

# THÈSE

Présentée par

**KSOURI Dalila**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES**

Filière : Génie des Procédés

Option : Génie Chimique

Thème

**Synthèse de bioverre 63S pour application biomédicale : caractérisation  
physico-chimique et microbiologique**

Soutenue le : 23/05/2022

Devant le Jury composé de :

<b>Nom et Prénom</b>	<b>Grade</b>		
<b>Mr KHELFAOUI Youcef</b>	Professeur	Univ. A. Mira-Bejaia	Président
<b>Mr KHIREDDINE Hafit</b>	Professeur	Univ. A. Mira-Bejaia	Rapporteur
<b>Mr HAMIDOUCHE Mohamed</b>	Professeur	Univ. de. Setif	Examineur
<b>Mme ZIANI Salima</b>	MCA	Univ.de. Bouira	Examinatrice
<b>Mme SIDANE Djahida</b>	MCB	Univ. A. Mira-Bejaia	Invitée
<b>Mme BOUREBABA Yasmina</b>	MCB	Univ. A. Mira-Bejaia	Invitée

**Année Universitaire : 2021 / 2022**

## REMERCIEMENTS

Ce manuscrit présente le travail de recherche enrichissant réalisé au sein du laboratoire de Génie de l'Environnement (LGE) de l'université de Bejaia. Durant ces années, j'étais amenée à collaborer avec de nombreuses personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse le professeur *Hafit KHIREDINE*, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils professionnels, qui ont contribué à orienter ma réflexion.

J'exprime mes plus sincères remerciements à :

Monsieur Youcef KHELFAOUI, Professeur à l'université A. Mira de Bejaia, qui m'a honoré de présider le jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Monsieur Mohamed HAMIDOUCHE, Professeur à l'université de Sétif, Madame ZIANI Salima, MCA à l'université de Bouira, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Madame Djahida SIDANE, Madame Yasmina BOUREBABA, MCB à l'université A. Mira de Bejaia, d'avoir accepté l'invitation et participé à l'enrichissement de l'audience.

Je tiens à présenter de chaleureux remerciements à Monsieur Ali AKSAS, Professeur à l'université A. Mira de Bejaia, pour sa précieuse participation à mon travail.

J'ai eu la chance de travailler, durant dix mois, au sein du département des Matériaux, Faculté d'Ingénierie, Université de Porto (FEUP), Portugal. Je tiens donc à adresser mon immense reconnaissance au Professeur José DOMINGOS SANTOS, de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que son entreprise « Bioskin » et je le remercie pour ces discussions aussi bien scientifiques qu'informelles que nous avons eu. Ce travail n'aura pu me laisser un excellent souvenir sans l'accueil, l'attention et la disponibilité des autres responsables d'autres universités à savoir :

Les techniciens des méthodes d'analyses de l'université d'Aveiro et l'université de Guimarães et le personnel de la faculté de Dentisterie de Porto.

Professeur Carlos FONSECA, Johana, Cristina, Candida, Ramiro, Dina, un merci tout particulier à Tiago VALENTE pour son aide au quotidien durant mon séjour.

Je remercie également les membres du Centre de Recherche en Nanomatériaux et Nanotechnologies (CINN) à l'Université d'Oveido – El Entrego, Espagne, en particulier le professeur Ramón TORRECILLAS, directeur du centre et le docteur Belén CABAL pour le travail qu'on a effectués ensemble sur les tests antimicrobiens et cellulaires, ainsi que le responsable de laboratoire des biomatériaux Raquel DIAZ VELASCO et la biologiste Celia DELGADO MORO.

Je tiens à présenter ma gratitude à tous les membres des laboratoires des Techniques de Caractérisation du département de Génie des Procédés et du département de Chimie de l'université A. Mira de Bejaia, je cite Monsieur BENIDIRI, Madame BENAMOR, Madame BRADAI, Monsieur MAMAS, Monsieur KITOUNE, Monsieur BRAHMI, ...

Je désire en outre remercier tous les membres du laboratoire LGE (étudiants, enseignants et chercheurs) pour leur sympathie et leur amitié. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et à partager de bons moments avec eux. Merci pour leur enthousiasme et leurs encouragements.

Mes remerciements vont aussi à mes parents, mes frères et sœurs et mon époux pour leur soutien au cours de ces dernières années et sans lesquels je n'en serai pas là aujourd'hui.

## ***TABLE DES MATIERES***

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale .....	1
Références Bibliographiques .....	5

### ***CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

I.1. Les Biomatériaux .....	6
I.1.1. Définition .....	6
I.1.2. Caractéristiques des biomatériaux pour comblement osseux .....	7
I.1.2.1. Biocompatibilité .....	7
I.1.2.2. Bioactivité .....	7
I.1.2.3. Ostéoconduction .....	7
I.1.2.4. Ostéoinduction .....	7
I.1.2.5. Biorésorbabilité .....	8
I.1.3. Classement des biomatériaux .....	8
I.1.3.1. Matériaux naturels .....	8
I.1.3.2. Métaux et alliages .....	9
I.1.3.3. Polymères .....	10
I.1.3.4. Céramiques .....	11
I.1.4. Les verres bioactifs .....	12
I.1.4.1. Définition .....	12
I.1.4.2. Structures atomiques des verres bioactifs .....	13
I.1.4.3. Principe de la bioactivité des bioverres .....	13
I.1.4.4. Applications cliniques des verres bioactifs .....	15
I.1.4.3. Méthode de synthèse des verres bioactifs.....	15
I.1.4.3.1. Méthode conventionnelle .....	15
I.1.4.3.2. Synthèse de verres par la méthode sol-gel .....	15
I.2. L'os et la substitution osseuse .....	21
I.2.1. Composition du tissu osseux .....	21
I.2.1.1. Matrice osseuse .....	21

I.2.1.2. Architecture osseuse .....	21
I.2.1.3. Cellules osseuses .....	23
I.2.2. Remodelage osseux .....	24
I.3. Infections bactériennes des implants orthopédiques .....	26
I.3.1. Germes responsables des infections .....	27
I.3.2. Adhérence de la bactérie : Formation de biofilm bactérien .....	28
I.3.2.1. Définition d'un biofilm .....	28
I.3.2.2. Mécanisme de formation de biofilm bactérien .....	28
I.3.3. Critère antibactérien des verres bioactifs .....	29
I.4. Les implants prothétiques .....	30
I.4.1. Substrats métalliques .....	31
I.4.1.1. Alliages de titane .....	31
I.4.1.2. Alliages de chrome-cobalte .....	32
I.4.1.3. Acier inoxydable .....	32
I.4.2. Revêtements des verres bioactifs sur implants et prothèses .....	34
I.4.3. Techniques d'élaboration de revêtements prothétiques .....	34
I.4.3.1. Vaporisation par torche à plasma .....	34
I.4.3.2. Dépôt par ablation laser (PLD) .....	35
I.4.3.3. Dépôt par la méthode dip-coating à partir d'une solution préparée par sol-gel .....	36
I.4.3.4. Dépôt chimique en phase vapeur .....	37
I.4.3.5. Dépôt par électrophorèse (EPD) .....	38
Conclusion et objectif de ce travail .....	42
Références bibliographiques .....	43

**CHAPITRE II. MATERIAUX, APPAREILS ET METHODES EXPERIMENTALES  
D'ANALYSES UTILISEES**

II.1. Elaboration des poudres de verre bioactif ternaire .....	53
II.1.1. Synthèse des poudres .....	53
II.2. Evaluation de la bioactivité des poudres de bioverre .....	55
II.2.1. Préparation du SBF (Simulated Body Fluid) .....	55
II.2.2. Mise en évidence de la bioactivité des poudres de bioverre .....	56
II.3. Étude du comportement des poudres en milieu cellulaire .....	57
II.3.1. Essais d'adhésion cellulaire et de prolifération des cellules MG63 .....	57

II.3.1.1. Culture des cellules MG63 .....	57
II.3.1.2. Caractérisation du profil de cytocompatibilité .....	58
II.3.1.3. Microscopie électronique à balayage .....	59
II.3.2. Évaluation de la cytotoxicité par contact indirect des poudres en utilisant le test de rouge neutre (RN) .....	59
II.3.2.1. Culture des cellules NIH 3T3 .....	59
II.3.2.2. Préparation de la suspension de poudre de bioverre .....	59
II.3.2.3. Viabilité cellulaire ; Test de rouge neutre (NR) .....	60
II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des poudres de verre bioactif .....	60
II.5. Elaboration des revêtements prothétiques à partir des poudres de verre bioactif par l'électrophorèse .....	62
II.5.1. Prétraitement de surface des substrats d'acier inoxydable 316L .....	62
II.5.2. Détermination du potentiel zêta des suspensions de poudres de bioverre .....	63
II.5.3. Procédés de revêtement électrophorétique .....	63
II.6. Caractérisation des poudres et revêtements de bioverre .....	64
II.6.1. Diffraction des rayons X (DRX) .....	64
II.6.1.1. Principe .....	64
II.6.1.2. Protocole expérimental .....	65
II.6.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	65
I.6.2.1. Principe.....	65
II.6.2.2. Protocole expérimental .....	66
II.6.3. Microscopie électronique à balayage - microanalyse X (MEB-EDS) .....	66
II.6.3.1. Principe .....	66
II.6.3.2. Protocole expérimental .....	66
II.6.4. Microscopie électronique à transmission (MET) .....	67
II.6.4.1. Principe .....	67
II.6.4.2. Protocole expérimental .....	67
II.6.5. Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS) .....	68
II.6.5.1. Principe .....	68
II.6.5.2. Protocole expérimental .....	68
II.6.6. Analyses thermiques par ATG/ATD .....	69
II.6.6.1. Principe .....	69
II.6.6.2. Protocole expérimental .....	69

II.6.7. Profilométrie .....	69
II.6.7.1. Principe .....	69
II.6.7.2. Protocole expérimental .....	70
II.6.8. Etude de la résistance à la corrosion .....	70
II.6.8.1. Principe .....	70
II.6.8.2. Protocole expérimental .....	71
Références bibliographiques .....	72

### **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

#### **PARTIE I. CARACTERISATION ET COMPARAISON DES POUDRES DE VERRE**

##### **BIOACTIF XEROGEL ET AEROGELS**

I.1. Synthèse des poudres de verre bioactif .....	76
I.2. Influence de traitement thermique des poudres .....	77
I.2.1. Analyse thermique ATG/ATD des poudres de bioverre .....	77
I.2.2. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX) .....	79
I.2.2.1. Analyse DRX des poudres de bioverre non traitées .....	79
I.2.2.2. Analyse DRX des poudres de bioverre traitées thermiquement .....	80
I.2.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (IRTF) .....	81
I.2.3.1. Analyse IRTF des poudres de bioverre non traitées .....	81
I.2.3.2. Analyse IRTF des poudres de bioverre traitées .....	82
I.2.4. Analyse des poudres de bioverre synthétisées par MEB couplée à l'EDS .....	83
I.2.4.1. Analyse élémentaire par EDS .....	84
I.2.4.2. Structure et morphologie des poudres de bioverre par MEB .....	85
I.2.5. Analyse par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) .....	87
I.2.6. Structure et morphologie des bioverres par MET .....	90
I.3. Influence du type de solvant sur la structure, la morphologie et la composition des bioverres aérogel .....	92
I.3.1. L'analyse thermique TG/DTG des poudres de bioverre .....	92
I.3.2. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX) .....	94
I.3.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (IRTF) .....	94
I.3.4. Structure et morphologie des poudres de bioverre par MEB .....	95
I.3.5. Analyse élémentaire par EDS .....	97
I.3.6. Structure et morphologie des poudres de bioverre par MET .....	98

Conclusion .....	99
Références bibliographiques .....	100

***PARTIE II. BIOACTIVITE ET CYTOCOMPATIBILITE DES POUDRES DE VERRE  
BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL***

II.1. Test de bioactivité in vitro : Comportement des poudres de bioverre dans un fluide biologique simulé (SBF) .....	105
II.1.1. Influence des transformations structurales sur la bioactivité.....	105
II.1.2. Analyse des pastilles par diffraction des rayons X .....	106
II.1.3. Analyse des surfaces et morphologie des pastilles après immersion .....	108
II.1.3.1. Composition élémentaire par analyse EDS .....	108
II.1.3.2. Morphologie des pastilles après immersion dans une solution SBF .....	111
II.1.4. Evolution du pH de la solution SBF après immersion des pastilles .....	116
II.2. Test de biocompatibilité in vitro : Viabilité et prolifération cellulaire des poudres de bioverre .....	118
II.2.1. Viabilité et prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles de verre bioactif : Test direct .....	119
II.2.1.1. Viabilité des cellules ostéoblastes MG63 par le test de résazurine .....	119
II.2.1.2. Observation au MEB de la prolifération des cellules MG63 sur les pastilles .....	120
II.2.2. Viabilité et prolifération des cellules fibroblastes NIH/3T3 des poudres de verre bioactif : Test indirect .....	124
II.2.2.1. Viabilité des cellules NIH/3T3 par le test neutral red des poudres de verre bioactif .....	125
Conclusion .....	127
Références bibliographiques .....	128

***PARTIE III. EFFET ANTIBACTERIEN DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF  
XEROGEL ET AEROGEL***

III.1. Evaluation de l'activité microbienne des poudres de verre bioactif .....	132
III.1.1. Micro-organismes utilisés .....	132
III.1.2. Mise en contact des poudres avec les micro-organismes .....	133
III.1.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	133
III.1.2.2. Mesure du pH de la suspension de culture (poudres et E. coli) .....	135

III.1.2.3 Mise en contact des poudres du xérogel et d'aérogel avec divers microorganismes .....	136
III.2. Effet antibactérien des poudres de verre bioactif .....	135
III.2.1. Effet antimicrobien des poudres de verre bioactif traitées thermiquement ...	137
III.2.2. Influence du solvant sur l'effet antimicrobien des poudres de verre aérogel	139
III.3. pH des poudres avec et sans contact avec les microorganismes .....	141
Conclusion .....	142
Références bibliographiques .....	143

***PARTIE IV. DEPÔT ELECTROPHORETIQUE DES POUDRES DE VERRE  
BIOACTIF SUR DES SUBSTRATS EN ACIER INOXYDABLE 316L***

IV.1. Caractéristiques du substrat utilisé, acier inoxydable 316L .....	147
IV.1.1. Préparation des substrats 316L SS .....	148
IV.1.2. Caractérisation du substrat : l'acier inoxydable 316L .....	148
IV.1.2.1. Analyse par DRX du substrat .....	148
IV.1.2.2. Analyse de la morphologie et composition élémentaire MEB-EDS des substrats .....	149
IV.1.2.3. Rugosité des substrats d'acier inoxydable 316L .....	150
IV.2. Revêtements prothétiques déposés sur des substrats en acier 316L par électrophorèse .....	151
IV.2.1. Potentiel Zeta des poudres de verre bioactif .....	151
IV.2.2. Processus de dépôts par électrophorèse des poudres de verre bioactif .....	152
IV.2.3. Caractérisation physico-chimique des revêtements réalisés .....	153
IV.2.3.1. Analyse DRX des revêtements en verre bioactif .....	154
IV.2.3.2. Analyse IRTF des revêtements en verre bioactif .....	154
IV.2.3.3. Analyse MEB-EDS des revêtements en verre bioactif.....	155
IV.3.4. Rugosité des revêtements en verre bioactif par profilomètre .....	157
IV.3.5. Résistance à la corrosion des revêtements en verre bioactif .....	158
Conclusion .....	161
Références bibliographiques .....	162
Conclusion générale et perspectives .....	165

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

**AGA** : Aérogel avec le solvant acétone

**AGE** : Aérogel avec le solvant éthanol

**AGM** : Aérogel avec le solvant méthanol

**ATD** : Analyse thermique différentielle

**ATG** : Analyse thermogravimétrique

**BG** : Verres bioactif (bioglass)

***C. albicans*** : *Candida albicans*

**CFU** : Nombre d'Unités de Colonies Formant (Colony Forming Units)

**CI** : Candidose invasive

**CINN** : Centre de Recherche sur les Nanomatériaux et les Nanotechnologies, El Entrego, Espagne.

***C krusei*** : *Candida krusei*

**CMI** : Concentration minimale d'inhibition

**CVD** : Dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition)

**DMEM** : Milieux de Eagle Modifiés de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

**DRX** : Diffraction des rayons X

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**EDX** : Spectroscopie des rayons X

**EPD** : Dépôt électrophorétique (Electrophoretic Deposition)

**ESB** : Société européenne des biomatériaux

**FBS** : Sérum Foetal Bovin (Fetal Bovine Serum)

**FT-IR** : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

**HAP** : Hydroxyapatite

**HAPc** : Hydroxyapatite carbonatée

**LB** : Luria Bertani

**MEB** : Microscopie Électronique à Balayage

**$\alpha$ -MEM** : Milieu essentiel  $\alpha$ -minimal (Minimum Essential Medium)

**MET** : Microscopie Électronique à Transmission

**MG63** : Cellules ostéoblaste humain

**NBCS** : Newborn Bovine Calf Serum

**NIH/3T3** : Cellules fibroblastes d'embryons murins

**NR** : Rouge Neutre (Neutral Red)

**OP** : Profilométrie optique

**PB** : Poudre de bioverre

**PBS** : Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)

**PLD** : Dépôt par ablation laser (Pulsed laser deposition)

**SBF** : Fluide corporel simulé (Simulated Body Fluid)

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

**SS** : Acier inoxydable (Stainless Steel)

**316L SS** : Acier Inoxydable 316L (Stainless Steel - Grade 316L)

**TCP** : Phosphate tricalcique

**TEOS** : Tétraéthyle orthosilicate

**TEP** : Triéthyle phosphate

**XPS** : X-ray photoelectron spectroscopy analysis

**XG** : Xérogel

**YEPD** : Dextrose d'extrait de levure

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure I.1</b> : Exemples d'implants métalliques utilisés en chirurgie .....	10
<b>Figure I.2</b> : Exemples de biomatériaux répertoriés en fonction de leur bioactivité .....	12
<b>Figure I.3</b> : Schématisation de la structure d'un verre .....	13
<b>Figure I.4</b> : Séquence de réactions à l'interface du bioverre lors de son immersion dans le milieu biologique conduisant à une accroche osseuse os-implant .....	14
<b>Figure I.5</b> : Schéma du processus de polymérisation sol-gel .....	17
<b>Figure I.6</b> : Principales étapes de la synthèse des verres bioactifs par fusion et la méthode sol-gel .....	20
<b>Figure I.7</b> : Schéma de la structure d'un os long et des tissus osseux qui le compose ...	22
<b>Figure I.8</b> : Structure microscopique de l'os compact .....	23
<b>Figure I.9</b> Structure microscopique de tissu osseux spongieux .....	23
<b>Figure I.10</b> : Cellules du tissu osseux .....	24
<b>Figure I.11</b> : Différentes étapes du remodelage osseux .....	26
<b>Figure I.12</b> : Formation d'un biofilm sur la surface d'un implant .....	29
<b>Figure I.13</b> : Exemples de différents dispositifs orthopédiques en acier inoxydable .....	33
<b>Figure I.14</b> : Schéma simplifié du principe d'une torche de projection plasma .....	35
<b>Figure I.15</b> : Schéma de l'installation expérimentale PLD .....	36
<b>Figure I.16</b> : Etapes du procédé de dip-coating .....	37
<b>Figure I.17</b> : Illustration des diverses étapes du procédé CVD .....	38
<b>Figure I.18</b> : Cellule de dépôt électrophorétique (EPD) montrant des particules chargées positivement en suspension migrant vers l'électrode négative .....	39

### CHAPITRE II. MATERIAUX, APPAREILS ET METHODES EXPERIMENTALES D'ANALYSES UTILISEES

<b>Figure II.1</b> : Schéma récapitulatif de la synthèse des poudres de bioverre par voie sol-gel .....	55
<b>Figure II.2</b> : Immersion des pastilles de poudres de verre bioactif dans la solution SBF	57
<b>Figure II.3.</b> Microorganismes pathogènes utilisés : a- <i>Escherichia coli</i> , b- <i>Staphylococcus aureus</i> , c- <i>Candida Albicans</i> et d- <i>Candida Krusei</i> .....	61
<b>Figure II.4</b> : Incubation des poudres de verre bioactif avec les bactéries <i>E. Coli</i> en milieu LB .....	62

<b>Figure II.5</b> : Montage expérimental utilisé pour l'élaboration de revêtements prothétiques par électrophorèse .....	64
<b>Figure II.6</b> : Cellule électrochimique utilisée pour l'évaluation de la corrosion des substrats recouverts de poudre de verre bioactif .....	71

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### PARTIE I. SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET COMPARAISON DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XÉROGEL ET AÉROGELS

<b>Figure III.1.1</b> : Courbes TG / DTG des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	78
<b>Figure III.1.2</b> : Diffractogrammes des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel sans calcination .....	79
<b>Figure III.1.3</b> : Diffractogrammes des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	80
<b>Figure III.1.4</b> : Spectres IRTF des poudres de bioverre xérogel et aérogel non traitées...	82
<b>Figure III.1.5</b> : Spectres IRTF des poudres de bioverre : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	82
<b>Figure III.1.6</b> : Spectre d'analyse quantitative EDS des poudres de verre bioactif : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f-AG 800 .....	85
<b>Figure III.1.7</b> : Micrographies MEB des poudres de bioverre 63S : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	86
<b>Figure III.1.8</b> : Spectres XPS obtenus pour les poudres de bioverre xérogel et aérogel traitées : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	87
<b>Figure III.1.9</b> : Spectres de déconvolution des pics Si2p, P2p et Ca2p des poudres de bioverre : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	89
<b>Figure III.1.10</b> : Micrographies MET des poudres de bioverre 63S : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800 .....	91
<b>Figure III.1.11</b> : Courbes TG / DTG des poudres de bioverre xérogel et aérogel : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600 .....	93
<b>Figure III.1.12</b> : Diffractogrammes des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d-AGM-600 .....	94
<b>Figure III.1.13</b> : Spectres IRTF des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d-AGM-600 .....	95

<b>Figure III.I.14</b> : Micrographies MEB des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600 .....	96
<b>Figure III.I.15</b> : Spectres d'analyse EDS des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600 .....	97
<b>Figure III.I.16</b> : Micrographies MET des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600 .....	98

## **PARTIE II. BIOACTIVITE ET CYTOCOMPATIBILITE DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL**

<b>Figure III.II.1</b> : Diffractogrammes XRD des pastilles de bioverre 63S avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours : a- XG 400, b-XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600,f- AG 800, g-AGA 600 et h-AGM 600 .....	107
<b>Figure III.II.2</b> : Analyse élémentaire EDS des pastilles de bioverre 63S avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours : a- XG 400, b-XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600, f- AG 800, g-AGA 600 et h-AGM 600 .....	110
<b>Figure III.II.3</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre XG 400 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	111
<b>Figure III.II.4</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre XG 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	112
<b>Figure III.II.5</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre XG 800 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	112
<b>Figure III.II.6</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre AG 400 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	113
<b>Figure III.II.7</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre AG 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	113
<b>Figure III.II.8</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre AG 800 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	114
<b>Figure III.II.9</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre AGA 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	114
<b>Figure III.II.10</b> : Micrographies MEB des pastilles de bioverre AGM 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	115
<b>Figure III.II.11</b> : Evolution du pH des solutions de SBF avant et après immersion des pastilles de verre bioactif .....	117

<b>Figure III.ii.12</b> : Viabilité des cellules MG63 ensemencées sur les pastilles de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 400, 600 et 800°C (figure à gauche) et l'influence de solvant traitées à 600°C (figure à droite) pour 1 et 7 jours .....	119
<b>Figure III.ii.13</b> : Micrographies MEB de la prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles de bioverre avant et après incubation pendant 1 et 7 jours : a- XG 400, b-XG 600, c- XG 800.....	121
<b>Figure III.ii.14</b> : Micrographies MEB de la prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles debioverre avant et après incubation pendant 1 et 7 jours : d- AG 400, e-AG 600, f- AG 800.....	122
<b>Figure III.ii.15</b> : Micrographies MEB de la prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles debioverre avant et après incubation pendant 1 et 7 jours : g- AGA 600 et h-AGM 600.....	123
<b>Figure III.ii.16</b> : Test de viabilité cellulaire NIH/3T3 des poudres de verre bioactif : XG 600, AG 600, XG 800 et AG 800 .....	125

### **PARTIE III. EFFET ANTIBACTERIEN DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL**

<b>Figure III.iii.1</b> : La concentration minimale inhibitrice (CMI) des poudres de verre bioactif XG 600 et AG 600 en contact avec la bactérie <i>E. coli</i> .....	134
<b>Figure III.iii.2</b> : Protocole d'élaboration de test de culture microbienne des poudres de verre bioactif .....	136
<b>Figure III.iii.3</b> : Croissance de la bactérie <i>E. Coli</i> sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800 .....	137
<b>Figure III.iii.4</b> : Croissance de la bactérie <i>S. Aureus</i> sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800 .....	137
<b>Figure III.iii.5</b> : Croissance du <i>candida Krusei</i> sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800 .....	138
<b>Figure III.iii.6</b> : Croissance de la <i>condida Albicans</i> sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800 .....	138
<b>Figure III.iii.7</b> : Croissance des microorganismes ( <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. krusei</i> et <i>C. albicans</i> ) sur les poudres de verre bioactif : XG 600, AG 600, AGA 600 et AGM 600....	140

**PARTIE IV. DEPÔT ELECTROPHORETIQUE DES POUDRES DE VERRE  
BIOACTIF SUR DES SUBSTRATS EN ACIER INOXYDABLE 316L**

<b>Figure III.IV.1</b> : Diffractogramme de la plaque d'acier inoxydable 316L .....	149
<b>Figure III.IV.2</b> : Morphologies MEB des plaques d'acier 316L SS polies : a- polie à 120 et b- polie à 1000 .....	149
<b>Figure III.IV.3</b> : Spectre d'analyse EDS de substrat d'acier inoxydable 316L SS .....	150
<b>Figure III.IV.4</b> : Potentiel zêta des suspensions de particules de verre bioactif xérogel et aérogel en fonction du pH de la solution d'ammoniac ajouté .....	152
<b>Figure III.IV.5</b> : Montage expérimental utilisé pour l'élaboration de revêtements prothétiques par électrophorèse et les revêtements obtenus après déposition .....	153
<b>Figure III.IV.6</b> : Diffractogrammes des revêtements en verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000 .....	154
<b>Figure III.IV.7</b> : Spectres IRTF des revêtements de verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS : a- XG 600 (SIC 120), b- AG 600 (SIC 120), c- XG 600 (SIC 1000) et d- AG 600 (SIC 1000) .....	155
<b>Figure III.IV.8</b> : Morphologies MEB des revêtements en verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000 .....	156
<b>Figure III.IV.9</b> : Spectres d'analyse EDS des revêtements de verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000 .....	157
<b>Figure III.IV.10</b> : Courbes de polarisation des revêtements de verre bioactif et des substrats de l'acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000 .....	159

## **LISTE DES TABLEAUX**

### **CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>Tableau I.1 :</b> Les microorganismes utilisés dans les expériences .....	27
<b>Tableau I.2 :</b> Composition chimique de l'acier 316L (Stainless steel SS) .....	32
<b>Tableau I.3 :</b> Propriétés physiques et mécaniques des implants métalliques couramment utilisés par rapport au tissu osseux .....	33

### **CHAPITRE II. MATERIAUX, APPAREILS ET METHODES EXPERIMENTALES D'ANALYSES UTILISEES**

<b>Tableau II.1 :</b> Concentrations ioniques du fluide corporel simulé SBF et du plasma sanguin humain .....	55
<b>Tableau II.2.</b> Ordre d'addition et quantités de réactifs pour la préparation de la solution SBF .....	56

### **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **PARTIE I. SYNTHÈSE, CARACTÉRISATION ET COMPARAISON DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGELS**

<b>Tableau III.i.1 :</b> Résultats des études EDS effectués sur les poudres de bioverre .....	84
<b>Tableau III.i.2 :</b> Composition élémentaire des poudres de bioverre par l'analyse EDS	97

#### **PARTIE II. BIOACTIVITÉ ET CYTOTOXICITÉ DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL**

<b>Tableau III.ii.1.</b> Analyse élémentaire EDX des poudres de verre bioactif avant et après immersion dans la solution SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours .....	108
<b>Tableau III.ii.2 :</b> Evolution du pH de la solution SBF après immersion des pastilles poudres de verre bioactif .....	117

#### **PARTIE III. EFFET ANTIBACTÉRIEN DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL**

<b>Tableau III.iii.1 :</b> Valeurs du pH des suspensions de poudre de verre XG 600 et AG 600 en contact avec <i>E. coli</i> après 72 h .....	135
<b>Tableau III.iii.2 :</b> pH des poudres de verre bioactif avec et sans présence de bactéries et de levures après 72 h .....	141

## **PARTIE IV. DEPÔT ELECTROPHORETIQUE DES POUDRES DE VERRE**

### **BIOACTIF SUR DES SUBSTRATS EN ACIER INOXYDABLE 316L**

<b>Tableau III.iv.1.</b> Composition chimique du substrat 316L SS .....	150
<b>Tableau III.iv.2.</b> Rugosité des substrats 316L SS polis à 120 et 1000 .....	151
<b>Tableau III.iv.3.</b> Rugosité et épaisseur des revêtements en poudres de verre bioactif...	158
<b>Tableau III.iv.4 :</b> Paramètres de corrosion extraient des courbes de polarisation .....	160

## ***INTRODUCTION GENERALE***

## ***INTRODUCTION GENERALE***

Depuis plus de 40 ans, en plus de la guérison des patients, la médecine s'intéresse également à l'amélioration de la qualité de vie et du confort de ces derniers. L'augmentation de l'espérance de vie et la recherche du confort font augmenter considérablement l'utilisation des biomatériaux. L'homme continue sa quête de recherche pour remplacer les parties déficientes de ses organes par des matériaux de diverses sources.

Le progrès de la médecine durant les années soixante a imposé de réelles exigences sur le choix des substituts utilisés. Le développement des matériaux, la compréhension de leurs propriétés ainsi que leur adaptabilité sont devenus indispensables. C'est dans ce sens que le marché des biomatériaux croît et donc les bioverres apparaissent comme très prometteurs y compris en matière de régénération osseuse.

Les bioverres sont introduit pour la première fois, en 1969 par Hench [1]. Cette famille de substituts est particulièrement adaptée au comblement des défauts osseux, aux revêtements prothétiques en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, esthétique et dentaire. Ils sont également appliqués pour compenser un organe ou un tissu déficient en pathologie, traumatisme ou vieillissement des tissus [2, 3].

En effet, lorsque les verres bioactifs sont en contact avec des fluides physiologiques ou des tissus, ils engendrent une série de réactions physico-chimiques conduisant à la formation d'une couche minérale de composition proche de celle de la phase minérale de l'os. Elle permet ainsi au matériau d'être utilisé comme implant osseux dans un organisme humain [4].

La méthode d'élaboration des verres bioactifs influence fortement sur la bioactivité et la biocompatibilité. La technique sol-gel est la plus utilisée pour la synthèse de verres bioactifs [5]. Le processus sol-gel implique l'hydrolyse, la polymérisation, la gélification et le séchage. Les gels sont généralement classés en aérogels et xérogels. Lorsque le solvant du gel est évaporé à température ambiante, les gels solides obtenus sont appelés xérogels. Alors que, lorsque le solvant du gel est extrait à l'état supercritique, ces matériaux sont appelés aérogels. Ils sont généralement monolithiques et ont une densité et un rétrécissement plus faibles que les xérogels. L'élimination du solvant au-dessus de son point critique se produit sans pression capillaire car il n'y a pas d'interfaces liquide-vapeur. Ainsi, dans le processus d'aérogel, il y a une force motrice considérablement réduite pour le rétrécissement [6, 7]. Les conditions de séchage du gel et la température de frittage dans le procédé sol-gel sont également un facteur important affectant la structure, la morphologie, la bioactivité et la biocompatibilité des verres bioactifs. La bioactivité et la biocompatibilité dépendent des caractéristiques physico-

chimiques des matériaux et en particulier de la composition chimique, de la cristallinité, de la taille des particules, de la microstructure et de la rugosité de surface [8]

La fabrication des verres bioactifs à l'échelle nanométrique développée par la méthode sol-gel ont attiré de plus en plus l'attention des chercheurs. Les verres bioactifs à l'échelle nanométrique ont une surface plus grande et une solubilité plus élevée que les verres bioactifs conventionnels (taille micrométrique), ainsi que leur réactivité et leur capacité à induire des caractéristiques de surface nano-topographiques dans les matériaux composites [9].

Le premier objectif de ce travail est d'élaborer des verres bioactifs ternaires de composition molaire 63 % SiO<sub>2</sub>, 28 % CaO et 9 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, connus sous le nom de verre bioactif 63S, par voie sol-gel conduisant à des verres bioactifs xérogel ou aérogel, en fonction du mode de séchage des gels. Dans la littérature, il existe de nombreux travaux sur le 63S obtenu par séchage à pression atmosphérique [6], mais aucun par séchage supercritique, du moins à ma connaissance. Cette partie compare l'évaluation de la structure et la morphologie des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel. L'influence de traitement thermiquement à différentes températures est également évaluée.

Les produits de dissolution de ces verres bioactifs (silicium et calcium) conduisent à l'expression rapide de gènes qui régulent à la fois l'ostéogenèse et la production de facteurs de croissance et stimulent la prolifération cellulaire. Le schéma de formation osseuse à l'interface du verre bioactif ressemble à une ossification intramembranaire, tandis que l'ossification enchondrale est absente. Cette découverte conduit à la conclusion que le verre bioactif n'induit pas une formation osseuse massive, mais provoque plutôt la propagation des ostéoblastes et des ostéocytes le long de la surface du verre, et que le matériau est principalement ostéoconducteur. On pense que les facteurs importants pour l'ostéoinduction sont la composition chimique, la morphologie de surface et les propriétés de dissolution spécifiques du bioverre. D'un point de vue clinique, le biomatériau idéal agissant comme substitut osseux devrait posséder des capacités ostéoconductrices et ostéoinductrices, et il devrait avoir des propriétés mécaniques importantes [10-12].

Cependant, tous les implants présentent un risque de problèmes post-opératoires provenant de l'adhésion microbienne à l'implant qui peut ultérieurement provoquer des infections et des maladies, parfois difficiles à guérir par les antibiotiques. La demande des nanotechnologies est devenue de plus en plus importante pour prévenir les conséquences catastrophiques de la résistance aux antimicrobiens [13, 14]. Le verre bioactif de taille nanométrique a une activité antimicrobienne contre une grande variété de micro-organismes qui peut s'expliquer par l'augmentation de la pression osmotique et du pH due à la diffusion des ions de verre bioactif

dans le milieu environnant. La capacité inhibitrice du verre bioactif est testée contre un large éventail de bactéries aérobies et anaérobies, à la fois Gram positif comme *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et les streptocoques et Gram négatif comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*. Les effets antibactériens des verres dépendent du type de micro-organisme, de la composition et de la concentration du verre bioactif. Au fur et à mesure que la concentration de l'échantillon augmente, une augmentation significative de l'inhibition de la croissance des micro-organismes est observée [15, 16].

Le deuxième objectif de ce travail est d'évaluer les caractères bioactif, biocompatible et l'effet antimicrobiens des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel synthétisées et traitées à différentes température. Les tests de bioactivité et de biocompatibilité sont réalisés en utilisant une solution SBF, les cellules ostéoblaste humain MG63 et les cellules fibroblastes NIH/3T3. Par ailleurs, les effets antimicrobiens sont obtenus sur deux bactéries très courantes : *Escherichia coli* à Gram négatif et *Staphylococcus aureus* à Gram positif et deux champignons : *Candida albicans* et *Candida krusei*.

La plupart des implants orthopédiques sont métalliques en raison de leurs bonnes propriétés mécaniques. Toutefois, les matériaux métalliques ne sont que bioinertes ou au mieux biotolérés et différents types de traitements de surface sont nécessaires afin d'améliorer leur activité biologique. Un dépôt de biocéramique sur des alliages métalliques peut améliorer le phénomène de biointégration grâce à la reconstruction du tissu osseux. Parmi les techniques de dépôts de matériaux biocompatibles, la technique de dépôt électrophorétique (EPD) est parmi les plus récentes. Elle est établie pour réaliser des revêtements de matériaux biocéramiques à partir de solutions aqueuse et non aqueuse. C'est un procédé rentable et efficace pour obtenir des dépôts d'une épaisseur homogène [17].

Le troisième objectif de ce travail consiste à élaborer des revêtements prothétiques des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel synthétisées via la méthode d'électrophorèse sur des substrats en acier inoxydable 316L en utilisant la méthode d'électrophorèse afin de remédier au problème de descellement.

Ce manuscrit est divisé en trois principaux chapitres :

Le premier chapitre est consacré aux généralités sur les biomatériaux et sur la problématique étudiée. Au cours de ce chapitre, nous définissons plusieurs notions liées aux biomatériaux. Nous nous intéressons ensuite aux verres bioactifs qui seront l'objet de cette étude.

Le deuxième chapitre détaille les méthodes et les techniques expérimentales mises en œuvre au cours de notre étude.

Le troisième chapitre porte l'ensemble des résultats obtenus et leurs discussions, il est également divisé en quatre parties :

La première partie résume la méthode suivie pour la synthèse des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel 63S via la méthode sol-gel et leurs caractérisation physico-chimique et microstructurale.

La deuxième partie a pour objectif d'évaluer le comportement des poudres de verre bioactif élaborées en milieux acellulaire et cellulaire. Le comportement de ces poudres est étudié grâce à des essais d'immersion dans une solution simulant les fluides biologiques et à travers des travaux de culture cellulaire *in vitro* faisant appel à des cellules ostéoblastes MG63 et fibroblastes NIH/3T3.

La troisième partie porte sur l'étude microbiologique *in vitro*, réalisée pour évaluer les propriétés antimicrobiennes des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel élaborées vis-à-vis de deux bactéries pathogènes, *Escherichia coli* à Gram négatif et *Staphylococcus aureus* à Gram positif et deux champignons, *Candida albicans* et *Candida krusei*.

La quatrième et dernière partie porte sur l'étude des revêtements des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel sur des substrats en acier inoxydable 316L par la technique d'électrophorèse. Enfin, une conclusion générale synthétise l'ensemble des résultats et souligne quelques perspectives pertinentes qui compléteront ce travail.

## Références bibliographiques

- [1]. L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T. K. Greenlee. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials, *J. Biomed. Mater. Res.* 1971; 2: 117-141.
- [2]. K. Ravindranadh, Bioactive Glasses for Technological and Clinical Applications, *Int. J. Chem. Sci.* 2016; 14: 1339-1348.
- [3]. M.D. Khalid, Z. Khurshid, M.S. Zafar, I. Farooq, R.S. Khan, A. Najmi, Bioactive Glasses and their Applications in Dentistry, *J. Pak. Dent. Assoc.* 2017; 26: 32-38.
- [4]. D. Bellucci, V. Cannillo, A. Sola. Calcium and potassium addition to facilitate the sintering of bioactive glasses. *Mater. Lett.* 2011; 65: 1825-1827.
- [5]. H.C. Li, D.G. Wang, J.H. Hu, C.Z. Che. Effect of various additives on microstructure, mechanical properties, and *in vitro* bioactivity of sodium oxide-calcium oxidesilica-phosphorus pentoxide glass-ceramics. *J. Colloid Interface Sci.* 2013; 405: 296-304.
- [6]. M. Catauro, F. Bollino, R.A. Renella, F. Papale. Sol gel synthesis of glasses: influence of the heat treatment on their bioactivity and biocompatibility. *Ceram. Int.* 2015; 41: 12578-12588.
- [7]. W. Wang, K.W.K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioact. Mater.* 2017; 2: 1-24.
- [8]. D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, Y.F. Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials.* 2001; 22: 87-96.
- [9]. M. Erol-Taygun, K. Zheng, A.R. Boccaccini. Nanoscale Bioactive Glasses in Medical Applications. *Int. J. Appl. Glass Sci.* 2013; 4: 136-148.
- [10]. E. Martin, S. Romero, A. Crawford, P.V. Hatton, R.L. Goodchild, I.M. Reaney, C.A. Miller, The osteogenic response of mesenchymal stromal cells to strontium-substituted bioactive glasses, *J Tissue Eng Regen Med.* 2015; 9: 619-631.
- [11]. A.M.C. Barradas, H. Yuan, C.A. van Blitterswijk, P. Habibovic, Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms, *Eur Cells Mater.* 2011; 21: 407-429.
- [12]. C. Gao, S. Peng, P. Feng, C. Shuai, Bone biomaterials and interactions with stem cells, *Bone Res.* 2017; 5: 17059.
- [13]. M. Ottomeyer, A. Mohammadkah, D. Day, D. Westenberg, Broad Spectrum Antibacterial Characteristics of Four Novel Borate-Based Bioactive Glasses, *Adv Microbiol.* 2016; 6: 776-787.
- [14]. H.A. Hemeg, Nanomaterials for alternative antibacterial therapy, *Int. J. Nanomedicine.* 2017; 12: 8211-8225.
- [15]. M.T. Cunha, M.A. Murça, S. Nigro, G.B. Klautau, M.J.C. Salles, In vitro antibacterial activity of bioactive glass S53P4 on multiresistant pathogens causing osteomyelitis and prosthetic joint infection, *BMC Infect. Dis.* 2018; 18: 157.
- [16]. D. Zhang, O. Lepparanta, E. Munukka, H. Ylanen, M.K. Viljanen, E. Eerola, M. Hupa, L. Hupa. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2010; 93: 475-483.
- [17]. D. Zhitomirsky, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Zhitomirsky. Electrophoretic deposition of bioactive glass/polymer composite coating with and without HA nanoparticle inclusions for biomedical applications. *J. Mater. Process. Technol.* 2009; 209: 1853-1860.

## ***CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

## **CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

Ce chapitre a pour objectif de situer notre travail dans un contexte plus général. La première partie concerne les biomatériaux et plus particulièrement les verres bioactifs, ensuite, nous présenterons les différentes méthodes utilisées pour l'élaboration des poudres de verre bioactif en se focalisant sur la méthode sol gel puis nous présenterons quelques généralités sur les cellules ostéoblastes et fibroblastes ainsi que les bactéries et levures qui infectent le corps humain. Enfin, nous passerons à la présentation des revêtements prothétiques de verre bioactif sur des implants métalliques et nous terminerons par la présentation des différents procédés et méthodes de dépôts en s'étalant plus sur la méthode d'électrophorèse qui a retenu notre attention.

### **I.1. Les biomatériaux**

#### **I.1.1. Définition**

L'une des premières définitions formelles du mot biomatériaux était «une substance inerte du point de vue systémique et pharmacologique conçue pour être implantée dans des systèmes vivants ou y être incorporée» et a été inventée par le conseil consultatif des biomatériaux de l'Université Clemson en 1976. Cette définition n'a toutefois pas tenu compte des agents bioactifs ou entités biologiques (cellules, fragments de cellules, protéines, acides nucléiques, hormones, facteurs de croissance ou médicaments) véhiculés par des biomatériaux ou des systèmes biodégradables [1, 2]. La Société européenne des biomatériaux (ESB) a tenu deux conférences de consensus en 1986 puis en 1991 et a retenu la définition suivante : *les biomatériaux sont des matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destinés à interagir avec les systèmes biologiques pour évaluer, traiter, modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps* [1-5].

Les biomatériaux ont été développés pour préserver l'intégrité et le confort de vie des personnes souffrant de déficiences fonctionnelles graves ou victimes d'accidents. L'objectif de leur développement est de permettre la fabrication de dispositifs d'assistance corporelle capables de suppléer les fonctions des organes endommagés. Ces matériaux trouvent ainsi des applications aussi bien en chirurgie cardiaque (valves cardiaques, stents), en ophtalmologie (lentilles de contact) qu'en chirurgie orthopédique, maxillo-faciale ou dentaire (prothèses, comblement osseux, substitution) [4, 6-9].

## **I.1.2. Caractéristiques des biomatériaux pour comblement osseux**

Le traitement des complications squelettales (fractures, perte osseuse), liées aux pathologies, requiert l'emploi de substituts afin de réparer, consolider et combler les défauts engendrés, restaurant ainsi la fonction de l'os. Cependant afin de mimer la structure et la fonctionnalité d'un os naturel, ces substituts doivent présenter un certain nombre de caractéristiques dont certaines sont indispensables [1, 10]. Le substitut osseux idéal doit répondre à plusieurs critères dont :

### **I.1.2.1. Biocompatibilité**

La biocompatibilité se réfère à la capacité d'un matériau à fonctionner avec une réponse du tissu hôte approprié dans une situation spécifique. Cette définition traduit un impératif d'interaction positive ou du moins neutre entre l'implant et le tissu hôte. En effet, un biomatériau, ou les produits qui en sont issus ne doivent pas affecter l'intégrité des tissus ou le fonctionnement de l'organe. Par ailleurs, les réactions inflammatoires déclenchées par la toxicité fragilisent l'interface de l'implant, et empêchent son intégration [3, 5, 8, 11-14].

### **I.1.2.2. Bioactivité**

La bioactivité est définie comme la propriété de créer des liens chimiques étroits au niveau de l'interface implant / tissu receveur. Elle est liée à la modification de la surface du matériau avec la formation de l'hydroxyapatite carbonatée suite à la dissolution, précipitation et les réactions d'échanges avec l'environnement physiologique. Le lien formé entre le matériau et le tissu vivant permet la fixation et la stabilisation de l'implant ou la prothèse. Ainsi, l'implant est dit bioactif lorsqu'il forme spontanément un lien avec l'environnement tissulaire sans interposition du tissu inflammatoire [1, 2, 5, 15-17].

### **I.1.2.3. Ostéoconduction**

L'ostéoconduction correspond à la propriété passive d'un biomatériau à recevoir la repousse osseuse et à servir de support à la formation d'os natif au sein du site implanté, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur au contact du matériau. Elle est en partie liée à la rugosité, à la surface spécifique et à la porosité [2, 18-20].

### **I.1.2.4. Ostéoinduction**

L'ostéoinduction d'un biomatériau implanté, permet de générer la formation osseuse en site extra-osseux, grâce à sa capacité d'induire une différenciation cellulaire et ainsi synthétiser une matrice osseuse minéralisable. Il induit la différenciation de cellules mésenchymateuses en cellules ostéoprogénitrices et éventuellement favorise l'ostéogenèse [2, 18-20].

### **I.1.2.5. Biorésorbabilité**

Les biomatériaux placés dans l'organisme sont altérés suite à des activités enzymatiques, cellulaires, bactériennes et virales. Leur disparition s'effectue au profit d'un remplacement à terme par les tissus osseux dont ils favorisent la croissance par ostéoconduction ou ostéoinduction. La biorésorption implique d'une part une biodégradation du matériau qui correspond à une perte des propriétés physiques du matériau par phagocytose par les macrophages et résorption par les cellules ostéoclastiques, et d'autre part une biodissolution qui est, en fait, une perte des propriétés chimiques du biomatériau. Les produits de dégradation du matériau sont éliminés par voie rénale ou métabolisés. Ces réactions dépendent des critères physico-chimiques des implants : porosité, état de surface, cristallinité et composition [21-23].

### **I.1.3. Classement des biomatériaux**

Historiquement, les premiers biomatériaux sont apparus au 16<sup>ème</sup> siècle. Il s'agissait de cuir bouilli, de bois de métaux ou encore d'or ou de platine. Ensuite, au 19<sup>ème</sup> siècle, les premières greffes naturelles sont tentées afin d'éviter une éventuelle amputation des membres. L'arrivée du pétrole a permis le développement des polymères au début du 20<sup>èmes</sup> siècle. Puis avec le développement des techniques d'élaboration de matériaux, les alliages et les céramiques apparaissent au cours des 70 dernières années. Les biomatériaux peuvent être utilisés en tant que substituts osseux ou comme revêtements prothétiques. Ils se déclinent en quatre types : Les métaux et les alliages, les polymères, les céramiques, et les matériaux naturels (corail, nacre,...) [3, 24, 25].

#### **I.1.3.1. Matériaux naturels**

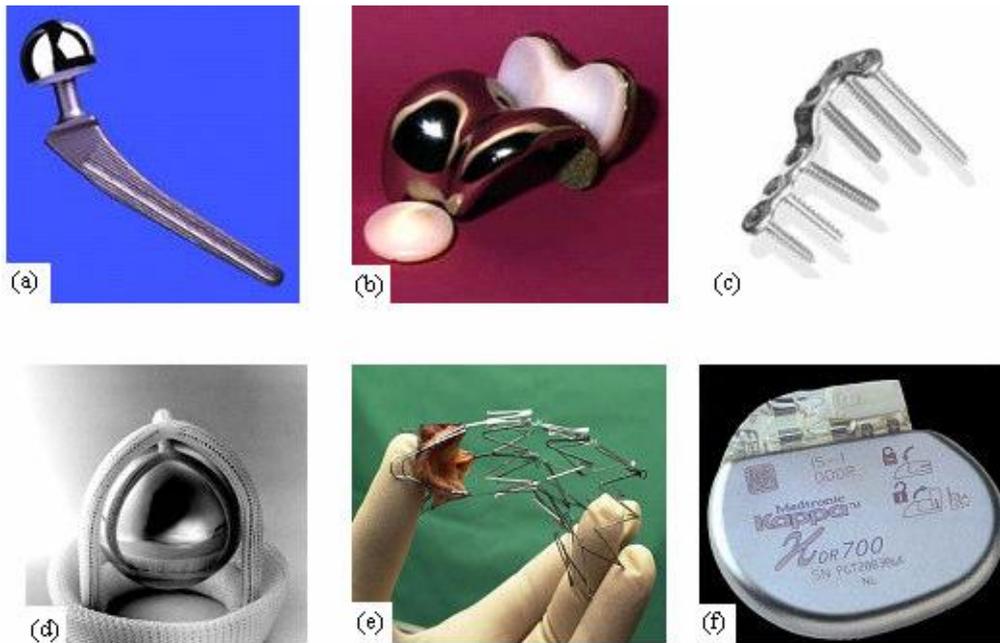
Les matériaux d'origine naturelle, sont constitués essentiellement de pièces de tissus osseux, appelés greffons. Les greffes sont de plusieurs types. Il s'agit d'une *autogreffe* lorsque le greffon provient du receveur lui-même. Elle correspond aux implants, qui potentiellement sont les plus ostéoconducteurs et ostéoinducteurs, notamment grâce à l'absence de réponse immunitaire. Les inconvénients proviennent surtout d'une quantité d'os limitée et des complications liées au site donneur. Lorsque le greffon provient d'un autre organisme, les transplantations sont désignées sous les termes d'*allogreffes* (donneur humain), ou *xénogreffes* (espèce animale). Dans ces cas, les traitements préalables sont obligatoires afin d'empêcher le risque de contamination. Les traitements peuvent être : la congélation, la stérilisation par rayonnement  $\gamma$ , la lyophilisation ou le chauffage, qui peuvent aussi agir sur les qualités biologiques et mécaniques de ces matériaux qui risquent d'une part le rejet de l'implant après une réaction immunitaire, et d'autre part dans la transmission potentielle d'agents infectieux (VIH,

hépatite pour un donneur humain) ou de bactéries. De plus, l'insuffisance d'échantillons disponibles et les grandes variabilités de comportement font que les matériaux naturels sont de moins en moins utilisés, au profit des matériaux synthétiques [5, 6, 8, 22].

### **I.1.3.2. Métaux et alliages**

L'utilisation des métaux et alliages a eu lieu depuis longtemps pour des applications biomédicales. Les matériaux métalliques sont surtout utilisés en chirurgie orthopédique notamment pour des prothèses, de hanche ou de genou, ou des outils de fixation tels que des plaques, des vis ou des fils ou en stomatologie (prothèses, implant dentaires). Des alliages métalliques ont également été utilisés pour l'élaboration de valves cardiaques, de prothèses endovasculaires (stents) ou de stimulateurs cardiaques (pacemakers) (Figure I.1). Il existe principalement trois grandes familles d'alliages employés comme implants ou prothèses : les aciers inoxydables, les alliages à base de cobalt et les alliages à base de titane. Les principales propriétés prises en considération lors de la sélection d'un matériau métallique sont la biocompatibilité, les propriétés mécaniques et la résistance à la corrosion [3, 5, 26, 27].

Malgré leur excellente tenue mécanique, les métaux présentent de nombreux inconvénients pour l'utilisation en clinique. Leur module d'élasticité étant plus élevé que celui de l'os, l'implant supportera la plus grande partie des efforts (phénomène de stress shielding). L'os étant moins sollicité, il va se résorber, pouvant entraîner un descellement de l'implant. Les métaux engendrent la présence d'artefacts avec l'imagerie par résonance magnétique, rendant l'intervention de révision compliquée. De plus, une seconde intervention peut être nécessaire pour retirer l'implant. Enfin les métaux sont des matériaux qui ne forment pas de liaisons avec l'os [3, 27].



**Figure 1.1 :** Exemples d'implants métalliques utilisés en chirurgie : (a) Prothèse totale de hanche, (b) prothèse totale de genou, (c) vis fémorales, (d) valve cardiaque, (e) prothèse endovasculaire, (f) stimulateur cardiaque [28].

### I.1.3.3. Polymères

Dans les applications médicales, une immense variété de polymères peut être trouvée, tels que le polyéthylène (PE), le polyuréthane (PU), le polyamide (PA), le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le polyméthylméthacrylate (PMMA), le polyéthylène téréphtalate (PET), le caoutchouc synthétique (SR), polystyrène (PS), polyétheréthercétone (PEEK), acide polylactique (PLA) et polyglycolide (PGA). Les polymères actuellement utilisés peuvent être divisés en polymères naturels (latex, cellulose, gommages, amidon, etc.), synthétiques et semi-synthétiques, et peuvent être subdivisés en biodégradables ou non biodégradables. Grâce à leur usinage aisé sous diverses formes les matériaux polymériques sont largement utilisés en implantologie : fibres, profilés, bandes, feuilles, fils, etc. Certains polymères présentent une forte ressemblance avec les composants polymériques naturels du corps humain, comme le collagène. Ainsi, dans certaines situations la liaison entre un polymère synthétique et un polymère tissulaire (naturel) devient possible. Grâce à leur biocompatibilité, les polymères adhésifs sont utilisés pour la suture ou la cicatrisation des blessures. Ils peuvent être également utilisés pour fixer les implants orthopédiques. Les polymères doivent être d'une part fonctionnels c'est-à-dire sont susceptibles d'avoir une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant ou bien avoir une capacité d'interaction avec les ostéoblastes favorisant la croissance osseuse et d'autre part biorésorbables, on trouve, 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 [3, 26, 27].

#### **I.1.3.4. Céramiques**

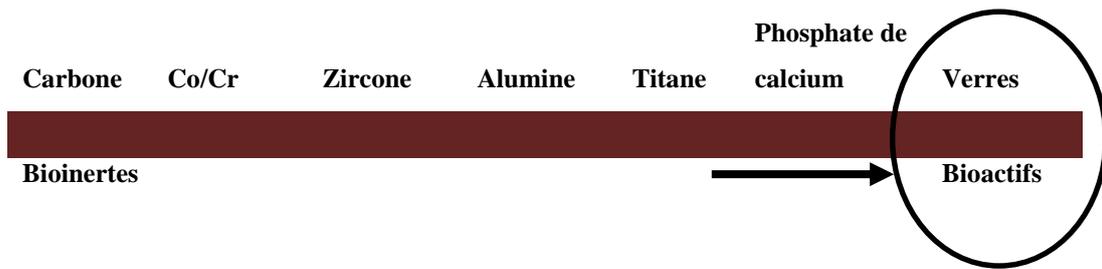
Une catégorie de matériaux très intéressante pour la médecine est celle des céramiques. Leur variété de structures, de compositions, de propriétés de surface et de porosité permettent une large gamme d'utilisations en dépit de leurs propriétés mécaniques souvent faibles. Les matériaux céramiques présentent des réactivités différentes vis-à-vis du corps humain. Ainsi on distingue des biocéramiques inertes, actives en surface et résorbables [3, 5, 9, 26, 27] :

Dans le cas des biocéramiques inertes la biocompatibilité est assurée par la stabilité chimique des matériaux qui sont peu solubles dans le milieu physiologique. Parmi les céramiques bioinertes les plus utilisées on trouve l'alumine et la zircone qui sont utilisées comme prothèses de hanche et implants dentaires, en raison de leur faible coefficient de frottement, une excellente résistance à la corrosion et une bonne compatibilité. Les mauvaises propriétés de fixation, sont le point faible de ces matériaux : en effet, l'implant est seulement maintenu par les irrégularités de surface, emprisonnées dans l'os après sa croissance (fixation morphologique) [5, 7, 27].

Les matériaux biorésorbables sont conçus pour se dégrader progressivement sur une période de temps donnée, afin d'être à terme, remplacés totalement par le tissu hôte. Ils sont utilisés dans les applications de libération contrôlée des médicaments ou dans les structures implantables biodégradables, comme par exemple dans les sutures. Deux problèmes principaux se posent : le maintien d'une interface stable et résistante durant le processus de transformation, et des vitesses de résorption adaptées au taux de réparation des tissus [7, 27].

Les biocéramiques actives possèdent une surface très réactive, permettant une liaison forte entre l'os et l'implant. Les céramiques bioactives plus couramment utilisées sont les céramiques de phosphate de calcium, l'hydroxyapatite (HAP) et notamment les bioverres. Le phosphate tricalcique (TCP) et les bioverres sont les matériaux biorésorbables les plus utilisés [2, 5, 27].

Le classement des biomatériaux peut se faire aussi en fonction de leur bioactivité. La figure I.2 montre l'apparition de quelques biomatériaux au cours du temps et notamment l'apparition des verres bioactifs en 1969.



**Figure I.2 :** Exemples de biomatériaux répertoriés en fonction de leur bioactivité [29].

Notre étude portera sur les céramiques bioactives et plus particulièrement sur les bioverres qui seront plus largement présentés dans les paragraphes suivants.

#### **I.1.4. Les verres bioactifs**

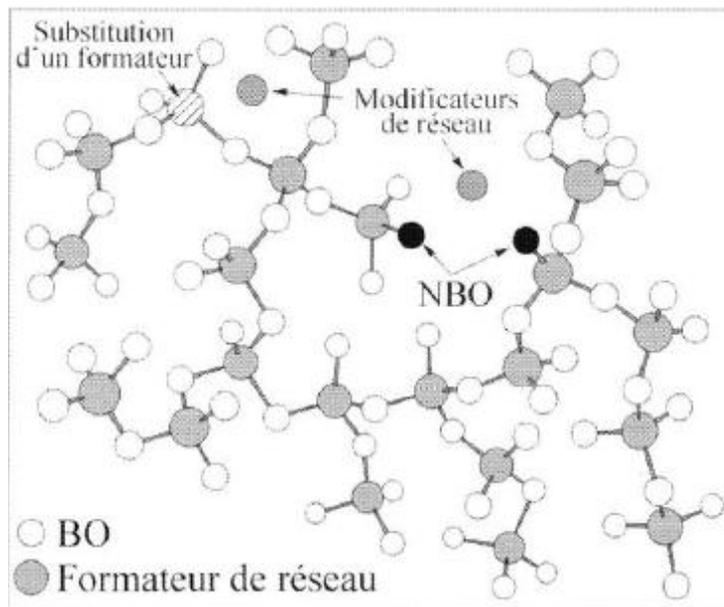
Les chirurgies dentaires et orthopédiques s'orientent depuis des années vers les matériaux d'origine synthétique, dont les plus performants sont les céramiques phosphocalciques et les verres bioactifs. Depuis leur première apparition en 1969, les verres bioactifs connaissent un essor considérable dans le domaine des biomatériaux. En effet, il existe un besoin de plus en plus grand en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale, cet essor s'explique également par les améliorations apportées au niveau de la conception, de l'élaboration du biomatériau par de nouvelles techniques. Les bioverres sont principalement utilisés comme revêtements prothétiques ou pour le comblement de pertes osseuses [2, 3, 30, 31].

##### **I.1.4.1. Définition**

Les verres bioactifs ou bioverres sont composés principalement d'oxydes de silicium ( $\text{SiO}_2$ ), de sodium ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), de calcium ( $\text{CaO}$ ) et de phosphore ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Le premier verre bioactif a été mis au point par L.L. Hench en 1969. Il s'agit d'un verre composé en % massique de 45% de  $\text{SiO}_2$ , 24,5% de  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24,5% de  $\text{CaO}$  et 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , appelé le 45S5 de L.L. Hench commercialisé sous le nom Bioglass®. Ce bioverre est classé sur toute la gamme des matériaux bioactifs dans la classe A, qui correspond à l'indice de bioactivité le plus élevé. Cette bioactivité est due à la capacité du bioverre lorsqu'il est immergé dans le milieu physiologique, de former de l'hydroxyapatite carbonatée (HAPc). Cette couche d'HAPc permet un accrochage chimique de l'implant à l'os en seulement quelques heures (environ 12 h). La bioactivité du bioverre 45S5 lui confère des propriétés d'ostéoconduction, d'ostéostimulation et de résorption. Les bioverres trouvent actuellement des débouchés dans les domaines orthopédiques, dentaires, crâniens et dans la chirurgie du rachis. La résistance à la compression des bioverres est d'environ 500 MPa ce qui leur permet de supporter de fortes contraintes mécaniques [1, 2, 9, 30-32].

### I.1.4.2. Structures atomiques des verres bioactifs

Les bioverres sont des matériaux amorphes, non cristallins et sans périodicité atomique présentant un phénomène de transition vitreuse. Ils sont constitués d'un réseau non organisé d'oxydes qui, selon leur rôle dans ce réseau, vont être répartis en deux catégories. La première est celle des formateurs de réseau ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{GeO}_2$ ,  $\text{V}_2\text{O}_5$ , ...) qui forment des polyèdres liés entre eux. La deuxième est celle des ajouts d'autres éléments dans la matrice, ces éléments sont appelés modificateurs de réseau ( $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ , ...) (Figure. 3). Les bioverres obtenus par fusion ayant une composition proche de  $\text{SiO}_2$  seront ainsi quasiment inertes. En revanche, par l'ajout de modificateurs,  $\text{CaO}$  et  $\text{Na}_2\text{O}$ , les réactions chimiques qui vont conduire à la liaison du verre avec l'os et à son action bénéfique sur la régénération osseuse deviennent possibles [1, 31, 33].

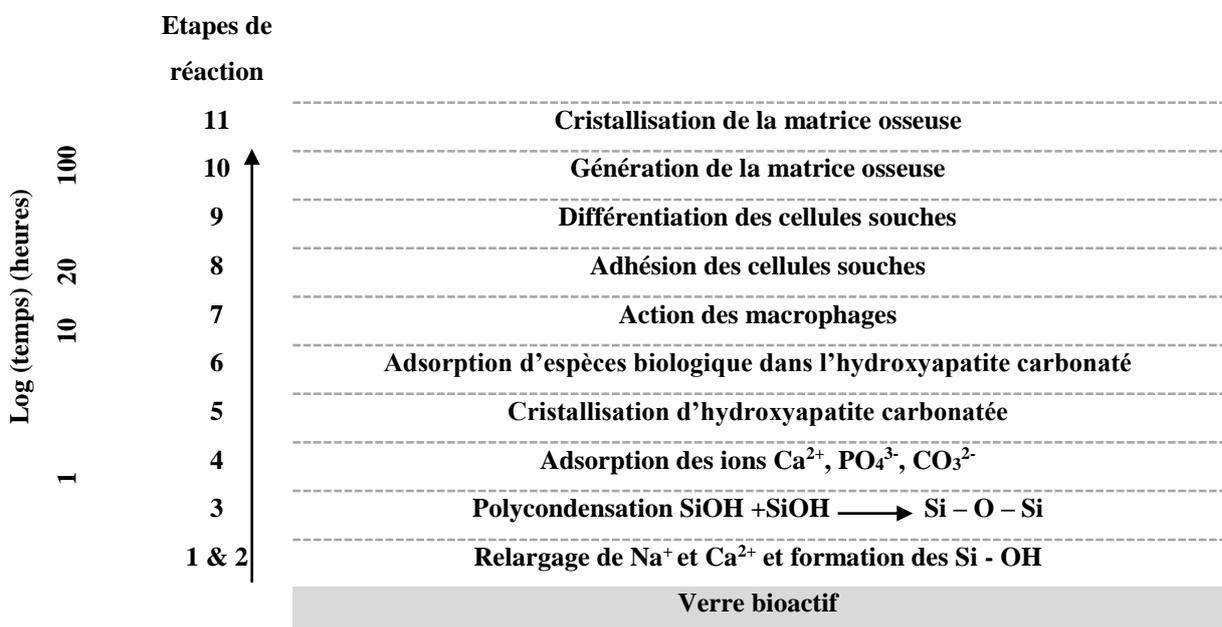


**Figure I.3 :** Schématisation de la structure d'un verre : Les tétraèdres  $[\text{SiO}_4]^{4-}$  reliés par des oxygènes pontants (Bridging Oxygen : BO) forment des chaînes parfois rompues (dépolymérisation) par des oxygènes non-pontants (Non-Bridging Oxygen : NBO). Les compensations de charge nécessaires suite à la présence des NBO ou à la substitution de Si par d'autres formateurs de réseaux sont réalisées par des ions modificateurs de réseau [33].

### I.1.4.3. Principe de la bioactivité des bioverres

Les verres bioactifs ont la capacité de se lier au tissu osseux et sont résorbables, ce sont donc des matériaux très intéressants pour la régénération osseuse. Leur capacité à se lier au tissu osseux peut être expliquée par le processus de bioactivité proposé par Hench. En effet, ce processus concerne à l'origine le Bioglass® 45S5, mais la plupart des études sur les verres bioactifs obtenus par voie sol-gel semblent corroborer ce mécanisme (figure I.4).

Ce mécanisme correspond à un échange des alcalins et alcalino-terreux contenus dans le verre avec  $H^+$  du milieu conduisant à la formation de groupements  $Si - OH$ . Ces groupements vont ensuite se condenser pour former des liaisons  $Si - O - Si$  et ainsi donné naissance à une couche riche en silice. Cette couche va alors permettre la suite du processus par l'adsorption des ions  $Ca^{2+}$  et  $PO_4^{3-}$  permettant la formation d'une couche phosphocalcique amorphe qui va incorporer des ions  $OH^-$  et  $CO_3^{2-}$  qui va croître et qui va progressivement cristalliser. Des espèces biologiques vont alors s'adsorber dans cette couche qui va servir de support à l'adhésion et à la différenciation des cellules osseuses. Ces cellules vont alors pouvoir former la matrice osseuse qui pourra ensuite minéraliser [2, 9, 31, 32, 34].



**Figure I.4 :** Séquence de réactions à l'interface du bioverre lors de son immersion dans le milieu biologique conduisant à une accroche osseuse os-implant [2, 9, 34].

Les cinq première étapes de ce mécanisme sont donc purement physico-chimiques et ne font pas intervenir de cellules. Cela permet d'expliquer une propriété très particulière des verres bioactifs qui est de former une couche d'apatite lors de l'immersion du matériau dans un milieu de culture acellulaire. Cette propriété a d'ailleurs longtemps été considérée comme une preuve de la bioactivité d'un matériau. En effet, lors de l'immersion dans un milieu de composition chimique minérale identique à celle du plasma sanguin, le SBF (Simulated Body Fluid : fluide biologique simulé), une corrélation a été observée entre la capacité d'un matériau à former une couche d'apatite dans ce milieu acellulaire et sa capacité à créer une liaison avec l'os lors d'essais *in vivo* [2, 32, 34].

#### **I.1.4.4. Applications cliniques des verres bioactifs**

Depuis les années 1980, les verres bioactifs ont été utilisés dans de nombreuses situations cliniques. La première application clinique des bioverres débuta en 1984 en tant que prothèse de l'oreille moyenne. Les bioverres ont connu un vif intérêt depuis l'introduction et la commercialisation de PerioGlas® en 1993, pour le traitement des pertes osseuses d'origine parodontale. D'autres compositions de bioverres ont été utilisées aussi en dentisterie. L'utilisation de verre bioactif a entraîné une réparation plus rapide et plus complète du défaut. Les granules de bioverre ont montré une bonne ostéoconduction, mais également une ostéostimulation. De façon intéressante, en plus de leurs capacités régénératrices, il s'est avéré qu'ils possèdent aussi des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires. Plus récemment, des bioverres (Bioglass®) ont trouvé des applications en tant que revêtement d'implants. En revanche, il existe encore des problèmes inhérents tels que la mauvaise cohésion entre l'implant et le revêtement. L'utilisation des verres bioactifs n'est pas limitée aux applications cliniques classiques et l'avenir est en faveur de l'ingénierie tissulaire. Les verres bioactifs semblent répondre aux exigences d'une matrice adéquate pour la formation tissulaire *in vitro* [35-41].

#### **I.1.4.3. Méthode de synthèse des verres bioactifs**

Deux procédés d'élaboration sont les plus utilisés pour la préparation des verres bioactifs :

##### **I.1.4.3.1. Méthode conventionnelle**

La technique de fabrication de base consiste à mélanger une poudre de modificateur de réseau ( $\text{Na}_2\text{O}$  ou  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,...) associé à un oxyde formateur de réseau ( $\text{SiO}_2$ ). Les oxydes principaux sont ensuite élaborés à haute température par fusion dans un creuset entre 1200-1500°C pendant une heure, l'ensemble se transforme en liquide. Le liquide devient homogène lorsque la température dite de fusion est maintenue suffisamment longtemps. Puis a lieu la phase dite de moulage, pendant laquelle la poudre est maintenue à une température fixe de 400°C pendant 4 heures. La viscosité du liquide augmente de façon importante au cours du refroidissement, jusqu'à une température critique dite de transition vitreuse, à partir de laquelle le matériau devient solide. Le matériau peut ensuite être broyé afin d'obtenir des granules [30, 42].

##### **I.1.4.3.2. Synthèse de verres par la méthode sol-gel**

Dès la première utilisation de la technologie sol-gel dans la conception de verres bioactifs, cette voie de synthèse a ouvert de nombreuses perspectives dans le domaine. Fondamentalement, le processus implique la synthèse d'un réseau inorganique en mélangeant les alcoxydes métalliques en solution, suivie de l'hydrolyse, de la gélification et de traitement thermique à basse température pour produire un verre. La capacité de modifier la structure de ce réseau est inhérente à ce

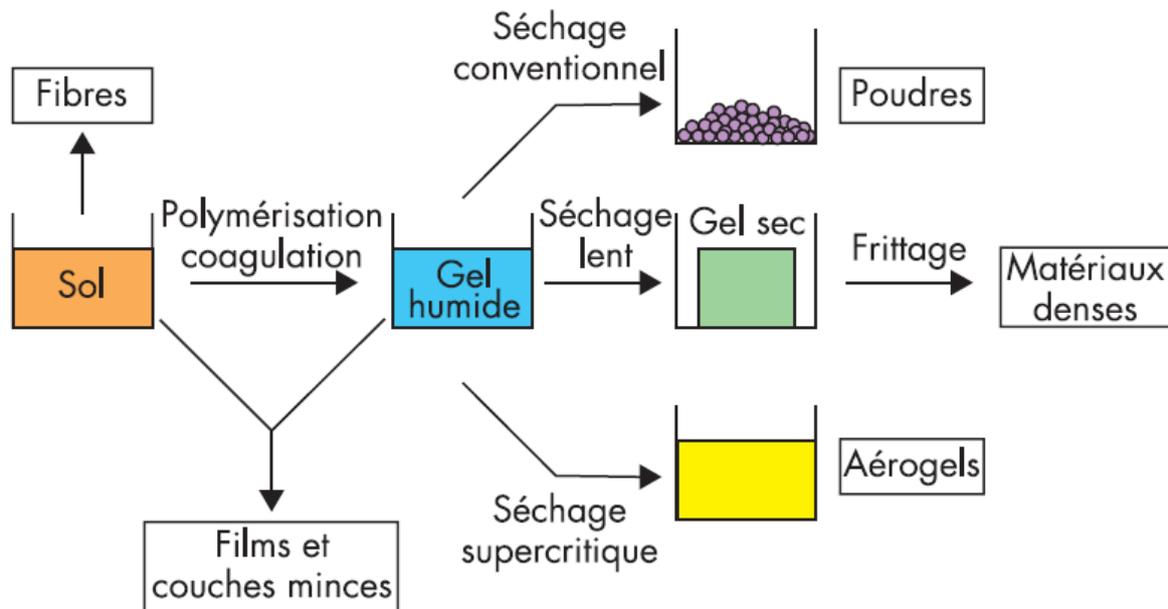
processus en contrôlant les réactions d'hydrolyse et de polycondensation. En effet, contrairement à la fusion, les températures utilisées sont basses. Il est par ailleurs possible de s'affranchir des modificateurs de réseau (sodium, calcium...) et ainsi atteindre de nouvelles compositions, une grande pureté et meilleure homogénéité du matériau. Cette technique permet la maîtrise et la mise en œuvre d'une palette très large de mises en forme et de morphologies : particules, fibres, mousses, couches, ou composites hybrides bioactifs. Aussi, le processus sol-gel offre des avantages potentiels pour faciliter la production de poudre, un plus large intervalle et un meilleur contrôle de la bioactivité en changeant la composition ou la microstructure par un traitement des paramètres. Ainsi, un changement de processus de vieillissement à basse température améliore le contrôle de la porosité, la surface spécifique et la cinétique de dissolution de réseau de gel-verres. Le processus sol-gel permet d'avoir des bioverres avec une grande surface spécifique et une structure poreuse et facilite la formation de couche riche en silice qui sont des éléments critiques essentiels pour la formation de la couche de HAPc [2,30, 32, 42-44].

### **1. Principe de base de la méthode**

L'utilisation de la méthode sol-gel dans la préparation des céramiques et des verres n'est pas récente. Le mot « sol », accordé à Jergensons et Straumanis, décrit la dispersion des colloïdes dans les liquides. Les colloïdes à leur tour sont décrits comme des particules solides avec un diamètre entre 10-1000Å, qui contient  $10^3$ - $10^9$  atomes. Quand la viscosité de la solution augmente suffisamment, à travers la perte partielle de leur phase liquide, il devient rigide. Ce matériau rigide est nommé «gel ». Les meilleurs matériaux de départ pour les préparations de sol-gel sont probablement la classe de matériaux connus sous le nom d'alcoxydes métalliques. Tous les métaux forment des alcoolates et répondent à la formule générale suivante :  $M(OR)_x$  Où M est le métal, R est un groupe alkyle et x est l'état de valence du métal. Tous les alcoolates métalliques sont rapidement hydrolysés en hydroxyde ou oxyde correspondant.

La méthode sol-gel a pour point de départ des espèces en solution qui vont subir une suite de réactions d'hydrolyse et de condensation aboutissant à la formation d'un réseau d'oxydes. Après la gélification, le gel contient deux phases : le réseau solide et le liquide (l'alcool + l'eau). Au cours du séchage classique (évaporation de liquide), des forces capillaires effondrent la structure du squelette de gel, donnant lieu à un verre dur appelé xérogel avec un retrait très important. En outre, le séchage induit la formation de fissures et de cassures au niveau du matériau formé. L'objectif du séchage hypercritique est d'éliminer les forces capillaires produites entre la surface (vapeur+ liquide) et la partie solide du gel. Cela permet l'expulsion

du solvant sans dégradation de la structure de la phase solide. Ce type de séchage conduit par conséquent à des matériaux très poreux appelés aérogels [2, 44-47]. Il existe plusieurs types de séchage permettant d'obtenir des types de matériaux différents. La figure 5 suivante résume les étapes de procédé sol gel :



*Figure I.5 : Schéma du processus de polymérisation sol-gel.*

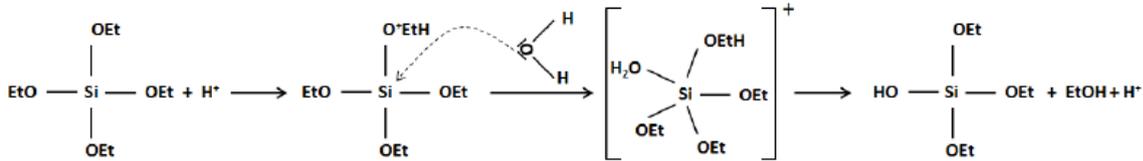
## 2. Réactions chimiques lors de la polymérisation

Le précurseur employé pour la réalisation de verres bioactifs faits à base de  $\text{SiO}_2$  utilisé dans ce travail est le tetraethoxysilane ou tétraéthyle orthosilicate [TEOS,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ]. Le silicium est moins électronégatif et donc moins sujet aux attaques nucléophiles, les vitesses d'hydrolyse et de condensation sont donc plus faibles. Lors de la synthèse par voie sol-gel à partir d'alcoxydes de silicium, des catalyseurs sont donc toujours employés [44-46, 48, 49]. On peut décrire les réactions de l'hydrolyse et de la polymérisation comme suit :

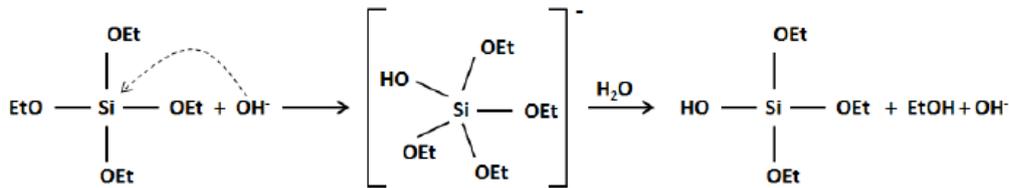
### 2.1. Réactions d'hydrolyse

Les alcoxyde de silicium ne sont pas miscibles à l'eau, pour réaliser l'hydrolyse un co-solvant de l'eau et de l'alcoxyde est donc généralement utilisé. Il s'agit souvent de l'alcool dont dérive l'alcoxyde. La première étape du processus de polymérisation du TEOS est une étape d'hydrolyse par substitution nucléophile qui dépend de la nature du catalyseur utilisé. Lors de la catalyse **acide** ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,...), la protonation des groupements alkoxydes chargés négativement est rapide, augmentant ainsi le caractère nucléofuge du groupe partant, ce qui induit une diminution de la densité électronique associée au silicium. Par conséquent, les attaques nucléophiles par les molécules d'eau sont favorisées par le caractère électrophile du

silicium (réaction I.1). Lors d'une catalyse **basique** (NaOH, NH<sub>3</sub>, KOH,...), l'ion hydroxyde remplace l'eau comme agent nucléophile et accélère la première étape réactionnelle en raison de sa plus grande réactivité (réaction I.2). A la fin de la réaction d'hydrolyse, de l'éthanol et une espèce hydroxylée instable sont obtenus. Cette espèce réactive est celle qui va donner lieu à des réactions de condensation [44, 45, 48, 49].



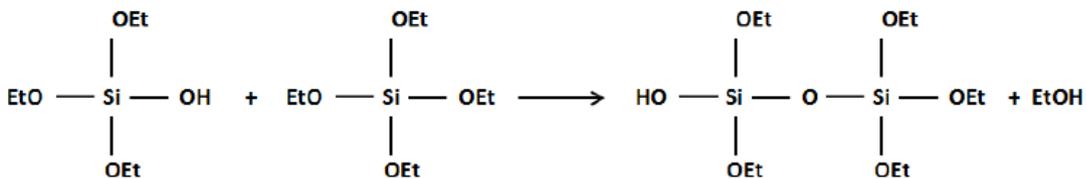
**Réaction I.1.** Mécanisme des réactions d'hydrolyse du TEOS en catalyseur acide



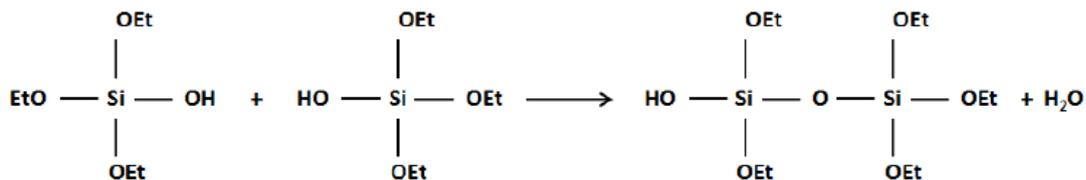
**Réaction I.2.** Mécanisme des réactions d'hydrolyse du TEOS en catalyseur basique

## 2.2. Réactions de condensation

La condensation correspond à l'étape de formation des ponts entre les différentes unités du réseau de verre. Cette réaction commence souvent avant la fin de l'hydrolyse. La réaction de condensation se fait selon deux mécanismes possibles, soit par réaction d'une espèce hydroxylée avec une molécule de TEOS, qui forme de l'éthanol en sous-produit (réaction d'alcoxolation) (réaction I.3), soit par réaction de deux espèces hydroxylées entre elles qui forme de l'eau en sous-produit (réaction d'oxolation) (réaction I.4) [44, 45, 48, 49].



**Réaction I.3.** Représentation de la réaction d'alcoxolation



**Réaction I.4.** Représentation de la réaction d'oxolation

### 3. Paramètres influençant les synthèses sol-gel

Plusieurs paramètres peuvent influencer la structure et la morphologie du matériau obtenu par la méthode sol-gel [44, 47- 50] :

#### ➤ Catalyse

- En milieu acide ( $0 < \text{pH} < 7$ ), l'hydrolyse est rapide par rapport à la condensation ce qui conduit à la formation d'une solution polymérique. La libération des monomères conduit à une formation rapide de petites particules qui s'agrègent pour former des amas polymériques et la viscosité du milieu devient importante et le liquide finit par se figer.

- En milieu neutre ou modérément basique, la condensation est plus rapide que l'hydrolyse, alors le polymère est alimenté progressivement en monomères. Ce mécanisme conduit à la formation de particules denses de taille allant jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres. Puisque ces particules sont chargées négativement, les répulsions électrostatiques empêchent une nouvelle agrégation entre les particules. Pour couper ces interactions coulombiennes, on ajoute des sels ioniques ou on bascule le pH (vers un pH acide).

- Pour un milieu très basique ( $\text{pH} > 11$ ), la dépolymérisation (rupture des ponts siloxanes) l'emporte et dans ce cas la silice est transformée en silicate soluble.

Pour les mêmes concentrations en catalyseur, la catalyse acide permet une hydrolyse plus rapide que la catalyse basique. Ainsi, l'hydrolyse en milieu basique donne un gel formé d'un ensemble de particules sphériques, alors que celui préparé en milieu acide a une structure fibreuse [44, 49, 50].

#### ➤ Quantité d'eau

La quantité de l'eau ajoutée : l'augmentation ou la diminution de la concentration de l'eau affecte l'avancement de la réaction d'hydrolyse suivant un sens ou l'autre. Le taux d'hydrolyse « h » peut être défini par :  $h = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{M}(\text{OR})_n]$ . Trois domaines principaux se distinguent [44, 49-51] :

$h < 1$  : La condensation est principalement gouvernée par l'alkoxolation. Les précurseurs de faible fonctionnalité ( $n=1$ ) ne permettent pas la formation d'un réseau polymérique infini, mais seulement de clusters moléculaires. Aucune gélification ne peut alors se produire.

$1 < h < n$  : Dans ce domaine, les mécanismes d'oxolation et d'alkoxolation sont en concurrence. Un réseau faiblement réticulé constitué de chaînes polymériques linéaires peut se former.

$h > n$  : L'excès d'eau permet la formation d'un réseau polymérique ramifié, d'un gel ou d'un précipité.

➤ **Nature des ligands**

Le comportement chimique du précurseur est très lié à la nature des ligands entourant l'atome central. Cette influence peut être soulignée à travers deux exemples [44, 47-49] :

- La cinétique d'hydrolyse décroît lorsque la taille du ligand augmente. En effet, cette augmentation de la taille entraîne une diminution de la charge partielle positive sur les centres métalliques, et la sensibilité des alkoxydes à l'hydrolyse diminue donc elle aussi.

- La fonctionnalité du précurseur peut être maîtrisée pour orienter la croissance du réseau. Ce dernier peut par exemple être linéaire lorsque le précurseur a une fonctionnalité de 2, empêchant ainsi l'interconnexion des chaînes inorganiques.

➤ **Température de la réaction**

L'augmentation de la température accélère les réactions d'hydrolyse et de condensation [44, 49].

La figure ci-dessous résume les différentes étapes des deux procédés d'élaboration des verres bioactifs :

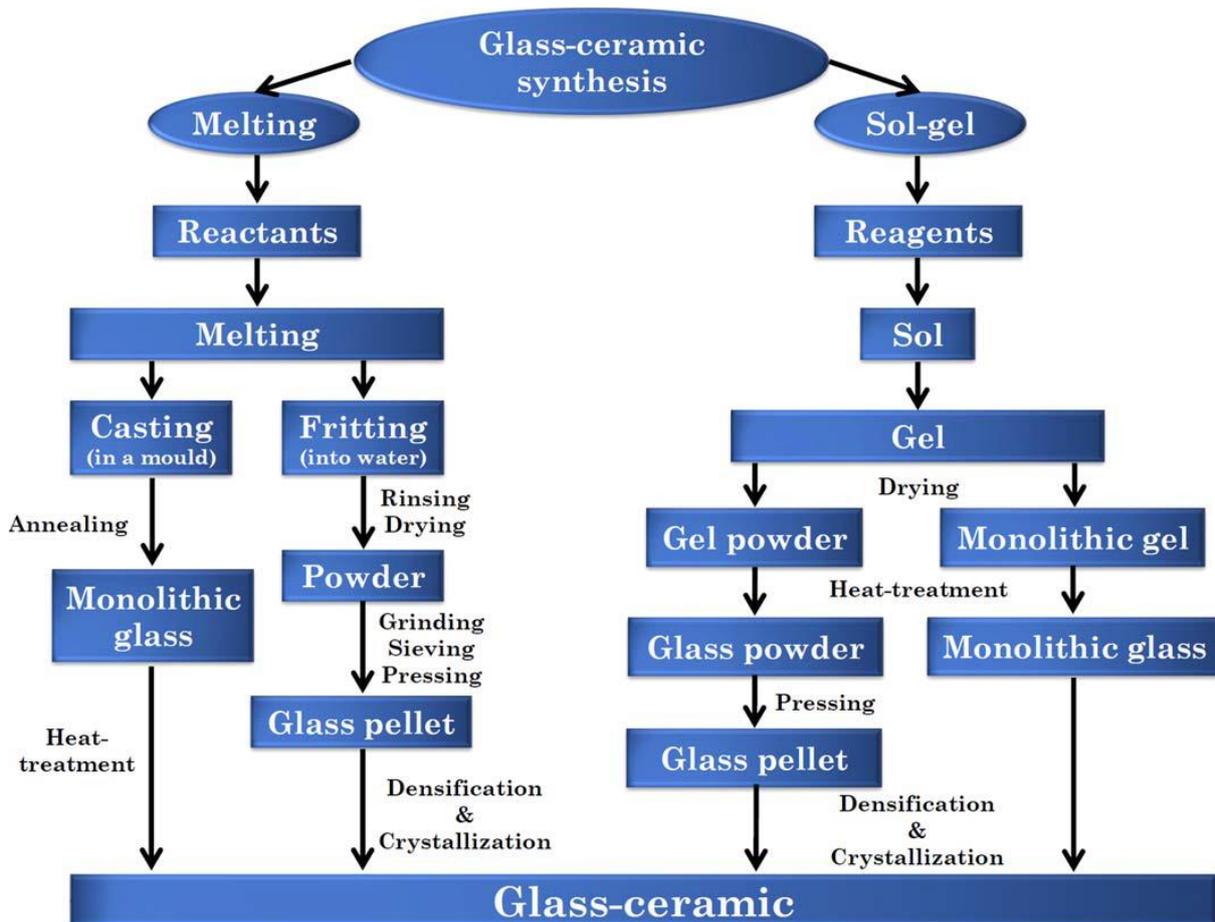


Figure I.6 : Principales étapes de la synthèse des verres bioactifs par fusion et méthode sol-gel [52].

## **I.2. Os et substitution osseuse**

Le système osseux forme une charpente où s'assemblent les organes du corps. Le rôle des os est de supporter le poids du corps généré par la gravité, de fournir la rigidité nécessaire au mouvement et de servir de points d'attache pour les muscles, les tendons et les ligaments. La structure osseuse joue également un rôle important dans la protection des organes internes (comme le cerveau ou la moelle épinière). L'os a également des fonctions métaboliques, telles que la formation de cellules sanguines ou encore une fonction de réservoir pour le calcium et les phosphates inorganiques [53, 54].

### **I.2.1. Composition du tissu osseux**

Le tissu osseux est le principal composant du système squelettique. C'est un tissu conjonctif hautement spécialisé composé d'une substance organique minéralisée. Il comprend une matrice osseuse, constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale (inorganique) qui confère à l'os sa dureté et sa résistance, des cellules osseuses (les ostéoblastes, les cellules bordantes, les ostéocytes et les ostéoclastes) ainsi que d'autres structures telles que le cartilage, les surfaces articulées des articulations, le périoste, les nerfs et les vaisseaux [55, 56].

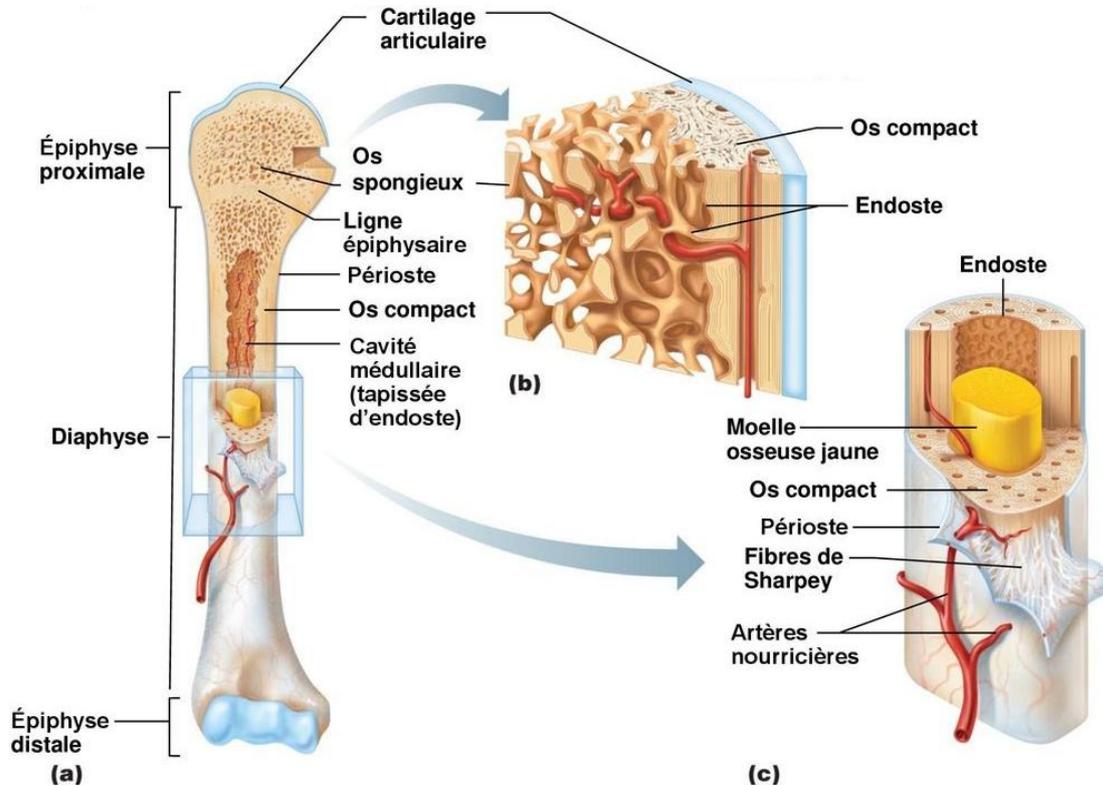
#### **I.2.1.1. Matrice osseuse**

La matrice osseuse est une structure dure, caractérisée par une charpente protéique collagène, une substance fondamentale (chondroïtines sulfates, acide hyaluronique, kératanes sulfates : qui possède une très grande affinité pour les sels de calcium) et des sels minéraux (calcium, phosphore, magnésium, ...). Ce sont ces substances qui confèrent à l'os sa flexibilité et sa grande résistance à des forces de tension, de traction et de cisaillement. Le calcium osseux est fixé sous forme de cristaux d'Hydroxyapatite (en aiguille ou en plaquette) qui sont situés entre les fibres de collagène ou à l'intérieur de celles-ci. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  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 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) [57,58].

#### **I.2.1.2. Architecture osseuse**

Les 213 os qui composent le squelette adulte sont divisés en trois principales catégories en fonction de leurs formes (court, plat et long). Les os courts (vertèbres, phalanges) sont composés d'un noyau d'os spongieux entouré d'une corticale ou os compact. Les os plats (sternum, côtes, omoplates, os crânien) sont constitués de deux couches d'os compact, les tables externe et interne, enfermant une couche d'os spongieux. Les os longs (fémur, tibia, humérus)

sont constitués de plusieurs éléments : la diaphyse, les épiphyses et les métaphyses. Leurs formes et leurs fonctions sont liées de telle sorte que chaque forme catégorique d'os a une fonction distincte [59,60]. La figure suivante présente quelques sortes de tissus osseux que l'on peut rencontrer dans un os type os long.



**Figure I.7 :** Schéma de la structure d'un os long et des tissus osseux qui le composent [61]

Macroscopiquement, on distingue deux architectures ; l'os cortical ou compact et l'os trabéculaire ou spongieux, l'ensemble étant entouré d'une enveloppe externe, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion de tendons et de ligaments [62]. La classification en os cortical et trabéculaire est basée sur le degré de porosité (5 à 30 % pour l'os cortical qui constitue surtout la « paroi » compacte de la diaphyse des os longs et de 30 à 90 % pour l'os trabéculaire situé surtout au centre de la diaphyse et dans les régions métaphysaire et diaphysaire, ainsi que dans les os courts et plats [59, 63, 64].

#### **a- Tissu osseux compact ou cortical**

Il représente 80 à 85% de l'ensemble du tissu osseux. Il forme la couche externe de tous les os du squelette et la plus grande partie de la diaphyse des os longs. Il soutient les os et permet à ces derniers de résister à la pression du poids. Il est constitué principalement d'ostéones ou système de Havers. Le canal de Havers est occupé par du tissu conjonctif constitué de fibres de collagène et de fibroblastes, englobant des capillaires, des artérioles et des veinules. Ces canaux sont reliés entre eux par des canaux plus petits appelés canaux de Volkman [59, 65, 66].

### b- Tissus osseux spongieux ou trabéculaire

Il est constitué de lamelles osseuses disposées en travées contenant des ostéoplastes et leurs canicules ainsi que des ostéocytes. Entre les travées existent des cavités de forme irrégulière (forme trabéculaire), interconnectées, contenant de la moelle hématopoïétique, un capillaire ou une veinule. Cet os spongieux représente la forme minoritaire du tissu osseux dans le squelette avec 20% de la masse totale de celui-ci [59, 66].

La structure microscopique des os compacts et spongieux est illustrée dans les figures suivantes:

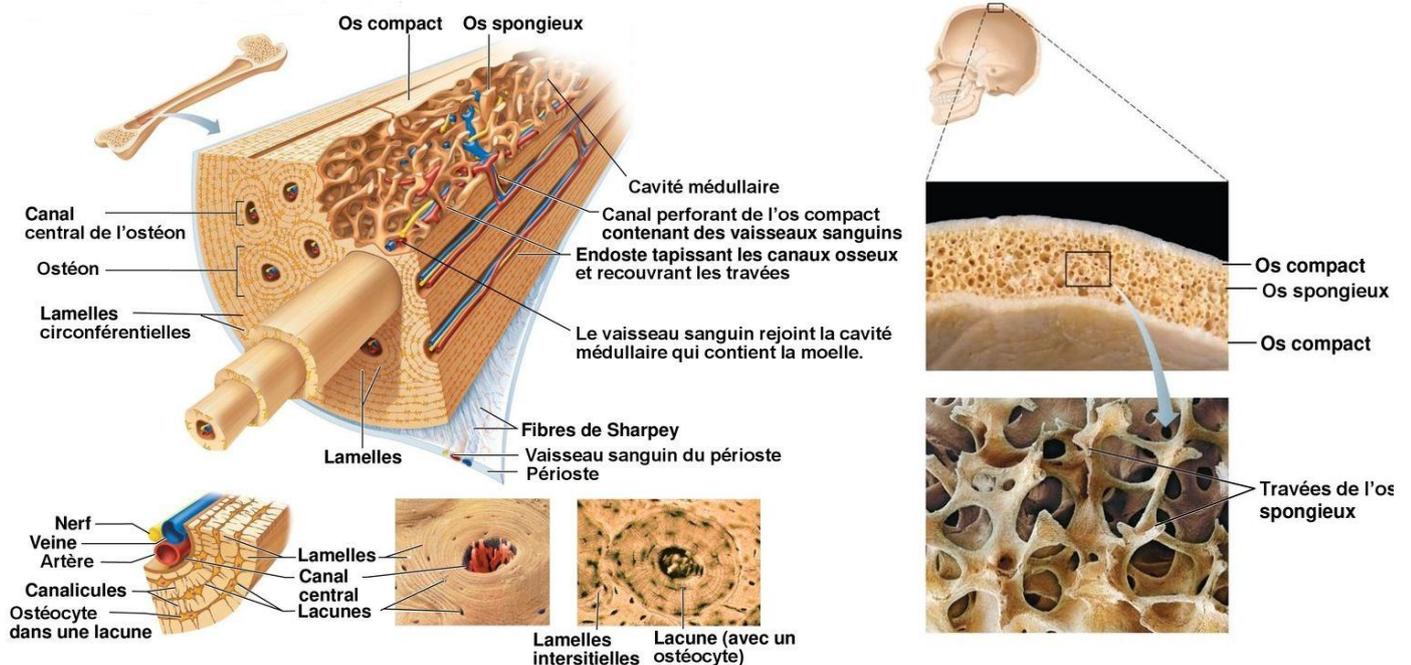


Figure I.8 : Structure microscopique de l'os compact [61]

Figure I.9 Structure microscopique de tissu osseux spongieux [61]

#### I.2.1.3. Cellules osseuses

Après implantation, ce sont les ostéoblastes qui se fixent en premier par adsorption sur l'implant, puis ils se transforment progressivement en ostéocytes lorsqu'ils sont emprisonnés par une matrice osseuse. Tout au long de la vie du patient un équilibre se crée entre la génération d'os néoformé par les *ostéoblastes* et la résorption osseuse par les *ostéoclastes*. Ce mécanisme ne peut se faire sans une irrigation sanguine importante.

#### a- Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées de 20 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces cellules ne sont jamais isolées mais des alignements épithélioïdes d'ostéoblastes sont rencontrés à la surface osseuse. Ce sont des cellules chargées d'une part de la synthèse de la nouvelle matrice osseuse (appelée ostéoïde) et d'autre part de la calcification (germination de cristaux d'apatite) [58, 60, 66].

### b- Ostéocytes

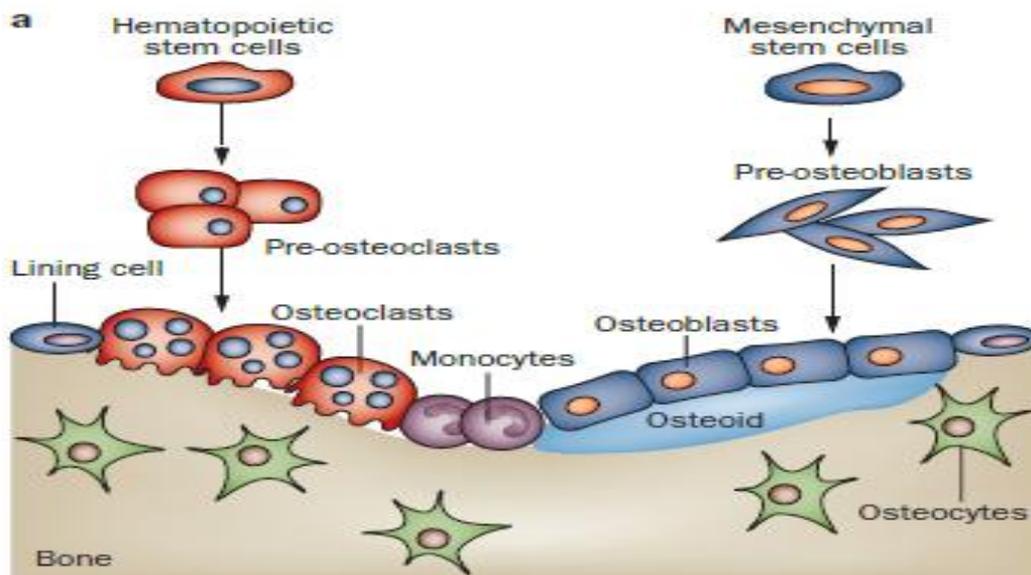
Les ostéocytes sont des ostéoblastes complètement entourés par la matrice osseuse minéralisée. Ce sont les cellules osseuses mûres qui assurent l'entretien de l'os, la logette d'emmurage est appelée ostéoplaste, et elles ont un rôle fondamental dans la régulation du remodelage osseux. Les ostéocytes constituent environ 1% de la masse du tissu osseux. La mort des ostéocytes semble signifier la mort du tissu osseux [58, 60, 66, 67].

### c- Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, multi nucléées, d'origine hématopoïétique (véhiculée par le sang) et généralement disposées au contact d'une zone de matrice osseuse minéralisée. Ils sont responsables de la résorption du tissu osseux calcifié : dissolution du minéral et dégradation de la matrice organique [58, 60, 66, 67].

### d- Cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos, et si nécessaire, elles peuvent redevenir des ostéoblastes actifs. Elles recouvrent les surfaces osseuses qui ne subissent pas de formation ou de résorption osseuse à un moment donné. Ce sont des cellules aplaties et allongées, possédant peu d'organites et sont connectées les unes aux autres et aux ostéocytes voisins par des jonctions communicantes [68, 69].



*Figure I.10 : Cellules du tissu osseux [69, 70]*

## I.2.2. Remodelage osseux

Que ce soit dans l'os compact ou trabéculaire le tissu osseux est en constant renouvellement que l'on appelle remodelage. Le remodelage osseux est un mécanisme physiologique complexe, qui fait intervenir des cellules, une matrice extracellulaire calcifiée et des facteurs de régulation

systemiques et locaux. Ce mécanisme de restructuration permet un renouvellement permanent du tissu vivant tout au long de la vie d'une personne. Cette capacité de renouvellement permet également aux os de se réparer et de s'adapter aux contraintes auxquelles ils sont perpétuellement soumis. Au niveau cellulaire, les principaux acteurs de ce remodelage sont les cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes). Ces cellules subissent l'influence de facteurs mécaniques, ioniques (Ca, P), systémiques (hormones) et locaux (cytokines, facteurs de croissance, protéines de la matrice extracellulaire). Les différentes phases du cycle de remodelage osseux sont [60, 71, 72] :

### **1- Phase d'activation**

Le remodelage commence par la phase d'activation, qui est déclenchée par une stimulation mécanique (dommage structurel de la matrice) ou chimique (hormonale, comme les estrogènes). Dans le cas de la stimulation mécanique, ce sont les ostéocytes, cellules imbriquées dans la matrice minérale osseuse, qui perçoivent les changements mécaniques grâce à leurs nombreuses extensions cytoplasmiques et sécrètent les facteurs nécessaires pour la formation d'ostéoclastes.

### **2- Phase de résorption :**

La deuxième phase est celle de résorption, qui est caractérisée par la réponse des ostéoblastes aux signaux des ostéocytes et la sécrétion de chémoattractants par les ostéoblastes en réponse au recrutement et à la prolifération d'ostéoclastes. Ces derniers peuvent alors effectuer la résorption de la matrice osseuse.

### **3- Phase intermédiaire ou d'inversion**

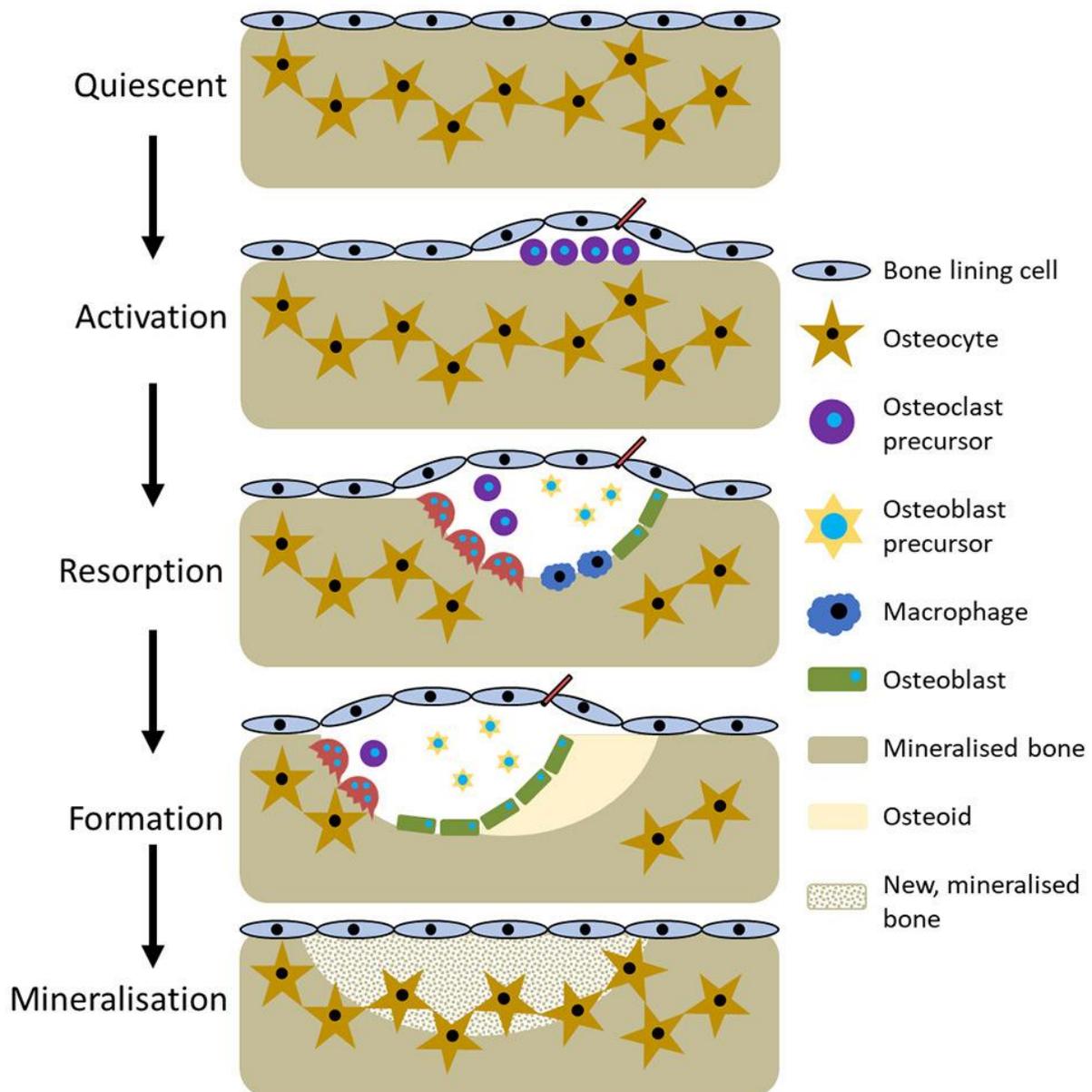
Cette phase, aboutit par le biais de cellules macrophagiques, au lissage de la surface résorbée, à la formation de la ligne cémentante. C'est au cours de cette phase que s'effectue le couplage entre la résorption et la formation, par transmission du signal inducteur de la formation osseuse.

### **4- Phase de Formation**

La prochaine phase est celle de formation de la matrice osseuse, initiée par les éléments libérés par la dégradation de la matrice signalant le recrutement des ostéoblastes. Il s'installe alors un équilibre, de sorte à avoir une quantité égale de matrices formée et résorbée.

### **5- Phase de quiescence**

Lorsque le remodelage prend fin, les ostéoblastes peuvent s'insérer dans la matrice et se différencier en ostéocytes, sinon elles s'inactivent et se posent à la surface de la matrice osseuse. On les appelle alors les cellules bordantes et elles semblent servir de précurseur pour de prochaines séances de remodelage. La balance osseuse qui est à l'équilibre chez l'adulte a tendance à devenir négative (ostéoporose).



*Figure I.11 : Différentes étapes du remodelage osseux [73]*

### I.3. Infections bactériennes des implants orthopédiques

Le matériel chirurgical orthopédique est utilisé de façon croissante pour les fixations de fractures, les arthrodèses et surtout la mise en place de prothèses articulaires. Les infections bactériennes sur ces matériels prothétiques implantés représentent un des problèmes majeurs de santé publique et une des premières causes de bactériémies nosocomiales. Par ailleurs, il apparaît que ces infections ne répondent pas toujours au traitement classique par les antibiotiques ce qui rend alors l'explantation de la prothèse nécessaire pour éradiquer l'infection. Afin de pallier à ces problèmes, plusieurs stratégies sont proposées et/ou sont encore à l'étude ; parmi celles-ci la conception d'un biomatériau antibactérien, l'imprégnation

d'antibiotiques ou le greffage de polymères bioactifs .... [74-76]. L'adhérence bactérienne sur une surface implantée dépend de différents paramètres [74] :

- Les facteurs de l'hôte (âge, immunodéficience, état physique) ;
- La nature de la souche (les micro-organismes qui sont impliqués dans le développement des infections sur corps étrangers sont très nombreux) ;
- Les propriétés physicochimiques de la surface (le type de matériau, la tension de surface l'hydrophobicité, la rugosité de surface, la présence ou non d'un film organique ou inorganique, la composition chimique de la surface.).

Les infections d'implants peuvent survenir par inoculation directe dans la plaie chirurgicale pendant l'opération (infection péri-opératoire), par le transport sanguin de microbes dus à une bactériémie secondaire à un foyer infectieux distant (infection hémotogène), par contact direct avec un foyer infectieux adjacent ou par plaie pénétrante (infection contiguë) [77, 78].

### I.3.1. Germes responsables des infections

Les microorganismes les plus couramment impliqués sont les bactéries Gram-positives *Staphylococcus aureus*, les *Staphylocoques* à coagulase négative, *Streptococcus sp*, suivi de bactéries Gram-négatives telles qu'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp* et également des levures telles que *Candida Albicans* et *Candida Krusei* [79-81]. Dans le cas des infections à *staphylocoques*, l'adhérence bactérienne est fortement influencée par les protéines de l'hôte adsorbées sur la surface de l'implant. Les mécanismes moléculaires à l'origine des interactions qui se développent entre *Staphylococcus aureus* et les protéines de l'hôte adsorbées sur les dispositifs médicaux, impliquent des protéines spécifiques de la surface bactérienne communément appelées adhésines [74, 82].

Les microorganismes utilisés dans ce travail sont : *S. aureus* (Gram positive), *E. coli* (Gram négative), *Candida albicans* et *Candida krusei* (levures), le tableau suivant montre quelques caractéristiques de ces bactéries :

**Tableau I.1** : Les microorganismes utilisés dans les expériences

Organismes	Pertinence Clinique	Source
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infections cutanées, infections des plaies, abcès, infections chirurgicales, ostéomyélite, maladie entérique	[83-85]
<i>Escherichia coli</i>	Infections intestinales (entérites, diarrhées) et extraintestinales (infections urinaires, septicémies, méningites).	[86-88]

<i>Candida Albicans</i>	Infections cutanées, des infections systémiques potentiellement mortelles, infections systémiques nosocomiales, candidose buccale ou vaginale	[89-91]
<i>Candida Krusei</i>	candidose invasive, infection de la circulation sanguine, infections cutanéomuqueuses et unguéales, infection nosocomiales, infections fongiques disséminées, Pneumonie	[92-94]

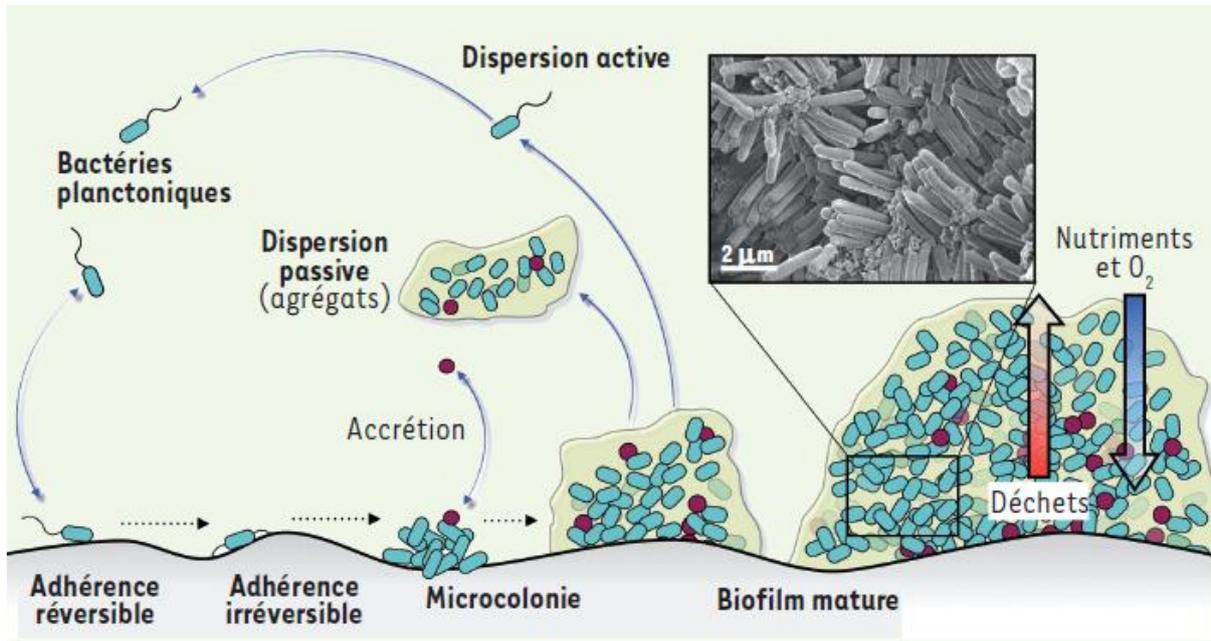
### **I.3.2. Adhérence de la bactérie : Formation de biofilm bactérien**

#### **I.3.2.1. Définition d'un biofilm**

Le terme de biofilm a été proposé en 1978 pour désigner une communauté de microorganismes enrobent une matrice hydratée, riche en polymères extracellulaires, et en contact avec une surface. Leur développement a de nombreux effets négatifs sur les procédures industrielles ainsi qu'en médecine humaine, la formation de biofilms bactériens sur les prothèses et cathéters contribuent au développement des infections liées aux soins [95, 96].

#### **I.3.2.2. Mécanisme de formation de biofilm bactérien**

L'adhérence initiale d'une bactérie sur une surface est d'abord conditionnée par ses propriétés physicochimiques (hydrophobie et charge électrostatique). Elle fait ensuite intervenir des macromolécules de l'enveloppe bactérienne - souvent appelées adhésines - qui interagissent de manière spécifique ou non avec les surfaces. Des polysaccharides entrant dans la composition de la matrice extracellulaire assurent également une cohésion mécanique entre les bactéries et contribuent au passage de la vie libre à la vie fixée. Après leur adhérence au substrat, qui peut survenir dans les secondes qui suivent le contact avec une surface, les bactéries s'agrègent, se multiplient et forment des microcolonies. Si les conditions du milieu le permettent, le biofilm connaît une phase de maturation qui se traduit par une croissance en épaisseur. A ce stade, l'incorporation de bactéries d'espèces différentes ou d'autres microorganismes mène à la formation de biofilms polymicrobiens ou mixtes. Le biofilm mature peut connaître une phase de dispersion, libérant des bactéries isolées ou des fragments de biofilms qui pourront, à leur tour, enclencher la formation d'un biofilm sur une autre surface (Figure I.12) [77, 78, 95, 96].



**Figure I.12 :** Formation d'un biofilm sur la surface d'un implant [95]

En quelques jours, une structure complexe en trois dimensions de microbes (25%) et de matrice extracellulaire (75%) se forme sur la surface.

### I.3.3. Critère antibactérien des verres bioactifs

La présence d'une infection n'est pas seulement un problème sur le site de l'implant médical, mais dans les structures et tissus environnants. Les infections osseuses chroniques comme l'ostéomyélite peuvent résulter d'une infection des tissus mous environnants, ajoutant plus de complications aux infections contractées après une chirurgie ou l'implantation d'un dispositif médical [97, 98].

Actuellement, afin d'inhiber l'activité bactérienne après une chirurgie implantaire, des doses élevées et des traitements antibiotiques à long terme sont couramment utilisés. Celles-ci peuvent entraîner des effets secondaires potentiellement graves et une prévalence croissante de souches bactériennes résistantes, telles que le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline [76, 99].

D'autre part, une combinaison de traitement antimicrobien systémique et local en remplissant la cavité osseuse avec des porteurs d'antibiotiques tels que le polyméthylméthacrylate (PMMA) est aussi utilisée. Cependant, le PMMA chargé d'antibiotiques présente certaines limites. Comme il n'est pas biodégradable, son utilisation nécessite plusieurs interventions chirurgicales, qui peuvent entraîner une perte de masse osseuse. De plus, la surface du polymère peut servir de substrat pour la formation de biofilms, conduisant à une réduction de l'efficacité des antimicrobiens [80, 100].

Ainsi, il devient de plus en plus important de développer des stratégies et du matériel de traitement alternatifs pour les infections difficiles à contrôler.

En raison de leur biocompatibilité, les verres bioactifs sont prometteurs en tant que matériaux pouvant être utilisés pour les implants médicaux et peuvent réduire le risque d'infection [96]. Les verres bioactifs comme S53P4 (53% SiO<sub>2</sub>, 23% Na<sub>2</sub>O, 20% CaO, 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) et 45S5 (45% SiO<sub>2</sub>, 24.5% Na<sub>2</sub>O, 24.5% CaO, 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> % mas) sont les derniers matériaux à étudier, leurs propriétés présentent des solutions à certaines faiblesses du traitement actuellement préconisé avec le PMMA ou le ciment [80, 100].

L'action antibactérienne des verres bioactifs repose sur plusieurs facteurs, notamment un pH élevé et des effets osmotiques causés par la concentration non physiologique d'ions dissous du verre bioactif, c'est-à-dire que l'action antibactérienne d'un verre bioactif est influencée par sa composition chimique et les conditions de dissolution dans son environnement. Cela permet à la fois l'inhibition de la croissance bactérienne par le biais du déséquilibre osmotique et acido-basique généré sans dépendre d'antibiotiques et la formation d'une nouvelle matrice osseuse, ne nécessitant pas d'autres procédures de retrait d'implant. [80, 100-103].

Le dopage des verres bioactifs avec d'autres ions, tels que l'argent, l'yttrium, le sélénium, gallium et l'iode, présentent également un potentiel d'activité antimicrobienne contre *E. coli*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas pyocyanea*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella sp.*, *Streptococcus sp.*, et *S. aureus* [97].

Dans ce travail approfondi, nous évaluons l'efficacité antibactérienne des poudres de verre bioactif 63S (63% SiO<sub>2</sub>, 28% CaO, 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> % mol) élaborées par la méthode sol-gel sur quatre microorganismes (*S. aureus*, *E. coli*, *Candidat albican* et *Candidat kresie*).

#### **I.4. Les implants prothétiques**

Un implant est une substance ou un matériel introduit dans le corps humain à des fins de traitement ou de remplacement d'organe. Il peut être provisoire ou permanent. Une prothèse remplace un élément manquant. Il existe des endoprothèses qui remplacent un élément interne (prothèse de hanche) et des exoprothèses qui remplacent un membre amputé. Les implants orthopédiques peuvent être statiques (vis, clous, tiges, plaques) pour consolider une fracture ou dynamiques (prothèses) pour remplacer une articulation ou un ligament [104]. Selon leurs comportement dans l'organisme vivant, les implants sont classés comme étant : inertes morphologiquement fixée dans l'organisme, résorbable qui sont complètement résorbés dans l'organisme, et bioactifs qui sont capables de stimuler ostéogénèse et de l'accrétion de l'os [105]. Les prothèses articulaires sont largement utilisées en chirurgie orthopédique. Elles sont utilisées pour reconstruire des articulations telles que la hanche, le genou, l'épaule ou les doigts, qui sont

endommagées par des fractures et sont souvent aggravées par des pathologies dégénératives telles que l'arthrose ou l'ostéoporose [106].

Même si les matériaux céramiques et l'os artificiel sont très utilisés en orthopédie, leurs faibles propriétés mécaniques ne permettent pas d'applications sans un support métallique. Les premières prothèses, implantées au début du siècle passé, ont été fabriquées en acier allié au vanadium et depuis, plusieurs matériaux métalliques ont été essayés, comme les aciers inoxydables, les alliages cobalt-chrome ou le titane et ses alliages. L'acier inoxydable est encore largement utilisé. Son intérêt dans ce domaine réside dans ses propriétés mécaniques intéressantes [105, 106].

#### **I.4.1. Substrats métalliques**

Les métaux sont les matériaux les plus couramment mis en œuvre car ils présentent des propriétés mécaniques adaptées. On peut notamment citer le titane pur et ses alliages, les alliages à base de cobalt ainsi que les aciers inoxydables car ils sont biocompatibles, ils peuvent supporter des charges importantes, résister en fatigue, subir une déformation plastique avant rupture et présentent une résistance à la corrosion. La limite élastique ainsi que la résistance en fatigue de ces matériaux dépendent du type d'alliage et de ses traitements ultérieurs [107].

##### **I.4.1.1. Alliages de titane**

Le titane et ses alliages, utilisés à l'origine en aéronautique, sont devenus des matériaux de grand intérêt dans le domaine biomédical (en orthopédie, en chirurgie cardio-vasculaire, en chirurgie orale et maxillo-faciale, implants dentaires...), en raison de leurs excellentes propriétés mécaniques. L'alliage de titane le plus largement utilisé est le Ti6Al4V. C'est un alliage à structure biphasé  $\alpha - \beta$ ,  $\alpha$  étant une phase hexagonale et  $\beta$  une phase cubique. L'aluminium joue le rôle de stabilisateur de la phase  $\alpha$ . Quant au vanadium, il stabilise la phase  $\beta$ . Ainsi, les deux phases peuvent coexister. Le titane et ses alliages peuvent s'intégrer étroitement dans l'os. Cette propriété améliore considérablement le comportement à long terme des dispositifs implantés, diminuant les risques de descellement et de défaillance. L'excellente résistance à la corrosion des alliages de titane est due à la formation d'une couche adhésive d'oxyde  $TiO_2$  à leur surface. D'autres propriétés de surface telles que l'usure sont très médiocres en raison de la faible résistance au cisaillement. Bien que le titane et ses alliages combinent une gamme d'excellentes propriétés, à savoir propriétés mécaniques, résistance à la corrosion, résistance à la fatigue-corrosion, faible densité et module d'élasticité relativement faible, leur traitement n'est pas facile qu'il s'agisse d'usinage, de forgeage ou de traitement thermique. Malgré leurs propriétés anticorrosion et toxicologiques attrayantes, le titane et ses alliages présentent généralement une mauvaise résistance au frottement et à l'usure, ce qui induit à la mauvaise intégrité de la couche

passive de  $TiO_2$ . De plus, la libération de débris d'usure peut entraîner des lésions cellulaires, induisant une inflammation ou une encapsulation de l'implant par un tissu fibreux [26, 108, 109].

#### I.4.1.2. Alliages de chrome-cobalte

Les alliages de chrome-cobalt sont commercialisés sous les noms de Stellite®, Vitallium®, Dentitan®, etc. Le principal avantage de ces alliages est leur grande résistance à l'usure. Cette caractéristique leur vaut d'être utilisés dans des applications où le frottement est important, comme les prothèses de la hanche et les valves cardiaques. Cependant, leur coût est légèrement supérieur à celui des aciers inoxydables et ils sont difficiles à usiner [26, 110, 111].

#### I.4.1.3. Acier inoxydable

L'acier inoxydable a été découvert en 1904 par Leon Guillet. L'utilisation de l'acier inoxydable dans les applications chirurgicales a commencé en 1926 lorsque Strauss a breveté l'acier inoxydable 18Cr-8Ni contenant 2-4% de molybdène. Les aciers inoxydables peuvent être classés en fonction de leur microstructure à savoir martensitique, ferritique, austénitique ou duplex (composé de phases ferritique et austénitique). L'acier inoxydable le plus largement utilisé dans les applications médicales est le type austénitique 316L, un alliage principalement de fer, de chrome et de nickel dont la composition est indiquée dans le tableau I.2. Le constituant d'alliage le plus important dans l'acier inoxydable est le chrome, qui doit avoir une concentration d'au moins 12% pour que l'acier développe à sa surface un film d'oxyde de chrome  $Cr_2O_3$  adhérent passif nécessaire à la résistance à la corrosion [26, 111, 112].

**Tableau I.2 :** Composition chimique de l'acier 316L (Stainless steel SS) (% en poids) [111].

Élément	C	P	S	Cu	N	Si	Mn	Cr	Ni	Mo	Fe
Composition (%)	<0.03	0.03	0.03	0.5	0.1	0.75	2	17-20	12-14	2 - 4	balance

L'utilisation de l'acier inoxydable en chirurgie orthopédique a ouvert un large éventail de nouvelles possibilités dans le traitement des fractures osseuses. Aujourd'hui, l'acier inoxydable est le matériau le plus utilisé pour la fixation interne. Sa biocompatibilité a été prouvée par une implantation humaine réussie pendant des décennies. En outre, le matériau d'implant en acier inoxydable présente une bonne combinaison de résistance mécanique, de ductilité, de rentabilité et de réponse de fabrication. Ces dispositifs peuvent se présenter sous la forme de fils, broches, vis, plaques et tiges (Figure I.13) [110, 112, 113].



**Figure I.13 :** Exemples de différents dispositifs orthopédiques en acier inoxydable. [114].

Les implants en acier inoxydable (SS) ont traversé différentes générations en raison de certaines déficiences inhérentes à ces matériaux pour une utilisation dans le corps, en particulier la libération d'ions métalliques toxiques (fer, chrome et nickel), l'augmentation de la vitesse de corrosion dans des environnements biologiques et la mauvaise oséointégration qui peut retarder la cicatrisation osseuse après chirurgie [115].

Le tableau I.3 ci-dessous regroupe quelques caractéristiques mécaniques de ces différents matériaux.

**Tableau I.3 :** Propriétés physiques et mécaniques des implants métalliques couramment utilisés par rapport au tissu osseux [116]

<b>Matériaux</b>	<b>Module d'Young (GPa)</b>	<b>Limite élastique (MPa)</b>	<b>Résistance à la traction (MPa)</b>	<b>Densité (g/ cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Coefficient de dilatation thermique (10<sup>-6</sup> /°C)</b>
<b>Alliage chrome-cobalt</b>	210 - 253	448 - 1606	655 - 1869	8,3	15,1
<b>Titane</b>	110	485	760	4,51	8,5
<b>Ti-6Al-4V</b>	101 - 120	795 - 1034	860 -1103	4,43	8,7
<b>Acier inoxydable 316L</b>	200	221 – 1213	586 - 1351	8,03	19,5
<b>Os cortical</b>	15 - 30	30 -70	70 - 150	1,75	27,5

#### **I.4.2. Revêtements des verres bioactifs sur implants et prothèses**

La plupart des implants orthopédiques qui doivent être soumis à de fortes contraintes en traction, flexion ou cisaillement sont métalliques. En général, ces matériaux sont bioinertes ou au mieux biotolérés. Cependant, au cours du temps, les sollicitations mécaniques auxquelles ils sont soumis peuvent conduire à leur détérioration. Ils sont également soumis à la corrosion chimique du milieu vivant. Ainsi, la dégradation de l'implant peut conduire à la libération d'ions métalliques qui peuvent nuire à l'organisme.

Ces raisons ont conduit à une solution astucieuse, celle du recouvrement des implants métalliques par des matériaux biocompatibles qui peuvent assurer la formation d'une liaison naturelle entre l'implant et l'os tout en empêchant la dégradation du matériau métallique et la libération des ions dans l'organisme. L'utilisation de revêtements de la prothèse métallique avec des verres bioactifs pourrait être un moyen de combiner de bonnes propriétés mécaniques, résistance à la corrosion, bioactivité et biocompatibilité dans un même matériau. Ces revêtements serviraient à améliorer l'ostéointégration des implants, protéger le métal contre la corrosion des fluides corporels et le tissu contre les produits de corrosion des alliages. Les bioverres permettent à la prothèse de s'adapter à la cavité osseuse, empêchent la formation de tissu fibreux à l'interface prothèse-os et favorisent une forte liaison chimique entre l'implant et le tissu de liaison [117]. D'un point de vue général, les revêtements biocéramiques peuvent être fabriqués par une grande variété de méthodes que nous décrivons dans la section suivante.

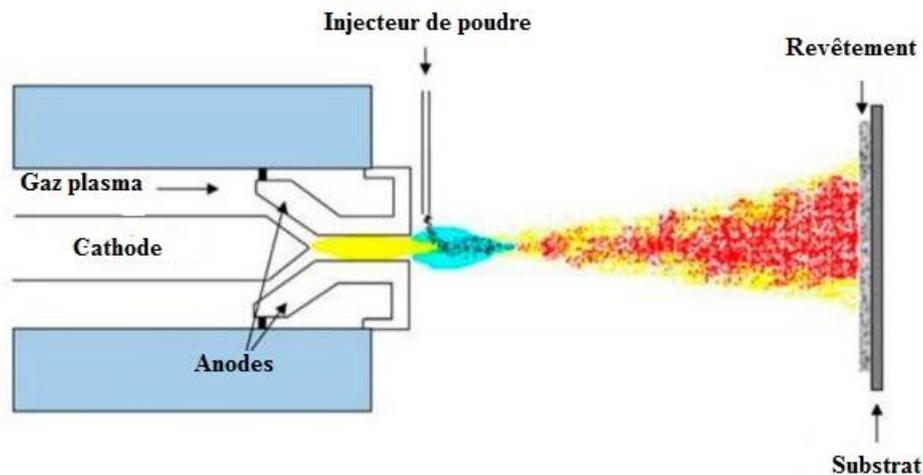
#### **I.4.3. Techniques d'élaboration de revêtements prothétiques**

L'un des processus de modification de surface les plus courants est le dépôt d'un ensemble de matériaux, appelé revêtement. Cependant, la gamme de ces matériaux étant large, différentes méthodes ont été introduites. Ces procédés sont sélectionnés en fonction du matériau du substrat, des applications du matériau revêtu et de l'épaisseur de la couche de revêtement. Il existe de nombreuses méthodes de revêtement offrant chacune des capacités différentes, cependant, seules quelques-unes de ces techniques sont suffisamment fiables pour être appliquées à des fins de bio-application. Ces techniques fournissent simultanément une résistance à la corrosion et une amélioration de la biocompatibilité du substrat [118]. Parmi les méthodes de revêtement de surface, on distingue :

##### **I.4.3.1. Vaporisation par torche à plasma**

L'une des méthodes de dépôt de matériau les plus étudiées est un revêtement par torche plasma. Grâce à sa capacité à déposer des alliages métalliques, des oxydes et des céramiques, ce procédé offre une large gamme d'applications dans les revêtements de biomatériaux et d'implants corporels. Le principe de cette technique consiste à créer un plasma en injectant un flux de gaz

(mélange de gaz inertes tel que l'argon (Ar) ou l'hélium (He) et de gaz diatomiques tel qu'hydrogène (H<sub>2</sub>) ou azote (N<sub>2</sub>)) dans une chambre où il est ionisé par un arc électrique. On produit un plasma à haute température (10000 à 30000K). Puis, les matériaux à vaporiser sont introduits sous forme de poudre dans le jet de plasma. La poudre chauffée est fortement accélérée (100 à 350 m/s) vers le substrat sur lequel les particules du matériau perdent leur énergie cinétique et thermique, constituant ainsi la couche de revêtement. Le passage très rapide des grains dans le plasma, entraînant leur fusion en surface, permet de produire une très forte liaison avec le substrat lors de l'impact (figure I.14) [118, 119]. Cependant, les problèmes cités avec les revêtements projetés au plasma comprennent la variation de la force de liaison entre les revêtements et les substrats, une mauvaise adhérence à l'interface et des altérations de la structure. De plus, à notre connaissance, il n'existe aucune preuve montrant que le revêtement par projection plasma prolongerait la durée de vie des implants ou améliorerait la fiabilité par rapport aux implants non revêtus [120].



*Figure I.14 : Schéma simplifié du principe d'une torche de projection plasma [118].*

#### I.4.3.2. Dépôt par ablation laser (PLD)

Le dépôt par ablation laser (Pulsed laser deposition PLD) est un outil expérimentalement destiné à la fabrication d'une large gamme de films minces et de structures multicouches. Cette méthode est basée sur l'interaction de la lumière d'un laser avec les solides. En principe, en PLD, un faisceau laser de très courte durée (20-30 ns) et de forte intensité fuse et vaporise sous vide ou dans une atmosphère gazeuse à basse pression la surface d'une cible (en général solide) ; le matériau évaporé est dirigé et collecté sur un substrat au moyen d'un plasma panache (Figure I.15). L'énergie électromagnétique laser absorbée par la surface est d'abord convertie en énergie d'excitation électronique, puis convertie en énergie thermique, en énergie chimique et même en énergie mécanique, entraînant l'évaporation, l'ablation, l'excitation, la formation de plasma et l'exfoliation [120-122]. Trois étapes principales du processus PLD peuvent être retenues :

1. L'irradiation de la cible par le faisceau laser qui engendre la vaporisation du matériau et la génération d'un plasma ;
2. Le développement et l'expansion du plasma ;
3. La condensation du matériau vaporisé sur le substrat.

Comparé à d'autres méthodes de dépôt, le PLD est facile à utiliser et permet la croissance du revêtement à une température plus basse mais son développement industriel nécessite la résolution de certains problèmes liés à la mauvaise cristallinité du revêtement déposé, au manque d'uniformité des dépôts sur des surfaces complexes (angles, trous, etc.), à l'augmentation de l'épaisseur du dépôt, et enfin à l'élimination des particules liquides [120].

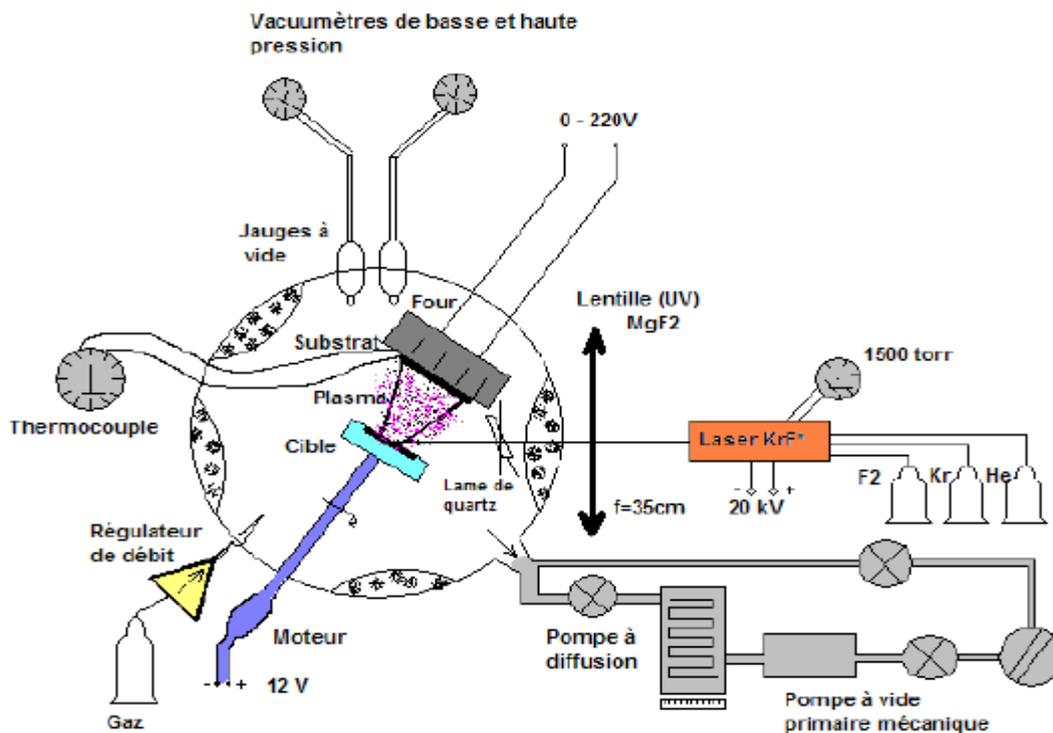
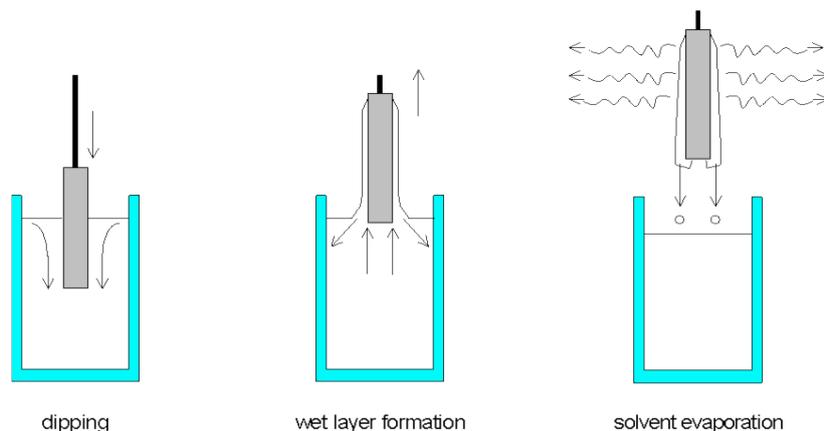


Figure I.15 : Schéma de l'installation expérimentale PLD [121].

#### I.4.3.3. Dépôt par la méthode dip-coating à partir d'une solution préparée par sol-gel

Le procédé sol-gel permet l'élaboration de couches minces d'épaisseurs entre 1nm et 20  $\mu\text{m}$ . Cette variation d'épaisseur est possible grâce à la souplesse du procédé. L'élaboration de couches minces par la voie sol-gel regroupe deux techniques qui sont le dip et le spin coating. Le principe de la technique du dip-coating (trempage-retrait) consiste à immerger plusieurs fois les substrats dans une suspension. Chaque trempage est suivi d'une étape de séchage. Les échantillons recouverts sont ensuite frittés. Le procédé de dip-coating comprend généralement trois étapes essentielles. L'immersion, le temps de séjour et l'extraction (Figure I.16). En revanche, la technique du spin-coating consiste à centrifuger une solution déposée en excès sur un substrat. Cette méthode nécessite également un traitement thermique de la pièce revêtue. En

général, les dépôts obtenus par sol-gel sont chimiquement purs et présentent une bonne cohésion [123].



**Figure I.16** : Etapes du procédé de dip-coating [123].

#### I.4.3.4. Dépôt chimique en phase vapeur

Le dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition CVD) est une technique utilisée pour plusieurs applications telles que la fabrication de revêtements, de films minces, de poudres, de fibres et de composants uniformes. Dans la technique CVD, un gaz précurseur s'écoule dans une chambre, sur les substrats chauffés à revêtir, et le dépôt de films minces sur la surface se produit en raison de la réaction chimique en phase vapeur. Ce procédé peut être défini comme un processus atomistique où les espèces primaires déposées sont des atomes ou des molécules ou une combinaison des deux (Figure I.17). D'autres procédures de dépôt courantes comprennent la technique de dépôt physique en phase vapeur (PVD), qui utilise l'évaporation, la pulvérisation cathodique et d'autres processus physiques pour produire des vapeurs de matériaux au lieu de processus chimiques [124, 125].

Malgré le progrès que connaît cette méthode et la possibilité d'avoir des dépôts fins et nanostructurés, les dépôts obtenus sont souvent biphasés et l'utilisation de solvants inflammables et/ou toxiques limite l'utilisation de cette technique pour des applications médicales.

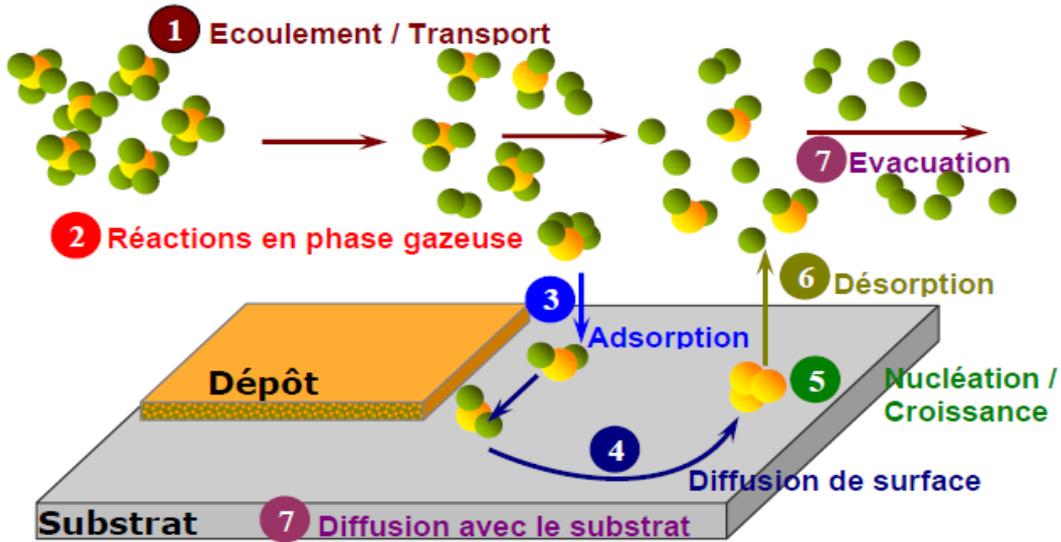


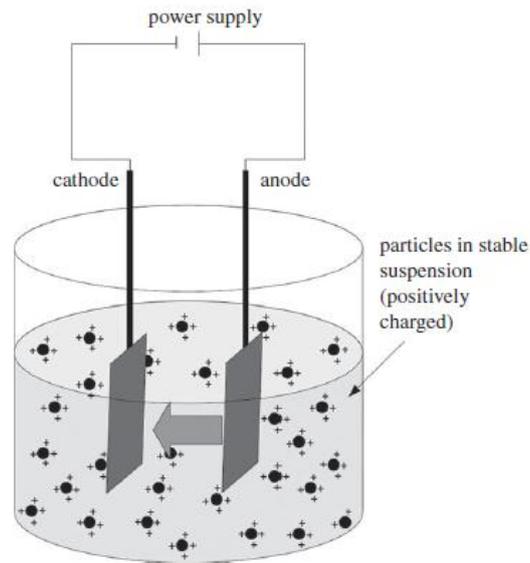
Figure I.17 : Illustration des diverses étapes du procédé CVD [125].

#### I.4.3.5. Dépôt par électrophorèse (EPD)

L'électrophorèse est un phénomène de grande importance en biologie, biochimie, science des matériaux, sciences pharmaceutiques, biotechnologie et chimie pour la manipulation de matériaux biologiques (protéines, enzymes, cellules,...) ainsi que colloïdes, polymères et particules inorganiques solides. L'intérêt de l'EPD repose non seulement sur sa grande polyvalence à utiliser avec différents matériaux et combinaisons de matériaux, mais également parce que l'EPD est une technique rentable nécessitant généralement un équipement et une infrastructure de traitement simples [126, 127].

##### 1. Principe de la méthode d'électrophorèse

Le dépôt électrophorétique (EPD) est une technique spéciale de traitement colloïdal qui utilise le mécanisme d'électrophorèse pour le mouvement des particules chargées en suspension dans une solution sous un champ électrique, pour les déposer de manière ordonnée sur un substrat pour développer des films minces et épais et des revêtements. La technique de dépôt par électrophorèse repose également sur la migration d'espèces chargées, ici de particules dispersées dans un milieu liquide, sous l'effet d'un champ électrique appliqué entre deux électrodes. Comme l'illustre le schéma de la figure I.18, le signe de la charge, positif ou négatif des particules, conditionne leur sens de déplacement vers l'électrode de signe opposé, la cathode ou l'anode ; on parlera alors ici de cataphorèse ou d'anaphorèse respectivement [126-129].



**Figure I.18 :** Cellule de dépôt électrophorétique (EPD) montrant des particules chargées positivement en suspension migrant vers l'électrode négative [126].

L'électrophorèse offre la possibilité de réaliser des dépôts homogènes sur divers substrats conducteurs ou semi-conducteurs, avec des épaisseurs variables. Les métaux, polymères, céramiques, verres et leurs composites peuvent être déposés par EPD. Après l'opération de dépôt électrophorétique, les dépôts subissent la plupart du temps un posttraitement thermique de polymérisation (particules organiques) ou de frittage (particules céramiques) conduisant à une consolidation du dépôt vis-à-vis du substrat [126, 130].

## 2. Facteurs influençant les dépôts électrophorétiques

La loi de Hamaker est un modèle mathématique bien connu prédisant la cinétique EPD des matériaux particuliers. Il prédit que la masse dépendant du temps du dépôt,  $w(t)$ , a une relation directe avec la mobilité électrophorétique des particules,  $\mu$ , la force du champ électrique,  $E$ , la surface des électrodes,  $A$ , le coefficient d'efficacité du dépôt,  $f$  ( $\leq 1$ , tenant compte du fait que seule une fraction des particules qui entrent en contact avec la surface de l'électrode se dépose) et la concentration de particules en suspension,  $C$ , comme illustré dans les équations (1) et (2) [129, 131]:

$$w(t) = \int_{t_0}^t f \cdot \mu \cdot E \cdot A \cdot C \cdot dt \quad (1)$$

En intégrant (1) par rapport au temps, Eq. (2) est obtenu:

$$w(t) = f \cdot \mu \cdot E \cdot A \cdot C \cdot t \quad (2)$$

Ainsi, deux contributions expérimentales peuvent être extraites de cette équation. La première est relative aux caractéristiques et aux propriétés de la suspension (concentration en particules  $C$ , mobilité électrophorétique  $\mu$ ) ; la seconde repose sur des paramètres relatifs au procédé de dépôt (champ électrique  $E$ , temps de dépôt  $t$  et surface de l'électrode  $A$ ) [129, 131].

Cependant, d'autres facteurs peuvent affecter indirectement les termes de cette équation. Par exemple, la mobilité électrophorétique de la particule,  $\mu$ , dépend du constant diélectrique,  $\epsilon_r$ , de la viscosité de cisaillement du milieu de dispersion,  $\eta$  et du potentiel zêta de la particule,  $\zeta$ , qui dépend de la charge de surface de la particule [131]. Les paramètres intrinsèques au procédé électrophorétique comme le champ électrique appliqué entre les deux électrodes, sa durée d'application, la nature, la géométrie et la distance entre électrodes, seront également des points clés à prendre en compte dans la formation d'un dépôt par EPD.

## 2.1. Paramètres liés au milieu

En ce qui concerne les propriétés de la suspension, de nombreux paramètres doivent être pris en compte, tels que la nature physico-chimique des particules en suspension, le milieu liquide et l'influence du type et de la concentration des additifs [131].

### a- Charge de surface - potentiel zêta

Le potentiel zêta des particules est un facteur clé dans le processus de dépôt électrophorétique. Il est impératif d'obtenir une charge superficielle élevée et uniforme des particules en suspension. Le pH du milieu induit une variation de charge de surface des particules. Cette charge de surface peut, en fonction du pH, être négative ou positive générant ainsi un potentiel électrique de surface, nommé potentiel zêta, et conditionnant la mise en œuvre des dépôts électrophorétiques. Pour des raisons de stabilité de la dispersion, il est souhaitable de sélectionner les conditions de pH permettant l'obtention d'un potentiel zêta le plus élevé possible en valeur absolue. Plus la valeur de ce potentiel est élevée, plus la répulsion entre les particules sera grande et plus la suspension sera stable. Au contraire, si les particules sont faiblement chargées, un phénomène de floculation intervient. La valeur du potentiel zêta témoigne donc de la stabilité des particules en suspension [127-129].

### **b- Concentration en particules (C)**

La concentration en particules est un paramètre important dans la formation d'un dépôt par EPD. Les cinétiques de dépôt sont fortement influencées par la dilution de la solution. Il a été démontré qu'une même épaisseur est obtenue plus rapidement dans des suspensions non diluées. Néanmoins, il est important de noter que la concentration en particules joue également un rôle sur le processus de gélification du sol et donc sur la viscosité, ce qui peut aussi affecter la mobilité électrophorétique des particules et leur cinétique de dépôt [128, 129].

### **c- Viscosité du milieu de dispersion**

La viscosité d'une suspension est également un paramètre susceptible de modifier la mobilité électrophorétique des particules. En EPD, une suspension plus visqueuse ou une charge de surface plus faible entraînera une mobilité électrophorétique plus faible qui à son tour donnera une faible vitesse de dépôt. Une suspension de faible viscosité sera préférée de façon à obtenir une mobilité électrophorétique plus élevée. En effet, la mobilité électrophorétique des particules  $\mu$  est inversement proportionnelle à la viscosité du milieu de dispersion [128, 129, 131].

## **2.2. Paramètres liés au procédé électrophorétique**

De façon générale, la technique de dépôt par électrophorèse montre la nécessité d'optimiser tous les paramètres, qu'ils soient relatifs à la suspension, ou au procédé de dépôt lui-même.

### **a- Champ électrique appliqué entre les deux électrodes**

Le champ électrique est un paramètre important, puisqu'il fournit la force motrice nécessaire au déplacement des particules pour aboutir à la formation d'un dépôt à l'électrode. Le champ électrique appliqué est néanmoins dépendant de la nature du milieu électrophorétique. Lorsque ce champ est trop faible, les particules acquièrent une force motrice insuffisante pour permettre la formation d'un dépôt d'épaisseur satisfaisante. Réciproquement, l'application d'un champ électrique trop important peut déstabiliser le flux de particules à proximité de l'électrode perturbant ainsi la microstructure du film final. Un compromis doit ainsi être trouvé de façon à pouvoir d'une part déplacer les particules et d'autre part s'assurer de la formation continue d'un dépôt homogène et dense. L'amplitude et la forme du champ électrique appliqué entre les deux électrodes peuvent donc fortement influencer la morphologie des dépôts [128, 129, 131].

**b- Durée du dépôt électrophorétique**

Un autre paramètre qui peut affecter la microstructure des films EPD est le temps de dépôt. Il a été rapporté que l'épaisseur du dépôt a une relation linéaire avec le temps. Ce phénomène se produit principalement dans le cas d'un champ électrique constant. Cependant, le champ électrique influençant l'électrophorèse diminue avec le temps de dépôt en raison de la formation d'une couche isolante de particules céramiques sur la surface de l'électrode. Une augmentation du temps de dépôt au-dessus d'un certain niveau peut conduire à un dépôt de revêtements épais non uniformes avec une fixation insuffisante au substrat, ou avec une porosité variable. En effet, il existe un temps optimal de dépôt au-delà duquel la masse déposée à l'électrode n'augmente plus linéairement mais atteint une saturation quel que soit le potentiel appliqué [129, 131].

**c- Electrodes**

Le choix des électrodes (caractéristiques, conductivité, géométrie, etc.) détermine également les conditions de formation des dépôts par électrophorèse. L'état de la surface du substrat est également un facteur pouvant affecter la cinétique de dépôt [126, 129].

**Conclusion et objectif de ce travail**

Le point de départ de ce travail est le constat du peu de travaux accomplis jusqu'à présent et du manque d'études approfondies sur les poudres de verre bioactif élaborées par la méthode sol gel à partir d'un aéro-gel. L'objectif de ce travail consiste donc d'une part, à préparer deux types de poudres de verre bioactif dérivées xérogel et aéro-gel via la méthode sol gel afin de pouvoir établir des comparaisons entre les deux poudres. Une fois les propriétés physico-chimiques des poudres sont bien caractérisées (structure et morphologie), l'étude portera sur la bioactivité, la biocompatibilité et l'activité antibactériennes des poudres élaborées. D'autre part, nous nous intéresserons aux dépôts des poudres de verre bioactif optimisés dans la première partie, par le procédé d'électrophorèse sur des substrats en acier inoxydable 316L et ce en vue d'améliorer la qualité des dépôts (résistance à la corrosion, rugosité, épaisseur, ...) pour des applications orthopédiques et/ou dentaires.

**Références bibliographiques**

- [1]. V. Hasirci, N. Hasirci, *Fundamentals of Biomaterials*, Springer Science + Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018.
- [2]. Iulian Vasile Antoniac (ed), *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*, Berlin, Germany: Springer, 2016; 1-1386.
- [3]. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *An introduction to materials in medicine. Biomaterials science*, 1996; 484: 1-879.
- [4]. P.M. Galletti, J.W. Boretos, *Report on the Consensus Development Conference on "Clinical Applications of Biomaterials," 1–3 November 1983*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1983; 17: 539-555.
- [5]. K Soballe, *Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation*, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1993; 64: 1-58.
- [6]. W. Xiaohong, *Overview on biocompatibilities of implantable biomaterials*, *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications in Biomedicine*, Lazinica, R., Ed, 2013; 111-155.
- [7]. S.V. Dbat, *Biomaterials*, Narosa Publishing House, New Delhi, India, 2002.
- [8]. J.R. Davis, *Overview of biomaterials and their use in medical devices*, *Handbook of materials for medical devices*, 2003; 1-12.
- [9]. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Elsevier, 2nd Edition, 2004; 31-59.
- [10]. A.S. Brydone, D. Meek, S. Maclaine, *Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering*, *J. Engineering in Medicine*, 2010; 224: 1329-1343.
- [11]. M.S. Scholz, J.P. Blanchfield, L.D. Bloom, B.H. Coburn, M. Elkington, J.D. Fuller, M.E. Gilbert, S.A. Muflahi, M.F. Pernice, S.I. Rae, J.A. Trevarthen, S.C. White, P.M. Weaver, I.P. Bond. *The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review*, *Composites Science and Technology*, 2011; 71: 1791–1803.
- [12]. W. Elshahawy. *Biocompatibility*. In: *Advances in Ceramics-Electric and Magnetic Ceramics, Bioceramics, Ceramics and Environment*. IntechOpen, 2011.
- [13]. J.M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess, *Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response*. *The AAPS journal*, 2010; 12: 188-196.
- [14]. B.D. Ratner, *The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century*, *J. of Cardiovasc. Trans. Res*, 2011; 4:523-527.

- [15]. A. Guaadaoui, S. Benaicha, N. Elmajdoub, M. Bellaoui, A. Hamal, What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus, *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2014; 3: 174-179.
- [16]. M. Bohner, J. Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?, *Biomaterials*, 2009 ; 30: 2175-2179.
- [17]. L. Niu, K. Jiao, T. Wang, W. Zhang, J. Camilleri, B.E. Bergeron, H. L. Feng, J. Mao, J.H. Chen, D.H. Pashley, F.R. Tay, A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements, *Journal of dentistry*, 2014; 42: 517-533.
- [18]. T. Nakamura, M. Takemoto, Osteoconduction and its evaluation, *Bioceramics and their clinical applications*, Woodhead Publishing, 2008; 183-198.
- [19]. G. Daculsi, B.H. Fella, T. Miramond, M. Durand, Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes, *IRBM*, 2013; 34: 346-348.
- [20]. T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *Eur Spine J*, 2001; 10: S96-S101.
- [21]. D. Das, Z. Zhang, T. Winkler, M. Mour, C.I. Günter, M.M. Morlock, H-G. Machens, A.F. Schilling, Bioresorption and Degradation of Biomaterials, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 2012; 126: 317-333.
- [22]. T. Winkler, E. Hoenig, R. Gildenhaar, G. Berger, D. Fritsch, R. Janssen, M.M. Morlock, A.F. Schilling, Volumetric analysis of osteoclastic bioresorption of calcium phosphate ceramics with different solubilities, *Acta Biomaterialia*, 2010; 6: 4127-4135.
- [23]. Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, M. Glogauer, Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications, *Materials*, 2015; 8: 5744-5794.
- [24]. I. Kulinets. "Biomaterials and their applications in medicine." *Regulatory affairs for biomaterials and medical devices*. Woodhead Publishing, 2015; 1-10.
- [25]. M. Véronique, History of biomaterials, *Biomaterials*, 2014; 1-10.
- [26]. A. J. Festas, A. Ramos, J. P. Davim, Medical devices biomaterials—A review, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, 2019; 234: 218-228.
- [27]. J.Y. Wong, J.D. Bronzino, *Biomaterials*, by Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, London, New York, 2007.
- [28]. C. Chollet, Intérêt de la maîtrise de la microtopochimie superficielle pour contrôler les interactions matériaux-tissus, Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 1, France, 2007.

- [29]. M. Arioua, Elaboration et caractérisation d'un substitut osseux poreux à base de verre bioactif, Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Lyon, France, 2007.
- [30]. L.L. Hench, The story of Bioglass, *J Mater Sci: Mater Med*, 2006; 17: 967-978.
- [31]. B. Ben-Nissan, H. O. Ylanen, Bioactive Glasses and Glass Ceramics, *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 2006; 1-13.
- [32]. F. Zivic, S. Affatato, M. Trajanovic, M. Schnabelrauch, N. Grujovic, K. L. Choy (ed). *Biomaterials in Clinical Practice Advances in Clinical Research and Medical Devices*, Springer, 2017.
- [33]. A. Milleville. L. Bellot-Gourlet, B. Champagnon, D. Santallier, La micro-spectroscopie Raman pour l'étude des obsidiennes : structure, micro-inclusions et études de provenance ?, In: *Revue d'Archéométrie*, 2003; 27: 123-130.
- [34]. L.L. Hench. Bioceramics: from concept to clinic, *Journal of the american ceramic society*, 1991; 74: 1487-1510.
- [35]. G.E. Merwin. Bioglass middle ear prosthesis: preliminary report, *Ann Otology Rhinol Laryngol*, 1986; 1: 78-82.
- [36]. E. Schepers, M.D. Clercq, P. Ducheyne, R. Kempeneers. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions, *J Oral Rehabil*, 1991; 18: 439-452.
- [37]. I. Allan, H. Newman, M. Wilson, Antibacterail activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria, *Biomaterials*, 2001; 22: 1683-1687.
- [38]. N. Aldini, M. Fini, G. Giavaresi, L. Martini, B. Dubini, M.P. Bossi, F. Rustichelli, A. Krajewski, A. Ravaglioli, M. Mazzocchi, R. Giardino, Osteointegration of bioactive glass coated and uncaoted zirconia in osteopenic bone : an in vitro experimental study, *J Biomed Mater Res*, 2004; 68A: 264-272.
- [39]. V. Stanic, N. Aldini, M. Fini, G. Giavaresi, R. Giardino, A. Krajewski, A. Ravaglioli, M. Mazzocchi, B. Dubini, M.G. Bossi, F. Rustichelli. Osteointegration of bioactive glass cated zirconia in healthy bone: an in vivo evaluation, *Biomaterials*, 2002; 18: 3833-3841.
- [40]. J.A. Roether, A.R. Boccaccini, L.L. Hench, V. Maquet, S. Gautier, R. Jerjme. Development and in vitro characterization of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polyactile foams and bioglass for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 2002; 18 : 3871-3888.
- [41]. A.R. Curtis, N.X. West, B. Su, Synthesis of nanobioglass and formation of apatite rods to occlude exposed dentine tubules and eliminate hypersensitivity, *Acta Biomaterialia*, 2010; 6: 3740-3746.

- [42]. B. Ben-Nissan, A.H. Choi, Innocent Macha. Advances in bioglass and glass ceramics for biomedical applications, *Biomaterials for Implants and Scaffolds*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2017. 133-161.
- [43]. P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench. Characterization of Melt-Derived 45S5 and sol-gel-derived 58S Bioactive Glasses, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001; 58: 734-740.
- [44]. A. C.Pierre. Introduction aux procédés sol-gel, Edition : SEPTIMA, Paris, 1992.
- [45]. J. Livage, C. Sanchez. Sol-gel chemistry, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1992; 145: 11-19.
- [46]. L.M. Mukundan, R. Nirmal, D. Vaikkath, P.D. Nair. A new synthesis route to high surface area sol gel bioactive glass through alcohol washing, *Biomatter*, 2013; 3: e24288-10.
- [47]. L.C. Bandeira, B.M. de Campos, E. H. de Faria, K.J. Ciuffi, P. S. Calefi, E. J. Nassar, J.V.L. Silva, M.F. Oliveira, I.A. Maia. TG/DTG/DTA/DSC As A Tool for Studying Deposition by The Sol-Gel Process on Materials Obtained by Rapid Prototyping, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2009 ; 97: 67-70.
- [48]. A.J. Vreugdenhil, V.N. Balbyshev, M.S. Donley. Nanostructured Silicon Sol-Gel Surface Treatments for AI 2024-T3 Protection, *Journal of Coatings Technology*, 2001; 73: 35-43.
- [49]. C.L. Klein. (ed). Sol-gel technology for thin films, fibers, preforms, electronics and specialty shapes. William andrew, 1988.
- [50]. C.J. Barbe, D.J. Cassidy, G. Triani, B.A. Latella, D.R.G. Mitchell, K.S. Finnie, J.R. Bartlett, J.L. Woolfrey, G.A. Collins. Sol-gel bonding of silicon wafers: Part 2. Influence of the sol-gel chemistry on bond morphology and interfacial energy, *Thin Solid Films*, 2005; 488: 160-166.
- [51]. M.G. Garnica Romo, J.M. Yanez Limon, J. Gonzalez Hernandez, R. Ramirez Bon. Structure and Electron Spin Resonance of Annealed Sol-Gel Glasses Containing Ag, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 24, 105-112, 2002.
- [53]. S.C. Christopher, E.I. Donald. Tensegrity and mechanoregulation: from skeleton to cytoskeleton. *Osteoarthritis and Cartilage*, 1999; 7: 81-94.
- [54]. R. Bruce Martin, D.B. Burr, N.A. Sharkey, D.P. Fyhrie. *Skeletal Tissue Mechanics*, New York: springer, 1998.
- [55]. R. Florencio-Silva, G.R. da Silva Sasso, E.S. Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*, BioMed research international, 2015.

- [56]. M. Kozielski, T. Buchwald, M. Szybowicz, Z. Błaszczak, A. Piotrowski, B. Ciesielczyk. Determination of composition and structure of spongy bone tissue in human head of femur by Raman spectral mapping, *J Mater Sci: Mater Med*, 2011; 22:1653–1661.
- [57]. X. Feng. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease, *Current Chemical Biology*, 2009; 3: 189-196.
- [58]. J. Desoutter, R. Mentaverri, M. Brazier, S. Kamel. Le remodelage osseux normal et pathologique, *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2012 ; 446 : 33-42.
- [59]. P. Fratzl, R. Weinkamer, Nature's hierarchical materials. *Progress in materials Science*, 2007; 52: 1263-1334.
- [60]. R. K. Fuchs, S. J. Warden, C. H. Turner, Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading, In : *Bone repair biomaterials*. Woodhead Publishing, 2009; 25-68.
- [61]. N.E. Marieb, H. Katja, L. Moussakova, R. Lachaine. Anatomie et physiologie humaines, (4e éd.). Saint-Laurent : Éditions du Renouveau Pédagogique Inc, 2005.
- [62]. J.A. Buckwalter, M.J. Glimcher, R.R. Cooper, R. Recker. Bone biology I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization, *Instr. Course Lect*, 1996; 45: 371-386.
- [63]. B.M. Schaffler, B.D. Burr. Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *Journal of biomechanics*, 1988; 21: 13-16.
- [64]. P. Zioupos, R.B. Cook, J.R. Hutchinson. Some basic relationships between density values in cancellous and cortical bone, *Journal of biomechanics*, 2008; 41: 1961-1968.
- [65]. F. Ader, J. Salomon, C. Perronne, L. Bernard. Origine de l'infection osseuse : endogène ou exogène ? *Éléments de physiopathologie, Médecine et maladies infectieuses*, 2004 ; 34: 530–537.
- [66]. C. Bart. Normal bone anatomy and physiology, *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 2008; 3: S131-S139.
- [67]. H. Fonseca, D.M. Gonçalves, H.J.A. Coriolano, J.A. Duarte. Bone Quality: The Determinants of Bone Strength and Fragility, *Sports medicine*, 2014; 44: 37-53.
- [68]. M.R. Iaquina, E. Mazzoni, M. Manfrini, A. D'Agostino, L. Trevisiol, R. Nocini, L. Trombelli, G. B. Brodano, F. Martini, M. Tognon. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019; 20 : 618-634.
- [69]. K.M. Alghazali, Z.A. Nima, R.N. Hamzah, M.S. Dhar, D.E. Anderson, A.S. Biris. Bone-tissue engineering: complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies, 2015; 47: 1-24.

- [70]. J.B. Lian, G.S. Stein, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, M.Q. Hassan, T. Gaur, Y. Zhang. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol (NATURE REVIEWS | ENDOCRINOLOGY)*, 2012; 8: 212–227.
- [71]. N. Ghani, F.E. Abourazzak, T. Harzy. Le remodelage osseux et ses implications thérapeutiques dans l'ostéoporose : mise au point, *Revue Marocaine de Rhumatologie*, 2012 ; 21: 10-15.
- [72]. M.C. de Vernejoul, P. Marie. Cellules osseuses et remodelage osseux, *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 1 1 92-1203.
- [73]. R. Owen, G.C. Reilly. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018; 6: 134-155.
- [74]. G. Pavon-Djavid, G. Hélyary, V. Migonney. Les biomatériaux inhibiteurs de l'adhérence et de la prolifération bactérienne : un enjeu pour la prévention des infections sur matériel prothétique, *ITBM-RBM*, 2005 ; 26 : 183–191.
- [75]. F. Ordikhani, S.P. Zustiak, A. Simchi. Surface Modifications of Titanium Implants by Multilayer Bioactive Coatings with Drug Delivery Potential: Antimicrobial, Biological, and Drug Release Studies, *JOM*, 2016; 68: 1100-1108.
- [76] S.H. Luo, W. Xiao, X.J. Wei, W.T. Jia, C.Q. Zhang, W.H. Huang, D.X. Jin, M.N. Rahaman, D.E. Day. In vitro evaluation of cytotoxicity of silver-containing borate bioactive glass, *journal of biomedical materials research b: applied biomaterials*, 2010; 95B: 441-448.
- [77]. O. Borens, F. Nussbaumer, R. Baalbaki, A. Trampuz. Diagnostic et traitement des infections d'implants orthopédiques, *Rev Med Suisse*, 2009 ; 5 : 2563-2568.
- [78]. C. Cyteval, A. Bourdon. Imagerie des infections sur matériel orthopédique, *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*, 2012 ; 93 : 578-589.
- [79]. N. Desplaces. Les bactéries anaérobies en pathologie osseuse. *Med mal Infect*, 2000 ; 30: 97-101.
- [80]. M.T. Cunha, M.A. Murça, S. Nigro, G.B. Klautau, M.J.C. Salles. In vitro antibacterial activity of bioactive glass S53P4 on multiresistant pathogens causing osteomyelitis and prosthetic joint infection, *BMC Infectious Diseases*, 2018; 18:157-163.
- [81]. M. Teweldemedhin, H. Gebreyesus, A.H. Atsbaha, S.W. Asgedom, M. Saravanan. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review, *Teweldemedhin et al. BMC Ophthalmology*, 2017; 17: 212-221.
- [82]. H. Carsenti-Dellamonica, Infections associées aux implants orthopédiques Infections associated with orthopedic implanted devices, *Antibiotiques*, 2008 ; 10 : 3-15.

- [83]. R.J. Rubin, C.A. Harrington, A. Poon, K. Dietrich, J.A. Greene, A. Moiduddin. The Economic Impact of Staphylococcus aureus Infection in New York City Hospitals, *Emerging Infectious Diseases*, 1999; 5: 9-17.
- [84]. E. Forestiera, V. Rémy, M. Mohseni-Zadeh, O. Lesens, B. Jauhac, D. Christmann, Y. Hansmann. Bactériémies à Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline aspects épidémiologiques et thérapeutiques récents. MRSA Bacteremia: recent epidemiological and therapeutical trends, *La Revue de médecine interne*, 2007 ; 28 : 746–755.
- [85]. D.J. Livorsi, N.G. Daver, R.L. Atmar, S.A. Shelburne, A.C. White, D.M. Musher. Outcomes of treatment for hematogenous Staphylococcus aureus vertebral osteomyelitis in the MRSA ERA, *Journal of Infection*, 2008; 57: 128-131.
- [86]. J. Hacker. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of Escherichia coli infections, *Canadian Journal of Microbiology*, 1992; 38: 720-727.
- [87]. J. El Bakkouri, H. Belabbes, K. Zerouali, A. Belaiche, D. Messaouidi, J.D.P. Gros Claude, N. El Mdaghri. Résistance aux Antibiotiques d'Escherichia coli Uropathogène Communautaire et Consommation d'Antibiotiques à Casablanca (Maroc), *European Journal of Scientific Research*, 2009 ; 36: 49-55.
- [88]. Z.D. Rakotovoao-Ravahatra, F.M. Randriatsarafara, S. Rasoanandrasana, L. Raverohanta, A.L. Rakotovoao. Phénotypes de résistance des souches d'Escherichia coli responsables d'infection urinaire au laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Befelatanana Antananarivo, *Pan African Medical Journal*, 2017 ; 26: 166-175.
- [89]. F.L. Mayer, D. Wilson, B. Hube. Candida albicans pathogenicity mechanisms, *Virulence*, 2013; 4: 119-128.
- [90]. D. Poulain. Candida albicans, plasticité et pathogénie, *revue francophone des laboratoires*, 2013 ; 450 : 37-46.
- [91]. M. Develoux, S. Bretagne. Candidoses et levuroses diverses Candidiasis and yeast infections, *EMC-Maladies Infectieuses*, 2005 ; 2 : 119–139.
- [92]. A. Forastiero, V. Garcia-Gil, O. Rivero-Menendez, R. Garcia-Rubio, M. C. Monteiro, A. Iastruey-Izquierdo, R. Jordan, I. Agorio, E. Mellado. Rapid Development of Candida krusei Echinocandin Resistance during Caspofungin Therapy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015; 59: 6975-6982.
- [93]. P.C. Iwen, D.M. Kelly, E.C. Reed, S.H. Hinrichs. Invasive Infection Due to Candida krusei in Immunocompromised Patients Not Treated with Fluconazole, *Clinical Infectious Diseases*, 1995; 20:342-347.

- [94]. M. Tan, J. Wang, P. Hu, B. Wang, W. Xu, J. Chen. Severe pneumonia due to infection with *Candida krusei* in a case of suspected Middle East respiratory syndrome: A case report and literature review, *experimental and therapeutic medicine*, 2016; 12: 4085-4088.
- [95]. D. Lebeaux, J.M. Ghigo. Infections associées aux biofilms. Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale?, *medecine/sciences* 2012 ; 28 : 727-39.
- [96]. L. Drago, C. Vassena, S. Fenu, E. De Vecchi, V. Signori, R. De Francesco, C.L. Romanò. In vitro antibiofilm activity of bioactive glass S53P4, *Future Microbiol*, 2014; 9: 593-601.
- [97]. Megan Ottomeyer<sup>1</sup>, Ali Mohammadkah, Delbert Day, David Westenberg, Broad-Spectrum Antibacterial Characteristics of Four Novel Borate-Based Bioactive Glasses, *Advances in Microbiology*, 2016 ; 6 : 776-787.
- [98]. I. Allan, H. Newman, M. Wilson, Antibacterial activity of particulate Bioglass\_ against supra- and subgingival bacteria, *Biomaterials*, 2001; 22: 1683-1687.
- [99]. L. Drago, E. De Vecchi, M. Bortolin, M. Toscano, R. Mattina, C.L. Romanò. Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulations against multidrug resistant strains, *Future Microbiol*, 2015; 10 : 1293-1299.
- [100]. N. Lindfors, J. Geurts, L. Drago, J.J. Arts, V. Juutilainen, P. Hyvonen, A. Suda, A. Domenico, S. Artiacco, C. Alizadeh, A. Brychcy, J. Bialecki, C. Romano. Antibacterial Bioactive Glass, S53P4, for Chronic Bone Infections – A Multinational Study, a Modern Approach to Biofilm-Related Orthopaedic Implant Infections, 2016; 81-92.
- [101]. M. Bellantone, N.J. Coleman, L.L. Hench. Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass, *J Biomed Mater Res*, 2000 ; 51 : 484–490.
- [102]. E. Munukka, O. Lepparanta, M. Korkeamaki, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, H. Ylanen, J.I. Salonen, M.K. Viljanen, E. Eerola. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria, *J Mater Sci: Mater Med*, 2008; 19:27–32.
- [103]. D.C. Coraça-Huber, M. Fille, J. Hausdorfer, D. Putzer, M. Nogler. Efficacy of Antibacterial Bioactive Glass S53P4 Against *S. aureus* Biofilms Grown on Titanium Discs In Vitro, *journal of orthopaedic research*, 2014; 32: 175-177].
- [104]. N. Raison-Peyron. Implants et prothèses (hors dentisterie) et allergie aux métaux, *Revue française d'allergologie*, 2010 ; 50 : S23–S28.
- [105]. C. Delaunay, I. Petit, I.D. Learmonth, P. Oger, P. A. Vendittoli. Couple de frottement métal-métal des prothèses totales de hanches : surveillance du relargage des ions métalliques cobalt et chrome, *Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique*, 2010 ; 96 : 990-1001.
- [106]. J.R. Davis. Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices, *Handbook of Materials for Medical Devices*, 1-11, 2013.

- [107]. J.R. Davis. *Metallic Materials, Handbook of Materials for Medical Devices*, 21-50, 2013.
- [108]. M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell, *Biomaterials in orthopaedics, Journal of Royal Society Interface*, 2008; 5: 1137-1158.
- [109]. A.C. Vieira, A.R. Ribeiro, L.A. Rocha, J.P. Celis, *Influence of pH and corrosion inhibitors on the tribocorrosion of titanium in artificial saliva, Wear*, 2006; 261: 994–1001.
- [110]. J. Lévesque, D. Mantovani. *Les biomatériaux métalliques : de l'industrie à la salle d'opération, Le Médecin du Québec*, 2003 ; 38 : 91-93.
- [111]. I. Gotman. *Characteristics of Metals Used in Implants, Journal of Endourology*, 1997; 11: 383-389.
- [112]. J. A. Disegil, L. Eschbachz. *Stainless steel in bone surgery, ( Injury International Journal of the Care of the Injured) Injury, Int. I. Care Injured*, 2000; 31: S-D2-6.
- [113]. D. Sidane. *Influence d'Oxydes de Titane et de Silice sur le Comportement de Revêtements Prothétiques en Hydroxyapatite: Application au Biomédical, Thèse de doctorat, Laboratoire de Génie de l'Environnement, université de Béjaia, Algérie*, 2017.
- [114]. L. Rony, R. Lancigu, L. Hubert. *Intraosseous metal implants in orthopedics:A review, Morphologie*, 2018; 102 : 231-242.
- [115]. M.A. Ur Rehman, F.E. Bastan, B. Haider, A.R. Boccaccini. *Electrophoretic Deposition of PEEK/Bioactive glass Composite Coatings for Orthopedic Implants: A Design of Experiment (DoE) Study, Materials & Design*, 2017; 130: 223-230.
- [116]. J.N. Oliver, Y. Su, X. Lu, P. Kuo, J. Du, D. Zhu. *Bioactive Glass Coating on Metallic Implants for Biomedical Applications, Bioactive Materials*, 2019; 4: 261–270.
- [117]. M.H. Fathi, A. Doostmohammadi. *Bioactive glass nanopowder and bioglass coating for biocompatibility improvement of metallic implant, journal of materials processing technology*, 2009; 209: 1385–1391.
- [118]. A. Dehghanhadikolaei, B. Fotovvati. *Coating Techniques for Functional Enhancement of Metal Implants for Bone Replacement: A Review, Materials*, 2019; 12: 1795.
- [119]. T.J. Levingstone, M. Ardhaoui, K. Benyounis, L. Looney, J.T. Stokes. *Plasma Sprayed Hydroxyapatite Coatings: Understanding Process Relationships using Design of Experiment Analysis, Surface & Coatings Technology*, 2015; 283: 29-36.
- [120]. C.W. Kang, F.Z. Fang. *State of the art of bio implants manufacturing: part II, Adv. Manuf.*, 2018; 6:137-154.
- [121]. R.N. Borşa. *Elaboration de poudres et de dépôts de phosphates de calcium silicatés à usage de Biomatériaux, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France*, 2008.

- [122]. I. N. Mihailescu, E. Gyorgy. Pulsed Laser Deposition: An Overview, *International Trends in Optics and Photonics*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1999; 201-214.
- [123]. F. Collignon. Cahier technologique Sol-Gel, Edité par Certech, 2008 ; p0-140.
- [124]. Y. Hamedani, P. Macha, T.J. Bunning, R.R. Naik, M.C. Vasudev. Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition: Where we are and the Outlook for the Future, *InTech*, chapter 10, 2016; 247-280.
- [125]. S.A. Jacota Popescu. films minces de dioxyde de titane déposés sur titane par mocvd : microstructure et biocompatibilité, Thèse de doctorat, l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 2008.
- [126]. A.R. Boccaccini, S. Keim, R.Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky. Electrophoretic deposition of Biomaterials, *J. R. Soc. Interface*, 2010; 7: S581-S613.
- [127]. M. Ammam. Electrophoretic deposition under modulated electric fields: a review, *RSC Advances*, 2012; 2: 7633-7646.
- [128]. L. Besra, M. Liu. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD), *Progress in Materials Science*, 2007; 52: 1–61.
- [129]. M. Diba, D.W.H. Fam, A.R. Boccaccini, M.S.P. Shaffer. Electrophoretic deposition of graphene-related materials: A review of the fundamentals, *Progress in Materials Science*, 2016; 82: 83–117.
- [130]. A.R. Boccaccini, J.A. Roether, B.J.C. Thomas, M.S.P. Shaffer, E. Chavez, E. Stoll, E.J. Minay, The electrophoretic deposition of inorganic nanoscaled materials-a review, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 2006; 114: 1-14.
- [131]. E.G. Kalinina, E.Y. Pikalova. New trends in the development of electrophoretic deposition method in the solid oxide fuel cell technology: theoretical approaches, experimental solutions and development prospects, *Russian Chemical Reviews*, 2019; 88: 1179-1219.

***CHAPITRE II. MATERIAUX, APPAREILS ET METHODES  
EXPERIMENTALES D'ANALYSES UTILISEES***

## **CHAPITRE II. MATERIAUX, APPAREILS ET METHODES EXPERIMENTALES D'ANALYSES UTILISEES**

Ce chapitre présente brièvement la méthode de synthèse adaptée à la préparation des poudres de verre bioactifs ternaire dont le système est  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  via la méthode sol gel et l'élaboration des revêtements des poudres synthétisées sur des substrats en acier inoxydable 316L par la méthode d'électrophorèse. Les moyens d'analyse utilisés pour caractériser les matériaux élaborés sont décrits dans ce chapitre, ensuite une étude *in vitro* du comportement des poudres en milieu physiologique simulé (SBF) ainsi qu'une étude de biocompatibilité *in vitro* est menée par culture de cellules ostéoblastiques humain MG63 et les cellules fibroblastiques 3T3 à la surface des poudres. Par ailleurs ; les différentes étapes utilisées pour l'évaluation de leur activité antibactérienne vis-à-vis de quatre microorganismes pathogènes très fréquents, à savoir les deux bactéries : *Eschérichia coli* à GRAM négatif, et *Staphylococcus aureus* à GRAM positif et les deux Candida : *Candida Albicane* et *Candida Krusei* sont présentés au cours de cette étude. En fin, les tests de corrosion, de rugosité et d'épaisseur des revêtements en bioverre sont aussi décrits. Les différentes techniques de caractérisations utilisées pour déterminer les propriétés physicochimiques et morphologiques des poudres synthétisées sont présentées vers la fin de ce chapitre.

### **II.1. Elaboration des poudres de verre bioactif ternaire**

Parmi les deux méthodes de synthèses décrites dans le premier chapitre, la voie sol-gel a été choisie pour mener notre étude.

#### **II.1.1. Synthèse des poudres**

La synthèse des poudres de verre bioactif est réalisée par voie sol gel en milieu éthanol [1]. Des solutions colloïdales (sols) de composition 63S (63 %  $\text{SiO}_2$ , 28 %  $\text{CaO}$ , 9 %  $\text{P}_2\text{O}_5$  (% mol)) ont été préparées en mélangeant l'eau distillée, l'acide chlorhydrique (HCl) 2N, le tétraéthyle orthosilicate (TEOS), le triéthyle phosphate (TEP) et le nitrate de calcium ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

##### **a- Préparation du sol**

Le procédé initial consiste à mélanger 28 ml de TEOS avec 40 ml d'éthanol en tant que milieu alcooliques sous agitation pendant 10 min. Ensuite, l'eau distillée est ajoutée à la solution avec un rapport molaire  $\text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$  de 4:1 afin d'initier la réaction d'hydrolyse. Après 30 minutes d'agitation, 2,3 ml de TEP est ajoutée à la solution et après encore 30 minutes, 12 g de nitrate de calcium sont ajoutées comme source de phosphore et calcium, respectivement. L'acide

chlorhydrique (HCl) est utilisé comme catalyseur et la solution est alors agitée pendant deux heures additionnelles.

### **b- Gélification et vieillissement**

Dans cette étape les solutions sont chauffées à une température de 60°C durant 10h. Les ions issus des précurseurs sont dissous dans le sol avant la transition sol-gel.

### **c- Séchage**

L'étape de séchage permet l'évaporation des solvants (eau, éthanol). Deux types de séchage sont utilisés, la première solution est chauffée à 60°C pendant 10 heures, puis séchée à 130°C pendant 20 heures pour obtenir une poudre de verre bioactif xérogel notés XG et la deuxième solution est chauffée à 60°C pendant 1 heures puis transmit dans un autoclave sous conditions supercritique d'éthanol (pression de 69 bars, température de 245°C) pour obtenir une poudre de verre bioactif aérogel noté AGE.

### **d- Calcination**

Les poudres obtenues sont broyées et calcinées à différentes température à savoir 400°C, 600°C et 800°C pendant 2 heures avec une vitesse de chauffe de 5°/min. Les poudres de verre bioactif à partir de xérogel calcinées à 400°C, 600°C et 800°C sont notées XG-400, XG-600 et XG-800, respectivement. Les poudres préparées à partir d'aérogel calcinées à 400°C, 600°C et 800°C sont notées AGE-400, AGE-600 et AGE-800 respectivement.

Afin d'étudier l'influence de type de solvants sur la microstructure et la morphologie des verres bioactifs aérogel deux autres solvants sont utilisés dans ce travail : l'acétone et le méthanol ainsi calcinées à 600°C sont notées AGA-600 et AGM-600, respectivement.

L'objectif de cette étape est double. Premièrement, à partir de 300-400°C, la décomposition des nitrates a lieu. Deuxièmement, à partir de 600°C, intervient la densification pendant laquelle le réseau 3D macroscopique est formé. Cette étape est rendue possible grâce à la fusion des particules secondaires, via un flux visqueux dû à la température relativement haute du traitement thermique [2,3]. Les étapes suivies pour élaborer les poudres de verre bioactif sont représentées dans la Figure II-1.

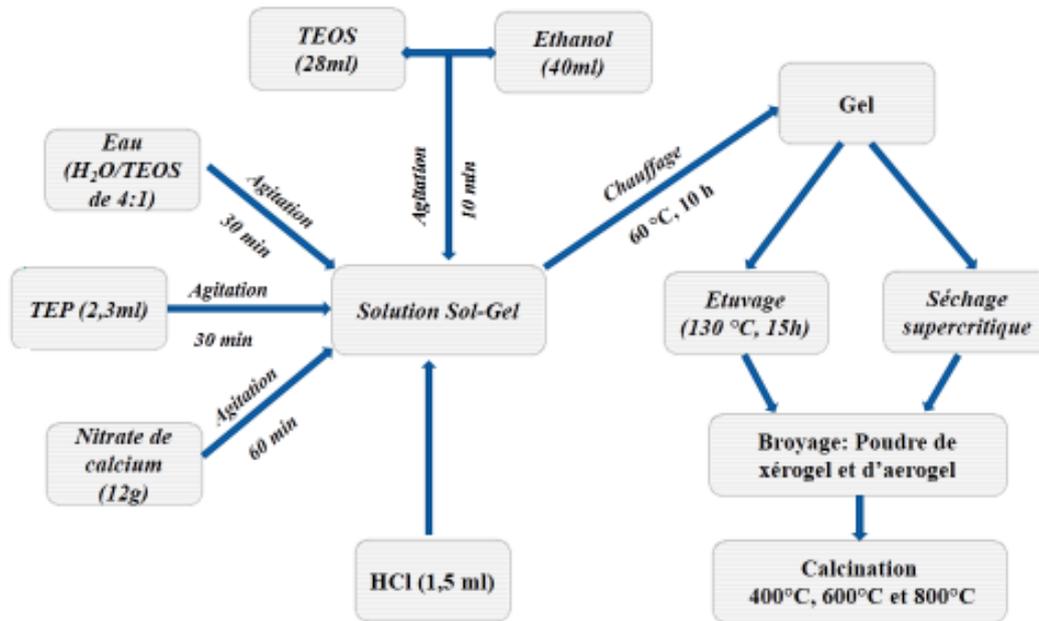


Figure II.1 : Schéma récapitulatif de la synthèse des poudres de bioverre par voie sol-gel.

## II.2. Evaluation de la bioactivité des poudres de bioverre

### II.2.1. Préparation du SBF (Simulated Body Fluid)

Il est clairement établi que la capacité des matières biologiques à se lier aux tissus vivants dépend de leur capacité à : 1) libérer certaines substances ioniques à des concentrations appropriées, et 2) former une couche apatitique au contact de fluides biologiques imitant le plasma sanguin. Par conséquent, les tests *in vitro* sont un outil puissant pour évaluer l'activité biologique des matériaux.

Kokubo et ses collègues [4, 5] ont développé un fluide corporel simulé acellulaire SBF (Simulated Body Fluid) qui a des concentrations d'ions inorganiques (partie minérale) similaires à celles du fluide extracellulaire humain (plasma humain), afin de reproduire la formation d'apatite sur des matériaux bioactifs *in vitro*. Le fluide corporel simulé est souvent abrégé en solution SBF ou Kokubo. Les concentrations ioniques du SBF sont données dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Concentrations ioniques du fluide corporel simulé SBF et du plasma sanguin humain [4, 5].

Eléments		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Concentration mmol/L	SBF	142	5	1,5	2,5	147,8	4,2	1	0,5
	Plasma humain	142	5	1,5	2,5	103	27	27	0,5

La solution SBF est préparée selon le protocole standard proposé par Kokubo et al. [4, 5]. Les produits utilisés (sous forme de poudres) sont dissous un par un, suivant l'ordre indiqué dans le tableau II.2, dans 750ml d'eau déminéralisée placée dans un flacon de 1000ml sous agitation et à une température de 37°C. Le mélange est ensuite tamponné au pH normal du plasma humain (pH=7,4) à l'aide de Tris et de l'acide chlorhydrique et complété à un litre avec de l'eau déminéralisée. Il est ensuite refroidi jusqu'à 20°C puis conservée dans un flacon en polyéthylène à une température située entre 5 et 10°C afin qu'il n'y ai pas précipitation des réactifs.

**Tableau II.2.** Ordre d'addition et quantités de réactifs pour la préparation de la solution SBF

Ordre	Réactifs	Formule	Quantité
1	Chlorure de sodium	NaCl	7,996g
2	Hydrogénocarbonate de sodium	NaHCO <sub>3</sub>	0,350g
3	Chlorure de potassium	KCl	0,224
4	Hydrogénophosphate de potassium trihydraté	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,228g
5	Chlorure de magnésium hexahydrate	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305
6	Chlorure de calcium	CaCl <sub>2</sub>	0,278g
7	Sulfate de sodium	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.071g
8	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,057g
9	Acide chlorhydrique	HCl	Ajuster le pH

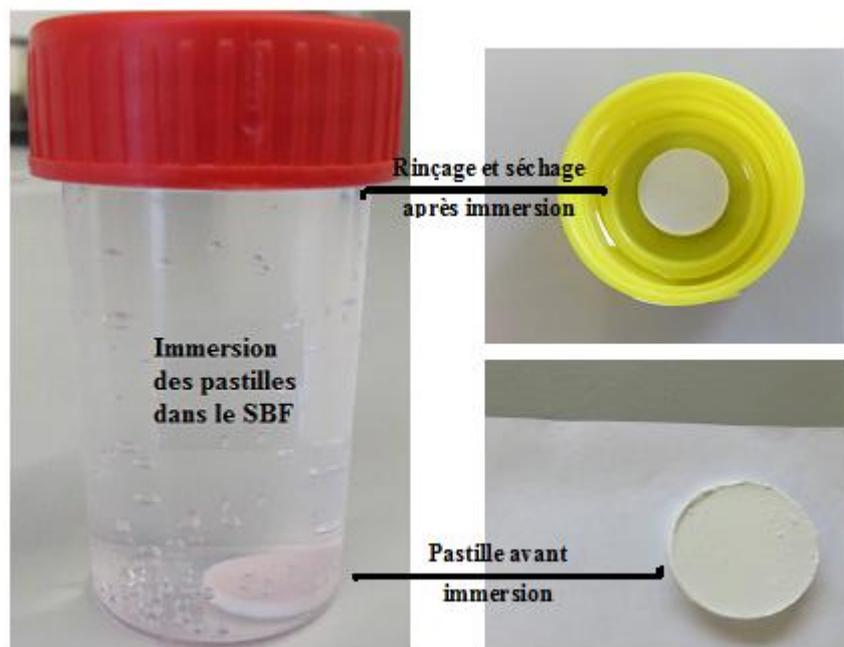
### II.2.2. Mise en évidence de la bioactivité des poudres de bioverre

Pour étudier la bioactivité, les poudres de verre bioactif ont été broyées et tamisées à une granulométrie de 38µm et pressées à l'aide d'une presse sous forme de pastilles (15 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur et d'une masse de 200 mg) afin de tester leur activité biologique *in vitro*. Ensuite, les pastilles ont été immergées dans un fluide corporel simulé (SBF). Le volume de solution SBF à ajouter dépend de la surface apparente (Sa) des échantillons selon l'expression suivante [4, 5] :

$$V_{\text{SBF}} = \frac{S_a}{10} \quad \text{Equation II. 1}$$

La surface apparente des pastilles étant de l'ordre de 450 mm<sup>2</sup>, le volume de solution SBF nécessaire pour réaliser les essais de bioactivité est de 45 ml. L'immersion des échantillons se fait dans des flacons en polyéthylène de 50 ml avec bouchon. Les flacons sont ensuite placés dans une étuve à 37°C pendant les temps d'immersion de 1, 3 et 7 jours. Le pH de la solution SBF utilisé est tamponné à 7,4. La solution SBF des échantillons est rafraîchie tous les deux

jours. A l'issue de ces différentes immersions, les pastilles ont été, rincées avec l'eau distillée puis séchées sous atmosphère ambiante. Les solutions SBF après immersion des échantillons sont récoltées et conservées à 5°C afin d'être dosée en ICP-AES. Les pastilles sans immersion dans la solution SBF sont notés (0 J). A l'issue de l'immersion en milieu SBF, la surface des pastilles est analysée par diffraction des rayons X et par spectroscopie infrarouge en mode ATR. La surface des pastilles est également observée par microscopie électronique à balayage et spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS) pour l'analyse élémentaire. Le pH des solutions SBF récoltées après immersion est mesuré à l'aide d'une sonde pH.



*Figure II.2 : Immersion des pastilles de poudres de verre bioactif dans la solution SBF*

### II.3. Étude du comportement des poudres en milieu cellulaire

La cytocompatibilité est déterminée en étudiant le comportement des ostéoblastes MG63 cultivés directement sur la surface des pastilles de verre bioactif et le comportement des fibroblastes 3T3 en utilisant le contact indirect sur les poudres de verre bioactif.

#### II.3.1. Essais d'adhésion cellulaire et de prolifération des cellules MG63

##### II.3.1.1. Culture des cellules MG63

Les cellules ostéoblastes MG63 obtenues de la Faculté de médecine dentaire, Université de Porto-Portugal, ont été cultivées dans du milieu essentiel  $\alpha$ -minimal ( $\alpha$ -MEM) additionné de 10% de sérum fœtal bovin (FBS), 1% de pénicilline, 1% d'acide ascorbique et 1% de Fungizone à 37°C sous une atmosphère humidifiée de 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air. Les cellules sontensemencées

dans des flacons en T de 25 cm<sup>2</sup> jusqu'à confluence. Le détachement des cellules est obtenu par une incubation de 5 min dans la trypsine, puis, on ajoute le milieu de culture aux cellules afin de stopper la réaction. Ensuite, les cellules sont centrifugées pendant 5 min et remises en suspension dans un milieu de culture frais. Le comptage des cellules est effectuée en utilisant un mélange avec de bleu Trypan (1:1) et les cellules incolores (viables) sont comptées dans un hémocytomètre de Neubauer. Les cellules sontensemencées sur les pastilles de poudres de bioverre à une densité de  $4 \times 10^4$  cellules/ml.

### **II.3.1.2. Caractérisation du profil de cytocompatibilité**

L'adhérence et la prolifération des cellules de types ostéoblastique MG63ensemencées sur les pastilles de poudres de bioverre sont évaluées en utilisant un test de viabilité des cellules avec le test Resazurin qui donne une information sur la perméabilité de la membrane cellulaire. Après une incubation de 1, 3 et 7 jours, l'activité d'oxydo-réduction dans le cytosol des cellules viables est évaluée par la réduction de résazurine. 200 mg de chaque poudre de bioverre de granulométrie inférieur à 38 µm est pressé sous forme de pastilles de diamètre de 15 mm et d'épaisseur de 2 mm sont stérilisées dans un autoclave. Les pastilles sont ensuite rincées avec 1 ml de milieu de culture et incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air pendant 1 h. Après lavage, les pastilles sont transférées dans des plaques de culture à 12 puits et les cellules MG63 sontensemencées sur les pastilles à une densité de  $4 \times 10^4$  cellules par ml du milieu de culture complet et incubées à 37°C.

Trois essais de chaque échantillon sont utilisés pour les tests cellulaires et les pastilles avec un milieu de culture cellulaire et sans cellule sont utilisées comme témoins. Après une incubation de 1, 3 et 7 jours, le milieu de chaque puits est éliminé et remplacé par un mélange de 1000 µl de milieu de culture frais et 10% de solution de réactif résazurine. Après incubation des cellules pendant 3 heures, 100 µl de surnageant cellulaire est transféré dans une plaque à 96 puits et la fluorescence est lue à 530 et 590 nm pour l'excitation et l'émission, respectivement, dans une plaque de lecture (Synergy; BioTek). La viabilité des cellules a été obtenue en comparant la fluorescence du surnageant des cellules cultivées sur les matériaux à celle des contrôles.

### **II.3.1.3. Microscopie électronique à balayage**

La morphologie des pastilles de poudres de verre bioactif avec et sans cellule est analysée par MEB. Afin d'évaluer l'adhérence et la structure de la croissance cellulaire. Les cellules ostéoblaste MG63 sontensemencées sur les pastilles de verre bioactif comme décrit précédemment. Au bout de 1, 3 et 7 jours de culture, les pastilles sont fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde dans du PBS à 4°C puis, les pastilles sont rincées deux fois avec de l'eau distillée et déshydraté dans de l'éthanol gradué de 70, 80, 90 et 100% pendant 10 minutes dans chaque solution. Les pastilles de poudres de verre bioactif sont revêtues d'or/palladium avant l'observation au MEB.

### **II.3.2. Évaluation de la cytotoxicité par contact indirect des poudres en utilisant le test de rouge neutre (RN)**

Des cellules NIH 3T3 (fibroblastes d'embryons murins) sont utilisées pour étudier la biocompatibilité *in vitro*, selon les normes internationales [6, 7].

#### **II.3.2.1. Culture des cellules fibroblastes NIH/3T3**

Les cellules fibroblastes embryonnaires murins NIH/3T3, obtenues du Centre de recherche sur les nanomatériaux et les nanotechnologies (CINN), El Entrego, Espagne, sont cultivées dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Fetal Bovine Serum), 1% d'une solution antibiotique pénicilline-streptomycine et 1% de L-glutamine à 37°C sous une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture cellulaire de 25 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont incubées sous une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à pré confluence. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Les cellules sont rincées deux fois avec la solution tampon phosphate salin (PBS, Phosphate-buffered saline) puis détachées avec l'ajout de quelques ml de la trypsine et incubées entre 5 à 20 min. Ensuite, 5ml de milieu de culture est ajouté aux cellules afin de stopper la réaction et le mélange est centrifugé pendant 5 min. Enfin, les cellules coagulées sont remises en suspension dans un milieu de culture frais. Le comptage des cellules est effectué dans un hémocytomètre de Neubauer.

#### **II.3.2.2. Préparation de la suspension de poudre de bioverre**

200 mg de chaque échantillon de poudre de verre bioactif sont stérilisés à 121 °C pendant 20 min. Ensuite, 2 ml de DMEM supplémenté avec 5% du sérum de veau nouveau-né bovin (NBCS, Newborn Bovine Calf Serum) et 1% de la solution antibiotique pénicilline-

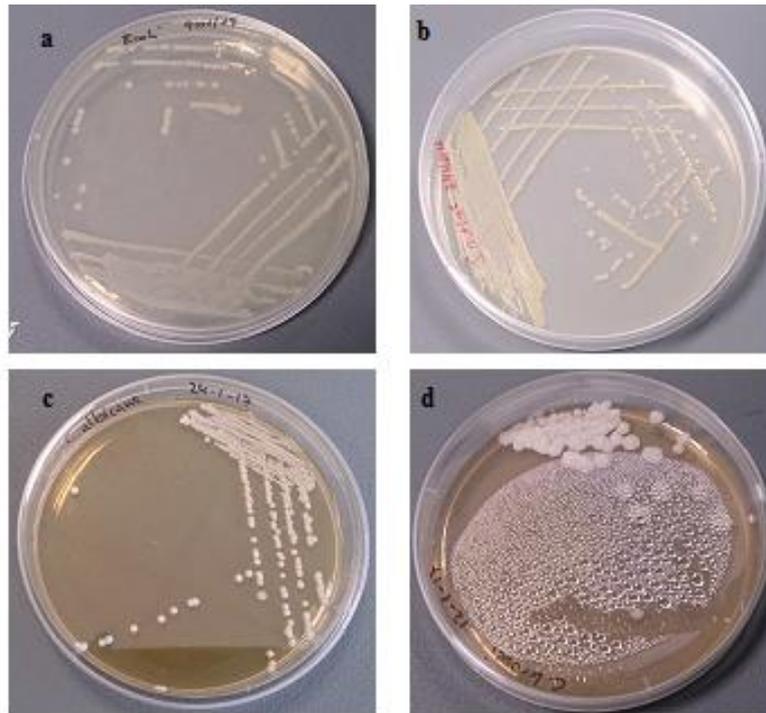
streptomycine sont ajoutés à chaque échantillon de poudre et incubés à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24, 48 et 72 h.

### **II.3.2.3. Viabilité cellulaire ; Test du rouge neutre (NR)**

Après chaque période spécifiée (24, 48 et 72h), les surnageants sont retirés, centrifugés et dilués par des facteurs de 1, 1/2, 1/10, 1/100 et 1/1000 en utilisant du milieu NBCS (100µl/puits) et chaque dilution est transférée dans une plaque à 96 puits contenant des cellulesensemencées à une densité de 10<sup>5</sup> cellules/puits. Les plaques contenant les cellules et les dilutions sont incubées pendant 24 h puis, le milieu NBCS a été éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). 100 µl de solution de rouge neutre (NR, Neutral Red) sont ajoutés à chaque puits et incubés pendant 3 h afin de réagir avec les cellules. Après 3 h, les solutions de NR sont éliminées et les plaques sont rincées deux fois avec du PBS ; puis, 150 µl de réactif de désorption (50 % d'éthanol absolu, 49 % d'eau distillée et 1 % d'acide acétique glacial) sont ajoutés à chaque puits pour arrêter la réaction. Après avoir ajouter le réactif de désorption, l'absorbance à une longueur d'onde de 540 nm, qui est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes en culture, est mesurée en utilisant un lecteur de microplaques BIO-RAD modèle 680. Tous les tests sont réalisés en triplicité. Trois contrôles sont utilisés dans ce test : un contrôle positif, des puits contenant des cellules et un milieu de culture NBCS avec 2% de Triton X-100 ; un contrôle négatif, des puits contenant des cellules et un milieu de culture NBCS et un témoin blanc, puits vides contenant du milieu de culture NBCS.

### **II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des poudres de verre bioactif**

Pour cette étude, deux souches de bactéries couramment impliquées dans l'infection hospitalière, apparues après la chirurgie sont sélectionnées pour tester l'activité antimicrobienne des poudres de verre bioactifs. *Escherichia coli* (*E. coli*) bactéries Gram-négatives, pathogènes conditionnés extrêmement résistants aux antibiotiques et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bactéries Gram-positives pathogènes, présentant le risque le plus élevé d'infection postopératoire en chirurgie prothétique et en reconstruction osseuse [8, 9]. Deux levures, *Candida Albicans* (*C. albicans*) et *Candida Krusei* (*C. krusei*) ont également été étudiées [10]. Ces quatre microorganismes utilisés dans ce travail sont présentés sur la figure II.3.



**Figure II.3.** Microorganismes pathogènes utilisés : a- *Escherichia coli*, b-*Staphylococcus aureus*, c- *Candida Albicans* et d- *Candida Krusei*.

En bref, une seule colonie d'*Escherichia coli* DH10B ou *Staphylococcus aureus* a été inoculée dans le milieu Luria Bertani (LB) (composition LB : 1% de tryptone; 0,5% d'extrait de levure; 1% de NaCl et 1,5% de gélose) pendant 12h à 37 °C. De la même manière, une seule colonie de *Candida albicans* ou *Candida krusei* a été inoculée dans du dextrose d'extrait de levure (YEPD). Le pH des milieux de culture est de 7. Chaque culture (10 µl) a été diluée dans du milieu frais (1 ml) et cultivée à 37°C pendant 6h. Cette suspension a été diluée dans du milieu LB ou YEPD frais pour obtenir une concentration bactérienne de  $10^5$  CFU / ml ; enfin, 100 mg, 50 mg, 12.5 ml et 6, 75 mg de chacune des poudres de verre ont été inoculés avec cette culture (1 mL). Une culture sans particules de verre a été utilisée comme témoin. Des échantillons ont été prélevés à 0, 24, 48 et 72 h pour déterminer les bactéries viables exprimées en unités formant colonie (Colony Forming Units ; CFU / ml). Le nombre de cellules bactériennes viables qui ont survécu a été déterminé en plaçant des dilutions en série sur des plaques de milieu LB solide. La limite de détection était de  $10^2$  CFU / mL. Les suspensions ont été centrifugées et le surnageant a été prélevé et utilisé pour les mesures de pH.



*Figure II.4 : Incubation des poudres de verre bioactif avec les bactéries E. coli en milieu LB.*

## **II.5. Elaboration des revêtements prothétiques à partir des poudres de verre bioactif par l'électrophorèse**

Les poudres de verre bioactifs aerogel et xerogel calcinées à 600°C ont été sélectionnées pour l'élaboration des revêtements prothétique sur des substrats en acier inoxydable 316L en utilisant la méthode d'électrophorèse.

### **II.5.1. Prétraitement de surface des substrats d'acier inoxydable 316L**

Afin d'améliorer la biocompatibilité et l'adhérence des dispositifs métalliques en modifiant les caractéristiques de leur oxyde de surface (topographie, rugosité), les biomatériaux métalliques ont subi divers traitements de surface (polissage mécanique par abrasion, lavage aux ultrasons et séchage). Ceux-ci éliminent les irrégularités causées par l'usinage précédent et nettoient la surface afin d'éliminer les impuretés présentes sur la surface des substrats métallique. Comme ils réduisent également la rugosité et produisent des surfaces homogènes riches en oxydes de fer et de chrome. Les étapes de traitement sont décrites ci-dessous :

**Polissage** : Les substrats en acier inoxydable 316L sous forme de plaques de dimensions de 30×10×2 mm, sont polis en utilisant une polisseuse, menée d'un disque pour la fixation des différents papiers de polissage (papier abrasif Si-C) de dimensions de 120, 400, 600, 800 et 1000 dans le but d'étudier l'influence de l'état de surface sur la morphologie des dépôts de bioverre.

**Lavage** : Après l'étape de polissage, les plaques d'acier 316L sont nettoyées à une température ambiante dans un bain à ultrasons. Le traitement ultrasonique des plaques s'effectue par un lavage dans de l'eau distillée, l'acétone, l'éthanol et l'eau distillée respectivement pour un

temps de 15 min dans chaque solvants, afin de retirer les débris de polissage (traces de papier abrasif : Si et C) ainsi que toute particule de poussière et substances organiques résiduelles.

**Séchage :** les plaques sont séchées sous air dans l'étuve à une température de 150°C durant 10 min et conservées pour l'utilisation dans les dépôts électrophorétique.

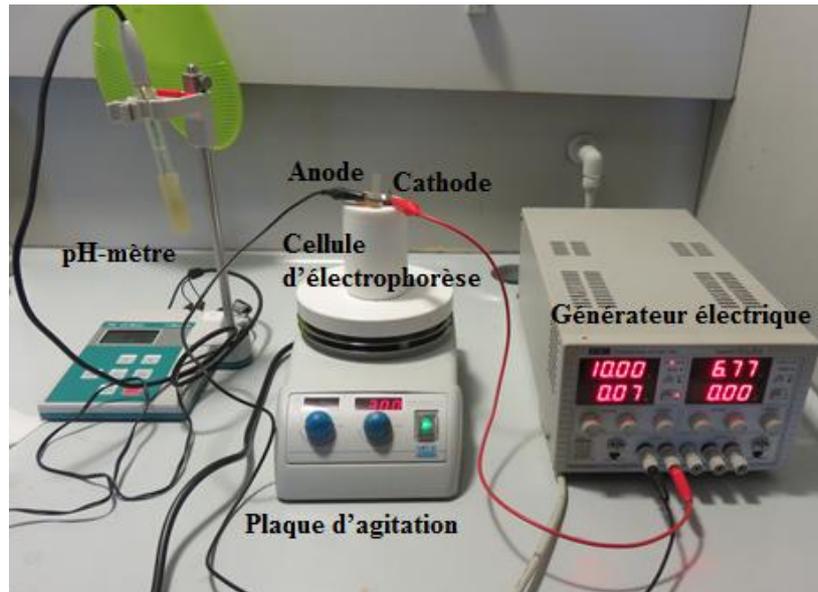
### **II.5.2. Détermination du potentiel zêta des suspensions de poudres de bioverre**

Les Zetasizer Nano offre la possibilité de mesurer trois caractéristiques de particules ou de molécules dans un milieu liquide. Ces trois paramètres fondamentaux sont la taille des particules, le potentiel zêta et le poids moléculaire. La technologie unique du système Zetasizer permet de mesurer ces paramètres sur une large gamme de concentrations [11]. La charge de surface des particules de bioverre est caractérisée par la mesure du potentiel zêta  $\zeta$  en utilisant le Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Malvern, Royaume-Uni). Le temps d'analyse était d'environ 1 minute à 25°C. Des mesures du potentiel zêta ont été effectuées pour différentes suspensions (poudre de bioverre et l'ammoniac) afin d'expliquer la charge de surface des particules de bioverre. L'agrégation des particules est moins susceptible de se produire en raison de la répulsion électrostatique pour les particules chargées avec un potentiel zêta optimal.

### **II.5.3. Procédés de revêtement électrophorétique**

Le processus d'électrophorèse est réalisé en mélangeant une masse de poudres de bioverre (5%) avec de l'eau distillé. La solution est agitée pour homogénéisation dans un ultrason durant 30 min. Le pH a été ajusté entre (12,5 et 13) avec une solution d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) à une température ambiante. La plaque du substrat de 316L (cathode) est plongée verticalement dans la suspension entourée d'une grille en acier inoxydable 316L (anode). Le test d'électrophorèse est réalisé sous agitation magnétique en appliquant des voltages de 10V et 5V pendant une période du temps qui varie entre 15 min et 60 min.

La figure II.5 montre une vue globale du montage expérimental que nous utilisons au laboratoire. Celui-ci est constitué d'une cellule d'électrophorèse ; constituée d'un béccher en téflon contenant une suspension dans lequel sont plongées deux électrodes : une cathode (plaque en acier inoxydable 316L de dimension égale à 30×10×2 mm) considéré comme électrode de travail et une anode (grille en acier inoxydable 316L), et d'un générateur électrique.



*Figure II.5 : Montage expérimental utilisé pour l'élaboration de revêtements prothétiques par électrophorèse.*

Les dépôts réalisés sont séchés à température ambiante puis calcinés sous vide à 500°C pendant 1h afin d'éliminer les résidus de précurseurs et améliorer leur adhérence au substrat.

## **II.6. Caractérisation des poudres et revêtements de bioverre**

Les différentes techniques de caractérisation physico-chimiques, structurales, morphologiques et biologiques des poudres et revêtements élaborés sont décrites dans la section suivante.

### **II.6.1. Diffraction des rayons X (DRX)**

#### **II.6.1.1. Principe**

La diffraction des rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique utilisée dans le but d'accéder à des informations qualitatives et quantitatives sur l'arrangement atomique des matériaux étudiés. L'identification des phases ainsi que l'évaluation des paramètres de mailles, voir la détermination de la structure cristalline, sont autant d'informations accessibles par cette méthode. On applique cette analyse soit aux poudres qui doivent être finement broyées ou aux échantillons massifs. La diffraction de rayons X consiste à observer l'interaction des rayons X avec la matière. Lors du bombardement de la matière par les rayons X, un rayonnement est émis dans toutes les directions avec des ondes de même phase et de même longueur d'onde. Cette diffusion entraîne des interférences entre les ondes cohérentes diffusées par chaque plan atomique formant ainsi une onde diffractée dont les caractéristiques dépendent de la structure cristalline de la matière.

L'orientation du faisceau diffracte est donnée par la loi de Bragg [12, 13] :

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad \text{Equation II. 2}$$

Où,  $\lambda$  : longueur d'onde du faisceau de rayons X.

$d_{hkl}$  : représente la distance entre deux plans réticulaires (hkl).

$\theta$  : angle d'incidence des rayons X sur la famille de plan.

### II.6.1.2. Protocole expérimental

Le caractère amorphe des poudres de bioverre, la caractérisation structurale de substrat et l'identification de la nature des phases cristalline présentes dans les revêtements électrophorétiques ont été réalisées par diffraction des rayons X à l'aide d'un diffractomètre de type Bruker D8 Discover avec une radiation monochromatique du cuivre ( $\text{CuK}\alpha$ ) de longueur d'onde  $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ . Les diffractogrammes des poudres de bioverres ont été enregistrés dans l'intervalle  $2\theta$  entre  $5^\circ$  et  $80^\circ$  à une vitesse de balayage de  $0,04^\circ/\text{s}$ . Les phases en présence sont identifiées par comparaison avec les références du fichier International Center for Diffraction Data – Powder Diffraction Files (ICDD-PDF).

### II.6.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

#### II.6.2.1. Principe

La spectroscopie d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR pour Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement, ce qui se traduit par une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption [14, 15].

On a utilisé un spectroscope à infrarouge de type (Bruker Equinox 55:  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ ). Les produits à analyser ont été préparés sous forme de pastilles minces en les mélangeant avec 98% masse de KBr sec. Cette technique a été utilisée pour identifier les phases cristallines et amorphes en donnant des informations sur les groupes moléculaires des différentes phases existants dans le produit analysé.

### **II.6.2.2. Protocole expérimental**

La caractérisation structurale des poudres et des revêtements de verre bioactif élaborés a été réalisée avec un spectromètre IR Affinity-1, Shimadzu spectromètre. La transmission infrarouge a été déterminée pour le domaine de nombre d'onde 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Les échantillons doivent être sous forme de pastilles. Pour cela, les poudres sont finement broyées et mélangées avec du KBr (bromure de potassium) à 98%, qui est transparent dans l'infrarouge et dont le rôle est de servir de matrice.

### **II.6.3. Microscopie électronique à balayage - microanalyse X (MEB-EDS)**

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique puissante d'imagerie.

#### **II.6.3.1. Principe**

La microscopie électronique à balayage (MEB) est un outil d'analyse puissant pour obtenir des informations sur la morphologie et la composition chimique d'un objet solide, le MEB permet d'atteindre une résolution de l'ordre de quelques nm et un grossissement jusqu'à plus de 300 000 fois. La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie électronique basée sur le principe des interactions électrons-matière ; un faisceau d'électrons primaires vient frapper la surface de l'échantillon et différents rayonnements sont ensuite émis par les atomes : électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger ou rayons X. Les différents rayonnements émis apportent des informations complémentaires sur la matière dont est constitué l'échantillon [16-18].

#### **II.6.3.2. Protocole expérimental**

La microstructure et la chimie des substrats des poudres et des revêtements de bioverre sont mises en évidence par microscope électronique à balayage environnemental à haute résolution couplé à une microanalyse X (EDX) de type Quanta FEG 400 ESEM / EDAX Genèse X4M. Avant l'analyse par MEB, les poudres et les revêtements de bioverre sont déshydratés et revêtus d'un film mince de Au/Pd, par pulvérisation, en utilisant l'équipement du module SPI Pulvérisateur Cathodique afin que la surface de l'échantillon soit conductrice. Cette métallisation permet aussi d'éviter une accumulation importante de charges à la surface des échantillons (isolants) et réduit la profondeur de pénétration du faisceau, ce qui améliore la qualité de l'image.

## **II.6.4. Microscopie électronique à transmission (MET)**

Cette technique d'analyse est utilisée pour caractériser des échantillons d'un point de vue morphologique mais également pour déterminer leur composition à l'échelle nanométrique.

### **II.6.4.1. Principe**

Le microscope électronique est composé d'un canon à électrons, d'un système de condensateurs magnétiques permettant de régler la convergence du faisceau, d'un objectif, d'un système optique de projection permettant de visualiser une image sur un écran phosphorescent, ainsi que d'un système de pompage pour faire le vide à l'intérieur de la colonne du microscope. Les électrons arrêtés se traduisent par des zones sombres sur un film photographique et les électrons transmis par des zones claires. Différents détecteurs sont placés de part et d'autre de l'échantillon tels qu'un spectromètre de dispersion d'énergie des rayons X et des détecteurs d'électrons transmis. Ces derniers sont placés sous l'écran d'observation et permettent d'obtenir une image de l'échantillon. Cette méthode consiste à envoyer un faisceau d'électrons sur l'échantillon. Les électrons incidents sont principalement transmis, diffusés élastiquement et inélastiquement. L'autre phénomène qui nous intéresse est l'émission de rayons X qui nous permettra de déterminer les éléments présents. La microscopie électronique à transmission dans sa configuration de base, ne permet pas l'observation de tissus vivants et nécessite une préparation particulière [19, 20].

### **II.6.4.2. Protocole expérimental**

Pour nos expériences, les poudres de verre bioactif sont dispersées dans une solution d'éthanol dans un bain à ultrasons. Une goutte de cette suspension est ensuite déposée sur une grille de cuivre surmontée d'un film de colodium contenant du carbone pour rendre les échantillons conducteurs. La grille est placée sur un support en béryllium et transférée dans la chambre d'analyse. La morphologie et la distribution granulométrique des poudres de verre bioactif sont réalisées à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET) (JEOL-2000EX). Le faisceau d'électrons focalisé sur les grains de l'échantillon à l'aide de lentilles magnétiques permet l'observation d'une image de la zone irradiée. Les profils élémentaires sont effectués du centre vers la périphérie de la particule en utilisant un spectromètre à dispersion d'énergie de rayons X.

### **II.6.5. Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS)**

La spectroscopie de photoélectrons par rayons X, ou X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), est une technique de caractérisation de surface non destructive qui repose sur l'utilisation de l'effet photoélectrique. Elle donne une information sur les états chimiques, la nature des liaisons chimiques et la composition sur une profondeur n'excédant pas 10 nm. Cette technique permet également une analyse semi-quantitative en déterminant les proportions relatives des éléments constituant la surface [21-24]

#### **II.6.5.1. Principe**

La spectroscopie XPS, anciennement appelée ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis) est basée sur le phénomène de photoémission. Le rayonnement provoque l'éjection d'un électron de cœur d'énergie cinétique  $E_c$  ou l'atome va ensuite se désexciter en éjectant un électron d'un niveau lié : c'est l'émission Auger. Les bandes visibles en XPS sont donc dépendantes de l'énergie incidente  $h\nu$  alors que les bandes visibles en spectroscopie Auger sont indépendantes du rayon incident. La mesure de l'énergie cinétique va permettre de déduire l'énergie de liaison. Celle-ci permet la reconnaissance élémentaire. Les énergies de liaison des niveaux de cœur sont sensibles à l'environnement chimique de l'atome, ce phénomène est appelé déplacement chimique. Il se traduit par des variations d'énergie de liaison qui peuvent alors être interprétées en termes de changements d'état électronique, de nature des liaisons chimiques et de variation de degrés d'oxydation.

#### **II.6.5.2. Protocole expérimental**

Les analyses sont effectuées à l'aide d'un spectromètre Thermo L-alpha, utilisant une source de raie Al-K $\alpha$  monochromatisée ( $h\nu = 1486,6$  eV), collectées à  $0^\circ$  par rapport à la normale de surface et détectée avec un analyseur hémisphérique. La taille du spot de la source XPS sur l'échantillon est d'environ 200  $\mu\text{m}$  et l'énergie de passage est de 20 eV. Au cours de l'acquisition de données, la pression est maintenue au-dessous de  $1 \times 10^{-9}$  Torr. Les spectres sont enregistrés de 0 à 1200 eV et les positions des pics obtenus après analyse se trouvent essentiellement constantes ( $\pm 0,3$  eV). Le spectre en énergie de liaison des niveaux de cœur est caractéristique d'un atome dans un composé donné, ce qui permet son identification. Tous les éléments peuvent être détectés à l'exception de l'hydrogène et de l'hélium. Les analyses ont été répétées sur plusieurs endroits de l'échantillon afin de confirmer l'homogénéité du composé. Les profils de profondeur de la surface d'échantillon, sont obtenus par utilisation d'une séquence de canon à

ions, qui exécute un cycle de gravure sur la surface de matériau à analyser pendant une certaine période de temps, avant d'être analysé par le spectre de l'XPS. Chaque cycle de gravure expose une nouvelle surface, qui va être par la suite analysé par XPS.

### **II.6.6. Analyses thermiques par ATG/ATD**

L'analyse thermique recouvre l'ensemble des méthodes mesurant les variations des propriétés physiques ou chimiques d'un matériau en fonction de la température ou en fonction du temps à température constante.

#### **II.6.6.1. Principe**

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique basée sur l'étude de l'évolution de la masse d'un échantillon lors d'un programme en température, sous atmosphère contrôlée. Cette variation de masse peut être une perte de masse (émission de vapeurs) ou gain de masse (fixation de gaz). Cette technique est utilisée pour déterminer la stabilité thermique et les masses relatives des différents constituants du matériau. L'analyse thermique différentielle (ATD) quant à elle, est une technique mesurant la différence de température entre un échantillon et une référence (matériau inerte thermiquement) en fonction du temps ou de la température lorsqu'ils sont soumis à une programmation de température, sous atmosphère contrôlée [25, 26].

#### **II.6.6.2. Protocole expérimental**

Les analyses thermiques différentielles, couplées à l'analyse thermogravimétrique des poudres de bioverre sont réalisées sur l'appareil TA Instruments, Q600. Les propriétés thermiques des poudres sont étudiées en nacelle de platine, sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) et de 25 à 1000°C, selon une vitesse de chauffe de 5°C/min. Les échantillons sont préalablement broyés et environ 50 mg de poudre sont placés dans le creuset lors des acquisitions. La référence est un creuset en platine vide, similaire à celui contenant l'échantillon.

### **II.6.7. Profilométrie**

#### **II.6.7.1. Principe**

La profilométrie optique (OP), est une méthode à interférométrie sans contact servant à caractériser la topographie des surfaces. La méthode est non destructive, rapide et permet d'accéder à la reconstitution 2D et/ou 3D de la surface analysée ainsi qu'à certaines caractéristiques de rugosité, notamment la rugosité arithmétique Ra. La technique est basée sur la réflexion d'un signal lumineux sur une surface qui permet d'observer la topographie de cette

surface sur des gammes de mesures allant de quelques dizaines de  $\mu\text{m}^2$  à quelques  $\text{mm}^2$ , avec une résolution latérale optique [24, 27].

### **II.6.7.2. Protocole expérimental**

La rugosité de surface des substrats nus et revêtus avec des poudres de bioverre est déterminée en utilisant un profilomètre optique 3D zygo NewView 7100 (microscopie confocale / interférométrie). L'épaisseur des revêtements est mesurée en utilisant un profilomètre DEKTAK 150, par l'enregistrement du profil de surface de régions revêtues et non revêtues sur une seule prise de mesure. La méthode permet un accès rapide à la rugosité moyenne arithmétique ( $R_a$ ) sur trois points différents de la surface de l'échantillon, mesurée sur une longueur de  $500\mu\text{m}$ .

### **II.6.8. Etude de la résistance à la corrosion**

Parmi les procédures expérimentales recommandées pour évaluer la biocompatibilité des biomatériaux, nous avons choisi des tests électrochimiques pour évaluer la résistance à la corrosion des revêtements de poudres de verre bioactif dans des solutions SBF dans des études *in vitro*.

#### **II.6.8.1. Principe**

La voltamétrie cyclique est une technique d'analyse électrochimique basée sur la mesure de la densité de courant résultant des phénomènes électrochimiques qui se produisent à la surface de l'électrode sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. La voltamétrie cyclique repose sur un balayage linéaire aller-retour du potentiel, permettant la mesure des courbes  $i = f(E)$  pour l'oxydation et la réduction du composé. Cette technique permet de calculer le potentiel de corrosion ( $E_{\text{corr}}$ ), le courant de corrosion ( $I_{\text{corr}}$ ) et la résistance à la polarisation ( $R_p$ ). Ces trois grandeurs sont déterminées en utilisant la méthode de polarisation linéaire à partir des courbes de voltamètre cyclique (courbes densité de courant-potentiel) à l'aide d'un montage potentiodynamique à trois électrodes.  $E_{\text{corr}}$  correspond au potentiel à partir duquel le film de passivation s'altère et de ce fait, la corrosion du biomatériau permet de déterminer l'intensité de courant critique ( $I_c$ ) ou la densité de courant critique ( $I_c$ ) qui sont les valeurs à atteindre pour passiver le matériau [24, 28].

### II.6.8.2. Protocole expérimental

L'ensemble des tests sont réalisés à 37 °C, température normale du corps humain, à l'aide d'un potentiostat/Galvanostat de marque PGZ 301 modèle Voltalab 21, piloté par le logiciel VoltaMaster 4 en balayant le potentiel à 1 mV/s entre -1 et 1V/SCE. La polarisation est effectuée dans une cellule Spot (spot Ø: 5,2 mm) et démarre après 30 minu de pause dans une solution électrolytique de fluide corporel simulé (SBF). Trois mesures pour chaque échantillon sont réalisées afin d'obtenir une valeur moyenne. Le montage du potentiostat est représenté sur la Figure II.6. Trois électrodes ont été utilisées pour les mesures de voltamétrie cyclique : Les trois électrodes sont les suivantes :

- Une électrode de travail : le substrat de l'acier inoxydable recouvert de dépôt de verre bioactif.
- Une électrode auxiliaire en platine.
- Une électrode de référence Ag/AgCl avec comme électrolyte d'une solution saturée en KCl.



*Figure II.6 : Cellule électrochimique utilisée pour l'évaluation de la corrosion des substrats recouverts de poudre de verre bioactif.*

**Références bibliographiques**

- [1]. A. Doostmohamadi, A. Monshi, M.H. Fathi, S. Karbasi, O. Braissant, Q.U. Daniels QU. Direct cytotoxicity evaluation of 63S bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using yeast model and human chondrocyte cells by microcalorimetry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011; 22: 2293-2300.
- [2]. R.L. Siqueira, O. Peitl, E.D. Zanotto. Gel-derived  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  bioactive powders: Synthesis and *in vitro* bioactivity, *Materials Science and Engineering C*, 2011; 31: 983–991.
- [3]. J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, X.G. Meng, J.Z. Shi. Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol–gel derived  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  bioglass, *Ceramics International*, 2010; 36: 1911-1916.
- [4]. T. Kokubo. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1990; 120: 138-151.
- [5]. T. Kokubo, H. Takadama. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity, *Biomaterials*, 2006; 27: 2907-2915.
- [6]. Tests for Cytotoxicity: *In Vitro Methods*, ISO 10993–5, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.
- [7]. Sample Preparation and Reference Materials, ISO 10993–12, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
- [8]. M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial material interactions, *Biomatter*. 2012; 4: 176-194.
- [9]. G. Sganga, C. Tascini, E. Sozio, M. Carlini, P. Chirletti, F. Cortese, R. Gattuso, P. Granone, C. Pempinello, M. Sartelli, S. Colizza. Focus on the prophylaxis, epidemiology and therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surgical site infections and a position paper on associated risk factors: the perspective of an Italian group of surgeons, *World J Emerg Surg*. 2016; 11: 26-39.
- [10]. R.G. Nair, L.P. Samaranayake. The effect of oral commensal bacteria on candida adhesion to denture acrylic surfaces: An *in vitro* study, *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 1996; 104: 339-349.
- [11]. S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release*, 2016; 235: 337–351.

- [12]. R. Jenkins, R.L. Snyder, Introduction to X-ray Powder Diffractometry, Wiley and Sons, New York, 1996.
- [13]. A. A. Bunaciu, E.G. Udriștioiu, H.Y. Aboul-Enein. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2015; 45: 289-299.
- [14]. J.B. Bates. Fourier Transform Spectroscopy, Computers & Mathematics with Applications, 1978; 4: 73-84.
- [15]. D.F. Leclerc. Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Pulp and Paper Industry, Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation, 2006.
- [16]. J. Goldstein, D.E. Newbury, P. Echlin, D.C. Joy, C.E. Lyman, E. Lifshin, L. Sawyer, J.R. Michael. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Springer, 3rd edition, Kluwer Academic, New York 1992.
- [17]. C.W. Oatley, The early history of the scanning electron microscope, Journal of Applied Physics, 1982; 53: R1-R13.
- [18]. M. Suga, S. Asahina, Y. Sakuda, H. Kazumori, H. Nishiyama, T. Nokuo, V. Alfredsson, T. Kjellman, S.M. Stevens, H.S. Cho, M. Cho et al., Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials, Progress in Solid State Chemistry, 2014; 42: 1-21.
- [19]. B. Fultz, J. Howe. Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials, Springer, 3rd Edition, Berlin, 2008.
- [20]. D.B. Williams, C.B. Carter. Transmission Electron Microscopy, A Textbook for Materials Science, Diffraction. II. Vol. 1. Springer Science & Business Media, 1996 Plenum Press, New York and London,
- [21]. C.R. Brundle, D. Baker. Electron Spectroscopy: Theory, Techniques and Applications, Academic Press, London, New York, San Francisco, volume 2, 1978.
- [22]. S. Evans, E. Raftery. X-Ray Photoelectron Diffraction Studies of Lepidolite, Clay Minerals, 1982; 17: 443-452.
- [23]. C.S. Fadley, R. J. Baird, W. Siekhaus, T. Novakov, S. A. L. Bergstrom, Surface analysis and angular distributions in x-ray photoelectron spectroscopy, Journal of Electrom Spectroscopy and Related Phenomena, 1974; 4: 93-137.
- [24]. B. Fatima, Synthèse de revêtements prothétiques par électrodéposition : Structure et propriétés antibactériennes, Thèse de doctorat, Laboratoire de Génie de l'Environnement, université de Béjaia, Algérie, 2015.

- [25]. N. Attari, S. Laoues, S. Chabane. Characterization of an Archaeological Mortar from the Ottoman Period in Algeria, *International Journal of Materials, Mechanics, and Manufacturing*, 2019; 7: 154-159.
- [26]. S. Elkacemi, L. Abahlous, S. Ait amar, L. Boukbir, N. El alem. Heat treatment of concrete and its influence on the mechanical properties, *MATEC Web of Conferences*, 2014; 11: 01011-01015.
- [27]. P. Boher, A. Dubois, L. Vabre, J.P. Piel, L. Escadafals, R. Tirmarche, C. Boccara, J.L. Stehle. Profilométrie optique appliquée à la caractérisation des surfaces en microélectronique et en technologie des écrans plats : les mesures optiques dans l'industrie, *REE. Revue de l'électricité et de l'électronique*, 2002 ; 6: 50-55.
- [28]. J.L. Crolet, méthodes d'étude de la résistance à la corrosion des aciers inoxydables : extrapolation des résultats aux réalisations industrielles, *Revue de Métallurgie*, 1978 ; 75: 633-639.

### ***CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION***

### **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

La maîtrise des conditions de synthèse des poudres de verre bioactif à partir de xérogel et d'aérogels par la méthode sol-gel apparaît très utile dans le but d'étudier leurs caractéristiques physico-chimiques, structurales, morphologiques et leurs propriétés biologiques. Ainsi que l'élaboration des revêtements des poudres sur les substrats en acier inoxydable 316 L par la méthode d'électrophorèse dans le but d'améliorer l'adhérence et la biocompatibilité des revêtements prothétiques et prothèses.

Ce chapitre est scindé en **quatre parties** :

- **La première partie** décrit la méthode d'élaboration des poudres de verre bioactif ternaire ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ ). La caractérisation des différentes poudres préparées à partir de xérogel et des aérogels par le procédé sol-gel, afin de mieux comprendre leurs propriétés structurales et morphologiques est aussi traitée dans cette partie.

- La bioactivité des poudres de verre bioactif élaborées qui peut être testée par formation à la surface d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée en milieu physiologique (SBF) ainsi que leur biocompatibilité vis-à-vis des cellules ostéoblastes et fibroblastes (viabilité cellulaire) font l'objet de **la deuxième partie** de ce chapitre.

- **La troisième partie** constitue la continuité de la deuxième partie, dans laquelle nous étudions l'évaluation antibactériennes des poudres synthétisées vis-à-vis de deux souches bactériennes pathogènes de familles différentes qui sont l'*Eschérichia coli* (*E. coli*) à Gram négatif, et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) à Gram positif et deux candidats qui sont *Candidat albicans* (*C. albicans*) et *candidat krusei* (*C. krusei*).

- **La quatrième et dernière partie** de ce chapitre est consacrée à la réalisation des revêtements prothétiques de deux poudres sélectionnées (ayant les meilleures performances) sur des substrats en acier inoxydable 316L via la méthode d'électrophorèse. Leurs caractérisations physico-chimiques (l'épaisseur, la rugosité et les tests de corrosion dans le milieu SBF) sont aussi étudiées.

***PARTIE I. CARACTERISATION ET COMPARAISON DES POUDRES DE  
VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL***

## ***PARTIE I. CARACTERISATION ET COMPARAISON DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGELS***

L'objectif de cette étude est d'élaborer des poudres de verre bioactif ternaire de système  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  via la méthode sol gel. L'originalité de ce travail repose sur les conditions de séchage des gels obtenus par sol-gel. A notre connaissance et selon les recherches effectuées sur la synthèse des poudres de verre bioactif, le séchage des gels de verre bioactif dérivé de sol-gel selon des conditions supercritiques n'a pas été évoqué. Dans cette partie, une étude comparative structurale et morphologique des poudres de verre bioactif élaborées à partir d'un xérogel et d'aérogel par la méthode sol gel est discutée. Le but est d'une part d'améliorer les propriétés physicochimiques, d'étudier l'influence de la température de traitement et l'influence du solvant utilisé dans le cas des poudres d'aérogel. D'autre part, de suivre l'évolution de la bioactivité, la biocompatibilité et l'évaluation antibactérienne des poudres obtenues qui seront traitées dans la deuxième et la troisième partie de ce chapitre.

### **I.1. Synthèse des poudres de verre bioactif**

Plusieurs procédés de synthèse des verres bioactifs ont été décrits dans la littérature [1]. Les poudres issues de chacune d'entre elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques structurales et morphologiques. Le choix d'un tel procédé de synthèse doit, par conséquent, être établi en fonction de l'application visée. En effet, la méthode de préparation des poudres doit être simple, reproductible et moins coûteuse.

Dans ce travail, nous avons élaboré des poudres de verres bioactifs ternaires noté 63S d'une composition molaire de 63%  $\text{SiO}_2$ , 28%  $\text{CaO}$  et 9%  $\text{P}_2\text{O}_5$  par voie sol-gel rapportée par Doostmohamadi et al [2] conduisant à des poudres de verre bioactif de xérogel ou d'aérogel, selon les conditions de séchage (le procédé est détaillé dans le chapitre II).

Le séchage sous pression atmosphérique, conduit à la formation des poudres de verre bioactif xérogel (XG), et le séchage supercritique mène à des poudres de verre bioactif aérogel (AGE). Les deux poudres (XG et AGE) élaborées sont traitées à des températures de 400, 600 et 800°C afin d'éliminer les sous-produits de synthèse et d'évaluer l'influence du traitement thermique sur la microstructure et la morphologie des poudres synthétisées. L'influence de deux autres solvants (acétone et méthanol) dans le cas de synthèse des poudres aérogel est présentée aussi dans cette partie. Les poudres obtenues sont calcinées à 600°C et notées respectivement AGA-600 et AGM-600.

Les poudres résultantes sont caractérisées par différentes techniques : diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), microscopie électronique à balayage (MEB), l'analyse élémentaire par (EDS), microscopie électronique à transmission (MET) et analyse thermogravimétrique (ATG/ATD).

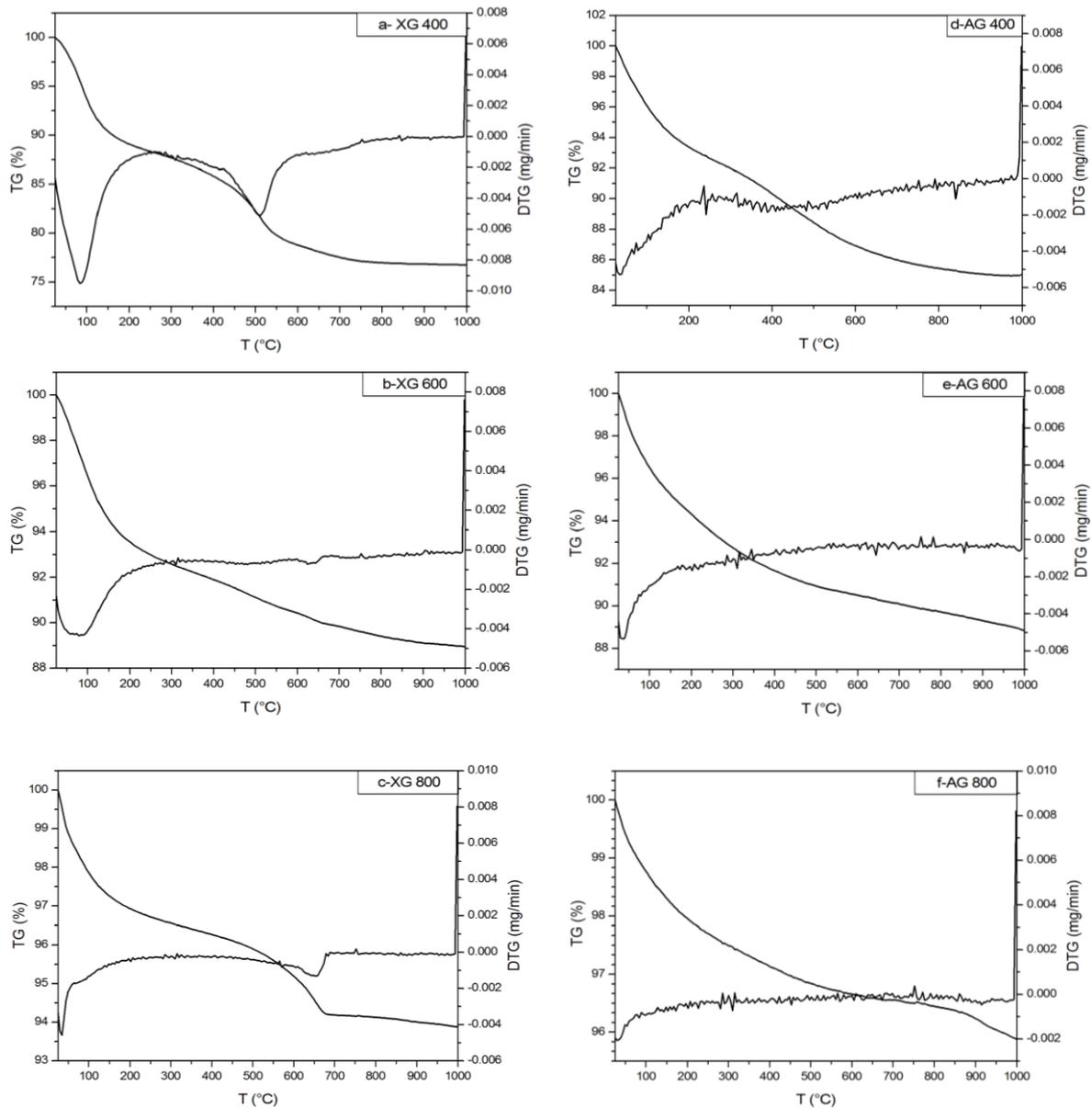
## **I.2. Influence de traitement thermique des poudres**

La température de calcination joue un rôle très important dans, la composition, la microstructure et la morphologie des biomatériaux synthétisés par la méthode sol-gel [3, 4]. Afin d'évaluer l'influence de la température de calcination sur la microstructure et la morphologie des poudres de bioverre élaborées, différentes méthodes d'analyses physico-chimiques ont été utilisées et les résultats obtenus avec leurs discussions sont présentés ci-dessous.

### **I.2.1. Analyse thermique ATG/DTG des poudres de bioverre**

L'analyse thermique (ATG) est basée sur la mesure des pertes de masse d'un matériau au cours du chauffage. Elle permet de déterminer la température de dégradation correspondante à la perte de masse pour chaque composant dans des matériaux et ensuite d'en déduire la stabilité thermique de ces matériaux. Plusieurs études concernant les matériaux sol-gel montrent que leur processus de dégradation et leur stabilité thermique dépendent de la structure et de la composition (teneur des composants organique/inorganique).

L'analyse thermogravimétrique ATG/DTG des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel est réalisée dans un domaine de température allant de la température ambiante jusqu'à 1000°C, à une vitesse de chauffage de 5°C/min. Les résultats de l'analyse sont présentés dans la figure III.1.1.



**Figure III.1.1 :** Courbes ATG/DTG des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

Les poudres de verre bioactif sont caractérisées par l'analyse thermogravimétrique et thermique différentielle (ATG/DTG). La figure III.1.1. (a-f) montre les courbes ATG/DTG des poudres de verre bioactif traitées à différentes températures. La perte de masse à basse température dans les poudres de verre bioactif aérogel est très limitée en raison des conditions supercritiques d'extractions de solvant. Les courbes ATG des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel présentent différentes étapes de perte de masse. Globalement, la poudre de verre bioactif xérogel calcinée à 400°C présente une perte de poids plus importante avec 23%, et celle d'aérogel avec une perte de masse de 15%. Une perte de masse identique de 11% est observée dans les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel calcinées à 600°C. En revanche, la poudre

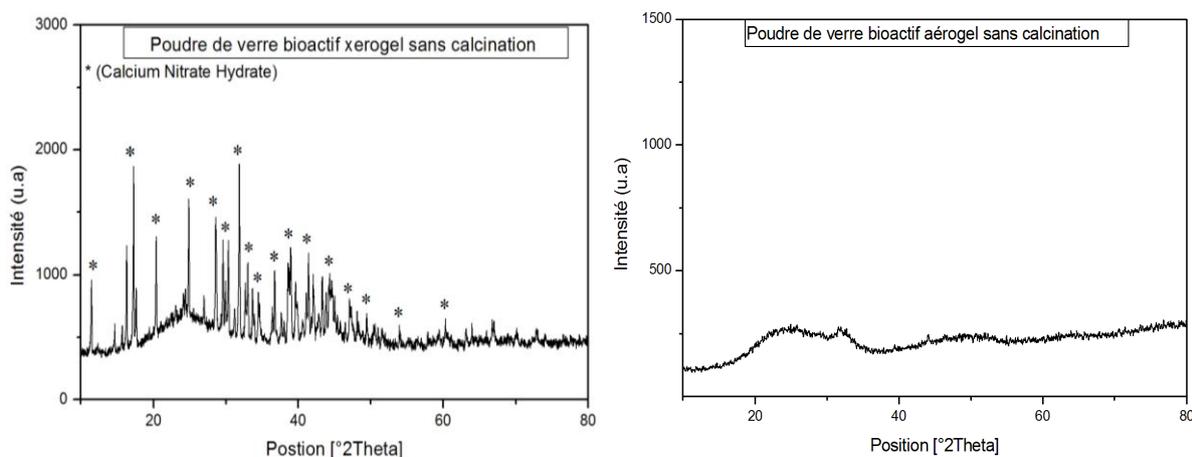
de verre bioactif de xérogel calcinée à 800°C montre une légère différence par rapport à la poudre de verre bioactive d'aérogel calcinée à 800°C avec 6% et 4% respectivement.

La première perte de masse se produit entre 100°C et 200°C peut être associée à l'évaporation de l'eau adsorbée, l'élimination de l'eau structurale et de l'éthanol présent à la surface des poudres [5]. Une seconde perte de poids se produit entre 350°C et 420°C est observée pour toutes les poudres attribuées à la dégradation thermique des résidus organiques et à la réaction de décomposition des nitrates utilisés lors du procédé sol-gel [6, 7]. La troisième perte de masse entre 550°C et 660°C est attribuée probablement à la polycondensation des alcoxydes résiduels [8]. Ces pertes de masse peuvent être expliquées par la température de transition vitreuse des particules de verre bioactif [7, 9]. Une quatrième perte de poids à 690°C et 850°C est observée dans le cas des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel calcinées à 800°C, respectivement peut être attribuée également à la transformation structurale [10]. Le traitement thermique élimine les groupes -OH, provoquant une formation supplémentaire de liaisons O-Si-O et les nitrates ont également été éliminés lors de la stabilisation par traitement thermique [11-13, 14]. Aucune perte de poids significative n'est observée au-dessus de ~700°C pour les poudres xérogel ce qui peut s'expliquer par l'achèvement des réactions de synthèse et l'élimination complète des résidus [7, 15-17].

## I.2.2. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)

### I.2.2.1. Analyse DRX des poudres de bioverre non traitées

Les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel avant de les traiter thermiquement sont présentés dans la figure III.1.2.



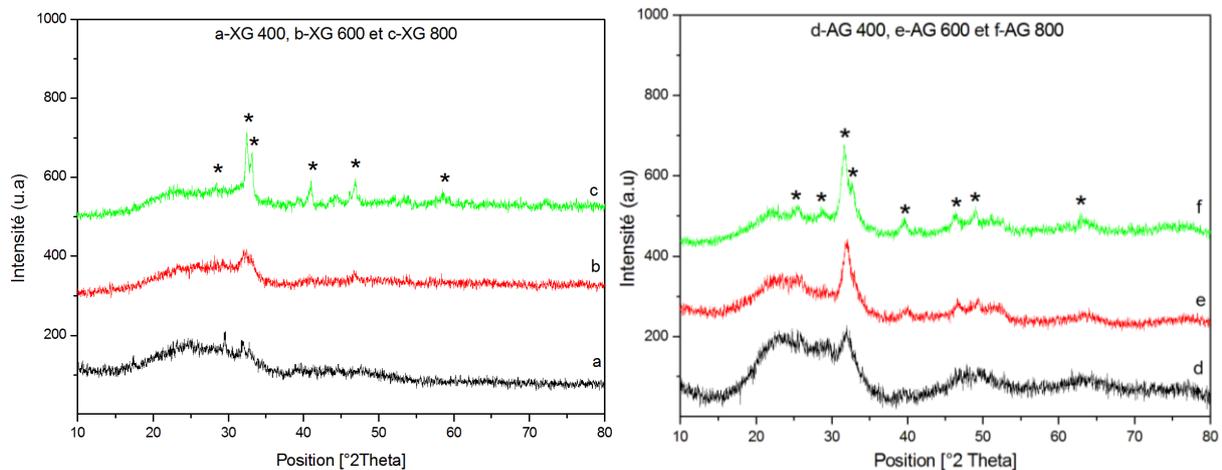
**Figure III.1.2 :** Diffractogrammes des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel sans calcination.

Les diffractogrammes des poudres de xérogel et d'aérogel non traitées (Figure III.1.2), montrent que les poudres de xérogel séchées à 130°C pendant 20h sont composées d'une seule phase de nitrate de calcium hydraté de formule chimique :  $(Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$  qui correspond au produit de départ employé. Ce résultat montre que les précurseurs initialement bien dissous, par la suite lors du séchage, des précipitations se produisent. Cette apparition traduit bien la croissance d'un composé cristallisé lors du séchage des gels. Un traitement thermique est nécessaire pour la solidification et la formation d'un verre bioactif [18].

En revanche, les poudres d'aérogel non traitées séchées en conditions supercritique de l'éthanol (pression de 69 bars, température de 245°C) présentent une structure amorphe, ce qui peut être expliquée, dans ces conditions, par la décomposition des nitrates de calcium [19, 20].

### I.2.2.2. Analyse DRX des poudres de bioverre traitées thermiquement

La cristallographie des bioverres joue un rôle important sur leur bioactivité et leur résistance mécanique. Les poudres de bioverre xérogel et aérogel traitées thermiquement à différentes températures (400°C, 600°C et 800°C) sont analysées par diffraction des rayons X afin d'identifier les phases cristallines en fonction de la température comme représenté sur la figure III.1.3 ci-dessous :



**Figure III.1.3 :** Diffractogrammes des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

L'analyse des diagrammes de diffraction des rayons X (figure III.1.3) des différentes poudres de bioverre xérogel et aérogel traité à 400°C et 600°C met en évidence un halo de diffraction allant de 20 à 37°C. Ce halo de diffraction est caractéristique des phénomènes de diffusion dans les matériaux amorphes, donc absence d'ordre à longue distance dans les poudres de bioverres [19, 20]. Au-delà de cette température (600°C), le traitement thermique provoque l'apparition

de phases cristallines. Les poudres traitées à 600°C ne présentent qu'une légère trace de cristallisation, trop peu marquée pour être identifiée. Cependant les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de xérogel et d'aérogel calcinées à 800°C révèlent une structure cristalline à des positions  $2^\circ\text{Theta}$  de 28°, 32°, 41°, 47° et 58° dont la phase cristallisée correspond à la formation de silicate de calcium  $\text{CaSiO}_3$  (wollastonite) [21-23]. Les résultats pour les deux poudres de bioverre xérogel et aérogel sont presque identiques. Toutefois le massif amorphe reste plus intense sur les poudres issues de xérogel que sur les poudres d'aérogel, où la cristallisation est plus marquée. L'analyse des résultats de la figure III.1.3 permet de conclure que le processus de cristallisation est fortement influencé par le traitement thermique [11, 12]. Nous remarquons sur ces diagrammes qu'au fur et à mesure que la température de la calcination augmente, les raies de diffraction s'affinent et deviennent de plus en plus résolues et intenses, ce qui traduit une amélioration de la qualité cristalline des poudres de bioverre étudiées. Par conséquent, l'analyse des diagrammes indique que la cristallinité des poudres de bioverre n'est bonne qu'à des températures de calcination supérieures à 800 °C. Après le passage à 400°C et 600°C, les deux poudres de bioverre aérogel gardent une couleur grisâtre : le carbone issu des précurseurs est encore piégé dans la structure du bioverre. Ce carbone semble toutefois se présenter sous forme amorphe ou il n'est pas en quantité suffisante pour être détecté par la diffraction X. Afin d'en savoir plus sur la chimie des différentes compositions, des analyses infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) sont réalisées en fonction de la température de traitement thermique.

### **I.2.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (IRTF)**

La formation des poudres de verre bioactif a été confirmée par l'analyse spectrale IRTF illustrée sur les figures III.1.4 et III.1.5.

#### **I.2.3.1. Analyse IRTF des poudres de bioverres non traitées**

Les spectres IRTF des poudres de xérogel et aérogel non traitées thermiquement sont enregistrés dans la figure III.1.4 ci-dessous :

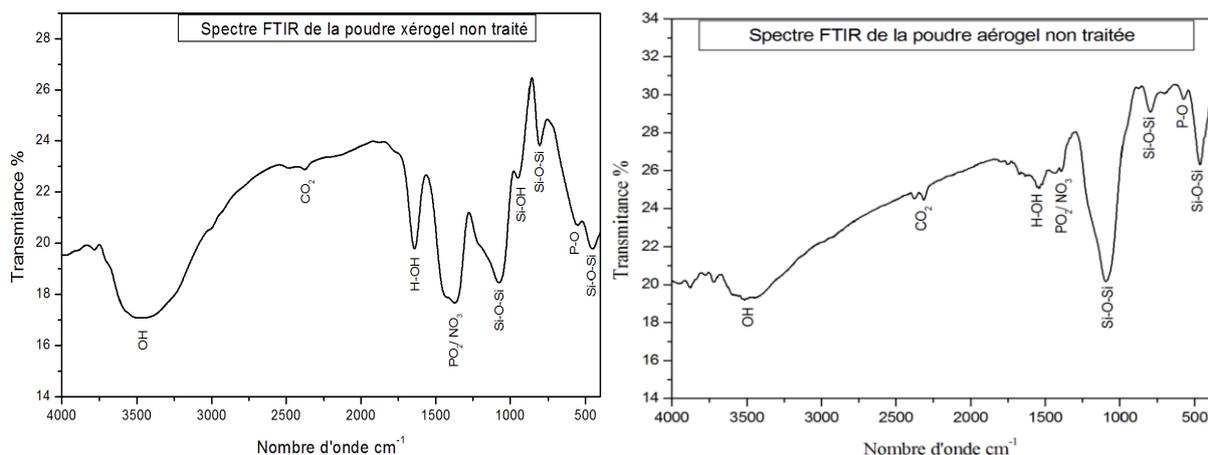


Figure III.1.4 : Spectres IRTF des poudres de bioverre xérogel et aérogel non traitées.

### I.2.3.2. Analyse IRTF des poudres de bioverre traitées

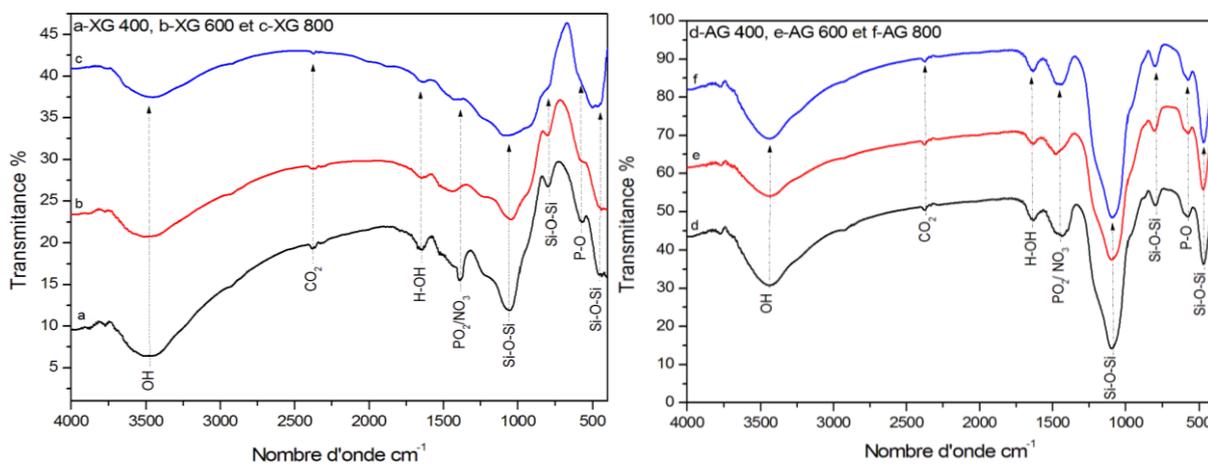


Figure III.1.5 : Spectres IRTF des poudres de bioverre : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

Les figures III.1.4 et III.1.5 montrent que les échantillons des verres bioactifs xérogel et aérogel non traités (gels séchés) et traités thermiquement à 400°C, 600°C et 800°C présentent des bandes d'adsorption à 1036-1082  $\text{cm}^{-1}$  assignées aux vibrations d'étirement de liaison asymétrique Si-O-Si. La bande située entre 785-790  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée aux vibrations d'étirement symétriques Si-O-Si et l'absorption autour de 453-463  $\text{cm}^{-1}$  est due au mode vibrationnel de la flexion de Si-O-Si indiquant que tous les échantillons sont essentiellement composés de réseau Si-O-Si [13, 22, 24]. Une augmentation de la température de traitement thermique des poudres de xérogel et d'aérogel se traduit par un élargissement progressif de la bande d'absorption dans la gamme 1036-1082  $\text{cm}^{-1}$ . Ceci indique l'accélération de la réaction

de polycondensation hydrolytique avec la formation de liaisons siloxane Si-O-Si [18, 25] et l'obtention de bioverres plus stables.

Par ailleurs, la bande entre 560-578  $\text{cm}^{-1}$  est liée à la vibration de flexion P-O correspondant aux phosphates cristallins. Cette bande indique que le phosphore est présent dans le réseau. Cette phase n'a pas été détectée lors de la diffraction X, certainement masquée par la wollastonite, un silicate de calcium qui ne contient pas de phosphore [24, 26].

La bande à 1396  $\text{cm}^{-1}$  est affectée aux vibrations des groupes  $\text{PO}_4$  et / ou  $\text{NO}_3$  cette bande disparaît dans les poudres de bioverre xérogel traitées à 600°C et 800°C et devient étroite dans les poudres de verre bioactif d'aérogel. La diminution et la disparition de cette bande sont dues à la transformation de  $\text{PO}_2$  en oxyde  $\text{P}_2\text{O}_5$  et/ou la dégradation du nitrate  $\text{NO}_3$  après calcination à 600°C pour les poudres bioactives de xérogel. Cependant, la présence de cette bande dans les poudres bioactives d'aérogel peut s'expliquer par leur structure poreuse qui contient de petits pores à échelle nanométrique, qui peuvent emprisonner le  $\text{PO}_2$  et/ou le  $\text{NO}_3$  qui n'ont pas réagi pendant le processus sol-gel [18, 27].

L'intensité de la bande d'absorption à 1620-1653  $\text{cm}^{-1}$  est caractérisée par un comportement spécifique correspondant à la présence de molécules d'eau. Ces bandes sont affaiblies après des traitements thermiques. Cependant, leur présence dans les poudres d'aérogels traitées correspond à une augmentation de la quantité d'eau physiquement liée (l'eau adsorbée). La bande large centrée à 3438-3455  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée au groupe hydroxyle structural [18, 28] et la bande autour de 2372  $\text{cm}^{-1}$  est assignée à l'adsorption du  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère [29].

Dans la figure III.1.4, Le spectre IRTF de la poudre de bioverre xérogel non traité présente aussi une bande supplémentaire vers 935  $\text{cm}^{-1}$  associée aux vibrations d'étirement des liaisons Si-OH qui peut être expliquée par le fait que le réseau structural du bioverre n'est pas complété car à cette température il reste beaucoup de liaisons OH qui sont caractéristiques d'un gel de silice. Une augmentation de la température de traitement thermique conduit à une diminution de l'intensité de cette bande jusqu'à sa disparition [18, 23]. Le spectre IRTF de poudre de xérogel séchée suggère que le produit contient un nombre assez grand de groupements OH et  $\text{NO}_3$  lié à la présence des nitrates de calcium hydraté n'ayant pas réagi lors de processus sol-gel. Ceci est également en accord avec les résultats de la diffraction des rayons X.

#### **I.2.4. Analyse des poudres de bioverre synthétisées par MEB couplée à l'EDS**

D'après les résultats de DRX et FTIR des poudres de xérogel et d'aérogel, on remarque que la formation des poudres de bioverre exige un traitement thermique. Dans la suite de ce travail, on se focalisera sur les poudres de bioverre xérogel et aérogel traitées à 400°C, 600°C et 800°C.

La microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à l'EDS (spectroscopie de dispersion d'énergie) est essentiellement une méthode d'analyse qualitative. Une analyse MEB-EDS est réalisée sur les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 400°C, 600°C et 800°C. Les résultats sont présentés dans le tableau III.1.1 et les figures III.1.6 et III.1.7.

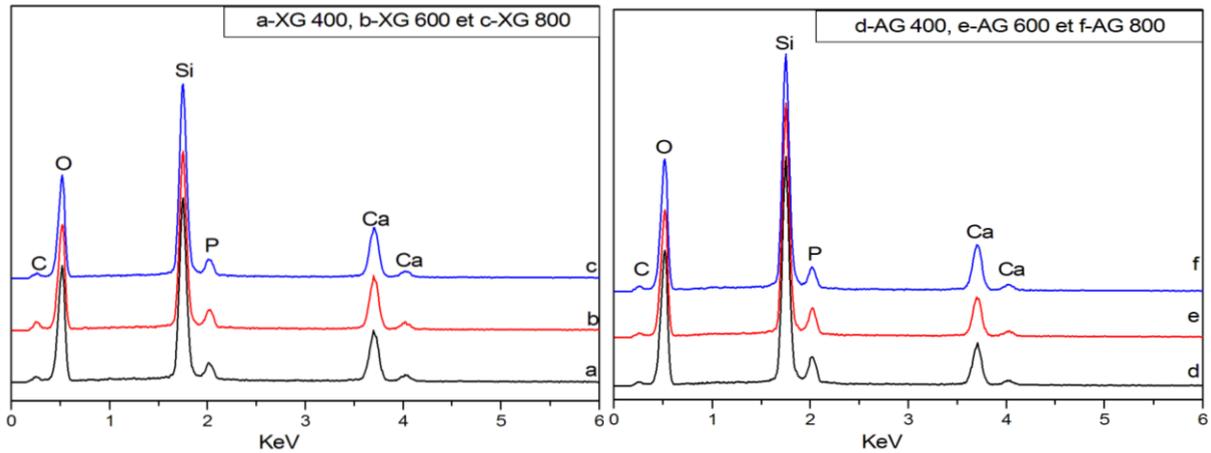
#### I.2.4.1. Analyse élémentaire par EDS

Afin d'écartier l'implication d'éventuelles différences de composition lors de la synthèse des différentes poudres de bioverre, une analyse par spectrométrie en énergie (EDS) est effectuée. La composition chimique atomique de toutes les poudres de bioverres xérogel et aérogel traitées à 400°C, 600°C et 800°C étudiées est alors vérifiée par EDS (Tableau III.1.1) et les spectres EDS sont présentés sur la figure III.1.6.

**Tableau III.1.1 :** Résultats des études EDS effectués sur les poudres de bioverre

Poudres % At	C	O	Si	P	Ca
XG 400	5. 74	61. 01	21. 04	2. 68	9. 52
XG 600	8. 67	58. 59	20. 20	2. 61	9. 93
XG 800	5. 41	58. 12	23. 52	2. 94	10. 02
AG 400	3. 99	60. 98	23. 76	4. 11	7. 16
AG 600	4. 23	59. 48	24. 96	4. 08	7. 24
AG 800	5. 09	59. 66	24. 10	3. 16	8. 00

Le tableau III.1.1 regroupe les pourcentages atomiques des poudres de bioverre xérogel et aérogel. L'analyse de tableau III.1.1 met en évidence que les poudres de verre bioactif traitées à 400°C, 600°C et 800°C contiennent du Si, du Ca, du P et O constituant d'un bioverre ternaire ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ ). L'observation de tableau III.1.1 permet d'observer qu'avec l'augmentation de la température de calcination le pourcentage atomique des éléments Si, Ca et P augmente aussi. On constate aussi que les pourcentages des éléments Si et P sont plus élevés dans le cas des poudres de bioverre aérogels contrairement au Ca qui est plus élevé dans les poudres de bioverre xérogel. Ceci est certainement généré par la condensation des groupes silanol et l'élimination des nitrates des composés organiques restants des précurseurs.

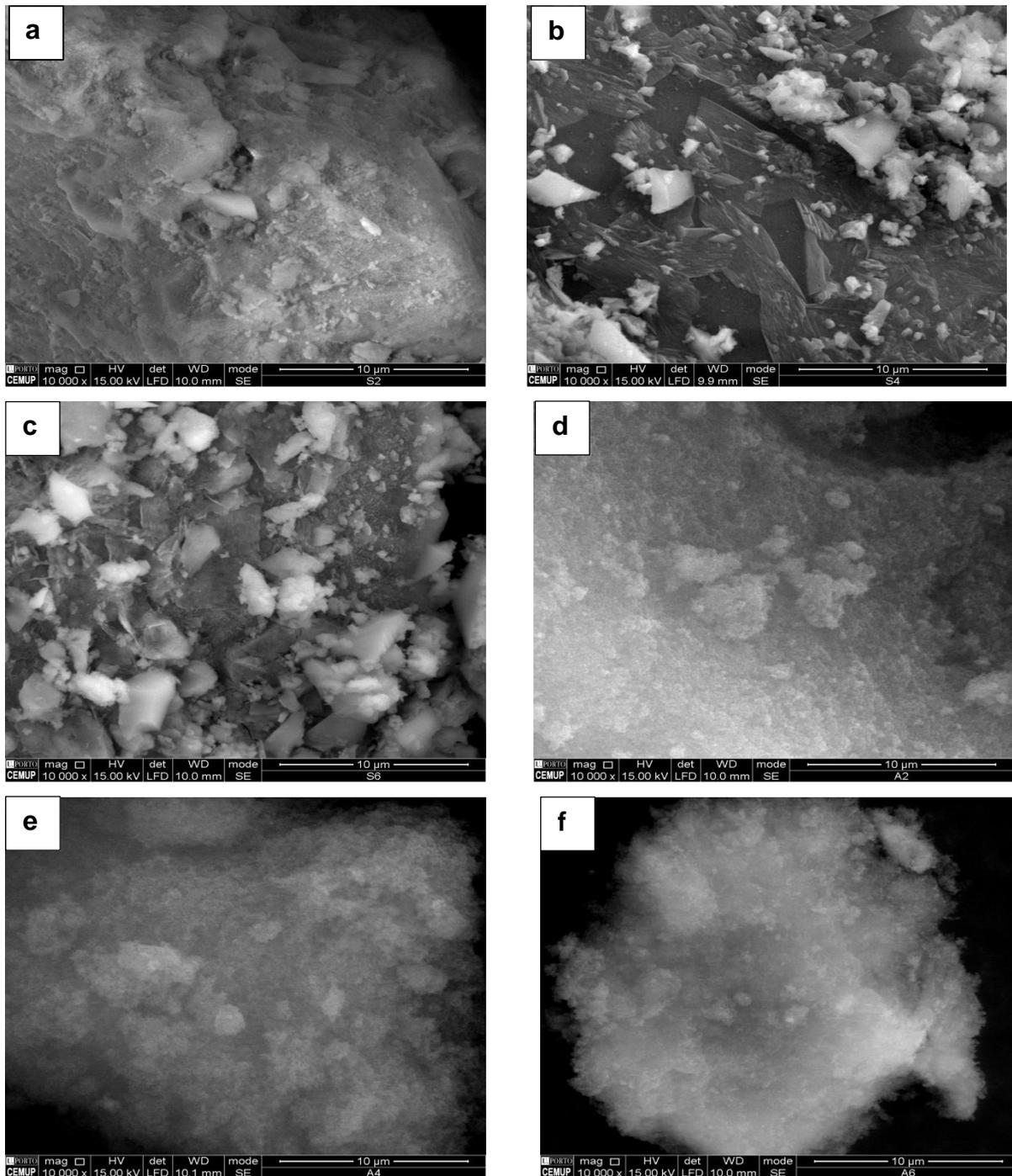


**Figure III.1.6 :** Spectre d'analyse quantitative EDS des poudres de verre bioactif : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f-AG 800.

Les analyses EDS des poudres de bioverre élaborées présentées dans la figure III.1.6, révèlent la présence de silicium, calcium, phosphore et oxygène correspondant aux différents éléments composant le bioverre introduits lors de l'étape de mélange du procédé sol-gel. Le pic important associé au silicium à 1,75 keV, celui du phosphore à 2,02 keV, et enfin celui du calcium à 3,72 et 4,03 keV [2, 14, 30].

#### **I.2.4.2. Structure et morphologie des poudres de bioverres par MEB**

Le traitement thermique a un effet important sur la morphologie et la porosité des poudres de bioverre xérogel et aérogel. Les micrographes MEB des poudres de bioverre réalisées à différentes températures sont présentés dans la figure III.1.7.



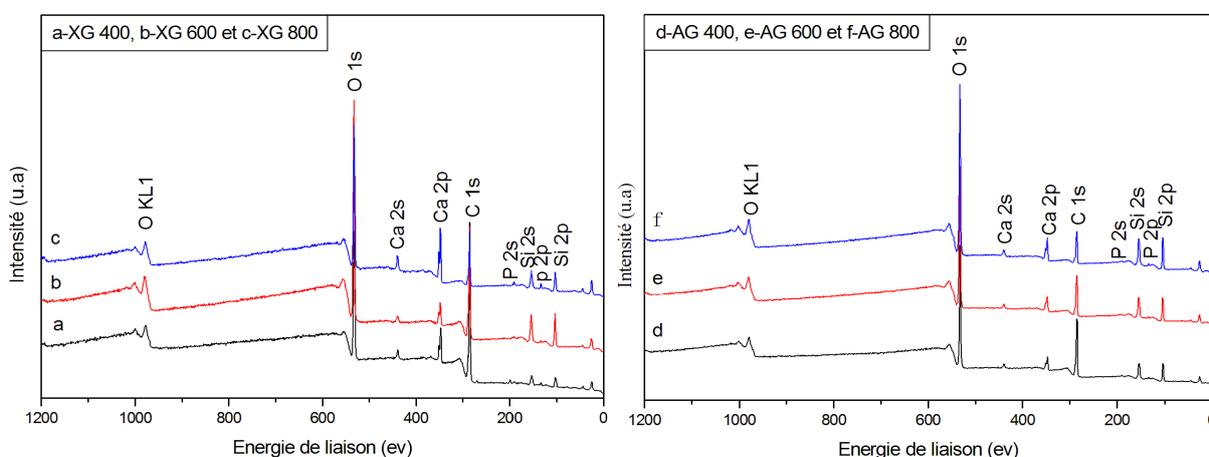
**Figure III.1.7 :** Micrographies MEB des poudres de bioverre 63S : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

Les observations en microscopie électronique à balayage MEB nous permettent d'obtenir des informations sur la taille, la forme et l'aspect de surface des particules. La figure III.1.7 représente l'état des surfaces des différentes poudres de bioverre xérogel et aérogel obtenues

via la méthode sol-gel et traitées à 400°C, 600°C et 800°C par microscopie électronique à balayage. Nous pouvons constater que les poudres de bioverre xérogel (figure III.1.7 a, b et c) sont constitués de blocs de formes aléatoires alors que les poudres de bioverre aérogel (figure III.1.7 d, e et f) sont formées principalement de petits grains sphériques agglomérées à structure spongieuse de taille nanométrique caractéristique de produits synthétisés par voie sol-gel et des conditions de séchage des gels. Les observations des micrographies attestent de l'obtention d'une structure poreuse pour les poudres de bioverre aérogel, contrairement aux poudres de bioverre xérogel qui présentent une structure plus dense [31-33]. De plus, l'augmentation de la température de calcination a aussi une influence sur la densification et la porosité des poudres, on remarque que la porosité diminue lorsque la température de calcination augmente pour toutes les poudres. On constate aussi l'apparition de particules blanches sur la surface des poudres de bioverre xérogel traitées à 600°C et 800°C qui peut être affectée à la phase cristalline (wollastonite). Ce résultat est confirmé par les analyses précédentes, réalisées par DRX.

### I.2.5. Analyse par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

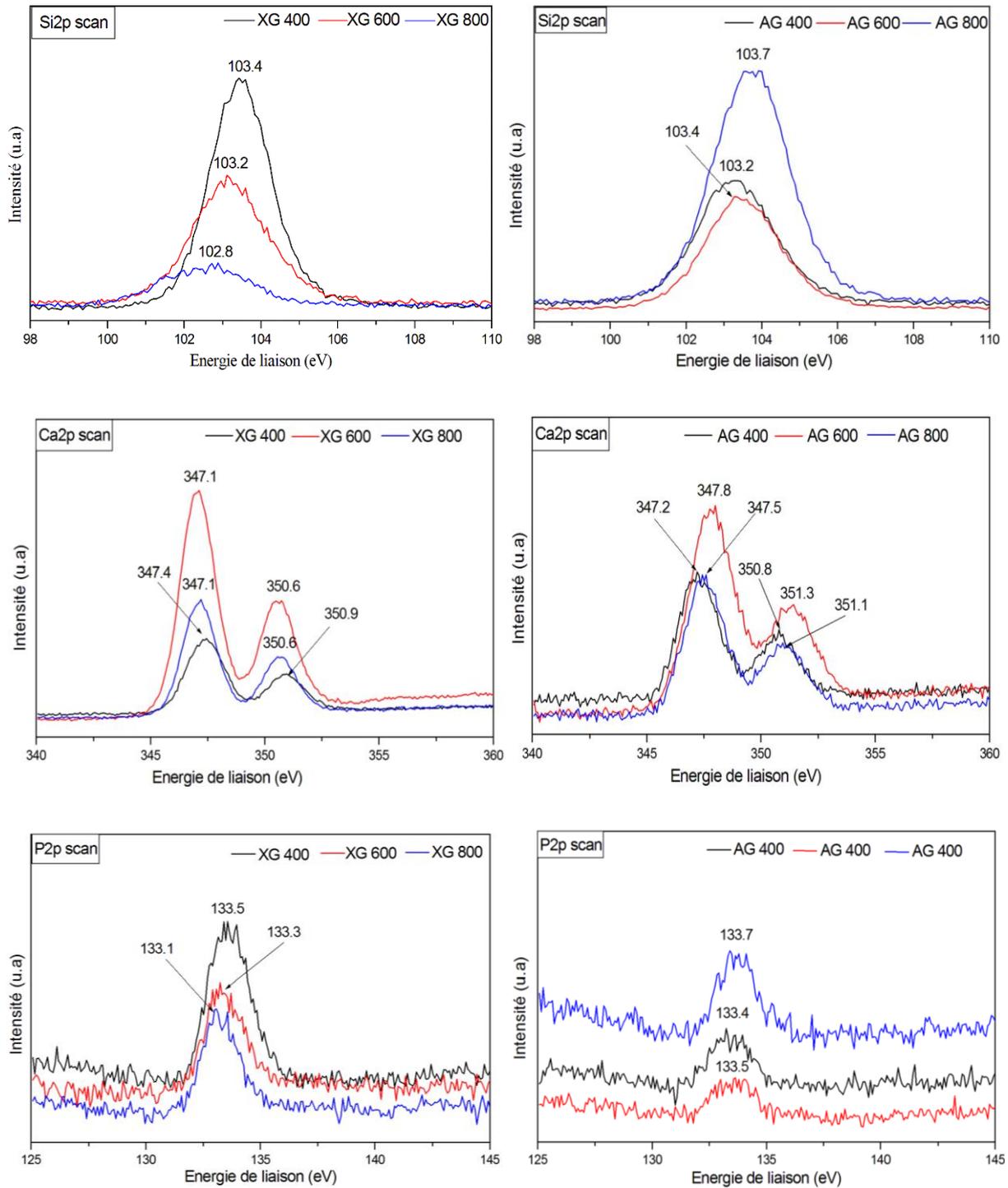
L'analyse XPS permet de connaître avec précision les niveaux des énergies pour tous les éléments constituant les poudres de bioverre analysées. Les énergies de liaison sont spécifiques à chaque élément chimique et sont sensibles à l'environnement chimique c'est-à-dire aux liaisons que réalise l'élément avec ses voisins. Les spectres de photoémission représentent le nombre de photoélectrons détectés en fonction de leur énergie de liaison. Dans ce travail, nous nous intéresserons aux pics de photoélectrons qui se présentent comme une succession de pics centrés sur l'énergie correspondant au niveau électronique de l'atome photo ionisé (figure III.1.8).



**Figure III.1.8 :** Spectres XPS obtenus pour les poudres de bioverre xérogel et aérogel traitées : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

Les analyses par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) des poudres de bioverre xérogel et aérogel permettent de mettre en évidence l'influence du traitement thermique sur la microstructure des poudres élaborées. Les spectres XPS obtenus pour les poudres de bioverre sont présentés dans la figure III.1.8. On constate que l'intensité des spectres XPS augmente en fonction de la température du traitement. Les spectres XPS montrent des pics spécifiques des éléments principaux constitutifs des poudres de bioverre. On observe dans les spectres d'analyse des pics de silicium (Si2p), de calcium (Ca2p) et de phosphore (P2p). Ces pics se trouvent à des énergies de liaisons de  $\sim 103$  eV,  $\sim 347$  eV et  $\sim 133$  eV, respectivement. Le pic situé à une énergie de liaison de  $\sim 287$  eV est assigné au carbone C1s, et le pic qui se trouve à  $\sim 532.5$  eV attribué à l'oxygène O1s, il est indicatif de la présence de SiO<sub>2</sub> régulier (c'est-à-dire, d'atomes O partagés d'une manière covalente par deux [SiO<sub>4</sub>] tétraèdres). On peut voir qu'il n'y a aucune différence dans l'énergie de liaison des éléments dans les poudres de bioverre xérogel et aérogel, indiquant qu'aucune variation de valence ne s'est produite pendant le processus de traitement thermique. Les quantités de carbone signalées par l'analyse EDS, et l'intensité plus au moins élevée du pic C1s présentée sur les spectres XPS qui peuvent être dû aux impuretés hydrocarbonées, qui contaminent très souvent les poudres de bioverre (Note qu'une contamination hydrocarbonée est également souvent observée dans la région 3000-2900 cm<sup>-1</sup> des spectres IR) [34-37].

La déconvolution des pics des éléments Si2p, Ca2p et P2p (figure III.1.9) est réalisée pour déterminer plus précisément l'évolution, la nature et la forme de chaque élément dans les poudres de bioverre xérogel et aérogel en fonction de la température de traitement.



**Figure III.1.9 :** Spectres de déconvolution des pics Si2p, P2p et Ca2p des poudres de bioverre: a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

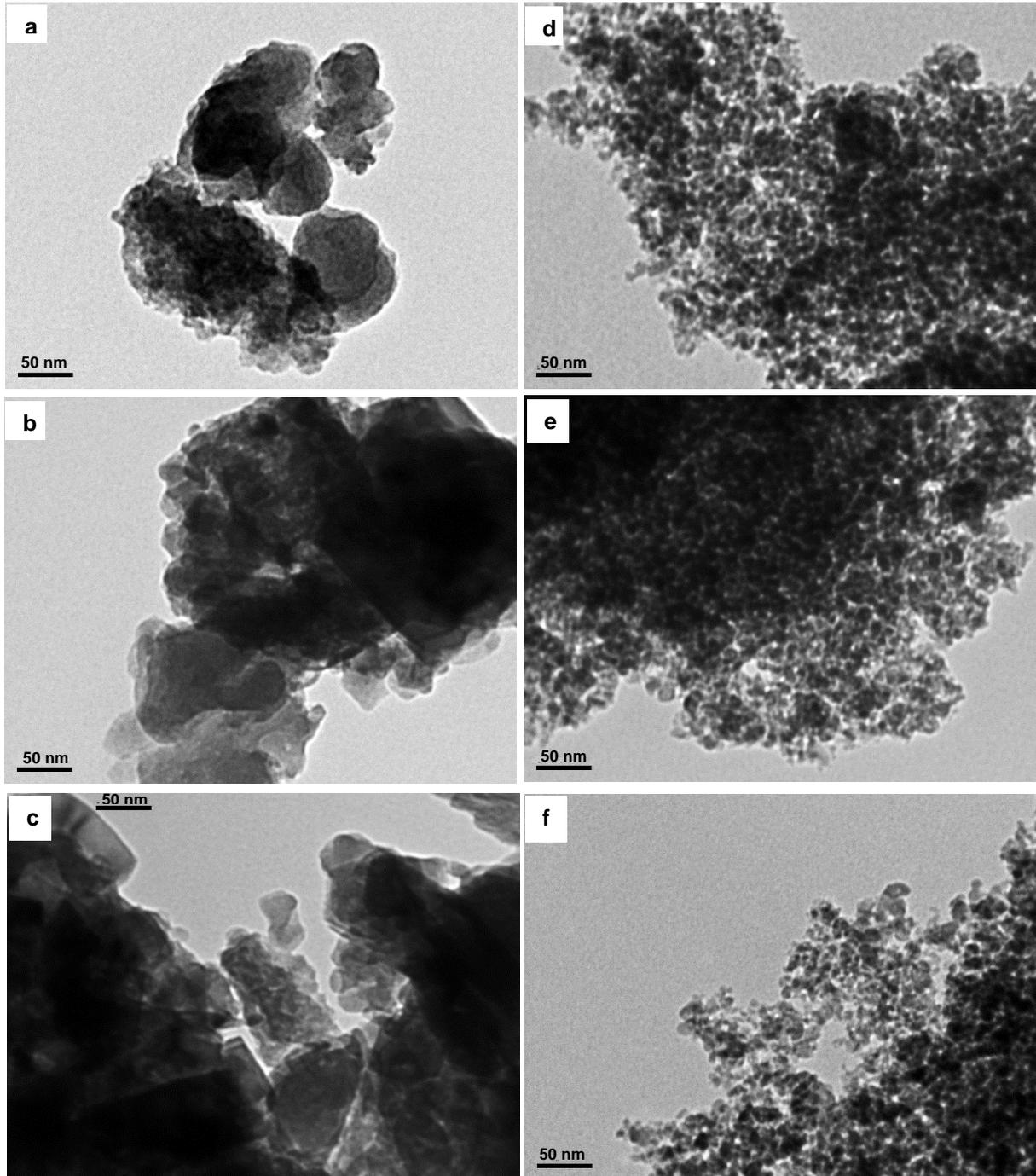
La figure III.1.9 présente les spectres de déconvolution des éléments de silicium, calcium et phosphore. On observe que le spectre XPS de silicium (Si2p), de calcium (Ca2p) et de phosphore (P2p) des poudres de bioverre xérogel et aérogel traitées à 400°C, 600°C et 800°C présentent les mêmes allures avec des intensités un peu variables avec la température de

traitement. Les changements dans la structure des environnements Si, Ca et P peuvent être décrits comme suit :

Dans le cas de la déconvolution du pic Si2p, on ne trouve qu'un seul composant pour Si, centré à une énergie qui varie entre 102.8 eV et 103.7 eV similaire à celle observée sur la silice ordinaire SiO<sub>2</sub> et aux atomes de silicium appartenant au SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>. Les variations des énergies de liaison reflètent les différences dans l'environnement électronique de l'élément Si, la valeur relativement faible des énergies de liaison du silicium peut être due au degré de dépolymérisation des unités SiO<sub>4</sub>. La dépolymérisation du silicate pourrait entraîner une augmentation du nombre d'unités Ca-O-Si et moins d'unités Si-O-Si, ce qui pourrait entraîner la formation de silicate de calcium. Les spectres de déconvolution du calcium comprennent deux zones principales Ca2p 1/2 (du côté des énergies de liaison hautes) (~350.8 – 351.3 eV) et Ca2p 3/2 (du côté des énergies de liaison faibles) (~347.1 – 347.8 eV). Les valeurs des énergies de liaisons sont assez proches des états chimiques de l'oxyde de calcium CaO et de la phase cristalline de silicate de calcium CaSiO<sub>3</sub> (wollastonite). Concernant les spectres de déconvolution du pic P2p, le pic se trouve entre 133,1 et 133,8 eV. La position du pic P ne change pas beaucoup avec la température de traitement.

### **I.2.6. Structure et morphologie des poudres de bioverre par MET**

La microscopie électronique à transmission (MET) est un outil de caractérisation des matériaux solides à l'échelle nanométrique. Le MET offre la possibilité de réaliser des images de hautes résolution et de recueillir des diagrammes de diffraction pour des petits grains ou cristaux. Pour nos expériences, les cristaux sont dispersés dans une solution d'éthanol dans un bain à ultrasons. Afin d'assurer la validité des résultats ci-dessus et de faire ressortir des informations morphologiques supplémentaires liées à la forme des particules et à leurs dimensions, des analyses MET ont été effectuées et les résultats de l'analyse sont représentés sur la figure III.1.10.



**Figure III.I.10 :** Micrographies MET des poudres de bioverre 63S : a- XG 400, b- XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600 et f- AG 800.

Les micrographies MET des particules de verre bioactif après le processus de traitement thermique sont représentées dans la figure III.I.10. Les valeurs de la taille des particules obtenues à partir des résultats de l'analyse d'image des micrographies MET ont également confirmé les résultats d'analyse MEB. Les micrographies montrent que les poudres de bioverre xérogel sont composées de particules irrégulières de taille moyenne qui varie entre 20 et 100

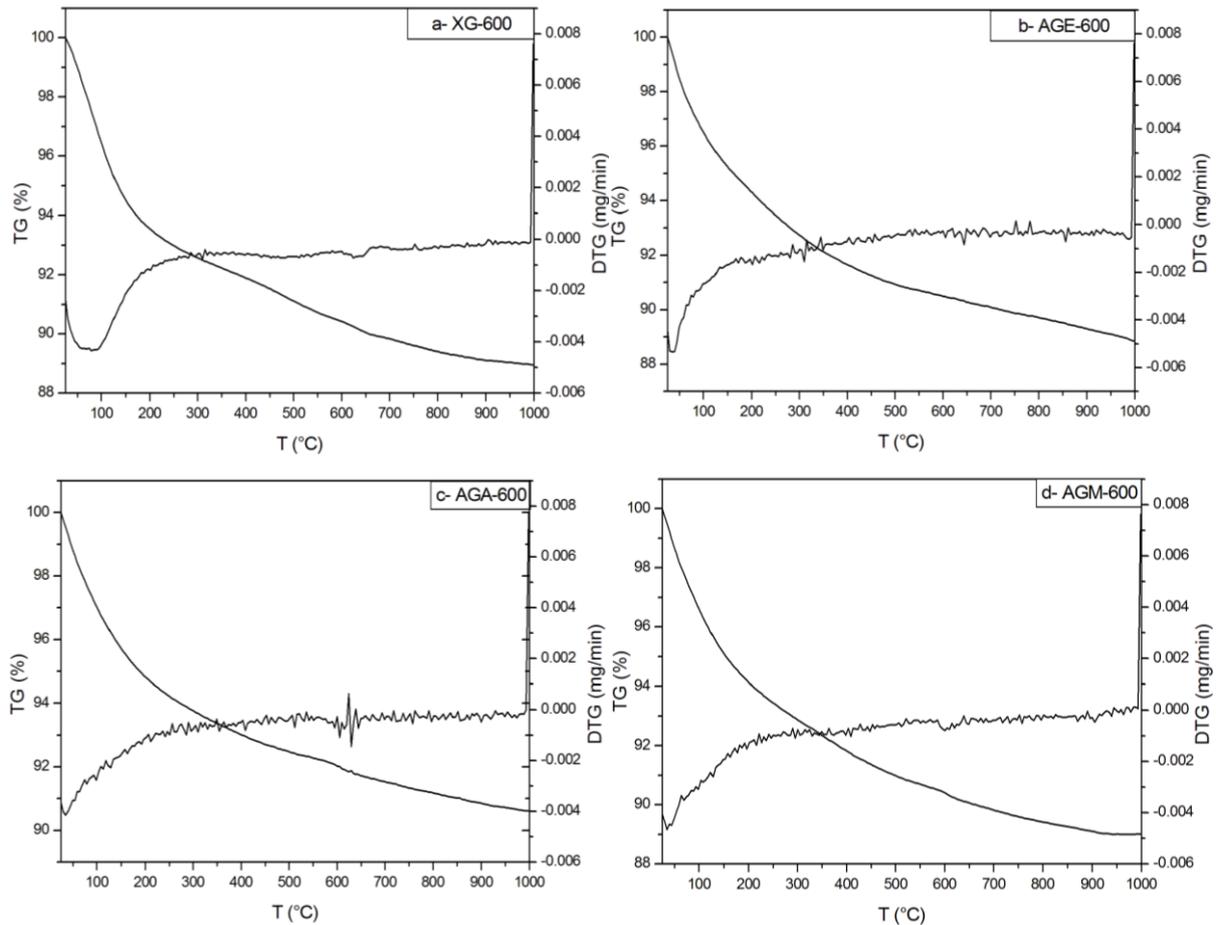
nm. Tandis que, les poudres de verre bioactif aérogel peuvent être décrites comme un assemblage de grappes avec une structure poreuse. Les poudres d'aérogel sont formées par l'agrégation de petites particules sphériques bien réparties de façon homogène et de taille inférieure à 10 nm. Les micrographies MET ont révélé que la taille des poudres de verre bioactif augmente avec l'augmentation de la température de traitement thermique. Ceci peut s'expliquer par la contraction structurelle et la densification lors du processus sol-gel des poudres de bioverre et la perte de poids due à la polycondensation de l'alcoxyde résiduel [8, 38, 39]. En outre, les grains de taille nanométrique et la fraction volumique élevée des joints de grains dans les matériaux nanostructurés présentent une biocompatibilité améliorée et une augmentation de l'adhésion et de la prolifération des ostéoblastes [40].

### **I.3. Influence du type de solvant sur la structure, la morphologie et composition des bioverres aérogel**

Pour évaluer l'influence du type de solvant dans le cas des aérogels sur la structure et la morphologie des poudres de bioverre aérogel, deux autres solvants en plus de l'éthanol (pression de 63 bars, température de 243°C) sont utilisés dans cette partie à savoir l'acétone (pression de 47 bars, température de 235°C) et le méthanol (pression de 79 bars, température de 240°C). Les différentes poudres de bioverre aérogel obtenues sont broyées et traitées à 600°C pendant 2 h avec une vitesse de chauffe de 5°/min et caractérisées avec différentes méthodes d'analyses. Les poudres de bioverre aérogel obtenues avec le solvant éthanol, acétone et méthanol sont notées AGE-600, AGA-600 et AGM-600, respectivement.

#### **I.3.1. L'analyse thermique TG/DTG des poudres de bioverre**

Des analyses TG/DTG sont effectuées sur les poudres de bioverre xérogel et aérogel préparées avec différents solvants. La figure III.1.11 suivante montre les résultats d'analyse thermique TG/DTG des poudres de xérogel et d'aérogel conduites à une vitesse de chauffe de 5°C/min sur un intervalle de 25°C à 1000°C.

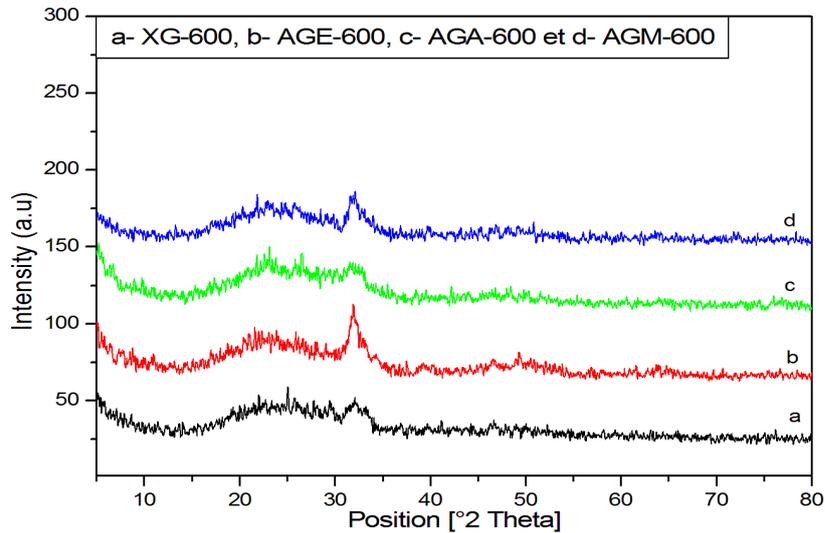


**Figure III.1.11** : Courbes TG / DTG des poudres de bioverre xérogel et aérogel : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600.

Les courbes TG des poudres de bioverre xérogel et aérogel présentent différentes étapes de perte de masse. Globalement, les poudres de bioverre xérogel (XG-600) et aérogel préparées avec l'éthanol et méthanol (AGE-600 et AGM-600) présentent une perte de masse identique de 11%. En revanche, la poudre de bioverre aérogel préparée avec l'acétone montre une légère différence de 1.5% par rapport aux autres poudres avec une perte de masse de 9.5%. Nous pouvons diviser cette perte de masse en trois zones : la première perte de masse se produit entre 100°C et 200°C est associée à l'évaporation endothermique de l'eau adsorbée et de l'éthanol présent à la surface des poudres et à l'élimination de l'eau structurale. La deuxième perte de masse est observée entre 350°C et 420°C est attribuée à la dégradation thermique des résidus organiques et à la réaction de décomposition des nitrates utilisés lors du procédé sol-gel et enfin la troisième perte de poids entre 550°C et 660°C est attribuée probablement à la transition vitreuse (transformation structurale) des particules de verre bioactif comme cela a été déjà souligné [5-9].

### I.3.2. Caractérisation par diffraction des rayons X (DRX)

Le caractère amorphe des poudres de bioverres est confirmé par la diffraction des rayons X à l'aide d'un diffractomètre pour 2 Theta compris entre 5° et 80°. Les diffractogrammes des différentes poudres de bioverre sont présentés dans la figure ci-dessous.

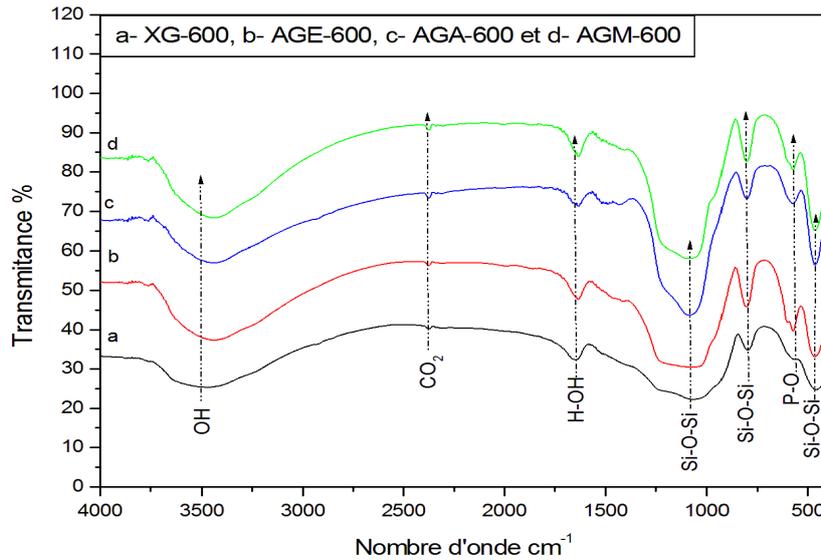


*Figure III.1.12 : Diffractogrammes des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d-AGM-600.*

Les diffractogrammes des différentes poudres de bioverre synthétisées sont présentés dans la figure III.1.12. Les résultats mettent en évidence un halo de diffraction allant de 20 à 37° pour toutes les poudres de bioverre (figure III.1.12, a-d). Cet halo de diffraction est caractéristique des phénomènes de diffusion dans les matériaux amorphes, donc d'absence d'ordre à longue distance dans les poudres de bioverre [22, 41]. En même temps, un petit pic d'intensité faible à la position 32° est observé, ce pic peut être affecté à la wallastonite ( $\text{CaSiO}_3$ ), ou à l'apatite [13, 18, 24].

### I.3.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (IRTF)

Les spectres de transmission infrarouge des différentes poudres de bioverre sont enregistrés entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ , à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure III.1.13.

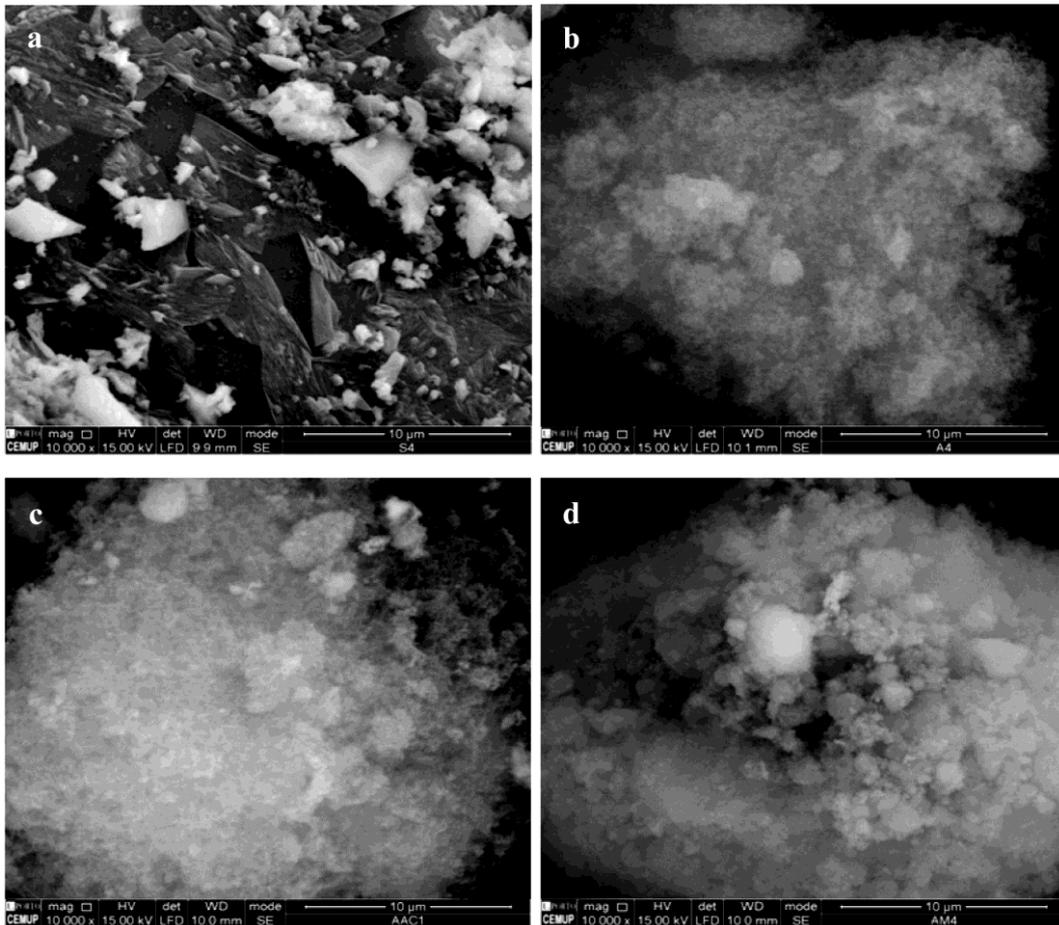


**Figure III.1.13 :** Spectres IRTF des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d-AGM-600.

L'analyse spectrale IRTF des poudres est présentée dans la Figure III.1.13. Les spectres des poudres de bioverre aérogel élaborées avec les deux solvants acétone et méthanol (AGA-600 et AGM-600) montrent les mêmes bandes d'absorptions observés dans les poudres de XG-600 et AGE-600 présentées dans la première partie. Trois bandes de vibration Si-O-Si sont observées entre 1036 - 1082  $\text{cm}^{-1}$ , 785 - 790  $\text{cm}^{-1}$  et 453 - 463  $\text{cm}^{-1}$  [6, 24, 28, 29]. Ces bandes prouvent que les poudres sont principalement composées d'un réseau Si-O-Si. Les spectres comportent également la bande autour de 560  $\text{cm}^{-1}$  qui est liée à la vibration de flexion P-O. La faible inflexion à 1620-1653  $\text{cm}^{-1}$  et la bande large centrée à 3438-3455  $\text{cm}^{-1}$  sont affectées au groupement OH d'eau adsorbée et au groupe d'hydroxyle structurel respectivement [10, 42, 43] et enfin, la bande à 2372  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à l'adsorption du  $\text{CO}_2$  par l'atmosphère [44].

#### **I.3.4. Structure et morphologie des poudres de bioverre par MEB**

La microstructure et la composition des poudres sont réalisées grâce au microscope électronique à balayage (MEB). Les micrographies des poudres sont illustrées dans la figure III.1.14.



*Figure III.1.14 : Micrographies MEB des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600.*

La figure III.1.14. Montre que les particules de bioverre aérogels (AGE-600, AGA-600 et AGM-600) sont de forme essentiellement sphérique avec une structure spongieuse. Contrairement à la poudre de xérogel (XG-600) qui est constituée de particules de formes irrégulières et des surfaces hétérogènes constituées de particules de taille aléatoire avec des arêtes vives et d'une structure compacte [33]. Les micrographies MEB montrent également que les poudres de bioverre aérogel obtenues sont moins denses et plus poreuses par rapport à la poudre de bioverre xérogel traitées à 600°C. Ces différences sont confirmées dans la définition des aérogels et des xérogels.

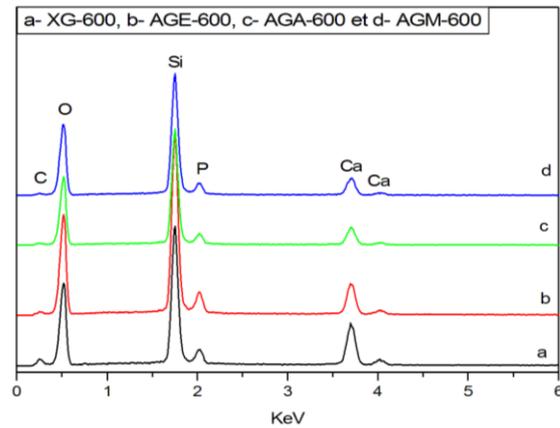
En comparant les trois poudres de bioverre aérogels, on constate que l'aérogel préparé avec le solvant éthanol est moins dense que les deux autres et l'aérogel préparé avec le solvant méthanol est le plus dense avec l'apparition d'agrégats sphériques. Cette différence est probablement due au groupement d'alkyle dans le cas des solvants éthanol et méthanol, et au groupement fonctionnel dans le cas de l'acétone.

### I.3.5. Analyse élémentaire par EDS

La composition élémentaire par microanalyse EDS des poudres obtenues est présentée dans le tableau III.1.2 et la figure III.1.15 suivants :

Elements	C	O	Si	P	Ca
% At					
XG-600	8.67	58.59	20.20	2.61	9.93
AGE-600	4.23	59.48	24.96	4.08	7.24
AGA-600	4.35	61.09	24.89	3.24	6.43
AGM-600	4.29	60.95	25.36	3.37	6.03

**Tableau III.1.2 :** La composition élémentaire des poudres de bioverre par l'analyse EDS.



**Figure III.1.15 :** Spectres d'analyse EDS des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600.

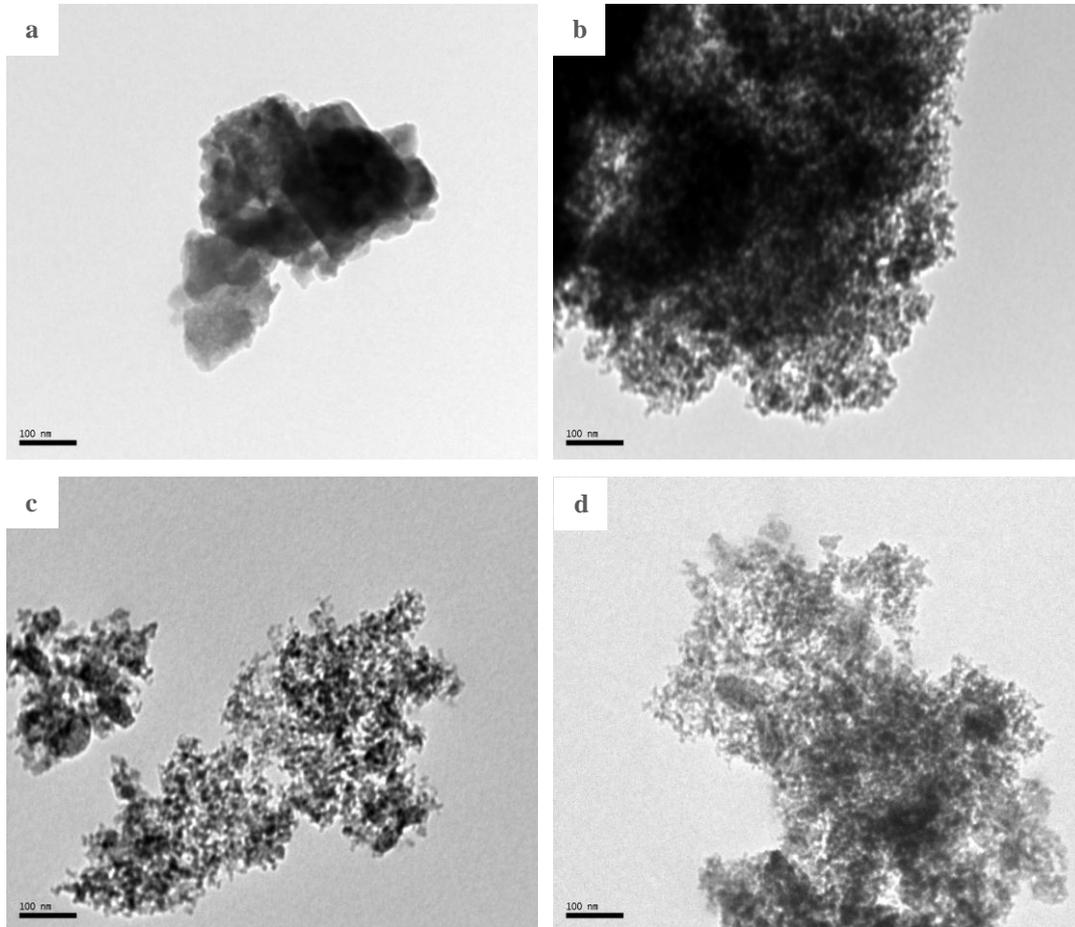
L'analyse quantitative EDS des poudres de bioverre xérogel et aérogel (figure III.1.15) confirme la présence de toutes les espèces introduites pendant l'étape de mélange du procédé sol-gel. Les pics observés à 1,75, 2 et 3.7 représentent Si, P et Ca respectivement indiquant les éléments constitués de bioverre ternaire [11, 20, 21].

Les pourcentages atomiques des différentes poudres de bioverre sont présentés dans le tableau I.2. Les résultats montrent que le pourcentage des éléments Si, Ca et P des poudres de bioverre aérogel traitées à 600°C sont approximativement identique.

Les pourcentages des éléments Si et P sont plus élevés dans le cas des verres bioactifs aérogels contrairement au Ca qui est plus élevé dans le verre bioactif xérogel. Ceci est certainement généré par la condensation des groupes silanol et l'élimination des nitrates et des composés organiques restants des précurseurs.

### I.3.6. Structure et morphologie des poudres de bioverre par MET

Pour obtenir des informations sur la taille et la forme des différentes poudres de bioverre, des analyses de microscopie électronique à transmission (MET) sont effectuées. Les résultats d'analyse sont présentés dans la figure III.1.16.



**Figure III.1.16 :** Micrographies MET des poudres de bioverre : a- XG-600, b- AGE-600, c- AGA-600 et d- AGM-600.

Les micrographies MET des particules de bioverre xérogel et aérogel préparées avec différents solvants et traitées à 600°C sont indiquées dans la figure III.1.16. Comme on peut le voir à partir des images MET (la figure III.1.16, a-d), les poudres d'aérogel préparées avec les solvants acétone et méthanol (AGA-600 et AGM-600) ont presque la même structure et la même taille des particules comparées à la poudre d'aérogel préparée à partir d'éthanol (AGE-600). Les particules sont presque de forme sphérique et bien réparties de façon homogène, d'une structure spongieuse et moins dense avec une taille moyenne des particules inférieure à 10 nm. La poudre de xérogel (XG-600) est composée de particules irrégulières de taille supérieure à 20 nm avec une structure plus dense ceci a été déjà souligné par plusieurs auteurs [45, 46].

## Conclusion

Malgré les études diverses et variées réalisées sur l'élaboration des bioverres depuis plusieurs années, la plupart de celles-ci portent sur l'élaboration des bioverres sous forme dense ou de particules grossière (bioverre xérogel), peu d'entre elles font mention d'élaboration de bioverre avec des particules fines de taille nanométrique (bioverre aérogel). A notre connaissance, il n'existe aucune étude détaillée sur la synthèse des poudres de bioverre à partir des aérogels. Au cours de cette étude, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir des poudres de bioverre ternaire ( $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ ) ayant des particules très fines via la méthode sol-gel à partir d'un aérogel. Les données relatives à la préparation des poudres de bioverre à différentes conditions de séchage des gels et différentes températures de traitement ( $400^\circ\text{C}$ ,  $600^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$ ), nous ont permis de mettre en évidence l'influence de ces derniers sur la structure et la morphologie des poudres de xérogel et aérogel préparées. L'analyse DRX montre une structure cristalline au-delà de  $600^\circ\text{C}$  pour les deux poudres xérogel et aérogel. Les caractérisations par EDS et XPS révèlent la présence de tous les éléments composant le bioverre ternaire. Les résultats de caractérisation MEB et MET ont montré que les poudres de bioverre aérogel sont caractérisées par une structure moins dense et spongieuse avec une taille de particules inférieure à 10 nm. Cependant, les poudres de bioverre xérogel présentent une structure dense avec une taille de particule varie entre 20 nm et 100 nm. La densification augmente avec l'augmentation de la température de traitement et l'analyse thermique TG/DTG est en accord avec les autres résultats. En bref, la morphologie et la structure des poudres de bioverre produites dépendent du type de gel (xérogel ou aérogel) et de la température de traitement.

L'étude de l'influence du type de solvant pour les poudres de bioverre aérogel traitées à  $600^\circ\text{C}$  est réalisée également dans cette partie. Les résultats obtenus montrent que la texture et la morphologie des poudres de bioverre élaborées sont influencées par deux facteurs, le type de gel utilisé (xérogel ou aérogel) et le type de solvant pour les poudres d'aérogel (éthanol, acétone ou méthanol). Les différentes analyses montrent que les poudres de bioverre aérogel préparées par les différents solvants ont des propriétés (structure et morphologie) pratiquement identique. Les différences observées peuvent être expliquées par les conditions de séchage des gels pour les différents solvants ou par la différence du groupement alkyle dans le cas des solvants d'éthanol et de méthanol et le groupement fonctionnel dans le cas de l'acétone.

## Références bibliographiques

- [1]. J.C. Elliot. Structure and Chemistry of Apatite and Other Calcium Orthophosphates, Studies in Inorganic Chemistry 18, Elsevier, Amsterdam, 1994; 230.
- [2]. A. Doostmohamadi, A. Monshi, M.H. Fathi, S. Karbasi, O. Braissant, Q.U. Daniels. Direct cytotoxicity evaluation of 63S bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using yeast model and human chondrocyte cells by microcalorimetry. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2011; 22: 2293-2300.
- [3]. A.R. Boccaccini, Q. Chen, L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier. Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass-derived glass-ceramics. The Royal Society of Chemistry. 2007; 136: 27-44.
- [4]. N. Letaief, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, P. Meleard, T. Pott, J. Jelassi, R. Dorbez-Sridi. Effect of aging temperature on the structure, pore morphology and bioactivity of new sol-gel synthesized bioglass. Journal of Non-Crystalline Solids. 2014; 402: 194-199.
- [5]. W.H. Lu, K.D. Li, C.H. Lu, L.G. Teoh, W.H. Wu, Y.C. Shen. Synthesis and Characterization of Mesoporous SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Bioactive Glass by SolGel Process. Materials Transactions. 2013; 54: 791-795.
- [6]. P.I. Riti, A. Vulpoi, V. Simon. Effect of pH dependent gelation time and calcination temperature on silica network in SiO<sub>2</sub>-CaO and SiO<sub>2</sub>-MgO glasses. Journal of Non-Crystalline Solids. 2015; 411: 76-84.
- [7]. S.M. Ahmadi, A. Behnamghader, A. Asefnejaad. Sol-gel synthesis, characterization and in vitro evaluation of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioactive glass nanoparticles with various CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ratios. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 2017; 12: 847-860.
- [8]. C. Alexandre. Sol-gel methods for synthesis of aluminosilicates for dental applications. Journal of Dentistry. 2016; 55: 105-113.
- [9]. S.Ö. Gönen, M.E. Taygun, A. Aktürk, S. Küçükbayrak. Fabrication of nanocomposite mat through incorporating bioactive glass particles into gelatin/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers by using Box-Behnken design. Materials Science and Engineering C. 2016; 67: 684-693.
- [10]. T. Charoensuk, C.S. Thitkul, U. Boonyang. Thermal analysis of mesoporous and macroporous bioactive glasses synthesized by Sol-Gel method. Romanian journal of materials. 2013; 43: 320-325.
- [11]. H.A. Elbatal. M.A. Azooz. E.M.A. Khalil. A. Soltan Monem. Y.M. hamdy. Characterization of some bioglass-ceramics. Materials Chemistry and Physics. 2003; 80: 599-609.

- [12]. M.H. Fathi, A. Doostmohammadi. Bioactive glass nanopowder and bioglass coating for biocompatibility improvement of metallic implant. *Journal of materials processing technology*. 2009; 209: 1385-1391.
- [13]. P. Jiang, H. Lin, R. Xing, J. Jiang, F. Qu. Synthesis of multifunctional macroporous-mesoporous TiO<sub>2</sub>-bioglasses for bone tissue engineering. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2011; 61: 421-428.
- [14]. A. Balamurgan, G. Balossier, D.L. Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent. Mater*. 2008; 24: 1343-1351.
- [15]. S. Solgi, M. Khakbiz, M. Shahrezaee, A. Zamanian, M. Tahriri, S. Keshtkari, M. Raz, K. Khoshroo, S. Moghadas, A. Rajabnejad. Synthesis, Characterization and *In Vitro* Biological Evaluation of Sol-gel Derived Sr-containing Nano Bioactive Glass. *Silicon*. 2017 ; 9: 535–542.
- [16]. M. Mami, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi, F. Mezahi, E. Dietrich. Investigation of the surface reactivity of a sol–gel derived glass in the ternary system SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. *Applied Surface Science*. 2008; 254: 7386-7393.
- [17]. F. Sharifianjazi, N. Parvin, M. Tahriri. Synthesis and characteristics of sol-gel bioactive SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Ag<sub>2</sub>O glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2017; 476: 108-113.
- [18]. E.V. tarasyuk. O.A. Shilova. A.M. Bochkin. A.D. Pomogailo. Investigation into the influence of organic modifiers and ultradispersed hybrid fillers on the structure and properties of glass-ceramic coating prepared by the sol-gel method. *Glass Physics and Chemistry*. 2006; 32: 439-447.
- [19]. A. Saboori, M. Rabiee, F. Moztarzadeh, M. Sheikhi, M. Tahriri, M. Karimi. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO bioglass. *Materials Science and Engineering C*. 2009; 29: 335-340.
- [20]. L. Radev. K. Hristova. V. Jordanov. M.H.V. Fernandes. I.M.M. Slvado. In vitro bioactivity of 70 Wt. % SiO<sub>2</sub>- 30 Wt. % CaO sol-gel glass, doped with 1.3 and 5 Wt. % NbF<sub>5</sub>. *Central European Journal of Chemistry*. 2012; 10: 137-145.
- [21]. A. Rainer, S.M. Giannitelli, F. Abbruzzese, E. Traversa, S. Licocchia, M. Trombetta. Fabrication of bioactive glass-ceramic foams mimicking human bone portions for regenerative medicine. *Qcta Biomaterialia*. 2008; 4: 362-369.
- [22]. A. Lucas-Girot, F.Z. Mezahi, M. Mami, H. Oudadesse, A. Harabi, M. Le Floch. Sol–gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-

- P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Comparison with melting method. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2011; 357: 3322–3327.
- [23]. J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, X.G. Meng, J.Z. Shi. Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol–gel derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglass. *Ceramics International*, 2010 ; 36: 1911-1916.
- [24]. J. Ma. C.Z. Chen. D.G. wang. J.H. Hu. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of magnesium-doped sol-gel glass and glass-ceramics. *Ceramics International*. 2011; 37: 1637-1644.
- [25]. W. Zhao, J. Wang, W. Zhai, Z. Wang, J. Chang. The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate. *Biomaterials*. 2005; 26: 6113-6121.
- [26]. W. Xia, J. Chang. Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol–gel method. *Materials Letters*, 2007; 61: 3251-3253.
- [27]. J. Qian, Y. Kang, Z. Wei, W. Zhang. Fabrication and characterization of biomorphic 45S5 bioglass scaffold from sugarcane. *Materials Science and Engineering C*. 2009; 29: 1361-1364.
- [28]. M. Mehdipour, A. Afshar. A study of the electrophoretic deposition of bioactive glass-chitosan composite coating. *Ceramics International*. 2012; 38: 471-476.
- [29]. H. Hajiali, S. Karbasi, M. Hosseinalipour, H.R. Rezaie. Preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate)/bioglass nanoparticles for bone tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med*. 2010; 21: 2125-2132.
- [30]. J.P. Nayak, S. Kumar, J. Bera. Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2010; 356: 1447-1451.
- [31]. A.M. El-Kady, E.A. Saad, B.M. Abd El-Hady, M.M. Farag. Synthesis of silicate glass/poly(L-lactide) composite scaffolds by freeze-extraction technique: Characterization and in vitro bioactivity evaluation. *Ceram. Int*. 2010; 36: 995-1009.
- [32]. W. Gong, Y. Dong, S. Wang, X. Gao, X. Chen. A novel nano-sized bioactive glass stimulates osteogenesis via the MAPK pathway. *The Royal Society of Chemistry*, 2017; 7: 13760-13767.
- [33]. S. Solgi, M. Shahrezaee, A. Zamanian, T.S. Jafarzadeh kashi, M. Raz, K. Khoshroo, M. Tahriri. Sol-gel synthesis and characterization of SiO<sub>2</sub> Cao-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SrO bioactive glass: in vitro study. *Key Engineering Materials*. 2015; 631: 30-35.

- [34]. J.D. Santos, L.J. JHA, F.J. Monteiro. *In vitro* calcium phosphate formation on SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass reinforced hydroxyapatite composite: a study by XPS analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1996; 7: 181-185.
- [35]. C.X. Wang, Z.Q. Chen, M. Wang. Fabrication and characterization of bioactive glass coatings produced by the ion beam sputter deposition technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2002; 13: 247-251.
- [36]. N.C. Koseoglu, A. Buyukaksoy, A.Y. Oral, M.H. Aslan. Hydroxyapatite/Bioactive Glass Films Produced by a Sol–Gel Method: In Vitro Behavior. *Advanced Engineering Materials*. 2009; 11: B194-B199.
- [37]. B.R. Barrioni, P. Naruphontjirakul, E. Norris, S. Li, N.L. Kelly, J.V. Hanna, M.M. Stevens, J.R. Jones, M.M. Pereira. Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019; 547: 382-392.
- [38]. S. Simon, R. Ciceo-Lucacel, T. Radu, L. Baia, O. Ponta, A. Iepure, V. Simon. Gold nanoparticles developed in sol-gel derived Apatite-bioactive glass composites. *J Mater Sci: Mater Med*. 2012; 23:1193-1201.
- [39]. D. Fernando, P. Colon, M. Cresswell, C. Journet, N. Pradelle-Plasse, P. Jackson, B. Grosgeat, N. Attik. The influence of precursor addition order on the porosity of sol–gel bioactive glasses. *Dental Material*. 2018; 34: 1323-1330.
- [40]. S. Arabyazdi, A. Yazdanpanah, A. Ansari Hamedani, A. Ramedani, F. Moztaarzadeh. Synthesis and characterization of CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-Li<sub>2</sub>O-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bioactive glasses: The effect of Li<sub>2</sub>O-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> content on the structure and in-vitro bioactivity. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2019; 503: 139-150.
- [41]. I.B. Leonor, R.A. Sousa, A.M. Cunha, R.L. Reis. Novel starch thermoplastic/Bioglass composites: Mechanical properties, degradation behavior and in-vitro bioactivity. *Journal of materials science: Materials in medicine*. 2002; 13: 939-945.
- [42]. D. Zhitomirsky, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. zhitomirsky. Electrophoretic deposition of bioactive glass/polymer composite coating with and without HA nanoparticle inclusions for biomedical applications. *Journal of Materials Processing Technology*. 2009; 209: 1853-1860.
- [43]. H.C. Li, D.G. Wang, J.H. Hu, C.Z. Che. Effect of various additives on microstructure, mechanical properties, and in vitro bioactivity of sodium oxide-calcium oxide-silica-phosphorus pentoxide glass–ceramics. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013; 405: 296–304.

- [44]. D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, Y.F. Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001; 22: 87-96.
- [45]. L. Courtheoux, F. Popa, E. Gautron, S. Rossignol, C. Kappenstein. Platinum supported on doped alumina catalysts for propulsion applications. Xerogels versus aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2004; 350: 113-119.
- [46]. M. Taherian, R. Rojaee, M. Fathi, M. Tamizifar. Effect of different sol-gel synthesis processes on microstructural and morphological characteristics of hydroxyapatite-bioactive glass composite nanopowders. *Journal of Advanced Ceramics*. 2014; 3: 207-214.

***PARTIE II. BIOACTIVITE ET CYTOCOMPATIBILITE DES POUDRES  
DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL***

## ***PARTIE II. BIOACTIVITE ET CYTOCOMPATIBILITE DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL***

Après la synthèse et l'évaluation de la structure et la morphologie des différentes poudres de verre xérogel et aérogel. L'objectif est d'utiliser ces poudres de verre comme implant, matériau de comblement osseux ou de recouvrement, de ce fait il devient donc indispensable de s'assurer de leurs caractères bioactif et biocompatible. Dans ce chapitre nous présenterons l'évaluation biologique des poudres de verre xérogel et aérogel élaborées tant au niveau de leurs bioactivité caractérisée par la précipitation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée (HAPc) à leurs surfaces, qu'au niveau de leurs biocompatibilité caractérisée par la tolérance des cellules ostéoblastes et fibroblastes mises en contact avec ces poudres.

Pour qualifier les poudres de verre bioactif élaborées en tant que biomatériaux, des tests de bioactivité et de biocompatibilité s'avèrent nécessaires. Ces derniers sont réalisés en utilisant une solution SBF, les cellules ostéoblaste humain MG63 et les cellules fibroblastes NIH/3T3. La cytocompatibilité est déterminée en analysant le comportement des ostéoblastes MG63 cultivés directement sur la surface des pastilles de verre et le comportement des fibroblastes NIH/3T3 en utilisant le contact indirect sur les extraits des poudres de verre bioactif. La bioactivité, la prolifération et la viabilité cellulaire sont analysées par DRX et MEB-EDS.

### **II.1. Test de bioactivité *in vitro* : Comportement des poudres de bioverre dans un fluide biologique simulé (SBF)**

#### **II.1.1. Influence des transformations sur la bioactivité**

L'ostéointégration d'un implant est régie par de nombreux phénomènes ayant lieu à l'interface, entre l'os et la surface du matériau. La dégradation du matériau est accompagnée de phénomènes de précipitation conduisant à la formation d'une couche d'apatite carbonatée proche du minéral osseux. Cette précipitation assure l'intégration de l'implant sur le site osseux receveur. Ces phénomènes peuvent être reproduits, *in vitro*, par immersion dans une solution de type SBF (Simulated Body Fluid). Cette technique génère un intérêt croissant depuis sa première utilisation en 1990 par T. Kokubo [1, 2].

Des tests de bioactivité *in vitro* sont utilisés pour évaluer la formation d'une couche d'apatite à la surface des pastilles de verre, considérée comme un indicateur de la bioactivité *in vivo* [3]. L'évaluation de la bioactivité *in vitro* des poudres de verre bioactif préparées à partir d'un

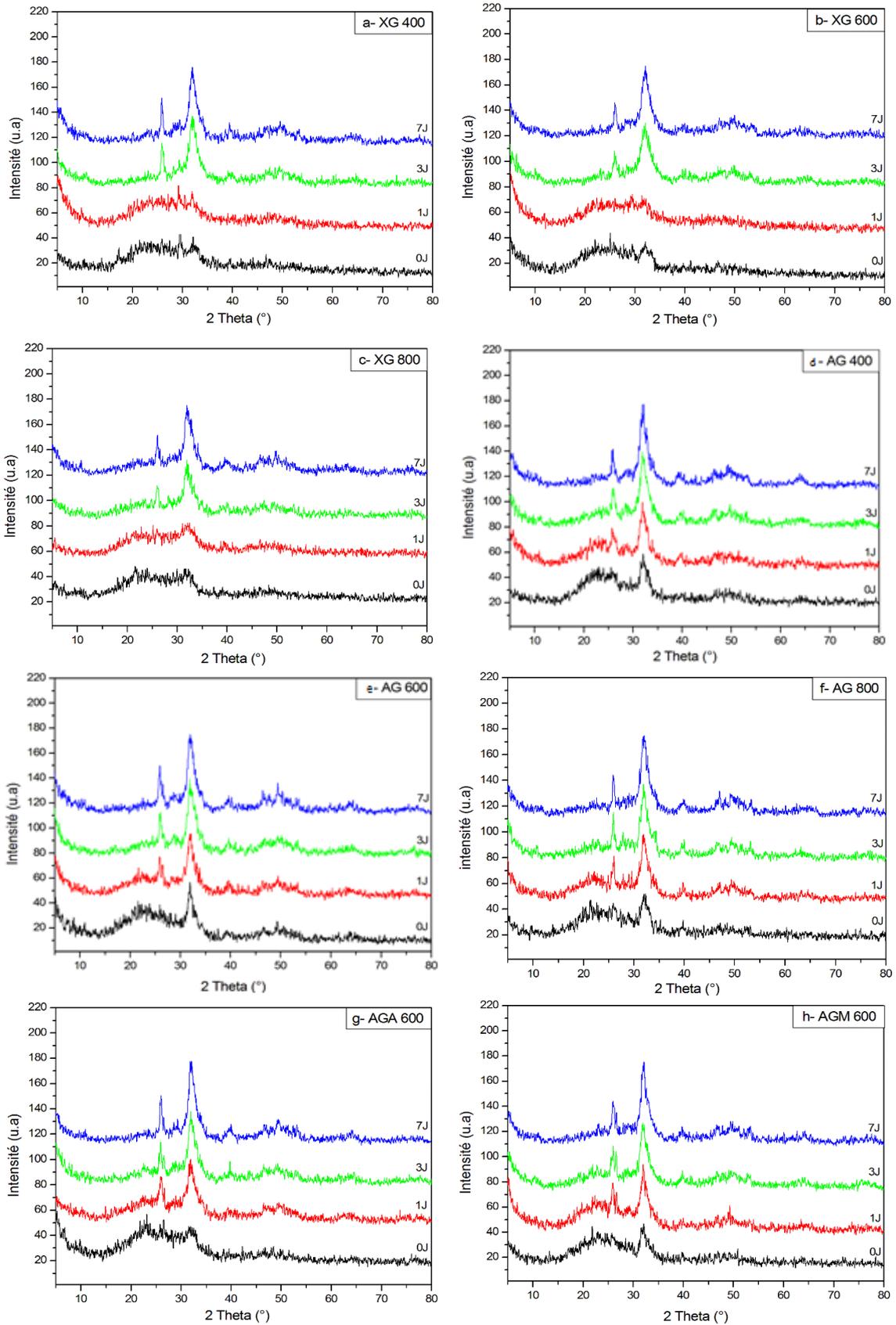
xérogel et aérogel à différentes températures de traitement (400°C, 600°C et 800°C) et pour différents solvants (éthanol, acétone et méthanol) est réalisée en utilisant une solution de SBF préparée selon le protocole de Kokubo [1, 2] (le protocole est détaillé dans le chapitre II).

A l'issue de l'immersion dans le milieu SBF, la surface des pastilles est analysée par la diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS) et la microscopie électronique à balayage (MEB). Le pH des solutions SBF récoltées après immersion est mesuré à l'aide d'une sonde pH.

### **II.1.2. Analyse des pastilles par diffraction des rayons X**

Après immersion et séchage à l'air, chaque pastille est analysée par diffraction des rayons X. La figure III.II.1 montre les diagrammes DRX des pastilles des poudres xérogel et aérogel traitées thermiquement à 400, 600 et 800°C et des pastilles des poudres aérogel préparées avec les solvants acétone et méthanol traitées à 600°C, avant et après immersion dans la solution de SBF pendant 1, 3 et 7 jours..

Nous pouvons voir sur la figure III.II.1, l'apparition de deux pics de diffraction à des positions ( $2\theta$ ) de 26° et 32° correspondant aux réflexions (002) et (211) d'une phase d'apatite comme l'ont déjà remarqué par Nayak, J. Ma et al [4, 5]. Ces pics sont faiblement observés après un jour pour les pastilles de xérogel (figure III.II.1a-c), après 3 jours d'immersion, ces pics sont clairement observés pour toutes les pastilles xérogel et aérogel quelque soit la température de traitement ou le type de solvant utilisé. Ces résultats indiquent qu'une phase cristalline d'apatite a été déposée sur la surface des pastilles. Cependant, les pics de diffraction sont moins définis dans les pastilles de xérogel qui peuvent être dues à une épaisseur plus faible de la couche de l'hydroxyapatite formée. L'intensité des pics de diffraction relatifs à la phase cristalline de la couche de l'hydroxyapatite formée augmente avec le temps d'immersion [6, 7].



**Figure III.11.1 :** *Diffractogrammes XRD des pastilles de bioverre 63S avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours : a- XG 400, b-XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600,f- AG 800, g-AGA 600 et h-AGM 600.*

### II.1.3. Analyse des surfaces et morphologie des pastilles après immersion

Un microscope électronique à balayage couplé à l'EDS est employé pour observer et analyser chimiquement la surface des pastilles après immersion dans le SBF pendant 1, 3 et 7 jours.

Le tableau III.11.1 et les figures III.11.2 et III.11.3 présentent les résultats de l'analyse EDS et les micrographies MEB de la surface des pastilles.

#### II.1.3.1. Composition élémentaire par analyse EDS

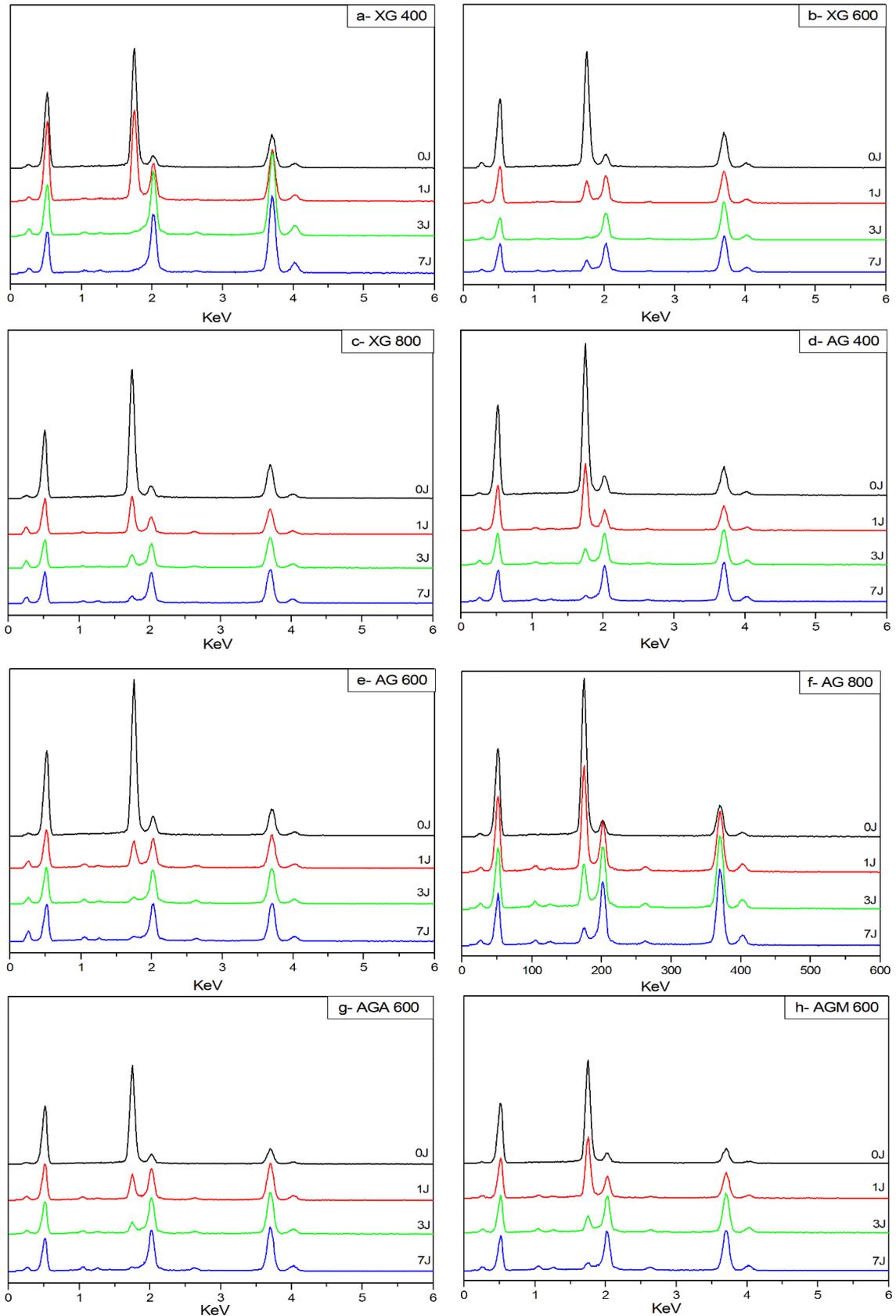
L'analyse élémentaire des pastilles de verre avant et après immersion dans SBF (0, 1, 3 et 7 jours) est confirmée par une technique d'analyse par rayons X à dispersion d'énergie (EDS). L'analyse est effectuée sur une surface de 150µm. Les résultats sont présentés dans le tableau III.11.1 et dans la figure III.11.2.

**Tableau III.11.1.** Analyse élémentaire EDS des poudres de verre bioactif avant et après immersion dans la solution SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours.

Echantillons /At %	C	O	Si	P	Ca
XG 400, 0J	5.74	61.01	21.04	2.68	9.52
XG 400, 1J	5.05	60.91	14.04	7.23	12.76
XG 400, 3J	7.43	57.26	0.47	12.07	22.76
XG 400, 7J	6.10	55.87	0.46	13.11	24.43
XG 600, 0J	8.67	58.59	20.20	2.61	9.93
XG 600, 1J	5.90	61.71	6.65	10.00	15.74
XG 600, 3J	5.53	57.71	0.89	12.17	23.70
XG 600, 7J	5.76	58.64	0.57	12.66	22.36
XG 800, 0J	5.41	58.12	23.52	2.94	10.02
XG 800, 1J	15.62	50.50	12.20	7.76	13.93
XG 800, 3J	14.61	50.55	4.66	10.68	19.51
XG 800, 7J	11.92	53.03	2.18	12.39	20.48
AG 400, 0J	3.99	60.98	23.76	4.11	7.16
AG 400, 1J	5.62	59.00	17.64	6.80	10.94
AG 400, 3J	9.18	57.08	4.72	11.21	17.82
AG 400, 7J	8.11	58.25	1.53	12.45	19.66
AG 600, 0J	4.23	59.48	24.96	4.08	7.24
AG 600, 1J	12.91	52.63	7.57	10.69	16.20

AG 600, 3J	10.99	55.39	1.74	13.02	18.88
AG 600, 7J	16.09	51.83	1.10	12.61	18.37
AG 800, 0J	5.09	59.66	24.10	3.16	8.00
AG 800, 1J	5.36	57.43	14.57	8.75	13.89
AG 800, 3J	5.99	56.99	6.91	11.63	18.49
AG 800, 7J	6.00	56.74	2.84	12.70	21.72
AGA 600, 0J	4.35	61.09	24.89	3.24	6.43
AGA 600, 1J	7.67	58.17	6.89	10.46	16.82
AGA 600, 3J	7.49	57.70	3.09	12.05	19.67
AGA 600, 7J	6.99	58.72	0.90	13.00	20.38
AGM 600, 0J	4.29	60.95	25.36	3.37	6.03
AGM 600, 1J	6.26	57.23	16.95	7.77	11.79
AGM 600, 3J	6.64	59.38	4.41	11.82	17.76
AGM 600, 7J	7.10	59.38	2.08	12.66	18.78

La Figure III.ii.2, présentant les spectres EDS des pastilles de verre bioactif, permettent de suivre l'évolution de la bioactivité en fonction du temps d'immersion. Les résultats (tableau III.ii.1, figure III.ii.2) montrent une augmentation remarquable de l'intensité des éléments calcium et phosphore et une diminution remarquable de pic de silice dans les pastilles de verre XG 600, AG 600 et AGA 600 dès le premier jour d'immersion dans la solution de SBF, contrairement aux pastilles de verre XG 400, AG 400, XG 800, AG 800 et AGM 600 qui présentent une légère diminution de la silice après 1 jour d'immersion. Cela peut être expliqué par la présence d'une phase cristalline dans les poudres traitées à 800°C et la non stabilité des poudres traitées à 400°C. Peitl et al ont montré que les poudres non cristallines sont plus réactives que les poudres cristallisées [8, 9]. Au bout de 3 et 7 jours d'immersion, la phase apatite devient prépondérante. Nous remarquons aussi, une disparition quasi totale du pic Si et l'apparition uniquement des pics Ca et P qui confirment le recouvrement total des surfaces des pastilles de verre bioactif par une couche d'hydroxyapatite carbonaté après 3 jours d'immersion. La présence du calcium et du phosphore est détectée en quantité importante après 7 jours d'immersion, signifiant que l'épaisseur de la couche d'apatite croît avec le temps d'immersion dans toutes les pastilles [10].



**Figure III.11.2 :** Analyse élémentaire EDS des pastilles de bioverre 63S avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours : a- XG 400, b-XG 600, c- XG 800, d- AG 400, e-AG 600, f- AG 800, g-AGA 600 et h-AGM 600.

### II.1.3.2. Morphologie des pastilles après immersion dans une solution SBF

La formation d'os comme couche d'apatite au cours des expériences de bioactivité est également évaluée en examinant la variation de la morphologie de la surface en fonction du temps d'incubation dans le SBF. Les figures III.11.3-10 montrent la morphologie de la surface des pastilles de verre bioactif avant et après immersion dans le SBF à 0, 1, 3 et 7 jours.

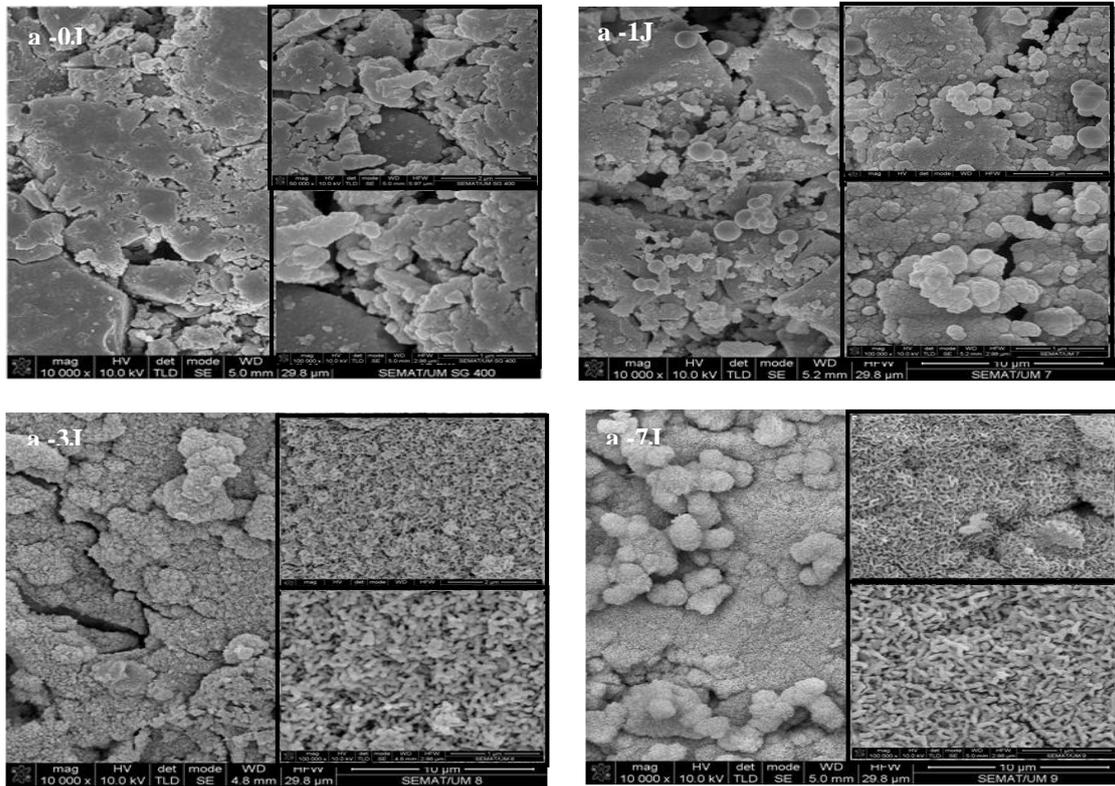
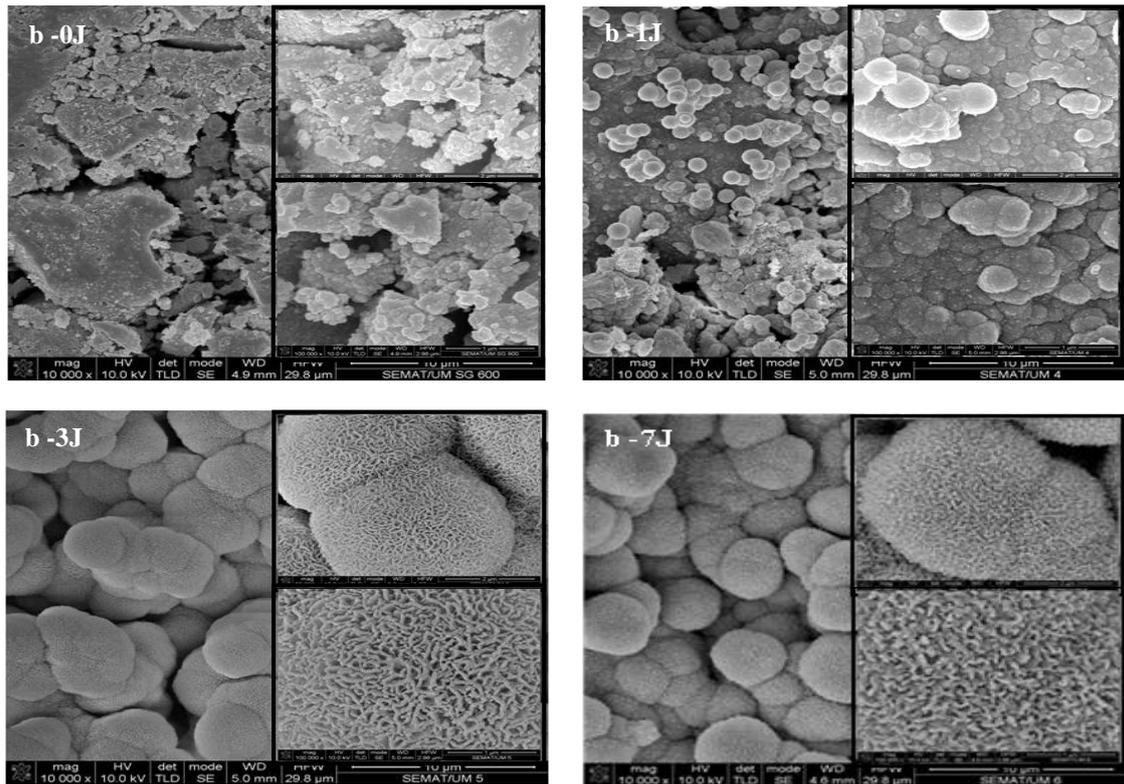
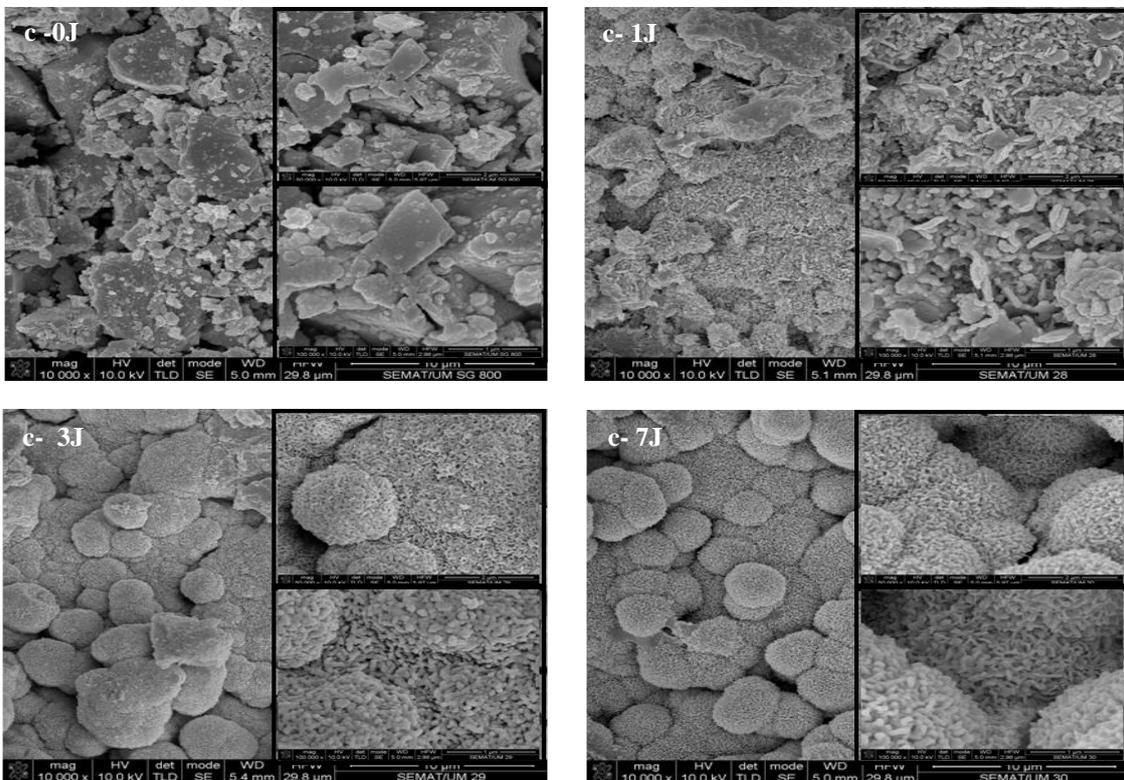


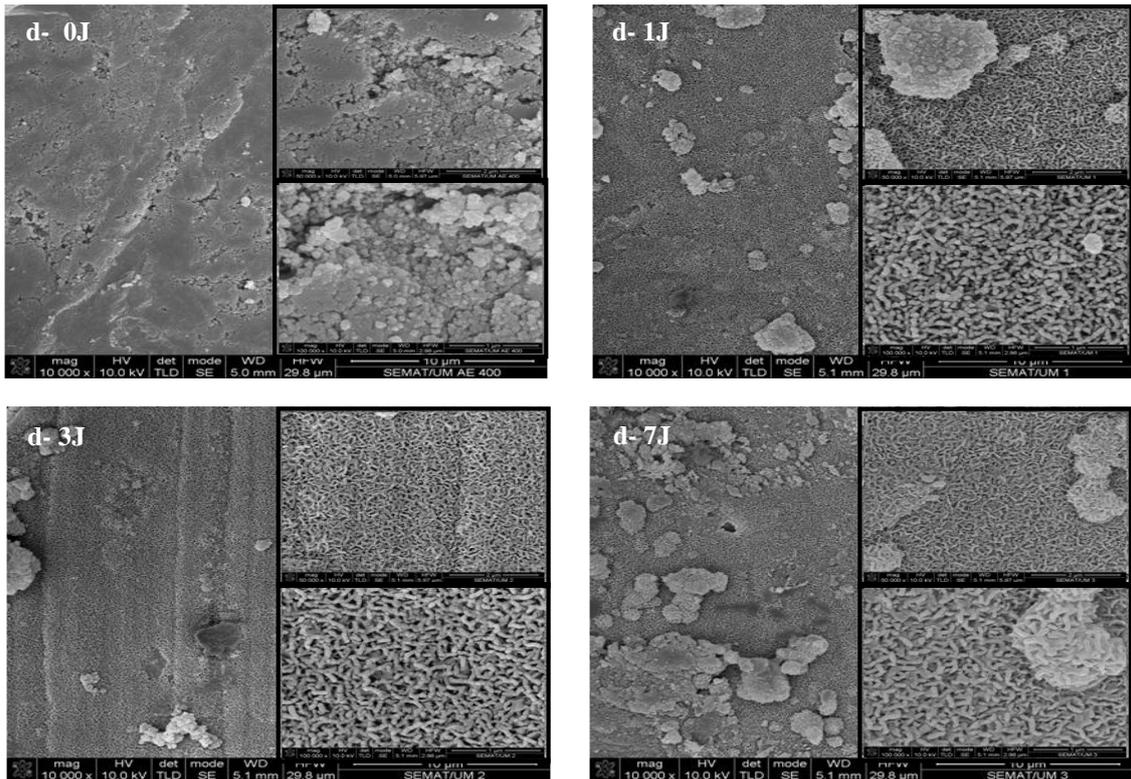
Figure III.11.3 : Micrographies MEB des pastilles de bioverre XG 400 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours



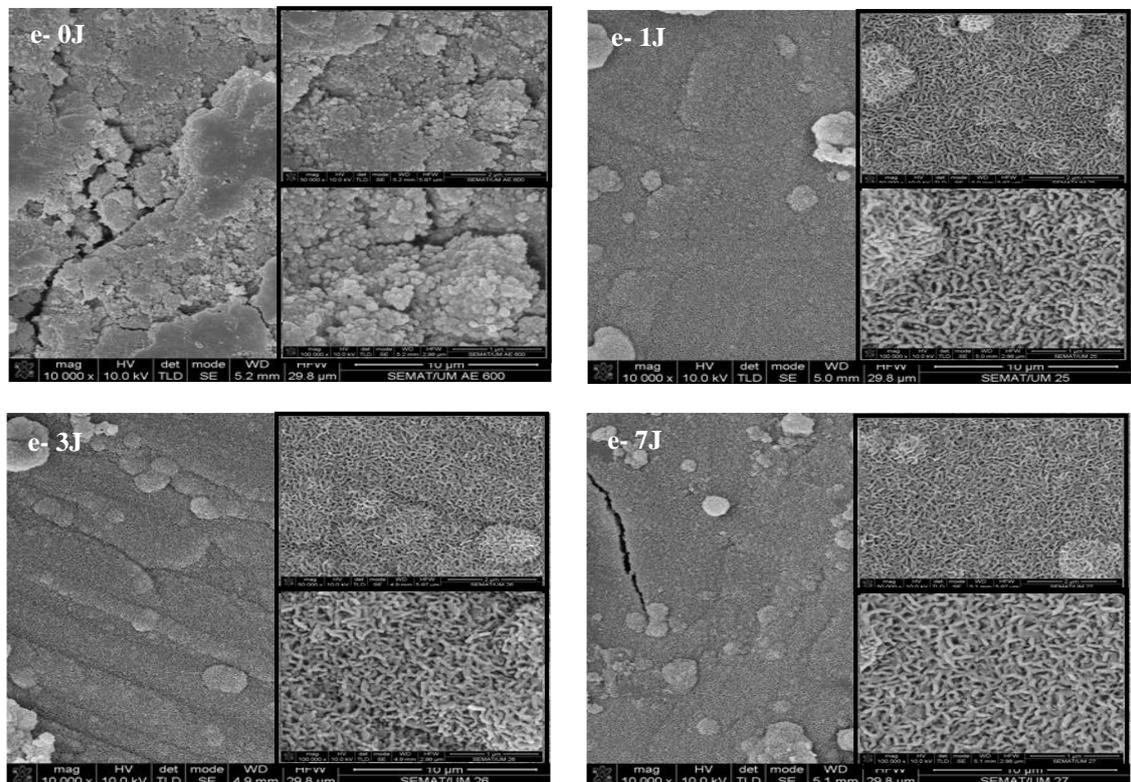
**Figure III.11.4 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre XG 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours*



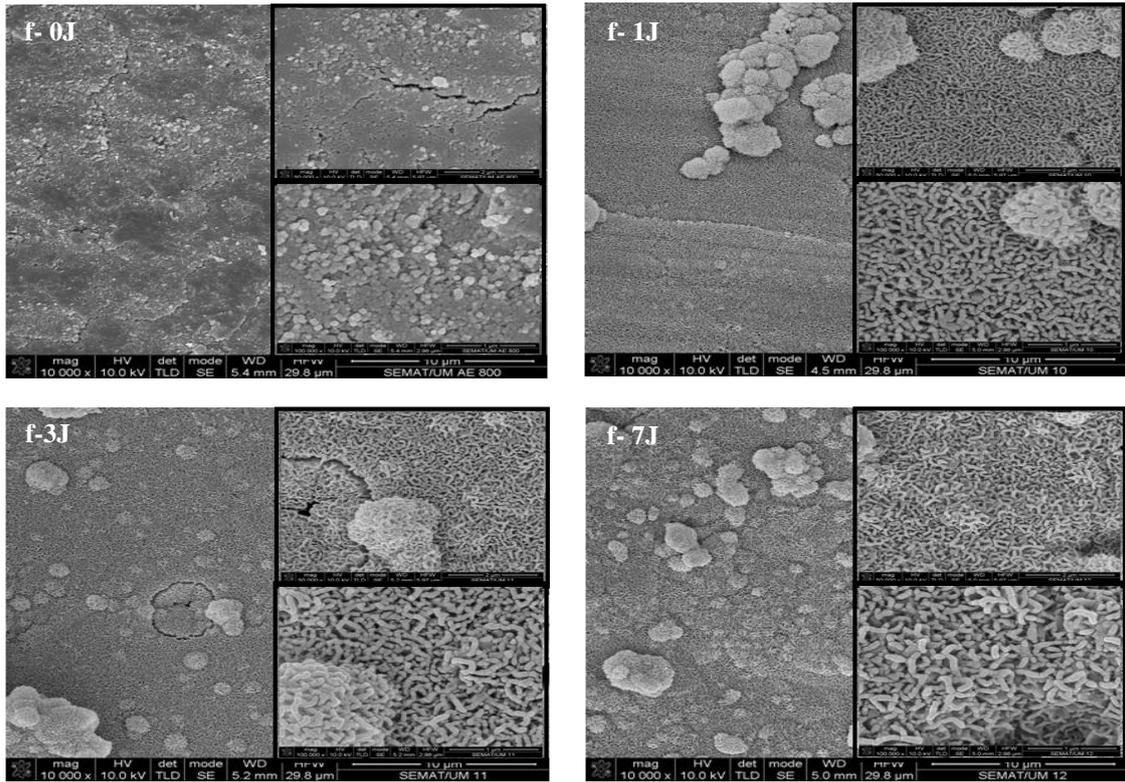
**Figure III.11.5 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre XG 800 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours.*



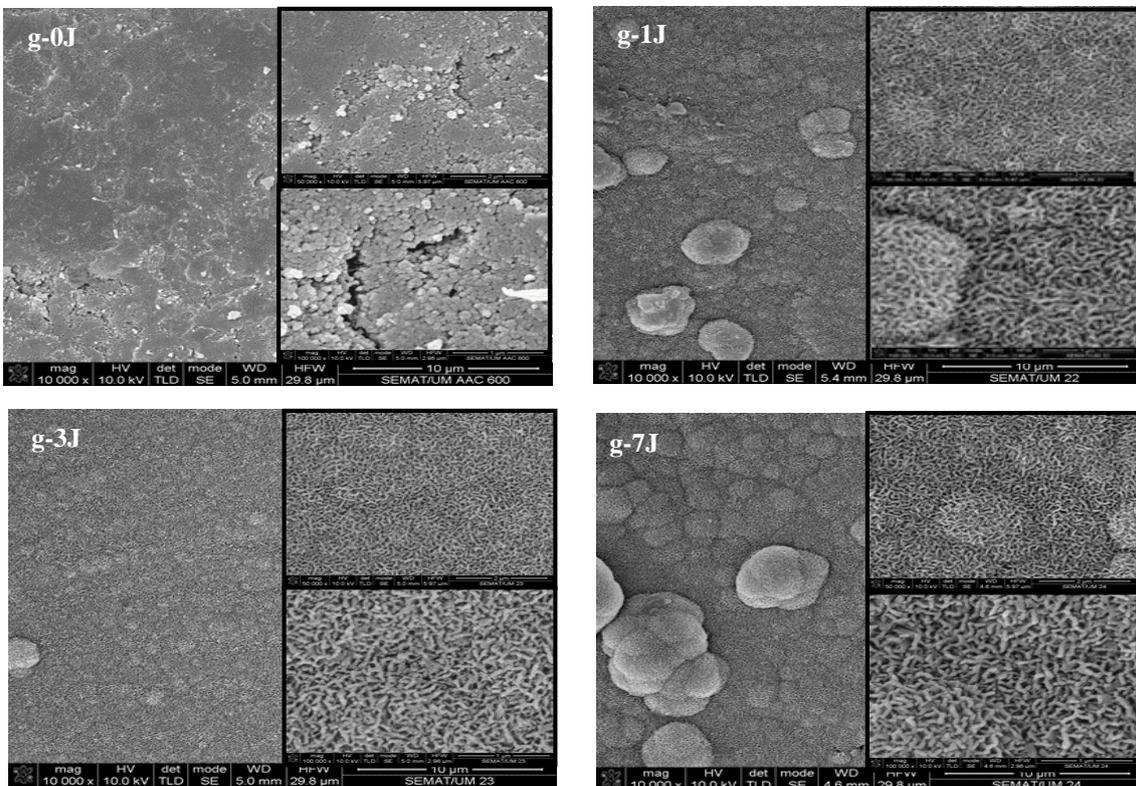
**Figure III.11.6 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre AG 400 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours.*



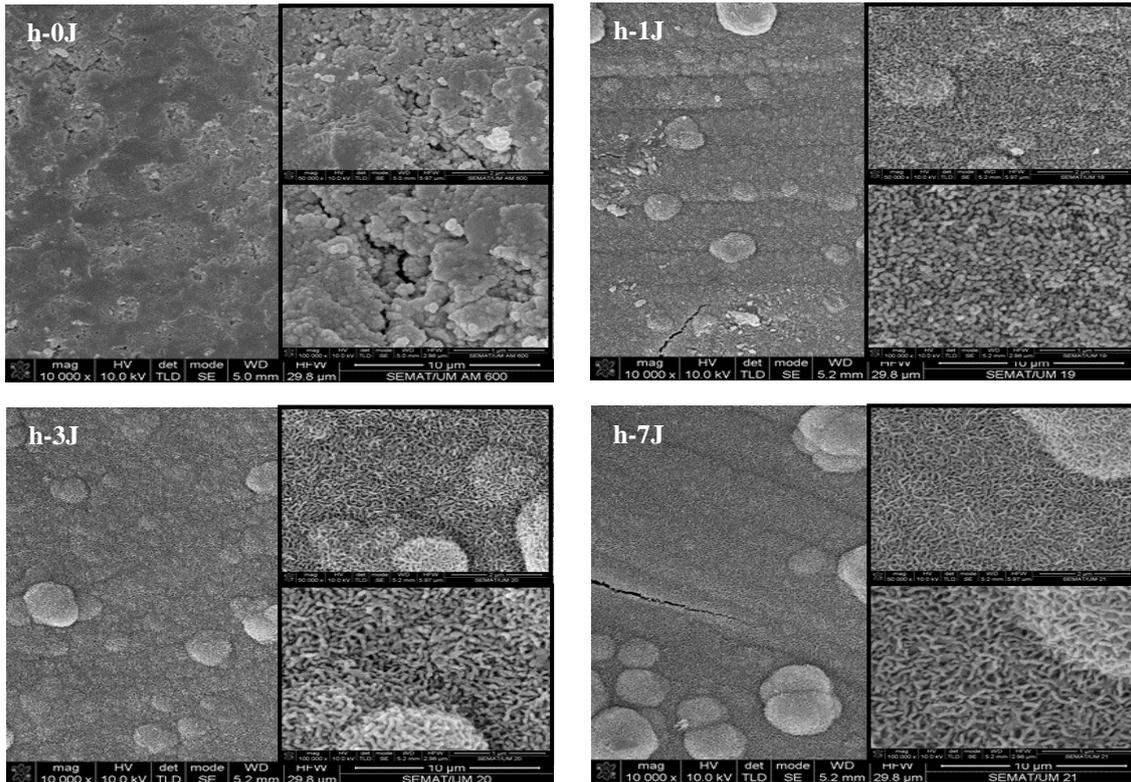
**Figure III.11.7 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre AG 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours.*



**Figure III.ii.8 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre AG 800 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours.*



**Figure III.ii.9 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre AGA 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours.*



**Figure III.11.10 :** *Micrographies MEB des pastilles de bioverre AGM 600 avant et après immersion dans SBF pendant 0, 1, 3 et 7 jours*

Les figures III.11.3-10 montrent la surface des différentes pastilles avant et après immersion dans le SBF pendant 0,1, 3 et 7 jours. L'analyse des micrographies MEB montrent que la morphologie de la surface change en fonction du temps d'incubation. Après 1 jour d'immersion dans le SBF comparées à l'état témoin « 0 jour », les micrographies révèlent la formation des grains sphériques individuels d'apatite sur la surface des pastilles de bioverre xérogel XG (figure III.11.3-5 (a-c 1J)) et une surface entièrement recouverte d'un précipité d'apatite sous une forme de minuscules flocons dans le cas des pastilles de verre bioactif aérogel. Cette couche est plus importante dans le cas des pastilles préparées avec les solvants d'éthanol AG (figure III.11.3 (d-f 1J)) et de l'acétone AGA (figure III.11.3 (g-1J)). Avec l'augmentation des périodes d'incubation, la formation de grains d'apatite augmente également, après 3 jours d'immersion, la surface des pastilles de xérogel (figure II.3 (a-c 3J)) est entièrement recouverte d'une couche d'apatite, et cette couche est composée de nombreuses particules sphériques. D'autre part, on observe la croissance de la couche d'apatite dans les pastilles d'aérogel ; AG (figure III.11.3 (d-f 3J)), AGA (figure III.11.3 (g-3J)) et AGM (figure III.11.3 (h-3J)). Toutefois, la densité du précipité (couche d'apatite) a augmenté significativement après 7 jours d'immersion [4, 11].

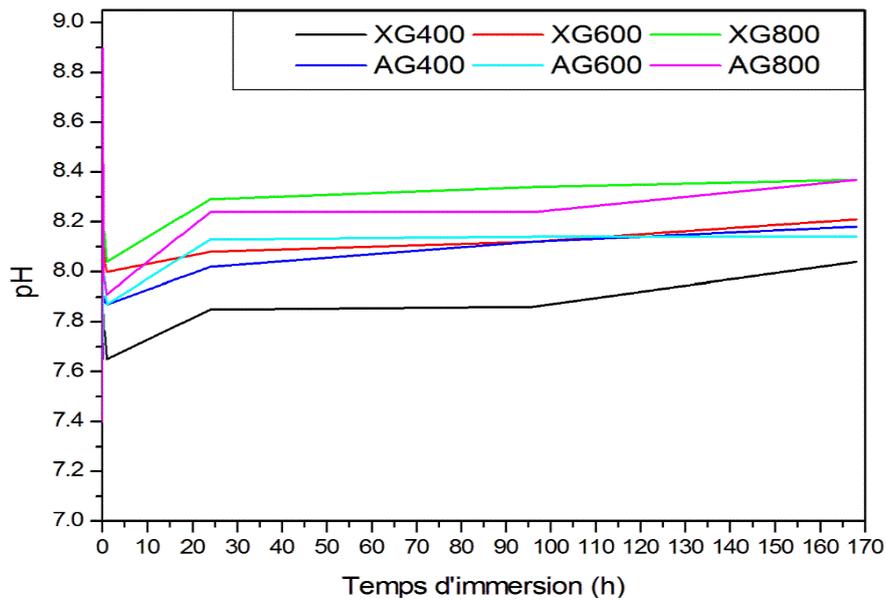
La capacité des bioverres d'aérogel (AG) à favoriser la formation rapide de la couche d'apatite après seulement un jour d'immersion ce qui peut être expliquée par l'échange plus rapide entre les ions de  $\text{Ca}^{2+}$  des pastilles d'aérogels et les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  du SBF ce qui peut donner lieu à la formation de groupes Si-OH sur la surface des pastilles qui induit la nucléation d'apatite, plus la quantité en ions  $\text{Ca}^{2+}$  est élevée, plus vite l'apatite est formée. En outre, le taux de formation d'apatite dépend des différences de texture et de morphologie des poudres de bioverres xérogel et aérogel qui améliorent le dépôt d'apatite dans le SBF et qui est plus intense dans les régions plus rugueuses et moins dans les régions plus plates [9, 12]. Pereira et al ont montré que le taux de formation d'apatite dépend de la texture des échantillons et ils ont souligné que les pores peuvent agir en tant que sites de nucléation où le degré de sursaturation pour la précipitation d'apatite est atteint plus rapidement. Les poudres d'aérogels ont une taille de nanoparticules et que la formation d'une couche d'apatite sur la surface était plus rapide et donc elles peuvent compenser un organe ou un tissu déficient en pathologie, traumatisme ou vieillissement [12-14]. En conclusion, l'analyse des micrographies MEB des différentes pastilles met en évidence le dépôt d'une couche d'apatite sur leur surface après 3 jours d'immersion indiquant que ces poudres de verre, sont bioactives. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par diffraction des rayons X, c'est à dire qu'au bout de 3 jours il y a une formation de la couche de l'hydroxyapatite carbonatée. Les cristaux d'hydroxyapatite forment une couche microporeuse à la surface des grains des pastilles de verre, avec une microstructure typique en forme de « Corn Flakes ».

#### **II.1.4. Evolution du pH de la solution SBF après immersion des pastilles**

Les échanges ioniques produits lors de l'immersion des pastilles de verre bioactif xérogel et aérogel traitées thermiquement à 400°C, 600°C et 800°C conduit au changement de pH de la solution de SBF. Les résultats de l'évolution du pH des solutions de SBF avant et après immersion des pastilles sont présentés dans le tableau III.11.2 et la figure III.11.1.

**Tableau III.11.2 :** Evolution du pH de la solution SBF après immersion des pastilles des poudres de verre bioactif.

	<b>XG 400</b>	<b>XG 600</b>	<b>XG 800</b>	<b>AG 400</b>	<b>AG 600</b>	<b>AG 800</b>
<b>Temps</b>	<b>pH</b>	<b>pH</b>	<b>pH</b>	<b>pH</b>	<b>pH</b>	<b>pH</b>
<b>0 min</b>	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
<b>5 min</b>	7,9	8,32	8,31	7,91	8,03	8,9
<b>15 min</b>	7,77	8,12	8,17	7,90	7,98	7,97
<b>30 min</b>	7,76	8,04	8,15	7,88	7,98	7,96
<b>60 min</b>	7,65	8,00	8,04	7,87	7,87	7,91
<b>1 j</b>	7,85	8,08	8,29	8,02	8,13	8,24
<b>3 j</b>	7,86	8,12	8,34	8,12	8,14	8,24
<b>7 j</b>	8,04	8,21	8,37	8,18	8,14	8,37



**Figure III.11.11 :** Evolution du pH des solutions de SBF avant et après immersion des pastilles de verre bioactif

La mesure du pH est très importante pour étudier le processus de dissolution des pastilles de verre quand elles sont immergées dans une solution physiologique. Les résultats des valeurs de pH (tableau III.11.2) et les graphes présentés dans la figure III.11.11 mettent en évidence l'augmentation du pH dans les solutions SBF (pH = 7,4) vers des valeurs basiques qui varie entre 7,9 et 8,9 après 5 min d'immersion, puis il diminue légèrement (pH = 7,6-8,17) après 15 min et 60 min d'immersion. Le pH de la solution augmente à nouveau après 1 et 7 jours d'immersion. Cette augmentation de pH est expliquée par l'échange ionique entre les protons

H<sup>+</sup> présents dans la solution SBF et les cations modificateurs des poudres de verre et par conséquent, l'augmentation du pH de la solution SBF. Alors que la diminution du pH est peut-être expliquée par la précipitation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée. Le processus de précipitation est généralement précédé d'un phénomène de dissolution des matériaux. Lorsque les matériaux sont immergés dans la solution SBF, ils libèrent des ions phosphate et calcium jusqu'à ce que la solution environnante devienne saturée, déclenchant la nucléation d'apatite. Par la suite, les mécanismes de précipitation et de dissolution interviennent simultanément et le premier mécanisme est prédominant sur le second [15-17]. Afin d'éviter l'augmentation du pH dû à la dissolution du bioverre qui peut influencer la formation de la couche d'HAPc et les interactions solide/liquide, un changement continu ou périodique de la solution d'immersion (SBF) est recommandé. Greenspan et Zong [18] appliquent ce renouvellement de solution à des intervalles de temps de 6h, 24h puis tous les deux jours pour des verres bioactifs de compositions incluses dans le système CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> [18, 19].

## **II.2. Test de biocompatibilité *in vitro* : Viabilité et prolifération cellulaire des poudres de bioverre**

Le potentiel cytotoxique des biomatériaux est l'un des principaux paramètres d'évaluation de leur biocompatibilité. Les tests de cytotoxicité sont nécessaires pour mettre en évidence un possible effet négatif du matériau sur les cellules ou sur les tissus de l'organisme. Par ailleurs, il existe une série de tests qui peuvent être réalisés *in vitro* pour vérifier la fonctionnalité des matériaux implantables, leur but est d'évaluer les éventuelles interactions entre les biomatériaux et les cellules osseuses [20].

Afin d'évaluer *in vitro* le comportement biologique des poudres de verre bioactif élaborées, deux types de cellules de la lignée ostéoblastique MG63, d'origine ostéosarcomateuse issues de tumeurs malignes osseuses et des lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris NIH / 3T3, fréquemment utilisées dans la recherche sur les interactions matériau / cellule [21, 22]. Ces cellules sont cultivées à la surface des pastilles en tests directe et indirecte, pour évaluer leurs cytocompatibilité et leurs prolifération. En effet, la réponse cellulaire *in vitro* est influencée par les propriétés chimiques mais également physiques de la surface des matériaux [23]. Les tests de cytotoxicité *in vitro* des pastilles de verre bioactif (test de contact direct) et des extraits des poudres de verre bioactif (test de contact indirect : test sur extrait) sont évalués conformément à des normes internationales et européennes ISO 10993-5/EN 30993-511[24, 25].

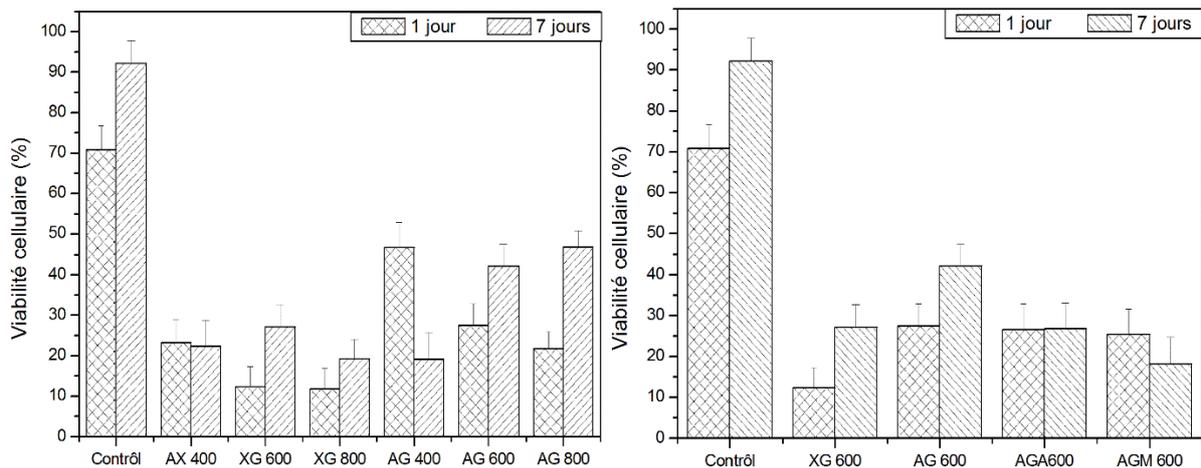
## II.2.1. Viabilité et prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles de verre

### bioactif : Test direct

Afin d'évaluer les effets des pastilles de verre xérogel et aérogel élaborées sur la prolifération et la viabilité des cellules eucaryotes, une souche appelée MG63 est utilisée. Ces cellules ont une bonne reproductibilité lors de la culture et leur activité peut être représentative de celle des cellules ostéoblastiques humaines. L'étude de la cytocompatibilité est évaluée après 1 et 7 jours de culture des cellules MG63 sur la surface des pastilles selon le protocole détaillé au chapitre II. La perméabilité de la membrane cellulaire (ou la toxicité cellulaire) est estimée par l'intermédiaire de test Resazurin. La résazurine est une molécule complexe qui est réduite en résorufine par les mitochondries lors de la respiration cellulaire. La résazurine est d'une couleur bleu et elle n'est pas une molécule fluorescente alors que la résorufine est rose et elle émet un rayonnement de fluorescence [26]. La viabilité des cellules est obtenue en comparant la fluorescence du surnageant de cellules cultivées sur les pastilles à celle du contrôle. L'adhésion et la prolifération des cellules sur les pastilles sont observées en microscopie électronique à balayage (MEB).

#### II.2.1.1. Viabilité des cellules ostéoblastes MG63 par le test de résazurine

La figure III.12 présente les résultats de mesure de la vitalité des cellules MG63 après 1 et 7 jours d'incubation à la surface des pastilles de verre bioactif xérogel et aérogel.

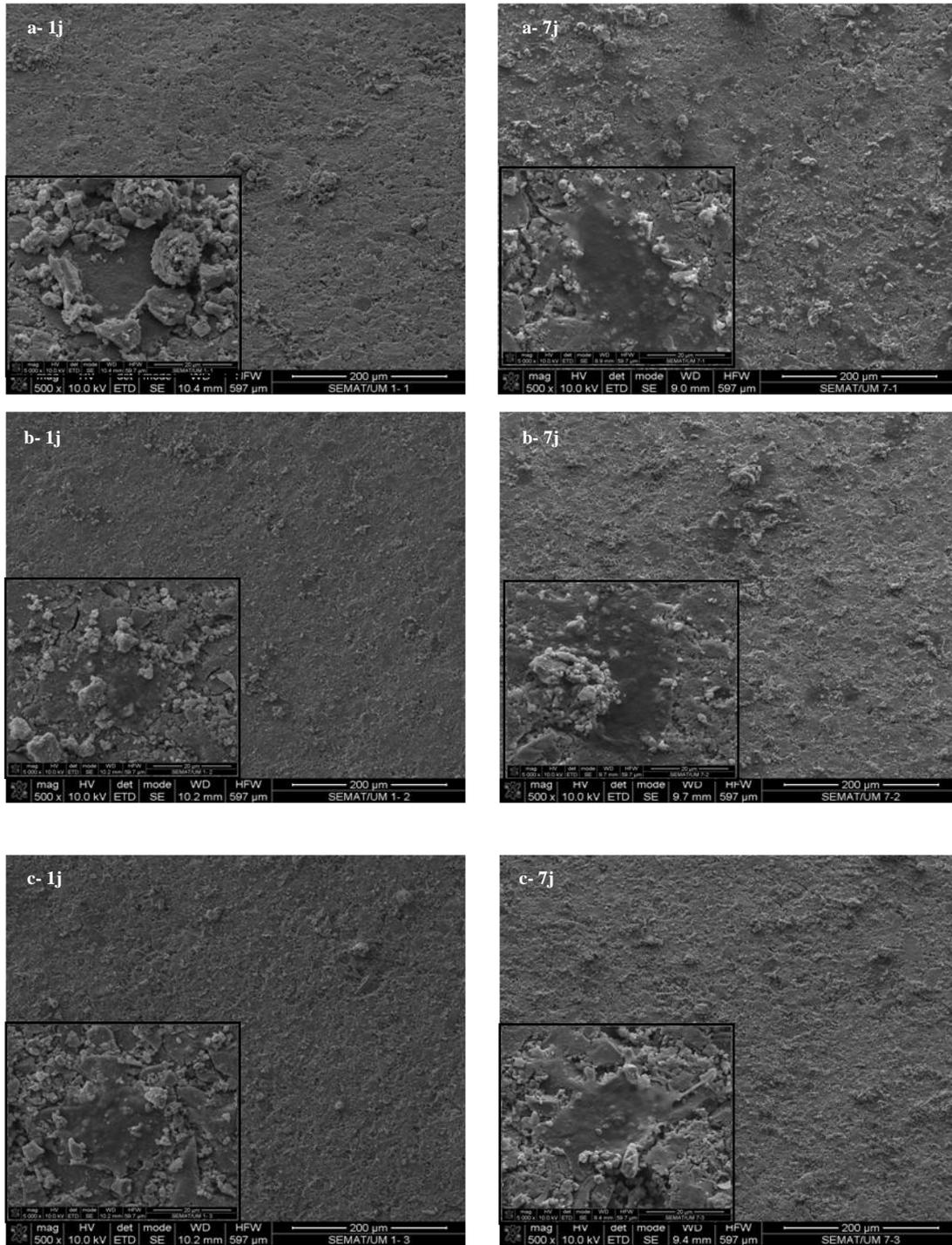


**Figure III.12 :** Viabilité des cellules MG63ensemencées sur les pastilles de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 400, 600 et 800°C (figure à gauche) et l'influence de solvant traitées à 600°C (figure à droite) pour 1 et 7 jours.

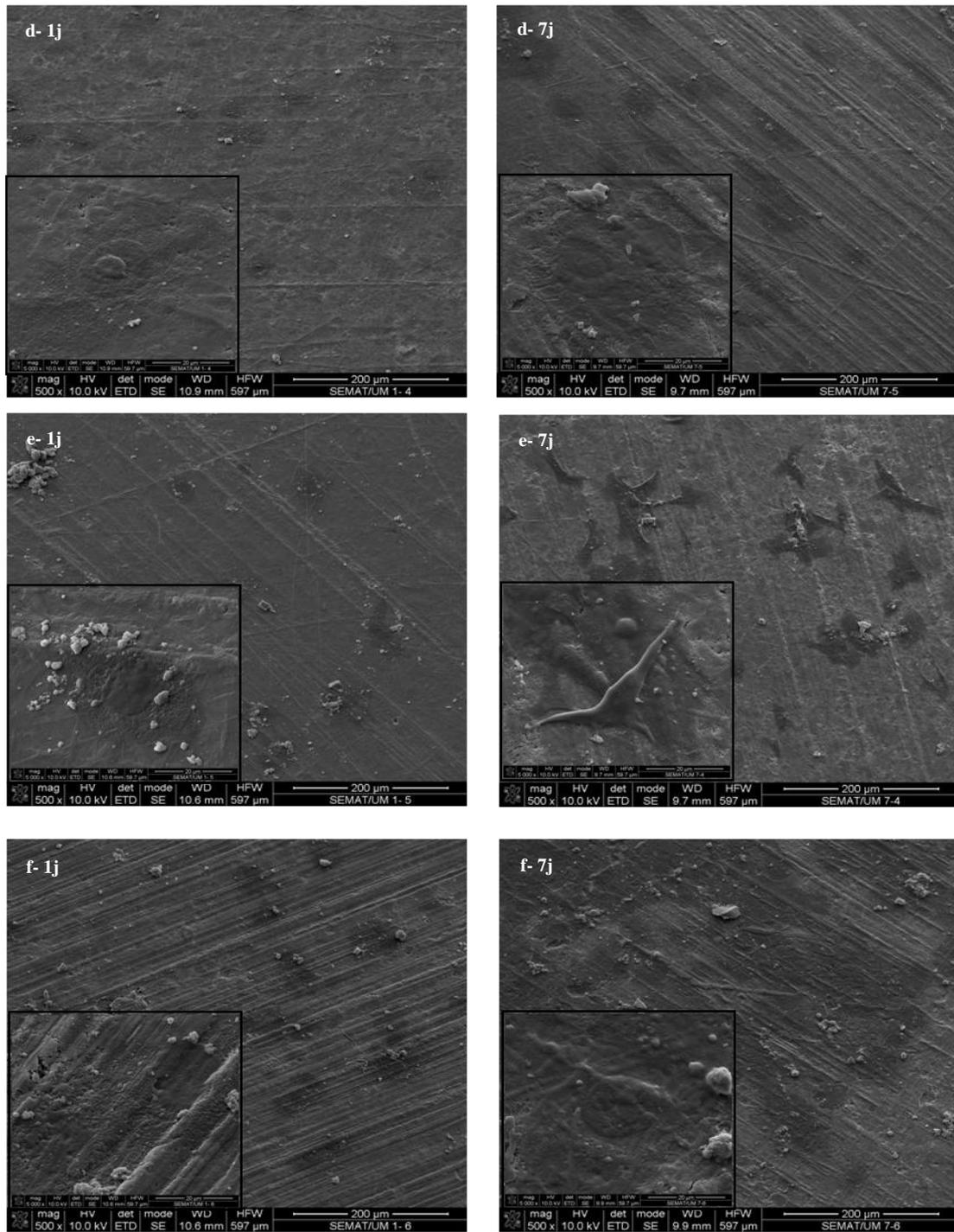
La figure III.ii.12 montre les résultats des mesures de la vitalité des cellules MG63 après 1 et 7 jours. En analysant les résultats de la figure III.ii.12, il est possible d'établir ou non la toxicité des surfaces testées vis-à-vis des cellules ostéoblastes MG63. Après 1 jour d'incubation, les cellules n'ont pas mieux survécu au contact des pastilles de verre xérogel et aérogel. La vitalité atteint environ 40% pour les pastilles AG 400 et varie entre 11% et 27 % pour les autres pastilles. Les pastilles aérogels présentent une meilleure viabilité comparant aux pastilles de xérogel après 1 jour de contact. Au bout de 7 jours, les pastilles présentent également des valeurs inférieures à celles rencontrées en 1 jour, à l'exception des pastilles XG 600, XG 800, AG 600 et AG 800 qui présentent des valeurs supérieures mais toujours très inférieures au contrôle. En conclusion, comparées au contrôle, les pastilles de verre xérogel et aérogel à des concentrations de 200 mg/ml ne présentent pas une bonne compatibilité avec les cellules MG63. La toxicité de ces poudres peut être influencée par plusieurs facteurs comme les éléments libérés par les pastilles de verre bioactif immergées dans le milieu de culture, d'où une analyse ICP du milieu d'immersion après 1 et 7 jours est nécessaire pour comprendre la cause de la toxicité observée. Les changements rapides du pH à la surface des pastilles peuvent également influencer négativement la viabilité et la prolifération des cellules eucaryotes. Afin de vérifier ces résultats, l'étude doit être reconsidérée en utilisant une autre lignée cellulaire. Par conséquent, il est nécessaire d'effectuer d'autres tests sur d'autres lignées cellulaires pour confirmer les résultats et pour étudier les causes de cette toxicité, qui peut être due au changement de pH qu'induisent les pastilles de verre au moment de leur réaction avec le milieu ou peut être dû à la concentration élevée des poudres de verre bioactif qui est de 200mg/ml dans le milieu de culture [27-30]. La barre d'erreur un peu plus importante signifie qu'un ou plusieurs échantillons ont présenté des réponses assez éloignées les unes des autres. Cela est probablement dû à un défaut d'homogénéité de la surface des pastilles.

#### **II.2.1.2. Observation au MEB de la prolifération des cellules MG63 sur les pastilles**

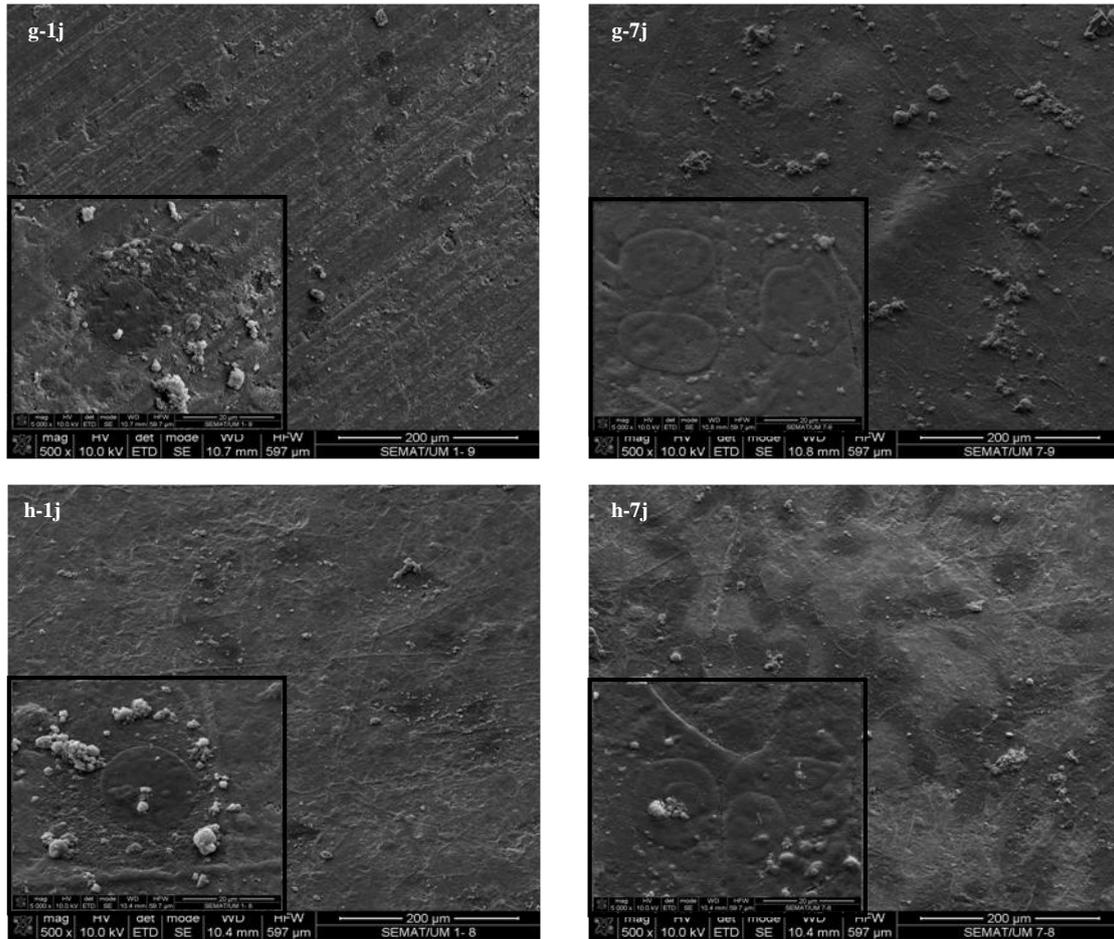
La morphologie des cellules MG63ensemencées sur les pastilles de verre bioactif pendant 1 et 7 jours est suivie par MEB. Les pastilles sont fixées avec 2,5% de glutaraldéhyde dans du PBS à 4°C, rincées deux fois avec de l'eau distillée et déshydraté dans de l'éthanol gradué (70, 80, 90 et 100%) pendant 10 minutes dans chaque solution. Les pastilles sont ensuite revêtues d'or/palladium avant l'observation au MEB. Les figures III.ii.13-15 ci-dessous présentent les micrographies de la surface des pastilles en contact avec les cellules ostéoblastes MG63 après 1 et 7 jours de culture.



*Figure III.13 : Micrographies MEB de la prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles de bioverre avant et après incubation pendant 1 et 7 jours : a- XG 400, b-XG 600, c- XG 800.*



*Figure III.11.14 : Micrographies MEB de la prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles debioverre avant et après incubation pendant 1 et 7 jours : d- AG 400, e-AG 600, f- AG 800.*



**Figure III.11.15 :** Micrographies MEB de la prolifération des cellules ostéoblastes MG63 sur les pastilles debioverre avant et après incubation pendant 1 et 7 jours : g-AGA 600 et h-AGM 600.

Les observations par la microscopie électronique à balayage (MEB) permettent de mieux comprendre le mode de développement cellulaire au contact des pastilles de verre bioactif. Les figures III.11.13-14 montrent la morphologie MEB des cellules MG63 ensemencées sur les pastilles de verre bioactif après 1 et 7 jours de contact. Après 1 jour de culture, on constate quelques cellules MG63 dispersées sur la surface des pastilles. Ces cellules sont attachées et étalées, présentant une configuration plate et une morphologie normale. Au 7<sup>ème</sup> jour, le nombre des cellules MG63 augmentent faiblement par rapport à 1 jour de culture et ne couvrent pas la totalité de la surface des pastilles. Les cellules voisines ont maintenu un contact physique entre elles par des extensions cytoplasmiques. La prolifération cellulaire observée sur les pastilles de verre aérogel est significativement plus élevée que sur les pastilles de verre xérogel. Cela peut être expliqué par la réactivité importante des pastilles de verre aérogel, en libérant un produit riche en silicium, stimulant la prolifération des ostéoblastes. En raison de la morphologie des

pastilles et du mode d'ensemencement, la répartition des cellules n'apparaît pas homogène sur la surface des pastilles. Nous pouvons observer des zones pour lesquelles les cellules sont agglomérées et enchevêtrées, alors que d'autres ne sont recouvertes que de quelques cellules isolées. Nous constatons des différences notables de morphologie des cellules MG63 entre les deux types de pastilles (xérogel et aérogel) : les cellules sont étalées et de nombreux filopodes assurent l'ancrage des cellules sur la surface des pastilles. Nous pouvons constater deux types de morphologie (pour les deux types de matériaux) : des cellules allongées qui semblent accrochées à la surface au niveau de leurs extrémités essentiellement par l'intermédiaire de ces longs filopodes dans les pastilles xérogel et des cellules d'une morphologie arrondie avec un aspect aplati dans les pastilles aérogels [31, 32].

Beaucoup de paramètres peuvent être reliés à l'adhésion et à la prolifération des cellules sur des biomatériaux : la composition chimique, l'énergie de surface, la rugosité, les micro- et nanotopographie, la taille des cristallites, le pourcentage de porosité, notamment, sont susceptibles d'induire des modifications de la réponse cellulaire à l'égard d'un biomatériau. Quelques auteurs ont suggéré que les concentrations ioniques en calcium et phosphate sont connues pour avoir une action sur la prolifération, la différenciation ostéoblastique et la mortalité cellulaires. Dans une gamme donnée, l'addition de calcium dans le milieu s'accompagne d'une augmentation de la prolifération et de la différenciation ostéoblastique. Par contre, une diminution de la concentration en calcium dans le milieu tout comme un excès d'ions calcium et phosphore peuvent limiter la prolifération cellulaire et même s'avérer toxique pour les cellules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [33-36].

On peut conclure, d'après les résultats de viabilité cellulaire et les observations MEB que les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel à une concentration de 200 mg/ml sont toxiques sur les cellules ostéoblastes MG63.

### **II.2.2. Viabilité et prolifération des cellules fibroblastes NIH/3T3 des poudres de verre bioactif : Test indirect**

Afin de vérifier l'hypothèse de l'influence de la concentration des poudres de verre bioactif sur la viabilité cellulaire et le type de cellule. Des cellules fibroblastes embryonnaires de souris NIH/3T3 sont choisies, nous avons utilisé le test de rouge neutre (Neutral Red assay : NR), qui colore uniquement les cellules vivantes, afin d'évaluer leur viabilité [24, 25, 39, 40].

### II.2.2.1. Viabilité des cellules NIH/3T3 par le test neutral red des poudres de verre bioactif

Le protocole détaillé de ce test est présenté dans le chapitre II. Les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C et 800°C sont sélectionnées pour évaluer la viabilité des cellules fibroblastes NIH/3T3 par contact indirect (test sur extrait) à l'aide de test colorimétrique : le rouge neutre. Le test NR est basé sur la capacité des cellules saines à incorporer dans leurs lysosomes le rouge neutre qui est un colorant supravital. Les cellules sont cultivées avec les extraits des poudres de verre bioactif (100 mg/ml) pendant 24h, 48h et 72h. La quantité de colorant NR incorporée par les cellules est évaluée par spectrophotométrie à 540 nm [41, 42]. Les résultats de viabilité cellulaire en fonction du temps de contact 24h, 48h et 72h avec des facteurs de dilution de 1, 1/2, 1/10, 1/100 et 1/1000 sont présentés dans la figure III.16.

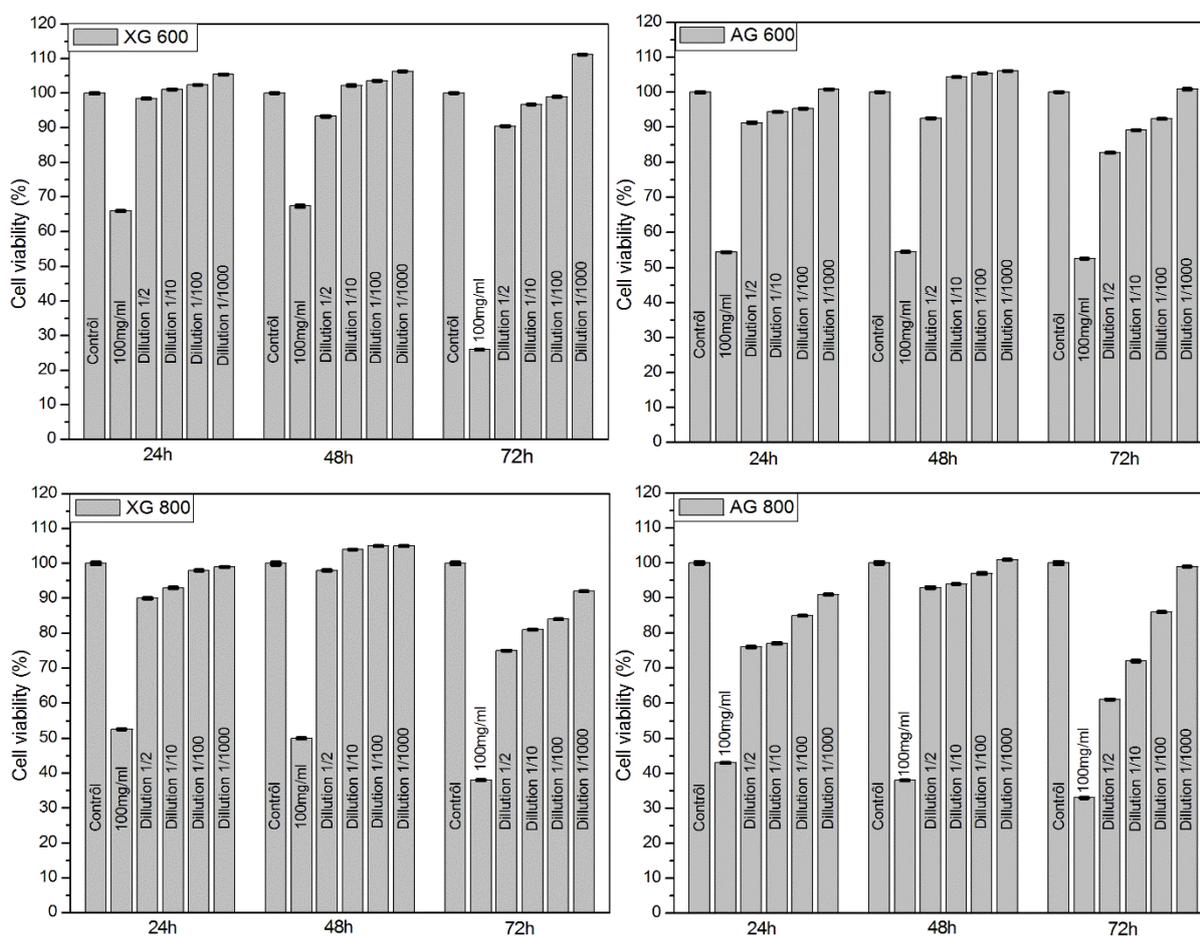


Figure III.16 : Test de viabilité cellulaire NIH/3T3 des poudres de verre bioactif : XG 600, AG 600, XG 800 et AG 800.

L'activité métabolique des cellules fibroblastes NIH/3T3 est évaluée en exposant les cellules à des extraits obtenus à partir de l'incubation des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C et 800°C dans le milieu de culture pendant 24 h, 48 h et 72 h par le test de Rouge Nutre. Les résultats de viabilité cellulaire présentés dans la figure III.16 montrent un pourcentage de viabilité des extraits des poudres de verre bioactif à une concentration de 100 mg/ml qui varie entre 45 % et 65 % par rapport aux contrôles. On constate aussi que les poudres de verre xérogel et aérogel traitées à 600°C présentent un pourcentage de viabilité des cellules NIH/3T3 supérieur à celui des poudres traitées à 800°C. Cependant, les échantillons de dilution 1/2 présentent des pourcentages de viabilité supérieure à 70 %, tandis que les autres dilutions (1/10, 1/100 et 1/1000) montrent des pourcentages de 100 % ou plus. On peut voir aussi sur la figure III.16 que les pourcentages de viabilité des extraits des poudres diminuent en fonction du temps d'immersion ce qui signifie que le milieu de culture est saturé en ions libérés par les poudres de verre bioactif. Pour remédier à ce problème, un changement du milieu de culture est nécessaire au bout de 24 h ou 48 h d'immersion des poudres [39, 40, 43]. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C et 800°C à des concentrations de 50 mg/ml ne présentent aucune toxicité vis-à-vis des cellules fibroblastes NIH/3T3. A plus forte concentration (100 mg/ml), les poudres de verre bioactif sont toxiques sur les cellules NIH/3T3.

## Conclusion

Dans cette partie, les tests de bioactivité et de cytocompatibilité *in vitro* des pastilles et des poudres de verre bioactif préparées à partir de xérogel et d'aérogel à différentes températures de traitement et différents solvants sont réalisés. Les analyses que nous avons menées montrent que la température de traitement et la méthode de préparation des poudres (xérogel et aérogel) influent sur la vitesse de formation de la couche d'hydroxyapatite et la cytotoxicité vis-à-vis des cellules ostéoblastes MG63 et fibroblastes NIH/3T3. Les résultats du test de bioactivité ont mis en évidence, le temps d'apparition de la couche d'hydroxyapatite carbonatée est d'un jour pour les pastilles d'aérogel et de 3 jours pour les pastilles de xérogel. Des mécanismes couplés de dissolution préférentielle aux joints de grains des pastilles et de précipitation seraient à l'origine de cette couche néoformée. Sa synthèse pourrait être favorisée par la présence du silicium qui induit une diminution de la taille des grains des matériaux occasionnant une dissolution plus importante des pastilles de verre bioactif.

L'étude menée avec les cellules ostéoblastes MG63 indique que toutes les pastilles de verre bioactif sont toxiques à une concentration de 200 mg/ml. Une étude complémentaire d'évaluation de l'influence de la concentration des poudres de verre bioactif est souhaitable afin de déterminer la concentration maximale de toxicité de ces poudres.

La culture des cellules NIH/3T3 sur des extraits des poudres de verre xérogel et aérogel traitées à 600°C et 800°C a démontré que la concentration de ces poudres dans le milieu de culture est un facteur très important dans l'évaluation de leur cytotoxicité. Les résultats ont montré que les cellules sont viables à des concentrations de 50 mg/ml et ne présentent aucune toxicité. Cependant, les poudres de verre bioactif sont toxiques à une concentration de 100 mg/ml. Afin de compléter l'étude du comportement biologique des poudres de verre bioactif élaborées, des analyses ICP des extraits s'avèrent nécessaires.

## Références bibliographiques

- [1]. W. Zhao, J. Wang, W. Zhai, Z. Wang, J. Chang. The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate. *Biomaterials*. 2005; 26: 6113-6121.
- [2]. T. Kokubo. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *J Non-Cryst Solids*. 1990 ; 120: 138-151.
- [3]. I.B. Leonor, R.A. Sousa, A.M. Cunha, R.L. Reis. Novel starch thermoplastic/Bioglass composites: Mechanical properties, degradation behavior and in-vitro bioactivity. *Journal of materials science: Materials in medicine*. 2002; 13: 939-945.
- [4]. J.P. Nayak, S. Kumar, J. Bera. Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2010; 356: 1447-1451.
- [5]. J. Ma, C.Z. Chen, D.G. wang, J.H. Hu. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of magnesium-doped sol-gel glass and glass-ceramics. *Ceramics International*. 2011; 37: 1637-1644.
- [6]. A. Balamurugan, G. Balossier, J. Michel, S. Kannan, H. Benhayoune, A.H.S. Rebelo, J.M.F. Ferreira. Sol Gel Derived SiO<sub>2</sub>-CaO-MgO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Bioglass System Preparation and In Vitro Characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*. 2007; 83: 546-553.
- [7]. R.L. Du, J. Chang, S.Y. Ni, W.Y. Zhai. Characterization and in vitro bioactivity of zinc-containing bioactive glass and glass-ceramics. *Journal of biomaterials applications*. 2006; 20: 341-360.
- [8]. O.P. Filho, G.P. La Torre, L.L. Hench. Effect of cristallization on apatite-later formation of bioactive glass 45S5. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1996; 30: 509-514.
- [9]. O. Peitl, E.D. Zanotto, L.L. Hench. Highly bioactive P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> glass ceramics. *Biomaterials*. 2001; 292: 115-126.
- [10]. E. Tamjid, R. Bagheri, M. Vossoughi, A. Simchi. Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. *Materials Science and Engineering C*. 2011; 31: 1526-1533.
- [11]. L. Ji, W. Wang, D. Jin, S. Zhou, X. Song. In vitro bioactivity and mechanical properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites. *Materials Science and Engineering C*. 2015; 46: 1-9.
- [12]. M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench. Effect of texture on the rate of hydroxyapatite formation on gel-silica surface. *J. Am. Ceram. Soc*. 1995; 78: 463-468.

- [13] A.M. El-Kady, E.A. Saad, B.M. Abd El-Hady, M.M. Farag. Synthesis of silicate glass/poly (L-lactide) composite scaffolds by freeze-extraction technique: Characterization and in vitro bioactivity evaluation. *Ceram. Int.* 2010; 36: 995–1009.
- [14] H. Hajjali, S. Karbasi, M. Hosseinalipour, H.R. Rezaie. Preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate)/bioglass nanoparticles for bone tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med.* 2010; 21: 2125-2132.
- [15]. M.D. O'Donnell, S.J. Watts, R.G. Hill, R.V. Law. The effect of phosphate content on the bioactivity of soda-lime-phosphosilicate glasses. *J Mater Sci: Mater Med.* 2009; 20:1611-1618.
- [16]. V.K. Vyas, A.S. Kumar, S. Prasad, S.P. Singh, R. Pyare. Bioactivity and mechanical behaviour of cobalt oxide-doped bioactive glass. *Bull. Mater. Sci.*, 2015; 38: 957-964.
- [17]. S. Manafi, F. Mirjalili, R. Reshadi. Synthesis and evaluation of the bioactivity of fluorapatite-45S5 bioactive glass nanocomposite. *Progress in Biomaterials.* 2019; 8: 77-89.
- [18]. J.P. Zhong, D.C. Greenspan, J.W. Feng. A microstructural examination of apatite induced by Bioglass® in vitro. *J. Mater. Sci.: Mater. In Med.*, 2002; 13: 321-326.
- [19]. J. Hlavac, D. Rohanova, A. Helebrant. The effect of tris buffer on the leaching behavior of bioactive glass-ceramics. *Ceram-Silikati.* 1994; 38: 119-122.
- [20]. X. Liu, J.Y. Lim, H.J. Donahue, R. Dhurjati, A.M. Mastro, E.A. Vogler. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro. *Biomaterials.* 2007; 28: 4535-4550.
- [21]. A. Billiau, V.G. Edy, H. Heremans, J.V. Damme, J. Desmyter, J.A. Georgiades, A.P. De Somer. Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1977 ; 12: 11-15.
- [22]. P. Rejmontová, Z. Capáková, N. Mikušová, N. Maráková, V. Kašpárková, M. Lehocký, P. Humpolíček. Adhesion, Proliferation and Migration of NIH/3T3 Cells on Modified Polyaniline Surfaces. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 1439-1446.
- [23]. S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia.* 2013; 9: 8037-8045.
- [24]. R.F. Wallin, F. Richard, E.F. Arscott. A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. *Medical Device and Diagnostic Industry.* 1998; 20: 96-98.
- [25]. P.K. Vallittu, K. Ekstrand. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *Journal of Oral Rehabilitation.* 1999; 26: 666-671.

- [26]. M.J. Stoddart (Ed). *Mammalian Cell Viability; Methods and Protocols*. Humana Press, New York, NY. 2011.
- [27]. C. Vitale-Brovarone, E. Verne, L. Robiglio, G. Martinasso, R.A. Canuto, G. Muzio. Biocompatible glass–ceramic materials for bone substitution. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19: 471-478.
- [28]. E. Verne, O. Bretcanu, C. Balagna, C.L. Bianchi, M. Cannas, S. Gatti, C. Vitale-Brovarone. Early stage reactivity and in vitro behavior of silica-based bioactive glasses and glass-ceramics. *J Mater Sci: Mater Med*. 2009; 20: 75-87.
- [29]. J. Clover, M. Gowen. Are MG-63 and HOS TE85 Human Osteosarcoma Cell Lines Representative Models of the Osteoblastic Phenotype? *Bone*. 1994; 15: 585-591.
- [30]. F.E. Ciraldo, E. Boccardi, V. Melli, F. Westhauser, A.R. Boccaccini. Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests. *Acta Biomaterialia*. 2018; 75: 3-10.
- [31]. A. Itala, H.O. Ylanen, J. Yrjans, T. Heino, T. Hentunen, M. Hupa, H.T. Aro. Characterization of microrough bioactive glass surface: Surface reactions and osteoblast responses in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002; 62: 404-411.
- [32]. A. Li, Y. Lv, H. Ren, Y. Cui, C. Wang, R.A. Martin, D. Qiu. In vitro evaluation of a novel pH neutral calcium phosphosilicate bioactive glass that does not require preconditioning prior to use. *International Journal of Applied Glass Science*. 2017; 8: 403-411.
- [33]. B.D. Bovan, T.W. Hummert, D.D. Dean, Z. Schwartz. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*. 1996; 17: 137-146.
- [34]. R.C. Bielby, I.S. Christodoulou, R.S. Pryce, W.J.P. Radford, L.L. Hench, J.M. Polak. Time- and Concentration-Dependent Effects of Dissolution Products of 58S SolDGel Bioactive Glass on Proliferation and Differentiation of Murine and Human Osteoblasts. *Tissue engineering*. 2004; 10: 1018-1026.
- [35]. J. Ajita, S. Saravanan, N. Selvamurugan. Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications. *Materials Science and Engineering C*. 2015; 53: 142-149.
- [36]. Q.Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A.R. Boccaccini. Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008; 84: 1049-1060.
- [37]. S.S. Nievethitha, N. Subhadrappa, D. Saravanan, N. Selvamurugan, W.B. Tsai, N. Srinivasan, R. Murugesan, A. Moorthi. Nanoceramics on Osteoblast Proliferation and

Differentiation in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 98: 67-74.

[38]. K. Zheng, M. Kapp, A.R. Boccaccini. Protein interactions with bioactive glass surfaces: A review. *Applied Materials Today*. 2019; 15: 350-371.

[39]. International Standard 10993–5, Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods, 2009.

[40]. International Standard 10993–12, Biological Evaluation of Medical Devices — Part 12: Sample Preparation and Reference Materials, 2007.

[41]. D. Bellucci, A. Sola, R. Salvatori, A. Anesi, L. Chiarini, V. Cannillo. Role of magnesium oxide and strontium oxide as modifiers in silicate-based bioactive glasses: Effects on thermal behaviour, mechanical properties and in-vitro bioactivity. *Materials Science and Engineering C*. 2017; 72: 566-575.

[42]. D. Bellucci, R. Salvatori, J. Giannatiempo, A. Anesi, S. Bortolini, V. Cannillo. A New Bioactive Glass/Collagen Hybrid Composite for Applications in Dentistry. *Materials*. 2019; 12: 2079-2084.

[43]. B.R. Barrioni, P. Naruphontjirakul, E. Norris, S. Li, N.L. Kelly, J.V. Hanna, M.M. Stevens, J.R. Jones, M. de M. Pereire. Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019; 547: 382-392.

***PARTIE III. EFFET ANTIBACTERIEN DES POUDRES DE VERRE  
BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL***

### ***PARTIE III. EFFET ANTIBACTERIEN DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF XEROGEL ET AEROGEL***

Diverses maladies dégénératives et inflammatoires des articulations et des os touchent des millions de personnes dans le monde [1,2]. L'augmentation massive de la chirurgie des implants articulaires et osseux est parallèle à l'augmentation des infections liées aux dispositifs médicaux [3-7]. Les infections microbiennes liées à la contamination des dispositifs médicaux implantés sont d'une complication clé qui conduit généralement à un échec d'implantation et elles ont un impact significatif sur la santé publique [8-10]. De plus, la prise en charge des infections associées aux dispositifs médicaux nécessite souvent une intervention chirurgicale ou/et une utilisation à long terme d'une antibiothérapie intraveineuse ou orale, ce qui entraîne une perte osseuse et une morbidité engendrant de sérieuses limitations pour les patients dans leur vie normale et leur bien-être. Afin de remédier aux problèmes de l'augmentation des taux d'infection des implants orthopédiques lors des chirurgies opératoires, des recherches approfondies ont conduit au développement des verres bioactifs (BG) et de vitrocéramiques avec une excellente biocompatibilité et bioactivité [2,11-15].

L'objectif de cette partie est de déterminer si les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel élaborées ont en plus de leurs bioactivité et biocompatibilité, un potentiel d'inhibition des microorganismes pathogènes, pour remédier au problème d'augmentation des taux d'infection. Les micro-organismes utilisés dans ce travail sont les deux bactéries très fréquentes : *Escherichia coli* à GRAM négatif, et *Staphylococcus aureus* à GRAM positif et les deux levures : *Candida albicans* et *Candida krusei*. Cette étude est détaillée dans la section suivante.

#### **III.1. Evaluation de l'activité microbienne des poudres de verre bioactif**

##### **III.1.1. Micro-organismes utilisés**

Dans cette étude, deux souches bactériennes *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) communément associées à des infections hospitalières ont été sélectionnées, apparues après une intervention chirurgicale afin de tester l'activité antibactérienne des différentes poudres de verre bioactif élaborées. La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est une bactérie à Gram négatif de la famille des entérobactéries, très souvent étudiée. Elle constitue un objet d'étude pour comprendre le fonctionnement des bactéries en général. Elle est communément trouvée dans les intestins des mammifères, y compris les êtres humains et présente une forte résistance aux antibiotiques. La bactérie à Gram positif pathogène

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), présente le risque le plus élevé d'infection postopératoire en chirurgie réparatrice et en reconstruction osseuse [16-18]

Deux types de levures, *Candida albicans* (*C. albicans*) et *Candida krusei* (*C. krusei*) ont également été étudiés. *Candida albicans* fait partie du microbiome humain normal. Chez la plupart des individus, *C. albicans* est un commensal inoffensif à vie. Cependant, il peut provoquer des infections allant d'infections superficielles de la peau à des infections systémiques mettant la vie en danger. De plus, les personnes légèrement immunodéprimées peuvent fréquemment souffrir d'infections récalcitrantes de la cavité buccale «candidose buccale». Ces infections peuvent affecter l'oropharynx et/ou l'œsophage des personnes présentant des dysfonctionnements du système immunitaire adaptatif. Le port de prothèses dentaires et les âges avancés sont d'autres facteurs de risque de développement de ces infections [19-21].

*Candida krusei* est décrit comme un agent causal d'infections fongiques disséminées chez les patients sensibles et aussi une cause de candidose invasive (CI), avec de nombreux cas rapportés chez des patients atteints de leucémie après une greffe de la moelle osseuse et un traitement par fluconazole. De nombreux cas impliquaient des patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse et colonisés par *C. krusei* après prophylaxie avec le fluconazole. La candidose invasive (CI) est une cause fréquente de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés, y compris ceux qui ont subi une chimiothérapie à haute dose et ceux qui ont subi une chirurgie abdominale étendue [19, 21-23].

### **III.1.2. Mise en contact des poudres avec les micro-organismes**

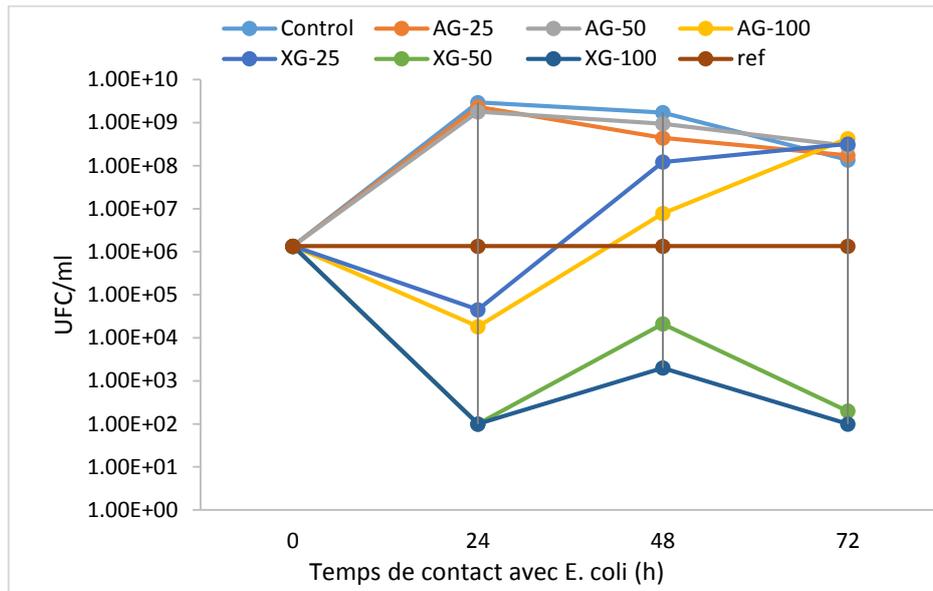
Cette étape consiste à mettre les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel en contact des micro-organismes afin d'évaluer leurs activité antimicrobienne. Le protocole de mise en contact est détaillé dans le chapitre II.

#### **III.1.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Afin de mieux évaluer l'activité microbienne, une étude est menée en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) des poudres de verre bioactif sur la bactérie *Escherichia coli*. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance microbienne visible à l'œil nu [24].

La bactérie *Escherichia coli* est cultivée avec deux poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C (XG 600 et AG 600) pour évaluer leur concentration minimale inhibitrice. Les concentrations des deux poudres testées étaient de 100, 50, 25, 12,5 et 6,25 mg/ml de milieu

LB contenant  $10^6$  CFU / ml. Les cultures bactériennes sans poudres de verres ont servies de témoins. Après 24 h, 48 h et 72 h de culture dans le milieu LB contenant des poudres de verre bioactif, la croissance des bactéries est évaluée après culture sur des plaques de gélose à 37 °C pendant 24 h. L'absence de croissance sur les plaques est un indicateur de l'effet bactéricide. Après 72h de culture, les suspensions ont été centrifugées et le surnageant est prélevé pour les mesures de pH. Les résultats de test de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des poudres de verre bioactif XG 600 et AG 600 sont présentés sur la figure III.III.1.



**Figure III.III.1 :** Concentration minimale inhibitrice (CMI) des poudres de verre bioactif XG 600 et AG 600 en contact avec la bactérie *E. coli*.

L'activité antibactérienne des poudres de verre bioactif XG 600 et AG 600 contre la bactérie *E. Coli* présentée dans la figure III.III.1 montre que le niveau d'activité le plus élevé est enregistré pour la poudre XG 600 à des concentrations de 25 mg/ml, 50 mg/ml et 100 mg/ml et la poudre AG 600 avec une concentration de 100 mg/ml après 24 h de contact avec *E. Coli*. Après 48 h et 72 h d'exposition, la poudre XG 600 montre une activité antibactérienne à des concentrations de 50 mg/ml et 100 mg/ml. Contrairement à la poudre AG 600 qui ne présente aucune activité antibactérienne après 48 h et 72 h pour toutes les concentrations. Ces résultats révèlent que la bactérie *E. Coli* est plus sensible à la poudre XG 600 qu'à la poudre AG 600 avec des valeurs de CMI allant de 50 à 100 mg/ml après 24 h.

### III.1.2.2. Mesure du pH de la suspension de culture (poudres et *E. coli*)

Après 72 h de contact avec les deux poudres de verre bioactif XG 600 et AG 600, 1 ml de chaque concentration est placé dans des eppendorfs et centrifugé à 100 rpm pendant 5 min. Les surnageants sont ensuite récupérés pour mesurer leurs pH. Les valeurs du pH sont énumérées dans le tableau III.m.1 ci-dessous. Le pH du milieu initial (milieu LB) est de  $7.2 \pm 0.2$ .

**Tableau III.m.1 :** Valeurs du pH des suspensions de poudre de verre XG 600 et AG 600 en contact avec *E. coli* après 72h

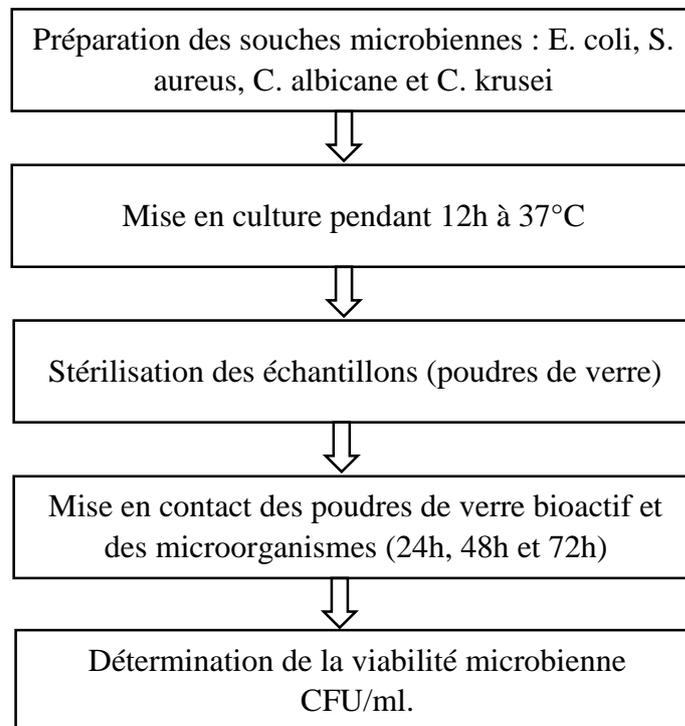
Echantillons	controle	AG 600 (25)	AG 600 (50)	AG 600 (100)	XG 600 (25)	XG 600 (50)	XG 600 (100)
pH	8,75	8.85	8.66	8.94	8.93	9.01	9.16

Le suivi du pH de la suspension bactérienne est représentée dans le tableau III.m.1 qui montre l'évolution significative du pH pendant 72 h de culture pour les deux poudres XG 600 et AG 600. Les valeurs du pH augmentent significativement pour la poudre XG 600, contrairement à la poudre AG 600 qui n'augmente pas beaucoup en comparant au control. La poudre XG 600 à des concentrations de 50 mg/ml et 100 mg/ml a maintenu une valeur de pH élevée (environ 9,1) pendant la période d'incubation et a montré un fort effet d'inhibition sur la croissance de la bactérie *E. Coli*.

Les résultats de cette étude montrent que le potentiel antibactérien et l'acidité de la poudre de verre bioactif XG 600 à une concentration de 50 mg/ml a un effet plus important en inhibant complètement la croissance de la bactérie *E. Coli* pendant la période d'incubation de 24 h, 48 h et 72 h par rapport à la poudre de verre bioactif AG 600 à une concentration de 100 mg/ml. Une étude réalisée par Eveliina Munukka et al [25] ont révélé que 8 verres bioactifs (MBG0103, MBG0118, MBG0123, S53P4, 13-93, H2-02, CaPSiO, CaPSiO II) avaient un effet inhibiteur bactérien à la concentration de 100 mg/ml, et seul le S53P4 était efficace à une concentration plus faible (50 mg/ml). L'action possible du verre bioactif contre la bactérie *E. Coli* provient principalement de l'élévation du pH et la libération d'ions (calcium, silicium et phosphore) dans le milieu de culture. Lorsque le verre bioactif entre en contact avec un milieu aqueux, les ions du matériau sont libérés et conduisent à une augmentation du pH, créant un environnement alcalin qui inhibe la croissance bactérienne. L'effet antibactérien des verres bioactifs sans aucun ion antibactérien s'explique principalement par l'augmentation du pH du milieu et la libération importante des ions dans le milieu, considéré comme bactéricide [26-30].

### III.1.2.3 Mise en contact des poudres du xérogel et d'aérogel avec divers microorganismes

Après la détermination de CMI, une culture fraîche du micro-organisme est diluée avec du bouillon nutritif stérile (Luria Bertani (LB) pour *E. coli* et *S. aureus* et Yeast Extract Dextrose (YEPD) pour *C. albicans* et *C. krusei*) pour obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  CFU / ml pour *E. coli*,  $10^8$  CFU/ml pour *S. aureus* et  $10^7$  CFU / ml pour *C. albicans* et *C. krusei*. Les suspensions sont directement incisées sur les poudres de verre bioactif (100 mg de poudre de verre bioactif / ml de la suspension du micro-organisme) et les échantillons sont incubés à 37°C pendant 24h, 48h et 72 h d'incubation. Le nombre d'unités de colonies formant (CFU) est déterminé par une série de dilutions. Les tubes qui ne contiennent pas de poudres de verre bioactif sont considérés comme témoins. Les étapes de la culture microbienne des poudres de verre bioactif sont illustrées dans le diagramme suivant :



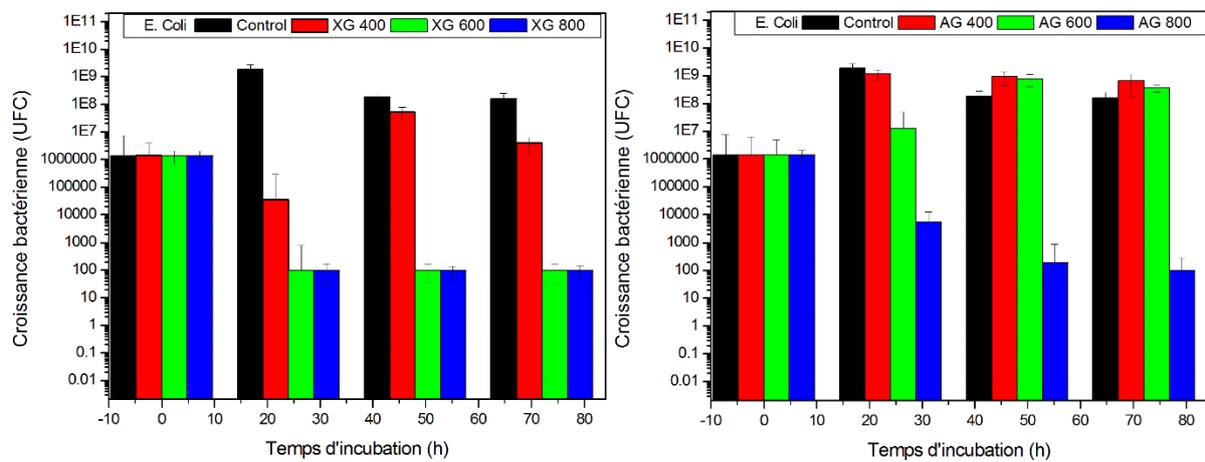
**Figure III.iii.2 :** Protocole d'élaboration de test de culture microbienne des poudres de verre bioactif.

### III.2. Effet antimicrobien des poudres de verre bioactif

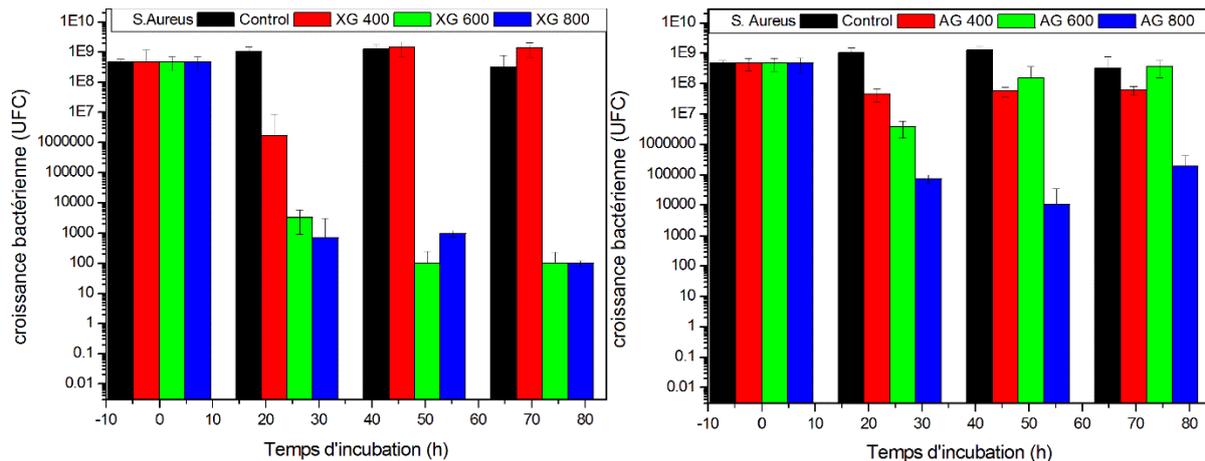
Les effets bactériostatiques des poudres de verre bioactif sont déterminés en effectuant un comptage viable après exposition de la colonie bactérienne aux poudres pendant une période de temps de 24 h, 48 h et 72 h.

#### III.2.1. Effet antimicrobien des poudres de verre bioactif traitées thermiquement

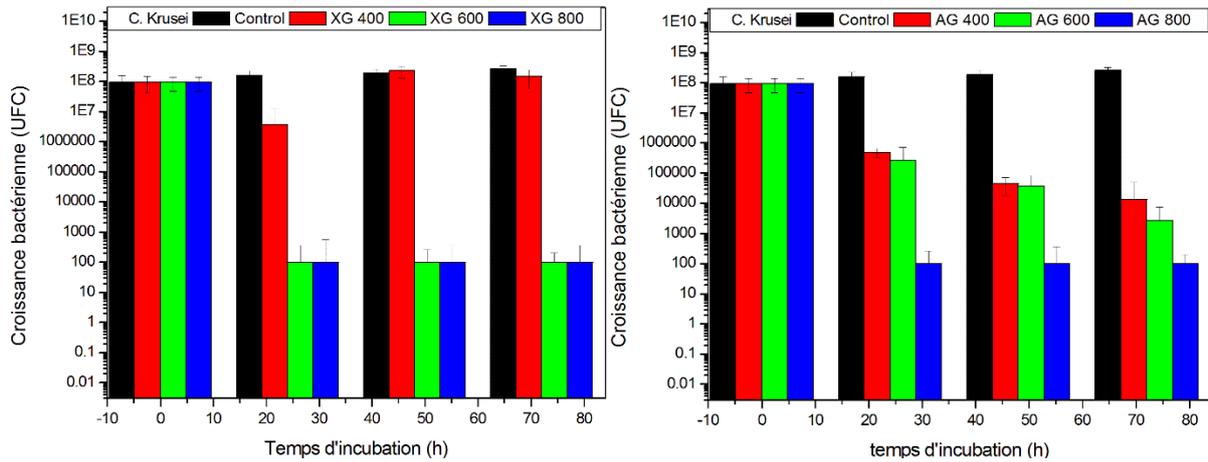
Les résultats des tests effectués sur les poudres de verre xerogel et aérogel traitées thermiquement à 400°C, 600°C et 800°C en contact avec les différents microorganismes pendant 24 h, 48 h et 72 h, sont présentés dans les figures suivantes :



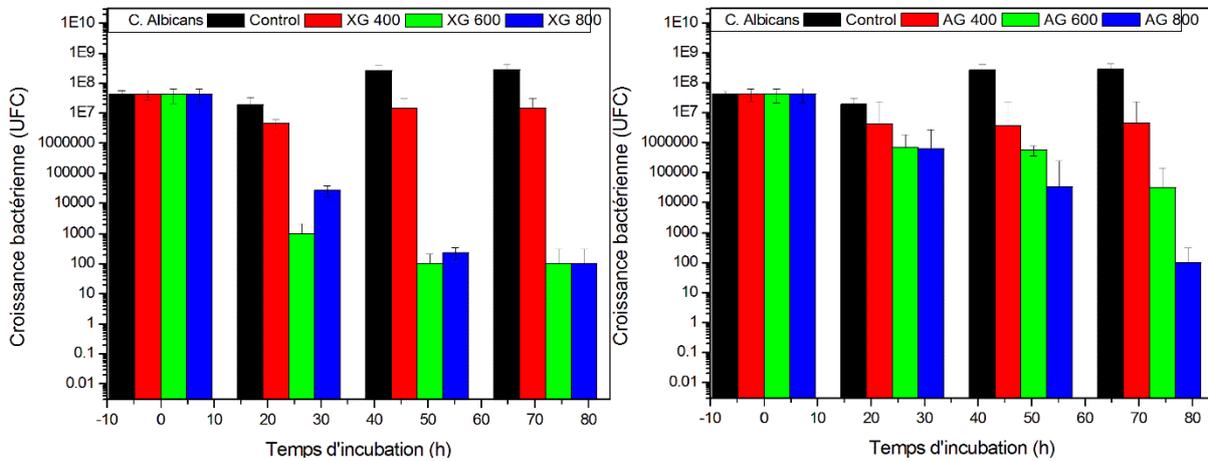
**Figure III.iii.3 :** Croissance de la bactérie *E. Coli* sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800.



**Figure III.iii.4 :** Croissance de la bactérie *S. Aureus* sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800.



**Figure III.3.5 :** Croissance du candida krusei sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800.



**Figure III.3.6 :** Croissance de la condida albicans sur les poudres de verre bioactif : XG 400, XG 600, XG 800, AG 400, AG 600 et AG 800.

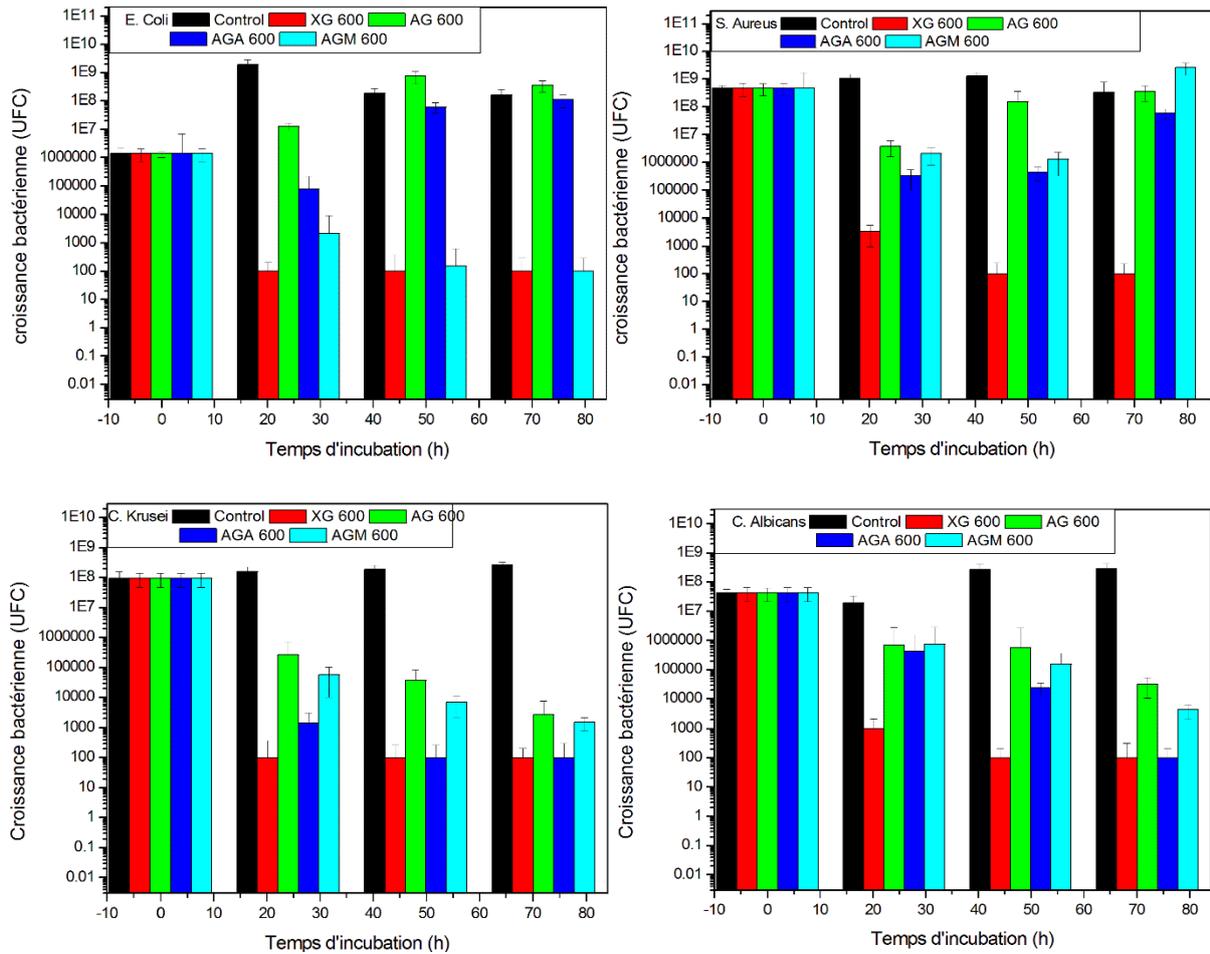
Nous avons examiné les effets antimicrobiens de six poudres de verre bioactif xérogel et aérogel dérivés sol-gel et traitées à 400°C, 600°C et 800°C. Les poudres de verre bioactif testés ont inhibé la croissance des microbiens. La concentration et le temps nécessaire à l'effet antibactérien varient en fonction du type de poudre (xérogel ou aérogel) et du traitement thermique des poudres (400°C, 600°C et 800°C). L'effet varie également entre les espèces microbiennes. Les figures III.3.3-6 montrent l'effet de destruction dépendant du temps de population de microorganismes en phase dynamique (sous agitation) par une concentration bactéricide de 100 mg/ml de poudres de verre bioactif. La poudre XG 400 montre une activité antibactérienne après 24 h de culture mais pas à 48 h et 72 h sur *E. coli* et *S. aureus*. Cependant, cette poudre n'a pas d'effet sur *C. krusei* et *C. albicans*. Les poudres XG 600 et XG 800 ont un bon effet bactériostatique sur tous les microorganismes et atteignent une limite de détection

après 24 h pour *E. coli* et *C. Krusei* et 48 h pour *S. aureus* et *C. albicans*. D'autre part, les poudres AG 400 et AG 600 n'ont qu'un faible effet inhibiteur sur *C. krusei* et *C. albicans*, mais elles ne présentent aucun effet antibactérien sur *E. coli* et *S. aureus*. La poudre AG 800 montre un bon effet antibactérien sur tous les microorganismes avec une limite de détection atteinte après 24 h pour *C. krusei*, 48 h pour *E. coli* et 72 h pour *C. albicans*. En conclusion, les poudres de verre bioactif plus efficaces sont XG 600, XG 800 et AG 800, car elles inhibent la croissance de tous les pathogènes, même les plus résistantes. Les poudres de verre bioactif élaborées peuvent inhiber ou au moins réduire la croissance de tous les microorganismes.

Ces résultats sont attendus, car les poudres de verre bioactif libèrent généralement des ions tels que le calcium, le phosphate et le silicate dans des conditions aqueuses et leur libération élève le pH et la pression osmotique de l'environnement. Un autre facteur peut être les fortes concentrations de calcium et d'alcalin susceptibles d'être libérées des poudres qui peuvent perturber le potentiel membranaire des microorganismes [25, 31-34]. Dans cette étude, les poudres dérivées sol-gel (poudres XG 600, XG 800 et AG 800) ont de bons effets antibactériens. Cela contraste avec les résultats de Catauro et al. [35] qui ont montré qu'un matériau sol-gel n'a de propriété antibactérienne que s'il contient des ions d'argent. La concentration de la matière bioactive dans leur étude était à peu près la même que dans la nôtre, mais sa composition chimique était différente de la nôtre.

### **III.2.2. Influence du solvant sur l'effet antibactérien des poudres de verre aérogel**

Le critère antimicrobien est également étudié en changeant le solvant dans le cas des poudres de verre bioactif aérogel (Ethanol, Acétone et Méthanol) traitées à 600°C et nous les avons comparées aussi à la poudre XG 600. Les résultats des tests effectués avec divers microorganismes pendant la période d'incubation 24 h, 48 h et 72 h sont présentés dans la figure III.III.7 suivante :



**Figure III.m.7 :** Croissance des microorganismes (*E. coli*, *S. aureus*, *C. krusei* et *C. albicans*) sur les poudres de verre bioactif : XG 600, AG 600, AGA 600 et AGM 600

La figure III.m.7 montre l'effet de destruction de divers microorganismes (*E. coli*, *S. aureus*, *C. krusei* et *C. albicans*) au contact avec une concentration bactéricide de 100 mg/ml de poudres de verre bioactif (XG 600, AG 600, XG 800, AGA 600 et AGM 600). Les résultats montrent que la poudre XG 600 a un effet antimicrobien après 24 h de culture sur tous les microorganismes, contrairement aux poudres aérogel qui présentent une faible activité antibactérienne. La poudre aérogel avec le solvant éthanol (AG 600) présente un faible effet sur *C. albicans* et *C. krusei* après 72 h de contact. La poudre avec le solvant acétone (AGA 600) montre une inhibition significative de la formation de colonies bactériennes après 48 h de culture avec *C. krusei* et 72 h pour *C. albicans*. D'autre part, la poudre avec le solvant méthanol (AGM 600) montre une bonne inhibition de la croissance bactérienne sur *E. coli*, après 48 h et un effet réduit sur *C. albicans* et *C. krusei* après 72 h de contact. Ces différents résultats peuvent être expliqués par le type de solvant utilisé qui influence la vitesse de dissolution de ces poudres et le pH du milieu.

### III.3. pH des poudres avec et sans contact avec les microorganismes

Le pH des poudres de verre bioactif dans les milieux de culture avec et sans présence des microorganismes (bactéries et levures) est mesuré après 72h de culture afin d'évaluer le potentiel antibactérien des poudres de verre xérogel et aérogel élaborées. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.iii.2.

**Tableau III.iii.2** : pH des poudres de verre bioactif avec et sans présence de bactéries et de levures après 72 h

Simple / pH	Control	XG 400	XG 600	XG 800	AG 400	AG 600	AG 800	AGA 600	AGM 600
LB+ PB	7.02	7.56	8.89	9.06	8.44	8.61	8.70	8.73	8.70
LB+ PB +E. coli	8.58	7.84	8.94	9.15	8.33	8.54	8.69	8.54	8.35
LB+PB+S. aureus	8.53	7.76	8.92	9.10	8.33	8.61	8.67	8.52	8.69
YEPD+PB	6.38	7.37	8.68	8.86	8.29	8.58	8.65	8.72	8.57
YEPD+PB+C. krusei	6.04	7.41	8.34	8.33	8.25	8.41	8.19	8.05	8.07
YEPD+PB+C. albicans	7.62	7.18	8.65	8.69	8.30	8.71	8.79	8.74	8.76

La variation du pH des poudres de verre bioactif dans le milieu de culture avec et sans bactérie et levure après 72h est présentée dans le tableau III.iii.2. Les résultats montrent que les valeurs du pH augmentent dans toutes les poudres par rapport au témoin (control) dans les milieux LB et YEPD sans bactéries. D'autre part, le pH des poudres dans les milieux de culture avec des microorganismes augmente également par rapport au témoin pour les poudres qui avaient une activité antibactérienne et diminue dans les poudres, qui ne possèdent pas d'effet antibactérien. Ceci peut s'expliquer par la solubilité des particules de verre bioactif qui favorisent la libération d'ions tels que le calcium, le phosphate et le silicium dans le milieu de culture. En effet, l'activité antibactérienne des poudres de verre bioactif résulte de plusieurs facteurs tels que les valeurs du pH élevées et des effets osmotiques provoqués par la concentration non physiologique d'ions dissous par le verre bioactif.

De plus, l'activité antibactérienne des poudres de verre bioactif est fortement influencée par sa composition chimique [25, 36, 37]. Les poudres de verre avec une teneur plus élevée en calcium ont un effet antibactérien plus important sur les microorganismes que sur celles avec des quantités plus faibles d'oxyde de calcium. Le pH du milieu diminue aussi avec la dissolution de la silice conduisant à moins d'effet antibactérien [36-38].

## Conclusion

Dans cette partie, l'objectif était d'évaluer l'influence du traitement thermique des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel préparées par le procédé sol gel et le type du solvant utilisé dans le cas des poudres de verre bioactif aérogel sur leurs effet antibactérien vis-à-vis de quatre microorganismes (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *C. krusei*). Selon les espèces, la concentration des poudres et la durée d'exposition nécessaire à l'effet bactéricide variaient. Les résultats de cette recherche soutiennent l'idée que le potentiel antibactérien dans ces poudres dépend du type de solvant utilisé et du traitement thermique de ces dernières. Les poudres les plus efficaces dans cette étude sont XG 600, XG 800 et AG 800, car elles inhibent la croissance de tous les pathogènes testés après 24 h. Alors que, la poudre XG 400 a un effet antibactérien sur *E. coli* et *S. aureus* seulement pour 24 h. Cependant, les poudres AG 400 et AG 600 ont de faibles effets inhibiteurs sur *C. krusei* et *C. albicans*. La poudre AGA 600 a montré une inhibition significative de la formation de colonies microbiennes après 48 h sur *C. krusei* et 72 h pour *C. albicans*. D'autre part, la poudre AGM 600 a un bon effet inhibiteur sur la croissance bactérienne d' *E. coli* après 48 h, et un effet réduit sur *C. krusei* et *C. albicans* après 72 h d'exposition. Nous concluons également que le résultat du test d'efficacité antimicrobienne dépend essentiellement de la quantité et de l'état vital des bactéries inoculées.

Dans cette partie, nous avons étudié des espèces microbiennes pouvant provoquer des infections à la surface des prothèses et autres dispositifs artificiels introduits dans le corps. Ces résultats peuvent être utilisés, par exemple, pour développer des revêtements de surface antibactériens pour ces dispositifs afin d'aider à empêcher les tissus qui les entourent d'être infectés et ainsi, d'empêcher le rejet des dispositifs et la propagation de l'infection.

### Références bibliographiques

- [1]. L. Drago, E. De Vecchi, M. Bortolin, M. Toscano, R. Mattina, C.L. Romanò. Antimicrobial activity and resistance selection of different bioglass S53P4 formulations against multidrug resistant strains. *Future Microbial*. 2015; 10: 1293-1299.
- [2]. I. Allan, H. Newman, M. Wilson. Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials*. 2001; 22: 1683-1687.
- [3]. M. Bellantone, N.J. Coleman, L.L. Hench. Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *J Biomed Mater Res*, 2000 ; 51: 484-490.
- [4]. O. Borens, F. Nussbaumer, R. Baalbaki, A. Trampuz. Diagnostic et traitement des infections d'implants orthopédiques. *Rev Med Suisse*. 2009 ; 5 : 2563-2568.
- [5]. H. Carsenti-Dellamonica. Infections associées aux implants orthopédiques Infections associated with orthopedic implanted devices. *Antibiotiques*. 2008 ; 10 : 3-15.
- [6]. C. Cyteval, A. Bourdon. Imagerie des infections sur matériel orthopédique. *Journal de Radiologie Diagnostique et Interventionnelle*. 2012 ; 93 : 578-589.
- [7]. H. Wang, S. Zhao, X. Cui, Y. Pan, W. Huang, S. Ye, S. Luo, M.N. Rahaman, C. Zhang, D. Wang. Evaluation of three-dimensional silver-doped borate bioactive glass scaffolds for bone repair: Biodegradability, biocompatibility, and antibacterial activity. *Journal of Materials Research*. 2015; 30: 2722-2735.
- [8]. D. Lebeaux, J.M. Ghigo, J.C. Lucet. Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. *La Revue du Praticien*. 2014 ; 64 : 620-625.
- [9]. L. Drago, C. Vassena, S. Fenu, E. De Vecchi, V. Signori, R. De Francesco, C.L. Romanò. In vitro antibiofilm activity of bioactive glass S53P4. *Future Microbiol*. 2014 ; 9: 593-601.
- [10]. P. Bernard, V. Jarlier, A. Santerre-Henriksen. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* responsables d'infections cutanées communautaires. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*. 2008 ; 135 : 13-19.
- [11]. S.H. Luo, W. Xiao, X.J. Wei, W.T. Jia, C.Q. Zhang, W.H. Huang, D.X. Jin, M.N. Rahaman, D.E. Day. In vitro evaluation of cytotoxicity of silver-containing borate bioactive glass. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2010; 95B : 441-448.
- [12]. M. Ottomeyer, A. Mohammadkhan, D. Day, D. Westenberg. Broad Spectrum Antibacterial Characteristics of Four Novel Borate-Based Bioactive Glasses. *Advances in Microbiology*. 2016; 6: 776-787.
- [13]. N. Lindfors, J. Geurts, L. Drago, J.J. Arts, V. Juutilainen, P. Hyveonen, A. Suda, A. Domenico, S. Artiaco, C. Alizadeh, A. Brychcy, J. Bialecki, C. Romano. Antibacterial

Bioactive Glass, S53P4, for Chronic Bone Infections - A Multinational Study. *AdvExp Med Biol - Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. 2016; 156: 81-92.

[14]. O. Lepparanta, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, M. Hupa, H. Ylanen, J.I. Salonen, M.K. Viljanen, E. Eerola. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19: 547-551.

[15]. D.C. Coraca-Huber, M. Fille, J. Hausdorfer, D. Putzer, M. Nogler. Efficacy of Antibacterial Bioactive Glass S53P4 against *S. aureus* Biofilms Grown on Titanium Discs *In Vitro*. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014; 32: 175-177.

[16]. M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial material interactions, *Biomater*. 4 (2012) 176–194.

[17]. G. Sganga, C. Tascini, E. Sozio, M. Carlini, P. Chirletti, F. Cortese, R. Gattuso, P. Granone, C. Pempinello, M. Sartelli, S. Colizza, Focus on the prophylaxis, epidemiology and therapy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* surgical site infections and a position paper on associated risk factors: the perspective of an Italian group of surgeons, *World J Emerg Surg.*, 2016; 11: 26-39.

[18]. D. Avram, D.N. Ungureanu, N. Angelescu, A. Gheboianu, I. Băncuță, M.G. Bratu. Study of Bioactivity and Antimicrobial Activity in Case of Glasses from SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Ternary System. *Scientific Bulletin of Valahia University. Materials & Mechanics*. 2015; 13: 81-86.

[19]. R.G. Nair, L.P. Samaranayake, The effect of oral commensal bacteria on candida adhesion to denture acrylic surfaces: An in vitro study, *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 1996; 104: 339-349.

[20]. F.L. Mayer, D. Wilson, B. Hube. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 ; 4: 119-128.

[21]. M. Develoux, S. Bretagne. *Candidoses et levures diverses*. EMC-Maladies Infectieuses. 2005 ; 2: 119-139.

[22]. A. Forastiero, V. Garcia-Gil, O. Rivero-Menendez, R. Garcia-Rubio, M.C. Monteiro, A. Alastruey-Izquierdo, R. Jordan, I. Agorio, E. Mellado. Rapid Development of *Candida krusei* Echinocandin Resistance during Caspofungin Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; 59: 6975-6982.

[23]. P.C. Iwen, D.M. Kelly, E.C. Reed, S.H. Hinrichs. Invasive Infection Due to *Candida krusei* in Immunocompromised Patients Not Treated with Fluconazole. *Clinical Infectious Diseases*. 1995 ; 20: 342-347.

- [24]. R. Ben Abdallah<sup>1</sup>, D. Frikha, S. Maalej, S. Sassi. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines. *J. I. M. Sfax*. 2019 ; 31: 38-44.
- [25]. E. Munukka, O. Lepparanta, M. Korkeamaki, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, H. Ylanen, J.I. Salonen, M.K. Viljanen, E. Eerola, Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria, *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19: 27-32.
- [26]. R. Koohkan, T. Hooshmand, M.R. Tahriri, D. Mohebbi-Kalhari. Synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of copper-containing magnetic bioactive glasses for hyperthermia in bone defect treatment. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2018; 5: 1797-1811.
- [27]. L.L. Daia, M.L. Meib, C.H. Chua, E.C.M. Loa. Antibacterial effect of a new bioactive glass on cariogenic bacteria. *Archives of Oral Biology*. 2020; 117: 104833-8.
- [28]. D.H. Kim, C.W. Song, S.Y. Yoon, S.Y. Kim, H.S. Na, J. Chung, Y.I. Kim, Y.H. Kwon. Antibacterial and remineralization effects of orthodontic bonding agents containing bioactive glass. *The Korean Journal of Orthodontics*. 2018; 48: 163-171.
- [29]. P. Stoor, E.S. Èderling, J.I. Salonen. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontologica Scandinavica*, 1998; 56: 161-165.
- [30]. R.L. Siqueira, N. Maurmann, D. Burguêz, D.P. Pereira, A.N.S. Rastelli, O. Peitl, P. Pranke, E.D. Zanotto. Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: Bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against *Streptococcus mu*. *Materials Science and Engineering C*. 2017; 76: 233–241.
- [31]. O.H. Andemon, J. Rosenqvist, K.H. Karlsson. Dissolution, leaching, and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> enrichment at the surface of bioactive glasses studied by solution analysis. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1993; 27: 941-948.
- [32]. O. Yamamoto, J. Sawai, H. Kojima, T. Sasamoto. Effect of mixing ratio on bactericidal action of MgO-CaO powders. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2002; 13: 789-792.
- [33]. H. Yli-Urpo, T. Nahri, E. Söderling. Antimicrobial effects of glass ionomer cements containing bioactive glass (S53P4) on oral microorganisms in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2003; 61: 241-246.
- [34]. M. Zehnder, E. Söderling, J. Salonen, T. Waltimo. Preliminary Evaluation of Bioactive Glass S53P4 as an Endodontic Medication in Vitro. *Journal of Endodontics*. 2004 ; 30 : 220-224.

- [35]. M. Catauro, M.G. Raucci, F. De Gaetano, A. Marotta. Antibacterial and bioactive silver-containing  $\text{Na}_2\text{O-CaO-2SiO}_2$  glass prepared by sol-gel method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004; 15: 831-837.
- [36]. O. Lepparanta, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, M. Hupa, H. Ylén, J.I. Salonen, M.K. Viljanen, E. Eerola, Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro, *J Mater Sci: Mater Med*. 2008; 19: 547-551.
- [37]. V. Mortazavi, M.M. Nahrkhalaji, M.H. Fathi, S.B. Mousavi, B.N. Esfahani, Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2010; 94: 160-168.
- [38]. S. Prasad, I. Ratha, T. Adarsh, A. Anand, P.K. Sinha, P. Diwan, K. Annapurna, K. Biswas, In vitro bioactivity and antibacterial properties of bismuth oxide modified bioactive glasses, *J. Mater. Res*. 2017; 33: 1-13.

***PARTIE IV. DEPÔT ELECTROPHORETIQUE DES POUDRES  
DE VERRE BIOACTIF SUR DES SUBSTRATS EN ACIER  
INOXYDABLE 316L***

## ***PARTIE IV. DEPÔT ELECTROPHORETIQUE DES POUDRES DE VERRE BIOACTIF SUR DES SUBSTRATS EN ACIER INOXYDABLE 316L***

Les poudres de verre bioactif élaborées et étudiées dans les parties précédentes, sont utilisées pour un comblement. Ces poudres servent aussi pour le revêtement des prothèses métalliques. Les prothèses métalliques mises en place dans le corps humain subissent des modifications entraînant le transfert d'éléments métalliques dans l'organisme avec ou sans dégradation de l'implant métallique qui conduit aux descellements d'implants [1].

Le but de cette partie de l'étude consiste à élaborer des revêtements prothétiques via la méthode d'électrophorèse afin de remédier à ce problème de descellement.

La technique de dépôt électrophorétique (EPD) est établie pour synthétiser des dépôts de matériaux céramiques à partir des solutions aqueuses et non aqueuses, c'est un procédé rentable et efficace pour obtenir une épaisseur de dépôt homogène. Le processus est influencé principalement par la taille des particules, la concentration du matériau de revêtement dans la solution, le pH de la solution, le voltage et le temps de dépôt [2]. Une étude détaillée réalisée sur le dépôt électrophorétique des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C, à partir d'une solution aqueuse, sur un substrat en acier inoxydable 316L a été rapportée dans cette partie. L'enquête s'est principalement limitée à identifier les conditions appropriées pour atteindre une efficacité de dépôt maximale pour un revêtement complet du substrat métallique avec une épaisseur uniforme. Les revêtements électrophorétiques sont réalisés en utilisant une concentration de poudres de verre bioactif dans la solution aqueuse de 5% (% en poids) avec une taille des particules de 38µm, le voltage de 10 V, le pH de la solution entre 12.5-13 et le temps de dépôt de 15 min.

Cette partie est divisée en deux sections, la première est consacrée à la caractérisation des substrats d'acier inoxydable 316L utilisées et la deuxième présente les résultats de la synthèse des revêtements prothétiques par la méthode d'électrophorèse ainsi que leurs caractérisations physico-chimiques.

### **IV.1. Caractéristiques du substrat utilisé, acier inoxydable 316L**

Avant d'entamer la partie d'élaboration des revêtements électrophorétiques des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel, nous caractérisons d'abord les substrats d'acier inoxydable 316L sélectionnés (noté 316L SS), en utilisant les méthodes de caractérisations tel que MEB-EDS, DRX et profilométrie, afin d'évaluer leurs état de surface et les éléments chimiques les constituants. L'acier inoxydable 316L est choisi comme matériau de base pour les revêtements

prothétiques en poudres de verre bioactif, en raison de sa résistance mécanique très élevée, de sa rigidité et de son faible coût [3, 4].

#### **IV.1.1. Préparation des substrats 316L SS**

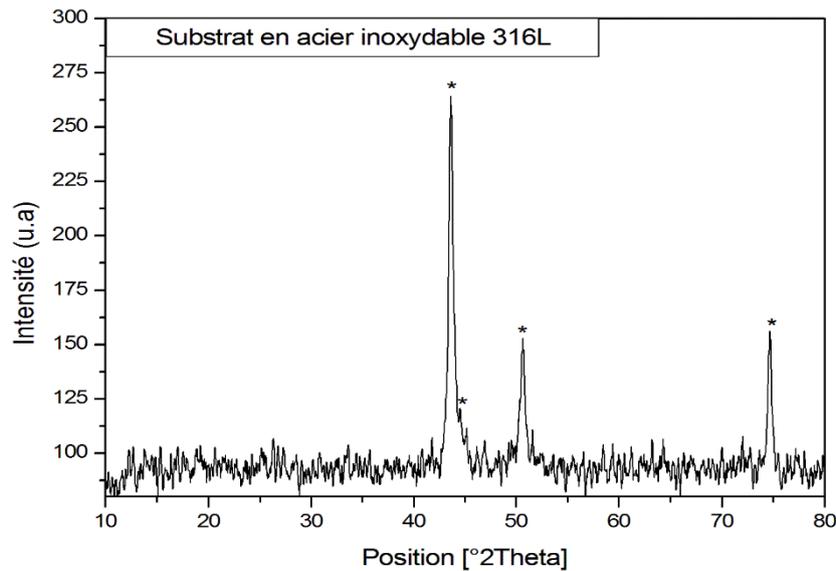
Les substrats en acier inoxydable 316L sous forme de plaques de dimensions de 30×10×2 mm, sont polis en utilisant une polisseuse, munit d'un disque pour la fixation des différents papiers de polissage (papier abrasif Si-C) de dimensions 120 et 1000 dans le but d'étudier l'influence de l'état de surface sur la morphologie des dépôts de poudres de verre bioactif. Les plaques d'acier 316L polis sont ensuite nettoyées à une température ambiante dans un bain à ultrasons. Le traitement ultrasonique des plaques s'effectue par un lavage dans l'eau distillée, l'acétone, l'éthanol et l'eau distillée, respectivement, pour un temps de 15 min dans chaque solvant, afin de retirer les débris de polissage ainsi que toute particule de poussière et de substances organiques résiduelles. Enfin les plaques sont séchées dans l'étuve à une température de 150°C durant 10 min avant d'être caractérisées et utilisées comme cathode dans le dispositif électrophorétique.

#### **IV.1.2. Caractérisation du substrat : l'acier inoxydable 316L**

Les substrats d'acier inoxydable 316L polis à 120 et 1000 sont caractérisés par la diffraction des rayons X, MEB-EDS et par la profilométrie. Les résultats de ces analyses sont discutés dans la section suivante.

##### **IV.1.2.1. Analyse par DRX du substrat**

Les différentes phases cristallines présentées dans le substrat d'acier inoxydable 316L sont analysées et identifiées par diffraction des rayons X. Le diffractogramme obtenu est présenté dans la figure III.IV.1 ci-dessous :

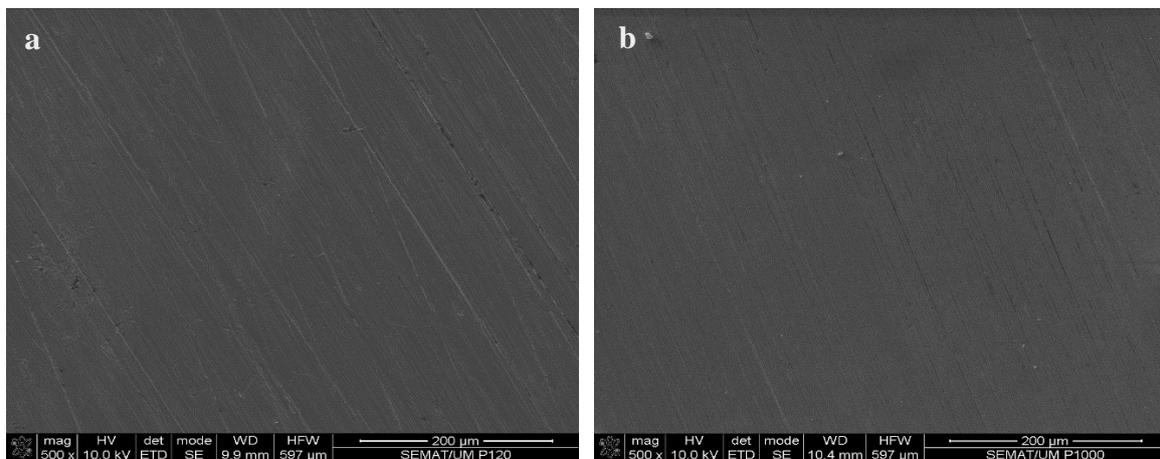


**Figure III.IV.1 :** *Diffractogramme de la plaque d'acier inoxydable 316L*

Le diffractogramme des rayons X de substrat d'acier inoxydable 316L présenté sur la figure III.IV.1 montre trois principaux pics situés à  $2\theta=43.5^\circ$ ,  $2\theta=50.7^\circ$  et  $2\theta=74.7^\circ$  correspondent principalement aux éléments Fer, Chrome et Nickel, respectivement [3-5].

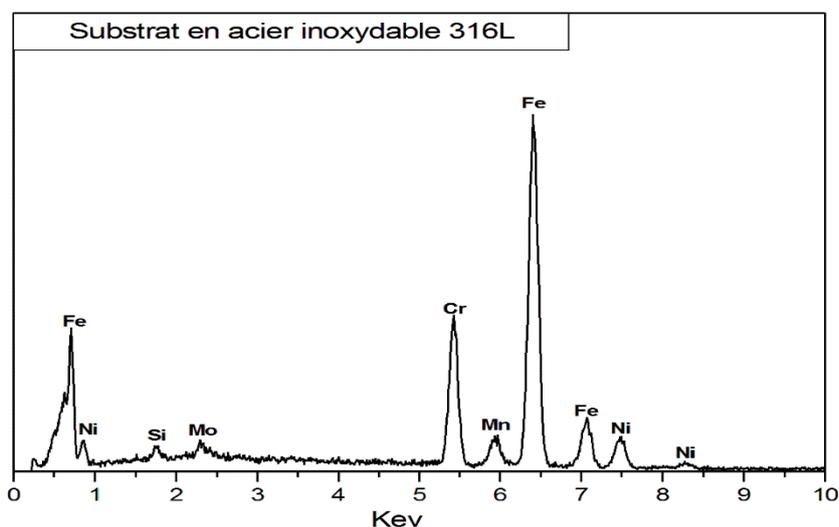
#### **IV.1.2.2. Analyse morphologique et composition élémentaire MEB-EDS des substrats**

La morphologie et l'analyse élémentaire de la surface des substrats non revêtu sont étudiées et évaluées en utilisant un microscope électronique à balayage couplé à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (MEB-EDS). Les figures III.IV.2 (a et b) et III.IV.3 présentent les micrographies MEB avec le spectre EDS de la surface de substrat acier inoxydable 316L après polissage à 120 et 1000 et lavage aux ultrasons.



**Figure III.IV.2 :** *Morphologies MEB des plaques d'acier 316L SS polies : a- polie à 120 et b- polie à 1000.*

La figure III.IV.2 (a et b) illustre les micrographies MEB des substrats d'acier inoxydable 316L après polissage à 120 et 1000, respectivement. Les micrographies du substrat non revêtu montrent quelques microfissures (des rayures parallèles les unes aux autres) à la surface des deux substrats. Cependant, le substrat poli à 120 illustre en plus des rayures des zones avec des défauts profonds.



**Figure III.IV.3 :** Spectre d'analyse EDS de substrat d'acier inoxydable 316L SS

Le spectre EDS de substrat d'acier inoxydable 316L présenté sur la figure IV.3 montre des bandes intenses relatives aux principaux éléments constituant le substrat : Fe, Cr et Ni. Le spectre indique également la présence des pics avec des intensités faibles telles que le Mn, Mo et Si [6]. Les différents éléments détectés par l'analyse chimique (EDS) avec leurs quantifications sont illustrés dans le tableau III.IV.1.

**Tableau III.IV.1.** Composition chimique du substrat 316L SS.

Eléments	Mo	Mn	Cr	Ni	Fe
% massique	2.25	2.16	17.43	10.10	68.06

#### IV.1.2.3. Rugosité des substrats d'acier inoxydable 316L

La rugosité des substrats est un facteur important affectant la morphologie des revêtements déposés. Au cours de cette première partie, les paramètres de rugosité de surface des substrats en acier inoxydable 316L après polissage à 120 et 1000 et lavage aux ultrasons sans revêtement sont mesurés et déterminés en utilisant le profilomètre optique de surface (Chapitre II). Les résultats sont représentés dans le tableau III.IV.2 suivant :

**Tableau III.IV.2.** Rugosité des substrats 316L SS polis à 120 et 1000.

<b>Substrats</b>	<b>Plaque 120</b>	<b>Plaque 1000</b>
<b>Rugosité (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0.35	0.20

Les valeurs de la rugosité moyenne arithmétique ( $R_a$ ) des substrats 316L SS après polissage à 120 et 1000 sont de  $0.35 \mu\text{m}$  et  $0.20 \mu\text{m}$ , respectivement [7]. Ces résultats sont en accord avec les micrographies MEB, les plaques polies à 1000 sont qualifiées comme surface miroir.

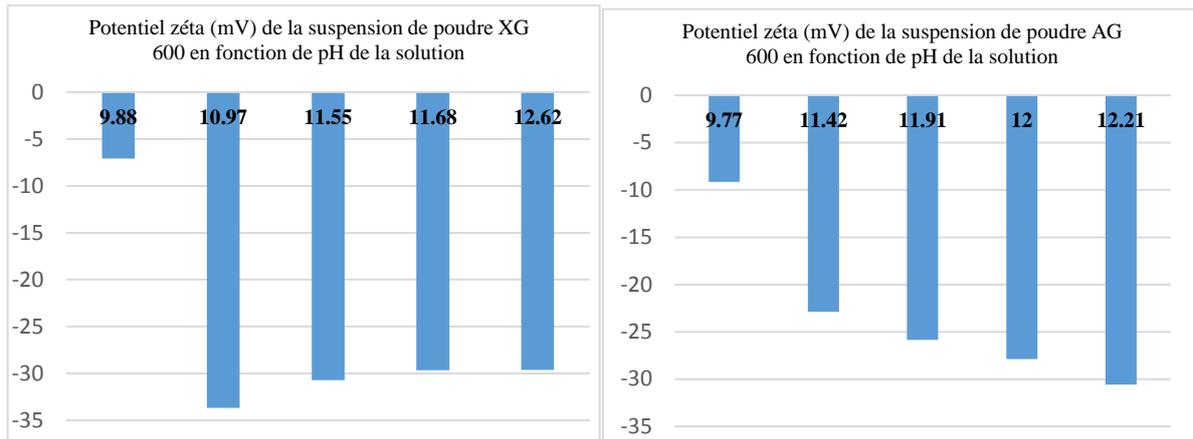
## **IV.2. Revêtements prothétiques déposés sur des substrats en acier 316L par électrophorèse**

La préparation de la surface des substrats de l'acier inoxydable 316L est importante dans le but d'obtenir une surface propice à l'accueil du revêtement prothétique. Après traitement de surface de ces substrats, des revêtements de poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à  $600^\circ\text{C}$  ont été mis en place via le procédé d'électrophorèse. Par la suite, la chimie, la structure et la topographie des revêtements ainsi que leur résistance à la corrosion ont été investiguées.

### **IV.2.1. Potentiel Zeta des poudres de verre bioactif**

Avant l'élaboration des revêtements en poudre de verre bioactif, la charge des particules de verre bioactif en fonction du pH (volume d'ammoniaque ajouté) a été étudiée.

La charge de surface des particules de verre bioactif préparées est caractérisée en mesurant le potentiel zêta (chapitre II). Des mesures de potentiel zêta ont été effectuées sur des suspensions de poudre de verre bioactif à différentes valeurs du pH. Les résultats des valeurs du potentiel zêta en fonction des valeurs du pH des suspensions de particules de verre bioactif xérogel et aérogel sont présentés sur la figure III.IV.4 ci-dessous.



**Figure III.IV.4 :** *Potentiel zêta des suspensions de particules de verre bioactif xérogel et aérogel en fonction du pH de la solution d'ammoniaque ajouté.*

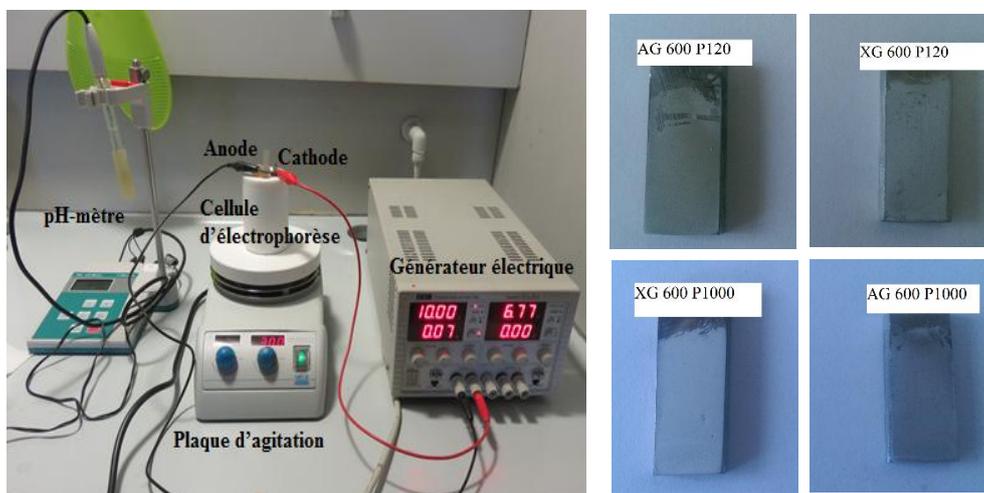
Le potentiel zêta ( $\zeta$ ) est utilisé pour évaluer les forces d'interaction entre les particules. Une valeur du potentiel zêta supérieure à  $\pm 30$  mV est souvent considérée comme suffisante pour obtenir une suspension stable. Des mesures sont effectuées sur des suspensions des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel calcinées à  $600^{\circ}\text{C}$ . La figure III.IV.4 trace les résultats du potentiel zêta  $\zeta$  recueillis en fonction du pH pour les poudres sélectionnées (XG 600 et AG 600). Les résultats montrent que les particules de XG 600 ont une valeur de potentiel zêta de  $-7.09$  mV et un pH de 9.88 sans ajout de la solution d'ammoniaque et une valeur de  $-29.63$  mV pour un pH de 12.62. Les particules d'AG 600 présentent une valeur du potentiel zêta de  $-9.15$  mV pour un pH de 9.77 sans ajout de la solution d'ammoniaque et une valeur de  $-30.57$  mV pour un pH de 12.21. Avec l'augmentation du pH, les valeurs du potentiel zêta  $\zeta$  deviennent progressivement plus négatives, avec des valeurs absolues atteignent des potentiels zêtas approximatifs de 30 mV pour un pH de 12. Le potentiel zêta dépend essentiellement de la polarité de surface. Malgré cela, la taille des particules est susceptible d'affecter la mobilité électrophorétique, car la gravité confère au mouvement une composante verticale qui devienne plus importante pour les grosses particules [8].

#### IV.2.2. Processus de dépôts par électrophorèse des poudres de verre bioactif

Le processus de déposition électrophorétique des poudres de verre bioactif sur les plaques d'acier 316L SS préparées préalablement est décrit dans le chapitre II. Le processus d'électrophorèse est effectué en mélangeant 5% en masse de poudre de verre bioactif (xérogel et aérogel) avec l'eau distillée. La solution est agitée aux ultrasons pendant 30 min puis le pH est ajusté entre (12,5 et 13) avec une solution d'ammoniaque ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) à température ambiante.

Le substrat d'acier 316L (cathode) est immergé verticalement dans la suspension entourée d'une grille en acier inoxydable 316L (anode).

Après la réalisation de plusieurs dépôts avec les plaques en acier inoxydable polies à différentes gammes (120, 400, 600, 800 et 1000), différents voltages (5 et 10V) et temps de dépôt (15, et 60 min). Une analyse MEB est réalisée afin de distinguer l'état des dépôts et d'optimiser les paramètres. Après les observations MEB des différents dépôts obtenus avec différents paramètres, nous avons choisi les paramètres suivant pour la suite de notre étude. Les tests d'électrophorèses sont réalisés sur des substrats 316L SS polis à 120 et 1000, sous agitation magnétique en appliquant une tension de 10 V pendant un temps de 15 min et le pH de la suspension est ajusté entre 12.5 et 13 avec l'ajout d'ammoniaque. Les dépôts obtenus sont séchés à température ambiante puis calcinés sous vide à 500°C pendant 1 h.



*Figure III.IV.5 : Montage expérimental utilisé pour l'élaboration de revêtements prothétiques par électrophorèse et les revêtements obtenus après déposition.*

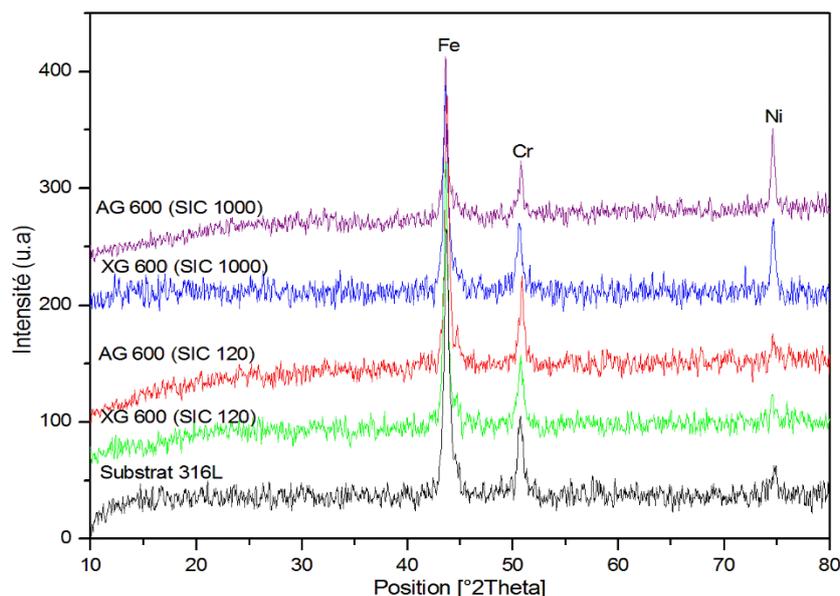
La figure III.IV.5 montre le dispositif utilisé pour l'élaboration des revêtements électrophorétiques, ainsi que les revêtements obtenus après dépositions des poudres XG 600 et AG 600 sur les substrats 316L SS polis à 120 et 1000. Les dépôts obtenus sont calcinés sous une atmosphère inerte à 500°C pendant 1h afin d'améliorer leur adhérence au substrat.

#### **IV.2.3. Caractérisation physico-chimique des revêtements réalisés**

La structure et la morphologie des revêtements en poudres de verre bioactif élaborés sont analysées par la diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie d'absorption infrarouge (FTIR) et la microscopie électronique à balayage (MEB) combinée à la spectroscopie de dispersion des rayons X (EDS). L'épaisseur, la rugosité et la résistance à la corrosion de ces revêtements sont également présentées et discutées.

#### IV.2.3.1. Analyse DRX des revêtements en verre bioactif

La pureté de phase des poudres de verre bioactif synthétisées et déposées par électrophorèse sur les substrats 316L SS est analysée par DRX. La figure III.IV.6 montre les diagrammes DRX des substrats 316L SS polis à 120 et 1000 revêtus de poudres XG 600 et AG 600 obtenus par dépôt électrophorétique à un potentiel constant de 10 V durant 15 min et après frittage sous vide.

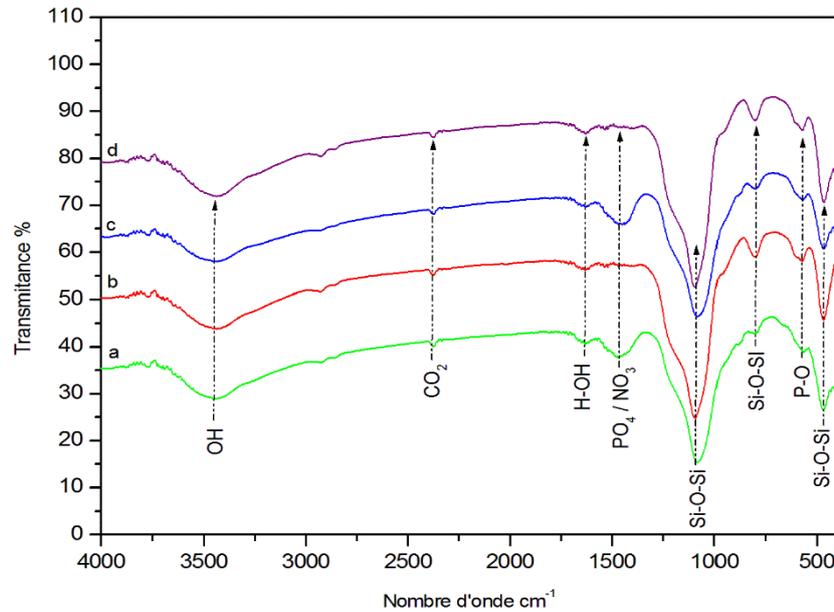


*Figure III.IV.6 : Diffractogrammes des revêtements en verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000.*

L'analyse des diagrammes de diffraction des rayons X (figure III.IV.6) des différents revêtements des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C met en évidence de larges réflexes, attribués à la structure amorphe des poudres de verre bioactif [9, 10]. Les trois pics observés à  $2\theta=43.5^\circ$ ,  $2\theta=50.7^\circ$  et  $2\theta=74.7^\circ$  correspondent principalement aux éléments Fer, Chrome et Nickel, respectivement constituant le substrat 316L SS. Les diffractogrammes ne présentent aucune transformation cristalline ce qui confirme la nature stable (amorphe) des revêtements en verre bioactif formés après traitement thermique [5, 11].

#### IV.2.3.2. Analyse IRTF des revêtements de verre bioactif

L'analyse IRTF est une méthode très utile pour l'identification de groupes fonctionnels inorganiques. Les revêtements en poudres de verre bioactif XG 600 et AG 600 sont analysés par IRTF, les spectres enregistrés sont présentés dans la figure III.IV.7 :

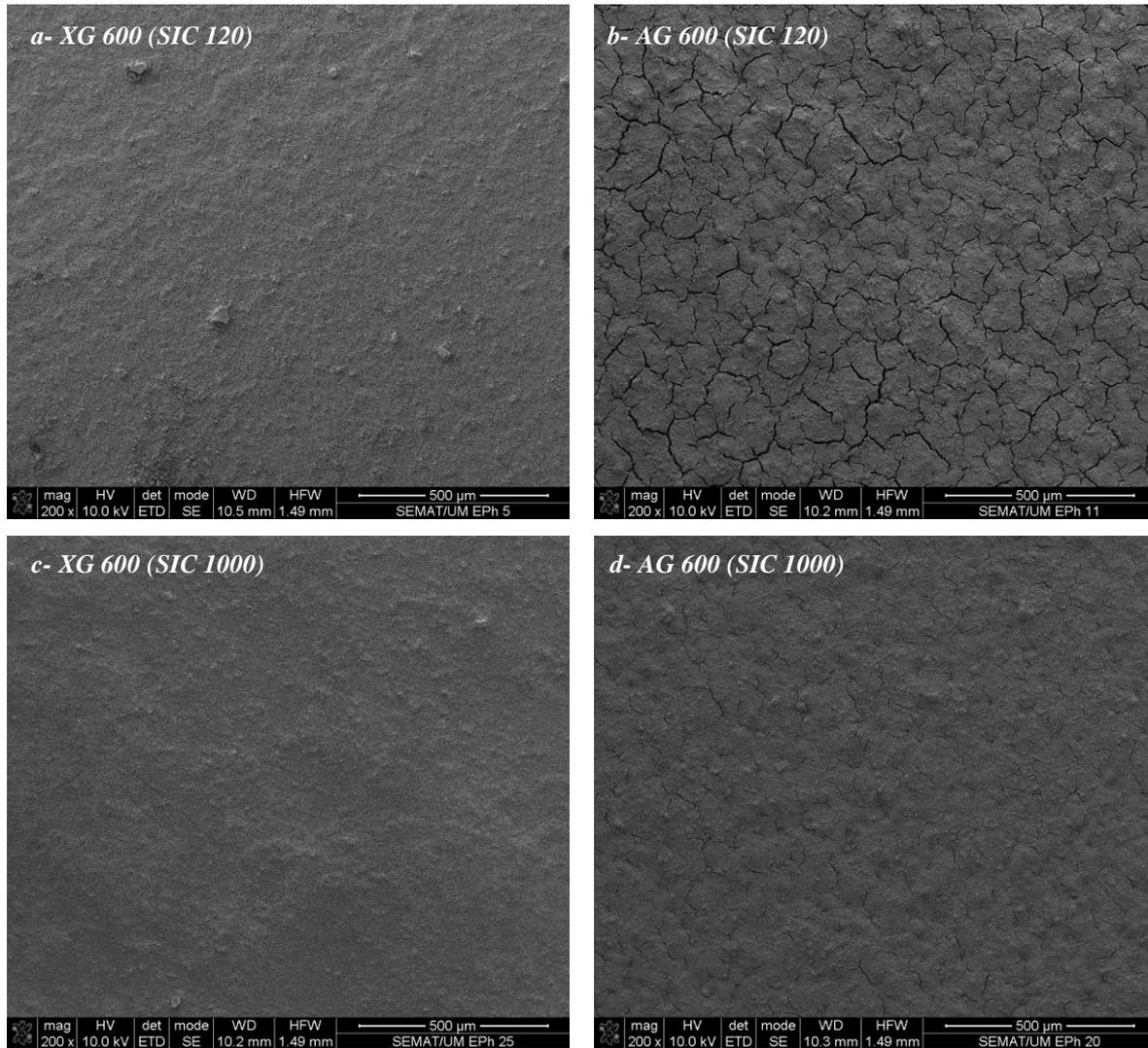


**Figure III.IV.7 :** Spectres IRTF des revêtements de verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS : a- XG 600 (SIC 120), b- AG 600 (SIC 120), c- XG 600 (SIC 1000) et d- AG 600 (SIC 1000).

Les spectres IRTF des revêtements des poudres de verre bioactif présentés sur la figure III.IV.7 montrent des bandes caractéristiques des poudres de verre bioactif utilisées (chapitre III, partie I). Les bandes intenses vers 1036 et 1082  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations d'élongation asymétrique du groupement Si-O-Si, celles entre 785 et 790  $\text{cm}^{-1}$  au mode d'élongation symétrique Si-O-Si alors que les bandes d'absorption autour de 453-463  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées au mode vibrationnel de la flexion de Si-O-Si indiquant que tous les revêtements sont essentiellement composés de réseau Si-O-Si [12-14]. Aucun pic autre que les pics constituant le verre bioactif n'est observé, ce qui prouve que les revêtements sont principalement constitués de poudres de verre bioactif mises en suspension lors du dépôt électrophorétique.

#### IV.2.3.3. Analyse MEB-EDS des revêtements de verre bioactif

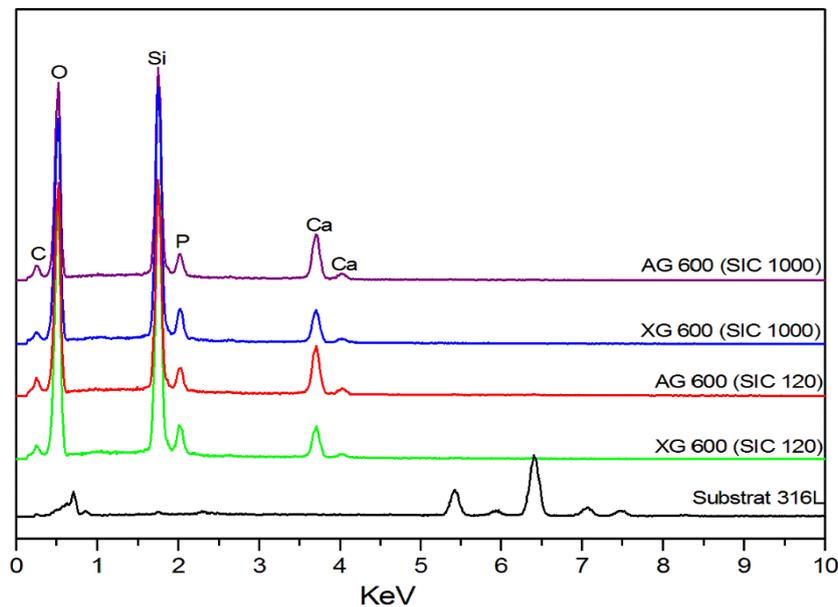
Les figures III.IV.8 et III.IV.9, présentent les micrographies MEB et les spectres EDS obtenus sur des revêtements électrophorétiques des poudres XG 600 et AG 600 déposés sur les substrats 316L SS polis à 120 et 1000 et calcinés sous vide à 500°C. Le potentiel appliqué est de 10 V pendant 15 min.



**Figure III.IV.8 :** Morphologies MEB des revêtements en verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000

Les micrographies MEB montrent que les revêtements élaborés avec la poudre XG 600 ont une surface continue avec un maillage de minuscules piqûres allongées (figure III.IV.8 ; a, c). Cependant, des fissures caractéristiques apparaissent à la surface des revêtements élaborés avec la poudre AG 600 (figure III.IV.8 ; b, d). On remarque aussi que les revêtements sur les substrats polis à 1000 sont plus homogènes que ceux élaborés sur les plaques polies à 120. Les fissurations observées est le résultat, entre autres, de tensions contractiles apparaissant dans les revêtements durant le traitement thermique. On peut supposer que la présence de telles fissurations sur la surface de l'implant peut avoir un effet positif sur la biointégration de l'implant, les ostéoblastes vont facilement s'installer, proliférer et synthétiser des protéines qui constituent une origine du tissu osseux [15]. La présence de telles fissurations peut aussi engendrer le détachement de la couche de poudre de verre bioactif déposée et la possibilité de

passage des éléments de l'acier en solution qui peut avoir un effet négatif sur la biointégration de l'implant.



**Figure III.IV.9 :** Spectres d'analyse EDS des revêtements de verre bioactif sur les substrats en acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000.

Les analyses EDS des revêtements des poudres XG 600 et AG 600 présentées dans la figure III.IV.9, révèlent la présence de silicium, calcium, phosphore et oxygène correspondant aux différents éléments composant le verre bioactif introduit lors de l'étape de déposition et aucun autre pic n'est observé. Les pics caractéristiques du substrat ont disparu ; ceci peut être expliqué par la formation de dépôt de poudre de verre bioactif sur la surface des substrats [16-18].

#### IV.3.4. Rugosité et épaisseur des revêtements par profilomètre

La rugosité finale des dépôts dépend de la rugosité initiale du substrat et des conditions expérimentales choisies pour le dépôt. Dans notre étude, la rugosité initiale est fixée par le polissage du substrat 316L SS (120, 1000), et la rugosité finale qui évolue essentiellement en fonction du potentiel appliqué (10 V), qui est également lié à l'épaisseur de dépôt, au temps de dépôt (15 min) et au type de poudre utilisée (XG 600, AG 600). Chaque mesure est répétée trois fois et les valeurs des paramètres de rugosité et de l'épaisseur sont obtenus par la moyenne des trois mesures. Le tableau III.IV.3 présente les valeurs moyennes de la rugosité et de l'épaisseur réalisées sur les revêtements obtenus.

**Tableau III.iv.3.** Rugosité et épaisseur des revêtements de poudres de verre bioactif

Revêtements	Rugosité ( $\mu\text{m}$ )	Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )
XG 600 (120)	1.57	5.45
AG 600 (120)	1.75	6.93
XG 600 (1000)	1.92	3.98
AG 600 (1000)	2.14	4.17

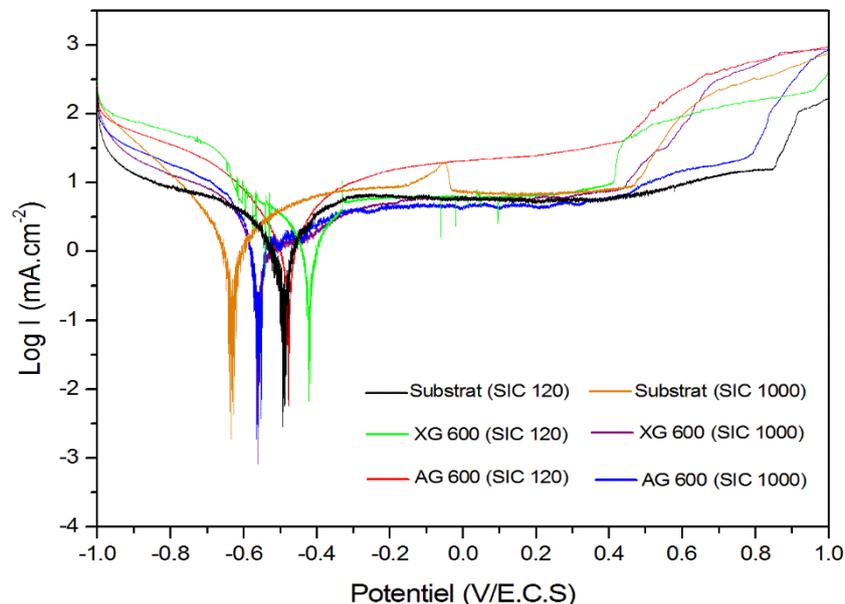
Sur la base de l'analyse des paramètres mentionnés ci-dessus (tableau III.iv.3), on remarque clairement l'influence du polissage des substrats 316L SS et le type de poudre utilisée sur l'épaisseur et la rugosité des revêtements réalisés, qui sont proportionnelles au temps de dépôt et au potentiel appliqué. D'après ces résultats, on peut conclure : la comparaison de la rugosité de surface obtenue pour les substrats non revêtus avec celle des substrats revêtus montre que les revêtements des poudres de verre bioactif modifient les propriétés de rugosité du substrat. Dans le cas des substrats avec la plus faible rugosité (substrats polis à 1000,  $R_a = 0,20 \mu\text{m}$ ), après application des dépôts de poudres AG 600 et XG 600, nous avons observé une augmentation de sa rugosité avec  $R_a = 2.14 \mu\text{m}$  et  $R_a = 1.92 \mu\text{m}$  pour les dépôts AG 600 (1000), XG 600 (1000) respectivement. Une tendance complètement différente est observée pour les substrats de rugosité plus élevée (substrats polis à 120,  $R_a = 0,35 \mu\text{m}$ ), ces matériaux indiquent une diminution de la rugosité des surfaces après dépôt de couches de verre bioactif, avec des valeurs de rugosité,  $R_a = 1.75 \mu\text{m}$  dans le cas de dépôt AG 600 (120) et  $R_a = 1.57 \mu\text{m}$  dans le cas de revêtement XG 600 (120) [15, 19]. Cependant, l'épaisseur diminue dans le cas des revêtements AG 600 (1000) et XG 600 (1000) avec des valeurs de  $4.17 \mu\text{m}$  et  $3.98 \mu\text{m}$ , respectivement. L'épaisseur des dépôts AG 600 (120) et XG 600 (120) est de  $6.93 \mu\text{m}$  et  $5.45 \mu\text{m}$ , respectivement. On constate aussi que la rugosité et l'épaisseur sont importantes dans les revêtements en poudre de verre bioactif aérogel.

#### IV.3.5. Résistance à la corrosion des substrats revêtus en verre bioactif

La résistance à la corrosion des alliages biocompatibles utilisés pour les implants du corps humain est d'une grande importance, non seulement parce qu'elle détermine la durée de vie du dispositif, mais aussi en raison de la nocivité des processus de corrosion ayant lieu dans l'organisme vivant. Les produits de corrosion peuvent affecter le métabolisme cellulaire, c'est-à-dire que le courant de corrosion peut affecter le comportement cellulaire. Différents

revêtements sont élaborés sur l'acier inoxydable pour diverses applications, notamment des utilisations biomédicales telles que les implants dentaires et orthopédiques. L'attention la plus importante est concentrée sur le comportement vis-à-vis de la corrosion et la biocompatibilité des implants métalliques [20, 21].

La résistance à la corrosion des revêtements élaborés est évaluée par voltamétrie cyclique, d'un potentiostat/Galvanostat de marque PGZ 301 modèle Voltalab 21, piloté par le logiciel VoltaMaster 4. Les courbes de polarisations obtenues pour les substrats d'acier 316L SS polis à 120 et 1000 non revêtus et revêtus des poudres de verre bioactif sont présentées sur la figure III.IV.10. Les paramètres de corrosion ( $E_{Corr}$  et  $I_{Corr}$ ) sont déterminés par la méthode de Tafel et regroupés dans le tableau III.IV.4.



**Figure III.IV.10 :** Courbes de polarisation des revêtements en poudres de verre bioactif et des substrats d'acier inoxydable 316L SS poli à : 120 et 1000.

La figure III.IV. 10 montre les courbes de polarisation des substrats 316L SS polis à 120 et 1000 avec et sans revêtement dans la solution SBF. Les revêtements en poudre de verre bioactif déposée sur les substrats 316L SS polis à 1000 décalent la courbe de polarisation du substrat vers des densités de courant plus faibles et des potentiels plus nobles, ce qui indique que la présence de revêtement de verre bioactif (XG 600) améliore la résistance à la corrosion de l'acier inoxydable (SIC 1000) et agit comme une couche protectrice [22, 23].

En revanche, on note que la densité de courant de corrosion ( $I_{Corr}$ ) des autres revêtements (XG 600 (SIC120), AG 600 (SIC 120) et AG 600 (SIC 1000)) est plus élevée que celle des substrats non revêtus contrairement au potentiel de corrosion ( $E_{Corr}$ ) qui décale vers des valeurs plus

nobles (tableau III.IV.4). Ceci conduit à une résistance à la corrosion inférieure, qui est due à la présence des fissurations causées lors du traitement thermique. L'existence d'éventuelles fissures dans les revêtements peuvent conduire à l'augmentation de la densité de courant de corrosion du substrat. Afin d'obtenir un revêtement homogène et sans fissures, l'accent est principalement mis sur les méthodes de traitement thermique [21].

Ces résultats sont cohérents avec les micrographies MEB (Figure III.IV.8), qui indiquent une morphologie plus homogène dans le revêtement XG 600 (SIC 1000) que celle des autres revêtements (XG 600 (SIC 120), AG 600 (SIC 120) et AG 600 (SIC 1000)) qui présentent des fissurations à la surface et conduit à une faible résistance à la corrosion.

Les variations de la résistance à la corrosion des revêtements peuvent aussi être attribuées aux variations de l'épaisseur et de la rugosité de surface des différents revêtements. On remarque aussi que la résistance à la corrosion est plus élevée dans le substrat 316L SS polis à 1000 en raison de sa surface plus lisse [24].

**Tableau III.IV.4 :** Paramètres de corrosion extraient des courbes de polarisation.

Echantillon	$E_{Corr}$ (mV/ECS)	$I_{Corr}$ ( $\mu A/cm^2$ )
Plaque 120	-488	729
Plaque 1000	-635	605
XG 600 (120)	-421	918
XG 600 (1000)	-547	574
AG 600 (120)	-479	1219
AG 600 (1000)	-561	813

## **Conclusion**

Au cours de cette étude, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir des revêtements en matériau synthétisé (les poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C) sur des substrats en acier inoxydable 316L SS polis à 1000 et 120 via la méthode d'électrophorèse. L'analyse DRX montre une structure amorphe des poudres déposées avec les pics caractéristiques de substrats 316 L SS. Les caractérisations par EDS révèlent la présence de tous les éléments composant le verre bioactif et l'analyse IRTF est en accord. Les micrographies MEB montrent des dépôts homogènes sur les deux plaques polies à 120 et 1000 avec des fissurations après traitement thermique sous une atmosphère inerte. La rugosité des revêtements est importante sur les plaques polies à 1000 qu'à 120 contrairement à l'épaisseur des revêtements qui diminue sur les plaques polis à 1000. Les résultats nous ont mené à supposer que les revêtements préparés rentrent dans la catégorie des implants de rugosité minimale. L'amélioration de la résistance à la corrosion peut être obtenue par la formation d'un revêtement en verre bioactif sur un substrat métallique tel que le 316L SS (XG 600 (SIC 1000)). En conséquence, une diminution de la libération d'ions dans le corps humain et donc une amélioration de la biocompatibilité qui pourraient être obtenues. Par conséquent, la prévention des lésions tissulaires, des inflammations et des irritations, et l'obtention d'une réponse histologique souhaitable pourraient être acquises.

## Références bibliographiques

- [1]. J.J. Ramsden, D.M. Allen, D.J. Stephenson, J.R. Alcock, G.N. Peggs, G. Fuller, G. Goch. The Design and Manufacture of Biomedical Surfaces. *Annals of the CIRP*. 2007; 56: 687-711.
- [2]. F. Gebhardt, S. Seuss, M.C. Turhan, H. Hornberger, S. Virtanen, A.R. Boccaccini. Characterization of electrophoretic chitosan coatings on stainless steel. *Materials Letters*. 2012; 66: 302-304.
- [3]. F. Bir, H. Khireddine, A. Touati, D. Sidane, S. Yala, H. Oudadesse. Electrochemical depositions of fluorohydroxyapatite doped by  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{+}$  on stainless steel substrates. *Applied Surface Science*. 2012; 258: 7021-7030.
- [4]. D. Sidane, H. Khireddine, F. Bir, S. Yala, A. Montagne, D. Chicot. Hydroxyapatite-TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> Coated 316L Stainless Steel for Biomedical Application. *Metallurgical and Materials Transactions A*. 2017; 48A: 3570-3582.
- [5]. L. Wen, H. Wanpei, L. Qian, L. Xu, C. Rongsheng, N. Hongwei, Z. Weiting. Antibacterial properties of Ag/TiO<sub>2</sub>/PDA nanofilm on anodized 316L stainless steel substrate under illumination by a normal flashlight. *J Mater Sci*. 2020; 55: 9538-9550.
- [6]. I.O. zbek, B.A. Konduk, C. Bindal, A.H. Ucisik. Characterization of borided AISI 316L stainless steel implant. *Vacuum*. 2002; 65: 521–525.
- [7]. R.M. Asri, W. Sharuzi W. Harun, Y.P. Asmara. Effect of Acid Pickling on Microstructure and Surface Roughness of 316L Stainless Steel. *The National Conference for Postgraduate Research, University Malaysia Pahang*. 2016; 142-146.
- [8]. B.A.E. Ben-Arfa, A.S. Neto, I.M.M. Salvado, R.C. Pullar, J.M.F. Ferreira. Robocasting: Prediction of ink printability in solgel bioactive glass. *Journal of American Ceramic Society*. 2019; 102: 1608–1618.
- [9]. A. Saboori, M. Rabiee, F. Moztafzadeh, M. Sheikhi, M. Tahriri, M. Karimi. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO bioglass. *Materials Science and Engineering C*. 2009; 29: 335-340.
- [10]. L. Radev, K. Hristova, V. Jordanov, M.H.V. Fernandes, I.M.M. Slvado. In vitro bioactivity of 70 Wt. % SiO<sub>2</sub>- 30 Wt. % CaO sol-gel glass, doped with 1.3 and 5 Wt. % NbF<sub>5</sub>. *Central European Journal of Chemistry*. 2012; 10: 137-145.
- [11]. C.X. Wang, Z.Q. Chen, M. Wang. Fabrication and characterization of bioactive glass coatings produced by the ion beam sputter deposition technique. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2002; 13: 247-251.

- [12]. A. Lucas-Girot, F.Z. Mezahi, M. Mami, H. Oudadesse, A. Harabi, M. Le Floch. Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  Comparison with melting method. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2011; 357: 3322–3327.
- [13]. P. Jiang, H. Lin, R. Xing, J. Jiang, F. Qu. Synthesis of multifunctional macroporous-mesoporous  $\text{TiO}_2$ -bioglasses for bone tissue engineering. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2011; 61: 421-428.
- [14]. S.H. Jun, E.J. Lee, S.W. Yook, H.E. Kim, H.W. Kim, Y.H. Koh. A bioactive coating of a silica xerogel/chitosan hybrid on titanium by room temperature sol-gel process. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6: 302-307.
- [15]. J. Krzak-Roś, J. Filipiak, C. Pezowicz, A. Baszczuk, M. Miller, M. Kowalski, R. Będziński. The effect of substrate roughness on the surface structure of  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , and doped thin films prepared by the sol–gel method. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2009; 11: 21-29.
- [16]. A. Doostmohamadi, A. Monshi, M.H. Fathi, S. Karbasi, O. Braissant, Q.U. Daniels. Direct cytotoxicity evaluation of 63S bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using yeast model and human chondrocyte cells by microcalorimetry. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2011; 22: 2293-2300.
- [17]. A. Balamurgan, G. Balossier, D.L. Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent. Mater*. 2008; 24: 1343-1351.
- [18]. J.P. Nayak, S. Kumar, J. Bera. Sol-gel synthesis of bioglass-ceramics using rice husk ash as a source for silica and its characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2010; 356: 1447-1451.
- [19]. R. Będziński, J. Filipiak, C. Pezowicz, J. Krzak-Roś, M. Kowalski, Influence of substrate roughness on  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$ , coating topography produced by the sol–gel process. *Engineering of Biomaterials*. 2008; 11: 87–89.
- [20]. J. Gallardo, P. Galliano, A. Duran. Bioactive and protective sol-gel coatings on metals for orthopaedic prostheses. *Journal of sol-gel science and technology*. 2001; 21: 65-74.
- [21]. M.H. Fathi, A. Doostmohammadi. Bioactive glass nanopowder and bioglass coating for biocompatibility improvement of metallic implant. *Journal of Materials Processing Technology*. 2009; 209: 1385-1391.

[22]. M. Mehdipour, A. Afshar, M. Mohebbali. Electrophoretic deposition of bioactive glass coating on 316L stainless steel and electrochemical behavior study. *Applied Surface Science*. 2012; 258: 9832– 9839.

[23]. M. Mehdipour, A. Afshar. A study of the electrophoretic deposition of bioactive glass–chitosan composite coating. *Ceramics International*. 2012; 38: 471-476.

[24]. L. Sorkhi, M. Farrokhi-Rad, T. Shahrabi. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite–chitosan–titania on stainless steel 316 L. *Surfaces*. 2019; 2: 458-467.

## ***CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES***

## CONCLUSION GENERALE

Malgré des études nombreuses et variées sur le développement des bioverres depuis plusieurs années, la plupart d'entre elles sont liées au développement de ceux-ci sous forme de particules denses ou grosses (bioverre xérogel), peu d'entre elles mentionnent des particules fines de granulométrie nanométrique. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude détaillée sur la synthèse des poudres de bioverre à partir d'aérogel. Au cours de cette étude, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir des poudres de bioverre ternaires ( $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ ) avec des particules très fines et cela à partir d'un aérogel par la méthode sol-gel. Les données sur la préparation des poudres de bioverre à différentes conditions de séchage du gel et à différentes températures du traitement ( $400^\circ\text{C}$ ,  $600^\circ\text{C}$  et  $800^\circ\text{C}$ ), nous ont permis de mettre en évidence l'influence de ces dernières sur la structure et la morphologie des poudres de xérogel et d'aérogel préparées. L'analyse DRX montre une structure cristalline au-delà de  $600^\circ\text{C}$  pour les deux poudres xérogel et aérogel. Les caractérisations EDS et XPS révèlent la présence de tous les éléments qui composent le bioverre ternaire. Les résultats de caractérisation MEB et MET ont montré que les poudres d'aérogel sont caractérisées par une structure moins dense et spongieuse avec une granulométrie inférieure à 10 nm. Cependant, les poudres de xérogel présentent une structure dense avec une granulométrie d'environ 100 nm. La condensation augmente avec l'augmentation de la température du traitement thermique et l'analyse thermique TG/DTG est en accord avec ces résultats. En résumé, la morphologie et la structure des poudres produites dépendent du type de gel (xérogel ou aérogel) et de la température de traitement.

L'effet du type de solvant utilisé dans le cas des poudres aérogels traitées à  $600^\circ\text{C}$  a été également étudié. Les résultats obtenus montrent que la texture et la morphologie des poudres élaborées sont influencées par deux facteurs, le type du gel utilisé (xérogel ou aérogel) et le type du solvant pour les poudres d'aérogel (éthanol, acétone ou méthanol). Les différentes analyses montrent que les poudres de bioverre aérogel préparées par différents solvants ont des propriétés pratiquement identiques. Il faut noter que les quelques différences observées sont attribuées aux conditions de séchage des gels des différents solvants et à la différence de groupement alkyle dans le cas de l'éthanol et du méthanol et du groupement fonctionnel dans le cas de l'acétone.

La bioactivité et la cytocompatibilité lors de tests *in vitro* des pastilles et des poudres de verre bioactif xérogel et aérogel à différentes températures du traitement et différents solvants ont été ensuite évaluée. Les analyses que nous avons menées montrent que la température de traitement et les conditions de séchages des gels (xérogel et aérogel) affectent la vitesse de formation de

la couche d'hydroxyapatite carbonatée et la cytotoxicité des cellules ostéoblastes MG63 et fibroblastes NIH/3T3. La couche d'hydroxyapatite carbonatée est observée après un jour d'immersion dans le cas des poudres aérogels et trois jours pour les poudres xérogel. Des mécanismes couplés de dissolution préférentielle aux joints de grains des pastilles et de précipitation sont à l'origine de cette couche néoformée.

L'étude menée avec les cellules ostéoblastes MG63 montre une toxicité à une concentration de 200 mg/ml pour toutes les pastilles des poudres de verre bioactif. Pour déterminer la concentration maximale de toxicité de ces poudres, il est souhaitable de réaliser une étude complémentaire évaluant l'effet de la concentration des poudres de verre bioactif.

La culture des cellules fibroblastes NIH/3T3 sur des extraits des poudres de xérogel et aérogel traitées à 600°C et 800°C a démontré que la concentration des poudres dans le milieu de culture est un facteur très important pour évaluer leur cytotoxicité. Les résultats ont montré que les cellules sont viables à des concentrations de 50 mg/ml et ne présentent aucune toxicité. Tandis que, les poudres de verre bioactif sont toxiques à une concentration de 100 mg/ml.

Des études microbiologiques ont été menées sur quatre microorganismes (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *C. krusei*). Les résultats de cette étude confortent l'opinion selon laquelle le potentiel antimicrobien des poudres dépend du type de solvant utilisé et du traitement thermique des poudres. Les poudres présentant un potentiel antibactérien sont XG 600, XG 800 et AG 800 car elles inhibent la croissance de tous les agents pathogènes testés après 24 h. Par contre, la poudre XG 400 a un effet antibactérien sur *E. coli* et *S. aureus* seulement pour 24 h, alors que les poudres AG 400 et AG 600 ont de faibles effets inhibiteurs sur *C. krusei* et *C. albicans*. La poudre AGA 600 inhibe significativement la formation de colonies microbiennes après 48 h sur *C. krusei* et 72 h sur *C. albicans*. En revanche, la poudre AGM 600 a un très bon effet inhibiteur sur la croissance bactérienne d'*E. coli* après 48 h, mais l'effet sur *C. krusei* et *C. albicans* est affaibli après 72 h d'exposition. Ces résultats peuvent être expliqués par les ions calcium, phosphore et silicium libérés par les poudres de verre bioactif, et leur libération augmente le pH et la pression osmotique du milieu. Les fortes concentrations de calcium et d'alcalins libérés par les poudres peuvent détruire le potentiel membranaire des micro-organismes. Nous avons également conclu que les résultats du test d'efficacité antimicrobienne dépendent principalement de la quantité et de l'état vital des bactéries inoculées.

Comme nous avons aussi étudié les types de micro-organismes qui peuvent provoquer des infections à la surface des prothèses et autres dispositifs introduits dans le corps. Ces résultats peuvent être utilisés pour développer des revêtements de surface antimicrobiens pour ces

dispositifs afin d'aider à prévenir l'infection des tissus qui les entourent, empêchant ainsi le rejet du dispositif et la transmission des maladies.

Au cours de la dernière partie de notre travail, nous avons montré qu'il est possible de réaliser des revêtements de poudres de verre bioactif xérogel et aérogel traitées à 600°C sur des substrats en acier inoxydable 316L SS polis à 1000 et 120 par la technique d'électrophorèse.

Les résultats des différentes analyses (DRX, EDX, FTIR, MEB) montrent la formation des revêtements homogènes de poudres de verre bioactif xérogel et aérogel introduites lors de déposition avec l'apparition des craquelures après traitement thermique sous vide. La rugosité et l'épaisseur des revêtements dépendent fortement de type de poudre utilisée (XG 600, AG 600) et du polissage du substrat 316L SS (SIC 120, SIC 1000). La formation des revêtements en verre bioactif sur des substrats métalliques, tel que 316L SS et plus particulièrement les dépôts de la poudre XG 600 sur les plaques polis à 1000 améliore la résistance à la corrosion. L'amélioration de la résistance à la corrosion des dispositifs implantés dans le corps humain permet l'amélioration de la biocompatibilité et la prévention des lésions tissulaires, des inflammations et des irritations, et l'obtention d'une réponse histologique idéale.

### **Perspectives**

Les résultats obtenus dégagent, des perspectives conséquentes qui sont soit spécifiques à ce travail, soit constituent un élargissement du sujet.

Les produits issus de la dissolution de la matrice vitreuse (notamment calcium, phosphore et silicium) peuvent favoriser l'activité cellulaire. Par conséquent, le rôle et l'importance biologique de ces espèces doivent être étudiés. De ce fait, la détection de phosphatase alcaline et d'autres marqueurs dans le milieu de culture cellulaire peut expliquer la différenciation des ostéoblastes. De plus, la caractérisation de l'interface verre bioactif/cellules par analyse par faisceau d'ions permettra d'étudier les gradients de concentration élémentaire dans l'interface et les organismes cellulaires.

D'autre part, il faut continuer d'étudier les principaux paramètres clés des réponses cellulaires (écotoxicité, cytokines, RNS, ROS, facteurs de croissance, etc.), et de diversifier les types des cellules étudiées, c'est-à-dire leur nature (épithéliale, etc.) et leur origine (animale, humaine). Ces mesures permettront une évaluation plus fiable de l'activité biologique globale des particules minérales étudiées.

Une autre perspective intéressante est la conception des matériaux pouvant fournir des doses contrôlées de substances ayant un effet positif sur les cellules osseuses. En particulier,

l'encapsulation dans des matériaux de facteurs de croissance aux propriétés ostéoinductives, tels que les BMP.

L'incorporation des oligo-éléments, tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), l'argent (Ag),... devraient être considérés comme des dopants dans la matrice vitreuse en raison de leurs propriétés antimicrobiennes.

La synthèse de verres bioactifs sous forme de 'scaffold' est également envisageable ; il permettra de remplacer vraisemblablement les recherches sur les matériaux sous forme de poudres agglomérées.

Nous avons montré que la méthode d'électrophorèse permet la formation des revêtements de composition homogène quelle que soit le type de poudre utilisée. Cette technique apparaît prometteuse. Cependant, des recherches supplémentaires doivent être menées pour contrôler certains paramètres qui affectent la pureté et la qualité du revêtement, à savoir : la tension appliquée, le temps de dépôt, le pH de la suspension, le traitement thermique et l'amélioration de l'adhérence et l'épaisseur en ajoutant des polymères, tels que le chitosan, le PCL,...

Après optimisation du processus de revêtement, l'évaluation des propriétés mécaniques et biologiques liées à la structure des revêtements est également indispensable.

Enfin, une étude *in vivo* s'impose pour les verres dont le comportement bioactif est le plus prometteur (XG 600, XG 800 et AG 800).

## Résumé

Dans ce travail, nous avons montré, qu'il est possible d'obtenir des poudres de verre bioactif ternaires ayant une composition molaire 63 % SiO<sub>2</sub>, 28 % CaO et 9 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> à partir de xérogel et des aérogels via la méthode sol-gel. L'objectif est d'utiliser ces poudres de verre comme implant, matériau de comblement osseux ou de recouvrement, de ce fait il devient donc indispensable de s'assurer de leurs caractères bioactif (formation d'une couche d'HAC), biocompatible (cellules ostéoblastes (MG63), fibroblastes (NIH/3T3)) et antimicrobien (E. Coli, S. Aureus, C. Albicans et C. Kusei). Les résultats montrent une bonne activité biologique des poudres avec formation d'une couche d'apatite après 24h d'immersion dans la solution SBF. L'étude menée sur les cellules ostéoblastes MG63 indique la toxicité de toutes les poudres à une concentration de 200 mg/ml et la non toxicité sur les cellules NIH/3T3 à une concentration de 50 mg/ml. Les poudres XG 600, XG 800 et AG 800 inhibent la croissance de tous les pathogènes testés après 24h. Ces poudres servent aussi pour le revêtement des prothèses métalliques (316L SS) via la méthode d'électrophorèse afin de remédier au problème de descellement de l'implant.

**Mots clés** : Sol-gel, Aérogel, Verre bioactif, Bioactivité, Cytobiocompatibilité, Antimicrobien, Electrophorèse, Substrats 316L SS, Revêtement prothétique.

## Abstract

In this work, we have shown that it is possible to obtain ternary bioactive glass powders with a molar composition of 63% SiO<sub>2</sub>, 28% CaO and 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> from xerogel and aerogels via sol-gel method. The aim is to use these bioactive glass powders as an implant, bone filling or covering material, therefore it becomes necessary to ensure their bioactivity (formation of HAC layer), biocompatibility (osteoblast cells (MG63) and fibroblasts (NIH/3T3)) and antimicrobial (E. Coli, S. Aureus, C. Albicans and C. Kusei). The results show a good biological activity of the powders with precipitation of hydroxyapatite layer after 24 h of immersion in SBF solution. The study conducted on MG63 osteoblast cells indicates the toxicity of all powders at a concentration of 200 mg/ml and non-toxicity on NIH/3T3 cells at the concentrations of 50 mg/ml. XG 600, XG 800 and AG 800 powders prevent the growth of all pathogens tested after 24 h. These powders are also used for the coating of metal prostheses (316L SS) via the electrophoresis method in order to cure the problem of releasing of the implant.

**Keywords**: Sol-gel, Aerogel, Bioactive glass, Bioactivity, Cytobiocompatibility, Antimicrobial, Electrophoresis, 316L SS substrates, Prosthetic coating.

## المخلص

في هذا العمل، أظهرنا أنه من الممكن الحصول على مساحيق الزجاج الحيوي ذات التركيب المولي (63% SiO<sub>2</sub> و 28% CaO و 9% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) عبر تقنية صول-جال انطلاقاً من ايروجيل و زيروجيل. الهدف هو استخدام هذه المساحيق كغرسة أو حشو عظم أو مادة تغطية، وبالتالي يصبح من الضروري ضمان نشاطها الحيوي (تكوين طبقة HAC)، وتوافقها الحيوي (خلايا بانينات العظم (MG63) وخلايا ليفية (NIH / 3T3)) و مضادات الميكروبات (E. Coli، S. Aureus، C. Albicans و C. Kusei). أظهرت النتائج نشاطاً بيولوجياً جيداً للمساحيق مع ترسيب طبقة هيدروكسي أباتيت بعد 24 ساعة من الغمر في محلول SBF. تشير الدراسة التي أجريت على خلايا بانينات العظم MG63 إلى سمية جميع المساحيق بتركيز 200 mg/ml وعدم سمية المساحيق على خلايا NIH/3T3 بتركيز 50 mg/ml. تمنع مساحيق XG 600 و XG 800 و AG 800 نمو جميع الميكروبات التي تم اختبارها بعد 24 ساعة. تستخدم هذه المساحيق أيضاً لطلاء الأطراف الاصطناعية المعدنية (316L SS) عبر طريقة الرحلان الكهربائي من أجل علاج مشكلة تحرير الغرسة.

**الكلمات المفتاحية**: صول-جال، ايروجيل، الزجاج النشط بيولوجياً، النشاط الحيوي، التوافق الحيوي للخلايا، مضادات الميكروبات، الرحلان الكهربائي، ركائز 316L SS. طلاء اصطناعي.