HAL
open science

Elaboration et caractérisation d'un hybride organominéral à base de polycaprolactone et de bioverre sous forme de mousse macroporeuse pour la régénération osseuse

Cédric Bossard

To cite this version:

Cédric Bossard. Elaboration et caractérisation d'un hybride organominéral à base de polycaprolactone et de bioverre sous forme de mousse macroporeuse pour la régénération osseuse. Chimie thérapeutique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC068 . tel-02128441

HAL Id: tel-02128441

https://theses.hal.science/tel-02128441

Submitted on 14 May 2019

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

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

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité chimie, sciences des matériaux

Par

Cédric BOSSARD

Élaboration et caractérisation d'un hybride organominéral à base de polycaprolactone et de bioverre sous forme de mousse macroporeuse pour la régénération osseuse

soutenue publiquement le 10/12/2018, devant la commission d'examen :

M	C. DROUET	Président
Mme	N. NASSIF	Rapporteuse
M	J. CHEVALIER	Rapporteur
Mme	L. MAIGNE	Examinatrice
M	J. LAO	Directeur
M	E. JALLOT	Co-directeur

Remerciements

En premier lieu, je remercie Jérôme Chevalier, Christophe Drouet, Lydia Maigne et Nadine Nassif pour avoir pris part à mon jury de thèse et pour m'avoir décerné le titre de Docteur.

J'adresse ma profonde gratitude à mon directeur de thèse et mentor, Jonathan Lao, pour m'avoir laissé autant de liberté sur mes travaux tout en m'indiquant les bonnes directions à prendre. Merci d'avoir accordé cette confiance en mes compétences qui a permis de m'épanouir en tant que scientifique. Je tiens aussi à remercier Jonathan Lao pour avoir toujours fait preuve de considération, pour sa disponibilité et pour son goût du partage des connaissances qui ont donné lieu à de nombreux échanges scientifiques formateurs. Je tiens à remercier vivement mon co-directeur de thèse, Édouard Jallot, qui en plus d'avoir toujours été à l'écoute et de m'avoir soutenu dans mes entreprises, m'a enseigné les multiples aspects du monde de la recherche. Je suis reconnaissant et fier d'avoir vécu cette aventure dans cette équipe, certes réduite en nombre mais riche en qualités scientifiques et humaines.

Je remercie mon collègue et ami, Henri Granel, pour ces trois années de proche collaboration. À mes yeux, cette thèse n'est pas la mienne mais la nôtre. Je suis convaincu que de nombreux résultats sont le fruit de nos échanges, et je pense en particulier au dopage en nutriments qui a résulté en un dépôt de brevet. J'espère que l'on pourra continuer à avoir de longues conversations téléphoniques et que l'on aura l'occasion de partager d'autres souvenirs comme Maastricht. Merci aussi à Yohann Wittrant pour avoir participé à cette collaboration et pour avoir contribué à la réussite de nos deux thèses.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble de nos collaborateurs. Ce fût un plaisir et un privilège de travailler avec des consœurs et confrères aussi professionnels et compétents. Au-delà de leur savoir, j'ai pu bénéficier de leur passion rayonnante pour la science qui m'a entraîné dans une dynamique positive. Merci donc à Christophe Drouet et Jérémy Soulié du CIRIMAT (Toulouse), au personnel de la plateforme AIFIRA du CENBG (Gradignan), à Valérie Montouillout et Franck Fayon du CEMHTI (Orléans), à Hanna Tiainen de la Faculty of Dentistry de l'Université d'Oslo (Norvège) et à Mhammed Benbakkar du LMV (Aubière). Merci aussi à Christophe Vial, Christophe Insa et Fabrice Audonnet pour leur aide, et à l'entreprise OST Développement pour avoir fourni des matériaux et pour avoir stérilisé nos échantillons.

Finalement, je prie mes chers amis du LPC d'agréer mes sincères remerciements distingués pour avoir apporté de la joie et de la bonne humeur dans mes journées bien remplies. Merci à Flo et son grand-père, à Sous et ses soushis, à Anne ma chère sœur, à Arthour (couillère), à Anne-Laure, Nicolas et Cloé, à Boris l'épéiste, à Manon d'amour, à Guillaume Cordonnier, à Χριστίνα, Marc et Franck. Merci également aux éternels oubliés que je n'ai pas manqué d'oublier.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION **7**

PARTIE I GENERALITES ET METHODES **9**

CHAPITRE 1 LES SUBSTITUTS OSSEUX **11**
1.1 BIOMATERIAUX 11
1.2 BIOVERRES 13
1.3 HYBRIDES 19
CHAPITRE 2 SYNTHESE DE SCAFFOLDS D'HYBRIDE ORGANIQUE-INORGANIQUE A BASE DE BIOVERRE **23**
2.1 SYNTHESE D'UN SOL HYBRIDE 23
2.2 PROCEDE DE FABRICATION DES SCAFFOLDS 27
CHAPITRE 3 TECHNIQUES D'ANALYSE **31**
3.1 METHODOLOGIE 31
3.2 PREPARATION DES ECHANTILLONS 31
3.3 ÉVALUATION DE LA BIOACTIVITE *IN VITRO* 34

PARTIE II SCAFFOLDS D'UN HYBRIDE POLYCAPROLACTONE-BIOVERRE DE CLASSE I **41**

CHAPITRE 4 CHOIX DU POLYMERE **43**
4.1 ÉTUDE PRELIMINAIRE *IN VIVO* 44
4.2 COLLAGENE HYDROLYSE 50
CHAPITRE 5 SYNTHESE DE SCAFFOLDS D'HYBRIDE POLYCAPROLACTONE-BIOVERRE DE CLASSE I **61**
5.1 PRECURSEUR DE CALCIUM 62
5.2 POROSITE 71
5.3 INFLUENCE DU RATIO ORGANIQUE-INORGANIQUE 76
CHAPITRE 6 PROPRIETES DU MATERIAU FINAL **81**
6.1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES 81
6.2 ÉTUDE CELLULAIRE 93
6.3 ÉTUDE ANIMALE 96

PARTIE III OPTIMISATION DES PERFORMANCES DU MATERIAU **103**

CHAPITRE 7 AUGMENTATION DU POTENTIEL OSTEOGENIQUE PAR INCORPORATION D'ELEMENTS D'INTERET **105**
7.1 DOPAGE INORGANIQUE AVEC DU STRONTIUM 105
7.2 DOPAGE ORGANIQUE AVEC DU COLLAGENE HYDROLYSE 110
7.3 DOPAGE ORGANIQUE AVEC DES ANTIOXYDANTS 115
CHAPITRE 8 RENFORCEMENT DES PROPRIETES MECANIQUES **119**
8.1 MELANGE DE POLYMERES 120
8.2 COUPLAGE ORGANIQUE-INORGANIQUE 122
8.3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 130
CHAPITRE 9 MISE EN FORME DES SCAFFOLDS PAR IMPRESSION 3D **133**
9.1 MOULE NEGATIF FABRIQUE PAR IMPRESSION 3D 133
9.2 IMPRESSION 3D A PARTIR DE FIL HYBRIDE 137
9.3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 141

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 143

PRODUCTION SCIENTIFIQUE 146

BIBLIOGRAPHIE 147

Introduction

L'accroissement de l'espérance de vie s'accompagne d'une détérioration de l'état de santé général des seniors et d'une recrudescence des maladies chroniques. Parmi les manifestations de la sénescence, l'atteinte de l'appareil locomoteur est particulièrement invalidante et accélère considérablement l'entrée en dépendance. C'est également le cas chez les plus jeunes lors d'atteintes traumatiques ou pathologiques. Ainsi, au niveau mondial 2,2 millions de greffes osseuses sont pratiquées chaque année, mais le taux de complications post-opératoires demeure élevé et est estimé à 15 % des interventions.

Ces faits dessinent les contours d'un enjeu sociétal majeur ; les matériaux d'origine animale posent des problèmes d'histocompatibilité, de pathogénicité et donc de rejet. C'est pourquoi les efforts de recherche ciblent prioritairement le développement de biomatériaux synthétiques aptes à promouvoir la régénération osseuse. Actuellement les principaux substituts osseux sur le marché sont les « céramiques » bioactives (phosphates de calcium, verres bioactifs) qui présentent comme caractéristiques d'être biocompatibles, de se lier spontanément aux tissus osseux, de promouvoir l'adhésion des cellules osseuses et enfin d'être biorésorbables. Cependant, malgré cet ensemble de caractéristiques très satisfaisantes, la fragilité de ces matériaux en limite les applications.

Pour pallier ce défaut, une solution ingénieuse est de s'inspirer de la structure particulière du tissu osseux. Celle-ci mêle intimement une phase inorganique, le minéral osseux constitué de cristaux d'apatite (phosphate de calcium résorbable), à une phase organique qui est majoritairement du collagène. De manière remarquable, une telle structure associe la rigidité de la partie inorganique à la ténacité des fibres de collagène. Pour obtenir des implants aux propriétés mécaniques proches du tissu osseux, la stratégie consiste donc à combiner céramiques bioactives et matière organique. À cette fin, l'équipe Biomatériaux du Laboratoire de Physique de Clermont (LPC) a récemment mis au point un procédé innovant qui permet la synthèse de matrices tridimensionnelles d'hybrides organique-inorganique à base de verre bioactif et de polymère biocompatible aux caractéristiques variées. Dans la continuité des travaux, il est alors question d'exploiter ce procédé afin de développer un substitut osseux hybride aux propriétés optimisées.

Le développement de biomatériaux se positionne à l'interface entre la science des matériaux, la biologie et la médecine, et il requiert une forte intrication de compétences multidisciplinaires et un décloisonnement des savoirs. C'est dans cet esprit qu'est née la collaboration entre l'équipe Biomatériaux du LPC, spécialisée dans l'élaboration et la caractérisation physico-chimique de substituts osseux, et l'équipe Alimentation et Santé Musculo-Squelettique de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Theix, spécialisée dans les processus biologiques du remodelage osseux. Le projet « Thématiques émergentes » financé par la région Auvergne et l'Europe (FEDER) a donné naissance à deux thèses, l'une au LPC et l'autre à l'INRA, étroitement liées de par leur objectif commun : parvenir à formuler un biomatériau aux propriétés optimisées pour les applications en régénération osseuse. La présente thèse expose l'étude du point de vue de la science des matériaux en se concentrant sur les aspects physico-chimiques.

La première partie de ce travail constitue les généralités. Pour commencer, elle présente plus en détail les substituts osseux et plus particulièrement ceux à base de verre bioactif. Elle décrit ensuite le protocole de synthèse des hybrides organique-inorganique développé antérieurement et leur élaboration sous forme de mousses macroporeuses. Pour finir, cette partie présente les méthodes de caractérisations employées pour évaluer le comportement physico-chimique des matériaux.

La deuxième partie retrace le développement et l'optimisation de matrices tridimensionnelles d'un hybride organominéral à base de verre bioactif. Il s'agit tout d'abord de sélectionner le polymère le plus adéquat pour la régénération osseuse, puis d'optimiser la synthèse (notamment la source de calcium), la structure macroporeuse et la proportion organique-inorganique. Cette partie se conclut sur les caractérisations *in vitro* du matériau final (propriétés physico-chimiques et biologiques) et sur ses performances *in vivo* suite à son implantation dans la calvaria de souris.

La troisième et dernière partie propose des pistes en vue d'améliorer encore les propriétés du matériau développé. Tout d'abord, l'ajout d'éléments thérapeutiques à faible dose (< 5 % massique du matériau) est envisagé afin d'augmenter son potentiel ostéogénique, c'est-à-dire sa capacité à stimuler la régénération osseuse. Dans la suite, différentes stratégies sont expérimentées pour tenter de renforcer ses propriétés mécaniques, comme l'ajout d'un polymère plus rigide ou bien l'établissement de liaisons covalentes entre les parties organiques et inorganiques. Pour conclure, la fin de la thèse exploite l'impression 3D en tant que nouveau procédé d'élaboration des mousses dans le but de faire varier la morphologie de la structure macroporeuse.

Partie I
Généralités et méthodes

CHAPITRE 1 LES SUBSTITUTS OSSEUX

1.1 Biomatériaux

1.1.1 Définition

Selon la Société Européenne des Biomatériaux, un biomatériau se définit comme « un matériau non-vivant utilisé dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques » [1]. Cette définition met en avant une notion de contact entre ces matériaux et les tissus ou fluides du vivant. Un tel contact est évidemment présent entre les implants et les tissus hôtes, mais aussi entre le matériel utilisé dans l'hémodialyse et le sang, ou encore entre les lentilles de contact et la cornée.

Le biomatériau étant en contact avec le vivant, il découle une notion de biocompatibilité. La biocompatibilité, à l'origine définie comme les propriétés que le matériau ne doit pas avoir (pas de réaction inflammatoire, pas de toxicité), est plus récemment définie comme « la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique » [2]. Ce changement de définition traduit une évolution du mode de pensée. Alors qu'autrefois les biomatériaux étaient conçus de façon à être le plus inerte possible, aujourd'hui ils visent à engendrer des réponses bénéfiques de la part du vivant. C'est par exemple le cas des sutures résorbables pour lesquelles la réaction inflammatoire participe à la résorption, ou des matériaux ostéoinducteurs qui stimulent l'activité des cellules osseuses *via* le relargage d'éléments d'intérêt (ions ou protéines présentant un potentiel ostéogénique).

De nombreux domaines médicaux nécessitent l'usage de biomatériaux, tels que l'odontologie, l'orthopédie et la chirurgie cardiovasculaire. Le cahier des charges varie fortement selon le domaine et l'application, et il en résulte un catalogue de biomatériaux très diversifié. On y retrouve les greffes animales et humaines mais aussi les grandes familles de matériaux, à savoir les métaux (titane), les céramiques (alumine, zircone), les polymères (acides polylactique) et les composites. Lors de la conception d'un nouveau matériau, il est primordial de prendre en compte l'application visée étant donné qu'elle va dicter les propriétés recherchées et donc la stratégie de développement à adopter. Dans le cadre de ce travail de thèse, l'application visée est le comblement osseux.

1.1.2 Comblement osseux

Le tissu osseux se renouvelle à raison de 10 % par an [3, 4] grâce à l'activité des cellules osseuses, les ostéoclastes qui résorbent l'os mature et les ostéoblastes qui synthétisent l'os. Le renouvellement de l'os permet d'assurer le maintien de ses propriétés mécaniques. De même, lorsqu'un défaut osseux est créé suite à un trauma ou à une opération chirurgicale, les ostéoblastes régénèrent l'os. C'est le cas des fractures [5], pour lesquelles le soin consiste à garder le membre en place au moyen d'un plâtre. Cependant, lorsque le défaut osseux est trop large, la régénération n'est pas possible. La taille critique des défauts dépend de l'os atteint et du patient. Les défauts de taille critique peuvent être traités en comblant la cavité avec un matériau sous forme de granules ou de matrice poreuse, appelé substitut osseux. Le substitut osseux sert de support aux cellules et permet

ainsi la reconstruction de l'os dans le volume du défaut. Cette capacité du matériau à guider la repousse osseuse est appelée ostéoconduction [6].

Le comblement osseux est principalement utilisé en chirurgie dentaire et en chirurgie orthopédique avec plus de deux millions de greffes par an dans le monde [7]. Un cas clinique fréquent est une perte osseuse au niveau de la mâchoire suite à l'extraction d'une dent (**Figure 1**). Le nouvel implant dentaire est une vis que le chirurgien va insérer dans le maxillaire ou la mandibule, il est donc nécessaire de régénérer l'os au préalable. L'opération consiste d'abord à combler la cavité avec un substitut osseux, puis à attendre quelques mois – le temps que l'os se régénère – et enfin à implanter la vis sur laquelle sera fixée une prothèse dentaire.

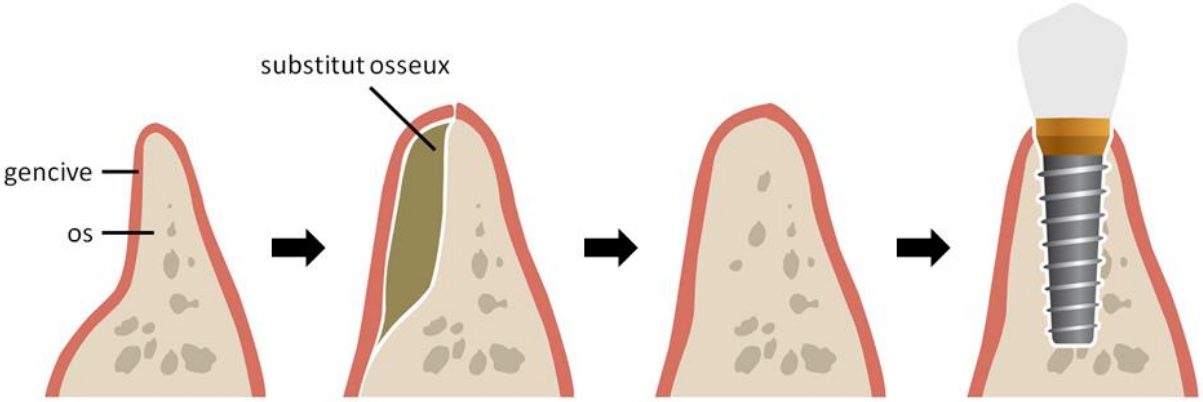


Figure 1. Exemple de comblement osseux en implantologie dentaire.

Le comblement osseux n'est pas une application récente puisque la première opération connue remonte à 1892 avec l'implantation de sulfate de calcium par Dressmann [8]. Aujourd'hui, le marché est bien développé avec plusieurs dizaines de substituts osseux commercialisés [9]. La nécessité d'augmenter les performances en termes de régénération osseuse des substituts osseux fait que la recherche ne cesse de croître dans ce domaine.

Les substituts osseux peuvent être d'origine humaine, animale ou synthétique. Les greffes d'os humain (allogreffe) ou d'os animal traité (xénogreffe) sont sujettes à des incompatibilités donneur-receveur et à la transmission d'agents pathogènes qui sont à l'origine d'un taux de rejet de 15 % [10]. L'autogreffe, qui consiste à prélever de l'os du même patient (généralement au niveau de la crête iliaque), ne présente pas de risque de rejet et est pour cette raison considérée comme la solution idéale [11]. En revanche, l'autogreffe nécessite une double-opération (pour prélever puis implanter) qui augmente le risque d'infection et elle n'est pas toujours envisageable étant donné la quantité limitée de greffon prélevable. C'est pourquoi les chirurgiens se tournent de plus en plus vers des matériaux synthétiques ne présentant pas de risque de rejet et disponibles à profusion [12]. Parmi les substituts osseux d'origine synthétique, on peut notamment citer les phosphates de calcium tels que l'hydroxyapatite et le phosphate tricalcique, et également les verres bioactifs qui font l'objet de cette thèse.

1.2 Bioverres

1.2.1 Bioverres

Les verres bioactifs ou bioverre sont des substituts osseux utilisés principalement en chirurgie dentaire et en chirurgie orthopédique. Développés pour la première fois en 1969 par Larry Hench [13], ils ont été commercialisés rapidement, d'abord sous forme de monolithes (MEP®, 1985) puis sous forme de granules (PerioGlas®, 1993). Aujourd'hui, le marché des bioverres est estimé à plus de 200 millions d'euros. Le succès des bioverres s'explique par les propriétés remarquables qu'ils possèdent : ils sont bioactifs, ils se résorbent au fur et à mesure que l'os repousse et leurs produits de dissolution stimulent les cellules osseuses au niveau génétique [14].

Le terme « bioactivité » désigne la capacité d'un matériau à se lier intimement aux tissus hôtes. Cette définition est à ne pas confondre avec celle utilisée en pharmacologie où le terme bioactif désigne la capacité d'une substance à engendre une réponse cellulaire. L'ancrage fort de l'implant permet d'assurer sa stabilité et réduit le risque de rejet ou de migration de l'implant dans le corps du patient. Dans le cas des bioverres, la création d'une interface stable et continue avec les tissus osseux se fait en deux étapes [15]. Tout d'abord, il se forme en surface du verre une couche phosphocalcique de composition analogue à la phase minérale de l'os. Cette apatite permet ensuite l'adsorption de protéines et l'adhésion de cellules qui prolifèrent, se différencient puis secrètent du collagène. L'incorporation des fibrilles de collagène dans la couche d'apatite croissante donne une microstructure similaire à celle de l'interface ligament-os, ce qui explique l'intégration importante des bioverres au sein des tissus osseux hôtes.

La transformation du bioverre en apatite est purement physico-chimique et ne fait pas intervenir de cellules. Elle est de fait observée lors de l'immersion de bioverres dans un milieu de culture acellulaire. Le mécanisme de formation de l'apatite a été proposé par Hench pour le bioverre originel Bioglass® 45S5 (composition massique 45 % SiO_2 - 24,5 % CaO - 24,5 % Na_2O - 6,0 % P_2O_5) [16], mais il est néanmoins adaptable à la majorité des matériaux bioactifs. De manière simple, lorsque le verre est mis au contact d'un fluide physiologique, les ions alcalins et alcalino-terreux (Na^+ et Ca^{2+}) présents en surface du verre sont échangés avec les ions H^+ du milieu (**Figure 2-A**). Cela entraîne localement une augmentation du pH et une modification de la composition chimique du milieu qui devient thermodynamiquement favorable à la précipitation d'apatite. De plus, l'augmentation du pH conduit à la rupture des liaisons Si-O-Si du réseau vitreux par hydrolyse. Le réseau silicate se dissout alors sous forme d'espèces solubles $SiO_x(OH)_{4-x}^{x-}$ (**Figure 2-B**) qui, peu stables à des concentrations élevées, se condensent et repolymérisent (**Figure 2-C**). Il se forme ainsi une couche de silice hydratée en surface du verre qui favorise la nucléation d'apatite. Finalement, des germes d'apatite se forment et croissent spontanément en consommant les ions Ca^{2+}, PO_4^{3-}, HPO_4^{2-} et OH^- du milieu et/ou du matériau (**Figure 2-D**). Il est à noter que, tout comme pour le minéral osseux, l'apatite formée peut incorporer d'autres ions présents dans le milieu : les cations tels que Mg^{2+}, Na^+ ou encore Sr^{2+} peuvent se substituer aux ions Ca^{2+}, et les carbonates CO_3^{2-} peuvent se substituer aux anions phosphates ou OH^-.

La bioactivité d'un verre dépend essentiellement de sa composition. Le verre bioactif 45S5 est préparé par la fusion à 1000°C de quatre oxydes différents, à savoir SiO_2, P_2O_5, Na_2O et CaO. La silice est un formateur de réseau, elle structure le verre via un assemblage désordonné de tétraèdres

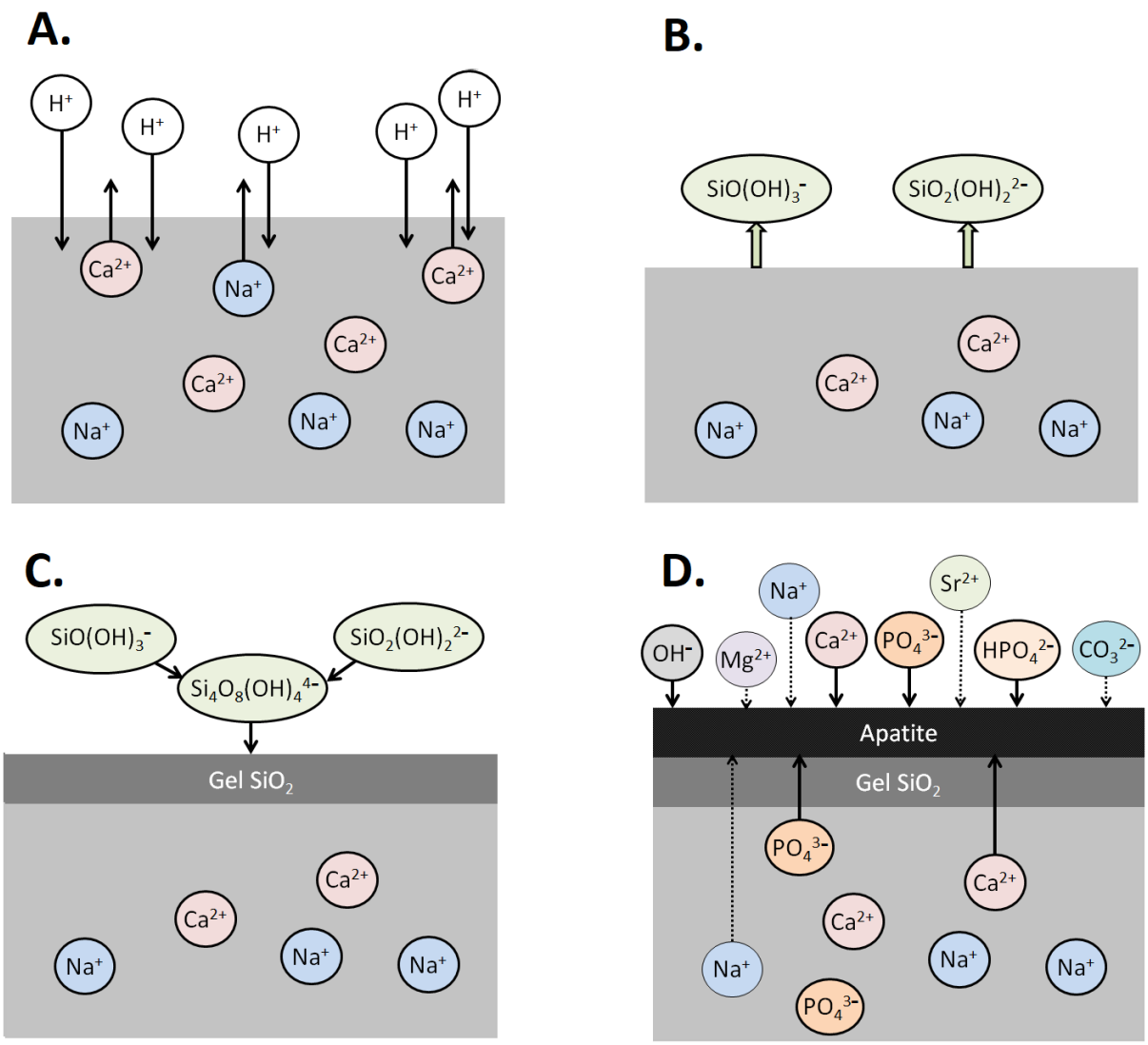


Figure 2. Mécanisme de formation de l'apatite en surface d'un verre bioactif.

[SiO_4] liés entre eux par des ponts siloxanes Si-O-Si (**Figure 3**). Les oxydes Na_2O et CaO sont des modificateurs de réseau, ils s'incorporent au réseau vitreux par des liaisons ioniques $Si\text{-}O^{-}\,{}^{+}Na$ et $Si\text{-}O^{-}\,{}^{+}Ca^{+}$ qui affaiblissent la connectivité entre tétraèdres (**Figure 3**). Cela a pour effet de diminuer la cohésion du verre qui devient sujet à la corrosion en milieu aqueux. Dans le cas des bioverres, cette capacité à se dissoudre est recherchée car elle est un élément clé du processus de bioactivité (**Figure 2-B**). D'où l'importance de la composition : lorsque le verre contient plus de 60 % de SiO_2, le degré de connectivité du réseau silicate est élevé, le verre est peu soluble et il n'engendre pas la formation d'apatite [17]. De même, les teneurs en Na_2O et CaO doivent être élevées car ces oxydes perturbent le réseau vitreux et augmentent sa solubilité, permettant ainsi la formation d'apatite.

Dans les années 1990 apparaît un procédé d'élaboration des verres alternatif à la fusion d'oxydes [18]. Il s'agit du procédé sol-gel, qui permet l'élaboration de matrices amorphes d'oxydes (gels) dans des conditions douces : température ambiante, pression atmosphérique, milieux aqueux ou hydro-alcoolique. Le verre est synthétisé grâce à une suite de réactions chimiques impliquant des précurseurs moléculaires (souvent des alcoxydes) ou des sels (nitrates par exemple). On parle aussi de chimie douce [19]. Tout d'abord, l'alcoxyde $Si(OR)_4$ subit une hydrolyse (**équation 1**), puis les produits d'hydrolyse vont se condenser (**équations 2 et 3**), créant ainsi des ponts siloxanes Si-O-Si. La

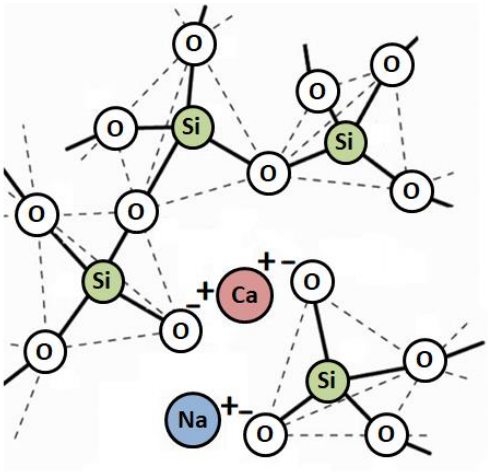


Figure 3. Réseau silicate d'un verre incorporant des cations modificateurs de réseau.

condensation progresse et induit la formation d'un réseau silicate tridimensionnel qui emprisonne le solvant. Lorsque le réseau s'étend à l'ensemble de la solution appelée « sol », cette dernière se fige (sa viscosité tend vers l'infini) et on parle alors de « gel ». Le solvant contenu dans le gel (eau/alcool) est ensuite éliminé par séchage, conduisant ainsi à l'obtention du verre. Le verre peut aussi être densifié par traitement thermique à 700°C.

$$Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow HO–Si(OR)_3 + ROH \quad \textbf{(1)}$$

$$(RO)_3Si–OH + HO–Si(OR)_3 \leftrightarrows (RO)_3Si–O–Si(OR)_3 + H_2O \quad \textbf{(2)}$$

$$(RO)_3Si–OR + HO–Si(OR)_3 \leftrightarrows (RO)_3Si–O–Si(OR)_3 + ROH \quad \textbf{(3)}$$

Dans l'optique d'obtenir des verres bioactifs, des ions modificateurs de réseau (Ca^{2+}, Na^{+}) peuvent être simplement ajoutés au sol en vue que le réseau silicate polymérise autour d'eux : l'établissement de liaisons ioniques $Si\text{-}O^{-+}Ca$ par attraction électrostatique signe leur incorporation au réseau silicate. En terme de structure et de bioactivité, les verres synthétisés par voie sol-gel diffèrent radicalement des verres élaborés par fusion. D'une part, ils contiennent de nombreux silanols résiduels Si-OH qui ne se sont pas condensés, et ce même s'ils ont subi un traitement thermique. Ils possèdent donc un degré de connectivité plus faible. D'autre part, ils ont une porosité de l'ordre du nanomètre, ce qui leur confère une surface d'échange plus étendue avec le milieu (typiquement plusieurs centaines de m^2/g contre quelques m^2/g pour les verres fusion) [20]. Ces deux aspects structurels impliquent une plus grande solubilité des verres obtenus par chimie sol-gel et par conséquent une gamme de compositions bioactives plus étendue. En effet, la chimie douce permet l'élaboration de verres bioactifs de compositions plus simples SiO_2-CaO-P_2O_5 ou SiO_2-CaO pouvant contenir jusqu'à 90 % de SiO_2 (au lieu de 60 % pour les verres fusion) [21]. La chimie douce permet en outre diverses mises en forme : nanoparticules, microparticules, fibres, couche mince ou monolithe.

Que ce soit pour les verres obtenus par fusion ou par chimie sol-gel, il est également possible d'incorporer des ions possédant une activité biologique. Lorsque le verre est immergé dans un fluide physiologique, il se dissout et les ions qu'il libère en solution induisent une réponse biologique spécifique. Grâce à un dopage inorganique, il est ainsi possible d'apporter de nouvelles propriétés aux verres, telles que des propriétés antibactériennes (Ag^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}), anti-inflammatoires (Zn^{2+}, Sr^{2+}), angiogéniques (Cu^{2+}, B^{3+}, Co^{2+}) et ostéogéniques (Zn^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Cu^{2+}, B^{3+}) [22, 23].

1.2.2 Scaffolds

Les verres bioactifs sont commercialisés sous forme de monolithes et de granules mais pas sous forme de mousse. Les mousses, plus communément dénommées scaffolds, sont des structures macroporeuses interconnectées qui visent à imiter celle de l'os spongieux (**Figure 4**). Dans la médecine régénérative, ce type de structure présente deux avantages majeurs. Le premier est la stabilité dimensionnelle de l'implant, qui fait parfois défaut aux biomatériaux particulaires : dans certains cas cliniques, des matériaux de fixation additionnels sont requis pour stabiliser les granules « libres » qui ont tendance à quitter le site d'implantation. Au contraire, les scaffolds et les monolithes sont stables et restent localisés au site où ils sont implantés, à condition qu'ils y supportent les contraintes mécaniques. Le deuxième avantage est la promotion de la néovascularisation (angiogenèse) et de la néoformation osseuse (ostéogenèse). En effet, la structure interconnectée de la mousse permet la colonisation cellulaire, la création de nouveaux vaisseaux sanguins et la formation d'os dans l'ensemble du volume de l'implant. Dans le cas des monolithes, la régénération osseuse est limitée à la périphérie de l'implant puis progresse de façon centripète au fur et à mesure que le verre se résorbe. Elle est donc hétérogène et significativement plus lente. Dans le cas des particules, l'espace inter-granulés permet la colonisation cellulaire et ainsi la reconstruction osseuse dans le volume de l'implant. Néanmoins, il est nécessaire d'utiliser une membrane pour garder les granules en place et éviter qu'ils ne quittent le site d'implantation. L'élaboration de scaffolds macroporeux constitue donc un aspect physique avantageux dans la conception des substituts osseux de demain [24, 25].

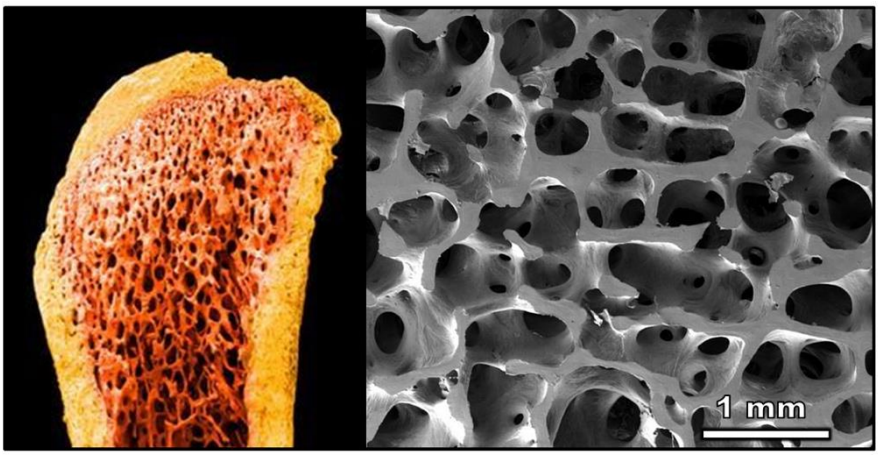


Figure 4. Coupe de l'épiphyse d'un os long humain (à gauche) et cliché MEB de l'os trabéculaire humain.

Bien que les scaffolds de bioverre ne soient pas encore disponibles commercialement, les études portant sur leur élaboration sont largement présentes dans la littérature. Il ressort notamment trois techniques de fabrication : le moussage [26, 27], l'empreinte sacrificielle [28, 29] et l'impression 3D [30, 31] (**Figure 5**). Toutes ces techniques utilisent soit une barbotine, c'est-à-dire un mélange d'eau et de poudre fine de bioverre synthétisée par fusion ou par sol-gel, soit le sol de bioverre directement. Le moussage consiste à introduire des bulles d'air dans la solution (barbotine ou sol) à l'aide d'une agitation vigoureuse et d'un tensioactif. L'émulsion est ensuite figée par polymérisation *in situ* de monomères dans le cas de la barbotine, ou par gélification suite aux réactions de condensation dans le cas du sol. L'empreinte sacrificielle consiste à générer la porosité grâce à un polymère qui est ensuite éliminé par traitement thermique ou par dissolution. Il peut s'agir de billes en polymère mélangées à la solution ou d'une mousse en polymère imprégnée de la

solution. Et enfin, l'impression 3D consiste à construire le scaffold couche par couche en déposant la solution au moyen d'une buse d'extrusion. Le déplacement de la buse est contrôlé par l'ordinateur et la structure poreuse est préalablement dessinée par CAO (conception assistée par ordinateur).

Les matériaux obtenus par ces trois méthodes de fabrication sont extrêmement fragiles et nécessitent un traitement thermique à 700°C, soit pour fusionner les grains de bioverre dans le cas de la barbotine, soit pour densifier le réseau silicate dans le cas du sol. Après ce traitement thermique, les scaffolds de bioverre ont des propriétés mécaniques similaires à celles de l'os trabéculaire, pour des porosités allant de 50 % jusqu'à plus de 90 %. Plus précisément, sur des essais en compression, la contrainte à la limite d'élasticité et le module d'Young sont identiques à ceux de l'os trabéculaire. Cependant, plus que toute céramique, le bioverre est intrinsèquement fragile et résiste très peu à la propagation de fissures. Cela signifie que les scaffolds de bioverre ne sont pas

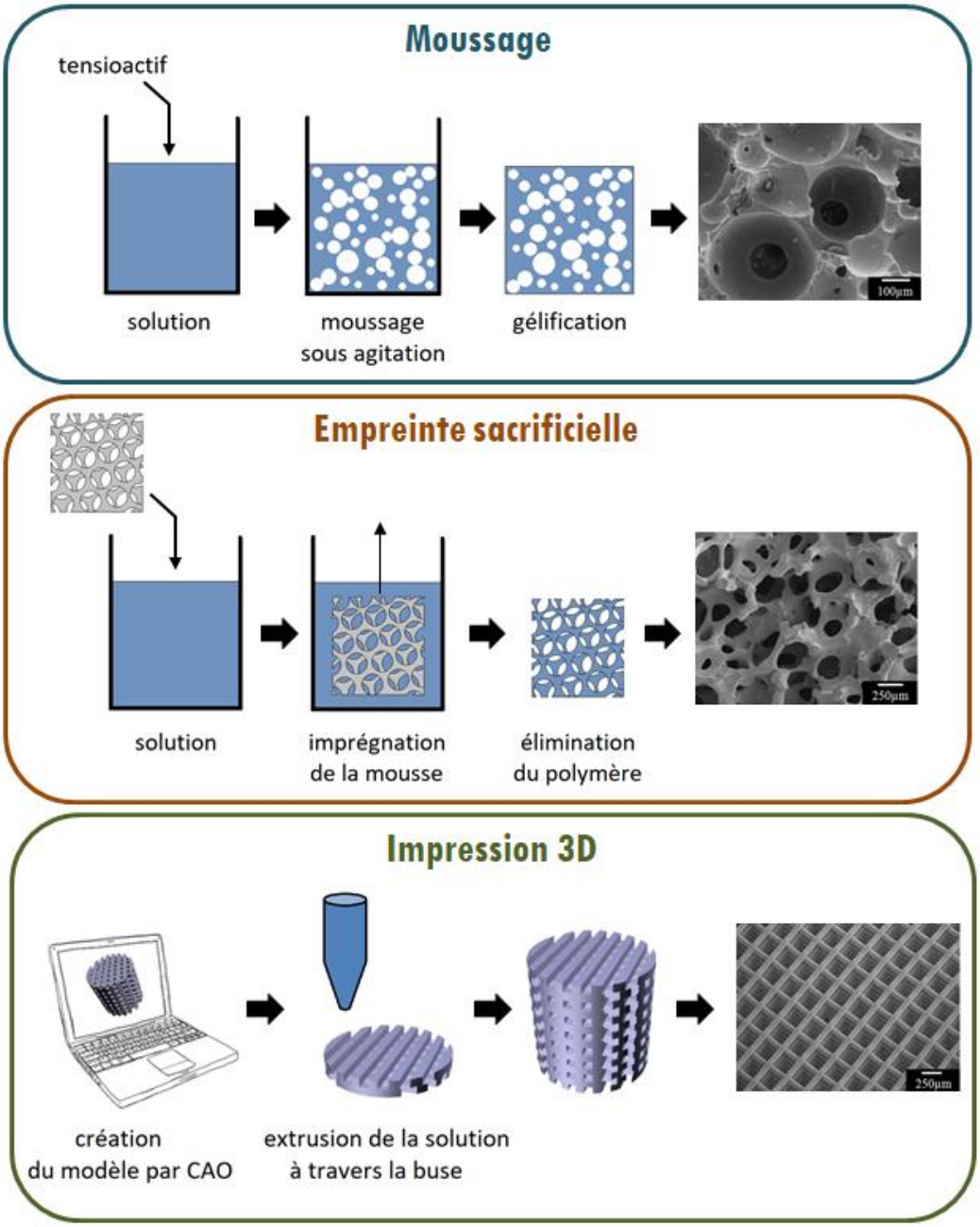


Figure 5. Quelques techniques de fabrication de mousses de verre bioactif.

adaptés à des sites d'implantation soumis à des charges cycliques [32]. Or, la plupart des os sont soumis à ce type de contraintes mécaniques, ce qui réduit fortement le potentiel d'utilisation des scaffolds de bioverre. Afin de pallier cette fragilité, le bioverre sous forme de poudre peut être dispersé dans une matrice polymère qui introduit de la plasticité au matériau. On parle de composites – ou nanocomposites quand les particules de bioverre sont nanométriques.

1.2.3 Composites

Les matériaux composites allient la bioactivité du verre à la ténacité du polymère. Ils consistent généralement en une dispersion de particules de bioverre, synthétisées par fusion ou par sol-gel, dans une matrice polymère (**Figure 6, à gauche**). Le polymère choisi doit évidemment être biocompatible et avoir un comportement plastique, mais il doit également se dégrader à une vitesse appropriée pour le comblement osseux. En effet, le scaffold sert de support à la repousse osseuse et ne doit donc pas être résorbé avant un stade avancé du processus de régénération osseuse. Idéalement, il doit se dégrader à la même vitesse que l'os se régénère.

L'élaboration de composites bioverre-polymère semble relativement simple à mettre en œuvre ; néanmoins, un certain nombre de difficultés émergent [23]. En premier lieu, la dispersion de particules est hétérogène, ce qui engendre une hétérogénéité de la bioactivité et des propriétés mécaniques. En particulier, dans ces composites la formation d'apatite est localisée sur les particules de bioverre qui dépassent de la surface (**Figure 6**), mais il est difficile de contrôler cette proéminence des particules. Un autre sujet de préoccupation concerne l'absence d'interaction chimique forte entre les deux phases. La faible cohérence de l'interface verre-polymère peut causer le détachement des particules émergentes, et la surface du composite ne permet alors plus la nucléation d'apatite. Ce phénomène est accentué par la dissolution des deux phases, les particules de bioverres ne « logeant » plus dans le polymère. Dans le cas des nanocomposites, la migration de nanoparticules de bioverre *in vivo* est bien plus problématique car celles-ci peuvent avoir des effets toxicologiques [33, 34].

Bien que le problème de détachement des particules puisse être résolu par l'établissement de liaisons covalentes entre les deux phases au moyen d'un agent couplant [35, 36], l'obtention de composites homogènes demeure complexe. Dans le but de remédier à cette hétérogénéité, une famille de composites est considérablement étudiée depuis une dizaine d'années. Il s'agit des nanocomposites IPN (InterPenetrated Networks), aussi appelés hybrides.

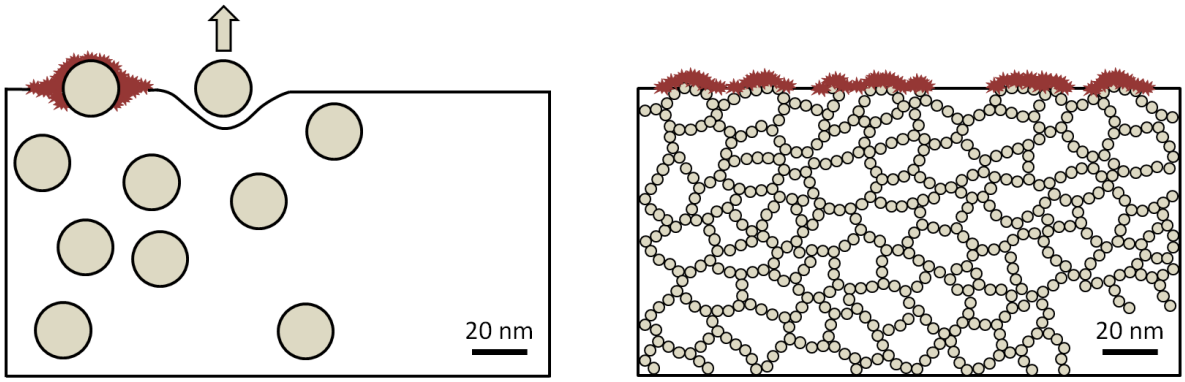


Figure 6. Schéma structural d'un nanocomposite (à gauche) et d'un hybride (à droite). L'apatite est représentée en rouge.

1.3 Hybrides

1.3.1 Hybrides et sol-gel

Dans les hybrides, la phase inorganique n'est pas constituée de nanoparticules, mais plutôt de chaînes de nanoparticules qui se relient pour former un réseau tridimensionnel (**Figure 6, à droite**). Dans l'idéal, on cherche à ce que les chaînes de bioverre soient entremêlées aux chaînes du polymère : ce type de matériaux est nommé IPN pour « InterPenetrated Networks ». L'obtention d'un réseau de bioverre est possible grâce au procédé sol-gel décrit dans la partie 1.2.1. Dans des conditions acides (plus exactement entre pH 2 et pH 7), le processus d'hydrolyse-condensation conduit à la formation de nanoparticules de SiO_2-CaO (ou SiO_2-CaO-P_2O_5) de 2 à 4 nm, qui s'agrègent ensuite pour former des chaînes puis un réseau [37]. Lorsque le réseau s'étend à l'ensemble du sol, ce dernier gélifie. La synthèse d'hybride se fait par l'ajout du polymère dissout avant gélification du sol (**Figure 7**).

Les hybrides s'affranchissent des problèmes récurrents des composites ou nanocomposites conventionnels (évoqués partie 1.2.3). L'interpénétration des phases à l'échelle moléculaire prodigue une grande homogénéité des propriétés et l'hybride est assimilable à une seule phase. Cela signifie notamment que l'intégralité de la surface de l'hybride permet la nucléation d'apatite.

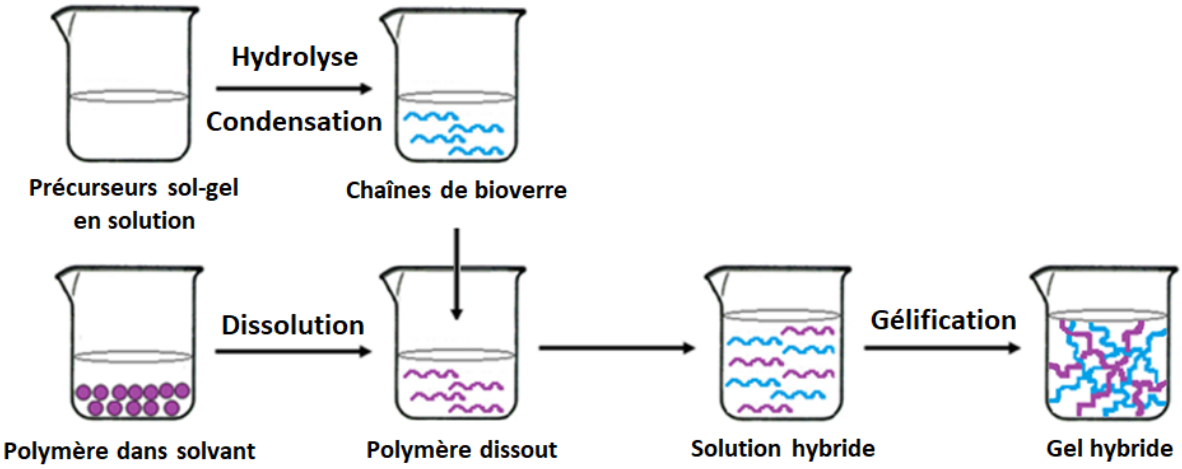


Figure 7. Synthèse d'un hybride organominéral à base de verre bioactif.

1.3.2 Couplage organique-inorganique

Les matériaux hybrides peuvent être séparés en plusieurs catégories : les hybrides de classe I dans lesquels les interactions entre les réseaux organique et inorganique sont faibles (liaisons hydrogène et forces de van der Waals) et les hybrides de classe II dans lesquels les réseaux sont liés de façon covalente (**Figure 8**) [38]. Les hybrides de classe II présentent un grand potentiel dans la régénération osseuse, car il est possible d'ajuster leurs propriétés mécaniques et leur vitesse de dégradation à l'application visée grâce au contrôle du degré de couplage entre les réseaux [39].

La réticulation entre les chaînes de bioverre et les chaînes de polymère peut être réalisée au moyen d'un agent couplant de type organoalcoxysilane, *e.g.* glycidyloxypropyl-triméthoxysilane (GPTMS). La partie alcoxysilane -$Si(OR)_3$ se lie au bioverre par réactions sol-gel, tandis que le groupement organique se lie au polymère par addition nucléophile (par exemple, le groupement époxyde du GPTMS réagit avec les espèces nucléophiles -COOH ou -NH_2 du polymère) [40, 41].

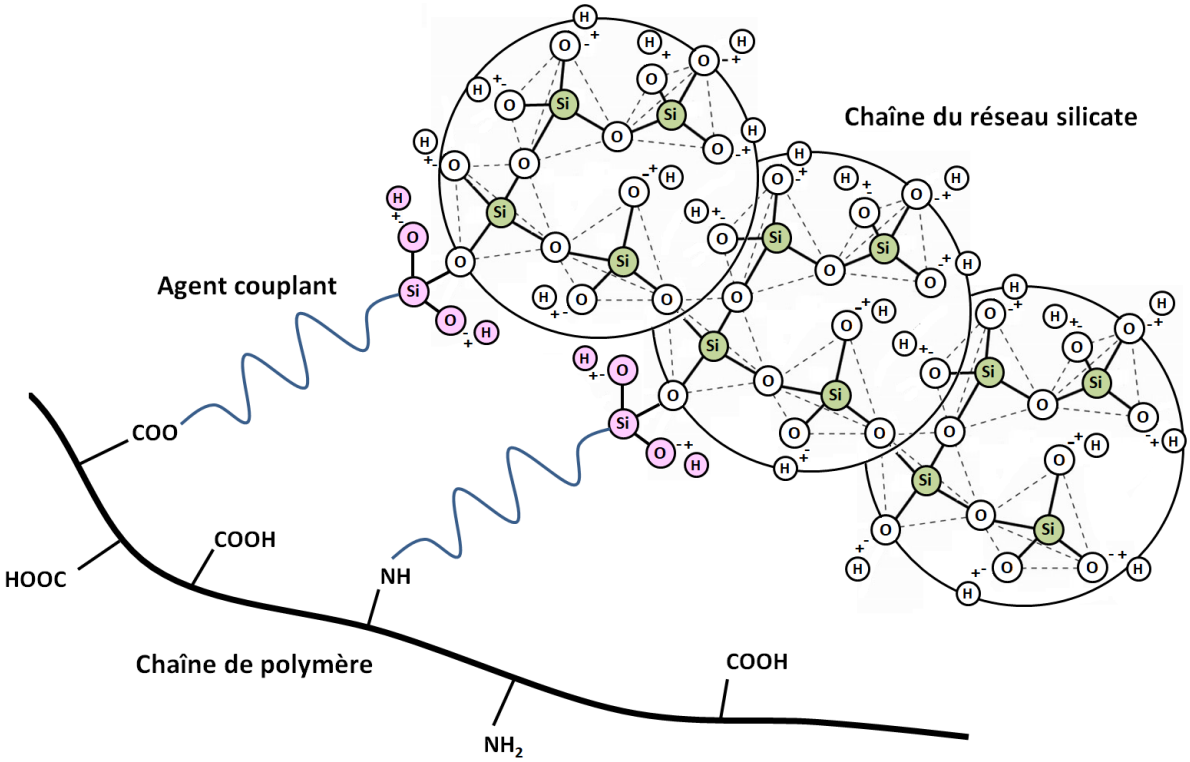


Figure 8. Réticulation entre chaînes organiques et inorganiques conduisant à un hybride de classe II.

Les polymères d'origine naturelle comme la gélatine et le chitosan contiennent de nombreux groupements nucléophiles le long de leur chaîne, ce qui permet un couplage considérable et ainsi un contrôle fin des propriétés de l'hybride [39, 42]. Cependant, outre l'autogreffe qui reste le substitut osseux de référence, l'industrie des substituts osseux se tourne de plus en plus vers les matériaux synthétiques qui, ne présentant pas de risque de transmission d'agents pathogènes, sont plus prompts à être autorisés sur le marché [9, 12].

Certains polymères synthétiques, comme par exemple le polycaprolactone, contiennent ce type de groupements nucléophiles, mais en faible quantité, le plus souvent situés en bout de chaîne. De ce fait, le couplage est extrêmement limité avec ces polymères. Dans ce cas, une solution est de réduire la longueur des chaînes du polymère afin d'augmenter la densité d'espèces nucléophiles et d'avoir ainsi un couplage plus conséquent entre réseaux organiques et inorganiques [43-45]. Cependant, le raccourcissement des chaînes du polymère affecte grandement les propriétés mécaniques et la vitesse de dégradation de l'hybride, qui est alors moins performant qu'un hybride de classe I. Finalement, bien qu'un hybride de classe II puisse être obtenu avec des polymères synthétiques, la quasi-absence de groupements nucléophiles dans la plupart ne permet pas un couplage important.

Dans le but d'élaborer des hybrides de classe II synthétiques et performants, il est devenu nécessaire de développer de nouveaux polymères synthétiques qui contiennent des espèces réactives dans leur motif de répétition et non uniquement en bout de chaîne. Une approche prometteuse consiste à introduire des unités monomériques telles que le (triméthoxysilyl)propyl méthacrylate dans la polymérisation radicalaire du polymère [46]. Cela conduit à un polymère contenant des alcoxysilanes $-Si(OR)_3$ le long de sa chaîne qui permettent l'établissement de ponts siloxanes Si-O-Si avec le bioverre. Le processus d'hydrolyse-condensation suffit alors à greffer le

polymère au bioverre et il n'est pas utile d'employer un agent couplant. Malheureusement, cette technique n'est applicable qu'aux polymères qui se synthétisent par polymérisation radicalaire, ce qui exclut la majorité des polymères biorésorbables tels que les polyesters.

1.3.3 Incorporation du calcium

Malgré l'intérêt grandissant porté aux hybrides organominéraux dans le domaine des biomatériaux, leur élaboration est délicate et constitue un véritable défi qui entrave leur développement.

Comme illustré **Figure 7**, les hybrides sont synthétisés en ajoutant le polymère sous forme solubilisée dans le sol de bioverre, avant que ce dernier ne gélifie. Les traitements thermiques à 700°C usuellement employés pour densifier le réseau vitreux (cf. partie 1.2.1) ne sont donc pas envisageables sous peine de détériorer la phase organique. Cela n'est *a priori* pas handicapant puisque cette densification avait pour but l'amélioration des propriétés mécaniques qui sont ici assurées par la matrice polymère.

Cependant, ces traitements thermiques ont une autre finalité : l'incorporation des ions calcium dans le réseau silicate. Le calcium est essentiel à la bioactivité du verre puisque son relargage initie le mécanisme de formation de l'apatite (cf. partie 1.2.1). Les précurseurs de calcium habituellement employés en sol-gel, $CaCl_2$ et $Ca(NO_3)_2$, ne sont pas soumis aux réactions d'hydrolyse et de condensation (**équations 2 et 3**). Le calcium n'est donc pas intégré au réseau silicate : les sels de calcium sont simplement déposés sur le réseau de silice et ils sont alors susceptibles d'être lessivés au premier contact avec les fluides biologiques [47]. Avec ces sels, l'incorporation du calcium n'est possible que par diffusion thermique et décomposition du contre-ion à des températures supérieures à 400°C. Ces températures, bien qu'inférieures à celles requises pour la densification, ne sont pas compatibles avec l'élaboration d'hybrides.

L'incorporation du calcium est possible à température ambiante en utilisant des alcoxydes $Ca(OR)_2$ au lieu des sels $CaCl_2$ ou $Ca(NO_3)_2$. L'établissement de liaisons ioniques $Si\text{-}O^{-}\,{}^{+}Ca$ par voie chimique se fait alors dans des conditions douces en termes de température et de pression, grâce à l'absence d'un contre-ion fortement électronégatif du calcium (cas des sels de calcium) qui est le principal frein à la formation de celles-ci. Néanmoins, ces précurseurs sont très facilement sujets à l'hydrolyse à l'air ; malheureusement un état d'hydrolyse trop avancé du précurseur peut provoquer une gélification prématurée du sol de bioverre à cause de la brusque augmentation du pH due à la libération des hydroxyles OH^- du précurseur hydrolysé. Or, la gélification du sol doit être suffisamment lente pour autoriser l'introduction du polymère puis la mise en forme du matériau hybride. Avec ces alcoxydes, leur état d'hydrolyse (taux de conversion des -OR en -OH) avant utilisation doit être connu et maîtrisé, et la quantité d'eau introduite dans le sol doit par conséquent être limitée.

Alors que le procédé de synthèse d'un hybride interdit l'usage de traitement thermique, l'utilisation d'alcoxydes de calcium ajoute une nouvelle contrainte en limitant l'introduction d'eau. Ces deux contraintes restreignent le champ des possibilités quant à la fabrication de scaffolds décrite dans la partie 1.2.2. Par exemple, le procédé de moussage n'est plus envisageable car il nécessite une quantité d'eau non-négligeable pour que le tensioactif puisse engendrer une émulsion. Également, lorsqu'un polymère sacrificiel est utilisé pour générer la porosité, il ne peut pas être éliminé par

traitement thermique. Il peut toutefois être éliminé à l'aide d'un solvant à condition que ce dernier ne dissolve pas la partie organique de l'hybride.

Ces complications expliquent que la plupart des scaffolds d'hybrides étudiés dans la littérature ne fassent pas usage de ces alcoxydes. Soit ils ne contiennent pas de calcium et possèdent une bioactivité limitée [48-50], soit ils contiennent du calcium *via* l'usage de sels qui ne permettent pas son incorporation [50, 51]. Le risque dans ce cas est un relargage prématuré des ions calcium dès contact avec les fluides biologiques, provoquant un choc alcalin néfaste. Seulement quelques hybrides intègrent le calcium à leurs réseaux silicates, mais ils sont obtenus sous forme de monolithes [44, 52] ou de fibres [53]. Il existe un réel défi lié à la synthèse d'un hybride qui d'une part incorpore le calcium et d'autre part soit élaboré sous forme de scaffold.

CHAPITRE 2 SYNTHESE DE SCAFFOLDS D'HYBRIDE ORGANIQUE-INORGANIQUE A BASE DE BIOVERRE

Dans cette partie, la synthèse de scaffolds d'hybride à base de bioverre est décrite. L'aspect novateur du protocole réside dans l'incorporation du calcium au sein du réseau silicate de scaffolds d'hybride. Bien que plusieurs travaux scientifiques soient déjà parvenus à incorporer le calcium [44, 52, 53], aucun des hybrides obtenus n'a pu être élaboré sous forme de scaffold (cf. partie 1.3.3). Ce protocole, développé en 2015 par l'équipe, représente de fait une avancée majeure dans le domaine des verres bioactifs. Il fait d'ailleurs l'objet de deux brevets internationaux délivrés en 2018 [54, 55].

La totalité du procédé se déroule à température ambiante afin de préserver l'intégrité de la phase organique. Une solution hybride est d'abord synthétisée par chimie sol-gel (cf. partie 1.3.1, **Figure 7**) et les scaffolds sont ensuite fabriqués à partir de cette solution par une technique d'empreinte sacrificielle (cf. partie 1.2.2).

2.1 Synthèse d'un sol hybride

Comme illustré sur la **Figure 7**, la synthèse d'une solution hybride consiste à préparer en parallèle un sol de bioverre et une solution du polymère, puis à les mélanger de sorte à obtenir après gélification un enchevêtrement des réseaux organique et inorganique.

2.1.1 Sol de bioverre

Le système binaire SiO_2-CaO est préféré au système ternaire SiO_2-CaO-P_2O_5 par souci de simplicité du procédé. Contrairement au calcium dont le relargage initie le mécanisme de précipitation de l'apatite (cf. partie 1.2.1, **Figure 2**), le phosphore n'est pas indispensable à la bioactivité du verre. Certes, des études montrent une formation d'apatite *in vitro* plus rapide sur des verres contenant du phosphore [56, 57], suggérant ainsi une plus grande bioactivité, mais la vitesse de formation de l'apatite sur des verres SiO_2-CaO est plus que suffisante pour supposer leur caractère bioactif. Le système binaire est donc choisi afin de limiter le nombre de réactifs et de simplifier la synthèse. Plus précisément, en accord avec une étude comparative sur les bioverres binaires [58], la composition massique 75 % SiO_2 - 25% CaO est choisie pour sa capacité à induire la formation rapide d'apatite et pour son excellent comportement *in vitro* et *in vivo* observé dans des essais d'implantation [59, 60].

Les précurseurs employés dans cette synthèse sont le tétraéthylorthosilicate $Si(OEt)_4$ (TEOS) pour le silicium et l'éthoxyde de calcium $Ca(OEt)_2$ (CE) pour le calcium. Si le TEOS est couramment utilisé en chimie sol-gel, le CE n'est pas un choix anodin puisque, comme mentionné partie 1.3.3, les alcoxydes de calcium autorisent l'intégration du calcium dans le réseau silicate à température

ambiante. De plus, le CE est préféré au méthoxyéthoxyde de calcium (CME) utilisé dans les publications de référence [47, 53, 61, 62] à cause de la toxicité du groupement alkoxy (éthoxy EtO^- avec CE, contre méthoxyéthoxy $CH_3OC_2H_4O^-$ avec CME). Si la fonction correspondante subsiste dans le matériau final, il est préférable d'utiliser le CE pour limiter un potentiel effet cytotoxique des sous-produits issus de la dégradation du matériau, l'éthanol étant ainsi nettement moins nocif que le méthoxyéthanol.

La synthèse du sol de bioverre est schématisée **Figure 9**. Le TEOS et le CE ont des réactivités diamétralement opposées : l'hydrolyse du TEOS est lente tandis que celle du CE est rapide. Pour cette raison, les précurseurs ne sont pas hydrolysés simultanément. Dans un premier temps, le TEOS est hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 2 mol/L. L'acide permet de catalyser l'hydrolyse du TEOS (celle-ci prend plusieurs jours sans catalyseur). Dans un second temps, le CE est ajouté afin de subir son hydrolyse et permettre la condensation du réseau silicate autour des ions calcium. Il est à noter que le CE se présente sous forme de poudre et qu'il a tendance à s'agglomérer, conduisant alors à un gel hétérogène. Afin d'éviter la formation de paquets, le précurseur de calcium est partiellement dissout et dispersé dans l'éthanol avant son ajout.

Avec un protocole similaire, Poologasundarampillai *et al.* rapportent la gélification rapide du sol qu'ils attribuent à la réactivité de l'alcoxyde de calcium [52], sans en détailler le mécanisme. Ici, la quantité d'eau est extrêmement réduite (ratio molaire H_2O/TEOS de 2) et les précurseurs sont dilués dans l'éthanol de sorte à retarder la gélification qui a lieu environ 2 heures après l'ajout du CE. Ce temps de gel permet l'obtention d'un sol de bioverre homogène (dissolution complète du CE après environ 1 heure), la réalisation du sol hybride (par ajout du polymère dissout) et sa mise en forme.

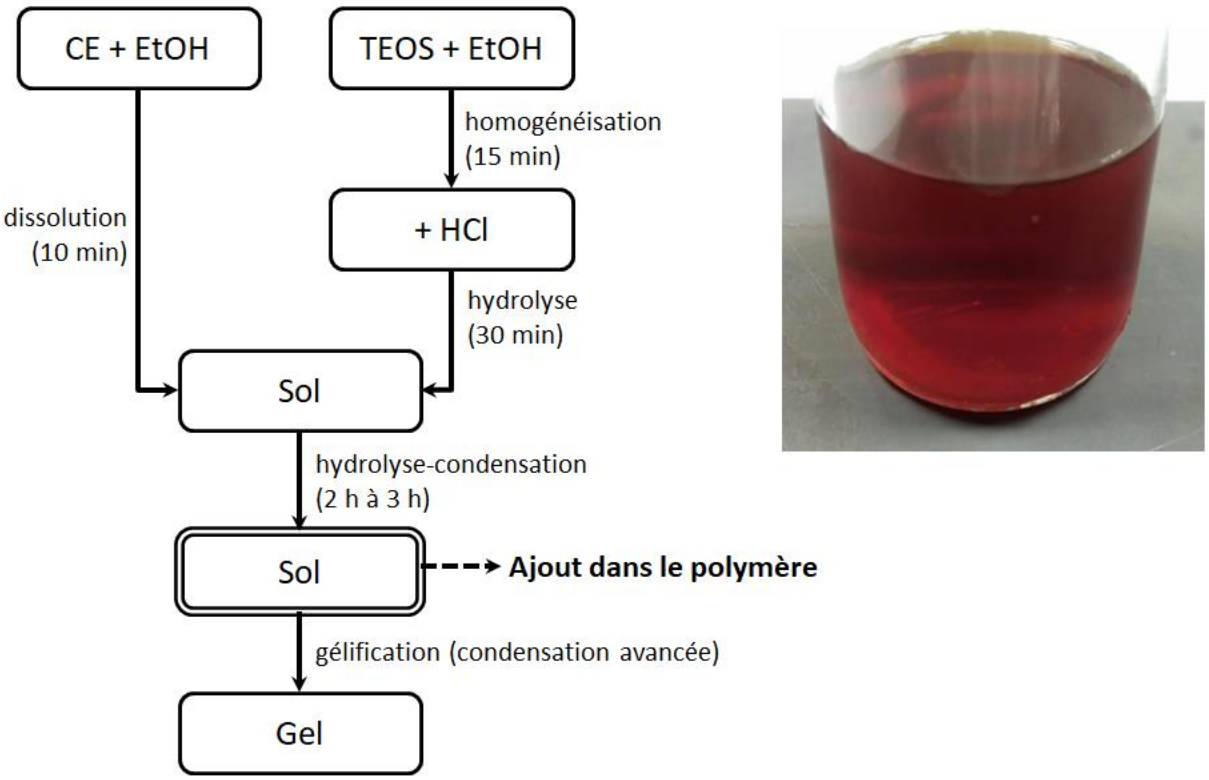


Figure 9. Synoptique de la synthèse de bioverre SiO_2-CaO (à gauche) et sol de bioverre (à droite).

2.1.2 Dissolution du polymère et sol hybride

Ce protocole est adapté à la majorité des polymères biorésorbables, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, et le cas général sera discuté ici.

Parallèlement à la synthèse du sol de bioverre, une solution du polymère est préparée (ces deux solutions sont destinées à être mélangées en vue d'obtenir le sol hybride). Le polymère est solubilisé dans un solvant qui doit répondre à un certain nombre de critères. Outre sa capacité à dissoudre le polymère, il doit être miscible avec l'éthanol qui est le principal constituant du sol de bioverre. Employer un solvant qui n'est pas miscible avec l'éthanol conduira inévitablement à un sol hybride biphasique. De plus, le bioverre et le polymère doivent être solubles dans le mélange solvant-éthanol du sol hybride. Par exemple, l'eau est souvent utilisée pour dissoudre les polymères naturels, mais l'ajout d'eau dans le sol de bioverre modifie le ratio molaire H_2O/TEOS, connu pour conditionner la cinétique de la réaction d'hydrolyse, ainsi que le pH, dont dépendent les réactions d'hydrolyse et de condensation [37]. Le résultat est la précipitation prématurée de particules de bioverre (**Figure 10, à gauche**) (gel colloïdal) ; il ne s'agit alors plus d'un hybride mais plutôt de particules dispersées dans un polymère, ce qui s'apparente à un composite. Autre exemple, les polymères sélectionnés pour l'ingénierie tissulaire osseuse sont rarement solubles dans l'éthanol ; ajouter le sol de bioverre au polymère solubilisé peut ainsi causer la reprécipitation du polymère. Pour résumer, l'étape de dissolution joue un rôle déterminant dans l'homogénéité du sol hybride. Elle est pour cela bien plus complexe que la simple solubilisation du polymère : d'une part le solvant doit être choisi avec précaution (miscible avec éthanol, préférentiellement anhydre), d'autre part son volume doit être ajusté tel que le polymère et le bioverre soient solubles dans le mélange solvant-éthanol.

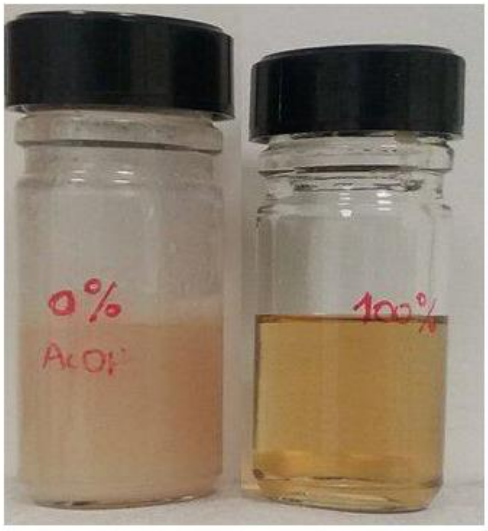


Figure 10. Solutions d'hybride gélatine-bioverre. La gélatine est préalablement dissoute dans l'eau (à gauche) ou dans l'acide acétique (à droite). L'eau provoque la précipitation de particules de bioverre, ce qui conduit à un sol hybride blanc opaque hétérogène.

Il n'est pas rare que, même une fois ces critères pris en compte, le polymère reprécipite lors de l'ajout du sol de bioverre. Cela est dû à l'hétérogénéité initiale du système, l'éthanol et le solvant n'étant pas encore bien mélangés. Dans ce cas, quelques minutes sous agitation suffisent généralement à solubiliser de nouveau le polymère, et si le problème subsiste, quelques minutes sous ultrasons permettent finalement l'obtention d'un sol hybride homogène.

Le mélange du sol de bioverre avec le polymère dissout a pour conséquence de retarder la gélification. En effet, les espèces oligomériques sont diluées par ce mélange et l'établissement d'un réseau silicate tridimensionnel continu par hydrolyse-condensation des oligomères est ralenti. Ainsi, le temps de gel du sol hybride se compte en jours dans des conditions normales (température ambiante, à l'air, contenant fermé) au lieu de quelques heures pour le sol de bioverre. C'est pourquoi le mélange hybride est réalisé peu avant la gélification du sol de bioverre (**Figure 9**) : une fois le mélange réalisé, les réactions sol-gel sont quasiment à l'arrêt ; il est donc crucial d'atteindre une condensation avancée du réseau silicate au sein du sol de bioverre avant d'ajouter ce dernier au polymère solubilisé.

Dans leurs travaux, Poologasundarampillai *et al.* évoquent au contraire une gélification accélérée du sol hybride [52, 53]. Cela est lié à l'utilisation d'un agent couplant, le GPTMS (glycidyloxypropyl-triméthoxysilane), qui vise à établir des liaisons covalentes entre les réseaux organique et inorganique (hybride de classe II, cf. partie 1.3.2). Le GPTMS est greffé au polymère (acide poly-γ-glutamique) préalablement solubilisé et le sol de bioverre est ensuite introduit. Bien que l'hydrolyse-condensation soit freinée suite à la dilution des espèces oligomériques silicates, ces dernières réagissent avec le polymère fonctionnalisé pour établir des liaisons polymère-GPTMS-bioverre. Cette réticulation entraîne la gélification rapide du sol hybride et il en résulte un véritable réseau mixte organominéral. Alors que les hybrides de classe II possèdent de nombreux avantages liés à cette nanostructure mixte (cf. partie 1.3.2), la gélification accélérée du sol empêche la fabrication de scaffolds et les hybrides présents dans la littérature sont pour cette raison élaborés sous forme de monolithes [44, 52] ou de fibres [53].

Le protocole développé par notre équipe est également compatible avec la synthèse d'hybrides de classe II. Par exemple, un hybride gélatine-bioverre de classe II peut être obtenu [63, 64] en ajoutant un agent couplant à la gélatine solubilisée, puis en laissant le tout sous agitation pendant 30 minutes (fonctionnalisation de la gélatine) avant d'introduire enfin le sol de bioverre. Le sol hybride résultant se fige en quelques heures au lieu de plusieurs jours pour un sol hybride de classe I, ce qui est en accord avec les observations de Poologasundarampillai *et al.* quant à la gélification accélérée des hybrides de classe II. Mais bien qu'elle soit accélérée, cette gélification reste suffisamment lente puisqu'elle permet l'homogénéisation du sol hybride (par agitation ou par ultrasons) et sa mise en forme. Si ici le temps de gel est significativement plus long que ceux rapportés dans la littérature, c'est en partie dû à la plus grande stabilité du sol de bioverre décrite en partie 2.1.1, obtenue grâce à un ratio H_2O/TEOS relativement bas favorisant le ralentissement des réactions d'hydrolyse et par la suite la gélification [37].

2.2 Procédé de fabrication des scaffolds

L'accent a été mis sur les défis liés à la synthèse d'un sol hybride à base de verre bioactif, à savoir l'incorporation du calcium dans le réseau silicate à température ambiante, la stabilité du sol de bioverre et l'obtention d'un sol hybride homogène et relativement stable. Non seulement le procédé développé par notre équipe relève ces défis avec succès, mais il permet aussi la fabrication de scaffolds.

La mise en forme du sol hybride doit se dérouler à température ambiante et dans des conditions anhydres : la présence du polymère interdit les traitements thermiques, tandis que l'eau provoque une gélification prématurée. Une technique d'empreinte sacrificielle est employée [65] (**Figure 11**). En bref, des billes de polymère sont empilées dans un moule, le sol hybride est infiltré dans l'empilement par centrifugation (ou par une autre méthode), puis après gélification les billes sont éliminées à l'aide d'un solvant. Ce solvant sera par la suite dénommé dissolvant afin d'éviter la confusion avec le solvant du polymère constitutif de l'hybride. Après rinçage à l'éthanol absolu et séchage sous vide, les matériaux obtenus sont des scaffolds structurés de pores sphériques. Les pores communiquent entre eux par des interconnexions qui proviennent du point de contact entre les billes porogènes. Ces interconnexions permettent aux cellules de circuler de pore en pore jusqu'au cœur du scaffold. L'interconnectivité est en effet un paramètre clé de la colonisation cellulaire et par conséquent de la néovascularisation et de la néoformation osseuse [66, 67].

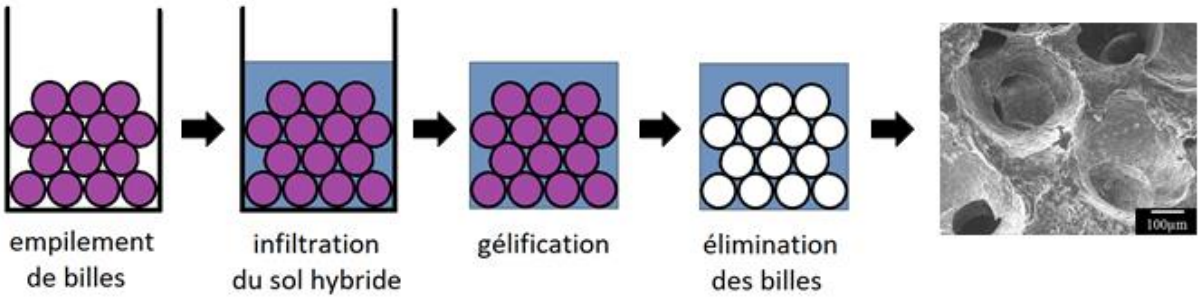


Figure 11. Procédé de fabrication de scaffolds d'hybride à base de verre bioactif.

Une attention particulière doit être portée sur le choix du couple billes-dissolvant. D'un côté, les billes ne doivent pas être dégradées par le sol hybride qui contient de l'éthanol et le solvant du polymère, d'un autre côté, le dissolvant ne doit pas dégrader l'hybride et notamment le polymère qui le constitue. Ces contraintes limitent le nombre de couples billes-dissolvant compatibles avec le sol hybride, d'autant plus que peu de polymères sont commercialisés sous forme de billes avec une granulométrie bien calibrée. Il peut être nécessaire, comme il sera vu plus tard, de synthétiser soi-même les billes du polymère adéquat.

Malgré un choix restreint de couples billes-dissolvant appropriés, ce procédé se révèle particulièrement adapté à la fabrication de scaffolds d'hybrides à base de verre bioactif. En plus de répondre au cahier des charges (procédé à l'ambiante et sans eau), il permet de contrôler la porosité de la mousse obtenue. En effet, la taille des pores est directement liée au diamètre des billes porogènes employées. De même, les interconnexions peuvent être agrandies en élargissant le point de contact entre les billes (**Figure 12-A et B**). Cette fusion des billes est réalisée avant l'infiltration du sol hybride, soit en chauffant l'empilement de billes légèrement en-dessous de leur température de

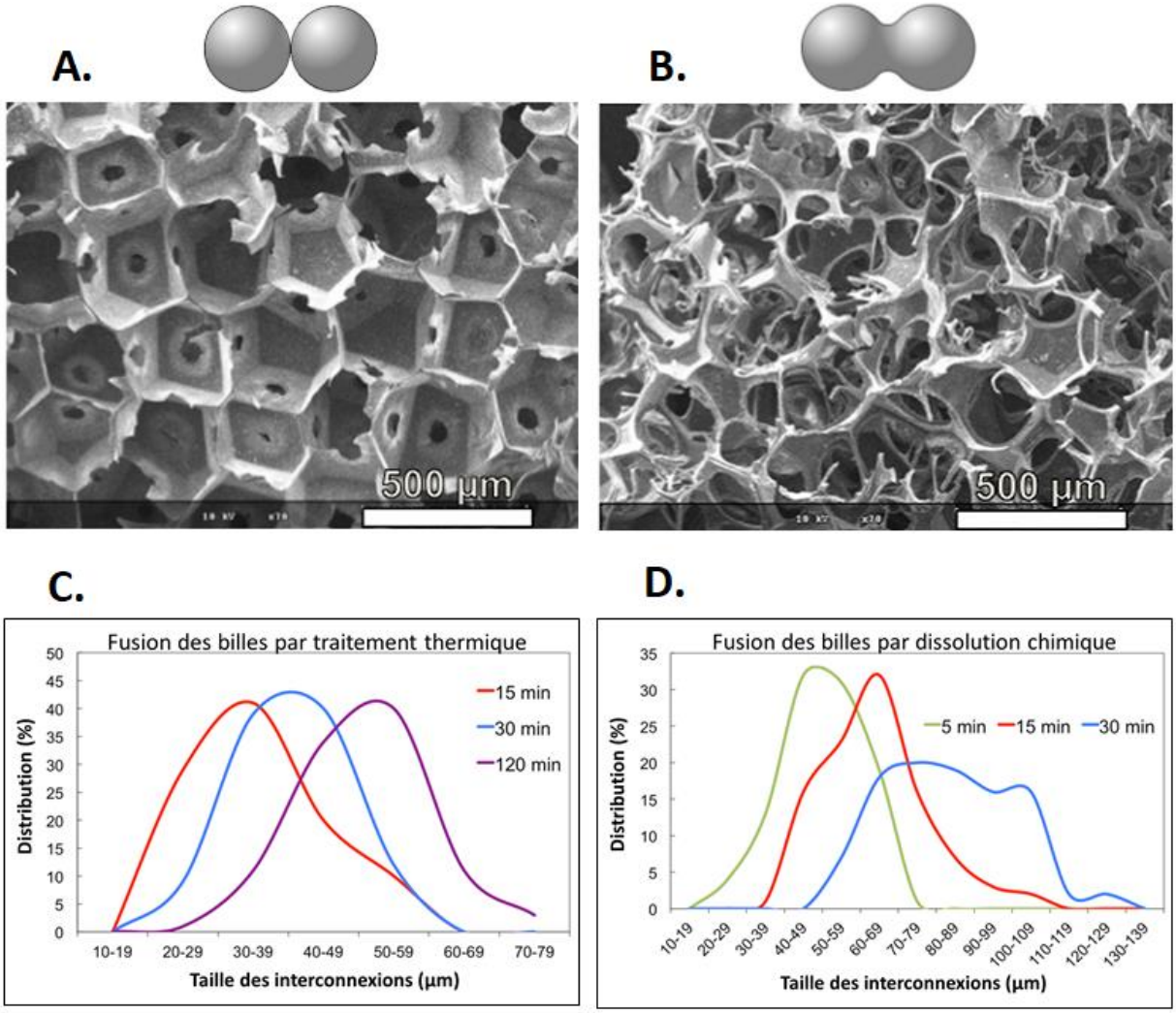


Figure 12. Scaffolds d'hybride gélatine-bioverre sans préfusion (A) et avec préfusion des billes (B). Élargissement des interconnexions de scaffolds d'hybride gélatine-bioverre en préfusionnant les billes par traitement thermique (C) ou par dissolution chimique partielle (D).D'après les travaux de Lao *et al.* [66].

fusion (**Figure 12-C**), soit en plongeant l'empilement de billes dans un solvant (ou un mélange de solvants) approprié (**Figure 12-D**). La taille des interconnexions dépendra alors du temps de ces traitements. Le contrôle fin de la porosité est un atout majeur de ce procédé étant donné que cela permet d'ajuster la macrostructure du scaffold en fonction de l'application visée.

Il est aussi possible de créer des scaffolds à porosité variable avec par exemple un gradient de porosité (**Figure 13-B**), ou encore une structure mixte dense-poreuse (**Figure 13-A**). Cela est particulièrement intéressant dans le cas de la reconstruction crânienne puisque les os de la voûte crânienne, plus souvent appelés calvaria en médecine, possèdent une structure dense-poreuse-dense. Également, la forme du matériau dépend de celle du moule, on peut donc imaginer des scaffolds de toutes formes (les plus courantes étant les cylindres et les cônes en ingénierie tissulaire osseuse) et de toutes tailles (**Figure 13-C**). En bref, ce procédé de fabrication offre une grande diversité dans la conception de matériaux poreux ostéoconducteurs.

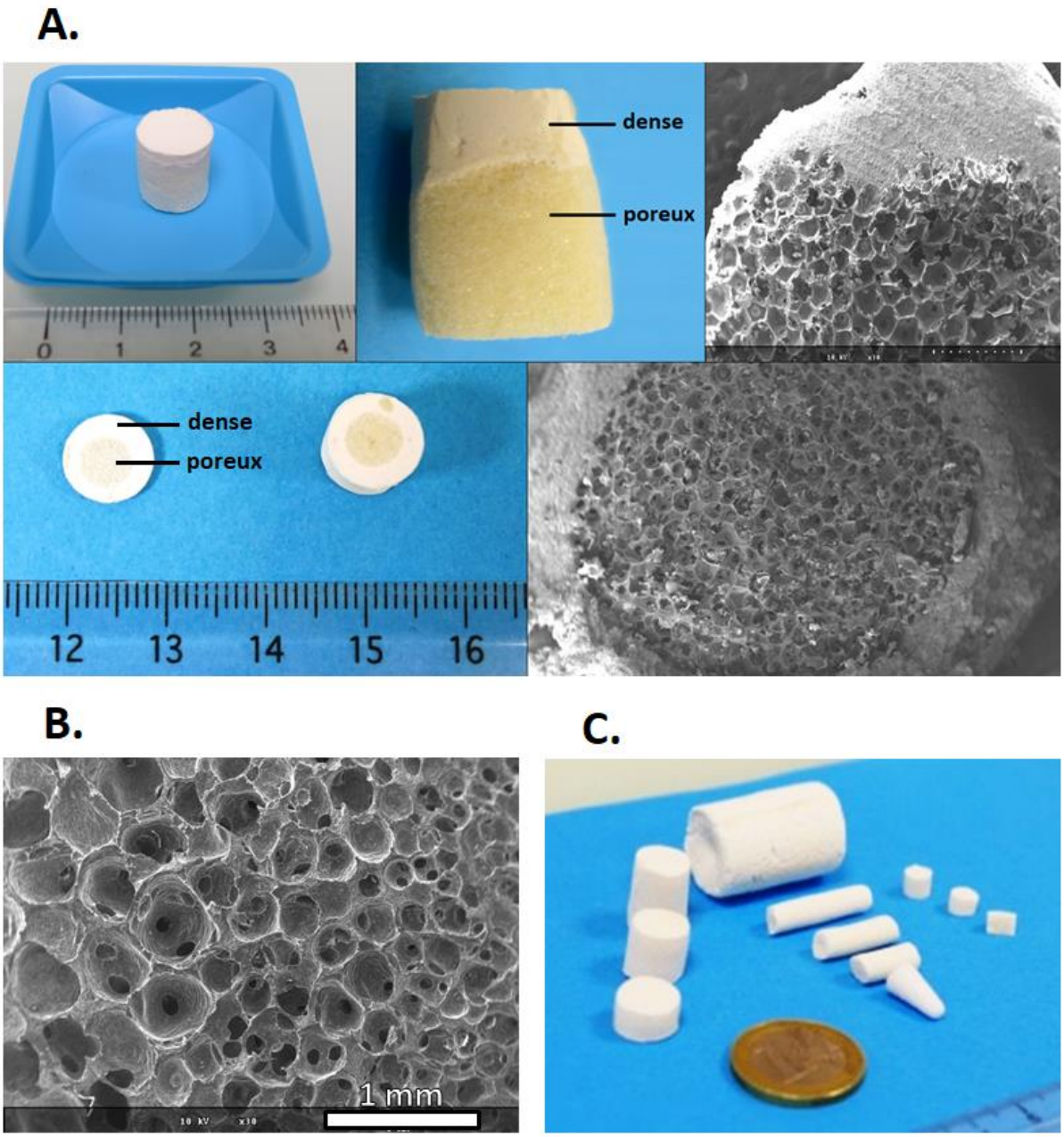


Figure 13. Exemples de structures réalisables grâce au procédé de fabrication. Scaffolds d'hybride gélatine-bioverre avec des structures mixtes dense-poreuses (A). Scaffold d'hybride polycaprolactone-bioverre avec gradient de porosité (B). Scaffolds d'hybride aux formes diverses et variées (C).

CHAPITRE 3 TECHNIQUES D'ANALYSE

3.1 Méthodologie

Les scaffolds hybrides sont caractérisés suivant la méthodologie illustrée sur la **Figure 14**. Une première évaluation des propriétés physico-chimiques est effectuée de façon systématique. Elle sert simplement à contrôler le bon rendu de la synthèse. La composition, les propriétés mécaniques, la structure macroporeuse et la capacité à induire la formation d'apatite biomimétique sont vérifiées (encadré bleu). Ces analyses peuvent être complémentées par des caractérisations visant à donner une description plus fine des propriétés physico-chimiques (encadré rouge). Après validation du matériau, il est délivré à la société OST Développement qui prend gracieusement en charge la stérilisation par rayonnement bêta. Des études biologiques sont ensuite menées par Henri Granel, doctorant à l'INRA Theix, Unité de Nutrition Humaine UMR 1019 INRA/UCA et dont la thèse, effectuée sous la direction de Yohann Wittrant dans le cadre du programme Thématiques Emergentes financé par le conseil régional d'Auvergne et le FEDER, porte sur la caractérisation des scaffolds hybrides du point de vue biologique. L'objectif est de jauger le potentiel du matériau par des études cellulaires *in vitro*, puis si les résultats sont encourageants, de l'implanter chez le petit animal afin de déterminer ses performances *in vivo*.

3.2 Préparation des échantillons

Extrait sec. L'extrait sec peut être défini comme le résidu obtenu après évaporation des solvants. Le sol de bioverre est prélevé peu avant la gélification, puis le prélèvement est versé dans une coupelle en aluminium qui est placée dans un dessiccateur (HB43-S, Mettler Toledo). Une balance suit l'évolution de la masse de l'échantillon chauffé à 105°C jusqu'à stabilisation. On obtient ainsi l'extrait sec (en %), ou autrement dit la concentration massique du sol de bioverre.

MEB-EDX. Les scaffolds sont coupés en tranches d'environ 2 mm d'épaisseur tandis que les bioverres sont broyés à la main puis pastillés. Avant analyse, l'échantillon est métallisé au carbone afin de limiter les effets de charge. La tension d'accélération du Microscope Électronique à Balayage (MEB) (SH-3000, Hirox) peut être réglée entre 5 kV et 30 kV selon le contraste recherché (chimique ou topographie) ou selon les éléments analysés par EDX (spectroscopie des rayons X par analyse dispersive en énergie).

Ionométrie calcium. Le milieu à analyser est dilué dans une solution de KCl à 1 mol/L selon le ratio volumique 1 : 1. Cela permet d'augmenter la force ionique du milieu de sorte à ce que celle-ci demeure constante entre les échantillons analysés, permettant ainsi une meilleure reproductibilité des résultats. La concentration en calcium dans la solution est déterminée par potentiométrie avec une électrode sélective d'ions calcium et une électrode de référence au chlorure d'argent (Metrohm).

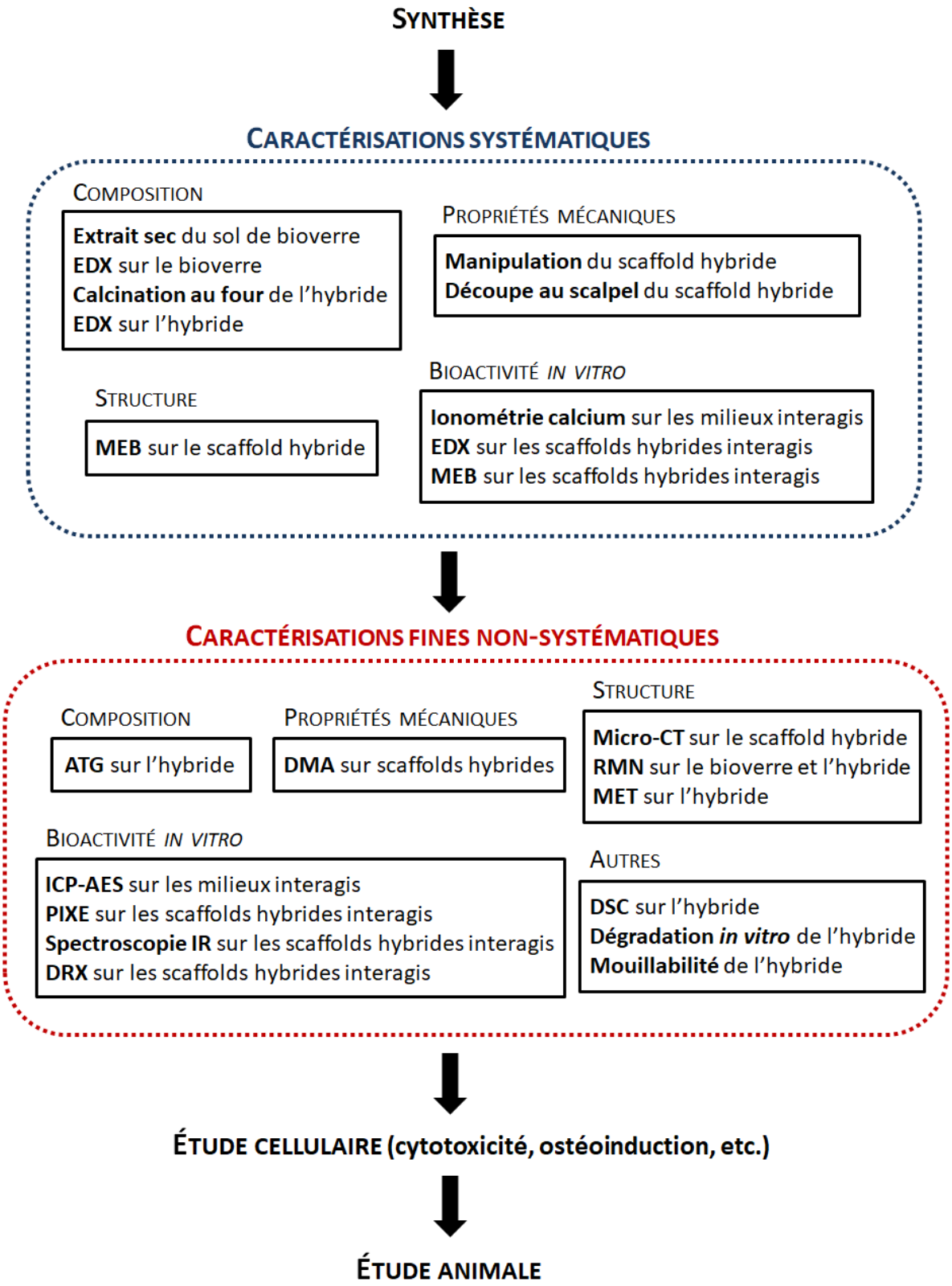


Figure 14. Méthodologie pour la caractérisation d'un hybride organique-inorganique.

ATG. Préalablement à l'Analyse ThermoGravimétrique (ATG) (TGA2050, TA Instruments), les scaffolds hybrides sont broyés avec une broyeuse à couteaux, puis la distribution 150-200 µm est récupérée par tamisage. Le bioverre est broyé à la main et séché sous vide. Environ 10 mg de l'échantillon sont placés sur la balance et chauffés avec une rampe de 10°C/min jusqu'à 800°C à l'air ambiant.

DMA. L'Analyse Mécanique Dynamique (DMA) est employée pour des essais en compression (DMA2980, TA Instruments). Les scaffolds hybrides sont découpés en cylindres de 5 mm de hauteur et 10 mm de diamètre, puis ils sont comprimés à 1 N/min jusqu'à 18 N. Le module d'élasticité est déterminé à partir de la pente du régime linéaire et la contrainte à la limite d'élasticité est déterminée à la transition du régime élastique vers le plateau avec le logiciel TA Universal Analysis.

Micro-CT. Les scaffolds hybrides sont expédiés en Norvège à notre collaboratrice Hanna Tiainen, professeur associé à la Faculty of Dentistry de l'Université d'Oslo, où ils sont scannés par microtomographie aux rayons X (micro-CT) (SkyScan 1172, Bruker) avec une résolution spatiale de 6 µm et une source sans filtre de 40 kV et 167 µA. Les échantillons sont mis en rotation à 180° autour de l'axe vertical et 3 images d'absorption sont enregistrées tous les 0,4°. Les images sont ensuite reconstruites avec le logiciel NRecon puis analysés avec les logiciels CTan et CTvox. Une région cylindrique d'intérêt de 5 mm de diamètre et 3 mm de haut est sélectionnée au centre du scaffold pour éliminer les potentiels effets de bord.

RMN. Les scaffolds hybrides et les bioverres sont broyés puis expédiés à nos collaborateurs Valérie Montouillout et Franck Fayon, chercheurs CNRS au CEMHTI à Orléans, où ils sont analysés par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) haute résolution du solide à 9,4 T (Avance I, Bruker) par rotation à l'angle magique des noyaux de ^{29}Si combinée à une séquence de polarisation croisée avec les noyaux d'hydrogène ^{1}H [64]. Les réactifs sont analysés par spectroscopie RMN du proton ^{1}H en phase liquide à 9,4 T (Avance 400, Bruker) en collaboration avec l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand.

MET. Les gels hybrides sont broyés avec une broyeuse à couteaux, inclus en résine et coupés en tranches de 100 nm d'épaisseur avec un ultramicrotome (EM UC6, Leica). Les échantillons sont observés en Microscopie Électronique à Transmission (MET) à 200 kV (CM 20, Philips) et les images sont enregistrées avec une caméra Keenview CCD et traitées avec le logiciel analySIS.

Spectroscopie IR. Les scaffolds hybrides et les bioverres sont broyés, mélangés à du KBr en poudre puis pastillés. Les pastilles sont analysées par spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (FTIR) en transmission (série 5700 FTIR MIR, Thermoscientific) en collaboration avec Jérémy Soulié et Christophe Drouet, respectivement maître de conférences et chercheur CNRS au CIRIMAT à Toulouse. Les échantillons peuvent aussi être analysés par spectroscopie FTIR en réflexion (ATR, Réflectance Totale Atténuée) avec un cristal diamant, auquel cas ils n'ont pas besoin de préparation. Les spectres sont traités avec le logiciel OMNIC et comparés à une banque de données interne développée au fil des années par le CIRIMAT.

DRX. Les scaffolds hybrides et les bioverres sont broyés puis analysés par Diffraction des Rayons X (DRX) en collaboration avec Jérémy Soulié et Christophe Drouet, à l'aide d'un diffractomètre fonctionnant avec un tube en cobalt (Equinox 1000, INEL). Les diffractogrammes sont traités avec le

logiciel Match! et comparés à la banque de données JCPDS de l'ICDD (International Centre for Diffraction Data) et à une banque de données interne développée au fil des années par le CIRIMAT.

DSC. Préalablement à la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC), les gels hybrides sont broyés avec une broyeuse à couteaux, puis la distribution 150-200 µm est récupérée par tamisage. Environ 5 mg de la poudre hybride sont introduits dans des capsules en aluminium qui sont ensuite fermées hermétiquement à l'aide d'une presse. Les capsules sont alors placées dans le calorimètre (2920 DSC, TA Instruments) puis chauffées de 0°C à 200°C sous azote avec une rampe de 10°C/min. Les données sont traitées avec le logiciel TA Universal Analysis.

Test de dégradation. Les scaffolds hybrides sont découpés en cylindres pesant environ 30 mg. Ils sont immergés dans une solution physiologique simulée (SBF), puis soumis à 60 mbar pendant 5 minutes pour assurer l'infiltration du milieu dans les pores du scaffolds, et enfin, ils sont mis sous une agitation orbitale de 250 tr/min à 37°C. Après un temps donné, les scaffolds sont rincés à l'éthanol absolu, séchés sous vide et pesés. On détermine ainsi la variation de la masse du matériau en fonction du temps d'immersion dans le fluide physiologique.

Mouillabilité. Les scaffolds hybrides sont broyés puis tamisés et environ 100 mg de la distribution 100-150 µm sont pastillés à 5 tonnes pendant 5 minutes. Une gouttelette de 10 µL d'eau distillée est déposée sur les pastilles et des images sont prises rapidement avec une caméra IDS. L'angle de contact entre l'eau et la pastille est déterminé avec le logiciel ImageJ.

3.3 Évaluation de la bioactivité *in vitro*

La bioactivité d'un matériau découle de sa capacité à induire la précipitation d'apatite biomimétique en sa surface. Il est possible, dans une certaine mesure, d'évaluer cette capacité *in vitro* en immergeant le matériau dans un milieu acellulaire qui possède les mêmes concentrations ioniques que le plasma sanguin. Dans ces travaux de thèse, le Simulated Body Fluid ou SBF est employé. Les sous-parties suivantes décrivent les essais d'immersion dans le SBF et deux techniques de caractérisation qui permettent de démontrer la formation d'un phosphate de calcium, à savoir l'ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy) et la spectroscopie PIXE (Proton Induced X-ray Emission).

3.3.1 Interaction avec le Simulated Body Fluid

En suivant les recommandations de Bohner et Lemaître [68], le SBF est préparé à partir de deux solutions, l'une contenant le chlorure de calcium et l'autre contenant le reste des sels (**Tableau 1**). Cela permet d'éviter la précipitation de phosphates de calcium dans le SBF au cas où celui-ci serait conservé plusieurs semaines avant d'être utilisé. De plus, comme le préconise Kokubo [69], le tris(hydroxyméthyle)aminométhane (TRIS) est introduit dans les deux solutions en tant que tampon pH. Les solutions sont préparées suivant le même protocole : pour 500 mL de solution (soit 1 L de SBF), 350 mL d'eau distillée est chauffée à 37°C, 10 mL d'acide chlorhydrique à 2 mol/L est ajouté, puis les sels sont introduits successivement dans l'ordre affiché sur le **Tableau 1**, en attendant avant chaque introduction la dissolution du sel précédent. Pour finir, le pH est ajusté à 7,4 par l'ajout d'acide chlorhydrique à 2 mol/L et le volume est ajusté à 500 mL par l'ajout d'eau distillée. Les solutions ainsi préparées sont conservées à 4°C dans des bouteilles en polypropylène afin de limiter la nucléation de phosphates de calcium durant le stockage.

Tableau 1. Produits et quantités utilisées pour la préparation de SBF.

Sels et tampon		Masse pour 500 mL de solution (g)	
Formule	Pureté	Solution A	Solution B
NaCl	99,5 %	8,035	0
KCl	99 %	0,225	0
$K_2HPO_4.3H_2O$	99 %	0,231	0
$MgCl_2.6H_2O$	99 %	0,311	0
Na_2SO_4	99 %	0,072	0
$CaCl_2$	97 %	0	0,292
TRIS	99 %	3,059	3,059
$NaHCO_3$	99,5 %	0,355	0

Au moment de lancer les essais d'immersion, le SBF est préparé en mélangeant les solutions A et B selon un ratio volumique 1 : 1 dans un flacon en polypropylène. Il est ensuite préchauffé à 37°C, puis le scaffold hybride est introduit. Le rapport « milieu physiologique sur matériau » est de 1 mL/mg. Enfin, le flacon est placé sous agitation orbitale à 250 rpm dans une étuve à 37°C. Après un temps donné (généralement 6 h, 1 j, 3 j ou 7 j), le milieu est récupéré et conservé au réfrigérateur, et le scaffold est rincé 3 fois abondamment à l'éthanol absolu puis séché sous vide. Les concentrations ioniques du milieu interagi peuvent être déterminées par ionométrie calcium ou par ICP-AES. Le matériau interagi peut être observé au MEB et analysé par EDX, par spectroscopie IR, par DRX ou par microfaisceau d'ions (PIXE).

Le protocole des essais d'immersion a été amélioré au cours de la thèse. En effet, il a été observé que de l'apatite biomimétique se formait uniquement sur le pourtour des scaffolds hybrides et que les cellules tendaient à fuir le centre des scaffolds. Ces résultats suggèrent un faible renouvellement du milieu voire une mauvaise infiltration au cœur du scaffold. Afin de le vérifier, un scaffold hybride a été immergé dans un mélange d'eau et d'encre bleue. La **Figure 15-A** montre qu'après 2 minutes sous agitation orbitale, le milieu n'a pas pénétré dans la mousse. Les tests suivants (**Figure 15-B à D**) ont permis de résoudre ce problème. Le premier test (**Figure 15-B**) montre qu'après 5 minutes à 60 mbar, l'air contenu dans la mousse a été chassé et le milieu s'est infiltré. À la suite de cette étape, la mousse est immergée dans un mélange d'eau et d'encre noire. La **Figure 15-C** montre qu'après 2 minutes *sans* agitation, le centre de la mousse demeure bleu, ce qui suggère une faible diffusion du milieu à travers le scaffold. En revanche, le centre de la mousse est noir après 2 minutes d'agitation, ce qui suggère un renouvellement du milieu (**Figure 15-D**). Pour résumer, lors de l'immersion d'un scaffold, une mise sous « vide » est nécessaire afin de permettre l'infiltration du

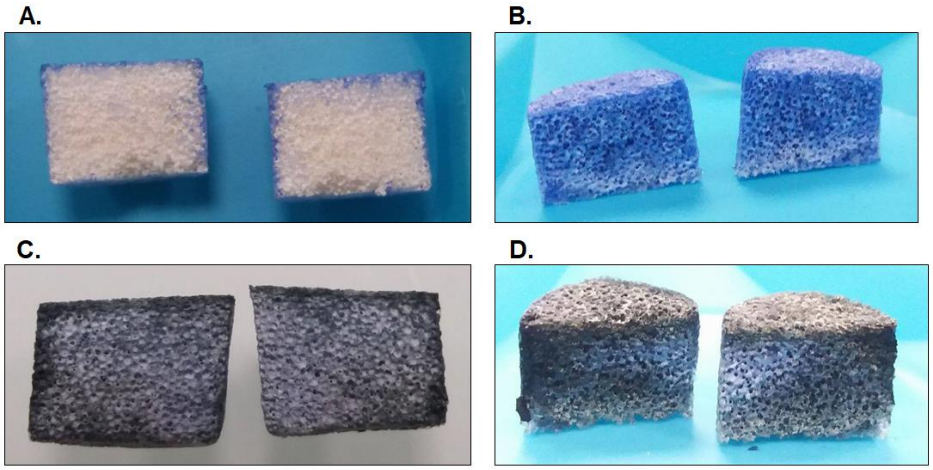


Figure 15. Tests d'infiltration du milieu (coloré en bleu ou en noir) dans un scaffold hybride.

milieu, suivie d'une mise sous agitation afin de permettre le renouvellement du milieu au sein du scaffold. Grâce à ce nouveau protocole, les scaffolds minéralisent dans tout le volume et ils sont colonisés par les cellules. Ce protocole s'accompagne *de facto* de bien meilleurs résultats lors des études *in vitro*.

3.3.2 Analyse du milieu interagi par ICP-AES

La spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif ou ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy) est une méthode d'analyse des concentrations dans la globalité d'un échantillon. Elle est réalisée par Mhammed Benbakkar, ingénieur d'étude au Laboratoires Magmas et Volcans de l'Université Clermont Auvergne.

Après interaction avec le scaffold hybride, le SBF est introduit dans une lampe à plasma *via* un système de nébulisation. Le plasma permet de casser les liaisons moléculaires de l'échantillon de manière à obtenir des atomes libres et il sert à exciter ces atomes. En se désexcitant, ces atomes émettent des photons d'énergies caractéristiques dans le domaine de l'ultraviolet et du visible (la longueur d'onde est généralement comprise entre 160 et 770 nm). Les rayonnements émis par les différents atomes de l'échantillon vont ensuite passer à travers un système dispersif qui permet d'isoler les différentes raies d'émission, puis ils vont être dirigés vers un détecteur qui transforme les photons en un signal électrique et permet ainsi de mesurer l'intensité des raies d'émission. Ces intensités sont ensuite comparées aux intensités mesurées pour des étalons de référence. Il est ainsi possible de déterminer les concentrations des différents éléments constitutifs de l'échantillon. Le suivi des concentrations en calcium et en phosphore dans le SBF au cours de l'interaction avec le scaffold hybride renseigne sur la formation d'un phosphate de calcium, tandis que le suivi de la concentration en silicium renseigne sur la dissolution du réseau silicate. Il peut aussi être intéressant de suivre la concentration d'autres ions présents dans l'apatite physiologique, tels que le magnésium, étant donné que celle-ci est amenée à diminuer dans l'éventualité où l'apatite précipite.

Dans l'équipe, les étalons étaient traditionnellement préparés en diluant l'élément à étalonner dans l'eau distillée [27, 70, 71]. Or le SBF, à l'image du plasma sanguin, est une solution saline riche en ions Na^+ et Cl^-. L'abondance de ces ions provoque des interférences à cause de nombreuses modifications physico-chimiques qui ne sont pas encore bien comprises (déplacement de l'équilibre ion-atome de l'analyte, recombinaison ion-électron, augmentation des collisions, *et cetera* [72-76]). De ce fait, les écarts de concentrations ioniques observés entre les valeurs théoriques et les valeurs mesurées par ICP-AES dans le SBF (**Tableau 2**) sont attribués à ces interférences appelées effet de matrice. Afin de corriger l'effet de matrice, les étalons sont désormais préparés à partir d'une solution de NaCl de concentration identique au SBF. Les valeurs mesurées correspondent alors aux valeurs attendues (**Tableau 2**).

Tableau 2. Concentrations en Ca, Mg et P dans le SBF. Valeurs théoriques (première ligne), puis valeurs déterminées à partir d'étalons préparés dans l'eau (deuxième ligne) ou dans une solution de NaCl (troisième ligne).

Valeurs…	**Concentration massique (ppm)**		
	Ca	Mg	P
Théoriques	100,0	36,5	31,0
Expérimentales (eau)	64,3 ± 2,6	28,8 ± 1,2	23,6 ± 1,4
Expérimentales (NaCl)	105,6 ± 4,3	35,5 ± 1,5	32,3 ± 2,0

3.3.3 Analyse du matériau interagi par PIXE

L'imagerie chimique quantitative par micro-faisceau d'ions permet la mesure locale des concentrations qui vient compléter les résultats obtenus par ICP-AES. Elle est réalisée en collaboration avec le Centre d'Études Nucléaires de Bordeaux Gradignan (CENBG) sur la plateforme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires de Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) (**Figure 16**).

Figure 16. À gauche : l'accélérateur électrostatique simple étage de type 3,5 MV - Singletron d'AIFIRA, qui délivre des faisceaux d'ions ($^{1}H^{+}$, $^{2}D^{+}$, $^{4}He^{+}$) de basse énergie. À droite : vue des cinq lignes d'analyse, avec au centre la ligne nanofaisceau utilisée pour nos travaux.

Cette technique repose sur l'accélération d'ions légers à des énergies de l'ordre de la centaine de keV à quelques MeV qui sont focalisés à l'échelle du micromètre voire jusqu'à quelques dizaines de nanomètres à la surface d'un échantillon ; les émissions de particules ou rayonnement qui accompagnent la pénétration des ions légers dans la matière sont détectées et leurs énergies mesurées, permettant le dosage élémentaire. Le **Tableau 3** présente les 5 principales techniques d'analyse par faisceaux d'ions, qui diffèrent par le type de particules ou rayonnement mesuré [77]. Ces techniques peuvent être déployées simultanément pour couvrir une large part de la table de Mendeleïev, les éléments légers aussi bien que les lourds pouvant ainsi être dosés avec une grande sensibilité et une très bonne sélectivité dans l'ensemble.

Tableau 3. Principales techniques d'analyses par faisceaux d'ions ou microsondes nucléaires (issu de Berger et Revel [77]).

Méthode	Éléments concernés	Profondeur analysée	Résolution en profondeur (nm)	Sensibilité (µg/g)	Sélectivité	Domaine d'application
Émission X induite par particule (PIXE)	$Z \geqslant 11$	0,1 à qq. µm	500 à 1 000	5 à 100 (sur cibles épaisses)	Excellente	Analyse multiélémentaire très sensible pour $Z > 11$ Étalonnage relatif
Rétrodiffusion élastique de la particule incidente (RBS)	$Z \geqslant 5$	0,001 à 10 µm	10 à 50	100 à 1 000	Bonne pour $Z < 30$, isotopique	Élément lourd dans matrice légère Profil de concentration Calibration des autres méthodes Étalonnage absolu
Diffusion élastique de l'atome cible (ERDA)	Atome cible plus léger que la particule	0,1 à 0,5 µm (en réflexion), 1 à 10 µm (en transmission)	20 à 50	10 à 100	Excellente, isotopique	Dosage d'hydrogène avec ^{4}He Profil de concentration Étalonnage absolu
Observation directe de réactions nucléaires (NRA)	$Z < 15$	qq. µm	5 à 100	1 à 1 000	Très bonne, isotopique	Dosage des éléments légers Profil de concentration Étalonnage absolu (1) ou relatif
Émission γ induite par particules (PIGE)	$3 < Z < 30$	10 à 50	500 à 1 000	100 à 1 000	Très bonne, isotopique	Analyse multiélémentaire Souvent associée au PIXE pour le dosage complémentaire des éléments légers

(1) Dans les cas où la section efficace de la réaction est connue avec précision et exactitude.

Sur le principe, la PIXE est identique à la spectrométrie EDX mise en œuvre dans un MEB, à la différence que des protons sont utilisés à la place des électrons comme source excitatrice. Ceci procure des avantages décisifs. Tout d'abord, comme illustré sur la **Figure 17**, les protons ont un parcours rectiligne à travers la matière tandis que les électrons forment une « poire d'interaction » [78, 79]. Pour cette raison, sur des échantillons épais ou semi-épais (> 1 µm), la résolution spatiale de la PIXE est 2 à 3 fois meilleure qu'en spectrométrie EDX. De plus, avec les protons, la profondeur sondée ne se limite pas aux premiers microns sous la surface, mais s'étend à 80 µm pour les bioverres (avec un élargissement du faisceau inférieur à 3 µm à cette profondeur). Ces caractéristiques font que l'analyse d'échantillons épais est possible sans sacrifier la résolution, et facilite ainsi la préparation des échantillons pour l'analyse.

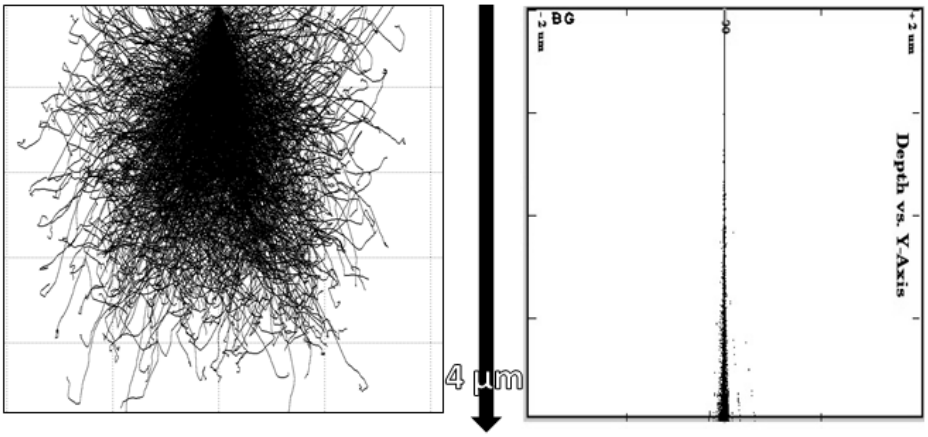


Figure 17. Parcours d'électrons de 20 keV (à gauche) et de protons de 3 MeV (à droite) traversant un verre SiO_2-CaO. Simulations obtenues avec les logiciels CASINO [78] et SRIM2013 [79] pour un même nombre d'évènements.

En termes de sensibilité d'analyse, la PIXE est également supérieure. Les sections efficaces d'ionisation des couches électroniques K et L par des ions de quelques MeV et des électrons de quelques dizaines de keV sont certes comparables, mais l'intensité du rayonnement de freinage engendré par les électrons est plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle des ions, qui bénéficient ici pleinement de l'effet de leur masse élevée (relation de Larmor, l'intensité du rayonnement de freinage est proportionnelle au carré de l'accélération *i.e.* à Z^2/m^2). La **Figure 18** montre ainsi que le fond continu dû au rayonnement de freinage est beaucoup plus faible dans le cas des ions, et ne masque aucunement les raies X caractéristiques de faible intensité de l'échantillon. La limite de détection en PIXE dépend du type d'ions incidents, de leur énergie, de la composition de la cible, ces trois facteurs conditionnant la valeur de la section efficace d'ionisation, et de la propension à émettre un rayonnement de freinage. La **Figure 19** montre que la quasi-totalité du tableau périodique est couverte avec une limite relative de détection inférieure à 5 ppm, quand l'EDX est associée couramment à une limite de quelques 1 000 à 10 000 ppm suivant les éléments. La grande sensibilité de la PIXE permet l'analyse des éléments traces qui s'avère particulièrement adaptée à l'étude des matériaux dopés ou de l'os comme cela sera le cas dans cette thèse.

La plateforme AIFIRA produit des faisceaux de protons focalisés sur un diamètre aussi petit que 600 nm sur la ligne nanofaisceau (**Figure 16**), avec un courant sur cible de l'ordre de 100 pA, permettant des temps d'acquisition rapides (quelques dizaines de minutes). Un système de balayage permet la cartographie par RBS, PIXE, NRA, ERDA et PIGE d'une zone de l'échantillon allant de quelques dizaines de microns à près d'un millimètre, selon l'énergie et la nature de l'ion utilisé.

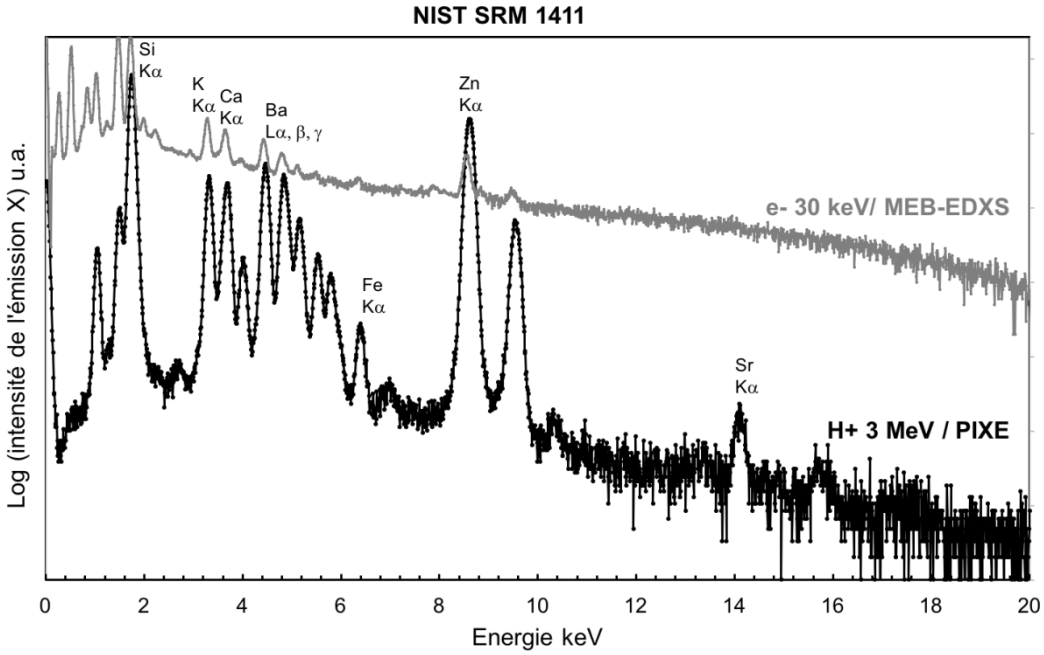


Figure 18. Comparaison des spectres en énergie des rayons X générés par le standard NIST SRM-1411 bombardé avec des protons de 3 MeV (méthode PIXE) ou des électrons de 30 keV (MEB-EDXS).

Des cartographies élémentaires peuvent être générées à partir du spectre obtenu par PIXE *via* le logiciel SupaVisio, en traitant seulement l'intervalle d'énergie correspondant à l'élément à cartographier (**Figure 20-A**). Il est ainsi possible d'observer la minéralisation de l'hybride (apparition du phosphore sur l'échantillon) et la dissolution du réseau silicate (disparition du silicium) au cours de l'interaction avec le SBF. Ces observations peuvent être complétées par des analyses quantitatives. Il est en effet possible de déterminer les concentrations élémentaires à partir des intensités des raies X caractéristiques des spectres PIXE. La procédure est détaillée dans l'article [80]. Brièvement, la zone de l'échantillon à analyser est sélectionnée à partir des cartographies élémentaires préalablement générées (**Figure 20-B**). Le spectre PIXE correspondant à la région d'intérêt est extrait, puis traité avec le logiciel GUPIX qui permet, après la calibration avec un matériau étalon (NIST 620), d'obtenir la quantification des éléments.

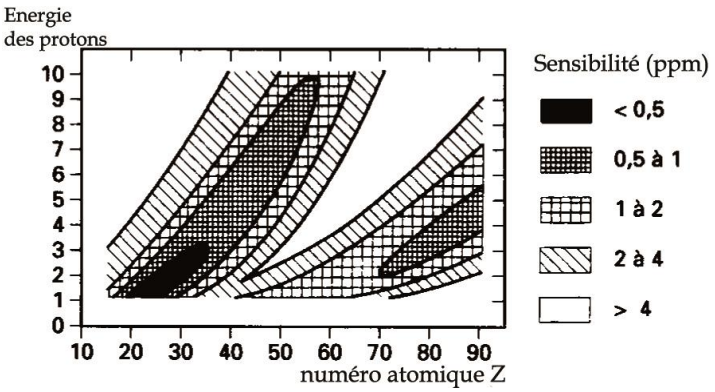


Figure 19. Limite de détection en PIXE avec des protons en fonction de leur énergie et de la composition de la cible.

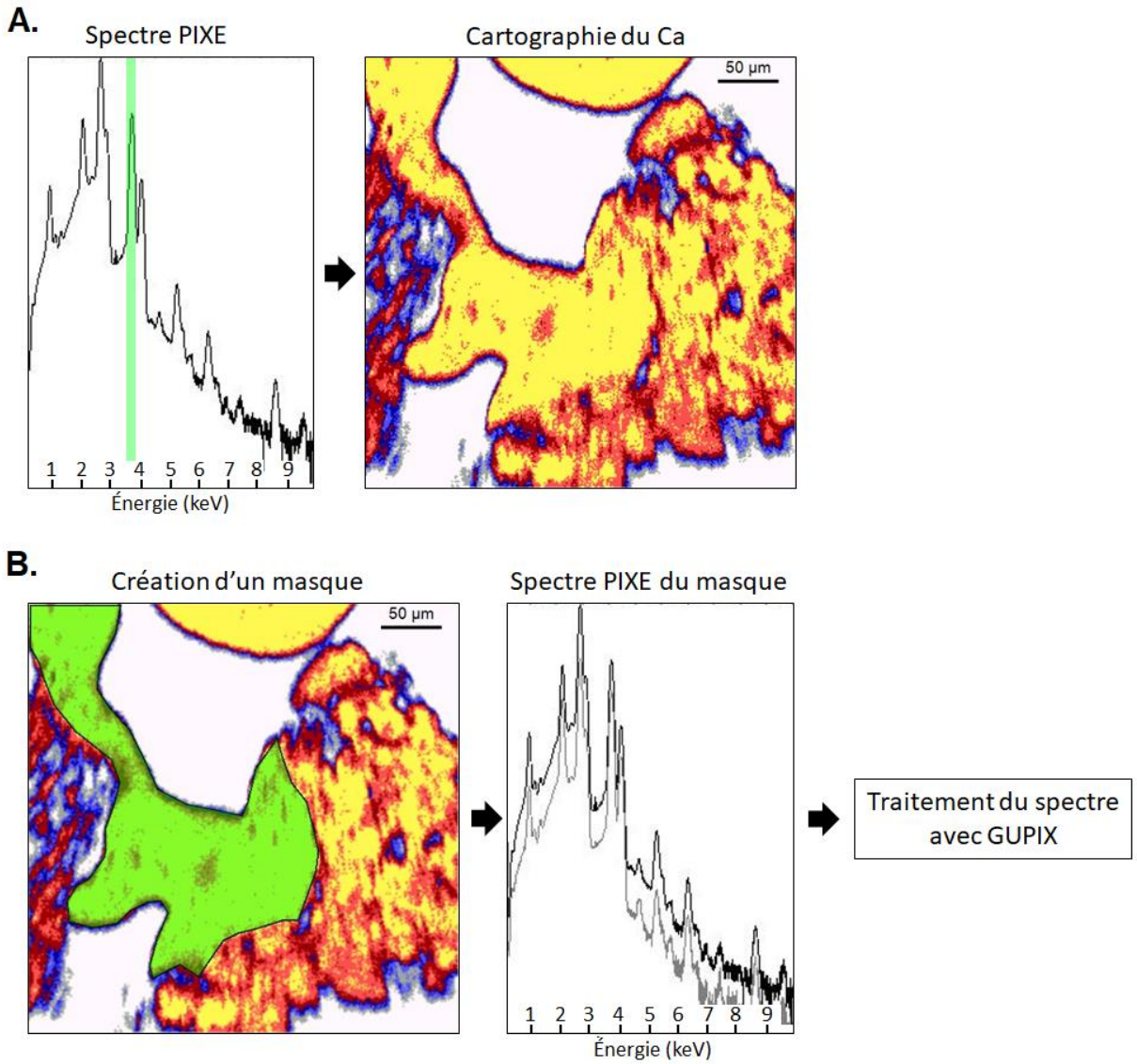


Figure 20. Création de cartographies élémentaires à partir du spectre PIXE (A). Création d'une région d'intérêt et extraction du spectre PIXE correspondant afin de réaliser une analyse quantitative (B).

Partie II
Scaffolds d'un hybride polycaprolactone-bioverre de classe I

CHAPITRE 4 CHOIX DU POLYMERE

L'objectif de cette thèse est de développer et d'optimiser une matrice hybride tridimensionnelle à base de verre bioactif pour le comblement osseux en vue d'une potentielle commercialisation. Il s'agit de sélectionner en premier lieu une composition organique-inorganique qui aura été identifiée comme la plus adaptée vis-à-vis de l'ostéogénèse, des propriétés mécaniques et de la vitesse de résorption de l'implant. Comme expliqué partie 2.1.1, la phase inorganique est un bioverre dans le système binaire et de composition massique 75 % SiO_2 - 25% CaO choisie pour sa capacité à induire la formation rapide d'apatite. La phase organique a quant à elle été choisie suite à une étude animale qui sera présentée dans ce chapitre.

Plusieurs propriétés sont recherchées : le polymère doit prodiguer de la ténacité au matériau hybride, il doit se dégrader à une vitesse adaptée à la régénération osseuse et ses produits de dégradation doivent pouvoir être éliminés naturellement par le corps. Dans le cadre des demandes de brevet, la synthèse d'hybride a été testée avec une dizaine de polymères biorésorbables afin de démontrer la polyvalence du protocole décrit au chapitre 2. Des scaffolds d'hybride ont été fabriqués à partir de polysaccharides (dextran, acide hyaluronique, carraghénane, chitosan), de protéines (gélatine, collagène) et de polymères synthétiques (polyéthylène glycol, poly(acide D,L-lactique), poly(alcool vinylique), polycaprolactone).

Après acceptation des demandes de brevet, un projet de maturation a été financé par la Société d'Accélération du Transfert de Technologies (SATT, **Figure 21**) dans le but de dérisquer la technologie et de faciliter son transfert vers l'industrie. Ce projet comprend notamment une étude animale qui permet de comparer les performances *in vivo* d'hybrides élaborés à partir de différents polymères. Cette étude animale représente une étape de criblage ou « screening », c'est-à-dire qu'elle vise à effectuer un tri de sorte à sélectionner rapidement un polymère en tant que constituant organique de l'hybride, l'objectif final n'étant pas de proposer un catalogue de matériaux mais de développer un seul et unique matériau hybride. À ce stade, les synthèses des différents hybrides ne sont pas optimisées, et ce n'est qu'une fois le screening terminé que la composition hybride retenue sera optimisée. Ce choix stratégique permet d'accélérer le processus de développement et *in fine* de réduire les coûts.

Figure 21. La SATT Grand Centre promeut l'innovation sur trois régions : Auvergne-Rhône-Alpes, Centre-Val de Loire et Nouvelle Aquitaine.

4.1 Étude préliminaire *in vivo*

4.1.1 Présentation de l'étude

Pour cette étude, quatre polymères ont été sélectionnés parmi ceux mentionnés ci-dessus par rapport à leur potentiel dans l'ingénierie tissulaire osseuse (**Tableau 4**) : la gélatine, le collagène, le poly(acide D,L-lactique) (PDLLA) et le polycaprolactone (PCL).

Polymère	Longueur des chaînes	Fournisseur
Gélatine (type B, bovine)	Indice de Bloom = 225 g	Aldrich
Collagène (types 1 et 3, porcin)		Biom'up
Poly(acide D,L-lactique)	Viscosité inhérente = 5,7 à 6,5 dL/g	Evonik
Polycaprolactone	M_n = 80 000 g/mol	Aldrich

Tableau 4. Polymères sélectionnés pour la synthèse d'hybrides organique-inorganique dans le cadre de l'étude animale.

La gélatine a déjà été employée dans des hybrides gélatine-silice par Mahony *et al.* [39], elle se révèle particulièrement intéressante pour la synthèse d'hybrides de classe II aux propriétés ajustables. En revanche, la gélatine est soluble dans l'eau à 37°C et les hybrides gélatine-bioverre de classe I sont également rapidement dissous *in vitro*. La solubilité de l'hybride peut être atténuée à façon *via* l'établissement de liaisons covalentes entre les réseaux organiques et inorganiques. Avec la gélatine, la réalisation d'un hybride de classe II est donc obligatoire pour le comblement osseux et c'est d'ailleurs un classe II qui a été utilisé dans cette étude [64].

Le collagène est un constituant majeur de l'os puisque ce dernier se compose grossièrement de 70 % en masse d'apatite nanocristalline et 30 % en masse de collagène ; il apparaît donc comme un choix évident pour la synthèse d'hybrides. Tout comme la gélatine, le collagène convient parfaitement à la synthèse d'hybrides de classe II (ce sont des polymères naturels contenant de nombreuses espèces nucléophiles, cf. partie 1.3.2). Un hybride collagène-bioverre de classe II a été utilisé dans cette étude.

Le PDLLA est couramment employé dans les vis d'interférence biorésorbables. Ces vis sont généralement des composites constitués de PDLLA et de particules d'une céramique biorésorbable. Elles sont par exemple conçues pour fixer un greffon autogène ostéo-tendineux dans le fémur et dans le tibia dans le cadre d'une réparation ligamentaire du genou. Les vis à base de PDLLA sont une alternative aux vis d'interférence métalliques, elles se démarquent par leur capacité à se résorber. Le PDLLA utilisé dans cette étude se dégrade entièrement en 2 à 3 ans (estimation du fournisseur). En revanche, il a été observé que l'hybride correspondant se dissolvait rapidement en milieu aqueux. L'élaboration d'un hybride de classe II serait une solution mais est difficilement envisageable en l'état ; en effet, le PDLLA ne possède pas de groupements nucléophiles le long de sa chaîne, la silanisation du PDLLA en vue du couplage organique-inorganique semble donc délicate (cf. partie 1.3.2). Une tentative d'hybridation du PDLLA avec du bioverre a malgré tout été réalisée pour le programme de criblage, sans garantie de l'obtention d'un réel couplage covalent entre les deux composants.

Le PCL est un polyester qui se dégrade lentement en comparaison avec les autres polymères biorésorbables (jusqu'à 4 ans) [81]. À l'origine employé dans des sutures résorbables et dans des dispositifs de relargage de médicaments, le PCL s'est vite fait dépasser par le PDLLA et l'acide polyglycolique du fait de leurs temps de résorption plus modérés. Après être resté dans l'oubli

pendant pratiquement deux décennies, l'intérêt pour ce polymère a ressurgi avec la naissance de l'ingénierie tissulaire. Ce nouveau domaine se caractérise par la construction de scaffolds, alors largement facilitée par les propriétés viscoélastiques et rhéologiques supérieures du PCL. Mais si le PCL est choisi dans cette étude, c'est bien pour sa dégradation lente – il s'agit effectivement d'un caractère recherché pour un substitut osseux. L'hybride PCL-bioverre n'est d'ailleurs pas soluble dans l'eau puisque le scaffold apparaît intact après 1 semaine d'immersion dans le SBF, et ce même pour un hybride de classe I. Dans cette étude, des hybrides PCL-bioverre de classe I et de classe II ont été utilisés ; cependant ici aussi la tentative d'hybridation du PCL avec du bioverre à travers les hybrides de classe II ne donne aucune garantie de l'obtention d'un réel couplage covalent entre les deux composants, car le PCL ne possède aucun groupement nucléophile le long de sa chaîne mais seulement une fonction carboxylique terminale susceptible de subir la silanisation. En l'état, si un couplage covalent PCL-bioverre est obtenu, il est attendu que son étendue soit nécessairement limitée.

L'étude *in vivo* a été exécutée par le Centre d'Investigation Clinique Innovation Technologique (CIC-IT) Biomatériaux de Bordeaux. Elle porte sur le comblement de défauts osseux situés au niveau du condyle fémoral (extrémité inférieure du fémur) de rates adultes (**Figure 22**). Les défauts sont de taille non-critique, ce qui signifie qu'une cicatrisation totale du défaut peut être obtenue même en l'absence d'implant. Ce modèle animal permet d'évaluer la biocompatibilité et l'ostéoconduction des matériaux et il permet de comparer les cinétiques de reconstruction. Malgré les avantages significatifs associés à l'utilisation de structures macroporeuses (cf. partie 1.2.2), il a été décidé pour des raisons liées au marché ciblé d'implanter les matériaux hybrides sous forme de granules, forme la plus utilisée en chirurgie dentaire. Les granules ont été produits en broyant les scaffolds puis en tamisant de sorte à ne conserver que la fraction 0,2 - 1 mm. Des granules de Bio-Oss® (Geistlich) avec la même granulométrie ont aussi été implantés en tant que matériau commercial référence. Le Bio-Oss® est de l'os bovin qui a été traité dans le but d'éliminer la partie organique (collagène et autres protéines) ; il fait partie des substituts osseux les plus vendus. Également, des défauts ont été laissés vides en tant que contrôles négatifs.

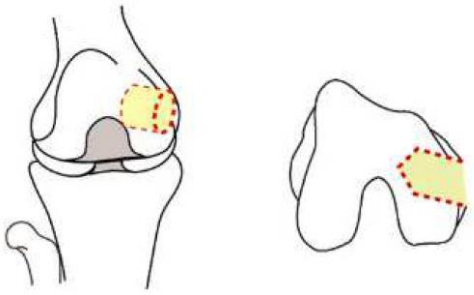


Figure 22. Modèle de défaut osseux au niveau du condyle fémoral chez le rat.

Les animaux ont été sacrifiés après 9 ou 15 semaines d'implantation. Après récupération, les explants ont été fixés dans une solution de formaldéhyde à 4 % puis enrobés dans une résine qui polymérise à froid. Les blocs résultants ont ensuite été découpés au microtome en coupes de 7 µm d'épaisseur et ces coupes ont finalement été colorées suivant la méthode du trichrome de Goldner ou avec la coloration von Kossa/MacNeal (**Figure 23**). L'association de ces deux techniques de coloration permet d'identifier le tissu osseux : le collagène apparaît en bleu-vert lorsque l'on applique la méthode du trichrome de Goldner et le calcium apparaît en noir lorsque l'on applique la

coloration von Kossa/MacNeal. Afin d'améliorer la lisibilité, seuls les clichés des coupes colorées au trichrome de Goldner sont systématiquement présentés. Sur ces clichés, trois zones d'intérêt ont été délimitées à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (fibrose, os néoformé, matériau résiduel) et quantifiées par rapport à la surface de la cavité créée représentant le 100 % (analyse histomorphométrique, **Figure 24**). Les différences statistiques entre les échantillons (n = 6) ont été évaluées par une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs suivie d'une correction de Bonferroni.

4.1.2 Résultats et discussion

Le défaut créé n'étant pas de taille critique, l'os se régénère entièrement en 9 semaines sans qu'un substitut osseux n'ait besoin d'être implanté (**Figure 23-A**). Néanmoins, l'os néoformé possède une structure dense et non physiologique qui n'est ici pas souhaitée puisque le condyle fémoral est fait d'os trabéculaire dans son volume.

D'après les observations histologiques, l'hybride gélatine-bioverre de classe II engendre une réaction inflammatoire importante après 9 semaines d'implantation et réduite après 15 semaines. La réaction inflammatoire est un élément déclencheur de la régénération osseuse : les cellules

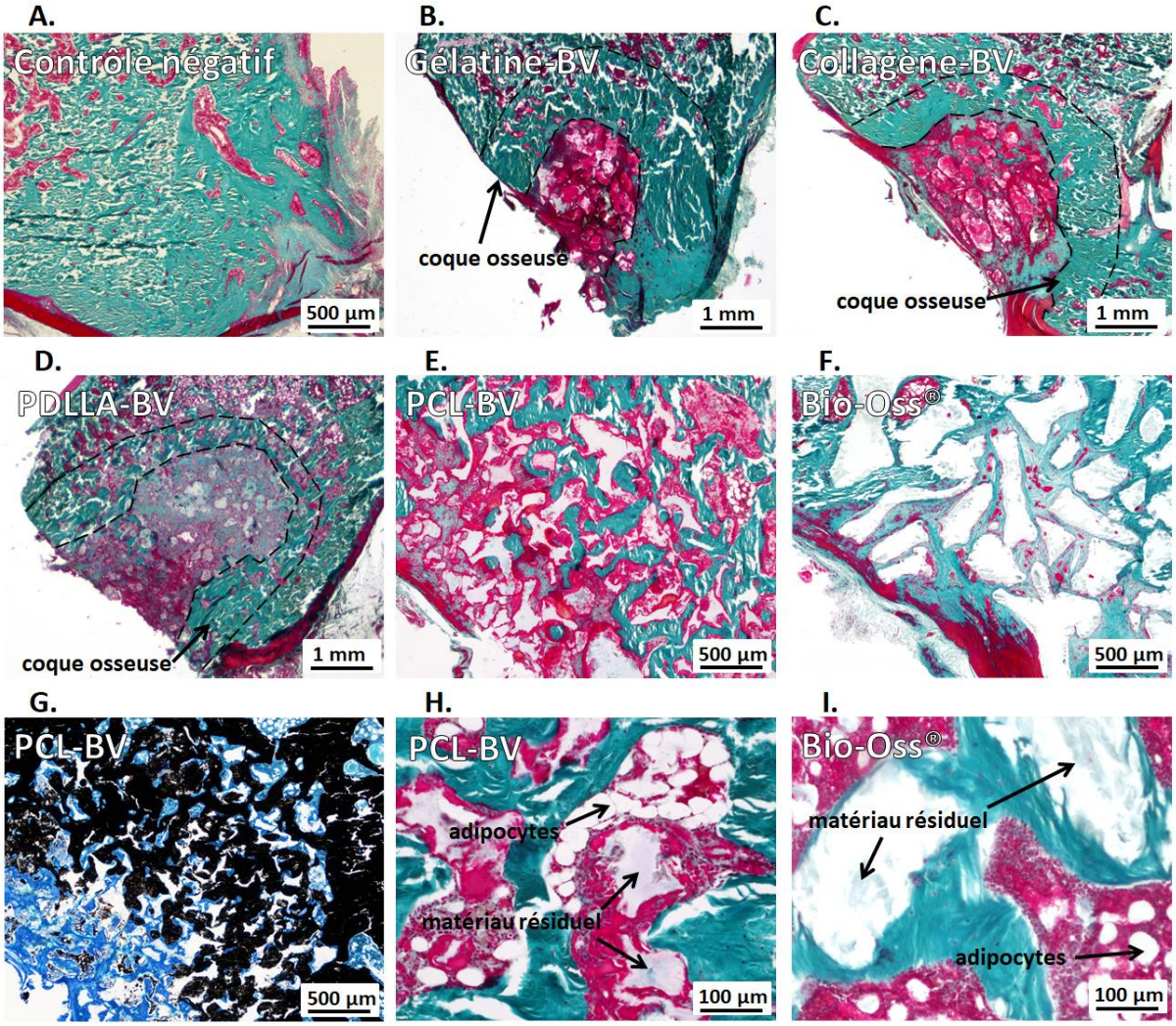


Figure 23. Observations en microscopie optique de coupes histologiques d'explants après 15 semaines, colorées selon la méthode du trichrome de Goldner (A-F, H et I) ou avec la coloration von Kossa/MacNeal (G). La coloration au trichrome de Goldner fait apparaître en bleu-vert le collagène, en rouge le cytoplasme et les globules rouges, en bleu foncé-noir les noyaux. La coloration von Kossa/MacNeal fait apparaître le calcium en noir.

inflammatoires sont impliquées dans le recrutement d'autres cellules inflammatoires et mésenchymateuses (précurseurs des ostéoblastes) et dans la stimulation de l'angiogenèse [82]. Néanmoins, une phase inflammatoire prolongée retarde les processus de revascularisation qui sont essentiels à la reconstruction osseuse [83]. Lorsque cette phase est anormalement persistante dans le temps, elle est caractérisée d'inflammation chronique et elle aboutit généralement à la formation d'un tissu conjonctif non-physiologique appelé fibrose. Ici, la quantité de fibrose reste relativement faible par rapport à la surface du défaut créé (**Figure 24-B**) ; cela signifie que l'hybride gélatine-bioverre n'induit pas d'inflammation chronique et qu'il est biocompatible. Par ailleurs, toujours d'après les observations histologiques, le défaut contient du matériau résiduel après 9 semaines d'implantation et il en contient peu après 15 semaines. Le matériau se résorbe, ce qui est illustré par les analyses histomorphométriques avec une diminution du pourcentage de matériau résiduel (**Figure 24-A**). Bien que la résorption du matériau soit une propriété recherchée, celle-ci doit être suffisamment lente pour permettre la repousse osseuse. Ici, l'os repousse en périphérie du défaut initial et une zone centrale reste non reconstruite (**Figure 23-B**). Il s'agit d'un os compact de type cortical semblable à celui observé dans le groupe contrôle négatif. Par conséquent, l'hybride gélatine-bioverre ne permet pas la régénération d'un os physiologique. La formation de cette « coque » osseuse peut être causée par deux phénomènes. La première hypothèse est la dégradation trop rapide de l'hybride qui n'assure alors pas sa fonction de support à la repousse osseuse. La deuxième hypothèse est un gonflement du matériau (la gélatine étant connue pour sa capacité à absorber l'eau) qui résulte en un amas de granules trop compact empêchant la repousse osseuse jusqu'au centre du défect. Dans le cas présent, le matériau semble se dégrader à une vitesse raisonnable et le gonflement des granules avait été constaté lors de l'implantation, c'est donc cette dernière hypothèse qui est retenue.

La morphologie de l'os néoformé est similaire avec l'hybride collagène-bioverre de classe II (**Figure 23-C**). Une « coque » osseuse se forme en périphérie du défaut initial probablement là aussi à cause du gonflement du matériau. En effet le collagène, à partir duquel est produite la gélatine, peut également absorber des quantités importantes d'eau. À cela s'ajoute une réaction inflammatoire significative après 9 semaines d'implantation, toujours présente après 15 semaines bien qu'amoindrie (**Figure 24-B**). La cinétique de dégradation de cet hybride est similaire à celle de l'hybride gélatine-bioverre (**Figure 24-A**).

L'hybride PDLLA-bioverre de classe II engendre une réaction inflammatoire conséquente après 9 et 15 semaines d'implantation, caractérisée par une proportion importante de fibrose (**Figure 24-B**) et des foyers de nécrose (**Figure 23-D**). Cette réaction inflammatoire est attribuée à la dégradation rapide de l'hybride au contact des fluides physiologiques (précédemment observée *in vitro*, cf. partie 4.1.1), avec très peu de matériau résiduel après 15 semaines d'implantation (**Figure 24-A**). La dégradation de l'hybride est d'autant plus rapide *in vivo* que les cellules inflammatoires telles que les monocytes et les macrophages tentent de résorber le matériau. Ainsi, l'hybride PDLLA-bioverre n'est pas biocompatible. De plus, la régénération osseuse est hétérogène avec une reconstruction périphérique de type coque osseuse (**Figure 23-D**). La formation de cet os non-physiologique est aussi attribuée à la dégradation trop rapide de l'hybride qui n'assure pas sa fonction de support à la repousse osseuse. Ces résultats mettent en exergue l'importance de la vitesse de résorption des substituts osseux.

Finalement, l'implantation de l'hybride PCL-bioverre conduit à une reconstruction osseuse identique à celle obtenue avec le matériau commercial référence. Peu de différences sont observées entre l'hybride de classe I et l'hybride de classe II, et les résultats seront donc présentés indépendamment de la classe de l'hybride PCL-bioverre.

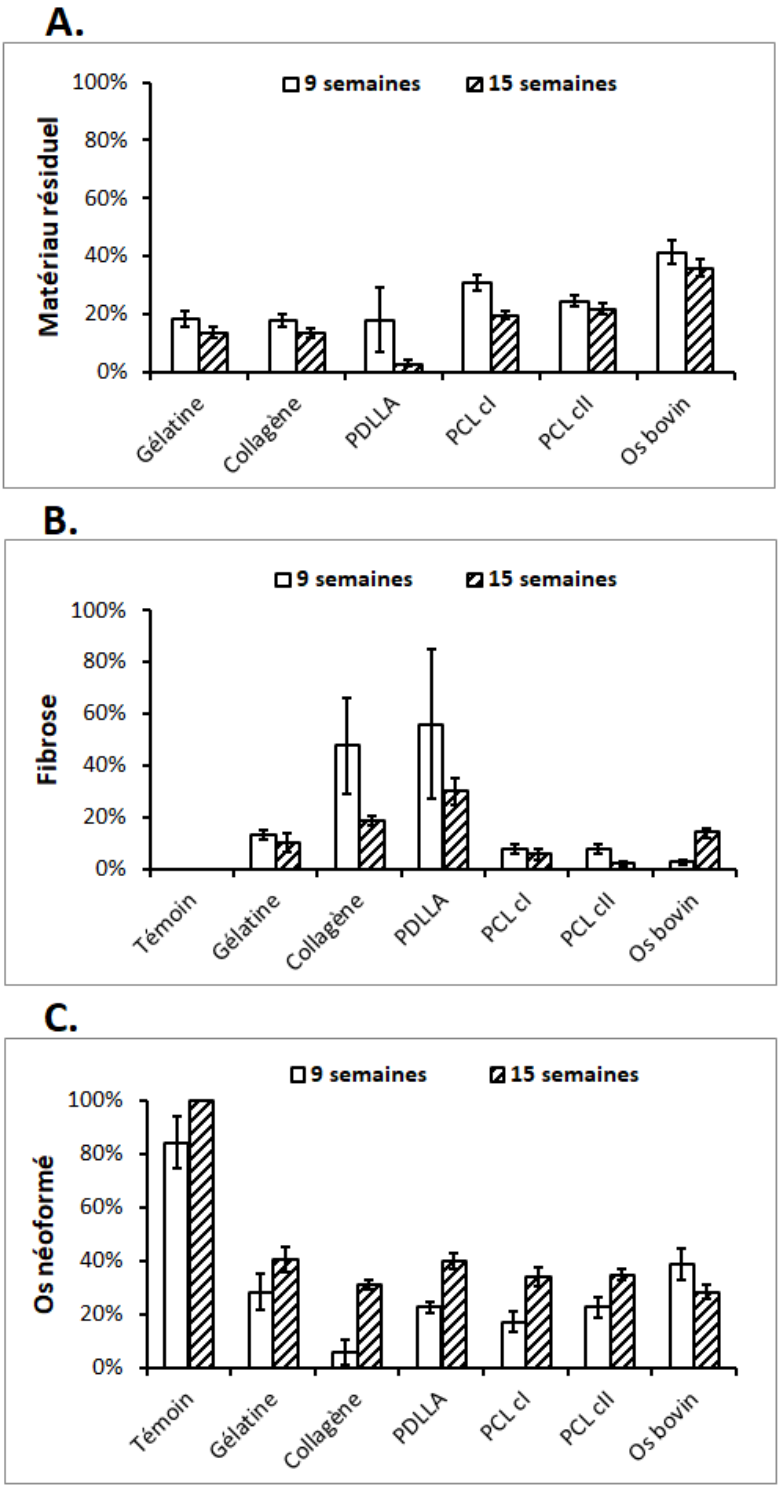


Figure 24. Pourcentages de matériau résiduel (A), de fibrose (B) et d'os néoformé (C) estimés en histomorphométrie après analyse d'images des coupes histologiques colorées au trichrome de Goldner. Les notations cI et cII désignent un hybride de classe I et de classe II, respectivement. Les analyses statistiques ne sont pas affichées afin d'améliorer la lisibilité des résultats.

4.1.3 Hybride PCL-bioverre et Bio-Oss®

La réponse inflammatoire est minimale à 9 et 15 semaines d'implantation pour l'hybride PCL-bioverre et le Bio-Oss® (**Figure 24-B**), démontrant ainsi la biocompatibilité des deux matériaux. Lorsque la cavité créée est comblée avec un de ces matériaux, un os physiologique repousse comme illustré par les nombreuses travées osseuses après 15 semaines d'implantation (**Figure 23-E, F, H et I**), et la présence de moelle osseuse et de tissu adipeux indique une reconstruction osseuse avancée. Comparé à l'os bovin, les analyses quantitatives révèlent une néoformation osseuse moindre avec l'hybride PCL-bioverre après 9 semaines d'implantation, mais légèrement supérieure après 15 semaines (**Figure 24-C**). Dans leur globalité, les deux matériaux ont des performances *in vivo* proches. Ils se différencient principalement par leur vitesse de résorption. En effet, l'hybride PCL-bioverre semble être partiellement dégradé après 9 semaines d'implantation et encore plus après 15 semaines (**Figure 23-E et H**), tandis que l'os bovin est à peine dégradé (**Figure 23-F et I**). L'histomorphométrie confirme ces observations dans la mesure où le défect contient significativement moins de matériau résiduel après 15 semaines d'implantation quand l'hybride est utilisé à la place du Bio-Oss® (**Figure 24-A**). Ces résultats étaient de fait attendus étant donné la faible résorbabilité du Bio-Oss®. Pour conclure, la capacité de l'hybride PCL-bioverre à se résorber est une qualité permettant d'envisager une cicatrisation complète du défect à plus long terme.

L'histologie a été complétée par des analyses élémentaires dans le but de suivre la transformation *in vivo* de l'hybride PCL-bioverre (**Figure 25**). L'imagerie quantitative a été effectuée par micro-faisceau d'ions (PIXE) sur des coupes histologiques non-colorées issues de l'échantillon hybride PCL-bioverre après 15 semaines d'implantation. La **Figure 25-A** montre que les compositions inorganiques du matériau résiduel, des espaces inter-trabéculaires et des travées osseuses sont similaires et ressemblent à celle de l'os natif. Seulement 5 % massique de silicium subsiste dans la phase inorganique de l'hybride au lieu des 30 % massiques initiaux, et sa faible concentration dans les travées osseuses et les espaces inter-trabéculaires suggère qu'il a été efficacement éliminé du site d'implantation. Lai *et al.* ont d'ailleurs prouvé que dans le lapin, le silicium relargué par les bioverres dans les tissus osseux est ensuite excrété par l'urine sans effets physiologiques nocifs [84]. D'après la **Figure 25-B**, le matériau résiduel est fortement minéralisé avec un ratio atomique Ca/P proche de celui des travées osseuses (1,8 et 1,7 respectivement). La transformation du matériau en apatite biomimétique révèle une potentielle bioactivité de l'hybride PCL-bioverre.

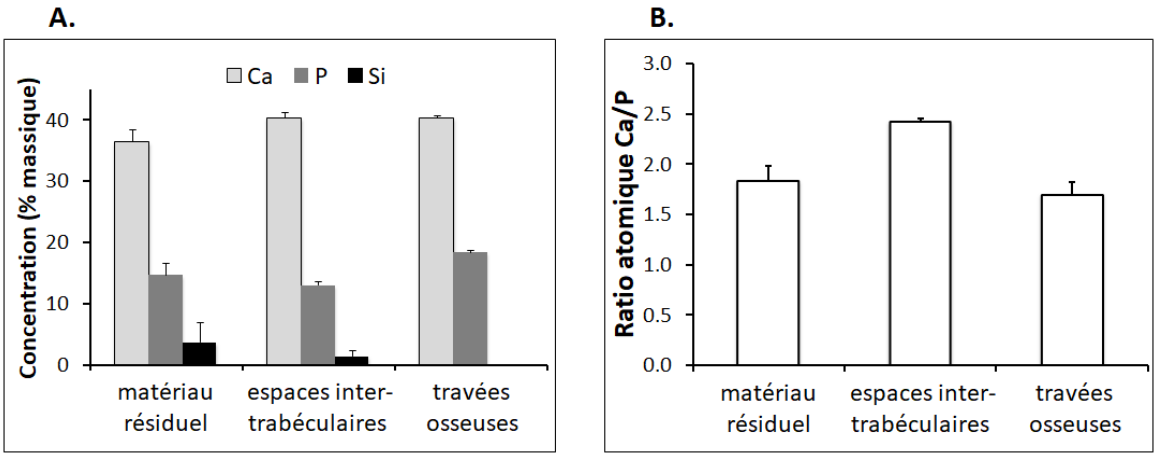


Figure 25. Mesures en PIXE de la composition inorganique (A) et du ratio atomique Ca/P (B) de différentes zones du défect reconstruit après 15 semaines d'implantation des granules hybrides PCL-bioverre.

Ces résultats démontrent que l'hybride PCL-bioverre et le Bio-Oss® ont des performances *in vivo* proches en matière de reconstruction osseuse et de biocompatibilité ; cependant, l'hybride surpasse l'os bovin pour ce qui est de la résorption et de la bioactivité. Par conséquent, l'hybride PCL-bioverre semble être un candidat prometteur pour la régénération osseuse. Il est à noter que dans cette étude, les synthèses ne sont pas optimisées. Ainsi, même si l'étude met en avant la pertinence du PCL en tant que constituant organique des hybrides à base de bioverre, les autres polymères demeurent des candidats potentiellement intéressants.

4.2 Collagène hydrolysé

Suite à cette étude animale, un autre polymère a été suggéré par la collaboration INRA-LPC. Il s'agit du « collagène hydrolysé » qui, contrairement à la gélatine et au collagène, ne gonfle pas au contact des fluides physiologiques. Ainsi le collagène hydrolysé, qui n'est pas à proprement parlé du collagène mais plutôt un polypeptide, présente les avantages de ces polymères naturels (nombreuses espèces nucléophiles pour la synthèse d'hybride de classe II) mais ne gonfle pas en milieu aqueux grâce à son faible poids moléculaire. Par ailleurs, le collagène hydrolysé a été l'objet d'une thèse à l'INRA dans l'Unité de Nutrition Humaine (UNH UMR1019 INRA Theix) au cours de laquelle son potentiel ostéogénique a été démontré : il stimule l'activité des ostéoblastes, il améliore l'absorption du calcium et il possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes [85]. De plus, tout comme la gélatine et le collagène, le collagène hydrolysé possède des séquences d'acides aminés qui servent de récepteur aux intégrines et favorisent de ce fait l'adhésion cellulaire. Au vue des propriétés biologiques (ostéogénique, adhésion cellulaire) et physico-chimiques (pas de gonflement, groupements nucléophiles) du collagène hydrolysé, il a été décidé de synthétiser des scaffolds d'hybride collagène hydrolysé-bioverre.

La synthèse de scaffolds d'hybride collagène hydrolysé-bioverre est décrite dans cette partie. Le développement de cette synthèse s'est accompagné de nombreux obstacles qui ont permis de mettre en lumière les paramètres clefs de la synthèse d'hybrides organominéraux et de leur élaboration en scaffolds (cf. chapitre 2). En particulier, l'accent sera mis sur le choix du solvant utilisé pour dissoudre le polymère, la concentration du polymère dans le solvant choisi, la centrifugation employée pour infiltrer le sol hybride dans l'empilement de billes, le couple billes-dissolvant et les conditions de séchage des scaffolds.

Le collagène hydrolysé est produit à partir du collagène. Le collagène est une protéine composée de trois chaînes polypeptidiques (**Tableau 5**), reliées entre elles par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes. Il est généralement extrait de la peau de porc ou de bœuf. L'hydrolyse partielle du collagène brise les liaisons intermoléculaires et mène à la dissociation des brins ; la gélatine est alors obtenue. L'hydrolyse avancée de la gélatine conduit ensuite à la rupture de liaisons peptidiques, et les brins initialement constitués de plus d'un millier d'acides aminés sont décomposés en peptides d'une vingtaine d'acides aminés ; le collagène hydrolysé est ainsi obtenu.

Grade	Représentation schématique	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau
Collagène		~300 000	Soluble entre pH 1 et pH 3
Gélatine		> 50 000	Soluble à T > 40°C
Collagène hydrolysé		< 3 000	Soluble

Tableau 5. Tableau comparatif entre le collagène, la gélatine et le collagène hydrolysé.

4.2.1 Problématique

Le collagène hydrolysé a une structure chimique proche de celle de la gélatine et il diffère surtout par la longueur de ses chaînes (cf. masses moléculaires, **Tableau 5**). Il a donc été décidé de s'inspirer de la synthèse de l'hybride gélatine-bioverre qui avait été adoptée lors de l'étude animale. Le collagène hydrolysé est dissout dans l'eau, puis mélangé au sol de bioverre. Le sol hybride résultant ressemble à celui obtenu avec la gélatine, à savoir qu'il contient des particules blanches qui lui donnent une couleur blanche et un aspect opaque (**Figure 26-A**). Après homogénéisation par agitation et ultrasons, le sol hybride est versé sur un empilement de billes en poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) et le tout est ensuite centrifugé à 3900 tr/min pendant 3 min. Alors que cette centrifugation suffisait à infiltrer le sol hybride gélatine-bioverre dans l'empilement de billes, elle ne permet pas l'infiltration du sol hybride collagène hydrolysé-bioverre. En effet, on observe un dépôt blanc sur l'empilement de billes, au-dessus duquel surnage une solution limpide (**Figure 26-B**). La formation de ce bouchon est également observée avec des vitesses et des temps de centrifugation variés. Il semble donc que les particules blanches contenues dans le sol hybride ne puissent pas pénétrer dans les interstices de l'empilement de billes et s'amassent sur celui-ci. Cela amène un certain nombre d'interrogations : quelles sont ces particules ? pourquoi apparaissent-elles ? peut-on éviter leur formation ? Ces questions avaient déjà été soulevées lors de l'élaboration des hybrides gélatine-bioverre, puisque même si la présence de ces particules ne faisait pas obstacle à la fabrication de scaffolds d'hybride gélatine-bioverre, elle remettait en cause l'obtention d'un véritable hybride – une dispersion de particules menant généralement à un composite. De plus, des analyses au microscope électronique à transmission (MET) semblent indiquer une structure composite de « l'hybride » gélatine-bioverre (**Figure 27, à gauche**), celui-ci étant constitué d'une dispersion de nanoparticules dans une matrice gélatine (un cliché de l'hybride PDLLA-bioverre est affiché à droite à titre de comparaison).

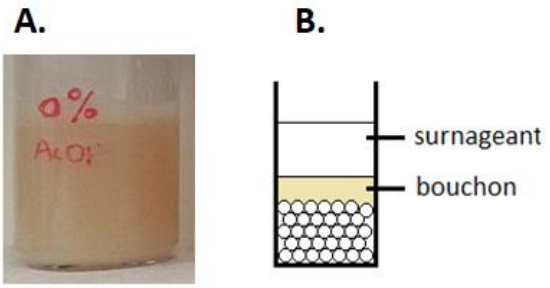


Figure 26. Sol hybride collagène hydrolysé-bioverre (A). Représentation schématique du bouchon obtenu après centrifugation du sol hybride collagène hydrolysé-bioverre (B).

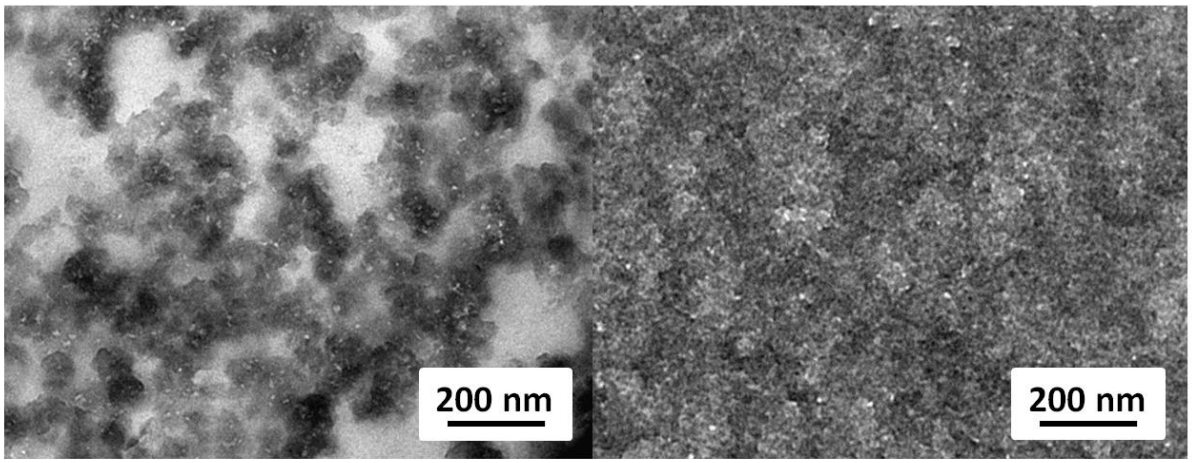


Figure 27. Gels hybrides gélatine-bioverre (à gauche) et PDLLA-bioverre (à droite) vus au microscope électronique à transmission.

Les particules blanches se forment lorsque le sol de bioverre est ajouté au collagène hydrolysé (ou à la gélatine) solubilisé. Elles peuvent provenir soit de la précipitation du collagène hydrolysé qui n'est pas soluble dans le sol de bioverre (majoritairement de l'éthanol), soit de la précipitation du bioverre qui n'est pas soluble dans la solution du polymère (majoritairement de l'eau). Or, des essais d'ajout montrent que l'introduction d'éthanol absolu dans la solution du polymère n'a pas d'impact sur sa limpidité, tandis que l'introduction du sol de bioverre dans l'eau distillée se traduit par la précipitation de particules. Ainsi, les particules sont identifiées comme étant du verre bioactif qui précipite dans l'eau. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le processus d'hydrolyse-condensation est extrêmement sensible à l'eau et que l'on introduit ici un sol de bioverre quasiment anhydre dans une grande quantité d'eau. Il apparaît donc que le solvant utilisé pour dissoudre le collagène hydrolysé n'est pas adapté à la synthèse d'hybrides à base de verre bioactif. Il est nécessaire de sélectionner un solvant ou un mélange de solvants approprié.

4.2.2 Choix du solvant

Les solubilités du collagène hydrolysé et du sol de bioverre sont étudiées dans plusieurs mélanges de solvants choisis à partir de la littérature (**Figure 28**) : un mélange acide fort (HCl)-eau, et les mélanges éthanol-eau, glycérol-eau [86] et acide faible (acide acétique)-eau [87-89]. Malgré les inconvénients liés à l'introduction d'eau, celle-ci demeure un solvant efficace du collagène hydrolysé et facilite par conséquent sa mise en solution dans les solvants précités. Par ailleurs, on constate que le verre bioactif est soluble dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique dont la concentration est supérieure à 2 mol/L (pH < 0). En réalité, il semble que le bioverre précipite avant de se re-dissoudre rapidement. Cela signifie que, bien que l'eau engendre la précipitation du bioverre, la mise en solution de ce dernier reste possible grâce à des conditions très acides. Néanmoins, un pH inférieur à 1 provoque l'hydrolyse des liaisons peptidiques et réduit ainsi la masse moléculaire du collagène hydrolysé. La dégradation du collagène hydrolysé au cours du procédé sol-gel est à éviter car elle peut se traduire par une altération de ses propriétés biologiques. Par conséquent, l'acide chlorhydrique en milieu aqueux n'est pas retenu comme solvant.

On constate également qu'il n'existe pas de mélange éthanol-eau ni de mélange glycérol-eau dans lesquels le collagène hydrolysé et le verre bioactif sont tous les deux solubles. Ces deux mélanges ne sont donc pas retenus comme solvant.

Finalement, le collagène hydrolysé et le bioverre présentent une solubilité commune dans des mélanges acide acétique (acide organique faible)-eau contenant au moins 30 % volumique d'acide acétique. Toutefois, il est intéressant de noter que lorsque le sol de bioverre est introduit dans ces mélanges, il gélifie instantanément avant de se re-dissoudre en quelques minutes, comme observé avec un acide fort comme HCl. Cette gélification a aussi lieu dans l'acide acétique pur (anhydre) et se distingue de la précipitation de particules blanches observées lors de l'ajout du sol de bioverre dans l'eau. Elle est probablement causée par le brusque changement de pH, le sol de bioverre ayant un pH entre 6 et 7 et l'acide acétique un pKa de 4,76 à 25°C. En effet, le pH est dans les réactions sol-gel un paramètre tout aussi important que le taux d'hydrolyse (ratio molaire H_2O/TEOS) et il influe

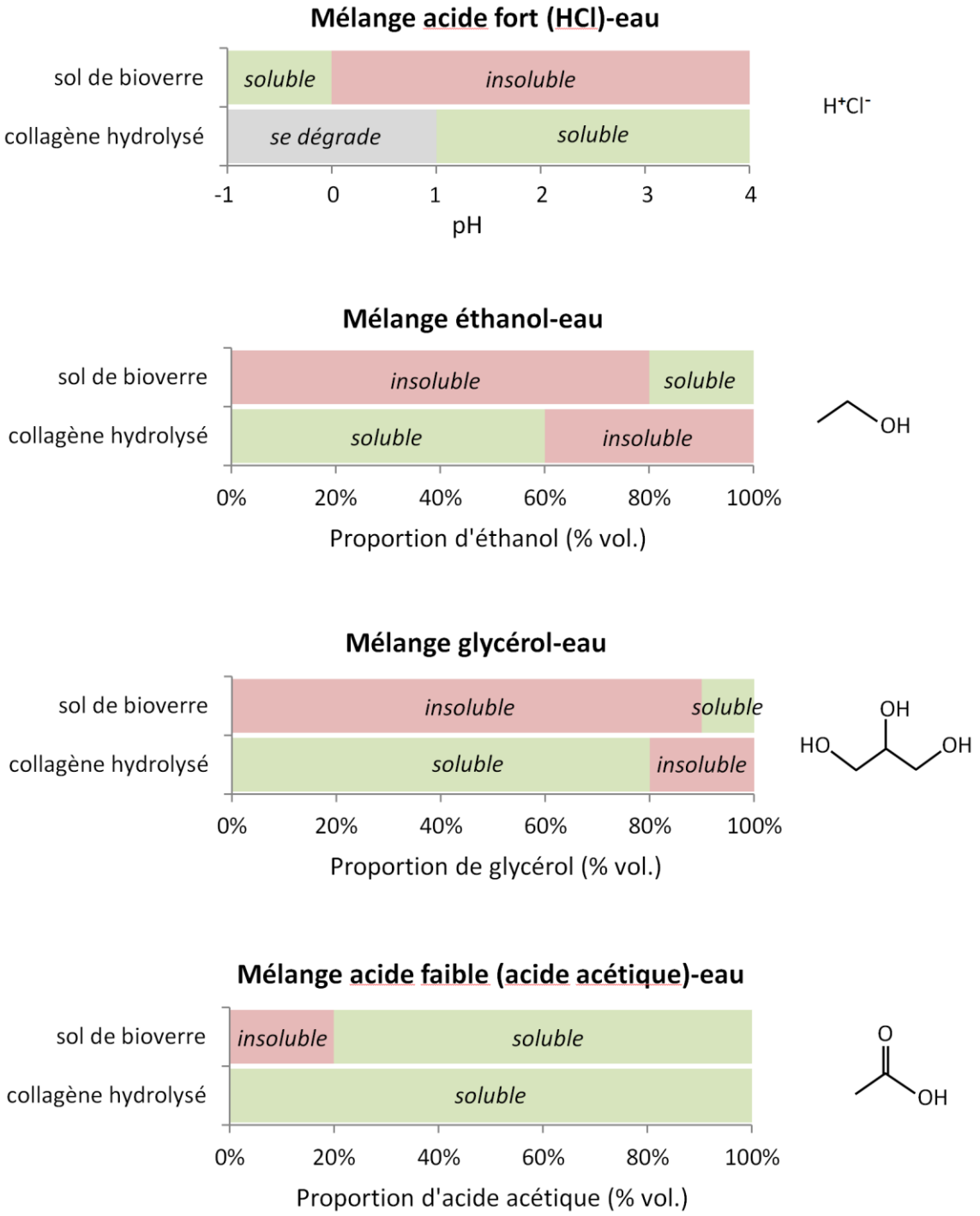
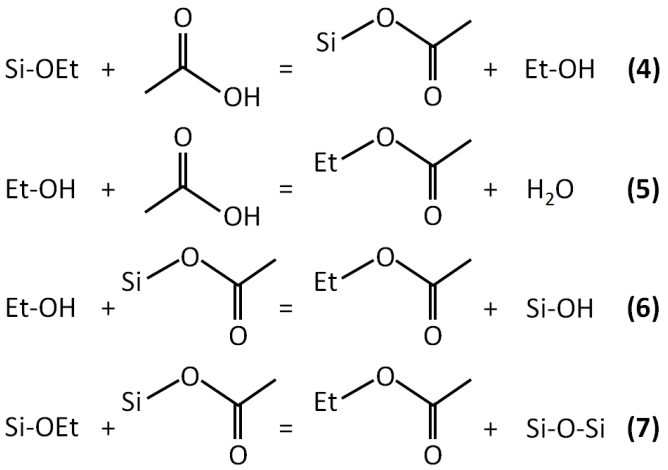


Figure 28. Solubilité du sol de bioverre et du collagène hydrolysé dans différents mélanges de solvants.

notamment sur les vitesses d'hydrolyse et de condensation [37]. La solvolyse avec l'acide acétique peut aussi être responsable de cette gélification prématurée, sachant qu'elle permet la condensation du réseau silicate par le biais de plusieurs réactions (**équations 4 à 7**) et ce en absence d'eau [90]. La mise sous agitation de la solution s'accompagne de la dissolution du gel précipité, certainement dû à l'homogénéisation du pH ou à l'atteinte de l'équilibre thermodynamique des réactions de solvolyse. Pour conclure, ce mélange de solvants apparaît comme un potentiel candidat étant donné qu'il autorise la mise en solution du collagène hydrolysé et celle du bioverre dans une certaine mesure. En outre, des analyses en chromatographie - spectrométrie de masse réalisées en collaboration avec l'INRA démontrent que l'acide acétique ne dégrade pas le collagène hydrolysé.



Afin de vérifier le potentiel du mélange acide acétique-eau, des solutions hybrides sont préparées. Le collagène hydrolysé est dissout à une concentration de 0,15 g/mL dans le mélange en question, puis le sol de bioverre est ajouté de sorte à atteindre une composition massique de 70 % polymère - 30 % bioverre. Les solutions hybrides obtenues après homogénéisation sont représentées **Figure 29-A**. La limpidité de la solution se révèle dépendante de la proportion d'eau contenue dans le mélange acide acétique-eau : le sol hybride est blanc opaque pour l'eau, puis opaques à troubles pour les mélanges constitués de 10 % à 70 % d'acide acétique, et enfin limpide pour le mélange à 90 % d'acide acétique et pour l'acide acétique pur. Ces résultats confirment que l'eau est bien à l'origine de l'hétérogénéité du sol hybride décrite précédemment. L'expérience est aussi réalisée avec la gélatine et conduit aux mêmes observations (**Figure 29-B**). Pour la première fois, un gel hybride gélatine-bioverre transparent est obtenu (**Figure 29-C**), ce qui est un bon indice de la forte intrication des domaines organiques et inorganiques. Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser des analyses au MET sur les matériaux conçus afin de vérifier la structure hybride attendue.

Les solutions hybrides limpides sont ensuite coulées sur l'empilement de billes et centrifugées. Elles s'infiltrent dans l'empilement sans qu'un bouchon ne se forme, ce qui permet de valider l'hypothèse de la formation de colloïdes micrométriques pour les hybrides collagène hydrolysé-bioverre préparés avec de l'eau, responsables de la mauvaise infiltration du sol à travers l'empilement de billes dont les interstices sont de l'ordre de la dizaine de µm. Pour conclure, cette étude a permis d'identifier deux solvants adaptés à la synthèse de scaffolds d'hybride collagène hydrolysé (ou gélatine)-bioverre, à savoir le mélange 90 % acide acétique - 10 % eau et l'acide acétique pur. Dans la suite, l'acide acétique pur sera utilisé comme solvant du collagène hydrolysé.

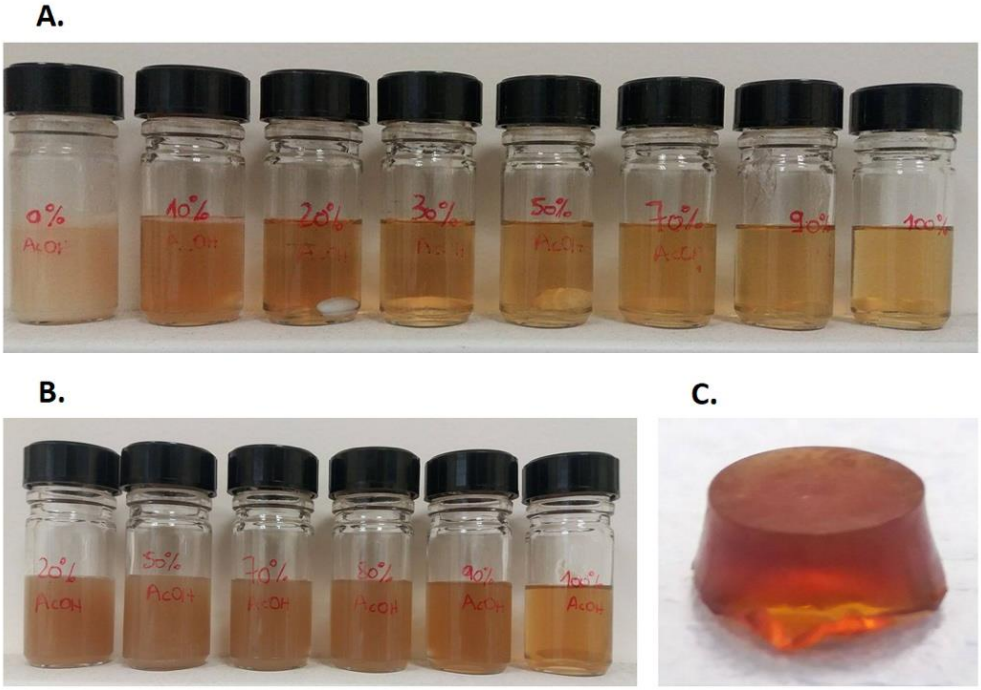


Figure 29. Solutions hybrides collagène hydrolysé-bioverre (A) et gélatine-bioverre (B) préparées dans différents mélanges acide acétique-eau. Gel hybride gélatine-bioverre (C).

4.2.3 Quantité de solvant

Il est maintenant question d'optimiser la concentration du sol hybride. D'une part, plus celui-ci est dilué, moins il y aura de matière dans les interstices de l'empilement de billes et plus les murs du scaffold seront étroits. Or, des murs fins résultent en de faibles propriétés mécaniques. D'autre part, sur un aspect pratique, les sols hybrides faiblement concentrés ont des temps de gélification significativement plus longs pouvant atteindre plusieurs semaines. L'objectif est donc de synthétiser un sol hybride le plus concentré possible.

La concentration du sol hybride est ajustable à travers la concentration de la solution du polymère, c'est-à-dire à travers la quantité d'acide acétique utilisée pour dissoudre le collagène hydrolysé. Jusque-là, les sols hybrides étaient synthétisés à partir d'une solution de collagène hydrolysé à 0,15 g/mL de solvant. Comme illustré **Figure 30-A**, le collagène hydrolysé est soluble dans l'acide acétique à hauteur de 0,75 g/mL. En prenant en compte cette limite, trois sols hybrides sont préparés à partir de solutions de collagène hydrolysé de différentes concentrations : 0,30 g/mL, 0,45 g/mL et 0,60 g/mL. Les solutions obtenues après quelques minutes d'homogénéisation sont représentées **Figure 30-B**. Le premier sol (0,30 g/mL) est homogène et translucide, alors que ce qui paraît être du verre bioactif gélifié surnage pour les sols plus concentrés. Après trente minutes d'agitation supplémentaires, le gel de bioverre est entièrement dissout dans le deuxième sol (0,45 g/mL) ; en revanche, la viscosité de ce sol hybride est telle qu'il n'est pas possible de le couler sur l'empilement de billes. Le troisième sol (0,60 g/mL) demeure quant à lui hétérogène, les grumeaux ne semblant pas se dissoudre. Par conséquent, la concentration de 0,30 g de collagène hydrolysé par mL d'acide acétique ressort comme la plus pertinente pour l'élaboration de scaffolds.

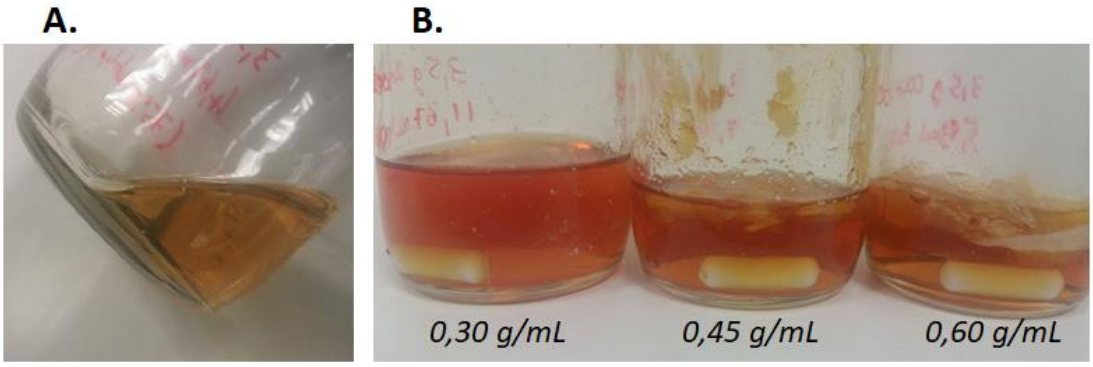


Figure 30. Collagène hydrolysé dissout dans l'acide acétique à une concentration de 0,75 g/mL (A). Solutions hybrides de collagène hydrolysé-bioverre (B) ; le collagène hydrolysé est préalablement dissout dans l'acide acétique à des concentrations de 0,30 g/mL, 0,45 g/mL et 0,60 g/mL.

4.2.4 Centrifugation

La centrifugation à 3900 tr/min pendant 3 min permet d'infiltrer la solution hybride dans l'empilement de billes. Cependant, l'infiltration s'avère trop prononcée : le sol hybride pénètre en-dessous de l'empilement de billes qui se décolle du fond du moule (**Figure 31-A**). Même si l'empilement est infiltré, il est fragile et son déplacement risque de le détériorer et d'altérer la structure poreuse du scaffold. Il apparaît de fait moins compact après centrifugation, suggérant ainsi que les billes partiellement fusionnées se sont détachées les unes des autres (la fusion des billes conditionne l'interconnectivité du scaffold). Ces paramètres de centrifugation convenaient à l'infiltration du sol hybride gélatine-bioverre lorsque la gélatine était solubilisée dans l'eau. Si l'infiltration est ici trop importante, c'est en partie dû à la masse volumique plus élevée de l'acide acétique (1,05 g/cm^3 contre 1,00 g/cm^3 pour l'eau) et surtout à un sol hybride plus concentré (cf. partie 4.2.3) qui contribuent à un sol hybride plus dense. En centrifugeant à 400 ou 500 tr/min pendant 1 min, les billes se disséminent dans le sol et le matériau obtenu après gélification contient des zones sans porogène (**Figure 31-B**). En centrifugeant à 100, 200 et 300 tr/min pendant 1 min, les billes restent au fond du moule et l'empilement est infiltré. Ce sont donc ces derniers paramètres qui sont retenus pour cette étape du procédé.

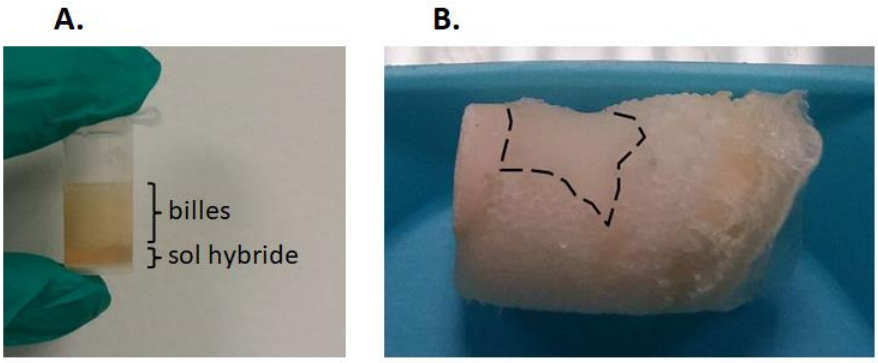


Figure 31. Sol hybride collagène hydrolysé-bioverre infiltré dans l'empilement de billes par centrifugation à 3900 tr/min pendant 3 min (A). Matériau obtenu après gélification du sol hybride infiltré par centrifugation à 500 tr/min (B). Les pointillés désignent une zone sans porogène.

4.2.5 Couple billes-dissolvant

Après l'étape de centrifugation, le sol hybride infiltré est laissé jusqu'à gélification. Le matériau obtenu est ensuite plongé dans l'acétone pendant 24 heures dans le but d'éliminer les billes porogènes en PMMA. Suite à ce premier bain, l'acétone est renouvelée et l'opération est répétée deux fois. Le scaffold ainsi fabriqué est finalement rincé dans l'éthanol absolu pendant 24 heures puis séché sous vide afin d'éliminer les solvants utilisés au cours du procédé (acide acétique, acétone, éthanol). Le scaffold produit est illustré sur la **Figure 32**. Il est transparent, difforme et non-poreux. Pourtant, le matériau était parfaitement cylindrique avant d'être soumis aux bains d'acétone. Il semble donc que l'étape de dissolution des billes soit à l'origine de la déformation des scaffolds. En se basant sur cette hypothèse, l'influence du couple billes-dissolvant (qui était ici PMMA-acétone) est investiguée.

Figure 32. Scaffold d'un hybride collagène hydrolysé-bioverre fabriqué à partir de billes en PMMA.

Pour cette étude, les couples billes-dissolvant comprennent des billes en PMMA ou en paraffine et comme dissolvant l'acétone, le cyclohexane, le tétrahydrofurane (THF) ou le chloroforme ($CHCl_3$). Les billes en paraffine ne sont pas disponibles commercialement et sont fabriquées selon les travaux de Ma *et al* [91] : la paraffine est solubilisée dans l'eau à 80°C et émulsifiée sous agitation à l'aide de gélatine qui fait office de tensioactif ; l'émulsion est ensuite versée dans l'eau froide, ce qui a pour effet de figer les gouttelettes de paraffine ; enfin, les billes en paraffine sont tamisées de façon à ne conserver que la fraction granulométrique d'intérêt. Dans cette étude, la fraction 400-600 µm est utilisée.

Le couple billes-dissolvant doit satisfaire à trois conditions :

1) le sol hybride (constitué d'éthanol et d'acide acétique) ne doit pas dégrader les billes,
2) le dissolvant doit dissoudre les billes,
3) le dissolvant ne doit pas dégrader l'hybride.

Tout d'abord, aucun des quatre dissolvants proposés ne dissout le collagène hydrolysé (**Tableau 6 en vert**), ce qui est un premier pas vers l'observance de la condition 3. En revanche, les couples paraffine-acétone et PMMA-cyclohexane sont retirés de la liste étant donné que l'acétone ne dissout pas la paraffine et que le cyclohexane ne dissout pas le PMMA (règle 2, **Tableau 6 en bleu**). Également, l'acide acétique – constituant en partie le sol hybride – dissout les billes PMMA (règle 1, **Tableau 6 en rouge**), ce qui explique l'aspect étrange des scaffolds fabriqués à partir du couple PMMA-acétone. Des scaffolds semblables sont obtenus à partir des couples PMMA-THF et PMMA-$CHCl_3$, confirmant ainsi l'inadéquation entre ce sol hybride et les billes PMMA. Pour finir, le couple paraffine-$CHCl_3$ n'est pas retenu car le matériau composite gel hybride-billes flotte dans le chloroforme, ce qui empêche l'élimination efficace du porogène.

	Éthanol	AcOH	Acétone	Cyclohexane	THF	$CHCl_3$
Billes en paraffine	Non-dissoutes	Non-dissoutes	Non-dissoutes	Dissoutes	Dissoutes	Dissoutes
Billes en PMMA	Non-dissoutes	Dissoutes	Dissoutes	Non-dissoutes	Dissoutes	Dissoutes
Collagène hydrolysé	-	-	Non-dissout	Non-dissout	Non-dissout	Non-dissout

Tableau 6. Étude du couple billes-dissolvant.

En résumé, les couples billes-dissolvant retenus sont paraffine-cyclohexane et paraffine-THF. Les scaffolds obtenus après rinçage dans l'éthanol sont représentés sur la **Figure 33**. On constate que les bains dans le cyclohexane conduisent à un écrasement de la mousse sur elle-même (**Figure 33-A**), tandis que les bains dans le THF résultent en un scaffold cylindrique dont les dimensions initiales sont conservées (**Figure 33-B**). Cependant, le scaffold subit au final une rétraction similaire lors du séchage (**Figure 33-C, à gauche**). Les causes possibles du retrait sont discutées au paragraphe suivant.

4.2.6 Séchage

D'après la littérature, le séchage est une étape cruciale dans l'élaboration de gels par chimie douce puisqu'il entraîne un retrait pouvant excéder les 50 % [37, 92]. Ce retrait peut par exemple provenir des forces capillaires : lorsque le solvant s'évapore, la quantité de liquide dans un pore diminue progressivement et la tension superficielle du liquide induit des forces de traction grandissantes sur les parois du pore ; il s'ensuit une rétraction de la structure et une diminution de la taille du pore. Afin de vérifier l'influence du séchage, un scaffold fabriqué à partir du couple paraffine-THF est vidé de l'éthanol piégé dans ses macropores *via* une entaille et au moyen de papier absorbant. Comme le suggère la **Figure 33-C (à droite)**, le scaffold subit un retrait moindre. Malheureusement ce résultat n'a pas pu être réitéré, l'éthanol s'écoulant difficilement hors du scaffold à cause de la capillarité.

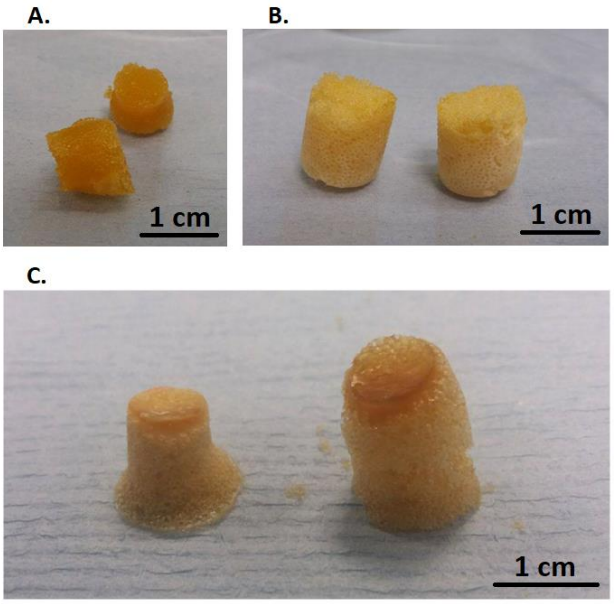


Figure 33. Scaffolds d'un hybride collagène hydrolysé-bioverre fabriqués à partir de billes en paraffine dissoutes dans le cyclohexane (A) ou le THF (B), après rinçage à l'éthanol absolu et avant séchage. Scaffolds obtenus à partir de THF après séchage (C) ; la majorité de l'éthanol contenu dans le scaffold de droite est préalablement extraite.

L'idéal serait d'éliminer l'éthanol à travers un séchage supercritique ou par lyophilisation (**Figure 34**). Le séchage supercritique consiste à contourner la transition directe liquide-gaz en soumettant le solvant à des conditions de pression et de température supérieures à ses valeurs critiques. Le solvant passe alors par un état de fluide supercritique au cours duquel la distinction entre liquide et gaz cesse d'exister. La lyophilisation consiste quant à elle à congeler le solvant puis à le sublimer. Ces deux techniques permettent d'éviter la présence d'une interface liquide-gaz, les forces capillaires et donc le retrait. Néanmoins, le séchage supercritique requiert généralement des températures qui ne sont pas compatibles avec le matériau hybride. En particulier, la température critique (T_c) de l'éthanol s'élève à 240°C [93]. Il faudrait alors envisager de remplacer l'éthanol par des composés tels que l'anhydride carbonique (T_c = 31°C), l'éthane (T_c = 32°C) ou encore l'éthylène (T_c = 9°C) qui ont l'inconvénient de se présenter sous forme gazeuse dans des conditions normales de température et de pression.

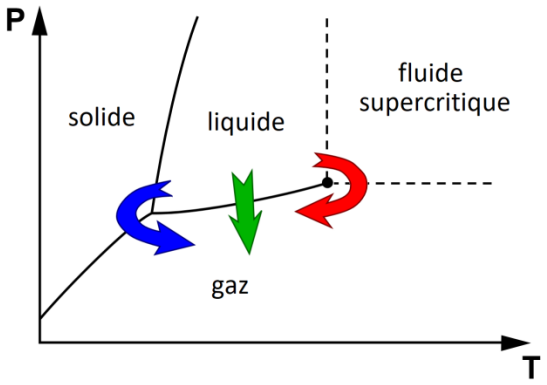


Figure 34. Exemple de diagramme de phase représentant le séchage ordinaire (en vert), le séchage supercritique (en rouge) et la lyophilisation (en bleu).

4.2.7 Conclusion

L'optimisation de plusieurs paramètres ont permis la fabrication de scaffolds d'un hybride collagène hydrolysé-bioverre. Notamment, le choix du solvant utilisé pour solubiliser le polymère s'est révélé comme un paramètre décisif dans l'obtention d'un sol hybride homogène. Également, le séchage s'est avéré problématique, et bien que des méthodes de séchage aient été suggérées, elles nécessitent l'achat d'équipements et n'ont par conséquent pas été envisagées outre mesure.

Les scaffolds fabriqués possèdent des propriétés mécaniques faibles et se dissolvent rapidement dans l'eau. Il est effectivement nécessaire de les manipuler avec délicatesse, sans quoi ils tendent à se briser. Cela est probablement dû aux courtes chaînes du polymère (M_n = 3 000 g/mol). Des scaffolds fabriqués à partir d'un collagène moins hydrolysé (M_n = 15 000 g/mol) paraissent d'ailleurs plus rigides et sont plus facilement manipulables ; néanmoins, les propriétés biologiques de ce polypeptide ne sont pas connues. De même, la réalisation d'un hybride de classe II permettrait d'améliorer grandement les propriétés mécaniques du matériau. L'établissement de liaisons chimiques fortes entre les réseaux organiques et inorganiques résulteraient en outre en une solubilité réduite de l'hybride en milieux aqueux, tel que cela avait été observé pour les hybrides gélatine-bioverre. Pour résumer, les scaffolds d'hybride collagène-bioverre nécessitent encore un travail d'optimisation au niveau du séchage et du couplage organique-inorganique.

En parallèle de cette étude, le développement de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre apporte des résultats satisfaisants en termes de synthèse et de propriétés physico-chimiques et biologiques. Le collagène hydrolysé avait été proposé comme alternative au PCL par rapport aux nombreux groupements nucléophiles qu'il contient (en vue de réaliser un hybride de classe II) et pour sa capacité à promouvoir l'ostéogénèse et à faciliter l'adhésion cellulaire. Il est à noter que de faibles concentrations en collagène hydrolysé suffisent à engendrer son activité biologique. Ainsi, il a été décidé de poursuivre ce travail de thèse sur l'hybride à base de PCL ; le collagène hydrolysé pourra éventuellement être incorporé en faible proportion dans la trame organique de l'hybride afin de stimuler son potentiel ostéogénique. Ce dopage organique sera présenté au chapitre 7 et s'inspirera du procédé développé pour la synthèse d'hybride collagène-bioverre.

CHAPITRE 5 SYNTHESE DE SCAFFOLDS D'HYBRIDE POLYCAPROLACTONE-BIOVERRE DE CLASSE I

Dans le chapitre précédent, le polycaprolactone (PCL) a été retenu comme constituant organique de l'hybride à base de verre bioactif. Ainsi, la suite de la thèse porte sur l'élaboration et l'optimisation de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre. Ce chapitre présente l'optimisation de la synthèse de scaffolds d'hybride PCL-bioverre de classe I. Contrairement à celle de l'hybride collagène hydrolysé-bioverre, la synthèse de l'hybride PCL-bioverre avait déjà été développée lors du projet de maturation. Les paramètres de synthèse étaient les suivants :

- Solvant : tétrahydrofurane (THF)
- Quantité de solvant : le PCL est dissout à une concentration de 18,0 g/mL dans le THF
- Centrifugation : 3900 tr/min pendant 3 min
- Couple billes-dissolvant : billes en paraffine-cyclohexane
- Séchage : sous vide

Bien qu'à ce stade la synthèse ne soit pas optimisée, les scaffolds possèdent d'ores et déjà des caractéristiques prometteuses. Du point de vue structurel, ils subissent un retrait peu conséquent avoisinant 10 %. Du point de vue mécanique, ils sont suffisamment rigides pour autoriser une manipulation non-destructive et ils se découpent facilement au scalpel sans se désagréger. Du point de vue de la dégradation, l'hybride se résorbe à une vitesse adaptée à la repousse osseuse comme cela a été observé *in vivo* (cf. partie 4.1.3).

En termes d'optimisation, il a d'abord été envisagé de réaliser un bioverre ternaire SiO_2-CaO-P_2O_5 (possédant potentiellement une meilleure bioactivité que le système binaire) en tant que phase inorganique de l'hybride. De façon analogue aux travaux de thèse de Jonathan Lao [70], le phosphate de triéthyle $OP(OEt)_3$ est employé comme précurseur du phosphore et est introduit après l'hydrolyse du TEOS et avant l'ajout de l'éthoxyde de calcium. Malheureusement le sol de bioverre gélifie en quelques minutes au lieu de plusieurs heures, et ce malgré une composition massique 73 % SiO_2 - 24 % CaO - 3 % P_2O_5 relativement pauvre en phosphore. Cette gélification prématurée empêche la réalisation du sol hybride. Par conséquent, l'éventualité d'une phase inorganique ternaire au sein de l'hybride a été abandonnée.

À travers diverses études qui seront présentées plus tard, trois solvants alternatifs au THF ont été envisagés : l'acide acétique (AcOH), le chloroforme ($CHCl_3$) et l'hexafluoroisopropanol (HFIP). Ces solvants semblent appropriés étant donné qu'ils conduisent à des sols hybrides homogènes et translucides. Les paramètres de synthèse (quantité de solvant, centrifugation, couple billes-dissolvant) sont ajustés en fonction du solvant. Après dissolution des billes, les scaffolds préparés à partir de AcOH et de HFIP se désintègrent, suggérant une faible cohésion du matériau hybride. Ceux

préparés à partir de $CHCl_3$ sont intacts, ont une structure poreuse interconnectée (**Figure 35-A**) et semblent bioactifs car nous observons la précipitation de phosphates de calcium en forme de sphérulite (**Figure 35-B**), mais ils possèdent des propriétés mécaniques insuffisantes à leur manipulation. Ainsi, alors que dans la partie 4.2.2, le choix du solvant s'est avéré crucial en vue d'obtenir des solutions hybrides homogènes, il semble également jouer un rôle primordial sur les propriétés mécaniques de l'hybride. Au final, le THF est conservé en tant que solvant du PCL.

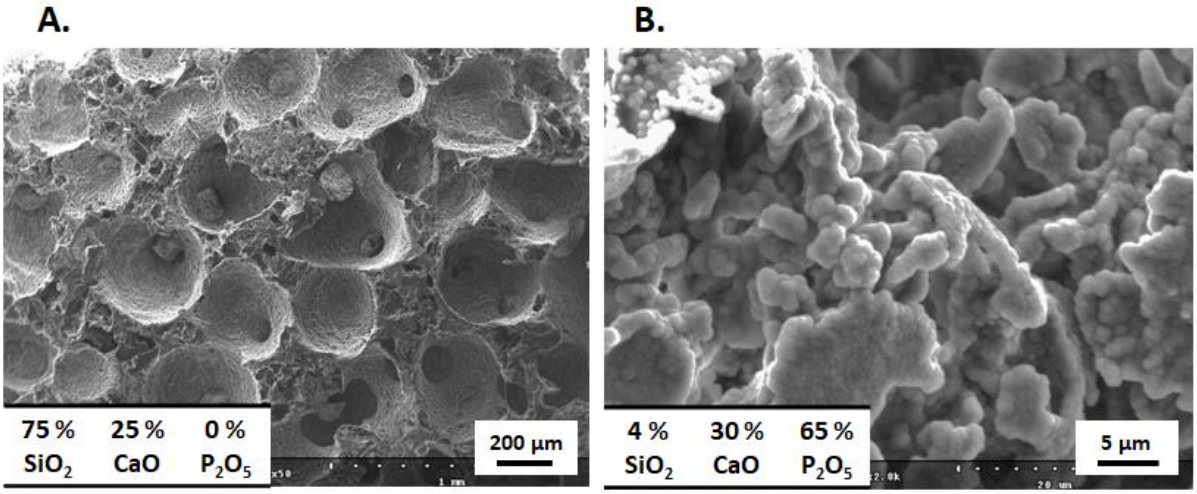


Figure 35. Scaffold d'un hybride PCL-bioverre synthétisé à partir de $CHCl_3$ avant (A) et après interaction avec le SBF pendant 3 jours (B). Les compositions massiques sont déterminées en EDX (n = 3), les erreurs relatives sont inférieures à 1 %.

Parmi les autres travaux d'optimisation, trois sont détaillés dans la suite. Le premier traite du précurseur de calcium, le second de la structure poreuse et le troisième du ratio organique-inorganique.

5.1 Précurseur de calcium

5.1.1 Problématique

En dépit des bénéfices apportés par l'utilisation de l'éthoxyde de calcium (cf. chapitre 1), il a été envisagé de le remplacer par un autre précurseur. En effet, les alcoxydes ont un coût significativement plus élevé que celui des sels métalliques. À titre d'exemple, la meilleure offre s'élève à 250 € pour 50 g de $Ca(OEt)_2$ (pureté de 95 %, Gelest) quand pour cette même somme il est possible d'acheter 10 kg de $CaCl_2$ (pureté de 97 %, Alfa Aesar). Non seulement les alcoxydes sont coûteux, mais il est de plus difficile de s'en procurer. Il existe peu de fournisseurs pour ces réactifs, et quand ceux-ci n'arrêtent pas définitivement leur chaîne de production (comme cela fut le cas avec ABCR), ils imposent des temps de livraison pouvant s'étendre de plusieurs mois à plus d'un an. Pour finir, la réactivité de l'éthoxyde de calcium semble dépendre de son « âge » : après ouverture d'un pot de $Ca(OEt)_2$, les sols de bioverre gélifient de plus en plus rapidement. Par exemple, le sol synthétisé à partir d'un pot neuf (ABCR) gélifie en 3 jours et celui synthétisé 1 mois après que le pot ait été ouvert gélifie en 3 heures. Or, pour réaliser un hybride, le sol de bioverre doit être introduit peu avant sa gélification dans le polymère solubilisé (cf. partie 2.1.2). L'influence de l'âge du précurseur rend compliquée la prévision du temps de gel et l'élaboration de l'hybride. Cela s'avère particulièrement problématique en vue d'une potentielle industrialisation du procédé étant donné que cela injecte un paramètre non contrôlé. L'hypothèse suivante est proposée afin d'expliquer la

dépendance du temps de gel avec l'âge du précurseur : après ouverture du pot, l'éthoxyde de calcium s'altère chimiquement au contact de l'humidité ambiante ; il s'hydrolyse rapidement selon l'**équation 8**.

$$EtO^{-}\,{}^{+}Ca^{+}\,{}^{-}OEt + H_2O \rightarrow EtO^{-}\,{}^{+}Ca^{+}\,{}^{-}OH + EtOH \quad \textbf{(8)}$$

Le précurseur est pré-hydrolysé avant même d'être introduit dans la synthèse sol-gel. La pré-hydrolyse s'amplifie au cours du temps et avec l'ouverture répétée du pot, et la gélification du sol n'en est que plus rapide. Cette hypothèse est supportée par des analyses en spectroscopie infrarouge (**Figure 36**). L'alcoxyde neuf ne contient pas de groupement $Ca^{+}\,{}^{-}OH$ (pic à 3640 cm^{-1} [94, 95]) et n'est pas hydraté (bande à 3100-3500 cm^{-1}), mais ces deux phénomènes apparaissent seulement 1 mois après l'ouverture du pot et l'altération du $Ca(OEt)_2$ en $Ca(OH)_2$ continue de prendre de l'ampleur avec le temps.

Le coût, l'indisponibilité et l'altération de l'éthoxyde de calcium (et des alcoxydes en général [96]) ont conduit à la recherche d'un autre précurseur. Mis à part les sels, il existe peu d'alternatives. Plusieurs articles scientifiques traitent des sels $CaCl_2$ et $Ca(NO_3)_2$ [47, 52, 53, 61], et si tous s'accordent à dire que le calcium n'est pas intégré au réseau silicate à température ambiante (cf. partie 1.3.3), aucun ne propose un mécanisme réactionnel permettant de comprendre pourquoi le calcium s'incorpore uniquement avec les alcoxydes. Ainsi, il s'avère nécessaire d'étudier le mécanisme d'incorporation du calcium dans l'espoir de trouver une alternative à l'utilisation des alcoxydes.

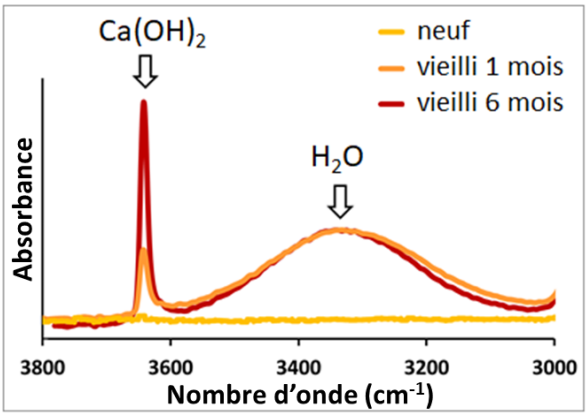


Figure 36. Spectres IR du précurseur $Ca(OEt)_2$ à l'ouverture du pot neuf (jaune), puis après 1 mois (orange) et 6 mois (rouge) normalisés par rapport à la bande à 1070 cm^{-1} (liaison C-O). Le pic d'absorption à 3640 cm^{-1} est caractéristique de la vibration par étirement de la liaison O-H d'une molécule de $Ca(OH)_2$. La bande d'absorption à 3100-3500 cm^{-1} correspond à la vibration par étirement de la liaison O-H où l'hydrogène est lié ; il est caractéristique de l'eau adsorbée.

5.1.2 Rôle du pH

Dans les articles précités, les auteurs supposent une réactivité importante des alcoxydes de calcium qui s'hydrolysent et se condensent rapidement, causant alors la gélification prématurée du sol. Cependant, ils n'ont pas considéré le fait que les alcoxydes d'alcalins et alcalinoterreux sont des bases fortes. Il est probable que le pH du sol, un paramètre impactant grandement la cinétique de condensation [97], évolue lors de l'ajout du précurseur de calcium. Afin de le vérifier, un sol de verre bioactif SiO_2-CaO est synthétisé suivant le protocole décrit au chapitre 2 et son pH est enregistré. Lorsque le TEOS est hydrolysé en catalyse acide (avant ajout du $Ca(OEt)_2$), le pH est proche de 0. Ce

pH fortement acide favorise l'hydrolyse par rapport à la condensation et permet ainsi l'obtention d'une solution stable à base d'oligomères issus du TEOS hydrolysé $Si(OEt)_{4-x}(OH)_x$, faiblement branchés. Après ajout du $Ca(OEt)_2$, le pH du sol monte jusqu'à 6-7 en quelques minutes, confirmant ainsi le rôle de base de l'alcoxyde de calcium.

Or, d'après Iler [97], la vitesse de condensation du réseau silicate est maximale autour de pH 6 (**Figure 37**). En effet, entre pH 2 et pH 7, le réseau silicate se condense *via* la catalyse basique (par exemple avec l'anion hydroxyde HO^-) selon :

$$Si–OH + HO^- \rightarrow Si–O^- + H_2O \quad \textbf{(9)}$$

$$Si–O^- + Si–OH \rightarrow Si–O–Si + HO^- \quad \textbf{(10)}$$

Au point isoélectrique de la silice (pH 2), les silanols sont principalement sous la forme SiOH et la condensation selon l'**équation 10** est quasiment inexistante : le sol est métastable (**Figure 37**). Au contraire, la condensation est la plus rapide autour du pH neutre pour lequel le sol contient des concentrations significatives en silanols protonés et déprotonés. Entre pH 2 et pH 7, la condensation plus ou moins rapide conduit à la création de particules de 2 à 4 nm qui s'agrègent ensuite pour former des chaînes de nanoparticules puis un réseau tridimensionnel. Entre pH 7 et pH 10,5, il se forme aussi des particules mais celles-ci contiennent essentiellement des SiO^- à leur surface – les SiOH étant présents sur les espèces monomériques ou oligomériques moins condensées. La répulsion électrostatique des particules empêche leur agglomération, la formation de chaînes et la gélification du sol ; cependant, elles continuent de grossir par réaction avec les unités monomériques jusqu'à atteindre des diamètres de l'ordre de la dizaine de micromètres : c'est le procédé Stöber [98, 99]. Au-dessus de pH 10,5, la réaction de condensation (**équation 10**) évolue dans le sens inverse et il n'y a pas de formation de particules.

Afin de confirmer l'influence du pH sur le temps de gel, un sol de TEOS sans précurseur de calcium est hydrolysé à pH nul, puis le pH est augmenté à 6-7 par ajout d'une solution de soude dans

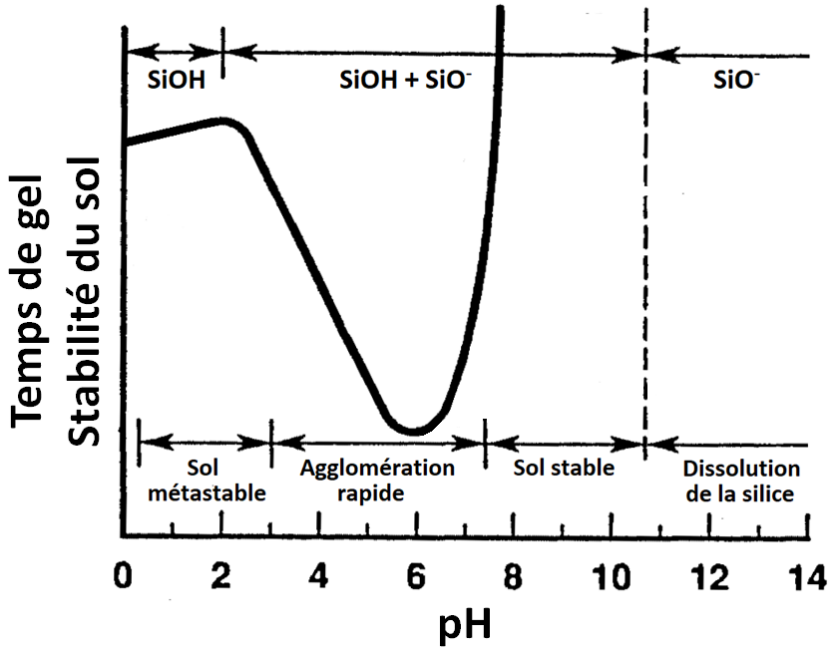


Figure 37. Graphique représentant l'effet du pH sur la stabilité du sol. Adapté d'après Iler [97].

l'éthanol. Le sol gélifie en moins d'une heure, un temps de gel du même ordre que celui du sol de bioverre synthétisé à partir de $Ca(OEt)_2$. Si les alcoxydes de calcium accélèrent la gélification du sol, ce n'est donc pas à cause de leur forte réactivité vis-à-vis des réactions sol-gel, mais plutôt à cause de leur influence sur le pH en tant que bases fortes. Cependant, qu'en est-il du mécanisme d'incorporation du calcium ? Se fait-elle à travers un processus d'hydrolyse-condensation entre alkoxydes ou le pH joue-t-il également un rôle ? Ces interrogations ne trouvent pas de réponse dans la littérature, puisque bien que des études comparent des verres SiO_2-CaO préparés à partir de sels ou d'alcoxydes de calcium [47, 52, 53, 61], ceux-ci sont synthétisés à des pH différents. En effet, dans ces travaux, le pH est initialement acide lors de l'hydrolyse du TEOS, mais l'ajout de l'alcoxyde s'accompagne nécessairement d'une hausse du pH (corrélé à un temps de gel court) tandis que l'ajout du sel a peu d'effet sur le pH (corrélé à un temps de gel long). Les auteurs ont observé l'incorporation du calcium uniquement avec les alcoxydes, mais il n'est pas possible d'affirmer que celle-ci soit liée à la nature du précurseur plutôt qu'au pH.

5.1.3 Mécanisme d'incorporation

Contrairement à ce qui est généralement assumé dans la littérature, le mécanisme d'incorporation ne peut pas se faire par des réactions sol-gel à proprement parler. En effet, en chimie douce, les réactions d'hydrolyse et de condensation sont des substitutions nucléophiles [37]. De plus, les alcoxydes de calcium $Ca(OR)_2$ sont dissociés en milieu hydro-alcoolique – comme la plupart des sels – en ions Ca^{2+} et RO^-. L'établissement d'une liaison ionique $SiO^{-+}Ca$ ne peut donc pas se faire par une substitution nucléophile qui implique la mise en commun d'électrons en une liaison covalente, mais plutôt par l'attraction électrostatique entre les anions SiO^- et les cations Ca^{2+}. On peut déduire de ce raisonnement un effet du pH : en dessous du point isoélectrique de la silice (pH 2), l'omniprésence de SiOH chargés positivement s'oppose à l'établissement de liaisons ioniques $SiO^{-+}Ca$. On comprend alors que le calcium n'ait pas été intégré au réseau silicate avec des sels (pH $<$ 2) mais seulement avec des alcoxydes (pH 6-7) dans les publications de référence.

L'influence du pH sur l'incorporation du calcium est étudiée. Des verres bioactifs de composition massique 75 % SiO_2 - 25 % CaO sont synthétisés à partir de l'éthoxyde $Ca(OEt)_2$, de l'hydroxyde $Ca(OH)_2$ ou du chlorure $CaCl_2$. Le TEOS est hydrolysé en catalyse acide à un pH proche de 0, puis le précurseur de calcium est introduit. Il s'ensuit une montée du pH à 5,1 pour $Ca(OEt)_2$ et à 5,4 pour $Ca(OH)_2$ qui est aussi une base forte. Dans le cas du $CaCl_2$, après dissolution complète du sel dans le sol de bioverre, le pH est ajusté à 4-5 par ajout d'une solution de soude dans l'éthanol. Les sols gélifient en 1h30 pour $Ca(OH)_2$ et $CaCl_2$ et en 2h30 pour $Ca(OEt)_2$. Les bioverres obtenus sont analysés par spectroscopie RMN du proton ^1H et du silicium ^{29}Si (**Figure 38-B**) en collaboration avec le CEMHTI à Orléans. Après avoir été rincés trois fois dans l'éthanol absolu pendant 24 h puis séchés, ils sont également analysés par EDX.

L'incorporation du calcium peut être déterminée par la distribution d'espèces Q^n dans le réseau silicate. On appelle Q^n les unités $[SiO_4]$ avec *n* atomes d'oxygènes pontants (pont Si-O-Si) et *4-n* oxygènes non-pontants (**Figure 38-A**). Les oxygènes non-pontants peuvent provenir des silanols résiduels (Si-O-H, notés Q_H) ou de l'incorporation d'ions modificateurs du réseau (ici $Si\text{-}O^{-+}Ca$, notés Q_{Ca}). La spectroscopie RMN haute résolution du solide par rotation à l'angle magique des noyaux de ^{29}Si combinée à une séquence de polarisation croisée avec les noyaux d'hydrogène ^1H permet de discriminer les espèces Q^3_H, Q^3_{Ca}, Q^2_{2H} et $Q^2_{Ca/H}$. De cette façon, il est possible de valider l'intégration du calcium dans le réseau silicate par la présence d'espèces Q^3_{Ca} ou $Q^2_{Ca/H}$. D'après la **Figure 38-B**, le

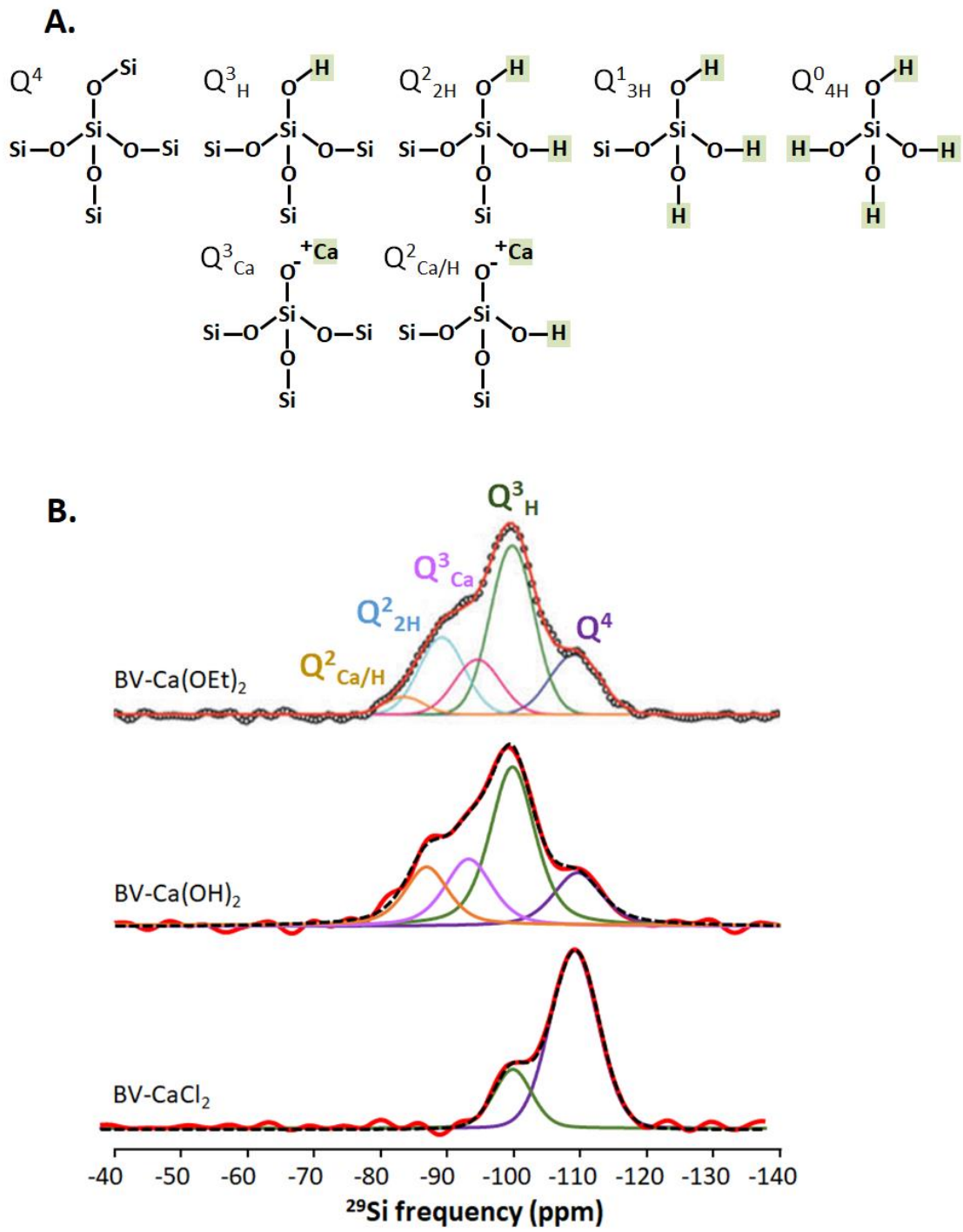


Figure 38. Représentation des espèces Q^n (A). Distributions des espèces Q^n dans les bioverres BV-Ca(OEt)$_2$, BV-Ca(OH)$_2$ et BV-CaCl$_2$ obtenues par RMN solide du silicium 29 (B).

calcium est incorporé avec Ca(OEt)$_2$ et Ca(OH)$_2$, mais pas avec CaCl$_2$ qui ne contient que des espèces Q^4 et Q^3_H. Ces résultats sont confirmés par EDX : après rinçage à l'éthanol absolu, le bioverre à base de CaCl$_2$ ne contient plus de calcium, alors que ceux à base de Ca(OEt)$_2$ et Ca(OH)$_2$ contiennent toujours autant de calcium. On rejoint donc les conclusions des publications de référence : le calcium est intégré au réseau silicate lorsque des alcoxydes sont employés, mais il ne l'est pas lorsque des sels sont employés, et ce malgré un pH favorisant l'attraction électrostatique entre cations Ca^{2+} et silanols déprotonés SiO^-. Il s'ajoute à cela une découverte intéressante : l'hydroxyde Ca(OH)$_2$ autorise l'incorporation du calcium et se présente de ce fait comme une potentielle alternative des alcoxydes.

Le mécanisme ci-dessous est proposé pour tenter d'expliquer l'incorporation du calcium au sein du réseau silicate avec les alcoxydes et hydroxydes $Ca(OR)_2$. Tout d'abord, la réaction acidobasique entre l'acide faible Si-OH et la base forte RO^- conduit à la déprotonation de silanols (**équation 11**). Les $Si\text{-}O^-$ résultants sont ensuite impliqués dans deux réactions compétitives : soit ils se condensent avec les Si-OH *via* une substitution nucléophile (**équation 12**), soit ils forment une liaison ionique $Si\text{-}O^{-\,+}Ca$ par attraction électrostatique (**équation 13**). Les anions HO^- issus de la réaction de condensation entraînent la déprotonation d'autres silanols qui se condensent à leur tour en produisant de nouveau des HO^-, ou qui se lient aux cations Ca^{2+}.

$$Si\text{–}OH + RO^- + Ca^{2+} \rightarrow Si\text{–}O^- + ROH + Ca^{2+} \quad \textbf{(11)}$$

$$Si\text{–}O^- + Si\text{–}OH \rightarrow Si\text{–}O\text{–}Si + HO^- \quad \textbf{(12)}$$

$$Si\text{–}O^- + Ca^{2+} \rightarrow Si\text{–}O^{-\,+}Ca^+ \quad \textbf{(13)}$$

La réaction de condensation (**équation 12**) est une substitution nucléophile d'ordre 2 qui passe par un intermédiaire réactionnel, sa cinétique est lente [37]. On peut ainsi supposer que la création d'une liaison électrovalente $SiO^{-\,+}Ca$ est cinétiquement favorisée par rapport à la condensation, permettant alors l'incorporation du calcium. Dans le cas du $CaCl_2$, les anions Cl^- ne sont pas consommés par la réaction acidobasique (**équation 11**) et interagissent avec les cations Ca^{2+}. Les cations Ca^{2+} sont sujets à de nombreuses interactions électrostatiques qui concurrencent l'attraction électrostatique des silanols déprotonés SiO^-. Par conséquent, on présume que le contre-ion du Ca^{2+} joue un rôle fondamental dans ce mécanisme : quand il n'intervient pas dans la déprotonation des silanols, il subsiste dans le sol et interagit avec les ions calcium, empêchant l'établissement de liaisons $SiO^{-\,+}Ca$.

Le mécanisme proposé ci-dessus laisse envisager l'emploi d'une variété de précurseurs de calcium autres que les alcoxydes. Les critères principaux sont que le contre-ion du Ca^{2+} soit une base dont l'acide conjugué est électriquement neutre (de cette façon, le contre-ion serait neutralisé selon l'**équation 11**), et que le pKa du couple acide/base soit au moins de 4 afin de faire monter le pH du sol vers la zone de condensation du réseau silicate. Par exemple, on peut suggérer les sels de calcium dérivés d'acides faibles tels que le citrate (pKa_1 = 3,1 ; pKa_2 = 4,8 ; pKa_3 = 6,4), le malate (pKa_1 = 3,5 ; pKa_2 = 5,1) et l'acétate (pKa = 4,8) (**Figure 39**). Des essais sont prévus dans un futur proche.

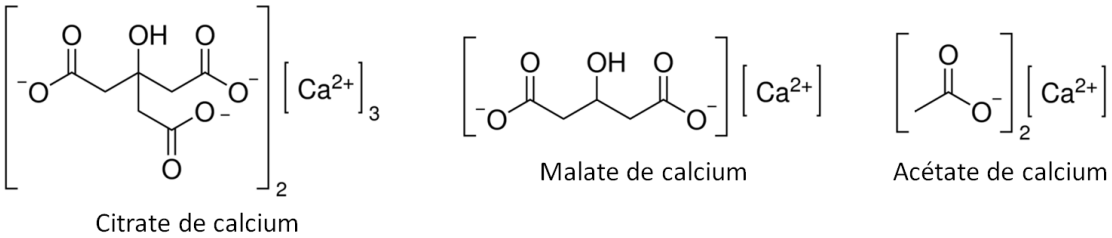


Figure 39. Sels de calcium dérivés des acides citrique, malique et acétique.

5.1.4 Hydroxyde *versus* éthoxyde de calcium

L'étude en spectroscopie RMN a permis d'identifier $Ca(OH)_2$ comme un possible substitut de $Ca(OEt)_2$. Ce précurseur permet l'incorporation du calcium à température ambiante sans les inconvénients que présentent les alcoxydes. En effet, l'hydroxyde de calcium (principal constituant de la chaux éteinte) est un produit de la vie courante utilisé notamment dans l'alimentation en tant

qu'additif (E526) ; pour cette raison, il est facile de s'en procurer et les prix sont 20 à 30 fois plus faibles que ceux de l'éthoxyde. Bien que l'hydroxyde de calcium puisse se carbonater au contact du dioxyde de carbone de l'air selon l'**équation 14**, des analyses en spectroscopie IR montrent l'absence de $CaCO_3$ plus d'un an après l'ouverture du pot.

$$Ca(OH)_2 + CO_2 \rightarrow CaCO_3 + H_2O \quad \textbf{(14)}$$

Contrairement à l'éthoxyde de calcium, l'hydroxyde ne semble pas s'altérer chimiquement de manière significative lors de son stockage, ce qui se traduit par une meilleure reproductibilité des temps de gel du sol de bioverre.

Avant de valider $Ca(OH)_2$ comme nouveau précurseur de calcium, il faut vérifier que son utilisation n'ait pas d'impact négatif sur les propriétés des matériaux synthétisés et en particulier sur la bioactivité. Les bioverres faits à partir de l'hydroxyde et de l'éthoxyde de calcium sont broyés et les poudres obtenues sont notées BV-CH et BV-CE respectivement. Également, des scaffolds d'hybride PCL-bioverre sont fabriqués à partir de l'hydroxyde et de l'éthoxyde de calcium et sont notés PCL-CH et PCL-CE. Les poudres de bioverre et les scaffolds d'hybride sont immergés dans le SBF pendant 6 h, 1 j, 3 j et 7 j. Le SBF interagi est filtré puis analysé par ICP-AES (**Figure 40**) et les matériaux interagis sont rincés à l'éthanol absolu puis analysés par spectroscopie IR et par DRX (**Figure 41 et Figure 42**) en collaboration avec le CIRIMAT à Toulouse.

Les graphiques de la **Figure 40** donnent l'évolution des concentrations en silicium, calcium et phosphore dans le SBF au cours de l'interaction avec les bioverres BV-CH et BV-CE. Cette évolution est typique de l'interaction d'un verre bioactif avec le SBF. Dans un premier temps, on observe la dissolution des verres qui libèrent du silicium et du calcium dans le milieu. Dans un second temps, on observe une diminution des concentrations en Ca et P qui est en accord avec la précipitation d'un phosphate de calcium (supposément de l'apatite). On constate que le phosphore est consommé plus rapidement avec BV-CH (notable à 6 h), ce qui suggère une plus grande capacité à induire la formation d'apatite. Cela est probablement dû à un relargage en Ca plus conséquent du BV-CH favorisant la précipitation de l'apatite.

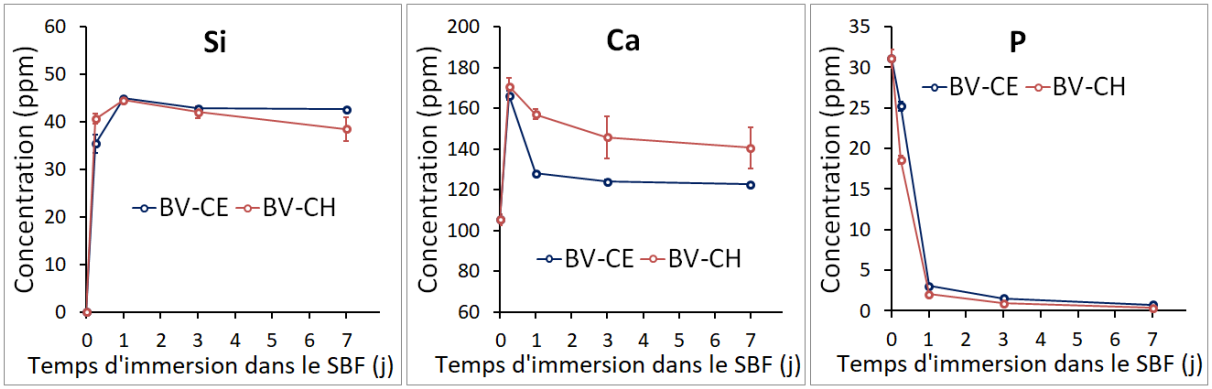


Figure 40. Évolution des concentrations en Si, Ca et P dans le SBF au cours de l'interaction avec la poudre de bioverre.

La **Figure 41** et la **Figure 42** comportent les spectres IR des échantillons PCL-CH et PCL-CE. Ceux des échantillons BV-CH et BV-CE amènent aux mêmes conclusions et ne sont donc pas systématiquement affichés. Pour commencer, les spectres IR des matériaux non-interagis (**Figure 41-A**) révèlent que BV-CH et PCL-CH contiennent du carbonate de calcium (pic d'absorption à 870 cm^{-1}

et bande d'absorption centrée en 1460 cm^{-1}) qui correspond d'après la DRX à de la calcite (**Figure 41-B**). Cette calcite pourrait provenir de l'altération du précurseur $Ca(OH)_2$ en $CaCO_3$ (**équation 14**), mais comme évoqué précédemment, la spectroscopie IR de l'hydroxyde de calcium ne montre pas la présence de carbonates. Par conséquent, il semble que la calcite soit produite pendant le procédé sol-gel. Elle résulte certainement de la réaction du $Ca(OH)_2$ avec le CO_2 dissout dans l'éthanol. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'à l'image de l'eau de chaux, le sol de bioverre synthétisé avec l'hydroxyde de calcium se trouble et prend une couleur blanchâtre, ce qui indique la précipitation de $CaCO_3$. Quoiqu'il en soit, le carbonate de calcium est biocompatible et il est utilisé comme substitut osseux sous forme de corail ; son occurrence dans le matériau n'est donc pas inquiétante.

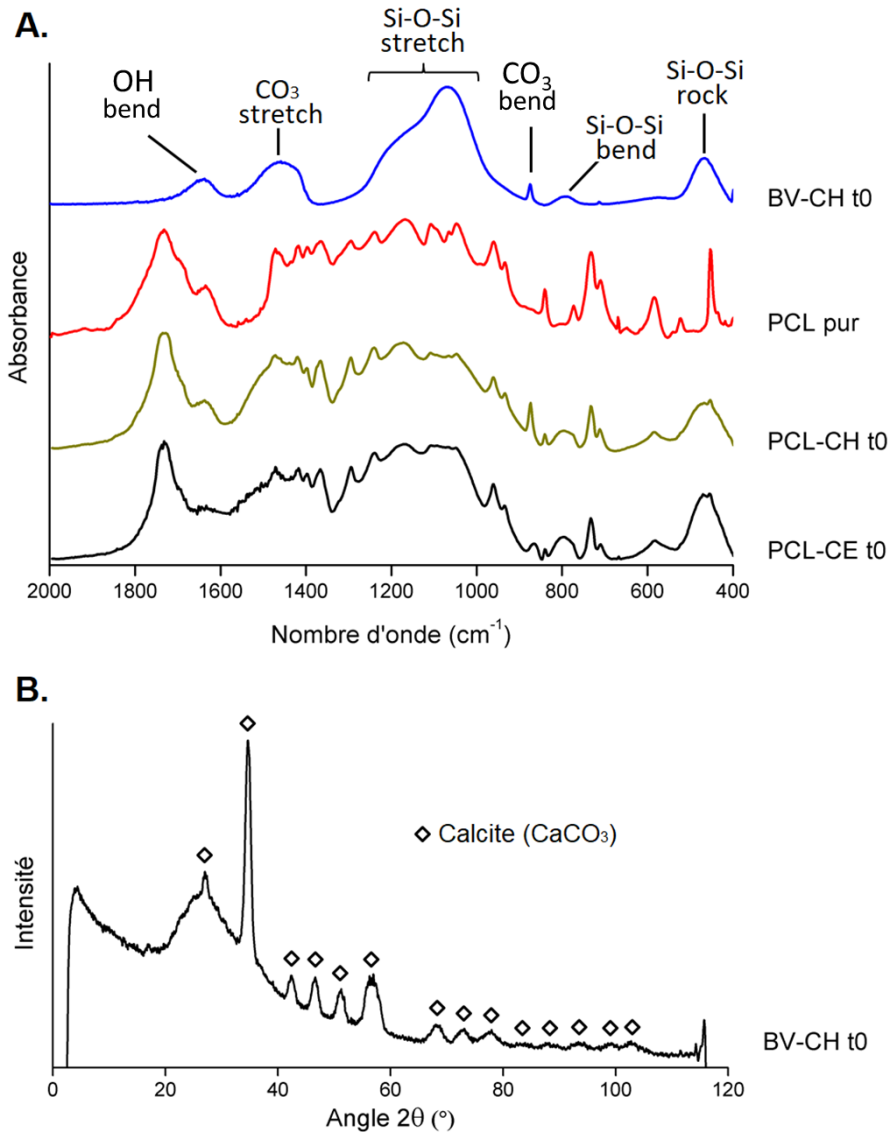


Figure 41. Spectre IR des matériaux non-interagis (A). Diffractogramme du bioverre BV-CH non-interagi (B).

Comme le montre la **Figure 41-A**, les nombreux pics d'absorption présents sur le spectre IR du PCL pur ne masquent pas les bandes caractéristiques du réseau silicate centrées à 460 cm^{-1} et 800 cm^{-1}, ni celles des groupements phosphates et hydroxyles de 500 à 650 cm^{-1}. Au cours de l'interaction avec le SBF (**Figure 42-A et B**), la disparition des bandes caractéristiques des ponts Si-O-Si démontre la dissolution du réseau silicate, et l'apparition d'un massif d'absorption vers

500-650 cm^{-1} renseigne sur la formation d'un phosphate de calcium avec notamment les pics à 564 et 603 cm^{-1} correspondant aux PO_4^{3-}. En théorie, le phosphate de calcium qui se forme lors de l'immersion d'un matériau dans le SBF peut être de diverse nature, par exemple la brushite $CaHPO_4.2H_2O$ (DCPD), le phosphate octocalcique $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4.5H_2O$ (OCP) et l'apatite – la brushite et l'OCP sont d'ailleurs des précurseurs métastables possibles de l'apatite [100]. Ici, le massif d'absorption correspond à une apatite non-stœchiométrique (**Figure 42-C**) avec notamment peu de HO^- comparé à l'hydroxyapatite stœchiométrique (pic à 632 cm^{-1}) ; par ailleurs, on voit un léger épaulement vers 545 cm^{-1} qui correspond aux HPO_4^{2-} [101]. D'après les spectres IR, il pourrait aussi s'agir de l'OCP, mais les analyses par DRX ne permettent pas de l'identifier (**Figure 42-D**) : contrairement à l'OCP, les échantillons interagis ne diffractent pas à un faible angle 2θ de 6°. La DRX confirme en outre qu'il s'agit bien d'une apatite et qu'elle est faiblement cristalline et donc

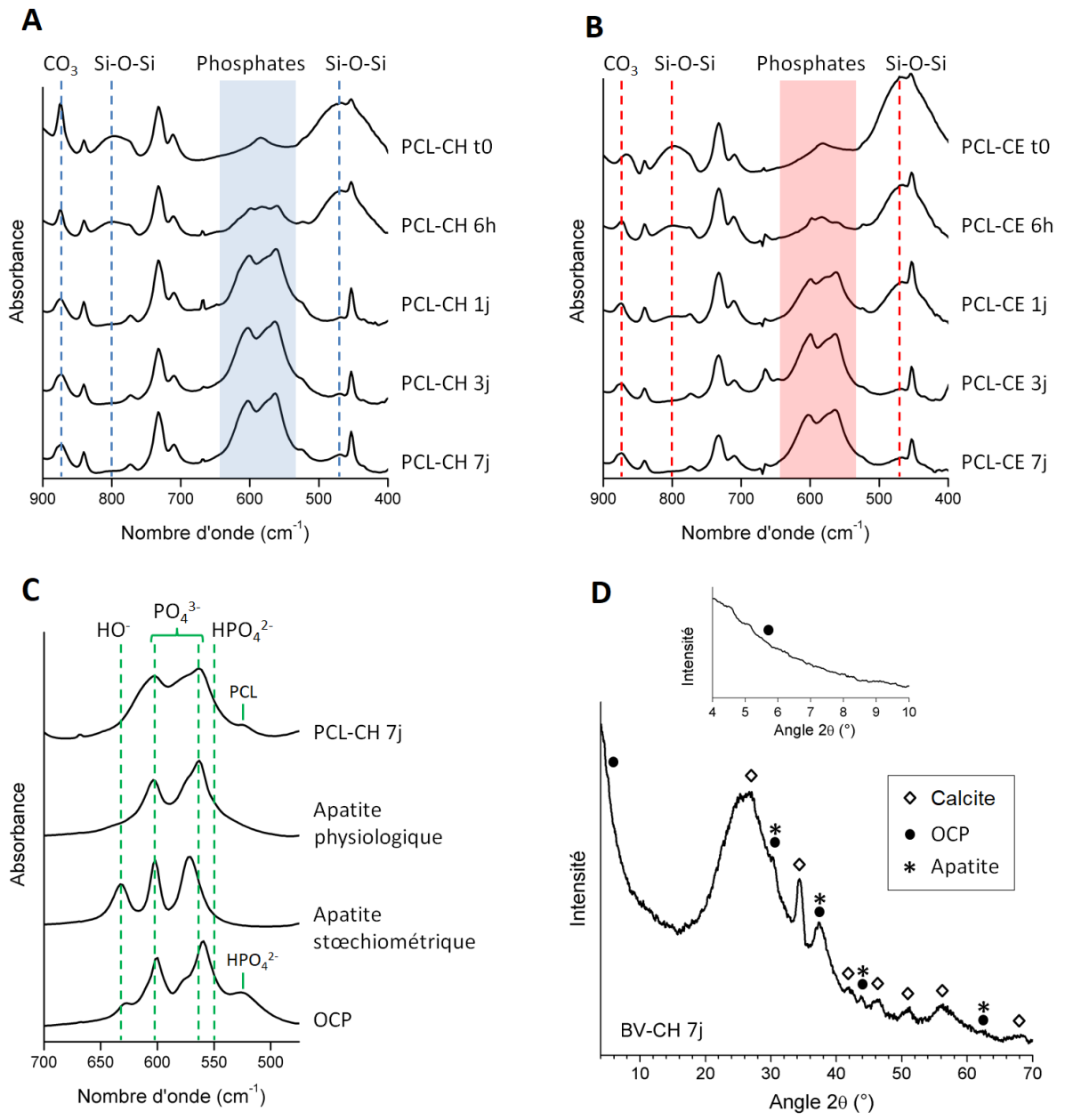


Figure 42. Évolution des spectres IR des scaffolds hybrides PCL-bioverre PCL-CH (A) et PCL-CE (B) au cours de leur interaction avec le SBF. Comparaison du spectre IR du PCL-CH interagi 7 jours avec les spectres de différents phosphates de calcium (C). Diffractogramme du bioverre BV-CH interagi 7 jours (D).

semblable à l'apatite physiologique. Si l'on compare l'évolution des spectres IR (**Figure 42-A et B**), on constate que les cinétiques de dissolution du réseau silicate et de formation de l'apatite biomimétique sont plus rapides pour PCL-CH (et BV-CH), ce qui concorde avec les résultats sur l'évolution de la concentration des ions dans le SBF obtenue par ICP-AES. En effet, le pic d'absorption à 460 cm^{-1} attribué au mode de vibration par bascule (« rocking » en anglais) de la liaison Si-O-Si [102-104] disparaît après 1 jour d'interaction dans le cas du PCL-CH, tandis qu'il disparaît après 3 jours dans le cas du PCL-CE. De même, le massif d'absorption vers 500-600 cm^{-1} associé à l'apatite est bien défini après 1 jour d'interaction pour PCL-CH contre 3 jours pour PCL-CE. On peut supposer que la dissolution plus rapide de la phase inorganique du PCL-CH provient d'un réseau silicate moins condensé (cf. partie 1.2.1). Le traitement des spectres en RMN du ^{29}Si est actuellement en cours et permettra de quantifier la distribution des espèces Q^n puis de déterminer le degré de connectivité du réseau silicate des verres obtenus à partir de $Ca(OEt)_2$ et de $Ca(OH)_2$.

Pour résumer, l'utilisation de l'hydroxyde de calcium au lieu de l'éthoxyde se traduit par une accélération de la dissolution du verre et de la formation de l'apatite. Cela dit, ces cinétiques restent du même ordre de grandeur qu'avec l'éthoxyde. Par conséquent, on peut conclure que $Ca(OH)_2$ est une alternative pertinente du $Ca(OEt)_2$ puisqu'il permet l'incorporation du calcium à température ambiante sans pour autant dégrader les propriétés du verre obtenu. On opte donc pour l'hydroxyde de calcium en tant que précurseur de calcium de la synthèse sol-gel.

5.2 Porosité

La structure poreuse est un facteur biologique déterminant des scaffolds étant donné qu'elle autorise la migration des cellules et la circulation des fluides physiologiques, deux phénomènes qui dictent l'angiogenèse et l'ostéogénèse (cf. chapitre 1). Les caractéristiques structurales les plus influentes sur le plan biologique sont la taille des pores, la taille des interconnexions et le nombre d'interconnexions par pore.

La structure poreuse du scaffold dépend de nombreux paramètres de synthèse. Dans ces travaux de thèse, elle a été optimisée à travers la préparation de l'empilement de billes, les paramètres de centrifugation pour l'infiltration du sol hybride dans l'empilement et les conditions de gélification du sol hybride infiltré. Le retrait se doit aussi d'être minime afin d'éviter une déformation trop significative de la structure poreuse. Ces différentes études sont présentées dans la suite.

5.2.1 Gélification et retrait

Lors de la fabrication de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre, des billes en paraffine sont empilées dans un moule, puis partiellement fusionnées à l'aide d'un traitement thermique et le sol hybride est finalement infiltré dans l'empilement de billes par centrifugation. Il faut alors attendre que le sol hybride gélifie avant de plonger le matériau dans des bains répétés de cyclohexane qui permettront d'éliminer les billes. Or, il a été observé que les conditions de gélification du sol hybride ont une grande influence sur le retrait. Comme illustré sur la **Figure 43**, le matériau se rétracte énormément lorsque le moule contenant les billes est fermé après l'infiltration du sol, tandis qu'il ne se rétracte quasiment pas lorsque le moule est laissé ouvert. Il est connu que pour les gels silicates, le retrait résulte de l'établissement de ponts siloxanes Si-O-Si qui viennent condenser la structure du verre jusqu'à expulser le solvant piégé dans la trame inorganique [37, 92]. Ce phénomène qui

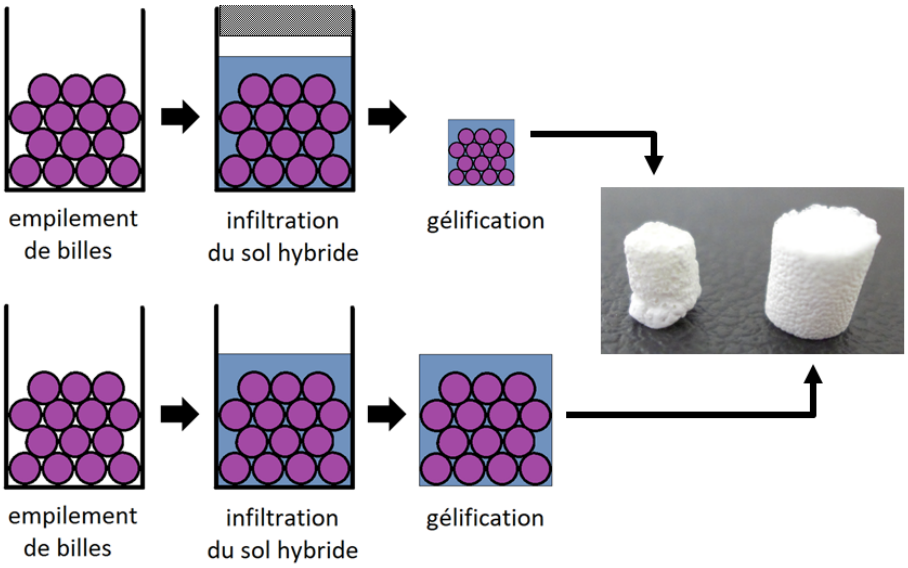


Figure 43. Influence des conditions de gélification (moule fermé ou ouvert) sur le retrait.

consiste à voir les réactions de condensation perdurer bien après le point de gel est appelé vieillissement. Lorsque le moule est laissé ouvert, les solvants constitutifs du sol hybride (éthanol et THF) s'évaporent et la condensation du réseau silicate est stoppée net. En effet, comme dans toutes les substitutions nucléophiles d'ordre 2, le solvant joue un rôle primordial dans la réaction de condensation en stabilisant le groupe partant et en facilitant ainsi son départ ; on comprend alors que le séchage se solde par l'arrêt des réactions de condensation et par un retrait modéré. Afin de limiter le retrait, on choisit donc de laisser les moules ouverts.

5.2.2 Centrifugation et interconnectivité

Dans la partie 4.2.4, il a été vu que lorsque le sol hybride est plus dense que les billes, une vitesse de centrifugation élevée peut mener à une infiltration trop prononcée qui détériore l'empilement de billes et l'interconnectivité du scaffold. Dans le cas présent, le sol hybride étant constitué majoritairement de THF (ρ_{THF} = 0,89 g/cm^3) et d'éthanol (ρ_{EtOH} = 0,79 g/cm^3), il est moins dense que les billes ($\rho_{paraffine}$ = 0,90 g/cm^3) et l'effet inverse est observé. En centrifugeant à 3900 tr/min, le scaffold obtenu est faiblement interconnecté (**Figure 44-A**), alors qu'en centrifugeant à 6000 tr/min, il contient de nombreuses interconnexions (**Figure 44-B**). Une vitesse de centrifugation plus élevée augmente probablement la compacité de l'empilement de billes et par là même l'interconnectivité de la mousse élaborée.

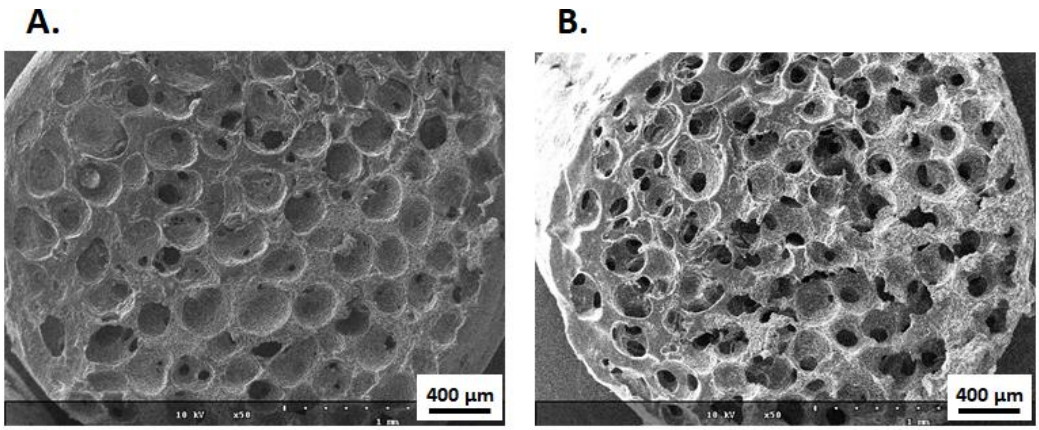


Figure 44. Scaffolds d'un hybride PCL-bioverre fabriqués en centrifugeant à 3900 (à gauche) ou à 6000 tr/min (à droite).

5.2.3 Empilement de billes et porosité

Comme décrit dans la partie 2.2, le procédé de fabrication permet de contrôler la porosité de la mousse. Plus précisément, la taille des pores est ajustable *via* le diamètre des billes porogènes, et la taille des interconnexions est ajustable à travers la fusion partielle des billes. D'après la littérature, il est généralement considéré que les scaffolds doivent posséder des fenêtres d'interconnexion d'au moins 100 µm pour autoriser l'angiogenèse et l'ostéogénèse [24, 105]. Dans une de leur étude, Karageorgiou et Kaplan reportent une régénération osseuse améliorée et la formation de capillaires pour des pores plus larges que 250 µm et des interconnexions supérieures à 50 µm [67]. Suite à une réunion avec l'INRA, il a été décidé de réaliser des interconnexions d'au moins 150 µm afin d'assurer le transfert des nutriments vers le centre du scaffold. La taille des pores a été choisie suite à une étude cellulaire qui sera présentée dans cette partie.

Taille des pores. Les billes en paraffine sont tamisées afin de séparer les fractions 300-400 µm, 400-600 µm et 600-800 µm (**Figure 45-A et B**). Des scaffolds d'un hybride PCL-bioverre sont fabriqués avec chacune de ces distributions. La **Figure 45-C** montre que la taille des pores est directement liée à la taille des billes.

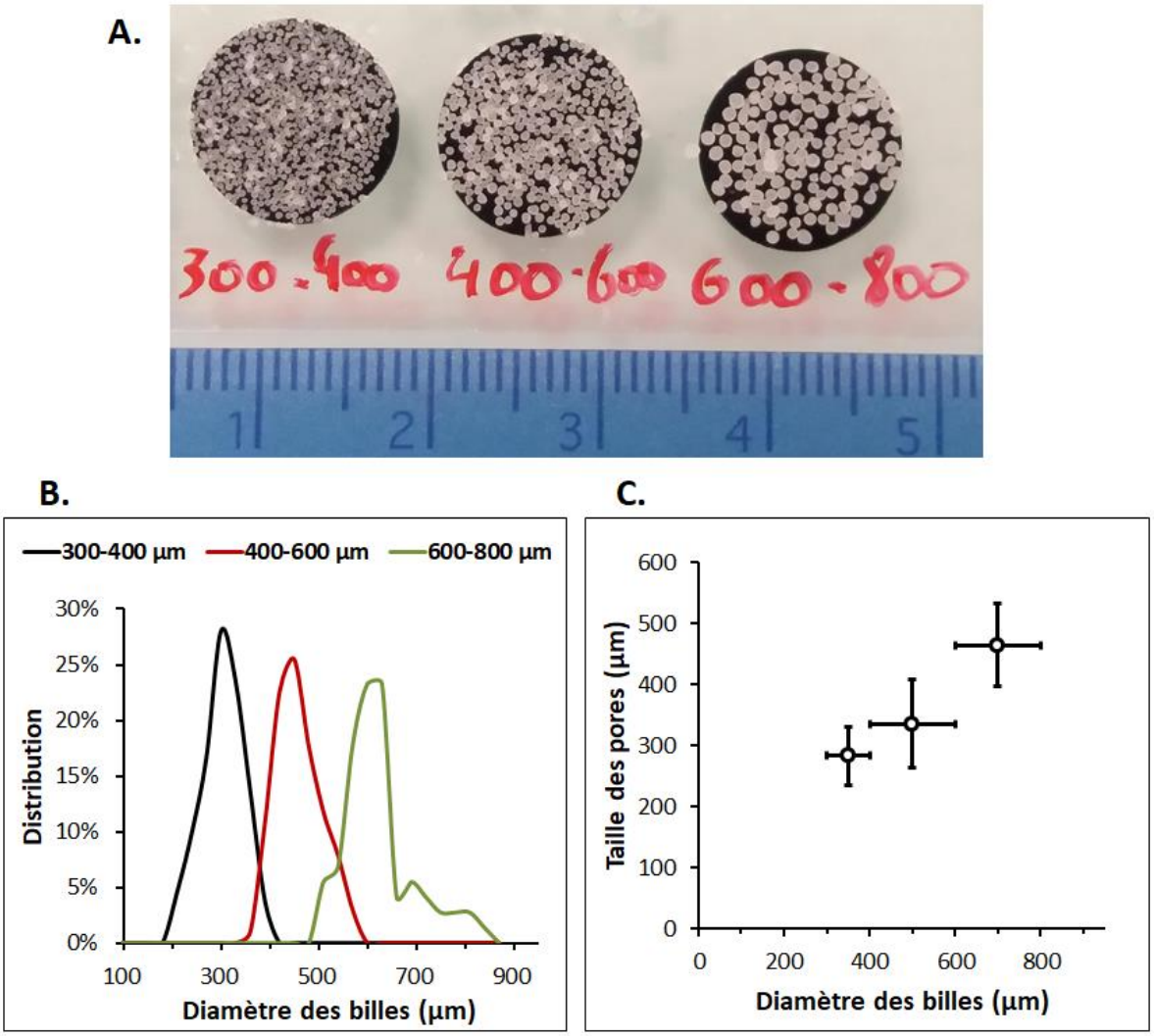


Figure 45. Les billes en paraffine sont tamisées en trois fractions : 300-400 µm, 400-600 µm et 600-800 µm (A). Leurs granulométries sont vérifiées au MEB (B). Taille des pores des scaffolds hybrides PCL-bioverre en fonction du diamètre des billes en paraffine (C).

Taille des interconnexions. Les billes sont partiellement fusionnées en chauffant l'empilement légèrement en-dessous de la température de fusion de la paraffine (expérimentalement, on trouve T_{fusion} (paraffine) = 55°C). En premier lieu, l'empilement de billes est préfusionné à 40°C pendant 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 min. La **Figure 47-A** démontre un effet du temps de préfusion, avec un net élargissement des interconnexions lorsque l'on passe au-dessus de 30 min. De plus, la **Figure 47-C** indique que toutes les interconnexions subissent cet élargissement à partir de 60 min. Au-delà de 60 min de préfusion, les interconnexions commencent à se toucher (**Figure 47-B**), ce qui risque de dégrader les propriétés mécaniques du scaffold. En second lieu, l'empilement de billes est préfusionné pendant 60 min à 40°C, 45°C ou 50°C. Une température plus élevée n'a pas d'influence significative sur la taille des interconnexions, mais elle semble engendrer plus d'interconnexions : à 40°C, les scaffolds comprennent des zones faiblement interconnectées (**Figure 47-E**), alors qu'à 45°C et 50°C, l'interconnectivité est homogène sur l'ensemble des scaffolds (**Figure 47-D**).

Résultats cellulaires. Une étude cellulaire sur l'influence de la porosité est réalisée en collaboration avec l'INRA. Des empilements de billes sont préparés avec les fractions 300-400 µm, 400-600 µm ou 600-800 µm et sont chauffés à 50°C pendant 60 min. Les scaffolds résultants sont ensemencés avec des ostéoblastes primaires de rats et l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), une enzyme sécrétée par les ostéoblastes et qui intervient dans la minéralisation de l'os néoformé, est déterminée après 7 jours et 14 jours de culture cellulaire. D'après la **Figure 46**, l'activité ALP est significativement plus importante avec les échantillons synthétisés avec la fraction de billes 400-600 µm. En se basant sur ces résultats, c'est donc la fraction 400-600 µm qui est retenue pour la fabrication de scaffolds.

Pour résumer, l'empilement de billes optimal est préparé à partir de la fraction 400-600 µm et en préfusionnant à 50°C pendant 60 min, ce qui donne des interconnexions de 201 µm (± 36 µm).

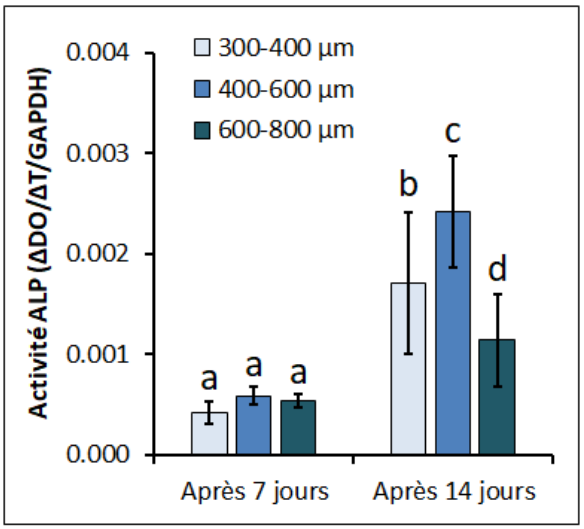


Figure 46. Résultats quantitatifs sur la différenciation cellulaire en fonction de la taille des billes. Les groupes statistiques sont estimés avec un test des étendues de Tukey et un intervalle de confiance de 95 %.

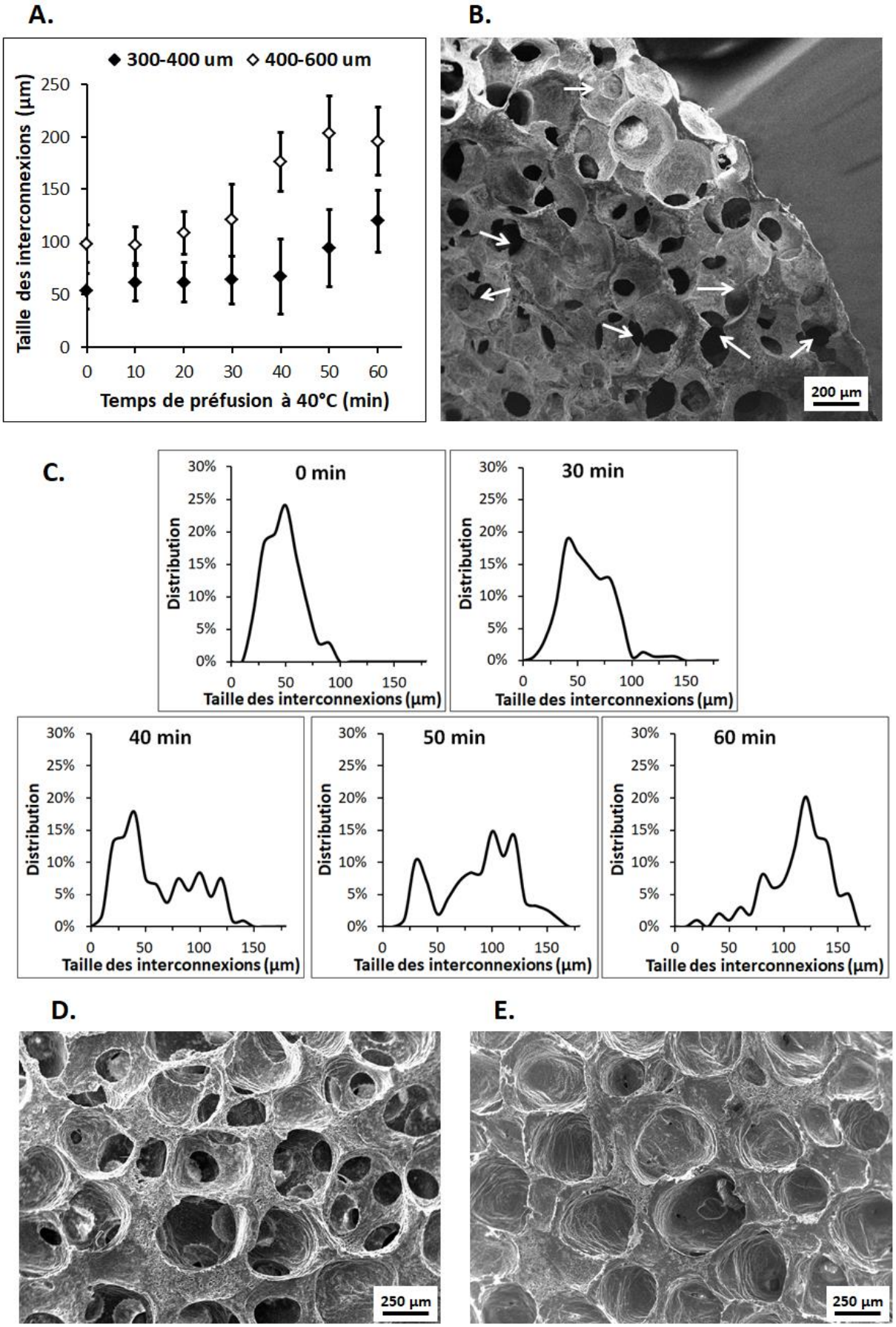


Figure 47. Taille des interconnexions des scaffolds hybrides PCL-bioverre en fonction du temps de préfusion des billes à 40°C (A). Scaffold d'un hybride PCL-bioverre fabriqué par préfusion des billes à 40°C pendant 90 min (B) ; les flèches blanches pointent des interconnexions qui se touchent. Distribution des tailles des interconnexions en fonction du temps de préfusion à 40°C des billes 300-400 µm (C). Les scaffolds fabriqués par préfusion à 45°C (D) ont une interconnectivité plus homogène en comparaison avec ceux obtenus à 40°C qui possèdent des zones faiblement interconnectées (E).

5.3 Influence du ratio organique-inorganique

Le ratio organique-inorganique influe sur la bioactivité et les propriétés mécaniques de l'hybride. Les travaux de Rhee illustrent parfaitement la tendance attendue [43]. Pour un hybride PCL-silice contenant du $CaCl_2$, une proportion plus importante en polymère se traduit d'un côté par un comportement moins fragile du matériau, d'un autre côté par une capacité moindre à former de l'apatite. Il existe donc un compromis : il s'agit de trouver le ratio PCL-bioverre qui conduise à la meilleure bioactivité possible tout en conservant le caractère ductile de l'hybride. On peut également imaginer un ajustement des propriétés du matériau en fonction de l'application visée.

Le protocole décrit au chapitre 2 a été développé pour des hybrides composés de 70 % massique de PCL et 30 % massique de bioverre (notés PCL70). On se propose ici d'étudier l'influence du ratio organique-inorganique sur l'hybride PCL-bioverre.

5.3.1 Synthèse

Contrairement aux travaux de Rhee qui portent sur des hybrides sous forme de monolithes et avec du $CaCl_2$, on s'intéresse ici à la synthèse de scaffolds avec incorporation du calcium, c'est-à-dire avec de l'hydroxyde $Ca(OH)_2$ ou de l'éthoxyde $Ca(OEt)_2$. Cela impose des contraintes (**Tableau 7**) qui rendent compliquée la variation du ratio organique-inorganique. Par exemple, pour augmenter la proportion inorganique dans l'hybride, Rhee ajoute simplement plus de sol de bioverre. Il synthétise de cette manière des hybrides contenant 20 à 60 % massique de silice. Dans notre cas, le sol de bioverre est extrêmement dilué dans l'éthanol afin d'éviter une gélification prématurée causée par le précurseur de calcium basique $Ca(OH)_2$ ou $Ca(OEt)_2$ (cf. partie 5.1.2). La forte dilution signifie qu'il faut ajouter un volume beaucoup plus important de sol (et donc d'éthanol) pour augmenter la

Paramètres	Formule	Valeur	Influence
Concentration de la solution polymère	$\frac{m_{PCL}}{V_{THF}}$	< 0,20 g/mL	Trop élevée ⇒ PCL non-dissout Plus la concentration est faible, plus le sol hybride est fluide
Concentration du sol de BV (extrait sec)	$\frac{m_{BV}}{m_{sol\ BV}}$	< 20 %	Trop élevée ⇒ gélification prématurée du sol de BV
Mélange THF-éthanol	$\frac{V_{THF}}{V_{EtOH}}$	> 1,5	Trop faible ⇒ précipitation irréversible du PCL dans le sol hybride Plus ce ratio est élevé, plus le sol hybride est fluide
Concentration en BV dans le sol hybride	$\frac{m_{BV}}{V_{sol\ hybride}}$	< 0,09 g/mL	Trop élevée ⇒ gélification prématurée du sol hybride
Concentration du sol hybride	$\frac{m_{BV} + m_{PCL}}{V_{sol\ hybride}}$	> 0,10 g/mL	Trop faible ⇒ effondrement des scaffolds par manque de matière Plus le sol hybride est concentré, plus il est visqueux et plus les murs des scaffolds contiennent de matière

Tableau 7. Influence et valeurs recommandées de cinq paramètres pour la synthèse d'un hybride PCL-bioverre.

proportion inorganique. Ainsi, l'introduction du sol de bioverre pour atteindre une composition massique 50-50 (PCL50) conduit à la précipitation du PCL qui n'est pas soluble dans le mélange THF-éthanol. Cette précipitation est déjà observée pour PCL60 et PCL70 (40 et 30 % massique de bioverre, respectivement), mais la mise sous agitation et sous ultrasons suffit à solubiliser de nouveau le PCL et à homogénéiser le sol hybride. En revanche, les solutions des hybrides contenant 50 % massique de bioverre ou plus demeurent hétérogènes même après cette étape d'homogénéisation. Ici, le facteur limitant est le ratio volumique V_{THF}/V_{EtOH}. Une approche pas-à-pas a permis de mettre en évidence les rôles principaux joués par quatre autres paramètres de synthèse qui sont résumés dans le **Tableau 7**. Cette étude a rendu possible l'élaboration de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre constitué de 10 à 70 % massique de verre bioactif.

5.3.2 Résultats et discussion

Le premier critère concerne la tenue mécanique des scaffolds. La manipulation et la découpe des scaffolds font ressortir un manque de rigidité des matériaux PCL30 et PCL40 (70 et 60 % massique de bioverre, respectivement). La **Figure 48** montre une différence de comportement à la découpe entre PCL40 (**à gauche**), dont le faciès illustre un déchirement des murs de la mousse, et PCL50 (**à droite**), dont la découpe est nette et propre. Par conséquent, il semble qu'une proportion de 60 % massique ou plus de bioverre ne soit pas appropriée, le matériau ne possédant pas les propriétés mécaniques requises pour sa préparation avant l'implantation.

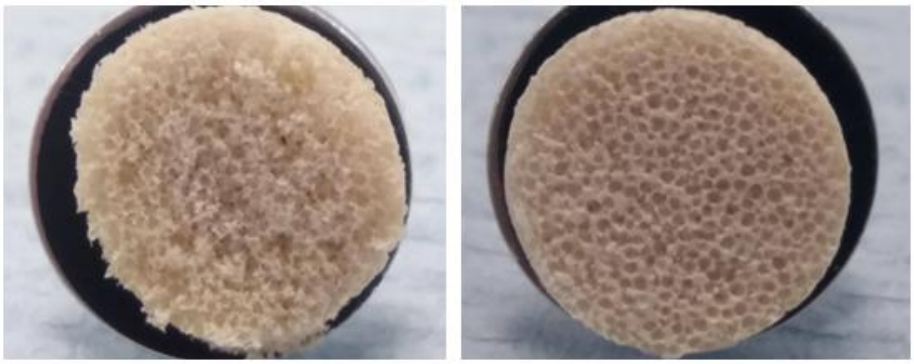


Figure 48. Coupe des scaffolds PCL40 (à gauche) et PCL50 (à droite).

Le second critère concerne l'homogénéité des phases inorganiques et organiques. En tant que matériau hybride, on s'attend à ce que ces phases soient indiscernables à l'échelle du micromètre. Or, la **Figure 49** démontre une certaine hétérogénéité du PCL50 (**en haut**) qui se répercute sur la formation de phosphates de calcium, elle aussi hétérogène (**en bas**). En effet, la synthèse de l'hybride PCL50 requiert un ratio volumique V_{THF}/V_{EtOH} bas et proche de la valeur limite ; même si la proportion importante d'éthanol ne provoque pas la précipitation irréversible du PCL, il est probable qu'elle entraîne une séparation des phases organiques et inorganiques en solution. Ainsi, le PCL50 est laissé de côté et les hybrides étudiés plus en profondeur sont les PCL60, PCL70 et PCL80.

Les scaffolds PCL60, PCL70 et PCL80 sont immergés dans le SBF pendant 6 h, 1 j, 3j ou 7 j. D'après les analyses en ICP-AES sur le milieu interagi, lorsque l'hybride contient plus de verre bioactif, il relargue plus de silicium (**Figure 50, à gauche**) et il induit une formation plus rapide de phosphate de calcium (**Figure 50, à droite**) : il faut respectivement 1 jour avec PCL 60, 3 jours avec PCL 70 et 7 jours avec PCL 80 pour que la concentration initiale en phosphore (32 ppm) dans le SBF

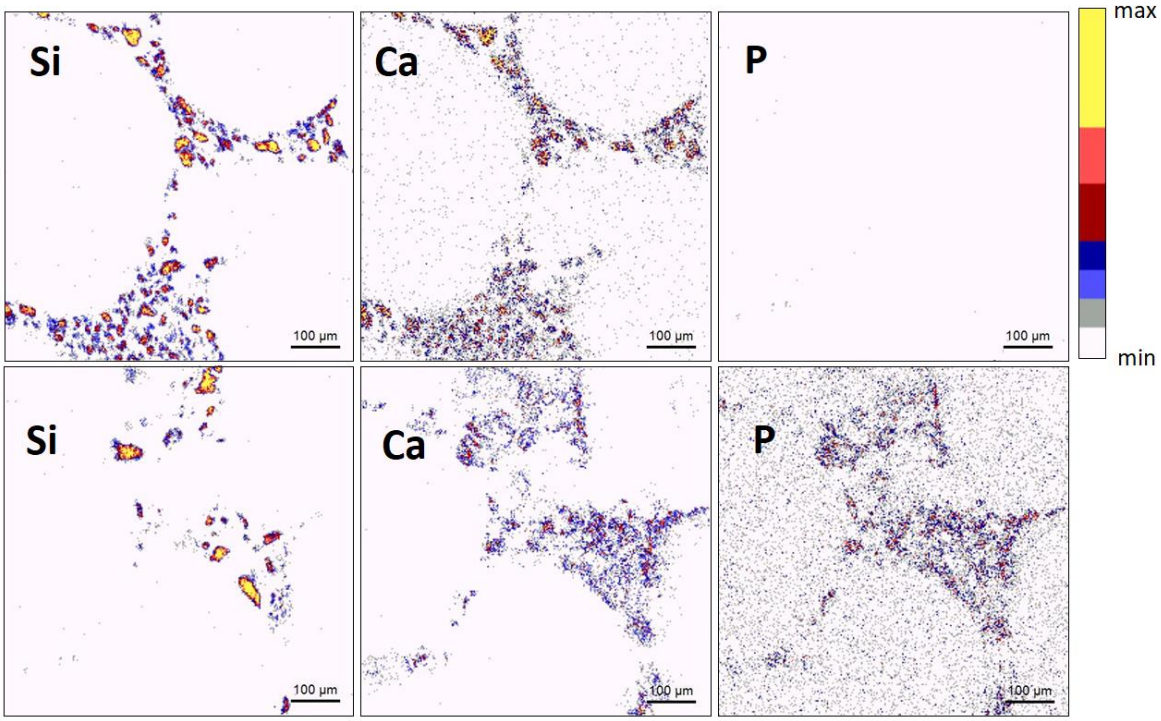


Figure 49. Cartographies élémentaires obtenues par micro-faisceau d'ions sur le scaffold PCL50 avant (en haut) et après (en bas) immersion dans le SBF pendant 3 jours.

soit divisée par 2. On retrouve les résultats de Rhee sur une vitesse de formation de l'apatite liée à la proportion de bioverre.

Les matériaux sont aussi soumis à des essais en compression (n = 5). Des scaffolds de 5 mm de hauteur et de 10 mm de diamètre sont comprimés à 1 N/min. La réponse en compression dépendant de la porosité, la structure macroporeuse des échantillons est préalablement contrôlée au MEB. Également, le volume poreux est estimé selon la formule :

$$V_{poreux} = 1 - \frac{d_{apparente}}{d_{réelle}} \quad \textbf{(15)}$$

Où la densité apparente est calculée à partir des dimensions des scaffolds et la densité réelle est mesurée par pycnométrie hélium. Les échantillons ont des volumes poreux similaires compris entre 94 % et 95 % (l'écart relatif est inférieur à 0,3 %). Les courbes de contrainte-déformation sont représentées sur la **Figure 51**. Les scaffolds PCL60, PCL70 et PCL80 ont des propriétés mécaniques identiques sans différence significative. Celles-ci seront discutées dans le chapitre suivant.

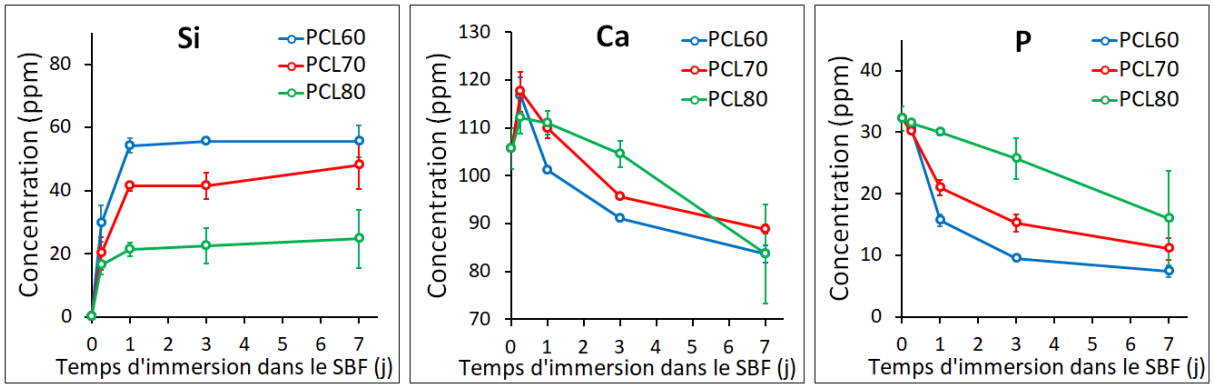


Figure 50. Évolution des concentrations en Si, Ca et P dans le SBF au cours de l'interaction avec les scaffolds.

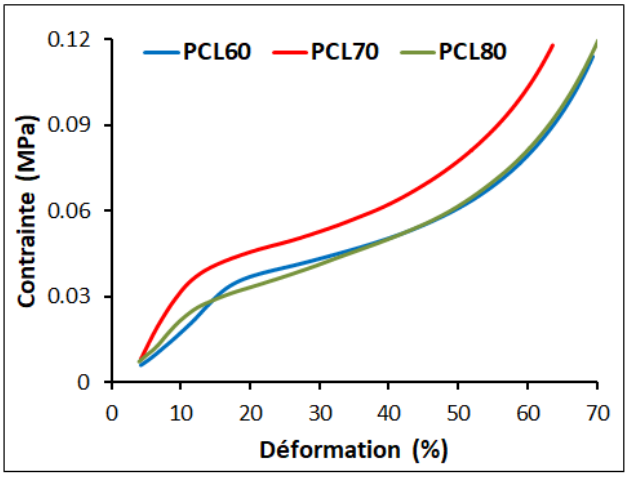


Figure 51. Courbes représentatives de contrainte-déformation obtenues par compression des scaffolds.

Pour conclure, la composition massique 60 % PCL - 40 % bioverre (PCL60) apparaît comme la plus optimale étant donné qu'elle engendre une formation plus rapide d'apatite (et donc potentiellement une meilleure bioactivité) par rapport à PCL70 et PCL80, tout en conservant les mêmes propriétés mécaniques. Cela dit, on décide de poursuivre avec la composition massique initiale 70 % PCL - 30 % bioverre (PCL70). En effet, la synthèse du PCL70 étant réalisée depuis le début de ces travaux de thèse, elle est bien mieux maîtrisée et les caractéristiques du scaffold sont mieux connues de par les nombreuses études physico-chimiques et cellulaires qui ont déjà été menées. En particulier, l'homogénéisation du sol hybride du PCL60 est complexe et requiert une mise sous ultrasons prolongée. Le scaffold élaboré est parfois hétérogène (**Figure 52**).

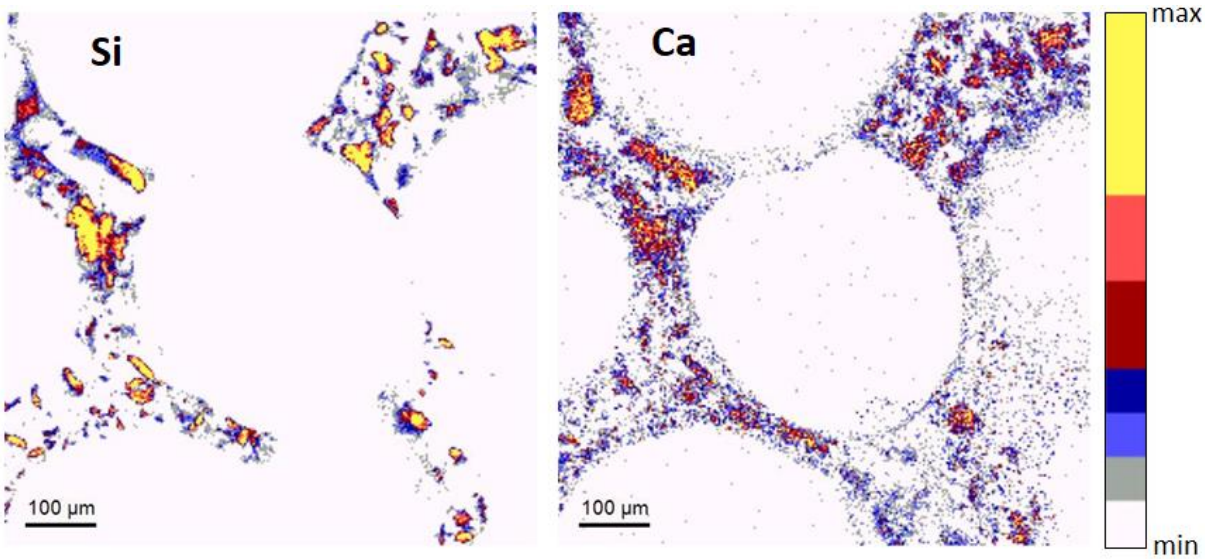


Figure 52. Cartographies élémentaires obtenues par micro-faisceau d'ions sur le scaffold PCL60.

CHAPITRE 6 PROPRIETES DU MATERIAU FINAL

Dans le chapitre précédent, l'élaboration de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre a été optimisée. Premièrement, la chaux éteinte $Ca(OH)_2$ est apparue comme un précurseur de calcium adapté qui, contrairement à l'éthoxyde, ne s'altère pas au contact de l'air. Deuxièmement, on a constaté une influence de la proportion en verre sur la vitesse de formation de l'apatite. Troisièmement, la préparation de l'empilement de billes s'est avérée critique en vue d'obtenir une structure macroporeuse interconnectée.

Dans ce chapitre sont évaluées les propriétés des scaffolds hybrides composés de 70 % massique de PCL et 30 % massique de verre bioactif, synthétisés à partir d'éthoxyde ou d'hydroxyde de calcium et fabriqués au moyen de billes de 400 à 600 µm chauffées à 50°C pendant 60 minutes. On verra dans un premier temps les propriétés physico-chimiques du matériau, puis le comportement des cellules à son contact et enfin ses performances *in vivo*.

6.1 Propriétés physico-chimiques

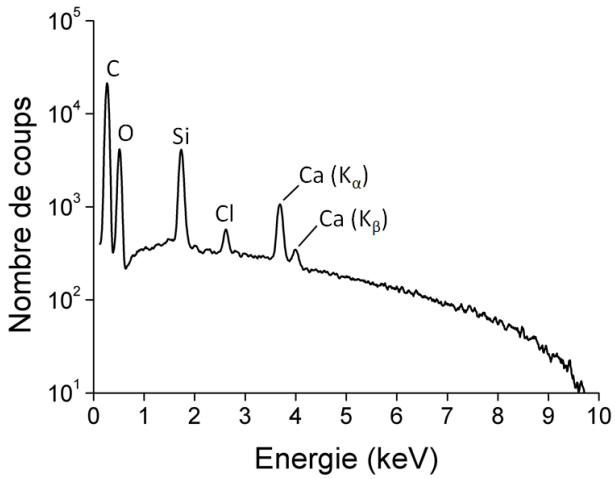
Les propriétés physico-chimiques caractérisées sont la composition, la macrostructure, les propriétés mécaniques, la capacité à former de l'apatite biomimétique et la dégradation des scaffolds au contact d'un milieu physiologique.

6.1.1 Composition

La phase inorganique de l'hybride est un verre bioactif binaire SiO_2-CaO. Les analyses en RMN présentées à la partie 5.1.3 démontrent l'intégration du calcium au sein du réseau silicate grâce à la présence d'espèces Q^3_{Ca} et $Q^2_{Ca/H}$ (**Figure 38-B**). Les espèces Q^3_H, Q^2_{2H} et $Q^2_{Ca/H}$ renseignent aussi sur la présence de silanols Si-OH. En effet, le verre étant synthétisé par chimie douce, il contient des groupements Si-OEt non-réagis (ou produits par la réaction inverse de l'hydrolyse) et des silanols résiduels qui ne se sont pas condensés (ou produits par la réaction inverse de la condensation). La quantification actuellement en cours permettra de déterminer la proportion de Si-O non-pontants, c'est-à-dire la connectivité du réseau silicate.

La composition inorganique de l'hybride, qui est en théorie 75 % massique SiO_2 - 25 % massique CaO, est déterminée par EDX avec un faisceau d'électrons de 10 keV (n = 3). La **Figure 53** représente un spectre obtenu à partir d'un scaffold préalablement métallisé au carbone. En plus du silicium et du calcium, on remarque la présence de chlore. Le chlore provient de l'acide chlorhydrique employé comme catalyseur dans les réactions sol-gel. Lorsque le précurseur de calcium $Ca(OR)_2$ est introduit dans le TEOS hydrolysé, il réagit avec l'acide chlorhydrique selon l'**équation 16**.

$$Ca^{2+} + 2\ RO^- + 2\ H^+ + 2\ Cl^- \rightarrow 2\ ROH + Ca^{2+} + 2\ Cl^- \quad \textbf{(16)}$$



Composition inorganique (% massique)

	Théorie	Expérimental
SiO_2	73,4 ± 0,1	74,8 ± 0,7
CaO	23,4 ± 0,1	22,8 ± 0,8
Cl	3,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1

Figure 53. Spectre d'émission des rayons X obtenu par analyse EDX d'un scaffold hybride PCL-bioverre et quantification.

Cette réaction de neutralisation explique la montée rapide du pH du sol de 0 à 6-7. Le précurseur de calcium est en excès : une fois l'acide fort H^+Cl^- consommé, le précurseur de calcium restant (plus de 90 % de la quantité initiale) réagit avec les groupements Si-OH faiblement acides, ce qui initie la condensation (cf. partie 5.1.3). Le fait que le chlore subsiste dans le matériau même après les étapes de rinçage à l'éthanol absolu suggère qu'il est intégré au réseau silicate. Son incorporation se fait probablement à travers des liaisons $SiO^{-}{}^{+}Ca^{+}{}^{-}Cl$. La quantification des spectres EDX (**Figure 53**) révèle que trois quarts du chlore introduit dans la synthèse sont contenus dans le matériau rincé. Les ions chlorure sont largement présents dans le sang (environ 100 mmol/L, soit 3500 ppm) et leur faible occurrence dans l'hybride (moins de 0,1 % massique) n'est *a priori* pas problématique. La présence résiduelle de chlore a toujours été constatée par l'équipe dans les bioverres sol-gel synthétisés en catalyse acide à l'HCl, sans que cela ne nuise à leur performance biologique *in vitro* ou *in vivo*.

Le ratio organique-inorganique, qui est en théorie 70-30 en pourcentages massiques, peut être vérifié expérimentalement par dégradation thermique de l'hybride. Soit les scaffolds sont traités thermiquement à 800°C, soit ils sont broyés, tamisés et la fraction 150-200 µm est analysée en ATG. Après leur passage au four à calciner, les scaffolds ont perdu entre 75 et 76 % de leur masse (n = 5). On retrouve ces valeurs par analyse thermogravimétrique (**Figure 54**). Une perte de masse de l'hybride supérieure à 70 % n'est pas choquante, puisque comme le montre la **Figure 54**, la phase organique n'est pas la seule à être dégradée : le bioverre pur est aussi altéré thermiquement et perd

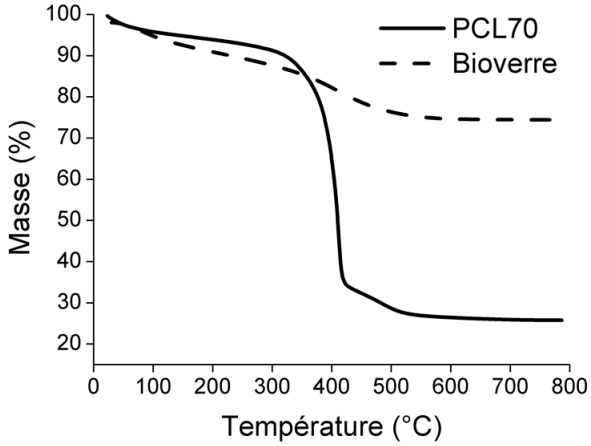


Figure 54. Analyse thermogravimétrique de l'hybride PCL-bioverre (PCL70) et du bioverre pur.

jusqu'à 25 % de sa masse. En effet, le traitement thermique résulte en une perte des groupements Si-OEt et Si-OH résiduels qui se condensent entre 350 et 500°C – ce genre de traitement thermique est d'ailleurs souvent utilisé pour densifier les verres obtenus par voie sol-gel. Comme le polymère se dégrade vers 400°C, il n'est pas possible de décorréler la perte de masse due à la dégradation du PCL de celle due à la densification du bioverre. Ainsi, ces techniques de caractérisation ne permettent pas de déterminer avec précision le ratio organique-inorganique. Elles offrent une première estimation qui sert de contrôle. Ici, une perte de masse de 75-76 % est cohérente avec une composition massique de 70 % en PCL et 30 % en verre bioactif.

La caractérisation par micro-faisceau d'ions (**Figure 55**) indique l'homogénéité chimique des scaffolds à l'échelle du micromètre. La phase inorganique semble bien distribuée au sein de l'hybride et ne forme pas de micro-domaines isolés qui pourraient évoquer des microparticules de bioverre comme cela fut le cas pour les hybrides PCL 50 et PCL60 (**Figure 49** et **Figure 52**).

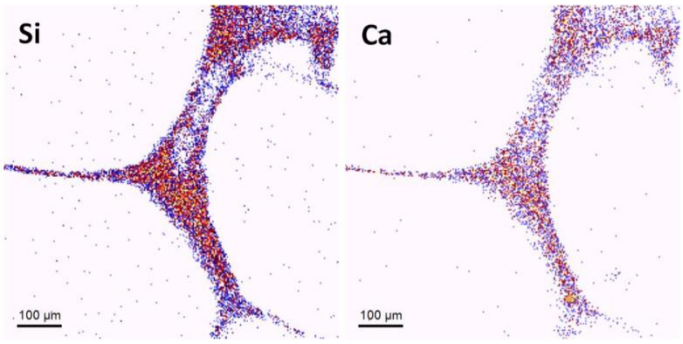


Figure 55. Cartographies élémentaires obtenues par micro-faisceau d'ions sur le scaffold hybride PCL-bioverre.

6.1.2 Structure poreuse

L'observation au MEB de la coupe d'un scaffold est représentée sur la **Figure 56-A**. La macrostructure est fortement interconnectée avec des pores bien définis. Le traitement des clichés obtenus au MEB donne une taille de pores de 464 µm ± 68 µm et une taille d'interconnexions de 196 µm ± 33 µm (cf. partie 5.2.3). On constate également une porosité dans les murs du scaffold (**Figure 56-B et C**). Cette porosité micrométrique résulte de l'évaporation du solvant. Elle peut être évitée en empêchant l'évaporation du solvant et en laissant ainsi les réactions de condensation se poursuivre jusqu'à une densification avancée du réseau silicate qui expulse le solvant des murs. Cela s'accompagnerait d'une rétraction des murs qui seraient beaucoup plus fins, mais aussi d'une rétraction globale du scaffold qui déformerait complètement la structure macroporeuse (cf. partie 5.2.1).

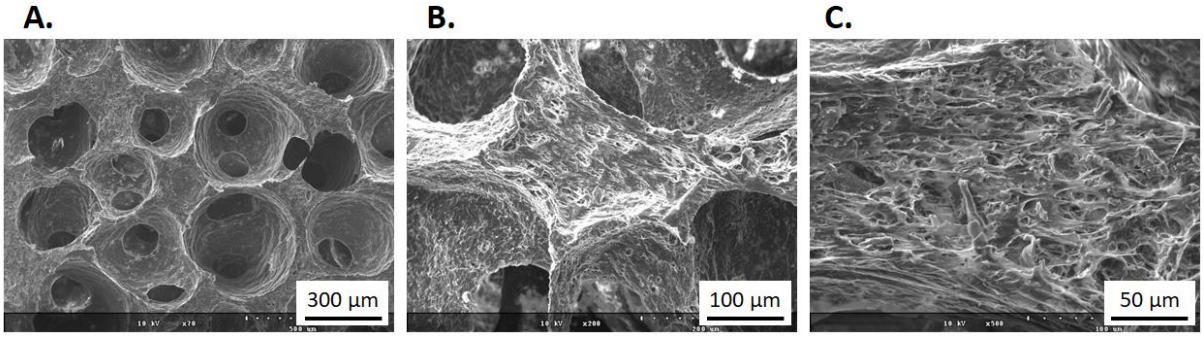


Figure 56. Scaffold d'un hybride PCL-bioverre vu au MEB.

Les scaffolds sont analysés en microtomographie des rayons X (micro-CT) en collaboration avec le Département des Biomatériaux de l'Université d'Oslo. Le matériau hybride étant constitué en majorité d'éléments légers (H, C, O), il est généralement radio-transparent. Sa radio-transparence peut d'ailleurs être exploitée en clinique pour suivre la repousse osseuse post-implantation et vérifier la réussite de l'opération. Cette vérification est réalisable au moyen d'une radiographie, contrairement à aujourd'hui où, les substituts osseux commercialisés étant radio-opaques, elle nécessite l'ouverture de la plaie. En revanche, la radiographie ne permettrait plus de vérifier la pose de l'implant, ce dernier quittant parfois le site d'implantation et ce notamment lorsqu'il est sous forme de granules. Dans le cas de nos analyses, le système d'imagerie (SkyScan 1172), les paramètres utilisés (40 kV, 167 µA et résolution de 6 µm par voxel) et les compétences de nos collaborateurs ont permis la reconstruction en trois dimensions des scaffolds. Les images 2D confirment la porosité micrométrique contenue dans les murs (**Figure 57-A**) qui, avec une épaisseur de 145 µm ± 6 µm, sont deux à trois fois plus larges que les trabécules osseuses humaines [106]. Le volume poreux calculé est de 75,2 % ± 1,2 % lorsque cette porosité micrométrique est prise en compte (**Figure 57-A**) et de 68,5 % ± 1,1 % lorsqu'elle ne l'est pas (**Figure 57-B**). Ces valeurs incluent une porosité fermée

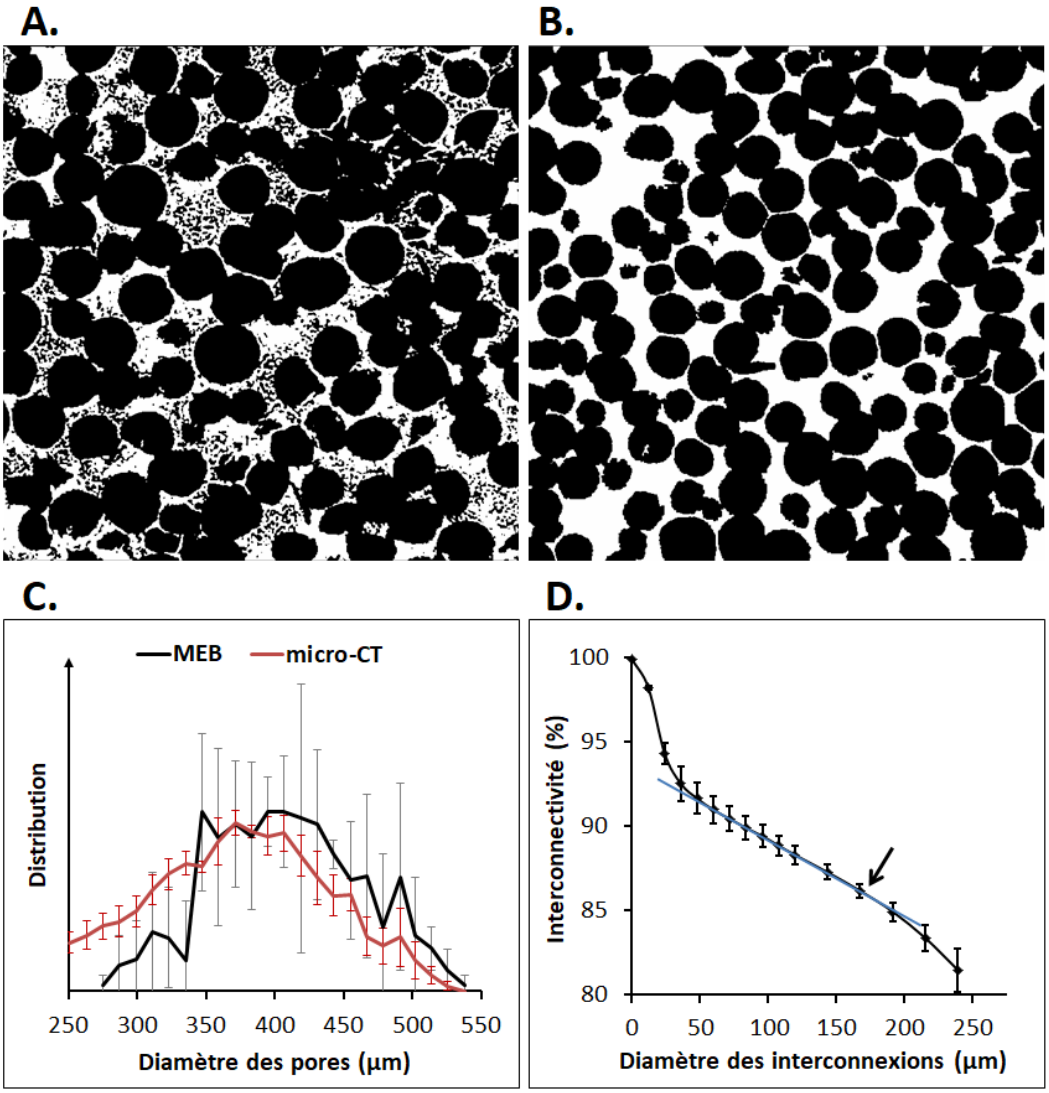


Figure 57. Images 2D du scaffold traitées par micro-CT avec (A) et sans (B) la porosité contenue dans les murs. Distribution de la taille de pores déterminée par micro-CT et MEB (C). Analyse de l'interconnectivité réalisée en micro-CT (D). La flèche indique une décroissance accélérée de l'interconnectivité.

inférieure à 0,1 % qui va dans le sens d'une structure fortement interconnectée. La **Figure 57-C** illustre la distribution de la taille de pores obtenue soit par le traitement des images reconstruites en micro-CT, soit par le traitement des clichés MEB. La distribution est similaire avec les deux méthodes et est centrée autour de 400 µm. La **Figure 57-D** donne l'évolution de l'interconnectivité en fonction du diamètre des interconnexions. Un diamètre de 80 µm correspond à une interconnectivité de 90 % ; il faut comprendre qu'un objet sphérique de 80 µm peut circuler librement dans 90 % du volume poreux. Plus cet objet est imposant, plus le volume auquel il a accès est restreint. Une diminution abrupte du volume accessible, comme c'est le cas entre 6 et 30 µm et vers 160 µm, signifie que de nombreuses fenêtres communicant avec des espaces poreux ne sont plus franchissables. Les diamètres de 6 à 30 µm correspondent aux pores présents dans les murs des scaffolds, tandis que le diamètre de 160 µm correspond aux premières interconnexions, ce qui est en accord avec les observations au MEB. La structure fortement interconnectée du scaffold associée à une taille d'interconnexions supérieures à 150 microns permettent ainsi une libre circulation des cellules au sein du matériau.

6.1.3 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des scaffolds ont été évoquées à la partie 5.3.2. Les essais en compression révèlent un comportement ductile de l'hybride avec trois domaines caractéristiques (**Figure 58**) : un régime élastique linéaire correspondant à un écrasement réversible du scaffold, un plateau correspondant à un effondrement progressif et irréversible des murs, et un dernier domaine correspondant à une densification du matériau une fois que tous les pores sont écrasés [107]. Cette ductilité laisse envisager une implantation de l'hybride dans des sites soumis à des charges cycliques, et il faudrait pour le confirmer réaliser des essais mécaniques en charge-décharge pour évaluer la réversibilité de la déformation. En effet, il est important que dans l'intervalle de déformation du défaut osseux, le scaffold se déforme de manière réversible, sinon il ne serait plus à la taille du défaut, ce qui pourrait conduire à une mauvaise intégration de l'implant et son rejet. Le module de Young ou module d'élasticité (noté E) est déterminé à partir de la pente du régime linéaire ; il vaut 0,49 MPa ± 0,03 MPa. La contrainte à la limite d'élasticité (notée σ_e) est déterminée à la transition du régime élastique vers le plateau ; elle vaut 0,036 MPa ± 0,003 MPa. Ces propriétés mécaniques sont

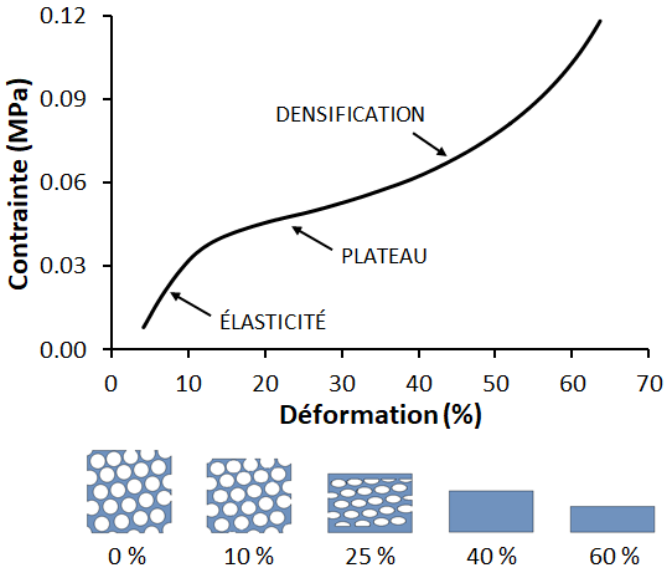


Figure 58. Courbe de contrainte-déformation obtenue par compression du scaffold sec.

très inférieures à celles de l'os trabéculaire qui est nettement plus rigide (E > 10 MPa ; σ_e > 0,1 Mpa) à porosité équivalente [107, 108]. Toutefois, l'hybride possède un domaine élastique étendu : il peut se déformer de façon réversible jusqu'à plus de 10 % (réversibilité à vérifier en essai charge-décharge), alors que la déformation à la limite d'élasticité de l'os trabéculaire ne dépasse pas les 3 %. La faible rigidité des scaffolds peut être attribuée d'une part au polymère employé, le PCL, qui est extrêmement flexible en comparaison avec les autres polymères biorésorbables et ce même avec un poids moléculaire élevé (ici, M_n = 80 000 g/mol) [109, 110], d'autre part à l'absence de liaisons fortes entre les phases organique et inorganique (ici, l'hybride est un classe I) [111].

Idéalement, un substitut osseux doit avoir des propriétés mécaniques proches de celles de l'os qu'il remplace. Si le matériau est trop rigide, il supporte l'essentiel des charges mécaniques soumises au site d'implantation. Les tissus osseux environnants transfèrent les charges au substitut osseux qui est plus rigide, ils ne font plus d'effort mécanique et, n'étant plus sollicités, ils se résorbent. La résorption de l'os au contact de l'implant est synonyme d'une mauvaise ostéo-intégration de l'implant qui peut alors être sujet à une encapsulation fibreuse, c'est-à-dire à un rejet. Si le matériau n'est pas assez rigide, ce qui est le cas ici, les tissus osseux environnants supportent l'essentiel des charges. L'absence de *stimuli* mécaniques au sein de l'implant peut alors constituer un frein à la néoformation osseuse (à l'image de l'os qui se résorbe lorsqu'il n'est pas sollicité). Dans le cas des substituts osseux, l'influence des propriétés mécaniques sur l'ostéogenèse est cependant controversée et certains estiment que le matériau doit simplement pouvoir être manipulé par le chirurgien et qu'il doit autoriser les activités du patient. En matière de manipulation, la flexibilité et l'élasticité des scaffolds hybrides PCL-bioverre s'avèrent avantageuses. Le scaffold peut être taillé proprement et aisément au scalpel afin d'ajuster ses dimensions au défaut osseux, et il est possible de le compresser légèrement pour faciliter sa mise en place sachant qu'il reprend ensuite sa forme initiale.

6.1.4 Bioactivité

La bioactivité des scaffolds est évaluée *in vitro* à travers des interactions avec le SBF. La spectroscopie IR, la DRX et l'ICP-AES ont permis de démontrer la capacité des scaffolds à induire la formation d'apatite (cf. partie 5.1.4). Les matériaux interagis sont aussi caractérisés par micro-faisceau d'ions (collaboration avec le CENBG à Gradignan) et observés au MEB (collaboration avec le CIRIMAT à Toulouse).

Les évolutions des concentrations en ions silicates, calcium et phosphates dans le SBF (obtenues par ICP-AES, **Figure 59-A**) et dans le matériau (obtenues par PIXE, **Figure 59-B**) s'accordent parfaitement. Elles sont caractéristiques de l'interaction des verres bioactifs avec le SBF, avec dans un premier temps la dissolution du verre, puis dans un second temps la précipitation d'un phosphate de calcium. Les cartographies élémentaires du scaffold interagi 3 jours (**Figure 59-C**) montrent que la formation de l'apatite n'est pas limitée à la surface des parois étant donné que l'on retrouve du phosphore à l'intérieur des murs. Cette bioactivité améliorée avait déjà été observée avec les hybrides gélatine-bioverre lors du projet de maturation [64]. Ce résultat s'oppose au mécanisme proposé par Larry Hench qui décrit la formation de l'apatite sur des verres élaborés par fusion (cf. chapitre 1) : dans ce mécanisme, la nucléation de l'apatite n'est possible que par le biais d'une couche *surfacique* de silice hydratée produite par la dissolution-reprécipitation du réseau silicate (**Figure 59-D**, [112]). En effet, l'apatite se forme grâce à l'attraction électrostatique entre les silanols déprotonés SiO^- présents dans cette couche hydratée et les ions calcium Ca^{2+} du milieu [113-115]. Les

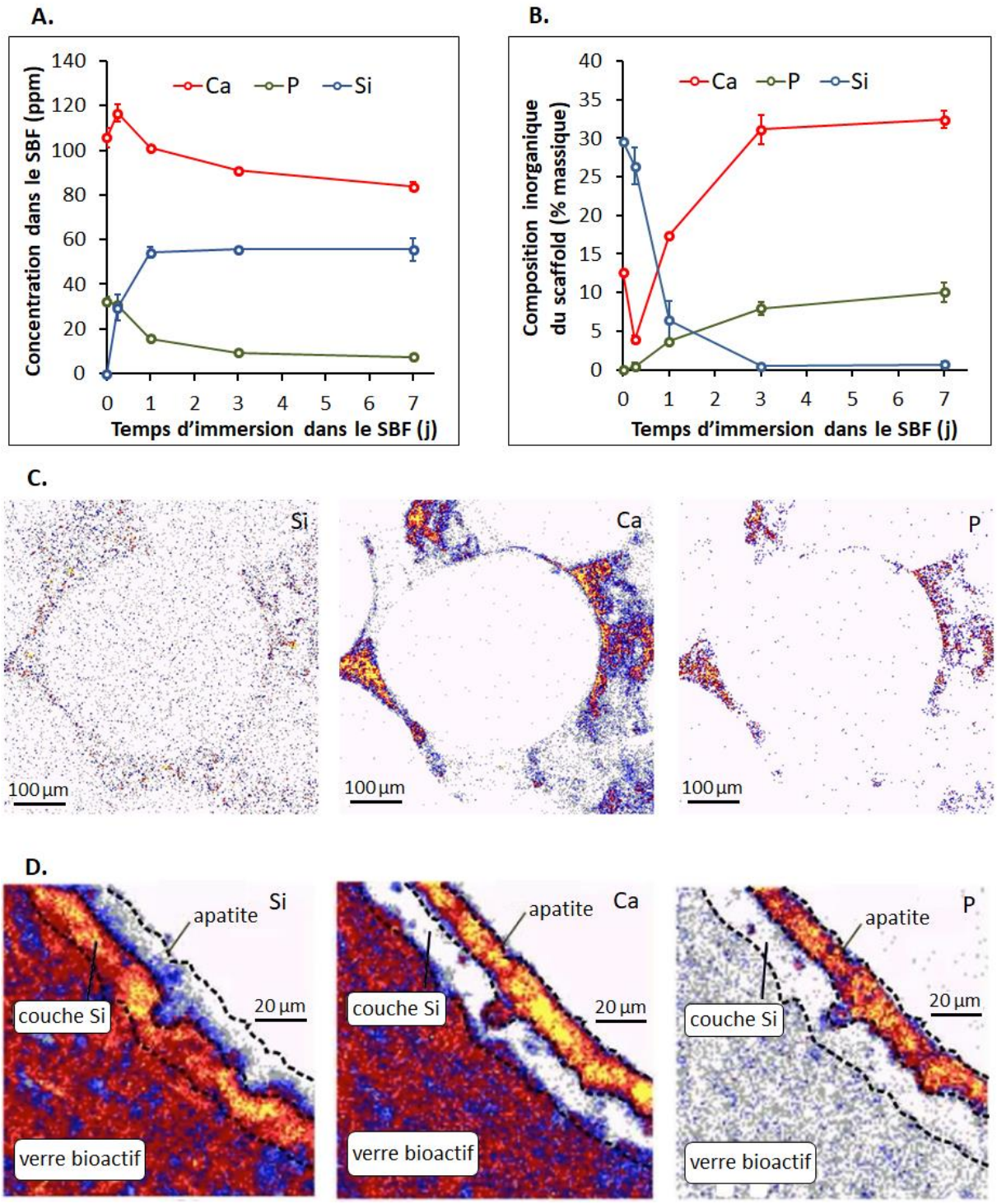


Figure 59. Évolutions au cours de l'interaction des concentrations en Si, Ca et P dans le SBF (A) et dans le scaffold (B) déterminées par ICP-AES et par PIXE, respectivement. Cartographies élémentaires obtenues par micro-faisceau d'ions sur le scaffold hybride PCL-bioverre après 3 jours d'immersion dans le SBF (C) et sur un bioverre élaboré par fusion après 7 jours d'immersion dans le SBF (D).

silicates de calcium générés se combinent à leur tour avec les ions phosphates du milieu pour donner un phosphate de calcium amorphe (ACP) qui continue d'incorporer des ions et cristallise peu à peu en une apatite. Ici, l'hybride étant élaboré par chimie douce, sa phase inorganique possède une faible connectivité et de nombreux silanols résiduels (cf. partie 5.1.3) qui favorisent la nucléation de l'apatite. Par conséquent, l'apatite peut précipiter directement sur et dans l'hybride sans qu'une

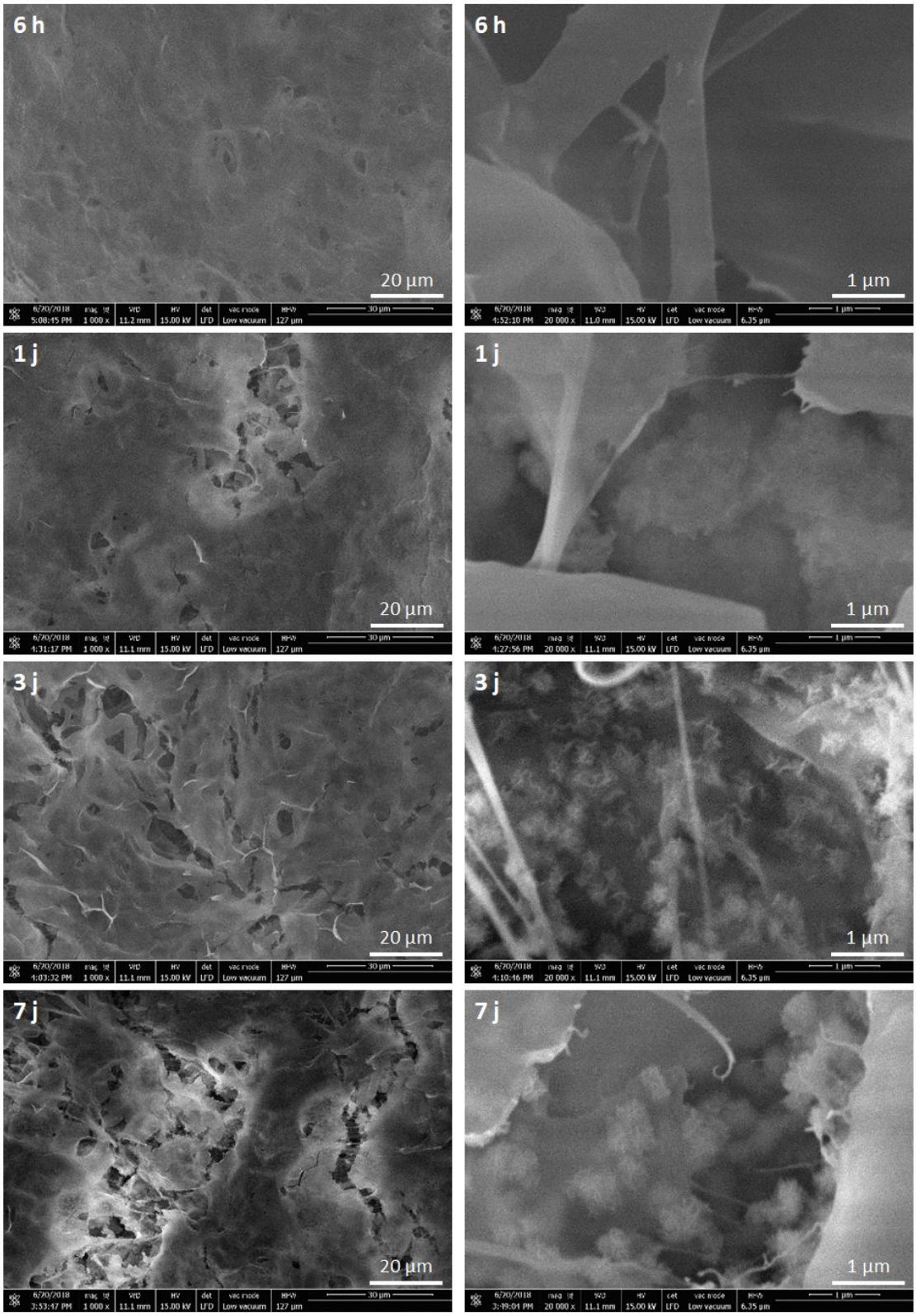


Figure 60. Scaffold d'un hybride PCL-bioverre après interaction avec le SBF pendant 6 h, 1 j, 3 j et 7 j, vu au MEB.

couche de silice ne se forme à sa surface. La porosité microscopique joue aussi un rôle important dans la précipitation homogène d'apatite dans la masse du scaffold.

Au MEB (**Figure 60**), on constate que des précipités se forment au niveau des pores contenus dans les murs du scaffold. Ces pores sont de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, ce qui

rejoint les observations faites en micro-CT. Par ailleurs, ils semblent s'élargir au fur et à mesure de l'interaction avec le SBF, probablement à cause de la dégradation de l'hybride – on voit également apparaître des fissures le long des parois. Les précipités, en forme de sphérulite, ressemblent typiquement à de l'apatite [101, 116]. Leur nombre et leur taille augmentent au cours de l'interaction jusqu'à couvrir entièrement la surface sur laquelle ils s'agrègent. L'apatite germe préférentiellement au niveau des pores de taille micrométrique car la diffusion des produits de dissolution (Ca, Si) vers l'extérieur des pores est moins efficace. Localement, il y a une saturation du milieu qui devient thermodynamiquement favorable à la précipitation d'apatite. Les murs des scaffolds contiennent de nombreux pores qui communiquent avec l'extérieur (on rappelle une porosité fermée inférieure à 0,1 % d'après la micro-CT). Ainsi, le SBF peut s'immiscer dans le volume des murs et y provoquer le dépôt d'apatite.

6.1.5 Dégradation

Dégradation de la phase inorganique. Les ions silicates et calcium issus de la dissolution des verres bioactifs stimulent l'expression de 7 familles de gènes responsables de l'ostéogénèse [117, 118]. Ces produits de dissolution sont responsables du caractère ostéoinducteur des bioverres [14, 119]. Cependant, un relargage trop important de ces ions, qui arrive généralement au début de l'immersion du bioverre dans un milieu physiologique, peut provoquer la mort cellulaire. Pour cette raison, certains auteurs recommandent une pré-incubation *in vitro* du bioverre pendant 2 à 3 jours avant de l'implanter *in vivo* [120].

La vitesse de dégradation de la phase inorganique de l'hybride est évaluée par des interactions semi-dynamiques. Les scaffolds sont immergés dans un fluide physiologique (SBF ou milieu de culture cellulaire) qui est renouvelé tous les deux jours. Le milieu interagi est ensuite analysé en ICP-AES. Cette expérience permet de simuler les conditions *in vivo* puisque la circulation du sang permet son renouvellement constant au niveau du site d'implantation.

L'interaction semi-dynamique représentée sur la **Figure 61-A** compte 6 interactions réalisées avec 1 mL de SBF par mg de scaffold. On constate que le matériau relargue 52 ppm de silicium après la première interaction, 8 ppm après la seconde et 1 ppm après la troisième. Cela correspond en théorie à 60 % du silicium initialement contenu dans l'hybride. On peut conclure que dans ces conditions, le réseau silicate se dissout rapidement. Sur les 30 ppm de phosphore initialement présents dans le SBF, seulement 6 ppm subsistent après la première interaction et 11 à 13 ppm subsistent après les interactions suivantes. Autrement dit, le matériau consomme plus de phosphore au début (interaction 1), ce qui s'explique par la nucléation et la croissance de l'apatite, puis cette consommation n'est plus liée qu'à la croissance des cristaux et elle devient plus faible et régulière (interactions 2 à 6). Le matériau consomme des quantités importantes de phosphore et de calcium, ce qui indique une précipitation conséquente de phosphates de calcium. Pour les interactions 2 à 6, les ratios massiques $Ca_{consommé}/P_{consommé}$ sont compris entre 2,16 et 2,27, sachant que la valeur théorique massique Ca/P de l'apatite stœchiométrique vaut 2,2 (ou 1,67 en atomique). Il semble donc que la phase qui précipite est bien de l'apatite biomimétique. Après les six interactions, le scaffold est observée au MEB et en PIXE. Ces deux techniques révèlent une réactivité avancée et homogène du matériau. Au MEB, on voit que les parois du scaffold sont toutes recouvertes d'agrégats en forme de sphérulite qui ressemblent typiquement à de l'apatite (**Figure 61-C**). En PIXE, on voit que la phase inorganique de l'hybride s'est complètement transformée en phosphates de calcium et ce dans tout le volume du scaffold (**Figure 61-D, E et F**).

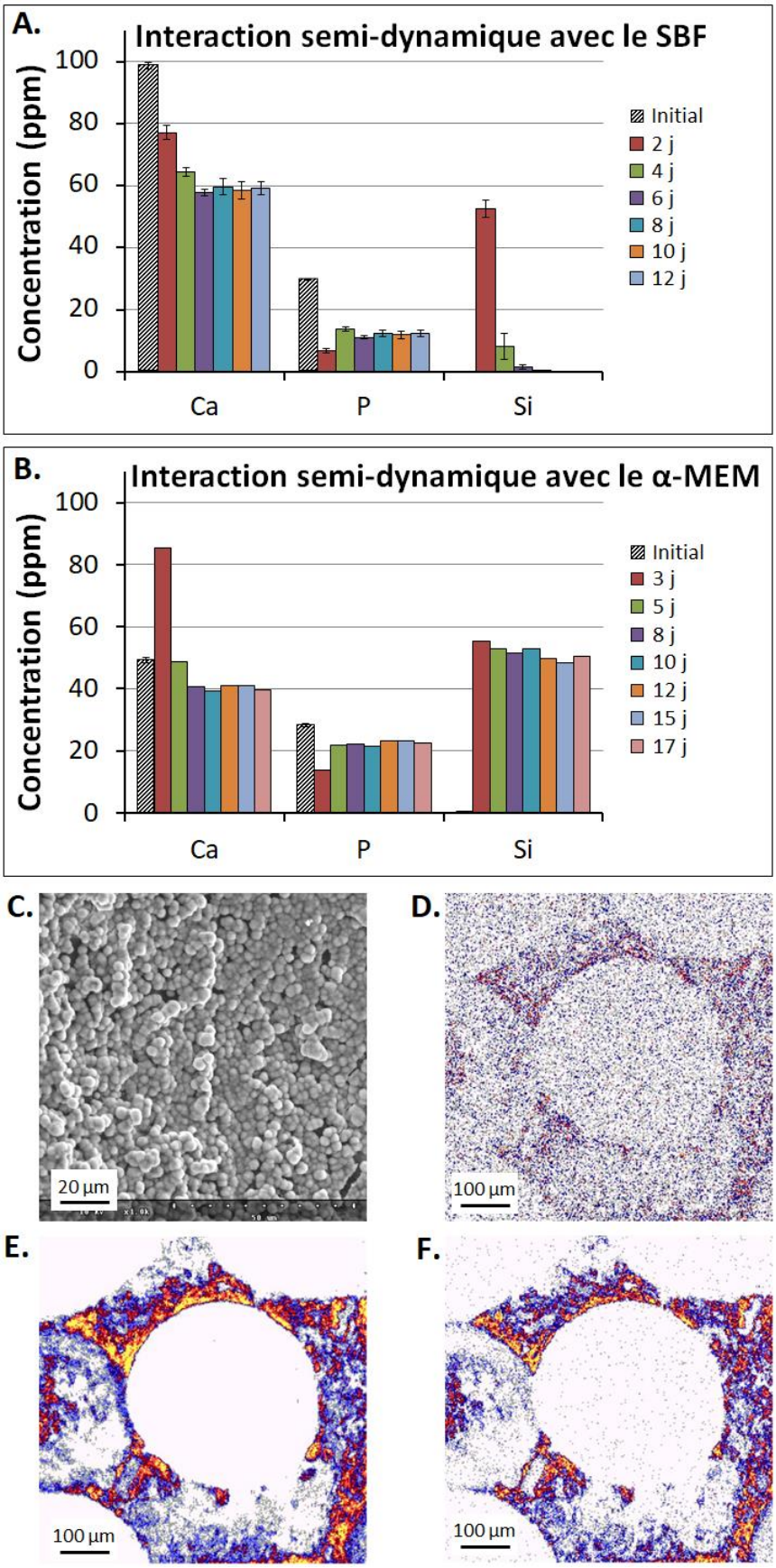


Figure 61. Concentrations déterminées par ICP-AES en Si, Ca et P dans le SBF (A) et dans le milieu de culture (B) après interaction avec un scaffold. Scaffold après 12 jours d'interaction avec du SBF vu au MEB (C) et en PIXE (D-F).

L'interaction semi-dynamique représentée sur la **Figure 61-B** compte 7 interactions réalisées avec 0,07 mL de α-MEM par mg de scaffold. On constate que le matériau relargue environ 50 ppm de silicium dans toutes les interactions, une concentration qui semble correspondre à la saturation du milieu en silicium. En effet le silicium issu de la dégradation du bioverre est relargué dans le milieu principalement sous forme d'acide orthosilicique $Si(OH)_4$, qui possède une limite de solubilité (en milieu aqueux à 25°C) de 2 mmol/L soit 58 ppm de Si, expliquant les présentes valeurs [121]. Si le matériau continue ici de délivrer des ions même après des temps d'interaction longs, c'est parce qu'il est immergé dans un volume faible de milieu de culture comparé aux essais dans le SBF (14 fois moins de milieu ici pour une même masse de matériau immergé). Ainsi, alors que 50 ppm de silicium relargués correspondaient à 50 % du silicium constitutif de l'hybride lors de la première interaction semi-dynamique (**Figure 61-A**), ici ils ne correspondent qu'à 3 %. Cette vitesse de dissolution du réseau silicate est plus appropriée à la régénération osseuse puisqu'elle permet un relargage d'ions ostéogéniques continu et maintenu sur une plus longue période.

Ces résultats ne permettent pas de déduire la vitesse de dissolution du réseau silicate *in vivo* puisque dans ces expériences, le milieu est renouvelé tous les deux jours alors que le sang l'est en permanence. Néanmoins, la seconde interaction semi-dynamique est plus proche des conditions *in vivo* pour ce qui est du volume de milieu par rapport à la quantité de matériau, et est représentative des conditions des essais cellulaires *in vitro* .

Dégradation de la phase organique. *In vivo*, le PCL (**Figure 62**) se dégrade en deux étapes : tout d'abord, une absorption d'eau provoque le clivage par hydrolyse des fonctions esters qui se traduit par une diminution du poids moléculaire ; une fois que le poids moléculaire est réduit à approximativement 3 000 g/mol, le polymère est éliminé naturellement *via* un mécanisme intracellulaire [81]. À cause de la présence de cinq unités hydrophobes CH_2 dans son motif de répétition, la désestérification du PCL est lente et peut prendre plus de 2 ans selon le poids moléculaire initial du polymère, tandis que la dégradation intracellulaire et l'excrétion des déchets durent 4 à 5 mois [122].

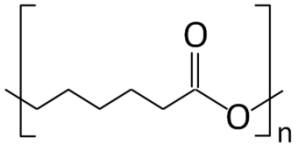


Figure 62. Polycaprolactone.

La dégradation de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre est étudiée *in vitro* en suivant leurs masses dans le SBF pendant 8 semaines (**Figure 63, à gauche**). Les échantillons se dégradent lentement avec une perte de masse de seulement 13 % après 8 semaines d'immersion dans le SBF. La vitesse de dégradation paraît adaptée au comblement osseux, contrairement à celle de nombreux hybrides présents dans la littérature. Par exemple, Poologasundarampillai *et al.* mentionnent le relargage de 60 % de l'acide polyglutamique après 2 semaines d'immersion dans le SBF [52], et Li *et al.* mentionnent une perte de masse de 43 % de l'hybride polyéthylène glycol-bioverre après 3 semaines [44]. Comme démontré lors des essais de bioactivité *in vitro* (**Figure 59-A et B**), la phase inorganique de l'hybride se dissout principalement pendant la première semaine d'une interaction non-dynamique. Cela implique que les pertes de masse à 2, 4 et 8 semaines sont probablement causées par la dégradation du PCL plutôt que par la dissolution du bioverre. Ainsi, il semble que la

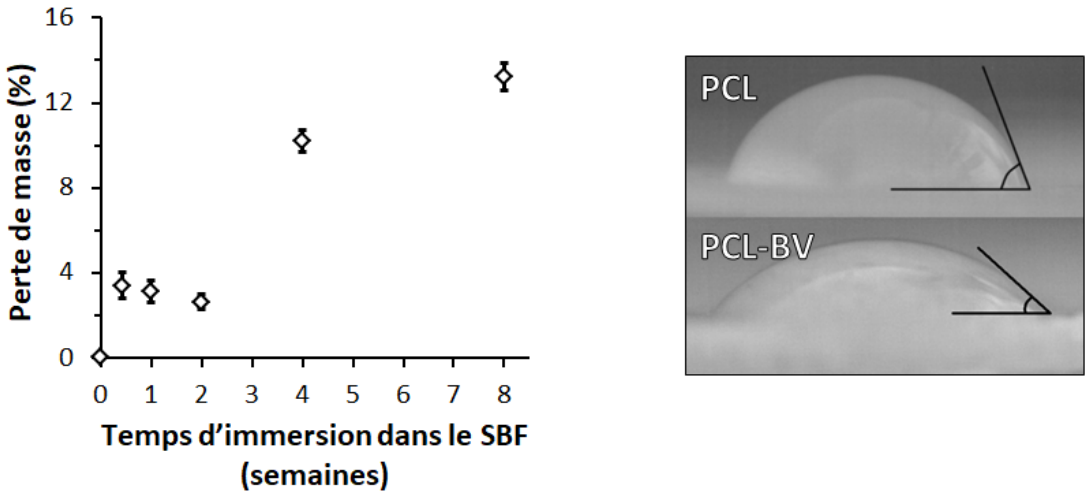
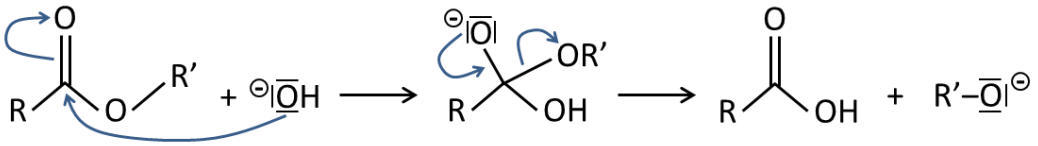


Figure 63. Dégradation des scaffolds d'un hybride PCL-bioverre dans le SBF (à gauche) et exemples de mouillabilité de pastilles en PCL pur et en hybride PCL-bioverre (à droite).

désestérification se produise après quelques semaines dans l'hybride PCL-bioverre au lieu de plusieurs mois voire années dans le PCL pur. Cette différence de cinétique peut être expliquée par le caractère hydrophile du bioverre. En effet, des mesures d'angle de contact (θ) entre une gouttelette d'eau et des pastilles de PCL (θ = 83,4° ± 3,1°) ou d'hybride PCL-bioverre (θ = 56,3° ± 4,8°) montrent que la présence de bioverre augmente la mouillabilité du matériau (**Figure 63, à droite**). L'absorption d'eau, qui initie le clivage par hydrolyse des fonctions esters, est donc plus rapide dans l'hybride. De plus, le bioverre est connu pour induire une élévation du pH en se dissolvant. En plus d'un effet antibactérien déjà prouvé [123], les ions hydroxydes peuvent catalyser la scission des liaisons esters selon le mécanisme réactionnel suivant :

1) 

2) $R'O^- + H_2O \longrightarrow R'–OH + HO^-$

6.2 Étude cellulaire

Le comportement d'ostéoblastes primaires de rats au contact de l'hybride est évalué par Henri Granel, doctorant à l'INRA Theix, Unité de Nutrition Humaine UMR 1019 INRA/UCA et dont la thèse, effectuée sous la direction de Yohann Wittrant dans le cadre du programme Thématiques Emergentes financé par le conseil régional d'Auvergne et le FEDER, porte sur la caractérisation des scaffolds d'hybride PCL-bioverre du point de vue biologique. Les matériaux hybrides sont systématiquement pré-incubés dans du milieu de culture pendant 72 h. L'adhésion, la prolifération, la colonisation et la différenciation des cellules sont étudiées. Les différences statistiques sont estimées avec un test des étendues de Tukey et un intervalle de confiance de 95 %. Les méthodes employées sont détaillées dans la thèse de Henri Granel.

6.2.1 Adhésion

L'adhésion des cellules à la surface d'un matériau est un prérequis à leur prolifération et à leur différenciation [124]. Les ostéoblastes primaires sont cultivés sur des pastilles de PCL pur et d'hybride PCL-bioverre, puis observés au MEB (**Figure 64-A et B**). Seulement quelques cellules adhèrent au substrat en PCL pur et elles possèdent une morphologie sphérique et recroquevillée caractéristique d'une faible adhésion, tandis que les cellules apparaissent bien étalées sur le substrat hybride PCL-bioverre avec des filopodes allongés indiquant une bonne adhésion. Ces projections cytoplasmiques sont aussi visibles sur la **Figure 64-C** où les noyaux fluorescent en bleu et le cytosquelette fluoresce en vert. L'adhésion des ostéoblastes sur l'hybride peut être expliquée par sa plus grande mouillabilité (**Figure 63, à droite**) étant donné que des surfaces hydrophiles sont souhaitables pour l'adhésion cellulaire [125]. Également, on peut penser que la précipitation d'apatite biomimétique en surface de l'hybride facilite l'adhésion des cellules. En effet, Olmo *et al.* ont montré que la formation d'apatite sur un bioverre composé de 75 % massique de SiO_2 et 25 % massique de CaO améliore significativement l'attache initiale des ostéoblastes [126].

L'adhésion des cellules sur les scaffolds hybrides PCL-bioverre est comparée à un biomatériau issu d'os trabéculaire bovin noté OTB (n = 4). Il s'agit d'un substitut osseux commercial de référence, fourni gracieusement par la société OST Développement, fabriqué à partir d'os bovin traité chimiquement de sorte à en retirer l'essentiel de la matière organique tout en préservant une partie de la trame collagénique, ce qui lui procure des propriétés biologiques supérieures à celles de biomatériaux issus d'os traités thermiquement notamment en termes d'adhésion cellulaire. La focal adhesion kinase (FAK) est une protéine qui se trouve dans le cytoplasme des cellules au niveau du

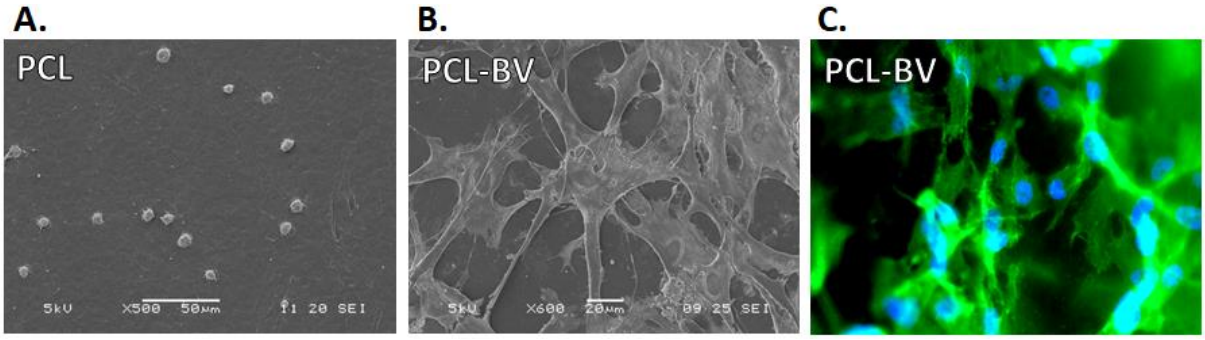


Figure 64. Clichés MEB d'ostéoblastes primaires cultivés sur des pastilles en PCL (A) ou en hybride PCL-bioverre (B). Image obtenue par la fluorescence d'ostéoblastes primaires cultivés sur une pastille en hybride PCL-bioverre (C). Les noyaux apparaissent en bleu et le cytosquelette en vert.

complexe d'adhérence. La phosphorylation de sa tyrosine 397 (p-FAK) est indicative de son implication dans l'adhésion cellulaire. Ainsi, la quantité de p-FAK relativement à la quantité de FAK renseigne sur l'adhésion des cellules. La morphologie des ostéoblastes cultivés dans les scaffolds hybrides PCL-bioverre est similaire à celle observée sur les pastilles (**Figure 65-A**). La **Figure 65-B** montre que l'adhésion des ostéoblastes est significativement plus importante sur les scaffolds hybrides (valeur-p = 0,009). La mouillabilité du matériau, la précipitation d'apatite à sa surface mais aussi la rugosité des parois des scaffolds (**Figure 65-C et D**) sont les causes probables de cette forte affinité avec les ostéoblastes. En effet, la topographie est un paramètre clef de l'adhésion cellulaire [127].

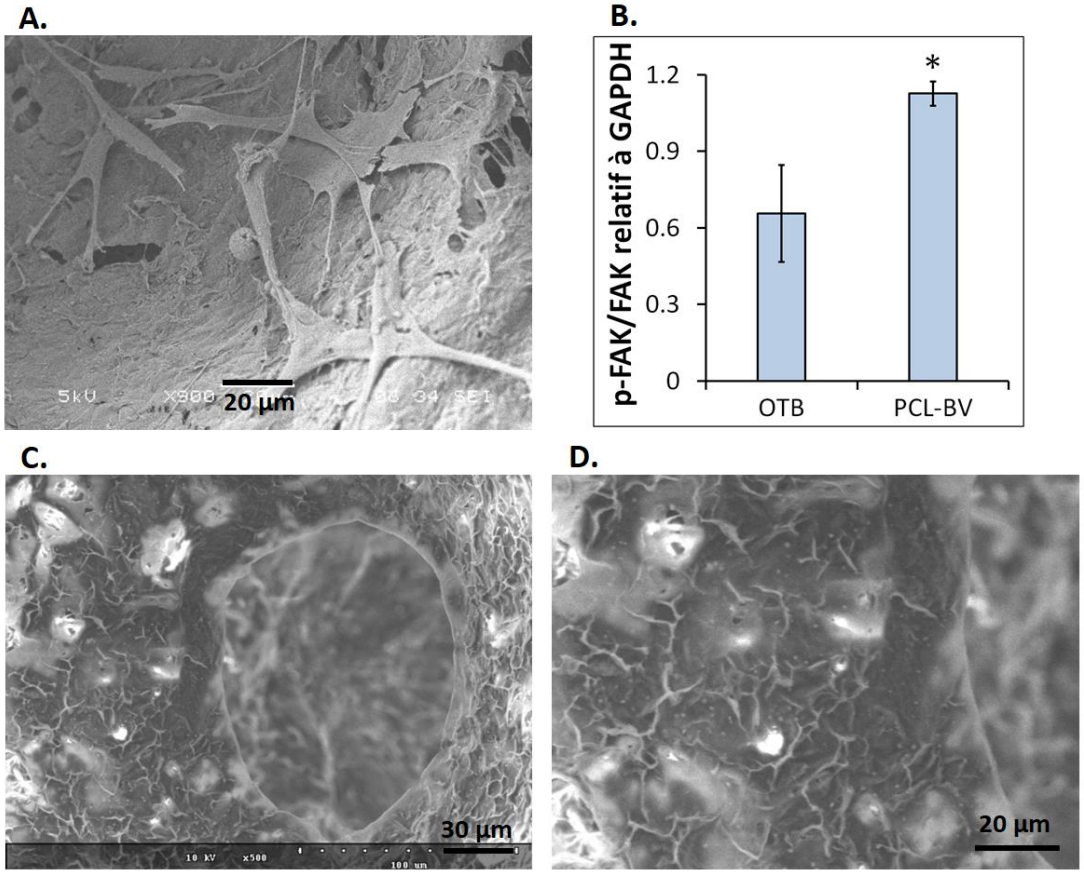


Figure 65. Cliché MEB d'ostéoblastes primaires cultivés dans un scaffold hybride PCL-bioverre (A). Résultats quantitatifs sur l'adhésion cellulaire (p* < 0,01) dans l'OTB et l'hybride (B). Clichés MEB des parois d'un scaffold sans cellule (C et D).

6.2.2 Prolifération

La cytotoxicité du matériau est évaluée en comparant la prolifération d'ostéoblastes primaires en présence de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre, d'OTB ou sans biomatériau (n = 3) après 4 jours de culture. Les cellules ne sont pas directement au contact du matériau : elles sont exposées aux produits de dissolution. Ces essais ont pour but de vérifier l'efficacité de la pré-incubation de l'hybride. La pré-incubation doit permettre d'éviter un relargage d'ions trop important et potentiellement cytotoxique qui a souvent lieu juste après l'immersion des bioverres dans un fluide physiologique. Comme le montre la **Figure 66**, les cellules prolifèrent sans différence significative entre les différentes conditions (valeur-p > 0,15). Ainsi, le scaffold hybride pré-incubé ne semble pas cytotoxique.

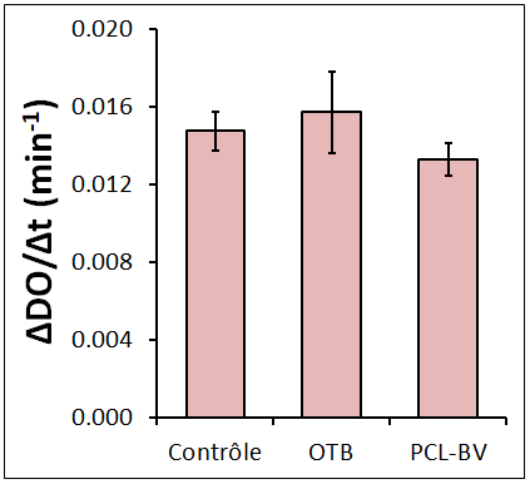


Figure 66. Résultats quantitatifs sur la prolifération cellulaire.

6.2.3 Colonisation

La pénétration des cellules dans tout le volume de la mousse est essentielle à l'ostéoconduction. La porosité du scaffold doit ainsi permettre la migration des cellules en son sein, mais aussi la circulation des fluides afin d'assurer l'approvisionnement en nutriments et l'activité cellulaire. Les images en fluorescence montrent la présence d'ostéoblastes primaires viables au cœur du scaffold hybride (**Figure 67**), ce qui démontre le potentiel ostéoconducteur du matériau.

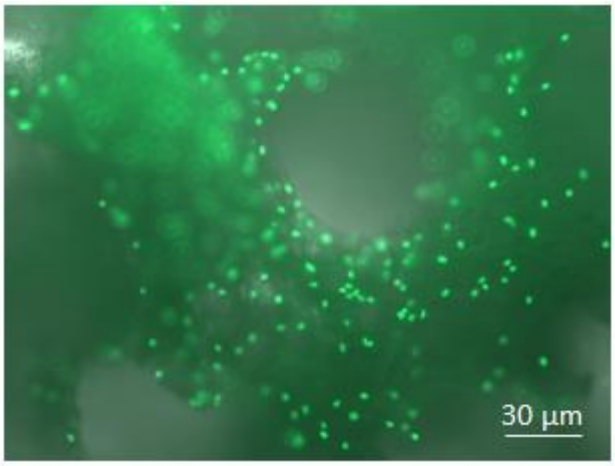


Figure 67. Image obtenue par la fluorescence d'ostéoblastes primaires cultivés dans un scaffold en hybride PCL-bioverre. Le matériau fluoresce en vert foncé et les points verts intenses correspondent aux noyaux des cellules.

6.2.4 Différenciation

La différenciation des ostéoblastes primaires est évaluée indirectement *via* la mesure de l'activité ALP après 7 et 14 jours de culture dans de l'OTB ou des scaffolds hybrides PCL-bioverre (n = 6). Le milieu de culture ne contient pas de facteur de différenciation. D'après la **Figure 68**, l'activité ALP est significativement plus élevée dans l'hybride à 14 jours (valeur-p < 0,0001). Cela signifie que l'hybride induit la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation de l'os néoformé. Cette ostéostimulation du matériau est sans doute liée à sa topographie, à la précipitation d'apatite à sa surface et aux produits de dissolution de la phase inorganique. En effet, comme démontré par

Xynos *et al.* en 2001 [14], les ions silicates et calcium issus de la dissolution des bioverres stimulent sept familles de gènes impliqués dans la minéralisation de l'os.

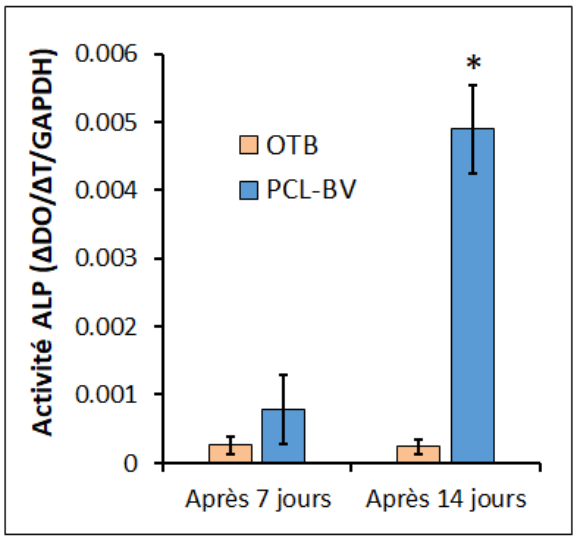


Figure 68. Résultats quantitatifs sur la différenciation cellulaire (p* < 0,0001).

6.3 Étude animale

Les études cellulaires ont permis de révéler le rôle de certains paramètres sur l'interaction du matériau avec les ostéoblastes primaires de rats : la présence de bioverre favorise l'adhésion des cellules sur l'hybride, la différenciation des ostéoblastes est stimulée grâce au relargage d'ions ostéogéniques à des concentrations non-cytotoxiques et la macrostructure interconnectée permet la colonisation cellulaire. Néanmoins, les essais *in vitro* ne sont pas représentatifs des conditions *in vivo* et ils ne permettent pas de prédire les performances cliniques du matériau. Une étude animale est pour cela nécessaire.

Afin d'évaluer le potentiel de régénération osseuse, d'ostéoconduction et d'ostéogénèse des scaffolds hybrides PCL-bioverre, on choisit un modèle de défaut de taille critique dans la calvaria de souris (**Figure 69-A**) âgées de 6 semaines. La calvaria ou calvarium est la partie supérieure de la voûte crânienne, il s'agit d'une zone peu vascularisée et contenant peu de cellules souches. Pour ces raisons, le défaut de taille critique dans la calvaria est un modèle extrêmement contraignant. Dans ces conditions, la repousse osseuse n'est possible qu'à travers la stimulation des cellules déjà présentes dans le but d'induire le recrutement de nouvelles cellules et d'enclencher ainsi le processus de régénération osseuse. Cette étude animale est donc un moyen efficace d'évaluer le potentiel ostéogénique du matériau précédemment observé *in vitro*.

Les matrices hybrides implantées (notées PCL-BV, n = 8) sont des cylindres de 3,5 mm de diamètre et 1 mm de hauteur, des dimensions qui correspondent au défaut créé. Une des faces du cylindre est une paroi dense de quelques micromètres (**Figure 69-C**) qui, orientée vers le cerveau, permet de protéger les méninges et de guider la repousse osseuse. Les matériaux préparés imitent ainsi la structure dense-poreuse de la calvaria (**Figure 69-B**). L'élaboration d'une telle structure démontre la puissance du procédé de fabrication des scaffolds. L'os trabéculaire d'origine bovine

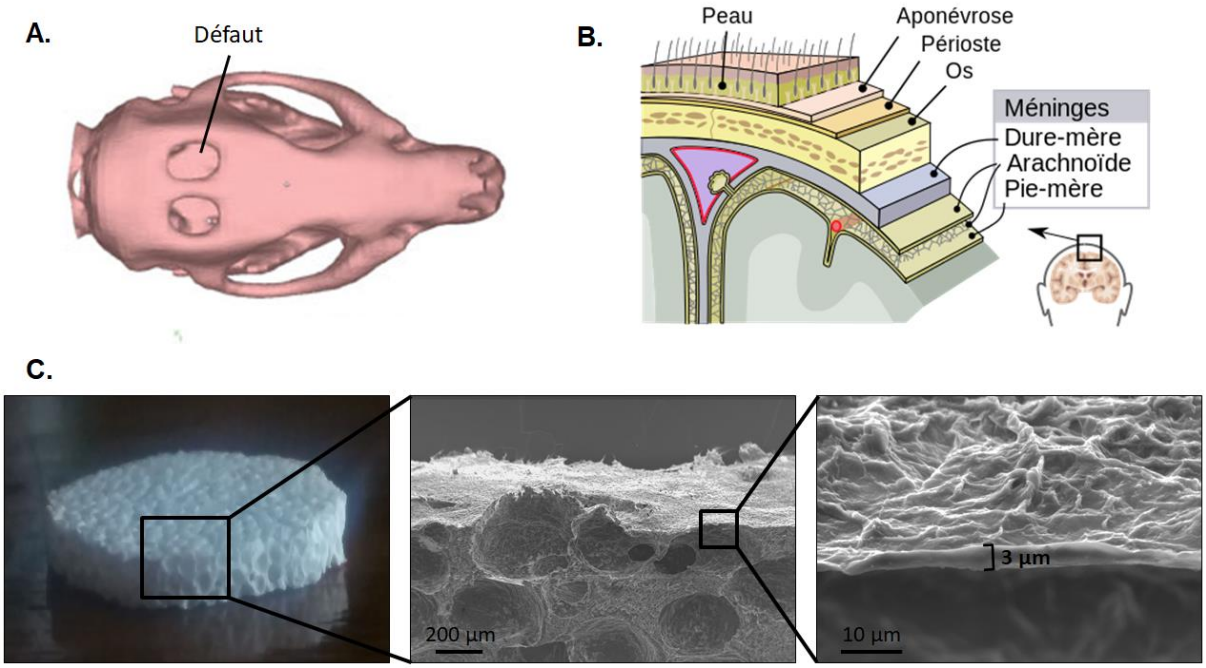


Figure 69. Défauts de taille critique dans la calvaria de souris (A). Représentation schématique des différentes couches entre la peau du crâne et le cerveau (B). Photographie et clichés MEB d'un scaffold hybride PCL-bioverre avec une structure dense-poreuse pour implantation dans la calvaria (C).

(noté OTB, n = 8) est également implanté en tant que substitut osseux de référence, et des défauts sont laissés vides pour le contrôle négatif (noté CTRL, n = 4).

Les souris sont endormies et l'avancement de la repousse osseuse est observé par micro-tomographie aux rayons X (microCT) juste après l'implantation, puis après 1 mois et 3 mois d'implantation (**Figure 70-A**). Comme attendu, le défaut critique n'est pas reconstruit en l'absence de substitut osseux (CTRL). Au contraire, les scaffolds hybrides (PCL-BV) servent de support aux cellules et on constate la régénération de tissus osseux dès 1 mois et une reconstruction avancée après 3 mois d'implantation. Enfin, l'OTB n'est pas transparent aux rayons X et on l'observe dès le premier temps J-0. Les images acquises aux temps J-30 et J-90 sont identiques à la première et il n'y a *a priori* pas de néoformation osseuse. On note ici l'utilité d'avoir un implant radio-transparent qui permet de suivre l'ostéogénèse simplement par des radiographies.

L'histologie a été réalisée en complément de la micro-tomographie aux rayons X, elle a pour but d'évaluer la qualité de l'os néoformé. Des coupes de 5 micromètres d'épaisseur sont préparées à partir des explants à la fin des 3 mois d'implantation. L'endomucine, une protéine sécrétée par les cellules endothéliales et qui sert de marqueur de la vascularisation, est colorée par immunohistochimie avec des anticorps (sc-65495, Santa Cruz Biotechnology). L'angiogénèse est avancée pour les deux matériaux OTB et PCL-BV avec la présence de nombreux vaisseaux sanguins (**Figure 70-B**). Ainsi, l'interconnectivité élevée des structures macroporeuses permet la néovascularisation qui est essentielle à l'ostéogénèse.

Les tissus osseux sont identifiés en combinant deux techniques de coloration, à savoir la coloration von Kossa et la méthode du trichrome de Goldner/Masson modifiée (**Figure 71-A**). Le calcium apparaît en noir lorsque l'on applique la coloration von Kossa et le collagène apparaît en bleu-vert (indiqué aussi par des points noirs sur la figure) lorsque l'on applique la méthode du trichrome de Goldner/Masson modifiée. D'après la coloration von Kossa, l'OTB contient peu de

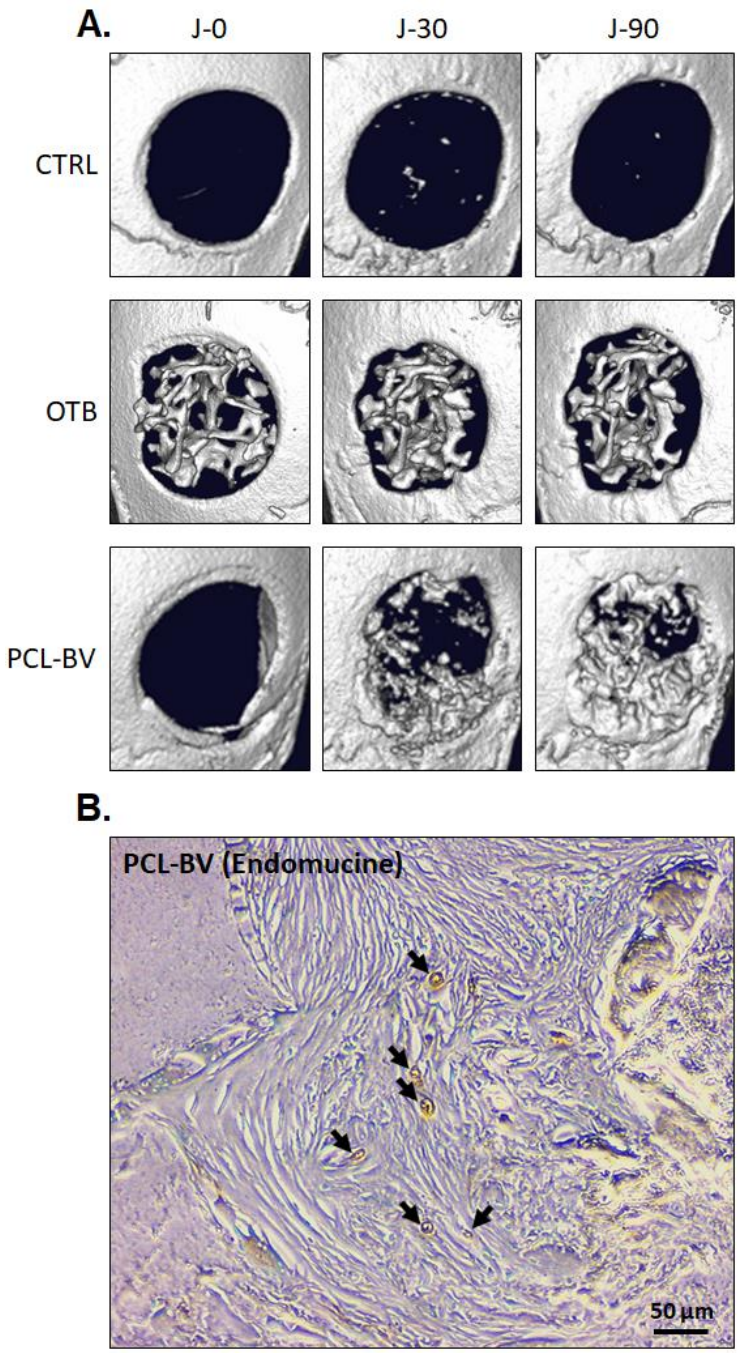


Figure 70. Suivi de la reconstruction osseuse par microCT après 0 mois, 1 mois et 3 mois d'implantation dans la calvaria de souris (A). Coupe histologique d'un explant issu de l'échantillon hybride PCL-BV après 3 mois d'implantation colorée par immunohistochimie afin de révéler la vascularisation (B). Les flèches indiquent des vaisseaux sanguins.

calcium. D'une part, cela traduit l'absence de nouvel os, ce qui rejoint les observations faites en microCT. D'autre part, cela signifie que l'OTB est altéré par le traitement chimique qu'il a subi ; en effet, le calcium qu'il contient n'est pas coloré alors que l'os natif (visible sur les bords de la figure) apparaît bien en noir. Enfin, le trichrome de Goldner/Masson confirme l'absence totale de néoformation osseuse dans l'OTB. À l'inverse, l'association des deux techniques de coloration montre la présence de nouveaux tissus osseux au sein du scaffold hybride, démontrant ainsi une ostéoconduction. De plus, ces tissus osseux comportent des puits de résorption (**Figure 71-B, à gauche**) créés par les ostéoclastes qui sont indicatifs d'un remodelage osseux en cours. Dans ces

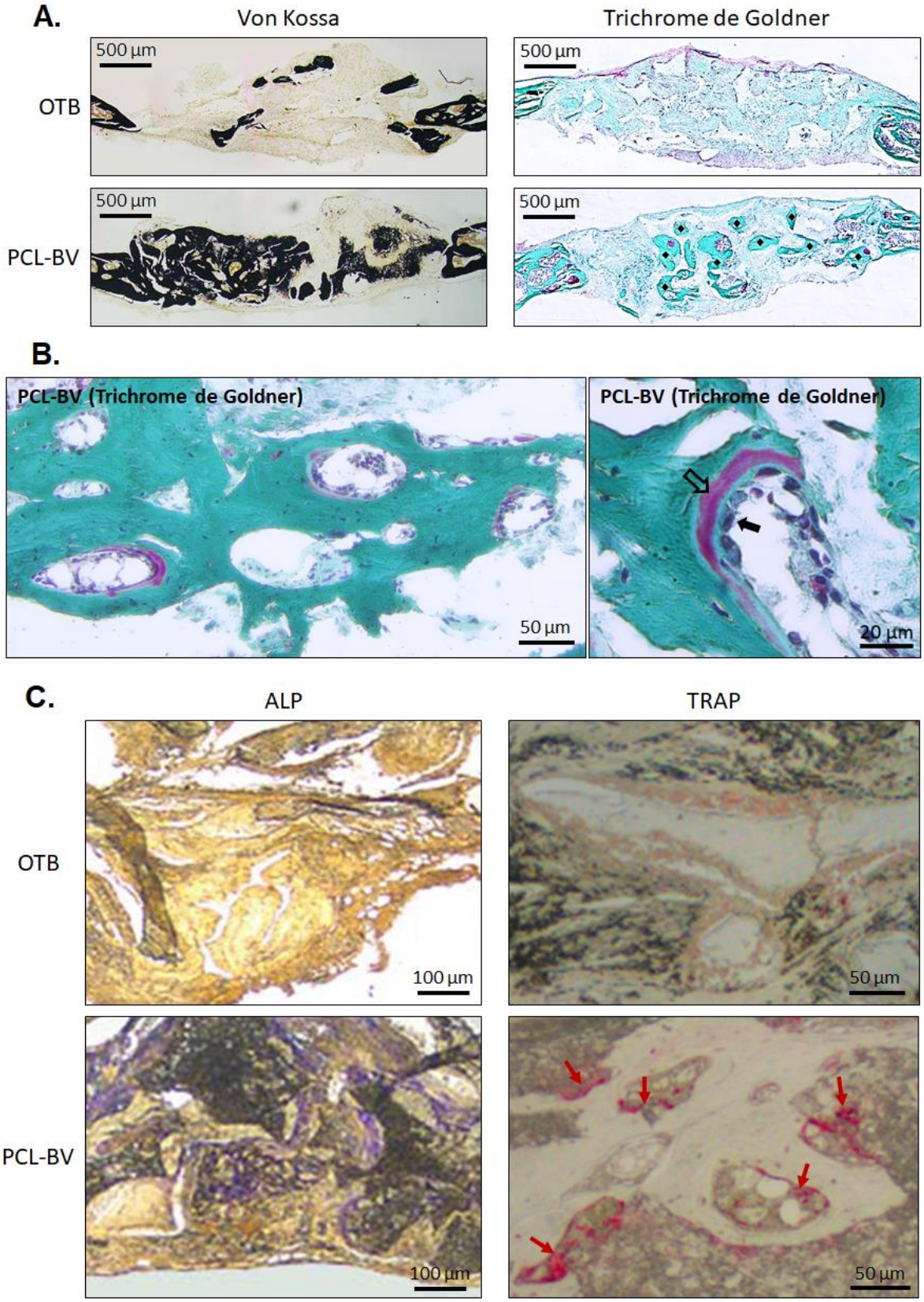


Figure 71. Coupes histologiques des explants après 3 mois d'implantation. La coloration von Kossa révèle le calcium en noir (A, gauche). La méthode du trichrome de Goldner/Masson modifiée révèle le collagène en bleu-vert (A, droite) ; l'os minéralisé est indiqué par un point noir. Le trichrome de Goldner révèle aussi le tissu ostéoïde indiqué par une flèche vide et les ostéoblastes indiqués par une flèche noire (B, droite). L'histoenzymologie colore l'ALP en violet (C, gauche) et la TRAP en rouge (C, droite). Les flèches rouges pointent la TRAP (C, droite).

puits de résorption, on observe d'ailleurs des ostéoblastes au contact de collagène non-minéralisé ou ostéoïde (**Figure 71-B, à droite**) : l'ostéoïde est vraisemblablement en cours de minéralisation par les ostéoblastes. Ces phénomènes témoignent d'un processus de remodelage osseux actif, démontrant par là même une reconstruction osseuse avancée avec les scaffolds hybrides.

Pour compléter ces observations, l'ALP et la TRAP (phosphatase acide tartrate-résistante) sont colorées par histoenzymologie (**Figure 71-C**). L'ALP, qui est un marqueur de l'activité des ostéoblastes et de la minéralisation osseuse, apparaît en violet ; la TRAP, qui est un marqueur de l'activité des ostéoclastes et de la résorption osseuse, apparaît en rouge. D'après les figures, ces deux protéines sont quasiment inexistantes avec l'OTB alors qu'elles sont colorées dans de nombreuses zones avec l'hybride PCL-BV. Avec l'hybride, il y a non seulement une reconstruction osseuse indiquée par la présence d'ALP, mais aussi un remodelage osseux indiqué par la présence de TRAP.

Des coupes de 5 micromètres d'épaisseur non-colorées issues des échantillons hybrides PCL-BV sont aussi analysées par micro-faisceau d'ions. Les cartographies du calcium, du phosphore et du silicium sont représentées sur la **Figure 72-A, B et C** et la quantification des éléments majoritaires est représentée sur la **Figure 72-D**. Le matériau résiduel est identifié grâce aux images obtenues par microscopie optique (**Figure 72-E et F**) sur lesquelles il apparaît plus opaque par rapport à l'os néoformé. Sur les cartographies, on constate que l'hybride est minéralisé avec moins de 0,2 % massique de silicium restant. De plus, l'analyse quantitative donne des ratios massiques Ca/P de 2,19 (± 0,05) pour le matériau résiduel et 2,20 (±0,05) pour l'os néoformé, des valeurs qui correspondent à l'apatite physiologique (ratio Ca/P de 2,2 en massique). Ainsi, la PIXE démontre la capacité de l'hybride à se transformer en apatite biomimétique. Par ailleurs, l'imagerie chimique montre une interface matériau-os uniforme (indiquée par des flèches sur la **Figure 72-G**) : il est difficile de discerner la limite entre l'hybride et le tissu osseux et on a recours à la microscopie optique pour faire cette distinction (**Figure 72-H**). L'interface uniforme illustre la capacité de l'hybride à se lier aux tissus osseux et elle démontre donc sa bioactivité *in vivo*. Sur les cartographies, on constate également un signal moins intense émis par le matériau résiduel qui traduit une densité moindre en apatite par rapport à l'os néoformé, ce qui peut s'expliquer par la présence de PCL dans l'hybride. Il semble donc que la phase organique ne soit pas entièrement dégradée après les 3 mois d'implantation et que le scaffold hybride continue de supporter la repousse osseuse.

Pour résumer, l'histologie démontre l'inefficacité de l'OTB à régénérer les tissus osseux, contrairement aux scaffolds hybrides PCL-bioverre pour lesquels une reconstruction osseuse avancée est observée avec notamment un remodelage osseux actif. Ces résultats corroborent un potentiel ostéogénique fort de l'hybride précédemment caractérisé *in vitro*. De plus, la PIXE démontre la bonne ostéointégration des scaffolds hybrides qui paraissent bioactifs. Les études biologiques ont révélé un énorme potentiel du scaffold hybride PCL-bioverre, avec des performances *in vitro* et *in vivo* bien supérieures à celles du matériau commercial de référence déjà performant en clinique.

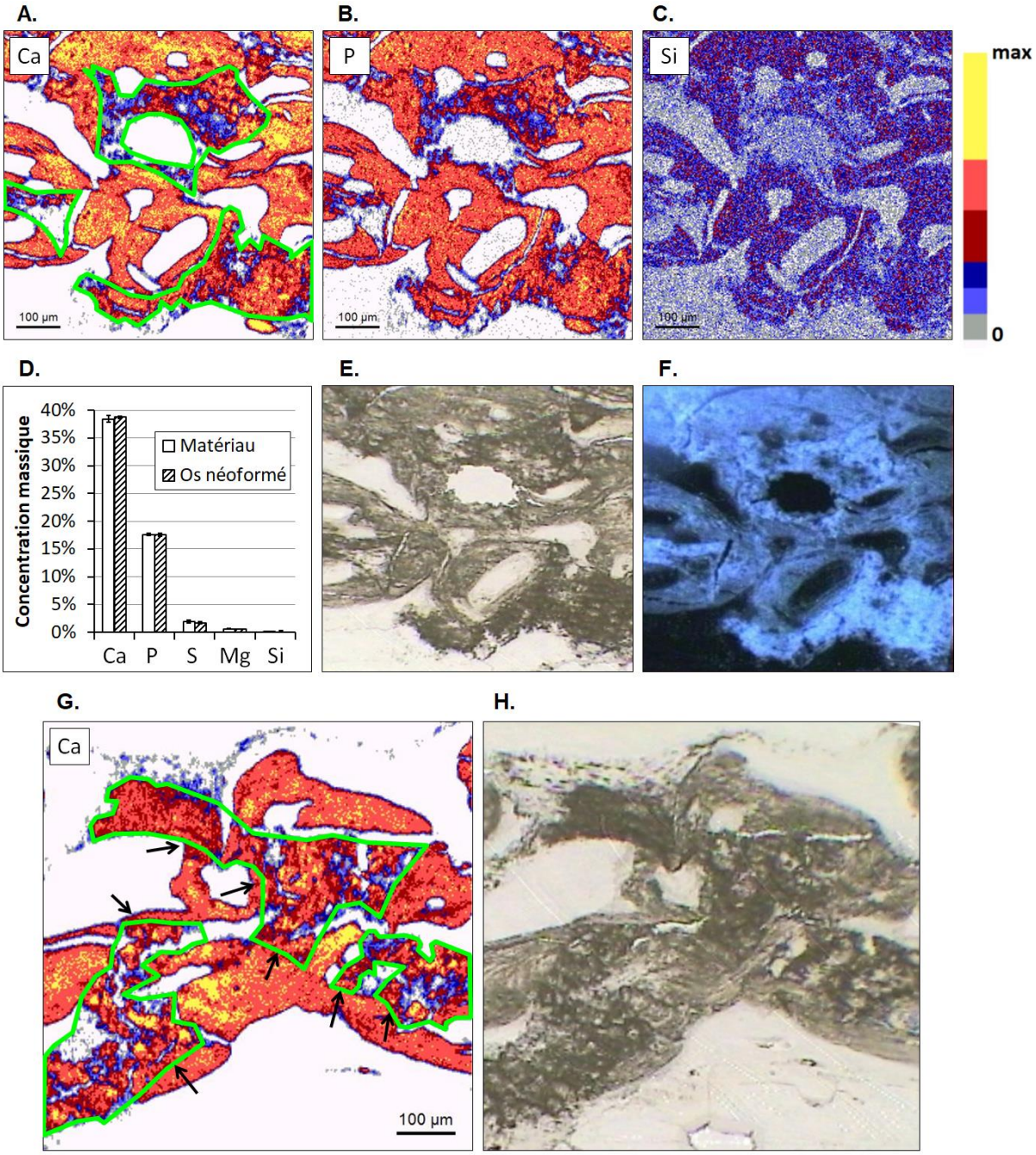


Figure 72. Cartographies élémentaires obtenues par micro-faisceau d'ions (A, B, C et G), résultats de l'analyse quantitative (D) et clichés optiques (E, F et H) sur les explants issus des échantillons hybrides PCL-bioverre après 3 mois d'implantation. Les clichés E et H sont obtenus avec le microscope optique de l'équipe, tandis que le cliché F est obtenu avec le microscope de la chambre de la ligne de micro-faisceau d'ions. Le matériau résiduel est entouré en vert sur les cartographies du Ca (A et G) et les flèches indiquent les interfaces matériau-os uniformes (G).

Partie III
Optimisation des performances du matériau

CHAPITRE 7 AUGMENTATION DU POTENTIEL OSTEOGENIQUE PAR INCORPORATION D'ELEMENTS D'INTERET

Dans la partie précédente, des scaffolds d'un hybride PCL-bioverre ont été développés et optimisés. Les essais d'implantation dans la calvaria de souris ont révélé des performances *in vivo* bien supérieures à celles de l'os trabéculaire bovin : les tissus osseux se régénèrent dans la mousse hybride, mais pas dans l'OTB. La néoformation osseuse dans la calvaria indique un caractère ostéogénique du matériau.

Dans ce chapitre, on cherche à augmenter encore le potentiel ostéogénique des scaffolds hybrides PCL-bioverre. En effet, bien que la calvaria soit une zone peu favorable à l'ostéogénèse, dans le modèle animal les souris opérées sont jeunes et n'ont pas terminé leur croissance osseuse [128]. Par conséquent, il est possible que le caractère ostéogénique de l'hybride ne suffise pas à stimuler la repousse des tissus osseux chez un patient âgé ou souffrant d'ostéoporose. Un des avantages majeurs du procédé sol-gel est qu'il permet l'incorporation facile de dopants ostéogéniques inorganiques (ions métalliques) et organiques (facteurs de croissance, protéines, nutriments). On se focalise ici sur le dopage inorganique en strontium, dont l'effet ostéogénique largement étudié dans la littérature n'est plus à prouver [59, 70, 129], et sur le dopage organique avec du collagène hydrolysé (cf. partie 4.2) ou avec des antioxydants. Les facteurs de croissance tels que les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) ne sont pas envisagés car ils sont potentiellement cancérigènes [130]. De plus, du point de vue industriel, les facteurs de croissance rentrent dans la catégorie des médicaments et leur utilisation dans les matériaux s'accompagne d'une réglementation plus stricte.

7.1 Dopage inorganique avec du strontium

De façon analogue à l'incorporation du calcium, les ions strontium peuvent être intégrés au réseau silicate par voie sol-gel avec des alcoxydes tels que l'isopropoxyde $Sr(iPrO)_2$ ou possiblement avec l'hydroxyde $Sr(OH)_2$. Ces précurseurs se présentent sous la forme de poudre. L'isopropoxyde de strontium a déjà été employé par l'équipe Biomatériaux du LPC pour le dopage des verres bioactifs SiO_2-CaO et des hybrides gélatine-bioverre. L'hydroxyde de strontium, au même titre que l'hydroxyde de calcium, est une alternative intéressante pour des raisons de coût, de disponibilité commerciale et de conservation. Compte tenu des résultats encourageants obtenus avec l'hydroxyde de calcium (cf. partie 5.1), on peut imaginer que l'hydroxyde de strontium soit un précurseur viable et qu'il permette notamment l'incorporation des ions strontium dans le réseau silicate.

On choisit de substituer les ions strontium aux ions calcium afin de modifier le moins possible l'organisation (degré de condensation) du réseau silicate. Ainsi, un verre dopé avec 10 % massique de strontium (noté BV-Sr10) a une composition massique de 75 % SiO_2, 15 % CaO et 10 % SrO. La synthèse développée par l'équipe consiste à introduire la poudre de $Sr(iPrO)_2$ dans le sol de bioverre 15 minutes après l'ajout du précurseur de calcium. Le sol de bioverre gélifie en 45 minutes contre 1h30 sans dopage inorganique. Il semble donc que l'isopropoxyde de strontium soit plus réactif que le précurseur de calcium. Avec $Sr(OH)_2$, cet effet est accentué puisque le sol gélifie en seulement 20 minutes et les précurseurs ne sont pas entièrement dissous, résultant en un gel hétérogène. La gélification accélérée liée à l'utilisation d'hydroxydes avait déjà été observée avec $Ca(OH)_2$ (temps de gel de 1h30 au lieu de 2h30 avec $Ca(OEt)_2$). L'explication la plus probable est la suivante : lorsque le précurseur basique est introduit, il réagit avec l'acide chlorhydrique selon les **équations 17, 18, 19 ou 20** (cf. partie 6.1.1).

$$Ca^{2+} + 2\ EtO^- + 2\ H^+ + 2\ Cl^- \rightarrow 2\ EtOH + Ca^{2+} + 2\ Cl^- \quad \textbf{(17)}$$

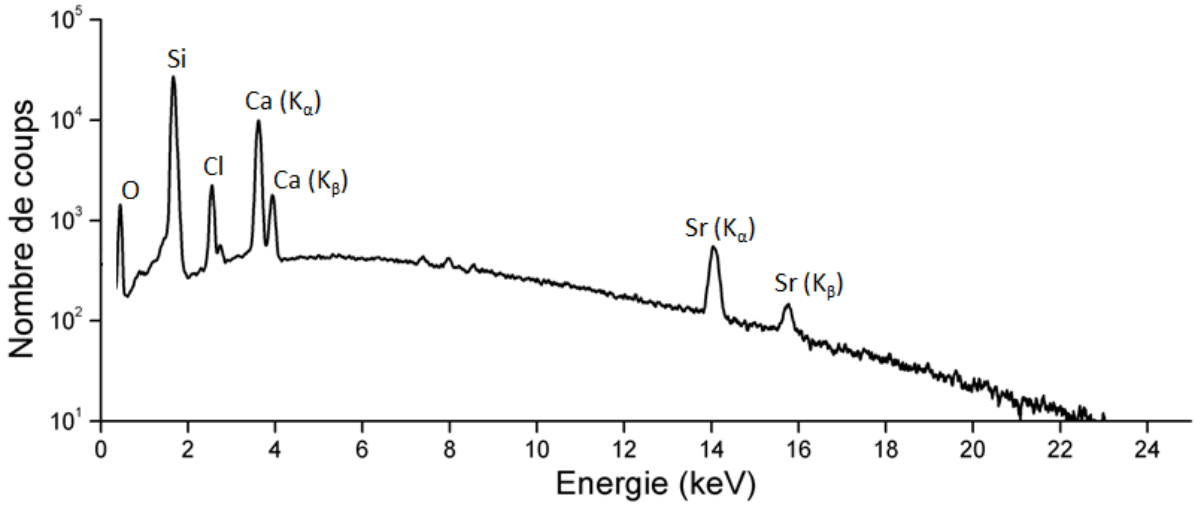
$$Ca^{2+} + 2\ HO^- + 2\ H^+ + 2\ Cl^- \rightarrow 2\ H_2O + Ca^{2+} + 2\ Cl^- \quad \textbf{(18)}$$

$$Sr^{2+} + 2\ iPrO^- + 2\ H^+ + 2\ Cl^- \rightarrow 2\ iPrOH + Sr^{2+} + 2\ Cl^- \quad \textbf{(19)}$$

$$Sr^{2+} + 2\ HO^- + 2\ H^+ + 2\ Cl^- \rightarrow 2\ H_2O + Sr^{2+} + 2\ Cl^- \quad \textbf{(20)}$$

La réaction acido-basique produit un alcool (éthanol ou isopropanol) dans le cas des alcoxydes (**équations 17 et 19**) ou de l'eau dans le cas des hydroxydes (**équations 18 et 20**). De même, la réaction de déprotonation des silanols par le précurseur (cf. partie 5.1.3) engendre la formation d'alcool avec les alcoxydes ou d'eau avec les hydroxydes. Or, la quantité d'eau est un paramètre critique en vue d'obtenir un sol stable et elle est pour cette raison réduite dans la synthèse (ratio molaire H_2O/TEOS de 2, cf. partie 2.1.1). Avec les hydroxydes, une quantité importante d'eau est générée *in situ* (en théorie, deux molécules d'eau par atome de calcium ou de strontium), ce qui alimente l'hydrolyse du TEOS, accélère le processus d'hydrolyse-condensation et mène à un temps de gel plus court. Si la gélification accélérée n'est pas gênante avec $Ca(OH)_2$ (temps de gel de 1h30), elle est en revanche prématurée avec $Sr(OH)_2$ (temps de gel de 20 minutes). Une solution consiste à mélanger l'hydroxyde de strontium au précurseur de calcium plutôt que de les introduire l'un après l'autre. Les précurseurs sont partiellement solubilisés dans l'éthanol puis ajouté au TEOS hydrolysé. On évite ainsi l'occurrence de deux chocs alcalins causés par les ajouts successifs des précurseurs basiques. Le sol de bioverre gélifie alors en 45 minutes et le gel obtenu est homogène.

Dans un premier temps, des verres bioactifs sont synthétisés soit avec $Sr(iPrO)_2$, soit avec $Sr(OH)_2$. Ils sont dopés à hauteur de 2 % (BV-Sr2), 5 % (BV-Sr5) ou 10 % (BV-Sr10). Les gels obtenus sont séchés à la température ambiante, broyés, pastillés puis leur composition est déterminée par EDX avec un faisceau d'électrons de 30 keV. Le bioverre BV-Sr10 synthétisé à partir de $Sr(OH)_2$ est aussi rincé 3 fois à l'éthanol absolu pendant 24 h puis analysé par EDX afin de vérifier l'intégration des ions calcium et strontium au sein du réseau silicate. Le tableau de la **Figure 73** révèle des concentrations en SrO et en CaO globalement supérieures aux valeurs attendues et des concentrations en SiO_2 légèrement inférieures (66 à 69 % massique au lieu de 75 %). On constate une diminution de la concentration en CaO lorsque le verre contient plus de SrO, ce qui est en accord avec une substitution des ions Ca^{2+} par les ions Sr^{2+}. La composition de l'échantillon BV-Sr10



Composition normalisée en oxydes (% massique)

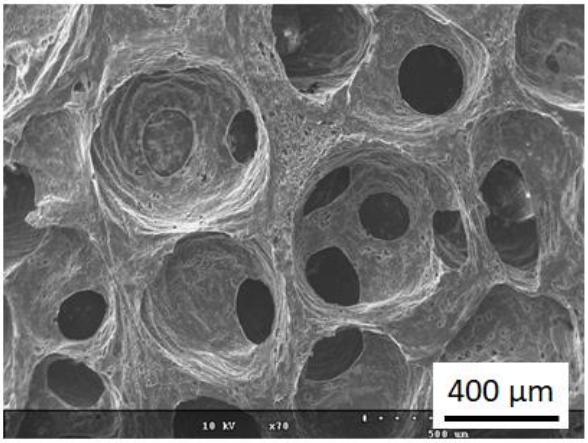
	BV-Sr**2** ($Sr(iPrO)_2$)	BV-Sr**5** ($Sr(iPrO)_2$)	BV-Sr**10** ($Sr(iPrO)_2$)	BV-Sr**10** ($Sr(OH)_2$)	
				Avant rinçage	Après rinçage
SiO_2	68,2 ± 1,2	66,9 ± 2,0	66,4 ± 0,7	68,5 ± 0,6	69,2 ± 0,7
CaO	29,2 ± 1,1	26,9 ± 1,7	20,0 ± 0,4	21,1 ± 0,6	20,7 ± 0,7
SrO	**2,6** ± 0,1	**6,2** ± 0,3	**13,6** ± 0,6	**10,4** ± 0,1	**10,1** ± 0,5

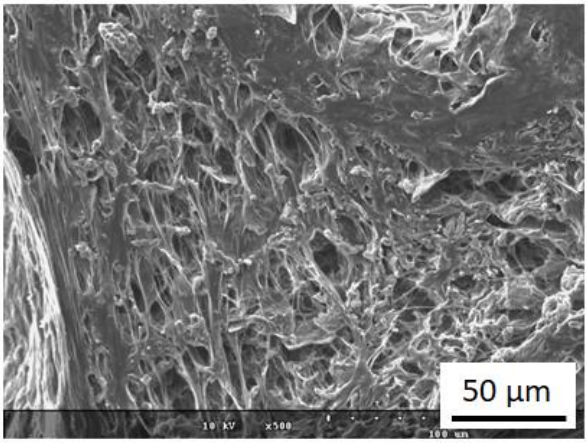
Figure 73. Spectre d'émission des rayons X obtenu par analyse EDX du bioverre BV-Sr10 et quantifications.

synthétisé à partir de $Sr(OH)_2$ est inchangée après les rinçages à l'éthanol, indiquant ainsi l'incorporation des ions alcalino-terreux dans le réseau silicate.

Dans un second temps, des scaffolds d'un hybride PCL-bioverre sont fabriqués à partir de l'alcoxyde $Sr(iPrO)_2$. L'hybride contient 30 % massique de bioverre qui est lui-même composé de 2 % (PCL-Sr2), 5 % (PCL-Sr5) ou 10 % (PCL-Sr10) massique d'oxyde de strontium. Ainsi l'échantillon PCL-Sr10 ne possède pas 10 % massique de SrO mais seulement 3 %. Ces compositions s'inspirent des travaux précédents sur le bioverre [70], le composite gélatine-bioverre [27] et l'hybride gélatine-bioverre dopés en strontium. Les scaffolds sont observés au MEB et analysés par EDX. La structure des scaffolds (**Figure 74, en haut**) est identique à celle des matériaux non-dopés (tailles des pores et des interconnexions, rugosité micrométrique en surface des murs, porosité micrométrique dans le volume des murs) et les compositions inorganiques des hybrides (**Figure 74, en bas**) sont dans l'ensemble en accord avec les compositions des bioverres correspondants. De plus, les scaffolds ayant subi de multiples bains de cyclohexane et d'éthanol absolu, les ions Ca^{2+} et Sr^{2+} qui demeurent dans le matériau sont intégrés au réseau silicate.

La bioactivité des hybrides PCL-Sr2, PCL-Sr5 et PCL-Sr10 est évaluée *in vitro*. Les scaffolds sont immergés dans le SBF (1 mL par mg de matériau) à 37°C pendant 6 h, 1 j, 3 j et 7 j. Les milieux interagis sont analysés par ICP-AES et les scaffolds interagis sont analysés par PIXE afin de déterminer les concentrations en Si, Ca, P et Sr. Les scaffolds PCL-Sr10 interagis sont aussi analysés par spectroscopie IR dans le but de vérifier la nature du phosphate de calcium précipité.





Composition normalisée en oxydes (% massique)

	PCL-Sr**2**	PCL-Sr**5**	PCL-Sr**10**
SiO_2	67,6 ± 0,1	66,1 ± 0,9	70,8 ± 3,2
CaO	29,2 ± 0,2	26,9 ± 1,0	21,1 ± 3,0
SrO	**3,3** ± 0,2	**7,1** ± 0,1	**8,0** ± 0,4

Figure 74. Structure macroporeuse et coupe d'un mur du scaffold PCL-Sr10 vues au MEB (en haut). Quantification des spectres d'émission des rayons X obtenus par analyse EDX des scaffolds hybrides dopés en strontium (en bas).

Sur la **Figure 75-A**, un massif d'absorption caractéristique d'une apatite non-stœchiométrique apparaît entre 500 et 650 cm^{-1} au cours de l'interaction. La vitesse de précipitation de l'apatite est similaire à celle observée sur les hybrides non-dopés (cf. partie 5.1.4). D'après ces résultats, le dopage en strontium ne semble pas impacter la capacité du matériau à induire la formation d'apatite biomimétique.

L'évolution de la concentration en phosphore dans le SBF (**Figure 75-B**) montre une légère influence de la teneur en strontium : lorsque l'hybride contient plus de strontium, le phosphore est consommé plus lentement (notable à 1 jour d'interaction), ce qui indique une formation ralentie de l'apatite. Cela rejoint les observations de Jonathan Lao sur les verres bioactifs dopés en strontium [131], ainsi que celles de Rokidi et Koutsoukos qui ont montré une baisse du taux de nucléation d'hydroxyapatite dans les solutions salines sursaturées en présence de Sr^{2+} [132]. Lorsque le réseau vitreux contient plus de strontium, il contient également moins de calcium – le strontium étant substitué au calcium. Or, une quantité moindre de calcium impacte la vitesse de précipitation de l'apatite. Néanmoins, cet effet n'est pas significatif et les cinétiques de formation de l'apatite sont proches entre les échantillons dopés à 2 %, 5 % et 10 % massique en SrO.

L'évolution de la concentration en strontium dans le SBF (**Figure 75-B**) démontre un relargage lié à la teneur en strontium : le SBF contient 11 ppm de Sr^{2+} après 7 jours d'interaction avec le PCL-Sr10, il en contient 8 ppm avec le PCL-Sr5 et 3 ppm avec le PCL-Sr2. D'après les données acquises sur les bioverres dopés en strontium [27, 59, 70, 129, 133], les produits de dissolutions du PCL-Sr10 en font un candidat adéquat à la stimulation des cellules osseuses. Par ailleurs, il est intéressant de noter une diminution progressive de la concentration en Sr^{2+} dans le SBF, particulièrement visible avec le PCL-Sr10. Après 6 h d'interaction, le SBF contient 15 ppm de Sr^{2+}, puis 13, 12 et 11 ppm après 1, 3 et 7 j d'interaction, respectivement. Cela semble indiquer qu'une partie du strontium relargué

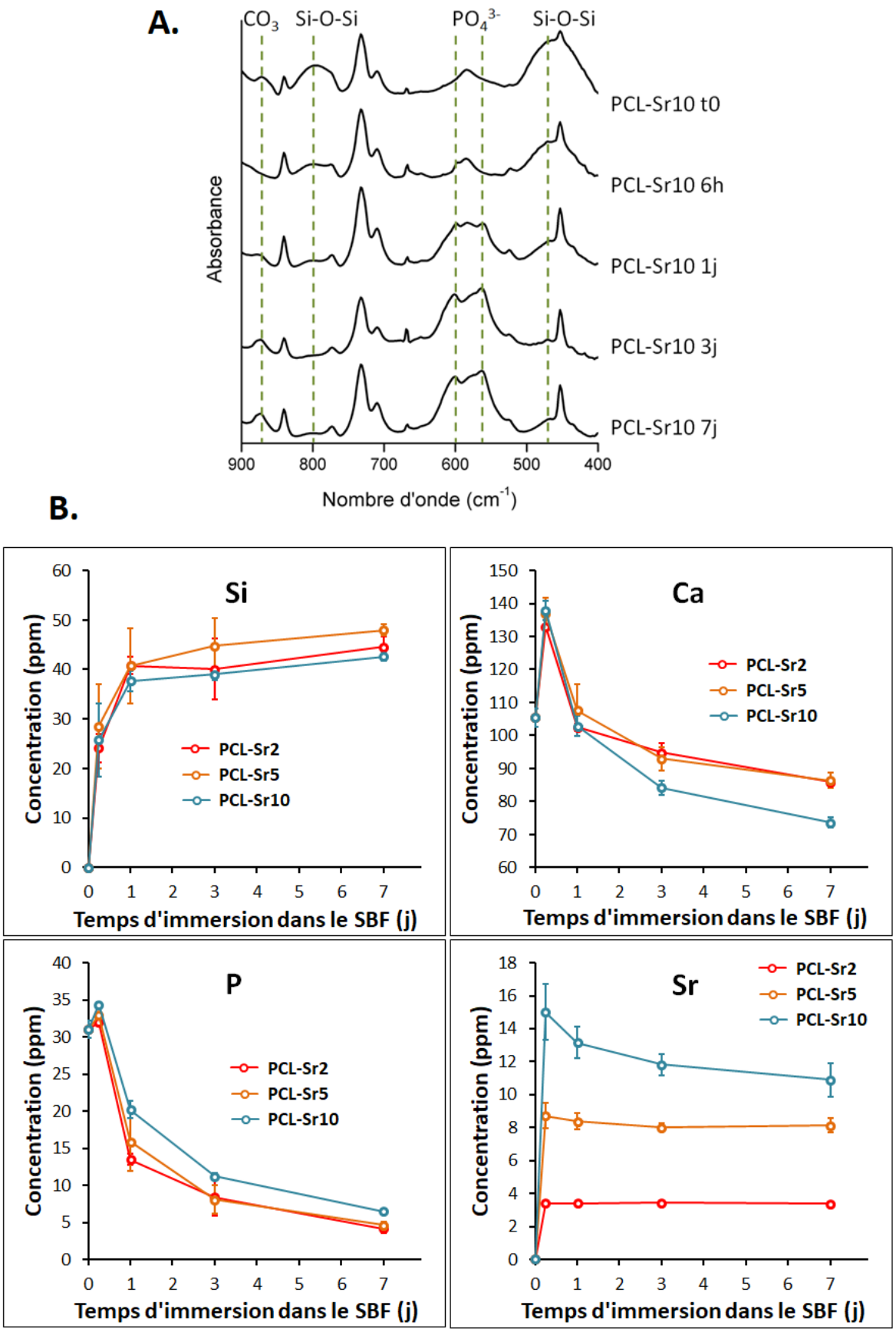


Figure 75. Évolution des spectres IR des scaffolds hybrides PCL-Sr10 au cours de leur interaction avec le SBF (A). Évolution des concentrations en Si, Ca, P et Sr dans le SBF au cours de l'interaction avec les scaffolds hybrides dopés en Sr (B).

précipite avec l'apatite en se substituant aux ions calcium de la maille cristalline des nanocristaux d'apatite [134]. L'apatite formée se rapproche alors d'une apatite physiologique qui comprend de nombreux substituants cationiques tels que Sr^{2+}, Mg^{2+} et Na^{+}.

Les cartographies élémentaires de Si, Ca, P et Sr dans les scaffolds interagis PCL-Sr2, PCL-Sr5 et PCL-Sr10 sont acquises par microfaisceau d'ions. La **Figure 76-A** illustre la transformation de la phase inorganique de l'hybride en un phosphate de calcium qui correspond d'après la spectroscopie IR à une apatite non-stœchiométrique. Après le relargage initial du strontium (**Figure 76-B, 6h et 1j**), celui-ci reprécipite sur le matériau (**Figure 76-B, 3j et 7j**) au niveau de l'apatite (**Figure 76-A**), ce qui rend convaincante l'hypothèse de la formation d'une apatite partiellement substituée en Sr^{2+}. Ainsi, l'action thérapeutique du strontium serait non seulement exploitée sur le court terme *via* son relargage, mais aussi sur le long terme *via* sa précipitation dans l'apatite qui constituerait alors un réservoir d'ions ostéogéniques [133]. Le strontium apatitique pourrait par exemple intervenir lors du processus de remodelage osseux, en étant remis en solution suite à la résorption du tissu osseux par les ostéoclastes, puis en stimulant la genèse de l'os par les ostéoblastes.

Les scaffolds de l'hybride PCL-Sr10 ont été implantés dans la calvaria de souris par Henri Granel en juin 2018. Les résultats de l'étude *in vivo* seront disponibles à la fin de l'année 2018 et seront présentés dans la thèse d'Henri Granel, doctorant à l'INRA de Theix sous la direction de Yohann Wittrant (Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019).

7.2 Dopage organique avec du collagène hydrolysé

Comme évoqué à la partie 4.2, le collagène hydrolysé stimule l'activité des ostéoblastes, améliore l'absorption du calcium et possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Bien que la synthèse de scaffolds d'hybride collagène hydrolysé-bioverre ait été abandonnée, il serait intéressant d'incorporer ce polypeptide en faible proportion dans la trame organique de l'hybride PCL-bioverre. En effet, un relargage du collagène hydrolysé de l'ordre du ppm suffit à promouvoir son action [85]. La présence de collagène hydrolysé dans le matériau peut aussi contribuer à l'adhésion des cellules (cf. partie 4.2). Ainsi, un dopage organique en collagène hydrolysé pourrait permettre d'améliorer le potentiel ostéogénique de l'hybride. Le collagène hydrolysé est substitué au PCL. On vise une composition massique de 60 % PCL, 10 % collagène hydrolysé et 30 % bioverre SiO_2-CaO que l'on note PCL-colH.

Du point de vue de la synthèse, la principale difficulté porte sur la dissolution commune des constituants organiques, à savoir le PCL et le collagène hydrolysé. Alors que le PCL est soluble dans des solvants organiques tels que le tétrahydrofurane (THF) et le chloroforme ($CHCl_3$), le collagène hydrolysé est principalement soluble dans l'eau. Néanmoins, les études précédentes ont permis de révéler l'acide acétique comme solvant commun du PCL et du collagène hydrolysé (cf. partie 4.2.2 et chapitre 5). L'acide acétique permet la dissolution des constituants organiques de façon homogène et la réalisation du sol hybride, mais après dissolution des billes (porogène) les scaffolds se désintègrent. Cette faible cohésion du matériau avait déjà été observée avec l'hybride PCL-bioverre synthétisé à partir d'acide acétique (cf. chapitre 5) ; le solvant semble jouer un rôle primordial sur les propriétés mécaniques du scaffold. Afin de pallier la fragilité des scaffolds PCL-colH, on envisage un mélange de solvants acide acétique-THF. Le PCL est soluble dans ce mélange, tandis que le collagène hydrolysé est soluble dans un mélange comprenant au moins 80 % volumique d'acide acétique. Des

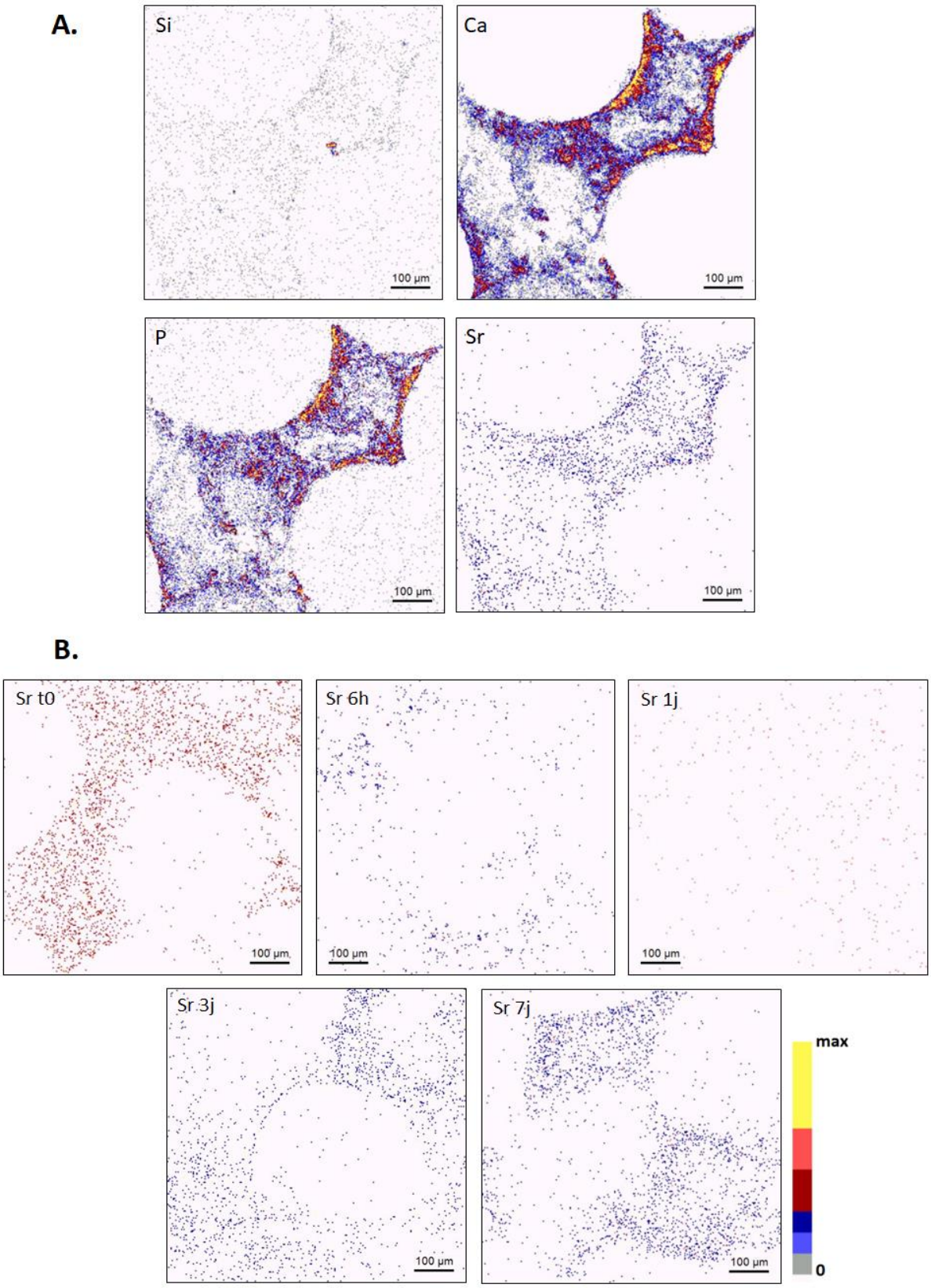


Figure 76. Cartographies élémentaires du scaffold hybride PCL-Sr5 acquises par micro-faisceau d'ions (PIXE) : cartographies du Si, Ca, P et Sr après 3 jours d'interaction (A) et suivi de la distribution du Sr au sein des coupes de scaffolds en fonction du temps d'interaction (B).

scaffolds sont fabriqués à partir des mélanges de composition volumique 80 % acide acétique-20 % THF et 90 % acide acétique-10 % THF. Ils ne se désintègrent pas et une proportion plus importante de THF conduit à un scaffold plus rigide et plus intègre (80 % acide acétique-20 % THF). C'est donc ce dernier mélange qui est retenu pour l'élaboration de scaffolds PCL-colH.

Les scaffolds sont observés au MEB. Comme illustré sur la **Figure 77-A**, ils possèdent des pores et des interconnexions bien définis et dont les diamètres sont identiques à ceux des scaffolds hybrides PCL-bioverre non-dopés. On voit également une porosité micrométrique dans le volume des murs. En revanche, les parois des scaffolds sont lisses alors que celles des scaffolds non-dopés possèdent une rugosité micrométrique qui peut favoriser l'adhésion des cellules. De plus, la découpe des scaffolds n'est pas aussi nette que celle des scaffolds non-dopés et s'accompagne d'un léger déchirement des murs. Il est intéressant de noter que des scaffolds d'un hybride PCL-bioverre non-dopé ont été fabriqués à partir du mélange 80 % acide acétique-20 % THF. L'absence de rugosité et la découpe délicate sont aussi constatées avec ces matériaux, ce qui signifie qu'elles ne sont pas une conséquence directe du dopage mais qu'elles sont plutôt dues au mélange de solvants employé.

Le relargage du collagène hydrolysé est étudié à travers une interaction semi-dynamique dans le SBF (1 mL par mg de matériau). Le SBF est renouvelé tous les 2 jours et le SBF interagi est analysé avec un kit de BioAssay afin de déterminer la concentration en collagène hydrolysé. L'étude compte 6 interactions consécutives de 2 jours. Les analyses révèlent un relargage de 40 % du collagène hydrolysé dans le SBF après la première interaction, puis la concentration en collagène hydrolysé

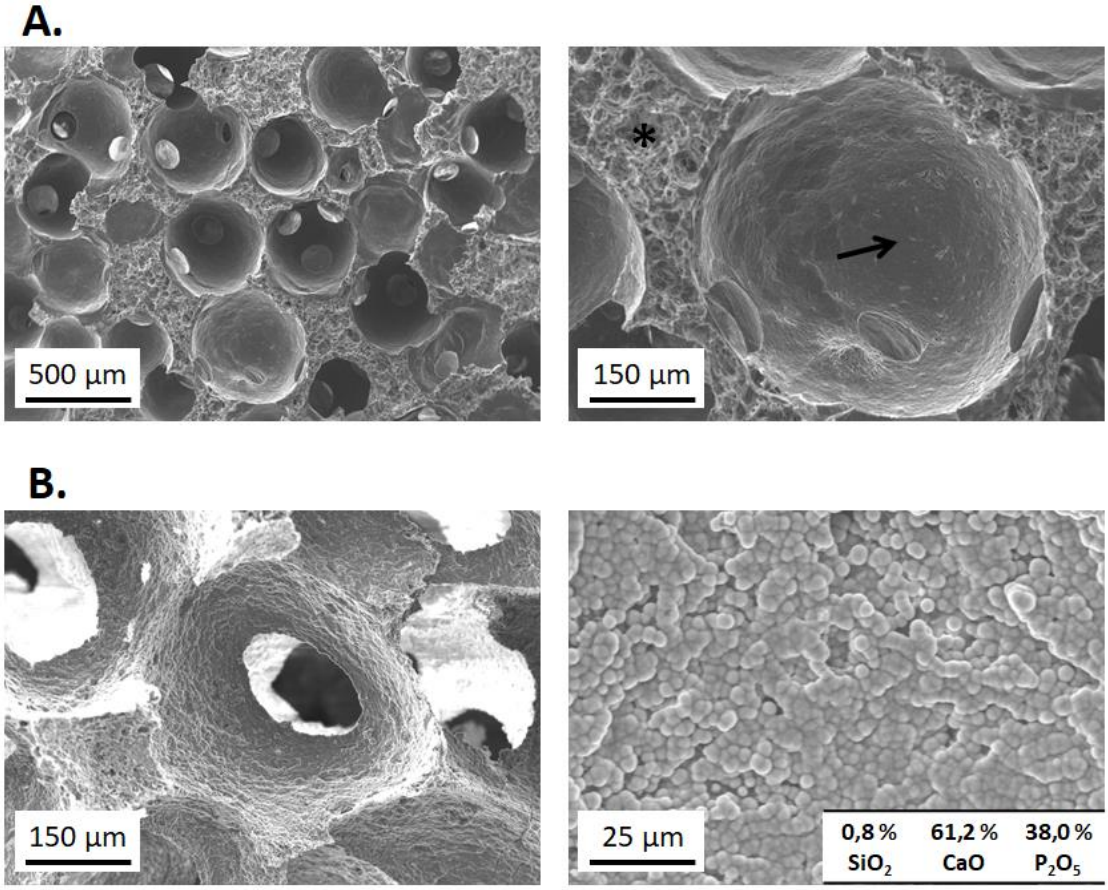


Figure 77. Clichés MEB de scaffolds d'un hybride PCL-bioverre dopé avec 10 % massique de collagène hydrolysé avant (A) et après l'interaction semi-dynamique dans le SBF (B). La flèche indique la paroi lisse du scaffold et l'astérisque indique le déchirement des murs du scaffold.

dans le SBF est en-dessous du seuil de détection pour les interactions suivantes. Ces résultats démontrent un relargage rapide du collagène hydrolysé analogue au relargage des ions Si (cf. partie 6.1.5). Le relargage rapide était attendu puisque le collagène hydrolysé, tout comme le réseau silicate, est soluble dans l'eau et est simplement intriqué aux chaînes de PCL (pas de liaison covalente). Ainsi, on peut conclure que la potentielle action de ce dopage organique se fera sur le court terme. Après les 6 interactions, le scaffold est observé au MEB et analysé en EDX. Une couche de précipités s'est formée en surface des parois (**Figure 77-B**) et elle correspond selon l'analyse en EDX à un phosphate de calcium. La morphologie en sphérulite de cette couche est typique d'une apatite. Il semble donc que le scaffold PCL-colH permette la formation d'apatite biomimétique, indicatrice de bioactivité.

Néanmoins la seule observation d'apatite en surface d'un matériau ne permet pas de conclure sur sa bioactivité *in vivo*. En effet, il est nécessaire d'étudier la vitesse de formation de l'apatite : une formation lente d'apatite *in vitro* (par exemple sur les verres de silice pure élaborés par voie sol-gel) se traduit souvent [68, 69] par un matériau qui n'est pas ou peu bioactif *in vivo*. La vitesse de formation de l'apatite sur l'hybride PCL-colH est déterminée *in vitro* par une interaction non-dynamique, et comparée à l'hybride non-dopé élaboré à partir de THF que l'on note PCL-BV. Les scaffolds sont immergés dans le SBF (1 mL par mg de matériau) à 37°C pendant 6 h, 1 j, 3 j et 7 j. Il s'agit là d'une première évaluation de la bioactivité et les milieux interagis sont simplement analysés par ionométrie calcium. L'évolution de la concentration en calcium dans le SBF (**Figure 78**) peut être divisée en deux étapes : d'abord, le calcium est relargué par le matériau et sa concentration dans le SBF augmente, puis l'apatite précipite et la concentration en calcium diminue. Après 6 h d'interaction, la concentration en calcium est nettement plus élevée pour le PCL-colH, ce qui suggère un relargage du calcium plus important ou une nucléation de l'apatite plus lente. À partir de 6 h jusqu'à 7 j d'interaction, on constate la diminution de la concentration en calcium que l'on attribue à la précipitation d'apatite biomimétique. La valeur de la pente négative est corrélée à la vitesse de formation de l'apatite ; les pentes sont ici relativement similaires et on a donc des cinétiques de formation de l'apatite proches entre PCL-colH et PCL-BV. Pour conclure, il semble que le PCL-colH ait une bioactivité similaire à l'hybride non-dopé.

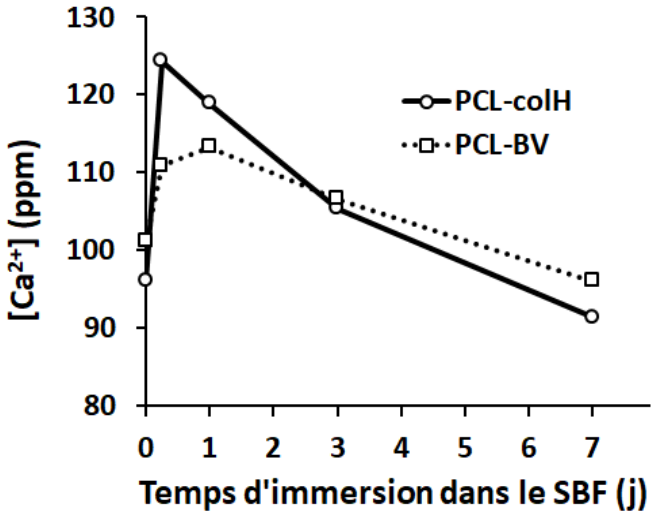


Figure 78. Évolution de la concentration en ions calcium dans le SBF au cours de l'interaction avec les scaffolds hybrides PCL-BV et PCL-colH.

Le potentiel ostéogénique de l'échantillon PCL-colH est évalué *in vitro* et comparé à celui de l'hybride non-dopé (PCL-BV) et de l'os trabéculaire bovin (OTB). Les scaffolds sont ensemencés avec des ostéoblastes primaires de rats et l'activité de l'ALP est déterminée après 7 jours et 14 jours de culture cellulaire. D'après la **Figure 79**, l'activité ALP est significativement plus importante avec le PCL-colH après 7 jours, puis elle est similaire pour le PCL-colH et le PCL-BV après 14 jours. Le collagène hydrolysé stimule donc le processus de minéralisation, mais cet effet se limite à des temps courts comme attendu. Sachant que le SBF est renouvelé tous les 2 à 3 jours dans cette expérience, il se peut qu'après 7 jours de culture cellulaire (c'est-à-dire 1 pré-incubation et 3 interactions) il ne subsiste plus de collagène hydrolysé dans l'hybride qui n'en relargue alors plus dans le milieu, ce qui expliquerait une ostéostimulation limitée aux temps précoces. Ainsi, ces résultats cellulaires rejoignent les observations précédentes sur le relargage rapide du collagène hydrolysé.

Les scaffolds PCL-colH sont finalement implantés dans la calvaria de souris. Le protocole est décrit à la partie 6.3. Après 3 mois d'implantation, l'os ne s'est pas régénéré dans les scaffolds PCL-colH (**Figure 80-A**) alors que la repousse osseuse est bien avancée dans les scaffolds non-dopés (cf. partie 6.3). Cette observation est corrélée à une activité des ostéoblastes faible dans la zone d'implantation du PCL-colH illustrée par l'absence d'ALP (**Figure 80-B**). De plus, on constate une inflammation importante avec le PCL-colH illustrée par une abondance de TRAP (**Figure 80-C**). De ce fait, le matériau PCL-colH ne semble pas adapté au comblement osseux, contrairement à l'hybride non-dopé PCL-BV pour lequel les performances *in vivo* sont excellentes (cf. partie 6.3). Le dopage organique n'est pas à remettre en cause, puisque d'après les résultats de l'étude cellulaire, il permet de stimuler la minéralisation de l'os néoformé. Les mauvaises performances du PCL-colH sont plus probablement liées aux modifications texturales provoquées par l'emploi du mélange acide acétique-THF comme solvant. L'altération de la structure des scaffolds résulte en une baisse de leur tenue mécanique, tandis que les parois lisses obtenues sont défavorables à l'adhésion cellulaire.

Pour conclure, le dopage organique en collagène hydrolysé ne semble en l'état pas approprié pour l'hybride PCL-bioverre. Les propriétés mécaniques du scaffold sont détériorées par l'utilisation de l'acide acétique. Ces conclusions ont mené à une remise en question de notre façon d'opérer : au

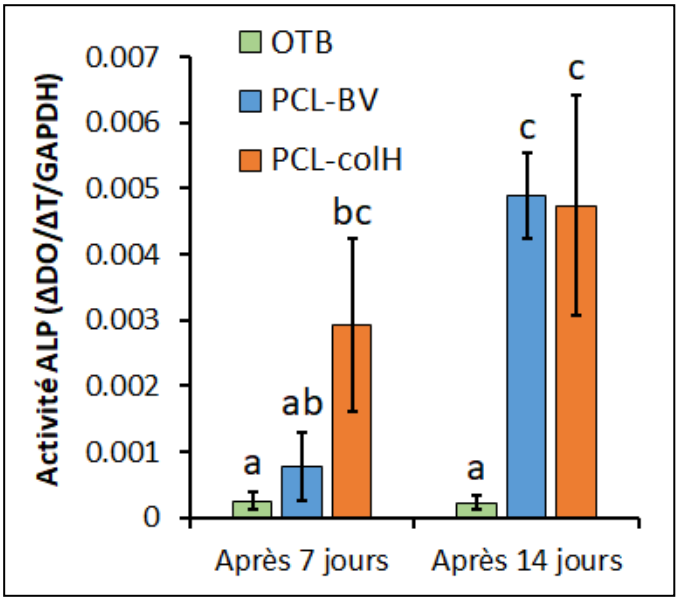


Figure 79. Résultats quantitatifs sur la différenciation cellulaire. Les groupes statistiques sont estimés avec un test des étendues de Tukey et un intervalle de confiance de 95 %.

lieu de sélectionner un dopant organique puis d'adapter la synthèse (comme ce fut le cas ici), le dopant est choisi de sorte à ce que la synthèse n'ait pas à être modifiée. Autrement dit, on cherche un dopant organique qui soit soluble dans le THF.

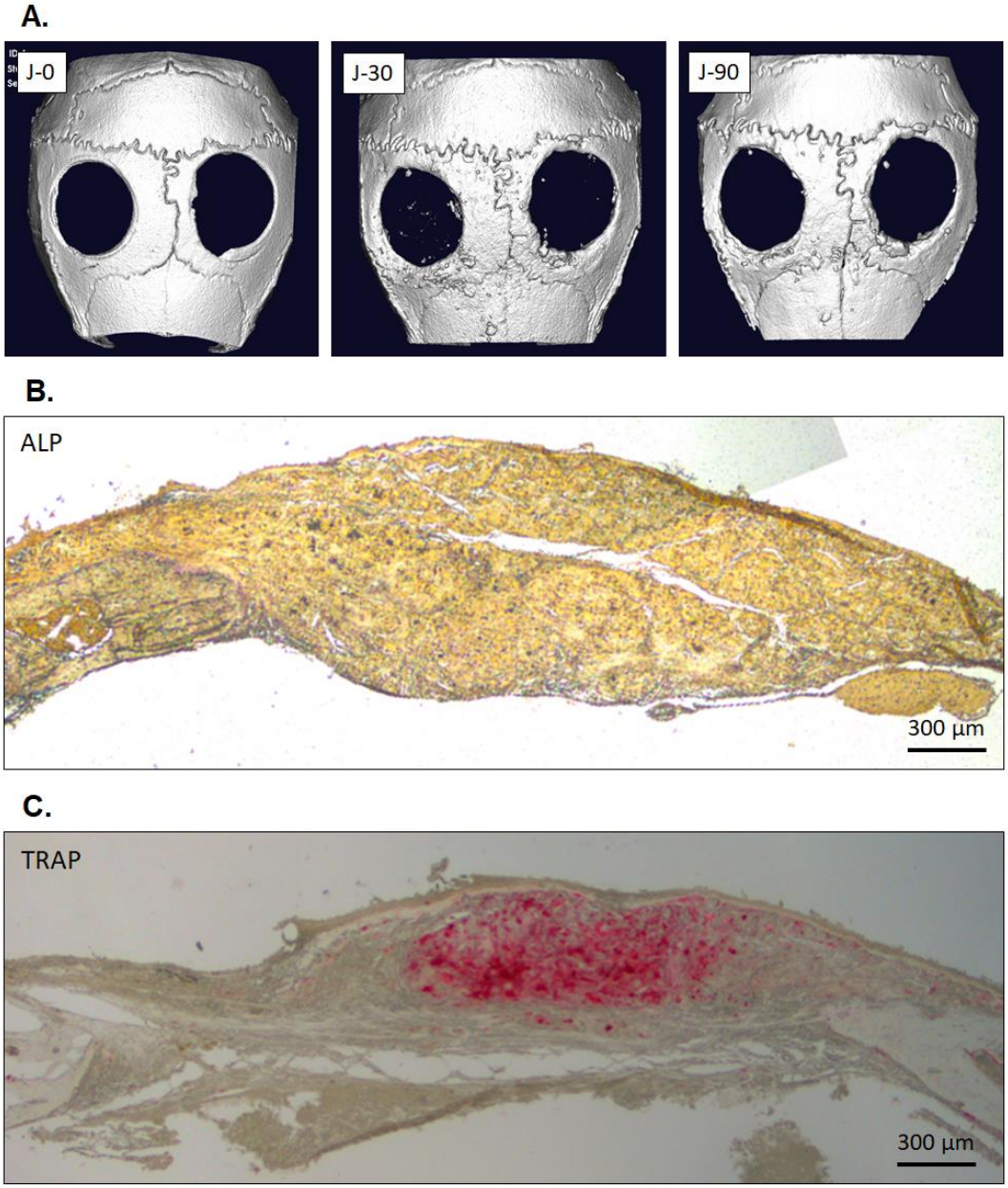


Figure 80. Images obtenues par micro-tomographie aux rayons X de la reconstruction osseuse après 0 mois, 1 mois et 3 mois d'implantation de scaffolds hybrides PCL-colH dans la calvaria de souris (A). Coupes histologiques après 3 mois d'implantation colorées par histoenzymologie pour marquer l'ALP en violet (B) ou la TRAP en rouge (C).

7.3 Dopage organique avec des antioxydants

Après une réunion avec nos collaborateurs de l'INRA, deux nutriments ont été retenus pour des essais de dopage organique sans modification du protocole de synthèse (**Figure 81**). Il s'agit de la fisétine, un polyphénol naturellement présent dans de nombreux fruits et légumes tels que la fraise, la pomme et le concombre, et de l'hydroxytyrosol, un composé phénolique naturellement présent

dans l'olive. Ces deux composés organiques sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, et il a été prouvé qu'une alimentation riche en fisétine ou en hydroxytyrosol stimule la repousse osseuse et renforce les os [135-142]. De plus, ils sont faiblement solubles dans l'eau ; en tant que dopants organiques, on peut donc s'attendre à ce que leur relargage soit étendu dans le temps.

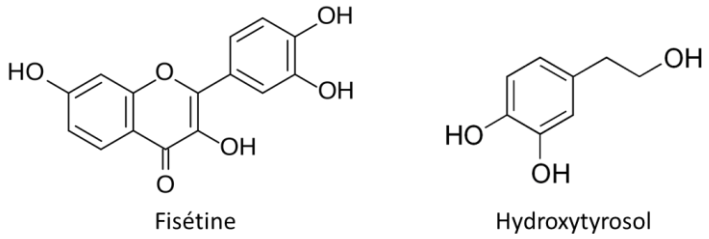


Figure 81. Nutriments envisagés pour le dopage organique des hybrides PCL-bioverre.

La fisétine et l'hydroxytyrosol sont rarement intégrés aux biomatériaux et les études se focalisent souvent sur leur utilisation en tant que compléments alimentaires. Pourtant, le dopage de biomatériaux présente plusieurs avantages face à la nutrition. Premièrement, il y a une notion de confort pour le patient qui perd une pilule à son pilulier. Deuxièmement, il y a une notion de biodisponibilité qui s'applique aux compléments alimentaires : le nutriment ingéré doit passer l'épithélium digestif et seulement une fraction atteint la circulation sanguine sous forme inchangée, alors que dans le cas du dopage le nutriment est directement au contact du sang et sa forme native est donc préservée. Troisièmement, l'administration par voie orale conduit à une dilution du nutriment dans la globalité de la circulation sanguine, alors que dans le cas du dopage le nutriment est directement délivré sur le site d'intérêt. La biodisponibilité et la dilution du nutriment impliquent des doses beaucoup plus conséquentes à administrer par voie orale. Compte tenu des prix élevés de la fisétine et de l'hydroxytyrosol (grossièrement 5 à 10 euros le milligramme), il n'est pas surprenant que ces antioxydants ne soient pas utilisés cliniquement comme « médicaments » post-opératoires. Au contraire, des quantités minimes suffisent dans le cas du dopage, ce qui fait du dopage organique une amélioration économiquement viable de l'hybride. En revanche, comme on a pu le voir avec le collagène hydrolysé, le dopage organique peut s'accompagner de complications relatives à la synthèse et d'une détérioration des propriétés.

Ici, la synthèse est calquée sur celle de l'hybride non-dopé et se déroule sans difficulté. D'après la littérature, des concentrations de 5 µmol/L suffisent à promouvoir l'activité biologique de ces antioxydants [136, 139] ; ainsi, l'hybride est dopé à hauteur de 1 % massique. La fisétine et l'hydroxytyrosol se dissolvent rapidement dans le THF et le mélange de polymères PCL-dopant s'homogénéise sous agitation. La fisétine et l'hydroxytyrosol donnent une couleur rougeâtre et jaunâtre respectivement (**Figure 82**) à la solution et les scaffolds obtenus ont une teinte rouge et brune (respectivement). Les solvants employés lors des étapes de dissolution des billes (cyclohexane) et de rinçage des scaffolds (éthanol) demeurent incolores, ce qui semble indiquer un relargage négligeable voire inexistant des dopants. La manipulation des scaffolds permet de constater des propriétés mécaniques identiques à celles des scaffolds non-dopés : ils ont une bonne tenue mécanique, ils sont à la fois légèrement élastiques et suffisamment rigides pour permettre leur manipulation, et leur découpe au scalpel est simple et propre (**Figure 82, en bas**). Du point de vue macroscopique, il n'est pas possible de différencier les scaffolds dopés des scaffolds non-dopés (hormis la couleur).

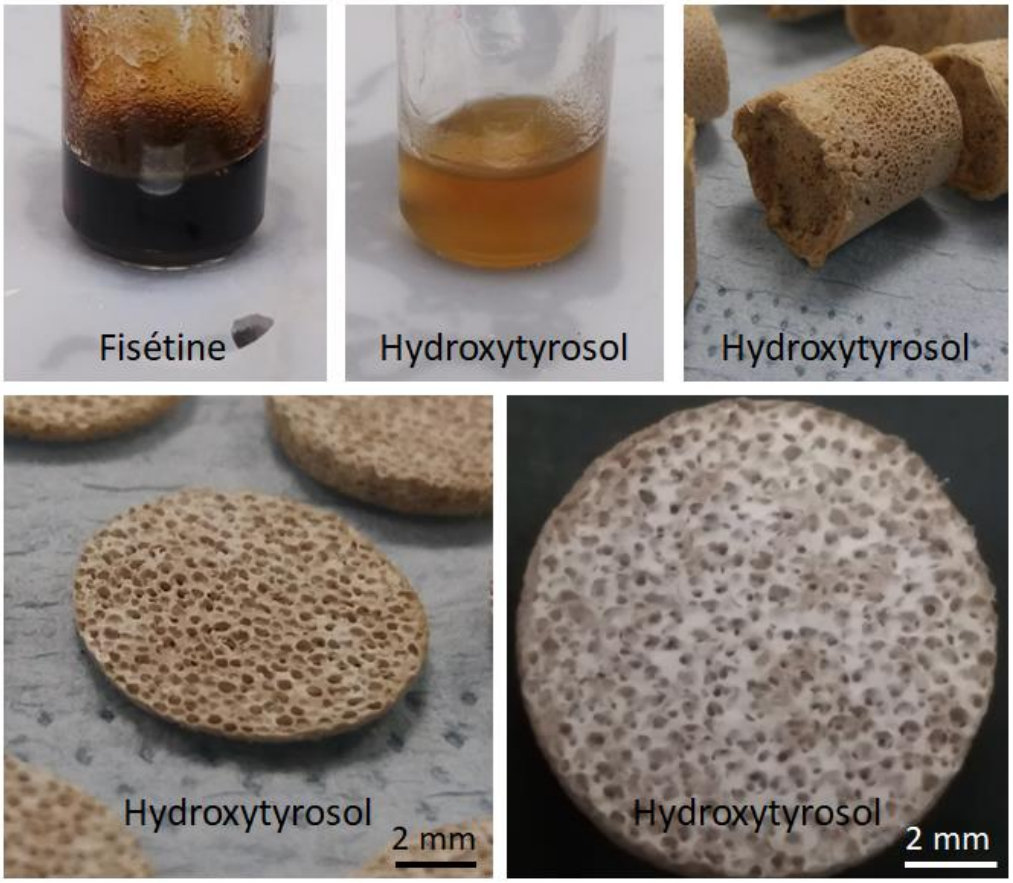


Figure 82. Solutions hybrides et scaffolds d'un hybride PCL-bioverre dopé avec la fisétine ou l'hydroxytyrosol.

Pour des raisons de coût et parce que les scaffolds sont *a priori* identiques à leur version non-dopée, il a été décidé de passer outre la caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques et d'étudier directement leurs propriétés biologiques. Ils sont tout de même observés au MEB afin de s'assurer de leurs structures poreuses. Comme illustré sur la **Figure 83**, les scaffolds ont une structure qui paraît identique à celle des scaffolds non-dopés, avec des pores bien définis et fortement interconnectés, une rugosité micrométrique en surface des parois et une porosité micrométrique à l'intérieur des murs.

Les potentiels ostéogéniques des scaffolds hybrides dopés en fisétine (PCL-fis) ou en hydroxytyrosol (PCL-hyd) sont évalués *in vitro* et comparés à celui de l'hybride non-dopé (PCL-BV). Les scaffolds sont ensemencés avec des ostéoblastes primaires de rats et l'activité de l'ALP est déterminée après 7 jours et 14 jours de culture cellulaire. D'après la **Figure 84**, des différences significatives sont observées entre les trois matériaux aux deux temps. L'activité ALP est plus importante avec PCL-fis, puis PCL-hyd et enfin PCL-BV, démontrant ainsi un effet ostéogénique de ces dopants organiques. Il est intéressant de noter que les performances *in vitro* supérieures de la fisétine par rapport à l'hydroxytyrosol avaient déjà été constatées dans une étude préliminaire où une dose optimale de ces nutriments était supplémentée à des ostéoblastes primaires de rats. Contrairement au dopage avec le collagène hydrolysé, l'effet ostéogénique de PCL-fis et PCL-hyd est observé jusqu'à 14 jours de culture cellulaire, qui équivalent à 1 pré-incubation et 6 interactions. Il semble donc que le relargage de ces dopants se fasse de façon plus durable qu'avec le collagène hydrolysé. Henri Granel, doctorant en charge de l'expérience, rapporte d'ailleurs un changement de couleur des milieux de culture après interaction avec PCL-fis, ceux-ci prenant la teinte du dopant. Ce

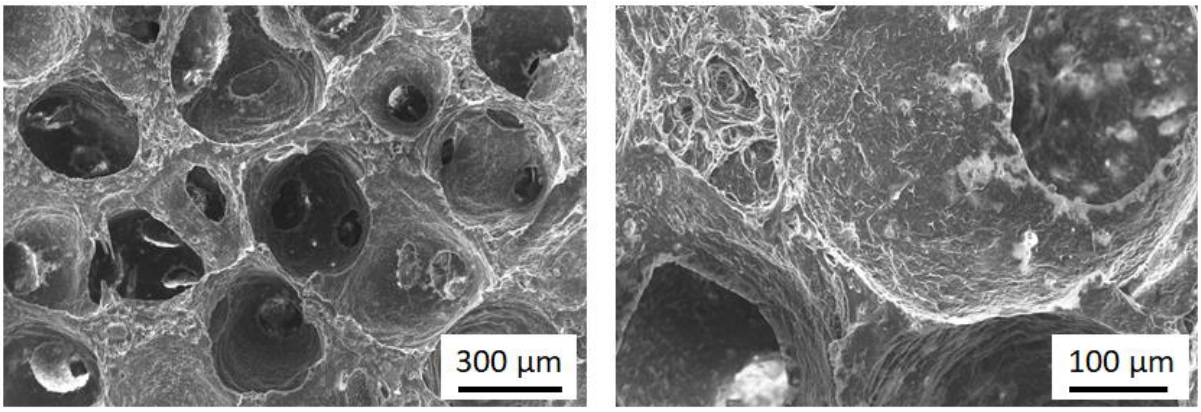


Figure 83. Cliché MEB d'un scaffold d'un hybride PCL-bioverre dopé en fisétine.

changement de couleur s'atténue au fil des renouvellements du milieu mais il est toujours notable, ce qui indique un relargage étalé dans le temps. Le relargage progressif de la fisétine et possiblement de l'hydroxytyrosol est à relier à une faible solubilité des composés phénoliques en milieu aqueux.

Les scaffolds de l'hybride PCL-fis et PCL-hyd ont été implantés dans la calvaria de souris par Henri Granel en juin 2018. Les résultats de l'étude *in vivo* seront disponibles à la fin de l'année 2018 et seront présentés dans la thèse d'Henri Granel.

En conclusion, la fisétine et l'hydroxytyrosol améliorent le potentiel ostéogénique de l'hybride tout en évitant les complications rencontrées avec le collagène hydrolysé. L'utilisation de ces antioxydants en tant que constituants d'un biomatériau n'est pas répandue, alors que d'un point de vue économique, il s'agit d'une stratégie bien plus intéressante comparée à l'ingestion de compléments alimentaires post-opératoires. De nombreux composés organiques ostéogéniques peuvent également être envisagés pour le dopage organique de l'hybride PCL-bioverre, en particulier dans la famille des polyphénols (oleuropéine, hespéridine, naringine, resveratrol). Pour toutes ces raisons, ce dopage organique apparaît comme prometteur dans l'optique d'améliorer le potentiel ostéogénique de nos matériaux et il a d'ailleurs fait l'objet d'une demande de brevet en octobre 2018.

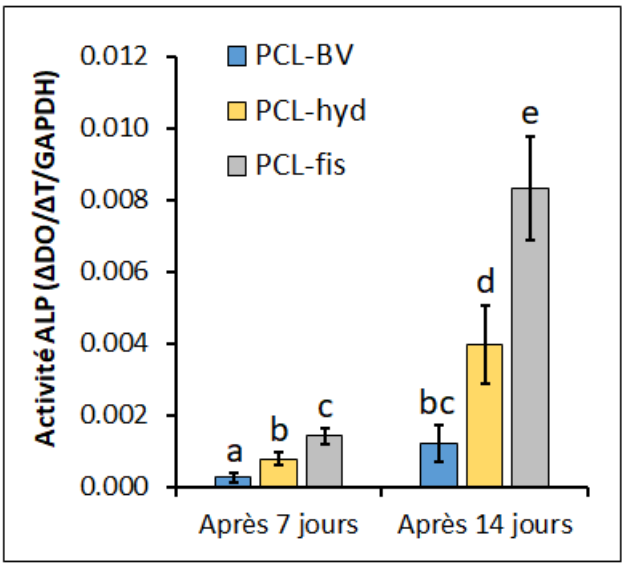


Figure 84. Résultats quantitatifs sur la différenciation cellulaire. Les groupes statistiques sont estimés avec un test des étendues de Tukey et un intervalle de confiance de 95 %.

CHAPITRE 8 RENFORCEMENT DES PROPRIETES MECANIQUES

En parallèle de l'amélioration du potentiel ostéogénique de l'hybride, il est apparu intéressant de renforcer les propriétés mécaniques des scaffolds hybrides PCL-bioverre pour deux raisons. Premièrement, la flexibilité et l'élasticité du PCL facilitent la pose de l'implant hybride, celui-ci pouvant être légèrement compressé de manière réversible pendant sa mise en place. Toutefois, le scaffold gagnerait à être un peu plus rigide. D'une part, le scaffold doit être découpé avec délicatesse et avec une lame aiguisée, sans quoi il tend à être écrasé plutôt que tranché. D'autre part, l'implantation (par exemple dans la calvaria de souris) nécessite parfois de pousser « en force » le matériau, ce qui peut résulter en un écrasement de sa porosité. Une plus grande rigidité faciliterait donc la manipulation des scaffolds et éviterait une détérioration de sa structure poreuse pendant l'opération chirurgicale. Deuxièmement, l'hybride en l'état actuel ne convient pas à toutes les applications en comblement de défauts osseux. Un substitut osseux doit permettre la néoformation osseuse, mais il peut aussi avoir à jouer un rôle protecteur *e.g.* s'il vient à remplacer une partie de la boîte crânienne qui protège les méninges. Le scaffold hybride PCL-bioverre est ostéoconducteur et permet l'ostéogénèse ; néanmoins, il est flexible et ne protège pas des chocs extérieurs. Pour étendre le domaine d'applications de notre matériau, il est donc nécessaire de renforcer ses propriétés mécaniques qui doivent idéalement correspondre à celles de l'os hôte.

En théorie, de nombreux paramètres permettent de moduler les propriétés mécaniques des scaffolds. Par exemple, le module d'Young E et la contrainte à la rupture σ_r dépendent du volume poreux V selon les **équations** empiriques **21 et 22** [39].

$$E = E_s\,(1 - V)^2 \quad \textbf{(21)}$$

$$\sigma_r = 0{,}3\,\sigma_s\,(1 - V)^{3/2} \quad \textbf{(22)}$$

Où E_s et σ_s sont le module d'Young et la contrainte à la rupture (respectivement) du matériau dense. D'après ces équations, plus le matériau est poreux et plus il perd en rigidité. L'idée serait donc de réduire la taille des interconnexions du scaffold et ainsi sa porosité afin de le rendre plus rigide. Or, les interconnexions sont avant tout indispensables à la colonisation cellulaire et à la circulation des fluides au sein de l'implant. Leurs diamètres ayant étés fixés en accord avec ces critères biologiques, il n'est pas envisageable de les modifier. De même, le ratio organique-inorganique permet théoriquement de moduler les propriétés mécaniques de l'hybride [43]. Une proportion plus importante de verre bioactif devrait résulter en un hybride plus rigide. Or, on a vu à la partie 5.3 qu'il était délicat de synthétiser des hybrides contenant plus de 70 % de bioverre, que ceux contenant 50 et 60 % de bioverre sont fragiles, et que ceux en contenant 20, 30 et 40 % possèdent des propriétés mécaniques proches. Dans ce système hybride et en l'état actuel de son développement, il n'est donc pas possible d'ajuster les propriétés mécaniques à travers le ratio organique-inorganique.

Dans la suite du chapitre, deux autres alternatives sont étudiées afin de renforcer les scaffolds hybrides. La première consiste à employer un mélange de polymères et la seconde consiste à élaborer un hybride de classe II, c'est-à-dire à lier les chaînes organiques et inorganiques de façon covalente.

8.1 Mélange de polymères

Une des propriétés remarquables du PCL est sa capacité à se mélanger à d'autres polymères [81]. L'objectif de ces travaux est de combiner le PCL pour sa résorption lente avec un polymère plus rigide afin de renforcer l'hybride. Le ratio organique-inorganique est conservée, *i.e.* 70 % massique de polymères (PCL plus un autre polymère) et 30 % de verre bioactif. Ainsi, l'ajout d'un autre polymère se traduit nécessairement par une proportion plus faible en PCL.

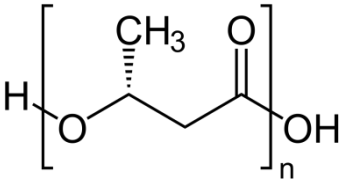


Figure 85. Polyhydroxybutyrate**.**

Avec les mêmes motivations, Ding *et al.* ont travaillé sur l'hybride PCL/polyhydroxybutyrate (PHB)-silice [50, 143, 144]. Le PHB (**Figure 85**) est un polyhydroxyalcanoate produit naturellement par la fermentation bactérienne de sucres ou de lipides. Tout comme le PCL, il s'agit d'un polyester biocompatible et biodégradable ; mais contrairement au PCL il est hautement rigide, d'où l'intérêt de réaliser un mélange PCL/PHB. Dans leur étude, Ding *et al.* élaborent l'hybride sous forme de fibres par « electrospinning », un procédé significativement différent du nôtre. Ils dissolvent les polymères dans un mélange de chloroforme et de *N,N*-diméthylformamide à 70°C. Dans notre cas, les réactions sol-gel sont sensibles à la température et un gain de quelques degrés Celsius peut suffire à changer la chimie des espèces en solution et les propriétés du matériau final. Il n'est donc pas concevable de dissoudre les polymères en chauffant à 70°C. Une série de tests a permis de déterminer l'hexafluoroisopropanol (HFIP) comme solvant commun du PCL et du PHB. L'acide acétique, le tétrahydrofurane et le chloroforme (ou des mélanges de ces solvants) ne permettent pas de dissoudre à la fois le PCL et le PHB à température ambiante. Les scaffolds obtenus à partir de l'HFIP

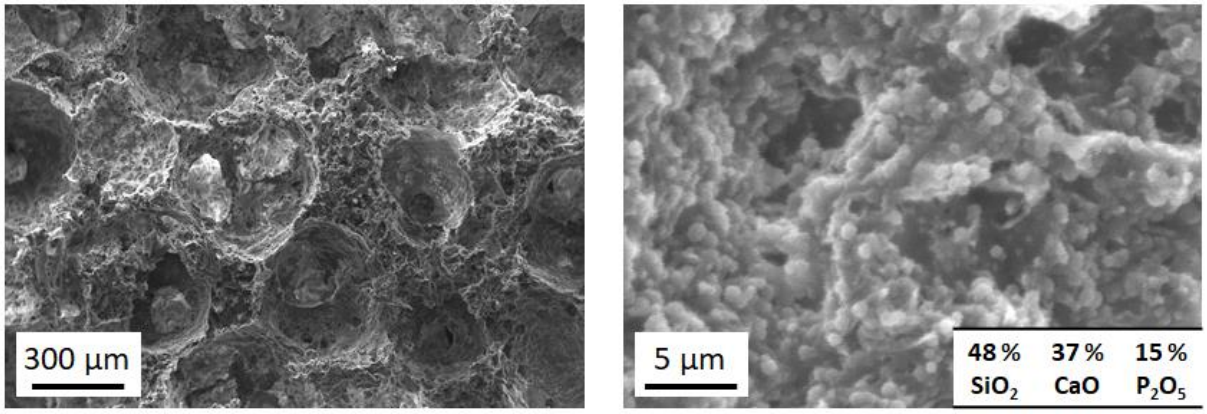
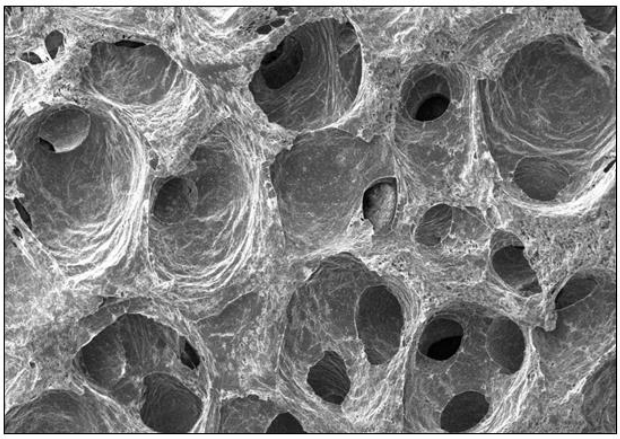


Figure 86. Clichés MEB d'un scaffold d'un hybride de composition massique 35 % PCL - 35 % PHB - 30 % bioverre avant (à gauche) et après (à droite) immersion dans le SBF pendant 3 jours.

(**Figure 86**) semblent bioactifs, cependant ils ont une faible tenue mécanique et tendent à se désintégrer lors de leur manipulation. De nombreuses synthèses ont été préparées avec différents mélanges de solvants HFIP-THF et des compositions organiques variées allant de 0 % à 50 % massique en PHB, mais les observations restent les mêmes : les scaffolds sont mécaniquement décevants. On constate certes une plus grande rigidité des hybrides en fonction de la proportion en PHB, mais *in fine* cette rigidité reste bien inférieure à celle de l'hybride PCL-bioverre élaboré à partir de THF. Ces résultats témoignent une fois encore d'un effet du solvant sur les propriétés mécaniques du matériau. À l'image du dopage organique, on décide de changer notre approche : au lieu de sélectionner un polymère puis d'adapter la synthèse, le polymère est choisi de sorte à ne pas avoir à modifier la synthèse. Autrement dit, on cherche un polymère biorésorbable rigide qui soit soluble dans le THF.

Le poly(acide D,L-lactique) (PDLLA), déjà présenté à la partie 4.1.1, répond à ces critères. Un hybride de composition massique 49 % PCL - 21 % PDLLA - 30 % bioverre est élaboré. Le PDLLA se dissout dans le THF et peut être mélangé au PCL grâce à une agitation mécanique – l'agitation magnétique n'étant pas efficace. Outre ce détail, la synthèse est identique à celle de l'hybride PCL-bioverre. Les scaffolds obtenus (**Figure 87, à gauche**) ont le même aspect que les scaffolds PCL-bioverre, ils paraissent plus solides et sont plus résistants à la découpe. Ils sont toujours déformables à la main mais il est désormais nécessaire de forcer légèrement. Les essais de compression effectués sur les scaffolds (n = 4) démontrent une rigidité similaire lorsque l'hybride contient du PDLLA (**Figure 87, à droite**) avec un module d'élasticité valant 0,40 ± 0,09 MPa contre 0,49 ± 0,03 MPa pour l'hybride PCL-bioverre à porosité équivalente (cf. partie 6.1.3). La contrainte à la limite d'élasticité est en revanche plus élevée lorsque l'hybride contient du PDLLA : elle vaut 0,055 ± 0,004 MPa contre 0,036 ± 0,003 MPa pour l'hybride PCL-bioverre. Cela explique qu'il soit nécessaire de fournir un effort plus important dans le but de déformer l'hybride PCL/PDLLA-bioverre de façon irréversible. Pour résumer, les scaffolds hybrides PCL/PDLLA-bioverre sont plus facilement manipulables et conviennent mieux à un rôle protecteur du substitut osseux. L'ajout de PDLLA est donc un moyen simple et efficace de renforcer modérément les scaffolds.



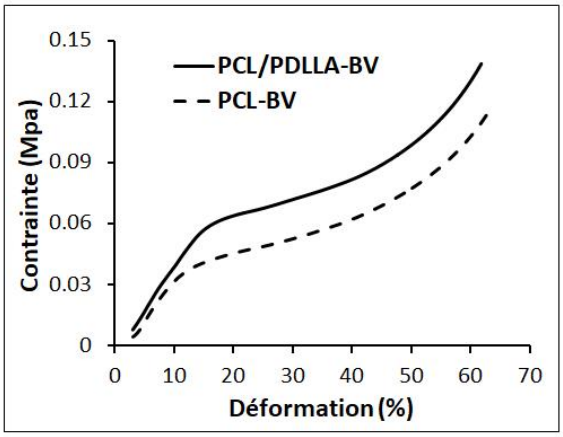


Figure 87. À gauche, cliché MEB d'un scaffold d'un hybride de composition massique 49 % PCL - 21 % PDLLA - 30 % bioverre. À droite, courbes de contrainte-déformation obtenues par compression des scaffolds de l'hybride contenant du PDLLA (noté PCL/PDLLA-BV) et de l'hybride n'en contenant pas (noté PCL-BV).

8.2 Couplage organique-inorganique

Dans l'optique d'implanter dans un site exposé aux chocs extérieurs, le matériau doit posséder des propriétés mécaniques proches de celles de l'os hôte afin d'assurer un rôle protecteur. Cela représente un défi sachant que l'hybride est constitué à 70 % de PCL, un polymère extrêmement flexible. Même avec l'ajout de PDLLA, les scaffolds hybrides sont bien en deçà de l'os trabéculaire humain en termes de rigidité (on rappelle que ce dernier possède un module d'élasticité supérieur à 10 MPa). Le mélange de polymères ne permettra pas un renforcement suffisant des scaffolds hybrides à moins peut-être de substituer une grande partie du PCL par un polymère plus rigide comme le PDLLA. Or, on souhaite conserver une proportion majoritaire de PCL, celui-ci servant de support à la repousse osseuse sur le long terme grâce à sa dégradation lente. Il faut donc trouver une alternative au mélange de polymères.

L'établissement de liaisons covalentes entre les chaînes de polymère et le réseau silicate (hybride de classe II, cf. partie 1.3.2) est une stratégie connue dans le but de moduler les propriétés mécaniques d'un hybride organominéral. L'élaboration d'un hybride de classe II se fait généralement au moyen d'un agent couplant qui se lie d'un côté au réseau silicate, de l'autre côté aux fonctions réactives du polymère. Malheureusement le PCL contient seulement deux fonctions nucléophiles situées en bout de chaîne, ce qui limite fortement le couplage. Il est possible de remédier à ce problème de deux façons. La première consiste à greffer des fonctions nucléophiles ($-NH_2$, -COOH) le long de la chaîne carbonée du PCL (**Figure 88-A**), voire directement des groupements siloxanes $-Si(OR)_3$ (dans ce cas, l'agent couplant n'est plus utile). La deuxième solution consiste à utiliser un PCL dont les chaînes sont plus courtes (**Figure 88-B**) afin d'augmenter la densité d'espèces réactives (cf. partie 1.3.2).

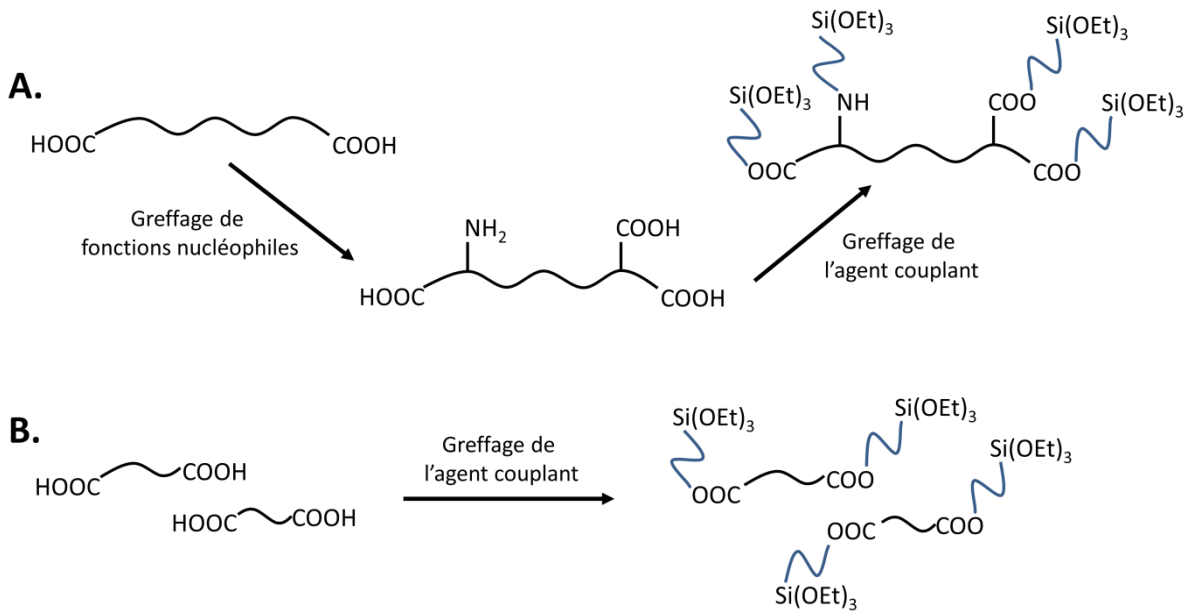


Figure 88. Représentation schématique de deux stratégies en vue d'augmenter la densité de fonctions réactives du PCL : fonctionnalisation de la chaîne carbonée du polymère (A) ou utilisation de chaînes plus courtes (B).

8.2.1 Fonctionnalisation des chaînes carbonées du PCL

Le greffage de groupements siloxanes $-Si(OR)_3$ le long de la chaîne du PCL peut être réalisé par photo-oxydation. La photo-oxydation consiste à exposer le polymère au rayonnement ultraviolet en présence d'un photo-initiateur tel que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. L'irradiation UV génère des radicaux libres sur la chaîne carbonée du polymère notée P (**équations 23 à 28** [145, 146]), qui peuvent ensuite réagir avec des liaisons doubles (d'un alcène par exemple) par addition radicalaire. L'alcène est alors greffé au polymère.

<u>Amorçage</u> :

$$H_2O_2 \xrightarrow{h\nu} 2\ HO^{\bullet} \quad \textbf{(23)}$$

$$PH + HO^{\bullet} \rightarrow P^{\bullet} + H_2O \quad \textbf{(24)}$$

<u>Propagation</u> :

$$P^{\bullet} + O_2 \rightarrow POO^{\bullet} \quad \textbf{(25)}$$

$$POO^{\bullet} + PH \rightarrow POOH + P^{\bullet} \quad \textbf{(26)}$$

$$POOH \xrightarrow{h\nu} PO^{\bullet} + HO^{\bullet} \quad \textbf{(27)}$$

<u>Exemple de terminaison</u> :

$$PO^{\bullet} + PO^{\bullet} \rightarrow POOP \quad \textbf{(28)}$$

Dans la littérature, la photo-oxydation est souvent employée pour greffer des groupements hydrophiles à la surface de membranes en polyuréthane [147-150], une famille de polymères dont le caractère hydrophobe est responsable d'une faible cytocompatibilité. En 2002, Zhu *et al.* rapportent la fonctionnalisation par photo-oxydation d'une membrane en PCL avec l'acide méthacrylique [151]. En s'inspirant de ces travaux, on décide de greffer le triéthoxysilane de vinyle $CH_2{=}CH{-}Si(OEt)_3$ au PCL. Les premiers essais se focalisent sur la fonctionnalisation d'une membrane de 150 µm d'épaisseur qui est préparée en dissolvant le PCL dans du THF puis en versant la solution sur un support plan en verre. Le protocole du greffage est résumé sur la **Figure 89**.

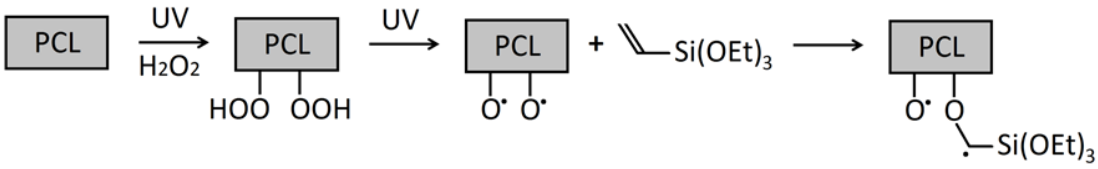


Figure 89. Représentation schématique du procédé de silanisation d'une membrane en PCL.

Tout d'abord, la membrane est immergée dans de l'eau oxygénée à 30 % et placée sous une lampe UV (254 nm, 2 x 20 W) à une distance de 4 cm pendant 5 heures, ce qui induit en théorie la formation de peroxydes POOH à sa surface (**équations 23 à 26**). La membrane est ensuite rincée abondamment avec de l'eau distillée, immergée dans une solution de triéthoxysilane de vinyle à 5 % massique dans l'éthanol, puis replacée sous la lampe UV pendant 2 heures. L'exposition aux rayonnements UV provoque la dissociation des peroxydes instables en radicaux $PO^{\bullet}$ et $HO^{\bullet}$ (**équation 27**) qui réagissent

avec le groupement vinyle selon un mécanisme d'addition radicalaire (**Figure 90**). Il peut alors y avoir un greffage de l'organo-alcoxysilane sur la chaîne carbonée du PCL.

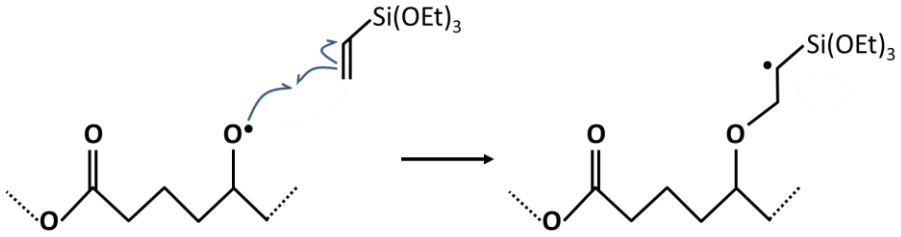


Figure 90. Addition radicalaire du PCL photo-oxydé avec le triéthoxysilane de vinyle.

Dans un premier temps, on souhaite vérifier la formation de peroxydes POOH à la surface de la membrane en PCL. Après avoir été plongée dans l'eau oxygénée sous UV, la membrane est rincée abondamment avec de l'eau distillée puis séchée. Une gouttelette d'eau de 10 µL est ensuite déposée et l'angle de contact (θ) entre la gouttelette et la membrane est mesuré (n = 9, **Figure 91 à gauche**). On constate une plus grande mouillabilité de la membrane (θ = 68,5° ± 4,5°) par rapport à la membrane en PCL non-traitée (θ = 83,4° ± 3,1°), ce qui est en accord avec la formation de groupements hydrophiles POOH à sa surface. Dans un second temps, on souhaite vérifier le greffage des fonctions siloxanes. Après avoir été immergée dans une solution de triéthoxysilane de vinyle sous UV, la membrane est rincée dans l'éthanol absolu pendant 48 h puis analysée par EDX. Une autre membrane servant de contrôle est également analysée ; elle a aussi été immergée dans une solution de triéthoxysilane de vinyle, mais dans le noir. Les spectres d'émission des rayons X représentés sur la **Figure 91 (à droite)** montrent la présence de silicium (pic à 1,74 keV) en surface de la membrane traitée sous UV, mais pas sur celle traitée dans l'obscurité. Par conséquent, il semble que ce protocole permette le greffage de fonctions siloxanes -Si(OEt)$_3$ sur des membranes en PCL.

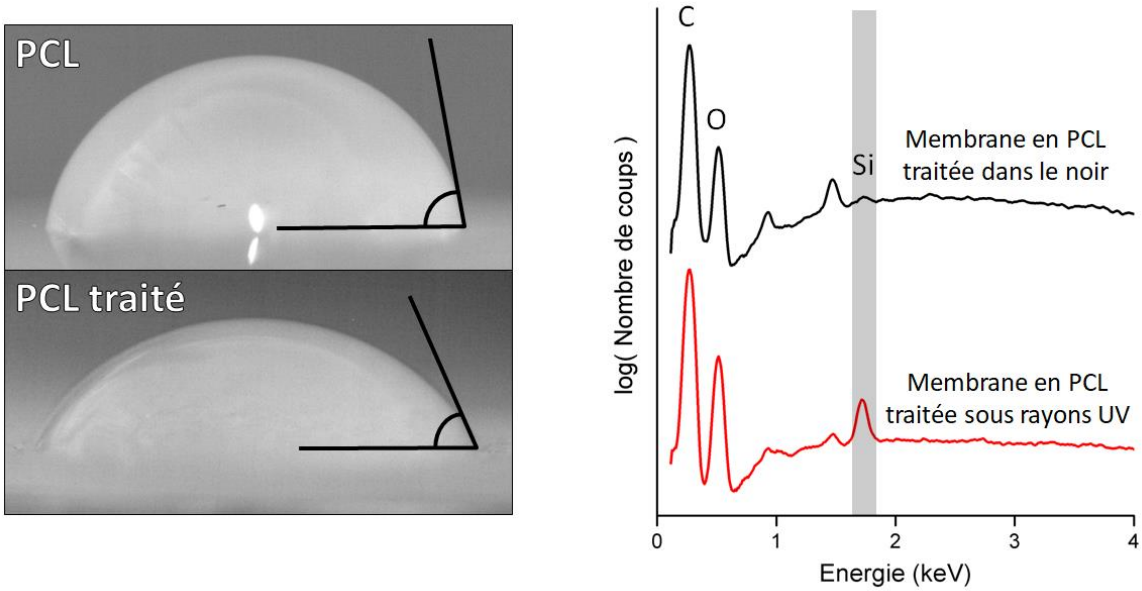


Figure 91. Exemples de mouillabilité de membranes en PCL pur avant et après traitement dans l'eau oxygénée (à gauche). Spectres d'émission des rayons X obtenus par analyse EDX des membranes en PCL fonctionnalisées avec le triéthoxysilane de vinyle (à droite).

La photo-oxydation est une méthode prometteuse dans le but de fonctionnaliser la chaîne carbonée du PCL. On a vu qu'il était possible de greffer des groupements siloxanes en surface d'une membrane, et il s'agit désormais d'élargir ce procédé à la fonctionnalisation du polymère en solution. En effet, fonctionnaliser une membrane ne répond pas à nos besoins puisque le greffage n'a lieu qu'en surface et il est donc hétérogène et relativement faible par rapport à la masse du matériau. L'état de l'art est inexistant en ce qui concerne la photo-oxydation d'un polymère en solution et on se propose de développer un procédé (**Figure 92**).

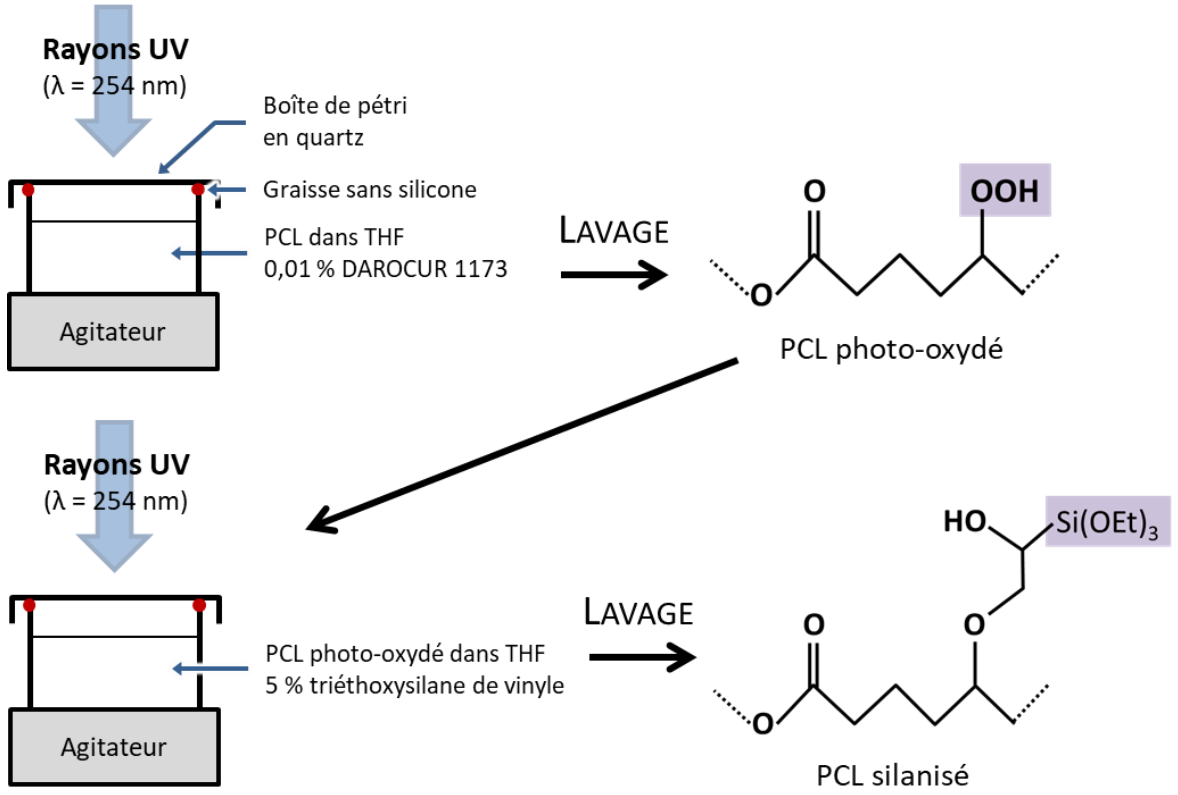


Figure 92. Représentation schématique du procédé de silanisation du PCL en solution.

Le PCL est dissout dans du THF qui ne contient pas d'hydroxytoluène butylé, un agent stabilisant qui évite certes la formation de peroxydes explosifs mais qui possède des pics d'absorption à 205 nm, 247 nm et 278 nm [152] (on rappelle que la lampe émet à une longueur d'onde de 254 nm). Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'étant pas soluble dans le THF, on utilise un photo-initiateur organique, le DAROCUR 1173 (**Figure 93**), qui possède un pic d'absorption à 245 nm [153]. Le fournisseur recommande une concentration en DAROCUR 1173 comprise entre 0,001 % et 0,01 %. La solution est versée dans une boîte de pétri en quartz transparente aux rayons UV qui est fermée hermétiquement avec de la graisse sans silicone. On évite ainsi l'évaporation du THF. Après 5 heures d'exposition au rayonnement UV sous agitation, le PCL dissout est lavé 5 fois avec du cyclohexane, rincé avec de l'éthanol absolu et séché. On obtient en théorie un PCL dont la chaîne est greffée avec

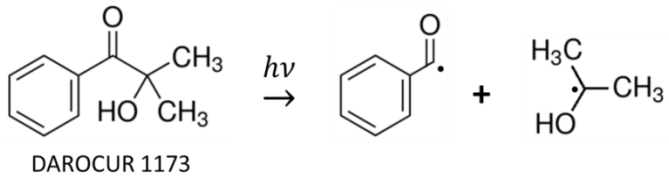


Figure 93. Réaction de dissociation du 2-hydroxy-2-méthylpropiophénone ou DAROCUR 1173.

des groupements peroxydes POOH. Le polymère obtenu est ensuite dissout dans une solution de triéthoxysilane de vinyle à 5 % dans le THF et la solution est placée sous UV, toujours dans une boîte de pétri en quartz et sous agitation. Après 2 h de traitement, le polymère est de nouveau lavé 5 fois avec du cyclohexane, rincé avec de l'éthanol absolu et séché. On devrait ainsi obtenir un PCL silanisé, c'est-à-dire fonctionnalisé avec des siloxanes $-Si(OEt)_3$.

Malheureusement, aucun des essais menés n'est concluant : sous un faisceau d'électrons de 10 keV, les échantillons n'émettent pas de rayons X caractéristiques du silicium et il n'y a *a priori* pas de silanisation du PCL. On décide alors d'évaluer l'efficacité du DAROCUR 1173. Pour ce faire, on tente de fonctionnaliser une membrane en PCL en employant le DAROCUR 1173. La membrane est immergée dans une solution de DAROCUR 1173 à 0,001 % ou 0,01 % dans l'éthanol – car ce photo-initiateur n'est pas soluble dans l'eau et le PCL serait dissout dans le THF – puis exposée aux rayons UV pendant 5 h avant d'être rincée et séchée. Les mesures d'angle de contact entre une gouttelette d'eau et les membranes (**Tableau 8**) révèlent une fonctionnalisation moins efficace en comparaison avec H_2O_2. Par ailleurs, les concentrations de 0,001 % et 0,01 % en DAROCUR 1173 donnent des résultats similaires. On constate toutefois que les membranes traitées à l'aide du DAROCUR 1173 sont sensiblement plus hydrophiles que le PCL brut, ce qui suggère la présence de groupements peroxydes. Ainsi, même si le DAROCUR 1173 paraît être un amorceur radicalaire moins performant que H_2O_2, cela ne permet pas d'expliquer l'absence de silanisation suite aux essais de photo-oxydation du polymère dissout.

Tableau 8. Angle de contact entre les membranes en PCL ayant subies différents traitement UV et une gouttelette d'eau.

Membrane traitée dans…	Non-traitée	30 % H_2O_2	0,001 % DAROCUR 1173	0,01 % DAROCUR 1173
Angle de contact avec l'eau	83,4° ± 3,1°	68,5° ± 4,5°	76,1° ± 2,3°	74,3° ± 4,3°

Une autre hypothèse peut être envisagée afin d'expliquer l'absence de silanisation : l'absorption des rayons UV par le solvant. Cette hypothèse n'a pas été approfondie et est simplement présentée dans le but de suggérer des perspectives d'amélioration du procédé. Idéalement, le solvant doit être transparent aux rayons UV. Le **Tableau 9** présente les longueurs d'onde pour lesquelles l'absorbance des solvants vaut 1,0 (λ_0) ou 0,05 (λ_1) sur un trajet « optique » de un centimètre, autrement dit pour lesquelles les solvants absorbent 90 % (λ_0) ou 10 % (λ_1) des rayons UV sur 1 cm [153-156]. On constate que l'eau (λ_0 = 185 nm ; λ_1 = 190 nm) est transparente aux rayons UV émis par la lampe (λ_L = 254 nm), que l'éthanol (λ_0 = 205 nm ; λ_1 = 240 nm) l'est un peu moins avec une valeur λ_1 proche de λ_L, et que le THF (λ_0 = 220 nm ; λ_1 = 280 nm) ne l'est pas et absorbe probablement une partie importante des rayons UV destinés à la création de radicaux. Ceci peut être une des raisons pour laquelle le PCL dissout dans le THF n'est pas fonctionnalisé. Il pourrait être intéressant d'utiliser un solvant plus transparent aux rayons UV émis par la lampe tel que le dichlorométhane (λ_0 = 230 nm ; λ_1 = 245 nm) ou d'utiliser une lampe qui émette vers 280 nm ou 331 nm, deux longueurs d'onde qui correspondent aux autres pics d'absorption du DAROCUR 1173.

Tableau 9. Longueurs d'onde pour lesquelles l'absorbance vaut 1,0 ou 0,05 sur une distance de 1 cm à travers le solvant.

		Eau	Éthanol	THF	CH_2Cl_2
Longueur d'onde	λ_0 ($A_{1\,cm}$ = 1,0)	185 nm	205 nm	220 nm	230 nm
	λ_1 ($A_{1\,cm}$ = 0,05)	190 nm	240 nm	280 nm	245 nm

Pour finir, il est un dernier constat qui complexifie le développement d'un procédé de photo-oxydation viable. Après traitement UV, les membranes en PCL sont cassantes. La détérioration des propriétés mécaniques est causée par la photodégradation du PCL. Il s'agit d'un mécanisme de dégradation bien connu dans le vieillissement des polymères [145]. On a vu précédemment que l'exposition au rayonnement UV engendre la formation de peroxydes le long de la chaîne carbonée (**équations 23 à 26**), puis que ces peroxydes se dissocient en radicaux $PO^{\bullet}$ et $HO^{\bullet}$ (**équation 27**). Les radicaux libres $PO^{\bullet}$ sont fortement instables et peuvent provoquer la scission de la chaîne carbonée suivant la réaction illustrée sur la **Figure 94** [146] :

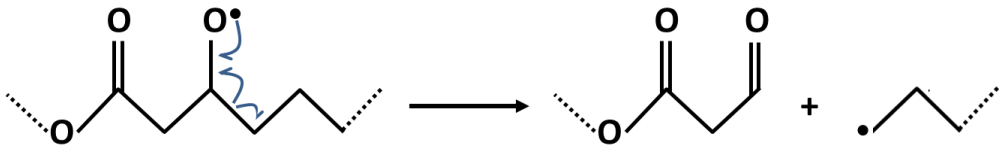


Figure 94. Photodégradation du PCL par scission de la chaîne carbonée.

Il résulte de cette scission un raccourcissement aléatoire des chaînes de polymère et une perte des propriétés mécaniques. Dans le développement d'un procédé de photo-oxydation, il est primordial d'optimiser les paramètres afin d'avoir un bon compromis entre la fonctionnalisation du polymère et sa dégradation. On peut citer comme paramètres le temps d'exposition au rayonnement UV, la puissance de la lampe, la distance entre la lampe et l'échantillon ou encore les concentrations des différents réactifs. Ici, on s'était inspiré des travaux présentés dans la littérature [148, 151] mais il semble que les paramètres ne soient pas optimaux. Pour conclure, le procédé de photo-oxydation paraît prometteur en vue de fonctionnaliser la chaîne carbonée du PCL, mais il requiert de nombreux travaux d'optimisation avant de pouvoir être appliqué.

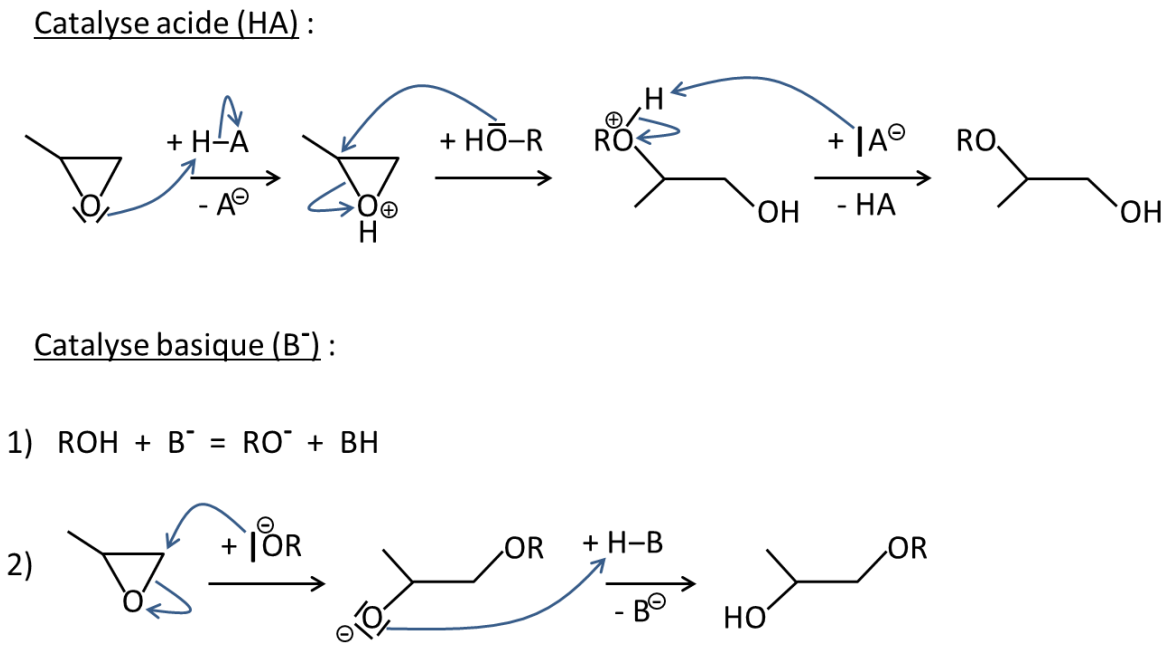


Figure 95. Mécanisme réactionnel de la substitution nucléophile entre un époxyde et un alcool en présence d'un catalyseur acide noté HA ou basique noté B^-.

8.2.2 Fonctionnalisation des groupements terminaux du PCL

La deuxième solution évoquée dans le but d'augmenter le degré de couplage est l'utilisation d'un PCL de masse moléculaire plus faible. Les chaînes de polymère étant plus courtes, la densité d'espèces réactives est plus élevée (**Figure 88-B**). En revanche, le raccourcissement des chaînes se traduit par une diminution des propriétés mécaniques qui peut annuler le renforcement apporté par le couplage organique-inorganique.

À la différence du procédé de photo-oxydation, le greffage de fonctions siloxanes -Si(OR)$_3$ se fait uniquement sur les groupements nucléophiles situés en bout de chaîne du PCL (généralement -OH ou -COOH). Pour cela, un agent couplant de type organo-alcoxysilane est employé. Le groupement nucléophile du PCL réagit avec la partie organique de l'agent couplant selon un mécanisme de substitution nucléophile d'ordre 2 (**Figure 95**). Généralement, un catalyseur est nécessaire pour soit accroître la force du nucléophile grâce à la catalyse basique, soit accentuer le caractère électrophile du groupe partant grâce à la catalyse acide. Le **Tableau 10** résume les travaux de deux groupes de chercheurs sur la silanisation des groupements terminaux du PCL [43, 157].

Tableau 10. Résumé de deux publications dont les travaux portent sur le greffage d'un organo-alcoxysilane sur les groupements terminaux du PCL.

Auteurs	Année	Poids moléculaire du PCL	Groupements terminaux du PCL	Agent couplant	Catalyseur
Rhee S-H	2004	M_w = 6700 g/mol	–OH	IPTES	DABCO (base de Lewis)
Mondal D Rizkalla A Mequanint K	2016	M_n = 3000 g/mol	–OH	GPTMS	TMB (acide de Lewis)

Mondal *et al.* font usage du borate de triméthyle B(OCH$_3$)$_3$ en tant qu'acide de Lewis [157]. Cet alcoxyde peut aussi être utilisé comme précurseur du bore dans les réactions sol-gel. Le bore est un élément d'intérêt dans les bioverres puisqu'il accélère le processus de précipitation de l'apatite [158], il est ostéoinducteur [159] et possède des propriétés angiogéniques [160]. Ainsi, le borate de triméthyle est un catalyseur de choix qu'il n'est pas utile d'éliminer par des étapes de lavage. En s'inspirant des travaux de Mondal *et al.*, on réalise le montage suivant (**Figure 96**).

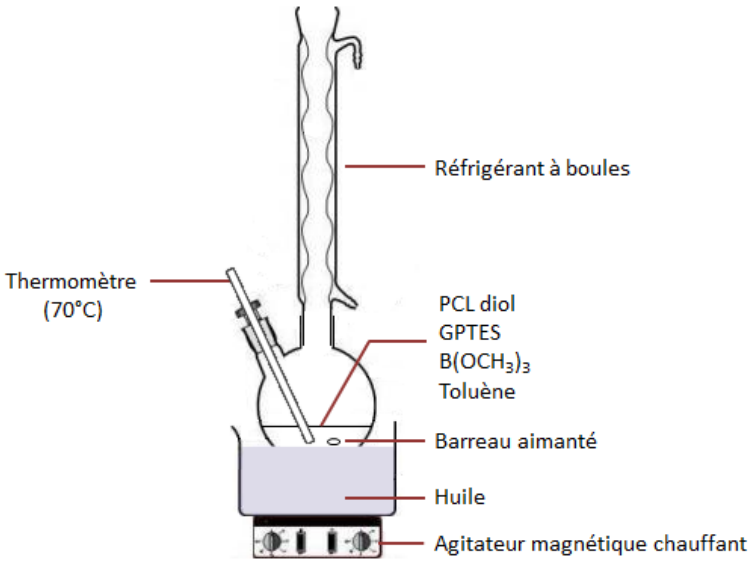


Figure 96. Représentation schématique du montage à reflux développé pour le greffage du GPTES sur le PCL diol.

Le PCL diol (M_w = 1 250 g/mol) est dissout dans le toluène à une concentration de 0,1 g/mL. L'agent couplant glycidoxypropyltriéthoxysilane (GPTES) et le catalyseur $B(OCH_3)_3$ sont introduits suivant les ratios molaires PCL : GPTES : $B(OCH_3)_3$ de 1 : 4 : 0,00025. Le mélange est mis sous agitation et chauffé à 70°C sous reflux pendant 6 h ou 24 h. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (60 mbar à 40°C pendant 24 h). Finalement, le PCL dissout est lavé 5 fois avec du cyclohexane et séché. Afin de vérifier la silanisation du polymère, les polymères obtenus sont analysés par EDX. Un témoin est aussi préparé en mélangeant le PCL et le GPTES dans le toluène puis en réitérant les étapes d'évaporation et de lavage. D'après la **Figure 97**, le témoin (temps de réaction nul) contient du silicium, ce qui signifie que le lavage n'est pas efficace et ne permet pas d'éliminer le GPTES résiduel. Ainsi, l'analyse des échantillons par EDX ne permet pas de vérifier la silanisation du

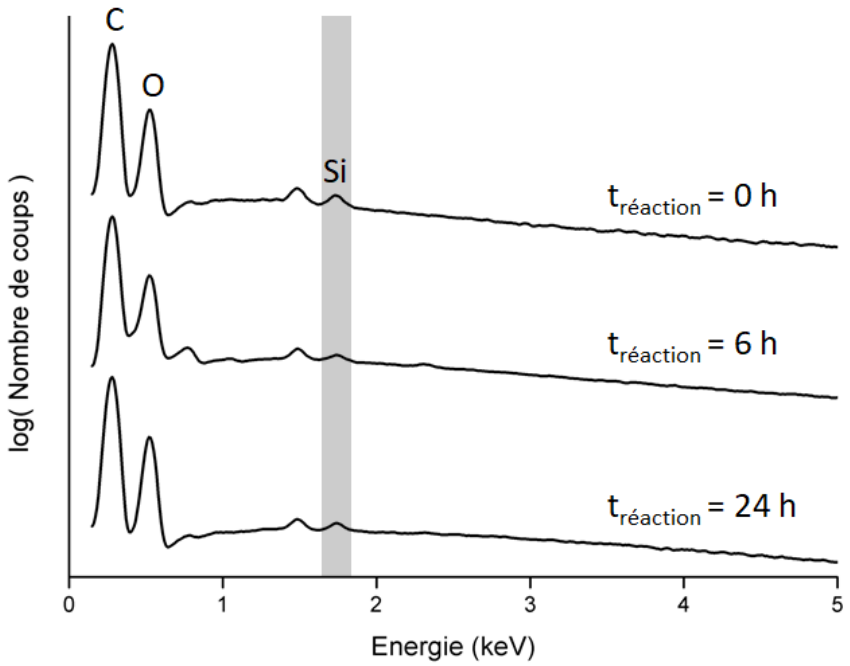


Figure 97. Spectres d'émission des rayons X obtenus par analyse EDX du PCL après la réaction avec le GPTES pendant un temps t.

PCL et des caractérisations supplémentaires sont requises, telles que des analyses par spectroscopie IR et par spectroscopie RMN. Des premiers travaux ont été initiés en collaboration avec l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, incluant la caractérisation en RMN ^{1}H du liquide des spectres caractéristiques des précurseurs utilisés (**Figure 98**) en vue de réaliser un suivi temporel de la silanisation d'unités monomériques représentatives. Notamment, nous avons établi qu'un déplacement des contributions des protons situés aux positions 5 et 6 (δ_5 = 3,02 ppm, δ_6 = 2,48 ppm, $\delta_{6'}$ = 2,66 ppm) est attendu et serait révélateur de l'ouverture du cycle époxyde [40, 41, 49, 157].

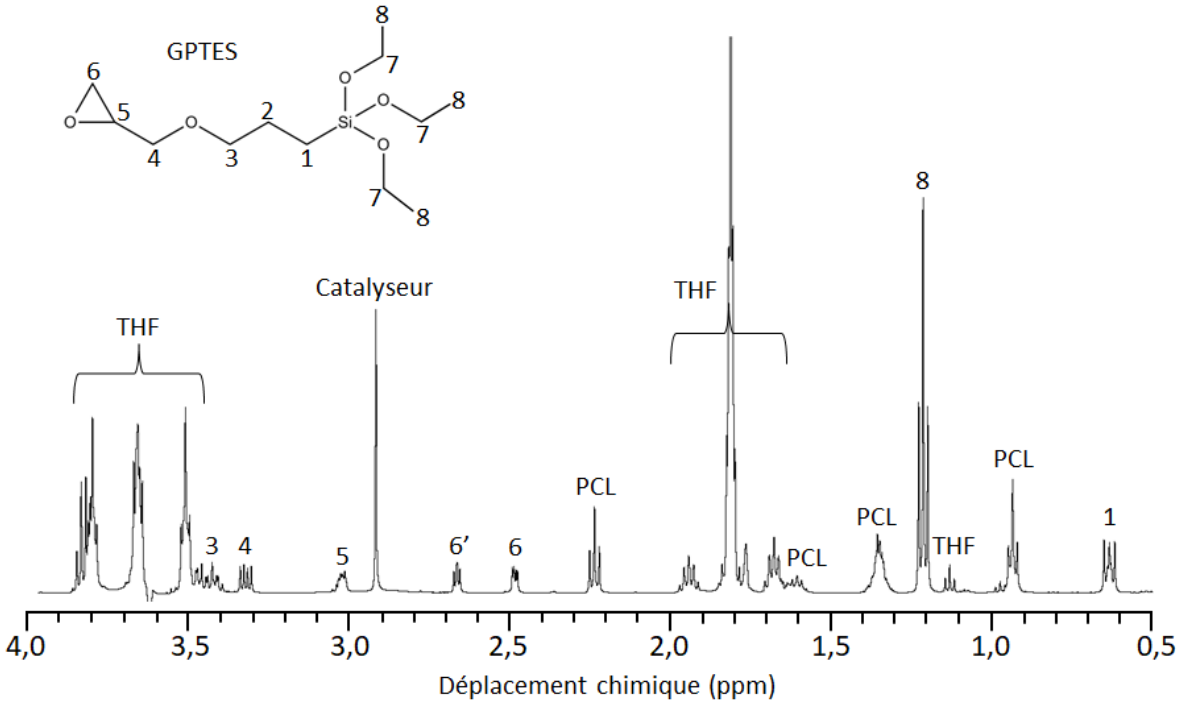


Figure 98. Spectre RMN ^{1}H du mélange réactionnel pour la silanisation du PCL. Les contributions des protons aux positions 2 et 7 se situent à des déplacements chimiques d'environ 1,8 et 3,6 (respectivement) et elles sont masquées par les pics du solvant THF.

8.3 Conclusions et perspectives

Il paraît intéressant de renforcer les scaffolds hybrides PCL-bioverre afin de faciliter leur manipulation et de pouvoir envisager leur implantation dans des sites exposés aux chocs extérieurs. Mélanger le PCL à un autre polymère plus rigide tel que le PDLLA conduit à un hybride plus résistant et facilement manipulable. Cette méthode s'avère particulièrement efficace lorsque le polymère en question est soluble dans le THF. En revanche, le scaffold hybride possède toujours des propriétés mécaniques bien inférieures à celles de l'os trabéculaire.

Pour un renforcement significatif du matériau, il semble nécessaire d'agir sur les interactions moléculaires en réalisant un hybride de classe II. L'établissement de liaisons covalentes entre les réseaux organiques et inorganiques passe d'abord par la silanisation du PCL au moyen d'un agent couplant. Par exemple, le GPTES peut être greffé aux groupements terminaux -OH du PCL à l'aide du catalyseur acide $B(OEt)_3$. Après validation du greffage par spectroscopies RMN et IR, il serait intéressant de fabriquer des scaffolds d'un hybride de classe II et d'étudier l'influence du poids

moléculaire du PCL. En effet, des chaînes plus courtes se traduisent d'un côté par un degré de couplage organique-inorganique plus élevé, de l'autre par un affaiblissement des propriétés mécaniques du polymère. Ainsi, la réduction du poids moléculaire du PCL peut résulter en une détérioration des propriétés de l'hybride de classe II malgré un couplage plus conséquent [43, 161]. Un contrôle indépendant du poids moléculaire du polymère et du couplage organominéral est généralement recommandé [23].

Il est possible d'augmenter le degré de couplage tout en conservant le poids moléculaire du PCL : il suffit pour cela d'intégrer des fonctions réactives le long de la chaîne carbonée du PCL. Ici, on a proposé un procédé de photo-oxydation qui a montré des premiers résultats prometteurs avec le greffage de fonctions silanes en surface de membranes en PCL. De plus amples travaux sont nécessaires afin d'adapter ce procédé à la silanisation du polymère en solution. Par ailleurs, les paramètres doivent être optimisés de sorte à minimiser la photo-dégradation du polymère.

Plusieurs équipes de recherche travaillent également sur la synthèse de polymères comportant des groupements silanes le long de leurs chaînes [46, 162, 163]. La synthèse présente l'avantage d'un meilleur contrôle sur la densité en espèces réactives comparé à la post-fonctionnalisation du polymère. Elle consiste très souvent en la polymérisation radicalaire du (triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (**Figure 99**), un monomère contenant des groupements $-Si(OCH_3)_3$. Les polymères résultants sont alors des copolymères du poly(triméthoxysilylpropyl méthacrylate). À elle-seule, la synthèse du polymère détermine le degré de couplage, les propriétés mécaniques et la vitesse de résorption de l'hybride. Il s'agit assurément de la méthode la plus élégante et la plus efficace pour élaborer un hybride de classe II à partir d'un polymère d'origine synthétique. Cette stratégie est récente et il ne fait nul doute que dans les années à venir, de nombreux polymères similaires seront développés.

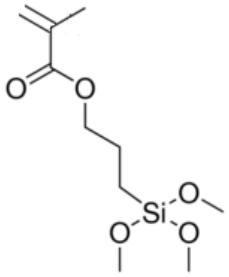


Figure 99. (Triméthoxysilyl)propyl méthacrylate.

CHAPITRE 9 MISE EN FORME DES SCAFFOLDS PAR IMPRESSION 3D

Le dernier aspect de la thèse porte sur l'élaboration des scaffolds hybrides PCL-bioverre au moyen des techniques d'impression tridimensionnelle, et plus particulièrement les méthodes de type FDM (Fused Deposition Modeling). La fabrication additive est un procédé de mise en forme rapide des scaffolds qui permet un contrôle fin de la structure macroporeuse. Comme illustré sur la **Figure 100**, des macrostructures diverses et variées peuvent être conçues avec des pores de morphologie et de taille ajustables à volonté [164, 165]. L'objectif est ici d'étendre la variété des structures réalisables pour l'hybride PCL-bioverre.

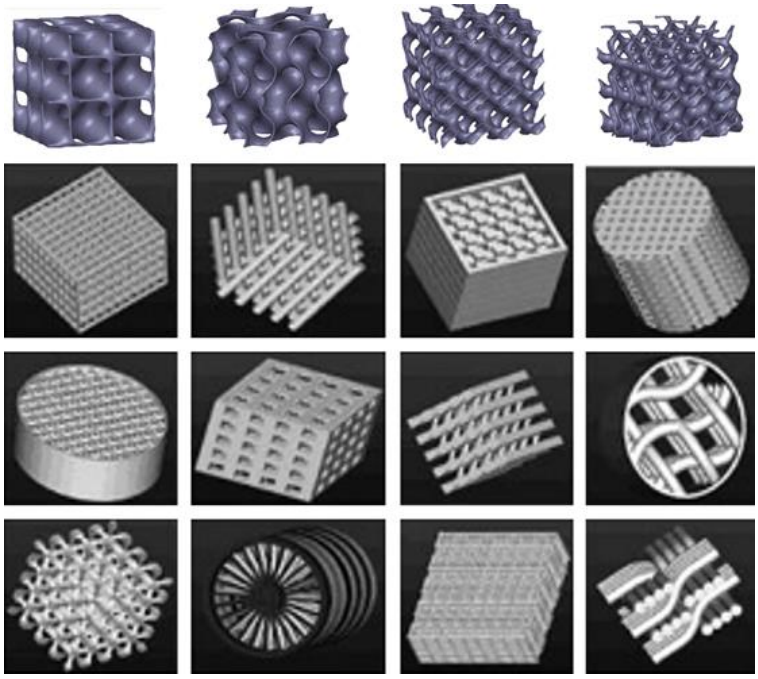


Figure 100. Exemples de la variété des modèles de structures poreuses pouvant être fabriquées par impression 3D [164, 165].

9.1 Moule négatif fabriqué par impression 3D

Dans cette partie, l'impression 3D sert à la fabrication d'une préforme polymérique sacrificielle. Le principe d'élaboration des scaffolds reste le même qu'aux chapitres précédents : la porosité est générée à travers un agent porogène qui est éliminé avec des solvants, mais au lieu d'employer un empilement de billes en paraffine, on emploie une matrice polymérique imprimée. Le polymère est choisi parmi l'ABS (acrylonitrile butadiène styrène), le PLA (acide polylactique), le PETG (poly(téréphtalate d'éthylène)), le nylon et l'HIPS (high impact polystyrene) qui sont fréquemment utilisés en FDM. Cette technique de fabrication additive est schématisée sur la **Figure 101**.

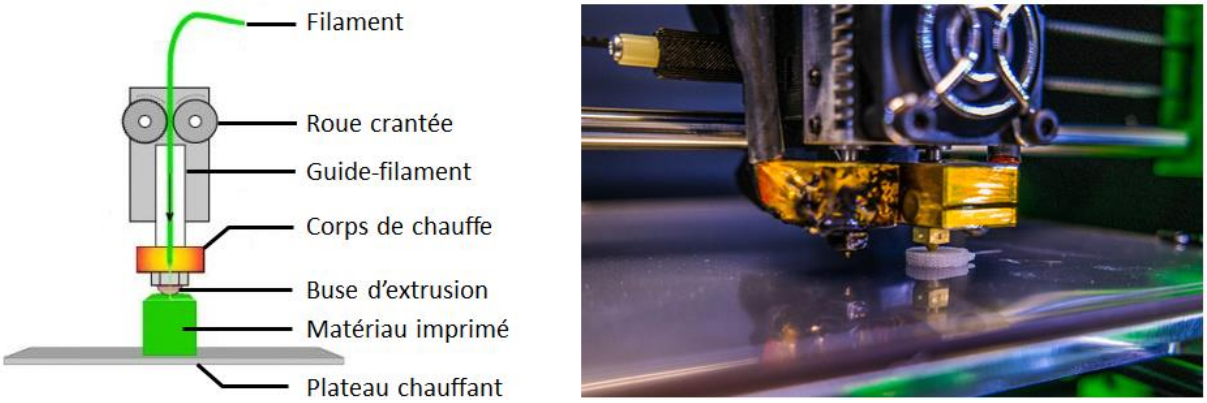


Figure 101. Impression par Fused Deposition Modeling.

Le filament en polymère est entraîné par des roues crantées dont la vitesse de rotation est contrôlée par un moteur. Il est guidé jusqu'à la tête d'extrusion où il est fondu puis extrudé à travers une buse de diamètre 250 µm, 400 µm ou 800 µm. La matière fondue est alors déposée sur un plateau qui peut être chauffé en vue d'améliorer l'adhésion de la première couche. Avec notre imprimante (STREAM 30 Dual, VOLUMIC), le plateau est fixe et le système d'extrusion se déplace dans les 3 axes. Le matériau est ainsi fabriqué couche par couche.

Le polymère constitutif du moule négatif est sélectionné selon les critères suivants : premièrement, il ne doit pas être soluble dans le sol hybride puisque ce dernier est infiltré dans le moule ; deuxièmement, il doit pouvoir être éliminé par un solvant qui ne dissout pas l'hybride ; troisièmement, il doit de préférence être facilement imprimable. Après une série de tests, l'HIPS est retenu. Une préforme à maille carrée est dessiné par CAO (**Figure 102-A**), elle est ensuite imprimée à partir d'un filament en HIPS (1,75 mm de diamètre, FormFutura) puis infiltrée avec le sol hybride. Après gélification, le matériau est plongé dans 5 bains consécutifs de d-limonène durant chacun 24 h afin de dissoudre l'HIPS. Il en résulte un scaffold hybride hautement poreux constitué de barreaux de 250 µm d'épaisseur qui sont périodiquement espacés de 850 µm (**Figure 102-B et C**). L'analyse par EDX donne bien une composition inorganique de 75 % SiO_2 - 25 % CaO en massique.

D'autres structures ont été créées grâce à ce procédé (**Figure 102-D à I**). La structure illustrée sur la **Figure 102-D à F** diffère de la précédente par l'organisation des barreaux. Au lieu d'avoir des barreaux alignés, ils sont décalés les uns par rapport aux autres (**Figure 102-D**). En vue de dessus, il n'est plus possible de voir à travers le scaffold hybride résultant (**Figure 102-E et F**). Cette structure a pour but d'augmenter le nombre de cellules adhérentes, le chemin parcouru à travers le scaffold étant plus tortueux [166, 167]. Il est également possible de réduire la taille des pores comme illustré sur la **Figure 102-G à I** afin de se rapprocher des recommandations de Karageorgiou et Kaplan qui rapportent l'angiogenèse et l'ostéogénèse avec des pores de 250 µm [67]. Ici, les barreaux du scaffold hybride sont épais de 100-150 µm et espacés de 500 µm.

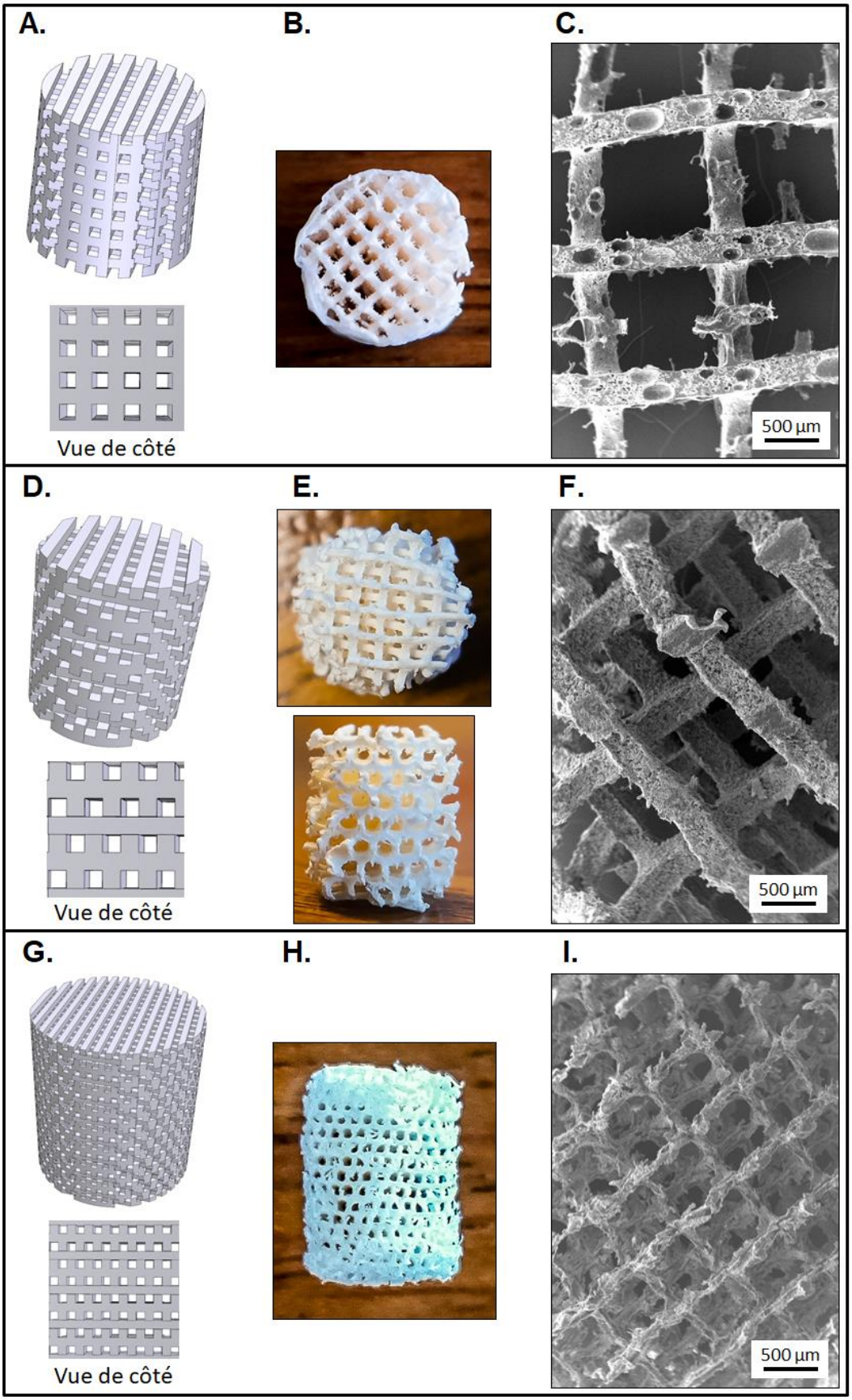


Figure 102. Dessin assisté par ordinateur des moules négatifs (A, D, G), et photographie (B, E, H) et cliché MEB (C, F, I) des scaffolds hybrides PCL-bioverre obtenus à partir de ces moules.

La bioactivité des scaffolds hybrides PCL-bioverre fabriqués à partir du premier modèle (**Figure 102-A à C**) est évaluée *in vitro*. Les scaffolds sont immergées dans le SBF (1 mL/mg de matériau) pendant 6 h, 1 j, 3 j et 7 j. Après avoir été rincés à l'éthanol absolu puis séchés, ils sont analysés par microfaisceau d'ions (**Figure 103**). Les cartographies montrent qu'après 3 jours d'interaction avec le SBF, la phase inorganique de l'hybride est presqu'intégralement convertie en un phosphate de calcium. La quantification des données acquises par PIXE montre une évolution du ratio massique Ca/P au cours de l'interaction avec le SBF, celui-ci valant 3,7 (± 0,3) après 1 jour d'interaction, 3,3 (± 0,5) après 3 jours et 2,8 (± 0,3) après 7 jours. Le ratio tend vers une composition apatitique (Ca/P massique de 2,2 pour l'apatite) et il pourrait être intéressant de réaliser des analyses par spectroscopie IR ou par DRX afin de confirmer la nature du phosphate de calcium précipité. On note que le barreau est minéralisé dans son volume et non uniquement en surface. On retrouve donc le comportement atypique des hybrides développés par l'équipe : contrairement aux bioverres qui induisent la formation d'une couche phosphocalcique n'excédant généralement pas 20 µm, les hybrides réagissent dans tout le volume (cf. partie 6.1.4). Ceci est d'autant plus remarquable qu'ici, il s'agit d'un barreau de plus de 100 µm qui a entièrement minéralisé.

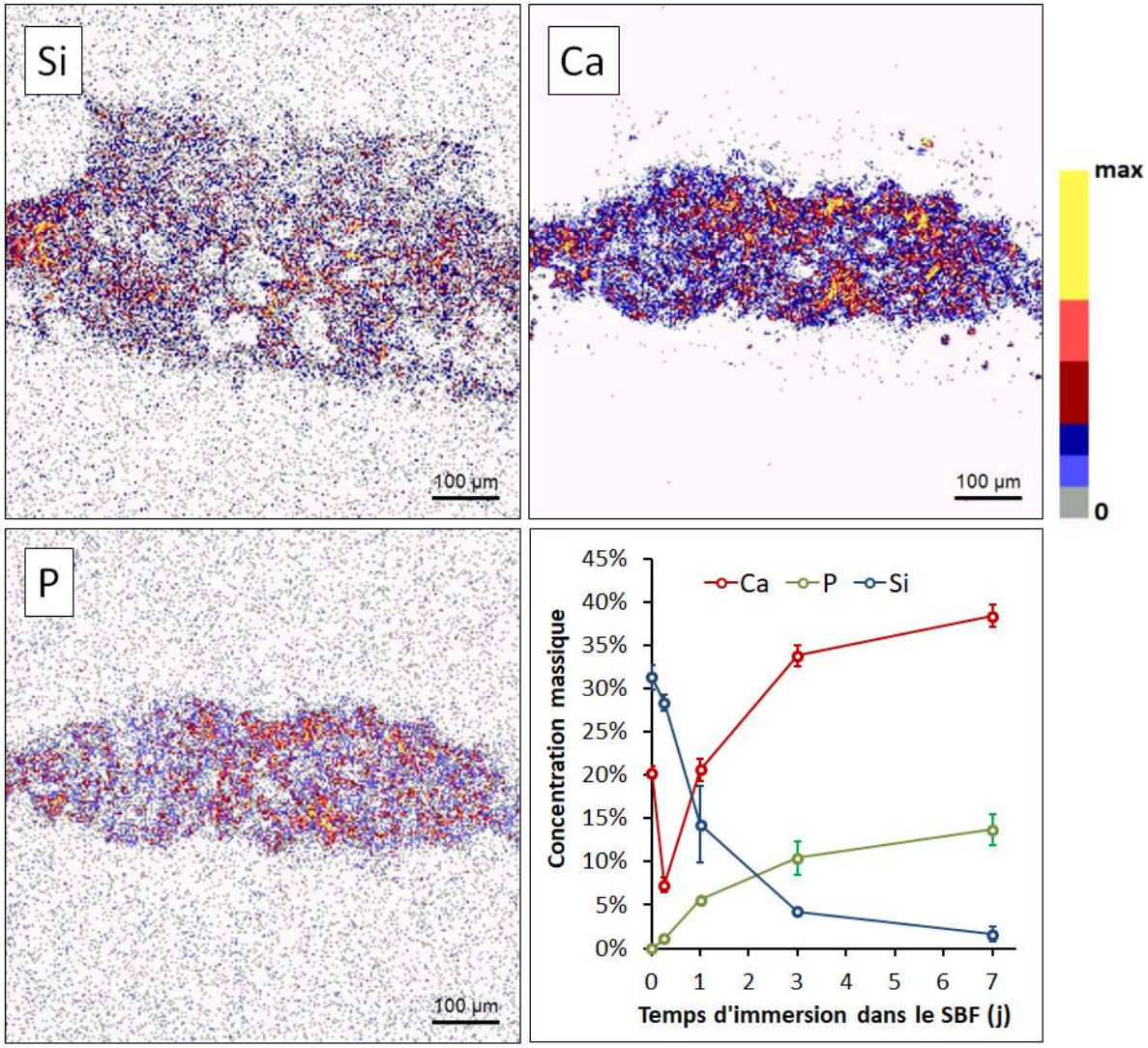


Figure 103. Cartographies élémentaires obtenues par microfaisceau d'ions sur un barreau du scaffold hybride PCL-bioverre fabriqué à partir d'un moule en HIPS et après 3 jours d'immersion dans le SBF. Analyse quantitative donnant l'évolution de la composition inorganique de l'hybride au cours de l'interaction avec le SBF.

9.2 Impression 3D à partir de fil hybride

9.2.1 Fabrication du fil hybride

Dans cette partie, le scaffold hybride PCL-bioverre est directement imprimé par FDM (**Figure 101**). Il faut avant tout créer un fil hybride pour pouvoir alimenter l'imprimante. Le fil est fabriqué par le système d'extrusion ci-dessous (**Figure 104**) :

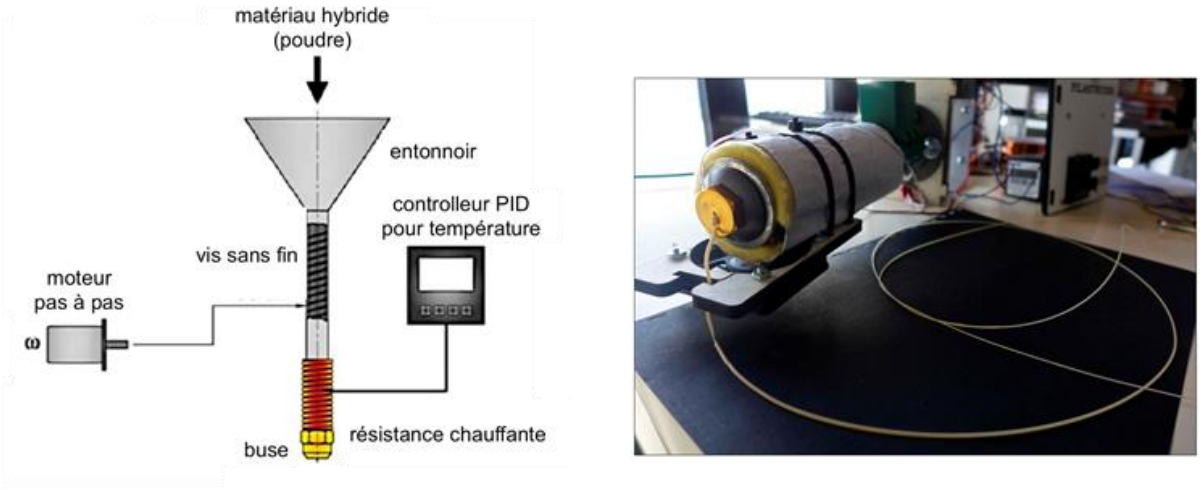


Figure 104. Fabrication d'un fil hybride PCL-bioverre par extrusion.

Tout d'abord, la solution hybride est laissée jusqu'à gélification, le bloc obtenu est broyé et les granules résultants sont rincés dans l'éthanol absolu. Après séchage, les granules hybrides sont introduits dans le système d'extrusion. Ils sont alors entraînés par une vis sans fin jusqu'à l'extrémité chauffante, puis l'hybride fondu est extrudé à travers une buse de 1,75 mm de diamètre.

À quelle température doit-on extruder l'hybride ? D'après des analyses par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), la partie organique de l'hybride de composition massique 70 % PCL - 30 % bioverre a une température de fusion de 63°C, et d'après les analyses thermogravimétriques (ATG) présentées à la partie 6.1.1, il commence à se dégrader à 350°C. Nous avons par ailleurs constaté que la température d'extrusion conditionnait la qualité du fil produit. Or, l'impression 3D demande un fil de bonne qualité, avec un minimum de défauts et un diamètre régulier et proche de la valeur requise (ici, 1,75 mm). Une température d'extrusion comprise entre 75°C et 80°C semble optimale : en dessous de cet intervalle, la matière peine à sortir et on obtient un fil rugueux ; au-dessus, la matière est fluide et conduit à un diamètre de fil trop fin.

9.2.2 Impression de scaffolds hybrides

Le fil hybride ainsi fabriqué est inséré dans l'imprimante 3D (**Figure 101**) et différents paramètres sont testés afin de permettre son extrusion : diamètre de la buse, température de chauffe et vitesse d'extrusion. L'hybride est difficilement extrudé à travers la buse de 400 µm : rapidement, les roues crantées ne parviennent plus à entraîner le fil et on n'obtient jamais plus de quelques centimètres de matériau extrudé. En poussant le fil à la main, on sent également une forte résistance.

La difficulté rencontrée à extruder l'hybride PCL-bioverre à travers une buse de 400 µm peut être expliquée par les forces de frottement, la dilatation thermique de la matière fondue et la

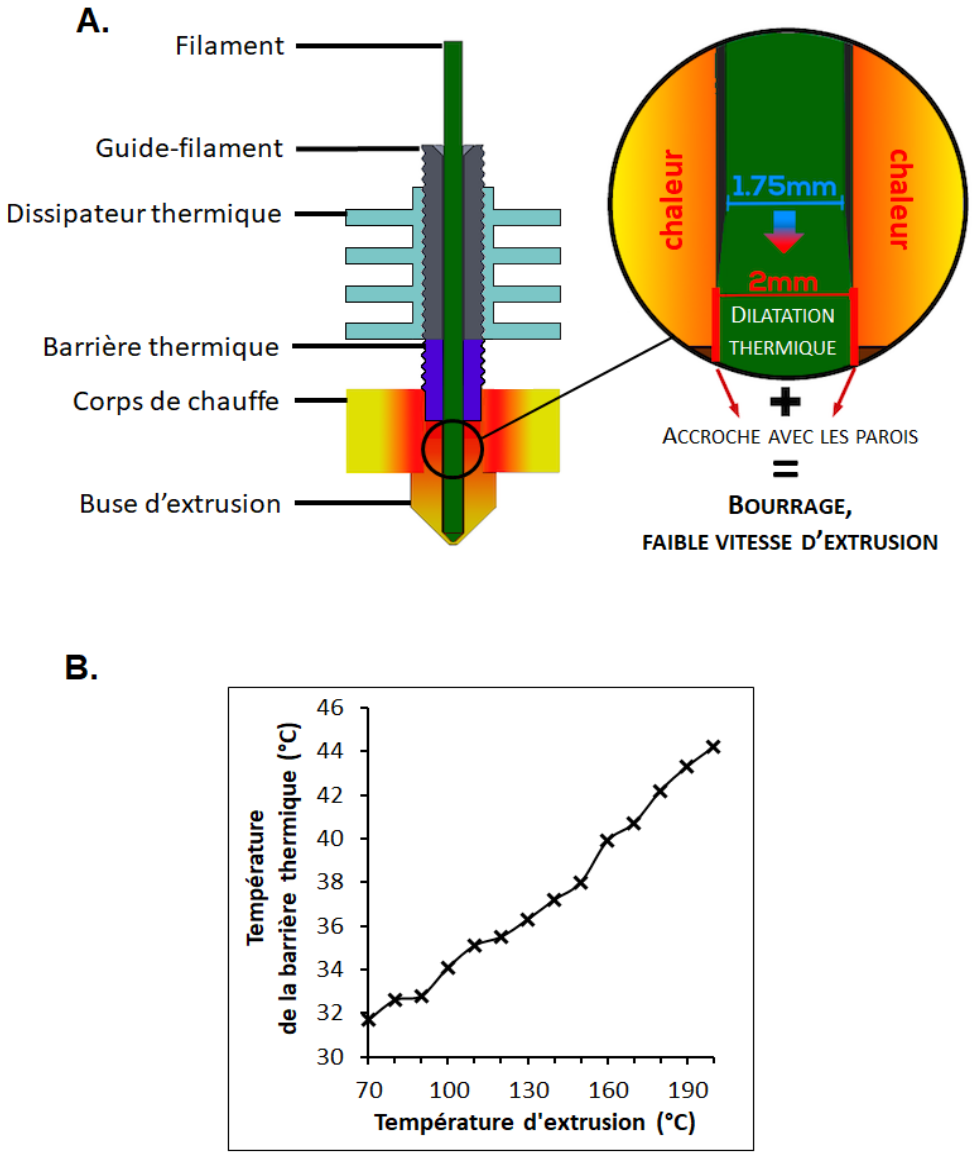


Figure 105. La dilatation thermique de la matière au niveau du corps de chauffe peut s'opposer à l'extrusion (A). Température au niveau de la barrière thermique en fonction de la température d'extrusion (B).

pression interne de l'extrémité chauffante [168]. Lorsque le fil arrive au niveau du corps de chauffe, il fond et se dilate, ce qui crée des forces de pression (**Figure 105-A**). De plus, la matière fondue vient coller aux parois. Ces deux phénomènes causent une résistance à la poussée du filament qui peut résulter en un bourrage de la buse. Dans notre imprimante, les tubes de guidage sont en polytétrafluoroéthylène (PTFE), ce qui permet de minimiser à la fois l'adhésion de la matière fondue et les frottements entre le fil et le guide-filament. La barrière thermique et le dissipateur thermique permettent d'évacuer la chaleur au plus près du corps de chauffe afin d'éviter que la matière ne fonde trop loin de la buse – un volume de matière fondue plus important se traduisant par une plus grande résistance à la poussée. La **Figure 105-B** montre que la température au niveau de la barrière thermique n'atteint pas les 45°C avec les températures d'extrusion qui nous intéressent. Ainsi, le bloc de refroidissement est efficace.

L'imprimante dont nous disposons paraît adaptée à la problématique de dilatation thermique et le bourrage de la buse semble plutôt lié au matériau utilisé. D'une part, le fil est artisanal et contient quelques défauts et irrégularités. Il est en outre relativement flexible comparé aux filaments

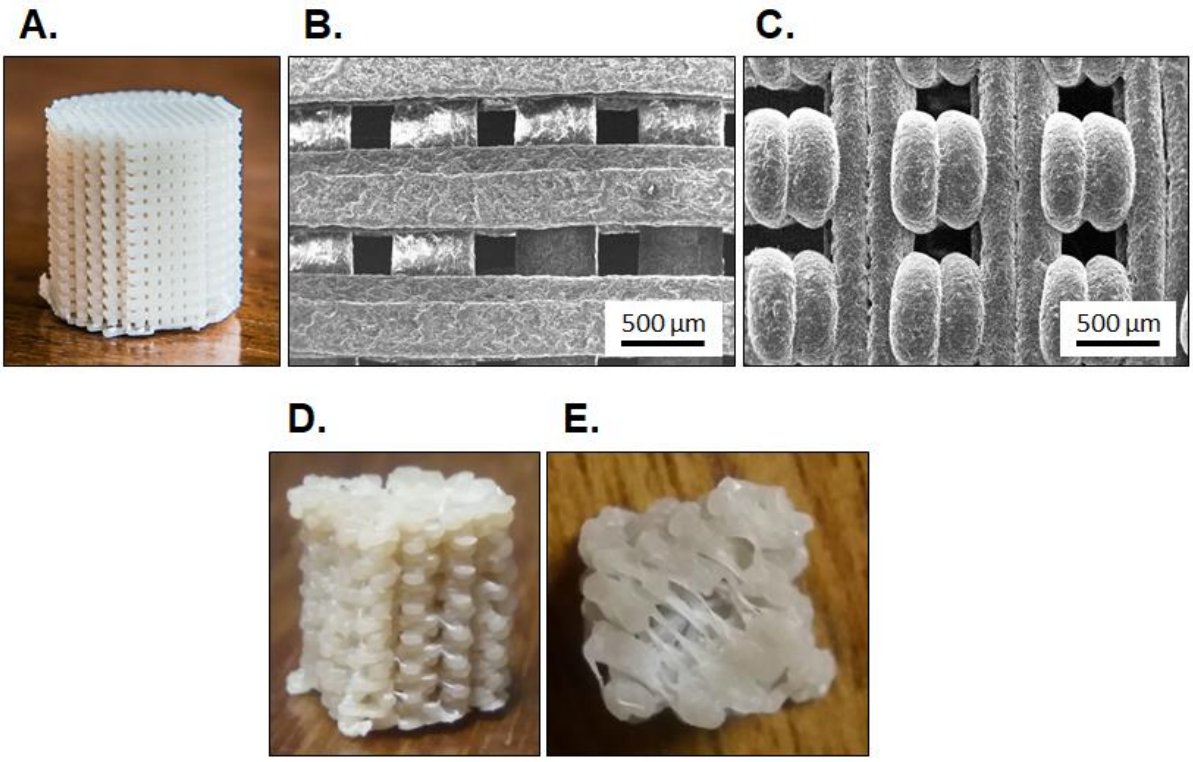


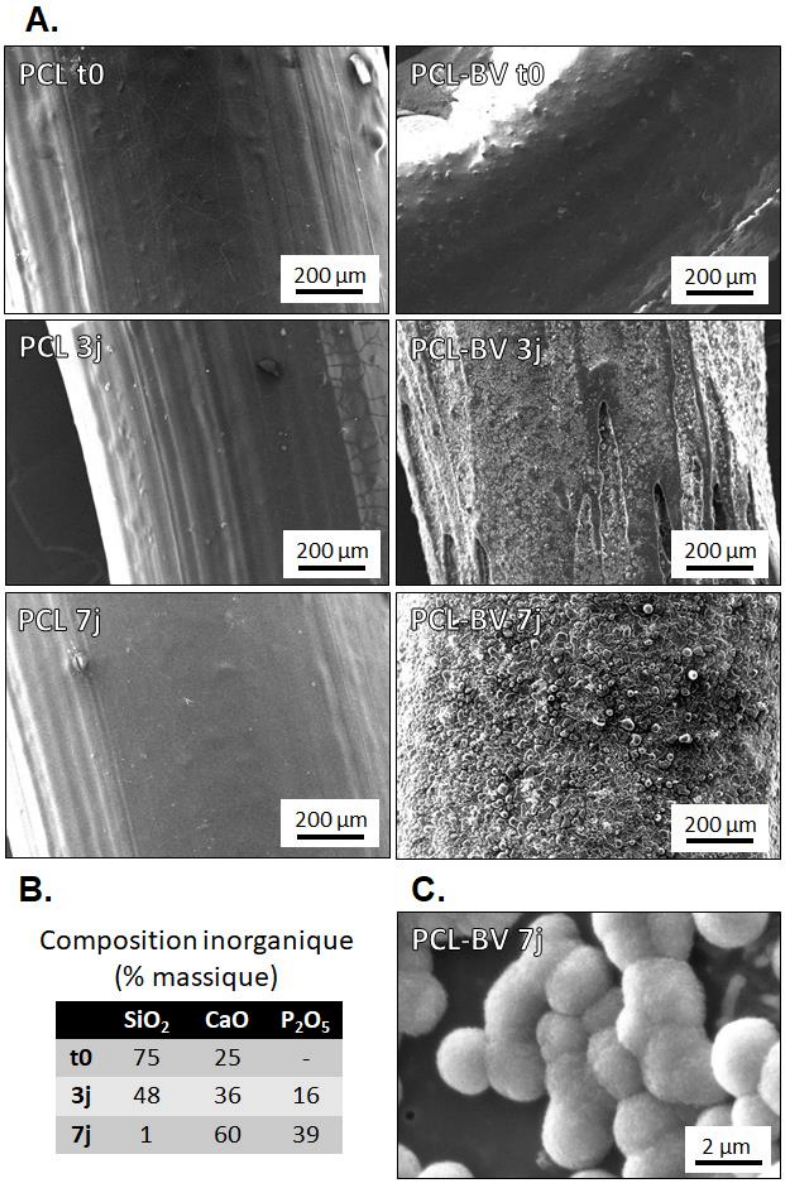
Figure 106. Photographie (A) et clichés MEB (B et C) d'un scaffold en PCL imprimé par FDM à 128°C avec une buse de 400 µm. Scaffold d'un hybride PCL-bioverre imprimé par FDM à 140°C avec une buse de 800 µm, vu de côté (D) et de dessus (E).

industriels. De ce fait, le fil hybride n'est pas forcément adéquat pour des forces de poussée élevées. D'autre part, l'hybride contient 30 % massique de bioverre. L'enchevêtrement des chaînes inorganiques avec les chaînes du polymère peut être défavorable à l'écoulement de l'hybride fondu. Le PCL pur est de fait peu sujet aux résistances à la poussée du filament, il est plus facilement extrudé et un scaffold peut alors être imprimé à 128°C (**Figure 106-A à C**). Le scaffold en PCL est d'une très bonne qualité, avec des barreaux de diamètre constant et une structure poreuse régulière. Il est identique au modèle dessiné par CAO, démontrant ainsi le potentiel de la fabrication additive à élaborer des structures à façon.

Pour finir, l'hybride PCL-bioverre est plus facilement extrudé à travers une buse de 800 µm et des scaffolds peuvent être imprimés à partir de 125°C (**Figure 106-D et E**). En effet, la pression interne causée par la dilatation thermique dépend grandement du diamètre de la buse [168]. Si en l'état l'extrusion de l'hybride semble compromise avec une buse de 400 µm, elle est tout à fait possible avec une buse de 800 µm. Comme illustré sur la **Figure 106-E**, la structure des scaffolds hybrides imprimés est irrégulière. En particulier, on constate un dépôt de matière important sur les pourtours du scaffold qui correspondent à des positions d'arrêt de la buse, et un dépôt de matière faible au centre du scaffold qui correspond à la « traversée » de la buse. Cela peut être dû à un déplacement trop rapide de la buse, à une extrusion trop lente – qui peut être accélérée en fluidifiant l'hybride à des températures plus élevées – ou à une mauvaise adhésion de la matière avec les couches sous-jacentes qui empêche le dépôt.

9.2.3 Bioactivité des scaffolds hybrides imprimés

La bioactivité de la matrice hybride imprimée a été évaluée *in vitro* par immersion dans le SBF (1 mL/mg) pendant 3 jours et 7 jours. Des précipités se forment en surface de l'hybride PCL-bioverre dès 3 jours d'immersion dans le SBF et ils couvrent entièrement la surface de l'hybride après 7 jours d'immersion (**Figure 107-A**). On constate en revanche que pour du PCL pur, l'état de surface n'évolue pas, la surface demeure lisse et aucun précipité n'est formé. D'après les analyses par EDX, les précipités recouvrant l'hybride sont des phosphates de calcium de composition voisine du minéral osseux (**Figure 107-B**) et leur forme en sphérulite est caractéristique d'une apatite (**Figure 107-C**). Ces résultats démontrent que le caractère bioactif du mélange hybride organique-inorganique demeure même après les deux extrusions subies au cours du procédé. Ceci laisse augurer d'un très bon comportement *in vivo* des matériaux hybrides PCL-bioverre obtenus par impression 3D.



	SiO_2	CaO	P_2O_5
t0	75	25	-
3j	48	36	16
7j	1	60	39

Figure 107. Évolution de l'état de surface de barreaux imprimés en PCL pur et en hybride PCL-bioverre (noté PCL-BV) au cours de l'interaction avec le SBF, vue au MEB (A). Évolution de la composition inorganique du barreau hybride PCL-bioverre au cours de l'interaction, déterminée par EDX (B). Cliché MEB des précipités formés en surface du barreau hybride après 7 jours d'immersion (C).

9.3 Conclusions et perspectives

L'impression du moule permet de faire varier la morphologie de la matrice hybride. Dans la partie 9.1, l'hybride PCL-bioverre a ainsi été élaboré avec des structures macroporeuses à mailles carrées. La taille des barreaux constituant ce maillage peut actuellement descendre à une centaine de micromètres. À terme, nous avons pour ambition d'imprimer directement le scaffold hybride, un procédé qui conduit à une structure plus fidèle au modèle, plus régulière et plus reproductible par rapport à l'utilisation d'une empreinte sacrificielle. Dans la partie 9.2, des scaffolds ont été imprimés avec une buse de 800 µm à partir d'un fil hybride qui a été préalablement fabriqué par extrusion. Il s'agit là de premiers prototypes et des travaux supplémentaires sont requis dans le but d'améliorer le rendu final. En l'état actuel, il n'est pas possible d'imprimer un scaffold hybride PCL-bioverre avec une buse de 400 µm à partir d'un fil. De plus, les matrices hybrides obtenues avec une buse de 800 µm sont bien trop grossières pour le comblement osseux étant donné que l'on souhaite des pores de 250 à 600 µm et des barreaux de 100 à 250 µm [67].

Une solution consiste à imprimer le scaffold à partir de granules hybrides et non à partir d'un fil. Cette méthode permet d'appliquer des forces de compression plus importantes en vue d'extruder l'hybride à travers une buse de 400 µm voire 250 µm. Elle est d'ailleurs fréquemment employée pour l'impression de scaffolds en PCL pur [169-172]. Deux dispositifs existent pour ce type d'imprimante : soit la matière est entraînée par une vis sans fin [169, 170], soit elle est comprimée par un système de pousse-seringue à poussée pneumatique ou mécanique [171, 172]. La conception de ces dispositifs a fait l'objet d'un projet étudiant à l'école d'ingénieurs Polytech de Clermont-Ferrand [173]. Les étudiants sont parvenus à extruder l'hybride PCL-bioverre à travers une buse de 400 µm à 85°C avec un système de pousse-seringue développé par leur soin (**Figure 108**).

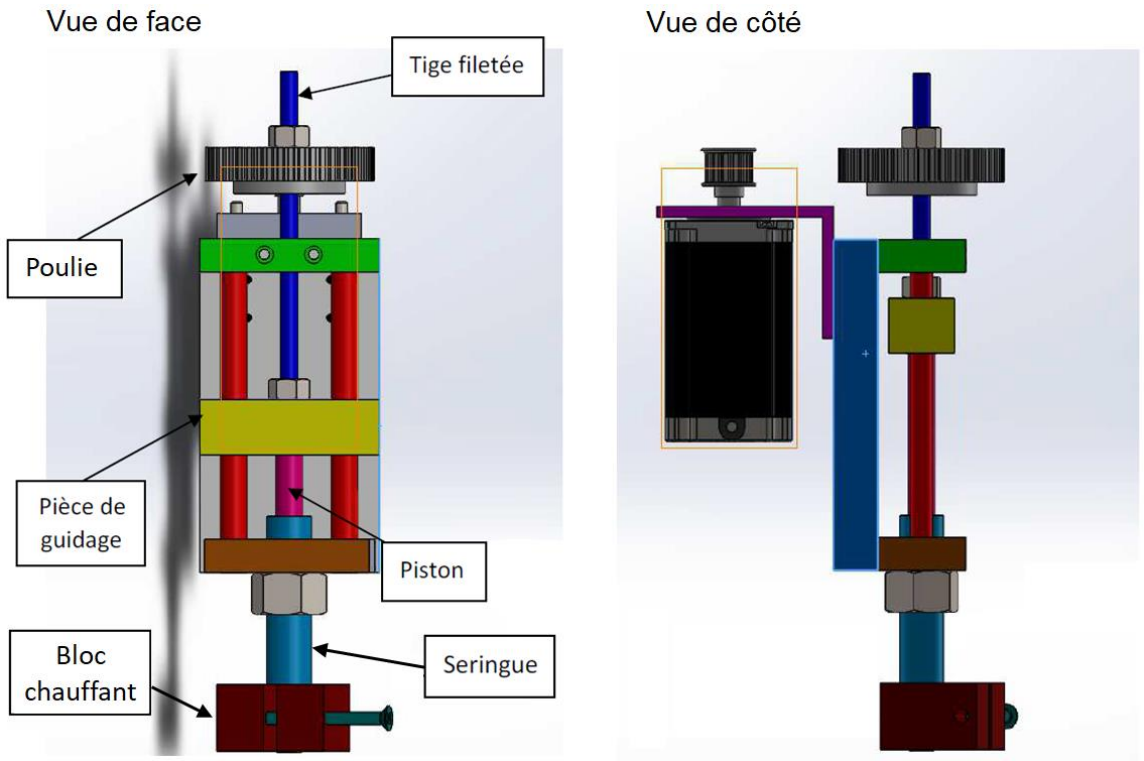


Figure 108. Représentation schématique du système d'extrusion par pousse-seringue développé à Polytech Clermont-Ferrand.

Brièvement, le moteur fait tourner les poulies qui entraînent une tige filetée en rotation. L'écrou présent sur la pièce de guidage transforme ensuite le mouvement de rotation en translation, poussant finalement le piston dans la seringue. Les granules hybrides contenus dans la seringue et préalablement fondus sont alors comprimés et extrudés à travers la buse de 400 µm. Malgré des résultats encourageants, le prototype est volumineux et pèse plus de 5 kilogrammes. Par conséquent, il n'est pas possible de l'intégrer dans un dispositif de déplacement de précision (les imprimantes 3D ont des résolutions axiales allant généralement de 1 à 30 µm [174, 175]) et il n'est pas adapté à l'impression 3D. Toutefois, ce projet a permis de démontrer le potentiel du système de pousse-seringue, susceptible d'être miniaturisé à l'avenir.

L'équipe a obtenue en 2017 un financement (région/FEDER, projet « BIOSTEON ») qui permettra l'acquisition d'une bio-imprimante à extrusion mécanique ou pneumatique qui répond à nos besoins actuels, permettant d'extruder directement à partir de granules hybrides. Des échantillons ont été envoyés à différents constructeurs d'imprimantes 3D et nous avons d'ores et déjà un retour positif de la part de CELLINK qui a pu extruder une première couche de l'hybride avec leur imprimante BIO X [176] (**Figure 109**). D'autres techniques de fabrication additive pourront être envisagées, comme l'extrusion directement à partir de la solution hybride. Avec cette technique, il n'est pas nécessaire de préparer des granules, ce qui écourte le procédé de fabrication des scaffolds. À l'image des récents travaux de Tallia *et al*. [177], l'idée est de produire une solution hybride suffisamment stable pour qu'elle ne gélifie pas dans la seringue, mais lors de son extrusion par suite de l'évaporation des solvants ; la solution est donc utilisée comme une « encre » pour l'impression de matrices hybrides.

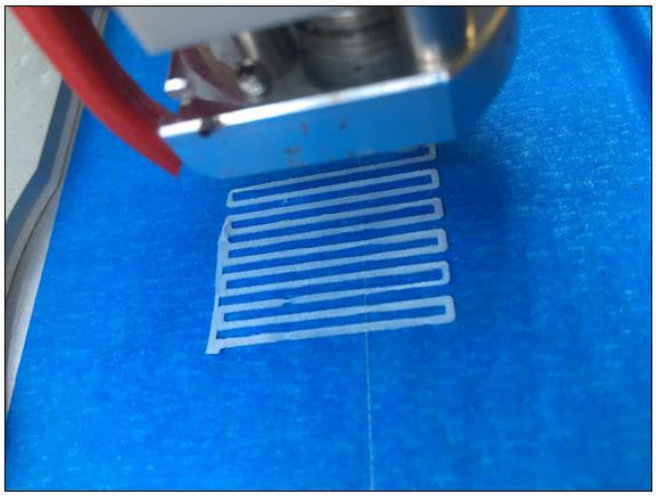


Figure 109. Essai d'impression de l'hybride PCL-bioverre à partir de granules avec l'imprimante BIO X de CELLINK.

Conclusions générales et perspectives

La thématique des hybrides organominéraux fait suite à plus de dix années de recherche au sein du groupe Biomatériaux du LPC, au cours desquelles ont été étudiés les bioverres élaborés par fusion, par chimie sol-gel et les composites polymère-bioverre. Ces progrès sont le fruit de collaborations par essence pluridisciplinaire, associant les compétences de physiciens, chimistes et biologistes comme illustré dans cette thèse. L'évolution de notre recherche vers des matériaux mixtes organique-inorganique traduit le besoin de mettre au point un substitut osseux capable de se lier intimement aux tissus hôtes et de stimuler la repousse osseuse tout en résistant aux charges cycliques physiologiques. C'était l'objet de la thèse que de développer un hybride polymère-bioverre répondant à ce cahier des charges.

Il s'agissait d'abord de choisir un polymère. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les travaux précédant la thèse et en particulier sur les performances *in vivo* de différents hybrides implantés sous forme de granules dans le condyle fémoral de rats lors du projet de maturation. Nous avons également élaboré un hybride à base de collagène hydrolysé, une protéine dont l'effet ostéogénique avait été prouvé par l'INRA. Finalement le polycaprolactone (PCL) a été sélectionné, notamment pour la dégradation lente *in vivo* et les propriétés mécaniques de l'hybride correspondant.

L'étape suivante consistait à optimiser la synthèse de matrices tridimensionnelles d'un hybride PCL-bioverre. Dans un premier temps, nous avons perfectionné la compréhension des modalités d'insertion des ions alcalino-terreux au sein de ces matériaux au cours du procédé sol-gel ; le mécanisme proposé a ainsi permis l'emploi de nouveaux précurseurs chimiques aux propriétés supérieures et à bas coût qui sont une avancée importante dans la maîtrise des synthèses et leur reproductibilité. Notamment, le calcium peut désormais être incorporé au réseau silicate avec le précurseur hydroxyde ; il s'agit là d'une découverte substantielle sachant que l'incorporation du calcium constitue un verrou technologique majeur dans le domaine des hybrides à base de bioverre. Dans un second temps, nous avons optimisé la structure macroporeuse de la matrice hybride. Le procédé de fabrication, qui consiste à générer la porosité *via* une empreinte sacrificielle, permet d'adapter la structure (taille des pores et des interconnexions, gradient de porosité, structure mixte dense-poreuse) en fonction de l'application visée. Nous avons déterminé par des essais cellulaires que des pores de 400 à 600 µm et des interconnexions d'environ 200 µm étaient optimaux pour notre matériau hybride, avec un caractère ostéogénique plus avéré comparé aux autres structures étudiées. Enfin, nous avons étudié l'influence du ratio organique-inorganique, à la suite de quoi la composition massique 70 % PCL - 30 % bioverre est apparue comme la plus adaptée vis-à-vis de l'homogénéité de l'hybride, de ses propriétés mécaniques et de sa capacité à induire la formation d'apatite biomimétique.

Après avoir optimisé la synthèse des scaffolds hybrides PCL-bioverre, nous les avons caractérisés extensivement, autant sur le plan physico-chimique que sur le plan biologique. Le caractère bioactif de l'hybride a été évalué finement *in vitro* grâce à de nombreuses techniques telles que le MEB, l'ICP-AES, la PIXE, la DRX et la spectroscopie IR. L'apatite précipite préférentiellement dans la microporosité contenue dans les murs du scaffold et ne se limite pas à la surface du matériau

puisque, contrairement aux bioverres élaborés par fusion, la formation d'apatite s'étend au cœur du matériau et l'hybride a entièrement minéralisé après 3 jours d'immersion dans le SBF. De plus, les ions calcium et silicium issus de la dissolution du bioverre sont relargués à une vitesse appropriée *in vitro* qui permet de stimuler la différenciation des ostéoblastes. Ce potentiel ostéogénique de l'hybride est soutenu par une étude animale dans la calvaria de souris : après 3 mois d'implantation, l'hybride implanté dans un défaut de taille critique est envahi de tissus osseux néoformés, vascularisés et en cours de remodelage, alors que l'os trabéculaire d'origine bovine et le défaut vide (témoin) ne permettent pas l'ostéogénèse. L'hybride PCL-bioverre apparaît donc comme un substitut osseux prometteur, associant la bioactivité et l'ostéostimulation des bioverres à la ductilité et à la dégradation lente du PCL. Ce matériau hybride est protégé par 2 demandes de brevet qui ont fait l'objet d'une licence d'exploitation signée en septembre 2018 par la société OST Développement. Ce contrat de licence a donné lieu à un projet de transfert technologique financé par la région Auvergne-Rhône-Alpes et par la société OST Développement. Il démarre mi-octobre 2018 et a pour objectif d'adapter le procédé d'élaboration des scaffolds hybrides PCL-bioverre à l'échelle industrielle.

Pour finir, nous avons tenté d'améliorer encore les propriétés de l'hybride. Un des avantages du procédé de synthèse par voie sol-gel de l'hybride est qu'il permet l'ajout de dopants de nature inorganique ou organique. Nous avons exploité cet atout en incorporant des éléments thérapeutiques au sein de l'hybride afin d'augmenter son potentiel ostéogénique. Nous avons ainsi réalisé un dopage inorganique en strontium. L'hybride résultant a des caractéristiques physico-chimiques identiques à l'hybride non-dopé et ses propriétés biologiques sont actuellement évaluées (étude animale en cours dans la calvaria de souris). Nous avons également réalisé des dopages organiques en fisétine et en hydroxytyrosol, qui se traduisent par une différenciation des ostéoblastes plus importante *in vitro* relativement à l'hybride non-dopé. Ces résultats prometteurs ont conduit au dépôt d'une demande de brevet (octobre 2018) sur le dopage organique des hybrides. Le potentiel ostéogénique des hybrides dopés en fisétine ou en hydroxytyrosol est à confirmer par une étude animale qui est en cours (calvaria de souris) et qui sera présentée dans la thèse d'Henri Granel. Ici, nous nous sommes concentrés sur l'ajout d'éléments ostéogéniques afin d'augmenter le caractère ostéogénique de l'hybride, mais il serait intéressant d'étudier d'autres dopages en vue d'améliorer ou d'introduire des propriétés antibactériennes, angiogéniques pour la néovascularisation ou chondrogéniques pour la réparation du cartilage.

Le deuxième aspect que nous avons tenté d'aborder est la souplesse des scaffolds hybrides PCL-bioverre. Bien que l'élasticité des scaffolds permette une déformation réversible appréciée des praticiens, leur faible rigidité interdit leur implantation dans des sites exposés à des chocs extérieurs comme la calvaria. Compte tenu des performances excellentes de l'hybride dans la calvaria de souris, il nous est paru intéressant de renforcer ses propriétés mécaniques. Nous avons d'abord exploité les propriétés viscoélastiques du PCL qui facilitent son mélange à d'autres polymères. Des scaffolds d'un hybride à base de PCL et de poly(acide D,L-lactique), un polymère plus rigide, ont été fabriqués. Ils sont légèrement plus rigides que les scaffolds hybrides PCL-bioverre, ce qui facilite leur manipulation, mais ils demeurent bien inférieurs à l'os trabéculaire humain en termes de propriétés mécaniques. Nous avons ensuite tenté d'établir des liaisons chimiques covalentes entre les chaînes de bioverre et les chaînes de PCL (hybride de classe II). Nous avons commencé à étudier la silanisation du PCL en essayant de greffer des molécules de type organo-alcoxysilane par addition radicalaire (photo-oxydation) ou par substitution nucléophile, mais des travaux supplémentaires sont requis.

Dans la dernière partie de la thèse, nous nous sommes penchés sur l'élaboration de scaffolds hybrides PCL-bioverre au moyen de différentes techniques d'impression 3D, le but étant de simplifier le procédé de fabrication des scaffolds et de pouvoir créer de nouvelles structures macroporeuses. Nous avons en premier lieu substitué l'empilement de billes par une matrice imprimée en 3D en tant qu'empreinte polymérique sacrificielle. Nous avons ainsi obtenu des scaffolds hybrides à mailles carrées, et on peut désormais imaginer la création de structures plus complexes. Des essais de bioactivité *in vitro* ont révélé la minéralisation complète de l'hybride, et ce malgré des barreaux épais de plus de 100 µm. En second lieu, nous avons tenté d'imprimer directement les scaffolds à partir de fil hybride préalablement fabriqué. La bioactivité semble conservée même après les deux étapes d'extrusion de l'hybride (fabrication du fil puis impression), mais le matériau est difficilement extrudé à travers une buse de 400 µm, ce qui limite fortement le potentiel de cette technique d'impression. Nous avons alors établi que l'utilisation d'un fil hybride n'était pas adaptée à notre matériau et qu'il était plus judicieux d'imprimer à partir de granules hybrides. Le projet étudiant à l'école d'ingénieurs Polytech de Clermont-Ferrand a permis de confirmer la puissance de l'impression 3D à partir de granules, l'hybride ayant été extrudé à travers une buse de 400 µm sans résistance apparente. Les travaux initiés dans cette thèse pavent donc la voie à l'impression 3D directe de scaffolds hybrides PCL-bioverre, renforçant l'attractivité de ces matériaux, et pourront servir de socle solide à la poursuite de cette thématique au sein du laboratoire.

Production scientifique

- **Publication :**

  C. Bossard, H. Granel, E. Jallot, C. Vial, H. Tiainen, Y. Wittrant, J. Lao

  "Polycaprolactone / bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration"

  Biomedical Glasses **2018** 4:108-122 (15 pages)

- **Brevet :**

  C. Bossard, H. Granel, J. Lao, Y. Wittrant, E. Jallot

  "Implant à porosité contrôlée en un matériau hybride dopé en nutriment ostéoinducteur"

  Déposé le 15 novembre 2018, financé par la SATT Grand Centre.

- **Participation à des congrès internationaux :**

  "ESB : European Society for Biomaterials" du 9 au 13 septembre 2018 à Maastricht, Pays-Bas

  Communication par affiche intitulée "Polycaprolactone / bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration"

  "Bioceramics 29" du 25 au 27 octobre 2017 à Toulouse, France

  Communication orale de 15 minutes intitulée "Polycaprolactone / bioactive glass hybrid scaffolds for bone regeneration"

- **Actions de communication scientifique :**

  Le 9 mai 2017 : présentation des travaux de thèse (15 minutes) à une association étudiante Lie'Utopie, dans le cadre de l'activité « Présente ta thèse »

  Le 14 février 2017 : présentation des travaux de thèse (2 fois 15 minutes) à des classes de premières et de terminales au lycée polyvalent Jean Monnet à Yzeure, dans le cadre du module de l'école doctorale EDSF intitulé « Échanges Doctorants-Lycéens »

Bibliographie

[1] D.F. Williams,

Definitions in biomaterials, 2nd Consensus Meeting, European Society of Biomaterials, Chester, UK, 1991.

[2] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, . . . F. Schué,

Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012),

Pure Appl. Chem. 84(2), 377, 2012.

[3] C. Isabelle,

Biologie du remodelage osseux,

Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique 28(2), 57-65, 2004.

[4] D. Chappard,

Modelage et remodelage au cours de l'ostéo-intégration,

Revue de Stomatologie, de Chirurgie Maxillo-faciale et de Chirurgie Orale 114(3), 159-165, 2013.

[5] L.C. Gerstenfeld, D.M. Cullinane, G.L. Barnes, D.T. Graves, T.A. Einhorn,

Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation,

J. Cell. Biochem. 88(5), 873-884, 2003.

[6] T. Albrektsson, C. Johansson,

Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,

Eur. Spine J. 10(2), S96-S101, 2001.

[7] A. Kinaci, V. Neuhaus, D. Ring,

Trends in bone graft use in the United States,

2014.

[8] H. Dressmann,

Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens,

Beiträge Zur Klinischen Chirurgie 9, 804–810, 1892.

[9] C. Laurencin, Y. Khan, S.F. El-Amin,

Bone graft substitutes,

Expert Rev. Med. Devices 3(1), 49-57, 2006.

[10] G. Chaushu, O. Mardinger, M. Peleg, O. Ghelfan, J. Nissan,

Analysis of Complications Following Augmentation With Cancellous Block Allografts,

J. Periodontol. 81(12), 1759-1764, 2010.

[11] A. Sakkas, F. Wilde, M. Heufelder, K. Winter, A. Schramm,

Autogenous bone grafts in oral implantology—is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures,

International Journal of Implant Dentistry 3, 23, 2017.

[12] R. Moore William, E. Graves Stephen, I. Bain Gregory,

Synthetic bone graft substitutes,

ANZ J. Surg. 71(6), 354-361, 2003.

[13] L.L. Hench, H.A. Paschall,

Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle,

J. Biomed. Mater. Res. 7(3), 25-42, 1973.

[14] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak,

Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution,

J. Biomed. Mater. Res. 55(2), 151-157, 2001.

[15] L.L. Hench, D. Greenspan,

Interactions between bioactive glass and collagen: a review and new perspectives,

Journal of The Australian Ceramic Society 49(2), 1-40, 2013.

[16] P. Saravanapavan, J.R. Jones, R.S. Pryce, L.L. Hench,

Bioactivity of gel–glass powders in the CaO-SiO2 system: a comparison with ternary (CaO-P2P5-SiO2) and quaternary glasses (SiO2-CaO-P2O5-Na2O),

Journal of Biomedical Materials Research Part A 66A(1), 110-119, 2003.

[17] L. Hench Larry,
Bioceramics: from concept to clinic,
J. Am. Ceram. Soc. 74(7), 1487-1510, 1991.

[18] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench,
An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing,
J. Appl. Biomater. 2(4), 231-239, 1991.

[19] J. Livage, M. Henry, C. Sanchez,
Sol-gel chemistry of transition metal oxides,
Prog. Solid State Chem. 18(4), 259-341, 1988.

[20] P. Sepulveda, R. Jones Julian, L. Hench Larry,
Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel–derived 58S bioactive glasses,
J. Biomed. Mater. Res. 58(6), 734-740, 2002.

[21] M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, Antonio J. Salinas,
Glasses with medical applications,
Eur. J. Inorg. Chem. 2003(6), 1029-1042, 2003.

[22] J. Lao, J.-M. Nedelec,
Verres bioactifs,
Techniques de l'ingénieur base documentaire : TIB573DUO(ref. article : n4955), 2014.

[23] J.R. Jones,
Review of bioactive glass: from Hench to hybrids,
Acta Biomater. 9(1), 4457-4486, 2013.

[24] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay,
Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,
Trends Biotechnol. 30(10), 546-554, 2012.

[25] A. R Vaccaro,

The role of osteoconductive scaffold in synthetic bone graft,

2002.

[26] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench,

Bioactive sol-gel foams for tissue repair,

J. Biomed. Mater. Res. 59(2), 340-348, 2002.

[27] J. Lacroix,

Sol-gel synthesis of macroporous scaffolds based on bioactive glasses for bone tissue engineering. Micro-PIXE characterization of their in vitro and in vivo reactivity, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013.

[28] X. Wang, X. Li, A. Ito, Y. Sogo,

Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO–MO–SiO2–P2O5 (M=Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds,

Acta Biomater. 7(10), 3638-3644, 2011.

[29] P. Yan, J. Wang, J. Ou, Z. Li, Z. Lei, S. Yang,

Synthesis and characterization of three-dimensional ordered mesoporous–macroporous bioactive glass,

Mater. Lett. 64(22), 2544-2547, 2010.

[30] Q. Fu, E. Saiz, A.P. Tomsia,

Bioinspired Strong and Highly Porous Glass Scaffolds,

Adv. Funct. Mater. 21(6), 1058-1063, 2011.

[31] Q. Fu, E. Saiz, A.P. Tomsia,

Direct Ink Writing of Highly Porous and Strong Glass Scaffolds for Load-bearing Bone Defects Repair and Regeneration,

Acta Biomater. 7(10), 3547-3554, 2011.

[32] Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia,

Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives,

Materials Science and Engineering: C 31(7), 1245-1256, 2011.

[33] J. Duan, Y. Yu, Y. Li, Y. Yu, Y. Li, X. Zhou, . . . Z. Sun,

Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint,

PLoS One 8(4), e62087, 2013.

[34] P. Guidi, M. Nigro, M. Bernardeschi, V. Scarcelli, P. Lucchesi, B. Onida, . . . G. Frenzilli,

Genotoxicity of amorphous silica particles with different structure and dimension in human and murine cell lines,

Mutagenesis 28(2), 171-180, 2013.

[35] K. Zhang, Y. Wang, M.A. Hillmyer, L.F. Francis,

Processing and properties of porous poly(l-lactide)/bioactive glass composites,

Biomaterials 25(13), 2489-2500, 2004.

[36] A. Liu, Z. Hong, X. Zhuang, X. Chen, Y. Cui, Y. Liu, X. Jing,

Surface modification of bioactive glass nanoparticles and the mechanical and biological properties of poly(l-lactide) composites,

Acta Biomater. 4(4), 1005-1015, 2008.

[37] C.J. Brinker, G.W. Scherer,

Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing, Academic press1990.

[38] B.M. Novak,

Hybrid Nanocomposite Materials—between inorganic glasses and organic polymers,

Adv. Mater. 5(6), 422-433, 1993.

[39] O. Mahony, O. Tsigkou, C. Ionescu, C. Minelli, L. Ling, R. Hanly, . . . J.R. Jones,

Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and mechanical properties for tissue regeneration,

Adv. Funct. Mater. 20(22), 3835-3845, 2010.

[40] L. Gabrielli, L. Connell, L. Russo, J. Jimenez-Barbero, F. Nicotra, L. Cipolla, J.R. Jones,

Exploring GPTMS reactivity against simple nucleophiles: chemistry beyond hybrid materials fabrication,

RSC Advances 4(4), 1841-1848, 2013.

[41] L. Gabrielli, L. Russo, A. Poveda, J.R. Jones, F. Nicotra, J. Jiménez-Barbero, L. Cipolla,

Epoxide opening versus silica condensation during sol–gel hybrid biomaterial synthesis,

Chemistry – A European Journal 19(24), 7856-7864, 2013.

[42] D. Wang, F. Romer, L. Connell, C. Walter, E. Saiz, S. Yue, . . . J.R. Jones,

Highly flexible silica/chitosan hybrid scaffolds with oriented pores for tissue regeneration,

J. Mater. Chem. B 3(38), 7560-7576, 2015.

[43] S.-H. Rhee,

Bone-like apatite-forming ability and mechanical properties of PCL/silica hybrid as a function of PCL content,

Biomaterials 25(7-8), 1167-1175, 2004.

[44] A. Li, H. Shen, H. Ren, C. Wang, D. Wu, R.A. Martin, D. Qiu,

Bioactive organic/inorganic hybrids with improved mechanical performance,

J. Mater. Chem. B 3(7), 1379-1390, 2015.

[45] D. Mondal, S.J. Dixon, K. Mequanint, A.S. Rizkalla,

Mechanically-competent and cytocompatible polycaprolactone-borophosphosilicate hybrid biomaterials,

J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 75, 180-189, 2017.

[46] A.L.B. Macon, S.J. Page, J.J. Chung, N. Amdursky, M.M. Stevens, J.V.M. Weaver, . . . J.R. Jones,

A structural and physical study of sol-gel methacrylate-silica hybrids: intermolecular spacing dictates the mechanical properties,

Phys. Chem. Chem. Phys. 17(43), 29124-29133, 2015.

[47] B. Yu, C.A. Turdean-Ionescu, R.A. Martin, R.J. Newport, J.V. Hanna, M.E. Smith, J.R. Jones,

Effect of calcium source on structure and properties of sol-gel derived bioactive glasses,

Langmuir 28(50), 17465-17476, 2012.

[48] O. Mahony, S. Yue, C. Turdean-Ionescu, J.V. Hanna, M.E. Smith, P.D. Lee, J.R. Jones,

Silica–gelatin hybrids for tissue regeneration: inter-relationships between the process variables,

J. Sol-Gel Sci. Technol. 69(2), 288-298, 2013.

[49] L.S. Connell, F. Romer, M. Suarez, E.M. Valliant, Z. Zhang, P.D. Lee, . . . J.R. Jones,

Chemical characterisation and fabrication of chitosan-silica hybrid scaffolds with 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane,

J. Mater. Chem. B 2(6), 668-680, 2014.

[50] Y. Ding, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, D.W. Schubert,

Fabrication of electrospun poly (3-hydroxybutyrate)/poly (e-caprolactone)/silica hybrid fibermats with and without calcium addition,

Eur. Polym. J. 55, 222-234, 2014.

[51] A.R.P.d. Silva, T.L. Macedo, D.J. Coletta, S. Feldman, M.d.M. Pereira,

Synthesis, characterization and cytotoxicity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Bioactive Glass hybrid scaffolds obtained by lyophilization,

Matéria (Rio de Janeiro) 21, 964-973, 2016.

[52] G. Poologasundarampillai, B. Yu, O. Tsigkou, D. Wang, F. Romer, V. Bhakhri, . . . J.R. Jones,

PGA/silica hybrids with calcium incorporated in the silica network by use of a calcium alkoxide precursor,

Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany) 20(26), 8149-8160, 2014.

[53] G. Poologasundarampillai, B. Yu, J.R. Jones, T. Kasuga,

Electrospun silica/PLLA hybrid materials for skeletal regeneration,

Soft Matter 7(21), 10241-10251, 2011.

[54] J. Lao, J. Lacroix, E. Jallot, X. Dieudonné,

Implant with controlled porosity made of a hybrid material, WO/2014/195863, 2014.

[55] J. Lao, E. Jallot, X. Dieudonné,

Hybrid material implant having variable porosity, WO/2016/051326, 2016.

[56] S. Padilla, J. Román, A. Carenas, M. Vallet-Regí,

The influence of the phosphorus content on the bioactivity of sol–gel glass ceramics,

Biomaterials 26(5), 475-483, 2005.

[57] P. Saravanapavan, R. Jones Julian, S. Pryce Russell, L. Hench Larry,

Bioactivity of gel–glass powders in the CaO-SiO2 system: A comparison with ternary (CaO-P2P5-SiO2) and quaternary glasses (SiO2-CaO-P2O5-Na2O),

Journal of Biomedical Materials Research Part A 66A(1), 110-119, 2003.

[58] A. Martinez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regi,

Bioactivity of a CaO-SiO2 binary glasses system,

Chem. Mater. 12(10), 3080-3088, 2000.

[59] J. Isaac, J. Nohra, J. Lao, E. Jallot, J.-M. Nedelec, A. Berdal, J.-M. Sautier,

Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells,

eCells and Materials Journal 21, 130-143, 2011.

[60] J. Lao, J. Lacroix, J. Nohra, N. Naaman, J.M. Sautier, E. Jallot,

Chemical imaging of the reconstruction of new bone and trace elements inside bioactive glass scaffolds in vivo: a multimodal and quantitative micro-ion beam analysis,

Surf. Interface Anal. 46(10-11), 702-706, 2014.

[61] B. Yu, G. Poologasundarampillai, C.A. Turdean-Ionescu, M.E. Smith, J.R. Jones,

A new calcium source for bioactive sol-gel hybrids,

Bioceramics Development and Applications 1, 1-3, 2011.

[62] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench,

Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro,

J. Biomed. Mater. Res. 28(6), 693-698, 1994.

[63] X. Dieudonne, V. Montouillout, E. Jallot, F. Fayon, J. Lao,

Bioactive glass hybrids: a simple route towards the gelatin-SiO2-CaO system,

Chem. Commun. 50(63), 8701-8704, 2014.

[64] J. Lao, X. Dieudonne, F. Fayon, V. Montouillout, E. Jallot,

Bioactive glass-gelatin hybrids: building scaffolds with enhanced calcium incorporation and controlled porosity for bone regeneration,

J. Mater. Chem. B 4(14), 2486-2497, 2016.

[65] M. Descamps, T. Duhoo, F. Monchau, J. Lu, P. Hardouin, J.-C. Hornez, A. Leriche,

Manufacture of macroporous ??-tricalcium phosphate bioceramics,

2008.

[66] S.F. Hulbert, S.J. Morrison, J.J. Klawitter,

Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures,

J. Biomed. Mater. Res. 6(5), 347-374, 1972.

[67] V. Karageorgiou, D. Kaplan,

Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,

Biomaterials 26(27), 5474-5491, 2005.

[68] M. Bohner, J. Lemaitre,

Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,

Biomaterials 30(12), 2175-2179, 2009.

[69] T. Kokubo, H. Takadama,

How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,

Biomaterials 27(15), 2907-2915, 2006.

[70] J. Lao,

Caractérisation par micro-faisceau d'ions des réactions physico-chimiques induites in vitro par des verres bioactifs nanostructurés élaborés par la méthode sol-gel, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007.

[71] J. Soulié,

Synthèse par voie sol-gel et réactivité in vitro de verres bioactifs dopés, mésostructurés et macrostructurés. Caractérisation par micro-faisceaux d'ions, 2010.

[72] G.C.Y. Chan, G.M. Hieftje,

Investigation of plasma-related matrix effects in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry caused by matrices with low second ionization potentials—identification of the secondary factor,

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 61(6), 642-659, 2006.

[73] M.M. Fraser, D. Beauchemin,

Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions,

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 55(11), 1705-1731, 2000.

[74] D.C. Gregoire,

The effect of easily ionizable concomitant elements on non-spectroscopic interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry,

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 42(7), 895-907, 1987.

[75] J.L. Venzie, R.K. Marcus,

Effects of easily ionizable elements on the liquid sampling–atmospheric pressure glow discharge,

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 61(6), 715-721, 2006.

[76] S.H. Tan, G. Horlick,

Matrix-effect observations in inductively coupled plasma mass spectrometry,

J. Anal. At. Spectrom. 2(8), 745-763, 1987.

[77] P. Berger, G. Revel,

Microsonde nucléaire Principe et appareillage,

Techniques de l'ingénieur Méthodes nucléaires d'analyse base documentaire : TIB389DUO(ref. article : p2563), 2005.

[78] D. Drouin, A.R. Couture, D. Joly, X. Tastet, V. Aimez, R. Gauvin,

CASINO V2.42 - A fast and easy-to-use modeling tool for scanning electron microscopy and microanalysis users,

Scanning 29(3), 92-101, 2007.

[79] J.F. Ziegler, M.D. Ziegler, J.P. Biersack,

SRIM - The stopping and range of ions in matter,

Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 268(11), 1818-1823, 2010.

[80] E. Jallot, O. Raissle, J. Soulie, J. Lao, G. Guibert, J.-M. Nedelec,

Quantitative chemical mapping of relevant trace elements at biomaterials/biological media interfaces by ion beam methods,

Adv. Eng. Mater. 12(7), B245-B255, 2010.

[81] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher,

The return of a forgotten polymer: polycaprolactone in the 21st century,

Prog. Polym. Sci. 35(10), 1217-1256, 2010.

[82] K. Schmidt-Bleek, H. Schell, N. Schulz, P. Hoff, C. Perka, F. Buttgereit, . . . G.N. Duda,

Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade,

Cell Tissue Res. 347(3), 567-573, 2012.

[83] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang,

Foreign body reaction to biomaterials,

Semin. Immunol. 20(2), 86-100, 2008.

[84] W. Lai, J. Garino, P. Ducheyne,

Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone,

Biomaterials 23(1), 213-217, 2002.

[85] A. Daneault, J. Prawitt, V. Fabien Soulé, V. Coxam, Y. Wittrant,

Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism,

Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57(9), 1922-1937, 2017.

[86] S. Sanwlani, P. Kumar, H.B. Bohidar,

Hydration of gelatin molecules in glycerol-water solvent and phase diagram of gelatin organogels,

The Journal of Physical Chemistry B 115(22), 7332-7340, 2011.

[87] J.-H. Song, H.-E. Kim, H.-W. Kim,

Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach,

J. Mater. Sci.: Mater. Med. 19(1), 95-102, 2008.

[88] M. Erencia, F. Cano, J.A. Tornero, M.M. Fernandes, T. Tzanov, J. Macanás, F. Carrillo,

Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity,

J. Appl. Polym. Sci. 132(25), n/a-n/a, 2015.

[89] T.H.C. Salles, C.B. Lombello, M.A. d'Ávila,

Electrospinning of gelatin/poly(vinyl pyrrolidone) blends from water/acetic acid solutions,

Materials Research 18(3), 509-518, 2015.

[90] E. Stathatos, P. Lianos, B. Orel, A.S. Vuk, R. Jese,

Study of acetic acid-catalyzed nanocomposite organic/inorganic ureasil sol–gel ionic conductors,

Langmuir 19(18), 7587-7591, 2003.

[91] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Shen,

Paraffin spheres as porogen to fabricate poly(L-lactic acid) scaffolds with improved cytocompatibility for cartilage tissue engineering,

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 67B(1), 610-617, 2003.

[92] D.M. Smith, G.W. Scherer, J.M. Anderson,

Shrinkage during drying of silica gel,

J. Non-Cryst. Solids 188(3), 191-206, 1995.

[93] R.C. Reid, J.M. Prausnitz, B.E. Poling,

The properties of gases and liquids, McGraw Hill Book Co.,New York, NY, United States, 1987.

[94] S. Nasrazadani, E. Eureste,

Application of FTIR for quantitative lime analysis, University of North Texas, 2008.

[95] M. Khachani, A. El Hamidi, M. Halim, S. Arsalane,

Non-isothermal kinetic and thermodynamic studies of the dehydroxylation process of synthetic calcium hydroxide Ca(OH) 2,

2014.

[96] A.E. Gash, T.M. Tillotson, J.H. Satcher Jr, L.W. Hrubesh, R.L. Simpson,

New sol-gel synthetic route to transition and main-group metal oxide aerogels using inorganic salt precursors,

J. Non-Cryst. Solids 285(1), 22-28, 2001.

[97] R.K. Iler,

The chemistry of silica,

J. Chem. Educ. 57(11), A324, 1980.

[98] S.L. Greasley, S.J. Page, S. Sirovica, S. Chen, R.A. Martin, A. Riveiro, . . . J.R. Jones,

Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium,

J. Colloid Interface Sci. 469, 213-223, 2016.

[99] S.-H. Wu, C.-Y. Mou, H.-P. Lin,

Synthesis of mesoporous silica nanoparticles,

Chem. Soc. Rev. 42(9), 3862-3875, 2013.

[100] M.S.A. Johnsson, G. H Nancollas,

The Role of Brushite and Octacalcium Phosphate in Apatite Formation,

1992.

[101] C. Drouet,

Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds,

BioMed Research International 2013, 12, 2013.

[102] H. Aguiar, J. Serra, P. González, B. León,

Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies,

J. Non-Cryst. Solids 355(8), 475-480, 2009.

[103] P. Innocenzi,

Infrared spectroscopy of sol–gel derived silica-based films: a spectra-microstructure overview,

J. Non-Cryst. Solids 316(2), 309-319, 2003.

[104] A.G. Kalampounias,

IR and Raman spectroscopic studies of sol-gel derived alkaline-earth silicate glasses,

Bull. Mater. Sci. 34(2), 299-303, 2011.

[105] J.R. Jones, P.D. Lee, L.L. Hench,

Hierarchical porous materials for tissue engineering,

Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 364(1838), 263, 2006.

[106] P. Lips, P. Courpron, P.J. Meunier,

Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: Changes with age,

Calcif. Tissue Res. 26(1), 13-17, 1978.

[107] L.J. Gibson,

Biomechanics of cellular solids,

J. Biomech. 38(3), 377-399, 2005.

[108] D.L. Kopperdahl, T.M. Keaveny,

Yield strain behavior of trabecular bone,

J. Biomech. 31(7), 601-608, 1998.

[109] I. Engelberg, J. Kohn,

Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study,

Biomaterials 12(3), 292-304, 1991.

[110] K. Van de Velde, P. Kiekens,

Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications,

Polym. Test. 21(4), 433-442, 2002.

[111] K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini,

Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,

Biomaterials 27(18), 3413-3431, 2006.

[112] A. Hoppe, B. Jokic, D. Janackovic, T. Fey, P. Greil, S. Romeis, . . . A.R. Boccaccini,

Cobalt-releasing 13-93 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications,

ACS Appl. Mater. Interfaces 6(4), 2865-2877, 2014.

[113] S.-B. Cho, K. Nakanishi, T. Kokubo, N. Soga, C. Ohtsuki, T. Nakamura,

Apatite formation on silica gel in simulated body fluid: Its dependence on structures of silica gels prepared in different media,

J. Biomed. Mater. Res. 33(3), 145-151, 1996.

[114] M.M. Pereira, L.L. Hench,

Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates,

J. Sol-Gel Sci. Technol. 7(1), 59-68, 1996.

[115] H. Takadama, H.-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Nakamura,

Mechanism of apatite formation induced by silanol groups,

2000.

[116] Y. Guo, Y. Zhou, D. Jia,

Fabrication of hydroxycarbonate apatite coatings with hierarchically porous structures,

Acta Biomater. 4(2), 334-342, 2008.

[117] S. Zou, D. Ireland, R.A. Brooks, N. Rushton, S. Best,

The effects of silicate ions on human osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation,

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 90B(1), 123-130, 2009.

[118] S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, . . . J. Tanaka,

The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture,

Biomaterials 26(23), 4847-4855, 2005.

[119] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak,

Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis,

Biochem. Biophys. Res. Commun. 276(2), 461-465, 2000.

[120] S. Midha, T.B. Kim, W. van den Bergh, P.D. Lee, J.R. Jones, C.A. Mitchell,

Preconditioned 70S30C bioactive glass foams promote osteogenesis in vivo,

Acta Biomater. 9(11), 9169-9182, 2013.

[121] D.J. Belton, O. Deschaume, C.C. Perry,

An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances,

The FEBS Journal 279(10), 1710-1720, 2012.

[122] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang,

The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant,

Biomaterials 27(9), 1735-1740, 2006.

[123] I. Allan, H. Newman, M. Wilson,

Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria,

Biomaterials 22(12), 1683-1687, 2001.

[124] R.O. Hynes,

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion,

Cell 69(1), 11-25, 1992.

[125] W. Jianhua, I. Toshio, O. Naoto, I. Takayasu, M. Takashi, L. Baolin, Y. Masao,

Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts,

Biomedical Materials 4(4), 045002, 2009.

[126] N. Olmo, Martı, x, A.I. n, A.J. Salinas, J. Turnay, . . . M.A. Lizarbe,

Bioactive sol–gel glasses with and without a hydroxycarbonate apatite layer as substrates for osteoblast cell adhesion and proliferation,

Biomaterials 24(20), 3383-3393, 2003.

[127] A. Zareidoost, M. Yousefpour, B. Ghaseme, A. Amanzadeh,

The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium,

J. Mater. Sci. Mater. Med. 23(6), 1479-1488, 2012.

[128] P.S. Gomes, M.H. Fernandes,

Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies,

Lab. Anim. 45(1), 14-24, 2011.

[129] E. Gentleman, Y.C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaiesh, M.D. O'Donnell, R.G. Hill, M.M. Stevens,

The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro,

Biomaterials 31(14), 3949-3956, 2010.

[130] J.P. Thawani, A.C. Wang, K.D. Than, C.-Y. Lin, F. La Marca, P. Park,

Bone morphogenetic proteins and cancer,

Neurosurgery 66(2), 233-246, 2010.

[131] J. Lao,

Du bioverre à l'hybride organo-minéral : élaboration de substituts osseux et caractérisation de la bioactivité par microsondes nucléaires,

Habilitation à diriger des recherches, Université Clermont Auvergne, Laboratoire de Physique de Clermont, 2017.

[132] S. Rokidi, P.G. Koutsoukos,

Crystal growth of calcium phosphates from aqueous solutions in the presence of strontium,

Chem. Eng. Sci. 77, 157-164, 2012.

[133] J. Lacroix, J. Lao, J.-M. Nedelec, E. Jallot,

Micro PIXE-RBS for the study of Sr release at bioactive glass scaffolds / biological medium interface,

Nuclear Instruments and Methods B 306, 153-157, 2013.

[134] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano,

Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals,

Inorg. Chim. Acta 360(3), 1009-1016, 2007.

[135] S.-W. Choi, Y.-J. Son, J.-M. Yun, S.H. Kim,

Fisetin inhibits osteoclast differentiation via downregulation of p38 and c-Fos-NFATc1 signaling pathways,

Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2012, 9, 2012.

[136] L. Léotoing, M.-J. Davicco, P. Lebecque, Y. Wittrant, V. Coxam,

The flavonoid fisetin promotes osteoblasts differentiation through Runx2 transcriptional activity,

Mol. Nutr. Food Res. 58(6), 1239-1248, 2014.

[137] L. Léotoing, F. Wauquier, J. Guicheux, E. Miot-Noirault, Y. Wittrant, V. Coxam,

The polyphenol fisetin protects bone by repressing NF-κB and MKP-1-dependent signaling pathways in osteoclasts,

PLoS One 8(7), e68388, 2013.

[138] K. Hagiwara, T. Goto, M. Araki, H. Miyazaki, H. Hagiwara,

Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss,

Eur. J. Pharmacol. 662(1), 78-84, 2011.

[139] E. Mével,

Utilisation des procyanidines et de l'hydroxytyrosol dans la prévention nutritionnelle de l'arthrose, 2015.

[140] V. Coxam, F. Wauquier, C. Darie, M. Spilmont, M.-J. Davicco, Y. Wittrant,

Huile d'olive et santé osseuse,

OCL 21(5), 2014.

[141] J. Anter, J.M. Quesada-Gómez, G. Dorado, A. Casado-Díaz,

Effect of hydroxytyrosol on human mesenchymal stromal/stem cell differentiation into adipocytes and osteoblasts,

Arch. Med. Res. 47(3), 162-171, 2016.

[142] Y. Cheng, Z. Qu, X. Fu, Q. Jiang, J. Fei,

Hydroxytyrosol contributes to cell proliferation and inhibits apoptosis in pulsed electromagnetic fields treated human umbilical vein endothelial cells in vitro,

Molecular Medicine Reports 16(6), 8826-8832, 2017.

[143] Y. Ding, W. Li, T. Müller, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, Q. Yao, J.A. Roether,

Electrospun polyhydroxybutyrate/poly(ε-caprolactone)/58S sol–gel bioactive glass hybrid scaffolds with highly improved osteogenic potential for bone tissue engineering,

ACS Appl. Mater. Interfaces 8(27), 17098-17108, 2016.

[144] Y. Ding, Q. Yao, W. Li, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, J.A. Roether,

The evaluation of physical properties and in vitro cell behavior of PHB/PCL/sol-gel derived silica hybrid scaffolds and PHB/PCL/fumed silica composite scaffolds,

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 136, 93-98, 2015.

[145] J. Lacoste, S. Therias,

Vieillissement des matériaux polymères et des composites,

Chimie en Auvergne (395), 2015.

[146] A. Maxwell, W. Broughton, G. Dean, G. Sims,

Review of accelerated ageing methods and lifetime prediction techniques for polymeric materials,

NPL Report, 2005.

[147] P. Alves, R. Cardoso, T.R. Correia, B.P. Antunes, I.J. Correia, P. Ferreira,

Surface modification of polyurethane films by plasma and ultraviolet light to improve haemocompatibility for artificial heart valves,

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 113, 25-32, 2014.

[148] P. Alves, S. Pinto, J.-P. Kaiser, A. Bruinink, H.C. de Sousa, M.H. Gil,

Surface grafting of a thermoplastic polyurethane with methacrylic acid by previous plasma surface activation and by ultraviolet irradiation to reduce cell adhesion,

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 82(2), 371-377, 2011.

[149] J. Guan, C. Gao, L. Feng, J. Shen,

Functionalizing of polyurethane surfaces by photografting with hydrophilic monomers,

J. Appl. Polym. Sci. 77(11), 2505-2512, 2000.

[150] Z.H.U. Yabin, G.A.O. Changyou, G. Jianjun, S. Jiacong,

Promoting the cytocompatibility of polyurethane scaffolds via surface photo-grafting polymerization of acrylamide, Springer, Heidelberg, ALLEMAGNE, 2004.

[151] Y. Zhu, C. Gao, J. Shen,

Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility,

Biomaterials 23(24), 4889-4895, 2002.

[152] M. Trivedi, A. Branton, D. Trivedi, G. Nayak, R. Singh, S. Jana,

Physicochemical and spectroscopic characterization of biofield treated butylated hydroxytoluene,

Journal of Food & Industrial Microbiology 1(1), 2015.

[153] Ciba,

Photoinitiators for UV curing, 2003.

[154] W.W. Simons,

The Sadtler handbook of ultraviolet spectra, Sadtler research laboratories ; Heyden, Philadelphia, Pa.; London, 1979.

[155] K. Hirayama,

Handbook of ultraviolet and visible absorption spectra of organic compounds, Plenum Press Data Division1967.

[156] R.A. Friedel, M. Orchin,

Ultraviolet spectra of aromatic compounds,

J. Am. Pharm. Assoc. 41(1), 1952.

[157] D. Mondal, A.S. Rizkalla, K. Mequanint,

Bioactive borophosphosilicate-polycaprolactone hybrid biomaterials via a non-aqueous sol gel process,

RSC Advances 6(95), 92824-92832, 2016.

[158] A. Yao, D. Wang, W. Huang, Q. Fu, M.N. Rahaman, D.E. Day,

In Vitro Bioactive Characteristics of Borate-Based Glasses with Controllable Degradation Behavior,

J. Am. Ceram. Soc. 90(1), 303-306, 2007.

[159] C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze, Y. Zhang,

Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds,

Biomaterials 32(29), 7068-7078, 2011.

[160] P. Balasubramanian, L. Hupa, B. Jokic, R. Detsch, A. Grünewald, A.R. Boccaccini,

Angiogenic potential of boron-containing bioactive glasses: in vitro study,

J. Mater. Sci. 52(15), 8785-8792, 2017.

[161] S.-H. Rhee, J.-Y. Choi, H.-M. Kim,

Preparation of a bioactive and degradable PCL/silica hybrid through a sol-gel method,

Biomaterials 23(24), 4915-4921, 2002.

[162] J.J. Chung, Y. Fujita, S. Li, M.M. Stevens, T. Kasuga, T.K. Georgiou, J.R. Jones,

Biodegradable inorganic-organic hybrids of methacrylate star polymers for bone regeneration,

Acta Biomater. 54, 411-418, 2017.

[163] S. Czarnecki, A. Bertin,

Hybrid silicon-based organic/inorganic block copolymers with sol–gel active moieties,

Chemistry – A European Journal 24(14), 3354-3373, 2017.

[164] S.M. Giannitelli, D. Accoto, M. Trombetta, A. Rainer,

Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering,

Acta Biomater. 10(2), 580-594, 2014.

[165] J. Nam, B. Starly, A. Darling, W. Sun,

Computer aided tissue engineering for modeling and design of novel tissue scaffolds,

Computer-Aided Design and Applications 1(1-4), 633-640, 2004.

[166] M.I. Gariboldi, S.M. Best,

Effect of ceramic scaffold architectural parameters on biological response,

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 3, 151, 2015.

[167] C. Leber, H. Choi, S. Bose, A. Bandyopadhyay,

Micromachined Si channel width and tortuosity on human osteoblast cell attachment and proliferation,

Materials Science and Engineering: C 30(1), 71-77, 2010.

[168] S. Wood,

How to 3D print with flexible filaments. <http://recreus.com/blog/en/learn/>, 2014).

[169] F. Wang, L. Shor, A. Darling, S. Khalil, W. Sun, S. Güçeri, A. Lau,

Precision extruding deposition and characterization of cellular polycaprolactone tissue scaffolds,

Rapid Prototyping Journal 10(1), 42-49, 2004.

[170] S. Lauren, G. Selçuk, C. Robert, G. Jennifer, K. Qian, H. Langdon, . . . S. Wei,

Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering,

Biofabrication 1(1), 015003, 2009.

[171] J. Li, M. Chen, X. Wei, Y. Hao, J. Wang,

Evaluation of 3D-printed polycaprolactone scaffolds coated with freeze-dried platelet-rich plasma for bone regeneration,

Materials 10(7), 831, 2017.

[172] M. Kammerer, M. Fabritius, C. Carvalho, R. Mülhaupt, T. Feuerstein, R. Trittler,

Valproate release from polycaprolactone implants prepared by 3D-bioplotting,

2011.

[173] A. Aubree, C. Feuillarade, L. Lastra, N. Memain-Perennec, M. Palluet, P.-E. Pizzoccaro,

Tête d'extrusion pour imprimante 3D, Polytech Clermont-Ferrand, 2018.

[174] VOLUMIC,

Imprimante 3D française. <https://www.imprimante-3d-volumic.com/fr/imprimante-3d-francaise.cfm>, 2018).

[175] EnvisionTEC,

The 3D-Bioplotter family. <https://envisiontec.com/3d-printers/3d-bioplotter/>, 2018).

[176] CELLINK,

CELLINK BIO X. <https://cellink.com/product/cellink-bio-x-bioprinter/>, 2018).

[177] F. Tallia, L. Russo, S. Li, A.L.H. Orrin, X. Shi, S. Chen, . . . J.R. Jones,

Bouncing and 3D printable hybrids with self-healing properties,

Materials Horizons 5(5), 849-860, 2018.