^{3+} et PO_4^{3-} par un ion CO_3^{2-} [Mayer, 1997] ;
- ~ substitution d'ions Ca^{2+} par un ion La^{3+} et PO_4^{3-} par un ion CO_3^{2-} [Mayer, 1999].

Les apatites biologiques sont complexes de par la quantité importante de substitutions ioniques présentes dans ces composés. En effet, les apatites biologiques sont composées :

- d'éléments principaux (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , et OH^-)
- de substituants minoritaires (CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , HPO_4^{2-} , ...)
- d'éléments traces (Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , ...).

L'hydroxyapatite étant l'apatite stœchiométrique la plus proche des phases minérales biologiques, beaucoup d'études ont été réalisées sur ce composé, afin de vérifier les effets des substitutions sur la formation et les propriétés des apatites. En effet, l'existence de lacunes et de substituants au sein de l'hydroxyapatite peut modifier fortement la cohésion de la structure et altérer les propriétés physico-chimiques ainsi que la bioactivité des composés ainsi obtenus. Afin d'évaluer l'impact biologique des différents ions présents dans les phases minérales biologiques, des études physico-chimiques ont été réalisées sur des modèles d'hydroxyapatites totalement ou partiellement substituées pour les comparer avec l'hydroxyapatite au niveau des propriétés physico-chimiques telles que les paramètres de maille, la cristallinité ou encore les propriétés de solubilité (Tableau 1-3).

Certains éléments (F^- [Laghzizil, 2001a], Ln^{3+} [Bouhaouss, 2001], BO_3^{2-} [Ternane, 2002], terres rares [Fleet, 2000], Eu^{3+} [Doat, 2003]...) ont également été incorporés au sein des apatites phosphocalciques afin d'améliorer leurs propriétés optiques, de luminescence ou encore de conductivité.

		Paramètre de maille (axe a)	Paramètre de maille (axe c)		
		Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	9,432 Å	6,882 Å	
		Substituants			Cristallinité
Substitution OH⁻	Carbonates, CO ₃ ²⁻	+	-		
	Fluor, F ⁻	-	=		+
	Chlore, Cl ⁻	+	-		=
Substitution PO₄³⁻	Carbonates, CO ₃ ²⁻	-	+		-
	HPO ₄ ²⁻	+	=		=
Substitution Ca²⁺	Strontium, Sr ²⁺	+	+		=
	Barium, Ba ²⁺	+	+		-
	Plomb, Pb ²⁺	+	+		-
	Potassium, K ⁺	+	=		=
	Magnésium, Mg ²⁺	-	-		-
	Cadmium, Cd ²⁺	-	-		-
	Manganèse, Mn ²⁺	-	-		-

Tableau 1-3 : Effet de quelques substitutions ioniques au sein de l'hydroxyapatite sur les paramètres de maille et sur la cristallinité (- : diminution ; + : augmentation, = pas de changement) [LeGeros, 1981]

1.3 Le phosphate tricalcique

Le phosphate tricalcique anhydre ou TCP a pour formule brute Ca₃(PO₄)₂ et un rapport Ca/P atomique égal à 1,5. La dénomination anhydre permet de le différencier du TCP apatitique hydraté ou whitlockite (nom d'un minéral découvert en 1941 par Hebert P. Whitlock). En effet, le terme de whitlockite devrait être réservé à des minéraux ou des matériaux synthétiques pouvant être formés à température ambiante et dans lesquels les ions Mg²⁺ et HPO₄²⁻ jouent un rôle structural, tandis que le TCP serait réservé à des composés de formule brute Ca₃(PO₄)₂, ne pouvant être synthétisés qu'à partir de 800°C, et dans lesquels les ions Mg²⁺ et HPO₄²⁻ seraient absents.

Il existe deux formes allotropiques (Tableau 1-4) :

~ Le β-TCP est stable jusqu'à 1125 °C.

~ L' α -TCP est stable entre 1125 et 1430 °C.

La réaction de transformation de β -TCP en α -TCP est réversible sauf si une trempe chimique est réalisée.

Le point de fusion du TCP se trouve à 1756°C.

	β -TCP	α -TCP
Symétrie	Rhomboédrique	monoclinique
Groupe d'espace	R3c	P21/c
Paramètres de maille	Dans le système hexagonal : a = b = 10,439 Å, c = 37,375 Å	a = 12,887 Å b = 27,280 Å c = 15,219 Å $\beta = 126,20$

Tableau 1-4 : Formes allotropiques du phosphate tricalcique

1.3.1 Structure cristallographique du β -TCP

La formule brute du β -TCP est β - Ca₃(PO₄)₂.

Il cristallise dans le système rhomboédrique. Son groupe d'espace est R3c.

Les paramètres de la maille peuvent être décrits dans le système hexagonal (a = b \neq c ; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$ et $\gamma = 120^\circ$) :

a = 10,439 Å et c = 37,375 Å [Dickens, 1974].

La maille contient 21 motifs [Ca₃(PO₄)₂] (Z = 21). Il y a donc 273 atomes par maille (Figure 1-4).

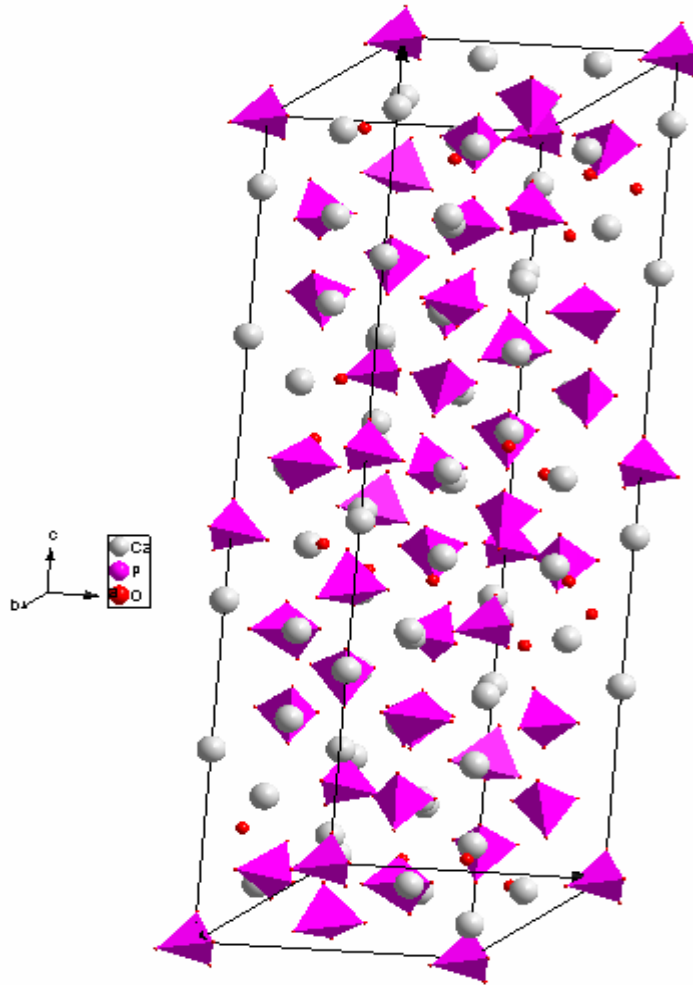


Figure 1-4 : Représentation schématique de la maille élémentaire du phosphate tricalcique β

Les ions calcium occupent 5 sites cristallographiques différents :

- ~ Les sites Ca(1), Ca(2), Ca(3) et Ca(5) sont totalement remplis.
- ~ Le site Ca(4) est statistiquement à moitié rempli.

Il y a 3 sites cristallographiques de phosphore dans un rapport stœchiométrique quantitatif 1/3/3 : P(1), P(2) et P(3).

Il y a 10 sites d'oxygène O(1), O(2), O(3), O(4), O(5), O(6), O(7), O(8), O(9) et O(10).

La structure du β -TCP peut être représentée comme un arrangement de deux types de colonnes A et B parallèlement à l'axe c de la maille hexagonale.

- ~ Colonne A : ... P(1) – Ca(4) – Ca(5) ...
- ~ Colonne B : ... P(2) – P(3) – Ca(1) – Ca(2) – Ca(3) ...

La colonne A est entourée de 6 colonnes B. La colonne B est entourée de 2 colonnes A et de 4 colonnes B (Figure 1-5).

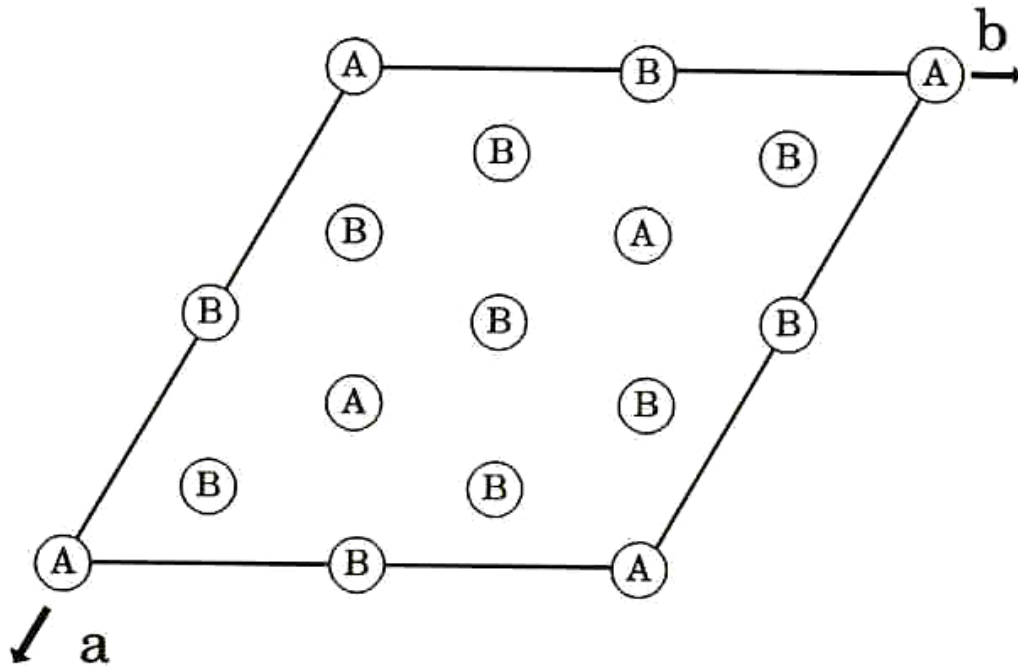


Figure 1-5 : Arrangement des colonnes A et B dans la maille du β -TCP (décrite dans le système hexagonal).

1.3.2 Substitutions ioniques

Le β -TCP anhydre n'a pas été retrouvé dans les tissus biologiques. Seul, le β -TCP substitué par du magnésium a été retrouvé dans des calcifications pathologiques [LeGeros, 1974]. De plus, il a été montré que la maille du β -TCP était stabilisée par différents cations comme le magnésium [LeGeros, 1974; LeGeros, 1989a] ou encore le zinc [Bigi, 1995].

Les substitutions isostructurales au sein du β -TCP sont principalement des substitutions cationiques.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la substitution totale ou partielle d'ions Ca^{2+} par des cations bivalents d'intérêt biologique :

- ~ Mg^{2+} [Clement, 1989] ;
- ~ Zn^{2+} [Bigi, 1997; Jakeman, 1989; Layrolle, 1996] ;
- ~ Sr^{2+} [Bigi, 1997].

D'autres substitutions isostructurales de cations au sein du β -TCP ont été réalisées afin d'améliorer les propriétés de luminescence ($\text{Ca}_{9,5}\text{Co}(\text{PO}_4)_7$ [Belik, 1998] ; $\text{Ca}_9\text{CoM}(\text{PO}_4)_7$ avec $\text{M} = \text{Li}^+, \text{Na}^+, \text{K}^+$) [Belik, 1999] ou catalytiques du β -TCP ainsi formé ($\text{Ca}_9\text{MLn}_{2/3}(\text{PO}_4)_7$ avec $\text{M} : \text{Li}^+, \text{Na}^+$ et $\text{Ln} : \text{Y}, \text{Bi}$ [Lazoryak, 1996b] ; $\text{Ca}_9\text{Cu}_{1,5}(\text{PO}_4)_7$ et $\text{Ca}_{9,5}\text{Cu}(\text{PO}_4)_7$ [Belik, 2001] ; $\text{Ca}_{19}\text{Cu}_2(\text{PO}_4)_{14}$ [Khan, 1997] ; $\text{Ca}_{10,5-x}\text{Cu}_x(\text{PO}_4)_7$ ($0 < x < 1$), [Benarafa, 2000a] $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ [Benarafa, 2000b; Lazoryak, 1996a].

Ces substitutions ont une influence sur les paramètres de maille du β -TCP ainsi formé (Tableau 1-5).

	a = b	c	Références
β -TCP	10,439	37,375	[Clement, 1989; Dickens, 1974]
Mg	-	=	[LeGeros, 1974]
Cu	-	-	[Belik, 2001; Benarafa, 2000a; Khan, 1997]
Eu	+	+	[Lazoryak, 1996b]
Nd	+	+	[Lazoryak, 1996b; Lazoryak, 1996c]
Na	+	-	[Lazoryak, 1996b]
Co	-	-	[Belik, 1998]
Fe	-	-	[Benarafa, 2000b; Lazoryak, 1996a]
Sr	=	-	[Bigi, 1997]
Zn	-	-	[Bigi, 1997]

Tableau 1-5 : Influence des substitutions des ions Ca^{2+} sur les paramètres de maille du β -TCP

1.4 Voies de synthèse des BCP

Les BCP, dont le rapport Ca/P varie entre 1,5 (phosphate tricalcique β pur) et 1,67 (hydroxyapatite pure) peuvent être obtenus par des voies de synthèse différentes :

- ~ Le mélange solide / solide qui consiste en un cycle de broyage / calcination de sels de calcium et de phosphate.
- ~ Une apatite déficiente en calcium (CDA) (précurseur) est synthétisée par double décomposition / précipitation de sels de calcium et de phosphate ; par hydrolyse en milieu basique de phosphate de calcium acide ou encore par réaction sol-gel. Ce précurseur est ensuite calciné au-delà de 800°C pour obtenir un BCP.

Les BCP peuvent également être obtenus par un mélange d'HA et de β -TCP dans les proportions souhaitées. Il semblerait cependant que les propriétés mécaniques et de bioactivité des BCP ainsi obtenus soient inférieures à celles des BCP issus d'un traitement thermique d'une CDA [Gauthier, 1999].

1.4.1 Voie sèche : mélange solide / solide, calcination

Un mélange intime de sels de calcium et de phosphate est effectué. Le Tableau 1-6 liste des précurseurs de calcium et de phosphate utilisées dans la synthèse de BCP. Le BCP est ensuite obtenu par calcination de ce mélange entre 800 et 1000°C.

Des attentions particulières doivent être apportées à la qualité du broyage ainsi qu'aux proportions des deux réactifs afin d'obtenir le rapport Ca/P souhaité du BCP. Les conditions de calcination (température, durée, atmosphère) doivent être déterminées avec précision afin de permettre à la réaction d'aller à son terme.

précurseurs de calcium	précurseurs de phosphate	Références
CaCO ₃	Ca ₃ (PO ₄) ₂	[Ramachandra Rao, 1997]
CaO	CaHPO ₄	[Yeong, 2001]
CaCO ₃	CaHPO ₄ , 2 H ₂ O	[Toriyama, 1996]
CaCO ₃	Ca ₂ P ₂ O ₇	[Rhee, 2002]
CaCO ₃	CaHPO ₄ ou CaHPO ₄ , 2 H ₂ O	[Jinawath, 2002]
CaCO ₃	CaHPO ₄	[Nelson, 1982]

Tableau 1-6 : Exemples de précurseurs de calcium et de phosphate trouvées dans la littérature pour la synthèse de BCP par mélange solide / solide

1.4.2 Voie humide : synthèse du précurseur CDA, calcination.

Des apatites déficientes en calcium (CDA) sont synthétisées en voie aqueuse. Les CDA doivent subir une calcination pour donner un BCP. Après un traitement thermique au-delà de 1000°C, ces CDA se décomposent en un mélange d'HA et de β -TCP [Toth, 1991] (qui sont les deux seuls orthophosphates de calcium stables à ces températures) dont le rapport Ca/P final dépend du rapport Ca/P de la CDA initiale [Ishikawa, 1993].

A température ambiante, seule l'hydroxyapatite peut être synthétisée ainsi que le β -TCP substitué par du magnésium (grâce à l'action stabilisante de l'ion magnésium). Le β -TCP non substitué ne peut pas être synthétisé en solution sans subir un traitement thermique supérieur à 800°C.

1.4.2.1 Décomposition / précipitation

Cette méthode est la plus couramment étudiée pour l'obtention d'une apatite déficiente en calcium (CDA). Elle se déroule en milieu basique par une décomposition / précipitation de précurseurs de calcium et de phosphate (Tableau 1-7) à des températures comprises entre 37 et 100 °C.

Précurseurs de calcium	Précurseurs de phosphate	références
$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	[LeGeros, 1991]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	[Andres-Verges, 1998; Cuneyt Tas, 2000; Liu, 2001; Raynaud, 2002]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	[Andres-Verges, 2000]
CaCl_2	K_2HPO_4	[Gomez-Morales, 2001]
$\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2, x \text{H}_2\text{O}$	H_3PO_4	[Liou, 2004]
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	H_3PO_4	[Slosarczyk, 1996; Victoria, 2002]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	[Kivrak, 1998; Kwon, 2003]
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{HPO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4$	[Vallet-Regi, 1997]

Tableau 1-7 : Exemples de précurseurs de calcium et de phosphates trouvées dans la littérature pour la synthèse de BCP par décomposition / précipitation

Le même type de réaction peut également être effectuée en chauffant une solution contenant un précurseur de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) et de phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ par des micro-ondes ce qui permet une homogénéisation de la température au sein de la solution [Manjubala, 2001; Sampath Kumar, 2000].

Le BCP est ensuite obtenu en calcinant la CDA entre 750 et 1000°C.

1.4.2.2 Hydrolyse

Cette méthode est basée sur le fait que l'HA est la phase phosphocalcique la plus stable à $\text{pH} > 4,5$ (Figure 1-6). Tout orthophosphate de calcium mis en suspension dans une solution maintenue à $\text{pH} > 4,5$ s'hydrolysera en HA. Pour des raisons de cinétique, le type de phosphate de calcium ainsi que la température et le pH de la réaction ont été étudiés afin d'accélérer la réaction de formation de l'apatite.

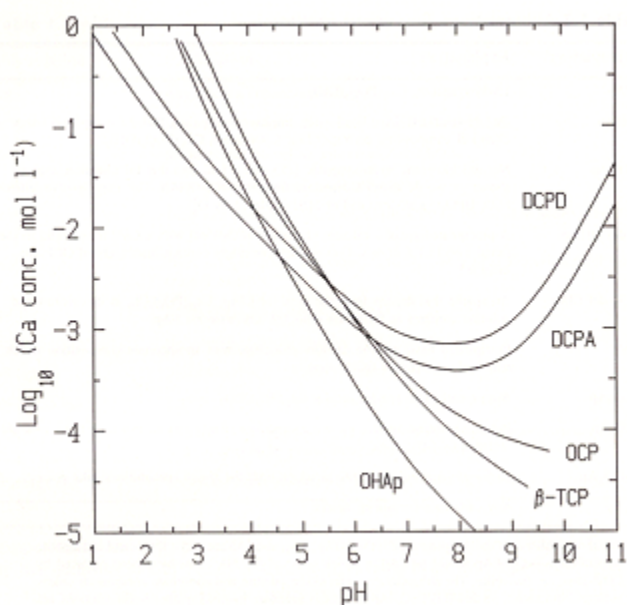


Figure 1-6 : Isotherme de solubilité des phases phosphocalciques dans le système $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ [Elliott, 1994]

L'obtention d'une CDA par hydrolyse en solution basique de phosphate de calcium acide (ACP, DCPD, DCPA, OCP, α - ou β -TCP, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, TeTCP) à une température comprise entre 37 et 100 °C a été décrite dans la littérature [Bouler, 2000; De Maeyer, 1994; Dorozhkina, 2002; LeGeros, 1986a; LeGeros, 1994; Monma, 1987; Tung, 1985].

La formation de ces CDA dépend du pH de la solution, de la température de réaction ainsi que des espèces ioniques présentes en solution. Il a ainsi été prouvé que la présence d'ions Mg^{2+} favorisait l'hydrolyse de DCPD en β -TCP substitué par du magnésium aux dépens de l'hydroxyapatite [LeGeros, 1974; LeGeros, 1989a].

Cette réaction reste cependant peu étudiée.

1.4.2.3 Voie sol-gel

Des BCP de rapport Ca/P variables peuvent être synthétisées par voie sol-gel. Cette réaction a souvent lieu dans une solution d'éthanol. Les alkoxydes sont fréquemment utilisés comme précurseurs de phosphore et de calcium. Après hydrolyse il y a une précipitation d'un phosphate de calcium amorphe de rapport Ca/P contrôlé, qui après traitement thermique donne un BCP [Kojima, 1993; Layrolle, 1998; Liu, 2002].

Divers procédés de mise en forme des BCP leur confèrent des utilisations variées [Daculsi, 1998]. En effet, les BCP peuvent être utilisés

- ~ sous forme de revêtements sur des implants métalliques afin d'améliorer l'ostéoconduction de ces prothèses. Dans ce cas, les revêtements peuvent être réalisés par torche plasma, par réaction sol-gel [Gan, 2004; Lopatin, 1998], par électrodéposition [Kuo, 2002], ou encore par MO-CVD (Metal-Organic Chemical Vapor Deposition) [Allen, 1996] ;
- ~ Comme céramiques denses ;
- ~ Comme céramiques macroporeuses ;
- ~ Sous forme de biomatériaux injectables. Ils associent une charge minérale (le BCP) ainsi qu'une phase vectrice (l'hydroxypropylméthylcellulose par exemple) [Weiss, 1999].

1.5 Mise en forme / frittage des CDA

1.5.1 *Mise en forme*

L'étape de mise en forme consiste à former des pièces manipulables et fonctionnelles. Cette opération peut être effectuée par compaction à froid à l'aide d'une presse uniaxiale ou isostatique. Lors de la mise en forme, l'incorporation de porogènes comme le naphthalène de granulométrie contrôlée peuvent être ajoutés. Après traitement thermique, ils seront à l'origine de la macroporosité du matériau.

1.5.2 *Frittage*

Le frittage est l'ensemble des phénomènes qui se produisent au cours du traitement thermique d'un aggloméré de poudre, notamment la consolidation et l'élimination de la

porosité. L'évolution thermodynamique tend à obtenir un seul grain qui présente la densité théorique maximale du composé. L'augmentation de la température amplifie le mouvement des atomes et rend possible la redistribution de la matière. En général, le frittage se divise en trois étapes [Binder Royer, 1988] :

Etape 1 : Apparition de joints de grains qui se fait pratiquement sans retrait.

Etape 2 : Densification avec un retrait important et l'élimination de la porosité interconnectée ; la croissance de grains reste faible ;

Etape 3 : A partir de 95% de la densité théorique, la fin de la densification a lieu par élimination de la porosité résiduelle fermée accompagnée d'un grossissement important des grains. Ce dernier phénomène est très important car il détermine les propriétés mécaniques de la céramique : il doit être parfaitement contrôlé.

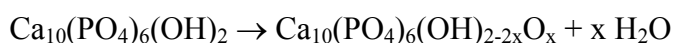
Les conditions de frittage d'un phosphate de calcium vont déterminer la composition finale, les caractéristiques structurales (taille des grains et densité) ainsi que les propriétés mécaniques de la céramique obtenue.

Le frittage doit permettre une densification optimale de la céramique sans pour autant induire une croissance des grains trop importante.

Plusieurs autres paramètres influent sur les propriétés mécaniques des céramiques phosphocalciques en plus de la température de frittage :

- ~ Les caractéristiques de la poudre de départ (taille et forme des grains, surface spécifique)
- ~ L'atmosphère sous laquelle est réalisé le frittage
- ~ Les montées et descentes en température ainsi que le palier de frittage

Au-delà de 1000°C, l'HA et le β -TCP sont les deux seuls orthophosphates stables. Cependant, on se limite à la température maximale de frittage de 1150°C pour l'HA (qui se décompose en β -TCP au dessus de 1200°C) et à 1300°C pour le β -TCP (qui se décompose en α -TCP au dessus de 1350°C). Le plateau de frittage ne doit pas être trop haut car au dessus de 1200°C, l'HA peut se déshydroxyler pour donner une oxyapatite :



La déshydroxylation dépend des conditions de frittage et notamment de la pression en H₂O dans le four.

De plus, un plateau de frittage trop haut peut induire une croissance de grains tant au niveau de l'HA [Bigi, 1980] qu'au niveau du β -TCP [Jarcho, 1976]. Ceci se traduit par une

diminution des propriétés mécaniques de la céramique obtenue [Halouani, 1994] selon la loi :

$$\sigma = A / d^n \quad \text{avec} \quad \sigma : \text{caractéristique mécanique}$$

$$d : \text{taille des grains}$$

$$A \text{ et } n : \text{constantes}$$

1.6 Caractérisation des phosphates de calcium

1.6.1 Diffraction des rayons X

Les cristaux, constitués de réseaux tridimensionnels réguliers, peuvent diffracter les rayons X qui ont une longueur d'onde du même ordre de grandeur que les dimensions du réseau cristallin. Tout se passe comme si les rayons X, de longueur d'onde λ , se réfléchissaient sur une famille de plans réticulés (hkl) du réseau cristallin avec un angle θ , selon la loi de Bragg (Figure 1-7) :

$$2 d_{hkl} \sin\theta_{hkl} = \lambda \quad \text{avec } d_{hkl} = \text{distance interréticulaire}$$

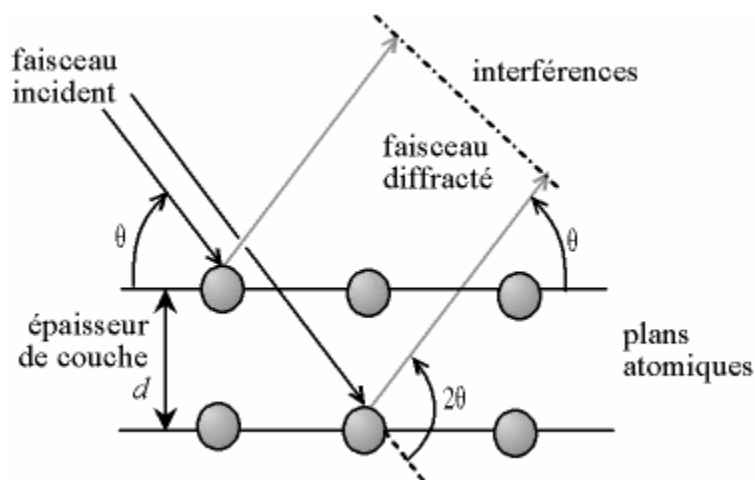


Figure 1-7 : Conditions de Bragg

Diffractomètre Bragg – Brentano

C'est le montage le plus courant. L'échantillon se présente comme une plaquette : une coupelle est remplie avec de la poudre de l'échantillon à analyser avec un niveau bien plan. Dans la configuration dite « $\theta - 2\theta$ », le tube à rayons X reste fixe. L'échantillon et le détecteur bougent. Le plan de l'échantillon fait un angle θ avec le faisceau incident, et le détecteur 2θ avec le même faisceau (Figure 1-8).

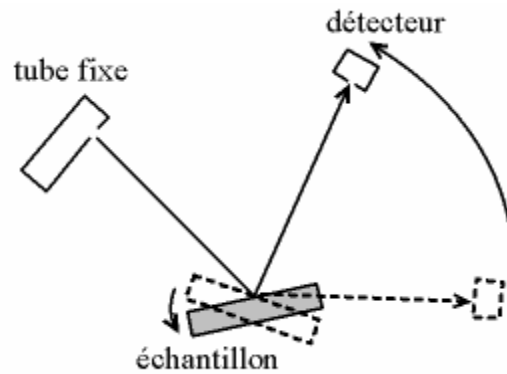


Figure 1-8 : Montage $\theta - 2\theta$

Le diagramme apparaît comme une succession de pics. Par la loi de Bragg, il est possible d'associer chaque pic à un plan atomique imaginaire. Ces plans peuvent être désignés par des indices de Miller (hkl). On peut de même associer ces indices (hkl) aux pics de diffraction. On parle d'indexation des pics (Figure 1-9).

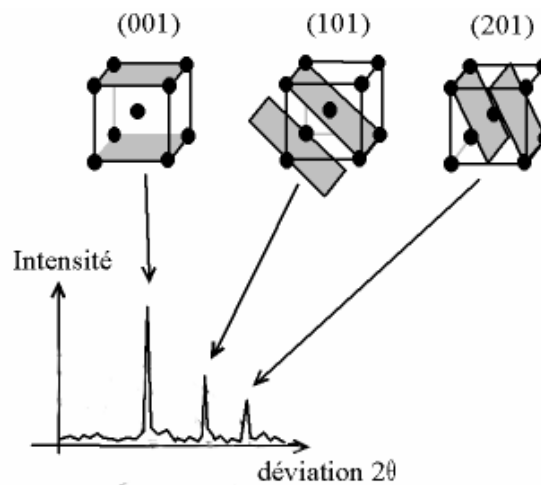


Figure 1-9 : Indexation des pics : association d'un pic de diffraction et d'un plan (hkl)

Le contenu de la maille (nature et position des atomes) gouverne l'intensité des pics par le facteur de structure. Le calcul de l'intensité peut être effectué par l'intensité dérivée du facteur de structure.

L'analyse par diffraction des rayons X de phosphates de calcium permet d'avoir accès à diverses informations dont :

- ~ L'identification et la pureté des structures cristallines ;
- ~ Les proportions des composés cristallins présents ;
- ~ L'estimation de la taille moyenne apparente des cristallites analysées à l'aide de la formule de Scherrer :

$$\beta = \frac{K\lambda}{T_{hkl} \cos \theta}$$

avec : β : largeur de raie à mi hauteur de l'échantillon analysé due à l'effet de taille

K : constante de forme (ici égale à 0,94)

T_{hkl} : taille des cristallites moyennes apparentes au plan hkl (en Å)

λ : longueur d'onde $\text{CuK}\alpha$ (en Å)

θ : angle de diffraction en radian

- ~ La détermination des paramètres de maille du composé analysé.

La méthode de Rietveld [Rietveld, 1969] permet d'effectuer un affinement de la structure à partir d'une solution approchée. Elle donne accès aux informations citées ci-dessus en prenant en considération l'ensemble du diffractogramme et non les intensités individuelles des pics de Bragg (qui est une méthode vite limitée par la superposition des réflexions).

Cette méthode ajuste donc l'ensemble du diagramme de diffraction expérimental en utilisant comme variable des paramètres instrumentaux, des paramètres structuraux (paramètres de maille, positions atomiques ...) ou encore les paramètres microstructuraux (tailles et déformation des cristallites) de l'échantillon analysé. Ainsi, à partir d'une structure initiale connue de la maille (système cristallin, paramètres de maille, positions atomiques ...), il est possible d'affiner les paramètres sélectionnés afin de minimiser la différence entre le diffractogramme calculé et le diffractogramme expérimental.

1.6.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

1.6.2.1 Principe

Les valeurs énergétiques des rayonnements infrarouges correspondent aux énergies développées lors des vibrations moléculaires. Une liaison A-B donnera naissance à une bande d'absorption infrarouge lorsque sa vibration déformera asymétriquement le nuage électronique des atomes A et B. Une telle déformation ne se produira que lorsque les deux atomes auront une électronégativité différente. Ainsi une liaison A-A ne sera pas active en infrarouge et plus la différence d'électronégativité entre les atomes A et B est grande, plus

la raie sera intense. Le domaine de l'infrarouge moyen (entre 4000 et 400 cm^{-1}) est couramment utilisé car la plupart des fréquences caractéristiques des groupements chimiques fonctionnels y sont situées.

Théoriquement, la fréquence de vibration d'une liaison est donnée par la formule suivante :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k_{AB}}{\mu} \right)^{1/2}$$

avec ν : fréquence de vibration de la liaison A-B (en s^{-1})

k_{AB} : constante de force de la liaison A-B (en $\text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$)

μ : masse réduite. $\mu = \frac{M_A + M_B}{M_A \times M_B}$ (en kg^{-1})

avec M_A : masse de l'atome A

M_B : masse de l'atome B

1.6.2.2 Spectroscopie d'absorption infrarouge et phosphates de calcium

La spectroscopie d'absorption infrarouge permet d'apporter des informations sur les groupements fonctionnels des apatites synthétiques :

- ~ Identification du composé étudié ;
- ~ Présence de groupements fonctionnels (CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , OH^- , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) ;
- ~ Type de substitution dans l'apatite (apatite carbonatée de type A ou de type B) : CO_3^{2-} pour OH^- ou PO_4^{3-} ;
- ~ Les effets des substitutions sur les vibrations des groupements PO_4 ou OH .

Groupements PO_4^{3-}

Les ions PO_4^{3-} sont tétraédriques. Ils présentent 4 modes de vibrations : ν_1 , ν_2 , ν_3 et ν_4

- ~ $\nu_1 \text{ PO}_4$: 950 – 1000 cm^{-1}
- ~ $\nu_2 \text{ PO}_4$: ~ 470 cm^{-1}
- ~ $\nu_3 \text{ PO}_4$: 1000 - 1500 cm^{-1}
- ~ $\nu_4 \text{ PO}_4$: 500 - 650 cm^{-1}

Phosphates de Calcium Biphases

Les spectres d'absorption infrarouge des BCP sont une contribution des bandes d'absorption de l'hydroxyapatite (groupements PO_4^{3-} et OH^-) et du phosphate tricalcique β (groupements PO_4^{3-}) (Tableau 1-8).

Hydroxyapatite (cm ⁻¹)	Phosphate tricalcique β (cm ⁻¹)	Attributions
3572		Vibration OH apatitiques
1087	1119	v ₃ PO ₄
1072	1094	
1046	1080	
1032	1041	
	1010	
962	972	v ₁ PO ₄
	945	
630		Mode de libration des OH ⁻
601	602	v ₄ PO ₄
571	589	
	550	
	541	

Tableau 1-8 : Principales bandes d'absorption IR de l'hydroxyapatite et du β-TCP
[Fowler, 1966]

Apatites déficientes en calcium

Le spectre infrarouge des apatites phosphocalciques non stoechiométriques est semblable à celui des apatites stoechiométriques, la différence majeure étant l'apparition de bandes dues aux substitutions : HPO₄²⁻, CO₃²⁻,

Substituants

HPO₄²⁻

Les groupements HPO₄²⁻ au sein d'une apatite sont caractérisés par la présence de bandes à :

- ~ 866 cm⁻¹ [Apfelbaum, 1992] (dans les apatites fortement carbonatées, cette bande est masquée par la bande forte v₂ CO₃) ;
- ~ 1145 cm⁻¹ [Rey, 1991] ;
- ~ 2 bandes à 520-530 et 540-550 cm⁻¹ [Rey, 1990].

CO₃²⁻

Sur les quatre modes de vibration des ions CO₃²⁻, seuls deux sont exploitables pour les études en infrarouge des phosphates de calcium : le domaine v₂ et v₃. En effet, le domaine

ν_1 CO_3^{2-} est masqué par la bande ν_3 PO_4 , et le domaine ν_4 donne lieu à des bandes de trop faibles intensités pour être exploitables.

Le domaine ν_2 CO_3 (860-880 cm^{-1}) se décompose en trois bandes : 871, 878, 866 cm^{-1} [Rey, 1989].

- ~ La bande à 878 cm^{-1} correspond à des apatites carbonatées de type A (les ions carbonates se substituent aux ions OH^- de l'apatite).
- ~ La bande à 871 cm^{-1} correspond à des apatites carbonatées de type B (les ions carbonates se substituent aux ions PO_4^{3-} de l'apatite).
- ~ La troisième bande située vers 866 cm^{-1} a été attribuée à des carbonates non-apatitiques appelés carbonates labiles.

Le domaine ν_3 CO_3^{2-} des apatites carbonatées de type A donnent lieu à deux bandes bien définies à 1535 et 1463 cm^{-1} . Celui des apatites carbonatées de type B présente deux bandes bien définies à 1456 et 1422 cm^{-1} .

Cependant, le domaine ν_3 CO_3^{2-} de l'apatite carbonatée de type AB est complexe avec des bandes principales et des épaulements (1416, 1470, 1500, 1545, 1568 cm^{-1}) qui ne se réduisent pas à une superposition des bandes spécifiques de l'apatite carbonatée de type A à celles de l'apatite carbonatée de type B [Elliott, 1985; Rey, 1989].

Il n'y a pas d'interférence entre la bande des ions HPO_4^{2-} et le domaine ν_2 CO_3^{2-} .

1.6.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

1.6.3.1 Principe

Un système physique, qui peut être mécanique, électrique ou magnétique, est dit résonant lorsqu'il est susceptible de modifier son état d'équilibre et d'emmagasiner de l'énergie, sous l'influence d'une sollicitation externe à une fréquence bien particulière. Cette fréquence correspond à la fréquence de résonance du système.

Le rapport gyromagnétique γ est caractéristique d'un noyau donné. Pour un champ donné, les noyaux résonnent à des fréquences qui leur sont propres :

$$\nu_0 = \gamma H_0 / 2\pi \quad \nu_0 : \text{fréquence de rotation du moment magnétique } \overset{\mu}{M} \text{ autour du champ extérieur } \overset{\mu}{H_0}$$

Un noyau isolé se comportera comme un petit aimant et pourra être observé par RMN si son moment magnétique μ est non nul. La RMN est donc réservée aux noyaux pour

lesquels un élément aura un spin non nul si A (nombre de masse) et Z (numéro atomique) ne sont pas tous les deux pairs.

Phénomènes de résonance

En présence d'un champ magnétique H_0 , le niveau d'énergie fondamental E_1 est légèrement plus peuplé que le niveau excité E_2 (la différence d'énergie ΔE suit la distribution de Boltzmann) (Figure 1-10).

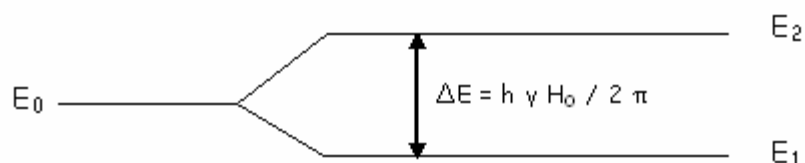


Figure 1-10 : Séparation d'énergie suivant la distribution de Boltzmann

Plus H_0 est grand, meilleure est la sensibilité (définie par la quantité minimale de noyaux détectables).

Pour observer la résonance, il faut fournir une énergie permettant aux noyaux de passer de l'état fondamental à l'état excité. Cette énergie est fournie par un second champ magnétique \vec{H}_1 d'intensité 10^6 fois plus faible que H_0 . Dans le cas d'un spectromètre à transformée de Fourier, \vec{H}_1 est envoyé sous forme d'impulsions très brèves afin d'obtenir la résonance. \vec{H}_1 , perpendiculaire à \vec{H}_0 , tourne autour de celui-ci à une vitesse angulaire variable ω_1 .

On obtient la résonance lorsque ω_1 est égale à la vitesse angulaire ω_0 de \vec{M} autour de \vec{H}_0 .

Détection et transformée de Fourier

Lorsque l'impulsion cesse, l'aimantation se met à osciller pour tendre à reprendre sa position d'équilibre, alignée sur H_0 . L'oscillation induit aux bornes de la bobine détectrice un signal de relaxation décroissant de fréquence ν_1 .

Une fois amplifié, le signal induit capté par la bobine est appelé FID (Free Induction Decay) ou encore signal de précession libre. Le signal FID représente un ensemble de sinusoides amorties en fonction du temps. La transformée permet de rendre compréhensible le signal. On obtient alors un signal en fonction de la fréquence représentant le spectre RMN final (Figure 1-11).

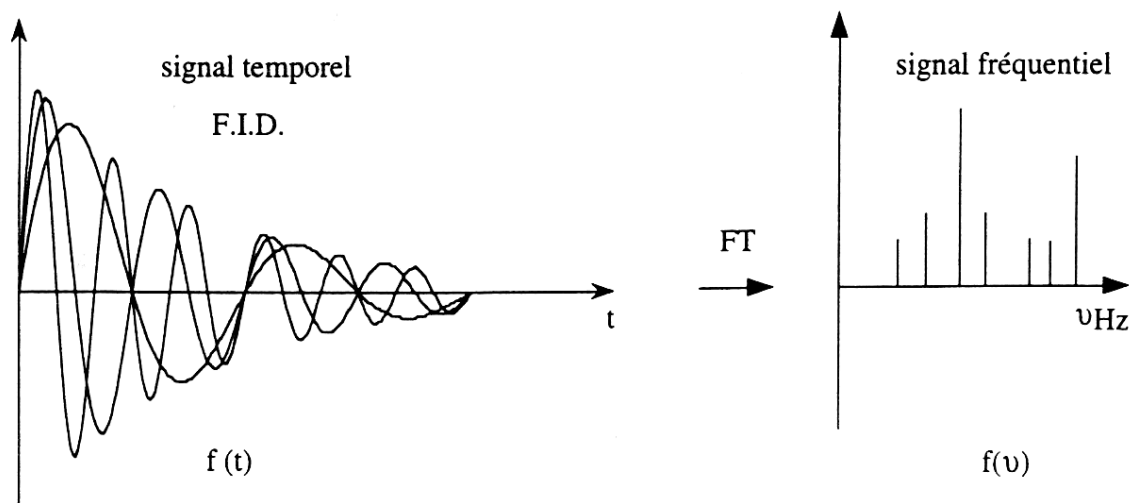


Figure 1-11 : Conversion du signal RMN FID par transformée de Fourier

Déplacements chimiques

Les noyaux sont dans un environnement qui leur constitue un écran magnétique par rapport au champ extérieur \vec{H}_0 .

Cet effet d'écran dépend de la place du noyau dans la molécule dont il fait partie, et du milieu dans lequel la molécule se situe (solution, produit pur ...)

Le champ effectif ressenti par le noyau est donc plus faible que H_0 .

$$H_{\text{eff}} = H_0 (1 - \sigma) \quad \sigma : \text{constante positive, appelée constante d'écran qui caractérise l'environnement du noyau.}$$

Les photons susceptibles d'être absorbés pour faire passer les noyaux du niveau E_1 au niveau E_2 ont donc une fréquence légèrement plus faible que ν_0 . L'écart est de quelques centaines de Hz au maximum (sur une valeur de quelques centaines de MHz). C'est cependant ce petit écart qui va permettre de caractériser l'environnement des noyaux étudiés.

Il y aura autant de fréquences absorbées $\nu_{\text{effective}} (= \nu_e)$ qu'il y a de noyaux de spin $1/2$ ayant un environnement différent.

La position des différentes raies est repérée par rapport à celle d'un noyau de même espèce (exemple : noyau = ^1H , ^{13}C , référence = $\text{Si}(\text{CH}_3)_4\text{TMS}$; noyau = ^{31}P , référence = H_3PO_4 85% (capillaire interne))

Le déplacement chimique δ_{ppm} s'exprime en partie par million : $\delta_{\text{ppm}} = 10^6 (\nu_e - \nu_{\text{ref}}) / \nu_0$

RMN haute résolution dans les solides (poudre)

Les matériaux solides présentent des spectres RMN avec des pics larges où l'ensemble des informations sur l'environnement local des noyaux est difficile à analyser.

A l'aide d'une série d'innovation, il est désormais possible de réaliser des spectres en RMN présentant des pics fins.

Les échantillons solides, placés dans un rotor, sont mis en rotation à un angle de $54,7^\circ$ par rapport au champ H_0 (Magic Angle Spinning : MAS), ce qui a pour conséquence de rétrécir la largeur des pics.

L'autre intérêt de la rotation de l'échantillon à l'angle magique est qu'elle permet en général à haute vitesse de rotation d'annuler la partie anisotrope du déplacement chimique, présente dans les échantillons solides. Seule la partie isotrope du déplacement chimique sera donc observée dans les spectres RMN MAS haute vitesse.

Cependant, si la vitesse de rotation n'est pas suffisante pour annuler l'anisotropie, des bandes de rotation apparaissent (représentées par un astérisque) de part et d'autre du pic central de déplacement chimique. Plus la vitesse de rotation sera élevée, plus les bandes de rotations seront espacées et moins elles seront nombreuses (Figure 1-12).

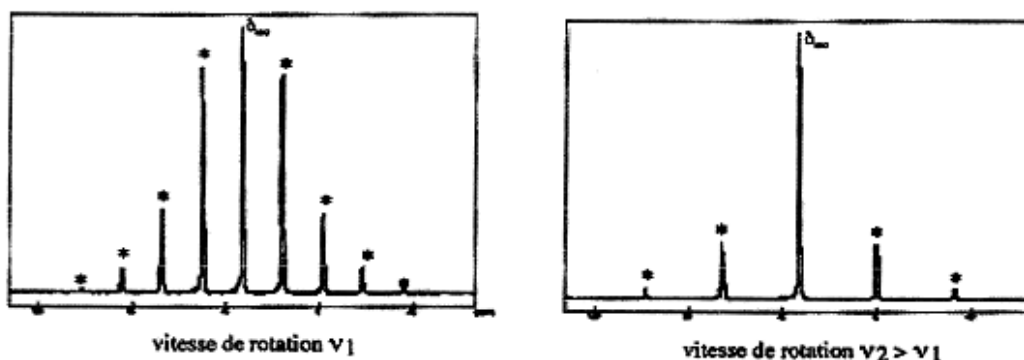


Figure 1-12 : Variation du nombre de bandes de rotation en fonction de la rotation de l'échantillon

1.6.3.2 Application à l'étude des phosphates de calcium

Depuis l'introduction de la RMN MAS, beaucoup d'attentions ont été consacrées à l'étude des biomatériaux en phosphate de calcium afin d'améliorer leur caractérisation et de corréler les données obtenues par RMN aux informations cristallographiques obtenues par DRX.

1.6.4 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Le fonctionnement du microscope électronique à balayage est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon. Il est constitué d'une enceinte sous vide secondaire (de l'ordre de 10^{-4} Pa) où un faisceau électronique est focalisé par des lentilles électromagnétiques pour exciter l'objet à étudier. Le faisceau d'électron est focalisé sur la surface de l'échantillon sous forme d'une tâche (spot), déplacée ligne par ligne de façon à balayer une surface rectangulaire.

Ces électrons qui irradient la surface de l'échantillon pénètrent profondément dans le matériau et affectent un volume appelé « poire d'interaction » qui dépend du numéro atomique moyen de l'échantillon et de l'énergie des électrons incidents. Dans ce volume d'interaction, les électrons du faisceau vont perdre leur énergie par collisions multiples avec des atomes du matériau générant ainsi de nombreux phénomènes secondaires comme les réémissions d'électrons et de photons ou encore l'absorption d'électrons. La Figure 1-13 illustre l'ensemble des radiations pouvant être émises lors de l'interaction entre le faisceau d'électrons et l'échantillon.

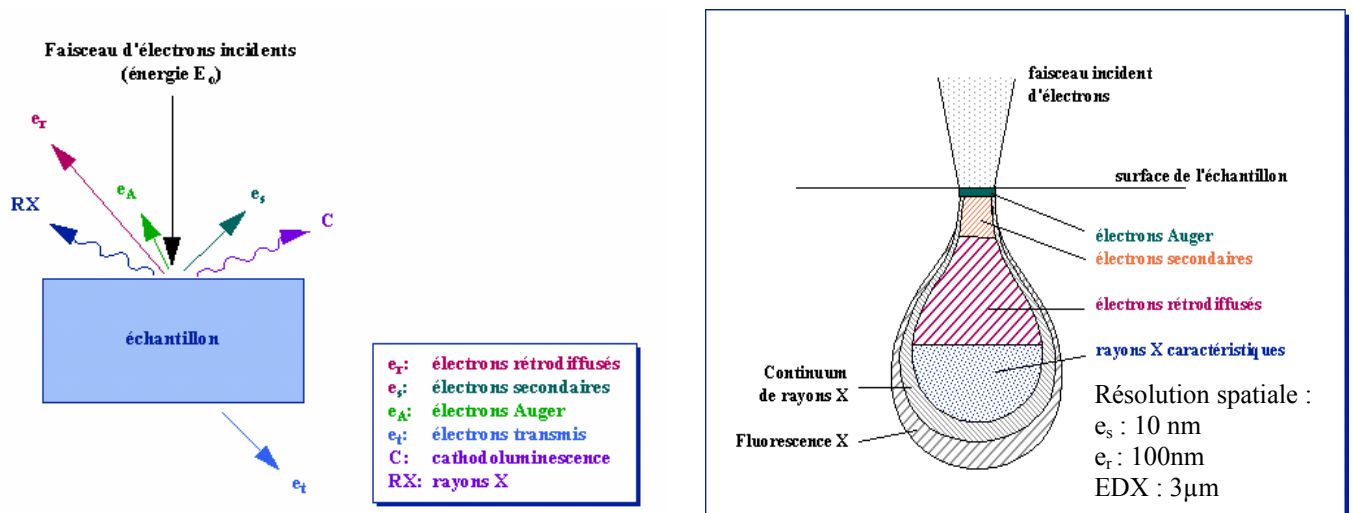


Figure 1-13 : Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon (gauche) et représentation de la poire de diffusion (droite)

Toutes ces radiations sont produites simultanément et rendent possibles à la fois l'observation et l'analyse d'un objet choisi.

Dans un microscope électronique à balayage, l'image est obtenue séquentiellement, point par point, en déplaçant le faisceau d'électrons primaires sur la surface de l'échantillon. L'image est alors reconstruite en utilisant le signal généré par les différents détecteurs pour moduler la brillance du tube cathodique (Figure 1-14).

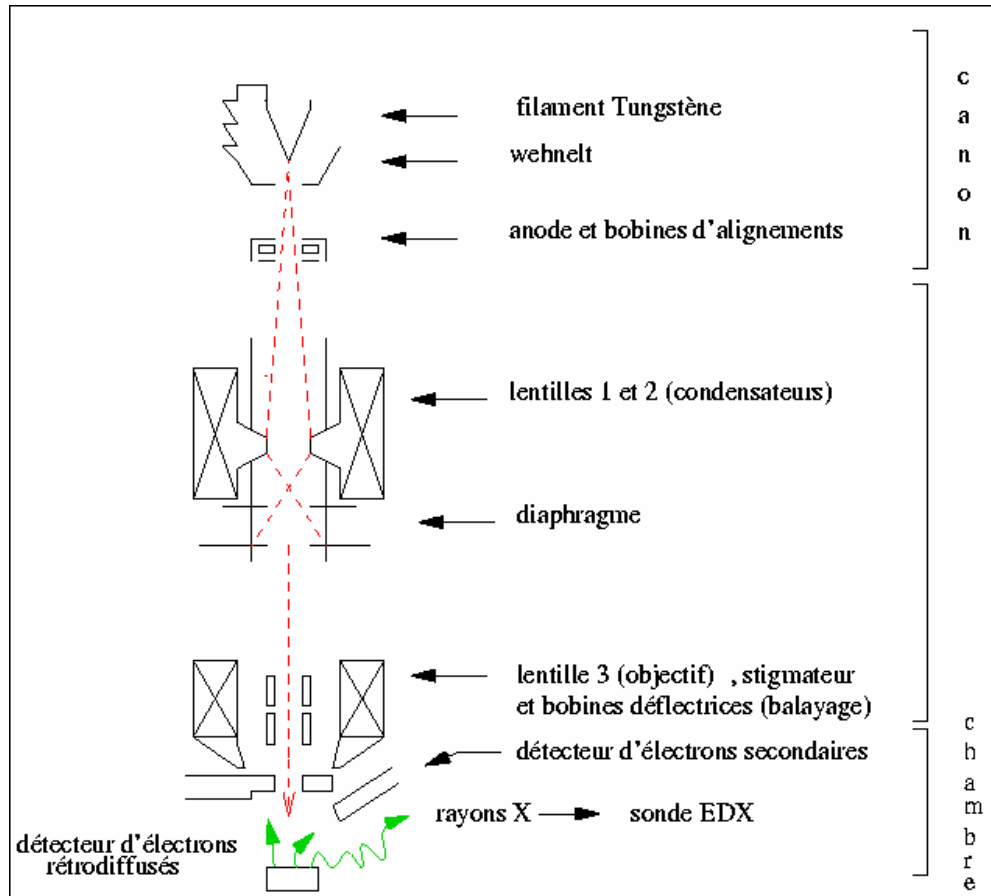


Figure 1-14 : Schéma du principe du microscope électronique à balayage

Le rapport entre le format de l'écran et celui de la zone balayée sur l'échantillon détermine le grandissement.

Spectroscopie en dispersion d'énergie des rayons X (EDXS)

Lorsqu'un électron d'énergie suffisante vient frapper un atome, il excite un électron qui est expulsé. Un électron de couche externe vient alors prendre la place vacante et un photon X caractéristique de l'élément est émis. Le spectre des rayons X émis par l'objet contient donc des pics aux énergies caractéristiques des éléments présents (La spectroscopie EDX ne permet pas la quantification d'éléments légers : $Z < 11$). Couplée à la microscopie

électronique à balayage, cette analyse permet une détection qualitative et semi quantitative des éléments présents dans l'échantillon.

Analyse d'image

L'analyse d'image est une méthode de quantification grâce à laquelle il est possible d'effectuer des mesures de granulométrie, de porosité et également de quantifier le taux de repousse osseuse après implantation d'un substitut [Boix, 2004; Gauthier, 1998; Gautier, 2000].

1.6.5 Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Le microscope électronique à transmission met en œuvre un faisceau large d'électrons traversant un échantillon très mince (inférieur à quelques centaines de nanomètres). La longueur d'onde associée au faisceau, donnée par la loi de Broglie : $\lambda = h / mv$ (h : constante de Plank, m : masse des électrons, v : vitesse des électrons), donne le pouvoir de résolution maximum accessible. L'augmentation de la tension d'accélération permet la diminution de la longueur d'onde. A 300 KeV, la résolution est de l'ordre atomique (10^{-10} m). Les électrons du faisceau peuvent interagir de deux façons avec le matériau : soit de manière inélastique, les électrons cèdent alors une partie de leur énergie, soit de manière élastique et les électrons ne perdent pas d'énergie. Ils peuvent, dans ce dernier cas, traverser la matière sans collision ou être déviés dans la direction θ selon les conditions de Bragg : $n \lambda = d_{hkl} \sin\theta$.

Les électrons du faisceau sont guidés à l'aide de lentilles magnétiques. La colonne du microscope est placée sous un vide poussé de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} Pascal. Les lentilles du système condenseur servent à éclairer l'échantillon avec un faisceau parallèle. Celles de l'objectif permettent d'obtenir de l'objet une figure et de grandir une centaine de fois la taille de l'objet observé. Elles permettent également d'obtenir de l'objet une figure de diffraction dans le plan focal et une image dans le plan image. Les lentilles de projection agrandissent encore l'image et assurent sa visualisation sur un écran fluorescent.

1.6.6 BET : surface spécifique

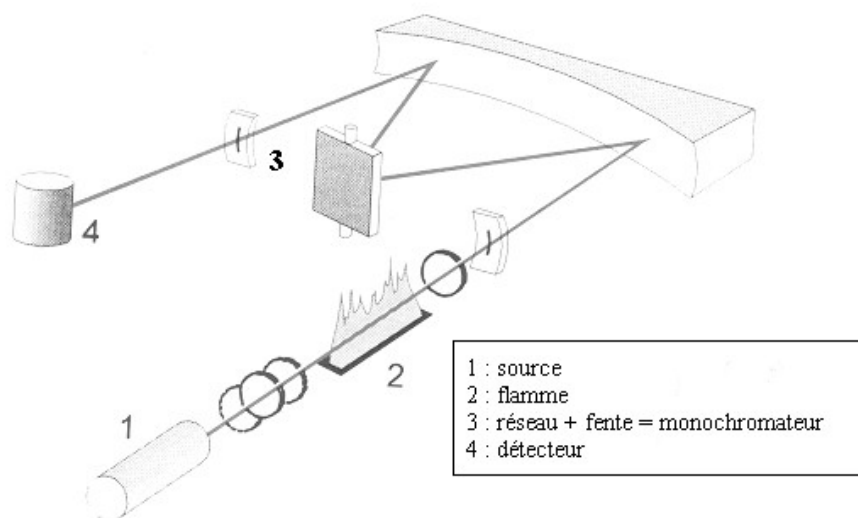
La méthode BET, du nom de ses trois inventeurs (Brunauer, Emmet et Teller) [Brunauer, 1938], permet de déterminer la surface d'adsorption en $m^2.g^{-1}$ d'une poudre. Il est

nécessaire de connaître la masse de l'échantillon, déterminée par pesée, ainsi que sa surface totale obtenue par adsorption physique d'un mélange gazeux, azote/hélium.

La surface spécifique est obtenue en divisant la surface totale par la masse de l'échantillon.

1.6.7 Spectrométrie d'absorption atomique

La solution à doser est pulvérisée dans une flamme où elle est transformée en vapeur atomique. On envoie une radiation caractéristique des atomes à doser (longueur d'onde de la raie de résonance le plus souvent), produite par la source qui est généralement une lampe à cathode creuse contenant l'élément (Figure 1-15).



Spectrophotomètre d'absorption atomique

Figure 1-15 : Spectrophotomètre d'absorption atomique

La radiation est absorbée par les atomes non excités sur le trajet de la lumière. Pour des concentrations (C) faibles, l'absorption A est donnée par la relation suivante : $A = kC$, avec k qui est une constante de proportionnalité pour une température donnée et une longueur d'onde donnée. En pratique, on compare l'absorption obtenue pour des solutions étalons et pour des solutions à doser dans les mêmes conditions.

La flamme air / acétylène est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments comme le calcium ou encore le sodium. Sa température est de 2500°C environ.

1.6.8 Pycnométrie à hélium (densité)

La pycnométrie à hélium est conçue spécifiquement pour mesurer le volume et la densité vraie des objets solides. Le fluide utilisé est un gaz pouvant pénétrer dans les moindres pores afin d'obtenir une justesse maximale. Pour cette raison, l'hélium est recommandé

pour sa faible taille qui lui permet de pénétrer dans les pores et imperfections du matériau de l'ordre de l'angström. Son comportement de gaz neutre est idéal.

Un échantillon de poids connu est inséré dans une cellule de pressurisation pour en déterminer le volume exact. Celui-ci s'obtient par l'augmentation de pression d'un volume de gaz constant d'hélium, mesuré dans la cellule successivement vide et contenant l'échantillon. Un capteur de pression envoie les mesures à une feuille de calcul qui intègre l'effet de la variation de température sur le gaz et calcule le volume de l'échantillon. Une purge d'hélium est nécessaire au début de la procédure afin de chasser l'air présent dans les pores ou entre les particules s'il s'agit d'une poudre (dégazage).

1.6.9 Normes

Des références normatives décrivent des méthodes de caractérisation physico-chimique des phosphates de calcium utilisés comme matériaux de substitution osseuse. Parmi elles, on peut distinguer :

- ~ La norme S 94-66 qui établit la procédure de quantification du rapport Ca/P dans les phosphates de calcium. Cette méthode utilise la diffraction des rayons X. Le rapport Ca/P des BCP est calculé après mesure de la hauteur des raies 2 1 0 de l'hydroxyapatite et 0 2 10 du phosphate tricalcique β [Norme S 94-66].
- ~ La norme S 94-67 qui établit les procédures d'identification de phases étrangères présentes dans les dépôts d'apatites par diffraction des rayons X : le phosphate tétracalcique, le phosphate tricalcique α , le phosphate tricalcique β , la chaux, le phosphate de calcium amorphe haute température [Norme S 94-67].
- ~ La norme S 94-68 établit les procédures de détermination de deux index de cristallinité relatifs à la phase apatitique de poudres, dépôts et céramiques massives en phosphate de calcium. Le premier, basé sur la mesure de l'intensité intégrée d'une raie de diagramme de DRX relative à l'échantillon et à un étalon interne de cristallinité, donne une indication globale sur la proportion de phase apatitique bien cristallisée dans l'échantillon. Le deuxième, basé sur la mesure des largeurs de raies de diagrammes de DRX, est lié à la dimension des domaines cristallins [Norme S 94-68].
- ~ La norme ASTM 1185-88 établit les procédures de détermination de composition d'apatite. Il est notamment spécifié que la concentration d'éléments traces tels que l'arsenic, le cadmium, le mercure le plomb ou encore les métaux lourds est limitée à quelques ppm [Norme ASTM F 1185 – 88].

Chapitre 2 : Structure et propriétés de phosphates tricalciques β dopés au sodium

2.1 Structure du β -TCP : environnement des ions PO_4^{3-} à courte distance

Dans le cadre d'études réalisées au sein du laboratoire, des phosphates de calcium d'intérêt biologique et plus particulièrement des phosphates de calcium biphasés (BCP) sont synthétisés. Ils sont ensuite caractérisés en routine par des méthodes décrites dans les normes en vigueur (la spectroscopie infrarouge pour la détection de pyrophosphates dans les β -TCP ; la diffraction des rayons X sur poudre pour la détection d'impuretés cristallines et la détermination du rapport Ca/P dans les BCP ; ou encore une analyse élémentaire pour la détection d'éléments traces).

Dans le cadre d'un travail de collaboration avec le Laboratoire de Synthèse Organique (UMR 6513 CNRS, Université de Nantes), une étude sur le greffage chimique d'agents thérapeutiques sur des phosphates de calcium biphasés a été réalisée [Josse, 2004a; Josse, 2004b]. Cette étude nécessitait une analyse par Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore ^{31}P en phase solide des BCP synthétisés par des voies différentes. Il est apparu que les spectres RMN ^{31}P étaient fortement différents selon les voies de synthèse, ces variations étant attribuées à la composante β -TCP. Cependant, en spectroscopie infrarouge ou en diffraction des rayons X, aucune différence notable n'a pu être mise en évidence.

L'objectif de ce chapitre a donc été d'expliquer comment des composés présentant un même diffractogramme en DRX sur poudre pouvaient donner lieu à des spectres RMN ^{31}P d'allure très différente. Des β -TCP ont donc été synthétisés par des méthodes de synthèse variées. Les β -TCP obtenus ont ensuite été caractérisés par les méthodes décrites par les normes (Spectroscopie Infrarouge et Diffraction des Rayons X) et par RMN du solide ^{31}P .

2.1.1 Matériels et méthodes

2.1.1.1 Synthèse des β -TCP

4 β -TCP ont été obtenus par des voies de synthèse différentes.

TCPNH₄OH

Ce β -TCP a été synthétisé par **hydrolyse en milieu basique** de Phosphate DiCalcique Dihydraté (DCPD ; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

500mL d'une solution de NH_4OH (Sigma) à $0,12 \text{ mol.L}^{-1}$ ont été ajoutés à 40g de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La réaction a été réalisée à une température de 90°C pendant 4 heures

sous agitation dans un réacteur sous pression autogène (Figure 2-1). La suspension obtenue a été filtrée puis rincée avec 1,5 L d'eau déminéralisée. La CDA obtenue a ensuite été séchée à 37°C pendant 48 heures, puis calcinée 4 heures à 1000°C.



Figure 2-1: Photos du réacteur utilisé pour les synthèses sous pression autogène

TCPNaOH

Ce β -TCP a été synthétisé par **hydrolyse alcaline** de Phosphate dicalcique dihydraté (DCPD ; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

500mL d'une solution de **NaOH** à $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ ont été ajoutés à 90g de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La réaction a été réalisée à 90°C pendant 4 heures sous agitation dans un réacteur sous pression autogène (réacteur : figure). La suspension obtenue a été filtrée puis rincée avec 1,5 L d'eau déminéralisée. La CDA obtenue a ensuite été séchée à 37°C pendant 48 heures, puis calcinée 4 heures à 1000°C.

TCPprécip [Akao, 1984 ; Prieto Valdes, 1997]

Ce β -TCP a été synthétisé par **double décomposition** de précurseurs de phosphates et de calcium.

500 mL d'une solution de H_3PO_4 à $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ sont ajoutés lentement (une goutte par seconde) à 500 mL d'une suspension de Ca(OH)_2 à $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ pour donner un gel. Le mélange obtenu est ensuite agité fortement pendant 2 heures. Le gel obtenu est filtré puis séché à 37°C pendant 24 heures. La CDA obtenue est calcinée 4 heures à 1000°C .

TCPsolid [Lazoryak, 1996c]

Le TCPsolid est obtenu par **mélange solide / solide**.

27,323 g de **DCPA** (CaHPO_4) et 10,008 g de **CaCO₃** (tel que $\text{Ca/P} = 1,5$) ont été broyés dans un mortier en agate durant 30 min, puis calcinés 24 heures à 1000°C .

Le composé **Ca₁₀Na(PO₄)₇** a également été synthétisé [Lazoryak, 1996c].

Il a été obtenu par **mélange solide / solide**

31,876 g de **DCPA**, 10,008 g de **CaCO₃** ainsi que 1,767 g de **Na₂CO₃** ont été broyés dans un mortier en agate durant 30 minutes, puis calcinés à 1000°C pendant 24 heures.

Afin de déterminer les effets de la durée de calcination sur la structure du β -TCP, les CDA donnant les TCPNaOH et TCPNH₄OH ont été également calcinées pendant 5 jours.

2.1.1.2 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Afin d'étudier la morphologie des β -TCP synthétisés, une analyse en microscopie électronique à balayage a été effectuée. Les échantillons ont été rendus conducteurs par le dépôt d'une couche mince d'or-palladium réalisée par évaporation sous vide.

Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope LEO 1450 VP (Zeiss, Allemagne) avec une tension de 15 kV.

Une analyse élémentaire semi-quantitative des β -TCP synthétisés a également été réalisée par spectroscopie en dispersion d'énergie des rayons X couplée à un microscope électronique à balayage.

2.1.1.3 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Pour analyser les phosphates de calcium, des pastilles composées de 1 mg de poudre d'échantillon et de 300 mg de KBr anhydre ont été réalisées.

Les spectres ont été enregistrés à partir de 128 balayages (acquisitions) sur un domaine spectral allant de 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} à l'aide d'un spectromètre

MAGNA IR 550 série II, Nicolet. Les contributions de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone ont été minimisées d'une part à l'aide d'un système de purge à sec, et d'autre part à l'aide du logiciel utilisé.

2.1.1.4 Densité (pycnométrie à hélium)

La densité des β -TCP a été déterminée à l'aide d'un pycnomètre à hélium (AccuPyc 1330, Micromeritics).

2.1.1.5 Spectrométrie d'absorption atomique

La quantité de sodium présente dans les β -TCP synthétisés a été déterminée par spectrométrie d'absorption atomique.

Toutes les solutions (gamme étalon + échantillon) ont été préparées à partir d'une solution de KCl (Merck) à 0,2%.

Une gamme étalon est réalisée avec des concentrations comprises entre 0,05 ppm et 2 ppm de sodium à partir de NaCl (Fischer Scientific).

100 mg d'échantillon ont été dissous dans 2 mL d'HCl à 10%. Le tout a ensuite été dilué afin d'obtenir des concentrations comprises entre 0,05 ppm et 2 ppm de sodium. L'analyse a été réalisée à 589 nm, sous une flamme d'air / acétylène avec une lampe sodium, à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam 989.

2.1.1.6 Diffraction des Rayons X (DRX)

Pour nos analyses, un diffractomètre Philips PW 1730 avec une anticathode en cuivre ($\lambda = 1,540598 \text{ \AA}$), alimenté par une tension de 40 kV et une intensité de 30 mA a été utilisé. Le diffractomètre de rayons X utilisé est composé d'un générateur PW1830, un goniomètre PW1050 et un détecteur PW1711. Le tube à rayons X en cuivre est filtré par le nickel, afin d'absorber la raie $K\beta$ du cuivre. Il s'agit d'un montage Bragg-Brentano θ - 2θ .

Les diffractogrammes ont été acquis avec un angle d'incidence 2θ compris entre 10 et 100° , un pas de $0,03^\circ$ et un temps par pas de 2,3 secondes.

Affinements par la méthode de Rietveld

Les affinements par la méthode de Rietveld des β -TCP ont été effectués à l'aide du logiciel Winplotr pour l'interface graphique et le logiciel Fullprof pour les affinements de type Rietveld [Rodriguez-Carvajal, 1990; Rodriguez-Carvajal, 1998].

Lors de ces affinements, la loi de Caglioti a été utilisée pour décrire la dépendance angulaire de la largeur de raie :

$$H = U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W$$

A/ Un affinement de type Le Bail a tout d'abord été effectué. Il s'agit d'effectuer un affinement sans contrainte sur les intensités. Il peut servir aussi à affiner les paramètres de maille.

Les paramètres suivants ont été affinés : sycos (correction liée au positionnement de l'échantillon), les paramètres de maille (position des pics), les paramètres U, V, W et η (définit la forme du pic entre les contributions gaussiennes ($\eta = 0$) et lorentzienne ($\eta = 1$)), ainsi qu'une éventuelle asymétrie.

B/ Un affinement par la méthode de Rietveld est ensuite effectué : la position des atomes dans la maille est affinée.

Les paramètres affinés sont le facteur d'échelle (facteur expérimental tenant compte de la puissance du générateur, de la sensibilité du détecteur, du temps d'acquisition...) ainsi que les positions atomiques.

Les paramètres sont ensuite tous affinés (Sycos, paramètres de maille, W, V, η , V, asymétrie, facteur d'échelle et les positions atomiques) jusqu'à convergence du programme.

La validité de la qualité d'un affinement peut être effectuée par les mesures de résidu (facteur de reliabilité R) comme le facteur de profil R_{wp} ou encore le « R de Bragg » (R_B) qui permet de s'assurer de l'accord entre les données expérimentales et le modèle structural utilisé.

Calcul de valence

La valence (V) d'un atome est calculée à l'aide d'une formule empirique :

$$V = \sum_i \exp\left(\frac{R_0 - d}{B}\right) = \exp\left(\frac{R_0}{B}\right) \sum_i \frac{-d}{B}$$

Avec

R_0 et B , des paramètres empiriques déterminés pour chaque atome et tabulés [Brown, 1985]

d , les distances interatomiques dans la sphère de coordination

i , somme de toutes les liaisons dans la sphère de coordination du cation

Un calcul de valence a été réalisé à l'aide du logiciel VaList qui permet de calculer la valence d'un atome à l'aide des distances interatomiques calculées à partir des positions atomiques déterminées lors de l'affinement par la méthode de Rietveld.

Recherche de phase amorphe

Lors de l'affinement par la méthode de Rietveld d'un mélange, la connaissance du facteur d'échelle permet de remonter au pourcentage des phases cristallisées. Ainsi dans le cas de la présence d'une phase amorphe, il suffit d'ajouter une phase cristallisée supplémentaire en quantité connue afin de recalculer les pourcentages de toutes les phases cristallisées et de remonter à la quantité d'amorphe [Orlhac, 2000].

Le pourcentage de phase amorphe dans les échantillons synthétisés a ainsi été déterminé en mélangeant une quantité connue de TiO_2 anatase (Merck) (environ 10 % en masse) au β -TCP.

2.1.1.7 Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P)

Les spectres RMN ^{31}P (121,5 MHz) en simple impulsion ont été enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectromètre DSX 300 Brüker au Centre de Recherche sur les Matériaux à Hautes Températures (UPR CNRS 4212, Orléans). Les spectres sont obtenus dans des conditions de rotation à l'angle magique (MAS - Magic Angle Spinning - rotation du rotor selon un axe faisant un angle de $54^\circ 44'$ avec le champ principal B_0) à haute vitesse de rotation (12 kHz) permettant de moyenniser l'anisotropie de déplacement chimique.

2.1.2 Résultats / discussion

2.1.2.1 Synthèses

4 β -TCP ont été obtenus par des voies de synthèse différentes (cf paragraphe 2.1.1.1.) :

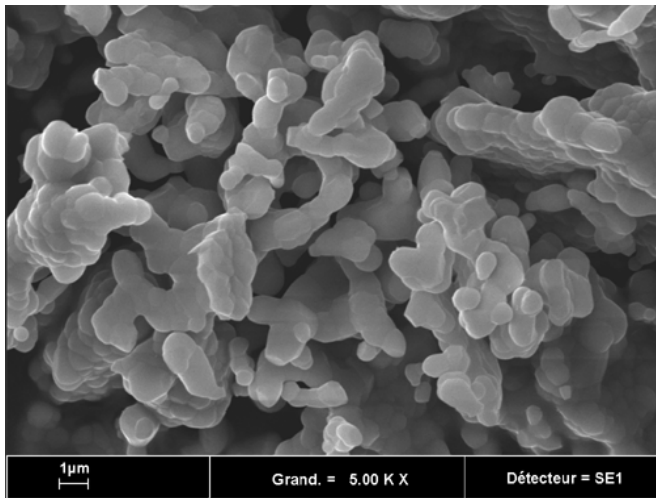
- Le mélange solide/solide et la double décomposition/précipitation qui sont les deux modes de synthèse de référence les plus étudiés dans la littérature, pour l'obtention du β -TCP par voie sèche et voie humide.
- L'hydrolyse en milieu basique d'un phosphate de calcium acide, le DCPD ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Il existe quelques travaux dans la littérature mais c'est une réaction peu étudiée. Deux bases différentes ont été choisies afin de connaître l'influence du contre-cation associé :
 - NH_4OH , dont le cation NH_4^+ semble avoir une taille trop importante (1,45 Å) pour s'intégrer au sein de la maille apatitique [Elliott, 1994].
 - NaOH , dont le cation Na^+ a un rayon ionique (0,99 Å) proche de celui de Ca^{2+} (1 Å), qui pourrait potentiellement s'intégrer au sein de l'apatite, et peut être au sein du β -TCP après calcination de la CDA.

Le β -TCP ne pouvant pas être obtenu à température ambiante, un traitement thermique doit être appliqué. Il diffère en fonction des synthèses réalisées :

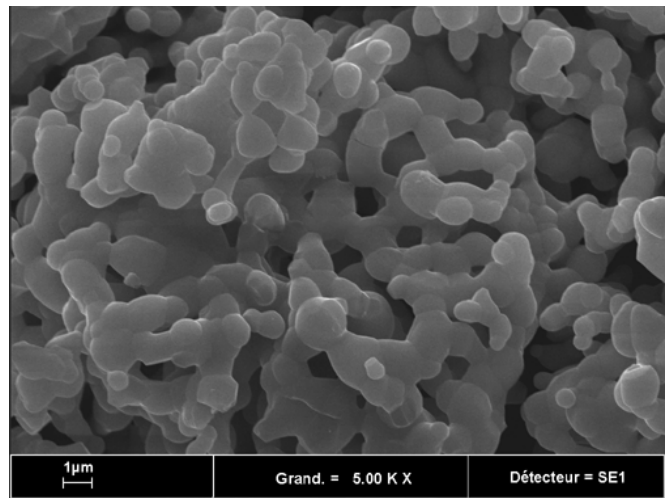
- ~ 24 heures pour la synthèse par voie sèche
- ~ 4 heures pour les synthèses par voie humide (hydrolyses en milieu basique et réaction de précipitation).

2.1.2.2 Observation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

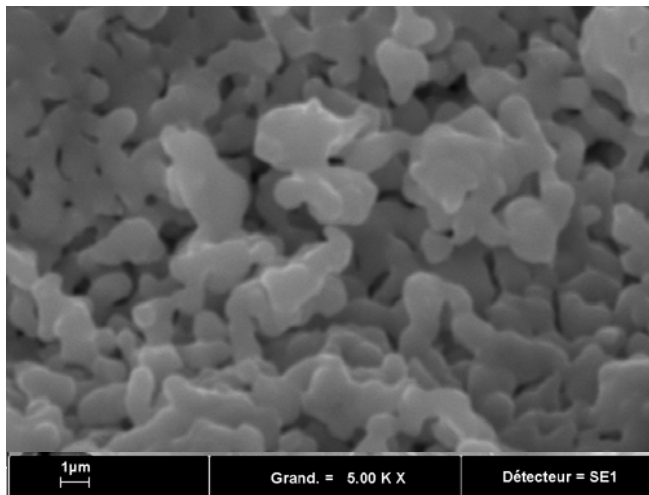
Le traitement thermique étant différent pour les synthèses effectuées, la taille des grains de β -TCP obtenus est donc différente. L'observation des β -TCP en Microscopie Electronique à Balayage après calcination (Figure 2-2) montre que le β -TCP qui a subi le plus long traitement thermique (TCPSolid) présente logiquement des grains plus gros que les autres [Jarcho, 1976].



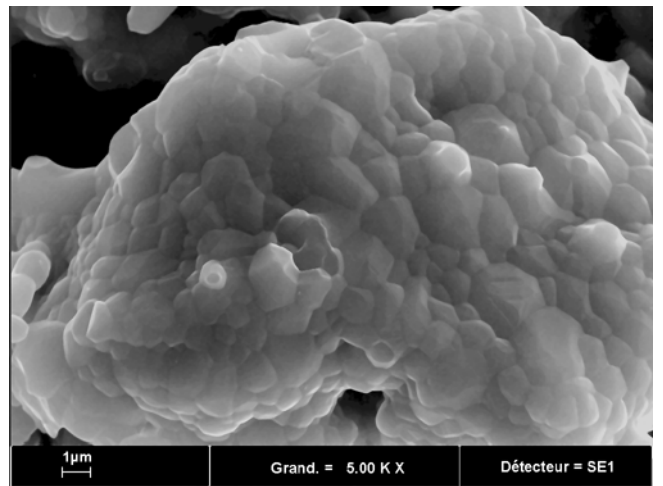
TCPNH₄OH



TCPNaOH



TCPPrecip



TCPSolid

Figure 2-2 : Morphologie des grains de β -TCP observés par MEB

2.1.2.3 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

En spectroscopie d'absorption infrarouge, aucune impureté n'a pu être détectée :

- ~ Pas de bande entre 1400 et 1600 cm^{-1} ni entre 860 et 880 cm^{-1} . Il n'y a donc pas de carbonates.
- ~ Pas de bande d'absorption à 720 cm^{-1} . Il n'y a donc pas présence de pyrophosphates.

~ Pas de bande à 3573 cm^{-1} attribuable aux OH apatitiques : aucun β -TCP synthétisé ne contient d'hydroxyapatite.

Les spectres d'absorption infrarouge des TCPNaOH et TCPNH₄OH sont différents lorsque le temps de calcination varie (4 heures ou 5 jours) (Figure 2-3).

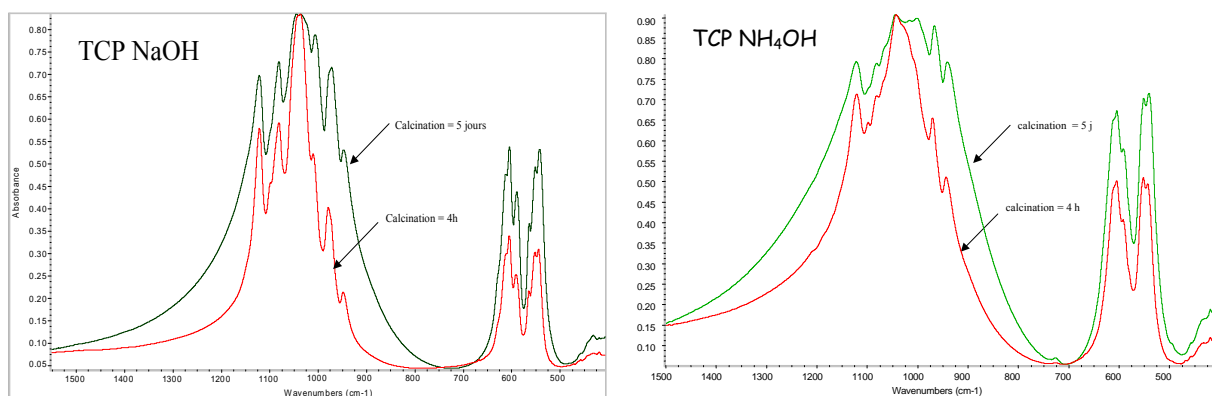


Figure 2-3: Effet de la durée de calcination (4 heures et 5 jours) sur les spectres Infrarouge des TCP NaOH et NH₄OH

Les largeurs de bandes des β -TCP qui ont subi un traitement thermique plus long sont plus élevées. Cependant, leur analyse en diffraction des rayons X ou encore en RMN ³¹P ne montre aucune différence lorsque la durée de calcination varie. Les différences de largeur de bandes observées en infrarouge sont ainsi probablement liées à la taille des grains : en effet, celle-ci augmente avec la durée de calcination.

La Figure 2-4 représente le spectre d'absorption infrarouge des β -TCP synthétisés, dans la zone spectrale allant de 1350 à 500 cm^{-1} .

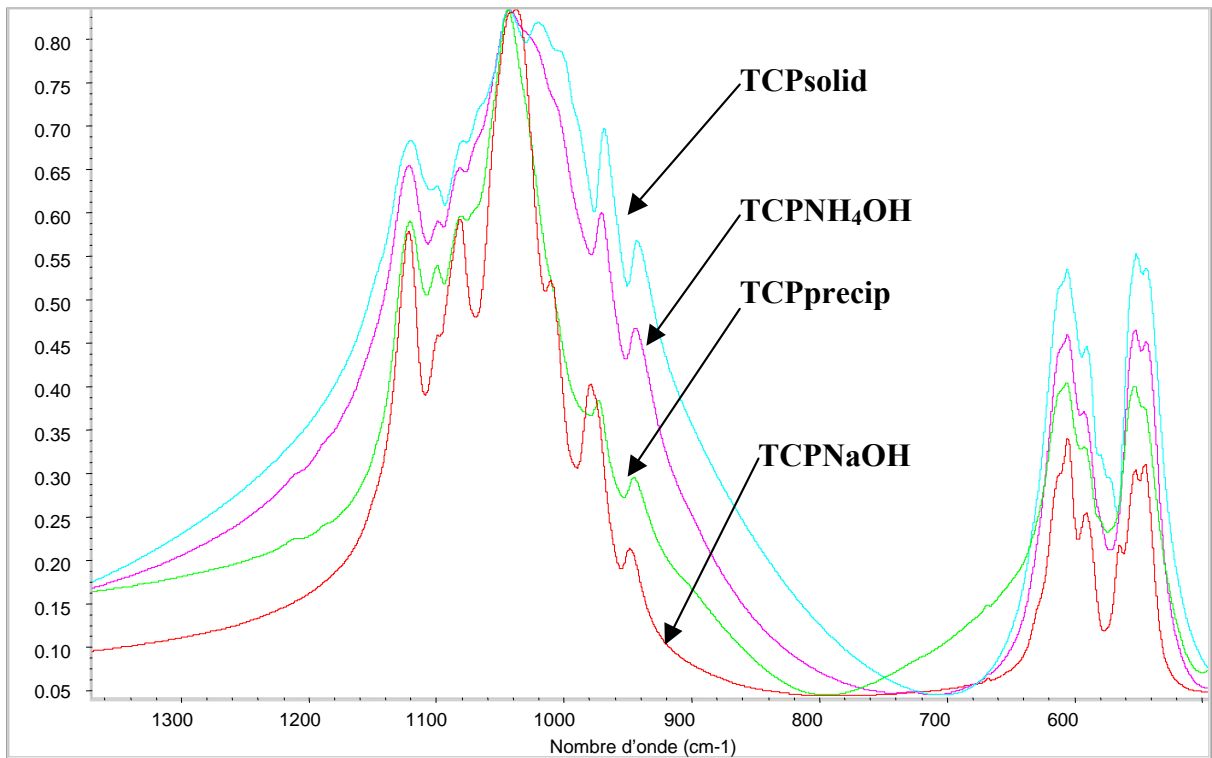


Figure 2-4 : Spectres infrarouge des TCP synthétisés

Dans cette zone, les différents modes de vibration observables sont :

- ~ ν_1 PO_4 (930 et 990 cm^{-1}) : élongation symétrique
- ~ ν_3 PO_4 (975 et 1150 cm^{-1}) : élongation antisymétrique
- ~ ν_4 PO_4 (510 et 670 cm^{-1}) : déformation antisymétrique

Les β -TCP présentent des spectres d'absorption infrarouge différents. Le spectre TCPSolid présente des largeurs de bandes plus importantes que celles des autres β -TCP synthétisés. Ceci est probablement lié à la taille des grains qui est plus grande dans le cas du TCPSolid que dans les autres β -TCP (cf paragraphe 2.1.2.2).

Des différences sont également observables entre les autres β -TCP (déplacement de certaines bandes dans les massifs ν_1 , ν_3 et ν_4 PO_4). L'environnement proche des ions PO_4^{3-} est donc différent entre ces β -TCP. Néanmoins, il est difficile de savoir exactement quelles vibrations subissent ces déplacements. En effet, au sein des cristaux de β -TCP la symétrie des groupes PO_4 dans le cristal conduit à un grand nombre de bandes théoriques attendues dans les deux massifs ν_3 PO_4 et ν_4 PO_4 .

2.1.2.4 Densité

Les densités ne diffèrent pas de façon significative d'un β -TCP à un autre (Tableau 2-1).

TCP	Densité (sans unité)
TCP NaOH	$3,115 \pm 0,004$
TCP NH₄OH	$3,063 \pm 0,005$
TCP Précip	$3,084 \pm 0,002$
TCP Solid	$3,090 \pm 0,004$

Tableau 2-1 : Densité des β -TCP synthétisés

2.1.2.5 Analyse élémentaire

Une étude semi-quantitative des éléments présents dans les β -TCP synthétisés a été réalisée Spectroscopie de Dispersion d'Énergie des Rayons X couplée à la Microscopie Electronique à Balayage (Figure 2-5).

Cette analyse montre, que de manière générale, il n'y avait aucun élément étranger présent dans les β -TCP dans les limites de la détection de la méthode ($\sim 0,1$ % en masse). Cependant, du sodium a été décelé dans certains β -TCP.

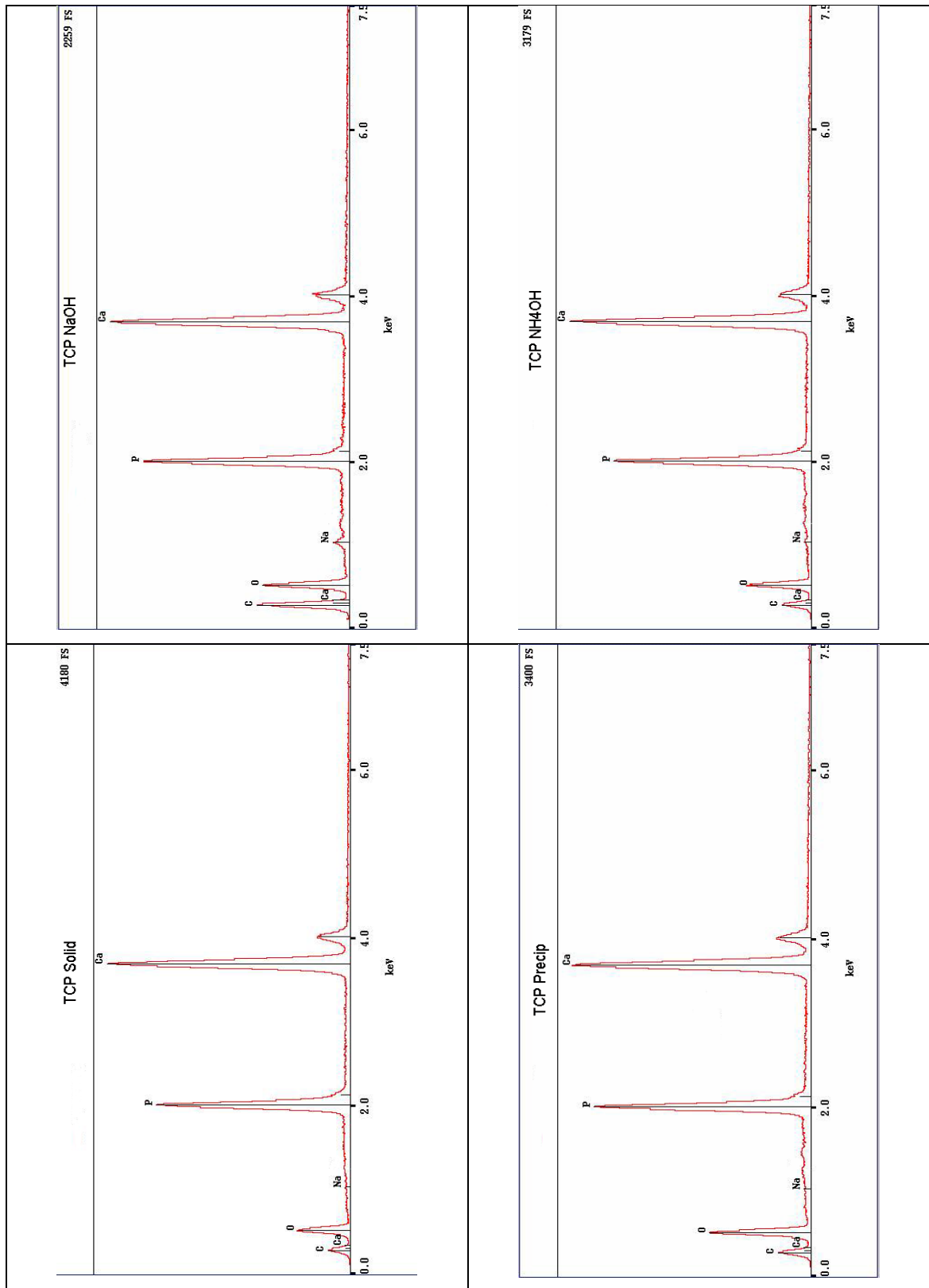


Figure 2-5 : Analyse par EDX des β -TCP synthétisés (MEB)

Afin de doser avec plus de précision la quantité de sodium présent dans les β -TCP, un dosage a été réalisé par spectrométrie d'absorption atomique. Cette analyse montre que le

TCPNaOH est la phase synthétisée qui contient le plus de sodium (Tableau 2-2). Ce dernier provient de la base utilisée pour l'hydrolyse du DCPD : la soude. L'analyse indique que le TCPNH₄OH contient également du sodium (0,45%). Afin de vérifier d'où provenait ce sodium, un dosage sur le DCPD, produit de départ, a été réalisé. Ce DCPD contient la même quantité de sodium que celle retrouvée dans le TCPNH₄OH. Les deux autres β -TCP (TCPsolid et TCPprecip) ne contiennent pas de sodium.

échantillon	% Na (en masse)
DCPD : CaHPO₄, 2 H₂O	0,45 ± 0,01
TCP NaOH	1,44 ± 0,02
TCP NH₄OH	0,44 ± 0,01
TCPPrecip	0,000 ± 0,001
TCPSolid	0,000 ± 0,001

Tableau 2-2 : Dosage de sodium dans les β -TCP et DCPD

2.1.2.6 Diffraction des Rayons X (DRX)

En diffraction des rayons X, l'utilisation de l'affinement par la méthode de Rietveld pour l'analyse de phosphates de calcium est récente dans le domaine des biomatériaux.

Cette méthode présente les avantages d'exploiter le profil total du diffractogramme et non les intensités individuelles des pics de Bragg (qui est une méthode vite limitée par la superposition des réflexions). La méthode Rietveld permet ainsi d'affiner la structure du composé et de déterminer avec précision les paramètres de maille, les pourcentages de phases cristallines ainsi que les taux de remplissage des différents sites.

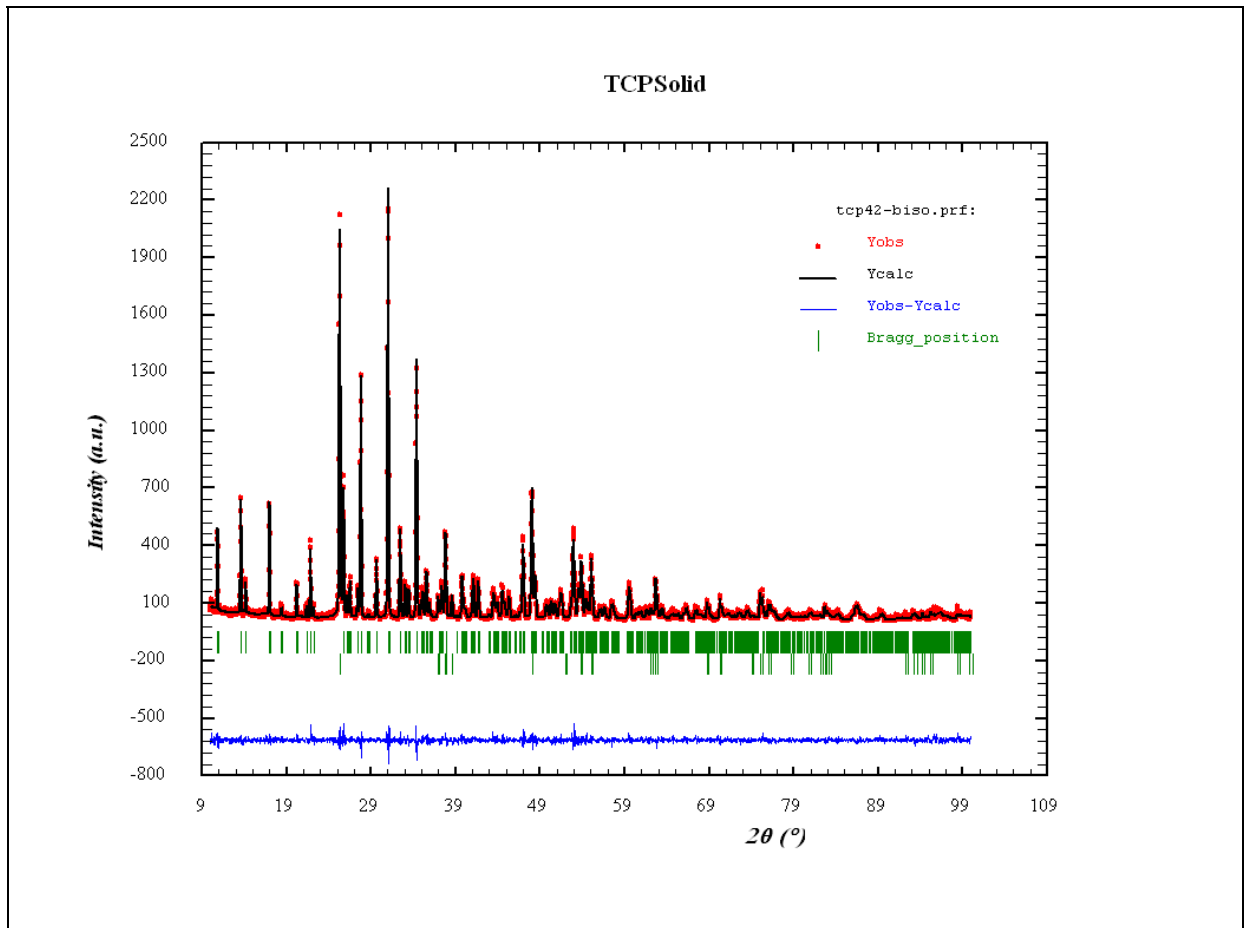


Figure 2-6 : Affinement par la méthode de Rietveld du TCPSolid avec ajout de TiO_2 pour déterminer le taux d'amorphe

L'étude de la quantification d'amorphe par DRX (Figure 2-6) a montré qu'aucun des β -TCP synthétisé n'en contenait.

Les analyses effectuées en Diffraction des Rayons X montrent qu'il n'y a pas d'impureté cristalline de synthèse pour les β -TCP obtenus. La comparaison sommaire des différents diffractogrammes ne révèle aucune différence notable entre les β -TCP.

En revanche, une variation des paramètres de maille est détectable après affinement par la méthode de Rietveld en particulier pour le paramètre c (Tableau 2-3).

	TCP NaOH	TCP NH ₄ OH	TCP Précip	TCP Solid
Paramètre a = b (Å)	10,4165(3)	10,4150(1)	10,4218(2)	10,4264(5)
Paramètre c (Å)	37,292(3)	37,3884(5)	37,3825(6)	37,428(2)
Σ cor	1,29	1,41	1,27	1,30
RB %	2,05	1,92	3,41	3,59
Rwp %	7,14	8,04	11,22	17,1

Tableau 2-3 : Paramètres de maille des β -TCP synthétisés (les chiffres entre parenthèses correspondent à l'écart type)

2.1.2.7 Résonance Magnétique Nucléaire du ³¹P (RMN ³¹P)

Les spectres RMN ³¹P des β -TCP synthétisés sont représentés dans la Figure 2-7.

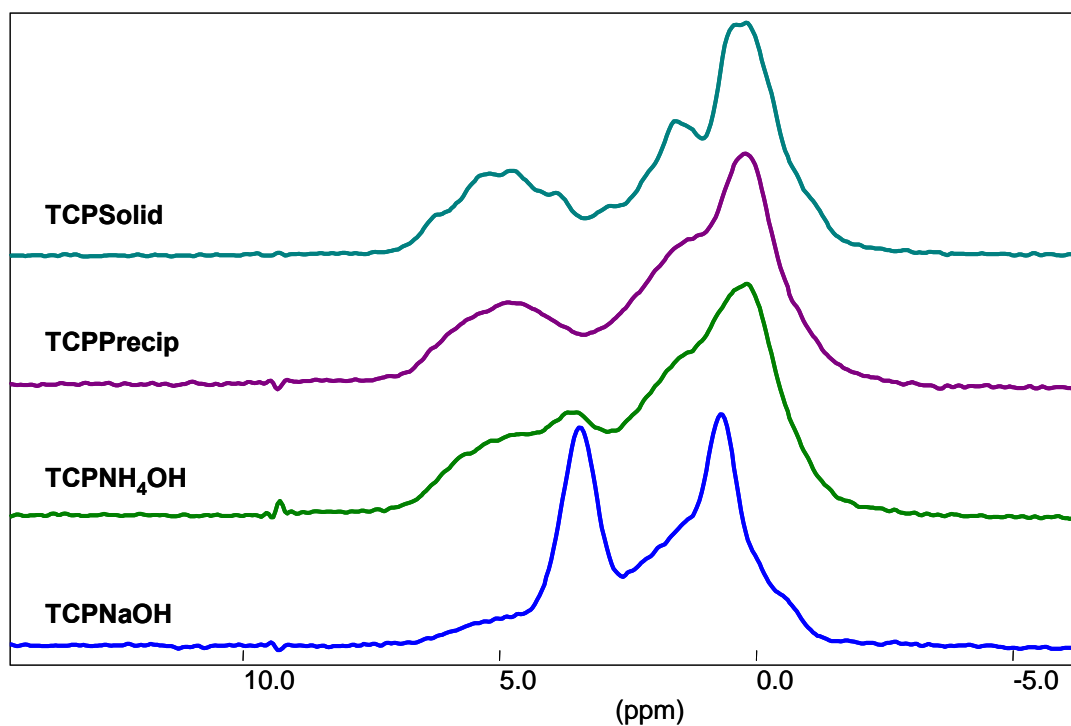


Figure 2-7 : Spectres RMN ³¹P des β -TCP synthétisés

La RMN ³¹P mettant en évidence l'environnement proche des ions PO₄³⁻, les différences observées sur les spectres sont dues à une modification de l'environnement de ces ions.

La seule différence observée pour les β -TCP considérés est la teneur en sodium. De plus, le β -TCP contenant le plus de sodium (TCPNaOH) présente un spectre de RMN ^{31}P fortement différent des autres. Le sodium (0,99 Å) ayant un rayon ionique proche de celui du calcium (1 Å), il pourrait se substituer partiellement au calcium dans la maille du β -TCP et modifier l'environnement des ions PO_4^{3-} . Dans ce cas, les spectres RMN ^{31}P et d'absorption infrarouge seront différents, tandis que les diffractogrammes ne devraient pas montrer de grandes différences, la structure cristallographique du β -TCP étant conservée.

Une description approfondie de la structure du β -TCP et des environnements des ions PO_4^{3-} semble donc nécessaire afin de vérifier si un ion monovalent tel que le sodium peut s'incorporer au sein de la maille du β -TCP et le cas échéant d'examiner quelle est son influence sur l'environnement des ions PO_4^{3-} .

2.1.2.8 Structure du β -TCP

La structure cristallographique du β -TCP est décrite depuis 1974 par Dickens, Schroeder, et Brown [Dickens, 1974] (Chapitre 1.3.1.).

Il y a trois sites de phosphore (P(1)/P(2)/P(3)) différents d'un point de vue cristallographique dans un rapport de multiplicité 1/3/3.

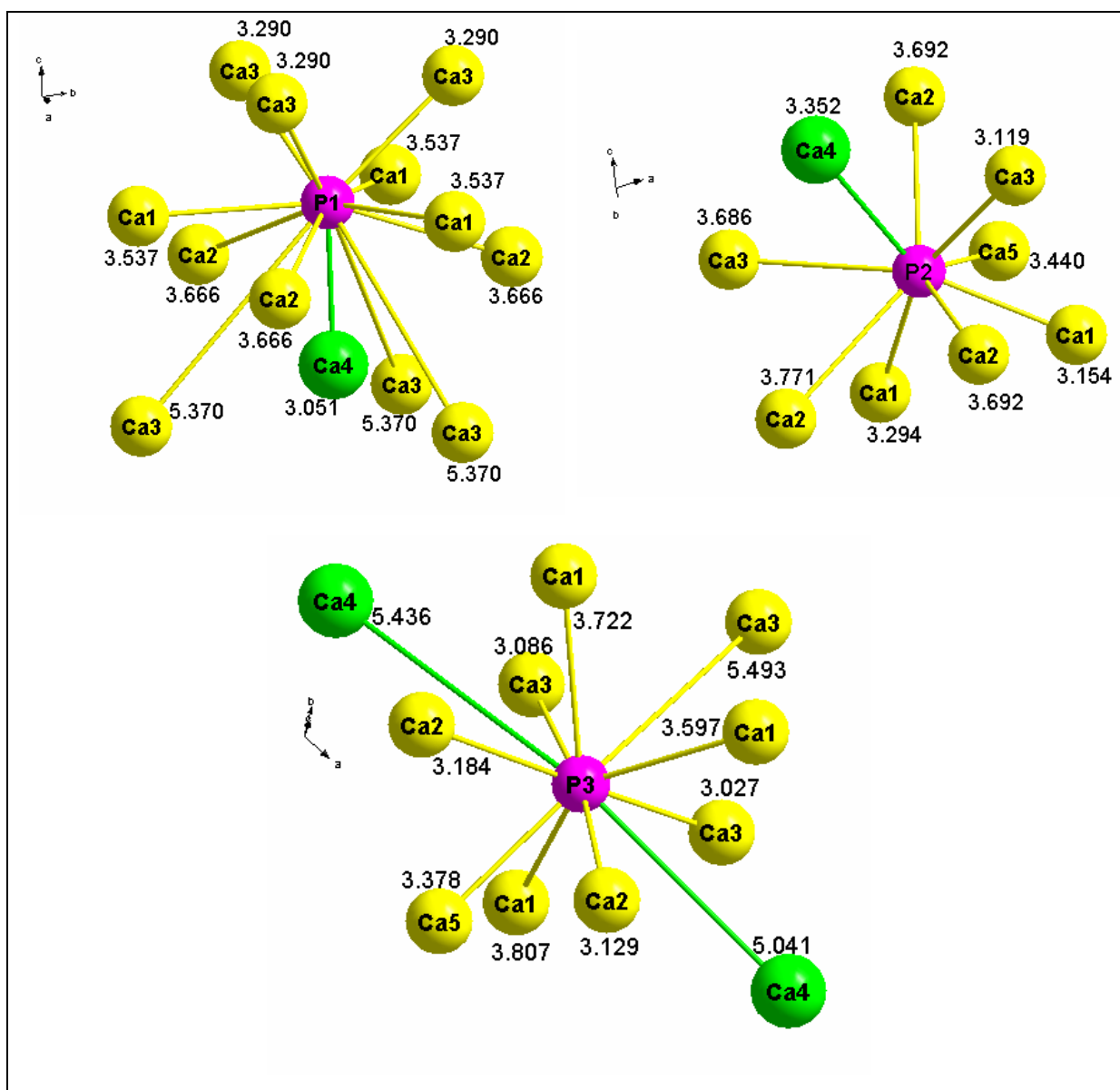
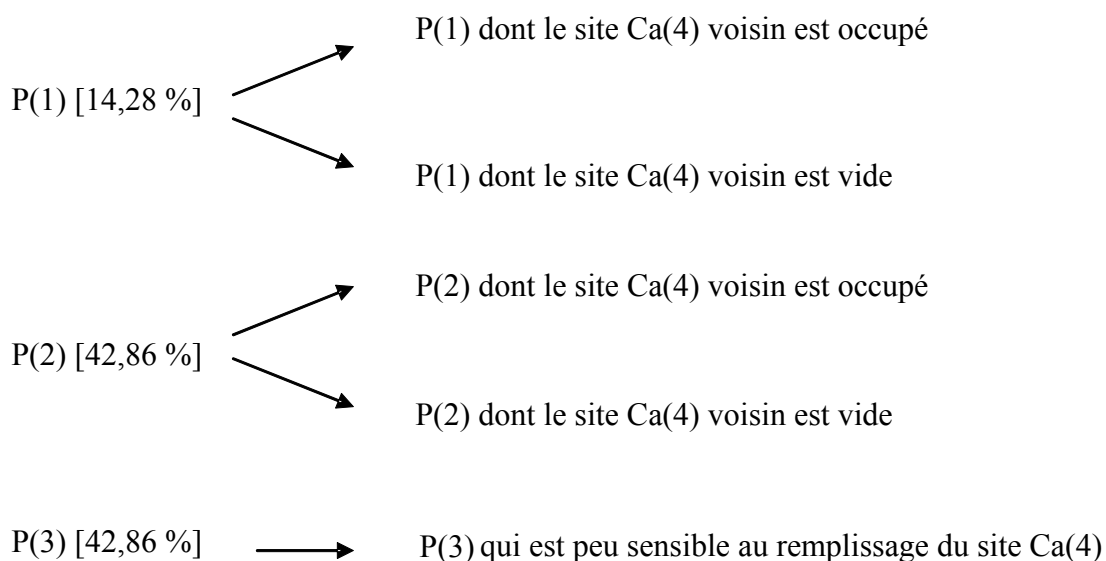


Figure 2-8 : Environnement des ions PO_4^{3-} dans la structure du β -TCP

Seuls les sites P(1) et P(2) ont un site Ca(4) dans leur proche voisinage alors que le site Ca(4) le plus proche de P(3) est situé à plus de 5 Å (Figure 2-8). Or d'après la structure du β -TCP, le site Ca(4) n'est rempli qu'à 50%. Ceci implique qu'il faut en réalité distinguer, pour les sites P(1) et P(2) les sites Ca(4) vides des sites Ca(4) occupés par un atome de calcium.

Il y a donc en première approximation cinq environnements d'ions phosphore différents :



Les proportions théoriques seraient respectivement : P(1) [7,14% / 7,14%], P(2) [21,43% / 21,43%] et P(3) [42,86 %] dans le cas où Ca(4) est rempli à 50%.

On s'attend donc à obtenir 5 bandes pour un β -TCP pur [Jakeman, 1989] en RMN ^{31}P (Figure 2-9). Ce spectre a été réalisé à partir d'un β -TCP pur. Le déplacement chimique de chaque bande a été déterminé arbitrairement de façon à optimiser la simulation du spectre expérimental.

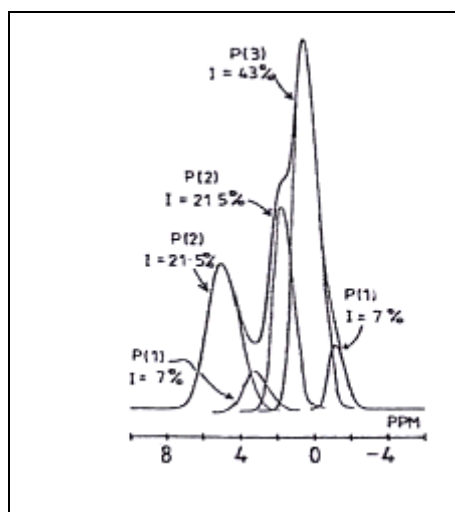


Figure 2-9 : Spectre RMN ^{31}P d'un β -TCP pur avec l'attribution des pics ainsi que leur intensité [Jakeman, 1989]

Le calcium localisé au sein du site Ca(4) peut être totalement substitué par un ion monovalent de rayon ionique voisin (1 Å) tel que le sodium (0,99 Å) : un ion Ca^{2+} avec

une lacune sont remplacés par deux ions Na^+ . Dans ce cas, le composé formé est $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ qui contient 2,11% en masse de sodium. Au sein de ce composé, il n'y a donc plus que trois environnements d'ions PO_4^{3-} différents, P(1), P(2) et P(3), dans un rapport 1/3/3. Ce composé devrait donc donner trois bandes en RMN ^{31}P du solide.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons synthétisé ce composé par mélange solide - solide (cf paragraphe XXX). Le spectre RMN ^{31}P est bien majoritairement composé de trois bandes (Figure 2-10).

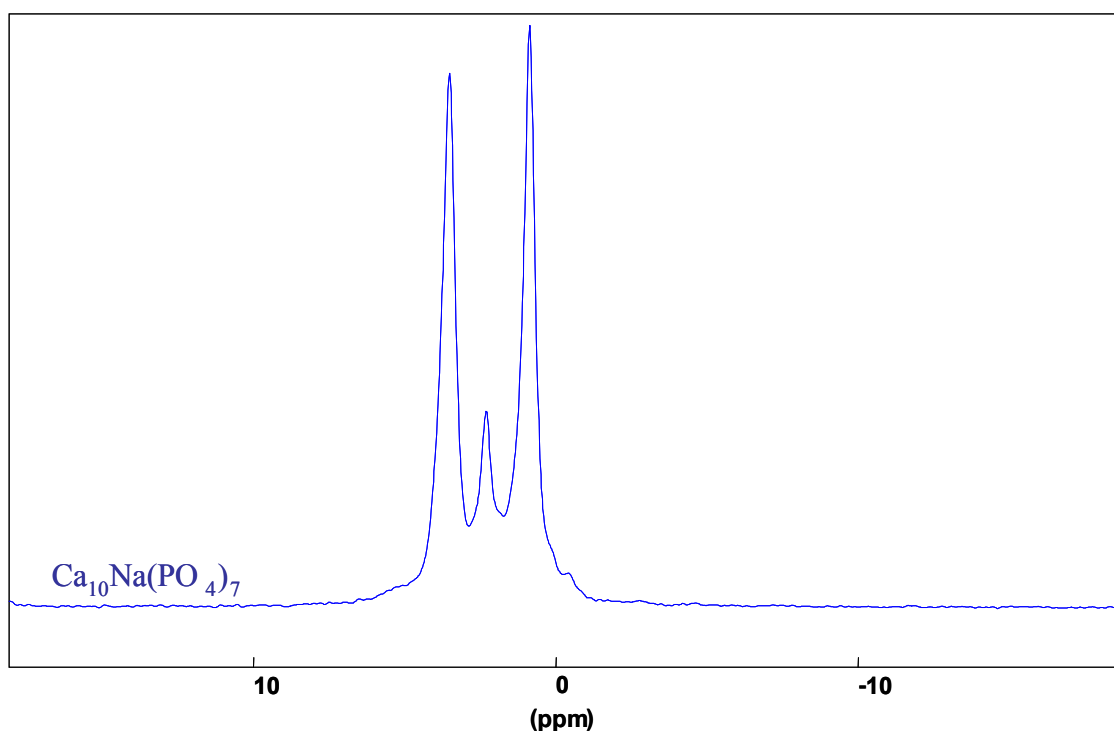


Figure 2-10 : Spectre RMN ^{31}P de $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$

Ainsi, le composé $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ présente trois bandes fines dans un rapport d'intensité proche de 3/1/3, comme le prévoit sa structure cristallographique (Tableau 2-4).

	Déplacement chimique (ppm)	Rapport des intensités de bandes (théorique)	Rapport des intensités de bandes (expérimental)
P(2)	3,56	42,87	42,47
P(1)	2,33	14,29	13,56
P(3)	0,91	42,87	43,96

Tableau 2-4 : Rapport d'intensité des bandes RMN ^{31}P pour le composé $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$

Du point de vue de la littérature, les données sur la RMN ^{31}P du β -TCP manquent de cohérence. En effet, Benarafa publie un spectre à trois bandes pour le composé $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ dans lequel tout le site Ca(4) du β -TCP est rempli par du sodium [Benarafa, 2000a]. Cependant, il publie également un spectre RMN ^{31}P identique pour le β -TCP pur, ce qui n'est pas cohérent avec sa structure [Benarafa, 2000a] par rapport à Jakeman, qui, quant à lui, présente un spectre RMN ^{31}P du β -TCP à 5 bandes [Jakeman, 1989].

Ces données étant contradictoires, nous avons synthétisé un β -TCP sans sodium d'après la méthode décrite par Benarafa. Nous avons ainsi obtenu 5 bandes en RMN du ^{31}P dans des proportions qui correspondent à la structure cristallographique du β -TCP, ce qui confirme l'hypothèse précédente.

Les TCPsolid et TCPprécip n'ayant pas de sodium donnent un spectre RMN à 5 bandes, en accord avec la structure du β -TCP non substitué. Les TCP NH_4OH et TCP NaOH qui contiennent du sodium présentent des spectres RMN pouvant être assimilés à une combinaison des deux spectres types β -TCP pur et type $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$.

Seule la bande située à 0,8 ppm est commune à tous les spectres des β -TCP ainsi qu'à celui du $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ (même si elle subit un léger déplacement d'un composé à l'autre). En effet, cette bande correspond au phosphore P(3) qui est très peu affecté par l'environnement du calcium Ca(4). Les autres bandes diffèrent beaucoup plus d'un spectre à un autre. Elles correspondent en effet aux phosphores P(1) et P(2), qui sont très affectés par le remplissage ou non du site Ca(4) situé dans leur proche environnement.

En diffraction des rayons X, aucune différence notable n'est observée. Ceci peut être expliqué par le fait que le sodium s'incorpore au sein la structure du β -TCP : celle-ci n'est donc pas modifiée. De plus, un ion Ca^{2+} est remplacé par deux ions Na^+ et la densité électronique reste donc inchangée : l'intensité des raies sur le diffractogramme ne varie donc pas.

En infrarouge, le dopage en ions Na^+ modifie l'environnement des ions PO_4^{3-} et donc certaines des positions des bandes d'absorption P-O, comme c'est le cas pour la substitution de calcium par le magnésium dans le β -TCP [LeGeros, 1994].

Après avoir remarqué que le TCPNH_4OH contenait 0,45 % de sodium qui provenait des impuretés du DCPD initial, nous souhaitons répéter la synthèse d'un β -TCP en partant d'un DCPD exempt d'impureté (une vérification de sa pureté a été réalisée par analyse élémentaire et par dosage de sodium). Le $\text{TCPNH}_4\text{OHbis}$ a donc été synthétisé.

Le spectre RMN ^{31}P du solide de ce composé est représenté dans la Figure 2-11, ayant l'allure attendue pour un β -TCP pur.

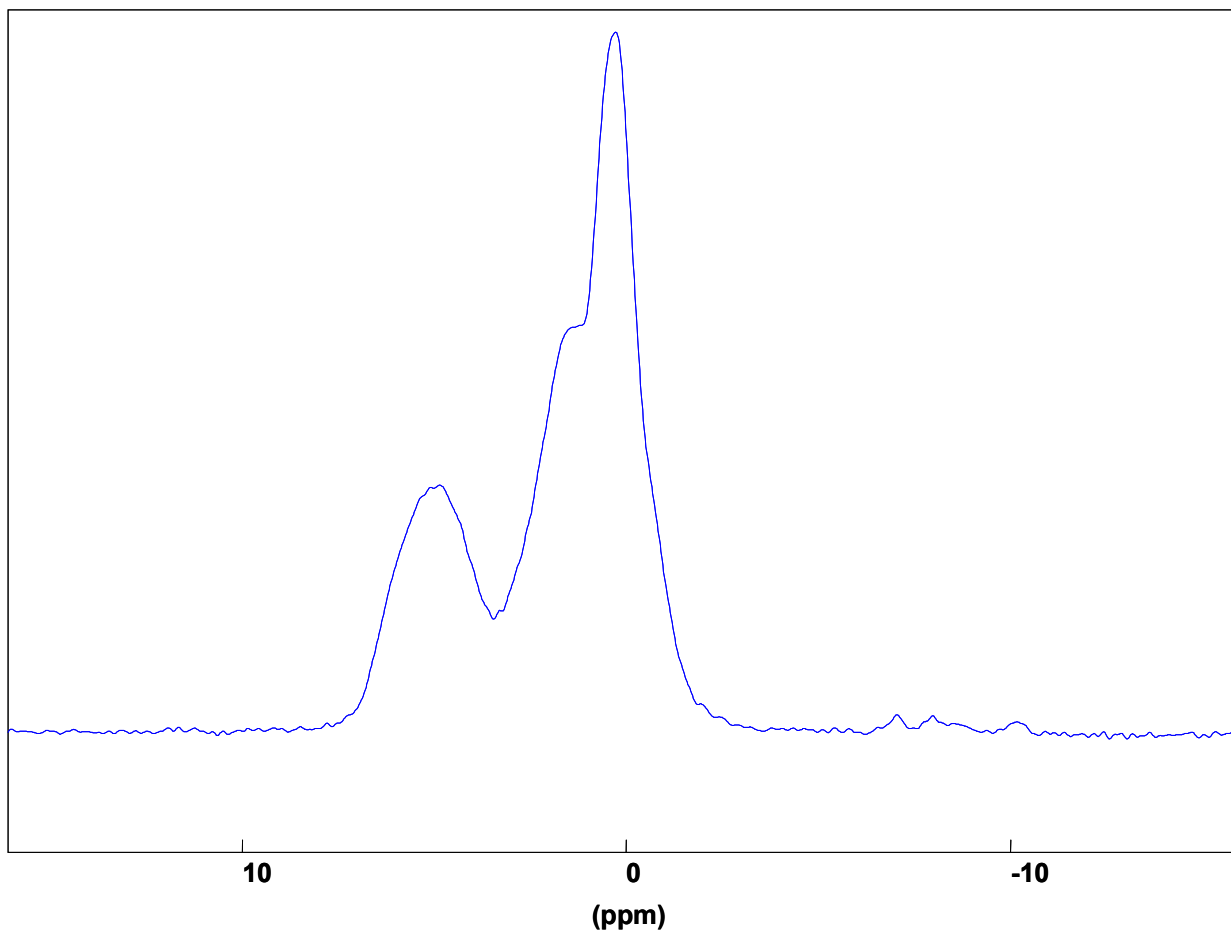
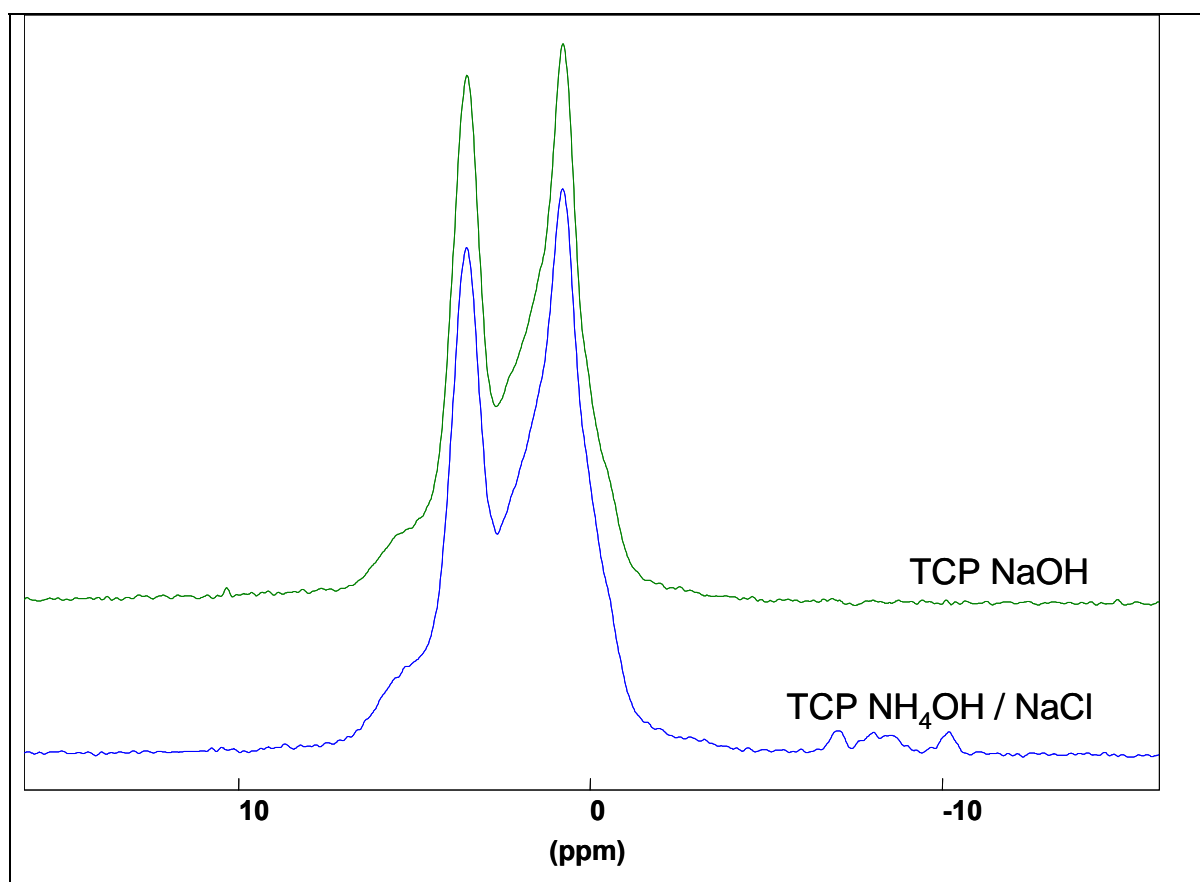


Figure 2-11 : Spectre RMN ^{31}P de $\text{TCPNH}_4\text{OHbis}$ (synthétisé à partir de DCPD exempt de sodium)

Les signaux situés dans la zone -8 / -10 ppm correspondent à une impureté en pyrophosphates.

Dans le but de confirmer notre hypothèse sur l'incorporation de Na dans le β -TCP, nous avons souhaité synthétiser un β -TCP contenant du sodium par une méthode différente : l'hydrolyse en milieu basique de DCPD par NH_4OH en saturant le milieu de NaCl. Le TCP $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NaCl}$ ainsi obtenu contient 1,43 % de sodium (déterminé par spectrométrie d'absorption atomique). Son spectre RMN ^{31}P du solide (Figure 2-12) est comparable à celui du TCPNaOH qui contient la même quantité de sodium. Ceci confirme que les deux β -TCP ont incorporé la même quantité de sodium.



La *Figure 2-13* représente les spectres de RMN ^{31}P de deux BCP contenant 25 % d'HA et de l'HA pure. Les allures des BCP sont cependant très différentes. Sur les deux spectres, on peut distinguer la composante HA (2,7 ppm). Dans le BCPa, la contribution du β -TCP ressemble au spectre du β -TCP sans sodium (5 bandes) tandis que dans le BCPb, celle du β -TCP ressemble au spectre du β -TCP avec sodium (3 bandes).

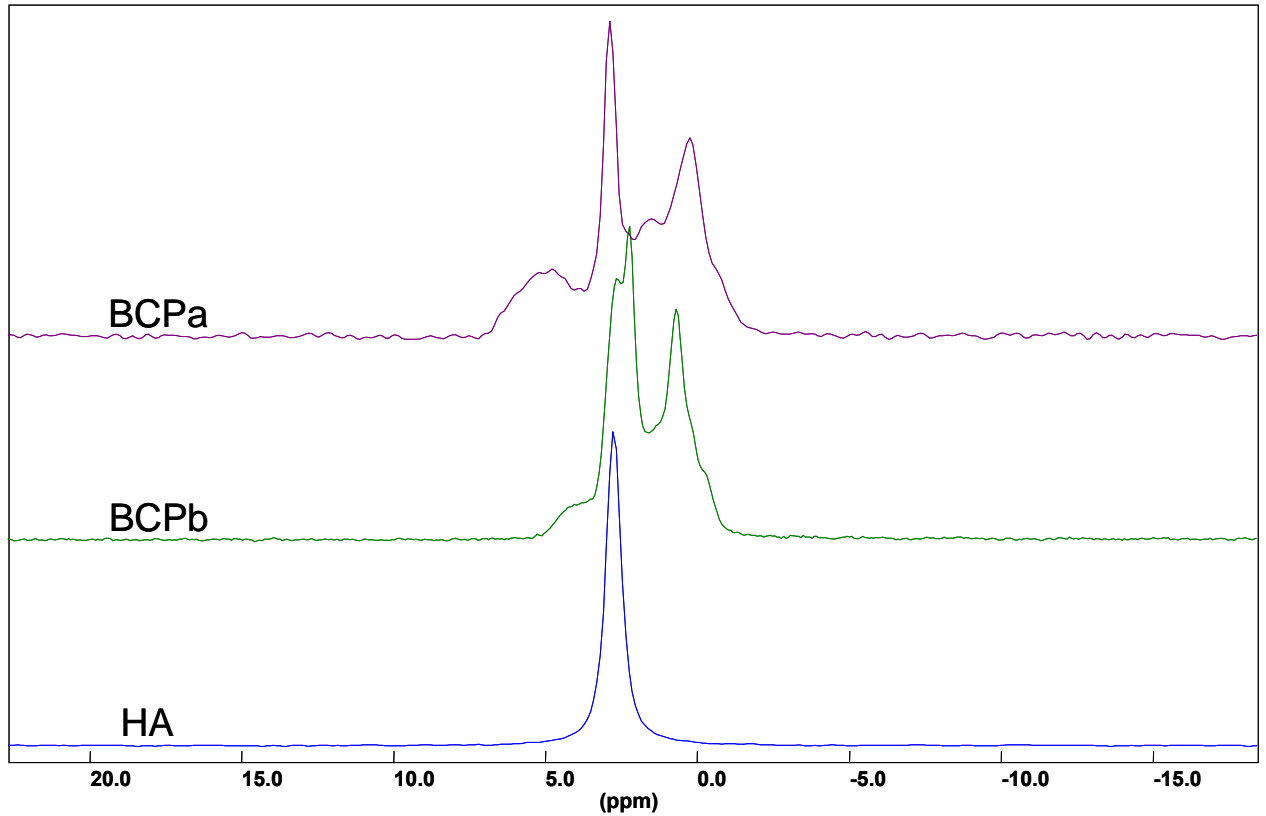


Figure 2-13 : spectre RMN de 2 BCP et de l'hydroxyapatite

2.1.2.9 Valence des ions Ca^{2+} dans la structure du β -TCP

Les valeurs des **valences** calculées pour les atomes de calcium sont données dans le Tableau 2-5.

	Ca(1)	Ca(2)	Ca(3)	Ca(4) (Na(4))	Ca(5)
TCP NaOH	2,16	2,20	1,83	2,10	2,88
TCP NH_4OH	2,00	2,35	1,73	2,42	3,06
TCP precip	2,03	2,13	1,82	1,59	2,82
TCP solid	2,07	2,12	1,93	1,42	2,62
$\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$	2,17	2,21	1,92	0,94 (Na)	2,94

Tableau 2-5 : valence des atomes de calcium dans les structures β -TCP et $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$

Ces résultats montrent que, pour tous les composés, la valence calculée du Ca(5) est proche de 3. Cette valeur a été confirmée par une analyse en diffraction des neutrons [Yashima, 2003]. Ceci laisserait supposer que la structure du β -TCP décrite depuis 1974 serait peut être inexacte. Pour répondre à cette question, nous tentons de synthétiser des monocristaux de β -TCP afin de déterminer sa structure cristalline avec des techniques plus précises que celles utilisées par Dickens en 1974 [Dickens, 1974]. En effet, les grandes dimensions de la maille cristalline du β -TCP rendent possible les affinements sur un diagramme de poudre sans que la structure soit parfaitement exacte à cause du grand nombre de recouvrements de pics à hauts θ .

Dans ce travail, la RMN du solide du ^{31}P nous a permis de mettre en évidence l'incorporation du sodium au sein des β -TCP ainsi que sa localisation (site Ca(4)).

Actuellement, les normes en vigueur font appel à la spectroscopie d'absorption infrarouge et à la diffraction des rayons X pour la caractérisation des phosphates de calcium utilisés comme matériaux de substitution osseuse, nous recommandons d'y ajouter la RMN du solide du ^{31}P .

2.2 Etude de β -TCP avec différents taux de substitution en sodium

Des études préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire semblent montrer que les propriétés mécaniques des BCP qui contiennent du sodium sont meilleures que celles des BCP ne contenant pas de sodium.

Dans la partie précédente (chapitre 2.1), nous avons expliqué que le sodium pouvait s'intégrer dans la maille du β -TCP pour une quantité maximale de 2,11 % en masse. Il nous semblait donc intéressant d'étudier l'influence de la teneur en sodium sur les propriétés mécaniques du β -TCP.

De plus, dans la partie précédente, nous avons montré que le sodium n'est pas détectable dans le β -TCP par les méthodes de caractérisation des phosphates de calcium préconisées par les normes en vigueur. Il nous semblait donc important de vérifier l'effet que pouvait avoir le sodium sur les propriétés générales du β -TCP.

Notre objectif a donc été de synthétiser des β -TCP avec des teneurs en sodium différentes, puis de caractériser les composés ainsi obtenus par spectroscopie d'absorption infrarouge, par Diffraction des Rayons X et par Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore 31 en phase solide. L'impact du sodium sur les propriétés mécaniques (résistance en compression) ainsi que sur la cytocompatibilité des phosphates tricalciques β sodés et non sodés a également été évalué.

2.2.1 Matériels et méthodes

2.2.1.1 Synthèse et mise en forme

Des β -TCP de formule $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$ (avec $x = 0 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,75$ et 1 ; Tableau 2-6) ont été synthétisés par mélange solide / solide. Un broyage de CaHPO_4 , de CaCO_3 , et de Na_2CO_3 a été effectué durant 30min dans un mortier en agate.

x (taux de sodium)	Composition du β -TCP formé
0 %	$\text{Ca}_{10,5}(\text{PO}_4)_7$ [Lazoryak, 1996c]
25 %	$\text{Ca}_{10,375}\text{Na}_{0,25}(\text{PO}_4)_7$
50 %	$\text{Ca}_{10,25}\text{Na}_{0,5}(\text{PO}_4)_7$
75 %	$\text{Ca}_{10,125}\text{Na}_{0,75}(\text{PO}_4)_7$
100 %	$\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ [Lazoryak, 1996c]

Tableau 2-6 : β -TCP dopés en sodium synthétisés

A l'aide de la poudre obtenue, vingt pastilles cylindriques de 20 mm de diamètre sur 5 mm de hauteur par type de β -TCP ont été formées par compression uniaxiale. La force de compression utilisée a été la même pour toutes les pastilles et a été la force minimale nécessaire pour former des pastilles qui permettaient de les manipuler sans les dégrader. Un frittage a ensuite été effectué à 1000°C durant 24 heures (Figure 2-14) pour obtenir une céramique microporeuse et effectuer la réaction suivante :

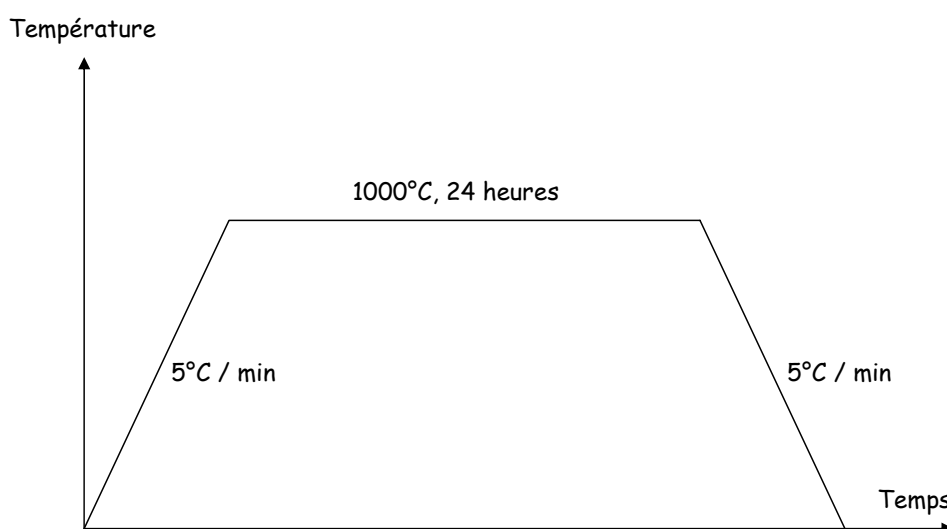
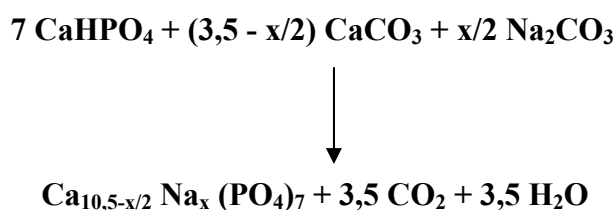


Figure 2-14: Condition de frittage des pastilles de β -TCP

Une attention particulière a été portée sur la pureté des produits de départ. Afin de ne pas induire d'autres substitutions que celle mettant en jeu du sodium, une analyse élémentaire des précurseurs (CaHPO_4 , CaCO_3 et Na_2CO_3) a été réalisée par spectroscopie en dispersion d'énergie des rayons X.

Après frittage, les pastilles ont été pesées et mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (hauteur + diamètre) afin de déterminer leur densité apparente.

2.2.1.2 Absorption Atomique (dosage du sodium)

Pour les cinq β -TCP analysés, le sodium a été dosé par absorption atomique suivant le même protocole que dans le paragraphe 2.1.1.5.

2.2.1.3 Diffraction des Rayons X (DRX)

Les β -TCP ont été analysés par diffraction des rayons X. Les paramètres d'acquisition des diffractogrammes sont les mêmes que dans le paragraphe 2.1.1.6.

L'affinement par la méthode de Rietveld a permis de déterminer les paramètres de maille, ainsi que le volume de la maille.

Les erreurs sur les paramètres de maille (ε) sont données par la relation suivante :

$$\varepsilon = 3 * SD * \Sigma\text{cor} [\text{Berar, 1991}]$$

avec SD : écart type ; Σcor : coefficient de corrélations sérielles

La **compacité** de chacun des β -TCP a également été déterminée. Elle est définie par la formule suivante :

$$\text{Compacité} = \frac{V_{\text{atome}}}{V_{\text{maille}}}$$

Le volume des atomes est calculé à partir du nombre d'atomes par maille et du rayon des atomes [Shannon, 1976].

Il y a 273 atomes dans la maille du β -TCP, donc 6 groupements formulaires : $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$.

$$\text{Ainsi : } V_{\text{atome}} = [(1 \times (10,5 - x/2)) + (x \times 0,99) + ((0,17 + (1,4 \times 4)) \times 7)] \times 6 .$$

Le volume de la maille est obtenu par l'affinement par la méthode de Rietveld du diagramme de rayons X du composé étudié.

2.2.1.4 Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P)

Pour les cinq β -TCP analysés, les spectres RMN ont été acquis suivant le même protocole que dans le paragraphe 2.1.1.7.

2.2.1.5 Spectroscopie d'absorption Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Les cinq β -TCP synthétisés ont été analysés suivant la même procédure que dans le paragraphe 2.1.1.3.

2.2.1.6 Propriétés mécaniques

La résistance en compression des compacts après frittage a été obtenue à partir des mesures de dureté Vickers.

Les céramiques sont des matériaux fragiles n'ayant pas de domaine plastique, la résistance en compression (σ_c) et la limite élastique (σ_e) sont équivalentes (Figure 2-15).

Pour les céramiques, il a été démontré que la limite élastique est directement liée à la dureté (H_v) par la relation suivante :

$$H_v = 3 \sigma_e = 3 \sigma_c \quad (\text{eq 1})$$

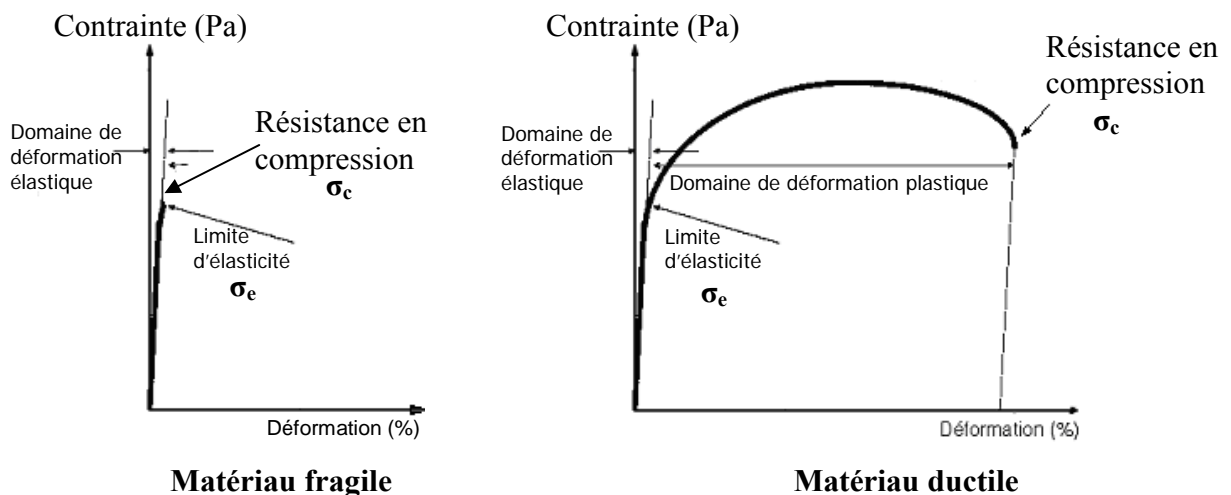


Figure 2-15 : Réponse en traction d'un matériau fragile et d'un matériau ductile

De plus, par définition, H_v est égal au rapport de la charge appliquée (F) sur l'aire d'indentation au contact du matériau (A) :

$$H_v = F / A \quad (\text{eq 2})$$

Pour nos essais, une pointe d'indentation Vickers d'angle au sommet 136° a été utilisée.

Ainsi, l'aire d'indentation au contact du matériau devient :

$$A = D^2 / 1,856 \quad (\text{eq 3})$$

Avec D : diagonale de l'empreinte.

eq 2 + eq 3 devient : $H_v = 1,856 F / D^2$ (eq 4)

eq 1 + eq 4 devient : $\sigma_e = 0,6187 F / D^2$

Ainsi, par indentation Vickers, il est possible de déterminer la résistance en compression de céramiques en connaissant la charge appliquée (en newtons) et le diamètre de l'empreinte (en millimètres) (Figure 2-16).

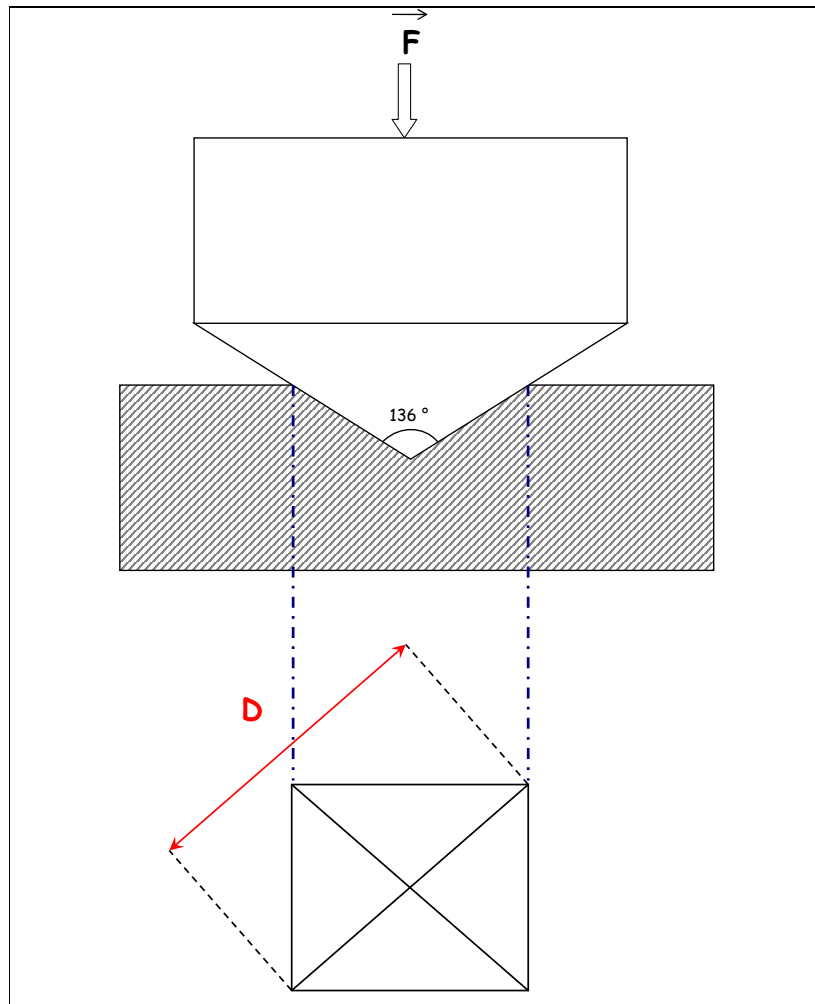


Figure 2-16 : Principe de mesure de dureté Vickers

Pour effectuer nos analyses, une pointe Vickers a été adaptée sur un analyseur de texture TA-XT2 texture analyser.

Une force de 49 N a été appliquée sur les β -TCP contenant 0, 25 et 50 % de sodium. Pour les β -TCP contenant 75 et 100 % de sodium, une force de 140 N a été appliquée (Pour une force de 49 N, l'empreinte réalisée était trop petite pour mesurer un diamètre avec précision). Les contraintes ont toujours été appliquées durant 15 secondes. Les empreintes ont été mesurées après observation à la loupe binoculaire et capture numérique de l'image.

2.2.1.7 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Une étude de porosité a été menée par MEB. Pour cela, les échantillons (blocs de 200 mg) ont été préalablement inclus dans une résine en polyméthylmétacrylate (Annexe).

L'étude de la microporosité (pores inférieurs à 10 μm) consiste à prendre 100 images par échantillon à un grossissement de 750 à l'aide d'un microscope électronique à balayage LEO 1450 VP (Zeiss, Allemagne). Après numérisation, les images obtenues ont été analysées pour obtenir des données quantitatives sur la composition de l'échantillon (Quantimet Q4, Leica, Cambridge, GB). Ceci repose sur la différence de niveaux de gris existant entre la céramique (blanc) et les pores (noir).

A l'aide du logiciel utilisé et au programme spécialement conçu pour la quantification de la microporosité, l'analyse d'image a permis d'obtenir la surface occupée par les pores et la surface occupée par la céramique en mm^2 . Ces données ont ensuite été rapportées en pourcentage de porosité au sein du matériau étudié.

2.2.1.8 Porosité Mercure

Des essais ont été faits sur 3 échantillons de β -TCP non sodés et sodés à 100%.

Les basses pressions utilisées sont comprises entre 0,0035 et 0,21 MPa et les hautes pressions entre 0,21 et 206 MPa.

Le porosimètre à mercure permet de déterminer la porosité totale des échantillons et de classer la taille des pores en cinq catégories grâce à un logiciel (Autopore III Windows Software) et ainsi de déterminer quelle classe de pores est dominante.

L'appareil utilisé pour mesurer la porosité et la taille des pores des différents β -TCP est le Porosimètre Autopore III 9420.

2.2.1.9 Solubilité

Deux pastilles de 200 mg chacune et 10 mm de diamètre ont été immergées dans 80 mL d'un tampon acétique pH = 4,8 de concentration 0,05 mol.L⁻¹ durant trois heures (Figure 2-17). La libération de calcium a été mesurée par une électrode spécifique des ions calcium (Ion Plus[®], modèle 9320), dont le signal amplifié a été enregistré au moyen du logiciel ISE/pH Ion-Analyser. Des prélèvements réguliers de 500 μ L ont été effectués pour quantifier la libération d'ions PO₄³⁻. Leur dosage a été réalisé par complexométrie. 5 étalons avec des concentrations allant de 5 à 100 ppm dans le tampon acétate ont été pour cela préparés.

A 500 μ L d'étalons ou d'échantillons sont ajoutés 100 μ L de réactif Molybdène–Vanadium (Merck) pour former un complexe coloré. La densité optique des solutions ainsi obtenues est lue à 405 nm à l'aide d'un spectromètre UV SECOMAN S750.

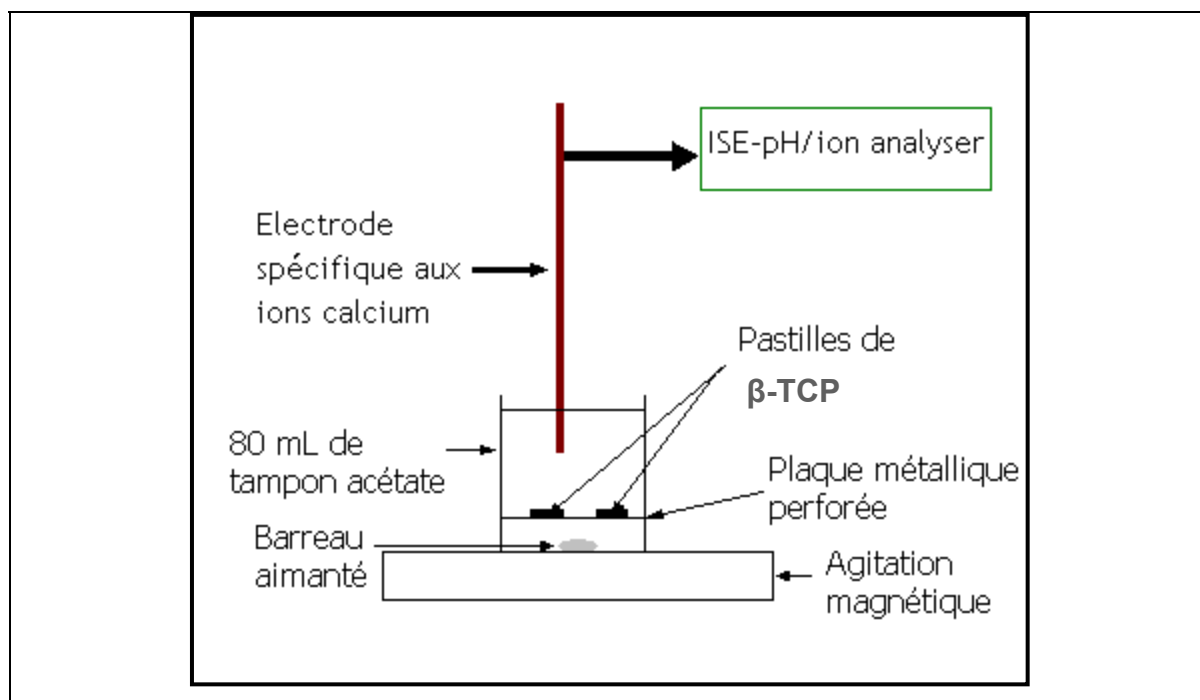


Figure 2-17 : Montage expérimental des essais de dissolution des différents types de β -TCP

2.2.1.10 Cytocompatibilité

Les études de cytocompatibilité sur le β -TCP et le Ca₁₀Na(PO₄)₇ ont été réalisées au sein du laboratoire par Marion Julien et Séverine Delplace, membres de l'Equipe 2 « physiopathologie des tissus ostéoarticulaires et dentaires ».

Conditions de culture des cellules pour les tests MTS et ALP

La lignée de cellules d'ostéoblastes de souris MC3T3-E1 est une lignée dérivée de fibroblastes de la calvaria d'embryon de souris. Les cellules ostéoblastiques ($10\,000$ cellules / cm^2) sont cultivées dans des plaques 24 puits au fond desquelles sont déposées des pastilles de β -TCP et de $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$. Les cellules sont cultivées dans du milieu α -MEM supplémenté de 10% de sérum de veau foetal, de 1% de pénicilline / streptomycine et de L-Glutamine dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO_2 . Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

Cultivées dans ces conditions, les MC3T3-E1 se différencient progressivement en ostéoblastes et deviennent positives à la phosphatase alcaline, marqueur de la différenciation ostéoblastique.

Morphologie cellulaire (MEB)

Afin de connaître la morphologie des cellules au contact des pastilles de β -TCP, celles-ci ont été cultivées deux jours, puis elles ont été fixées pendant 30 min dans une solution de glutaraldéhyde à 4% à 4°C . Après deux rinçages de 10 minutes dans une solution de PBS à 4°C , les pastilles ont été déshydratées en les passant successivement dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50%, 70%, 95%, $3 \times 100\%$). Les pastilles ont ensuite été incubées dans des bains de mélanges éthanol/trichlorofluoroéthane : 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 (15 min à 4°C , la dernière étape est menée jusqu'à évaporation complète du trichlorofluoroéthane).

Les pastilles ont été métallisées à l'or/palladium puis observées au microscope électronique à balayage (LEO 1450 VP, Zeiss, Allemagne).

Test de viabilité cellulaire (MTS)

Ce test colorimétrique permet de mettre en évidence la viabilité cellulaire des cellules en mesurant la capacité des mitochondries des cellules vivantes à oxyder le sel de méthyl tétrazolium (MTS) en formazan. Un produit coloré (marron) est formé, en quantité proportionnelle à l'activité déshydrogénase des mitochondries. La mesure de l'absorbance permet de quantifier la viabilité cellulaire. Après 14 jours de culture, les cellules ont été mises dans du milieu frais et incubées une heure à 37°C en présence de $100\ \mu\text{L}$ de réactif MTS. La mesure de l'absorbance à $490\ \text{nm}$ a été réalisée à l'aide du lecteur de multiplaques (MRX, Dynatech laboratories, VWR international). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité MTS par rapport aux conditions de contrôles (cellules cultivées en l'absence de matériau).

Mesure de l'activité phosphatase alcaline : marqueur de la différenciation ostéoblastique

Ce test colorimétrique mesure l'activité phosphatase alcaline des ostéoblastes en culture, qui est maximale après deux semaines de culture. La phosphatase alcaline transforme le paranitrophénylphosphate (incolore) en un composé jaune. Après 14 jours de culture, les cellules ont été rincées au PBS puis lysées avec 250 μL de Nonidet P-40 0,2% (NP 40). Le fond du puits a été gratté et le NP-40 transféré dans un tube en verre. Les cellules ont été centrifugées à 3 000 tours / min pendant 5 minutes à 4°C après avoir subi un traitement aux ultrasons de 30 secondes. 100 μL du surnageant ont été ajoutés à 900 μL de réactif (composé de para-nitrophénylphosphate ($10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), 2-amino-2-méthyl-1-propanol ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), MgCl_2 (1 mol.L^{-1})) porté à 37°C. La solution a été incubée, puis la réaction a été stoppée par ajout de 400 μL de NaOH. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de multiplaques (MRX, Dynatech laboratories, VWR international). Les résultats sont exprimés en nmol de phosphate inorganique transformé par minute, rapporté au contenu des protéines de chaque puits mesuré par le kit Pierce Coomassie Plus Protein Assay (Perbio, Helsingborg, Suède). Les essais ont été répétés trois fois. Afin de déterminer si les résultats trouvés étaient significativement différents, des tests statistiques (Fischer) ont été réalisés.

2.2.2 Résultats / discussion

2.2.2.1 Pureté des β -TCP

Si la stoechiométrie des réactifs de départ (rapport Ca/P = 1,5) n'est pas rigoureusement respectée, à la suite du traitement thermique, des pyrophosphates de calcium apparaissent lorsque le rapport Ca/P est inférieur à 1,5 ou de l'hydroxyapatite est détectée si le rapport Ca/P est supérieur à 1,5.

Sur les diffractogrammes des β -TCP, aucune impureté cristalline n'a été détectée (HA, pyrophosphates ou encore réactifs de départ).

En spectroscopie d'absorption infrarouge, il n'a pas été détecté de :

- ~ Pyrophosphates : pas de bande à 720 cm^{-1}
- ~ Hydroxyapatite : pas de bande à 3475 cm^{-1} caractéristique des OH apatitiques.

Il a de plus été vérifié que la structure du β -TCP ne peut pas accepter plus de 2,11 % de sodium. Si plus de sodium est ajouté, un autre composé se forme : le Na_3PO_4 (observé en DRX).

2.2.2.2 Synthèses

Le mode de synthèse utilisé pour l'obtention des β -TCP permet d'obtenir l'incorporation en sodium souhaitée. Pour chaque synthèse effectuée, la quantité de sodium dosée est équivalente à la quantité de sodium théorique (Tableau 2-7). La méthode de synthèse par mélange solide-solide est donc adaptée pour une incorporation de sodium avec des taux contrôlables au sein des β -TCP.

X (%)	% Na en masse théorique	% Na en masse expérimental
0	0	$0,000 \pm 0,001$
25	0,53	$0,54 \pm 0,01$
50	1,06	$1,07 \pm 0,02$
75	1,59	$1,61 \pm 0,03$
100	2,11	$2,13 \pm 0,03$

Tableau 2-7 : Dosage du sodium dans les β -TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$

2.2.2.3 Résonances Magnétique Nucléaire du ^{31}P (RMN ^{31}P)

Les études réalisées en RMN ^{31}P du solide confirment que le sodium est bien incorporé dans la maille du β -TCP. En effet, le spectre du β -TCP non sodé peut être décomposé en cinq bandes et celui du β -TCP contenant le maximum de sodium est analogue au spectre de $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$. Les composés intermédiaires ($x = 25, 50$ et 75 %) sont des combinaisons des deux autres spectres ($x = 0$ et 100 %) (Figure 2-18). Le β -TCP contenant 75% de sodium a une contribution plus importante du spectre de type $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$.

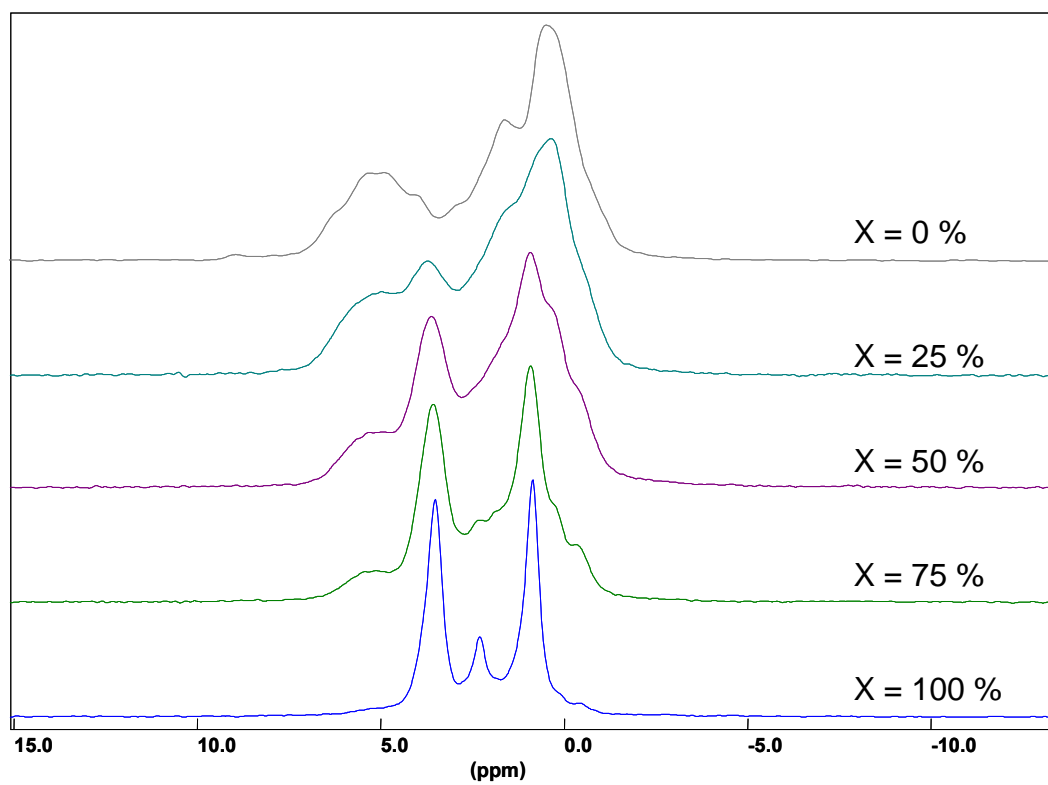


Figure 2-18 : Spectres RMN ^{31}P des β -TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$

Les spectres RMN des composés β -TCP et $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ ont été respectivement décomposés en 5 et 3 bandes (Figure 2-19). Les valeurs des positions ainsi que des intensités des bandes sont données dans le Tableau 2-8.

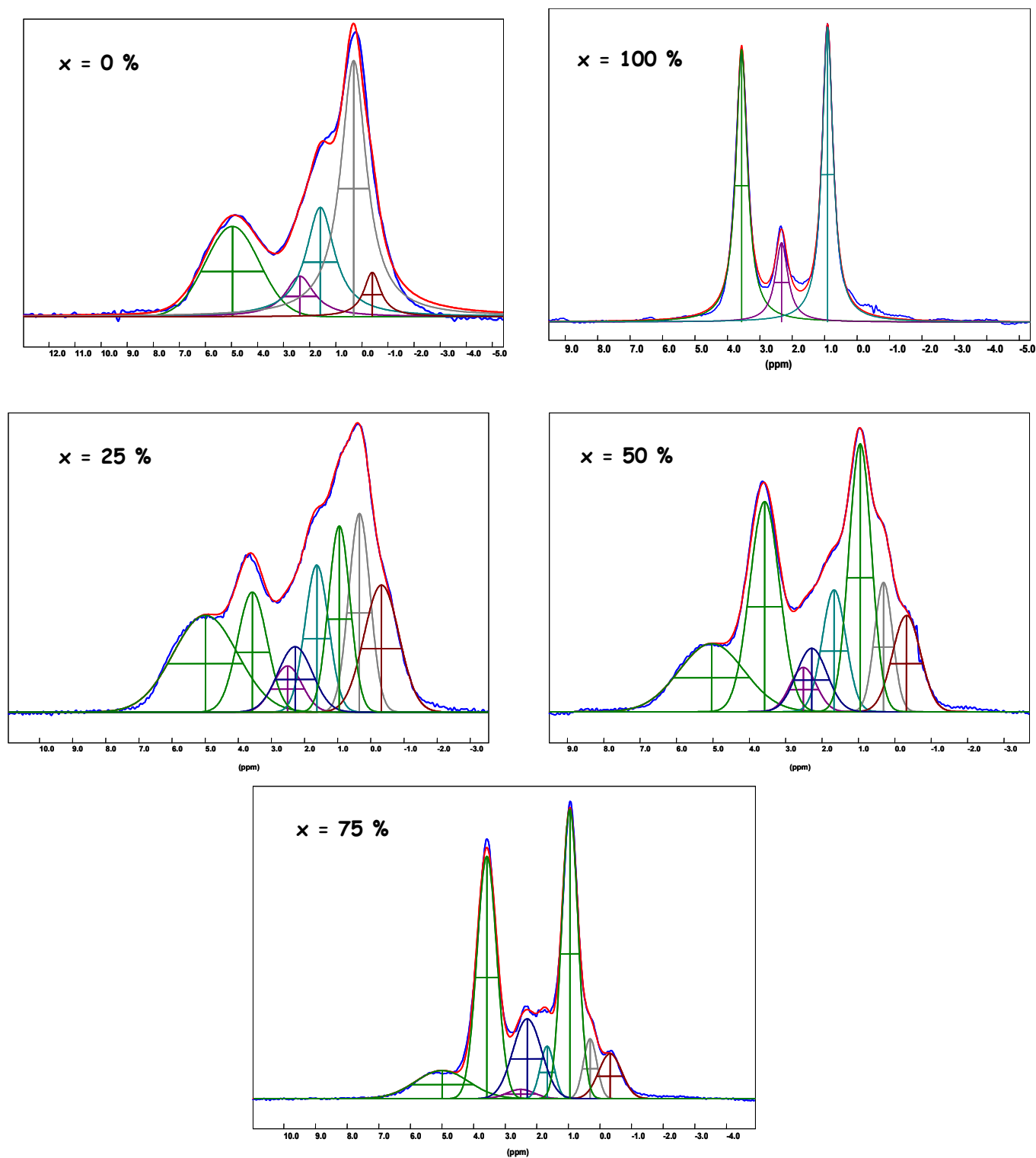


Figure 2-19 : Déconvolution des spectres RMN ^{31}P des β -TCP à différentes teneurs en sodium

Bandes d'absorption du β -TCP (cm^{-1})	Bandes d'absorption du $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ (cm^{-1})	
1118	1118	$\nu_3 \text{PO}_4$
1100	-	
1080 (↓)	1179 (↑)	
1068	1062	
1046 (↑)	1042 (↓)	
1038 (↓)	1038 (↑)	
1023	1023 (↓)	
1008	1008 (↑)	
970	-	
-	980	
-	947	
943	-	
-	563	
578	-	
571	-	
551	551 (↓)	
- : pas de bande d'absorption ; (↓) peu intense ; (↑) intense		

Tableau 2-9 : Bandes d'absorption infrarouge du β -TCP et du $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$

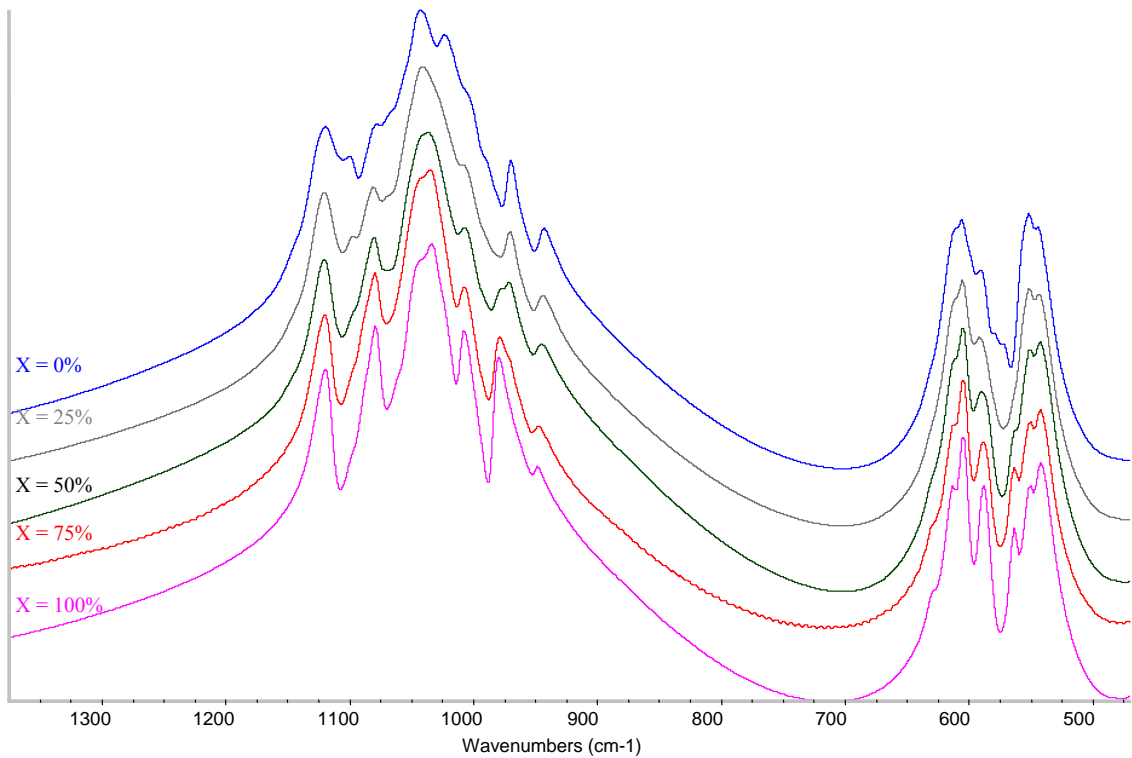


Figure 2-20 : Spectres infrarouge des β -TCP $Ca_{10,5-x/2} Na_x(PO_4)_7$

2.2.2.5 Diffraction des rayons X (DRX)

L'étude en diffraction des rayons X montre que les paramètres de maille sont modifiés lors de l'incorporation de sodium.

En effectuant un test sur le coefficient de corrélation r , nous avons calculé la probabilité p pour que la droite obtenue ne soit pas linéaire.

Le paramètre c du β -TCP diminue linéairement avec l'augmentation du taux de sodium en passant de 37,42 Å pour le β -TCP non sodé à 37,32 Å pour $Ca_{10}Na(PO_4)_7$ (Figure 2-21).

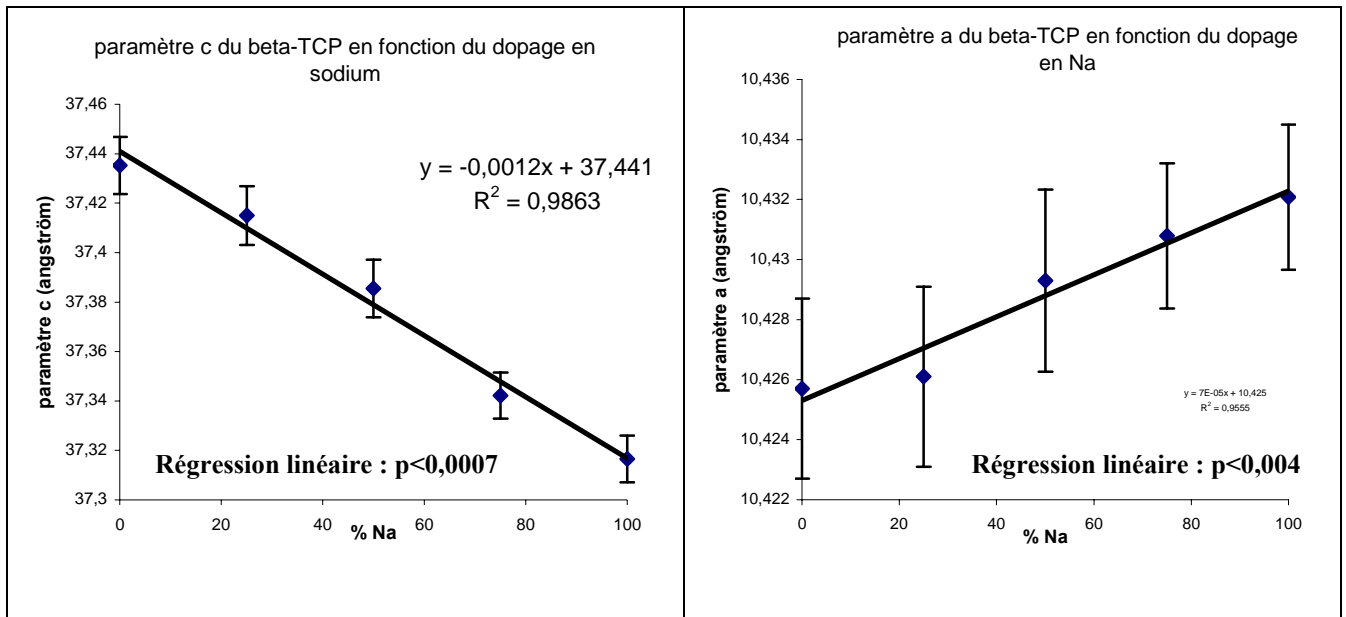


Figure 2-21 : Paramètres de maille des β -TCP $Ca_{10,5-x/2} Na_x(PO_4)_7$

Le paramètre augmente en fonction de l'incorporation en sodium.

2.2.2.6 Propriétés mécaniques

La caractérisation par microindentation présente l'avantage d'être une méthode non destructive. Les échantillons peuvent donc être utilisés postérieurement pour d'autres analyses. De plus, plusieurs mesures par pastille sont possibles. Ceci permet de vérifier l'homogénéité du matériau.

Le β -TCP sodé présente, pour une même force appliquée (49 N), une empreinte d'un diamètre beaucoup plus petit que pour le β -TCP non sodé (Figure 2-22). Le $Ca_{10}Na(PO_4)_7$ a donc une résistance à la compression supérieure à celle du β -TCP non sodé.

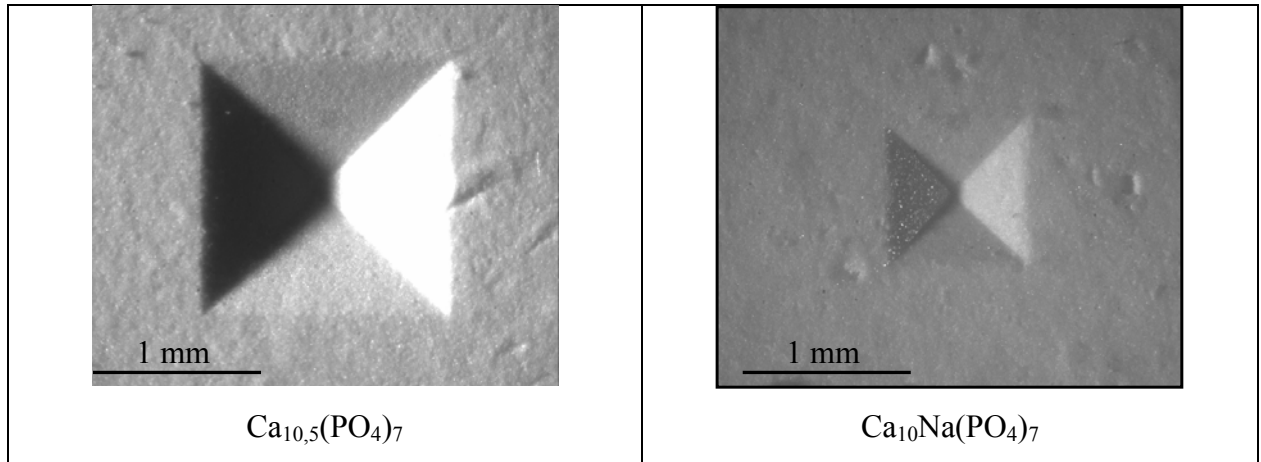


Figure 2-22 : Empreintes Vickers obtenues pour les TCP non sodé et sodé à 100% pour une même force appliquée (49 N)

De plus, la résistance en compression augmente linéairement avec la quantité de sodium incorporé dans le β -TCP (Figure 2-23). Le sodium améliore donc sensiblement la résistance des pastilles ayant subies le même traitement thermique.

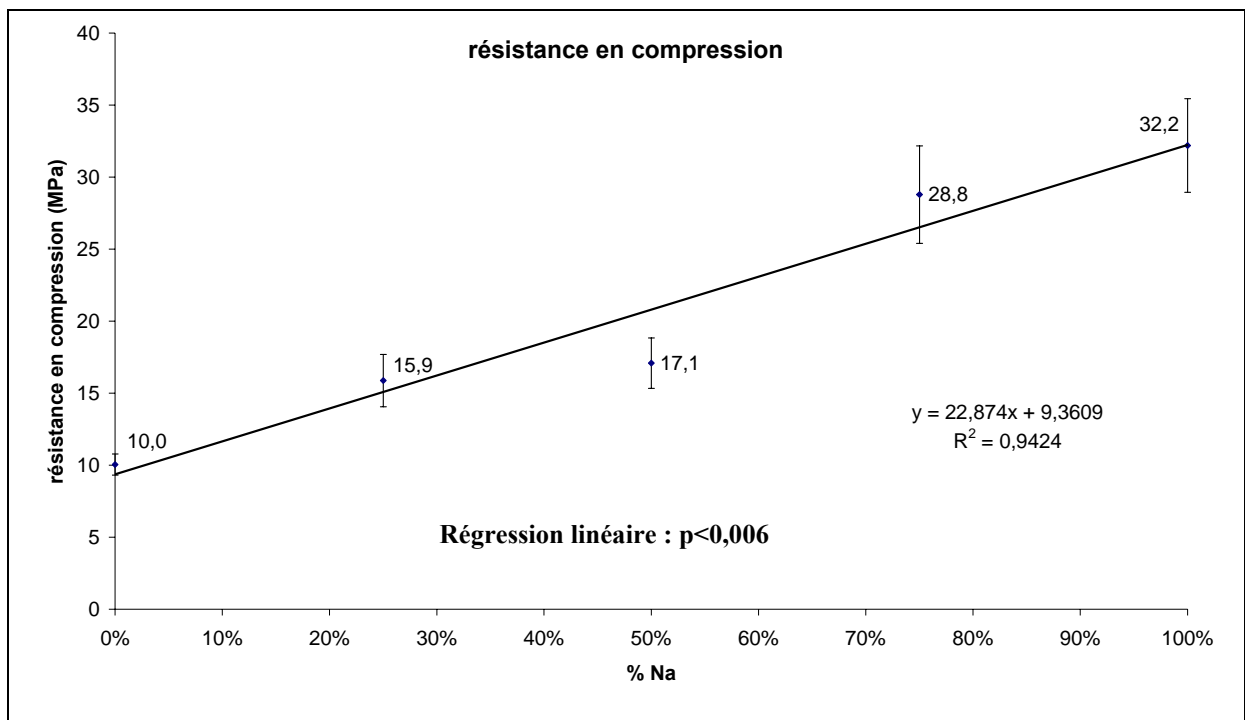


Figure 2-23 : Résistance en compression des β -TCP $Ca_{10,5-x/2}Na_x(PO_4)_7$

2.2.2.7 Porosité / compacité

a) Observations par MEB

Les observations effectuées au MEB montrent des grains et des joints de grain sans différence notable entre les β -TCP synthétisés (Figure 2-24).

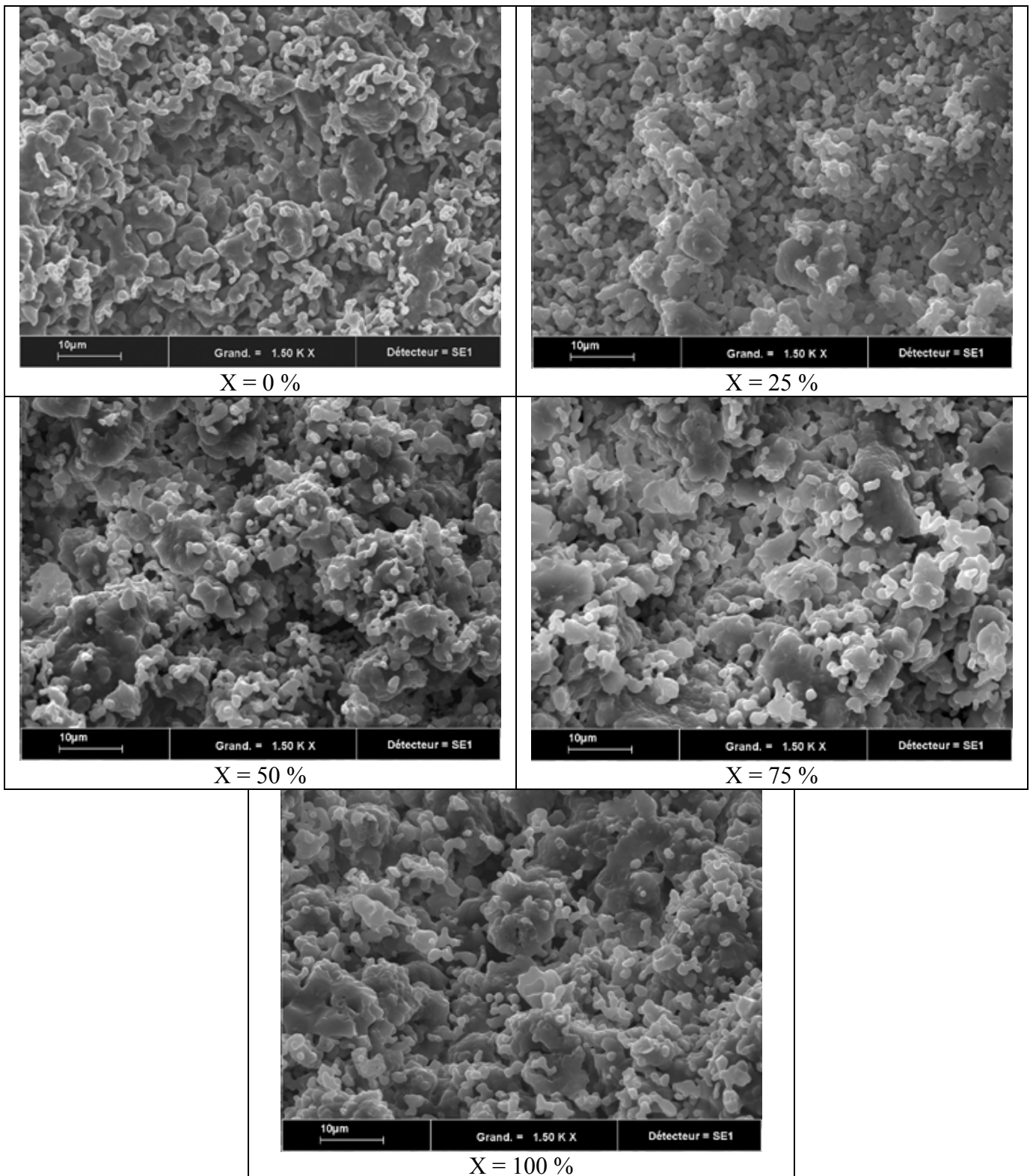


Figure 2-24 : Morphologie des grains des β -TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$

b) densité

Les pastilles avant frittage étaient homogènes en masse et en volume.

À l'issue du traitement thermique, les pastilles sont microporeuses, ne présentent ni fissure, ni déformation de surface. Ceci indique que la mise en forme par compression uniaxiale et un traitement thermique composé d'une montée, d'une descente en température (5° par minute) et d'un plateau de 24 heures à 1000 °C conviennent à l'obtention de céramiques de β -TCP. De plus, une faible vitesse de montée et de descente en température permet d'éviter les chocs thermiques et donc de prévenir la formation de fissures dans le matériau.

La densité apparente des pastilles augmente après frittage en fonction du taux d'incorporation de sodium (Figure 2-25).

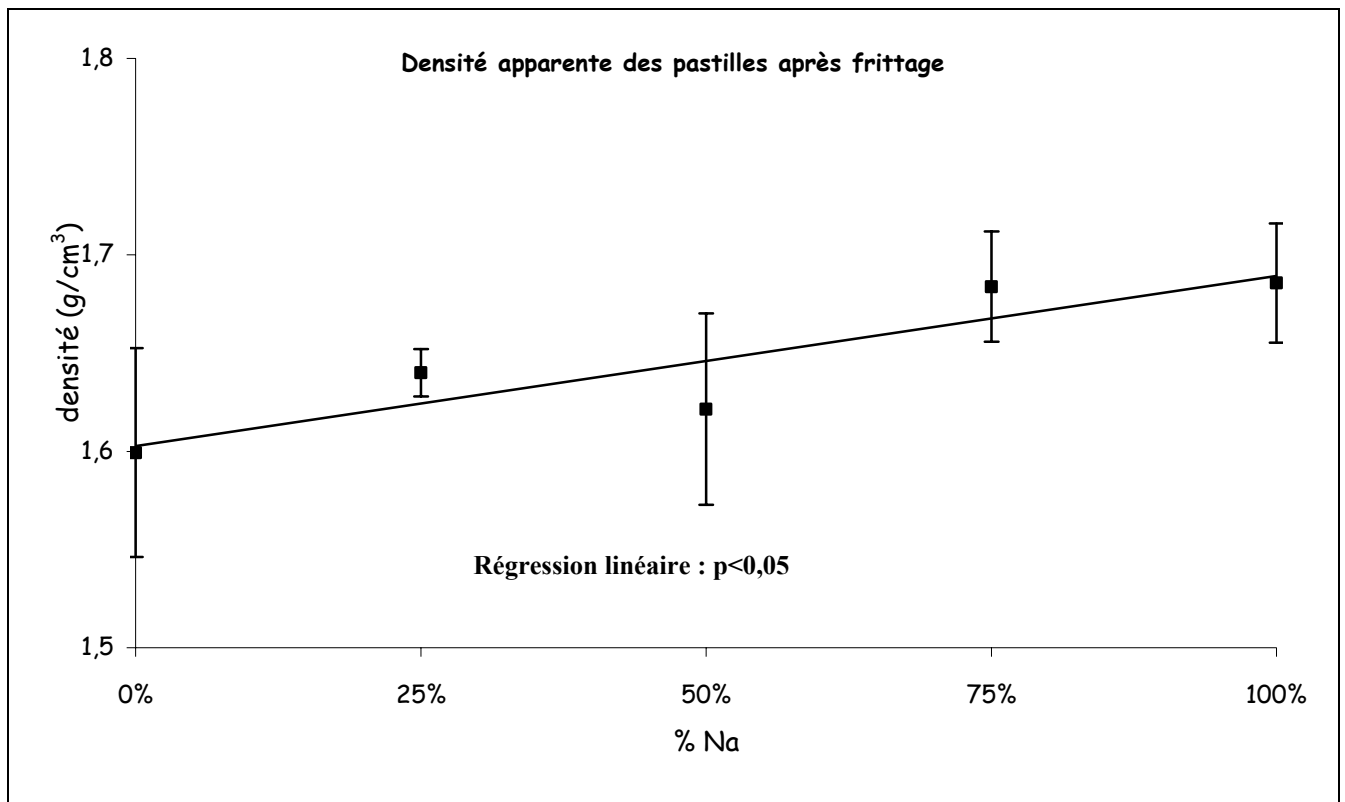


Figure 2-25 : Densité des pastilles de β -TCP $Ca_{10,5-x/2}Na_x(PO_4)_7$ après frittage

Les études statistiques (test ANOVA) ont montré que seuls les β -TCP contenant 75% et 100% de sodium n'avaient pas des densités apparentes significativement différentes.

c) compacité

Le volume de la maille du β -TCP diminue lorsque l'incorporation en sodium augmente à l'inverse du volume occupé par les atomes dans la maille qui augmente en fonction de l'incorporation en sodium. La compacité de la maille du β -TCP, quant à elle, augmente légèrement en fonction de l'incorporation en sodium (0,623 pour le β -TCP ; 0,628 pour le $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$) (Figure 2-26).

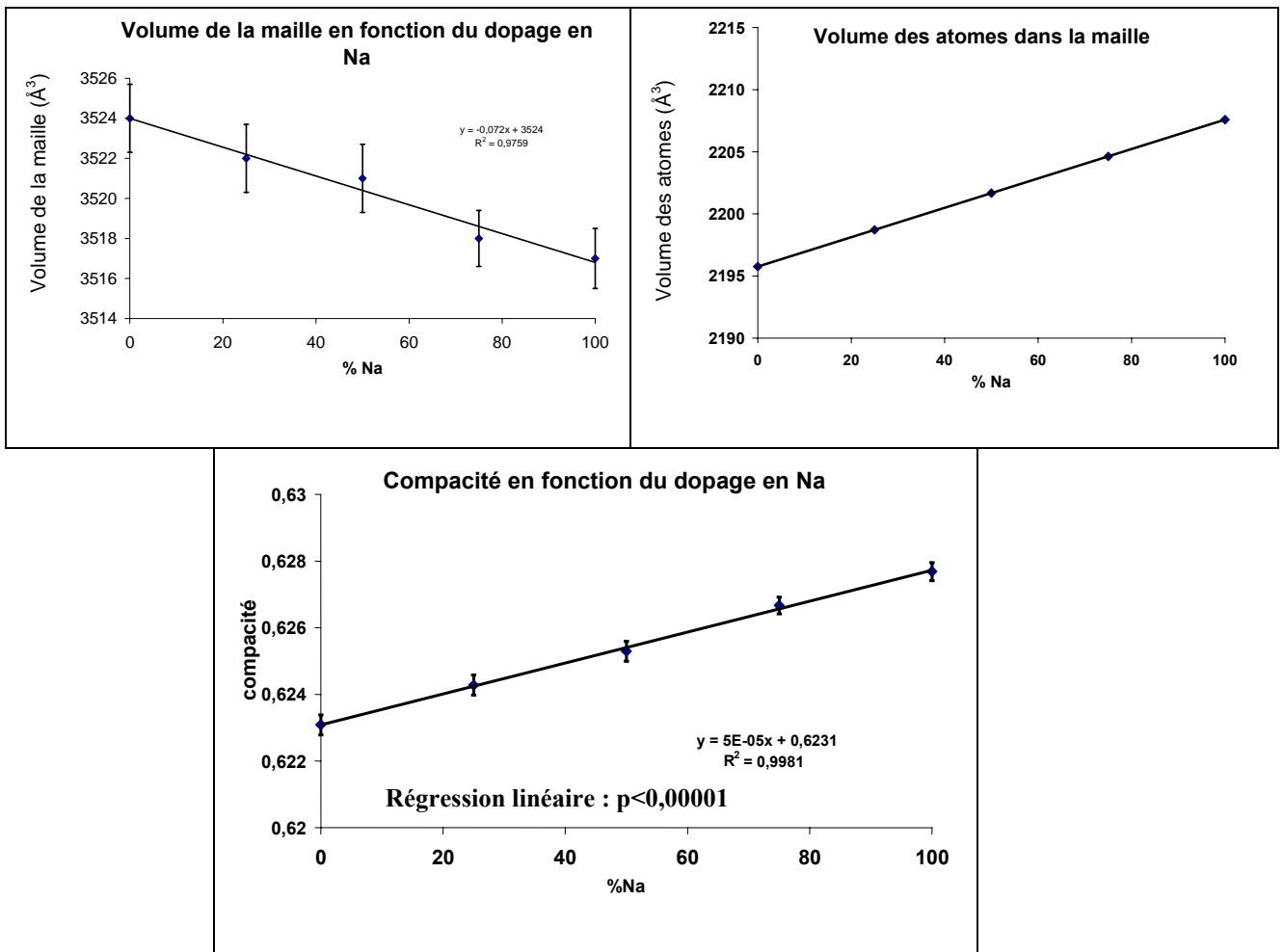


Figure 2-26: Compacité des β -TCP dopés au sodium

d) porosité

La porosité totale obtenue par MEB diminue avec l'incorporation en sodium (Figure 2-27).

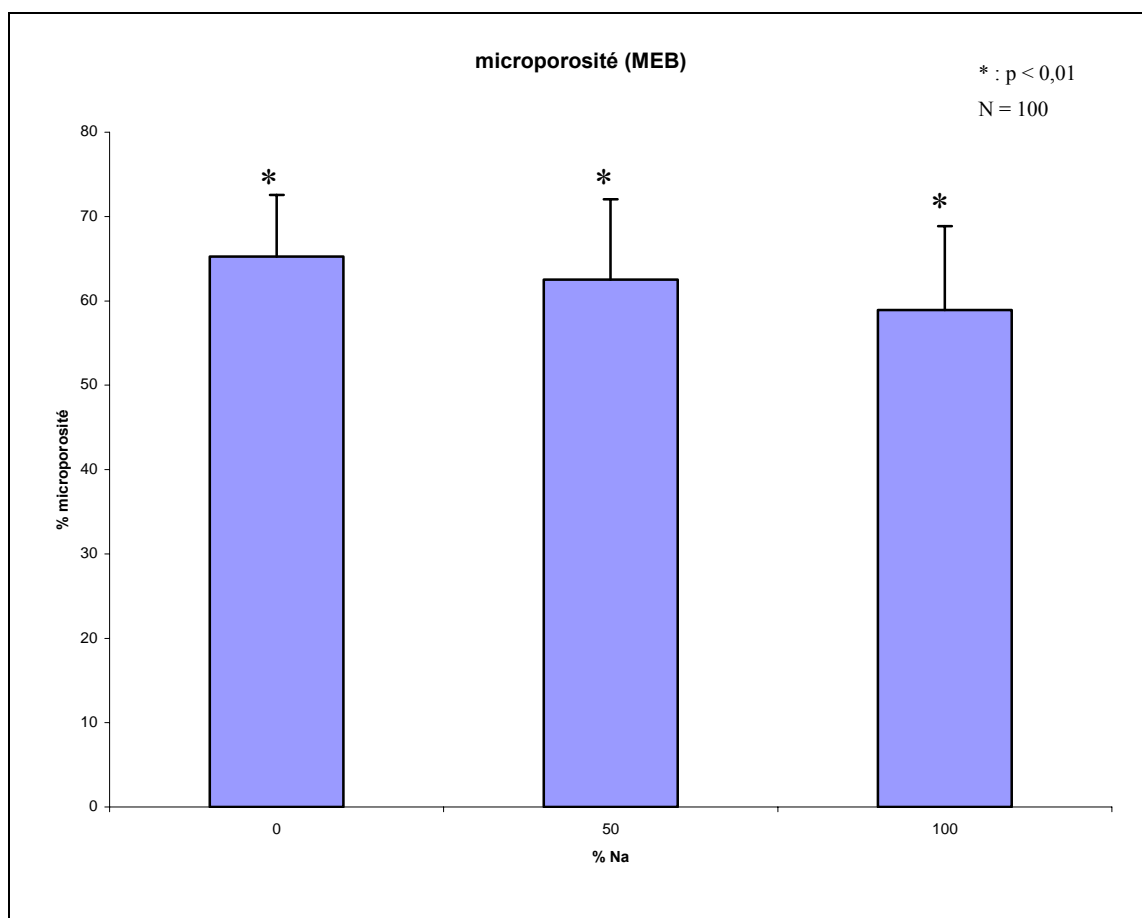


Figure 2-27 : Porosité des β -TCP $Ca_{10,5-x/2} Na_x(PO_4)_7$ (MEB)

Une étude statistique (test Anova) a été menée afin de vérifier si les valeurs de microporosités trouvées étaient significativement différentes. L'étude statistique indique que la microporosité déterminée par MEB est significativement différente pour les β -TCP sodés à 0%, 50% et 100% avec un seuil de confiance de 95%.

Les études de porosité au mercure montrent que les porosités totales obtenues ont des valeurs plus faibles que celles trouvées par MEB. Cependant, la tendance est la même : la porosité du β -TCP est supérieure à celle du $Ca_{10} Na(PO_4)_7$ (Tableau 2-10).

		Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
β-TCP	Porosité totale (%)	54,4	56,5	52,3
$Ca_{10}Na(PO_4)_7$	Porosité totale (%)	49,4	53,7	51,4

Tableau 2-10 : Porosité totale du β -TCP sodé et non-sodé (porosimétrie mercure)

La substitution partielle de calcium par du sodium provoque une diminution de la microporosité et une augmentation de la densité apparente des β -TCP. Ceci est peut être dû à une diminution de la température de frittage pour le $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ par rapport au β -TCP pur. Pour confirmer cette hypothèse, des essais de dilatométrie sont prévus.

Ceci peut expliquer en partie les résultats obtenus pour l'étude des propriétés mécaniques : une meilleure résistance en compression pour les β -TCP présentant une incorporation maximale de sodium.

La répartition des pores obtenue par porosimétrie mercure (Figure 2-28) montre que plus de 98% des pores ont un diamètre inférieur à 10 micromètres. Cependant, elle est différente en fonction de l'incorporation de sodium : il y a plus de pores inférieurs à un micromètre et moins de pores compris entre 1 et 10 micromètres dans le $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ que dans le β -TCP.

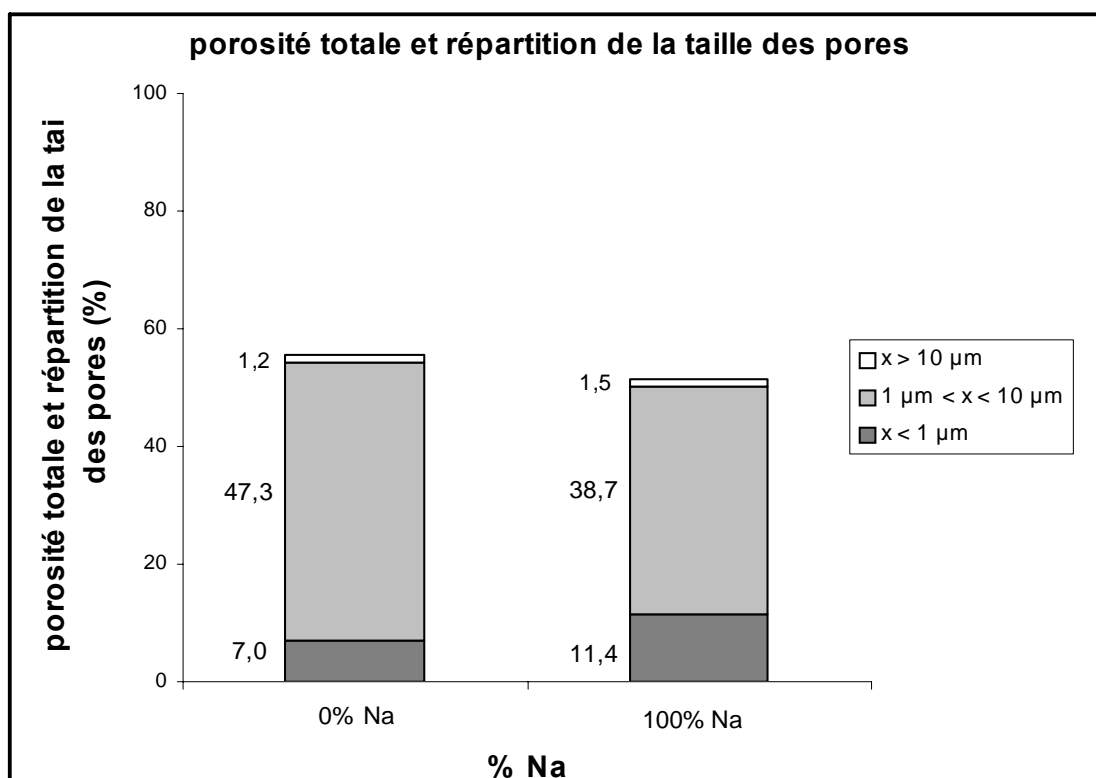


Figure 2-28 : Répartition de la taille des pores pour les β -TCP sodés et non-sodés, déterminée au porosimètre à mercure

2.2.2.8 Solubilité des β -TCP

Le but de cette étude était d'évaluer l'influence du sodium sur la solubilité des β -TCP synthétisés à une attaque acide.

Les expériences ont été effectuées sous faible agitation pour avoir une solution homogène et pour ne pas accélérer le phénomène de dissolution.

Sur les deux figures suivantes sont représentées les courbes de dissolution des β -TCP avec des taux d'incorporation en sodium différents, dans une solution tampon à $\text{pH} = 4,8$, pendant 6 heures et sous faible agitation. La Figure 2-29 concerne la libération des ions calcium et la Figure 2-30 celle des ions phosphate.

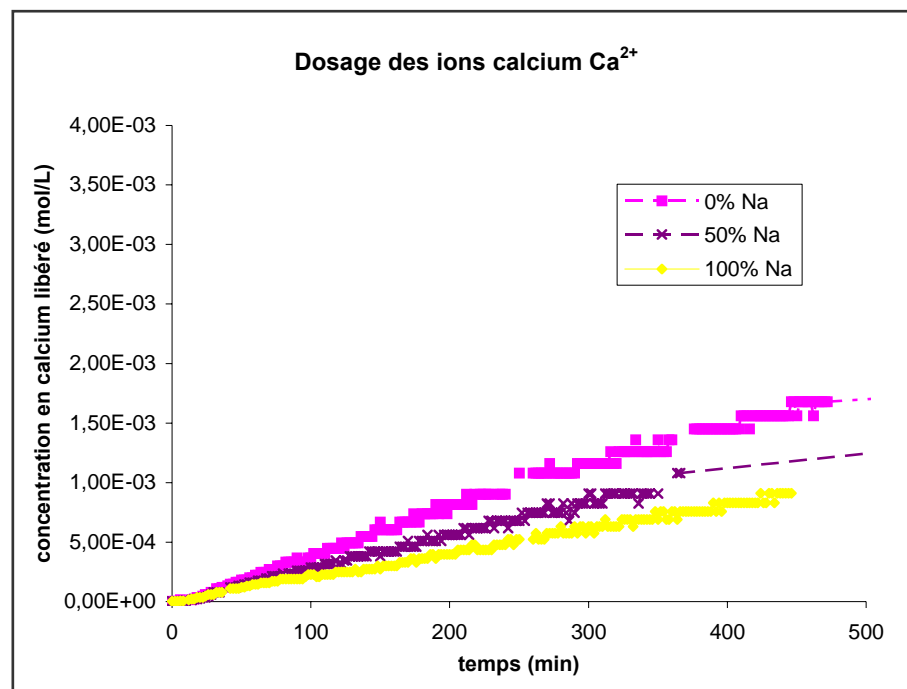


Figure 2-29 : Profil de libération des ions calcium des β -TCP dans une solution à $\text{pH} = 4,8$

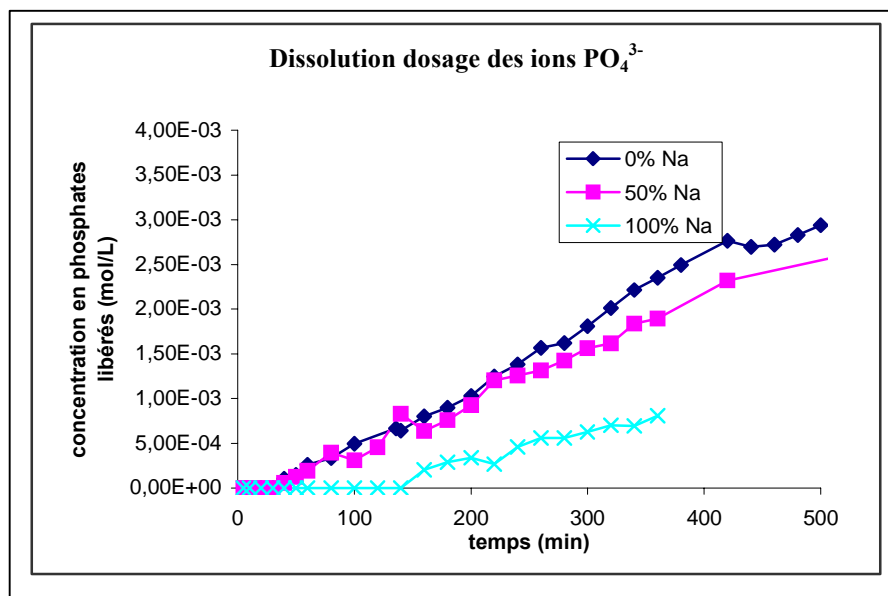


Figure 2-30 : Profil de libération des phosphates des β -TCP en solution à $\text{pH} = 4,8$

Les deux figures indiquent la même tendance : la solubilité des β -TCP sodés est plus faible que celle des β -TCP non-sodés.

La porosité diminue avec un taux de sodium plus important, ce qui rend les échanges avec la solution potentiellement plus difficiles. La diminution de la solubilité avec une substitution partielle d'ions calcium par du sodium peut être liée à cette variation de porosité.

2.2.2.9 Cytocompatibilité

La morphologie des ostéoblastes au contact des pastilles de β -TCP et de $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ a été évaluée par observation au microscope électronique à balayage après 48 heures de culture des MC3T3-E1. Les cellules au contact du β -TCP et du $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ présentent une morphologie étalée avec de larges prolongements cytoplasmiques. Il n'y a pas de différence morphologique observable pour les cellules cultivées au contact de ces deux matériaux (Figure 2-31).

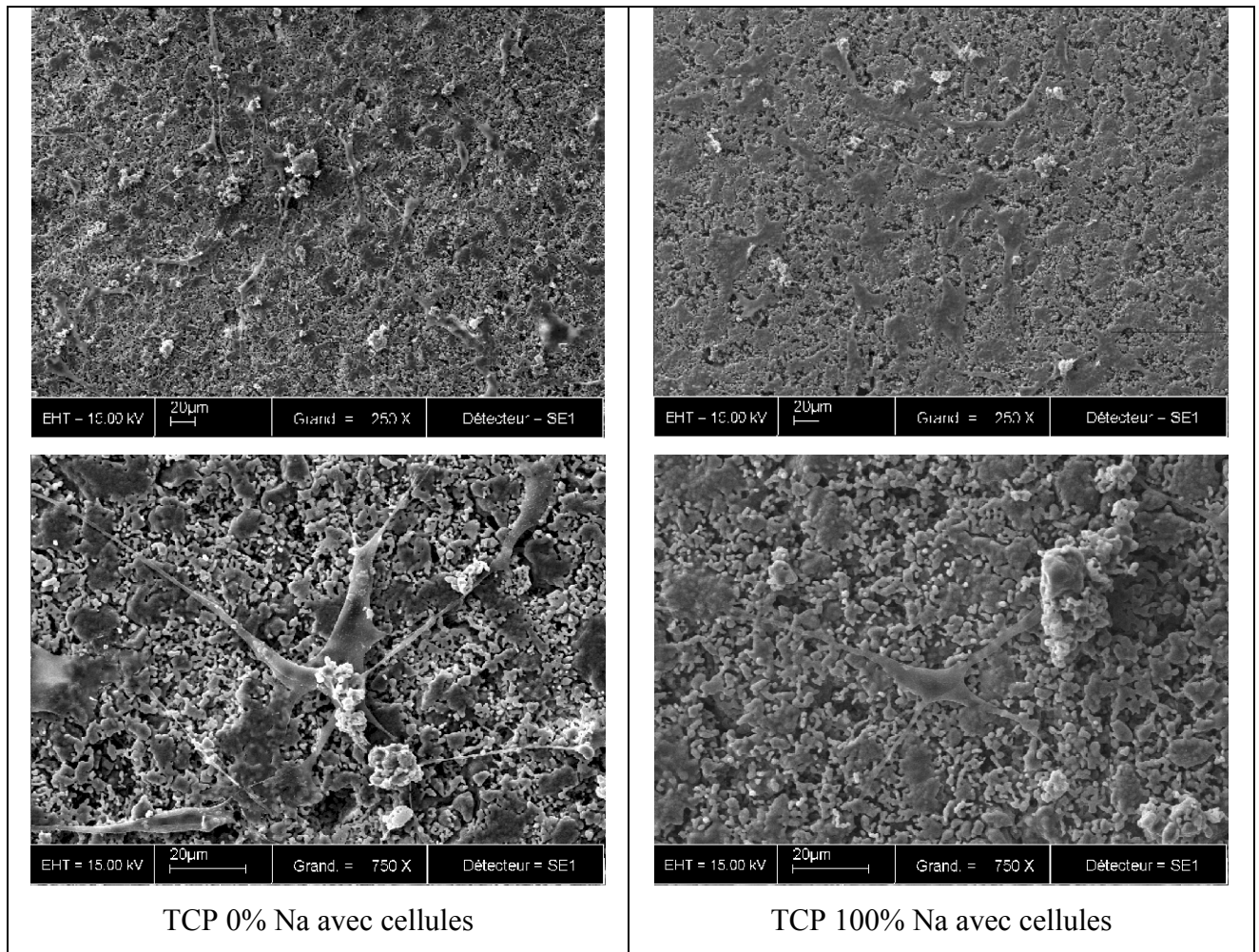


Figure 2-31 : Morphologie des cellules MC3T3-E1 au contact du β -TCP (gauche) et du $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ (droite), observées au MEB

La mesure de la viabilité des ostéoblastes a été déterminée par un dosage de l'activité MTS. A 14 jours de culture, la viabilité des MC3T3-E1 ne montre pas de différence significative entre les conditions du contrôle (cellules cultivées sur plastique) et les cellules cultivées sur les pastilles de β -TCP et de $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ (Figure 2-32).

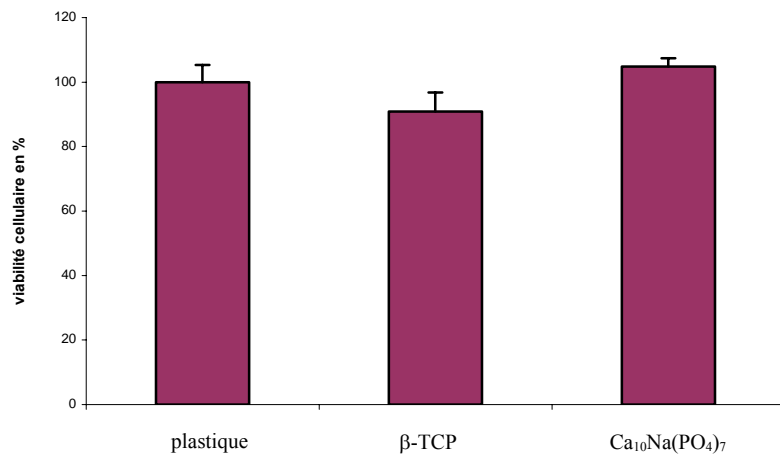


Figure 2-32 : Viabilité comparée des cellules MC3T3-E1 cultivées sur plastique (contrôle), sur β -TCP et sur $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$, après 14 jours (activité MTS)

Afin de vérifier l'expression de l'un des marqueurs de la différenciation ostéoblastique des MC3T3-E1, l'activité phosphatase alcaline a été mesurée.

Il n'existe pas de différence significative après 14 jours de culture entre les cellules cultivées sur les pastilles de β -TCP et celles cultivées sur les pastilles de $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ (Figure 2-33).

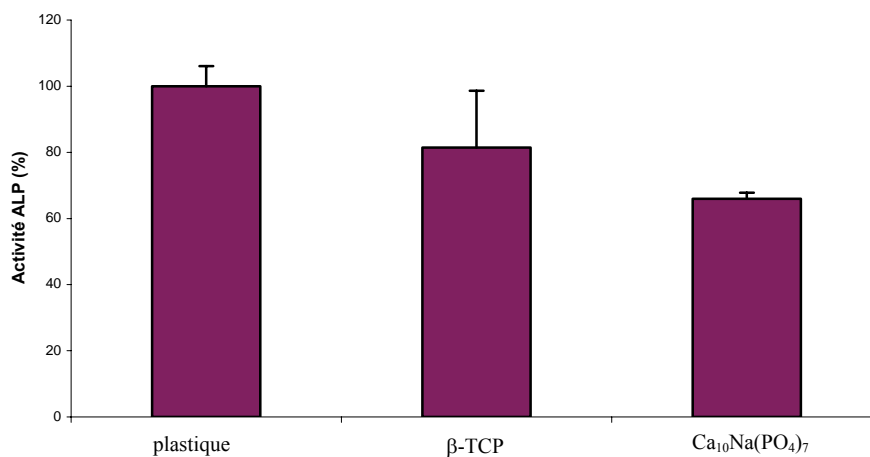


Figure 2-33 : Comparaison de l'activité phosphatase alcaline, marqueur de différenciation des ostéoblastes pour les cellules MC3T3-E1 cultivées sur plastique (contrôle), sur β -TCP et sur $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$, après 14 jours

Au cours de cette partie, il a été montré que le sodium provoquait une modification des paramètres de mailles du β -TCP en diminuant du paramètre c . De plus, l'incorporation du sodium au sein de la maille du β -TCP modifie ses propriétés mécaniques (multiplication par 3 de la résistance en compression). En outre, la présence du sodium ne modifie pas la cytocompatibilité du β -TCP.

Le β -TCP substitué par du sodium semble donc être un candidat potentiel pour des applications comme matériaux de comblement osseux. Pour valider cette hypothèse, des essais d'implantation chez le lapin de β -TCP sodé et non sodés sont actuellement en cours au sein du laboratoire.

**Chapitre 3 : Formation d'apatites
phosphocalciques par hydrolyse en milieu
ammoniacal : influence de la température,
du temps et de la pression autogène**

3.1 Introduction

Les phosphates de calcium biphasés (BCP) en hydroxyapatite et en phosphate tricalcique β sont des céramiques utilisées depuis de nombreuses années comme matériau de substitution osseuse. Ces BCP peuvent être obtenus par traitement thermique d'une Apatite Déficiente en Calcium (CDA). L'obtention des CDA peut être réalisée par différentes voies de synthèse, dont la décomposition / précipitation de précurseurs de calcium et de phosphate, méthode la plus étudiée dans la littérature [Andres-Verges, 2000; Kivrak, 1998; Kwon, 2003; LeGeros, 1991; Liou, 2004; Petrov, 2001; Raynaud, 2002; Slosarczyk, 1996; Vallet-Regi, 1997; Victoria, 2002].

L'obtention de CDA par hydrolyse en milieu basique d'un phosphate de calcium acide est une voie de synthèse peu décrite dans la littérature [De Maeyer, 1994; Dorozhkina, 2002; LeGeros, 1986a; Monma, 1987; Tung, 1985].

L'objectif de cette étude était de synthétiser des CDA de rapport Ca/P contrôlé à l'aide d'une méthode peu étudiée : l'hydrolyse en milieu ammoniacal de phosphate de calcium dihydraté (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). L'utilisation d'une solution de NH_4OH permet d'obtenir des CDA sans substitution cationique car, à cause de son important rayon ionique, l'ion NH_4^+ ne peut pas être incorporé au sein de la maille apatitique.

Trois paramètres ont été choisis comme variables :

- ~ la température de synthèse ;
- ~ le temps de réaction ;
- ~ la pression (les synthèses étant réalisées, soit dans un réacteur sous pression autogène, soit dans un système ouvert, à reflux).

Le rapport Ca/P des CDA, lié aux conditions de synthèse, a une influence importante sur les propriétés biologiques. Afin de déterminer l'influence des paramètres de synthèse sur le rapport Ca/P de l'apatite obtenue, ainsi que leurs éventuelles interactions, nous avons structuré notre expérience à l'aide d'un plan factoriel 2^3 du 1^{er} degré qui permet également de limiter le nombre de synthèses [Goupy, 1988; Stuart Hunter, 1985].

La taille des cristallites ainsi que la surface spécifique des apatites obtenues ont également été mesurées car ces caractéristiques ont une influence importante sur les propriétés de frittage et mécaniques des céramiques issues des CDA synthétisées.

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise à *Journal of Biomedical Materials Research*. Le manuscrit en anglais est annexé ci-après et fait l'objet d'une discussion en français en fin de chapitre.

**Calcium deficient apatites synthesized by ammonia
hydrolysis of DiCalcium Phosphate Dihydrate: influence of
temperature, time and pressure.**

(J Biomed Mater Res, soumis à publication)

J. M. Bouler, Equipe mixte INSERM 99-03, 1, place A. Ricordeau, 44042, Nantes Cedex 1,
France

jmbouler@sante.univ-nantes.fr

BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATES SYNTHESIZED BY AMMONIA HYDROLYSIS
OF DICALCIUM PHOSPHATE DIHYDRATE: INFLUENCE OF TEMPERATURE, TIME
AND PRESSURE.

Laetitia OBADIA^a, Thierry ROUILLON^a, Bruno BUJOLI^b, Guy DACULSI^a, Jean Michel
BOULER^{*a}

^a INSERM UMRS 99-03 'Ingénierie Ostéoarticulaire et Dentaire', Faculté de Chirurgie
Dentaire BP 84215, 44042, Nantes Cedex 01, France

^b CNRS UMR 6513 'Laboratoire de Synthèse Organique', Faculté des Sciences et Techniques
BP 92208, 44342 Nantes Cedex 03, France

ABSTRACT

Biphasic calcium phosphates (BCP) consisting of mixtures of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP) are widely used as bone substitutes. Several methods are developed to prepare BCP including solid state reaction, and aqueous reactions producing calcium deficient apatite (CDA) which have to be sintered above 800°C to give a BCP presenting a HA/ β -TCP ratio related to the Ca/P ratio of the CDA.

In this work, CDA were synthesized by ammonia hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) to obtain BCP without any extra-ionic substitution.

The influence of three parameters was studied: temperature of the reaction, time of the reaction and the reaction vessel. Experiments used a factorial design method allowing optimization of the number of experiments as well as the statistical analysis of results.

The crystal size of CDA was determined according to the Scherrer's formula and from Rietveld refinements taking into account of CDA anisotropy.

Factorial design results allow to describe HA% in BCP by a first order polynomial equation in the experimental area studied and showed an increasing percentage of HA in BCP with time and temperature of the reaction. Moreover, the type of reaction vessel (open / closed system) appeared to have a little influence on HA%.

Introduction

Biphasic Calcium Phosphate (BCP) ceramics are biocompatible and capable of binding chemically to bone. They are widely used as bone repair materials for human surgery^{1,2} because of their chemical composition similar to that of bone mineral³.

BCP consists in a mixture of hydroxyapatite (HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and tricalcium phosphate β (β -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). This material combines physico-chemical properties of these two components: good solubility of β -TCP to obtain local supersaturation in calcium and phosphorous ions along with nucleation capacity of HA to promote precipitation of biological apatite⁴.

The kinetic of bone resorption / substitution and the bioactivity of the implants can be controlled by turning the proportion of both HA and β -TCP in BCP, via the Ca/P ratio.

Several routes were studied to synthesize these BCP:

- ~ Mechanical mixing of HA and β -TCP in desired quantities;
- ~ Solid state reaction, consisting in a high temperature process of intimately homogenized mixtures of calcium and phosphate salts^{5,6};
- ~ Wet chemical methods, consisting in the synthesis of calcium deficient apatites ($\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$), which have to be sintered above 800°C to give BCP with the same Ca/P ratio as the former CDA. The co-precipitation from calcium and phosphate salts is the most currently studied method⁷⁻¹⁶.

The aim of our study was to synthesize CDA with controlled Ca/P ratios via an original method: hydrolysis of DiCalcium Phosphate Dihydrate (DCPD; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in aqueous ammonia solution¹⁷⁻²¹. The use of ammonia allows to obtain CDA free of cationic substitution because, in the apatitic lattice, NH_4^+ ion could not be incorporated owing to its large ionic radius.

Biological BCP properties strongly depend of the Ca/P ratio of CDA, which is related to synthesis parameters. It is also important to determine the influence of synthesis factors on phase composition and to give evidence eventual interactions between influential parameters. This is why a 2^k factorial design method, based on statistical analysis of results, was applied in this study²².

The crystallite size and specific surface area of the CDA were measured because these parameters have a great influence on the sintering behavior of CDA and then on the mechanical properties of the final BCP ceramics.

Materials and methods

1/ Synthesis of Calcium Deficient Apatite

Calcium-Deficient Apatite (CDA, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$) powders were obtained by hydrolysis of 40 g of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) powder (Merck, Darmstadt, Germany) in 500 mL of a 0.3 mol/L NH_4OH solution. This reaction was performed under gentle stirring. The influence of three parameters was studied: the temperature, reaction time and the pressure (table 1). Eight CDA were synthesized according to a factorial design.

The obtained CDA were sintered at 1000°C during 4 hours in air. After sintering, Biphasic Calcium Phosphates (BCP) were obtained with HA / β -TCP ratios depending on the Ca/P ratio of the initial CDA^{23,24}.

The study of the influence of the temperature of synthesis on the HA% of BCP was performed at: 50, 70, 90, 100, 150 and 200°C. The reaction was performed during 4 hours in a closed system.

2/ Physico-chemical analysis

CDA and BCP were studied by:

- Fourier Transformed Infrared spectroscopy (FTIR): pellets made of 1 mg of sample in 300 mg of KBr were prepared and spectra were carried out in a 400 and 4000 cm^{-1} spectral range with a 4 cm^{-1} resolution (128 scans) using a Nicolet Magnat II 550 FTIR spectrometer.
- X-Ray powder Diffraction (XRD): XRD patterns of BCP and CDA powders were recorded using a Philips PW 1830 generator equipped with a vertical PW 1050 ($\theta / 2\theta$) goniometer and a PW 1711 Xe detector. XRD parameters were recorded using the Ni filtered copper $\text{K}\alpha$ radiation in a step by step mode with the following parameters:
 - BCP: 2 θ initial: 10°, 2 θ final: 100° step 2 θ = 0.03°, time per step: 2.3 seconds
 - CDA : 2 θ initial: 8°, 2 θ final: 100° step = 0.02°, time per step: 10 seconds

The HA/ β -TCP ratios of the BCP was determined from X-Ray Diffraction measurements refined using the Rietveld method. XRD refinements were performed using the graphic user interface Winplotr and fullprof as Rietveld refinement software²⁵. The precision on the HA percentage was calculated using the formula : SD

* 3 * Scor, where SD is the standard deviation and Scor, a serial correlation coefficient²⁶.

The crystal size of CDA was determined from XRD pattern. The decrease of the crystal size causes an increase of the integral breadth β of the reflexion profile according to the Scherrer's formula²⁷:

$$\tau_{hkl} = (K\lambda)/((\beta^2 - \beta_0^2)^{1/2} * \cos\theta)$$

where: τ_{hkl} is the average crystallite size perpendicular to the hkl plan (in angstrom)

K is a shape constant equal to 0.94

λ is the CuK α radiation wavelength(in angstrom)

θ is the diffraction angle (in radian)

β is the integral breadth assimilated to the full width at half maximum of the CDA (in radian)

β_0 is the full width at half maximum of the LaB₆ (in radian)

Rietveld analysis were performed to determine lattice parameters, apparent sizes of crystallites and apparent microstrain from broadening effects on the diffraction profiles of the CDA samples. In order to obtain refined parameters related to significant physical parameters, all diffraction patterns were refined using, for the diffraction profile, the modified Thompson-Cox-Hastings (TCH) pseudo-Voigt function^{28,29}.

At first, to determine the instrumental contribution, LaB₆ powder (NIST SRM 660a), a well crystallized material, was used as reference in order to obtain the instrumental parameters (U_{inst} , V_{inst} , W_{inst} , X_{inst} , Y_{inst} , Z_{inst}) of the resolution profile function with the following angular dependence of the FWHM (full width at half maximum), for the Gaussian component ($H_{G(inst)}$) and for the Lorentzian component ($H_{L(inst)}$)^{25,30}:

$$H_{G(inst)} = (U_{inst} \tan^2\theta + V_{inst} \tan\theta + W_{inst})^{1/2}$$

$$H_{L(inst)} = X_{inst} \tan\theta + Y_{inst} / \cos\theta + Z_{inst}$$

Diffraction patterns of CDA samples were refined according to the following angular and hkl dependence of FWHM for the Gaussian component (H_G) and for the Lorentzian component (H_L) of the profile shape function of the hkl reflexions:

$$H_G = (U \tan^2\theta + V \tan\theta + W + I_G / \cos^2\theta)^{1/2}$$

$$H_L = X \tan\theta + [Y + F(S_Z)] / \cos\theta + Z_{inst}$$

Where $F(S_Z) = S_Z \sin\Phi$

With $F(S_Z)$: Anisotropic size broadening function corresponding to a model of cylindrical coherent domains of crystallites (needle-like shape) along the $[u_z, v_z, w_z]$ crystallographic direction.

S_Z : Refined anisotropic size broadening parameter

Φ : Acute angle between the scattering vector (h,k,l) and the crystallographic direction $[u_z, v_z, w_z]$ defining the axial direction of the needle-like shape of coherent domains.

$V = V_{inst}$ and $W = W_{inst}$

In this case, I_G and $[Y + F(S_Z) - Y_{inst}]$ represent respectively the crystallites size broadening effect on the Gaussian component and on the Lorentzian component of the reflexion profile.

In the same way, $(U - U_{inst})$ and $(X - X_{inst})$ represent respectively the microstrain broadening effect on the Gaussian component and on the Lorentzian component of the reflexion profile.

The broadening size contribution of the sample on the $[hkl]$ reflexion can be expressed as:

$$H_{G(size)} = (I_G / \cos^2\theta)^{1/2}$$

$$H_{L(size)} = [Y + F(S_Z) - Y_{inst}] / \cos\theta$$

In the same way, the broadening strain contribution of the sample can be expressed as:

$$H_{G(strain)} = [(U - U_{inst}) \tan^2\theta]^{1/2}$$

$$H_{L(strain)} = (X - X_{inst}) \tan\theta$$

The average apparent size of crystallites $\langle\tau\rangle$ according to a $[hkl]$ direction and the average apparent strain $\langle\varepsilon\rangle$ ($\Delta d/d$) were then respectively obtained from the contribution of size and strain parameters to the integral breadth according to the following relations:

$$\beta_{(size)} = (K_s \lambda) / (\langle\tau\rangle \cos\theta) \text{ (Scherrer's formula) }^{27}$$

$$\beta_{(strain)} = \langle\varepsilon\rangle K_d \tan\theta$$

Where K_s and K_d are constants set to 1 and λ is the wavelength of radiation.

In this case, $\langle \varepsilon \rangle$ corresponds to $\frac{1}{4}$ of the apparent strain defined by Stokes and Wilson³¹.

Owing to the thinner width of $00l$ reflexions in the diffraction patterns observed for the CDA samples, and taking the well known anisotropic character of apatite into account³²⁻³⁴, we introduced an anisotropic size model with a needle-like shape of coherent domains of crystallites along the $[001]$ direction of the apatite cell.

Any anisotropic micro strain model was introduced to refine all patterns of CDA samples.

Owing to a high asymmetry, the 100 reflexions were excluded from refinements leading to an excluded region between 8° and 13° (2θ). Asymmetry parameters were then refined and finally fixed to 0 owing to slightly negative values.

Moreover, owing to the anisotropic shape of crystallites, a preferred orientation contribution according to the $[001]$ direction has been refined using the March&Dollase's function³⁵ with a fraction of 100% of sample textured.

Structural parameters of CDA introduced in refinements were deduced from the structure of hydroxyapatite described in the hexagonal space group $P6_3/m$ ($n^\circ 176$) and determined by Kay et al³⁶.

- Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses of CDA were performed with a JEOL 1010 Microscope.
- Specific surface areas of CDA were determined from gas adsorption measurements according to the BET (Brunauer, Emmet and Teller) method using a Micromeritics® apparatus.

3/ Factorial design method (FDM)

To optimize the synthesis conditions of CDA, the influence of three factors on the HA percentage in BCP powders was evaluated:

F1: temperature of the reaction ($^\circ\text{C}$)

F2: time of the reaction (h)

F3: open or closed system

The results were analyzed with a Factorial design method to determine the influence of each parameter and the possible interactions between them.

Eight (2^3) CDA were synthesized according to a factorial design experiment as described in table 1 to obtain all possible combinations.

The validity of the design method was checked by synthesis of 5 CDA corresponding to the medium level parameters (85°C, 11 hours and closed system) to compare experimental and calculated average HA% in the resulting BCP.

Results

1/ Physico-chemical properties

Infrared absorption spectra of CDA and BCP did not show any absorption band corresponding to DCPD or pyrophosphates. XRD patterns of CDA before sintering are typical of apatitic structure. XRD patterns of all BCP exhibit hydroxyapatite and β tricalcium phosphate peaks and no crystalline impurity was detected.

Refinement parameters obtained from the Rietveld refinement of the XRD patterns of CDA (figure 1) are given in table 2. The crystallite sizes and strains determined from these refinements and from the FWHM of the (002) reflexion of CDA, calculated from the Scherrer's formula, are given in table 2.

Figure 2 shows typical TEM images of the synthesized CDA. They are formed of agglomerated particles with a needle-like shape.

The values of specific surface areas of CDA are ranging between 113 and 151 m²/g.

The influence of temperature on the HA% in BCP is presented in figure 3.

2/ Determination of HA% of BCP

The HA percentage was calculated for each sample from the Rietveld refinement of the XRD patterns (figure 3).

The obtained HA% are summarized in table 3.

The error on the HA%: ε (HA) is given by the following equation:

$$\varepsilon \text{ (HA)} = t_{(0.05,4)} * \text{SD} = 2.776 * 1.42 = 3.94$$

where: SD represents the standard deviation estimated from the medium level samples (n=5) and $t_{(0.05,4)}$ the Student value for a 95% confidence limit.

3/ Influences and interactions

The matrix of influences and interactions is presented in table 4.

The influence (I_i) or interaction (I_{ij}) factor were given by the condition $|I| > \Delta I$, where ΔI is the error-type value. ΔI was deduced from the following equation:

$$\Delta I = 3 * SD * t_{(0.05,4)} / N^{1/2}$$

$$\Delta I = 3 * 1.42 * 2.776 / 8^{1/2}$$

$$\Delta I = 4.18$$

$|I| > 4.18$ was also the criterion to determine significant influence or interaction factor.

A positive influence value indicated that an increase in the parameter produced a higher HA % in BCP (and a negative influence value that an increase produced a lower HA %).

According to table 4, the major influences on the HA % in BCP were the temperature and the reaction time. Pressure (open or closed system) appeared to have little influence on the HA %. The results didn't show any significant interaction between all the factors studied.

4/ Validity of the Factorial Design Model

The comparison between the calculated averages (CA) of the eight HA% measurements (N = 8) with the experimental average (EA) of five measurements (n = 5) at a medium point given by the mathematical model allowed to determine the validity of the factorial design model:

$$CA = CM \pm \varepsilon (HA) / N^{1/2} = 32.17 \pm 1.29$$

$$EA = EM \pm \varepsilon (HA) / n^{1/2} = 32.67 \pm 1.63$$

As the two average values were not significantly different, the mathematical model was considered valid and the following equation was proposed to describe the HA%:

$$HA\% = CA \pm \sum_i f_i(F_i)$$

where $f_i(F_i)$ is a first-order polynomial function depending on significant influences among the three factors (F1, F2 and F3) of the factorial design model²².

Our model equation became:

$$HA \% = 32.17 + 9.39 X1 + 5.04 X2$$

With $X1 = (\text{temperature} - 85) / 15$

$$X2 = (\text{time} - 11) / 7$$

$$HA \% = -48.31 + 0.85 \text{ Temperature} + 0.72 \text{ time}$$

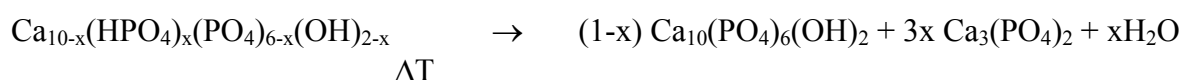
With $70^\circ\text{C} < T < 100^\circ\text{C}$

$$4 \text{ hours} < t < 18 \text{ hours}$$

Therefore, the HA% isoresponse lines can be drawn (Fig. 4) to describe BCP in this experimental domain.

Discussion

Calcium phosphate compounds in aqueous solution maintained at $\text{pH} > 4.5$ are known to transform gradually into calcium deficient apatite (CDA) with increasing Ca/P ratio until stoichiometric hydroxyapatite is obtained³⁷. Our main purpose in this work was to study the influence of specific parameters on the kinetics of such a transformation. In order to follow the kinetic of the reaction, we measured the Ca/P ratio of all CDA which is assumed to remain the same that the Ca/P ratio of for the corresponding mixture of HA and β -TCP obtained after the following thermal treatment at 1000°C ^{23,24}:



The HA and β -TCP percentage in BCP were determined from a Rietveld refinement analysis. This method exploits the whole pattern profile, to refine the structure, and to determine with precision the lattice parameters and the percentage of crystalline phases. The crystallite sizes of CDA were determined from two methods: Rietveld refinements and application of Scherrer's formula for single peak profile refinement.

The application of the Scherrer 's formula requires to determine the profile of only a single peak reflexion. This is a disadvantage for the determination of crystallite size from single peak fitting when the interesting reflexion is overlapped with the nearest reflexions. In the case of CDA, only the crystallite size along the c-axis seems easily accessible.

A Rietveld refinement seems to be a good method to determine crystallite sizes and strains. This method uses the whole diffraction pattern profile and gives access to the FWHM of all reflexions. The Refinements were carried out taking into account of CDA anisotropy. The crystallite sizes of CDA according to the $\langle \text{hk}0 \rangle$ and the $\langle 00l \rangle$ directions are accessible by this method.

First, we observed that the chemical yield was independent of our experimental conditions. This could be explained by the strongly basic solutions we used for the hydrolysis: none of the pH values measured at the end of the reaction (figure 3) were found to be acidic, enough to lead to CDA dissolution during the process.

IR and XRD analyses proved that only apatitic phases were formed. In particular, no pyrophosphate bands (720 cm^{-1}) were detected in BCP powders, giving evidence that all DCPD transformed into apatite. Ammonia aqueous solutions were preferred to other strong basic ones in order to avoid any extra ionic apatitic substitution as observed in previous studies (e.g. Na^+ provided by NaOH ³⁸). Indeed the NH_4^+ size (ionic radius: 1.45) does not

allow any Ca^{2+} substitution (ionic radius: 1.00). Moreover, the excess of ammonia can be easily evacuated by thermal treatment at the end of the synthesis. Nevertheless, as NH_3 is a volatile compound, specific cautions have to be taken in order to avoid any leak in the experiments run under reflux. For this reason we decided to compare a standard reflux system with a closed steel reactor where hydrolysis occurs under autogenous pressure.

The FDM mathematical model provided a suitable method to determine the influence of the three parameters considered here on the HA content in BCP powders. First, no significant difference was found between the experimental mean and the value predicted at the medium-level. Secondly, the validation of the FDM theory required the absence of any very marked interactions between the factors studied²². As these two conditions were met, it would appear that our first-order polynomial equation described the HA content in BCP correctly in the experimental area studied. Of course, the theory does not allow any extrapolation to chemical composition response outside this domain.

The three parameters studied can be classified according to their influence on the HA content response (table 4). The two major factors are respectively temperature and time of reaction.

On the other hand, no significant difference was observed between a reflux system or a closed reactor. The latter is thus preferred because any leak of NH_3 can be controlled by pressure measurements. Furthermore, all the studied parameters were found independent with no significant interaction between themselves.

The following obtained equation model ($\text{HA}\% = -48.31 + 0.85 T + 0.72t$) allows then to calculate the Ca/P ratio of the synthesized apatites in the studied experimental domain.

The isoresponse line diagram (Figure 4) represents various CDA described by our experimental design, thus allowing to optimize hydrolysis conditions in order to synthesize powders with the desired Ca/P ratio.

In the domain covered by our FDM, the transformation of DCPD into HA was not complete (Ca/P max around 1.59). For this reason, we chose to investigate further the main influencing factor (temperature) on the formed apatite Ca/P ratio. The related HA% was found to increase with temperature according to a logarithmic function (figure 3) while the final pH of the reaction was found to decrease linearly ($r^2=0.99$). Calculations gave a theoretical temperature of 424.54°C to obtain pure HA in our conditions of time and NH_4OH concentration conditions. At this temperature, the final pH should be around 7.5 which is still favorable to HA formation.

In agreement with previous studies,¹³ the temperature also appears to facilitate the crystal growth at the expense of specific surface.

Conclusion

This study confirms the marked influences of temperature and time conditions on the stoichiometry of the formed CDA and then on the HA/ β -TCP ratio of the final BCP. Factorial design method allowed to describe this chemical response by a simple first-order polynomial equation in the experimental area studied. This work allowed to valid the use of method to determine influence of experimental parameters on apatite synthesis, optimizing the number of experiments.

Rietveld refinements were carried out taking into account the CDA anisotropy. Crystallite sizes of CDA along $\langle 00l \rangle$ and $\langle hk0 \rangle$ directions are also accessible. Rietveld refinement seems to be a reliable method to determine crystallite size of CDA.

Furthermore, the correlation found between the pH measured at the end of the hydrolysis and the final Ca/P ratio allows us to predict and to control *in situ* the stoichiometry of the formed apatite. Knowing that biological apatites are essentially non-stoichiometric and carbonate⁴, this study represents a step to model the formation of these mineral phases. It will now be necessary to incorporate biological ions (CO_3^{2-} , Mg^{2+} ...) in the reaction to be closer to the biological apatite formation conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS “Programme Matériaux Nouveaux, Nouvelles Fonctionnalités” and Région Pays de Loire “Programme Biomatériaux S3”.

References

1. Cavagna R, Daculsi G, Bouler J. Macroporous calcium phosphate ceramic: a prospective study of 106 cases in lumbar spinal fusion. *J Long Term Eff Med Implants* 1999;9:403-12.
2. Ransford A, Morley T, Edgar M, Webb P, Passuti N, Chopin D, Morin C, Michel F, Garin C, Pries D. Synthetic porous ceramic compared with autograft in scoliosis surgery. A prospective, randomized study of 341 patients. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:13-8.
3. Rey C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials* 1990;11:13-5.
4. Daculsi G, Bouler J-M, LeGeros RZ. Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int Rev Cytol* 1997;172:129-91.
5. Toriyama M, Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti G, Piancastelli A. Synthesis of Hydroxyapatite-Based Powders by Mechano-Chemical Method and their Sintering. *J Eur Ceram Soc* 1996;16(4):429-436.
6. Jinawath S, Sujaridworakun P. Fabrication of porous calcium phosphates. *Mater Sci Eng: C* 2002;22(1):41-46.
7. Andres-Verges M, Fernandez-Gonzalez C, Martinez-Gallego M, Solier J, Cachadina I, Matijevic E. A new route for the synthesis of calcium deficient hydroxyapatite with low Ca/P ratio: both spectroscopic and electric characterization. *J Mater Res* 2000;15(11):2526-2533.
8. Kivrak N, Tas AC. Synthesis of calcium hydroxyapatite - tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior. *J Eur Ceram Soc* 1998;81(9):2245 - 52.
9. Kwon S-H, Jun Y-K, Hong S-H, Kim H-E. Synthesis and dissolution behaviour of beta-TCP and HA / beta-TCP composite powders. *J Eur Ceram Soc* 2003;23(7):1039 - 1045.
10. LeGeros RZ. Calcium phosphate in oral biology and medicine. Switzerland; 1991.
11. Liou S-C, Chen S-Y, Lee H-Y, Bow J-S. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. *Biomaterials* 2004;25(2):189-196.

12. Petrov OE, Dyulgerova E, Petrov L, Popova R. Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics. *Materials Letters* 2001;48(3-4):162-167.
13. Raynaud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials* 2002;23(4):1065-1072.
14. Slosarczyk A, Slosarczyk E, Stobierska E, Paszkiewicz Z, Gawlicki M. Calcium phosphate materials prepared from precipitates with various calcium:phosphorous molar ratio. *J Am Ceram Soc* 1996;79(10):2539 - 44.
15. Vallet-Regi M, Rodriguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite. *Solid State Ionics* 1997;101-103(Part 2):1279-1285.
16. Victoria EC, Gnanam FD. Synthesis and characterization of biphasic calcium phosphate. *Trends biomater. Artif. Organs.* 2002;16(1):12 - 14.
17. De Maeyer EAP, Verbeeck RMH, Naessens DE. Optimization of the preparation of Na⁺- and CO₃²⁻-containing hydroxyapatite by the hydrolysis of monetite. *J Cryst Growth* 1994;135(3-4):539-547.
18. Dorozhkina EI, Dorozhkin SV. Mechanism of the solid-state transformation of a calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) into biphasic calcium phosphate (BCP) at elevated temperature. *Chem Mater* 2002;14:4267 - 4272.
19. LeGeros RZ. Variability of HAP/b-TCP in sintered "apatites". *J Dent Res* 1986;65S:292.
20. Monma H, Kamiya T. Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite. *J Mater Sci* 1987;22:4227 - 4250.
21. Tung MS, Chow LC, Brown WE. Hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate in the presence or in absence of calcium fluoride. *J Dent Res* 1985;64(1):2-5.
22. Stuart Hunter J. Statistical design applied to product design. *J Qual Technol* 1985;17(4):210-221.
23. Ishikawa K, Ducheyne P, Radin S. Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis. *J Mater Res: Mat in Med* 1993;4:165 - 168.
24. Toth JM, M. HW, Hubbard WG, Brantley WA, Lynch KL. Determination of the ratio of HA/TCP mixtures by X-ray diffraction. *J Applied Biomater* 1991;2:37 - 40.

25. Rodriguez-Carvajal J, Roisnel T. Fullprof.98 and WinPLOTR: New Windows 95/NT application for diffraction. Commission for powder diffraction, international union of crystallography 1998;newsletter n°20.
26. Berar JF, Lelann P. E.S.D.'s and estimated probable error obtained in Rietveld refinement with local correlation. *J Appl Cryst* 1991;24:1-5.
27. Scherrer P. *Nachr. Gött* 1918;2:98-100.
28. Thompson, Cox, Hastings. *J Appl Cryst* 1987;20:79.
29. Young RA, Desai P. *Arch. Nauk Mater.* 1989;10:71-90.
30. Rodriguez-Carvajal J. FULLPROF: A Program for Rietveld Refinement and Pattern Matching Analysis. 1990; Toulouse, France. p 127.
31. Stokes AR, Wilson AJC. *Proc. Phys. Soc. London* 1944;56:174-181.
32. Baig AA, Fox JL, Young RA, Wang Z, Hsu J, Higuchi WI, Chhetry A, Zhuang H, Otsuka M. Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters. *Calcif Tissue Int* 1999;64(5):437-49.
33. Psycharis V, Kalamakis N, Boukos C, Trapalis C, Bourlinos AK, M. a. *Mater Sci Forum* 2001:759-764.
34. Young RA. the rietveld method; 1993.
35. Dollase WA. *J Appl Cryst* 1986;19:267-272.
36. Kay MI, Young RA, Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* 1964;204(12):1050-1052.
37. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates. Amsterdam; 1994.
38. Bouler JM, LeGeros RZ, Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. *J Biomed Mater Res* 2000;51(4):680-4.

Figures

Table 1: Experimental matrix

Table 2: Crystal size of the prepared CDA

Table 3: HA% for the eight samples and the medium points

Table 4: Matrix of the influences and the interactions

Figure 1: Pattern profile refined by a Rietveld method analysis of CDA 8 (100°C, 18 hours in closed system)

Figure 2: TEM observation of CDA

Figure 3: Influence of the temperature used for the synthesis on the HA% of BCP and the final pH of the reaction

Figure 4: Diagram of HA% isoresponse lines

Table 1: Experimental matrix

Sample	Temperature of synthesis F1	Time of synthesis F2	open / closed system F3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
Level -1	70°C	4 hours	Open system
Level 1	100°C	18 hours	Closed system

Table 2: Rietveld refinement and crystallite sizes (Rietveld and Scherrer)

Sample	LaB ₆	CDA 1	CDA 2	CDA 3	CDA 4	CDA 5	CDA 6	CDA 7	CDA 8	50°C, 4 hours	200°C, 4 hours
a (in Å)	4.156415(1)	9.4477(4)	9.4406(3)	9.4460(4)	9.4330(2)	9.4477(4)	9.4378(3)	9.4448(4)	9.4325(2)	9.4516(4)	9.4231(1)
c (in Å)	-	6.8747(3)	6.8731(2)	6.8740(3)	6.8729(2)	6.8745(3)	6.8726(2)	6.8741(3)	6.8729(2)	6.8754(3)	6.8723(1)
U _{inst} or (U - U _{inst})	0.0057(6)	0.314(74)	0.168(50)	0.262(63)	0.219(35)	0.219(69)	0.193(46)	0.287(69)	0.126(32)	0.532(95)	0.090(8)
V _{inst} or (V - V _{inst})	-0.0083(7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
W _{inst} or (W - W _{inst})	0.0047(2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
X _{inst} or (X - X _{inst})	0*	0.235(46)	0.214(38)	0.223(42)	0.028(30)	0.228(45)	0.107(34)	0.276(44)	0.074(28)	0.310(52)	0*
Y _{inst} or (Y - Y _{inst})	0.0455(4)	0.094(14)	0.077(11)	0.081(13)	0.089(9)	0.073(13)	0.089(11)	0.079(13)	0.078(9)	0.061(15)	0.057(3)
Z _{inst}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I _G	0	0.061(3)	0.046(2)	0.054(3)	0.032(2)	0.063(3)	0.055(2)	0.056(3)	0.045(2)	0.075(4)	0.0294(7)
Sz needle <001>	-	11.46(15)	10.05(12)	11.34(13)	8.29(9)	11.71(14)	9.28(11)	10.76(14)	7.62(8)	12.59(16)	4.39(5)
G <001>	-	1.016(2)	1.005(2)	1.014(2)	1.005(2)	1.014(2)	1.005(2)	1.013(2)	1.000(2)	1.027(2)	0.997(1)
d: App size <hk0> (in Å)	∞	71	82	73	95	72	85	76	101	68	157
L: App size <00l> (in Å)	∞	241	283	263	304	254	256	261	284	247	361
L/d	-	3.39	3.45	3.6	3.2	3.53	3.01	3.43	2.81	3.63	2.30
Isotropic Strain : ε <hkl> (.10 ⁴)	0	37.18(7)	29.31(4)	34.37(7)	22.98(2)	35.79(4)	25.36(4)	38.12(5)	19.92(5)	48.54(11)	13.92(2)
Nb of Ref.	20	204	204	204	204	204	204	204	204	204	204
Scor	2.69	2.46	2.46	2.64	2.84	2.66	2.84	2.55	2.52	2.30	2.31
RB %	3.15	2.52	2.80	2.71	2.82	2.61	2.58	2.51	2.71	2.39	2.57
Rexp %	4.85	8.10	7.94	7.91	7.77	7.98	7.88	7.93	7.75	8.00	7.48
Rwp %	12.6	10.30	10.2	10.2	10.1	10.2	9.93	10.1	9.75	10.2	9.41

* refined and then fixed to 0 - number in () correspond to ESD

Scherrer crystal size <002> (Å)		231	273	248	321	233	270	243	303	214	430
--	--	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

Table 3: HA% for the eight samples and the medium points

sample	1	2	3	4	5	6	7	8
HA%	19.8	32.7	26.2	46.9	19.3	36.8	25.9	49.9

Medium points	5 measurements performed at 85 °C during 11 hours in a closed system				
HA%	31.5	34.0	34.2	31.1	32.6

Table 4: Matrix of the influences and the interactions

Influences			1 st -order interactions		
I1	I2	I3	I12	I23	I13
9.38875	5.04375	0.78125	1.77875	-0.11	0.961

I_i: influence of factor i; I_{ij}: interactions between factors i and j

Figure 1: Example of pattern profile refined by Rietveld method analysis of the CDA 8 (100°C. 18 hours in closed system)

CDA 8

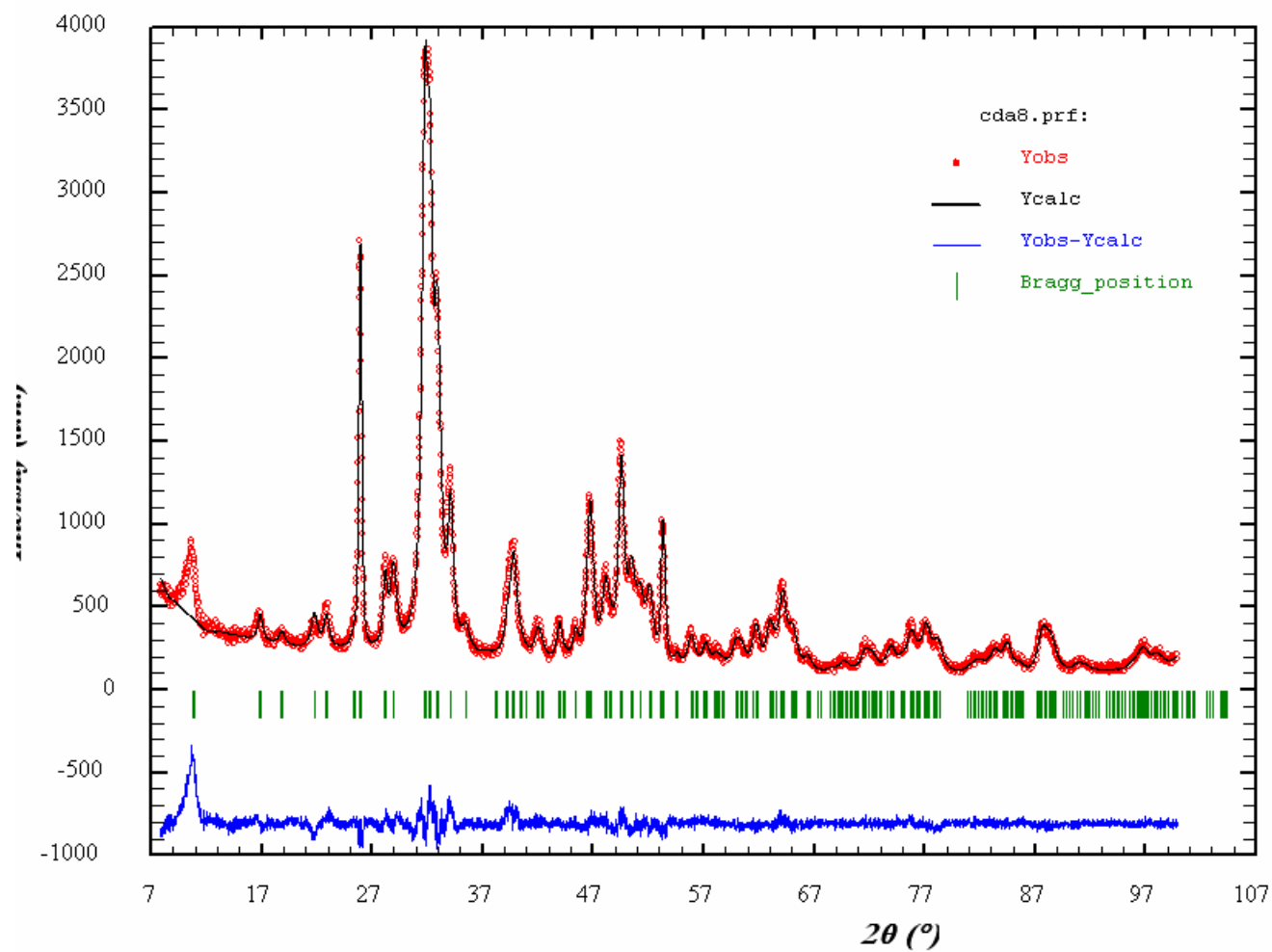
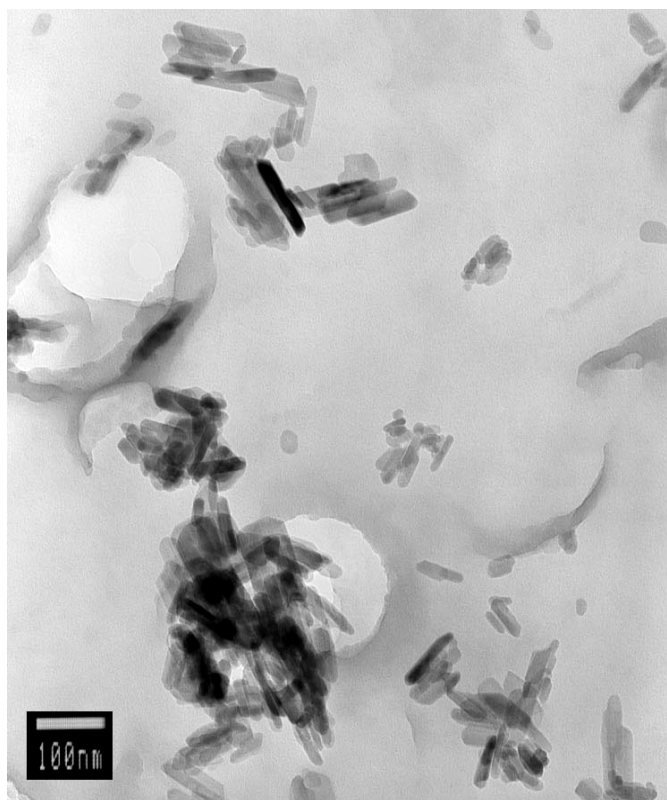
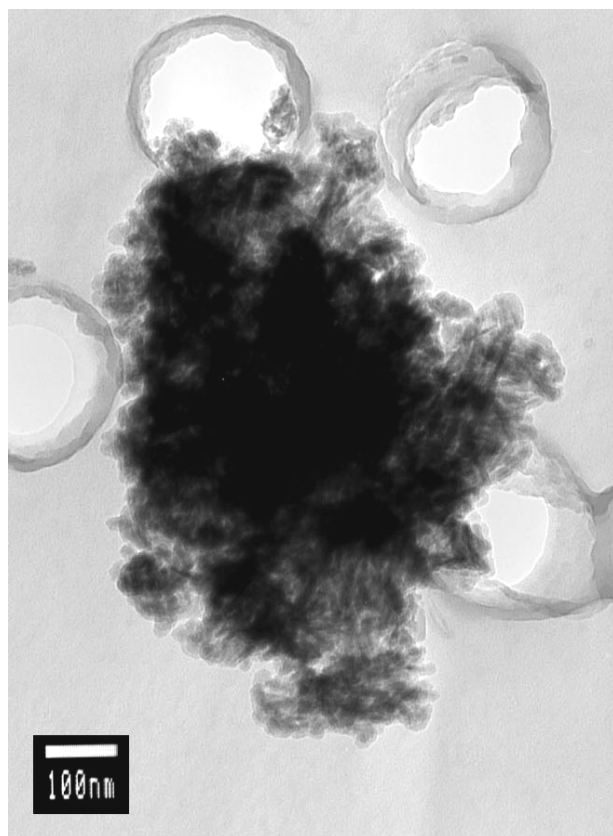


Figure 2: TEM observations of CDA

CDA: 200°C. 4 hours. closed system



CDA: 50°C. 4 hours. closed system

Figure 3: Influence of the temperature of the synthesis on the HA% of BCP and the final pH of the reaction

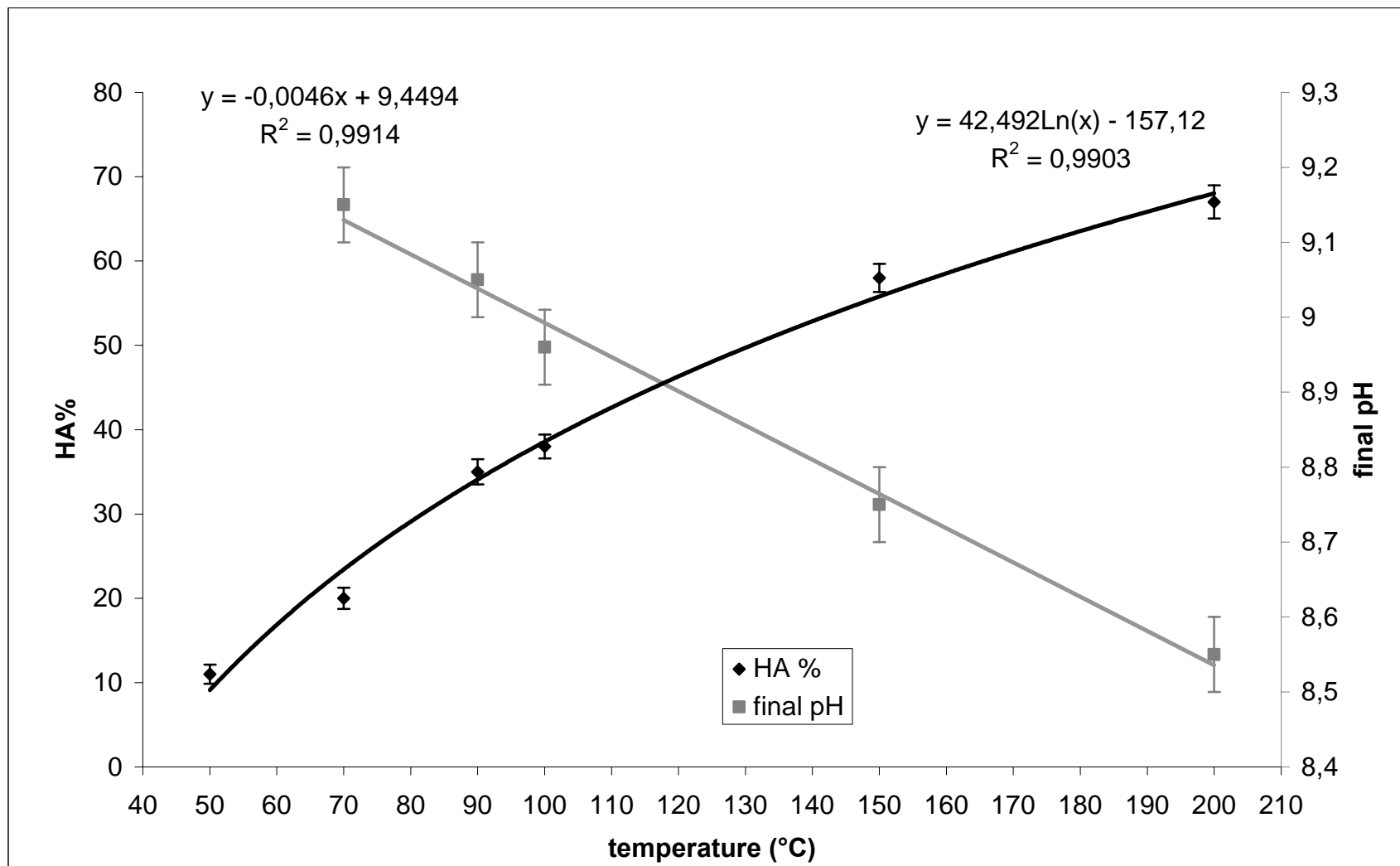
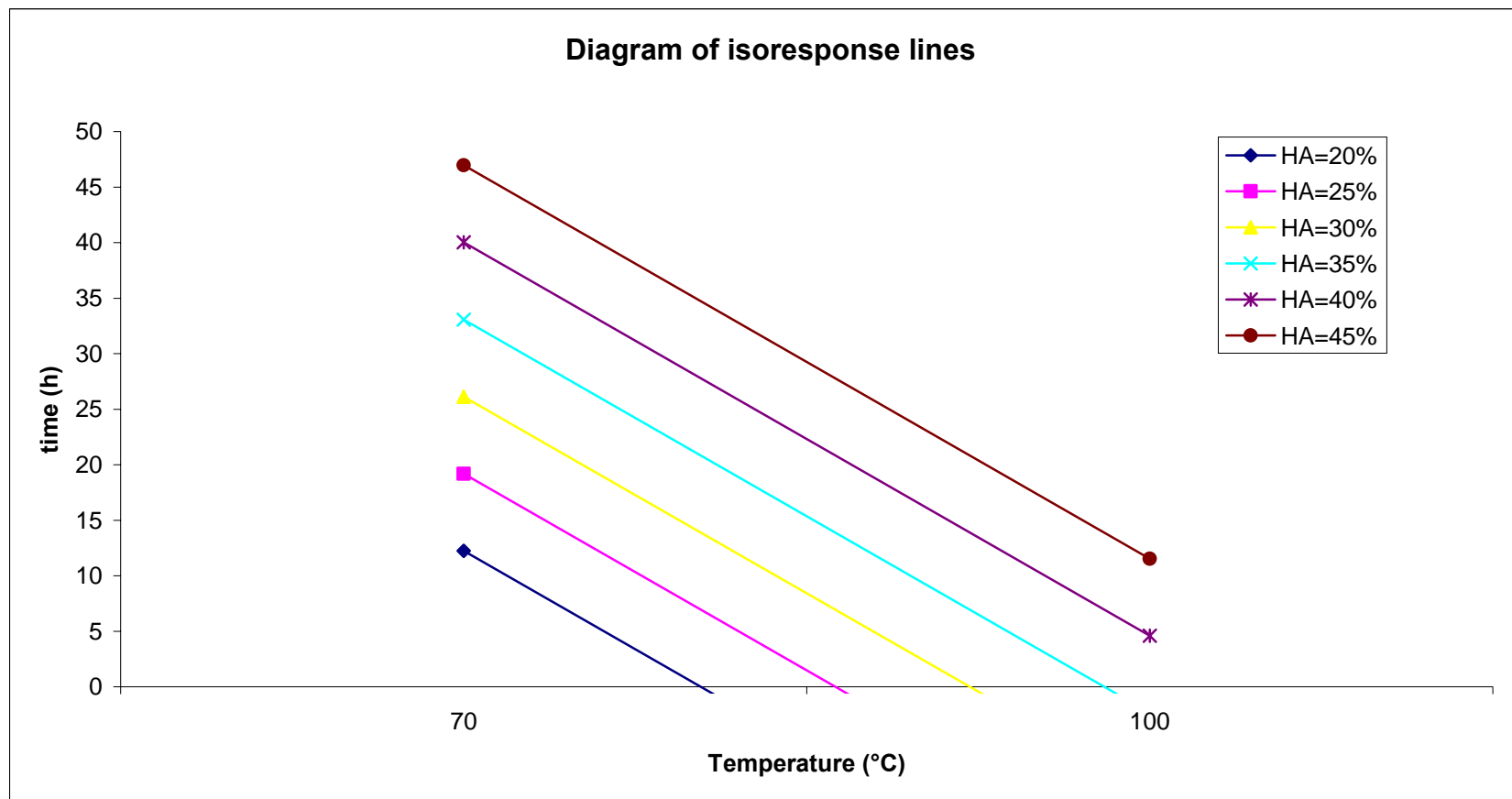


Figure 4: Diagram of HA% isoresponse lines



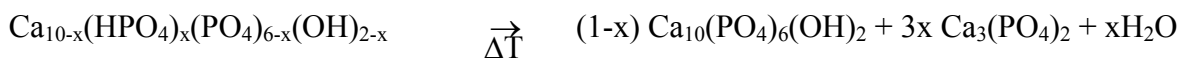
3.2 Discussion / Conclusion

Dans cette étude, nous avons étudié une voie de synthèse originale des CDA : l'hydrolyse en milieu basique de phosphate dicalcique dihydraté.

Notre objectif principal était d'évaluer l'impact des paramètres de synthèse sur la cinétique de formation des apatites pour ce type de réaction.

A pH supérieur à 4,5 le phosphate de calcium le plus stable thermodynamiquement est l'hydroxyapatite. L'hydrolyse de phosphate de calcium en hydroxyapatite est plus ou moins rapide en fonction des conditions de synthèse.

Dans le but de suivre la cinétique de la réaction, le rapport Ca/P des CDA a été mesuré. Les apatites ont été calcinées à 1000°C afin de donner un mélange d'HA et de β -TCP :



La littérature précise qu'à cette température, une CDA forme un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique β dans un rapport Ca/P identique à celui de la CDA [Ishikawa, 1993; Toth, 1991].

$$\text{Ca/P}_{\text{atomique}} = \frac{\left(\frac{10 \times \% \text{HA}_{\text{massique}}}{M_{\text{HA}}} + \frac{3 \times \% \beta\text{-TCP}_{\text{massique}}}{M_{\beta\text{-TCP}}} \right)}{\frac{6 \times \% \text{HA}_{\text{massique}}}{M_{\text{HA}}} + \frac{2 \times \% \beta\text{-TCP}_{\text{massique}}}{M_{\beta\text{-TCP}}}}$$

Avec M_{HA} : masse molaire de l'hydroxyapatite (1004,64 g.mol⁻¹) et $M_{\beta\text{-TCP}}$: masse molaire du phosphate tricalcique β (310,18 g.mol⁻¹).

Les pourcentages de β -TCP et d'HA ont été déterminés en affinant les diffractogrammes des BCP par la méthode de Rietveld. Cette méthode permet d'exploiter tout le profil du diagramme et de déterminer avec précision les paramètres de maille, ainsi que la proportion des différentes phases cristallines.

Les CDA synthétisées, observées par MET, sont formées de particules agglomérées en forme d'aiguille. La taille des cristallites a été déterminée par deux méthodes : l'affinement par la méthode de Rietveld et l'application de la formule de Scherrer à partir d'un seul pic du diffractogramme. Cette dernière méthode ne permet donc pas de déterminer la taille des

crystallites à partir d'un pic si celui-ci est superposé avec un autre. Ainsi, dans le cas des CDA seule la taille des cristallites le long de l'axe c semble facile à évaluer.

L'affinement par la méthode de Rietveld semble une méthode efficace pour déterminer la taille des cristallites. Cette méthode permet en effet d'avoir accès aux largeurs à mi-hauteur de toutes les réflexions. Ainsi, pour l'analyse des CDA, les tailles des cristallites selon la direction $\langle 00l \rangle$ et $\langle hk0 \rangle$ peuvent être déterminées.

Le pH mesuré à la fin de la réaction d'hydrolyse de chacune des synthèses est basique, empêchant ainsi une dissolution de l'apatite durant la réaction. De plus, ces conditions de pH sont favorables à la formation d'hydroxyapatite qui est la phase la plus stable en solution basique.

La spectroscopie d'absorption infrarouge permet de détecter la présence éventuelle de DCPD qui n'aurait pas complètement réagi. En effet, sur les spectres des CDA, la bande à 720 cm^{-1} est attribuable au DCPD. Dans aucune des CDA synthétisées, il n'a été détecté de DCPD. Tout le DCPD présent en début de réaction a donc réagi.

Les diagrammes de diffraction des rayons X des CDA synthétisées étaient caractéristiques d'une structure apatitique. Aucune autre phase cristalline n'a été détectée.

Le choix de la solution basique est important pour maîtriser l'incorporation d'ions au sein de l'apatite. En effet, des études réalisées sur la synthèse d'apatites par hydrolyse de DCPD par NaOH ont montré la présence d'ions Na^+ au sein des CDA obtenues [Bouler, 2000]. De plus, nous avons montré dans le 0 2 que le sodium pouvait s'incorporer au sein du β -TCP obtenu à partir de CDA synthétisées par hydrolyse de DCPD par NaOH.

Dans le but d'obtenir une apatite exempte de substitution cationique, nous avons choisi d'utiliser une solution de NH_4OH pour l'hydrolyse du DCPD. En effet, la taille de l'ion NH_4^+ (1,42 Å) semble trop importante pour s'incorporer au sein de la maille apatitique (le rayon ionique du calcium étant de 1,0 Å). De plus, l'excès d'ammoniaque issu de la synthèse peut être facilement éliminé par traitement thermique. Cependant, l'ammoniac étant un composé très volatil, des attentions particulières doivent être prises afin d'éviter des pertes lors de réaction à reflux. Pour cette raison, nous avons décidé de comparer un système à reflux standard avec un système fermé, dans laquelle l'hydrolyse a lieu sous pression autogène.

L'utilisation d'un plan factoriel permet d'optimiser les résultats en minimisant le nombre de synthèses réalisées. La méthode des plans d'expérience est un modèle mathématique fiable afin d'évaluer l'influence des trois paramètres (temps de réaction, température de synthèse, pression) sur le rapport Ca/P des apatites obtenues.

Ce modèle mathématique a été validé en comparant la valeur moyenne expérimentale avec celle calculée par l'équation mathématique au centre du domaine, considérée comme étant le point de plus grande variabilité. Ces deux valeurs n'étant pas significativement différentes, l'équation issue du plan factoriel 2^3 a été considérée comme prédictive. Ce modèle ne permet cependant aucune extrapolation du rapport Ca/P en dehors du domaine étudié.

Les trois paramètres étudiés peuvent être classés selon leur influence sur le pourcentage d'HA dans les BCP correspondant aux CDA synthétisées. Les deux facteurs les plus influents sont la température de synthèse et le temps de réaction : le pourcentage d'HA dans les BCP augmente lorsque la température de la réaction est plus élevée ou lorsque le temps de la réaction augmente. Il a également été montré que, dans le domaine étudié, la température a une influence plus importante sur le pourcentage d'HA dans les BCP que le temps de réaction.

Il a cependant été observé que la pression n'a pas d'influence sur le rapport Ca/P de la CDA obtenue. Il est ainsi plus simple de réaliser les synthèses dans un réacteur sous pression que dans un système à reflux afin de minimiser les pertes d'ammoniac, qui est un composé très volatil.

Il a également été montré que les paramètres étudiés sont indépendants les uns des autres. Il n'y a donc pas d'interaction entre la température de synthèse, le temps de réaction ou encore la pression de synthèse.

Il a été possible de déterminer une équation qui permet de prédire, dans le domaine étudié, le pourcentage d'HA sur les BCP issus des CDA synthétisées en fonction de la température de synthèse (T) en °C, et du temps de réaction (t) en heures :

$$\% \text{ HA} = - 48,31 + 0,85 T + 0,72 t$$

Dans le domaine couvert par notre plan d'expérience, la transformation du DCPD en hydroxyapatite n'était pas complète (le rapport Ca/P maximal des CDA obtenues était de 1,59). Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier davantage l'impact du paramètre ayant le plus d'influence sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées (la température). Le pourcentage d'HA semble évoluer en fonction de la température selon une loi

logarithmique, tandis que le pH final de la réaction diminue linéairement en fonction de la température. Le pourcentage maximal obtenu a été de 67% d'HA pour une température de 200°C. Les calculs ont donné une température théorique de 424°C pour obtenir une hydroxyapatite pure dans nos conditions de temps de synthèse et de concentration en NH_4OH . A cette température, le pH final devrait être autour de 7,5, pH qui reste favorable pour une formation d'apatite stoechiométrique.

Les phosphates de calcium biphasés obtenus par hydrolyse de DCPD par NH_4OH ont des valeurs de rapport Ca/P se situant dans la gamme classiquement observée pour les phosphates de calcium utilisés en chirurgie orthopédique.

Il a été montré que la température semble avoir une grande influence sur la taille des cristallites de CDA pour des durées de synthèse équivalentes. En effet, plus la température de synthèse est élevée, plus la taille des cristallites est importante.

Les résultats obtenus pour les surfaces spécifiques des CDA montrent que cette valeur diminue lorsque la température de synthèse et le temps de réaction augmentent. Ceci est en accord avec les études précédentes réalisées sur des réactions de décomposition / précipitation [Raynaud, 2002].

Cette étude confirme les influences importantes que la température de synthèse et le temps de réaction ont sur la stoechiométrie des apatites formées et donc sur le rapport HA/ β -TCP des BCP formés.

Ce travail a permis de décrire cette réponse chimique par une équation du premier degré prédictive dans le domaine expérimental étudié, et ainsi de valider le recours aux plans factoriels pour étudier l'influence des paramètres de synthèses sur la formation d'apatites.

Cette étude a également montré que l'affinement par la méthode de Rietveld semble être efficace pour déterminer la taille des cristallites de CDA en tenant compte de leur anisotropie.

De plus, la corrélation mise en évidence entre le pH final de la réaction et le rapport Ca/P nous permet de prédire et de contrôler la stoechiométrie de la CDA synthétisée.

Les apatites biologiques étant connues pour être non stoechiométriques et carbonatées, cette étude représente une première étape dans la formation de ces phases minérales. Il serait intéressant d'incorporer des ions tels que les ions CO_3^{2-} , les ions Na^+ , ou encore les ions Mg^{2+} afin de se rapprocher des conditions de formation des apatites biologiques.

**Chapitre 4 : Hydrolyse en milieu basique
de DCPD par voie NH_4OH ou NaOH**

4.1 Introduction

La synthèse d'Apatites Déficiées en Calcium (CDA) est une première étape classique pour obtenir des Phosphates de Calcium Biphases (BCP). Il apparaît de plus que les CDA, plus proches de la structure des apatites biologiques, semblent avoir des propriétés *in vivo* d'ostéoconduction et de résorption / substitution intéressantes [Bourgeois, 2003].

Nous avons montré dans le chapitre précédent (chapitre 3) l'influence de la température ainsi que du temps de réaction sur le rapport Ca/P des apatites obtenues par hydrolyse de DCPD par NH_4OH .

Nous avons démontré en outre que le sodium, élément présent dans les apatites biologiques, améliorerait les propriétés mécaniques des β -TCP, constituant des BCP, et ne semblait pas modifier les propriétés biologiques (chapitre 2).

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre était d'étudier la réaction d'hydrolyse de DCPD par NaOH par comparaison avec NH_4OH dans le but d'obtenir des CDA sodées, qui après traitement thermique donnerait naissance à des céramiques biphases intégrant du sodium. Les paramètres de la réaction (réactifs utilisés, température, pH ...) ont été étudiés avec attention car ils ont une influence importante sur les propriétés des apatites obtenues (rapport Ca/P, taille des cristallites...).

Les paramètres de synthèse étudiés ont été :

- ~ La nature de la base (NaOH ou NH_4OH) et particulièrement l'influence du contre ion choisi (NH_4^+ ou Na^+)
- ~ La concentration de la base utilisée.
- ~ La température de la réaction
- ~ Le temps de la réaction

L'influence de ces paramètres expérimentaux sur les apatites formées a été étudiée (substitution en ions HPO_4^{2-} et / ou CO_3^{2-} , paramètres de maille, rapport Ca/P, taille des cristallites, morphologie des cristallites, surface spécifique, densité).

Les premiers résultats obtenus nous ont amenés à étudier plus en détail l'influence de la concentration et de la température de réaction sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées.

Les propriétés de la CDA ont une influence sur les interactions entre le matériau obtenu et les cellules. Il est donc très important de maîtriser l'impact que peuvent avoir les paramètres de synthèse sur la nature de l'apatite obtenue. En effet, les différences observées sur les apatites déficientes en calcium vont de plus se répercuter sur les BCP obtenus après traitement thermique.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Synthèses

Le mode de synthèse utilisé pour obtenir les apatites déficientes en calcium a été l'hydrolyse en milieu basique d'un phosphate de calcium acide : le phosphate dicalcique dihydraté ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; DCPD).

La réaction s'effectue en milieu hétérogène (suspension aqueuse).

Le rapport volume de la réaction sur masse de DCPD a été constant pour toutes les synthèses : respectivement 500 mL et 40 grammes.

La synthèse a été réalisée sous pression autogène dans un réacteur (Equilabo, Parr instrument Co., model n° 4523) sous agitation constante, à une température T maintenue durant un temps t.

Lorsque la réaction a été arrêtée, la suspension de phosphate de calcium a été rincée avec 1,5 litre d'eau déminéralisée (3 fois le volume réactionnel). La poudre obtenue a ensuite été séchée durant 48 heures dans une étuve maintenue à 37 °C.

Les CDA obtenues ont ensuite été calcinées à 1000°C durant 4 heures afin d'obtenir les BCP correspondants.

a) Une série de synthèses (Tableau 4-1) a été réalisée afin de déterminer l'influence sur la nature de la CDA obtenue (rapport Ca/P, surface spécifique, taille des cristallites, densité ainsi que morphologie des cristaux) :

- ~ De la température de la réaction
- ~ Du temps de la réaction
- ~ De la nature de la base utilisée (NaOH ou NH_4OH)
- ~ De la concentration de la base

Synthèse	Nature de la base	Concentration de la base	Température (°C)	Temps (heures)
CDA A	NH_4OH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	50	4
CDA B	NH_4OH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	200	4
CDA C	NaOH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	50	4
CDA D	NaOH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	200	4
CDA E	NH_4OH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	100	4
CDA F	NH_4OH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	100	18
CDA G	NaOH	3 mol.L^{-1}	100	4
CDA H	NaOH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	100	4
CDA I	NaOH	$0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	100	18
CDA J	NH_4OH	3 mol.L^{-1}	100	4

Tableau 4-1 : Conditions de synthèse des CDA A à J

b) L'influence de la température de réaction sur le rapport Ca/P des apatites déficientes en calcium synthétisées a été suivie (Tableau 4-2).

Paramètre constant : temps = 4 heures			
Base NH_4OH [NH_4OH] = $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	Base NaOH [NaOH] = $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$	Base NaOH [NaOH] = $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$	Base NaOH [NaOH] = $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$
50°C	50°C	50°C	50°C
70°C	70°C	70°C	70°C
90°C	90°C	90°C	90°C
100°C	100°C	100°C	100°C
150°C	150°C	150°C	150°C
200°C	200°C	200°C	200°C

Tableau 4-2 : Condition de synthèse des CDA avec comme paramètre variable la température de réaction

c) L'influence de la concentration de la base ajoutée sur le rapport Ca/P des apatites obtenues a ensuite été étudiée plus en détail (Tableau 4-3).

Paramètres constants : température = 90°C Temps = 4heures	
Base utilisée NH_4OH (concentration en $mol.L^{-1}$)	Base utilisée $NaOH$ (concentration en $mol.L^{-1}$)
0,12	0,3
0,15	0,35
0,2	0,4
0,3	0,5
0,5	0,6
2	1
5	2
7,5	3
10	4

Tableau 4-3 : Condition de synthèse des CDA avec comme paramètre variable la concentration en base ajoutée

4.2.2 Caractérisation

4.2.2.1 Pureté

La pureté des CDA obtenues (et des BCP correspondants) a été évaluée par spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier et par diffraction des rayons X.

Pour analyser les phosphates de calcium en spectroscopie d'absorption infrarouge, des pastilles composées de 1 mg de poudre d'échantillon (CDA ou BCP) et de 300 mg de KBr anhydre ont été réalisées. Les spectres ont été tracés à partir de 128 acquisitions du signal sur une largeur spectrale allant de 400 à 4000 cm^{-1} . Un spectromètre MAGNA IR 550 série II, Nicolet a été utilisé. Les contributions de la vapeur d'eau et du dioxyde de carbone ont été minimisées par un système de purge à sec.

Les diffractogrammes des CDA et des BCP ont été effectués à l'aide d'un diffractomètre de rayons X composé d'un générateur PW1830, d'un goniomètre PW1050 et d'un détecteur PW1711.

Les conditions d'acquisition des diffractogrammes des CDA et des BCP sont résumées dans le Tableau 4-4.

	Conditions d'acquisition (CDA)	Conditions d'acquisition (BCP)
2 θ initial	8	10
2 θ final	100	100
Pas (2 θ)	0,02	0,03
Temps par pas (sec)	10	2,3
Temps total d'acquisition	12 h	1 h 55

Tableau 4-4 : Conditions d'acquisition des diffractogrammes RX pour les CDA et les BCP

4.2.2.2 Rapport Ca/P

Chaque CDA a été frittée à 1000°C pour obtenir un BCP avec deux phases cristallines : l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique β . Afin de déterminer le rapport Ca/P du BCP ainsi obtenu, une étude en diffraction des rayons X a été réalisée : le rapport Ca/P avant et après frittage de la CDA reste inchangé [Ishikawa, 1993; Toth, 1991] :

$$Ca/P_{\text{atomique}} = \left(\frac{10 \times \%HA_{\text{massique}}}{M_{HA}} + \frac{3 \times \% \beta - TCP_{\text{massique}}}{M_{\beta-TCP}} \right) \bigg/ \left(\frac{6 \times \%HA_{\text{massique}}}{M_{HA}} + \frac{2 \times \% \beta - TCP_{\text{massique}}}{M_{\beta-TCP}} \right)$$

Avec M_{HA} : masse molaire de l'hydroxyapatite (1004,64 g.mol⁻¹) et $M_{\beta-TCP}$: masse molaire du phosphate tricalcique β (310,18 g.mol⁻¹).

Les proportions des phases cristallines au sein des BCP (HA et β -TCP) ont été calculés par affinement par la méthode de Rietveld [Vallet-Regi, 1997; Pena, 2003].

Les erreurs sur le pourcentage d'hydroxyapatite ($\varepsilon(\%HA)$) déterminé au sein des BCP issus des CDA synthétisées sont données par la relation suivante :

$$\varepsilon(\%HA) = 3 * SD * \Sigma_{\text{cor}} \text{ [Berar, 1991]}$$

avec SD : écart type ; Σ_{cor} : coefficient de corrélations sérielles

4.2.2.3 Paramètres de maille

L'affinement par la méthode de Rietveld des diagrammes RX des apatites synthétisées permet de déterminer les paramètres de maille mais également la taille moyenne apparente des cristallites.

Les diagrammes des CDA ont été affinés selon le protocole décrit dans le chapitre 3.

4.2.2.4 Morphologie des cristallites

La morphologie des cristallites des apatites synthétisées a été observée à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage à effet de champ JSM 6300 de JEOL après métallisation des CDA à l'or / palladium.

4.2.2.5 Surface spécifique

La surface spécifique des CDA a été déterminée selon la méthode BET (Brunauer, Emmet and Teller) [Brunauer, 1938] à l'aide d'un appareil ASAP 2010 (Micromeritics, France).

4.2.2.6 Densité vraie

La densité des β -TCP a été déterminée à l'aide d'un pycnomètre à hélium (AccuPyc 1330, Micromeritics).

4.2.2.7 Taille des cristallites

Dû au caractère anisotrope des CDA, la taille des cristallites doit être déterminée suivant les directions $\langle 001 \rangle$ (L) et $\langle hk0 \rangle$ (d).

La taille des cristallites peut être obtenue à l'aide de la formule de Scherrer à partir du diffractogramme de l'échantillon étudié. En effet, la largeur des raies β_{sample} est due aux microcontraintes ainsi qu'à la taille des cristallites

$$\beta_{\text{sample}} = \frac{K\lambda}{T_{hkl} \cos \theta} + 4\varepsilon \tan \theta \quad \text{équation 1}$$

avec : β_{sample} : largeur de la raie à mi-hauteur de l'échantillon analysé

K : constante de forme (ici égale à 0,94)

T_{hkl} : taille des cristallites moyennes apparentes au plan hkl (en Å)

λ : longueur d'onde $CuK\alpha$ (en Å)

θ : angle de diffraction en radian

$\varepsilon = \Delta d/d$: quantifie les fluctuations d'une distance inter-réticulaire qui peut être supposée varier de façon équiprobable entre deux valeurs limites $d-\Delta d$ et $d+\Delta d$

Dans l'équation 1 : $\frac{K\lambda}{T_{hkl} \cos \theta}$ est la composante due à la taille des cristallites

$4 \varepsilon \tan \theta$ est la composante due aux microcontraintes

A) La largeur à intégrale peut être déterminée en la mesurant sur les diffractogrammes.

Dans ce cas, la taille des cristallites (T_{hkl}) peut être déterminée par les relations suivantes, en négligeant les microcontraintes :

$$T_{hkl} = \frac{K\lambda}{\cos \theta \sqrt{\beta_{mesuré}^2 - \beta_{instr}^2}}$$

B) La taille des cristallites, utilisant la formule de Scherrer, peut également être déterminée par affinement par la méthode de Rietveld (Chapitre 3) en affinant tout le profil de la CDA. Dans ce cas, l'affinement tient compte à la fois des microcontraintes, et également de la taille des cristallites.

Les cristaux de CDA ont été observés à partir des clichés réalisés en Microscopie Electronique à Transmission sur les CDA A et B.

4.3 Résultats

4.3.1 Pureté des CDA / BCP

4.3.1.1 Spectroscopie d'absorption infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge des CDA sont caractéristiques des spectres d'apatites :

- ~ 3572 cm^{-1} : vibration des OH^-
- ~ $1150 - 1000 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$
- ~ $1000 - 950 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$
- ~ $650 - 500 \text{ cm}^{-1}$: $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$

Aucun spectre d'absorption infrarouge ne montre la présence de bande d'absorption correspondant à du DCPD dans les CDA ou à des pyrophosphates (720 cm^{-1}) dans les BCP.

Sur les spectres d'absorption infrarouge des CDA obtenues par hydrolyse en milieu basique de DCPD par NH_4OH , nous remarquons un pic large et peu intense vers 860 cm^{-1} sans noter la présence de pic entre 1500 et 1400 cm^{-1} (Figure 4-1). Ce pic est donc dû à la présence de groupements hydrogénophosphates (HPO_4^{2-}) au sein des apatites.

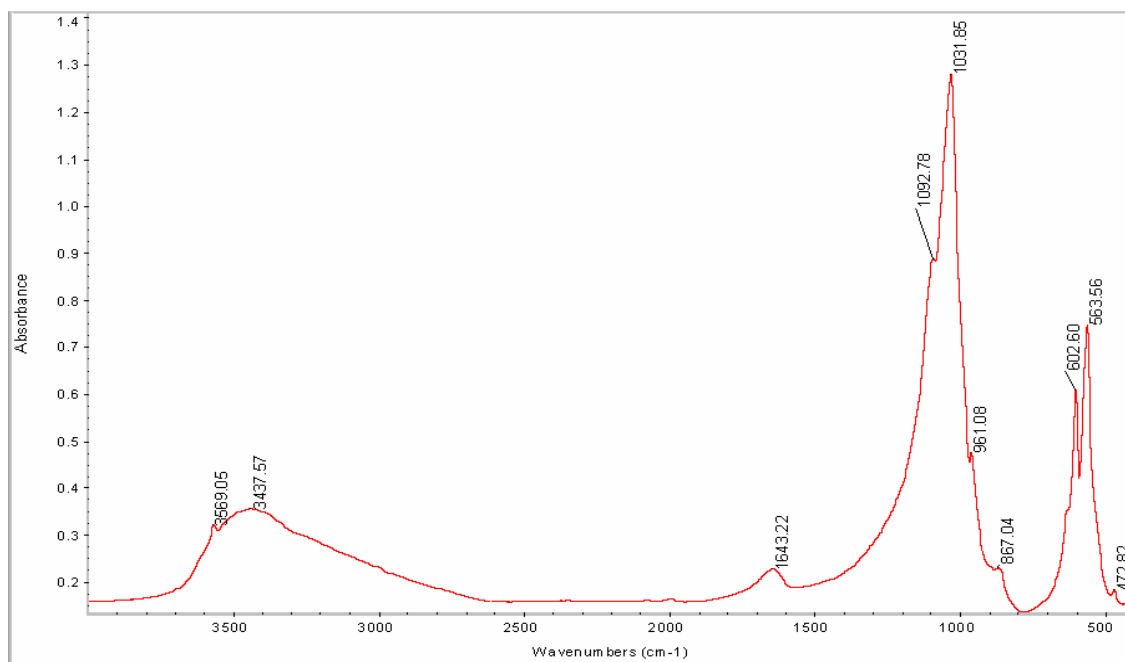


Figure 4-1 : Spectre d'absorption infrarouge des CDA obtenues par hydrolyse en milieu basique de DCPD par NH_4OH

Sur les spectres obtenus par hydrolyse alcaline de DCPD par NaOH , la présence de bandes d'absorption situées entre 1500 et 1400 cm^{-1} et d'une bande d'absorption vers 875 cm^{-1} (Figure 4-2) indique la présence de groupements CO_3^{2-} au sein des apatites obtenues.

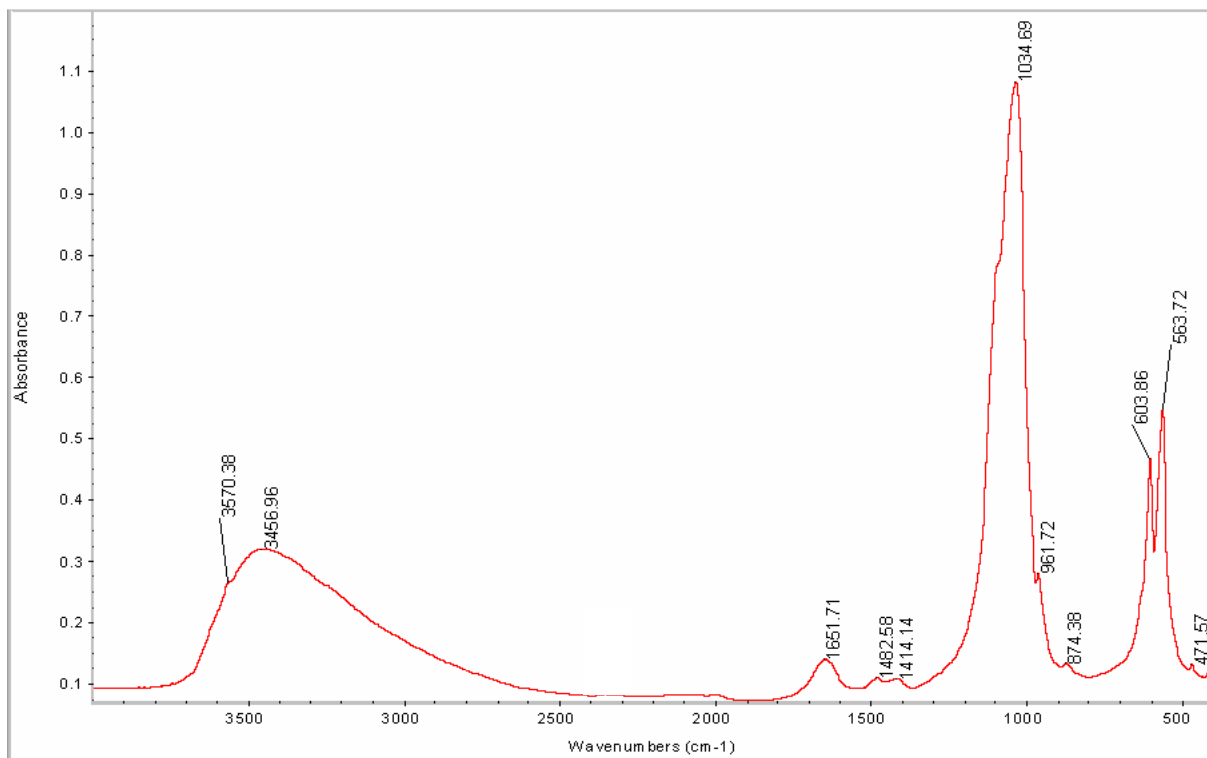


Figure 4-2 : Spectre d'absorption infrarouge des CDA obtenues par hydrolyse alcaline de DCPD par NaOH

Si on s'intéresse aux synthèses par hydrolyse alcaline de DCPD par NaOH , l'intensité des bandes d'absorption des carbonates dans la région $1500 - 1400\text{ cm}^{-1}$, normalisées avec la bande d'absorption des phosphates à 1035 cm^{-1} , augmente lorsque la concentration en soude augmente (Figure 4-3) et augmente lorsque la température de synthèse augmente (Figure 4-4).

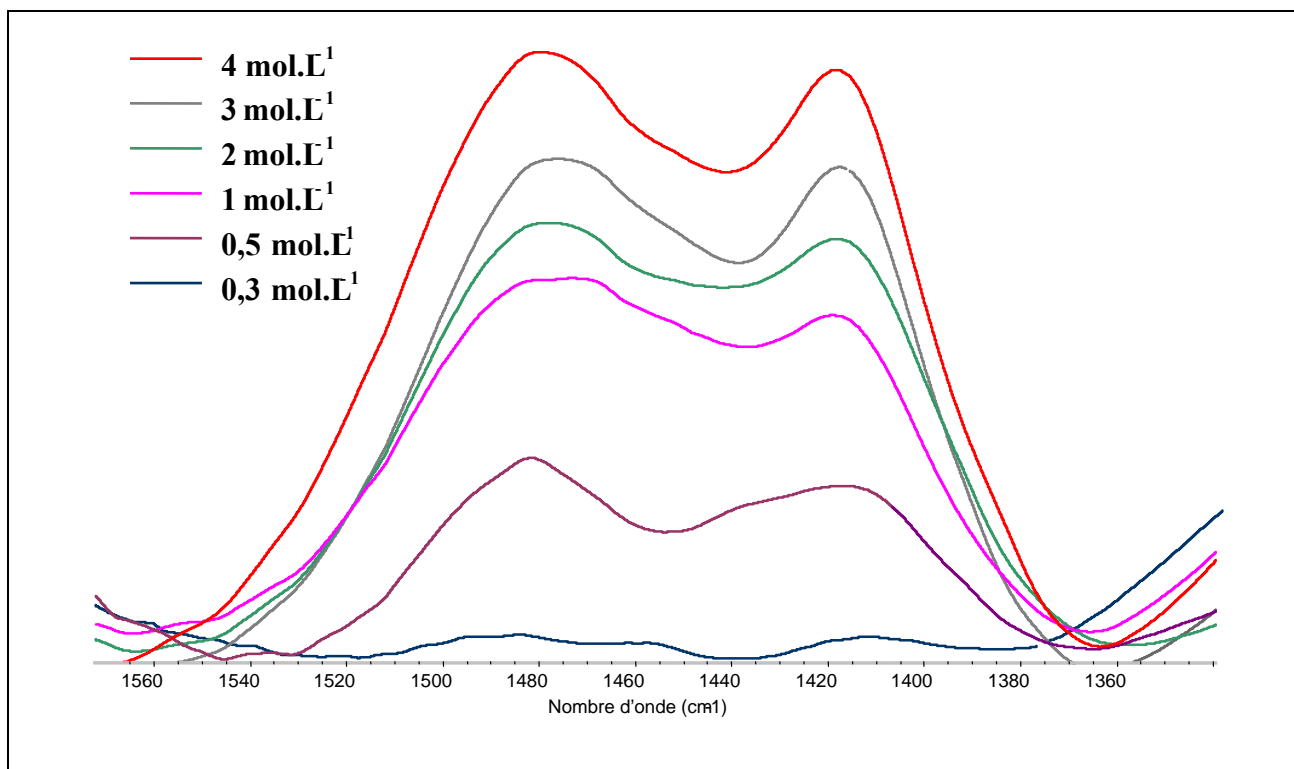


Figure 4-3 : Détail du massif $\nu_3 \text{CO}_3$ pour les spectres d'absorption des CDA issues de l'hydrolyse alcaline de DCPD, en fonction de la concentration en NaOH .

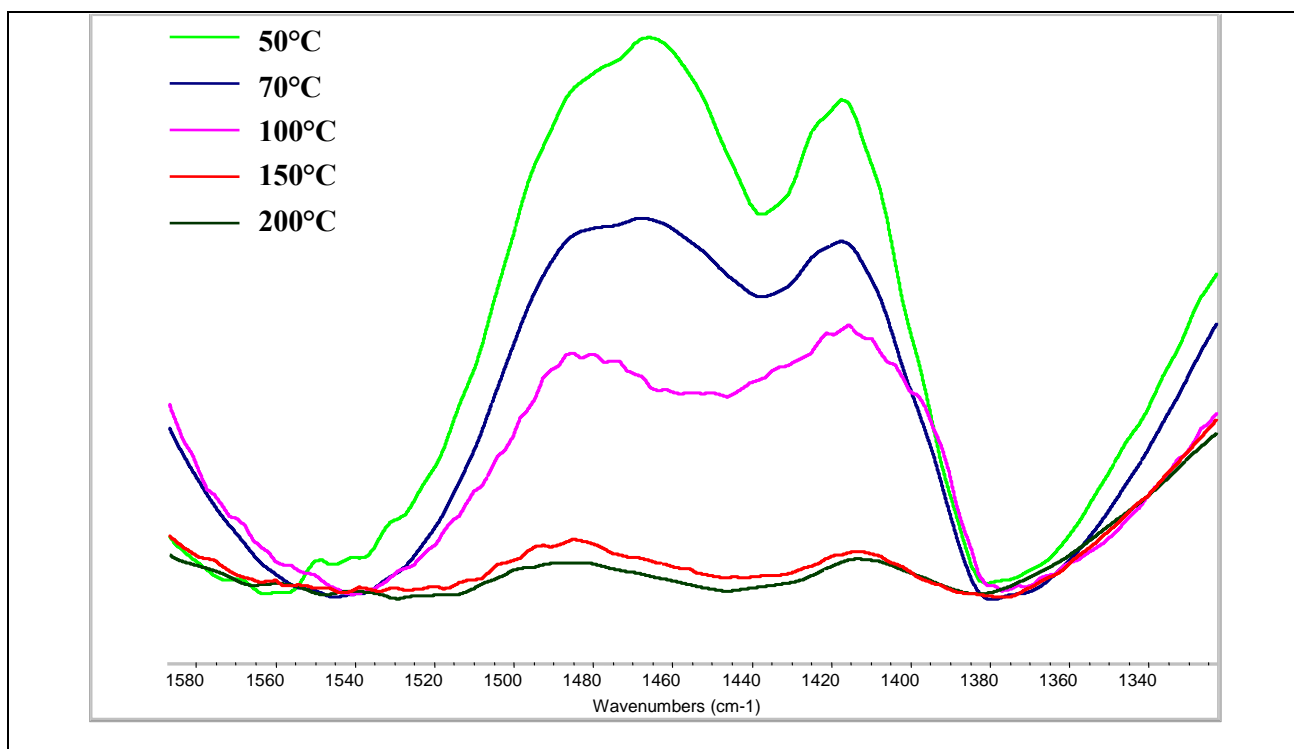


Figure 4-4 : Détail du massif $\nu_3 \text{CO}_3$ pour les spectres d'absorption des CDA issues de l'hydrolyse alcaline de DCPD, en fonction de la température de réaction (base utilisée : NaOH)

Les spectres d'absorption infrarouge des BCP sont caractéristiques des spectres d'absorption d'un mélange de phosphate tricalcique β et d'hydroxyapatite (Figure 4-5).

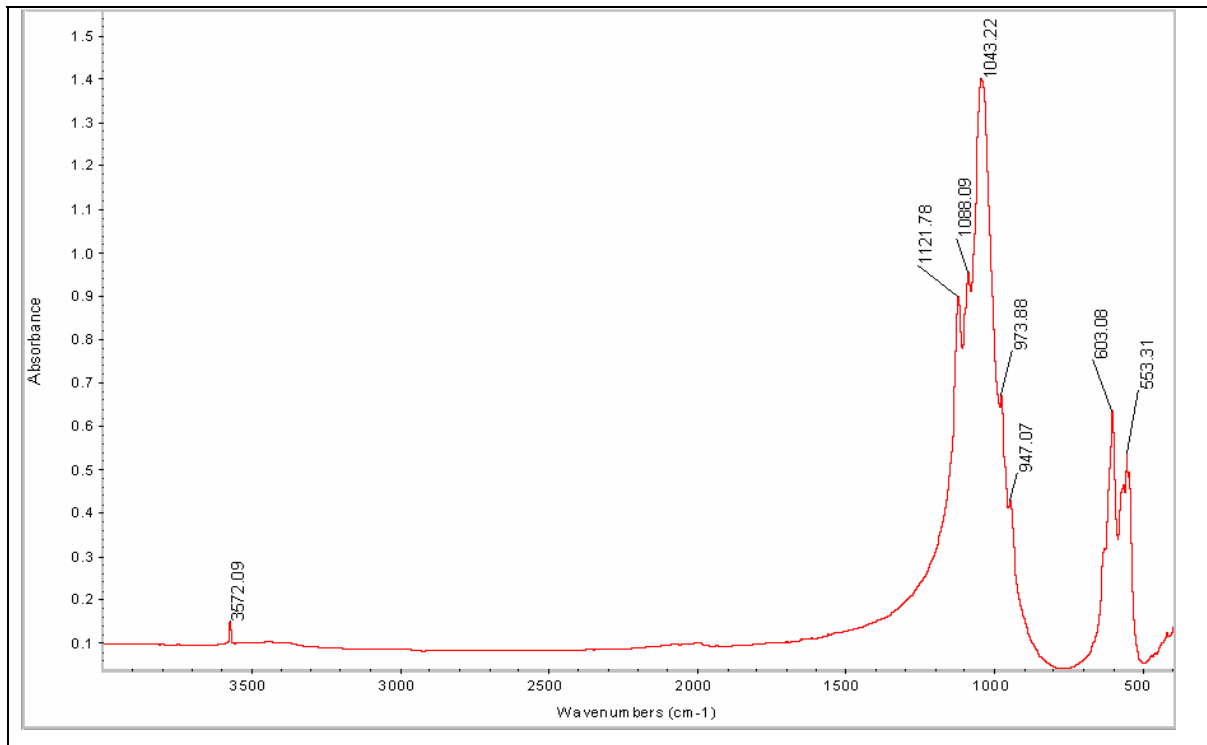


Figure 4-5 : Spectre d'absorption infrarouge des BCP

4.3.1.2 Diffraction des Rayons X

Les diffractogrammes obtenus pour les CDA sont caractéristiques de diffractogrammes d'apatites. Aucune trace de DCPD n'a pu être détectée au sein des CDA synthétisées (Figure 4-6).

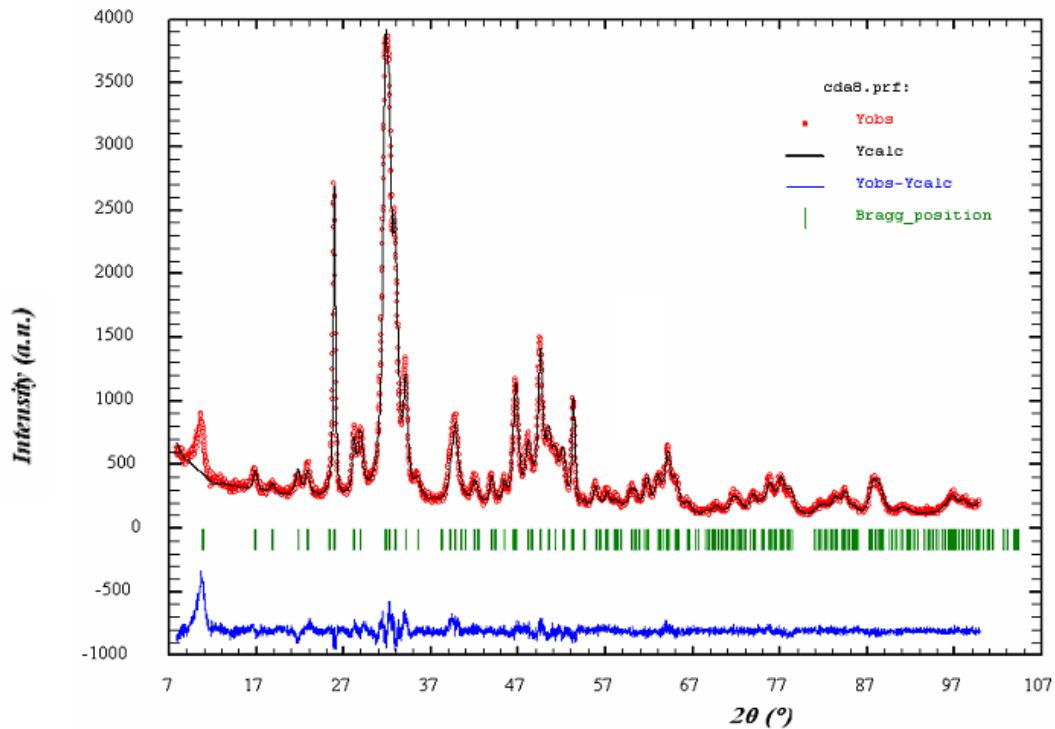


Figure 4-6 : Diffractogramme expérimental de CDA (.), diffractogramme calculé (-) et résidu (-)

Les diffractogrammes des BCP ne présentent aucun autre pic de diffraction que ceux de l'HA et du β -TCP (Figure 4-7).

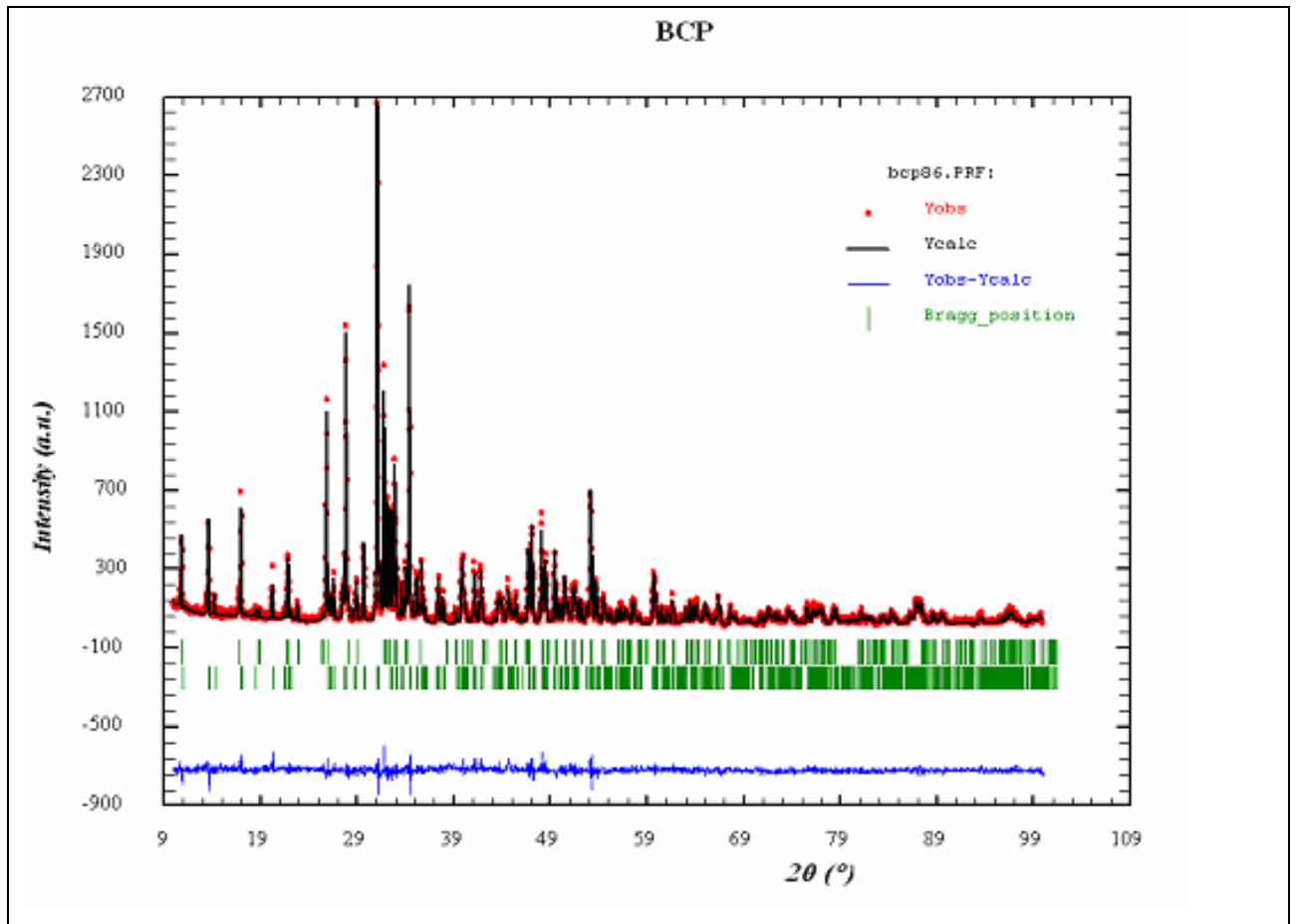


Figure 4-7 : Diffractogramme expérimental de BCP (.), diffractogramme calculé (-) et résidu (-)

4.3.2 Rapport Ca/P

4.3.2.1 Influence de la température (Ca/P + pH)

L'augmentation de la température de synthèse, quelle que soit la base utilisée, induit une augmentation du rapport Ca/P de la CDA obtenue (ou le pourcentage d'hydroxyapatite dans les BCP correspondants). Cependant, tandis que cette augmentation semble linéaire pour des hydrolyses de DCPD effectuées avec NaOH (Figure 4-8), le rapport Ca/P des CDA synthétisées par hydrolyse de DCPD avec NH_4OH évolue en fonction de la température selon une fonction logarithmique (Figure 4-9).

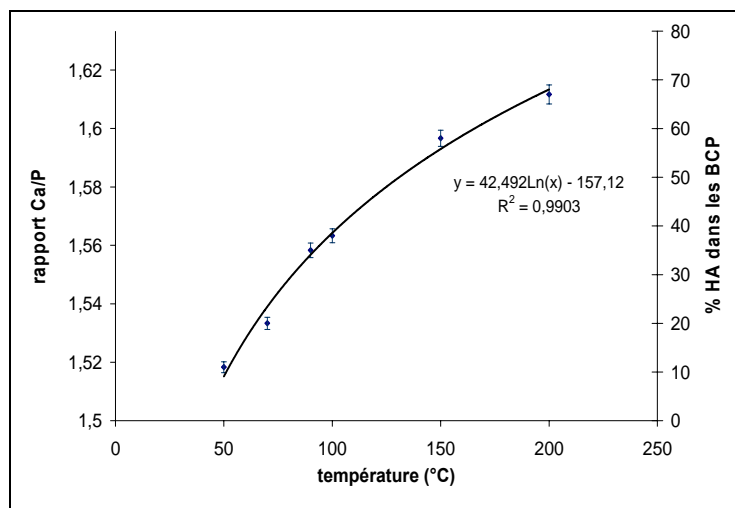


Figure 4-8 : Hydrolyse de DCPD par NH_4OH : influence de la température sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées

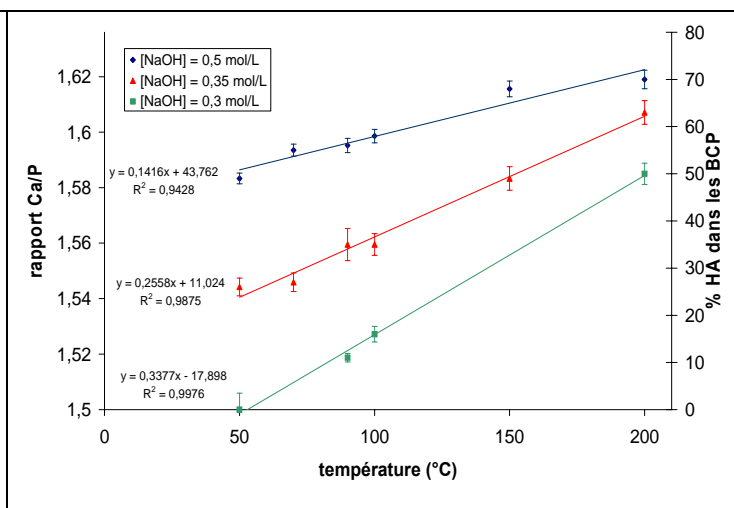


Figure 4-9 : Hydrolyse de DCPD par NaOH : influence de la température sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées

Le pH final de réaction diminue lorsque la température de synthèse augmente. De plus, cette diminution varie de façon linéaire avec l'augmentation du rapport Ca/P des CDA synthétisées pour les deux types de bases utilisées (Figure 4-10 et Figure 4-11).

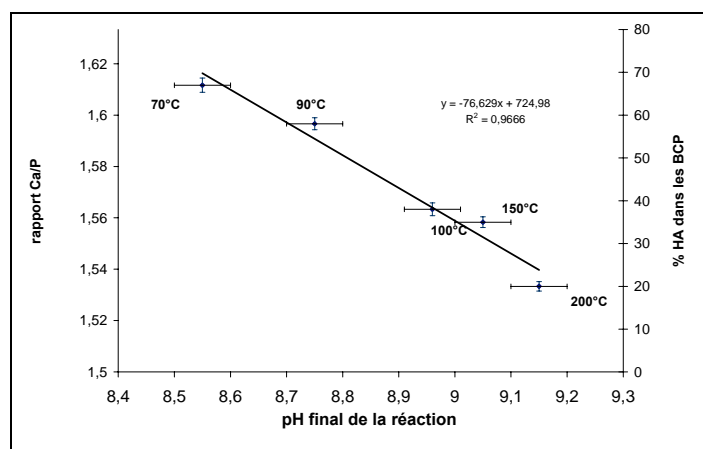


Figure 4-10 : Hydrolyse de DCPD par NH_4OH : pH final en fonction du rapport Ca/P des apatites obtenues pour différentes températures de synthèse

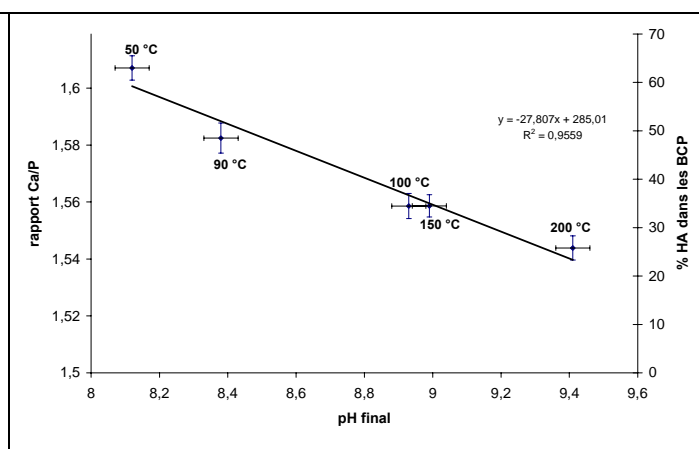


Figure 4-11 : Hydrolyse de DCPD par NaOH : pH final en fonction du rapport Ca/P des apatites obtenues pour différentes températures de synthèse

4.3.2.2 Influence de la concentration de la base

L'évolution du rapport Ca/P des CDA en fonction de la concentration de la base utilisée (NH_4OH ou NaOH) montre des profils différents en fonction des deux bases (Figure 4-12 et Figure 4-13).

Il semble qu'il y ait deux régimes différents :

- ~ Un premier dans lequel il y a une augmentation rapide du rapport Ca/P de la CDA avec la concentration. Ceci est valable à faible concentration et pour les deux bases utilisées.
- ~ Un deuxième dans lequel l'évolution est plus lente et qui diffère en fonction des deux bases utilisées. Pour les hydrolyses de DCPD avec NH_4OH , à partir d'une concentration de $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$, le rapport Ca/P n'augmente plus. Il diminue même à forte concentration en NH_4OH . Lorsque la base utilisée pour l'hydrolyse du DCPD est NaOH , pour des concentrations supérieures à $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$, le rapport Ca/P augmente lentement jusqu'à l'obtention d'une hydroxyapatite stoechiométrique.

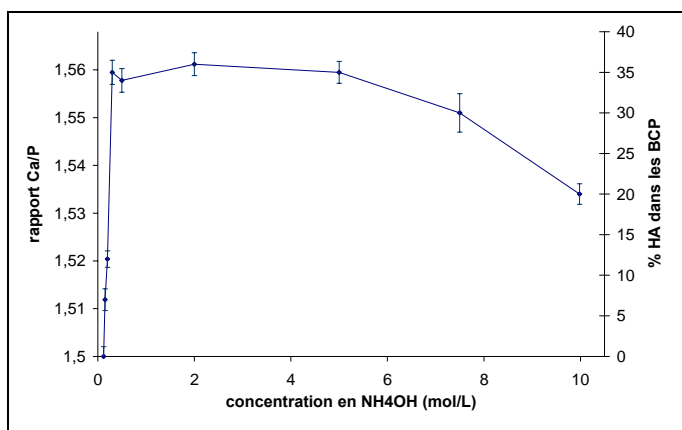


Figure 4-12 : Hydrolyse de DCPD par NH_4OH : influence de la concentration en NH_4OH initiale sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées

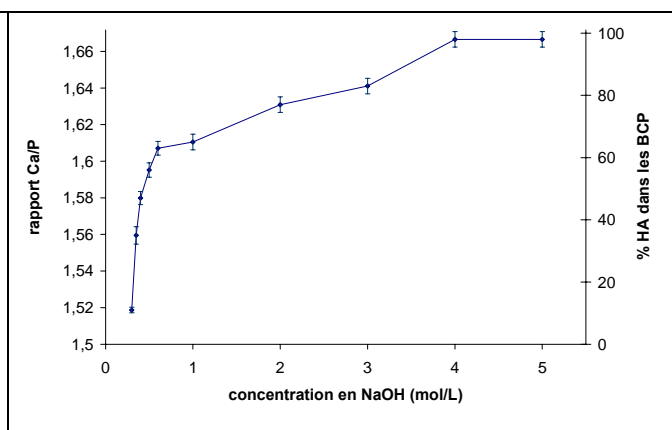


Figure 4-13 : Hydrolyse de DCPD par NaOH : influence de la concentration en NaOH initiale sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées

4.3.3 Paramètres de maille

Les paramètres de maille des CDA synthétisées, obtenus par affinement par la méthode de Rietveld, sont donnés dans le Figure 4-14.

Echantillon	LaB6	CDA A	CDA B	CDA C	CDA D	CDA E	CDA F	CDA G
a (en Å)	4,156415(1)	9,4516(4)	9,4231(1)	9,4604(4)	9,4286(1)	9,4378(3)	9,4325(2)	9,4263(3)
c (en Å)	-	6,8754(3)	6,8723(1)	6,8754(3)	6,8770(1)	6,8726(2)	6,8729(2)	6,8837(2)
U_{inst} ou ($U - U_{inst}$)	0,0057(6)	0,532(95)	0,090(8)	0,008(6)	0,068(15)	0,193(46)	0,126(32)	0,032(3)
V_{inst} ou ($V - V_{inst}$)	-0,0083(7)	0	0	0	0	0	0	0
W_{inst} ou ($W - W_{inst}$)	0,0047(2)	0	0	0	0	0	0	0
X_{inst} ou ($X - X_{inst}$)	0*	0,310(52)	0*	0,466(47)	0,088(18)	0,107(34)	0,074(28)	0,311(32)
Y_{inst} ou ($Y - Y_{inst}$)	0,0455(4)	0,061(15)	0,057(3)	0,150(13)	0,049(6)	0,089(11)	0,078(9)	0,114(10)
Z_{inst}	0	0	0	0	0	0	0	0
l_G	0*	0,075(4)	0,0294(7)	0,011(3)	0,0139(8)	0,055(2)	0,045(2)	0,019(2)
Sz <001>	-	12,59(16)	4,39(5)	11,09(13)	3,77(4)	9,28(11)	7,62(8)	5,85(8)
Contraintes isotropiques $\varepsilon_{\langle hkl \rangle}$ ($\cdot 10^4$)	0	48,54(11)	13,92(2)	32,69(7)	16,32(3)	25,36(4)	19,92(5)	25,159(8)
Nombre de réflexions Ref.	20	204	204	204	204	204	204	204
Σcor	2,69	2,30	2,31	2,83	2,65	2,84	2,52	2,50
RB %	3,15	2,39	2,57	3,62	3,22	2,58	2,71	3,19
Rexp %	4,85	8,00	7,48	8,24	7,55	7,88	7,75	7,96
Rwp %	12,6	10,2	9,41	10,7	10,1	9,93	9,75	9,94

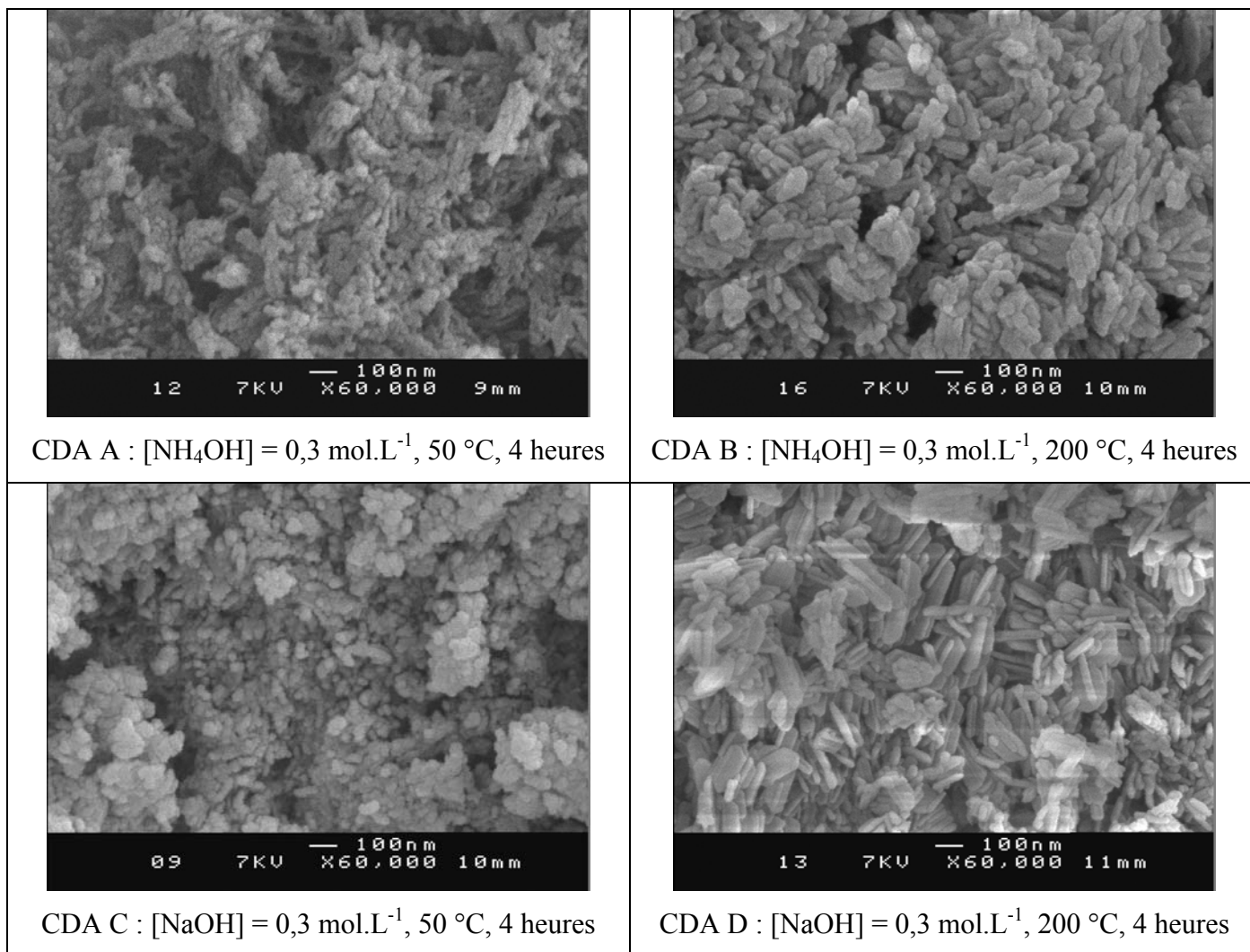
* affiné puis fixé à 0 – les chiffres entre parenthèses correspondent à l'écart type

Figure 4-14 : Paramètres de maille et paramètres affinés lors des affinements par la méthode de Rietveld effectués sur les CDA

4.3.4 Caractérisation des cristaux

4.3.4.1 Morphologie : MEB

Les observations par microscopie électronique à balayage montrent des différences dans la morphologie des cristaux en fonction des conditions de synthèse utilisées (Figure 4-15).



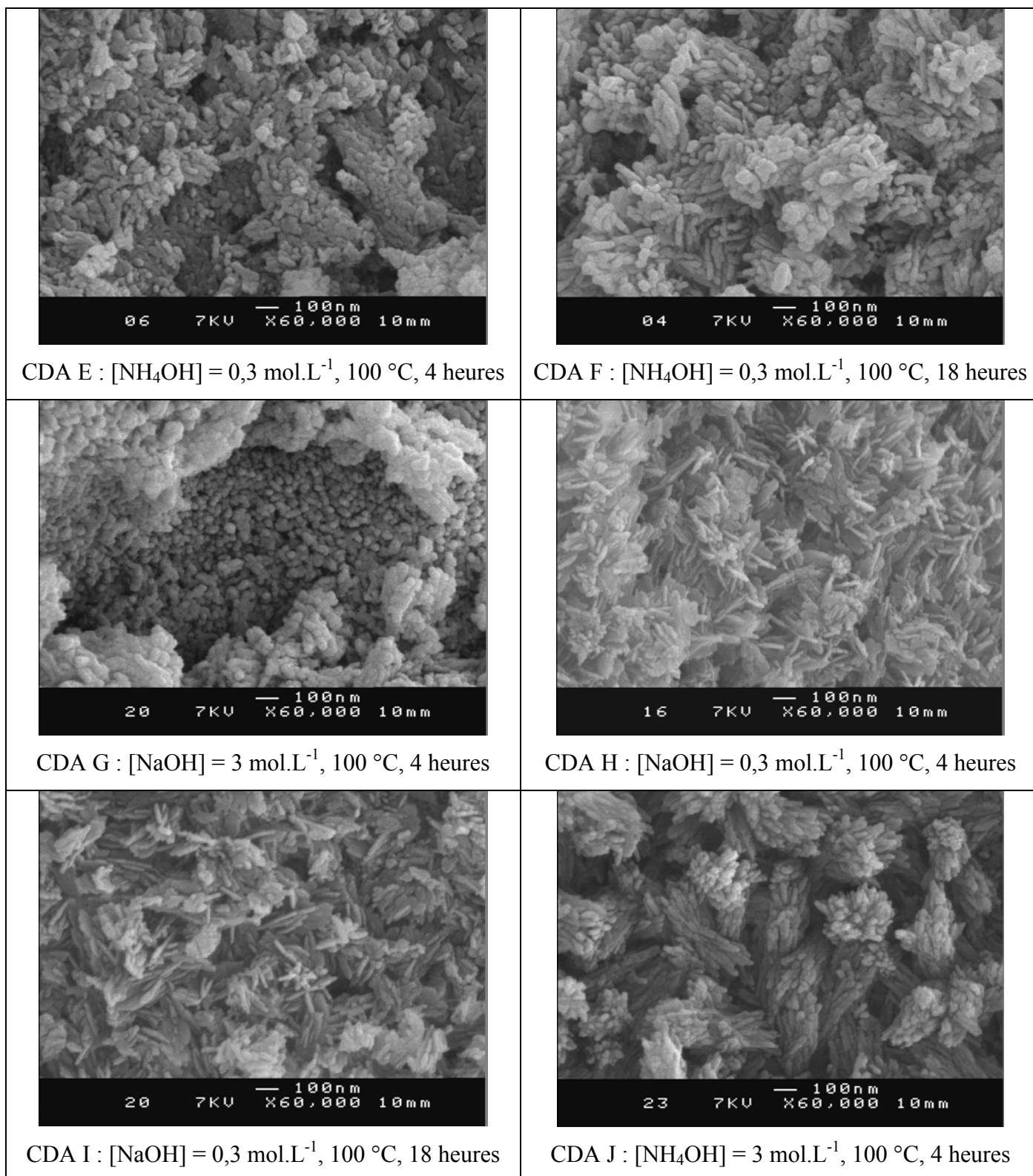


Figure 4-15 : Observations au MEB des CDA

Les observations réalisées par Microscopie Electronique à Balayage montrent qu'il existe une influence des paramètres de synthèse sur la morphologie des cristallites. En effet, plus la température de synthèse est élevée, plus la longueur des cristallites semble importante (ceci semble se vérifier quelle que soit la base utilisée pour hydrolyser le DCPD). De plus, il semble que lorsque le temps de réaction augmente, la taille des cristallites est plus importante. Cependant, la différence de taille en fonction des différentes bases utilisées est moins évidente.

4.3.4.2 Surface spécifique : BET

Les résultats obtenus pour les surfaces spécifiques des CDA sont donnés dans le Tableau 4-5.

Echantillon	Surface spécifique (en $m^2 \cdot g^{-1}$)
CDA A	$125,6 \pm 0,4$
CDA B	$77,4 \pm 0,1$
CDA C	$86,2 \pm 0,2$
CDA D	$62 \pm 0,1$
CDA E	$132 \pm 0,2$
CDA F	$113 \pm 0,2$
CDA G	$116 \pm 0,2$
CDA H	$99 \pm 0,2$
CDA I	$97 \pm 0,2$
CDA J	$115 \pm 0,3$

Tableau 4-5 : Spécifique des CDA

De grandes variations dans les valeurs des surfaces spécifiques des CDA peuvent être observées (entre 62 et $170 m^2 \cdot g^{-1}$).

La température de synthèse a une forte influence sur la surface spécifique. En effet, lorsque la température de synthèse augmente, la surface spécifique diminue dans le domaine étudié :

~ NH_4OH : surface spécifique (CDA A) > surface spécifique (CDA E) > surface spécifique (CDA B)

~ $NaOH$: surface spécifique (CDA C) > surface spécifique (CDA H) > surface spécifique (CDA D)

On peut également remarquer une influence de la base utilisée sur les surfaces spécifiques obtenues. En effet, les synthèses réalisées par hydrolyse ammoniacale de DCPD semblent donner des CDA de surface spécifique plus grande que pour celles obtenues par hydrolyse de DCPD par $NaOH$.

Lorsque le temps de la réaction augmente, ces différences sont moins importantes.

4.3.4.3 Densité : pycnométrie à hélium

Les valeurs des densités vraies des CDA A, B, C et D sont données dans le Tableau 4-6. Il n'y a pas de différence significative de densité pour les CDA selon la base utilisée (A et C ; B et D). Cependant, l'augmentation de la température de synthèse induit une augmentation de densité de la CDA obtenue (densité (CDA B) > densité (CDA A) ; densité (CDA D) > densité (CDA C)).

CDA : conditions de synthèse	Densité (sans unité)
CDA A	2,84 ± 0,04
CDA B	2,98 ± 0,03
CDA C	2,79 ± 0,02
CDA D	3,03 ± 0,02

Tableau 4-6 : Densité vraie des CDA A, B, C et D

4.3.4.4 Taille des cristallites (CDA) : DRX

Les tailles des cristallites calculées par la formule de Scherrer, soit en mesurant la largeur des raies, soit par affinement par la méthode de Rietveld sont données dans le Tableau 4-7.

CDA	mesure de la largeur de raie	Affinement par la méthode de Rietveld		
	L: taille apparente $\langle 00l \rangle$ (in Å)	L: taille apparente $\langle 00l \rangle$ (in Å)	d: taille apparente $\langle hk0 \rangle$ (in Å)	L/d
A	210	250	68	3,63
B	430	360	157	2,30
C	240	300	72	4,12
D	520	490	192	2,56
E	270	260	85	3,01
F	300	280	101	2,81
G	300	310	119	2,63

Tableau 4-7 : Tailles des cristallites obtenues par la formule de Scherrer

Les tailles de cristallites calculées à partir de la formule de Scherrer donnent des résultats différents en fonction de la méthode utilisée.

Lorsque la largeur de la raie considérée est mesurée, la mesure des cristallites dans la direction $\langle hk0 \rangle$ n'est pas possible car toutes les raies $(hk0)$ sont superposées avec d'autres raies.

Les tailles de cristallites calculées à partir de l'affinement par la méthode de Rietveld peuvent être calculées dans les directions $\langle 00l \rangle$ et $\langle hk0 \rangle$ puisque l'affinement se fait sur tout le profil.

Il est donc possible de calculer le paramètre L/d Tableau 4-7. Plus ce paramètre est grand, plus l'anisotropie des cristaux est importante.

Les valeurs de taille des cristallites sont différentes en fonction des méthodes utilisées mais présentent la même variation en fonction des CDA.

Ainsi, il est possible d'évaluer l'influence des paramètres de synthèse sur la taille des cristallites à partir de la formule de Scherrer :

- ~ Plus la température de synthèse est importante, plus la taille des cristallites est importante.
- ~ La taille des cristallites de CDA synthétisées par hydrolyse de DCPD par $NaOH$ semble plus importante que celle des CDA synthétisées par hydrolyse ammoniacale.

Le rapport L/d, caractéristique de l'anisotropie des cristallites indique que l'anisotropie des cristallites est plus importante lorsque la température de synthèse est faible. De plus, cette anisotropie semble également plus grande lorsque la base utilisée pour l'hydrolyse est $NaOH$

Les observations en microscopie électronique à transmission ont montré que les cristaux de la CDA B (synthétisée à $200^{\circ}C$) étaient plus grands que ceux de la CDA A (synthétisée à $50^{\circ}C$) (Figure 4-16).

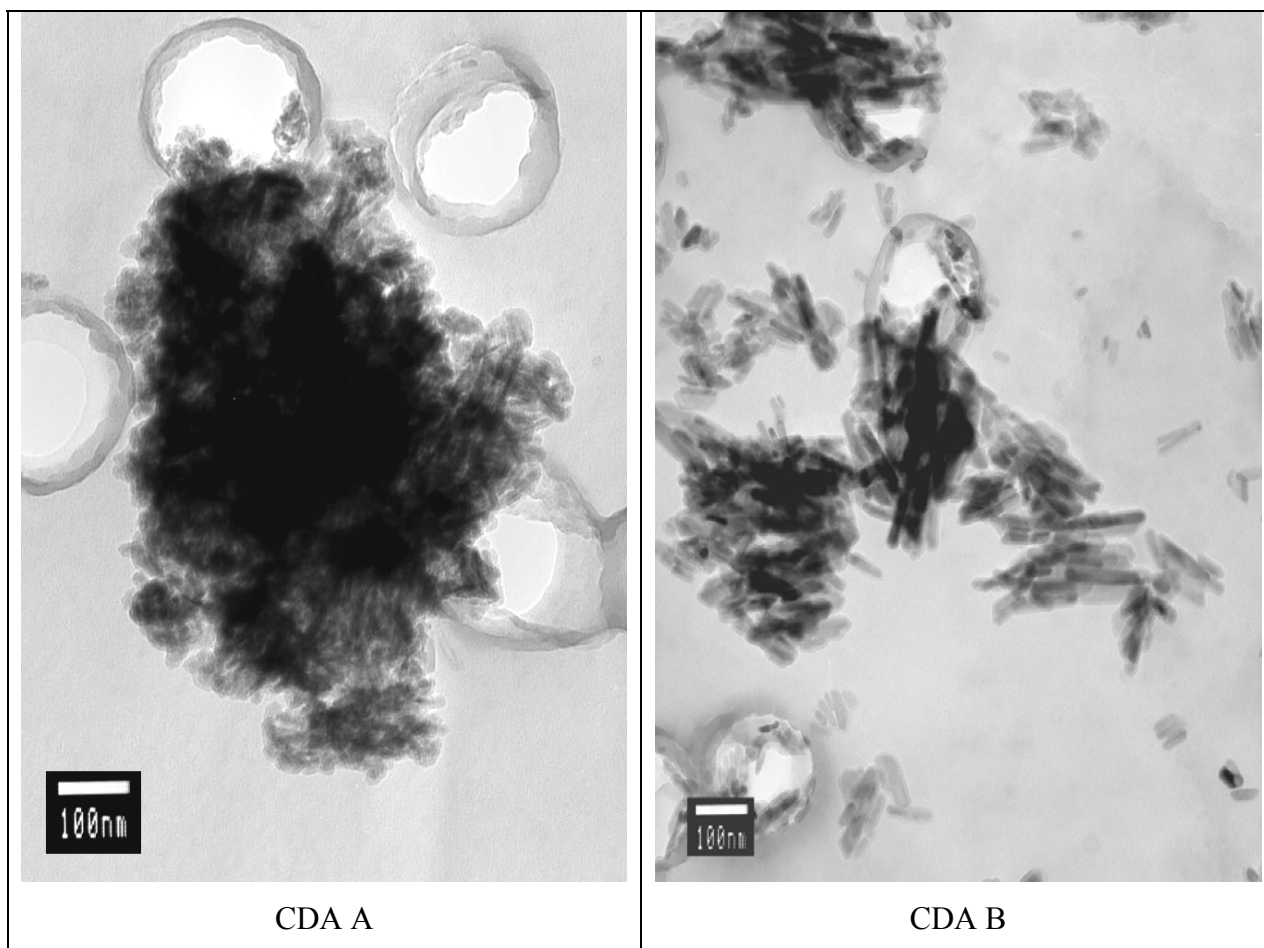


Figure 4-16 : Observation en MET des cristaux des CDA A et B

4.4 Discussion

Dans le chapitre 2, nous avons montré que l'incorporation de sodium, substitution des apatites biologiques, provoquait une augmentation des propriétés mécaniques du β -TCP. De plus, nous avons pu déterminer dans le chapitre 3 l'influence des paramètres de synthèse (temps, température, pression autogène) sur la cinétique d'hydrolyse du DCPD.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'apatites sodées par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$; DCPD), et donc après traitement thermique de céramiques biphasée intégrant du sodium.

Un réacteur permettant de réaliser des synthèses sous pression autogène a été utilisé. Ceci a permis de réaliser des synthèses en solution à des températures supérieures à $100^\circ C$ et donc d'investiguer un champ de température plus large (jusqu'à $200^\circ C$ dans ce travail) que ce qui a été réalisé dans les études précédentes de synthèses d'apatites. De plus, nous avons pu démontrer dans le chapitre précédent (chapitre 3) que le fait de réaliser les synthèses dans un réacteur fermé ou dans système à reflux n'avait pas d'influence sur le rapport Ca/P des CDA obtenues (dans le domaine étudié).

Aucune bande d'absorption infrarouge ne correspond au DCPD dans les CDA analysées, ni à des groupements pyrophosphates dans les BCP étudiés, ainsi, tout le DCPD présent en début de réaction a réagit.

Les analyses en diffraction des rayons X ne montrent pas d'autre phase cristalline que celle de l'apatite dans les poudres analysées.

Dans le but de suivre la cinétique de la réaction d'hydrolyse du DCDP, les rapports Ca/P des apatites ont été calculés.

En accord avec la consommation en ions OH^- lors de l'hydrolyse du DCPD pour former la CDA, le pH final de la réaction diminue lorsque le rapport Ca/P de l'apatite augmente, quelle que soit la base utilisée pour l'hydrolyse. Ceci est en accord avec les résultats de la littérature pour la synthèse de CDA par co-précipitation [LeGeros, 1994].

Il a été montré que la nature de la base utilisée ($NaOH$ ou NH_4OH) pour l'hydrolyse du DCPD avait une influence sur le potentiel zéta des CDA obtenues (et des BCP issus de ces CDA) [Smith, 2004]. Ceci peut influencer l'attachement cellulaire et donc la biocativité de

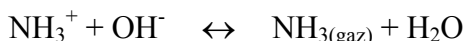
ces matériaux. Il semble ainsi important d'étudier l'influence de la base utilisée pour l'hydrolyse de DCPD sur la nature des CDA / BCP obtenus.

La concentration en base (NaOH et NH_4OH) influe sur le rapport Ca/P de l'apatite obtenue : plus la concentration en base est élevée, plus le rapport Ca/P augmente (excepté pour les synthèses réalisées avec NH_4OH pour lesquelles le rapport Ca/P de l'apatite obtenue reste constant après $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ et diminue même à forte concentration).

Quelle que soit la base utilisée (NaOH ou NH_4OH), l'augmentation de la température a pour effet une augmentation du rapport Ca/P et une augmentation de la densité de la CDA obtenue. Ce qui va dans le sens d'une plus grande stoechiométrie de l'apatite. Ce résultat est comparable à ceux décrits dans la littérature pour la synthèse d'apatites déficientes en calcium par co-précipitation. En effet, cette réaction est thermiquement activée [Raynaud, 2002].

Les deux bases n'ont cependant pas la même influence sur l'hydrolyse du DCPD. En effet, tandis que l'augmentation du rapport Ca/P semble linéaire en fonction de la température pour les hydrolyses de DCPD par NaOH , le rapport Ca/P des CDA synthétisées par hydrolyse de DCPD par NH_4OH évolue en fonction de la température selon une loi logarithmique.

Pour les synthèses réalisées avec NH_4OH , nous avons l'équilibre suivant :

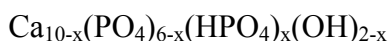


Cette réaction est favorisée par la concentration élevée en NH_4OH et par la température. Le déplacement de l'équilibre de la réaction a été mis en évidence par une augmentation de la pression dans le réacteur lorsque la concentration en NH_4OH et / ou la température de la réaction augmentaient. La basicité de la réaction est donc moins importante et la vitesse de la réaction est diminuée.

Ceci explique les différences obtenues entre les deux bases utilisées sur l'évolution du rapport Ca/P des CDA obtenues en fonction de la température de synthèse et de la concentration en base.

Les études en spectroscopie d'absorption infrarouge permettent de déterminer la nature des substitutions des apatites non stoechiométriques : ions HPO_4^{2-} et / ou CO_3^{2-} .

Les analyses effectuées montrent que pour les hydrolyses de DCPD avec NH_4OH , il y a présence d'ions HPO_4^{2-} . Les apatites obtenues sont donc de type sous stoechiométrique en calcium :



Pour les hydrolyses de DCPD avec $NaOH$, il y a présence d'ions CO_3^{2-} mais pas d'ions HPO_4^{2-} .

Les bandes d'absorption IR attribuées aux carbonates (874 , 1414 , 1484 cm^{-1}) sont caractéristiques d'une apatite carbonatée de type B, dans laquelle les carbonates substituent les groupements PO_4 de l'apatite. Ces valeurs sont légèrement différentes de celles trouvées pour des apatites carbonatées de type B (1425 ; 1460 cm^{-1}), cependant des valeurs comparables à celles trouvées dans nos études ont été décrites dans la littérature pour des apatites carbonatées et sodées [De Maeyer, 1994; Suchanek, 2002; Wilson, 2004].

Ces apatites intègrent également des ions Na^+ . Les synthèses ayant eu lieu en milieu fermé, la concentration en CO_2 disponible pour la réaction reste *a priori* constante pour toutes les synthèses. Nous avons de plus montré que plus la concentration en $NaOH$ était importante, plus l'incorporation en ions CO_3^{2-} dans l'apatite était importante. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui indiquent que l'incorporation d'ions Na^+ au sein d'une apatite déficiente en calcium favorise l'incorporation d'ions CO_3^{2-} .

Les études de spectroscopie d'absorption infrarouge ont montré que la température de synthèse des CDA obtenues par hydrolyse de DCPD par $NaOH$ avait une influence sur la quantité d'ions carbonates incorporés. En effet, plus la température de synthèse est importante, moins la quantité d'ions carbonates incorporés est importante. Ces résultats sont en accord avec une incorporation d'ions carbonates en site B plus importante, et donc d'une stoechiométrie plus faible, pour une apatite réalisée à faible température.

Le microscope électronique à balayage permet de comparer la morphologie des cristallites mais l'épaisseur de la couche de métallisation d' Au/Pd empêche d'en déduire une valeur absolue de la taille des cristallites.

Les tailles de cristallites des CDA ont été déterminées par différentes méthodes : l'affinement par la méthode de Rietveld et l'application de la formule de Scherrer pour un pic du diffractogramme.

La détermination de la taille des cristallites par affinement par la méthode de Rietveld permet d'avoir accès aux tailles de cristallites des CDA selon les directions $\langle hk0 \rangle$ (L) et $\langle 00l \rangle$ (d), ce qui permet ensuite d'avoir accès au rapport L/d, caractéristique de l'anisotropie des CDA. Ce paramètre ne peut pas être déterminé en appliquant la formule de Scherrer pour un pic du diffractogramme. En effet, par cette méthode, seule la taille des cristallites le long de l'axe c semble facilement accessible.

Par ces deux méthodes, les calculs de la taille des cristallites des CDA synthétisées donnent les mêmes tendances. En effet, lorsque la température augmente, la taille des cristallites augmente. De plus, la surface spécifique diminue. Ces mêmes résultats ont été trouvés pour des synthèses d'apatites par coprécipitation [LeGeros, 1994; Liu, 2001; Raynaud, 2002]. On peut faire l'hypothèse que l'augmentation de la température active la croissance des cristaux et diminue leur surface spécifique.

Conclusion générale

Ce travail a permis de répondre à des problématiques appliquées aux biomatériaux phosphocalciques (amélioration des propriétés mécaniques de céramiques, étude d'une méthode de synthèse pour l'obtention de matériaux de comblement osseux) ainsi que d'approfondir les connaissances fondamentales portant sur les structures cristallographiques de composés phosphocalciques utilisés comme biomatériaux par l'utilisation de la RMN MAS ^{31}P ou encore de la DRX (affinement par la méthode de Rietveld).

Au cours de cette thèse, la RMN du solide du ^{31}P nous a permis de mettre en évidence l'incorporation de sodium au sein des β -TCP, biocéramiques couramment utilisées comme substituts osseux. Cette méthode de caractérisation n'est pas recommandée par les normes en vigueur pour la caractérisation des phosphates de calcium utilisés comme matériaux de substitution osseuse. Actuellement, seules la DRX et la spectroscopie IR sont utilisées dans les normes, et nous recommandons d'y ajouter la RMN du solide du ^{31}P .

Au cours de cette étude, nous avons montré que le sodium pouvait s'incorporer au sein de la maille du β -TCP dans le site Ca(4) jusqu'à un maximum de 2,11% en masse provoquant ainsi une modification des paramètres de maille (diminution du paramètre c et augmentation du paramètre a). De plus, l'incorporation du sodium au sein du β -TCP modifie ses propriétés mécaniques : la résistance en compression du β -TCP est multipliée par 3. En outre, la présence du sodium ne modifie pas la cytocompatibilité du β -TCP. Ainsi, le β -TCP substitué par du sodium semble être un candidat potentiel pour des applications comme matériaux de comblement osseux.

Nous nous sommes également intéressés à la synthèse d'apatites déficientes en calcium (CDA), qui après calcination à 800°C donnent des phosphates de calcium biphasés (BCP). Nous avons étudié un mode de synthèse de CDA peu décrit dans la littérature : l'hydrolyse en milieu basique du phosphate dicalcique dihydraté (DCPD).

Ce travail a permis de déterminer l'influence de paramètres expérimentaux sur la nature de la CDA obtenue, et notamment le rapport Ca/P, qui influe directement sur les propriétés biologiques des BCP.

Un plan d'expérience factoriel a permis de démontrer que, dans le domaine étudié (entre 70 et 100°C pour un temps de synthèse compris entre 4 et 18 heures), la température de synthèse et le temps de réaction avait une influence sur le rapport Ca/P de l'apatite obtenue et donc sur le rapport HA / β -TCP des BCP issus des CDA synthétisées. La pression autogène quant à elle ne modifie pas significativement le rapport Ca/P des CDA. Il a également été montré que les paramètres étudiés sont indépendants les uns des autres. Une équation polynomiale du premier degré prédisant le pourcentage d'HA dans les BCP a pu être formulée. Une corrélation entre le pH mesuré à la fin de la réaction d'hydrolyse et le rapport Ca/P de l'apatite obtenue nous permet de prédire et de contrôler la stoechiométrie de la CDA synthétisée.

Ce travail a également souligné l'importance de la nature de la base utilisée sur l'incorporation des ions au sein de l'apatite formée : lorsqu'une solution d'ammoniaque est utilisée, aucune substitution cationique n'est observée, ni d'incorporation de carbonates ; *a contrario*, une incorporation d'ions Na^+ et CO_3^{2-} est observée lorsque la base utilisée est NaOH. Cette substitution semble être d'autant plus importante que la concentration en base est élevée ou que la température de synthèse est importante.

Il a de plus été remarqué que lorsque la température de synthèse augmente, la taille des cristallites ainsi que leur densité augmentent et la surface spécifique diminue.

Cette étude contribue également à valider le recours à l'affinement de diagrammes de DRX par la méthode de Rietveld pour le calcul des paramètres de mailles, du pourcentage de phases cristallines ou encore des tailles de cristallites lors de la caractérisation des phosphates de calcium d'intérêt biologique.

L'hydrolyse en milieu basique de DCPD permet donc de synthétiser des CDA avec des valeurs de rapport Ca/P se trouvant dans la gamme classiquement utilisée pour les substituts osseux, c'est-à-dire compris entre 1,5 et 1,67.

Les techniques issues de la Chimie Douce nous semblent prometteuses pour moduler les propriétés mécaniques et biologiques des biomatériaux phosphocalciques en permettant des substitutions ioniques contrôlées à action spécifique.

Références bibliographiques

Akao M., Miura N. and Aoki H., Fracture toughness of sintered hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate, *Yogyo Kyokai-Shi*, 92, (1984), pp 78 - 80.

Allen G. C., Ciliberto E., Fragala I. and Spoto G., Surface and bulk study of calcium phosphate bioceramics obtained by metal organic chemical vapor deposition, *Nucl Instrum Meth B*, 116, 1-4 (1996), pp 457-460.

Andres-Verges M., Fernandez-Gonzalez C. and Martinez-Gallego M., Hydrothermal Synthesis of Calcium Deficient Hydroxyapatites with Controlled Size and Homogeneous Morphology, *J Eur Ceram Soc*, 18, 9 (1998), pp 1245-1250.

Andres-Verges M., Fernandez-Gonzalez C., Martinez-Gallego M., Solier J., Cachadina I. and Matijevic E., A new route for the synthesis of calcium deficient hydroxyapatite with low Ca/P ratio: both spectroscopic and electric characterization, *J Mater Res*, 15, 11 (2000), pp 2526-2533.

Apfelbaum F., Diab H., Mayer I. and Featherstone J. D. B., An FTIR study of carbonate in synthetic apatites, *J Inorg Chem*, 45, 4 (1992), pp 277-282.

Badraoui B., Thouvenot R. and Debbabi M., Etude par diffraction des rayons X, par resonance magnetique nucleaire ^{31}P en phase solide et par spectrometrie infrarouge des hydroxyapatites mixtes cadmium-strontium, *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIC - Chemistry*, 3, 2 (2000), pp 107-112.

Badrou L., Sadel A., Zahir M., Kimakh L. and El Hajbi A., Synthesis and physical and chemical characterization of $\text{Ca}_{10-x}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}[\text{uplus}]_x$ apatites, *Ann Chim-Sci Mat*, 23, 1-2 (1998), pp 61-64.

Belik A. A., Morozov V. A., Khasanov S. S. and Lazoryak B. I., Crystal structures of new double calcium and cobalt phosphates, *Mater Res Bull*, 33, 7 (1998), pp 987-995.

Belik A. A., Morozov V. A., Khasanov S. S. and Lazoryak B. I., Crystal structures of new triple $\text{Ca}_9\text{CoM}(\text{PO}_4)_7$ (M = Li, Na, K) phosphates, *Mater Res Bull*, 34, 6 (1999), pp 883-893.

Belik A. A., Yanov O. V. and Lazoryak B. I., Synthesis and crystal structure of $\text{Ca}_9\text{Cu}_{1.5}(\text{PO}_4)_7$ and reinvestigation of $\text{Ca}_{9.5}\text{Cu}(\text{PO}_4)_7$, *Mater Res Bull*, 36, 10 (2001), pp 1863-1871.

Ben Abdelkader S., Khattech I., Rey C. and Jemal M., Synthese, caracterisation et thermochimie d'apatites calco-magnesiennes hydroxylees et fluorees, *Thermochim Acta*, 376, 1 (2001), pp 25-36.

Benarafa A., Kacimi M., Coudurier G. and Ziyad M., Characterisation of the active sites in butan-2-ol dehydrogenation over calcium-copper and calcium-sodium-copper phosphates, *Appl Catal A-Gen*, 196, 1 (2000a), pp 25-35.

Benarafa A., Kacimi M., Gharbage S., Millet J.-M. M. and Ziyad M., Structural and spectroscopic properties of calcium-iron $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ phosphate, *Mater Res Bull*, 35, 12 (2000b), pp 2047-2055.

Berar J. F. and Lelann P., E.S.D.'s and estimated probable error obtained in Rietveld refinement with local correlation, *J Appl Cryst*, 24, (1991), pp 1-5.

Bigi A., Foresti E., Gandolfi M., Gazzano M. and Roveri N., Inhibiting Effect of Zinc on Hydroxylapatite Crystallization, *J Inorg Chem*, 58, 1 (1995), pp 49-58.

Bigi A., Foresti E., Gandolfi M., Gazzano M. and Roveri N., Isomorphous Substitutions in β -Tricalcium Phosphate: The Different Effects of Zinc and Strontium, *J Inorg Chem*, 66, 4 (1997), pp 259-265.

Bigi A., Incerti A., Roveri N., Foresti-Serantoni E., Mongiorgi R., di Sanseverino L. R., Krajewski A. and Ravaglioli A., Characterization of synthetic apatites for bioceramic implants, *Biomaterials*, 1, 3 (1980), pp 140-144.

Binder Royer A., Etude de l'influence de la composition de l'hydroxyapatite frittée sur ses propriétés mécaniques, Thèse d'université, Grenoble (1988)

Boix D., Gauthier O., Guicheux J., Pilet P., Weiss P., Grimandi G. and Daculsi G., Alveolar bone regeneration for immediate implant placement using an injectable bone substitute: an experimental study in dogs, *J Periodontol*, 75, (2004), pp 663-671.

Botelho C. M., Lopes M. A., Gibson I. R., Best S. M. and Santos J. D., Structural analysis of Si-substituted hydroxyapatite: zeta potential and X-ray photoelectron spectroscopy, *J Mater Sci: Mat in Med*, 13, (2002), pp 1123-1127.

Bouhaouss A., Laghzizil A., Bensaoud A., Ferhat M., Lorent G. and Livage J., Mechanism of ionic conduction in oxy and hydroxyapatite structures, *Int J Inorg Mater*, 3, 7 (2001), pp 743-747.

Bouler J. M., LeGeros R. Z. and Daculsi G., Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio, *J Biomed Mater Res*, 51, 4 (2000), pp 680-684.

Bourgeois B., Laboux O., Obadia L., Gauthier O., Betti E., Aguado E., Daculsi G. and Bouler J. M., Calcium-deficient apatite: a first in vivo study concerning bone ingrowth, *J Biomed Mater Res*, 65A, 3 (2003), pp 402-408.

Brown I. D. and Altermatt D., Bond-valence parameters obtained from a systematic analysis of the Inorganic Crystal Structure Database, *Acta Cryst.*, B41, (1985), pp 244-247.

Brunauer S., Emmet P. H. and Teller E., Adsorption of gases on multimolecular layers, *J Am Chem Soc*, 60, (1938), pp 309-319.

Chickerur N. S., Tung M. S. and Brown W. E., A mechanism for incorporation of carbonate into apatite, *Calcif Tissue Int*, 32, 1 (1980), pp 55-62.

Christoffersen J., Christoffersen M. R., Kolthoff N. and Barenholdt O., Effects of Strontium Ions on Growth and Dissolution of Hydroxyapatite and on Bone Mineral Detection, *Bone*, 20, 1 (1997), pp 47-54.

Clement D., Tristan J. M., Hamad M., Roux P. and Heughebaert J. C., Etude la substitution Mg^{2+} / Ca^{2+} dans l'orthophosphate tricalcique béta, *J Solid State Chem*, 78, 2 (1989), pp 271 - 280.

Cuneyt Tas A., Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids, *Biomaterials*, 21, 14 (2000), pp 1429-1438.

Daculsi G., Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute, *Biomaterials*, 19, 16 (1998), pp 1473-1478.

Daculsi G., Bouler J.-M. and LeGeros R. Z., Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials., *Int Rev Cytol*, 172, (1997), pp 129-91.

Daculsi G., Laboux O., Malard O. and Weiss P., Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics, *J Mater Sci: Mat in Med*, 14, (2003), pp 195-200.

Daculsi G., LeGeros R., Nery E., Lynch K. and Kerebel B., Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization, *J Biomed Mater Res*, 23, 8 (1989a), pp 883-894.

Daculsi G., LeGeros R. Z., Heughebaert M. and Barbieux I., Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics, *Calcif Tissue Int*, 46, 1 (1990a), pp 20-27.

Daculsi G., LeGeros R. Z. and Mitre D., Crystal dissolution of biological and ceramic apatites, *Calcif Tissue Int*, 45, 2 (1989b), pp 95-103.

Daculsi G. and Passuti N., Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics, *Biomaterials*, 11, (1990b), pp 86-87.

Daculsi G., Passuti N., Martin S., Deudon C., Legeros R. Z. and Raheer S., Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study, *J Biomed Mater Res*, 24, (1990c), pp 379-396.

Daculsi G., Weiss P., Bouler J.-M., Gauthier O., Millot F. and Aguado E., Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials, *Bone*, 25, 2, Supplement 1 (1999), pp 59S-61S.

De Maeyer E. A. P., Verbeeck R. M. H. and Naessens D. E., Optimalization of the preparation of Na^+ and CO_3^{2-} containing hydroxyapatite by the hydrolysis of monetite, *J Cryst Growth*, 135, 3-4 (1994), pp 539-547.

De Maeyer E. A. P., Verbeeck R. M. H. and Pieters I. Y., Influence of the solution composition on the stoichiometry of Na^+ and of K^+ containing carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite, *J Cryst Growth*, 169, 3 (1996), pp 539-547.

Dickens B., Schroeder L. W. and Brown W. E., Cristallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β -Ca₃(PO₄)₂. I. The cristal structure of pure β -Ca₃(PO₄)₂., *J Solid State Chem*, 10, (1974), pp 232 - 248.

Doat A., Fanjul M., Pelle F., Hollande E. and Lebugle A., Europium-doped bioapatite: a new photostable biological probe, internalizable by human cells, *Biomaterials*, 24, 19 (2003), pp 3365-3371.

Dorozhkina E. I. and Dorozhkin S. V., Mechanism of the solid-state transformation of a calcium-deficient hydroxapatite (CDHA) into biphasic calcium phosphate (BCP) at elevate temperature, *Chem Mater*, 14, (2002), pp 4267 - 4272.

El Feki H., Michel Savariault J., Ben Salah A. and Jemal M., Sodium and carbonate distribution in substituted calcium hydroxyapatite, *Solid State Sci*, 2, 5 (2000), pp 577-586.

El Feki H., Savariault J. M. and Ben Salah A., Structure refinements by the Rietveld method of partially substituted hydroxyapatite: Ca₉Na_{0.5}(PO₄)_{4.5}(CO₃)_{1.5}(OH)₂, *J Alloy Comp*, 287, 1-2 (1999), pp 114-120.

Ellinger R. F., Nery E. B. and Lynch K. L., Histological assessment of periodontal osseous defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate ceramics: a case report, *Int J Periodontics Restorative Dent*, 6, (1986), pp 22-33.

Elliott J. C., Structure and chemistry of the apatites and other calcium phosphates, elsevier, studies in inorganic chemistry (1994).

Elliott J. C., Holcomb D. W. and Young R. A., Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel, *Calcif Tissue Int*, 37, 4 (1985), pp 372-375.

Fleet M. E., Liu X. and Pan Y., Site Preference of Rare Earth Elements in Hydroxyapatite [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂], *J Solid State Chem*, 149, 2 (2000), pp 391-398.

Fowler B. O., Moreno E. C. and Brown W. E., Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate, *Arch Oral Biol*, 11, (1966), pp 477-492.

Gan L. and Pilliar R., Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization, *Biomaterials*, 25, 22 (2004), pp 5303-5312.

Gauthier O., Bouler J.-M., Aguado E., LeGeros R. Z., Pilet P. and Daculsi G., Elaboration conditions influence physicochemical properties and *in vitro* bioactivity of macroporous biphasic calcium phosphate ceramics, *J Mater Sci: Mat in Med*, 10, (1999), pp 199-204.

Gauthier O., Bouler J.-M., Aguado E., Pilet P. and Daculsi G., Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth, *Biomaterials*, 19, 1-3 (1998), pp 133-139.

Gautier H., Merle C., Auget J. L. and Daculsi G., Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: comparison with a classical method, *Biomaterials*, 21, 3 (2000), pp 243-249.

Gomez-Morales J., Torrent-Burgues J., Boix T., Fraile J. and Rodriguez-Clemente R., Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method, *Cryst. Res. Technol.*, 36, 1 (2001), pp 15-26.

Goupy J., La méthode des plans d'expériences, P. Dunod, (1988).

Hadrich A., Lautie A. and Mhiri T., Vibrational study and fluorescence bands in the FT-Raman spectra of $\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ compounds, *Spectrochim Acta A*, 57, 8 (2001), pp 1673-1681.

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

Heijligers H. J., Driessens F. C. M. and Verbeeck R. M. H., Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and strontium hydroxyapatite., *Calcif Tissue Int*, 29, 2 (1979), pp 127-131.

Ishikawa K., Ducheyne P. and Radin S., Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis, *J Mater Res: Mat in Med*, 4, (1993), pp 165 - 168.

Jakeman R. J. B., Cheetham A. K., Clayden N. J. and Dobson C. M., A magic angle spinning NMR study of the phase diagram $\text{Ca}_{3-x}\text{Zn}(\text{PO}_4)_2$, *J Solid State Chem*, 78, (1989), pp 23-34.

Jarcho M., Bolen H., Thomas M. B., Bobick J., Kay J. F. and Doremus R. H., Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form, *J Mater Sci*, 11, (1976), pp 2027-2035.

Jarcho M., Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 157, (1981), pp 259-278.

Jha L. J., Best S. M., Knowles J. C., Rehman I., Santos J. D. and Bonfield W., Preparation and characterization of fluoride-substituted apatite, *J Mat Sci: Mat in Med*, 8, (1997), pp 185-191.

Jinawath S. and Sujaridworakun P., Fabrication of porous calcium phosphates, *Mater Sci Eng: C*, 22, 1 (2002), pp 41-46.

Josse S., Fauchoux C., Soueidan A., Grimandi G., Massiot D., Alonso B., Janvier P., Laïb S., Pilet P., Gauthier O., Daculsi G., Guicheux J., Bujoli B. and Bouler J.-M., Novel biomaterials for bisphosphonate delivery, *Biomaterials*, sous presse, (2004a)

Josse S., Faucheux C., Soueidan A., Grimanidi G., Massiot D., Alonso B., Janvier P., Laïb S., Gauthier O., Daculsi G., Guicheux J., Bujoli B. and Bouler J.-M., Chemically modified calcium phosphates as biomaterials for drug delivery, *Adv.Mat.*, sous presse, (2004b)

Kay M. I., Young R. A. and Posner A. S., Crystal structure of hydroxyapatite, *Nature*, 204, 12 (1964), pp 1050-1052.

Khan N., Morozov V. A., Khasanov S. S. and Lazoryak B. I., Synthesis and crystal structure of calcium copper phosphate, $s\text{-Ca}_{19}\text{Cu}_2(\text{PO}_4)_{14}$, *Mater Res Bull*, 32, 9 (1997), pp 1211-1220.

Kivrak N. and Tas A. C., Synthesis of calcium hydroxyapatite - tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior, *J Eur Ceram Soc*, 81, 9 (1998), pp 2245 - 2252.

Kojima Y., Shiraishi A., Ishii K., Yasue T. and Arai Y., Hydroxyapatite coating on alumina substrate by sol-gel technique, *Phosphorous Research Bulletin*, 3, (1993), pp 79-84.

Kuo M. C. and Yen S. K., The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature, *Mater Sci Eng C-Bio S*, 20, 1-2 (2002), pp 153-160.

Kwon S.-H., Jun Y.-K., Hong S.-H. and Kim H.-E., Synthesis and dissolution behaviour of beta-TCP and HA / beta-TCP composite powders, *J Eur Ceram Soc*, 23, 7 (2003), pp 1039 - 1045.

Lacout J. L., Nounah A. and Ferhat M., Strontium-cadmium substitution in hydroxy- and fluor-apatites, *Ann Chim-Sci Mat*, 23, 1-2 (1998), pp 57-60.

Laghzizil A., El Herch N., Bouhaouss A., Lorente G. and Macquete J., Comparison of Electrical Properties between Fluoroapatite and Hydroxyapatite Materials, *Journal of Solid State Chemistry*, 156, 1 (2001a), pp 57-60.

Laghzizil A., Elherch N., Bouhaouss A., Lorente G., Coradin T. and Livage J., Electrical behavior of hydroxyapatites $\text{M}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (M = Ca, Pb, Ba), *Mater Res Bull*, 36, 5-6 (2001b), pp 953-962.

Layrolle P., Ito A. and Tateishi T., Sol-gel synthesis of zinc containing calcium phosphate biomaterials, *Phosphorous Research Bulletin*, 6, (1996), pp 63-66.

Layrolle P., Ito A. and Tateishi T., Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate and sintering into microporous hydroxyapatite bioceramics, *J Am Ceram Soc*, 81, (1998), pp 1421-1428.

Lazoryak B. I., Morozov V. A., Belik A. A., Khasanov S. S. and Shekhtman V. S., Crystal structure and characterization of $\text{Ca}_9\text{Fe}(\text{PO}_4)_7$ and $\text{Ca}_9\text{FeH}_{0.9}(\text{PO}_4)_7$, *J Solid State Chem*, 122, (1996a), pp 15-21.

Lazoryak B. I., Strunenкова T. V., Golubev V. N., Vovk E. A. and Ivanov L. N., Triple phosphates of calcium, sodium and trivalent elements with whitlockite-like structure, *Mater Res Bull*, 31, 2 (1996b), pp 207-216.

Lazoryak B. I., Strunenкова T. V., Vovk E. A., Mikhailin V. V., Shpinkov I. N., Romanenko A. Y. and Schekoldin V. N., The new phosphates $\text{Ca}_9\text{MLn}_{2/3}(\text{PO}_4)_7$ (M = Li, Na; Ln = rare earth, Y, Bi), *Mater Res Bull*, 31, 6 (1996c), pp 665-671.

LeGeros J. P., Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics., *Clin Mater*, 14, (1993), pp 65-88.

LeGeros R. Z., Crystallography studies of the carbonate substitution in the apatite structure, P. Thesis, (1967).

LeGeros R. Z., Variation in the crystalline components of human dental calculus. I. Crystallographic and spectroscopic methods analysis, *J Dent Res*, 53, (1974), pp 45-50.

LeGeros R. Z., Apatites in biological systems, *Progr Crystal Growth Charact*, 4, (1981), pp 1 - 45.

LeGeros R. Z., Variability of HAP/b-TCP in sintered "apatites", *J Dent Res*, 65S, (1986a), pp 292.

LeGeros R. Z., Calcium phosphate in oral biology and medicine, H. M. M. ed, Monograph in oral science (1991).

LeGeros R. Z., Biological and synthetic apatite, B. a. B. Constantz, Hydroxyapatite and related materials (1994), pp 3 - 28

LeGeros R. Z., Daculsi G., Kijkowska R. and Kerebel B., The effect of magnesium on the formation of apatites and whitlockites, D. J. e. Itokawa Y., Magnesium in health and disease (1989a).

LeGeros R. Z., Daculsi G. and Orly I., Solution-mediated transformation of OCP to apatite, *Scan Electron Micros*, 3,(1989b), pp 129-138.

LeGeros R. Z., Daculsi G., Orly I., Gregoire M., Heughebaert M., Gineste M. and Kijkowska R., Formation of carbonated apatite on calcium phosphate materials: Dissolution / precipitation processes, *Bone Bonding - Reed Healthcare Communications* (1992)

LeGeros R. Z., Kijkowska R., Abergas T., LeGeros J. P. and Kazimiroff, pH-temperature dependence of calcium phosphate formation, *J Dent Res*, 65S, (1986b), pp 80.

Liou S.-C., Chen S.-Y., Lee H.-Y. and Bow J.-S., Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders, *Biomaterials*, 25, 2 (2004), pp 189-196.

Liu C., Huang Y., Shen W. and Cui J., Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11, *Biomaterials*, 22, 4 (2001), pp 301-306.

Liu D.-M., Troczynski T. and Tseng W. J., Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite, *Biomaterials*, 23, 4 (2002), pp 1227-1236.

Lopatin C. M., Pizziconi V., Alford T. L. and Laursen T., Hydroxyapatite powders and thin films prepared by a sol-gel technique, *Thin Solid Films*, 326, 1-2 (1998), pp 227-232.

Malard O., Bouler J.-M., Guicheux J., Heymann D., Pilet P., Coquard C. and Daculsi G., Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions. Preliminary *in vitro* and *in vivo* study, *J Biomed Mater Res*, 46, (1999), pp 103 - 111.

Manjubala I. and Sivakumar M., In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation, *Mater Chem Phys*, 71, 3 (2001), pp 272-278.

Mayer I., Cohen H., Voegel J. C. and Cuisinier F. J. G., Synthesis, characterization and high temperature analysis of Al-containing hydroxyapatites, *J Cryst Growth*, 172, 1-2 (1997), pp 219-225.

Mayer I., Layani J. D., Givan A., Gaft M. and Blanc P., La ions in precipitated hydroxyapatites, *J Inorg Chem*, 73, 4 (1999), pp 221-226.

Monma H. and Kamiya T., Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite, *J Mater Sci*, 22, (1987), pp 4227 - 4250.

Montel G., Sur les structures de quelques apatites d'intérêt biologique et leurs imperfections, *Bull Soc fr Minéral Cristallogr*, 94, (1971), pp 300-313.

Nelson D. G., Featherstone J. D., Duncan J. F. and Cutress T. W., Paracrystalline disorder of biological and synthetic carbonate-substituted apatites, *J Dent Res*, 61, 11 (1982), pp 1274-1281.

Norme ASTM F 1185 - 88: Standard specification for composition of ceramic hydroxyapatite for surgical implants (1993).

Norme S 94-066 : Détermination quantitative du rapport Ca/P de phosphates de calcium (1993).

Norme S 94-067: Détermination qualitatives et quantitatives des phases étrangères présentes dans les poudres, dépôts et céramiques à base de phosphate de calcium (1993).

Norme S 94-068: Détermination de la cristallinité et de la dimension apparente des cristallites d'apatites et de poudres, dépôts et céramiques à base d'hydroxyapatite (1993).

Nery E. B., Lynch K. L., Hirthe W. M. and Mueller K. H., Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects, *J Periodontol*, 46, 6 (1975), pp 328-347.

Orlhac X., Fillet C., Deniard P., Dulac A. M. and Brec R., Determination of the crystallized fractions of a largely amorphous multiphase material by the Rietveld method, *J Appl Crystallogr*, 34, (2000), pp 114 - 118.

Passuti N., Daculsi G., Rogez J. M., Martin S. and Bainvel J. V., Macroporous calcium phosphate ceramic performance in human spine fusion, *Clin Orthop*, 248, (1989), pp 169-176.

Pena J. and Vallet-Regi M., Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique, *J Eur Ceram Soc*, 23, 10 (2003), pp 1687-1696.

Petrov O. E., Dyulgerova E., Petrov L. and Popova R., Characterization of calcium phosphate phases obtained during the preparation of sintered biphasic Ca-P ceramics, *Mater Lett*, 48, 3-4 (2001), pp 162-167.

Prieto Valdes J. J., Ortiz Lopez J., Rueda Morales G., Pacheco Malagon G. and Prieto Gortcheva V., Fibrous growth of tricalcium phosphate ceramics, *J Mat Sci: Mat in Med*, (1997), pp 297 - 301.

Ramachandra Rao R., Roopa H. N. and Kannan T. S., Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP – β -TCP composite ceramic powders, *J Mat Sci: Mat in Med*, 8, 8 (1997), pp 511 - 518.

Raynaud S., Champion E., Bernache-Assollant D. and Thomas P., Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders, *Biomaterials*, 23, 4 (2002), pp 1065-1072.

Rey C., Collins B., Goehl T., Dickson I. R. and Glimcher M. J., The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study, *Calcif Tissue Int*, 45, 3 (1989), pp 157-164.

Rey C., Shimizu M., Collins B. and Glimcher M. J., Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the $\nu_4\text{PO}_4$ domain, *Calcif Tissue Int*, 46, 6 (1990), pp 384-394.

Rey C., Shimizu M., Collins B. and Glimcher M. J., Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the $\nu_3\text{PO}_4$ domain, *Calcif Tissue Int*, 49, 6 (1991), pp 383-388.

Rhee S. H., Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment, *Biomaterials*, 23, (2002), pp 1147-1152.

Rietveld H. M., A profile refinement method for nuclear and magnetic structures, *J Appl Crystallogr*, 2, (1969), pp 65-71.

Rodriguez-Carvajal J., FULLPROF: A Program for Rietveld Refinement and Pattern Matching Analysis, *Abstracts of the Satellite Meeting on Powder Diffraction of the XV Congress of the IUCr* (1990) Toulouse, France.

Rodriguez-Carvajal J. and Roisnel T., Fullprof.98 and WinPLOTR: New Windows 95/NT application for diffraction, *Commission for powder diffraction, international union of crystallography*, newsletter n°20, (1998)

Rodriguez-Lorenzo L. M., Hart J. N. and Gross K. A., Influence of fluorine in the synthesis of apatites. Synthesis of solid solutions of hydroxy-fluorapatite, *Biomaterials*, 24, 21 (2003), pp 3777-3785.

Sampath Kumar T. S., Manjubala I. and Gunasekaran J., Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation, *Biomaterials*, 21, 16 (2000), pp 1623-1629.

Shannon R., Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides, *Acta Cryst A*, 32, 5 (1976), pp 751-767.

Slosarczyk A., Slosarczyk E., Stobierska E., Paszkiewicz Z. and Gawlicki M., Calcium phosphate materials prepared from precipitates with various calcium:phosphorous molar ratio, *J Am Ceram Soc*, 79, 10 (1996), pp 2539 - 2544.

Smith I. O., Baumann M. J., Obadia L. and Bouler J.-M., Surface potential and osteoblast attraction to calcium phosphate compounds is affected by selected alkaline hydrolysis process, *J Mater Sci: Mat in Med*, 15, (2004), pp 841-846.

Stuart Hunter J., Statistical design applied to product design, *J Qual Technol*, 17, 4 (1985), pp 210-221.

Suchanek W. L., Shuk P., Byrappa K., Riman R. E., TenHuisen K. S. and Janas V. F., Mechanochemical-hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature, *Biomaterials*, 23, 3 (2002), pp 699-710.

Ternane R., Cohen-Adad M. T., Panczer G., Goutaudier C., Kbir-Ariguib N., Trabelsi-Ayedi M., Florian P. and Massiot D., Introduction of boron in hydroxyapatite: synthesis and structural characterization, *J Alloy Compd*, 333, 1-2 (2002), pp 62-71.

Toriyama M., Ravaglioli A., Krajewski A., Celotti G. and Piancastelli A., Synthesis of Hydroxyapatite-Based Powders by Mechano-Chemical Method and their Sintering, *J Eur Ceram Soc*, 16, 4 (1996), pp 429-436.

Toth J. M., M. H. W., Hubbard W. G., Brantley W. A. and Lynch K. L., Determination of the ratio of HA/TCP mixtures by X-ray diffraction, *J Applied Biomater*, 2, (1991), pp 37 - 40.

Tung M. S., Chow L. C. and Brown W. E., Hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate in the presence or in absence of calcium fluoride, *J Dent Res*, 64, 1 (1985), pp 2-5.

Vallet-Regi M., Rodriguez-Lorenzo L. M. and Salinas A. J., Synthesis and characterisation of calcium deficient apatite, *Solid State Ionics*, 101-103, Part 2 (1997), pp 1279-1285.

Victoria E. C. and Gnanam F. D., Synthesis and characterization of biphasic calcium phosphate, *Trends biomater. Artif. Organs.*, 16, 1 (2002), pp 12 - 14.

Wei M., Evans J. H., Bostrom T. and Grondahl L., Synthesis and characterization of hydroxyapatite fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite, *J Mat Sci: Mat in Med*, 14, (2003), pp 311-320.

Weiss P., Gauthier O., Bouler J.-M., Grimandi G. and Daculsi G., Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer, *Bone*, 25, 2, Supplement 1 (1999), pp 67S-70S.

Wilson R. M., Elliott J. C., Dowker S. E. P. and Smith R. I., Rietveld structure refinement of precipitated carbonate apatite using neutron diffraction data, *Biomaterials*, 25, (2004), pp 2205-2213.

Yamada S., Heymann D., Bouler J.-M. and Daculsi G., Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/[beta]-tricalcium phosphate ratios, *Biomaterials*, 18, 15 (1997), pp 1037-1041.

Yamada S., Nakamura T., Kokubo T., Oka M. and Yamamuro T., Degradation of the apatite layer formed on bioactive ceramics and of the underlying ceramic surface by osteoclast in a culture system, *Cells and materials*, 4, 4 (1994), pp 347-356.

Yashima M., Sakai A., Kamiyama T. and Hoshikawa A., Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction, *Journal of Solid State Chemistry*, 175, 2 (2003), pp 272-277.

Yeong K. C. B., Wang J. and Ng S. C., Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO_4 , *Biomaterials*, 22, 20 (2001), pp 2705-2712.

Annexe

Protocole d'inclusion au Méthyle Métacrylate (MMA) à -20°C

Préparation des solutions

Préparation du MMA purifié (solution A)

500mL de MMA sont placés dans une ampoule à décanter.

250mL de NaOH 5% sont ajoutés

Le surnageant est conservé, la phase inférieure contenant la soude est éliminée.

Cette opération est effectuée 4 fois.

Le MMA obtenu est ensuite filtré sur des cristaux de CaCl₂ secs. (Les cristaux de CaCl₂ sont placés à l'étuve à 80-100°C au moins une journée avant utilisation et placés une nuit à -20°C) Le lendemain des cristaux de glace qui se sont éventuellement formés sont éliminés par filtration Büchner.

Préparation de cristaux de peroxyde de benzoyle

2g de peroxyde de benzoyle puis 20mL de méthanol sont ajoutés à 10mL de chloroforme.

Des cristaux de benzoyle se forment sous vive agitation au bout de quelques minutes.

L'ensemble est conservé à -20°C.

Préparation du milieu catalyseur

1g de cristaux de peroxyde de benzoyle (bpo), séchés sur un filtre sans cendres, est ajouté à 90mL de MMA purifié (solution A).

Le mélange est ensuite placé à -20°C pendant quelques heures, et les éventuels cristaux de glace sont éliminés par filtration Büchner (**solution B**).

10mL sont ensuite ajoutés à 10 mL de dibuthylphtalate (dbp) pour 90mL de la solution B. Ce mélange peut être conservé plusieurs mois à -20°C (**solution C**).

Déshydratation

Les échantillons sont placés dans des flacons en verre contenant une solution d'éthanol 100° pendant 15 minutes. Cette opération est répétée une deuxième fois.

Imprégnation

Les échantillons sont imprégnés pendant 24h dans un mélange 50% Alcool 100° / 50% solution A, puis pendant 24 heures dans la solution A seule.

Inclusion

L'échantillon à inclure est imprégné avec la solution C dans un flacon fermé hermétiquement et placé à 4°C pendant 2h.

10µL de N,N diméthyl-p-toluidine (NNdmpt) sont ajoutés par mL de solution C : c'est la solution D.

La solution C est remplacée par la solution D.

Le flacon est ensuite fermé hermétiquement, puis placé dans un bain d'alcool 70° jusqu'au-dessus de l'échantillon. Le tout est placé à -20°C pendant au moins 24h.

L'échantillon doit rester à température ambiante pendant 48h avant de pouvoir être exploité.

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1-1 : Schéma du remodelage osseux.....	18
Figure 1-2 : Représentation schématique de la maille élémentaire de l'hydroxyapatite.....	22
Figure 1-3 : Assemblage des ions PO_4^{3-} sur le plan (001), dans l'hydroxyapatite.....	22
Figure 1-4 : Représentation schématique de la maille élémentaire du phosphate tricalcique β	28
Figure 1-5 : Arrangement des colonnes A et B dans la maille du β -TCP (décrite dans le système hexagonal).	29
Figure 1-6 : Isotherme de solubilité des phases phosphocalciques dans le système $Ca(OH)_2 - H_3PO_4 - H_2O$ [Elliott, 1994].....	33
Figure 1-7 : Conditions de Bragg.....	36
Figure 1-8 : Montage $\theta - 2\theta$	37
Figure 1-9 : Indexation des pics : association d'un pic de diffraction et d'un plan (hkl).....	37
Figure 1-10 : Séparation d'énergie suivant la distribution de Boltzmann.....	42
Figure 1-11 : Conversion du signal RMN FID par transformée de Fourier.....	43
Figure 1-12 : Variation du nombre de bandes de rotation en fonction de la rotation de l'échantillon.....	44
Figure 1-13 : Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon (gauche) et représentation de la poire de diffusion (droite).....	45
Figure 1-14 : Schéma du principe du microscope électronique à balayage.....	46
Figure 1-15 : Spectrophotomètre d'absorption atomique.....	48
Figure 2-1: Photos du réacteur utilisé pour les synthèses sous pression autogène.....	52
Figure 2-2 : Morphologie des grains de β -TCP observés par MEB.....	58
Figure 2-3: Effet de la durée de calcination (4 heures et 5 jours) sur les spectres Infrarouge des TCP NaOH et NH_4OH	59
Figure 2-4 : Spectres infrarouge des TCP synthétisés.....	60
Figure 2-5 : Analyse par EDX des β -TCP synthétisés (MEB).....	62
Figure 2-6 : Affinement par la méthode de Rietveld du TCPSolid avec ajout de TiO_2 pour déterminer le taux d'amorphe.....	64
Figure 2-7 : Spectres RMN ^{31}P des β -TCP synthétisés.....	65
Figure 2-8 : Environnement des ions PO_4^{3-} dans la structure du β -TCP.....	67
Figure 2-9 : Spectre RMN ^{31}P d'un β -TCP pur avec l'attribution des pics ainsi que leur intensité [Jakeman, 1989].....	68
Figure 2-10 : Spectre RMN ^{31}P de $Ca_{10}Na(PO_4)_7$	69
Figure 2-11 : Spectre RMN ^{31}P de $TCPNH_4OH$ bis (synthétisé à partir de DCPD exempt de sodium).....	71
Figure 2-12 : Spectres RMN ^{31}P des TCP NaOH et TCP $NH_4OH/NaCl$	72

<i>Figure 2-13 : spectre RMN de 2 BCP et de l'hydroxyapatite.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 2-14: Condition de frittage des pastilles de β-TCP</i>	<i>76</i>
<i>Figure 2-15 : Réponse en traction d'un matériau fragile et d'un matériau ductile</i>	<i>78</i>
<i>Figure 2-16 : Principe de mesure de dureté Vickers.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 2-17 : Montage expérimental des essais de dissolution des différents types de β-TCP.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 2-18 : Spectres RMN ^{31}P des β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 2-19 : Déconvolution des spectres RMN ^{31}P des β-TCP à différentes teneurs en sodium.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 2-20 : Spectres infrarouge des β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$</i>	<i>89</i>
<i>Figure 2-21 : Paramètres de maille des β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$.....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 2-22 : Empreintes Vickers obtenues pour les TCP non sodé et sodé à 100% pour une même force appliquée (49 N).....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 2-23 : Résistance en compression des β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 2-24 : Morphologie des grains des β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 2-25 : Densité des pastilles de β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$ après frittage</i>	<i>93</i>
<i>Figure 2-26: Compacité des β-TCP dopés au sodium</i>	<i>94</i>
<i>Figure 2-27 : Porosité des β-TCP $\text{Ca}_{10,5-x/2} \text{Na}_x(\text{PO}_4)_7$ (MEB).....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 2-28 : Répartition de la taille des pores pour les β-TCP sodés et non-sodés, déterminée au porosimètre à mercure</i>	<i>96</i>
<i>Figure 2-29 : Profil de libération des ions calcium des β-TCP dans une solution à pH = 4,8.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 2-30 : Profil de libération des phosphates des β-TCP en solution à pH = 4,8.....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 2-31 : Morphologie des cellules MC3T3-E1 au contact du β-TCP (gauche) et du $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$ (droite), observées au MEB.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 2-32 : Viabilité comparée des cellules MC3T3-E1 cultivées sur plastique (contrôle), sur β-TCP et sur $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$, après 14 jours (activité MTS).....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 2-33 : Comparaison de l'activité phosphatase alcaline, marqueur de différenciation des ostéoblastes pour les cellules MC3T3-E1 cultivées sur plastique (contrôle), sur β-TCP et sur $\text{Ca}_{10}\text{Na}(\text{PO}_4)_7$, après 14 jours.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 4-1 : Spectre d'absorption infrarouge des CDA obtenues par hydrolyse en milieu basique de DCPD par NH_4OH.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 4-2 : Spectre d'absorption infrarouge des CDA obtenues par hydrolyse alcaline de DCPD par NaOH</i>	<i>146</i>
<i>Figure 4-3 : Détail du massif $\nu_3 \text{CO}_3$ pour les spectres d'absorption des CDA issues de l'hydrolyse alcaline de DCPD, en fonction de la concentration en NaOH.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 4-4 : Détail du massif $\nu_3 \text{CO}_3$ pour les spectres d'absorption des CDA issues de l'hydrolyse alcaline de DCPD, en fonction de la température de réaction (base utilisée : NaOH)</i>	<i>147</i>

<i>Figure 4-5 : Spectre d'absorption infrarouge des BCP</i>	148
<i>Figure 4-6 : Diffractogramme expérimental de CDA (.), diffractogramme calculé (-) et résidu (-)</i>	149
<i>Figure 4-7 : Diffractogramme expérimental de BCP (.), diffractogramme calculé (-) et résidu (-)</i>	150
<i>Figure 4-8 : Hydrolyse de DCPD par NH₄OH : influence de la température sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées</i>	151
<i>Figure 4-9 : Hydrolyse de DCPD par NaOH : influence de la température sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées</i>	151
<i>Figure 4-10 : Hydrolyse de DCPD par NH₄OH : pH final en fonction du rapport Ca/P des apatites obtenues pour différentes températures de synthèse</i>	151
<i>Figure 4-11 : Hydrolyse de DCPD par NaOH : pH final en fonction du rapport Ca/P des apatites obtenues pour différentes températures de synthèse</i>	151
<i>Figure 4-12 : Hydrolyse de DCPD par NH₄OH : influence de la concentration en NH₄OH initiale sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées</i>	152
<i>Figure 4-13 : Hydrolyse de DCPD par NaOH : influence de la concentration en NaOH initiale sur le rapport Ca/P des CDA synthétisées</i>	152
<i>Figure 4-14 : Paramètres de maille et paramètres affinés lors des affinements par la méthode de Rietveld effectués sur les CDA</i>	153
<i>Figure 4-15 : Observations au MEB des CDA</i>	155
<i>Figure 4-16 : Observation en MET des cristaux des CDA A et B</i>	159

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Composition des apatites (os, dentine, émail) chez l'adulte.....	16
Tableau 1-2 : Différents orthophosphates de calcium d'intérêt biologique.....	19
Tableau 1-3 : Effet de quelques substitutions ioniques au sein de l'hydroxyapatite sur les paramètres de maille et sur la cristallinité(- : diminution ; + : augmentation, = pas de changement) [LeGeros, 1981]	26
Tableau 1-4 : Formes allotropiques du phosphate tricalcique	27
Tableau 1-5 : Influence des substitutions des ions Ca^{2+} sur les paramètres de maille du β -TCP.....	30
Tableau 1-6 : Exemples de précurseurs de calcium et de phosphate trouvées dans la littérature pour la synthèse de BCP par mélange solide / solide	31
Tableau 1-7 : Exemples de précurseurs de calcium et de phosphates trouvées dans la littérature pour la synthèse de BCP par décomposition / précipitation.....	32
Tableau 1-8 : Principales bandes d'absorption IR de l'hydroxyapatite et du β -TCP [Fowler, 1966]	40
Tableau 2-1 : Densité des β -TCP synthétisés.....	61
Tableau 2-2 : Dosage de sodium dans les β -TCP et DCPD	63
Tableau 2-3 : Paramètres de maille des β -TCP synthétisés (les chiffres entre parenthèses correspondent à l'écart type)	65
Tableau 2-4 : Rapport d'intensité des bandes RMN ^{31}P pour le composé $Ca_{10}Na(PO_4)_7$	69
Tableau 2-5 : valence des atomes de calcium dans les structures β -TCP et $Ca_{10}Na(PO_4)_7$	74
Tableau 2-6 : β -TCP dopés en sodium synthétisés.....	76
Tableau 2-7 : Dosage du sodium dans les β -TCP $Ca_{10,5-x/2}Na_x(PO_4)_7$	84
Tableau 2-8 : Position et % d'intensité des pics après déconvolution des spectres RMN ^{31}P des β -TCP $Ca_{10,5-x/2}Na_x(PO_4)_7$	87
Tableau 2-9 : Bandes d'absorption infrarouge du β -TCP et du $Ca_{10}Na(PO_4)_7$	88
Tableau 2-10 : Porosité totale du β -TCP sodé et non-sodé (porosimétrie mercure)	95
Tableau 4-1 : Conditions de synthèse des CDA A à J.....	140
Tableau 4-2 : Condition de synthèse des CDA avec comme paramètre variable la température de réaction	140
Tableau 4-3 : Condition de synthèse des CDA avec comme paramètre variable la concentration en base ajoutée	141
Tableau 4-4 : Conditions d'acquisition des diffractogrammes RX pour les CDA et les BCP.....	142
Tableau 4-5 : Spécifique des CDA	156
Tableau 4-6 : Densité vraie des CDA A, B, C et D.....	157
Tableau 4-7 : Tailles des cristallites obtenues par la formule de Scherrer.....	158

Synthesis and characterization of calcium phosphate biomaterials:

- ~ Structure and properties of Na-doped β tricalcium phosphates
- ~ Formation of non stoichiometric apatites by hydrolysis of DiCalcium Phosphate Dihydrate

SUMMARY

The mineral phase of bone is similar to a poorly crystallized carbonated apatite.

The ageing of the population leads the surgeons to use synthetic bone substitutes.

Among these biomaterials, there are Biphasic Calcium Phosphates (BCP), consisting in a mixture of hydroxyapatite (HA) and β -tricalcium phosphate (β -TCP).

In a first step, thanks to NMR ^{31}P and XRD, we detected the incorporation of sodium within the β -TCP lattice, also its localisation and influence on lattice parameters. Furthermore, we showed that the integration of this ion within β -TCP increases the compressive strength of this bioceramic without modifying its cytocompatibility. The β -TCP doped with sodium appears to be a potential candidate for use as bone substitute.

During this thesis, we were also interested in the synthesis of Calcium Deficient Apatite (CDA), which after sintering above 800°C gives a BCP presenting a Ca/P ratio identical to that of the initial CDA.

We synthesized CDA via an original method consisting in hydrolysis of DiCalcium Phosphate Dihydrate (DCPD). The Ca/P ratio influences directly the biological properties of BCP. Thus, it was important to determine the influence of the experimental parameters on the Ca/P ratio of biological apatite.

A factorial design method was applied to prove that the temperature and the time of synthesis had an influence on the Ca/P ratio of CDA.

An equation predicting the Ca/P ratio was formulated.

This work emphasise the importance of the base used on the nature of synthesized apatite: when NH_4OH is used, no incorporation of carbonate ions is observed, while when NaOH is used the obtained CDA are substituted by sodium and carbonate ions, thus approaching biological apatite.

It was also shown, that when the temperature increased, the Ca/P ratio of CDA, the size of crystallites as well as the density increased while the specific surface of apatite decreased.

This study contributes to use Rietveld refinement for the determination of lattice parameters, crystallite size as well as the percentage of HA and β -TCP phases in the BCP.

This works allowed to answer to problems applied to this class of bioceramics (improvement of the ceramics mechanical properties, study of a method of synthesis to obtain bone substitute materials). Moreover, this study allows to better understand fundamental knowledge on crystallographic structures of calcium phosphate materials used as bone substitutes.

Key words

Biomaterials, apatites, β tricalcium phosphate, synthesis, X ray diffraction, infrared, nuclear magnetic resonance

Laëtitia OBADIA

Synthèse et caractérisation de phosphates de calcium d'intérêt biologique :

- ~ Structure et propriétés de phosphates tricalciques β dopés au sodium
- ~ Formation d'apatites non stoechiométriques par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté

Nombre de pages : 155 ; nombre de figures : 65 ; nombre de tableaux : 25

Thèse : Doctorat d'Université, Nantes (2004)

RESUME

La phase minérale de l'os est assimilable à une apatite carbonatée mal cristallisée. Le vieillissement de la population conduit les praticiens à avoir recours à des substituts osseux de synthèse. Parmi ces biomatériaux, on peut distinguer les phosphates de calcium biphasés (BCP) en hydroxyapatite (HA) et en phosphate tricalcique β (β -TCP).

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence, à l'aide de la RMN du solide du ^{31}P et de la DRX, l'incorporation du sodium au sein de la maille du β -TCP, sa localisation ainsi que son influence sur les paramètres de maille. De plus, nous avons montré que l'intégration de cet ion au sein du β -TCP augmentait la résistance en compression de cette biocéramique et ne modifiait pas sa cytocompatibilité. Le β -TCP dopé au sodium apparaît être un candidat potentiel pour une utilisation comme matériaux de comblement osseux.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes également intéressés à la synthèse d'apatites déficientes en calcium (CDA), qui après calcination au-delà de 800°C donnent des BCP de rapport Ca/P identique à la CDA de départ. Nous avons étudié un mode de synthèse peu décrit dans la littérature : l'hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté (DCPD). Le rapport Ca/P des BCP influe directement sur les propriétés biologiques, nous nous sommes donc attachés à déterminer l'influence des paramètres expérimentaux sur le rapport Ca/P des apatites synthétisées.

Un plan d'expériences a permis de démontrer que, dans le domaine étudié, la température et le temps de synthèse avaient une influence sur le rapport Ca/P des CDA obtenues. Une équation prédisant le rapport Ca/P a pu être formulée.

Ce travail a également souligné l'importance de la base utilisée sur la nature des CDA obtenues : lorsque NH_4OH est utilisé, aucune incorporation d'ions carbonates n'est observée, tandis que lorsque NaOH est employée, les CDA obtenues sont substituées par des ions sodium et carbonates, se rapprochant ainsi des apatites biologiques.

Il a de plus été montré que lorsque la température augmentait, le rapport Ca/P des CDA, la taille des cristallites ainsi que la densité augmentaient tandis que la surface spécifique des apatites diminuait.

Cette étude contribue également à valider le recours à l'affinement Rietveld pour la détermination des paramètres de mailles, de la taille des cristallites dans les CDA ainsi que le pourcentage de phases d'HA et de β -TCP dans les BCP.

Ce travail a permis de répondre à des problématiques appliquées à cette classe de biocéramiques (amélioration des propriétés mécaniques de céramiques, étude d'une méthode de synthèse pour l'obtention de matériaux de comblement osseux) ainsi que d'approfondir les connaissances fondamentales portant sur les structures cristallographiques de composés phosphocalciques utilisés comme biomatériaux.

DISCIPLINE

Chimie des matériaux / Biomatériaux

MOTS CLES

Biomatériaux, apatites, phosphate tricalcique β , synthèse, diffraction des rayons X, infrarouge, résonance magnétique nucléaire