

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA – BEJAIA
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option

Génie Pharmaceutique

Thème

*Elaboration et Caractérisation d'un Biomatériau Composite
Poreux : Hydroxyapatite-Gélatine.*

Présenté par :

M^{elle} MEHDI KATIA

Encadrée par :

Dr. SIDANE

Pr. KHIREDDINE

Soutenu devant le jury composé de:

Mr S. FATMI

Université A.Mira-Bejaia

Président

Mme T. IKHLEF

Université A.Mira-Bejaia

Examinatrice

Mme S. ZIANI

Université de Brouira

Examinatrice

Mme D. SIDANE

Université A.Mira-Bejaia

Rapporteuse

Mr H.KHIREDDINE

Université A.Mira-Bejaia

Co-Rapporteur

2017-2018

Remerciement

Dieu merci pour m'avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas abouti.

Les travaux de ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de génie de l'environnement (LGE) de l'université de Bejaia .

Au terme de ce travail je tiens à remercier ma promotrice Mme D. SIDANE et mon Co-promoteur Mr H. KHIREDDINE pour l'intérêt qu'ils ont portés à ce travail et pour leurs conseils et leurs patience et leurs grande disponibilité.

Mes grands remerciements a l'équipe du laboratoire de génie de l'environnement (LGE).

Mes remerciements vont également aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté aides et conseils durant la réalisation de tout ce travail.

DEDICACES

*Je remercie en premier lieu Allah le tout
puissant de m'avoir donné, la force et le
courage d'achever ce travail
Avec ma profonde gratitude et grand amour, je dédie ce
modeste travail :*

A mes très chers parents

A mon fiancée

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

ATG : Analyse thermique gravimétrique et différentiel.

DRX : diffraction des rayons X.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier.

ATR : réflectance Total atténué.

HAP : Hydroxyapatite.

HG: Hydroxyapatite gélatine.

SBF: Simulated Body Fluid.

BMU: Unité Multicellulaire de base.

1. LISTE DES FIGURES

Figure I.1. : Structure hiérarchisée de l'os	5
Figure I.2 : Le cycle du remodelage osseux	8
Figure II.1 :(a) Structure cristalline de l'hydroxyapatite(b) substitution ionique « F-» dans le réseau apatitique.	21
Figure I.9.1 : Procédé de fabrication de la gélatine.....	25
Figure I.12.1 : Schéma représentatif de la synthèse des matériaux par voie sol gel	33
Figure I.15.1 Evolution de la viscosité des gels.....	41
Figure I.16.1 Courbes ATG/ATD du gel séché d'hydroxyapatite	42
Figure I.16.2 Courbe ATG de la gélatine.....	43
Figure I.17.1 Gel séché d'hydroxyapatite	44
Figure I.17.2 Diagramme DRX de l'hydroxyapatite calcinée à 500°C.....	46
Figure I.17.3 Représentation des graphes d'hydroxyapatite a différentes températures de calcination.	47
Figure I.17.4 Diffractogramme DRX de la gélatine.....	48
Figure I.17.5 Gel séché d'hydroxyapatite composite (HG5%).....	49
Figure I.17.6 HG calciné à une température de 400°C et pour différentes teneurs en gélatine.....	50
Figure I.17.7.(a) HG calciné à T=500°C et pour différentes teneurs en gélatine.....	51
Figure I.17.8 HG calciné à une température de 700°C et pour différentes teneurs en gélatine.....	52
Figure I.17.9 HG calciné à une température de 900°C et pour différentes teneurs en gélatine.	53
Figure I.17.10 Spectre ATR de la gélatine.....	54
Figure I.17.11 Spectres ATR du gel séché de HAP et du composite HG5%.	55
Figure I.17.12 Spectres ATR des gels séchés des composites.....	56
Figure I.17.13 Spectres ATR des composites à 300°C.....	57
Figure I.17.14 Spectres ATR de l'hydroxyapatite calcinée à 500, 700 et 900°C.....	58
Figure I.17.15 Spectres ATR des composites à T=700°C	59
Figure I.17.16 Spectres ATR des composites à T=900°C.....	60
Figure I.17.17 Spectres ATR des composites à T=900°C.....	61
Figure I.20.1 schéma représentatif du viscosimètre	71
Figure.1I.24.1 Technique d'analyse ATR.....	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Résultats des tests de flexion : module d'Young (E), contrainte à la rupture ($\alpha\mu$) raideur (R) et force maximale à la rupture ($F\mu$)	7
Tableau II.1: Famille de phosphates de calcium	18
Tableau II.2 : Quelques propriétés physiques de la gélatine en fonction de l'origine	26
Tableau III.1 : Réactifs utilisés pour la préparation d'un litre de solution de SBF à 37 °C	35
Tableau IV.1 Mesure de la porosité et de la masse volumique de HAP, de la gélatine et des composites.....	62
Tableau IV.2 Mesures de la rugosité à la surface des composites, HAP et de la gélatine.....	63
Tableau VI.1 Composition ionique de SBF et du plasma humain.....	72

1. SOMMAIRE

Introduction	1
I. Chapitre I : Le système osseux	
I.1 La structure et les propriétés de l'os	3
I.1.1 La composition	3
I.1.2 La structure de l'os	4
I.1.3 Les propriétés mécaniques	6
I.1.4 Le remodelage osseux	7
I.2 Les substituts osseux	8
I.2.1 Les greffes osseuses	9
I.2.2 Les substituts osseux synthétiques	9
I.3 La propriété de bioactivité	10
II. Chapitre II : Généralités sur les biomatériaux	
II.1 Définition des Biomatériaux	12
II.2 Les métaux et alliages métalliques	13
II.3 Les polymères	13
II.4 Les céramiques	14
II.4.1 Les phosphates de calcium	15
II.4.2 L'hydroxyapatite	16
II.5 Bio-fonctionnalisation de l'hydroxyapatite par la gélatine	20
II.5.1 Choix de la gélatine	20
II.5.2 Composition et structure de la gélatine	20
II.5.3 Préparation de la gélatine	22
II.5.4 Caractéristiques de la gélatine	24
II.5.5 Applications de la gélatine	25
II.6 Références bibliographiques (Chapitre I et II)	26

III.	Chapitre 3 : Matériels et méthodes	
III.1	Introduction	30
III.2	Procédure expérimentale	30
III.2.1	Principes utilisés dans la formulation sol gel	30
III.2.2	Préparation de la solution sol d'hydroxyapatite (HAP)	31
III.2.3	Préparation de la solution de gélatine	31
III.2.4	Préparation des composite hydroxyapatite-gélatine (HG)	31
III.2.5	Préparation de la solution SBF	32
III.2.6	Mise en forme des matériaux : Préparation des pastilles	32
III.3	Caractérisation physico-chimique	33
III.3.1	Mesure de la viscosité	33
III.3.2	Essai de porosité	33
III.3.3	Mesure de la rugosité	35
III.3.4	Analyse thermiques gravimétriques et différentielles (ATG/ATD).....	35
III.3.5	Analyse par diffraction des rayons X (DRX).....	35
III.3.6	Analyse par spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared).....	35
III.4	Références bibliographiques (Chapitre III)	36
IV.	Chapitre 4 : Résultats et discussions	
IV.1	Mesure de la viscosité des gels.....	37
IV.2	Analyses thermiques.....	39
IV.2.1	Gel séché de HAP	39
IV.2.2	Diagramme thermogravimétrique de la gélatine	40
IV.3	Analyses microstructurales.....	41
IV.3.1	Diffraction des rayons X	41
IV.3.2	Spectrométrie Infrarouge.....	52
IV.4	Gélatine comme agent porogène	59

IV.4.1	Etude de la porosité	59
IV.4.2	Rugosité de surface	61
IV.5	Références bibliographiques (Chapitre IV).....	62
V.	Conclusion et perspectives	65
VI.	Annexes	



Introduction



L'os est un tissu vivant en perpétuel renouvellement. Le maintien de la masse osseuse à l'âge adulte est assuré grâce à l'activité simultanée de deux lignées cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Dans le cas de larges pertes de substances osseuses, lors par exemple de maladie telle que l'ostéoporose ou suite à une exérèse tumorale, le mécanisme naturel de renouvellement n'est plus suffisant. Un apport de matière extérieure devient alors indispensable pour traiter le traumatisme. Les matériaux d'origine biologique ont connu une utilisation très large pour la reconstitution de défauts osseux. Cependant, les allogreffes présentent des risques de rejet. L'autogreffe, quant à elle, ne déclenche pas de réaction inflammatoire, mais elle nécessite un second site opératoire, En plus ces techniques peuvent être valables dans le cas d'une substitution osseuse très réduite en volume.

Les progrès réalisés dans le domaine des matériaux ont permis de pallier ces inconvénients grâce au développement de greffons synthétiques biocompatibles (polymère, alliage métallique, céramique, verre...). Parmi les biocéramiques, nous pouvons citer le phosphate tricalcique β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ou l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) qui se sont imposés depuis plusieurs années comme substituts osseux de choix en chirurgie réparatrice. Ces céramiques ostéoconductrices accueillent la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire, mais leur faible bioactivité constitue une limite à une intégration rapide de l'implant dans l'organisme hôte. Afin d'améliorer les propriétés biologiques des substituts osseux phosphocalciques, l'une des méthodes consiste à modifier leur composition chimique pour se rapprocher de celle de la partie minérale de l'os. De telles modifications peuvent affecter la chimie et la structure des phosphates de calcium et donc avoir une influence sur le comportement biologique du matériau.

L'hydroxyapatite constitue l'une des phases les plus mystérieuses de la grande famille des apatites. Grand nombre d'articles et brevets sont publiés traitant la synthèse, les propriétés et les applications de cet intéressant matériau. En raison de leur biocompatibilité et de leur structure cristalline permettant diverses substitutions isomorphiques, en raison notamment de nombreux domaines d'applications (catalyse, environnement, médicale...), plusieurs méthodes de synthèse ont été mises en œuvre. Dans le domaine biomédical, la méthode sol gel est la plus utilisée compte tenu des précurseurs de grande pureté utilisés et de la température de cristallisation pas trop élevée.

Dans ce présent travail, qui représente une synthèse de quelques travaux effectués jusqu'à présent, nous allons d'abord dans le premier chapitre décrire les propriétés de l'os et ses

différentes substitutions que cela soit le comblement ou le remplacement de l'os par principalement l'hydroxyapatite.

Le chapitre deux expose des généralités sur les biomatériaux ainsi que la bio-fonctionnalisation de l'hydroxyapatite par la gélatine. Par la suite, dans le chapitre trois, nous présenterons les différents protocoles expérimentaux utilisés ainsi que les méthodes de caractérisation physico-chimiques. Le quatrième chapitre est consacré à la présentation et l'interprétation des résultats expérimentaux, concernant l'élaboration de l'hydroxyapatite par la méthode sol gel et la bifonctionnalisations de l'hydroxyapatite par la gélatine. Et enfin, nous terminons le travail par une conclusion générale résumant l'ensemble des données expérimentales obtenues.



Chapitre I

Le système Osseux



Chapitre 1 : Le système osseux

I. 1. La structure et les propriétés de l'os

Le système osseux forme une charpente où s'assemblent les organes du corps. Il assure notamment [1]:

- Le soutien aux organes mous du corps.
- Le mouvement en servant de points d'attache aux muscles.
- Le stockage d'ions calcium et phosphore dans la structure même de l'os (le squelette renferme 99% du calcium de l'organisme).
- La protection des organes internes : le crâne et la colonne vertébrale protègent le cerveau et la moelle épinière, la cage thoracique protège le cœur et les poumons et le bassin protègent les organes de la reproduction.
- La formation des globules rouges dans les cavités de certains os.

I.1.1. La composition

Les os sont des structures qui ont besoin de recevoir du sang et d'être *innervés*¹ car ils renferment des cellules vivantes qui en renouvellent constamment le tissu, exigent des nutriments et doivent se débarrasser de leurs déchets. Le tissu osseux est constitué de différents types de cellules et par une abondante matière extracellulaire, la matrice. C'est la combinaison judicieuse d'éléments organiques et inorganiques de la matrice qui permet à l'os d'être extrêmement durable et résistant sans devenir cassant[1].

Les cellules impliquées dans le tissu osseux sont :

Les cellules ostéoblastes : rencontrées en surface du tissu osseux en croissance. Elles sont riches en organites, témoins de l'importance des synthèses protéiques (collagène en particulier) et *mucopolysaccharidiques*² dont ils sont le siège. De plus, ces cellules contiennent une concentration élevée d'enzymes pyrophosphatases et phosphatases alcalines qui interviennent dans le déclenchement et l'entretien de la minéralisation de la substance pré-osseuse (ostéoïde).

Les cellules ostéocytes : sont des ostéoblastes complètement entourés par la matrice osseuse minéralisée ; ce sont les cellules osseuses mûres qui assurent l'entretien organique de l'os.

¹Innervé : système biologique animal responsable de la coordination des actions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps.

²mucopolysaccharidique : polysaccharide d'origine animale renfermant un sucre aminé (glucosamine ou galactosamine).

Les cellules ostéoclastes :sont situées à la surface du tissu osseux en voie de résorption. Elles assurent la phagocytose de l'os.

La matrice extracellulaire est faite d'une matière organique (substance fondamentale et fibre collagène) minéralisée. La matrice organique (35% en volume de la matrice extracellulaire), sécrétée par les ostéoblastes, est constituée principalement de fibres de collagène de type I. La substance fondamentale, très peu abondante, contient des mucopolysaccharides (et en particulier du chondroïtine-sulfate), des glycoprotéines, des protéines sériques, de l'eau et des électrolytes. Ce sont ces substances qui confèrent à l'os sa flexibilité et sa grande résistance à la tension ou torsion.

La dureté du tissu osseux est due à la minéralisation (ou calcification) de la matrice organique. Il s'agit essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite (phosphate de calcium) qui sont visibles en microscopie électronique entre les fibres de collagène ou à l'intérieur de celles-ci. Les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel et donc avec le courant sanguin. Ces constituants minéraux forment près de 65% en volume de la matrice.

Le calcium est un élément important pour le corps et les os en sont le réservoir. Il est impliqué dans le fonctionnement de plusieurs phénomènes dans le corps (contractions musculaire et cardiaque et transmission de l'influx nerveux par exemple). Les os doivent répondre rapidement à toute élévation ou diminution de la calcémie : à tout moment, le calcium peut être libéré en fonction des besoins de l'organisme et du taux de calcium sanguin qui doit rester constant[1].

I.1.2. La structure de l'os

La plupart des os sont une construction élaborée, composée d'une partie extérieure dense d'os compact, entourant un noyau d'os spongieux. Dans certains cas, comme aux joints entre vertèbres ou à la fin des os long, cette configuration minimise le poids de l'os tout en assurant une large surface d'appui. Dans d'autres cas, comme dans la *crête iliaque*³, l'os forme une structure légère en sandwich : 2 « feuilles » d'os compact entourant de l'os spongieux.

La surface des os n'est pas lisse ou uniforme. On y retrouve des bosses, des trous et des crêtes permettant aux muscles, tendons et ligaments de bien s'y ancrer, et servant de passage aux vaisseaux sanguins et aux nerfs. La structure hiérarchisée d'un os long (voir **figure I.1**) est composée d'os spongieux et d'os cortical[2,3].

³Crête iliaque : partie supérieure d'un des os du bassin.

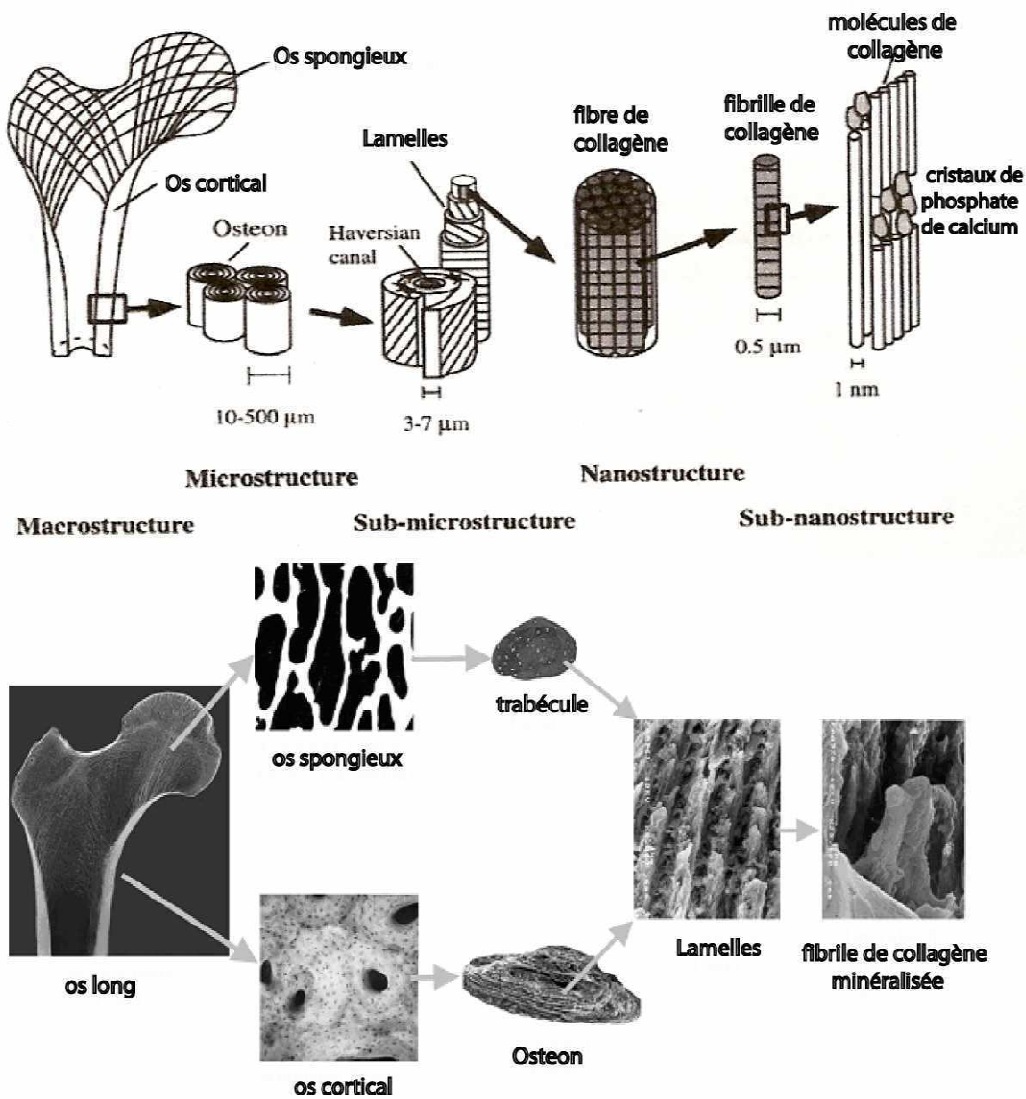


Figure I.1 : Structure hiérarchisée de l'os[2,3].

D'après Hansen et al[4] les os sont composés à 65% en volume d'hydroxyapatite et 35% de collagène, de cellules et d'eau. Le collagène type I de l'os est un matériau très flexible, de limite d'élasticité en traction très élevée et qui est constitué de longues chaînes d'acides aminés arrangées en une structure en triple hélice. Dans l'os, la structure cristalline de la phase inorganique d'hydroxyapatite forme un lien avec les molécules de collagène. Ces dernières s'assemblent pour former des fibrilles, qui elles même se rassemblent pour former des fibres de collagène qui s'organisent en lamelles. L'orientation des fibres dans les lamelles est *anisotrope*⁴, ce qui amène une résistance des lamelles supérieure dans le sens des fibres.

⁴Anisotrope : est la propriété d'être dépendant de la direction.

La partie minérale d'hydroxyapatite donne à l'unité basique de l'os de bonnes propriétés en compression tandis que le collagène lui apporte sa bonne flexibilité le long de la direction des fibres. Afin de former l'os compact, les lamelles sont ensuite arrangées en structures tubulaires à parois épaisses appelées ostéons dans lesquels les murs sont constitués de plusieurs couches de lamelles. Les lamelles s'orientent selon l'axe de l'ostéon, c'est pour cela que les ostéons sont plus résistants à des forces appliquées sur leur longueur. La partie cavitaire centrale de cette structure est connue en tant que canal de Havers. Celui-ci contient un vaisseau sanguin qui apporte des nutriments à tout l'ostéon à travers de petits canalicules émanant du canal. Chaque ostéon est couvert par un mûr liant connu en tant que « ligne de ciment ». L'os mature est principalement constitué de beaucoup de ces sous-systèmes, qui collectivement sont connus comme os haversien. L'os spongieux, quant à lui, dérive de l'arrangement des lamelles en trabécules. Dans ce cas, les lamelles sont plates et forment une structure tubulaire. L'os spongieux est alors constitué d'un réseau interconnecté de tiges ou de plaquettes. Un réseau de tiges engendre des cellules ouvertes de faible densité alors qu'un réseau de plaquettes donne lieu à une structure plus dense de cellules. Dans la pratique, la densité relative de l'os spongieux varie de 0,05 à 0,7. La densité augmente lorsque les tiges s'élargissent et s'aplatissent pour former des plaquettes, et finalement fusionnent pour donner des cellules fermées [5].

I.1.3. Les propriétés mécaniques

Les os sont constamment soumis à des forces de compression, de tension et de flexion lors des activités quotidiennes[6-8]. Les différences de propriétés mécaniques sur les différents sites osseux dans le même animal sont étudiées. Dans des souris, Jämsä et al[9] ont trouvé des valeurs de forces à la rupture, déformation à rupture, raideur et module d'Young plus élevées dans le tibia que dans le fémur. Les tests flexion [10-12] peuvent être utilisés sur toute la longueur des os ou sur des échantillons d'os cortical ou spongieux (**tableau I.1**).

Tableau 1.1 : Résultats des tests de flexion : module d'Young (E), contrainte à la rupture (α_μ), raideur (R) et force maximale à la rupture (F_μ) [9-11].

Test	Type d'os	E(GPa)	α_μ (MPa)	R (N/mm)	F_μ (N)
3 points	Fémur d'un rat femelle	9,3± 0,7	133± 5	/	/
3 points	Fémur de souris	1,92± 0,52	123± 23	70±19	19,9±4
4 points	Tibia humain	17± 1,7	131± 6	/	/
4 points	Metacarpal de chien	11,25± 1,49	356± 30	932±190	624±124

Ces différents tests montrent la grande variété des propriétés mécaniques des os, dues à leur caractère « vivant », adaptable aux contraintes subies. De plus, il ne faut pas oublier que les propriétés mécaniques de l'os dépendent du taux d'humidité, un os extrait du corps humain et séché aura des propriétés mécaniques supérieures à celles d'un os en contact avec les fluides du corps.

I.1.4. Le remodelage osseux

Le tissu osseux doit permettre la formation adaptée du squelette durant la croissance, la conservation de ses propriétés mécaniques et leur adaptation aux contraintes, la réparation des fractures et la mise à disposition du calcium qu'il stocke. Pour assurer ces propriétés, l'os est en perpétuel renouvellement : c'est le remodelage osseux. Au cours du remodelage osseux (figure I.2), l'os ancien est détruit ou résorbé par des ostéoclastes et remplacé par de l'os nouveau généré par des ostéoblastes [13].

Dix pour cent de l'os du squelette adulte est renouvelé chaque année. Le remodelage a lieu dans une structure définie appelée Unité Multicellulaire de Base (BMU) qui a pour dimensions 1 à 2 mm de long et 0,2 à 0,4 mm de large. Chez l'adulte, à tout moment, environ un million de BMUs sont activées. Dans l'os cortical, les BMUs progressent à la façon d'un tunnelier creusant l'os en front et re-synthétisant de l'os neuf à l'arrière [14]. Dans l'os trabéculaire, les BMUs traversent de part en part l'os et forment une tranche neuve. Les acteurs principaux du remodelage osseux, les ostéoclastes et les ostéoblastes, agissent de façon exactement orchestrée dans l'espace et dans le temps. La durée de vie d'une BMU est de 6 à 9 mois, période durant laquelle les ostéoclastes et les ostéoblastes doivent être recrutés en permanence. Le cycle débute par l'activation des précurseurs des ostéoclastes et leur

différenciation. Ceux-ci détruisent la matrice osseuse puis entrent en apoptose⁵. Parallèlement les précurseurs ostéoblastiques sont activés et les ostéoblastes se différencient[13]. Ils synthétisent, en arrière du front des ostéoclastes, l'os neuf et remplissent d'abord la cavité de matrice extracellulaire organique, la matrice ostéoïde, qui ensuite se minéralise. Une partie des ostéoblastes meurt par apoptose, l'autre partie devient des ostéocytes inclus dans la matrice osseuse et des cellules bordantes qui recouvrent la surface de l'os à l'état quiescent[15].

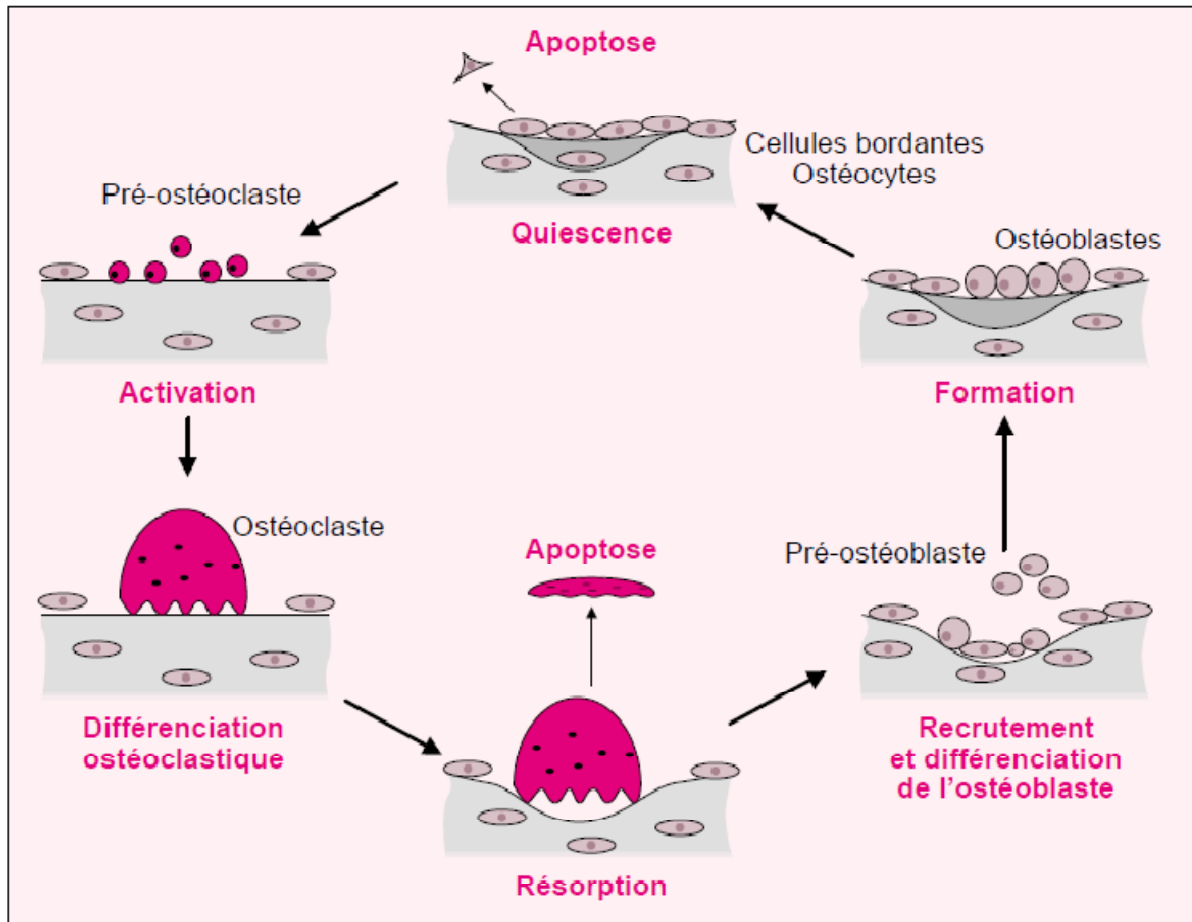


Figure I.2 :Le cycle du remodelage osseux[15].

I.2. Les substituts osseux

Dans certains cas le système osseux peut être déficient, il apparaît alors un besoin de substitution osseuse. Il existe plusieurs méthodes pour reconstruire des défauts osseux telles que les greffes osseuses, l'utilisation de la matrice osseuse déminéralisée (DBM), des

⁵ Apoptose ou mort cellulaire programmée est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires.

protéines osseuses et plusieurs autres facteurs de croissance osseux, ainsi que des substituts osseux synthétiques[16].

Un implant destiné à la régénération osseuse doit présenter quatre propriétés essentielles[17] :

- L'ostéogénèse : formation d'os nouveau et de tissu osseux par les cellules contenues dans le greffon ;
- L'osteoinduction : activation de la formation d'os nouveau par les tissus environnants du receveur ;
- L'osteoconduction : création d'un nouveau système haversien et vascularisation ;
- L'ostéointégration : liaison intime entre l'implant et l'os hôte.

I.2.1. Les greffes osseuses

La substitution osseuse la plus évidente consiste à remplacer l'os déficient par un autre os qui peut provenir du patient lui-même (autogreffe), être prélevé sur des cadavres (allogreffe) ou sur des animaux (xéno greffe). L'autogreffe apporte des propriétés idéales d'osteoconduction, d'ostéointégration et d'osteoinduction. Son prélèvement présente cependant plusieurs inconvénients puisqu'il augmente la durée de l'intervention chirurgicale et amène souvent des douleurs résiduelles et des désavantages esthétiques. De plus, la plupart des éléments cellulaires, tels que les cellules ostéogéniques ne survivent pas à l'implantation. D'autres limitations apparaissent pour des patients âgés avec des maladies malignes, des infections, des fractures ...etc. pour 8 à 20% des cas. L'allogreffe est la substitution osseuse la plus utilisée après l'autogreffe. Ce type de greffe consiste à utiliser un os provenant de cadavres. Cette dernière solution présente l'avantage d'être biocompatible, cependant elle peut transmettre des maladies et est dépendante de la disponibilité des greffons. Pour pallier le risque de transmission de maladies, on utilise des banques d'os *lyophilisés*⁶. Les cellules sont donc éliminées et il n'y a théoriquement plus de risque de transmission de maladie. Par contre le problème de disponibilité est toujours présent. Les xéno greffes sont évitées à cause des problèmes de biocompatibilité[18].

I.2.2. Les substituts osseux synthétiques

Les substituts osseux synthétiques sont des matériaux dérivés de la nature (corail par exemple) ou des matériaux synthétisés par l'homme (céramiques ou polymères).

⁶ Lyophilisé : dessiccation d'un produit préalablement congelé, par sublimation. Le solvant sublimé est généralement de l'eau, mais ce peut être également un alcool.

Ils peuvent s'utiliser sous forme dense, de suspension injectable (ciments) ou de blocs poreux. Les matériaux utilisés peuvent être résorbable ou stable.

La qualité essentielle que doit avoir un biomatériau est la biocompatibilité. Elle est étudiée par des tests *in vivo* sur animaux. D'autres tests doivent de même permettre de connaître pour chaque matériau son pouvoir favorisant ou inducteur de la repousse osseuse. Il doit donc être possible de connaître sa biofonctionnalité de façon à pouvoir l'appliquer dans tel cas précis parfois dans un but mécanique mais le plus souvent en « suppléance » de la repousse osseuse[18].

Les structures poreuses sont favorisées car elles apportent une fixation à l'interface par la repousse des tissus dans les pores à la surface ou à travers l'implant. Cet attachement est appelé fixation biologique. Elle est capable de supporter des états de contrainte plus complexe que dans le cas des implants denses, presque inertes qui ne permettent qu'une fixation morphologique. Une bonne fixation biologique demande des pores de diamètre supérieur à 100-150µm pour apporter une vascularisation vers le tissu hôte[19].

La recherche de substituts osseux synthétiques s'est rapidement tournée vers l'utilisation de céramiques. Cette dernière classe de matériau présente l'avantage d'être d'une grande dureté et de n'être pas soumis aux phénomènes de corrosion, comme dans le cas des métaux. On a tout d'abord cherché à utiliser des matériaux les plus inertes possibles tels que l'alumine par exemple. Ces matériaux étaient biocompatibles mais une capsule fibreuse non adhérente se formait à l'interface entre l'implant et l'os empêchant une liaison intime et forte avec l'os. Les recherches se sont alors tournées vers les matériaux bioactifs, c'est-à-dire ceux capables à la fois de former une liaison intime avec l'os et de favoriser la repousse osseuse[18].

I.3. La propriété de bioactivité

La bioactivité a été défini de la manière suivante : un matériau bioactif induit une réponse biologique spécifique à l'interface, ce qui le conduit à former un lien avec les tissus. Un matériau bioactif crée donc un environnement compatible à la croissance de l'os (ostéogénèse) avec le développement d'une interface minérale qui joue le rôle d'un lien naturel entre les matériaux vivant et non vivant. Ce concept a été étendu pour inclure un grand nombre de matériaux bioactifs avec une large gamme de vitesse de liaison et d'épaisseur de la couche de liaison interfaciale. Ils incluent des verres bioactifs tels que le bioverre 45S5, des vitrocéramiques bioactives telles que l'apatite/wolastonite (A/W), des céramiques denses en phosphate de calcium tels que l'hydroxyapatite synthétique (HAP), des composites bioactifs

comme un mélange polyéthylène-hydroxyapatite (PE-HA), et une série de matériaux bioactifs de revêtements.

Les matériaux résorbables comme le phosphate tricalcique (TCP) sont également bioactifs. Cependant, il faut que leurs vitesses de résorption soient du même ordre de grandeur que la vitesse de formation de l'os. On utilise souvent ce type de matériaux en combinaison avec des céramiques bioactives plus stable (HAP-TCP) [20].

Tous les résultats des tests *in vivo* et *in vitro* montrent que la seule caractéristique commune aux matériaux d'implants bioactifs est la couche biologiquement active d'hydroxyapatite carbonatée qui se forme à leur surface. Une fois implantés ils engendrent une série de réactions physico-chimiques se produisant à l'interface implant/tissu osseux. Ces réactions conduisent éventuellement à un lien interfacial chimique fort à travers une couche d'apatite (Ca-P) précipitée en milieu biologique. Donc, l'os adhère aux matériaux implantés grâce à la création d'un lien chimique, ce qui va former une couche d'hydroxyapatite à la surface du matériau et ainsi sceller l'implant à l'os. Cependant, les grandes différences des vitesses de liaison de l'os aux implants bioactifs indiquent que différents facteurs biochimiques sont mis en œuvre à l'interface implant tissu.

Chaque type d'implant bioactif induit une interaction avec les tissus environnants. Deux types d'interactions peuvent se dérouler :

Une interaction extracellulaire, qui est déterminée par les propriétés de surface du matériau. Cette interaction permet l'adsorption à la surface de l'implant de diverses substances biologiques (facteurs de croissance, enzymes) présentes dans l'os [21].

Une interaction intracellulaire qui conduit à une ostéogénèse et à un lien stable avec les tissus mous. Cette interaction se retrouve dans le cas des verres à cause du relargage de silices solubles de leur surface qui sont des facteurs mitogènes efficaces pour des cellules ostéoblastiques humaines. Ils augmentent la synthèse d'ADN et induisent l'activité des phosphatases alcalines et le relargage d'ostéocalcines[22].

Les implants d'hydroxyapatite synthétique sont ostéoconducteurs. Les implants ostéoconducteurs apportent simplement une interface biocompatible à travers laquelle l'os migre. La bioactivité ostéoconductrice apparaît lorsqu'un matériau induit uniquement une réponse extracellulaire à son interface. Le relargage de silices solubles est faible et ne peuvent pas former un lien stable avec les tissus mou. Le bioverre 45S5, est un matériau bioactif, il est à la fois ostéoproduit et ostéoconducteur[23].



Chapitre II

Généralités sur les biomatériaux



Chapitre 2 : Généralités sur les biomatériaux

II.1. Définition des Biomatériaux

Il ne peut sans doute pas exister une définition totalement satisfaisante des biomatériaux. La Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux, dite conférence du consensus a retenu, en 1986, la définition suivante : "matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques".

Au-delà de toute définition formelle, la notion de biomatériaux est entièrement contenue dans la nécessaire prise en compte du contact de ces matériaux avec des tissus ou fluides vivants. Cet aspect de contact, qui est évident dans le cas d'implants, doit être étendu aux contacts qui se réalisent à la surface ou à l'extérieur du corps comme, par exemple, ceux qui se produisent avec le sang dans l'hémodialyse, ou avec la cornée dans les lentilles de contact. A la limite, elle devrait même être étendue aux produits de diagnostic (microplaques, support de culture, ...) et aux matériaux pour biotechnologies, qui sont en contact avec des cellules vivantes. En relation directe avec l'aspect contact, la notion de « biocompatibilité » est essentielle dans le domaine des biomatériaux. Soit, classiquement, biocompatibilité "négative", définie par les propriétés que le matériau ne doit pas avoir (pas de réaction inflammatoire, pas de toxicité, ...), soit, à la suite d'une évolution plus récente, biocompatibilité élargie (et si possible mesurable), définie comme "la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique". Cette biocompatibilité "élargie" débouche sur la notion très actuelle de "bioactivité", par laquelle l'on souhaite que le matériau ne soit pas nécessairement le plus inerte possible, mais au contraire fasse réagir le tissu vivant.

Il faut également prendre en compte la durée du contact avec les tissus vivants, même si cette durée peut varier beaucoup suivant les cas. Pour que l'on puisse parler de biomatériaux, on admet généralement que le contact avec le vivant doit dépasser quelques heures. Ce paramètre permet d'exclure les produits pharmaceutiques du champ des biomatériaux mais laisse encore la place à certaines interprétations multiformes : cas des systèmes de libération contrôlée de médicaments [24].

Les plus grandes catégories de biomatériaux synthétiques qui peuvent être envisagées sont :

- Les métaux et alliages métalliques,
- Les polymères,
- Les céramiques au sens large.

II.2. Les métaux et alliages métalliques

Ce sont en quelque sorte les "ancêtres" des biomatériaux puisque ce sont les premiers à avoir été utilisés pour faire des implants. Le plus important par les volumes est sans doute l'acier inoxydable, encore largement utilisé en chirurgie orthopédique. L'intérêt de l'acier inoxydable dans ce domaine réside dans ses propriétés mécaniques. Il faut également mentionner particulièrement le titane, qui est utilisé principalement en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. On le trouve également dans les stimulateurs cardiaques et les pompes implantables. L'un des avantages principaux du titane est sa bonne biocompatibilité : l'os adhère spontanément au titane. On utilise également des alliages cobalt, chrome, molybdène, du tantale, etc. Les principaux problèmes mal résolus avec les métaux et alliages métalliques sont liés à la corrosion électrochimique et durabilité, aux mécanismes de dégradation non électrochimiques incluant les interactions protéine/métal, aux réactions immunitaires et d'hypersensibilité, ainsi que les problèmes de débris et de frottements.

II.3. Les polymères

Les utilisations des polymères dans le domaine des biomatériaux sont extrêmement nombreuses. Les deux grandes tendances de l'usage des polymères concernent :

Les polymères fonctionnels : sont susceptibles d'avoir une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant, à savoir par exemple la capacité d'interaction avec les ostéoblastes (et/ou les fibroblastes) qui favorise la repousse osseuse. Ceci est envisagé par la fixation sur le polymère de groupements ionisés tels que : orthophosphate, carbonate, carboxylate, etc. La "fonctionnalité" peut notamment être obtenue par la modification de l'état de surface du polymère par implantation ionique ou par greffage de substances fonctionnelles.

Les polymères résorbables : tels que les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique qui sont utilisables en chirurgie orthopédique traumatologique, ou les polyanhydrides et/ou polyaminoacides qui sont utilisés dans les formes retard de médicaments.

Les principaux problèmes mal résolus avec les polymères actuellement mis en œuvre ne concernent pas que la biocompatibilité à l'interface matériau-tissu, mais aussi l'instabilité au rayonnement gamma, la réactivité à certains types de médicaments, les risques liés aux additifs, aux composants de bas poids moléculaire, aux produits de dégradation in vivo, l'érosion de surface ou de la masse etc. [24].

II.4. Les céramiques

Les céramiques se caractérisent par une température de fusion élevée et un comportement fragile, qui déterminent leurs domaines d'application. Elles incluent des oxydes, des sulfures des bromures, des nitrures, des carbures, des composés intermétalliques, Dans le domaine des biomatériaux, on rencontre principalement l'alumine et la zircone utilisées dans les têtes de prothèses de hanche, ainsi qu'en odontologie pour les implants dentaires[24].

En 1970, Hench [25] découvre les verres bioactifs ou encore les bioverres. Ils appartiennent à la famille des céramiques bioactives. Ce sont des matériaux amorphes avec de faibles propriétés mécaniques, lesquelles orientent leurs applications en tant que revêtements prothétiques. La configuration de base d'un verre bioactif est $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$. Il est basé sur quatre oxydes : 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO , et 6% de P_2O_5 .

Il faut signaler tout particulièrement les utilisations et les développements de deux céramiques à base de phosphate de calcium : l'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique (TCP). En effet, ces matériaux présentent l'avantage d'être ostéoconducteurs, c'est-à-dire de favoriser la repousse osseuse au contact et la colonisation par l'os ; 65 % de la matière constituant le tissu osseux est d'ailleurs une forme de phosphate calcique dont la formule chimique s'apparente à l'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, mais dont l'agencement spatial en diffère notablement puisque des cristaux d'hydroxyapatite y sont accolés à des fibres de collagène. En outre, l'HAP poreuse et les céramiques à base de TCP sont biorésorbables. Le principal problème avec l'HAP est d'arriver à synthétiser une HAP ayant juste la bonne taille de pores pour que la colonisation se fasse bien.

On trouve donc des utilisations de HAP dans les implants et matériaux de comblement dentaires et dans la chirurgie orthopédique. Des vaisseaux artificiels à base d'HAP frittées ont même été élaborés.

Les principaux problèmes mal résolus avec les céramiques sont :

- Les mécanismes de dégradation,
- la durabilité,
- La résistance à la fracture
- L'activité de surface,
- L'adhésion des protéines ou des cellules en surface.

Avec les céramiques biorésorbables, les problèmes sont :

- La mesure et le contrôle de la biorésorption et l'effet sur le tissu local,

- La calcification,
- Les effets de la stérilisation sur la biorésorbabilité,
- les effets sur la cicatrisation et la formation de l'os[24].

II.4.1. Les phosphates de calcium

La plupart des études menées sur les apatites ont porté leur plus grand intérêt au phosphate de calcium, en raison notamment de leur biocompatibilité. Leur structure cristalline permet diverses substitutions de cations et /ou d'anions. En effet, les phosphates de calcium forment une famille de composés chimique de structures et de composition variables, ils peuvent apparaître sous différentes formes : hydrates, hydroxydes ou anhydres. Les propriétés de dissolution de ces phosphates de calcium dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques, en particulier le rapport molaire Ca/P, et de la structure cristallographique. Ainsi, en fonction du rapport molaire Ca/P, nous pouvons définir plusieurs familles de phosphates de calcium (voir **tableau II.1**)[26].

Tableau II.1 : Famille de phosphates de calcium[27].

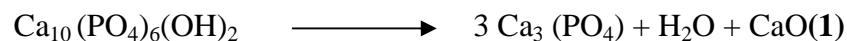
Phosphates de calcium	Formule chimique	Abréviation	Ca/P
Phosphate monocalcique Anhydre Monohydrate	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MCPA MPCM	0,50
Phosphate dicalcique Anhydre Dihydraté Pyrophosphate de calcium	CaHPO_4 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_2\text{P}_5\text{O}_7$	DCPA DCPD PPC	1,00
Phosphate octocalcique Apatitique Amorphe	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5(\text{PO}_4)_{3,5}(\text{OH})_{0,5}$ $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$	OCPa OCPam	1,33
Phosphate tricalcique α ou β Apatitique Amorphe	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)(\text{OH})$ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot n \text{H}_2\text{O}$	TCP(α, β) TCPa ACP	1,50
Hydroxyapatite stoechiométrique Non-stoechiométrique	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$	HAP PCA	1,67
Phosphate tétracalcique	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	TTCP	2,00

II.4.2. L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est un minéral de la classe des phosphates. On retrouve de l'hydroxyapatite en grande quantité dans la dentine (ivoire), l'émail des dents et les os. On utilise de l'hydroxyapatite comme enduit dans les implants prothétiques et comme remplissage des os amputés. L'hydroxyapatite est également utilisée en médecine dentaire pour servir d'enduit sur certains implants dentaires. L'hydroxyapatite est généralement bien tolérée par l'organisme.

II.4.2.1. Les propriétés de l'hydroxyapatite

La composition de la poudre d'HAP dépend fortement de la température et du temps de frittage. Après synthèse de la poudre d'hydroxyapatite par voie sol-gel à partir du système P_2O_5 et $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$. Fathi et al [28], ont varié le temps de frittage de 1h jusqu'à 6h pour des températures de frittage de 600°C et 700°C. Ils ont remarqué que le degré de cristallinité de la poudre d'HAP et la taille des particules augmentent quand la température de frittage augmente de 600°C à 700°C et que le frittage à 700°C provoque la décomposition de l'HAP en β TCP et CaO selon la réaction :



Selon Bigi et al [29], les propriétés structurales et morphologiques des gels et des nano cristaux d'HAP dépendent fortement du rapport molaire Ca/P.

Afin de se rapprocher encore de la partie minérale de l'os qui contient de nombreux substitués ioniques, des dopages de l'hydroxyapatite de synthèse avec des éléments métalliques ont été effectués. De nombreuses études ont été menées concernant l'influence de divers ions comme le fluor, le strontium ou des groupements comme les carbonates ou les silicates. Quelques travaux antérieurs ont mis en évidence l'intérêt du silicium dans la prolifération des cellules osseuses, le zinc et le manganèse dans la capacité à favoriser la résorption et l'ossification [30-32].

II.4.2.2. Le domaine d'applications de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite fait l'objet de nombreuses études, en raison de ses propriétés physico-chimiques qui lui confèrent une large gamme d'application dans différents domaines.

a. Domaine biomédical

En raison de ses propriétés de bioactivité et de biocompatibilité, l'hydroxyapatite est largement utilisée dans le domaine médical et dentaire, de la reconstitution osseuse. Elle est utilisée dans le recouvrement des parties métalliques des prothèses de hanches ou de genoux. Elle peut être utilisée sous forme de granules ou de pièces macroporeuses pour le comblement en chirurgie réparatrice. Elle est aussi utilisée comme substituts osseux, système de libération de principes actifs, céramiques et ciments [33].

b. Domaine industriel

L'hydroxyapatite est utilisée comme catalyseur dans l'industrie des polymères pour la déshydrogénation et la déshydratation des alcools primaires, ainsi que dans l'industrie des sucres. L'hydroxyapatite synthétique est également utilisée couramment comme phase stationnaire, dans les colonnes chromatographiques pour la séparation de diverses molécules telles que les vitamines (vitamine D₃) [34].

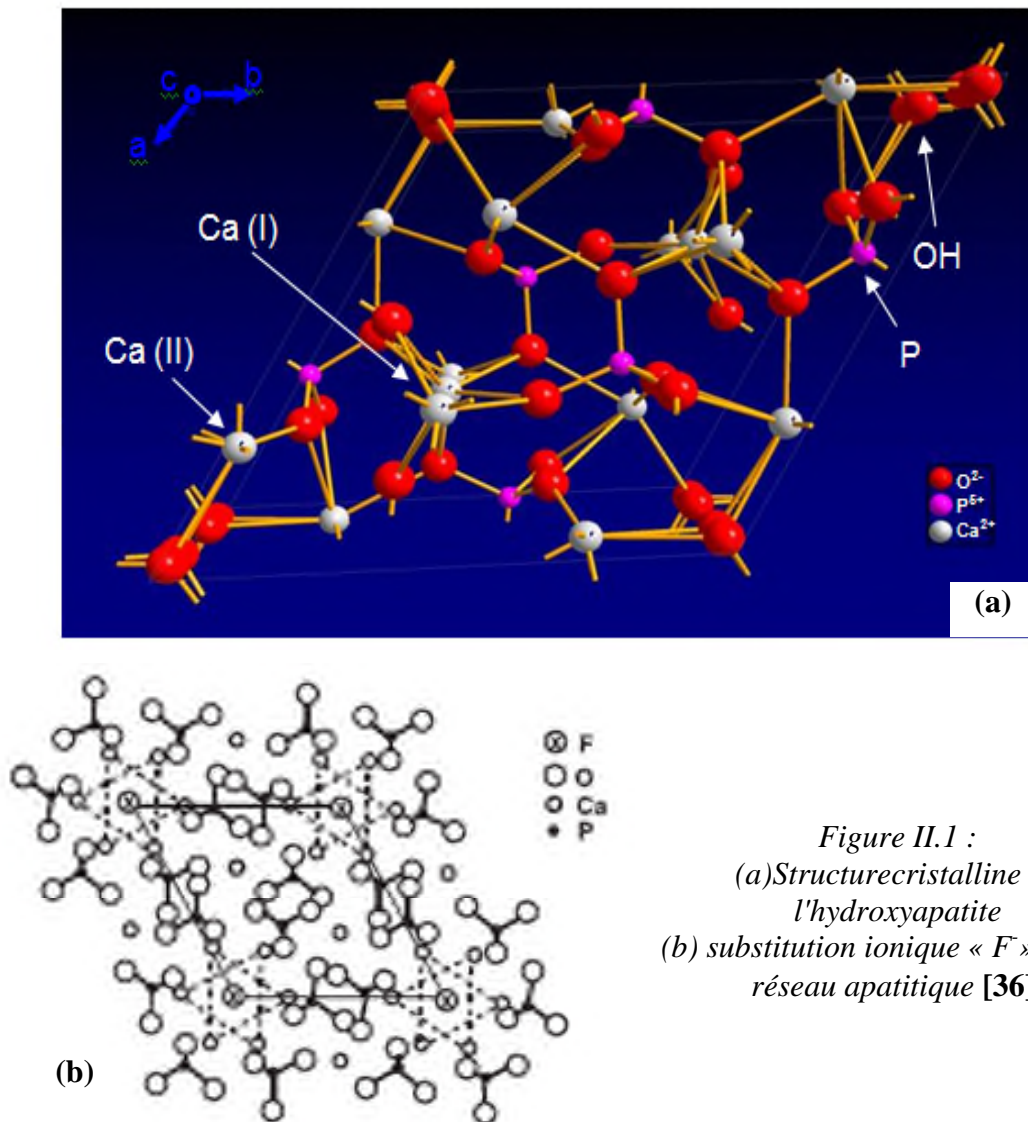
c. Domaine environnemental

Les apatites sont utilisées comme additifs pour le traitement des sols pollués, et comme matériaux de confinement des déchets radioactifs. La structure cristalline de l'hydroxyapatite offre la possibilité d'échanger les ions Ca²⁺ avec d'autres cations en solution. De nombreuses études ont été menées sur la fixation d'ions de métaux lourds sur l'HAP en solution aqueuse ou dans les sols contaminés [35].

II.4.2.3. Structure de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est une espèce minérale de la famille des phosphate, de formule Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. L'hydroxyapatite cristallise dans le système hexagonal, groupe spatial P6₃/m, qui résulte d'un empilement de groupements PO₄, qui forme deux types de tunnels parallèles à l'axe (c) dans lesquels se localisent les ions Ca²⁺ (**figure II.1**) [36].

L'ion OH⁻ peut être remplacé par le fluor, le chlore ou le carbonate. La poudre d'hydroxyapatite pure est blanche. Celles que l'on trouve dans la nature peuvent cependant être de couleur marron, jaune ou verte.



II.4.2.4. Méthodes de synthèse de l'hydroxyapatite

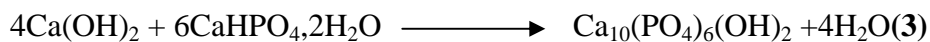
Plusieurs méthodes ont été mises en œuvre, nous pouvons citer [37-39]:

a. Méthode sol-gel

Le procédé sol-gel est une technique appropriée pour synthétiser des poudres de grande pureté grâce au contrôle précis des paramètres du procédé. Les particules primaires ainsi obtenues sont caractérisées par des nano-dimensions. De plus, la forte réactivité de la poudre sol-gel autorise une réduction de la température du procédé, et empêche les phénomènes de dégradation lors du frittage. Les inconvénients de ce procédé résident dans la possibilité d'hydrolyse des phosphates et le coût élevé des réactifs (alkoxide).

b. Méthode hydrothermale

Le principe de la synthèse hydrothermale consiste à chauffer au-dessus de 100°C un mélange de réactifs en solution sous pression suffisamment haute (>1 atm) de telle sorte à permettre une élévation de la température tout en empêchant l'eau de s'évaporer. Cette méthode conduit à l'obtention de poudres d'HAP fines, homogènes et bien cristallisées. Cette technique permet la synthèse des poudres d'hydroxyapatites avec la cristallinité et la morphologie désirées. Les réactifs utilisés sont variés, nous citons à titre d'exemple les couples (CaO / H₃PO₄) et (Ca(OH)₂ / CaHPO₄·2H₂O) qui réagissent selon les réactions suivantes:



Le cout énergétique très élevé de cette méthode dans un système fermé limite son application industrielle.

c. Méthode de précipitation

La précipitation est la technique de synthèse de l'HAP la plus utilisée, certainement grâce aux faibles couts engendrés. Il existe deux approches de synthèse : la précipitation par double décomposition et par neutralisation de l'acide ortho-phosphorique.

➤ *Voie par double décomposition*

La méthode par double décomposition consiste à ajouter de façon contrôlée une solution d'un sel cationique des ions Ca²⁺ dans une solution des ions PO₄³⁻ à une température de 80°C. Le précipité est ensuite lavé et séché. Cette technique permet également d'obtenir des apatites mixtes (contenant deux cations différents).

➤ *Voie par neutralisation*

Elle consiste à neutraliser une solution de lait de chaux Ca(OH)₂ en y ajoutant une solution d'acide phosphorique. Cette réaction permet d'obtenir rapidement de grandes quantités d'hydroxyapatite phosphocalcique. La réaction mise en jeu est la suivante :



II.5. Bio-fonctionnalisation de l'hydroxyapatite par la gélatine

II.5.1. Choix de la gélatine (agent porogène)

La combinaison de composants organiques et inorganiques permet d'obtenir des matériaux avec une biocompatibilité et une ostéoconductivité maximales [40]. Dans les tissus osseux, le collagène forme un matériau *composite* avec les phosphates de calcium. Des matériaux composites tels que l'hydroxyapatite/collagène sont d'un intérêt particulier dans le remplacement des défauts osseux [41]. La gélatine est un produit de l'hydrolyse partielle du collagène [42] et contrairement à ce dernier, la gélatine est plus stable et moins *antigénique*¹, ce qui permet son application en tant que biomatériaux [40, 42, 43]. Par conséquent, l'incorporation d'un biopolymère naturel tel que la gélatine dans une matrice minérale telle que l'hydroxyapatite permet de fournir aux cellules un environnement favorable à leur prolifération et leur différenciation. En outre, la porosité est un paramètre essentiel qui définit les propriétés d'un biomatériau. Les tissus conjonctifs solides sont poreux, la porosité de l'os spongieux est de 50 à 90% (la taille des pores est presque de 1 mm de diamètre) [44, 45]. Des travaux de recherche [46-48] ont montré l'influence de l'ajout de la gélatine dans la matrice de l'hydroxyapatite sur la porosité du matériau composite obtenu. La gélatine est également avantageuse en raison de sa disponibilité, son faible coût, sa biocompatibilité et biodégradabilité [43,49,50].

II.5.2. Composition et structure de la gélatine

La gélatine est un mélange hétérogène de protéines hydrosolubles de masses moléculaires élevées. Elle est obtenue par dégradation du collagène qui est la protéine la plus répandue chez les mammifères, un tiers des protéines totales chez les mammifères. On le retrouve également chez les poissons, les oiseaux, etc. Le collagène est le constituant majeur des tissus conjonctifs et des matrices des os. Le collagène est une protéine *fibrillaire*², son rôle est primordial dans le développement des tissus, il se présente sous la forme de fibres caractérisées par une forte résistance mécanique, protégeant ainsi les muscles contre de trop fortes tensions [51].

¹ Antigénique : toute substance que le système immunologique d'un individu reconnaît comme étrangère, et qui provoque une réponse par la production d'anticorps

² Fibrillaire : protéine Qui se compose de fibrilles

La gélatine est composée d'acides aminés hydrophobes et hydrophiles, qui lui confèrent un caractère amphiphile. Elle est composée de groupes chargés positivement (13% de lysine et d'arginine), des groupes chargés négativement (~ 12% d'acide glutamique et aspartique) et des groupes hydrophobes (~ 11% de la chaîne comprenant la leucine, isoleucine, méthionine et valine). L'autre partie de la chaîne contient de la glycine, de la proline et de l'hydroxyproline (**figure II.2**). L'analyse de la composition en acides aminés des gélatines en fonction du prétraitement montre, que le prétraitement acide modifie peu la composition en acides aminés de la gélatine alors que le prétraitement alcalin transforme les résidus asparagine et glutamine en acides aspartique et glutamique. La structure de la gélatine est une molécule en forme de baguette (une protofibrille) composée des structures hélicoïdales primaires, secondaires et tertiaires [47,49].

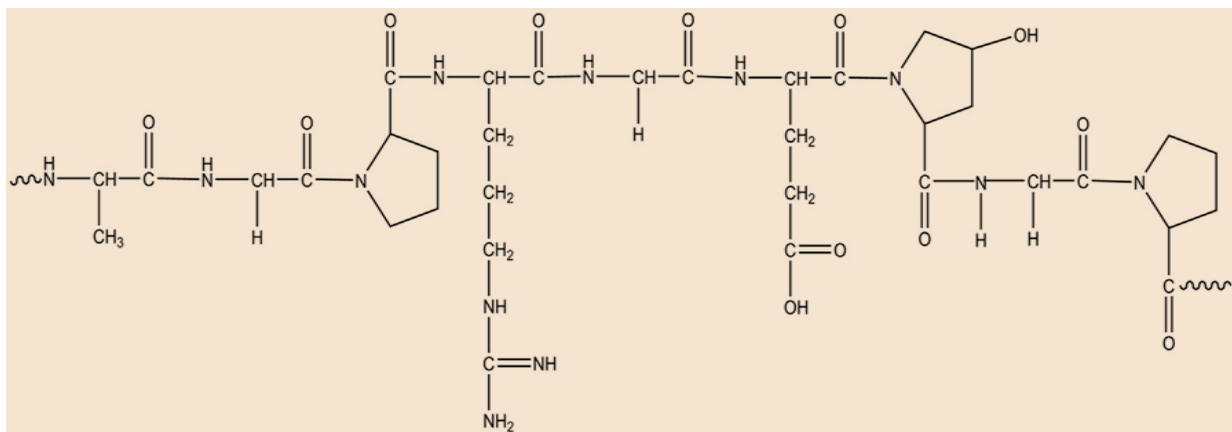


Figure II.2 : La structure chimique de base de la gélatine [47,49].

La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Elle est soluble dans l'eau chaude que dans l'eau froide. Elle est pratiquement insoluble dans la plupart des solvants organiques tels que l'alcool, le chloroforme, l'acétone ...etc. et les huiles. Pour que la gélatine soit solubilisée, il est nécessaire de la chauffer à des températures supérieures à 40°C. Pour des températures supérieures à 40°C, la gélatine présente une structure dite désordonnée. Le système ainsi obtenu est une solution de gélatine à l'état sol [52]. Si l'on refroidit la solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place.

II.5.3. Préparation de la gélatine

Elle consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec des propriétés physicochimiques souhaitées, telles que la force en gel, la viscosité, etc. Le procédé de fabrication de la gélatine est présenté dans la **figure II.3**.

La conversion du collagène en gélatine se réalise en deux étapes. La solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. La gélatine de type A est dérivée d'un tissu durci à l'acide. Le type B est dérivé du tissu traité à la chaux [51].

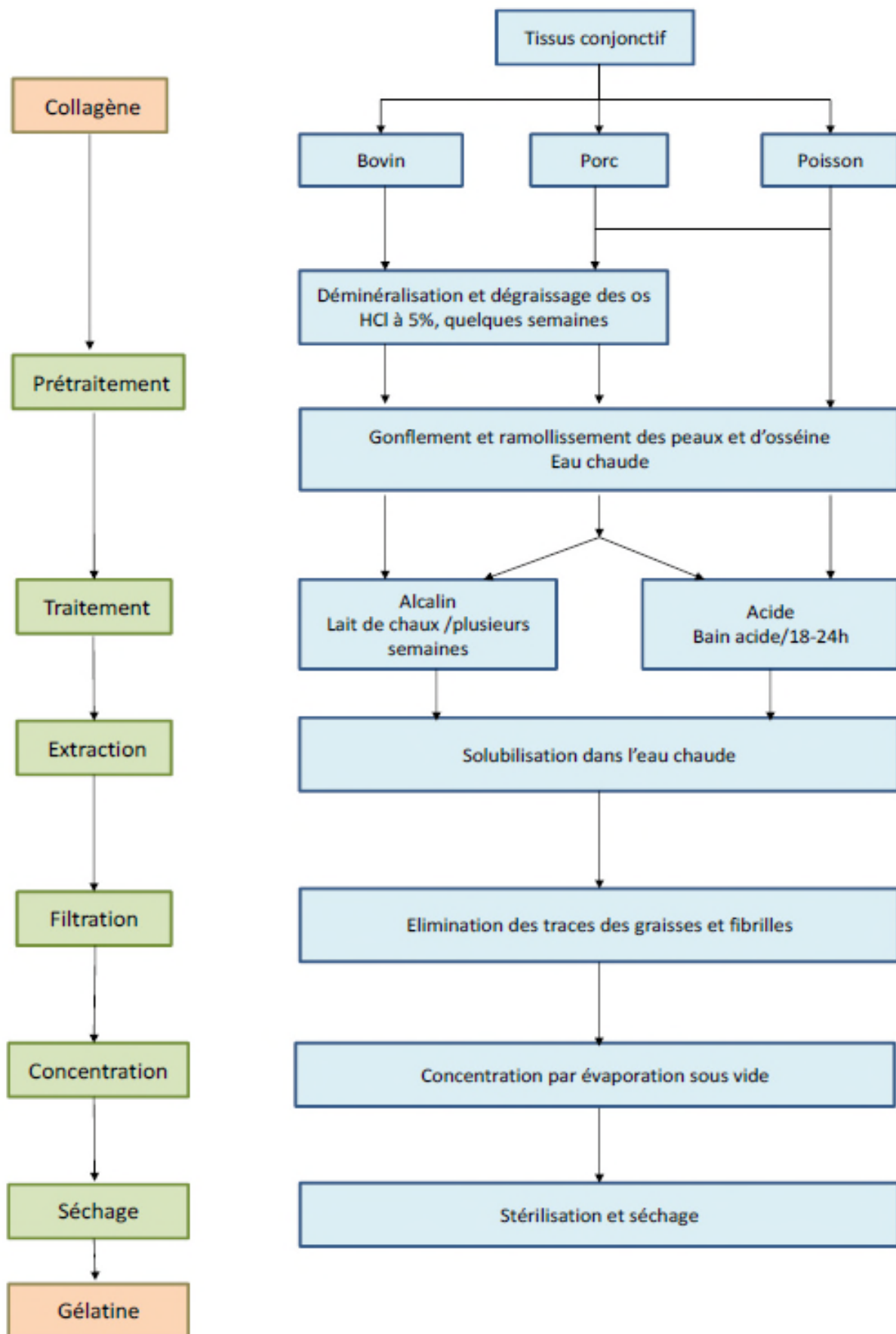


Figure II.3 : Procédé de fabrication de la gélatine.

II.5.4. Caractéristiques de la gélatine

Le comportement physicochimique de la gélatine est principalement déterminé par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, sa distribution en masses moléculaires, ainsi que par les conditions du milieu (pH, force ionique et la réaction avec d'autres composés). Les propriétés de la gélatine peuvent être divisées en deux groupes. Le premier associé aux propriétés gélifiantes de la gélatine (force en gel, viscosité, etc.) et le second plutôt lié aux propriétés de surface de la gélatine (**tableau II.2**).

➤ Les propriétés associées à la gélification sont principalement, la formation du gel, la texturation, et l'effet épaississant, sont dépendantes de la viscosité, de la structure, de la masse moléculaire et de la température du système. Le refroidissement d'une solution de gélatine conduit à la formation d'un gel réversible, théoriquement illimité.

➤ Les propriétés de surface sont basées sur le fait que les chaînes latérales de la gélatine, comme celles de toutes les protéines, ont des groupements chargés des acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Les parties hydrophiles et hydrophobes ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse. Cette propriété est utilisée dans la production et la stabilisation des mousses et émulsions [52].

Tableau II.2 : Quelques propriétés physiques de la gélatine en fonction de l'origine [52].

	Bovine Type B	Porc Types A et B	Poisson Type A
Température de gélification (°C)	24-25 29-33	19-23,9 31-36	11-19 14-27
Point de fusion (°C)	4-5	7-9	7-9
Point isoélectrique (pH)	210-239	216-295	56-323
Force de gel (g)			

La gélatine se compose donc d'une large gamme d'espèces moléculaires. D'une manière générale, les gélatines ont une masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) comprise entre 50 et 100 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, et une masse moléculaire moyenne en masse (M_w) comprise entre 100 et 1 000 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, avec un indice de polydispersité I_p (M_w/M_n) souvent supérieur à 2, dû à l'hétérogénéité même de la gélatine [53].

II.5.5. Applications de la gélatine

La propriété gélifiante de la gélatine est la plus connue et la plus utilisée. Le marché de la gélatine est axé principalement vers le pharmaceutique et l'alimentaire. Dans l'industrie pharmaceutique, la gélatine est utilisée pour la fabrication des gélules et des capsules. Elle protège les médicaments des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène. Les gélules sont essentiellement employées pour les médicaments liquides, alors que les capsules sont utilisées pour les poudres. La gélatine permet de lier les principes actifs du médicament et de prolonger leur durée de conservation. Grâce à une sélection et un dosage rigoureux, la gélatine peut même influencer la vitesse de libération des principes actifs, soit en l'accéléralant, soit en la ralentissant. Les comprimés enrobés de gélatine représentent un nouveau progrès technologique dans le domaine de la santé.

La gélatine est largement utilisée en industrie alimentaire, grâce à sa texture agréable et son caractère fondant. De nombreux produits allégés ou pauvres en matières grasses n'existeraient sans la gélatine. Elle est très utilisée en préparations alimentaires comme agent épaississant et gélifiant [54,55]. La gélatine est également considérée comme un sous-produit de l'industrie alimentaire, possède un grand nombre d'applications comme films biodégradables et comestibles. La forte abondance de la gélatine à des coûts relativement bas, ajoutée à sa biodégradabilité, à ses excellentes propriétés filmogènes, ses bonnes propriétés barrière à l'oxygène et aux arômes ont fait de ce hydrocolloïde un bon matériau pour des applications en emballages comestibles [56].

Références bibliographiques (Chapitre I et II)

- [1] Site Web: <http://www.cegeprimouski.qc.ca/dep/biologie/humain/os/os-html>. "L'os et le remodelage osseux ».
- [2] J. S. Nyman, M. Reyes, X. Wang, Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. *Micron* 36 (2005) 566-582.
- [3] D. Vashishth, Hierarchy of bone microdamage at multiple length scales. *International Journal of Fatigue* 29 (2007) 1024-1033.
- [4] U. Hansen, S. Masouhos, A. A. Amis, Material properties of biological tissue related to joint surgery. *Current Orthopaedics* 20 (2006) 6-22.
- [5] L. J. Gibson and M. Ashby, In: *Cellular solids – Structure and properties* second Edition. Ed DR Clarke, S. Suresh, IM. Wards FRS of Cambridge University Press, 2001, pp 431
- [6] D. B. Burr, C. Milgrom, D. Fyrhie, M. Forwood, N. Nyska, A. Firestone, In vivo measurements of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* 18 (1996) 405-410.
- [7] J. Ekenman, K. Halvorsen, P. Westblad, L. Fellander-Tsai, C. Rolf, Local bone deformation at two predominant sites of stress fractures of the tibia: an in vivo study. *Foot Ankle International* 19 (1998) 479-484.
- [8] D. Vashishth, K. E. Tanner, W. Bonfield, Fatigue of cortical bone under combined axial torsional loading. *Journal of Orthopaedic Research* 19 (2001) 414-420.
- [9] T. Jämsä, P. Jalovaara, Z. Peng, H. K. Väänänen, J. Tuukkanen, Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur tibia. *Bone* 23 (1998) 155-161.
- [10] S. M. Tommasini, P. Nasser, M. B. Schaffler, K. J. Jepsen, Relationship between bone morphology and bone quality in male tibias: implication for stress fracture risk. *Journal of Bone Mineral Research* 20 (2005) 1372-1380.
- [11] C. Y. Li, C. Price, K. Delisser, P. Nasser, D. Laudier, M. Clement, Long term disuse osteoporosis seems less sensitive to bisphosphonate treatment than other osteoporosis. *Journal of Bone Mineral Research* 20 (2005) 117-124.
- [12] C. Y. Li, M. B. Schaffler, H. T. Wolde-Semait, C.J. Hernandez, K.J. Jepsen, Genetic background influences cortical response to ovariectomy. *Journal of Bone Mineral Research* 20 (2005) 2150-2158.
- [13] A. M. Parfitt, F. Rauch, R. Travers, F. Glorieux, Osteonal and hemiosteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Cell Biochem Suppl* 55 (1994) 273-286.
- [14] S. C. Manolagas, Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21 (2000) 115-137.
- [15] P. Marie, Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *Médecine/Sciences* 17 (2001) 1252-1259.

- [16] A.R. Vaccaro, K. Chiba, J. G. Heller, T. C. Patel, J. S. Thalgott, E. Truumees, J. S Fischgrund, M. R. Craig, S. C. Berta, J. C. Wang, Contemporary concepts in spine care- bone grafting alternatives in spinal surgery. *The Spine Journal* 2 (2002) 206-215.
- [17] I. I. Doron and A. L. Ladd, Bone graft substitutes. *Operative techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* 9 (2003) 151-161.
- [18] L. Lefebvre, Développement de bioverre poreux ostéoinducteur pour application à l'orthopédie et à l'ingénierie tissulaire. INSA de Lyon, 2007.
- [19] V. Kalageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.
- [20] W. Cao, L. L. Hench, Bioactive Materials. *Ceramics International* 22 (1996) 493-507.
- [21] L. L. Hench. Bioactive ceramics: Theory and clinical application. In *bioceramics* 7 (1994) 3-14.
- [22] A. M. Green, J. A. Jansen, J. P. C. M. Van Der Waerden, and A. F. Von Recum, Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: texture orientation into or out of the surface. *Journal of Biomedical Materials Research* 28 (1994) 647-653.
- [23] E. Carlisle. In *silicon biochemistry*. Wiley, New York, 1986, pp 123-136.
- [24] L. Sedel, C. Janot, *Biomatériaux. Rapport de conférence*. Faculté de médecine Lariboisière, Paris & Université Joseph Fourier-ILL, Grenoble, 2003.
- [25] L. L. Hench. Semiconducting glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2 (1970) 250-277.
- [26] G. E. Georgescu, Ajout d'une charge minérale et création d'une porosité dans les ciments apatitiques à usage biologique. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse, France, 2004.
- [27] M. Hadioui, Synthèse d'hydroxyapatite et de silice greffées pour l'élimination de métaux toxiques en solution aqueuse. Thèse de doctorat, Université de Toulouse III- Paule Sabatier, France, 2007.
- [28] M. H. Fathi, A. Hanifi Evaluation and characterization of nanostructure hydroxyapatite powder prepared by simple sol-gel method. *Materials letters* 61 (2007) 3978-3983.
- [29] A. Bigi, E. Foresti, F. Marchetti, A. Ripamonti, N. Roveri., Barium calcium hydroxyapatite solid solutions. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* 6 (1984) 1091-1093.
- [30] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals. *Inorganica Chimica Acta* 360 (2007) 1009-1016.
- [31] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta biomaterialia* 6(2010) 1882-94.
- [32] F. Miyaji, Y. Kono, Y. Suyama Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Materials Research Bulletin* 40 (2005) 209-220.
- [33] K. De Groot, Medical applications of calcium phosphate bioceramics, *J. Ceramic Society of Japan*, 99 (1991) 943-953.
- [34] A. Benmoussa, C. Delaurent, J. L. Lacout, P. R. Loiseaud, M. Mikou, Determination of cholecalciferol and related substances by calcium phosphate hydroxyapatite and calcium phosphate fluoroapatite high-performance liquid chromatography. *J. chromatography A* 731 (1996) 153-160.

- [35] M. E. Hodson, E. V. Jones, J. D. C. Howells, W. E. Dubbin, A. J. Kemp, I. Thornton, A. Warren, Effect of bones meal amendments on metal release from contaminated soils-a leaching column study. *Environmental Pollution* 112 (2001)233-243.
- [36] B. Wopenka, J. D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C* 25 (2005) 131–143.
- [37] B. B. Nissan, D. D. Green, G.S. Kannangara, C. S. Chai, A. Milev, ³¹P NMR studies of diethyl phosphite derived nanocrystalline hydroxyapatite, *J. Sol Gel Science and Technology* 21 (2001) 27–37.
- [38] K. Zhu, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda, K. Kajiyoshi, Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method. *Journal of the European Ceramic Society* 26(2006) 509-513.
- [39] S.Raynaud, E.Champion, D.Bernache-Assollant, P.Thomas, Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. *Biomaterials* 23 (2002) 1065-1072.
- [40] Z. Babaei, M. Jahanshahi, S.M. Rabiee, The fabrication of nanocomposites via calcium phosphate formation on gelatin/chitosan network and the gelatin influence on the properties of biphasic composites. *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 370-375.
- [41] Y.S. Pek, S. Gao, M.S.M. Arshad, K.J. Leck, J.Y. Ying, Porous collagen apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials* 29 (2008) 4300-4305.
- [42] Y. Zhou, Y. Zhao, L. Wang, L. Xu, M. Zhai, S. Wei, Radiation synthesis and characterization of nano silver/gelatine/carboxymethyl chitosan hydrogel, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (2012) 553-560.
- [43] A.O. Elzoghby, Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems:reviewing three decades of research. *J. Control. Release* 172 (2013)1075-1091.
- [44] T.M. Keaveny, E.F. Morgan, G.L. Niebur, O.C. Yeh, Biomechanics of trabecularbone, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3 (2001) 307-333.
- [45] C. Kailasanathan, N. Selvakumar, V. Naidu, Structure and properties of titaniumreinforcednano-hydroxyapatite/gelatine bio-composites for bone graft materials. *Ceram. Int.* 38 (2012) 571-579.
- [46] S. Mobini, J. Javadpour, M. Hosseinalipour, M. Ghazi-Khansari, A. Khavandi and H. R. Rezaie, Synthesis and characterisation of gelatin–nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *AdvAppl Ceram*107 (2008) 4-8
- [47] A. Yanovska, V. Kuznetsov , A. Stanislavov, E. Husak, M. Pogorielov, V. Starikov, S. Bolshanina, S. Danilchenko, Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopaedic application. *Mater ChemPhys* 183 (2016) 93-100
- [48] B. William, Y.Hillig, S.Choi, N.Murtha, P.Natravali, An open-poredgelatin/hydroxyapatite composite as a potential bone substitute. *J Mater Sci: Mater Med* 19 (2008) 11-17.
- [49] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J. Control. Release* 161 (2012) 38-49.

[50] S. Kommareddy, D.B. Shenoy, M.M. Amiji, Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization, in: C.S.S.R. Kumar (Ed.), *Nanotechnologies for the Life Sciences, Biofunctionalization of Nanomaterials*, vol. 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005, pp. 330-352.

[51] S. Farris, K.M. Schaich, L.S. Liuc, L. Piergiovanni, & K. L. Yam, Development of polyioncomplexhydrogels as an alternative approach for the production of biobased polymers for food packaging applications: a review. *Trends Food Sci Technol.* 20 (2009) 316-332.

[52] A. Borghi, M. Cojazzi, G. Fichera, A.M. Panzavolta, S. Roveri, Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *J. Therm. Anal.* 61 (2000) 451-459.

[53] R. Schrieber, H. Gareis, *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007, pp 347.

[54] P.J.A. Sobral, & A.M.Q.B. Habante, Phase transitions of pigskin gelatine. *Food Hydrocoll* 15(2001) 377-382.

[55] J. Gómez-Estaca, P. Montero, F. Fernandez-Martín, M.C. Gomez Guillen, Physicochemical and film forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: a comparative study. *J Food Eng.* 90 (2009) 480-486.

[56] N. Cao, Y. Fu, J. He, Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocoll* 21 (2007) 575-584.



Chapitre III

Matériels et méthodes



Chapitre 3 : Matériels et méthodes

III.1. Introduction

Ce chapitre a pour but de présenter les différents protocoles utilisés ainsi que les méthodes de mesures et d'analyses.

Ainsi, le travail présenté consiste en premier lieu à élaborer et caractériser la biocéramique d'hydroxyapatite. Ce biomatériau sera ensuite modifié par ajout de gélatine afin d'améliorer d'avantage ses propriétés telles que : la cristallinité, la porosité et la rugosité. Nous avons étudié l'influence de deux paramètres, il s'agit de la température de calcination et la teneur des composites en gélatine.

III.2. Procédure expérimentale

III.2.1. Principes utilisés dans la formulation sol gel

Le principe d'élaboration par voie sol gel est représenté dans la **figure III.1**.

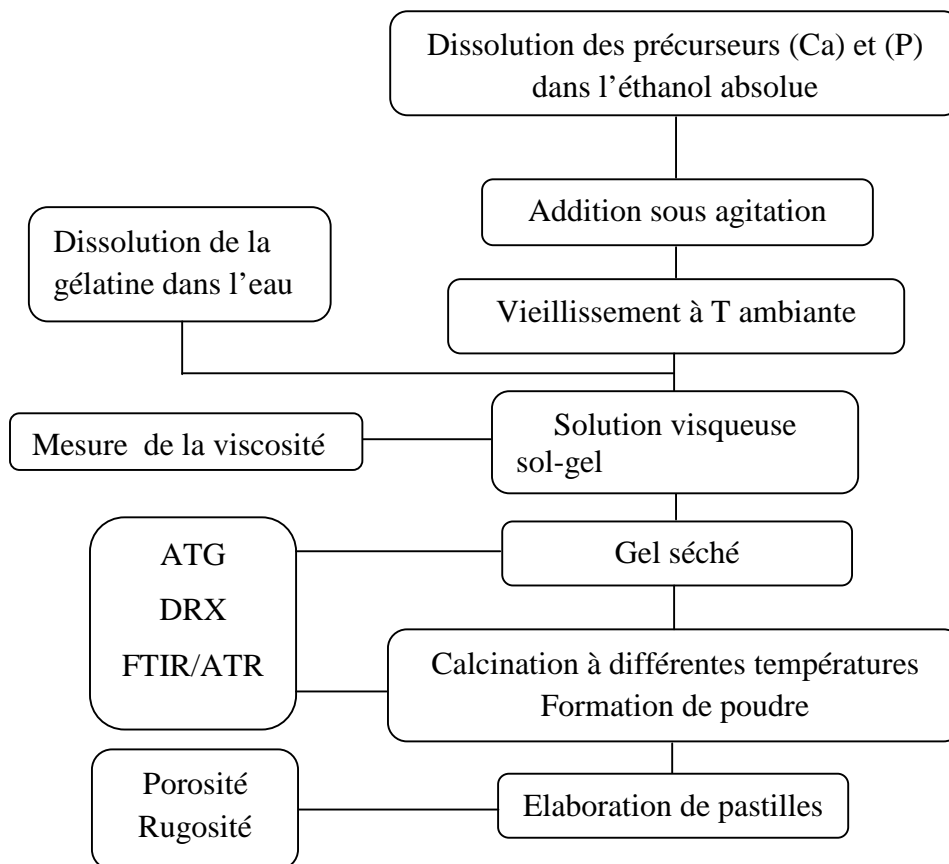


Figure III.1 :Schéma représentatif de la synthèse des matériaux par voie sol gel.

III.2.2. Préparation de la solution sol d'hydroxyapatite (HAP)

On fait dissoudre une quantité de nitrate de calcium tetrahydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, 100%) de concentration de 1,67 mol/L dans l'éthanol absolu. De la même manière, une quantité de pentoxyde phosphorique P_2O_5 (Prolabo, 97%) de concentration de 0,5 mol/l est dissoute dans l'éthanol absolu. Les deux solutions sont agitées puis mélangées à température ambiante [1]. La solution obtenue dont le rapport molaire Ca/P=1,67 est portée sous agitation pendant 24h. Une fois la solution sol est formée, celle-ci est mise au repos (vieillissement) pendant un temps de 24h à température ambiante, c'est le temps de prise en masse. Pendant la phase de repos les précurseurs solubilisés se condensent [2]. Le gel est alors séché à 150°C pendant 24h puis calciné à des températures de 500°C, 700°C et 900°C sous air atmosphérique pendant 1h et à pas de 1°C/min. Les poudres ainsi obtenues sont broyées à l'aide d'un mortier.

III.2.3. Préparation de la solution de gélatine

5g de gélatine issue de la peau du porc ((Italgelatine S.P.A.) microbiologie) sont dissous dans 100 ml d'eau distillée [3]. La solution est chauffée à une température de 40°C pendant 30 minutes sous agitation jusqu'à dissolution complète de la gélatine.

III.2.4. Préparation des composite hydroxyapatite-gélatine (HG)

On mélange des quantités de la solution de HAP préparée selon le protocole montré ci-dessus avec différentes quantités de la solution de gélatine (5%, 15%, 35%, 25% et 50% v/v¹). Les mélanges sont alors agités pendant 24h à température ambiante.

Les sols composites obtenus, hydroxyapatite-gélatine (HG5%, HG15%, HG35% et HG50%) sont récupérés puis étuvés à 150°C pendant 24h. Les gels composites séchés sont alors calcinés à différentes températures (300°C, 400°C, 500°C, 700°C et 900°C) sous air atmosphérique pendant 1h à un pas de 1°C/min puis broyés dans un mortier.

Les sols composites (HG5%, HG15%, HG25%, HG35% et HG50%) ainsi que celui de HAP pure (HG0%) sont laissés vieillir à température ambiante, c'est l'étape de transition du sol vers la phase du gel, et ceci afin de mesurer leurs viscosités [3, 4]. Dans le cas de la gélatine, la viscosité de la solution hydrolysée est mesurée juste après refroidissement de celle-ci (une fois la solution atteint la température ambiante).

¹ v/v : pourcentage volumique ; volume de gélatine par rapport au volume de HAP pour un volume total de 100%.

III.2.5. Préparation de la solution SBF

Le fluide physiologique simulé « Simulated Body Fluid, SBF » est un fluide préparé dans des conditions semblables aux conditions physiologiques du corps humain. Le pH et la température sont à peu près égaux à ceux du plasma sanguin. Il est préparé à une température de $37 \pm 0,5$ °C, en utilisant la formulation de Kokubo et Taka dama[5]. Les Réactifs utilisés pour la préparation d'un litre de solution SBF sont listés par ordre de dissolution dans le **tableau III.1**. On fait dissoudre les quantités des sels par ordre mentionné ci-dessous. La solution est tamponnée par le trishydroxyméthylaminométhane. Le pH de la solution est ajusté avec du HCl ajouté goutte à goutte jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur variant de 7,2 à 7,4. La solution préparée est bien scellée et stockée à une température de 4 °C afin d'éviter la précipitation des sels[6].

Tableau III.1 : Réactifs utilisés pour la préparation d'un litre de solution de SBF à 37 °C[5].

Ordre	Réactifs par ordre de dissolution	Quantité (g)
1	Chlorure de sodium NaCl	7,996
2	Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO ₃	0,350
3	Chlorure de potassium KCl	0,224
4	Hydrogénophosphate de potassium trihydraté K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228
5	Chlorure de calcium hydraté MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
6	Chlorure de calcium CaCl ₂	0,278
7	Sulfate de sodium Na ₂ SO ₄	0,071
8	Tris (Trishydroxyméthylaminométhane) (CH ₂ OH) ₃ CNH	6,057
9	Acide chlorhydrique HCl pour ajuster le pH	pH=7,42

III.2.6. Mise en forme des matériaux : préparation des pastilles

Avant de transformer les poudres en pastilles, celles-ci sont d'abord séchées à environ 80°C pendant des heures. Après séchage, elles sont stockées dans un dessiccateur.

Les poudres sont alors déposées dans un moule à pastiller (une masse de 0,2 g pour chaque échantillon) puis soumises à une très forte pression d'environ pendant quelques minutes dans une presse hydraulique sous vide. Elles sont ensuite extraites du moule sous la forme de pastilles de 14 mm de diamètre (1 à 3 pastilles pour chaque échantillon).

III.3. Caractérisation physico-chimique

La caractérisation des matériaux synthétisés dans cette étude est réalisée par diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge par la technique de réflectance total atténuée (ATR). La perte de masse et les flux de chaleurs relatifs sont déterminés par analyses thermiques (ATG-ATD). La rugosité de surface est obtenue par profilométrie tandis que la porosité est estimée par la méthode de déplacement du liquide.

III.3.1. Mesure de la viscosité

Les mesures de viscosité des gels sont effectuées avec un rhéomètre de type VibroViscometer (AND SV 10) qui est piloté par Micro-ordinateur. Il fonctionne selon le principe représenté en Annexes (Partie 1). Un échantillon gel d'un volume de 35 à 45 ml est mis dans une cuve en verre où il subit des mouvements de vibrations grâce à deux lamelles vibratoires menées d'une lame détectrice de température de la solution. Les résultats sont récoltés sous forme de graphes et de data. Ils présentent la variation de la viscosité en fonction du temps et de la température qui reste presque constante durant toute la manipulation. Les essais sont effectués à température ambiante.

III.3.2. Essai de porosité

Différents milieux liquides sont évoqués dans la littérature pour la mesure de la porosité et de la densité d'un solide [7-11]. Pour reproduire au mieux ce qui se passe dans le corps humain, nous avons choisi d'immerger nos biomatériaux dans le milieu SBF, qui contient la partie minérale du plasma humain avec la même teneur en ions que le fluide physiologique réel (voir Annexes partie 2). Des pastilles d'hydroxyapatite pure et composite sont immergées, chacune séparément, dans 2 ml (V_1) de la solution de SBF contenue dans des tubes gradués, pendant un temps de 24h puis 2h. Nous avons effectué la lecture des volumes juste après immersion (V_2) et après retrait (V_3) des échantillons. Nous avons également procédé à la mesure de la masse des pastilles sèches i.e. avant immersion (W). Les lois et relations à utiliser sont définies et exploitées dans le chapitre 4.

III.3.3. Mesure de la rugosité

La rugosité des pastilles est mesurée, en utilisant un profilomètre DEKTAK 150 SURFACE PROFILER par le balayage de la surface de l'échantillon sur une longueur de rayure de 5000 μm . Ce qui permet d'enregistrer un profil de surface avec accès rapide et directe à la rugosité moyenne arithmétique (R_a). 8 différentes zones sur une longueur de 500 μm de la surface de l'échantillon sont balayées.

III.3.4. Analyse thermiques gravimétrique et différentielle (ATG/ATD)

L'appareillage utilisé est le STA PT 1600 LINSEIS (Annexes partie 3). Il permet d'avoir accès aux variations de masse des échantillons (analyse thermogravimétrique) ainsi qu'aux températures des réactions endothermiques et exothermiques (analyse thermique différentielle). Le gel séché est analysé par ATG afin de déterminer la variation de la masse dans l'échantillon. Les températures de sublimation des substances volatiles sont déterminées par ATD. L'intervalle de température est $T_{\text{eb}} \leq T \leq 800^\circ\text{C}$ et le taux ou vitesse de chauffe est de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ sous un flux d'azote.

III.3.5. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse par diffraction de rayons X permet de déterminer la structure de nos échantillons. C'est une méthode d'identification des phases cristallines. Elle donne des informations sur la pureté, la cristallinité, la valeur des paramètres cristallographiques etc. Le diagramme DRX est obtenu à partir d'un diffractomètre à poudre à rayons X (Panalytical type MPD/système vertical θ/θ) (Annexes partie 4), en utilisant une radiation $\text{CuK}\alpha$ de longueur d'onde $\lambda = 0,15406 \text{ nm}$. Le diagramme DRX est obtenu dans l'intervalle 2θ allant de 10° à 80° à un pas de $0,0167^\circ$ avec un temps d'acquisition de 7 secondes. Les phases sont identifiées par comparaison avec les références du fichier JCPDS-ICDD (Joint committee on powder diffraction standard-International Center for Diffraction Data), donné sous forme de fiches PDF (Powder Diffraction File). Pour identifier la poudre synthétisée et vérifier si la phase cristallisée est pure, on extrait les valeurs de 2θ et I associées aux pics de diffraction observés, à partir des fiches de références.

III.3.6. Analyse par spectroscopie ATR

L'analyse des groupements fonctionnels des gels séchés et des échantillons calcinés est réalisée par la mesure des spectres infrarouge dans la région des nombres d'ondes (400-4000 cm^{-1}) avec une résolution de $2/4 \text{ cm}^{-1}$. L'analyse en réflexion totale atténuée (ATR, Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer) (Annexes partie 5) permet la mesure directe d'échantillons sous forme de poudre. Le procédé en réflexion totale atténuée (ATR) utilise un prisme en diamant de haut indice de réfraction que l'on presse contre l'échantillon. Lors de la mesure du spectre la lumière infrarouge est totalement réfléchi à l'intérieur du prisme.

Références bibliographiques

- [1] S. Kim, P.N. Kumta, Sol-gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder. *Mater. Sci. Eng. B* 111 (2004) 232-236.
- [2] D. Sidane, H. Khireddine, S. Yala, S. Ziani, F. Bir, and D. Chicot, Morphological and mechanical properties of hydroxyapatite bilayer coatings deposited on 316L SS by sol-gel method. *Metallurgical and materials transaction B* 46 (2015) 2340-2347.
- [3] D. Sidane, Synthèse et caractérisation des dépôts d'hydroxyapatite sur l'acier 316 L : structure & adhérence. Mémoire de Magister, Université de Bejaia, 2010.
- [4] A. Bigi, B. Bracci, S. Panzavolta, Effect of added gelatin on the properties of calcium phosphate cement. *Biomaterials* 25 (2004) 2893-2899.
- [5] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907-2915.
- [6] F. Bir, Synthèse de revêtements prothétiques par électrodéposition : Structure et propriétés antibactériennes. Thèse de Doctorat. Université de Bejaia, Algérie, 2016.
- [7] S. Ziani, Synthèse, étude physico-chimique et comportement microbiologique d'une hydroxyapatite modifiée et greffée par la β -cyclodextrine. Thèse de Doctorat, Université de Bejaia, Algérie, (2016).
- [8] O. Zamoume, Etude de systèmes fixateurs à libération prolongée. Thèse de Doctorat, Université de Tizi-Ouzou, Algérie, (2013).
- [9] M. Mozafari, F. Moztarzadeh, M. Rabiee, M. Azami, S. Maleknia, M. Tahriri, Z. Moztarzadeh, N. Nezafati, Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering. *Ceramics International* 36 (2010) 2431-2439.
- [10] M.K. Narbat, F. Orang, M. S. Hashtjinand A. Goudarzi fabrication of porous hydroxyapatite-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering. *Iranian Biomedical Journal* 10 (2006) 215-223.
- [11] A. Yanovska, V. Kuznetsov, A. Stanislavov, E. Husak, M. Pogorielov, V. Starikov, S. Bolshanina, S. Danilchenk, Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatin composite materials for orthopaedic application. *Materials Chemistry and Physics* 183 (2016) 93-100.



Chapitre IV

Résultats et Discussions



Dans ce chapitre nous exposons les résultats obtenus au cours de notre étude, il est subdivisé essentiellement en 3 parties :

- La première partie concerne la mesure de la viscosité des gels colloïdaux.
- La deuxième partie concerne la caractérisation par analyse thermique, diffraction des rayons X et spectrométrie Infrarouge des gels séchés et calcinés : hydroxyapatite, gélatine, composite « hydroxyapatite-gélatine ».
- Dans la troisième partie, nous présentons les résultats des essais de la porosité et de la rugosité.

I.1 MESURE DE LA VISCOSITE DES GELS

La mesure de la viscosité des gels après processus de vieillissement (au bout de 96 h) est effectuée à une température de 24 ± 1 °C. Les résultats obtenus sont illustrés sur la **figure IV.1**.

Sur la **figure IV.1 (a) et (b)**, nous pouvons remarquer que dans le cas du gel d'hydroxyapatite (HAP) et des gels composites (HG50%, HG35% et HG25%, HG15% et HG5%) la viscosité ne varie pas en fonction du temps. Elle reste constante. Ce qui indique que le gel est stable dans l'intervalle de temps choisi (720 s). Alors que dans le cas de la solution de gélatine, on constate une augmentation progressive de la viscosité dans le même intervalle de temps (720 s).

La viscosité du gel HAP est de 6,14 mPa.s (**figure IV.1 (a) et (b)**), ce résultat est en accord avec les travaux de Sidane et al[1] où la viscosité du gel HAP mesurée après 96 h de vieillissement avec un rhéomètre de type rotatif est trouvée égale à 6,35 mPa.s.

La viscosité de la gélatine subit une variation continue, elle est de 17,25 mPa.s à l'instant initial et augmente jusqu'à atteindre 27,35 mPa.s après 720 s (**figure IV.1 (a)**). Ceci est dû principalement à l'effet épaississant ou gélifiant de la gélatine. Le refroidissement d'une solution de gélatine conduit à la formation d'un gel réversible, théoriquement illimité [2].

La viscosité des gels composites varie proportionnellement avec la teneur en gélatine (**figure IV.1 (a)**). Les valeurs de la viscosité des deux gels HG25 (7,75 mPa.s) et HG35% (7,94 mPa.s) sont presque identiques. La viscosité atteint une valeur maximale dans le cas du gel composite HG50% qui est de l'ordre de 8,52 mPa.s. On peut alors déduire que le gel composite devient plus visqueux lorsqu'on atteint une composition du gel en gélatine de 50 % v/v. Ces valeurs sont supérieures à celle de HAP et restent inférieures à celle de la gélatine. Donc la viscosité des gels composites est comprise entre celles de HAP et de la gélatine pour des pourcentages volumiques en gélatine supérieurs à 25 % v/v.

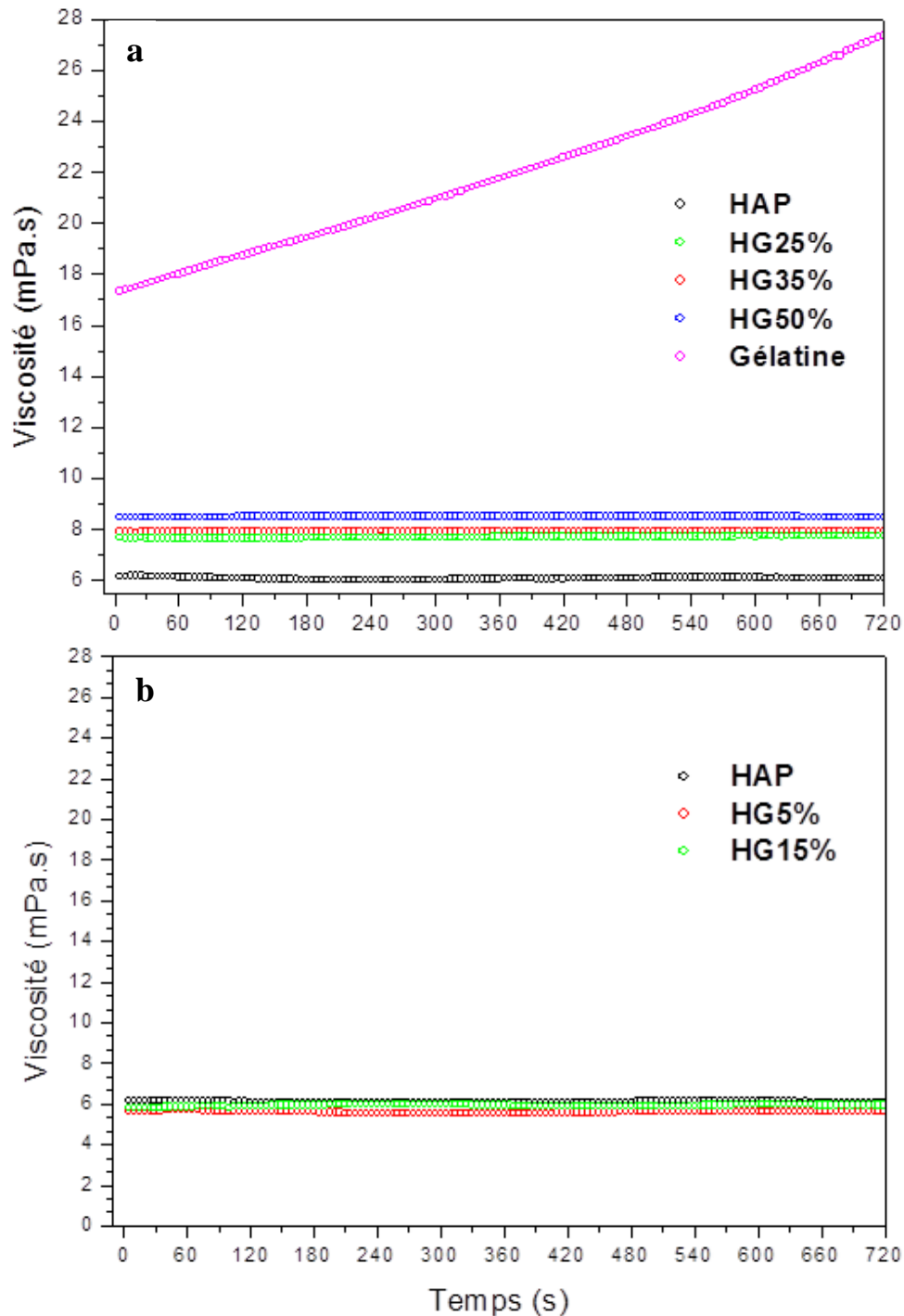


Figure IV.1 Evolution de la viscosité des gels.

Pour des pourcentages de 5 et 15 % v/v (HG5% et HG15%), la viscosité des gels est égale à celle de HAP (voir **figure IV.1 (b)**), elle est de de l'ordre de 6 mPa.s. Ces résultats montrent l'influence de l'incorporation de la gélatine sur le comportement rhéologique du gel d'hydroxyapatite qui ne varie pas dans le temps mais dont la viscosité augmente en fonction de la quantité incorporée et qui atteint le maximum pour une teneur en gélatine de 50% v/v.

I.2 ANALYSES THERMIQUES

I.2.1 Gel séché de HAP

La **figure IV.2** correspond à l'analyse thermogravimétrique (ATG) et thermique différentielle (ATD) du gel d'hydroxyapatite séché à 150°C. Il existe quatre pertes de masse.

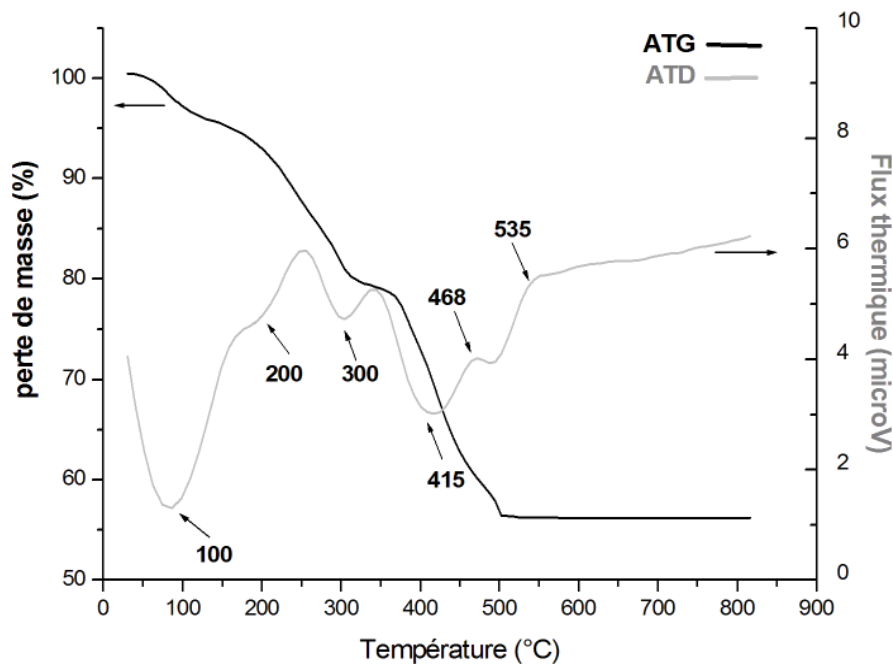


Figure IV.2 Courbes ATG/ATD du gel séché d'hydroxyapatite .

La première perte de masse, où la bande endothermique est observée ($\approx 50\text{-}200^\circ\text{C}$) correspond à l'évaporation de l'eau d'absorption et de constitution dans le précurseur de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), et les composés volatils tels que l'éthanol. Il existe d'autres petits pics dans l'intervalle ($\approx 200\text{-}300^\circ\text{C}$) correspondant à la deuxième perte et qui peuvent être attribués à la présence d'espèces de nitrate en plus de l'eau de constitution. La troisième perte de masse combinée avec le pic endothermique ($\approx 415^\circ\text{C}$) traduit la disparition des groupes NO_3 [3].

Le pic exothermique aux environs de 468°C correspond à la cristallisation de HAP [4]. Le pic exothermique qui apparaît à 535°C et qui correspond à une faible variation de la masse (0,43%), est attribuée en général à la libération du CO_2 ($520\text{-}580^\circ\text{C}$), originaire de la décomposition de l'apatite carbonatée [5], et /ou autres réactions chimiques, où le CO_2 peut se former par décomposition du CaCO_3 par exemple. La perte de masse totale est de 44%, il n'y

a pas de perte de masse observée au-delà de 535°C, indiquant la présence d'une phase stable après traitement thermique à des températures $\geq 500^\circ\text{C}$.

I.2.2 Diagramme thermogravimétrique de la gélatine

Le thermogramme ATG, présenté sur la **figure IV.3**, montre les domaines de stabilité/dégradation thermiques de la gélatine à l'état de poudre commercialisée.

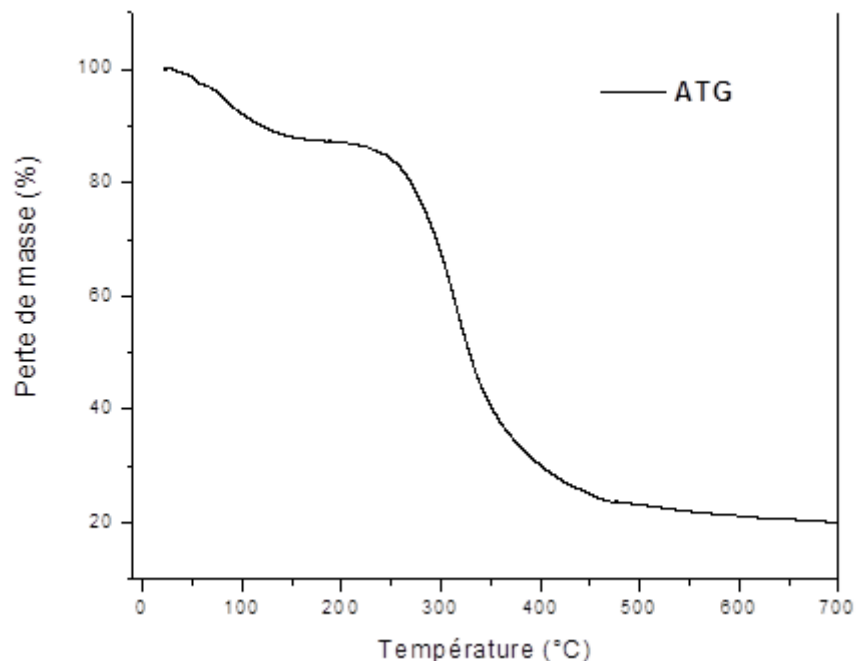


Figure IV.3 Courbe ATG de la gélatine.

La première perte de masse ($\approx 20\text{-}150^\circ\text{C}$) est liée à la perte d'eau ($\approx 12\%$). La deuxième perte, qui est attribuée à la dégradation de la gélatine, est observée pour un intervalle de température allant de 200°C jusqu'à 450°C . C'est la plus grande perte de masse qui est de l'ordre de 63%. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Barreto et al [6], Inamura et al [7] et Pena et al [8] qui ont indiqué une évolution thermique similaire à celle-ci dans le cas de biocomposite et de film préparés à base de la gélatine. Ils ont observé une première perte de masse allant de 25°C à 150°C . Benbettaieb[9] a également noté dans ses travaux menés sur la gélatine de poisson une première perte de masse d'environ 11% située entre 52°C et 200°C . Ces auteurs [8, 9] ont noté la deuxième perte de masse qui est de 65 à 67% à des températures comprises entre 250 et 420°C . Ce qui est en accord avec nos résultats.

Barreto et al [6] ont constaté que la dégradation des films de gélatine commence à avoir lieu pour des températures situées entre 296 et 329°C . Ils ont attribué cette dégradation à la rupture de la chaîne protéique (structure hélicoïdale) ainsi que les liaisons peptidiques

constituant la gélatine. La masse résiduelle notée est également en accord avec les travaux antérieurs de Barreto et al [6] et Benbettaieb[9] qui est estimée à 18-20% en masse.

I.3 ANALYSES MICROSTRUCTURALES

I.3.1 Diffraction des rayons X

I.3.1.1 Formation de la phase cristalline de HAP

I.3.1.1.1 Gel séché de HAP

Le diffractogramme du gel d'hydroxyapatite séché à 150 °C est présenté sur la **figureIV.4**.

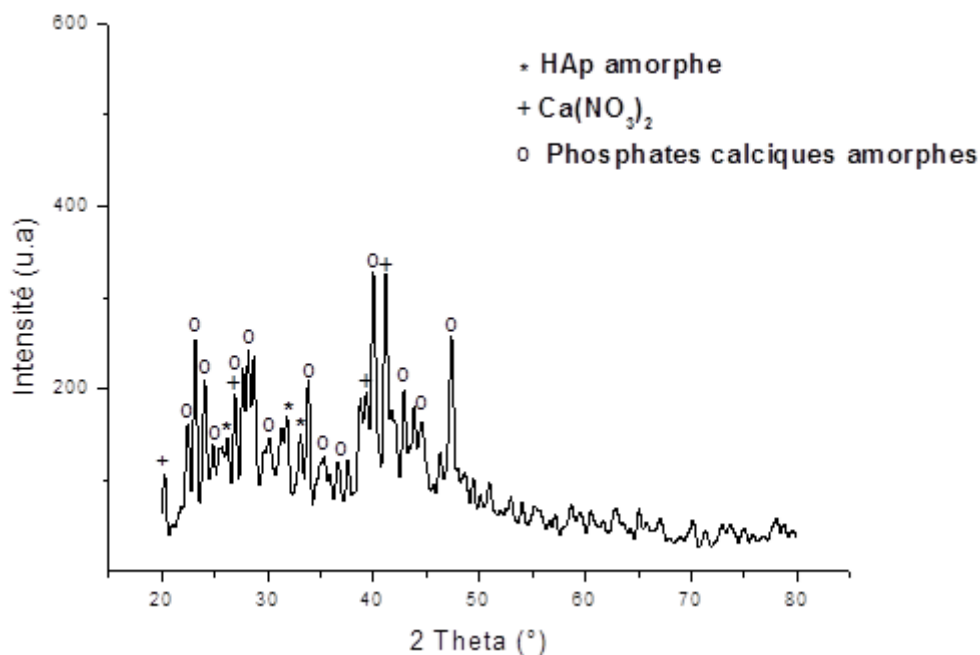


Figure IV.4 Gel séché d'hydroxyapatite.

Le diffractogramme montre les pics les plus intenses de HAP (fiche 00-009-0432), rassemblés avec ceux caractéristiques des nitrates de calcium (fiche 00-007-0204).

La présence des nitrates de calcium implique une réaction incomplète entre les deux composés $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et $\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_{3-x}(\text{OH})_x$ (réaction6) car le nitrate de calcium n'est pas totalement transformé en nitrate alcoxyde $\text{Ca}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$:

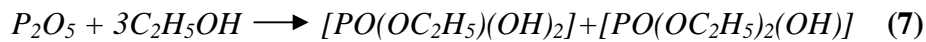


Le sel cristallin non réagit se manifeste dans le gel selon cette réaction :



(6)

Avec $PO(OC_2H_5)_{3-x}(OH)_x$, $x=1$ et 2 : composés de phosphore sous forme d'alcoxyde formés après dissolution de P_2O_5 dans l'éthanol suivant cette réaction :



Les pics correspondants au gel séché sont très larges et bruités. L'élargissement de ces pics, s'explique par la réduction de la taille des cristaux et l'augmentation du désordre atomique. La phase de HAP n'est pas bien développée, il n'y a pas de phase cristalline observée dans le cas d'un gel séché. Donc le gel séché de HAP est à l'état amorphe. On peut remarquer également la présence des phosphates calciques amorphes (espèces intermédiaires formés initialement après interaction entre les précurseurs Ca et P), tels que le pyrophosphate de calcium $Ca_2P_2O_7$ et le phosphate tricalcique amorphe $Ca_9(PO_4)_6 \cdot nH_2O$, ainsi que l'hydroxyde de calcium $Ca(OH)_2$ et d'autres phosphates calciques (voir **tableau II.1**), qui, après calcination se transforment en apatite de structure cristalline.

I.3.1.1.2 Processus de densification

Selon les résultats de l'ATG, un traitement à une température de $500^\circ C$ est suffisant pour produire une hydroxyapatite pure et relativement cristalline. Le gel séché de HAP est alors densifié à travers un traitement thermique à des températures de 500 , 700 et $900^\circ C$ pendant 1h.

La **figure IV.5** montre le diffractogramme DRX de l'hydroxyapatite calcinée à $500^\circ C$.

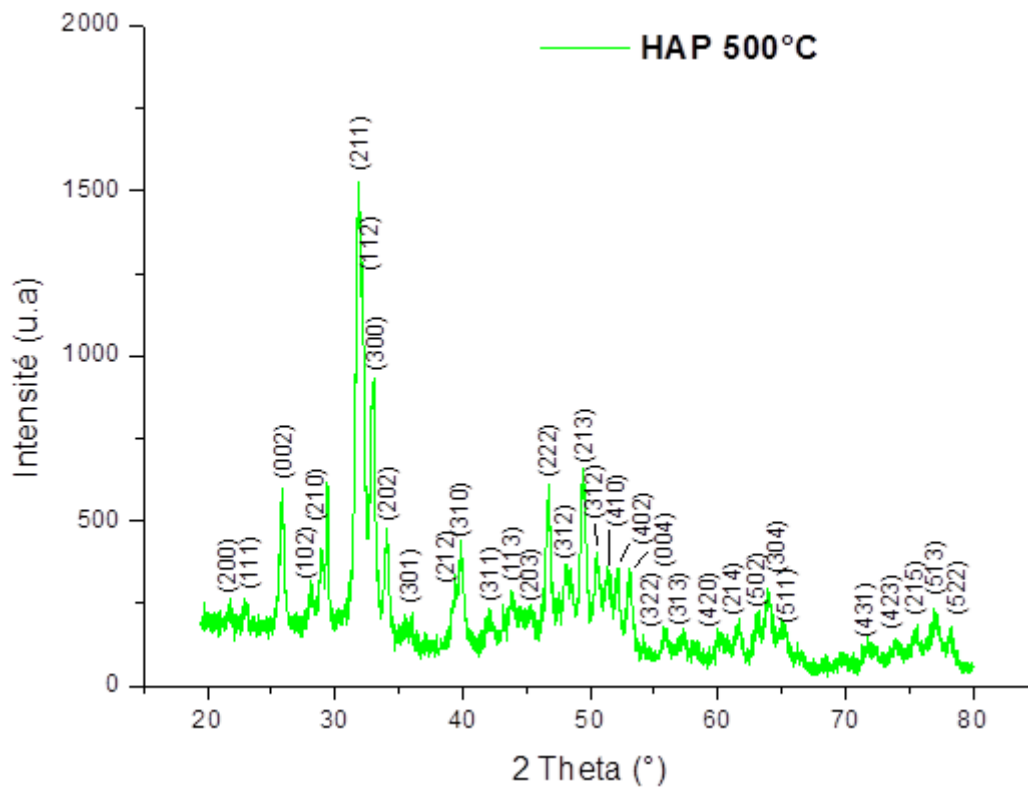


Figure IV.5 Diagramme DRX de l'hydroxyapatite calcinée à 500°C.

Nous remarquons la présence du triplet de diffraction caractéristique de l'hydroxyapatite qui correspond respectivement aux plans réticulaires (211), (112) et (300) observés pour des valeurs de 2θ proches, entre 31° et 32°. Nous remarquons également l'apparition de tous les pics caractéristiques de l'hydroxyapatite, une déduction peut être faite et on peut nettement dire qu'à 500°C l'hydroxyapatite se cristallise comme phase majoritaire.

Les diffractogrammes DRX de l'hydroxyapatite calcinée à 500, 700 et 900°C sont regroupés et représentés sur la **figure IV.6**.

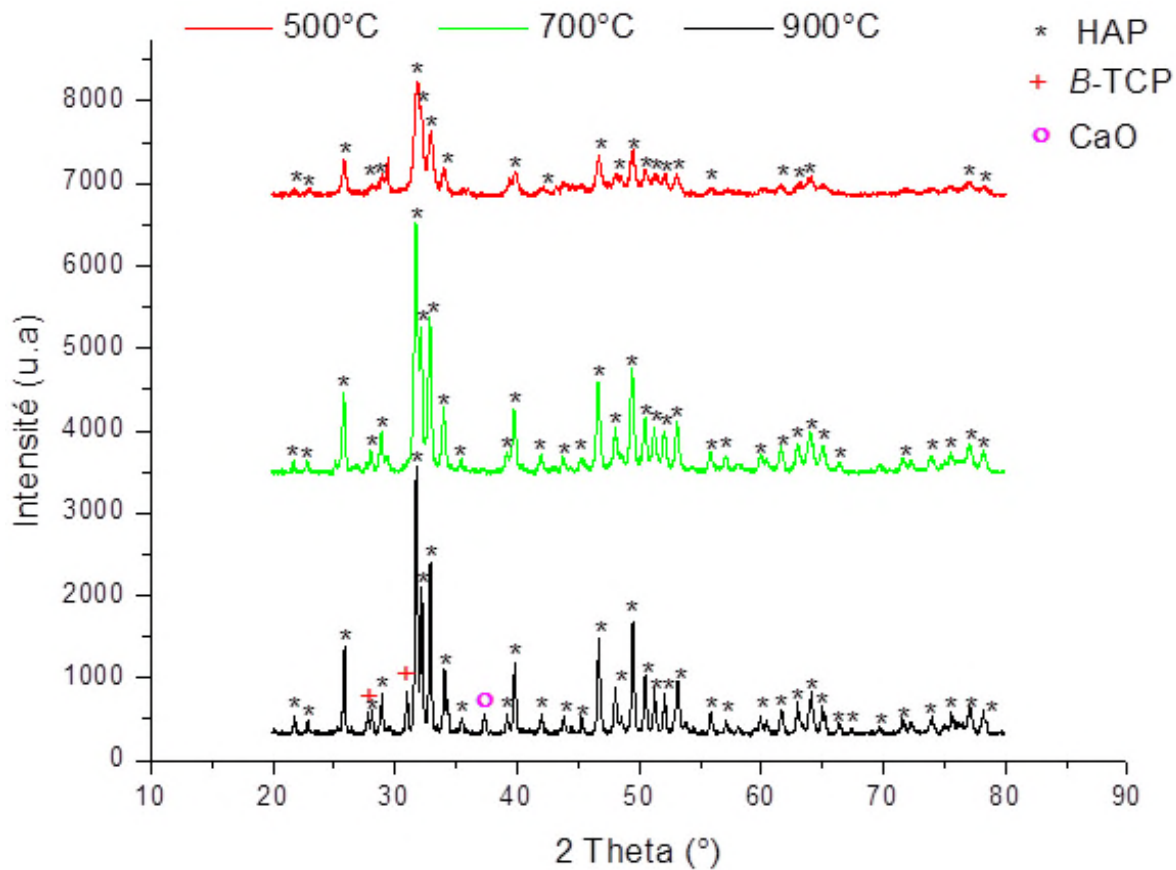
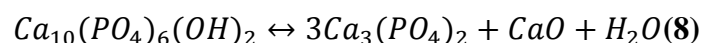


Figure IV.6 Représentation des graphes d'hydroxyapatite à différentes températures de calcination.

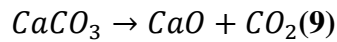
L'analyse indique la présence de tous les pics inscrits dans la fiche de référence de l'hydroxyapatite. L'augmentation de la température de calcination induit un affinement des raies de diffraction, qui est attribué à une croissance des grains. Le triplet de diffraction caractéristique de l'hydroxyapatite est encore mieux défini après calcination à 900°C. En se référant aux fiches correspondant au β -TCP (fiche 00-009-169), la raie caractéristique du β -TCP (notamment la raie la plus intense généralement observée à 31,026°) et la raie la plus intense caractéristique du CaO située à 37,35° (fiche 00-037-1497), sont présentes dans le cas de la poudre calcinée à 900°C.

Donc la poudre calcinée à 900°C, contient des petites quantités de phosphate tricalcique β -TCP et de l'oxyde de calcium CaO (la chaux). On peut alors déduire que à une température de 900°C HAP se décompose en β -TCP et CaO et la réaction proposée est :



D'après les résultats de l'ATG/ATD et de la DRX, l'hydroxyapatite synthétisée selon le procédé sol-gel est carbonatée puisqu'il y a dégagement de CO_2 qui ne peut être attribué qu'à

la décomposition de l'apatite carbonatée. D'ailleurs aucune phase cristalline correspondant au carbonate de calcium CaCO_3 , qui se décompose selon la réaction (9) et qui pourrait être à l'origine du dégagement du CO_2 , n'a été détectée.



I.3.1.2 Composites hydroxyapatite-gélatine (HG)

I.3.1.2.1 Diffractogramme de la gélatine

La poudre de gélatine commercialisée utilisée dans cette étude est caractérisée par DRX.

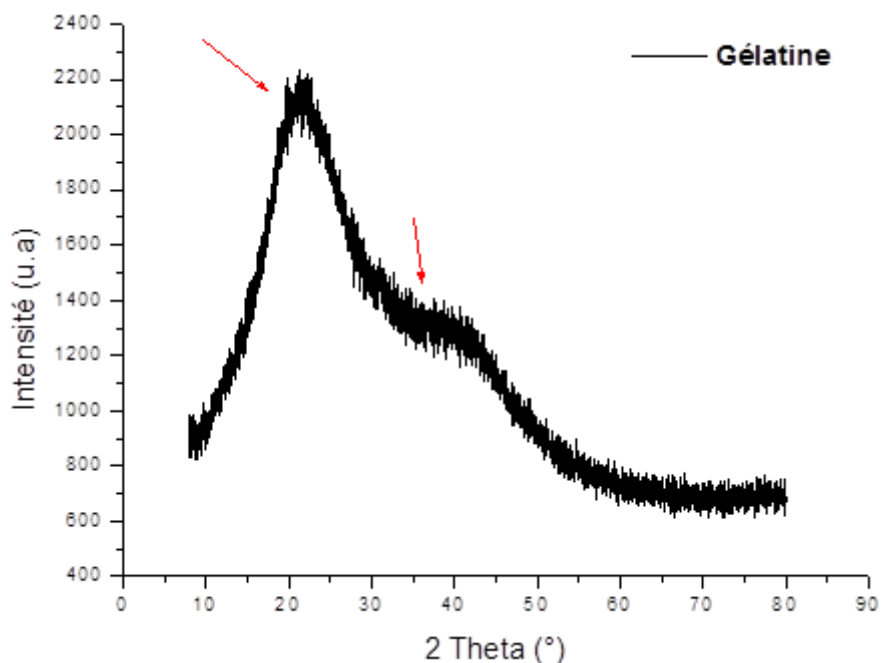


Figure IV.7 Diffractogramme DRX de la gélatine.

Sur ce diagramme (**figure IV.7**) on remarque que la gélatine est détectée dans la poudre de précurseur avec une très faible cristallinité, le pic caractéristique s'étend dans l'intervalle $2\theta = 20-22^\circ$ [10]. Il y a également présence d'un autre pic de diffraction très large autour de $2\theta = 31-45^\circ$. Ces pics sont attribués à un halo amorphe de protéines [11, 12].

I.3.1.2.2 Diffractogramme du gel séché composite HG5%

Le diffractogramme du gel d'hydroxyapatite composite séché à 150°C est présenté sur la **figure IV.8**.

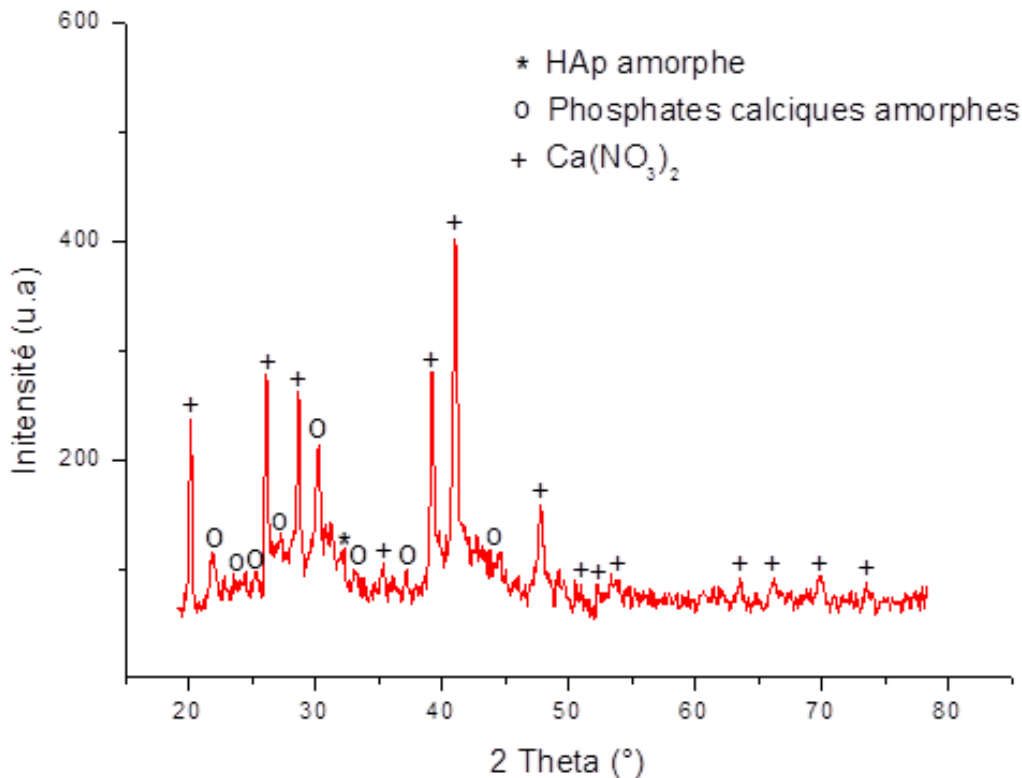


Figure IV.8 Gel séché d'hydroxyapatite composite (HG5%).

Ce diffractogramme montre une structure typiquement amorphe interprétée par des pics de diffraction larges et mal définis. La largeur de ces pics traduit non seulement le désordre survenu au niveau de la maille apatitique mais aussi sa cristallinité médiocre. On retrouve principalement les mêmes phases que celles détectées sur le diagramme du gel séché de HAP pure. Les pics présents sont relatifs aux nitrates de calcium, aux phosphates calciques avec apparition d'un très faible pic caractéristique de la phase de HAP. La gélatine n'est pas détectée dans le diagramme DRX du composite. La gélatine sèche (à l'état poudre) présente un certain niveau de cristallinité, tel que c'est montré au-dessus (**figure IV.7**), mais qui disparaît à la suite de sa dissolution, sa reconstitution et son mélange avec le gel de HAP [10]. Contrairement au gel séché de HAP pure (**figure IV.4**), la phase de HAP est décelée dans le gel séché de HAP composite à l'état de trace. Ce qui montre l'effet de l'ajout de la gélatine dans la matrice base de l'hydroxyapatite et qui est détaillé dans les prochaines sections de ce chapitre.

1.3.1.3 Effet de la teneur en gélatine et du traitement thermique

L'effet de la gélatine et du traitement thermique sont étudiés par DRX. Les composites préparés avec des teneurs en gélatine de 0 (HAP), 5, 15, 35 et 50% v/v correspondant

respectivement à HG0%, HG5%, HG15%, HG35% et HG50% sont calcinés à une température de 400°C, 500, 700 et 900°C.

La **figure IV.9** présente le diagramme DRX des composites préparés calcinés à une température de 400°C.

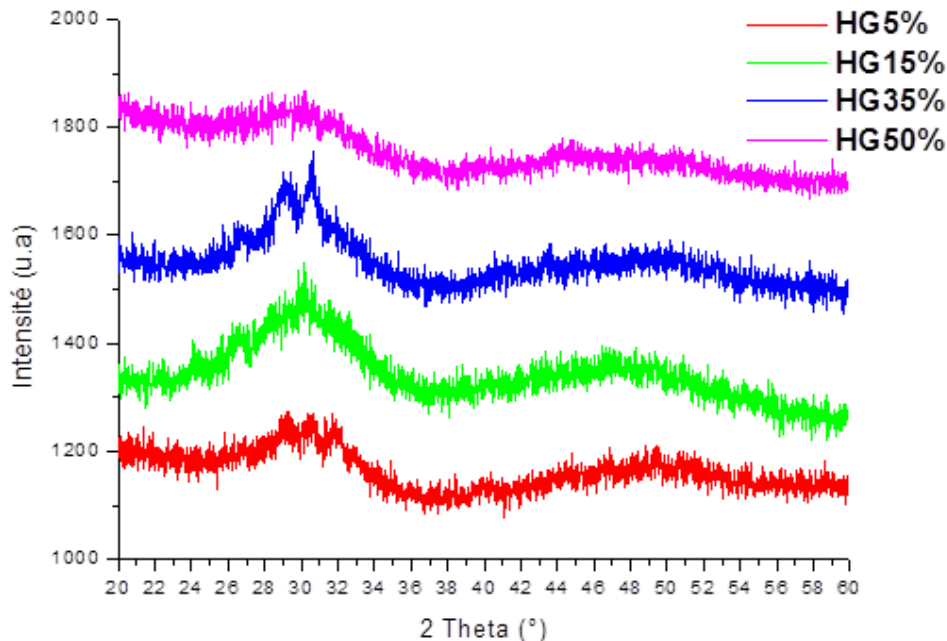


Figure IV.9 HG calciné à une température de 400°C et pour différentes teneurs en gélatine.

Sur ce diagramme, nous remarquons que tous les composites présentent des bandes très larges, bruitées et de faibles intensités pour des angles de diffraction aux environs de 25°-34°. Ceci indique la formation d'une phase de HAP de très faible cristallinité et/ou la taille des cristallites est petite [13]. D'après les résultats de l'ATG/ATD, HAP commence à se cristalliser uniquement pour des températures supérieures à 500°C. Il convient alors de mentionner l'effet de l'incorporation de la gélatine dans la phase de HAP. Pour 50% v/v, le diffractogramme ne présente aucun pic, il est similaire à celui d'un matériau amorphe donc aucune phase cristalline de gélatine ou de HAP n'est détectée par DRX. Ce qui est en accord avec les résultats du gel séché composite.

Pour un traitement thermique de 500°C durant 1h, le diagramme DRX des différents composites et de HAP est présenté sur la **figure IV.10(a)**. L'agrandissement effectué dans le domaine [25°- 40°] est montré sur la **figure IV.10 (b)**.

Les diffractogrammes des composites présentés sont similaires à celui de HAP, mais les pics deviennent plus larges avec une diminution au niveau de leur intensité. La superposition des principaux pics de la phase de HAP (intervalle 2θ compris entre 31° et 35°) montre une

meilleure résolution des pics dans le cas des trois premiers échantillons i.e pour HG0%, HG5% et HG15%. Alors que dans le cas des composites HG35% et HG50%, les pics deviennent moins résolus.

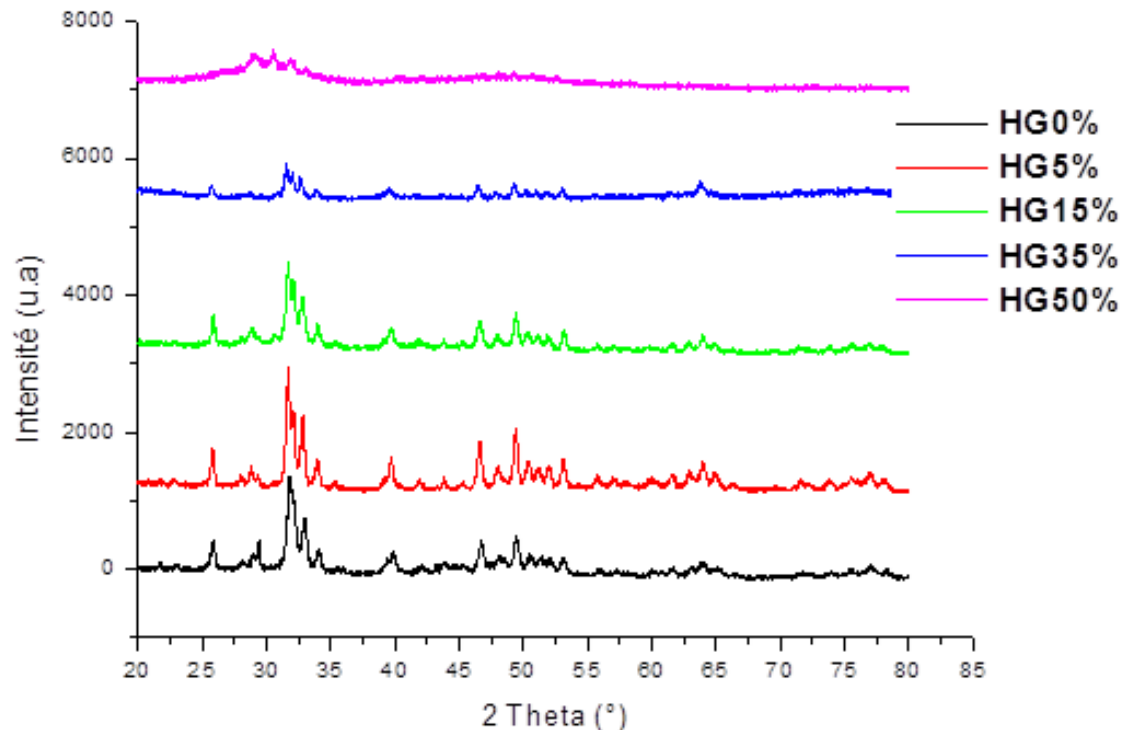


Figure IV.10 (a) HG calciné à $T=500^{\circ}\text{C}$ et pour différentes teneurs en gélatine.

On peut ainsi déduire que la cristallinité du composite diminue avec la réduction de la quantité de HAP dans les échantillons de 100 à 50% ou encore avec l'augmentation de la composition en gélatine de 0 à 50% [14].

On peut noter également une modification au niveau de la position des pics due à un décalage des pics les plus intenses dans le sens des angles de diffraction les plus petits (voir **figure IV.10 (b)**). Donc lorsque la teneur en gélatine augmente, une variation dans la position et une diminution de l'intensité des pics DRX sont observées. Les pics sont très larges et bruités. Ceci pourrait être expliqué par une substitution dans la structure de HAP. Selon Chao et al [13] lors de la dissolution de la gélatine et son mélange avec la phase de HAP, certaines liaisons chimiques se dissocient, entraînant ainsi une interaction avec les ions Ca^{2+} dans la structure de HAP.

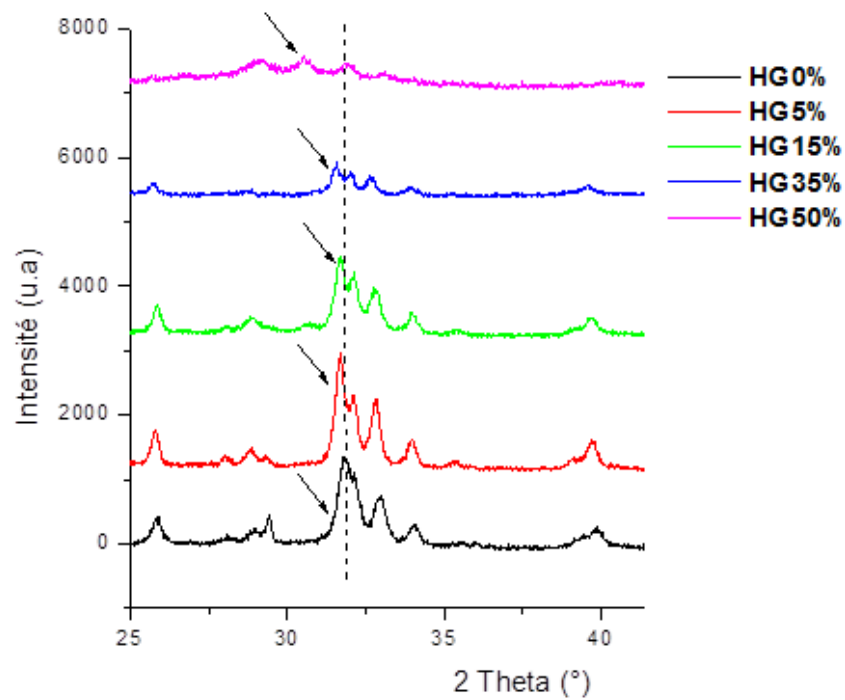


Figure IV.10.(b) *agrandissement sur le domaine* .

La **figure IV.11** montre que les pics relatifs aux différents composites calcinés à une température de 700°C sont plus distincts et mieux définis, par rapport à ceux obtenus pour une température de 500°C . Néanmoins leur résolution diminue avec l'augmentation de la teneur en gélatine.

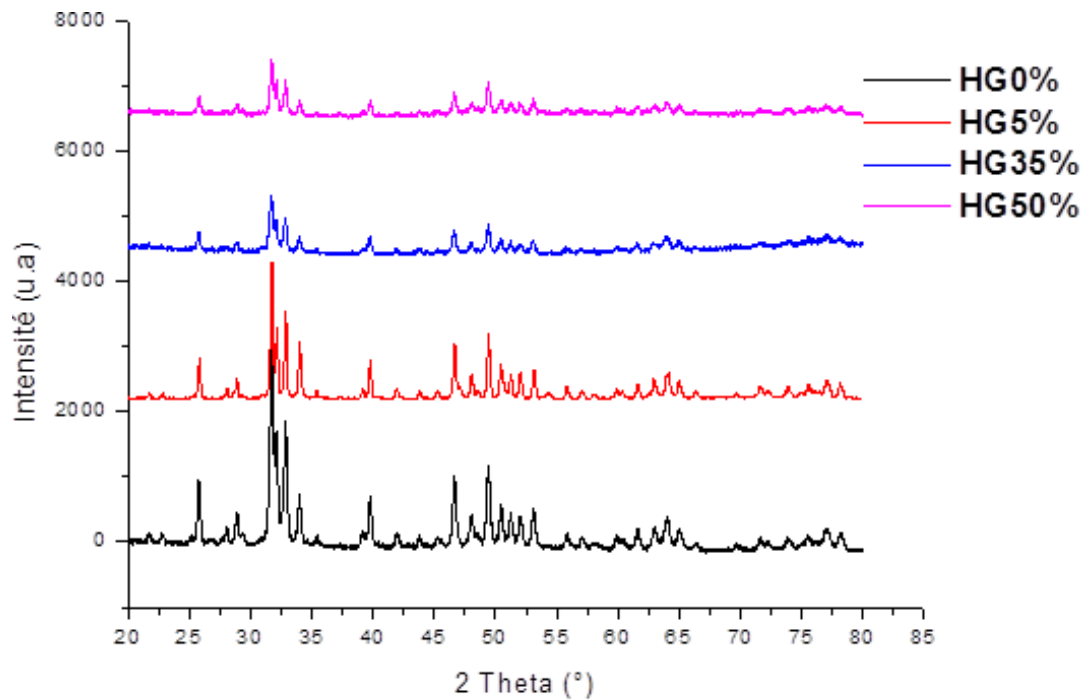


Figure **Erreur ! Il n'y a pas de texte répondant à ce style dans ce document.**1HG calciné à une température de 700°C et pour différentes teneurs en gélatine.

Les diffractogrammes DRX des composites calcinés à 900°C sont représentés sur la **figure IV.12**. La phase de HAP est présente dans tous les composites mais sa cristallinité diminue avec l'augmentation des pourcentages volumiques de la gélatine.

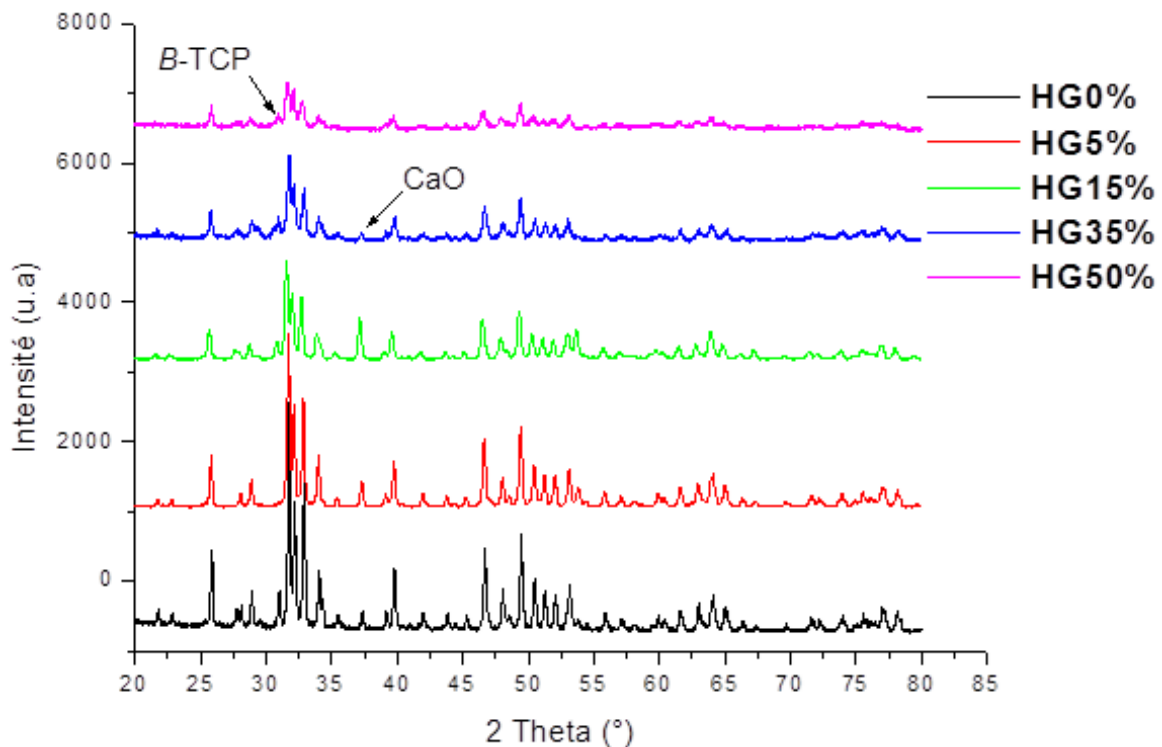


Figure IV.12 *HG calciné à une température de 900°C et pour différentes teneurs en gélatine.*

A noter également une légère modification au niveau des positions des pics relatifs aux composites calcinés à 700 et 900°C qui reste moins importante par rapport aux composites calcinés à 500°C (HG35% et HG50%). Ce qui peut être expliqué par la disparition complète de la gélatine à des températures supérieures à 500°C. Les deux phases secondaires de B-TCP et de CaO sont détectées aussi dans les composites calcinés à 900°C.

Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux rapportés par Chang et al [15] qui ont étudié le développement des cristaux de HAP dans les composites en variant les compositions en gélatine par analyse DRX. Ils ont montré que des phases de HAP faiblement cristallines sont formées lorsque la teneur en gélatine augmente.

D'après ces résultats on constate que la cristallinité qui est un paramètre important pour l'utilisation d'un biomatériau tel que l'hydroxyapatite dépend non seulement de la température de calcination mais aussi de la quantité de la gélatine ajoutée dans la phase de HAP. Dans nos prochains travaux nous allons essayer de déterminer le taux de cristallinité et la taille des cristallites des composites élaborés.

I.3.2 Spectrométrie Infrarouge

I.3.2.1 Spectre ATR de la gélatine

La figure ci-dessous (**figure IV.13**) montre le spectre ATR de la poudre de gélatine commercialisée.

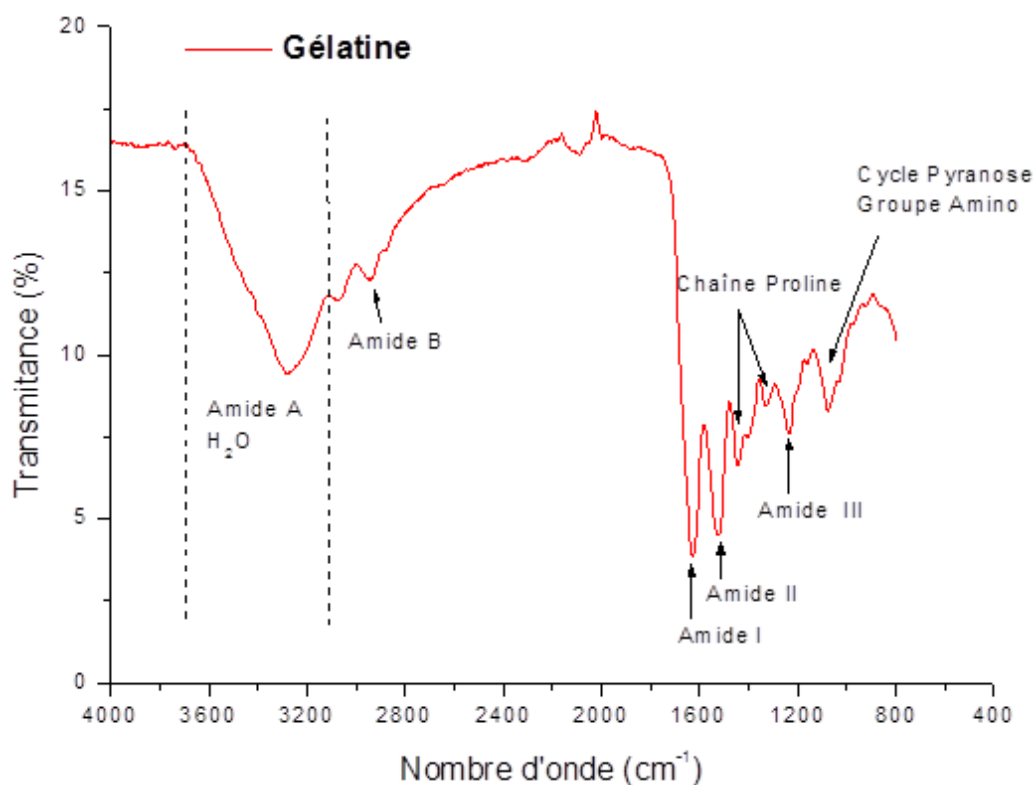


Figure IV.13 Spectre ATR de la gélatine.

Nous observons la présence de pics intenses relatifs aux groupements amides (A et B, I, II, III) qui caractérisent la structure de la gélatine du porc. La bande de transmittance proche de 1630 cm^{-1} est due aux vibrations de la liaison C=O (amide I). La bande de transmittance aux environs de 1520 cm^{-1} est due aux vibrations de déformation des groupements N-H et aux vibrations d'élongation des groupements C-N (amide II). A 1235 cm^{-1} , on retrouve les vibrations des groupements C-N et N-H d'un amide lié ou bien des groupements CH_2 de la glycine (amide III) [16-19]. La bande spectrale large située aux alentours de 3274 cm^{-1} est attribuées à (ν_{OH} et ν_{NH}) dans l'amide A avec de l'eau libre. La bande située à 2939 cm^{-1} correspond à ν_{CH} dans l'amide B. La bande à 1071 cm^{-1} correspond au pyranose¹ cyclique et aux groupes amino et dans l'intervalle $1325\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ on retrouve principalement la vibration due à la chaîne d'acides aminés (proline) [9, 20].

¹Pyranose : structure chimique composée d'un hétérocycle à 6 atomes : 5 atomes de carbone et un atome d'oxygène.

I.3.2.2 Spectres ATR des gels séchés HAP et HG

Les spectres infrarouges du gel séché d'hydroxyapatite pure et composite (5% v/v) sont représentés dans la **figure IV.14**.

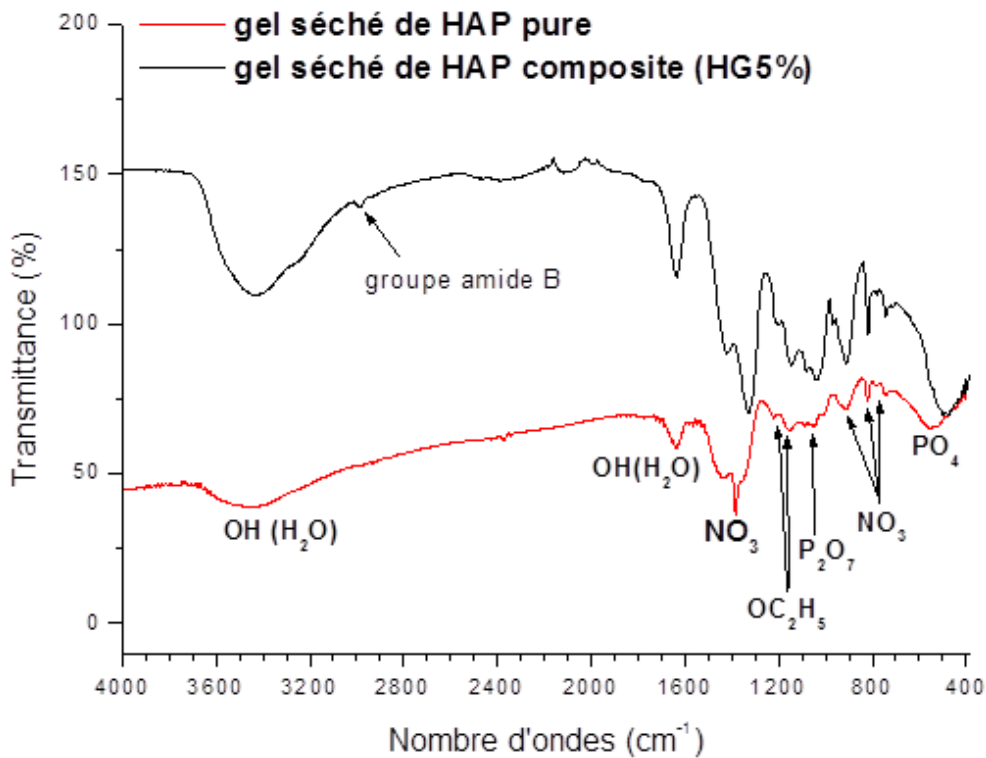


Figure IV.14 Spectres ATR du gel séché de HAP et du composite HG5%.

Les spectres révèlent la présence d'une bande large dans l'intervalle 500-600 cm^{-1} (pic aux environs de 551 cm^{-1}) relative aux groupements PO_4 caractéristique de l'hydroxyapatite. Les bandes à 727, 821, 910 cm^{-1} et dans l'intervalle 1330-1420 cm^{-1} (pic aux environs de 1383 cm^{-1}) sont relatifs aux groupements NO_3 issus des nitrates de calcium. La bande large entre 3200 et 3600 cm^{-1} , correspond aux vibrations d'élongation des liaisons O-H de l'eau adsorbée, aussi, la bande à 1632 cm^{-1} dénote l'élongation O-H (eau moléculaire et d'adsorption) [21]. Ce qui indique que le gel séché de HAP est à l'état amorphe. Les petits pics à 1153 et 1232 cm^{-1} sont attribués aux groupements éthoxy (OC_2H_5) [22]. Le petit pic à 1045 cm^{-1} correspond aux groupements pyrophosphates ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) [23]. Le gel composite HG5% présente en plus des pics caractéristiques du gel séché de HAP, un petit pic correspondant au groupe amide B et qui est décalé de 2939 cm^{-1} vers 2982 cm^{-1} . Ce qui indique la présence de la gélatine dans le composite préparé à 5 % v/v et séché à 150°C.

D'après la **figure IV.15** on retrouve également les groupes amide B (2982 cm^{-1}) dans les gels séchés composites (HG15%, HG35% et HG50%). L'apparition du groupe amide I à 1690 cm^{-1} (au lieu de 1630 cm^{-1}) et du groupe amide II à 1540 cm^{-1} (au lieu de 1520 cm^{-1}) indique que les deux composites HG35% et HG50% adoptent une structure hélicoïdale qui est la structure de la gélatine [20, 24, 25]. Ceci vient confirmer les résultats des mesures de la viscosité où nous avons noté une variation de la viscosité des gels composites lorsque leur teneur en gélatine dépasse 25%.

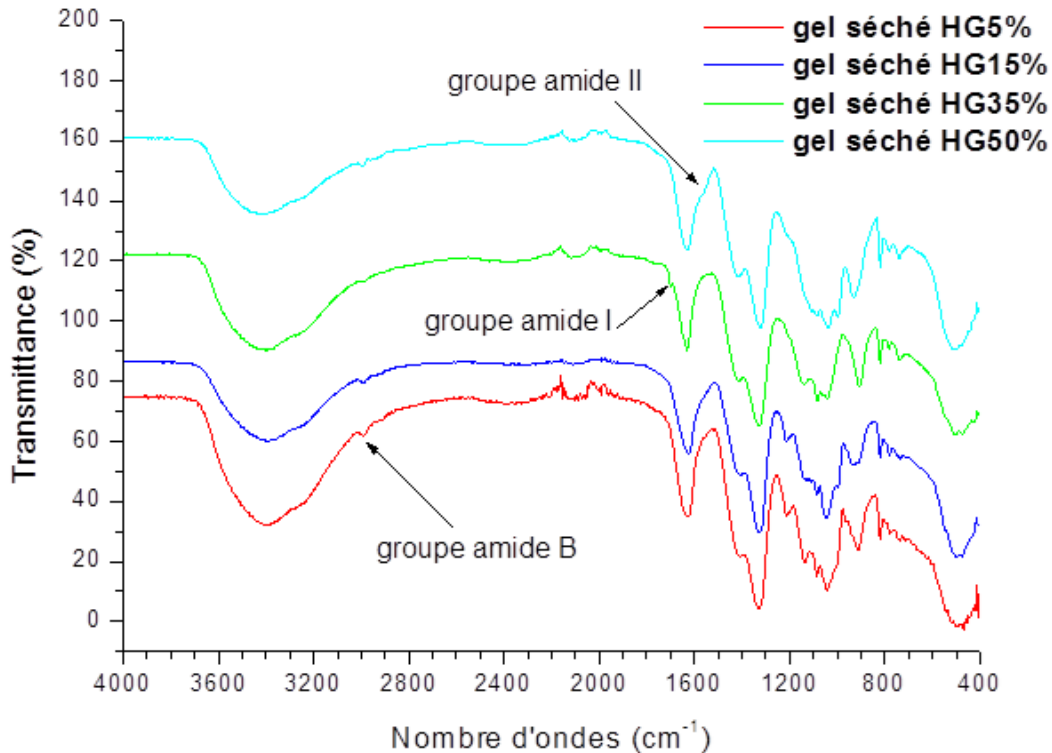


Figure IV.15 Spectres ATR des gels séchés des composites.

I.3.2.3 Effet de la teneur en gélatine et du traitement thermique

L'effet de la variation de la température de calcination sur chaque composite est illustré dans les **figures IV. 17-18-19 et 20**.

On remarque sur le spectre ATR des composites calcinés à 300°C (**figure IV.17**), la disparition des pics relatifs aux groupements (OC_2H_5) et (P_2O_7) et l'apparition des pics représentatifs des groupements phosphates (PO_4) dans le domaine $900\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$. Cependant on retrouve les bandes d'absorption caractéristiques des nitrates (NO_3) lesquels d'après l'analyse ATD/ATG ne disparaissent qu'après traitement à une température de 415°C . Nous

remarquons, également, la présence de bandes originaires des groupements amides II qui caractérisent la structure de la gélatine dans les composites HG50% et HG35%.

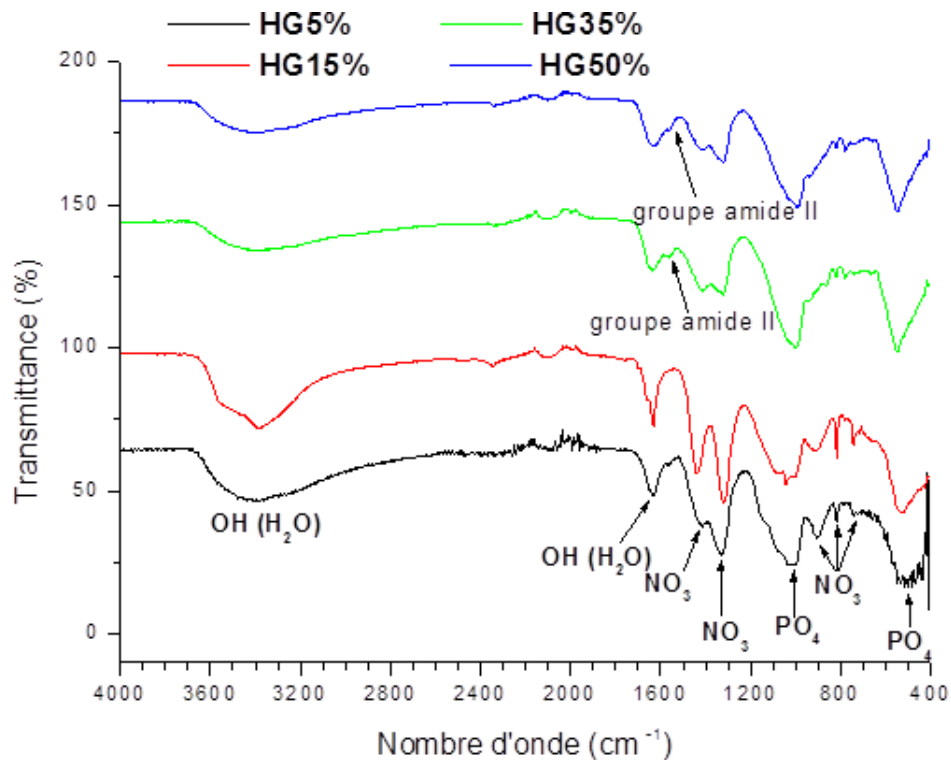


Figure IV.16 Spectres ATR des composites à 300°C.

Lorsque la température de calcination atteint 500°C (**figure IV.16**), la bande large, dans le spectre du gel séché (**figure IV.14**), située dans l'intervalle 500-600 cm^{-1} se décompose en 3 pics à 473, 563 et 600 cm^{-1} .

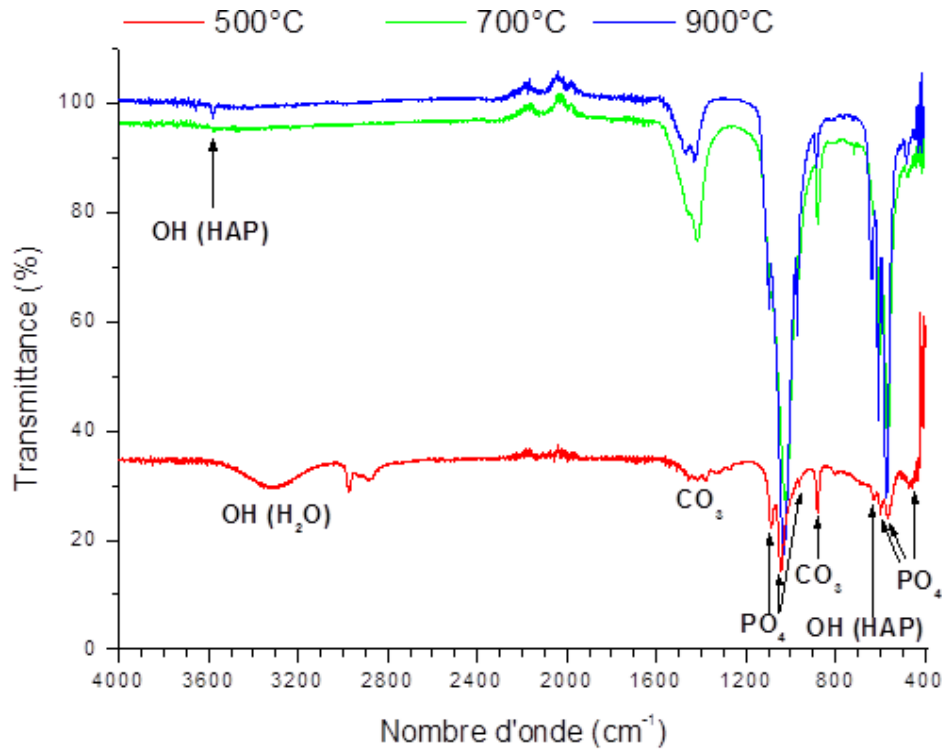


Figure IV.17 Spectres ATR de l'hydroxyapatite calcinée à 500, 700 et 900°C.

Ce triplet (473, 563 et 600 cm^{-1}) est attribué aux vibrations ν_4 et ν_2 de la liaison des ions PO_4^{3-} . Ce qui caractérise la structure de l'apatite et indique la formation de la phase de HAP dans tous les échantillons (700 et 900°C) [26]. La bande à 964 cm^{-1} correspond à l'élongation symétrique ν_1 (P-O) et les bandes à 1049 et 1089 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations ν_3 des ions PO_4^{3-} . La bande large allant de 3200 à 3500 cm^{-1} est attribuée aux vibrations ν_3 et ν_1 , respectivement des liaisons OH dans les molécules de H_2O . La bande à 1632 cm^{-1} correspond au mode de déformation ν_2 des molécules de H_2O . La bande d'absorption à 3572 cm^{-1} qui apparaît mieux pour HAP calcinée à 900 et 700°C et le pic développé à 630 cm^{-1} proviennent des modes de vibration d'élongation des ions OH^- dans la structure de l'hydroxyapatite [27]. La présence des carbonates est indiquée par les bandes d'absorption situées à 1419, 1460, 1501, 1540 cm^{-1} et 873 cm^{-1} . Leur présence dans la structure apatitique est due à la substitution partielle des groupes PO_4 par ceux de CO_3 donnant lieu à une apatite carbonatée [28, 29]. La substitution d'une partie des groupes PO_4 par ceux de CO_3 , induit une modification du rapport Ca/P, l'hydroxyapatite carbonatée obtenue est alors non stoechiométrique [30].

Les spectres ATR des composites calcinés à 500°C (**figure IV.18**) montrent des bandes d'absorption similaires mais dans le cas des deux composites HG35% et HG50%, leur résolution diminue et leur position est également modifiée.

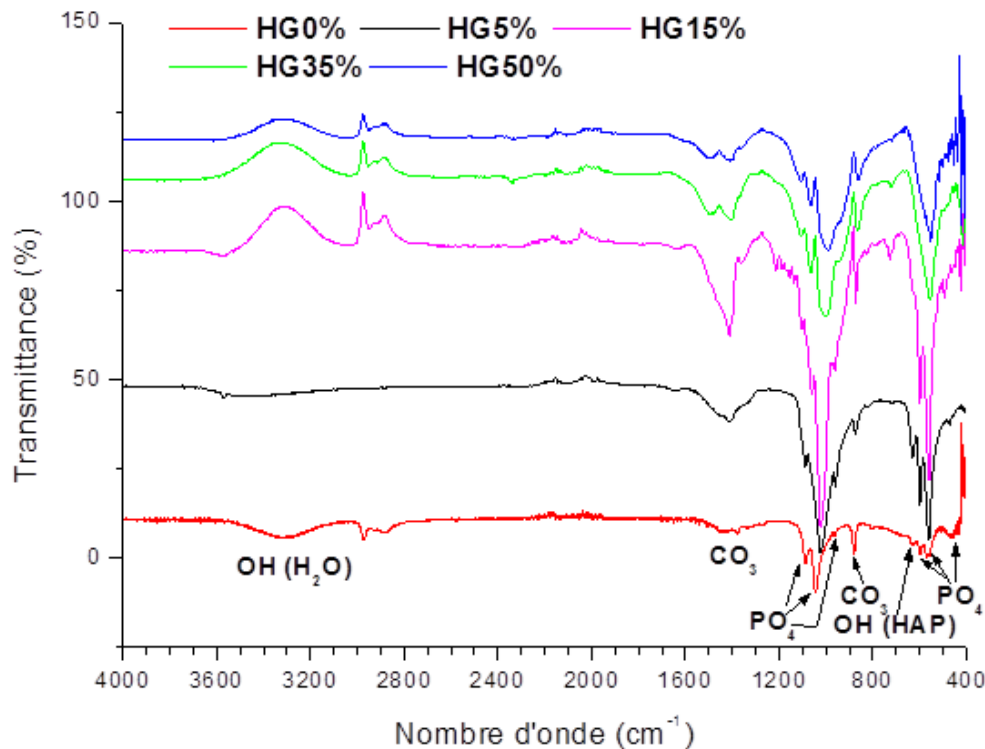


Figure IV.18 Spectres ATR des composites à $T=500^{\circ}\text{C}$.

Contrairement aux spectres enregistrés dans le cas des composites calcinés à 300°C, il n'y a pas de bandes spectrales originaires de la gélatine (amide I et II). Le diagramme ATG de la gélatine a montré que la dégradation de celle-ci commence à avoir lieu pour des températures situées entre 200 et 450°C. Donc pour des températures supérieures à 450°C la gélatine est dégradée il y a rupture de la chaîne protéique (structure hélicoïdale).

Les spectres ATR des composites calcinés à 700°C (**figure IV.19**) et 900°C (**figure IV.20**) indiquent des bandes bien définies associées à la phase de HAP. Ils montrent une même évolution des bandes spectrales dont l'intensité diminue avec l'augmentation de la teneur en gélatine.

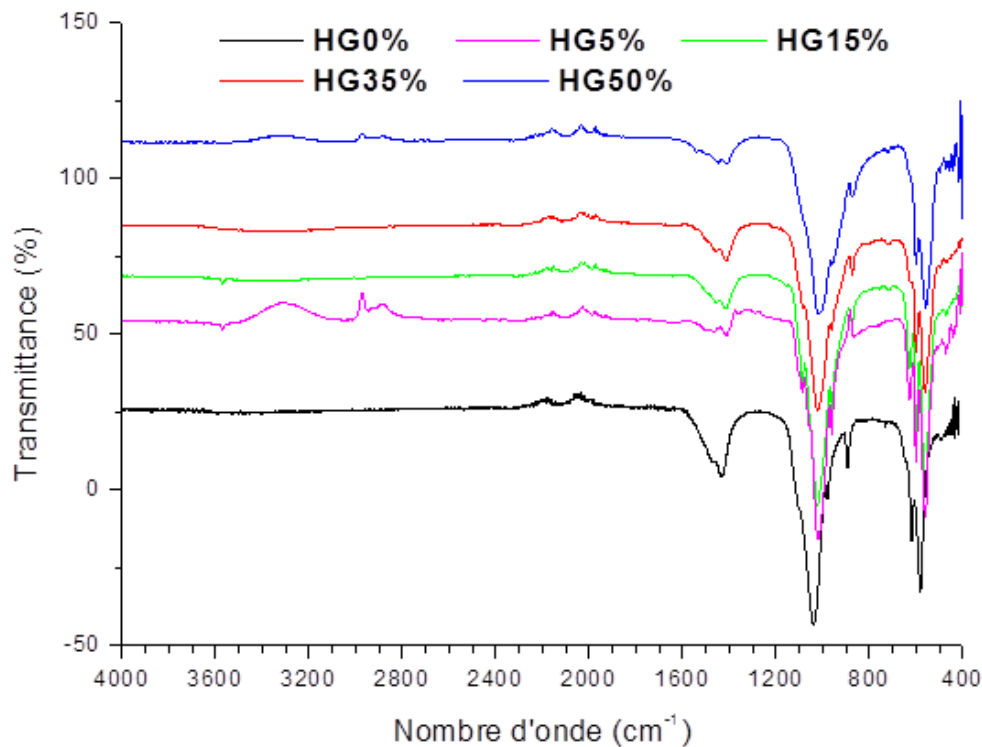


Figure IV.19 Spectres ATR des composites à $T=700^{\circ}\text{C}$.

On note aussi un décalage au niveau des bandes et des pics dans tous les spectres mais qui est plus important dans le cas des composites (HG35% et HG50%) calcinés à 500°C . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par analyse DRX. Donc on peut tirer la conclusion que lorsque la température diminue et que la quantité de gélatine rajoutée dans la phase de HAP augmente, la cristallinité du composite ainsi formé diminue. Par conséquent la taille des cristallites peut diminuer et favoriser ainsi la possibilité de création de pores. Comparés à ces deux composites, les deux composites HG35% et HG50% préparés une température de 900°C montrent une cristallinité relativement plus élevée, donc on s'attend dans ce cas à ce que la porosité diminue. Il est connu que tout matériau utilisé pour la régénération du tissu doit posséder certaines propriétés chimiques et physiques. En plus de la biocompatibilité et de la solubilité qui dépend de la cristallinité, un matériau avec une structure représentant des pores interconnectés est nécessaire pour favoriser l'invasion cellulaire [20].

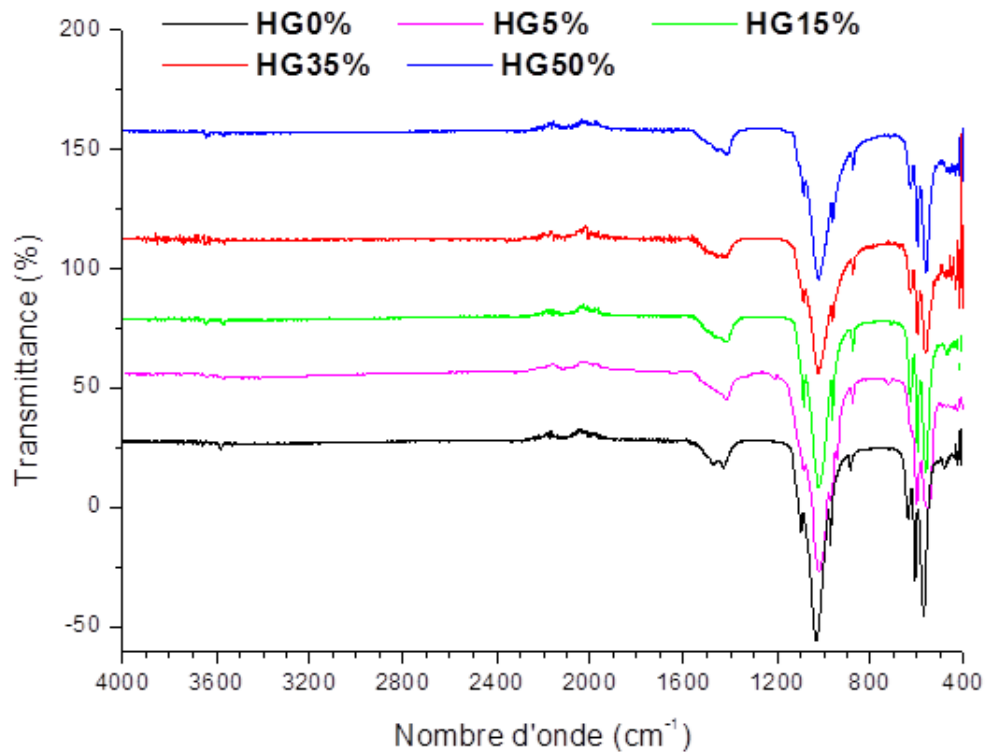


Figure IV.20 Spectres ATR des composites à $T=900^{\circ}\text{C}$.

Pour renforcer ces constatations nous avons réalisé les tests de porosité et la mesure de la rugosité.

I.4 GELATINE COMME AGENT POROGENE

I.4.1 Etude de la porosité

Les matériaux à tester que nous avons choisis sont : HAP pure préparée à 500°C (HAP 500°C), la gélatine, deux composites préparés avec 50% de gélatine et calciné chacun à 500 et 900°C (HG50% 500°C et HG50% 900°C). Ces matériaux sont mis en forme de pastilles puis immergés dans le SBF durant 24h. Après 24h de contact avec la solution de SBF, les pastilles sont partiellement solubilisées alors nous avons réduit le temps d'immersion à 2 h.

NB : nous avons effectué un essai pour chaque mesure parce qu'on n'a pas pu préparer assez de pastilles.

La porosité est calculée en utilisant la relation (1) [31] :

$$P(\%) = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \times 100 \quad (1)$$

Avec :

$V_1 = 2\text{ml}$, volume initial de la solution de SBF.

V_2 : Volume de la solution après immersion des échantillons.

V_3 : Volume de la solution après retrait des échantillons.

Pour le calcul de la masse volumique [32] :

$$d = \frac{W}{V_2 - V_3} \quad (2)$$

W:masse de la pastille sèche (avant immersion).

Les résultats obtenus comparés à ceux donnés par la littérature pour un os spongieux et un os cortical sont représentés dans le **tableau IV.1**.

Tableau IV.1 Mesure de la porosité et de la masse volumique de HAP, de la gélatine et des composites.

Echantillon	Masse, W (g)	V_2 (ml)	V_3 (ml)	Masse volumique, d ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Porosité, P (%)
HAP 500°C	0,4097	2,3	1,8	0,8194	40
Gélatine	0,6134	2,5	1,2	0,4718	62
HG50% 500°C	0,1798	2,2	1,75	0,3996	56
HG50% 900°C	0,1627	2,1	1,9	0,8135	50
Os cortical ou compact [33]	-	-	-	1,8-2	5-30
Os spongieux ou trabéculaire [33]	-	-	-	0,14-1,2	30-90

Les résultats de mesures montrent l'effet de la gélatine sur la porosité et la masse volumique de l'hydroxyapatite préparée à une température de 500°C. La porosité des composites calculée est comprise entre celle de HAP pure et celle de la gélatine, elle augmente légèrement de 50 % pour le composite préparé à 900°C à 56% (composite préparé à 500°C). La porosité mesurée dans cette étude ainsi que la masse volumique correspondent à celles de l'os spongieux.

I.4.2 Rugosité de surface

Les mesures sont effectuées sur 10 sections de surface de 500 μm de longueur, nous avons représenté les 5 mesures les plus proches pour chaque échantillon puis calculé la moyenne.

Tableau IV.2 Mesures de la rugosité à la surface des composites, HAP et de la gélatine.

Echantillon	Rugosité 1	Rugosité 2	Rugosité 3	Rugosité 4	Rugosité 5	Rugosité (nm) Moyenne
HAP 500°C	879	905,35	742	1473,41	1424,43	1085
Gélatine	11617	24512	13960	13633,64	9608,96	14666
HG50% 500°C	1595,69	1232	1208,50	1202,13	1120,14	1272
HG50% 900°C	1401,34	1481,61	1484,34	1534,50	1580,58	1497

La pastille de gélatine montre la rugosité de surface la plus élevée (14666 nm) ce qui peut être expliqué par sa structure poreuse. Les deux composites présentent une surface qui est légèrement plus rugueuse que celle de HAP pure. La morphologie de surface des substituts osseux est un paramètre majeur qui conditionne leur efficacité. Un certain degré de porosité (présence des micropores ($\leq 10 \mu\text{m}$), des macropores ($\geq 100 \mu\text{m}$) et de pores interconnectés en particulier), augmente la surface spécifique du biomatériau, sa rugosité et résorbabilité, ce qui permet la colonisation des substituts osseux par les cellules osseuses, les fluides physiologiques, et favorise ainsi la formation de nouveaux tissus osseux [34-36].

I.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (CHAPITRE IV)

- [1] D. Sidane, Synthèse et caractérisation des dépôts d'hydroxyapatite sur l'acier 316 L : structure & adhérence. Mémoire de Magister, Université de Bejaia, 2010.
- [2] A. Borghi, M. Cojazzi, G. Fichera, A. M. Panzavolta, S. Roveri, Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *J. Therm. Anal.* 61 (2000) 451-459.
- [3] S. Kim, P.N. Kumta, Sol gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder, *Materials Science and Engineering B* 111 (2004) 232-236.
- [4] D. M. Liu, Q. Yanga, T. Troczynski, W. J. Tsenga, Structural evolution of sol gel derived hydroxyapatite. *Biomaterials*, 23 (2002) 1679-1687.
- [5] D. M. Liu, T. Troczynski, W. J. Tseng, Aging effect on the phase evolution of sol gel hydroxyapatite. *Biomaterials*, 23 (2002) 1227-1236.
- [6] P.L.M. Barreto, A.T. N. Pires, V. Soldi., Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polymer Degradation and Stability* 79 (2003) 147-152.
- [7] P.Y. Inamura, F.H. Kraide, W.S. Drumond, , N.B. de Lima, E.A.B. Moura, N.L. del Mastro. Ionizing radiation influence on the morphological and thermal characteristics of a biocomposite prepared with gelatin and Brazil nut wastes as fiber source. *Radiation Physics and Chemistry* 84 (2013) 66-69.
- [8] C. Pena, K.de la Caba, A. Eceiza, R. Ruseckaite, I. Mondragon, Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bio Resource. Technology*, 101 (2010) 6836–6842.
- [9] N. Benbettaieb, Influence de traitements de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosan encapsulant ou non des antioxydants naturels : caractérisations physico-chimiques et application. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne et Faculté des Sciences de Bizerte de l'université de Carthage, 2015.
- [10] V. Uskoković, S. Ghosh, V.M. Wu, Antimicrobial Hydroxyapatite-Gelatin-Silica Composite Pastes with Tunable Setting Properties. *Journal of Materials Chemistry B* (2017) DOI: 10.1039/C7TB01794D.
- [11] A. Bigi, M. Borghi, G. Cojazzi, A.M. Fichera, S. Panzavolta, N. Roveri, Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films. *Journal of Thermal Analysis* 61 (2000) 451-459.
- [12] J. Grevellec, C. Marquié, L. Ferry, A. Crespy, V. Vialettes. Processability of cottonseed proteins into biodegradable materials. *Biomaterials* 2 (2001) 1104-1109.
- [13] S.C. Chao, M-J. Wang, N-S. Pai, S-K. Yen, Preparation and characterization of gelatin–hydroxyapatite composite microspheres for hard tissue repair, *Materials Science and Engineering C* 57 (2015) 113-122.

- [14] A. Yanovska, V. Kuznetsov, A. Stanislavov, E. Husak, M. Pogorielov, V. Starikov, S. Bolshanina, S. Danilchenko, Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatin composite materials for orthopaedic application. *Materials Chemistry and Physics* 183 (2016) 93-100.
- [15] M.C. Chang, C-C. Ko, W.H. Douglas, Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials* 24 (2003) 2853–2862.
- [16] A. Gennadios, Protein-based edible films and coatings. CRC Press, Lancaster (2002) pp 890.
- [17] Y. Yin, Z. Li, Y. Sun, and A. Yao, Preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of Material Science (Letters)* 40 (2005) 4649-4652.
- [18] Z.A. Nur Hanani, M. McNumara, Y.H. Ross, & J. P. Kerry, Effect of plasticizer content on the functional properties of extruded gelatin based composite films. *Journal of Food Hydrocolloids* 31 (2013) 264-269.
- [19] P. Tongnuanchan, S. Benjakul, & T. Prodpran, Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry* 134 (2012) 1571-1579.
- [20] M. KazemzadehNarbat, F. Orang, M. SolatiHashtjin and A. Goudarzi, Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Iranian Biomedical Journal* 10 (2006) 215-223.
- [21] S.W. Russel, K.A. Luptak, C.T.A. Suchicital, T.L. Alford, V.B. Pizzicoui, Chemical and structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite thin films under rapid thermal processing. *J Am Ceram Soc* 79(1996) 837–842.
- [22] S. Kim, P.N. Kumta, Sol gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder, *Materials Science and Engineering B*, 111 (2004) 232–236.
- [23] A. H. Rajabi-Zamani, A. Behnamghader, A. Kazemzadeh, Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite powder via nonalkoxide sol gel method. *Materials Science and Engineering C*, 28 (2008) 1326–1329.
- [24] B.B. Doyle, Infrared spectroscopy of collagen and collagen like polypeptides. *Biopolymers* 14 (1975) 937-957.
- [25] E.P. Epaschalis, E. Betts, E. Di Carlo, R. Mendelsohn, and A.L. Boskey, FTIR microspectroscopic analysis of normal human cortical and trabecular bone. *Calcif. Tissue Int.* 61 (1997) 480-486.
- [26] D.M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, Sol gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. *Biomaterials* 23 (2002) 691–698.
- [27] Z.H. Cheng, A. Yasukawa, K. Kandori, T. Ishikawa, FTIR study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94 (1998) 1501–1505.

- [28] D.W. Holcomb, R.A. Young, Thermal decomposition of human tooth enamel, *Calcif. Tissue Int.* 31 (1980) 189–201.
- [29] J.C. Elliott, The crystallographic structure of dental enamel and related apatites PhD. Thesis University of London, 1974.
- [30] A. Slosarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz, FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods, *J. Mol. Struct.* 747 (2005) 657–661.
- [31] V. Maquet, A.R. Boccaccini, L. Pravata, I. Notingher, R. Jerome, Porous poly(ahydroxyacid)/Bioglass® composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterisation, *Biomaterials* 25 (2004) 4185-4194.
- [32] F. Naghizadeh, N. Sultana, M.R. Kadir, T.M. Shihabudin, R. Hussain, T. Kamarul. The fabrication and characterization of PCL/rice husk derived bioactive glassceramic composite scaffolds, *J. Nanomater.* 2014 (2014) 1-9.
- [33] M. Mozafari, F. Moztarzadeh, M. Rabiee, M. Azami, S. Maleknia, M. Tahriri, Z. Moztarzadeh, N. Nezafati, Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering. *Ceramics International* 36 (2010) 2431–2439.
- [34] B. S Chang, C. K. Lee, K. S. Hong, Hyuk-Joon Youn, H. S. Ryu, S. S. Chung, K. W. Park, Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21 (2000) 1291-1298.
- [35] M. Jarcho, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orthopaedics& Related Research* 157(1981) 259-278.
- [36] P. Habibovic, M. C. Kruyt, M. V. Juhl, S. Clyens, R. Martinetti, L. Dolcini, N. Theilgaard, C. A. V. Blitterswijk, Comparative In Vivo Study of Six Hydroxyapatite-Based Bone Graft Substitutes, *Journal of Orthopaedic Research* 10 (2008) 1363-1370.



Conclusion et perspectives



Durant ce travail, nous avons choisi d'utiliser la technique sol gel pour l'élaboration de nos biomatériaux. Ce procédé a permis d'obtenir une hydroxyapatite carbonatée à une température de 500°C avec développement de phases secondaires (CaO et *B*-TCP) lorsque la température de calcination atteint 900°C.

L'objectif du travail fixé étant de modifier les propriétés de ce biomatériau en lui ajoutant un agent porogène tel que la gélatine. Nous avons alors commencé par varier les proportions de la gélatine dans la phase de HAP (5%, 15%, 35% et 50% v/v) puis calciné le composite à différentes températures (300, 400, 500, 700 et 900 °C) et déterminer ainsi l'effet du traitement thermique et de la teneur en gélatine sur la cristallinité, la porosité et la rugosité des composites hydroxyapatite-gélatine obtenus.

La caractérisation physico-chimique est réalisée essentiellement par la combinaison de 3 techniques d'analyses(DRX-ATR-ATG) qui nous ont permis de connaître la température de cristallisation, les phases cristallines et les groupements fonctionnels de l'hydroxyapatite et de la gélatine et d'identifier ainsi les différents matériaux composites élaborés.

La mesure de la viscosité des mélanges a indiqué une évolution au niveau des deux gels HG35% et HG50%. D'ailleurs les groupements amides (I et II) caractéristiques de la structure hélicoïdale de la gélatine sont détectés uniquement dans le cas des gels séchés composites HG35% et HG50% et après calcination à 300 °C. Au-delà de cette température (à 500°C) la gélatine subit une dégradation(rupture au niveau des chaînes constituant sa structure).

La cristallinité des composites hydroxyapatite- gélatine est évaluée qualitativement (intensité, largeur et position des pics) par analyse DRX et ATR, celle-ci augmente avec l'augmentation de la température de calcination (700 et 900°C) et diminue pour des teneurs en gélatines élevées (35% et 50%). A partir des conclusions tirées de cette partie de l'étude, deux échantillons sont sélectionnés pour estimer leur porosité, il s'agit de HG50% 500°C et HG50% 900°C.

La porosité des matériaux composites (HG50% 500°C et HG50% 900°C) ainsi que celle de HAP et de la gélatine est estimée entre 40 et 62% ce qui correspond à la porosité de l'os spongieux. En allant de 0 à 50% en teneur de gélatine, la porosité augmente de 40% (HAP) jusqu'à 56% (HG50% 500°C) et pour un même pourcentage en gélatine (50%), le composite calciné à 500°C présente une porosité légèrement supérieure (56%) à celle du composite calciné à 900°C (50%), donc on peut supposer que la teneur en gélatine influe sur la porosité du matériau de manière excessive par rapport à la température de calcination.

Les matériaux composites et la gélatine ont montré une surface plus irrégulière/rugueuse que celle de HAP. Cette observation peut être expliquée par les résultats de porosité, plus le

Conclusion générale

matériau est de structure poreuse, l'aspect de sa surface devient irrégulier (exemple de la pastille de gélatine).

En conclusion, le biomatériau d'origine synthétique ainsi élaboré peut être utilisé comme substitut osseux pour le comblement osseux puisque il présente une certaine porosité relative à celle de l'os spongieux.

Comme perspective, il est recommandé d'abord de compléter et d'approfondir ce travail qui ouvre éventuellement d'autres horizons :

- ✚ D'abord détailler les paramètres de cristallinité (taux de cristallinité, tailles des cristallites, paramètres de maille,...).
- ✚ Compléter l'analyse microstructurale et déterminer la composition élémentaire par microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (MEB/EDXS).
- ✚ Estimer la porosité de tous les matériaux composites en effectuant plusieurs essais et comparer les résultats obtenus avec ceux du BET et du MEB (dimension des pores, volume poreux,...).
- ✚ Elaborer une autre série de matériaux composites avec : 10, 20, 25, 30, 40 et 45 % v/v en gélatine.
- ✚ Etudier la bioactivité *in vitro* avec et sans modification du biomatériau composite (hydroxyapatite -gélatine) par greffage d'un principe actif.
- ✚ Faire les tests de microbiologie avec insertion d'un anti bactérien tel que la silice.



Annexes



IV.1 Principe du rhéomètre vibrant - méthode du diapason :

Deux fines lamelles de capteur montées comme un diapason sont maintenues en mouvement par un moteur électromagnétique. Elles vibrent dans le plan de leur épaisseur, en opposition de phase, et à leur fréquence de résonance de 30 Hz tout en étant immergées dans le fluide échantillon dont la viscosité doit être mesurée. La viscosité correspond à la résistance du fluide à s'opposer au mouvement des lamelles du capteur. Elle est proportionnelle à l'intensité du courant injecté dans la bobine électromagnétique pour obtenir une amplitude de vibration donnée [1].

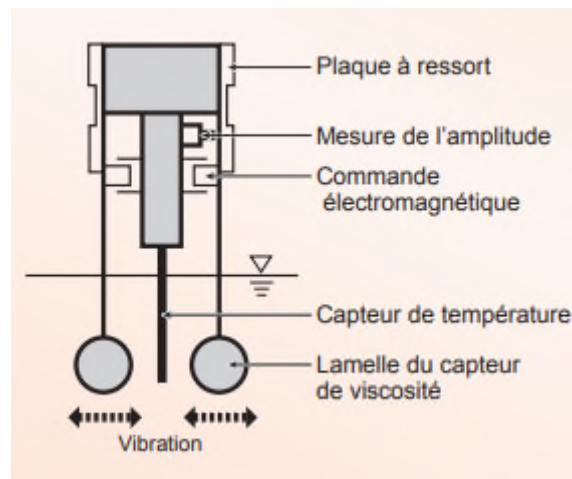


Figure 0.1 schéma représentatif du viscosimètre

ε : constante dépendant de la fréquence caractéristique de l'élément à doser (coefficient d'extinction moléculaire);

L : longueur du trajet optique dans la flamme contenant l'élément à doser ;

C : concentration de l'élément à doser.

IV.2 CONCENTRATIONS DES IONS PRESENTS DANS LE SBF PAR RAPPORT AU PLASMA HUMAIN.

Tableau Erreur ! Il n'y a pas de texte répondant à ce style dans ce document..1Composition ionique de SBF et du plasma humain[2].

Ions	SBF [$10^{-3}M$]	Plasma humain [$10^{-3}M$]
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.8	103.0
HCO ₃ ⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
pH	7,25-7,42	7,24-7,40

IV.3 PRINCIPE DE LA TECHNIQUE ATG/ATD

L'analyse thermique englobe un ensemble de techniques destinées à mesurer l'évolution d'un matériau minéral ou organique en fonction du temps, de la température et de l'atmosphère. Ces différentes techniques rendent possible l'identification des propriétés physiques des matériaux au cours de leur cycle de vie.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) consiste à mesurer la variation de masse d'un matériau en fonction du temps et de la température. Cette technique est utilisée pour la détermination des caractéristiques des matériaux tels que la stabilité thermique, la cinétique des réactions chimiques, les températures de dégradation ou encore la volatilité.

L'analyse thermodifférentielle (ATD) va permettre une mesure de la différence de température entre l'échantillon et un corps témoin inerte. Cette technique vient généralement compléter l'analyse ATG [3].

IV.4 TECHNIQUE ET PRINCIPE DE LA DRX

La diffraction des rayons X est une méthode qui permet d'expliquer la complexité des solides, en approfondissant la notion du corps solide par l'analyse de ses détails, et d'exploiter les défauts de réseaux[4]. La diffraction des rayons X (DRX) est un effet interférentiel entre les ondes diffusées par les atomes du cristal. Ainsi l'éclairement d'un matériau avec une onde

électromagnétique nanométrique engendre un diffractogramme: un ensemble de pics de diffraction dont les positions angulaires discrètes données par la relation de Bragg suivant un angle. Les rayons X de longueur d'onde λ peuvent se réfléchir sur les plans réticulaires déterminés par la loi de Bragg suivant un angle θ .

$$n\lambda = 2 d \sin (\theta)$$

Avec :

n : nombre entier positif qui désigne l'ordre de l'intensité maximale diffractée ;

λ : longueur d'onde du rayon X ;

d : distance entre plans réticulaires ;

θ : angle entre le rayon X et le plan réflexion.

IV.5 TECHNIQUE DE REFLECTANCE TOTALE ATTENUÉE (ATR)

Un accessoire ATR fonctionne en mesurant les modifications survenant dans un faisceau infrarouge réfléchi en interne lorsque le faisceau entre en contact avec un échantillon. Un faisceau infrarouge est dirigé vers un cristal optiquement dense avec un indice de réfraction élevé à un certain angle. Cette réflectance interne crée une onde évanescente qui s'étend au-delà de la surface du cristal et à l'intérieur de l'échantillon qui est en contact avec le cristal[5]. Dans les régions du spectre IR où l'échantillon absorbe de l'énergie, l'onde évanescente est atténuée. Le faisceau atténué revient au cristal, puis quitte l'extrémité opposée du cristal et est dirigé vers le détecteur dans le spectromètre IR. Le détecteur enregistre le faisceau IR atténué sous forme d'un signal d'interférogramme, qui peut ensuite être utilisé pour générer un spectre IR.

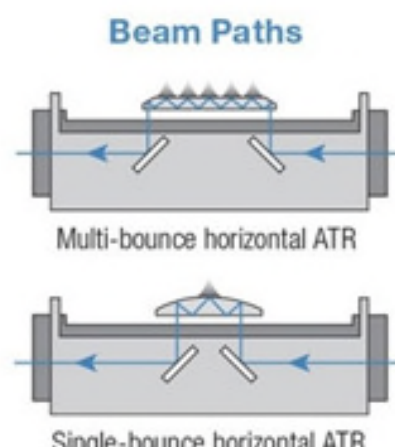


Figure.10.1 Technique d'analyse ATR

Le principal avantage de la spectroscopie ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance – Fourier TransformInfrared) est qu'elle permet d'étudier tant des films minces que des poudres, des polymères ou des liquides, le tout avec une préparation d'échantillon minimale. Grâce à l'utilisation de différents accessoires, la caractérisation de matériaux absorbants dans les hautes longueurs d'onde tels que des caoutchoucs et certains polymères peuvent être mesurés dans des conditions très variées (température, milieu acide...).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Rhéomètre vibrant – Méthode du diapason RV-10000, ISO 9000, *A&D Company*.
- [2] T.Kokubo,H. Takadama, *Biomaterials* 2006, 27, 2907-2915.
- [3] Analyses thermiques par ATG, ATD, DSC sur des matériaux, *analytice (société de service analytique.)*
- [4] S. Djellal and S. Guendouzen, « Valorisation de rejet de minerai de phosphate noir de gisement de keh Es Sennoun de la mine de Djebel Onk (Tebéssa-Algérie) dans l'élaboration d'une biocéramique », Mémoire de fin de cycle Master en Mine,*Université de Bejaia, 2015*
- [5] Techniques d'échantillonnage par FTIR : Réflectance total atténuée (ATR), *ThermoFisher SCIENTIFIC*.

Résumé

La substitution osseuse exige un matériau biocompatible dont la composition est très proche de celle de l'os afin d'éviter tout rejet une fois implanté. L'hydroxyapatite est un sérieux candidat pour cette opération, elle présente des propriétés identiques à celles de l'os. Ainsi ce travail consiste à élaborer puis caractériser cette biocéramique (hydroxyapatite). Ce biomatériau est ensuite modifié par ajout de gélatine afin d'optimiser certaines propriétés telles que : la cristallinité, la porosité,...et ceci selon l'application visée (substitut/comblement osseux). Les proportions de la gélatine dans la phase de HAP ont été introduites comme suit : (5%, 15%, 35% et 50% v/v), cette opération est suivie par une calcination du composite à différentes températures (300, 400, 500, 700 et 900 °C). En outre les propriétés intrinsèques de ce biomatériau dépendent aussi d'un certain nombre de paramètres tels que la méthode de synthèse, la température de calcination, la teneur en gélatine, la viscosité, le temps de vieillissement,...etc. La caractérisation physico-chimique est réalisée essentiellement par la combinaison de 3 techniques d'analyses (DRX-ATR-ATG). La porosité des matériaux composites (HG50% 500°C et HG50% 900°C) ainsi que celle de HAP et de la gélatine est estimée entre 40 et 62% ce qui correspond à la porosité de l'os spongieux.

Mots clés : (4 à 5 mots clés) : biomatériau, hydroxyapatite, composite, gélatine, porosité.

Abstract

Bone substitution requires a biocompatible material whose composition is very close to that of the bone to prevent rejection once implanted. Hydroxyapatite is a serious candidate for this operation, it has properties identical to those of bone. Thus this work consists in elaborating then characterizing this bioceramic (hydroxyapatite). This biomaterial is then modified by adding gelatin to optimize certain properties such as: crystallinity, porosity, ... and this according to the intended application (substitute / bone filling). The proportions of the gelatin in the PAH phase were introduced as follows: (5%, 15%, 35% and 50% v / v), this operation is followed by a calcination of the composite at different temperatures (300, 400, 500, 700 and 900 ° C). In addition the intrinsic properties of this biomaterials also depend on a number of parameters such as the method of synthesis, the calcination temperature, the gelatin content, the viscosity, the aging time ... etc. The physicochemical characterization is carried out essentially by the combination of 3 analysis techniques (DRX-ATR-ATG). The porosity of the composite materials (HG50% 500 ° C and HG50% 900 ° C) as well as that of PAH and gelatin is estimated between 40 and 62% which corresponds to the porosity of the cancellous bone.

Key words :(4 to 5 key words): biomaterial, hydroxyapatite, composite, gelatin, porosity.