



**HAL**  
open science

# Synthèse par pulvérisation cathodique magnétron et caractérisation de revêtement d'oxydes biocompatibles pour application aux implants dentaires en alliage de titane

André Marlot

## ► To cite this version:

André Marlot. Synthèse par pulvérisation cathodique magnétron et caractérisation de revêtement d'oxydes biocompatibles pour application aux implants dentaires en alliage de titane. Autre. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0319 . tel-01749477

**HAL Id: tel-01749477**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749477>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



THÈSE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité : Sciences des Matériaux

Ecole Doctorale Energie Mécanique Matériaux (EMMA)  
Institut Jean Lamour – Département Chimie et Physique des Solides et des Surfaces (CP2S)

Présentée par

**André MARLOT**

Pour l'obtention du titre de  
**Docteur de l'Université de Lorraine**

**SYNTHESE PAR PULVERISATION CATHODIQUE MAGNETRON ET  
CARACTERISATION DE REVETEMENTS D'OXYDES  
BIOCOMPATIBLES POUR APPLICATION AUX IMPLANTS  
DENTAIRES EN ALLIAGE DE TITANE**

Soutenu publiquement le 4 décembre 2012

Devant la commission d'examen composée de :

Ghislaine BERTRAND, Professeur, ENSIACET Toulouse (Rapporteur)

Philippe STEYER, Maître de Conférences – HDR, INSA de Lyon (Rapporteur)

Bernard FOLIGUET, Professeur, Université de Lorraine (Examineur)

Frédéric SANCHETTE, Professeur, Université de Technologie de Troyes (Examineur)

Alain BILLARD, Professeur, Université de Technologie de Belfort-Montbéliard (Directeur de thèse)

Jean-François PIERSON, Professeur, Université de Lorraine (Co-directeur de thèse)

## Remerciements

---

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Alain Billard qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Alain tu es le père de ce travail, jamais je ne l'oublierai.

Mes remerciements vont également à mon directeur de recherche, Jean-François Pierson, qui m'a accompagné tout au long de ce long parcours. Sa patience, sa compréhension que nous n'avons pas le même bagage scientifique, sa disponibilité et ses généreux secours au cours de certains de mes moments difficiles ont été d'une très grande qualité, et d'un immense réconfort : merci infiniment Jeff.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury : Madame Ghislaine Bertrand, Monsieur Philippe Steyer, Monsieur Frédéric Sanchette, et bien sûre Monsieur Bernard Foliguet.

Mes pensées se dirigent également vers Marie-Cécile de Weerd et mes amis thésards, avec qui j'ai partagé tant de problèmes !

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail. Je pense et remercie Madame Jacqueline Chanel et Monsieur Marc Merten pour m'avoir accueilli dans leur unité de recherche et de laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.

Une pensée très particulière pour Jean Straczek qui a été d'une générosité sans limite afin de pour pouvoir se débarrasser de moi. Sa modestie le caractérise, mais son talent dans le travail est tout simplement immense.

Il y a une personne de très grande importance dans ma vie, qui m'accompagne et qui me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles. Il s'agit de toi Eléna, ma merveilleuse, splendide et vertueuse épouse, dont je ne pourrai mesurer l'apport dans l'accomplissement de cette thèse. Dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir, tu as été l'autre moi. Je te remercie infiniment ma belle.

De plus, mes remerciements seraient incomplets, si je ne fais pas mention de mes enfants Anna et Juliette, qui ont pu supporter mon éloignement et continuer à être 'sages' en dépit de mon absence, ou grâce à la présence de Maria et Théodore.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes que nous pourrions résoudre grâce à des formules mathématiques et des algorithmes. Malgré mon éloignement depuis de (trop) nombreuses années, leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses ? Je n'en connais en tous cas pas de mauvais. Je vous aime.

Une pensée pour terminer ces remerciements pour toi qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail mais je sais que tu aurais été très fier de ton fils !

A tous ceux que je ne nomme pas, mais qui se reconnaîtront.

## Remerciements

---

*Je n'ai pas échoué. J'ai trouvé dix mille moyens qui ne fonctionnent pas.*

Albert Einstein

*Le temps met tout en lumière.*

Thalès

**SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>page 1</b>
<b>CHAPITRE I – BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>4</b>
<b>I.1 Généralités.....</b>	<b>5</b>
I.1.1 Quand parlons-nous de biomatériaux ?.....	5
I.1.2 Les besoins de connaissances en amont des biomatériaux.....	5
I.1.3 Conception de biomatériaux, propriétés physico-chimiques .....	6
I.1.4 Biocompatibilité et biofonctionnalité .....	6
<b>I.2 Les matériaux biocompatibles .....</b>	<b>7</b>
I.2.1 Polymères et matières molles .....	7
I.2.2 Matériaux d'origine naturelle.....	8
I.2.3 Métaux et alliages métalliques.....	8
I.2.4 Céramiques .....	11
I.2.4.1 Les céramiques oxydes .....	13
I.2.4.2 Les céramiques non oxydes .....	15
<b>I.3 Facteurs influençant la biocompatibilité.....</b>	<b>16</b>
I.3.1 Rugosité.....	16
I.3.1.1 Modification de surface d'implant dentaire par sablage .....	17
I.3.1.2 Modification de surface d'implant dentaire par mordançage.....	18
I.3.1.3 Modification de surface d'implant dentaire par anodisation.....	18
I.3.2 Stérilisation.....	21
<b>I.4 Implant dentaire.....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE II - MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....</b>	<b>26</b>
<b>II.1 Rappels sur la pulvérisation cathodique magnétron .....</b>	<b>27</b>
II.1.1 Principe de fonctionnement.....	27
II.1.1.1 Production des espèces et mécanismes de pulvérisation.....	28
II.1.1.2 Transport des espèces de la cible vers le substrat.....	30
II.1.1.3 Formation du dépôt solide .....	31
II.1.2 Fonctionnement en conditions réactives .....	32
II.1.2.1 Instabilité électrique .....	32
II.1.2.2 Instabilité du régime de pulvérisation.....	33
II.1.2.3 Intérêt du système « Plasma Emission Monitoring » .....	35
<b>II.2 Dispositifs expérimentaux.....</b>	<b>36</b>

---

II.2.1 Enceinte de pulvérisation Alcatel SCM650.....	36
II.2.2 Réacteur LSGS .....	39
<b>II.3 Cultures cellulaires.....</b>	<b>40</b>
II.3.1 Spécifications de la norme ISO 10993-5.....	40
II.3.2 Choix de la méthode et des moyens.....	40
II.3.3 Protocoles d'utilisation des appareils (microscope inversé) .....	44
II.3.4 Protocoles des manipulations.....	45
II.3.5 Protocole du test de cytotoxicité.....	52
II.3.6 Les différentes phases du projet.....	54
II.3.7 Planning prévisionnel du projet biocompatibilité (Annexe 1) .....	56
<b>CHAPITRE III - CHOIX DES MATERIAUX ET DES PROCEDES.....</b>	<b>57</b>
<b>III.1 Le titane.....</b>	<b>58</b>
III.1.1 Titane pur .....	58
III.1.2 Alliages de titane.....	59
III.1.2.1 Les éléments alphagènes.....	59
III.1.2.2 Les éléments betagènes.....	60
III.1.2.3 TiAl6V4.....	61
III.1.2.4 Solutions solides d'insertion.....	61
III.1.2.5 Solutions solides de substitution.....	61
III.1.2.6 Propriétés physiques et mécaniques.....	61
III.1.2.7 Corrosion.....	62
III.1.2.8 Mise en œuvre.....	63
III.1.2.9 Aptitude à la liaison céramo-métallique du titane.....	64
<b>III.2 La zircone.....</b>	<b>64</b>
III.2.1 Zircone pure.....	64
III.2.2 Zircone alliée.....	66
III.2.3 Usages médicaux.....	68
III.2.4 Rugosité.....	68
III.2.5 Processus de mise en forme.....	69
III.2.6 Intérêt en implantologie dentaire.....	69

---

<b>CHAPITRE IV - REVÊTEMENTS SUR ALLIAGE TITANE : ÉLABORATION, CARACTÉRISATION ET CULTURES CELLULAIRES .....</b>	<b>70</b>
<b>IV.1 Introduction.....</b>	<b>71</b>
<b>IV.2 But de l'étude .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.3 Matériels et méthodes .....</b>	<b>72</b>
IV.3.1 L'alliage titane.....	72
IV.3.2 Autres revêtements.....	72
IV.3.3 Elaboration de revêtement par procédé PVD.....	73
IV.3.4 Cultures cellulaires.....	74
<b>IV.4 Caractérisation des substrats et des revêtements.....</b>	<b>76</b>
IV.4.1 Caractérisation des substrats.....	77
IV.4.1.1 Plot en TiAl6V4.....	77
IV.4.1.2 Implant commercial IDI.....	79
IV.4.2 Préparation des substrats.....	81
IV.4.3 Développement des couches par pulvérisation cathodique.....	84
IV.4.3.1 Synthèse de couches de zircone.....	85
IV.4.3.2 Autres revêtements.....	91
IV.4.4 Résultats – conclusion des dépôts sur alliage titane .....	95
<b>IV.5 Cultures cellulaires.....</b>	<b>95</b>
IV.5.1 Résultats des cultures cellulaires (phase I).....	95
IV.5.1.1 Cultures fibroblastes sur lame de verre et polymère.....	95
IV.5.1.2 Cultures fibroblastes sur TiAl6V4 .....	97
IV.5.1.3 Cultures fibroblastes sur TiAl6V4-(Zr,Y)O <sub>2-x</sub> .....	100
IV.5.1.4 Conclusion des cultures cellulaires (phase I).....	103
IV.5.2 Résultats des cultures cellulaires (phase II) .....	105
IV.5.2.1 Cultures fibroblastes sur Zr et Y amorphes.....	105
IV.5.2.2 Cultures fibroblastes sur Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> et Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	110
<b>IV.6 Discussion des résultats.....</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>116</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>133</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>145</b>

**INTRODUCTION**

Dans un monde où de plus en plus la technologie aide la médecine à élaborer de nouveaux concepts pour remplacer une partie déficiente, abîmée ou perdue du corps humain, suite à un accident de la vie, à la vieillesse ou la maladie, une nouvelle science est apparue de façon contemporaine : la bioingénierie.

Il est peu de thérapeutiques médico-chirurgicales qui ne fassent pas appel à des biomatériaux. Nous pouvons citer par exemple leur utilisation dans le traitement chirurgical des traumatismes, des conséquences cardiovasculaires, ophtalmologiques, urologiques ou articulaires du vieillissement, les tumeurs, les maladies dégénératives, etc.

Aborder le domaine des biomatériaux ou de la biocompatibilité nécessite de comprendre que les domaines d'application sont étendus et donc ; que les défis technologiques sont importants lorsque nous mettons en jeu des biomatériaux implantables définitivement (implants dentaire ou de hanche), limités dans le temps (fils de sutures), pour la délivrance locale de principes actifs (antibiotiques, hormones, gènes), voire hybrides pour bénéficier de l'activité de cellules étrangères. L'obstacle le plus généralement rencontré dans le domaine de la biocompatibilité est la bonne maîtrise de la tolérance au niveau de l'interface entre les matériaux utilisés dans le domaine médical et les tissus vivants de l'hôte.

Ainsi, la réparation d'un organe perdu comme une dent, un os ou une articulation peut être remplacé par un outil mécanique plus ou moins complexe. La grande question qui se pose est de savoir si cette prothèse artificielle est compatible avec le tissu vivant qui est au contact avec la prothèse et avec le reste du corps humain pour permettre alors de rétablir la fonction pour laquelle elle a été conçue, à courte et longue échéance.

La science des matériaux est fondamentale pour la médecine d'aujourd'hui car elle fait appel de plus en plus à l'utilisation de protocoles médicaux de réparations modernes comme les prothèses de hanche (150 000/an), de genou (50 000/an) ou les implants dentaires (200 000/an) [1].

C'est un enjeu de santé publique qui nous concerne tous, car il permet la correction d'un handicap, pour rester actif dans les sphères de la vie professionnelle et privée. Mais c'est aussi un enjeu économique considérable. En effet, il représente en France une dépense totale de santé (DTS) estimée à 11% du PIB, soit 175 milliards d'euros en 2010 (source INSEE), dont 10 milliards d'euros uniquement pour les biomatériaux (source CNAM) sur une production mondiale de biomatériaux estimée à 800 milliards d'euros annuel dont 2 milliards rien que pour les implants dentaires. Dans ce marché mondial, depuis 2010, la France se situe au 3<sup>ème</sup> rang en terme de DTS, derrière les États-Unis et la Suisse [2].

La recherche médicale dans le domaine de l'ingénierie est donc un élément majeur de notre société moderne où l'homme refuse même de vieillir. L'homme moderne recherche alors dans la science médicale une avancée technologique et durable au même titre que les technologies qui encadrent son confort.

Les biomatériaux posent le problème de leur sécurité, de leur devenir dans l'organisme en termes de (bio)tolérance et de (bio)fonctionnalité surtout pour les systèmes prothétiques à usage de remplacement définitif. Afin d'encadrer la recherche en bioingénierie, il a été défini

par l'INSERM, un cahier des charges idéal pour un minimum d'interactions avec les tissus avoisinants [3].

De nouvelles stratégies font actuellement l'objet de prospections importantes. Elles reposent toutes sur l'obtention de plus fortes interactions entre les matériaux (alliages, céramiques, polymères, assemblages moléculaires) et les milieux vivants (molécules, cellules, tissus, organes). La recherche actuelle met en place des implants servant à remplacer la fonction ou la forme de l'organe ou tissu malade, mais en visant une intégration (ou un remplacement) par les tissus naturels au contact de l'implant biodégradable ou non et en colonisant la surface de l'implant servant alors de matrice. Ces stratégies médico-chirurgicales et/ou pharmacologiques reposent en général sur l'aptitude d'un organisme vivant à s'autoréparer. Que les systèmes soient artificiels, naturels modifiés ou hybrides, la notion de "biocompatibilité", ou plutôt d'acceptabilité, est au cœur des progrès ; car ce sont les organismes vivants qui réagissent à leur guise. Le thérapeute ne faisant qu'apprécier les résultats pour repousser ainsi la notion d'échec, malgré la connaissance de la science et l'utilisation de matériaux spontanément compatibles.

Pour assurer la sécurité de matériaux transformés en biomatériaux, la recherche bio-scientifique est pluridisciplinaire : mécanique des fluides, des solides, anatomie, biologie cellulaire, chirurgie, etc. Elle touche aussi bien la science et l'ingénierie du matériau qui modélisera au mieux la future prothèse à son usage clinique, que les sciences biologique et médicale qui étudient les réactions du vivant dès l'introduction du biomatériau dans le corps humain.

Mais, alors que les résultats se critiquent et se quantifient à l'échelle des protéines qu'élaborent les cellules en contact avec la prothèse, nous avons pu observer une compatibilité non totale au voisinage de tous les matériaux dits 'biocompatibles'.

Existe-t-il alors des procédés scientifiques permettant d'améliorer les propriétés de compatibilité humaine d'un matériau pour le rendre totalement biocompatible ?

Afin de tenter de répondre à cette question, il nous faut définir les notions de biocompatibilité et de biomatériaux (*chapitre I*), ainsi que les axes actuels de la recherche biomédicale en matière de biomatériaux (*chapitre II*). Ce rappel de connaissances, nous permettra de mieux comprendre les choix de notre axe de recherche en bioingénierie portant sur l'étude des revêtements en couches minces sur alliages à usage médical, afin de définir une perspective d'amélioration des biomatériaux (*chapitres III et IV*).

Notre recherche au sein du département de Chimie et Physique des Solides et des Surfaces (CP2S) de l'Institut Jean-Lamour est l'aboutissement d'une réflexion faite durant l'année d'étude du Master M2R Bioingénierie et Pharmacologie, où les effets de la corrosion sur le vivant avaient été étudiés.

**CHAPITRE I  
BIBLIOGRAPHIE**

## I.1 GÉNÉRALITÉS

### I.1.1 Quand parlons-nous de biomatériaux ?

Il n'existe pas une seule définition totalement satisfaisante des biomatériaux [4]. Nous pouvons en retenir deux :

- 1- *matériaux non vivants utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques* [5].
- 2- *tout matériau, naturel ou non, comprenant tout ou partie d'une structure vivante ou d'un appareil biomédical qui exécute ou remplace une fonction naturelle.*

La définition d'un biomatériau n'inclut pas uniquement les biomatériaux artificiels qui sont construits à base de *métaux* ou de *céramiques*. Un biomatériau peut aussi être une *autogreffe*, *allogreffe* ou *xéno greffe* utilisée comme une transplantation de matériaux.

Au-delà de toute définition, la notion de biomatériau est entièrement contenue dans la nécessité de prise en compte du contact de ce matériau avec des tissus ou fluides vivants (sang, synovie, etc.), selon des normes ISO définies.

En relation directe avec la notion du 'contact', celle de la biocompatibilité est toute aussi essentielle. Nous pouvons la qualifier de « négative », quand elle est définie par des propriétés que le matériau ne doit pas posséder : pas de réaction inflammatoire, pas de toxicité, etc. Et, elle est dite « élargie », et si possible mesurable, quand elle est définie comme : "*la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique*" [5].

Cette biocompatibilité "élargie" débouche sur la notion très actuelle de bioactivité, par laquelle nous recherchons à ce que le matériau ne soit pas nécessairement le plus inerte possible, mais au contraire fasse réagir le tissu vivant. C'est par exemple le cas pour les sutures résorbables dans lesquelles la réaction inflammatoire participe justement à la résorption du fil, ou encore ; les matériaux ostéoconducteurs qui facilitent la croissance osseuse, tel que l'oxyde de titane qui stimule une apposition osseuse en surface sur des implants dentaire ou de hanche.

Il faut également prendre en compte la durée du contact avec les tissus vivants. Ce paramètre permet d'exclure les produits pharmaceutiques du champ des biomatériaux.

### I.1.2 Les besoins de connaissances en amont des biomatériaux

Le domaine des biomatériaux traite et corrige le handicap sous toutes ses formes par des systèmes médicaux artificiels, implantables ou au contact d'une muqueuse, visant à suppléer une fonction défaillante (biofonctionnalité).

Cette approche plus complexe et pluridisciplinaire, nécessite de sélectionner, d'une part, les catégories de matériaux concernés, et d'autre part, les grandes fonctions et propriétés pouvant intervenir. Ainsi, les deux principaux thèmes de la recherche fondamentale touchent

à résoudre, en premier lieu, des problèmes physico-chimiques des biomatériaux par l'étude des réactions induites au niveau de l'interface système *vivant-matériau*. Ces études portent à la fois sur les modifications des matériaux et sur les réactions de l'organisme. Et secondairement, à résoudre des problèmes touchant à leur biocompatibilité et biofonctionnalité par la création de matériaux possédant un couple de propriétés *biofonctionnalité-biocompatibilité* meilleur. Pour chaque utilisation médicale future, ces contraintes sont différentes et impliquent donc des recherches spécifiques.

Reproduire les caractéristiques fonctionnelles du tissu à remplacer est un "challenge" encore incomplètement maîtrisé, quel que soit le matériau.

Ces recherches fondamentales ont des répercussions pratiques sur les techniques et les protocoles d'implantation, sur le choix des sites d'implantation, ainsi que celui portant sur la géométrie des implants et de leur état de surface.

### **I.1.3 Conception de biomatériaux, propriétés physico-chimiques**

La conception microstructurale de la surface des matériaux doit bénéficier de propriétés compatibles avec les contraintes biochimiques du milieu naturel d'implantation ou de la contrainte cellulaire de colonisation. Citons pour exemple la membrane ultra-lisse des valves cardiaques qui doivent empêcher les globules rouges de s'y accrocher ou d'être abîmée au contact de cette dernière. Alors qu'un implant à visée osseuse doit favoriser l'apposition de cellules osseuses, qui doivent coloniser le site implantaire, pour une ostéointégration primaire. Cela passe également par une adaptation moléculaire de la composition chimique des surfaces des matériaux pour répondre aux contraintes biochimiques et biomécaniques, mais également répondre aux réactions cellulaires ou tissulaires au contact.

Ainsi, la recherche fondamentale étudie des critères d'adhésion, de dureté et de frottement en y recherchant le meilleur état de surface par greffage, dépôts de film mince ou multicouches pour définir un vieillissement des matériaux compatibles avec le vivant.

### **I.1.4 Biocompatibilité et biofonctionnalité**

Plusieurs facteurs peuvent influencer la biocompatibilité et la biofonctionnalité, comme la stérilisation (agissant sur l'intégrité du biomatériau et sur sa biorésorbabilité) ou les effets cytotoxiques en changeant la cytocompatibilité (l'adhésion, la viabilité, la prolifération ou l'expression du phénotype).

Suite à ces influences, la qualité de la réparation tissulaire peut être altérée, ainsi que les effets sur les tissus environnants et les performances fonctionnelles de l'implant à long terme.

## I.2 LES MATERIAUX BIOCOMPATIBLES

### I.2.1 Polymères et matières molles

Un polymère est une substance composée *d'unités constitutives* se développant dans les trois directions de l'espace pour former une macromolécule. Les polymères sont résorbables ou non, stables ou actifs, permettant ou non le relargage de médicaments.

La plupart des polymères synthétiques manque de propriétés biologiques et biochimiques. Ce manque de fonctionnalités restreint les propriétés du polymère et les empêche de contrôler spécifiquement les interactions existantes au niveau de l'interface cellule-matériau.

En travaillant sur ces polymères par modification de leurs chaînes répétitives, nous obtenons une modification de leurs propriétés pour une meilleure tolérance du vivant. Ceci est envisagé par la fixation sur le polymère de groupements ionisés tels que les orthophosphates, carbonates, carboxylates, etc. Cette "fonctionnalité" peut notamment être obtenue par la modification de l'état de surface du polymère par implantation ionique ou par greffage de substances fonctionnelles. Ainsi, des propriétés de résistance mécanique s'approchant de l'os natif peuvent être obtenues par activation de groupements fonctionnels libres [6].

La sélection de plusieurs polymères par association ou comparaison, permettent de retenir le meilleur d'entre eux pour la recherche d'une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant, à savoir la capacité d'interaction avec les ostéoblastes (et/ou les fibroblastes) qui favorise la repousse osseuse ou ligamentaire [7]. Elle permet également d'améliorer le cahier des charges des pièces métalliques pour réduire les effets indésirables dus à l'usage de cette prothèse métallique, en servant de revêtement où l'alliage métallique en est le tuteur, notamment en servant de coiffe, pour réduire les effets de frottement ou d'usure de deux implants en contact l'un envers l'autre [8]. Ce sont essentiellement les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique qui sont utilisables en chirurgie orthopédique traumatologique. Leur principal inconvénient est qu'ils présentent tous une variabilité de chaque "lot" fabriqué, par un manque de standards, qui aboutit à observer comme défauts des effets négatifs de la stérilisation, une érosion de surface ou érosion dans la masse, un vieillissement physique et chimique, des effets sur la cicatrisation ou sur le remplacement des tissus naturels, des interactions avec les éléments vivants (macromolécules, cellules, organes, etc.).

Les polymères, par la nature de leur construction moléculaire à base d'éléments de répétition, sont des candidats du futur pour l'élaboration de prothèses permanentes ou temporaires sophistiquées ou pour remplacer des matériaux actuellement d'origine naturelle dans la limite de leurs propriétés mécaniques.

## **I.2.2 Matériaux d'origine naturelle**

Etre d'origine naturelle, c'est leur principal avantage. Ils sont biodégradables et non-toxiques, biocompatibles voire hémocompatibles [9] [10] [11] [12]. Mais ils sont également, pour la plupart, bactériostatique et fongistatique avec une activité antimicrobienne et une immunogénicité faible. L'apparition des problèmes de biocompatibilité des implants a orienté les chercheurs vers ces matériaux logiquement biocompatibles puisque d'origine naturelle, ce qui indique clairement un immense potentiel de développement futur.

Par modification chimique, ces substances sont facilement transformables en gels, éponges, membranes ou perles [11]. Ils ont un domaine d'application privilégié pour la régénération des tissus et l'ostéogénèse par vectorisation de molécules biologiquement actives [9]. Ces biopolymères possèdent d'immenses possibilités structurelles par modification chimique et mécanique pour agir dans le domaine tissulaire et osseux, le contrôle inflammatoire d'une blessure ou chirurgie, la délivrance de médicaments et dans le diagnostic de certains cancers [13] [14] [15].

Ainsi, des propriétés mécaniques modifiées sont obtenues pour lutter contre la rupture et la dégradation dans le but d'obtenir une diminution de l'inflammation [12]. Nous pouvons également rechercher une biodégradation accrue, tout en contrôlant l'inflammation, quand le matériau sert d'échafaudage à une colonisation cellulaire et à une adsorption des protéines qui augmenteraient les propriétés de bio-minéralisation [10] [16] [17].

## **I.2.3 Métaux et alliages métalliques**

Ils sont les "ancêtres" des biomatériaux puisque ce sont les premiers à avoir été utilisés pour faire des implants.

Le plus important par les volumes est sans doute l'acier inoxydable, encore largement utilisé en chirurgie orthopédique. Son intérêt réside dans ses bonnes propriétés mécaniques et sa bonne résistance à la corrosion.

Il faut également mentionner les alliages de titane qui sont utilisés principalement en chirurgie orthopédique, implants dentaires, dans les stimulateurs cardiaques et les pompes implantables. L'un des avantages principaux du titane est sa bonne biocompatibilité: l'os adhère spontanément au titane (ostéoconductivité).

Les alliages à mémoire de forme sont une variante intéressante des alliages de titane. Nous pouvons citer pour exemples dans le domaine dentaire ou orthopédique la gamme dite 'memoria' d'alliage en nickel-titane qui développe des forces biologiques dans un large champ de déformations ; la gamme 'thermomemoria' en alliage spécial de nickel-titane, qui représente une innovation, car ces alliages développent des forces différentes selon la température, ambiante ou corporelle, dans laquelle ils se trouvent ; la gamme 'memoria natura' unissant une haute élasticité, une indéformabilité où la force de frottement est plus faible lorsque les alliages sont utilisés avec des verrous métalliques.

Nous pouvons également rappeler comme biomatériaux métalliques les métaux ou alliages de cobalt, chrome, molybdène, etc.

### **I.2.3.1. Le magnésium et ses adjuvants**

Métal léger, avec des propriétés mécaniques similaires à l'os naturel, il possède une structure ionique naturelle lui conférant des rôles fonctionnels importants dans les systèmes biologiques. Sa dégradation in vivo par la corrosion dans le milieu électrolytique de l'organisme, fait que des implants à base de magnésium sont utilisés pour servir de matrice biocompatible, par ostéoconduction, car dégradables pour des applications implantaires de charge [18] [19].

### **I.2.3.2. Les alliages de titane**

Si le titane pur présente à 20°C a une structure hexagonale compacte, appelée alpha, il subit au-delà de 880°C, une modification de sa structure qui devient cubique centrée appelée bêta ; les alliages titane présentent une structure mixte : alpha + bêta et trouvent de nombreuses applications dans la médecine (cf chapitre III.I.I). Si le titane pur est surtout utilisé pour sa bonne tenue à la corrosion, ces caractéristiques mécaniques à la rupture sont toutefois limitées (800-1100MPa). L'utilisation des alliages base Ti présentent des caractéristiques mécaniques à la rupture bien supérieures à celles du titane pur (350-450 MPa).

Les alliages de titane destinés aux applications biomédicales doivent afficher à la fois une biocompatibilité clinique et mécanique, mais, ils possèdent encore un module d'élasticité de Young trop élevé par rapport à celui de l'os ( $E = 110$  GPa), ce qui peut conduire à une défaillance prématurée de l'implant. Pour que mécaniquement l'alliage soit exploitable en médecine, nous lui rajoutons des adjuvants tels que le fer (Fe), l'aluminium (Al), le molybdène (Mo), le niobium (Nb), le tantale (Ta) ou le zirconium (Zr) avec un rapport de charge prédéfini [22] [23]. Cela permet de combiner une haute résistance mécanique avec un module d'élasticité proche de l'élasticité osseuse ( $E = 20$  GPa), pour améliorer les processus de remodelage osseux et d'ostéointégration. Les propriétés mécaniques comme la résistance à la traction ou à la compression et le profil de dureté sont alors évaluées selon les normes ISO. Mais, malgré un cahier des charges qui définit certains alliages de titane (TiAl6V4) comme étant biocompatibles, le revêtir d'une couche mince ne suffit pas toujours pour empêcher la dissolution de revêtement [24]. La conséquence est l'apparition d'un oxyde de surface qui est l'oxyde de titane dû à cette dissolution. Cela pose alors la question des effets toxicologiques potentiels des nanoparticules de revêtements en circulation dans le corps humain [25], suggérant que les nanorevêtements à la surface des implants doivent être contrôlés et standardisés.

Pour mieux agir sur les propriétés mécaniques et de corrosion des alliages de titane, nous pouvons intervenir sur sa composition par ajouts d'éléments d'alliage, ou sur sa structure cristallographique (martensitique, biphasée  $\alpha + \beta$ ). Ainsi, un alliage de titane renforcé par Nb ou Zr n'aura pas le même comportement de résistance face à la corrosion et à l'usure que celle de l'alliage de titane de référence TiAl6V4 [26].

➤ **Les alliages TiZr (titane-zirconium)**

L'amélioration des propriétés mécaniques et de corrosion des alliages TiZr est sous l'influence d'éléments d'alliage [28] ou de leur structure [27].

Ainsi, un alliage TiNb enrichi en Zr voit ses propriétés mécaniques et d'élasticité modifiées [27], mais cette réponse est totalement différente par le simple fait d'en modifier la teneur des adjuvants comme le Nb, où les propriétés d'élasticité sont améliorées, ou de la couche mince Zr, où cette dernière augmente la tendance à la passivation [28]. Les réponses tissulaire et cellulaire sont également influencées par la rugosité de surface obtenue en fonction du mode de fabrication de l'alliage de titane et de sa composition. La bonne fixation biologique du matériau au tissu environnant se fait grâce à la croissance du tissu osseux dans le réseau poreux avec des propriétés ostéoinductrices plus prononcées grâce à l'alliage contenant du Nb et du Zr dans des rapports de charges précis. Ainsi, l'addition de Zr (0, 2, 4%) a supprimé la formation et la croissance de la phase oméga pendant le traitement du vieillissement. La phase oméga exerce des effets inhibiteurs sur la transformation martensitique.

Mais, les principaux problèmes mal résolus avec les métaux ou alliages métalliques sont liés à l'apparition d'une corrosion électrochimique remettant en cause leur durabilité. En effet, l'inoxidabilité du métal et de son alliage n'est pas absolue. Le matériau résiste à la corrosion mais ne l'empêche pas [30]. Nous avons du mal à maîtriser les mécanismes de dégradation non électrochimiques par interactions entre les protéines et le métal [20], les réactions immunitaires et d'hypersensibilité [30], l'adaptation des propriétés mécaniques [29], et les propriétés de frottement et problèmes de débris [21].

Pour mieux comprendre la problématique du titane actuellement, nous allons étudier les conséquences d'un traitement de surface.

➤ **Modification de surface d'implant dentaire par projection plasma**

(cf chapitres II et IV.3.3)

Une poudre de titane est placée dans une enceinte à plasma à haute température. Les particules de titane sont projetées sur la surface des implants, où elles se condensent et fusionnent avec la surface de l'implant formant un film d'une épaisseur de 30µm avec une rugosité moyenne d'environ  $R_a=7\mu\text{m}$ , ce qui augmente la surface de l'implant et la résistance à la traction à l'interface os-implant en comparaison avec des implants à surface lisse présentant un  $R_a$  moyen de 0.2 µm [31].

Le relargage de particules de titane a été trouvé dans l'os adjacent par rapport aux implants traités par cette technique de modification de surface. La présence de ces particules métalliques de titane qui ont circulé dans le foie ou la rate est avérée. Localisés en de petits agrégats, ils sont retrouvés dans les macrophages et même dans les ganglions lymphatiques

para-aortiques [32] [33]. Les ions métalliques libérés sont le résultat d'une dissolution, de l'usure par frottement.

Si cela engendre une source de préoccupation en raison des effets indésirables systémiques dus à la libération des ions de titane systémique ainsi que des effets potentiellement cancérogènes [34] [35], aucun cas in vivo à l'échelle mondiale n'a été reconnu [36].

#### **I.2.4 Céramiques**

La société américaine ASTM (American Society for Testing and Materials) définit une céramique comme :

*« un article ayant un corps vitrifié ou non, de structure cristalline ou partiellement cristalline, ou de verre, dont le corps est formé de substances essentiellement inorganiques et non métalliques, et qui est formé par une masse en fusion qui se solidifie en se refroidissant, ou qui est formé et porté à maturité, en même temps ou ultérieurement, par l'action de la chaleur ».*

Nous pouvons séparer les céramiques traditionnelles (silico-alumineux), qui sont issues de matières premières naturelles (argile, feldspath, kaolin, quartz) et généralement mises en œuvre par coulée (barbotine), des céramiques techniques (associations métal-métalloïde), obtenues le plus souvent par frittage qui est un traitement thermomécanique qui, dans un premier temps, provoque la cohésion de granulés de poudre avec un « aggloméré » préparé par compression à froid. Cette ébauche étant ensuite chauffée dans des fours spéciaux ou par électrofusion, procédé où les oxydes sont coulés directement dans un moule.

**La céramique technique** est une branche de la céramique dédiée aux applications industrielles, par opposition aux créations artisanales (poterie) ou artistiques (céramique d'art). L'objectif de cette industrie est la création et l'optimisation de céramiques aux propriétés physiques médicales spécifiques : mécaniques, électriques, magnétiques, optiques,...

Les céramiques industrielles entrent dans trois catégories différentes : la première qui représente les *oxydes* : oxyde d'aluminium, oxyde de zirconium. La seconde est la catégorie des non-oxydes : carbures, borures, nitrures, siliciures. Enfin, les céramiques composites qui sont la combinaison des oxydes et des non-oxydes.

Chacune de ces catégories possède des propriétés particulières. Elles se caractérisent toutes par une température de fusion élevée, des propriétés de grande résistance mécanique, une faible densité, une faible conductivité thermique, une forte dureté et une résistance élevée à l'usure. Cependant, de petites imperfections, notamment de petites fissures dans la céramique, peuvent rendre ces matériaux fragiles, ce qui détermine leurs domaines d'application.

Elles sont opaques (céramiques cristallines) ou translucides (verres amorphes).

Dans le domaine biomédical, la réactivité entre l'implant et les tissus mène à distinguer deux types de matériaux. Il existe des céramiques qui ne réagissent pas de façon notable et celles qui réagissent fortement, dont les propriétés sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Les biocéramiques ont été conçues pour minimiser les réactions avec les tissus biologiques (céramiques bio inertes) ou, au contraire, favoriser la réparation des tissus et l'intégration des dispositifs auxquels ils sont associés (céramiques bioactives).

Les céramiques peuvent offrir les avantages d'une composition chimique ne conduisant pas au dégagement de composés toxiques et d'une excellente résistance au frottement et à l'usure. Elles sont définies comme biocompatibles.

Leur utilisation dans le secteur médical couvre ainsi aussi bien la chirurgie reconstructrice (prothèses, substituts osseux, implants oculaires), le dentaire (implants dentaires, bridges, brackets) les systèmes médicaux (bioréacteurs, outils chirurgicaux et instrumentation médicale)...

**Tableau I** : propriétés des céramiques employées dans le domaine biologique en fonction de leurs compositions chimiques

Céramiques	Propriétés	Matériaux	Applications
INERTES	Aucune réaction avec le milieu physiologique	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ZrO <sub>2</sub> SiO <sub>2</sub>	SUBSTITUTS Tête de fémur Implants dentaires
ACTIVES	Réaction avec le milieu physiologique	Phosphate de calcium Hydroxyapatite	Comblement osseux Prothèse oculaires
RESORBABLES	Céramique remplacée par les tissus vivants	Phosphate tricalcique Phosphate de calcium	COMBLEMENTS

La bio-inertie étant l'absence de réaction du milieu physiologique, les *céramiques bio-inertes* sont essentiellement des céramiques à base d'*oxydes*, de *carbures* ou de *nitrures*. L'*alumine* est la principale céramique bio-inerte. Les carbures et les nitrures de *titane* en font aussi partie.

De par leur caractère de matériau neutre, les céramiques sont donc sans danger pour l'homme. Elles peuvent également jouer un rôle en tant que matériau résorbable. Nous parlons alors de céramiques dites bioactives de deuxième génération. Les prothèses de première génération sont parfaitement tolérées par l'organisme, mais restent des corps étrangers. Aujourd'hui, nous utilisons des céramiques dont la composition chimique est encore mieux adaptée : le phosphate de calcium appelé hydroxyapatite est utilisé en raison de sa composition chimique quasi identique à celle de l'os. En effet, ces matériaux présentent l'avantage d'être ostéoconducteurs, c'est-à-dire de favoriser la repousse osseuse au contact et la colonisation par l'os. Elles seront remplacées peu à peu par les tissus vivants. L'os est constitué de collagène et de phosphate tricalcique (75%). Ce dernier cristallisant suivant un système comparable à celui de l'apatite, l'hydroxyapatite (HAP) et le phosphate tricalcique (TCP) sont remplacées à 60 % par de l'os après six mois. Les vitrocéramiques (MgO-CaOSiO<sub>2</sub>) sont

utilisées pour les vertèbres artificielles. En outre, l'HAP poreuse et les céramiques à base de TCP sont biorésorbables. Le principal problème avec l'HAP est d'arriver à synthétiser une HAP ayant juste la bonne taille de pores pour que la colonisation cellulaire se fasse bien (cf chapitre II.3.1.3.2).

Nous trouvons des utilisations de l'HAP aussi comme matériaux de comblement dentaire et dans la chirurgie orthopédique. Des vaisseaux artificiels à base d'HAP frittées ont même été élaborés. L'utilisation des verres au phosphate assure une accroche de type quasi chimique avec le tissu osseux.

Nous utilisons principalement l'alumine et la zircone dans les têtes de prothèses de hanche, ainsi qu'en odontologie pour les implants.

Dans les céramiques les liaisons entre atomes ont un caractère iono-covalent : les liaisons ioniques ne sont pas directionnelles, elles tendent à maximiser les attractions et minimiser les répulsions isocharges ce qui conduit à des arrangements d'anions et cations très compacts. Alors que les liaisons covalentes sont directionnelles et conduisent quant à elles, à des arrangements covalents étendus. Le caractère plutôt ionique ou covalent dépend de la différence d'électronégativité des éléments formant la céramique suivant cette tendance générale : plus la différence d'électronégativité est grande, plus le caractère ionique est important, plus elle est faible, plus le caractère covalent prévaut. Ainsi, la fluorine ( $\text{CaF}_2$ ) est ionique à 90%, le carbure de silicium ( $\text{SiC}$ ) ne l'est qu'à 10%, alors que le dioxyde de silicium ou silice ( $\text{SiO}_2$ ) est ionique à 50%. Ce caractère iono-covalent implique des structures cristallines géométriques relativement compactes et étendus.

Il faut également retenir que les oxydes des céramiques techniques, sont composés majoritairement d'éléments métalliques et d'oxygène, comme par exemple : l'alumine ou oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ). Leur inertie chimique et leur biocompatibilité en font des matériaux valables pour les prothèses chirurgicales et dentaires. Les propriétés des céramiques peuvent également être utilisées pour réduire les frottements entre pièces mécaniques (prothèse de hanche) et combattre l'usure. Par exemple, jusqu'ici les articulations artificielles mettaient en contact une partie métallique avec une cavité en polyéthylène (PE), ce qui provoquait la production de poussières avec des conséquences néfastes. Désormais, nous recouvrons les parties en contact à l'aide d'aluminates à haute dureté qui assurent une faible production de corps étrangers [37].

#### **I.2.4.1 Les céramiques oxydes**

Nous effectuons une brève description des deux céramiques bio-inertes les plus importantes [38]:

##### **a. l'alumine (oxyde d'aluminium $\text{Al}_2\text{O}_3$ )**

L'alumine est considérée comme parfaitement biocompatible, car qu'elle est chimiquement inerte et isolante électrique. L'aluminium a une bonne résistance à la corrosion. De par sa grande affinité pour l'oxygène, une couche d'alumine recouvre rapidement la surface de l'aluminium lorsqu'il est en contact avec une atmosphère oxydante. Cette couche est parfaitement couvrante et protège le métal sous-jacent. De plus, il est possible d'accroître cette protection par les traitements d'oxydation anodique (anodisation).

L'alumine un composé chimique que nous trouvons à l'état naturel dans la bauxite. Elle s'y présente hydratée et mélangée à de l'oxyde de fer. Le procédé Bayer permet d'extraire chimiquement l'alumine de la bauxite.

L'oxyde d'aluminium existe sous plusieurs formes cristallines : la forme  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> appelé corindon, et la forme  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> qui constitue, avec l'oxyde de magnésium, le spinelle de formule MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

L'alumine est l'un des composés les plus durs, elle est donc mécaniquement très résistante, inerte, utilisée comme réfractaire (résistant aux fortes températures), abrasive (sous sa forme corindon). Compte tenu de sa masse volumique très faible (3,97 g·cm<sup>-3</sup>), son coefficient de frottement (0,1-0,4) très bas, son taux d'usure presque nul et son coefficient de résistance à la compression excellent (400 MPa), elle est utilisée pour la réalisation des prothèses de hanche.

b. la zirconie (oxyde de zirconium ZrO<sub>2</sub>)

La zirconie possède des caractéristiques intéressantes, car elle présente une élasticité identique à celle des métaux et une ductilité élevée.

Le module d'élasticité de la zirconie relativement bas (98 GPa), autorise une légère déformation du matériau avant rupture, chose unique dans la classification des matériaux à rupture fragile. Ceci permet une certaine absorption des contraintes dans le matériau qui répond particulièrement bien aux tests de fatigue décrit au **Tableau II**.

**Tableau II** : caractéristiques des propriétés mécaniques de la zirconie en comparaison avec d'autres matériaux à usage médical

<b>Résistance à la flexion</b>		
	<b>Matériau</b>	<b>Résist. / Flexion (MPa)</b>
<b>Matériaux à rupture fragile</b>	Zirconie (non HIP)	1100 à 1150
	Alumine	300 à 600
	Céramique infiltrée	600 à 750
	Céramique dentaire renforcée pressée	350
	Céramique dentaire de stratification et verre	90 à 100
<b>Matériaux ductiles</b>		
	Titane	350 à 450
	Acier	300 à 800
	Alliages précieux	250 à 500

Il en existe deux types : la zirconie non stabilisée ou intrinsèque, utilisée en tant qu'additif, comme matériau de revêtement [39], elle possède d'excellentes propriétés mécaniques aux températures élevées, une conductivité thermique faible à température ambiante (22,7 W/m/K), une grande dureté (1 200 Vickers), une bonne résistance à l'usure, une bonne inertie chimique. La zirconie stabilisée à l'aide d'additifs comme l'yttrium (ZrO<sub>2</sub>/Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), la magnésie

(ZrO<sub>2</sub>/MgO), ou par CaO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, à des taux de l'ordre de 5 à 10%. Les zircons partiellement stabilisés présentent une forte résistance à la compression et aux chocs thermiques.

Alors que son application pour la réalisation de prothèses dentaires ne cesse de croître, elle a été abandonnée comme biomatériaux des prothèses de hanches.

Il existe d'autres facteurs qui influencent les propriétés de la zircone. Ainsi, il a été démontré, que l'influence de la taille des grains pouvait agir sur la résistance à la corrosion de la zircone. Ainsi, l'affinement de la taille des grains peut améliorer la résistance à la corrosion du métal zirconium [40]. Des variations dans la composition chimique, dans la microstructure et de la rugosité d'implants dentaires en zircone commercialement disponibles étaient fortement présentes. Selon que nous observions la zone du collet (zone cervicale) ou du corps (racine) après analyses [41]. Il a été décelé également une pollution par la présence d'éléments C, O, Zr et Y (collet) et Al (racine) sur les surfaces d'implants ZrO<sub>2</sub>, une corrosion des éléments Zr, Y et Al totalement oxydés, une contamination par les éléments Na, K et Cl présents en trace sur la racine des pièces d'implants. Des variations dans la composition cristallographique (DRX) ont révélé la présence de zircone monoclinique et quadratique avec des phases d'oxyde d'yttrium cubique. Des variations de la fraction volumique de la zircone monoclinique étaient plus élevées à la surface des racines qu'au collet (Raman),

Les différences de compositions observées sur les implants de commerce sont dues à la contamination au carbone, la teneur résiduelle en alumine, la transformation de phases quadratique à monoclinique de ZrO<sub>2</sub> et la rugosité de surface mal définie.

Tous ces paramètres peuvent contribuer à une différenciation importante dans les réponses cellulaire et tissulaire, car le simple changement d'un paramètre de rugosité ou de porosité de surface sur des oxydes de revêtements influence fortement les propriétés de ces matériaux [39].

#### c. autres oxydes

Pour mémoire, l'utilisation de l'oxyde de magnésium (MgO) ou l'oxyde de zinc (ZnO) sont des matériaux de renforcement dans les composites métalliques.

En résumé, les propriétés des céramiques techniques sont dues à leur structure cristallographique qui, en fonction de l'arrangement de la maille élémentaire va rendre le matériau biocompatible [40]. Un autre élément influence ces propriétés, il s'agit de la différence d'électronégativité des oxydes ou des nitrures [41].

#### **I.2.4.2 Les céramiques composites**

Cette classe de matériaux comprend des oxydes associés à des polymères. L'impact des maladies des os et des traumatismes dans les pays développés peut être traité par les verres bioactifs, en particulier avec des matériaux à base de silice. Ils sont appelés à jouer un rôle dans ce domaine en raison de leurs propriétés ostéoconductrice, ostéoproductrice et ostéoinductrice [43] [44]. Durant les dernières années, les procédés sol-gel et de la chimie supramoléculaire de tensio-actifs ont été incorporés au domaine biocéramiques, permettant à

la porosité du bioverre d'être contrôlée à l'échelle nanométrique [45]. Cette avancée a promu une nouvelle génération de verres sol-gel bioactifs plus performants avec des applications comme les systèmes de délivrance de médicaments, ou pour des greffes de régénération [46]. Ainsi, la combinaison de verres à base de silice avec des composants organiques ont conduit à de nouveaux matériaux organiques-inorganiques hybrides aux propriétés mécaniques améliorées. Et enfin, un effort a été fait pour organiser au niveau macroscopique la préparation de verre sol-gel. Cet effort a abouti à la création de nouveaux échafaudages macroporeux en trois dimensions, aptes à être utilisés dans les techniques d'ingénierie tissulaire ou comme pièces poreuses pour être implantées in situ.

La faiblesse des céramiques réside dans l'observation de mécanismes de dégradation qui influence la durabilité, la résistance à la fracture ou l'adhésion des protéines ou des cellules en surface.

Avec les céramiques biorésorbables, plusieurs problèmes peuvent être évoqués comme le contrôle de la biorésorption ou les effets de la stérilisation.

### **I.3 FACTEURS INFLUENÇANT LA BIOCOMPATIBILITÉ**

Selon la catégorie dans laquelle nous pouvons les classer, les matériaux donnent des résultats différents les uns des autres, impliquant qu'un matériau biocompatible ne le devient plus si, il est utilisé dans un domaine d'application médicale autre que celui pour lequel il est le plus performant. Indépendamment de la nature des matériaux, plusieurs autres paramètres peuvent influencer leur caractère biocompatible.

#### **I.3.1 Rugosité**

La modification de surface d'un matériau pour en améliorer la biocompatibilité est devenue un axe fort du développement scientifique et technique. Pour preuve simple, des changements radicaux de la morphologie de surface de matériaux implantés dans la forme et dans le volume, ont radicalement été modifiés ces deux dernières décennies, pour une même correction d'un handicap ou d'une fonction [47]. La compréhension actuelle de la biocompatibilité de surface s'appuie sur des procédés mécaniques (grenailage) ou chimique (mordançage à l'acide, anodisation) en vue de fournir une amélioration du procédé de l'ostéointégration et de mieux contrôler la cicatrisation, par une action aux niveaux moléculaire et cellulaire. En effet, par des modifications de surface, il a été démontré que la réponse cellulaire est alors plus précise à l'interface entre les tissus vivants et les matériaux inertes. Cela permet alors une plus haute intégration biologique pour une meilleure guérison des applications de l'ingénierie tissulaire, avec un minimum de rejets [48].

La bioactivité améliorée des alliages, après modification de surface, est alors démontrée ou pas par culture cellulaire *in vitro* utilisant des cultures de référence, comme les ostéoblastes humains type SaOS2 qui est une lignée cellulaire reproductible possédant une expression de son ADN lui permettant de se différencier par rapport à d'autres lignées humaines normales

par l'élaboration de protéines différenciables des autres lignées, grâce à l'expression de son ARNm.

Il n'existe pas de modèles référencés pour améliorer les performances d'un matériau possédant au départ des qualités biocompatibles. Ainsi, à la lecture de la bibliographie, un panel de techniques est à notre disposition avec deux axes principaux : modifier la typologie de rugosité (cf chapitre II.3.1.1 et suivants), ou modifier la composition chimique de surface (cf chapitre II.3.1.2).

Dans tous ces cas, les études ont toutes une ligne commune : améliorer la biocompatibilité à l'interface à partir de propriétés déjà connues d'un matériau. Cela passe par une modification de sa surface qui influence les propriétés pour lesquelles le biomatériau avait été choisi. Les résultats recherchés sont des valeurs mécaniques plus élevées afin de lutter contre l'usure ou pour améliorer l'accroche cellulaire. Le but visé est la colonisation cellulaire la plus rapide et la plus durable à l'interface tissu vivant-biomatériau. Nous agissons alors sur l'inflammation transitoire post opératoire et évitons un état chronique de rejet, qui aboutirait alors à un échec thérapeutique.

Quels sont les procédés actuels pour créer la rugosité ? Diverses méthodes ont été développées pour créer une surface rugueuse : le dépôt d'un revêtement de surface, le sablage avec des particules de céramique, le mordantage à l'acide et l'anodisation.

### **I.3.1.1. Modification de surface d'implant dentaire par sablage**

Pour rendre rugueuse la surface en titane, la solution la plus simple consiste à sabler la surface des implants avec des particules de céramique dure. Elles sont projetées à haute vitesse en sortie d'une buse par l'intermédiaire d'air comprimé. Selon la taille des particules de céramique, des rugosités de surface différentes peuvent être produites sur les implants titane. Les particules de sablage doivent être chimiquement stables et elles ne doivent pas entraver l'ostéointégration des implants en titane. Diverses particules de céramiques sont utilisées, comme l'alumine ( $Al_2O_3$ ), les oxydes de titane ( $TiO_2$ ) et les particules de phosphate de calcium (PdC).

Si l'alumine  $Al_2O_3$  est fréquemment utilisée comme matériau de sablage, elle reste souvent intégrée dans la surface de l'implant après le nettoyage par ultrasons, au bain d'acide de passivation et lors de la stérilisation. En effet, l'alumine est insoluble dans l'acide et est donc difficile à enlever de la surface du titane. Dans certains cas, ces particules vont être libérées dans les tissus environnants et vont interférer contre l'ostéointégration des implants.

Par ailleurs, cette l'hétérogénéité chimique de la surface de l'implant peut diminuer l'excellente résistance à la corrosion du titane en bouche [49].

Concernant les particules d'oxyde de titane  $TiO_2$  avec une taille moyenne de 25  $\mu m$ , elles permettent de produire une surface modérément rugueuse avec un  $Ra = 1-2 \mu m$  sur les implants dentaires.

Une étude utilisant des microimplants sablés  $TiO_2$  chez l'homme a montré une amélioration significative de contact à l'interface os-implant pour ces implants en comparaison avec des implants à surfaces usinées ou par rapport à des implants en titane lisse [50] [51] [52] [53] [54]. Ces études ont montré que l'ancrage osseux avec une rugosité de surface des implants

est augmenté mais quel que soit la surface de préparation, il a été observé des valeurs comparables dans l'apposition osseuse [55]. Ces études corroborent le fait que la rugosité de surface des implants dentaires en titane permet d'augmenter leur fixation mécanique initiale dans l'os mais n'influence pas leur fixation biologique à long terme.

Enfin, le phosphate de calcium est un matériau biocompatible, ostéoconducteur et résorbable. Les phosphates de calcium tels que HAP,  $\alpha$ -PTC,  $\beta$ -PTC, et leurs mélanges sont résorbables, lors du nettoyage de la texture de surface du titane pur.

Des études ont démontré une ostéointégration osseuse plus élevée pour ces implants dentaires préparés par sablage de PdC, en comparaison à des implants aux surfaces usinées [56] [57].

### **I.3.1.2. Modification de surface d'implant dentaire par mordantage**

L'immersion d'implants en titane, pendant plusieurs minutes dans un double mordantage à l'acide, qui est un mélange d'acide chlorhydrique concentré et l'acide sulfurique, est employée pour produire une surface microrugueuse. Le double mordantage de surface améliore le processus ostéoconducteur de l'attachement de la fibrine et des cellules ostéogéniques en contact direct avec la surface de l'implant [58]. De fines trabécules osseuses dans la zone péri-implantaires, tissé d'os sur les implants ont également été décrites [59]. L'hypothèse émise est que les implants traités par deux mordantages à l'acide ont une topographie spécifique capable de s'attacher à la trame de la fibrine pour favoriser l'adhérence ostéogénique des cellules et ainsi favoriser l'apposition osseuse [60] [61]. Cette adhésion de la fibrine donne des indications de contact pour les ostéoblastes qui migrent le long de la surface.

Une autre approche consiste à traiter des implants dentaires en titane dans les solutions de fluorure. Le titane est très réactif aux ions fluorures, formant des molécules solubles  $TiF_4$ . La rugosité de surface par l'incorporation de fluorure est favorable à l'ostéointégration des implants dentaires [62] [63]. Néanmoins, les traitements chimiques pourraient réduire les propriétés mécaniques du titane. Ainsi, le mordantage à l'acide peut conduire à des fragilisations par l'action de l'hydrogène sur le titane, créant des microfissures à sa surface qui pourraient réduire sa résistance à la fatigue [64]. En effet, l'absorption d'hydrogène par du titane est associée à la formation d'une phase d'hydrures cassante et qui conduit donc à une réduction de la ductilité du titane. Ce phénomène est lié à l'apparition de mécanismes de rupture dans les implants dentaires [64].

### **I.3.1.3. Modification de surface d'implant dentaire par anodisation**

Les surfaces micro-ou nano-poreuses peuvent également être produites par anodisation potentiostatique ou galvanostatique du titane dans les acides (acide sulfurique  $H_2SO_4$ , acide phosphorique  $H_3PO_4$ , acide nitrique  $HNO_3$ , acide fluorhydrique HF) à haute densité de courant ( $200A/m^2$ ) ou potentiel (100 V). Le résultat de l'anodisation est d'épaissir la couche d'oxyde à plus de 1000 nm sur le titane. Lorsque les acides forts sont utilisés dans une solution électrolytique, la couche d'oxyde sera dissoute le long des lignes de courant de convection pour s'épaissir du côté opposé. Cela crée des nano-pores à la surface du titane [65] [66].

L'anodisation produit des modifications dans la microstructure et la cristallinité de la couche d'oxyde de titane [67]. Le processus d'anodisation est assez complexe et dépend de divers

paramètres tels que l'intensité du courant, la concentration des acides, la composition et la température de l'électrolyte.

La réponse osseuse est plus élevée en comparaison avec des surfaces usinées [68] [69]. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer cette ostéointégration: une mécanique de verrouillage par la croissance de l'os dans les pores, associée à une biochimie d'adhésion [70] [71].

Des modifications dans la composition chimique de la couche d'oxyde de titane ont été testées avec l'incorporation de magnésium, de calcium, de soufre ou de phosphore [72] [73]. Il a été démontré que l'incorporation de magnésium dans la couche d'oxyde de titane conduit à une valeur de couple ionique élevée par rapport à d'autres ions [70].

Pour conclure, la rugosité de surface joue un rôle majeur dans les qualités et la vitesse de l'ostéointégration de l'implant en titane utilisé en dentaire.

#### **I.3.1.3.1 Modification morphologique de surface**

Le matériau idéal n'existant pas, des recherches proposent l'amélioration des performances d'un biomatériau en agissant sur la surface par la création de micro- ou nano-reliefs [47], de nanostructures ou nanotubes [74], d'une couche mince plus réactive chimiquement au collage [75] [76], d'une couche mince sur un alliage, à partir d'un autre bioalliage, pour augmenter les propriétés de biocompatibilité. Citons l'alliage de titane revêtu d'une couche de zircone [77]. Nous pouvons aussi modifier la surface par la création d'un matériau composite pour obtenir des propriétés mécaniques similaires à l'os et sa corticale avec une haute bioaffinité. Citons la zircone ( $ZrO_2$ ) revêtue d'une couche d'hydroxyapatite (HAP) [78]. L'HAP peut également subir des modifications physico-chimiques [79]. A l'opposé, nous pouvons rechercher l'obtention d'une surface ultra-lisse pour augmenter considérablement la résistance à l'usure [80][81].

#### **I.3.1.3.2 Modification chimique de surface**

##### **a. Les hydroxyapatites**

Les phosphates de calcium (PdC) sont des solides blanchâtres qui composent la partie minérale de l'os et des dents. Nous trouvons également du phosphate de calcium dans le plasma sanguin, et le cytoplasme. Nous les retrouvons principalement sous 3 formes. Leurs formules sont pour le phosphate tricalcique  $Ca_3(PO_4)_2$ , l'apatite :  $Ca_5(Mg, Fe)(PO_4)_3(OH)$  et pour la whitlockite :  $Ca_9(Mg, Fe)(PO_4)_6(PO_3OH)$ .

L'apatite est un nom générique désignant des phosphates hexagonaux de composition assez variable :  $Ca_5(PO_4)_3(OH, Cl, F)$ . Trois formes principales sont reconnues et nommées selon l'anion prévalent : la chlorapatite de formule  $Ca_5(PO_4)_3Cl$ , la fluorapatite de formule  $Ca_5(PO_4)_3F$ , et l'hydroxyapatite nommée  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ . L'enzyme catalysant sa fixation sur l'os est la phosphatase alcaline.

Le phosphate de calcium est utilisé en chirurgie dentaire et osseuse, comme biomatériau bioactif, en raison de sa tolérance par l'organisme. La forme commerciale contient 96 % de  $Ca_3(PO_4)_2$ , et de la chaux (CaO).

Mais, si l'idée de faire appel à un matériau retrouvé naturellement dans le corps comme moyen de modifier de façon physico-chimique la surface d'un biomatériau [78][82][83] semble logique pour améliorer la biocompatibilité de manière significative [84], la réalité clinique n'est pas aussi simple [85].

La force d'adhérence faible du revêtement à l'hydroxyapatite (HAP) est un point faible dans son application en tant que prothèse biomédicale [86]. Et, en fonction de l'alliage, il a été observé que cette force d'adhérence à la traction du revêtement HAP sur le métal est significativement modifiée selon la composition de l'alliage [87] ou de sa structure cristallographique [88], sur lequel est réalisé le film HAP. Pour améliorer cela, nous pouvons citer comme exemple l'utilisation de l'oxyde d'yttrium sur de la zircone, qui stabilisée alors en structure cristallographique  $\beta$ , a permis d'améliorer les propriétés mécaniques des revêtements HAP. Les résultats indiquent que la décomposition de l'HAP est réduite de manière significative [88]. De plus, des quantités d'oxyde de calcium (CaO), de phosphate tricalcique (PTC) et le phosphate tétracalcique (PTTC) se sont formées sur ces revêtements HAP modifiés.

Les contraintes de traction ne sont pas générées dans la couche, mais à l'interface entre le revêtement et son alliage, entraînant ainsi, le relargage dans un premier temps de l'HAP revêtu, puis celui des particules de l'alliage. L'utilisation de l'HAP comme couche mince en revêtements d'alliage, retarde ainsi le relargage ionique de l'alliage [85], ou favorise la fixation mécanique d'une pièce prothétique scellée, par stimulation de l'apposition osseuse directe plutôt que l'encapsulation de la prothèse par du tissu fibreux [89].

Si en présence d'un matériau placé dans le corps humain, celui-ci permet la formation d'apatite à sa surface [90], il est alors considéré comme biocompatible. Il faut alors rechercher dans un second temps, la meilleure topographie de surface pour performer ses propriétés. Ainsi, il est apparu qu'en utilisant la zircone en nanoparticules ou nanotubes, l'apatite naturelle se précipite alors beaucoup plus vite [90] [91].

Un autre axe de recherche est le choix de la forme des phosphates de calcium (PdC) utilisés en revêtements, autre que la simple utilisation de l'HAP [92].

### **b. Revêtements ioniques**

Par polymérisation de précurseurs moléculaires en solution, il est possible d'obtenir des matériaux vitreux sans passer par l'étape de fusion. Nous disposons par ces méthodes de matériaux massifs, des procédés bien adaptés à la réalisation de revêtements, aboutissant à la création de matériaux purement inorganiques. En associant ces deux mondes, organique et inorganique, la synthèse sol-gel ouvre un champ nouveau dans le domaine des matériaux vitreux. Les implications de ces procédés sont variées [93] [94], citons par exemple l'augmentation de la biocompatibilité par une inhibition de l'adhésion cellulaire sur des valves cardiaques artificielles en carbone vitreux polymérique (CVP) [94], l'augmentation de la réponse cellulaire par création d'un dépôt de calcium ionique en surface d'alliage titane et d'alliage titane-zirconium [95], ou encore la modification des propriétés électrochimiques retardant les effets de la corrosion [96].

### **I.3.2 Stérilisation**

La stérilisation dont le but est de permettre au biomatériau d'assurer la cytocompatibilité est une procédure indispensable dans l'utilisation de tout matériau placé dans le corps humain.

Il existe trois méthodes de stérilisation couramment utilisées, l'autoclavage, l'irradiation et l'immersion dans un bain éthanol. Mais, les méthodes ne donnent pas tous les mêmes résultats car elles peuvent influencer la biocompatibilité du type de matériau à stériliser, par une attaque de surface sur certains alliages, entraînant un vieillissement accéléré.

Les résultats montrent que les méthodes de stérilisation affectent sensiblement la cytocompatibilité des alliages [97]. Les UV et la stérilisation à l'éthanol donner lieu à une énergie de surface plus élevée mais sans susciter un accroissement de l'adhésion et la prolifération cellulaire initiale par rapport à l'autoclavage, alors que l'irradiation par UV produit les meilleures fonctions cellulaires, y compris l'adhérence, la prolifération, ainsi que la différenciation mesurée par l'expression de gènes.

Les résultats suggèrent que le processus de stérilisation joue un rôle important dans la cytocompatibilité observée des oxydes de titane et peut être la raison pour laquelle les résultats restaient controversés jusqu'ici. La stérilisation par UV se trouve être la meilleure méthode du point de vue de l'élimination de la contamination de surface [98][99][100].

## **I.4 IMPLANT DENTAIRE**

Pour mieux comprendre pourquoi la composition de la surface de l'implant, son degré d'hydrophilie et sa rugosité sont des paramètres qui jouent un rôle dans l'interaction implant-tissu osseux, nous allons développer toutes ces notions.

### **I.4.1. La composition chimique de la surface des implants dentaires et l'hydrophilie**

La composition chimique et les charges ioniques à la surface des différents implants en titane influencent l'adsorption des protéines et la fixation des cellules. Les implants dentaires sont fabriqués à partir de titane commercialement pur ou d'alliages de titane. Le titane pur est classé par un degré de pureté (grade de 1 à 4) et est caractérisé par les teneurs en oxygène, carbone et fer. Alors que les alliages de titane dentaire sont du TiAl6V4 (alliage grade 5) avec une résistance à la fatigue plus élevée que le titane pur [101].

La composition chimique de surface des implants en titane affecte l'hydrophilie de la surface. Les surfaces hydrophiles semblent préférables aux surfaces hydrophobes car elles favoriseraient les interactions avec les fluides biologiques, cellulaires et les tissus [102] [103]. Ainsi, des mesures d'angle de contact donnent des valeurs allant de 0° (hydrophile) à 140° (hydrophobe) pour des surfaces en titane [104] [105]. Mais, cette notion pourrait être contradictoire car d'autres études ont échoué à démontrer une meilleure ostéointégration en utilisant une surface hydrophile d'implants dentaires [106] [107].

#### **I.4.2. La rugosité de surface des implants dentaires (Ra)**

Des études démontrent que la rugosité de surface (Ra) des implants en titane affecte le taux d'ostéointégration et la fixation biomécanique [108] [109]. La rugosité de surface peut être divisée en trois niveaux selon l'échelle : macro, micro et nano-topologies.

Le niveau macro est défini pour des caractéristiques topographiques allant du millimètre à des dizaines de micromètres. Cette surface macro-rugueuse donne une rugosité de surface de plus de 10  $\mu\text{m}$ . Cela permettrait à la fois une fixation osseuse précoce et à long terme la stabilité mécanique des prothèses qui serait améliorée par un haut profil de rugosité par rapport aux surfaces lisses [31] [50] [110].

Si la macro-rugosité aboutit à un verrouillage mécanique entre la surface de l'implant et l'os en formation, un risque majeur de haute rugosité de surface aboutit à une augmentation de la péri-implantite, ainsi qu'à une augmentation de la fuite ionique des éléments cellulaires empêchant ainsi l'ostéogénèse [111].

Une rugosité modérée dite micro (de 1 à 2  $\mu\text{m}$ ) peut limiter les deux paramètres de péri-implantite et de fuite ionique [112]. Le profil microtopographique des implants dentaires est défini par une rugosité de surface comme étant de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{m}$ . Cette gamme de rugosité maximise l'imbrication entre l'os et la surface de l'implant [109] [110].

Un modèle théorique suggère que la surface idéale devrait être préparée avec des reliefs hémisphériques d'environ 1,5  $\mu\text{m}$  en profondeur et 4  $\mu\text{m}$  de diamètre [113].

La principale indication clinique d'un implant avec une surface rugueuse est l'utilisation en présence d'une mauvaise qualité ou d'un défaut du volume osseux de l'hôte devant recevoir son implant. Ainsi, dans le cas où la quantité d'os est insuffisante ou face à des contraintes anatomiques, les implants courts conçus avec une grossière surface ont démontré des résultats cliniques supérieurs aux surfaces lisses [32] [114].

Si les implants en titane avec des surfaces rugueuses ont plus de contact avec l'os que les implants en titane avec des surfaces plus lisses [108] [109], il n'a pas été trouvé la preuve clinique démontrant la supériorité d'une surface particulière d'implant [115].

Les profils de surface à l'échelle nanométrique jouent un rôle important dans l'adsorption des protéines et l'adhérence des cellules ostéoblastes et donc agit sur le taux d'ostéointégration [116]. Cependant, la reproductibilité de la rugosité de surface à l'échelle nanométrique est difficile à produire avec des traitements chimiques. Ainsi, le modèle de surface nano-topographique idéale pour l'adsorption sélective de protéines menant à l'adhésion rapide des cellules ostéoblastiques pour une apposition osseuse reste à définir.

#### **I.4.3. Les tendances futures dans les modifications de surfaces d'implant dentaire**

Ces tendances à venir concernent les modifications de rugosité de surface à l'échelle nanométrique pour le contrôle de l'adsorption des protéines et de l'adhésion cellulaire, avec l'élaboration de revêtements améliorant l'ostéoconduction et l'incorporation de médicaments biologiques pour accélérer le processus de cicatrisation osseuse dans la zone péri-implantaire. Ainsi, si nous désirons agir sur le facteur rugosité, il faut se rappeler que la plupart des surfaces actuellement disponibles ont une topographie aléatoire avec une large gamme d'épaisseurs (du nanomètre au millimètre). L'influence exacte de ces caractéristiques de surface reste malgré tout inconnue en raison de l'absence de surfaces normalisées avec une

topographie répétitive au niveau nanométrique (alvéoles en nids d'abeille). Ces surfaces normalisées pourraient aider à comprendre les interactions entre les protéines et les cellules spécifiques mais également favoriser l'apposition osseuse au début de l'ostéointégration.

Seules quelques études ont rapporté des modifications de la rugosité à l'échelle nanométrique d'une manière reproductible par des méthodes de traitement faisant appel à l'industrie de l'électronique tels que la lithographie de surface modifiée au laser [117] [118]. L'attachement des cellules ostéoblastiques a été renforcé sur ces structures à l'échelle submicronique comparées à des surfaces lisses par le développement de prolongements cytoplasmiques tels que des filopodes qui pénètrent directement dans les pores nanométriques de surface. On assure ainsi la fixation initiale des cellules ostéoblastiques. Ces structures nanométriques contrôlées peuvent également donner une orientation positive des cellules au moyen de la sélection de l'attachement des ostéoblastes à la surface de l'implant. Ce processus de fixation sélective pourrait conduire à l'amélioration de cicatrisation initiale autour des implants dentaires.

Alors que si nous désirons agir par l'incorporation de médicaments biologiquement actifs, la surface des implants dentaires en titane peut être revêtue d'agents osseux stimulants tels que les facteurs de croissance pour améliorer le processus de guérison osseuse au niveau local. Nous pouvons citer les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), le TGF- $\beta$ 1, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et de l'insuline (IGF-1 et 2). Ils sont quelques-uns des candidats les plus prometteurs [119] [120]. A cet effet, le facteur limitant est que le produit actif doit être libéré progressivement et non en une seule rafale.

Une autre possibilité pourrait être l'adjonction d'un plasmide contenant le gène codant pour une BMP. Cette possibilité est limitée en raison de la faible efficacité des plasmides à s'insérer dans les cellules et permettre ainsi l'expression des protéines codées. En outre, la surproduction de BMP par les cellules pourrait ne pas être souhaitable après le processus de cicatrisation osseuse.

La surface des implants pourraient aussi être chargée avec des molécules contrôlant le processus de remodelage osseux. L'incorporation de médicaments anti-ostéoporosité, tels que les biphosphonates, pourrait être très pertinente dans les cas cliniques manquant de densité osseuse [121]. L'effet inhibiteur de la résorption osseuse par la drogue semble être limité au voisinage de l'implant. En raison de l'affinité chimique élevée des biphosphonates pour les surfaces de phosphate de calcium, l'incorporation de ce médicament sur les implants dentaires est actuellement envisagée dans les pays scandinaves. Toutefois, la dose idéale de ce médicament inhibiteur de la résorption osseuse devra être contrôlée dans sa concentration, car le biphosphonate est concentration-dépendante [122].

#### **I.4.4. Revêtements au phosphate de calcium pour implants dentaires**

Les implants métalliques sont revêtus d'une couche de phosphate de calcium principalement composée d'hydroxyapatite (HAP)  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ . Suite à l'implantation, la libération de phosphate de calcium dans la zone autour de l'implant augmente la saturation des fluides biologiques et précipite une apatite biologique sur la surface de l'implant [123] [124]. Cette couche d'apatite biologique peut contenir des protéines endogènes et sert de matrice pour la fixation des cellules ostéogéniques et leur croissance [125]. Le processus de cicatrisation osseuse autour de l'implant est donc renforcé par cette couche d'apatite biologique. La

fixation biologique des implants en titane au tissu osseux est plus rapide avec un revêtement de phosphate de calcium que sans [126] [127].

Ces taux de réussite à long terme sont dus à un taux supérieur initial de l'ostéointégration [128]. Différents méthodes ont été développées pour l'apposition d'une couche d'HAP sur des implants en titane : PVD, revêtement sol-gel, électrophorèse par dépôt.

Toutefois, seul le procédé de revêtement par projection thermique a été utilisé pour le revêtement d'implants dentaires en titane par du HAP en pratique clinique. La projection thermique est la technique dans laquelle des particules d'hydroxyapatite (HAP) sont injectées dans une torche à plasma à haute température et sont projetées sur la surface du titane où HAP se condensent et fusionnent, formant un revêtement avec une épaisseur allant de quelques micromètres à quelques millimètres. Pour d'obtenir une rétention mécanique du revêtement, la surface de l'implant sera rugueuse, par exemple au moyen d'une technique de sablage. Mais cette méthode de projection thermique présente des inconvénients de porosité du revêtement à l'interface substrat-revêtement ainsi que des changements dans la composition et la cristallinité du phosphate de calcium initial en poudre [129] [130]. Plusieurs phases de phosphate de calcium ont été observées dans le revêtement à HAP telles que les phosphates tricalcique ( $\alpha$  et  $\beta$ -TCP)  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , phosphate tétracalcique  $[\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}]$ , l'oxyde de calcium  $[\text{CaO}]$  et de phosphate de calcium amorphe (PCA) [131] [132].

Les couches projetées d'HAP sont composées de grosses particules cristallines d'HAP incorporées dans une phase soluble amorphe de phosphate de calcium. Par ailleurs, la technique de projection plasma n'est pas adaptée à la réalisation de revêtements fins sur implants dentaires avec une forme complexe. En effet, les implants dentaires revêtus d'HAP par cette technique ont révélé des problèmes cliniques [133] [134]. L'un des principaux échecs est le délaminage entre le revêtement et la surface de l'implant en titane. La délamination à l'interface implant-revêtement ainsi que des vitesses différentes dans la dissolution entre les différentes phases HAP font que le revêtement conduit à la libération de particules ioniques et aboutit ainsi à l'échec clinique d'implants dentaires posés [133] [134].

Pour toutes les raisons ci-dessus citées, l'utilisation clinique d'HAP comme revêtement par la technique à de projection thermique pour des indications d'implants dentaires est limitée. Ce type de traitement a néanmoins beaucoup plus de succès dans l'orthopédie.

### **Conclusion bibliographique**

Un certain nombre de surfaces sont commercialement disponibles pour les implants dentaires et pour tout implant à visée humaine. La plupart de ces surfaces ont prouvé une efficacité clinique (> 95% sur 5 ans). Cependant, le développement de ces surfaces a été empirique, nécessitant de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo*. La plupart de ces tests ne sont pas normalisés, utilisant des surfaces, des populations de cellules ou des modèles animaux différents.

Le rôle exact, de la chimie de surface et de sa topographie sur les événements précoces de l'ostéointégration des implants dentaires ou autres, reste mal compris. Par ailleurs, les études cliniques comparatives avec des surfaces d'implants différents sont rarement effectuées. Le futur de l'implantologie doit viser à développer les surfaces avec une topographie contrôlée et

normalisée ou grâce à la chimie de synthèse permettant de copier les processus de modelage primaire à une intégration initiale de l'implant. Cette approche est la seule façon de comprendre le comportement des protéines, des interactions cellulaires et tissulaires avec des surfaces d'implants. La libération de médicaments (revêtus en surface des implants) peut stimuler l'os ou permettre la résorption de la péri-implantite dentaire et peut également répondre à des situations cliniques difficiles comme une mauvaise qualité ou quantité osseuse. Ces stratégies thérapeutiques devraient renforcer le processus d'ostéointégration des implants pour leur mise en charge immédiate et obtenir un succès à long terme.

Ramené à ce qui se rapproche de mon domaine de compétence, ainsi que dans le cadre de notre recherche de thèse, nous retenons que la biocompatibilité est influencée par la nature chimique de l'alliage voire de sa surface. Il existe de nombreux alliages considérés comme biocompatibles, mais le sont-ils tous de la même manière ? Gardent-ils tous cette qualité à court, moyen et long terme ? Existe-il un procédé d'amélioration de leurs qualités, et diminuer ainsi un vieillissement trop prématuré? Ce sont les principales questions que nous avons soulevées après ce rappel de la littérature. Et, elles ont été à la base de notre dispositif de recherche, que nous allons développer dans les chapitres suivants.

**CHAPITRE II**  
**MÉTHODES EXPÉRIMENTALES**

## II.1 RAPPELS SUR LA PULVÉRISATION CATHODIQUE MAGNÉTRON [157]

D'une manière générale, les propriétés finales d'un matériau sont liées à sa composition, à son processus d'élaboration, à sa mise en forme et à son milieu environnant (thermique, mécanique, chimique). La qualité d'un revêtement dépend donc de la méthode de dépôt qui doit être choisie en fonction de l'application envisagée. Des travaux antérieurs ont déjà permis d'établir la faisabilité d'un film mince de zircone yttrée à partir d'un système de pulvérisation cathodique magnétron [135].

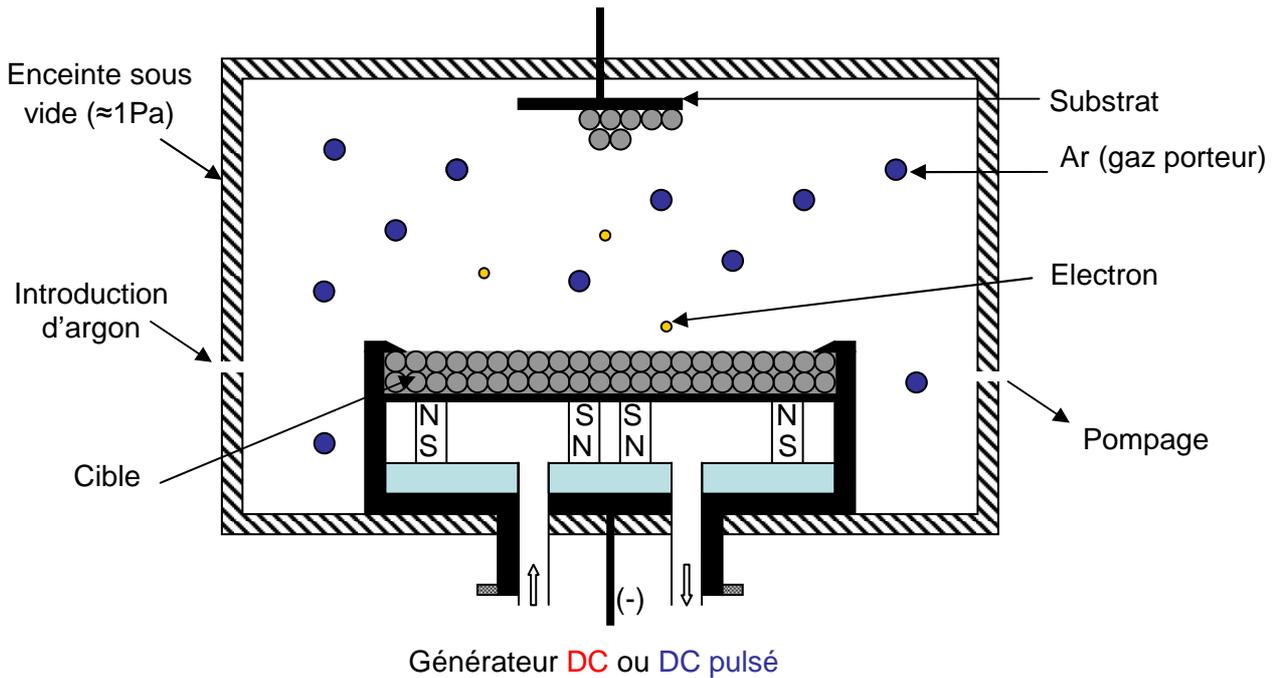
A partir de ces éléments, notre étude sera principalement axée sur la méthode d'élaboration par pulvérisation cathodique magnétron en focalisant l'approche sur la réalisation d'un dépôt dense, de faible épaisseur et biocompatible.

Dans un premier temps, ce chapitre présentera un rappel du fonctionnement général d'une enceinte de pulvérisation cathodique en évoquant de manière plus particulière les mécanismes permettant l'obtention de dépôts denses et minces. Les différents paramètres seront présentés afin d'évaluer et de mettre en évidence les principales difficultés liées à l'utilisation de ce système. Dans un second temps, les différents dispositifs expérimentaux permettant une vérification de l'obtention des propriétés requises au niveau du dépôt élaboré seront décrits.

### II.1.1 Principe de fonctionnement

La pulvérisation cathodique magnétron fait partie de la famille des procédés de dépôt par voie sèche et plus spécifiquement de dépôt en phase vapeur. Dans ce procédé l'énergie des espèces pulvérisées est de quelques eV et les vitesses de dépôt de l'ordre de quelques  $\mu\text{m.h}^{-1}$ .

Un réacteur PVD se présente sous la forme d'une enceinte étanche reliée à un système de pompage qui permet de faire le vide. A l'intérieur de cette enceinte, le matériau à déposer (cible) est fixé sur une embase refroidie que nous polarisons avec une tension négative de quelques centaines de volts par rapport à l'enceinte qui est maintenue à la masse. En général, le porte substrat est isolé électriquement de l'enceinte pour pouvoir être polarisé. En fonctionnement, la cible est « pulvérisée » par le bombardement des ions qui sont formés dans la décharge entre les deux électrodes (Figure 1). Nous parlons de pulvérisation car, c'est l'effet mécanique du bombardement ionique qui permet l'obtention de la vapeur métallique.



**Figure 1** : schéma général d'un réacteur de pulvérisation cathodique

L'élaboration des dépôts implique trois étapes : (i) la production d'une vapeur obtenue par bombardement de la cible, (ii) son transfert au sein de la phase gazeuse et (iii) sa condensation directement ou par l'intermédiaire d'une réaction chimique (avec des éléments de l'environnement) sur le substrat froid placé en vis-à-vis.

La réalisation de dépôts par pulvérisation cathodique se fait en général à basse température (<250°C) et basse pression (entre 0,1 Pa et 1 Pa) en présence d'un plasma de gaz rare (argon).

### II.1.1.1 Production des espèces et mécanismes de pulvérisation

La pulvérisation du matériau de la cible nécessite l'utilisation d'un gaz « plasmagène » (également appelé gaz porteur) qui produira les ions nécessaires à la pulvérisation de la cible. La nature de ce gaz conditionne le taux de pulvérisation de la cible, c'est à dire le nombre d'atomes pulvérisés par effet balistique en fonction du nombre d'ions incidents (1) :

$$Y_M = \frac{N_{ap}}{N_{ii}} \quad (1)$$

Avec

$Y_M$  : taux de pulvérisation

$N_{ap}$  : nombre d'atomes pulvérisés

$N_{ii}$  : nombre d'ions incidents

D'une manière générale, plus le numéro atomique de l'ion est élevé, plus l'effet balistique et donc l'efficacité augmente. Toutefois, en pratique nous utilisons principalement l'argon comme gaz plasmagène car il présente un effet balistique appréciable pour un coût d'utilisation modéré. Ainsi, à l'intérieur de l'enceinte PVD, l'application d'une différence de potentiel entre la cible et les parois du réacteur au sein d'une atmosphère raréfiée permet, par ionisation du gaz résiduel, la création d'un plasma « froid » (hors équilibre), composé d'électrons, d'ions, de photons et de « neutres » dans un état fondamental ou excité. Le plasma est un milieu conducteur dans lequel un courant électrique s'établit entre les deux électrodes. Sous l'effet du champ électrique, les électrons sont attirés par l'anode (substrat) et les ions positifs  $\text{Ar}^+$  du gaz porteur sont accélérés vers la cathode (cible). Les espèces positives  $\text{Ar}^+$  entrent en collision avec les atomes de la cible et communiquent leur quantité de mouvement aux atomes environnants. Ainsi, les atomes se communiquent cette quantité de mouvement de proche en proche, jusqu'à l'éjection d'un ou plusieurs atomes de surface.

La décharge « diode » est entretenue par les électrons secondaires éjectés de la cathode sous l'effet du bombardement ionique. Cependant, afin de permettre les collisions ionisantes avec le gaz porteur, la pression doit être suffisamment élevée pour que le libre parcours moyen (distance moyenne entre deux collisions successives) des électrons soit inférieur à la distance cible-substrat.

Pour d'améliorer l'efficacité du système, nous équipons généralement la cible d'un dispositif magnétron, constitué de deux aimants concentriques de polarités inverses afin de modifier les trajectoires électroniques et ainsi favoriser l'ionisation du milieu en augmentant la probabilité de chocs entre les électrons et les neutres d'argon (Figure 2).

Une pièce polaire ferme le circuit magnétique d'un côté tandis que la cible, amagnétique pour permettre l'effet magnétron, laisse les lignes de champ se refermer au sein de la phase gazeuse.

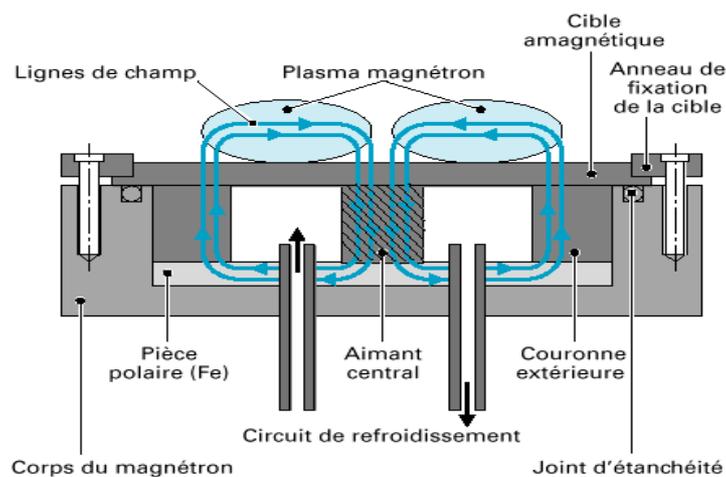


Figure 2 : schéma de principe du dispositif magnétron [157]

L'ajout de deux aimants permanents concentriques de polarités inverses au niveau de la cible permet la création d'un champ magnétique parallèle à la surface de la cible et donc orthogonal au champ électrique  $E$ . La force de Lorentz induite provoque ainsi un mouvement hélicoïdal des électrons autour des lignes de champ magnétique, ce qui augmente considérablement la probabilité de collisions des électrons avec les atomes d'argon, donc le taux d'ionisation et, par conséquent, la vitesse de pulvérisation de la cible.

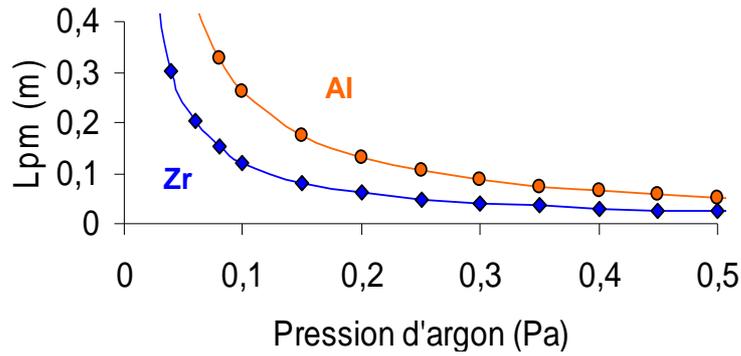
Lors du dépôt, la décharge est auto-entretenu par les électrons secondaires émis par la cible et « piégés » par les lignes de champ. Une décharge luminescente est alors concentrée dans la zone où le champ magnétique est le plus intense.

L'ionisation des atomes d'argon libère aussi des électrons qui sont également piégés par les lignes de champ et qui transmettent une partie de leur énergie cinétique à d'autres atomes d'argon qui vont s'ioniser à leur tour. Nous obtenons ainsi un effet d'avalanche et une probabilité de collision entre les atomes d'argon et les électrons beaucoup plus importante. Un plasma dense est alors généré au niveau de l'entrefer des aimants, ce qui conduit à augmenter considérablement le courant de décharge et donc la vitesse de dépôt qui peut atteindre  $10 \mu\text{m.h}^{-1}$  [157]. Ceci intervient toutefois au détriment d'une érosion hétérogène de la cible puisque le champ magnétique n'est pas homogène au niveau de la cible. L'utilisation d'un magnétron permet également d'amorcer et d'entretenir la décharge pour de plus faibles pressions de travail, améliorant de ce fait la qualité des revêtements (densité, cohésion).

### II.1.1.2 Transport des espèces de la cible vers le substrat

Le transport des espèces de la cible vers le substrat est conditionné par la nature des espèces présentes et par leur densité liée à la pression de travail qui est typiquement située entre 0,1 et 1 Pa. Lors de leur trajet entre la cible et le substrat, les atomes de métal pulvérisés subissent aussi des collisions avec les atomes d'argon, au cours desquelles ils sont susceptibles de perdre une partie de leur énergie cinétique. Le nombre de collisions est proportionnel à la distance parcourue par l'atome pulvérisé et à la pression de travail qui conditionne la probabilité de chocs dans le plasma.

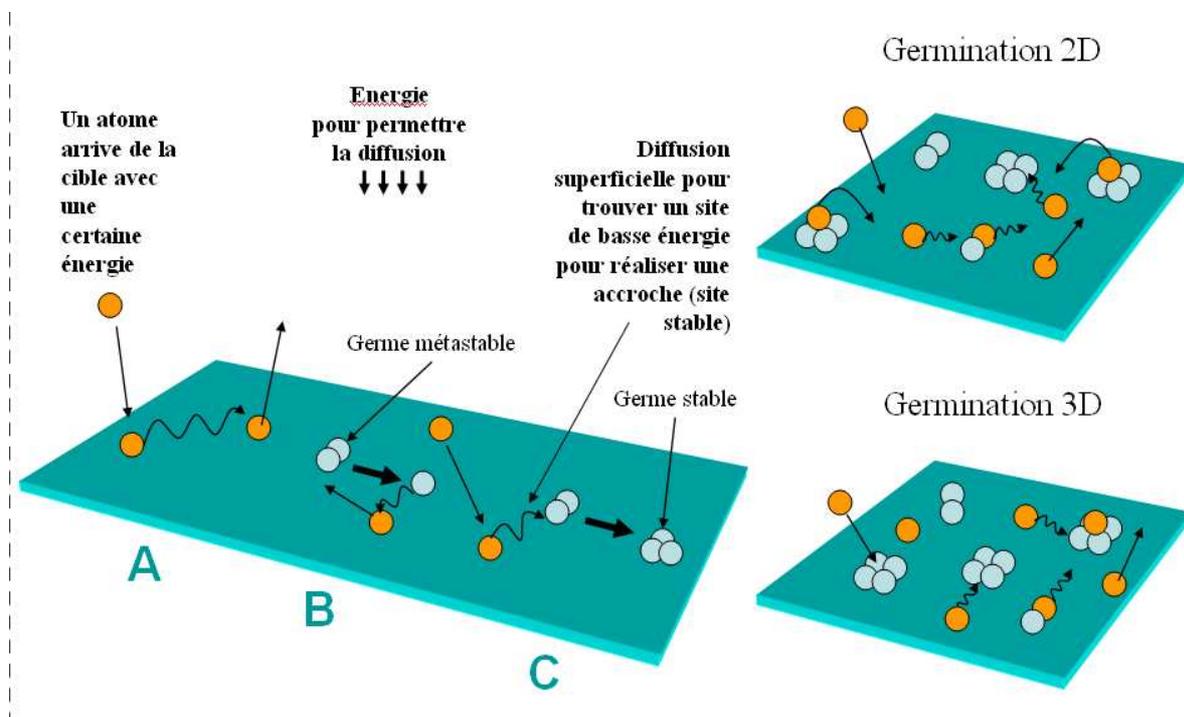
Ainsi, pour une décharge d'argon à la pression de 1 Pa, le libre parcours moyen (LPM) des atomes pulvérisés, c'est-à-dire la distance entre deux collisions successives avec des atomes d'argon, est d'environ un centimètre. La distance séparant la cible du substrat à revêtir étant usuellement de l'ordre d'une dizaine de centimètres, les atomes pulvérisés perdent l'essentiel de leur énergie cinétique au cours des différentes collisions et atteignent donc le substrat à l'état thermalisé, c'est-à-dire avec une énergie cinétique de l'ordre de 0,1 eV. Un abaissement de la pression de travail permet d'accroître le LPM (Figure 3) et d'assurer un niveau énergétique plus élevé des atomes arrivant sur le substrat.



**Figure 3** : libre parcours moyen du zirconium ( Zr ) et de l'aluminium ( Al ) en fonction de la pression de travail

### II.1.1.3 Formation du dépôt solide

La formation du dépôt se fait par condensation sur le substrat de la vapeur métallique provenant de la cible. Le mécanisme d'accroche dépend alors principalement de l'énergie des atomes pulvérisés. Si les atomes de la vapeur métallique arrivent avec une énergie relativement faible, l'accroche se fera principalement au niveau des sites d'arrivée. Par contre, si leur énergie est plus importante, les atomes peuvent migrer sur le substrat vers des sites plus stables, améliorant ainsi la compacité du dépôt. La **Figure 4** illustre le processus de diffusion superficielle et d'accroche des atomes sur le substrat.



**Figure 4** : illustration des mécanismes d'accroche des atomes sur le substrat

L'énergie permettant la diffusion superficielle de l'atome peut être apportée directement lors de la pulvérisation (paramètres de décharge) ou en limitant la perte d'énergie lors du transport (travail à plus faible pression). Un autre moyen d'apporter de l'énergie consiste à ajouter un système de chauffage du substrat ou une polarisation en courant continu ou radiofréquence. L'utilisation de cette dernière solution nécessite toutefois une sélection judicieuse de la puissance fournie au porte substrat afin de ne pas repulvériser les atomes du dépôt.

### **II.1.2 Fonctionnement en conditions réactives**

La pulvérisation en atmosphère neutre est utilisée pour la réalisation de dépôts métalliques (Cr, Ti, Al, Cu, ...). La pulvérisation en atmosphère réactive se traduit par l'ajout d'éléments réactifs sous forme gazeuse dans le plasma d'argon. Les gaz réactifs les plus couramment utilisés sont le dioxygène (O<sub>2</sub>), le diazote (N<sub>2</sub>), le méthane (CH<sub>4</sub>) et l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) en fonction des composés que nous voulons réaliser.

Toutefois, les composés céramiques comme les oxydes de métaux de transition sont en général des isolants électriques. La contamination de la cible par réaction avec le gaz réactif choisi est alors souvent une source de problèmes qui peuvent dans certaines conditions conduire à une instabilité du mode de pulvérisation associée à une chute drastique de la vitesse de dépôt. Le taux de pulvérisation d'une céramique est ainsi souvent d'environ un à deux ordres de grandeur inférieur à celui d'un métal. Etant donné que le taux de pulvérisation et donc la vitesse de dépôt dépend de nombreux paramètres, les valeurs précédentes ne sont citées qu'à titre d'exemple sachant qu'elles peuvent varier dans de fortes proportions en fonction des conditions opératoires et des caractéristiques du système de pulvérisation utilisé.

#### **II.1.2.1 Instabilité électrique**

Ce type d'instabilité est consécutif à la formation d'une couche isolante due au recouvrement partiel de la surface de la cible par le gaz réactif. Les ions argon qui viennent frapper la cible ne peuvent plus évacuer leur charge, engendrant une accumulation de charges positives dans les zones où le processus de pulvérisation est le plus faible. Sous l'effet de la différence de potentiel résultant de cette accumulation de charges positives, des claquages du diélectrique (micro-arcs) se forment, provoquant l'éjection de débris ou de micro-gouttelettes qui nuisent à la qualité du revêtement.

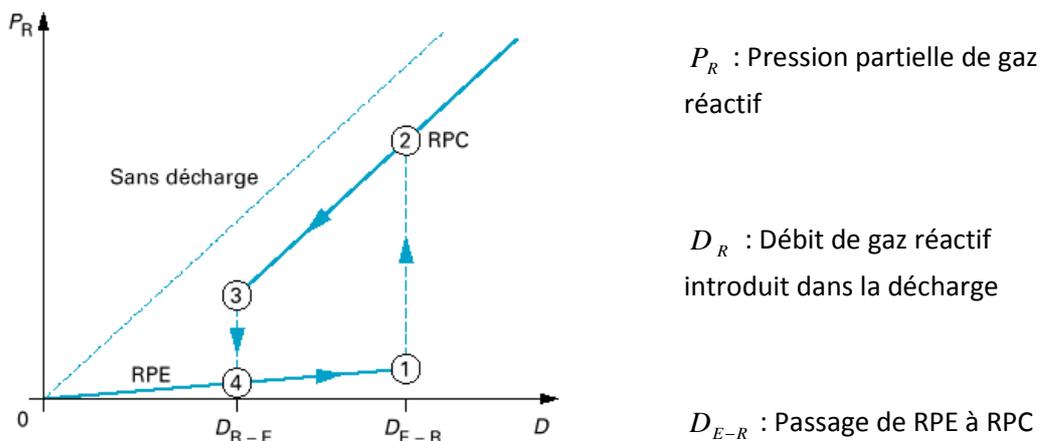
Afin d'éviter l'apparition de ces instabilités électriques, il est souvent nécessaire d'utiliser un générateur radiofréquence, ce qui conduit à une efficacité de pulvérisation réduite à environ la moitié de celle que nous obtenons à puissance identique avec un générateur de courant continu. D'autres solutions telles que l'utilisation de bobines déflectrices ou d'un cache pour limiter l'accumulation de charges à la périphérie de la cible sont quelques fois utilisées. La solution la plus fréquemment utilisée reste l'utilisation d'un générateur de courant continu pulsé à moyenne fréquence (10 à 100 kHz). Pendant le temps de polarisation négative ( $t_{on}$ ),

les charges positives s'accumulent à la surface des zones contaminées de la cible. Lors de l'arrêt de décharge ( $t_{off}$ ), les électrons présents au voisinage de la cible neutralisent la surface contaminée. Le temps de claquage étant de l'ordre d'une dizaine de microsecondes, la phase de polarisation ( $t_{on}$ ) ne doit pas excéder cet ordre de grandeur. Comme la décharge complète dure également une dizaine de microsecondes, ceci conduit à des fréquences typiques de l'ordre de 50 kHz pour éviter le claquage du diélectrique.

### II.1.2.2 Instabilité du régime de pulvérisation

Le procédé de pulvérisation conduit également dans des réacteurs industriels à des instabilités du régime de pulvérisation. Cette instabilité peut être mise en évidence par la présence d'une boucle d'hystérésis sur la courbe d'évolution de la pression partielle de gaz réactif en fonction de la quantité de gaz réactif introduit (Figure 5). Ainsi, nous distinguons trois principaux régimes de pulvérisation :

- Le régime de pulvérisation élémentaire (RPE) qui se caractérise par de faibles débits de gaz réactif, une consommation quasi-totale des espèces réactives, un taux de recouvrement de la cible proche de 0 et des vitesses de dépôt du métal élevées (de 1 à quelques  $10 \mu\text{m.h}^{-1}$ ).
- Le régime de pulvérisation du composé (RPC) qui se caractérise par des débits de gaz réactif élevés, une faible consommation des espèces réactives, un taux de recouvrement de la cible proche de 1 et des vitesses de dépôt du composé faibles ( $Y_C \ll Y_M$ ). L'évolution de la pression partielle de gaz réactif pour des débits de gaz réactif croissants est alors parallèle à la droite « sans décharge ».
- Enfin, le régime de pulvérisation intermédiaire (RPI) qui se caractérise par un taux de recouvrement de la cible compris entre 0 et 1. Ce régime est également appelé régime de pulvérisation de transition (RPT).



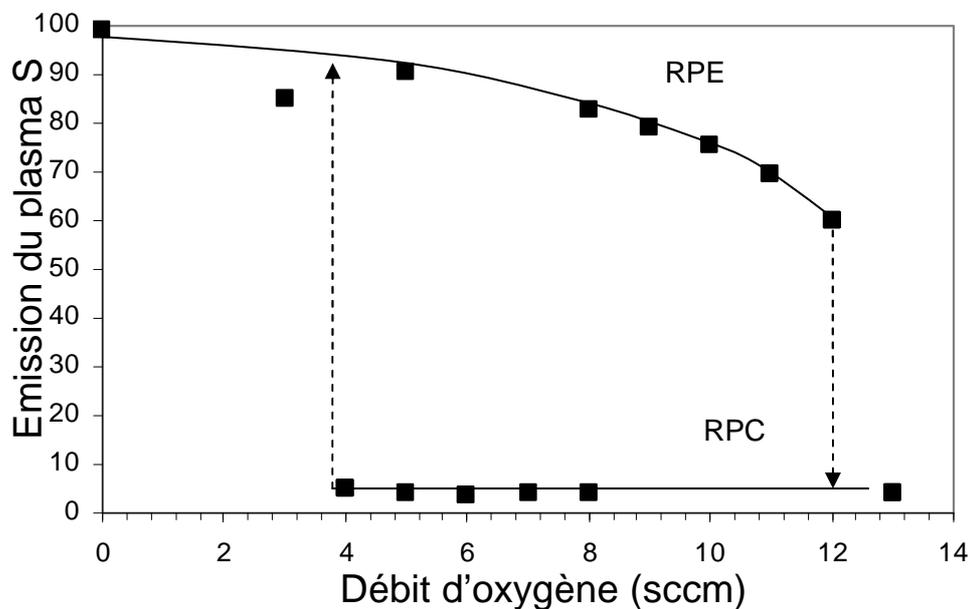
**Figure 5 :** courbe caractéristique d'évolution de la pression partielle de gaz réactif en fonction du débit de gaz réactif dans le cas d'un système fortement réactif [157]

Pour les faibles débits de gaz réactif, l'évolution de la pression partielle de gaz réactif reste faible et la surface de la cible demeure essentiellement métallique. Le système opère en Régime de Pulvérisation Élémentaire (RPE). La vitesse de dépôt est importante mais ne conduit pas à la formation de composés stoechiométriques sur le substrat.

Lorsque le débit de gaz réactif atteint un niveau suffisant, les sites d'adsorption des parois sont saturés, ce qui se traduit par une brusque augmentation de la pression partielle, entraînant une contamination plus importante de la cible. Le système bascule en Régime de Pulvérisation de Composé (RPC) où la vitesse de dépôt est plus faible mais permet la réalisation de composés stoechiométriques sur le substrat.

La différence entre les courbes d'évolution de la pression partielle de gaz réactif avec et sans décharge représente la quantité de gaz consommée par la cible et le dépôt. L'inverse de la pente de la droite sans décharge correspond alors à la vitesse de pompage.

L'instabilité du régime de pulvérisation peut également être mise en évidence par l'observation de l'émission lumineuse du plasma en fonction du débit de gaz réactif. La **Figure 6** présente à titre d'exemple une évolution type de l'intensité optique de la raie à 360,12 nm du zirconium en fonction du débit d'oxygène introduit dans la décharge lors d'un dépôt de zircone à partir d'une cible de zirconium.

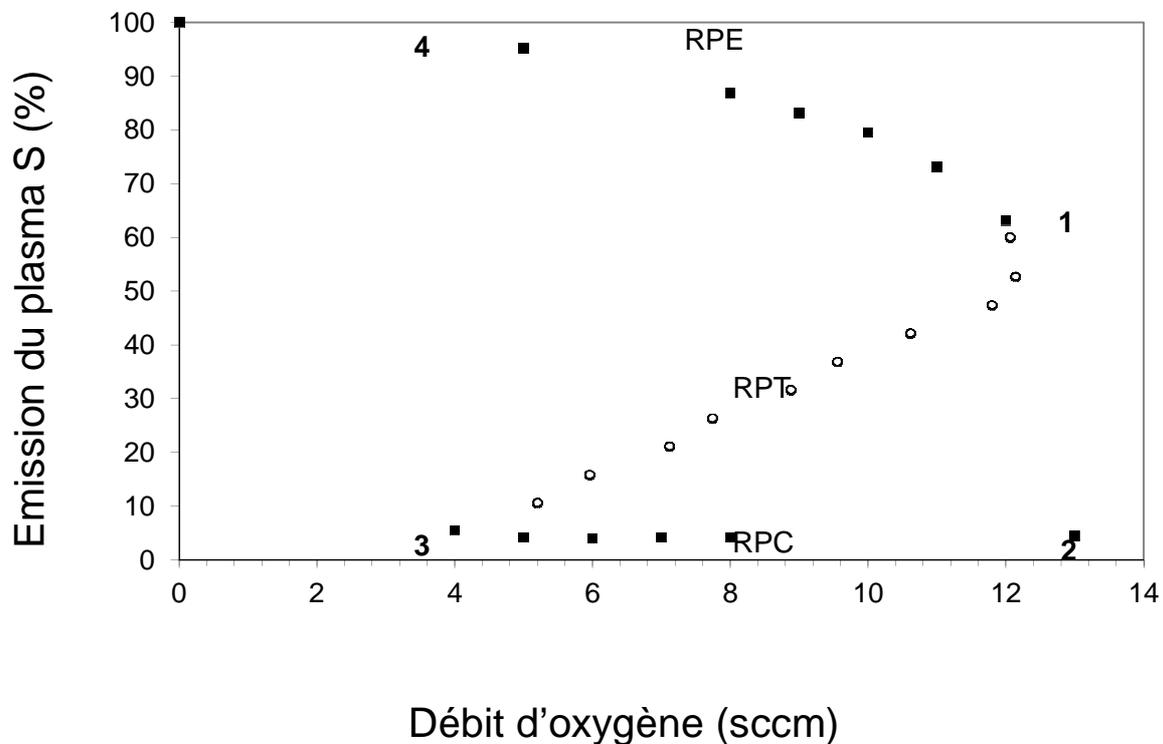


**Figure 6** : courbe caractéristique de l'émission lumineuse d'une raie du zirconium ( $\lambda=360,12$  nm) en fonction du débit de gaz réactif représentant l'instabilité du régime de pulvérisation pour une cible de zirconium en présence d'oxygène

L'augmentation ou la diminution du débit d'oxygène produit une boucle d'hystérésis caractéristique des conditions d'instabilité de la pulvérisation. Une faible vitesse de dépôt du composé (zircone) est observée lorsque la valeur de l'émission optique est proche de 0 % et une vitesse de dépôt élevée du métal (zirconium) lorsque l'émission optique est proche de 80 %.

### II.1.2.3 Intérêt du système « Plasma Emission Monitoring »

L'utilisation d'un système de régulation basé sur l'émission optique du plasma (PEM : Plasma Emission Monitoring) permet un contrôle simple du procédé de dépôt à l'intérieur de la boucle d'hystérésis. La **Figure 7** présente à titre d'exemple une évolution de l'intensité de l'émission optique du zirconium  $I_{Zr}$  à la longueur d'onde 360,12 nm en fonction du débit d'oxygène avec un courant fixé à 4 A sur la cible de zirconium.



**Figure 7** : courbe caractéristique représentant l'évolution de l'intensité lumineuse du plasma en fonction du débit d'oxygène traduisant l'instabilité du régime de pulvérisation pour une cible de zirconium (■). Le domaine défini par les (○) représente le domaine de pulvérisation dans le domaine instable, accessible uniquement grâce à un moyen de contrôle en boucle fermée

Lorsque le débit d'oxygène croît jusqu'à 12 sccm (standard cubic centimeter per minute = normo centimètre cube par minute), la cible se pulvérise selon le régime de pulvérisation élémentaire (RPE), avec une forte vitesse de dépôt. Au-delà de 12 sccm d'oxygène, le système bascule en régime de pulvérisation du composé, avec une faible vitesse de dépôt

(faible valeur du signal reçu par la fibre optique). L'utilisation d'un système de régulation basé sur l'utilisation de l'émission optique du plasma permet ainsi d'effectuer le dépôt en Régime de Pulvérisation de Transition (RPT) instable. Sans le système de régulation, les courbes décrivent un cycle d'hystérésis selon les points caractéristiques 1, 2, 3, 4 notés sur la **Figure 7**. L'ajout du système de régulation permet le contrôle du procédé à l'intérieur de la boucle d'hystérésis en maintenant un point de fonctionnement sur la courbe d'équilibre instable.

D'une manière générale, il est préférable d'utiliser ce système de régulation en positionnant la fibre optique au niveau de la cible correspondant à l'espèce majoritaire dans le dépôt souhaité. Dans notre cas, le système de régulation est donc basé sur la valeur de l'émission optique du zirconium pour un courant de décharge fixé.

## **II.2 DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX**

### **II.2.1 Enceinte de pulvérisation Alcatel SCM650 (situé au LERMPS)**

Un réacteur classique se compose principalement d'une enceinte reliée à un système de pompage et d'un générateur pour permettre la génération d'un plasma. L'un des dispositifs expérimentaux utilisés pour cette étude est composé d'une machine Alcatel SCM 650 et de différents éléments complémentaires permettant le contrôle du procédé de dépôt.

L'enceinte de la machine Alcatel SCM 650 est un réacteur cylindrique de hauteur 30 cm et de diamètre intérieur 71 cm donnant un volume d'environ 100 litres. Un mécanisme de translation – rotation permet l'ouverture et la fermeture couvercle de l'enceinte sur lequel est fixé le porte substrat tournant. Cette enceinte permet la mise en place de 4 cibles de diamètre 200 mm.

L'embase de la cible et le système magnétron sont refroidis par un circuit d'eau. Une feuille de graphite placée entre la sole en cuivre qui assure l'étanchéité vis-à-vis du circuit de refroidissement et la cible permet d'améliorer les contacts électriques et thermiques. Les cibles utilisées sont de diverses natures mais de dimensions identiques : diamètre 200 mm, épaisseur 6 mm.

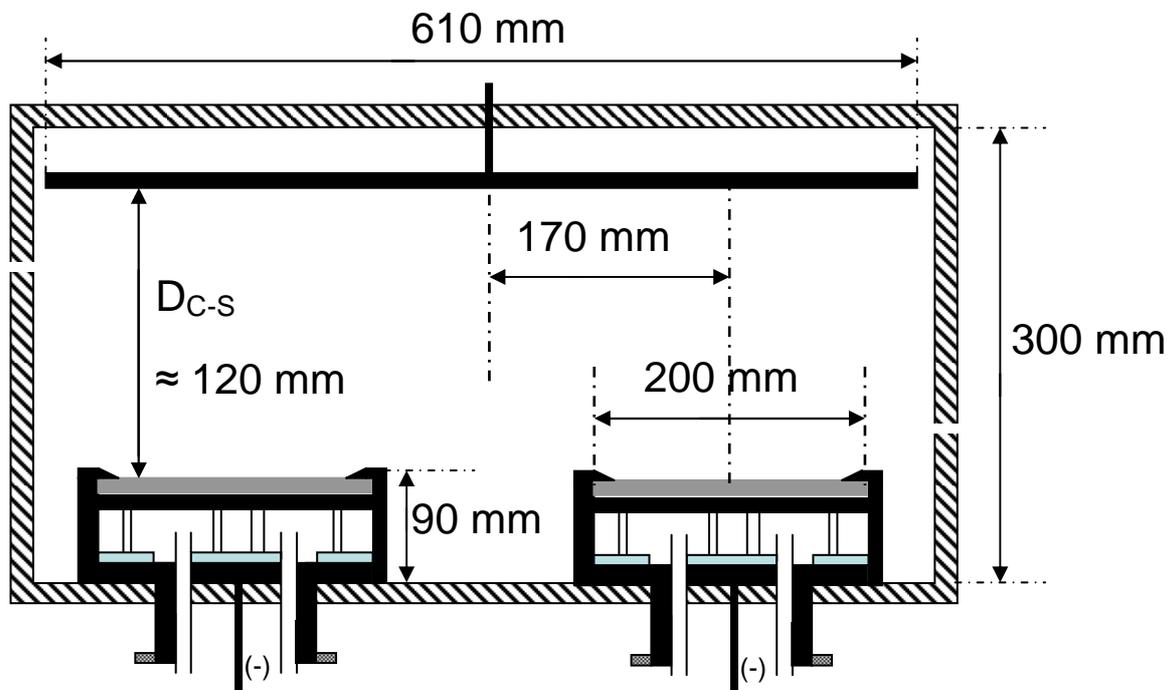
Le système de pompage est composé d'une pompe primaire Alcatel XDS35Si et d'une pompe turbomoléculaire Alcatel 5401CP permettent d'atteindre un vide avoisinant  $5 \cdot 10^{-4}$  Pa en 11 heures.

Un générateur double voie Advanced Energy<sup>®</sup> de type DC Pinnacle<sup>®</sup> Plus+ permet la polarisation des cibles avec une régulation en intensité, en tension ou en puissance. L'ajustement de la fréquence de pulsation est possible dans la gamme 5 à 350 kHz. La valeur retenue pour nos travaux est de 50 kHz.

Un moteur électrique permet la mise en rotation du porte substrat à une vitesse de 14 tours/min. Ce porte substrat est constitué d'un disque de 610 mm de diamètre placé à une

hauteur de 110 mm ( $\pm 10$  mm) par rapport à la surface des cibles. La distance maximale dans l'enceinte entre la cible et le substrat ( $D_{c-s \text{ max}}$ ) est d'environ 180 mm. En pulvérisation cathodique magnétron, le flux est directif. Pour un matériau donné, la vitesse de dépôt est une fonction de la distance entre la cible et le substrat, ou distance de tir. Lorsque la distance de tir excède le diamètre moyen d'érosion de la cible, la vitesse de dépôt est maximale dans l'axe de la cible.

Plus nous augmentons la tension, plus nous éjectons d'atomes et plus l'effet directionnel est marqué. Augmenter la distance de tir améliore donc l'homogénéité chimique et conduit à une augmentation de la proportion moyenne en l'élément qui se disperse le moins, généralement celui qui possède la plus faible masse. Pour nos essais, les substrats ont été placés à une distance d'environ 170 mm du centre du porte échantillon, cette position correspondant à la zone où la distance entre le substrat et le centre de la cible est la plus faible lors de leur passage en vis-à-vis (Figure 8).



**Figure 8** : représentation schématique du placement des échantillons dans l'enceinte de dépôt Alcatel SCM 650 (LERMPS)

L'obtention d'un composé par l'utilisation de plusieurs cibles nécessite la mise en rotation du substrat afin d'assurer l'homogénéité du dépôt. La vitesse de rotation du substrat conditionne alors la répartition des espèces pulvérisées tandis que l'intensité appliquée sur chaque cible conditionne la quantité de chaque espèce arrivant sur le substrat et donc la composition finale du revêtement. Il est généralement admis que la vitesse minimale de rotation du porte-substrat suive la relation (2) :

$$V \times t < 1 \text{ nm} \quad (2)$$

Avec :

$V$  : Vitesse instantanée de dépôt ( $\text{nm.s}^{-1}$ )

$t$  : Temps de passage devant la cible (s) :  $t = \frac{l}{2\pi\Omega r}$

$l$  : Largeur de la cible (cm)

$r$  : Rayon du porte-substrat (cm)

$\Omega$  : Vitesse de rotation du porte-substrat ( $\text{tour.s}^{-1}$ )

Ainsi, pour une vitesse instantanée de dépôt de  $10 \mu\text{m.h}^{-1}$ , une cible de 200 mm de diamètre et un porte substrat de 200 mm de diamètre, la vitesse de rotation doit être supérieure à 8 rpm. Dans notre cas, elle est de 12 rpm.

Un générateur Radiofréquence (RF) Dressler de type Cesar<sup>®</sup> 1310 peut être couplé au porte substrat pour étendre la zone du plasma dans l'enceinte. Ce générateur de fréquence 13,56 MHz permet d'appliquer une puissance maximale comprise entre 250 W et 1 kW selon la taille du substrat. La puissance RF est délivrée sous une impédance standard de 50  $\Omega$  par un câble reliant le générateur et le porte échantillon. Cependant l'impédance de l'ensemble cathode-plasma varie en fonction des différents paramètres de l'enceinte. Le générateur radio fréquence est donc relié à une boîte d'accord (adaptateur d'impédance) composée de deux condensateurs réglables et d'une résistance ajustable. L'accord est réalisé lorsque la puissance réfléchie mesurée par le générateur RF est nulle.

Un ensemble de jauges permet un suivi de la pression à l'intérieur de l'enceinte. La pression varie principalement en fonction du débit de gaz envoyé dans l'enceinte, de la température et des éventuels effets de dégazage des parois. Le système est équipé d'une jauge primaire (jusqu'à  $10^{-3}$  mbar), d'une jauge secondaire et d'une jauge MKS Baratron (plus précise pendant la phase de dépôt).

Des régulateurs de débit massiques de type MKS sont utilisés pour contrôler les débits d'oxygène et d'argon introduits dans l'enceinte.

Un système de Spectroscopie d'Emission Optique (SEO) composé d'une fibre optique, d'un spectromètre et d'un ordinateur a été utilisé pour effectuer un suivi des caractéristiques du plasma. L'analyse de l'émission lumineuse du plasma et donc de sa composition se fait par le biais de l'intensité des raies d'émission des espèces considérées. Ce système permet notamment un contrôle du procédé dans le domaine instable rendant possible une régulation des niveaux d'oxydation des cibles afin d'optimiser la vitesse de dépôt du revêtement stœchiométrique. La fibre optique qui permet de capter le signal à la surface de la cible a été

placée à environ  $8 \pm 2$  mm au-dessus de la cible. Cette fibre est composée d'un filament de silice dopée au bore de diamètre 60  $\mu\text{m}$ . Elle est placée de manière tangentielle à la zone de plus forte érosion afin de recueillir un maximum de lumière. Un système composé d'un support permettant d'assurer le maintien de la fibre optique, d'une lame de verre permettant sa protection et d'un tube de collimation en cuivre a été fabriqué afin d'assurer la reproductibilité de la mesure pour chaque dépôt. Le spectromètre utilisé (Roper Scientific Spectra Pro 500i) équipé d'un tube photomultiplicateur (Hamamatsu R 636) dispose d'un réseau de Blaze avec une longueur d'onde nominale de 500 nm et 300 raies par mm.

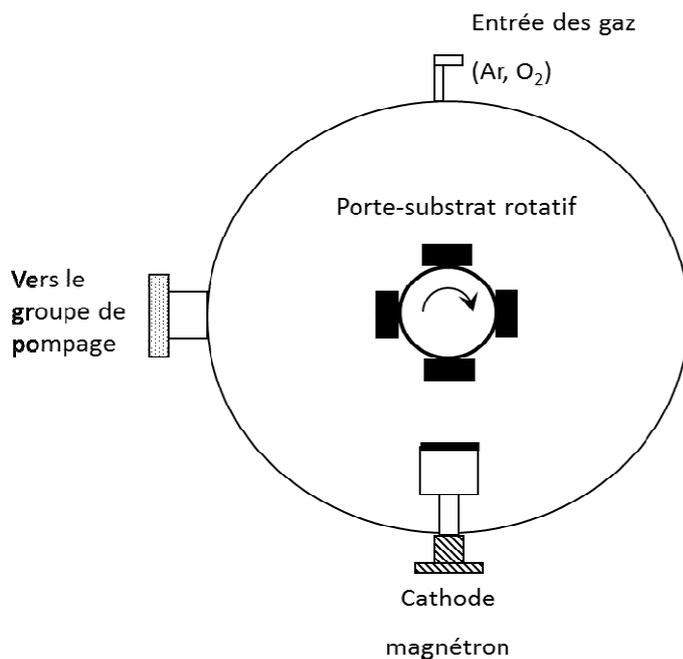
L'ordinateur relié au spectromètre permet un suivi et une gestion du niveau d'oxydation de la cible de zirconium. Une interface développée sous le logiciel Labview<sup>®</sup> assure la régulation de l'oxydation des cibles grâce à une régulation du débit d'oxygène.

### II.2.2 Réacteur disponible à l'IJL

Le réacteur de dépôt localisé à l'Institut Jean Lamour utilisé pour la synthèse des films à base de zircone est un réacteur cylindrique d'un volume de 50 L (Figure 9). Il est équipé d'une cathode magnétron refroidie à l'eau. Le diamètre de la cible est de 50 mm et son épaisseur de 3 mm. Au cours de cette étude, nous avons employé trois cibles qui ne diffèrent que par leur teneur en yttrium. Ces cibles présentent les compositions atomiques suivantes :  $\text{Zr}_{100}$ ,  $\text{Zr}_{92}\text{Y}_8$ ,  $\text{Zr}_{84}\text{Y}_{16}$ . Cette cathode est alimentée par un générateur de courant pulsé commercialisé par la société Advanced Energy (Pinnacle +). Systématiquement, nous avons régulé l'intensité appliquée sur la cible en utilisant un temps off de 4  $\mu\text{s}$  pour une fréquence de pulsation de 50 kHz. L'introduction des gaz est assurée par l'intermédiaire de débitmètres massiques. Le pompage des gaz est assuré par un groupe de pompage comprenant une pompe primaire à palettes et une pompe turbomoléculaire. La mesure de la pression durant le dépôt est réalisée par l'intermédiaire d'une jauge Baratron. Les substrats (lame de verre, échantillons de TiAl6V4 polis et vis en TiAl6V4) sont positionnés sur un porte-substrat rotatif situé à 60 mm de la surface de la cible de pulvérisation. Préalablement à leur introduction dans le réacteur, les substrats sont nettoyés chimiquement pour les dégraisser. Leur nettoyage est complété par un décapage plasma dans le réacteur de dépôt.

Dans l'objectif de définir les conditions de dépôt des films de zircone, nous avons dans un premier temps tracé les courbes tension de cible et pression partielle d'oxygène en fonction du débit d'oxygène introduit dans le réacteur. De telles courbes nous ont permis de définir la gamme de débit d'oxygène permettant de travailler en régime de pulvérisation de composé (cf. paragraphe IV.3.3). Les conditions suivantes ont été fixées pour la synthèse des revêtements :

- Débit d'argon : 35 sccm
- Débit d'oxygène : 3,5 sccm
- Intensité appliquée à la cible métallique : 0,7 A
- Pression régnant dans le réacteur pendant le dépôt : 1,7 Pa



**Figure 9 :** schéma de principe du réacteur de dépôt des films à base de zircone situé à l'Institut Jean Lamour

### II.3 CULTURES CELLULAIRES

L'utilisation d'un matériau dans le domaine médical doit se faire dans un cadre normatif. En effet, pour pouvoir utiliser un matériau dans le domaine médical il faut au préalable que ce dernier ait subi des tests de cytotoxicité et de biocompatibilité. Ces tests doivent se faire conformément aux normes ISO 10.993-5 et 10.993-12.

Le but de notre travail est de réaliser ces tests afin de valider l'utilisation de notre alliage et de nos dépôts dans le domaine médical.

Dans une première partie, nous allons voir les spécifications de la norme ISO 10.993-5. Dans un second temps, nous présenterons la liste des moyens mis en œuvre, ainsi que la justification de ces choix.

#### II.3.1 Spécifications de la norme ISO 10993-5

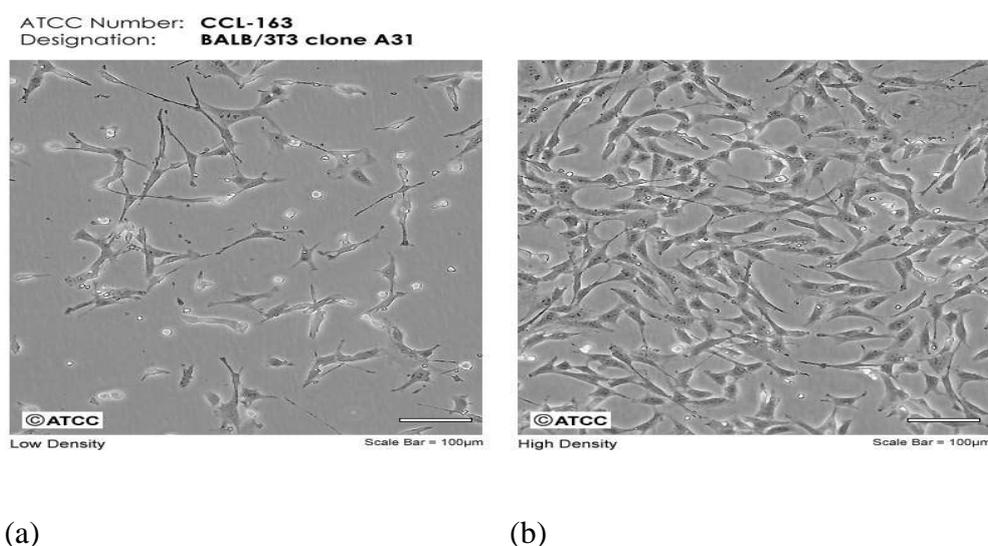
Plusieurs critères sont nécessaires, afin d'obtenir la norme ISO 10993-5, concernant le choix de la lignée cellulaire que nous avons retenue (Balb/3T3 clone A31 ATCC), les conditions de stockage, le milieu de culture, la préparation des cellules pour les essais en contact direct, le mode opératoire d'essai et l'évaluation de la cytotoxicité.

## II.3.2 Choix de la méthode et des moyens

### II.3.2.1 Choix de souche cellulaire

Nous utilisons des fibroblastes de souris qui sont adhérentes à la surface de contact et qui exprime la succinate déshydrogénase mitochondriale.

Ces cellules sont référencées en Balb/3T3 clone A31 (fournisseur : ATCC). Isolée en 1968 par Aaronson à partir d'un embryon de souris Balb/c âgé de 14 à 17 jours, cette souche est très sensible à l'inhibition de contact. Elle nécessite de croître dans un environnement peu dense en cellules comme le montre la photo ci-dessous (Figure 10).



**Figure 10** : étude par microscopie optique de développements cellulaires des cellules Balb/3T3, influencée par la densité de colonisation sur le support de culture où une faible densité représente un bon environnement pour le développement à terme (a), alors qu'une forte densité s'apparente à un environnement défavorable (b)

L'atmosphère de culture est composée de 95% d'air et de 5% de CO<sub>2</sub> à 100 % d'humidité.

Nous avons choisi la souche Balb/3T3 car il s'agit d'un fibroblaste. En effet, le matériau testé est destiné à être en contact avec des fibroblastes car les cellules les plus proches du canal radiculaire dentaire sont les fibroblastes du desmodonte.

De plus, le fibroblaste Balb/3T3 possède des propriétés adhésives, qui nous intéressent particulièrement pour nos tests par contact direct sur nos dépôts métalliques.

La souche Balb/3T3 exprime également la succinate déshydrogénase mitochondriale. La mesure de cette protéine va nous servir à évaluer la cytotoxicité du milieu dans lequel évoluent les cellules. Notamment grâce au test MTT qui est un sel de tétrazolium hydrosoluble de couleur jaune et qui est réduit en un cristal insoluble pourpre (formazan) par les succinates déshydrogénases mitochondriales (NADH<sup>+</sup> dépendante). Cette conversion n'est effectuée que par les cellules ayant une activité métabolique mitochondriale, c'est-à-dire par les cellules viables (cf paragraphe II.3.4.6).

Le métabolisme des cellules en prolifération est plus important que celui des cellules quiescentes ou non actives. La mesure spectrophotométrique de la quantité des cristaux de formazan formé pendant un temps donné permettra d'évaluer une éventuelle cytotoxicité des différents milieux utilisés lors de la culture (dilution de médicaments ou milieux conditionnés) par rapport aux milieux contrôle (sans le médicament ou non conditionnés).

Enfin, une dernière raison à ce choix est que cette souche fait partie des souches validées par la norme ISO 10993-5, norme à laquelle doivent répondre tous les tests de biocompatibilité, y compris les nôtres.

### **II.3.2.2 Milieu de culture**

Le choix du milieu de culture a été porté sur une modification d'un milieu de culture de référence appelé Milieu Minimum Essentiel d'Eagle ou EMEM. Mis au point par Harry Eagle, ce milieu est utilisé pour l'apport d'éléments nutritifs nécessaire au maintien et à la prolifération de différents types de cellules *in vitro*. La composition de ce milieu est à base d'acides aminés, de sels (chlorure de potassium, sulfate de magnésium, chlorure de sodium et du phosphate de dihydrogène de sodium), de glucose et des vitamines (acide folique, nicotinamide, riboflavine et vitamine B12).

Notre milieu retenu est en fait une variation de l'EMEM, modifié par Dulbeccoe. Le DMEM contient approximativement quatre fois plus de vitamines et d'acides aminés que dans la formule originale et de deux à quatre fois plus de glucose. En outre, il contient du fer également. Le milieu DMEM est approprié pour presque tous les types de cellules, comprenant les cellules humaines, de singe, de hamster, de rat, de souris, de volaille et de poisson. Il contient également 2 mmol/L de L-glutamine, 10%(V/V) de bovine calf sérum, 10µg/mL gentamycine, 100 unités/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine.

Le choix d'ajouter du sérum est justifié par la nécessité d'avoir des cellules adhérentes. En effet, le sérum apporte aux cellules les protéines nécessaires à la synthèse de la matrice extracellulaire qui est responsable de l'adhésion recherchée.

Le choix d'ajouter des antibiotiques se justifie par la nécessité de protéger la culture cellulaire d'une infection bactérienne.

### **II.3.2.3 Choix des échantillons**

L'échantillon étalon à tester est une pièce ronde d'alliage titane TiAl6V4 de diamètre 5 mm et de 3 mm d'épaisseur. La face supérieure possède une boule en son milieu pour permettre la préhension lors des manipulations. Les surfaces inférieure et latérale de l'échantillon sont polies avec une pâte diamantée de granulométrie 1µm.

Les échantillons TiAl6V4 soumis au bain de culture cellulaires ont un diamètre 20 mm et une épaisseur de 5 mm. Le ratio surface de l'échantillon sur le volume de milieu égal à 1/10è doit être respecté.

Les échantillons servant à nos contrôles négatif et positif auront exactement les mêmes dimensions et le même état de surface.

### II.3.2.4 Choix des matériaux de contrôle

#### a. Contrôle positif

Le contrôle positif correspond à un matériau qui, lorsqu'il est soumis à l'essai, induit une réponse cytotoxique reproductible.

Le choix du contrôle positif sera porté sur le PVC (Polychlorure de vinyl) pour les raisons de disponibilité et parce qu'il a été validé comme contrôle positif par la norme ISO 10993.

#### b. Contrôle négatif

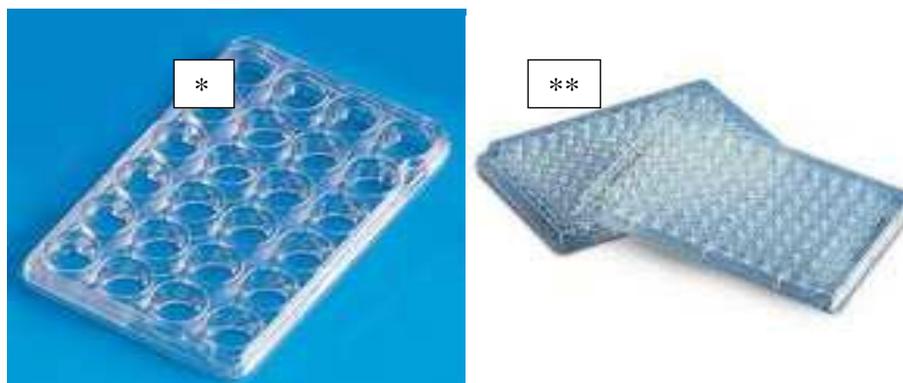
Le contrôle négatif correspond à un matériau qui, lorsqu'il est soumis à l'essai, ne produit pas de réponse cytotoxique.

Le choix du contrôle négatif sera porté sur le titane commercialement pur (T-cp), connu pour être non cytotoxique et pour sa disponibilité.

L'échantillon de titane commercialement pur est préparé par un laboratoire de prothèse dentaire à partir d'un moulage de l'échantillon de référence, l'alliage TiAl6V4 à tester. L'échantillon de contrôle en titane pur est poli pour obtenir le même état de surface que celui de l'alliage TiAl6V4.

### II.3.2.5 Choix du récipient de culture pour les tests

Deux types de récipients ont été utilisés : un pour l'incubation au contact du matériau (\*) et un autre pour les mesures au spectrophotomètre (\*\*) (Figure 11).

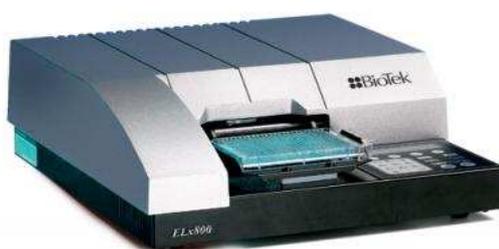


**Figure 11** : récipient 24 puits pour l'incubation au contact du matériau en présence de cultures des cellules Balb/3T3 (\*), avant de les analyser dans un récipient microplaque de 96 puits destiné au spectrophotomètre (\*\*)

Ce qui caractérise les deux plaques : la première (\*) est une plaque à 24 puits à diamètre variable (volume de travail de 0,5 à 1,5 mL) et à fond plat en polystyrène avec couvercle. Elle est stérile, avec un traitement physique de surface pour les cultures de cellules adhérentes certifiées exemptes de RNase, de DNase et d'ADN humain, apyrogène et non cytotoxique. La seconde (\*\*\*) est une plaque à 96 puits en polystyrène à fond plat et transparent, pour un volume de 350 µL par puit.

### II.3.2.6 L'appareil de mesure

L'appareil utilisé est le MICROPLATE READER EL800 de BIOTEK, compatible avec les deux types de plaques (Figure 12).



**Figure 12** : lecteur d'absorbance pour microplaques d'un EL800

### II.3.2.7 Choix de la technique d'évaluation de la cytotoxicité

La méthode retenue est celle du test MTT (*cf* paragraphe II.3.4.6). C'est une méthode d'évaluation quantitative et qualitative conforme aux recommandations de la norme ISO 10993-5 pour étudier nos cellules, et qui très bien documentée dans la littérature.

### II.3.2.8 Choix de la méthode d'analyse statistique

L'analyse statistique sera effectuée à l'aide de l'outil pour les analyses statistiques appliqué à la biologie appelé R-project.

## II.3.3 Protocoles d'utilisation des appareils

L'étude des cultures cellulaires obtenues se fait conformément aux protocoles d'utilisation type (hotte à flux laminaire, balance de précision, centrifugeuse, bain marie, purificateur d'eau, microscope inversé, pH mètre, étuve *Hera Cell 150*). Nous allons détailler l'utilisation du microscope inversé.

## Protocole d'utilisation du microscope inversé



**Figure 13** : photo d'un microscope optique avec filtres lumineux (MORE)

Le microscope utilisé pour l'observation des cultures en choisissant le filtre approprié à l'observation est représenté **Figure 13**. Nous parlons alors d'une observation MORE (Microscopie Optique Rétro Eclairée), qui est différente de celle observée par MO (Microscopie Optique) conventionnelle. Il est important d'observer la totalité du flacon de culture pour repérer la présence éventuelle d'une contamination.

### II.3.4 Protocoles des manipulations

#### II.3.4.1 Protocole de stérilisation des échantillons TiAl6V4

Le protocole de stérilisation des échantillons, alliage TiAl6V4 à tester, contrôle positif et contrôle négatif seront stérilisés selon la procédure standard de stérilisation, notamment par l'utilisation d'un autoclave classe B.

##### a. Trempage

Les échantillons sont mis à tremper 10 minutes dans une cuve à ultrasons contenant 20 mL d'ampholyse diluée dans 5 litres d'eau du robinet. A partir de ce moment, les échantillons stériles ne doivent plus être touchés avec les doigts.

##### b. Séchage

Les échantillons sont mis à sécher sous la hotte à flux laminaire sur du papier absorbant.

##### c. Mise en sachet

Avec une précelle stérile, les échantillons sont déposés dans un sachet qui sera ensuite scellé.

#### **d. Stérilisation**

Les 3 sachets, alliageTiAl6V4, titane et PVC, sont mis dans la cuve de l'autoclave réglé à 134° C pendant 18 minutes à 2 bars.

### **II.3.4.2 Protocole de congélation et de décongélation des fibroblastes**

#### **a. Protocole de décongélation (ATCC)**

Pour utiliser la lignée de fibroblastes Balb/3T3, nous faisons appel à une lignée élaborée par l'American Type Culture Collection (ATCC), que nous recevons congelés.

Nous utilisons pour nos cultures cellulaires, la plupart du temps, un stock congelé appelé cryotube.

Trempé dans un bain marie à 37°C, le cryotube contenant les cellules se décongèle. Puis, sous la hotte à flux laminaire, des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> neufs sont utilisés, pour préparer les tubes à être centrifugés à 1400 rpm (rotation par minute) pendant 4 minutes à une température de 6°C.

Avec une pipette de 10 mL, la suspension cellulaire est aspirée puis éjectée pour bien dissocier les cellules. L'opération est répétée avec une seringue de 10 mL équipée d'une aiguille pour affiner la dissociation. Le contenu est alors versé dans le flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> et est complété avec un milieu frais (DMEM) pour obtenir un volume final de 25 mL. Le flacon est placé dans l'étuve à 37 °C dans une atmosphère à 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub> à 100% d'humidité.

#### **b. Protocole de congélation à -170 °C (ATCC)**

A partir d'un prélèvement frais, nous pouvons établir des stocks de cultures. Pour bien réussir la congélation de ses cellules, il est très important que les cellules soient en phase exponentielle, pas trop confluentes. Elles doivent être en bonne santé, le pH du milieu = 7.2-7.4, c'est-à-dire pas trop acide. Le milieu de culture (EDEM) doit être changé 24 h avant la congélation.

Avant de procéder à la congélation, une observation au microscope inversé (MORE) est effectuée afin de détecter une éventuelle présence bactérienne ou d'autres agents infectieux. Le cas échéant, il peut s'avérer nécessaire de faire usage d'antibiotique.

La technique de congélation repose sur celle de la dilution des cellules dans leur bain. Après centrifugation à 1400 rpm pendant 4 minutes, la dilution de la suspension cellulaire est répétée jusqu'à obtenir une concentration cellulaire de 3.10<sup>6</sup> cellules par mL. La procédure de comptage cellulaire sera réalisée selon la technique de la cellule de MALASSEZ.(cf paragraphe II.3.4.5). Enfin, il faut noter sur chaque cryotube la date, le nom de la souche, le numéro de lot et l'opérateur, en remplissant une fiche de congélation/décongélation.

### **II.3.4.3 Protocole de préparation du milieu de culture**

Le milieu recommandé par ATCC est une formule DMEM contenant 2 mmol/L de L-glutamine, 10 %(V/V) de bovine calf sérum, 10 µg/mL gentamycine, 100 unités/mL pénicilline, 100 µg/mL streptomycine, 28 mmol/Litre d'HEPES et du NaOH.

L'HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) est un composé organique couramment utilisé sous forme de solution tampon en biochimie. Il est largement préféré au tampon bicarbonate pour la culture cellulaire en raison d'une meilleure stabilité au pH physiologique. Contrairement aux tampons phosphates et bicarbonates, la dissociation de l'HEPES dans l'eau diminue lorsque la température diminue aussi, ce qui privilégie son utilisation comme solution tampon pour maintenir la structure et la fonction d'enzymes à basse température. Les produits nécessaires sont désignés dans le **Tableau III**.

**Tableau III** : composition chimique d'un milieu de culture type DMEM

Désignation	Présentation	Concentration	Volume	Référence	Fournisseur	Quantité nécessaire	Volume nécessaire
MEM L.glutamine	poudre	2mmol/L	0	12000-014	GIBCO	1	0
bovine calf serum	liquide flacon 100 mL	Pur	100mL	12138C	SIGMA	1	100mL
Gentamycine	poudre 250mg	Pur	0	46305	SIGMA	1	10mg
pénicilline/ streptomycine	liquide flacon 20mL	10.000U/mLpe nicilline  10 mg/mLstrepto mycine	20mL	P0781	SIGMA	1	10mL
HEPES	poudre	25 gramme	0	H2393	SIGMA	7.28g	0
NaOH	Liquide						
eau pure	Liquide						890mL

Nous utilisons un agitateur magnétique et barreau magnétique, afin d'en homogénéiser la solution DMEN en préparation, avec également l'utilisation d'une balance de précision avec une hotte à flux laminaire (PSM).

### II.3.4.4 Entretien des cellules Balb/3T3

L'entretien des cultures de fibroblastes se réalise par l'utilisation de flacons de 75 cm<sup>2</sup> en polystyrène vierge conforme à la pharmacopée, de forme rectangulaire à col incliné (Figure 14). Le bouchon est ventilé avec une membrane en polyéthylène filtrante à 0,22 µm. La surface est traitée pour optimiser l'adhérence cellulaire (référence SIGMA C7231-120EA). Le renouvellement du milieu de culture et/ou le repiquage de la culture cellulaire se fait en condition stérile, c'est-à-dire, sous la hotte à flux laminaire (PSM) et selon un protocole défini.

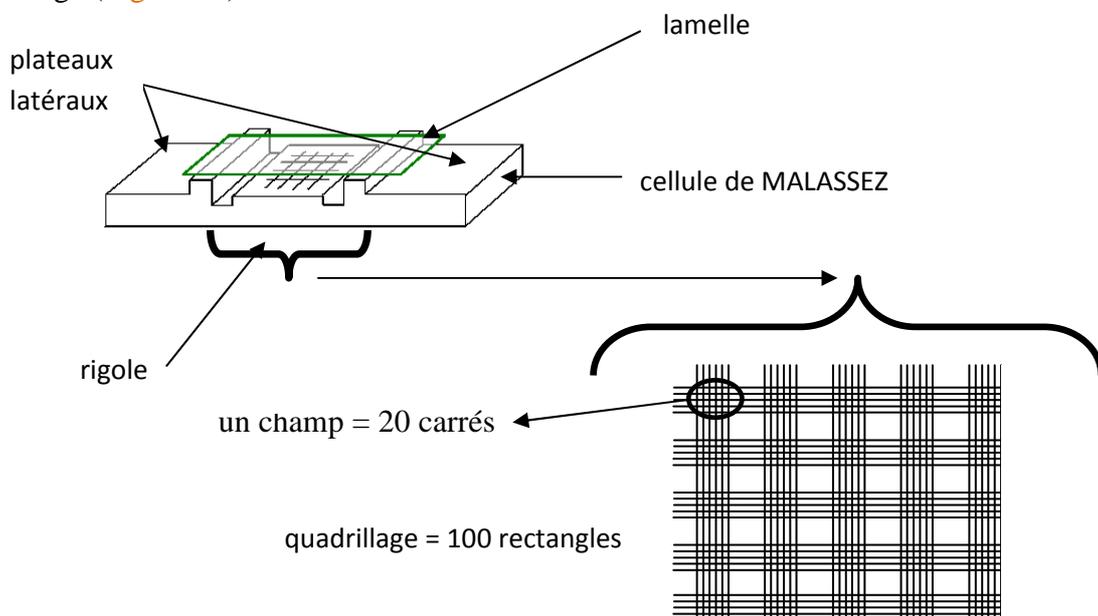


**Figure 14** : boîtes de cultures (75 cm<sup>2</sup>) pour incubation cellulaires évoluant dans un bain de DMEM

### II.3.4.5 Protocole de comptage selon la technique de la cellule de MALASSEZ

#### a. La cellule de MALASSEZ

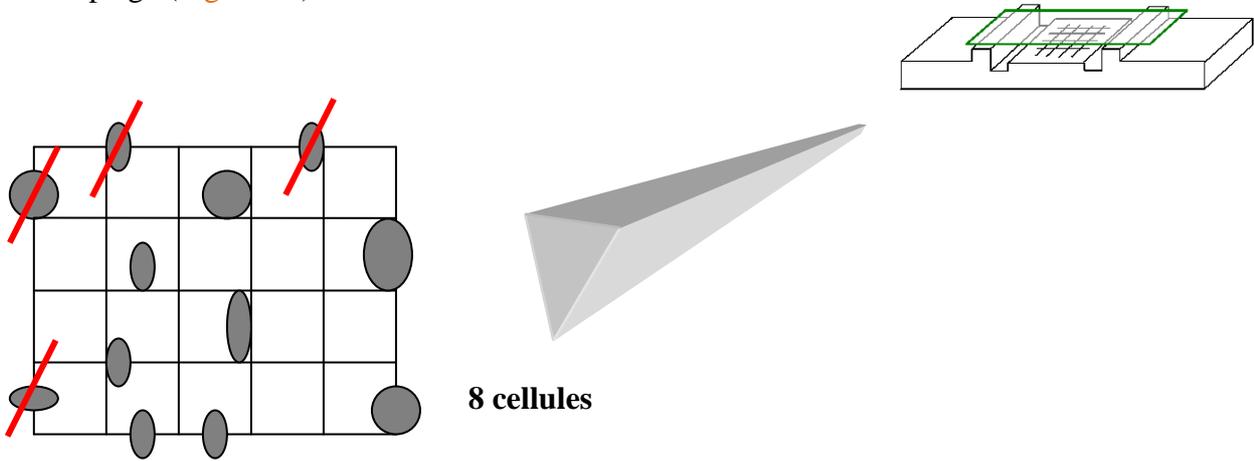
La cellule de MALASSEZ est une lame porte-objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre comportant des rigoles et un quadrillage (Figure 15).



**Figure 15** : cellule de MALASSEZ servant au comptage cellulaire sur un support quadrillé (20x20)

Placée sur une cellule de MALASSEZ recouverte d'une lamelle de verre, la suspension cellulaire à compter, est observée au microscope optique.

Le prélèvement de la suspension cellulaire se fait en milieu stérile, c'est-à-dire sous la hotte : à partir du flacon de culture, un aliquote de la suspension cellulaire est placé dans un tube à essais. Puis, nous prélevons 100 µL de cette suspension cellulaire que nous transférons dans un autre tube à essais auquel nous ajoutons 100 µL de bleu Trypan. Ce colorant facilite leur comptage (Figure 16).



**Figure 16** : marquage cellulaire au bleu Trypan facilitant le comptage cellulaire sur une cellule de MALASSEZ

Au grossissement x40, nous comptons les cellules qui se trouvent dans le champ, en ne tenant pas compte des cellules qui sont sur la ligne la plus à gauche et la ligne supérieure, mais en comptant les cellules qui sont sur la ligne la plus à droite et sur la ligne inférieure. Le résultat est reporté sur une feuille. Puis, nous déplaçons la platine jusqu'au champ suivant qui se trouve immédiatement à droite et nous comptons les cellules de la même manière. Nous reportons sur une feuille le résultat du comptage des 25 champs.

Cela nous permet de calculer la concentration cellulaire  $C_1$ , selon l'équation ci-dessous où  $N$  est le nombre total de cellules comptées,  $d$  le facteur de dilution (ici le facteur de dilution est de 2 car nous avons mis 100 µL de la suspension cellulaire et 100µL de bleu Trypan) et enfin  $n$  qui représente le nombre de champs comptés (équation numéro 1) :

**Equation 1**

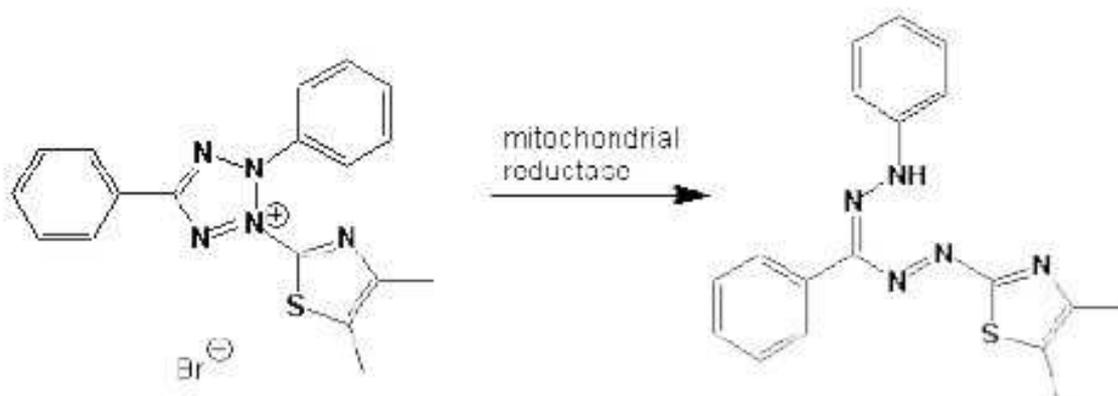
$$C_1 = \frac{N \times d \times 10^5}{n}$$

### II.3.4.6 Protocole du test MTT

L'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité se fait par comptage des cellules vivantes après coloration avec un colorant vital tel que le bleu de trypan. La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des *cellules mortes*. Ce colorant a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et deviendra bleue. Une autre explication réside dans le fait que chez une cellule vivante, la membrane intacte empêche l'entrée de la coloration dans le cytoplasme, alors qu'au contraire chez une cellule morte, la membrane lésée laisse passer le colorant ce qui aboutit à la coloration de la cellule en bleu.

Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues. Une alternative à cette méthode est la méthode qui utilise le test MTT. Il s'agit d'un moyen simple, rapide, précis et reproductible d'évaluation de la quantité et de la qualité des cellules vivantes par le biais de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives (Figure 17). Le formazan est un cristal insoluble solubilisé secondairement par une solution d'isopropanol acidifié. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, mais aussi à leur activité métabolique. Il est donc nécessaire, dans le cas où le test doit être quantitatif, de réaliser pour chaque essai une courbe d'étalonnage. La lecture est réalisée à partir d'une spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm. Nous obtenons le résultat final après soustraction de la densité optique (DO) à 690 nm de la référence.



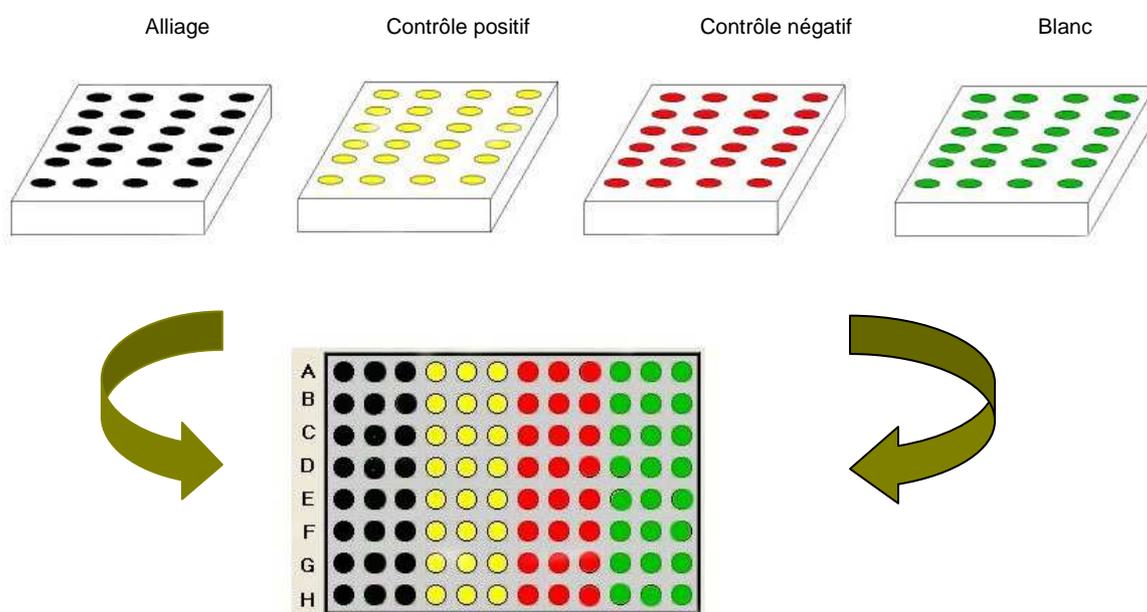
**Figure 17** : le test MTT est la réduction du tétrazolium par la succinate déshydrogénase mitochondriale

Après 72 heures d'incubation au contact du matériau, les plaques sont transférées sous la hotte 50  $\mu$ L d'une solution de MTT contenant 5mg de MTT/mL dissous dans du PBS est ajoutée dans chaque puits. Puis le tout repart à l'étuve pendant deux heures.

Après deux heures d'incubation, les plaques retirées de l'étuve sont placées sous la hotte pour éliminer la solution composée du MTT par ajout dans chaque puits de 0,5 mL de la solution de solubilisation du MTT (SIGMA M-8910).

La plaque est ensuite placée dans le MICROPLATE READER EL800 réglé pour mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 570 nm. La DO de l'échantillon de référence est quant à elle toujours mesurée à 690 nm.

La DO de notre échantillon sera donnée par la soustraction entre la D mesurée à 570 nm de l'alliage et la DO mesurée à 690 nm de la référence (Figure 18).



**Figure 18** : contrôle de nos cultures cellulaires placées sur des microplaques soumises à une analyse par lecteur d'absorbance d'un EL800 par mesure de la D.O

#### II.3.4.7 Protocole d'analyse statistique

Les résultats des mesures de la D.O sont rassemblés dans un tableau, où en colonne les puits sont référencés pour mesurer en lignes les D.O. concernant l'alliage, le contrôle positif, le contrôle négatif, et le blanc.

Ces analyses sont obtenues par l'utilisation d'un microplate reader EL 800. Et l'analyse statistique des résultats se fait finalement à l'aide du logiciel R-project.

### **II.3.5 Protocole du test de cytotoxicité**

#### **II.3.5.1 Préparation des cellules**

Deux semaines avant le début des tests, il est nécessaire de sortir un cryotube du lot 1 de l'azote liquide. A partir de ce tube, un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup> est préparé. 24 heures après la décongélation, le milieu de culture est renouvelé. Une observation au microscope inverse est alors effectuée deux fois par jour pour évaluer la densité cellulaire et la présence d'une éventuelle contamination. 72 heures après la décongélation, un repiquage est effectué soit au tiers, soit au quart, selon la densité. 24 heures après le premier repiquage, le milieu est renouvelé et une observation minutieuse est effectuée. 72 heures après le premier repiquage, un deuxième repiquage est effectué dans les mêmes conditions que le premier. Ce sont les cellules de ce dernier passage qui serviront pour les tests. Ce flacon de culture est alors remis à l'étuve et une observation minutieuse est effectuée toutes les 12 heures. Le test débute lorsque l'observation montre que le tapis cellulaire est en phase logarithmique de croissance.

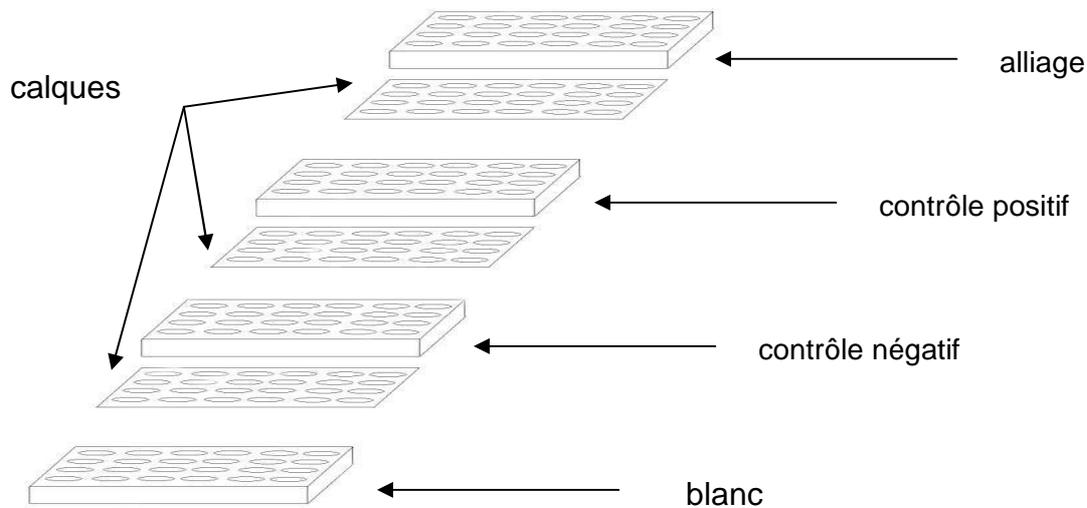
Pour cela, les cellules du cryotube sont détachées et remises en suspension en éliminant le milieu de culture par ajout de 1 mL de Trypsine EDTA qui est homogénéisée sur le tapis cellulaire. Puis la trypsine EDTA est éliminée par centrifugation à 1400 rpm pendant 4 minutes à 6°C. Après la centrifugation, le milieu est éliminé en un seul geste pour éviter de perdre trop de cellules.

L'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) est un acide diamino-tétracarboxylique de formule C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. L'EDTA comporte six sites basiques, quatre correspondant aux bases conjuguées (carboxylates) des fonctions carboxyliques et deux correspondant aux fonctions amines. Sa principale caractéristique, est son fort pouvoir chélatant (ou complexant) par lequel il forme des complexes métalliques très stables, ce qui en fait un poison. Dans les complexes, l'EDTA est lié aux cations métalliques sous la forme d'une de ses bases conjuguées. La trypsine est une enzyme de la famille des protéases. Elle catalyse l'hydrolyse de liaisons peptidiques (liaisons entre acides aminés) au sein de son substrat naturel qu'est la protéine. Ici, La trypsine est utilisée en culture cellulaire pour détacher des cellules adhérant sur les flasques de culture ou les boîtes de Petri. En effet, la trypsine clive les protéines membranaires d'adhésion du fibroblaste, et les cellules se retrouvent alors en suspension. Cette "trypsinisation" est quotidiennement utilisé pour maintenir les cultures cellulaires (en passant à une flasque de culture plus grande ou en multipliant les flasques), pour compter les cellules par cytométrie de flux (microplate reader El800), ou pour faire d'autres analyses. Cependant, ce traitement affecte un peu les cellules (viabilité, marqueurs membranaires). Aussi, l'action de la trypsine doit-elle être limitée: éliminée par lavage des cellules, elle est aussi inhibée par un ajout de sérum bovin (protéines en large excès sur les protéines membranaires), ou d'un inhibiteur spécifique.

Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du milieu frais et un aliquote de 1 mL est prélevé pour faire un comptage.

Après le comptage, la suspension cellulaire est diluée avec du milieu frais pour obtenir une concentration cellulaire de 40 000 cellules par mL. Puis, la suspension cellulaire est distribuée d'un aliquote de 0,5 mL dans chacun des puits.

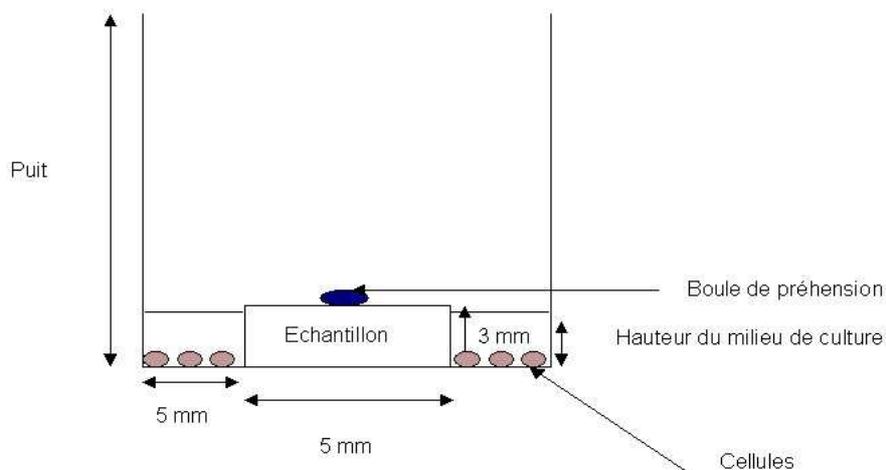
Nous allons disposer les quatre plaques 24 puits, sur des étagères séparées verticalement, pour éviter les contaminations croisées. Puis, dans chacun des puits de chacune des plaques, nous allons déposer 0.5 mL de cette suspension cellulaire, ce qui représente 10 000 cellules par  $\text{cm}^2$  (Figure 19).



**Figure 19** : méthodologie de contrôle dans la préparation des cultures pour obtenir une bonne répartition cellulaire en nombre identique dans chaque puit à l'aide de calques

Moins d'une minute après avoir déposé la suspension cellulaire, il faut déposer l'échantillon au centre du puit en s'aidant à l'aide des calques. Nous devons veiller lors de cette manipulation à faire très attention pour ne pas faire de gestes brusques qui risquent de décoller les cellules.

Après avoir déposé les échantillons dans les puits, nous plaçons les plaques à l'étuve pendant 72 heures à 37° C dans une atmosphère composée de 95% d'air et de 5% de CO<sub>2</sub> à 100% d'humidité (Figure 20).



**Figure 20** : représentation schématique d'un échantillon plongé dans un bain cellulaire de fibroblastes Bald/3T3 en suspension au fond d'un puits d'une plaque PVC

Après 72 heures d'incubation, les plaques transférées sous la hotte reçoivent la solution de 5 mg de MTT/mL qui sera ensuite éliminée par la solubilisation du MTT (SIGMA M-8910).

### II.3.5.2 Lecture au spectrophotomètre

La plaque 96 puits est placée dans le lecteur de plaques MICROPLATE READER EL800 de BIOTEK. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 570 nm qui correspond au pic d'absorption du formazan. La D.O de notre échantillon sera donnée par la soustraction entre la D.O mesurée à 570 nm de l'alliage et la D.O mesurée à 690 nm de la référence.

### II.3.5.3 Analyse statistique des résultats

Les résultats des mesures des D.O de nos cultures cellulaires placés dans un microplate reader EL800 seront présentés sous la forme d'un tableau, où les puits sont référencés en colonne, pour mesurer en lignes les différentes D.O obtenues au niveau de l'alliage, du contrôle positif, du contrôle négatif et du blanc.

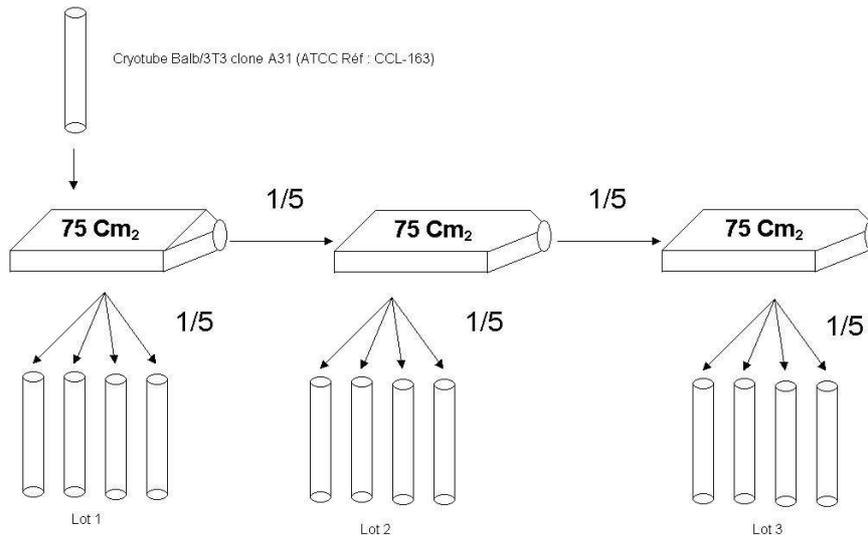
Nous calculons alors la différence entre D.O<sub>570</sub> densité optique mesurée et D.O<sub>690</sub> densité optique de la référence (blanc).

L'analyse statistique des résultats se fera à l'aide du logiciel R-project.

### II.3.6 Les différentes phases du projet

#### Phase 1 - Préparation d'un stock de cellules Balb/3T3

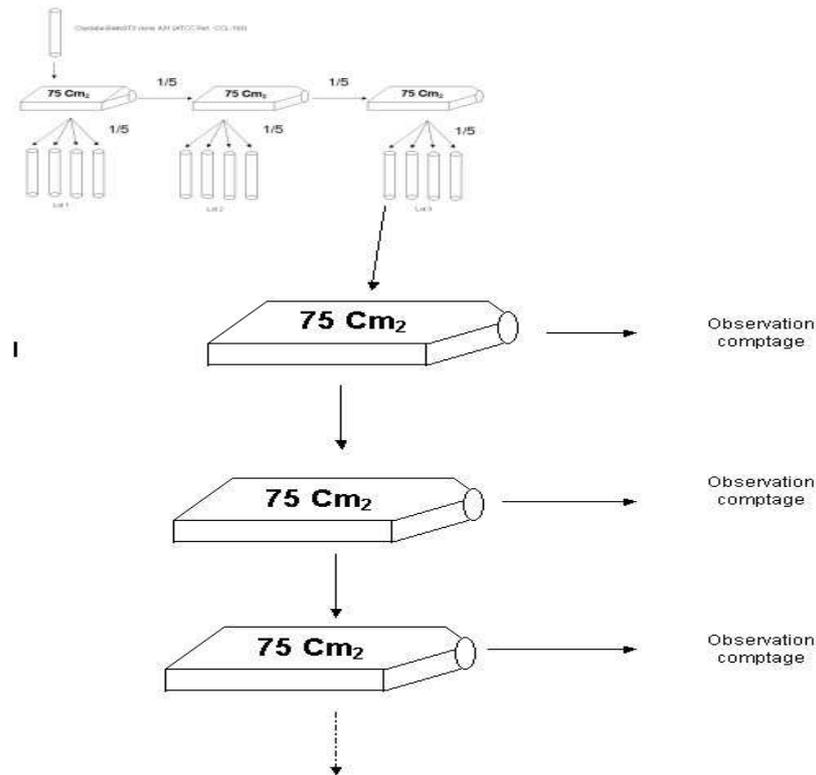
A partir du cryotube reçu, plusieurs lots de tubes sont réalisés. Cela constitue une réserve en cas de contamination bactérienne et pour disposer d'un stock de cellules afin de pouvoir répéter les expériences plusieurs fois (Figure 21).



**Figure 21** : représentation schématique de la procédure en vue de réaliser un stock cellulaire identique à partir de la décongélation d'un cryotube (ATCC). Cette décongélation est suivie d'une mise en cultures cellulaires sur des boîtes à cultures (75 cm<sup>2</sup>), permettant la création d'un stock de cryotubes (lots n°1, 2, 3) qui sera conservé par congélation

#### Phase 2 - Familiarisation avec la souche Balb/3T3 clone A31

Avant de faire des expériences sur la souche Balb/3T3, il faut en connaître ses caractéristiques. Pendant plusieurs semaines, un cryotube du lot X du stock est décongelé pour réaliser, à partir des boîtes de cultures (75 cm<sup>2</sup>), plusieurs passages. A chaque repiquage, nous effectuons des comptages pour connaître le taux de mortalité, le taux de croissance, ses capacités d'adhésion et analyser la morphologie des cellules au microscope.



**Figure 22** : utilisation d'un cryotube issu du stock congelé (lot n°3), afin de réaliser des mises en cultures et observations des cellules fibroblastes Balb/3T3

A l'issue de cette étape, nous connaissons le rythme de croissance de la souche Balb/3T3. Cela nous permettra de choisir le moment idéal pour débiter les tests (Figure 22).

### Phase 3- Test blanc

Avant de faire les tests, nous allons faire, à deux ou trois reprises, des tests blancs. Cette étape nous permettra de nous familiariser avec les protocoles des différentes manipulations. Cela sera aussi l'occasion de corriger les erreurs et d'intégrer les imprévus. Pour cette étape, nous allons tenir un journal de laboratoire où sera noté toutes les manipulations effectuées, ainsi que les problèmes rencontrés et les solutions apportées.

### Phase 4 - Test de biocompatibilité

C'est seulement lors de cette phase que nous allons prendre en compte les résultats des tests. Cette étape ne devra être effectuée que lorsque l'étape précédente aura permis de corriger tous les problèmes rencontrés. Cette étape devra être effectuée trois fois.

#### II.3.7 Planning prévisionnel du projet biocompatibilité (cf Annexe 1)

A tout moment de l'avancée des cultures, un planning prévisionnel nous permet, de savoir quelles sont les étapes à suivre pour encadrer la mise en culture d'un stock de cryotubes.

**CHAPITRE III**  
**CHOIX DES MATÉRIAUX ET DES PROCÉDÉS**

### III.1 LE TITANE

Dans le domaine médical où nous devons remplacer une pièce biologique qui subit le poids des charges (dents, phalange, omoplate) ou du corps (vertèbre, hanche), le titane et ses alliages ont pris une place de plus en plus importante car ce sont des matériaux alliant la biocompatibilité à de bonnes propriétés physiques et mécaniques. La combinaison chimique des alliages titane varie selon les éléments d'addition au titane 'pur', entraînant une modification des caractéristiques chimiques et physiques de l'alliage. Le champ des applications médicales utilisant l'alliage titane est alors élargi.

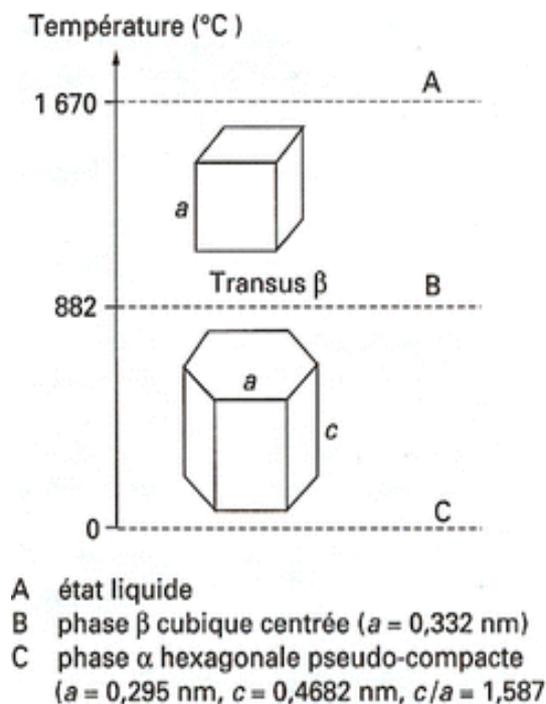
#### Composition et classification

Le titane employé en odontologie et en orthopédie est le plus souvent soit pur soit allié.

##### III.1.1 Titane pur

Le titane pur présente, à la température ambiante, une structure hexagonale compacte appelée Ti  $\alpha$ . Les paramètres cristallographiques de cette phase sont :  $a = b = 0,295$  nm et  $c = 0,468$  nm

A la température de  $882^{\circ}\text{C}$ , représentée par la **Figure 23**, la transformation allotropique  $\alpha \Rightarrow \beta$  (Transus  $\beta$  ou T $\beta$ ) se produit. La structure devient cubique centrée ; et il s'agit de la phase Ti  $\beta$ . Son paramètre cristallographique  $a$  est de  $0,3320$  nm.



**Figure 23** : transformation allotropique du titane [137]

Le potentiel d'oxydoréduction du titane, proche de celui de l'aluminium, en fait un matériau très oxydable. Cependant, comme dans le cas de l'aluminium, un film natif d'oxyde protège le matériau des environnements oxydants et corrosifs. Le titane est l'un des rares métaux biocompatibles du fait d'une bonne tolérance des organismes vivants à l'oxyde de titane. Cependant ses caractéristiques mécaniques à la rupture sont limitées (350-450 MPa).

Le titane considéré comme pur ou non allié, est plus exactement un titane commercialement pur (Ti-cp), présente sur le plan chimique des éléments incorporés tels que l'oxygène, le fer, le carbone, l'azote et l'hydrogène. En fonction du pourcentage de ces différents éléments, nous distinguons 4 types de Ti-cp (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : composition chimique du titane "commerciale pur" selon la norme DIN 17850

Composition chimique (% en poids)						
	Fe max	O max	N max	C max	H max	Ti
Grade 1	0,15	0,12	0,05	0,06	0,013	Reste
Grade 2	0,20	0,18	0,05	0,06	0,013	Reste
Grade 3	0,25	0,25	0,05	0,06	0,013	Reste
Grade 4	0,30	0,35	0,05	0,06	0,013	Reste

D'autres éléments tels que l'aluminium (Al), le vanadium (V), le palladium (Pd), le nickel (Ni) ou même le cuivre (Cu) peuvent être ajoutés au titane, en quantité plus importante, réalisant ainsi un alliage de titane dont les propriétés sont optimisées en fonction de l'application désirée (aéronautique, aérospatiale, armement...).

En médecine chirurgicale, seul le TiAl6V4 (Ti- 6 % Al-4 % V) est utilisé et appelé grade 5.

### III.1.2 Alliages de titane

Avec une température de fusion de l'ordre de 1670°C (**Figure 23**) et une masse volumique proche de 4,6 g/cm<sup>3</sup>, les nombreux alliages de titane forment une classe de matériaux très intéressants pour différents domaines tels que le nucléaire, l'aéronautique ou le biomédical.

Il existe 3 grandes classes d'alliages de titane : alliages  $\alpha$ , alliages  $\alpha + \beta$  et alliages  $\beta$ . Cette classification rend compte des phases stables à température ambiante. Les éléments d'alliages sont classés en deux catégories suivant leur capacité à stabiliser, à la température ambiante, la phase  $\alpha$  ou la phase  $\beta$ .

#### III.1.2.1 Les éléments alphagènes

Les alliages  $\alpha$  (100 %  $\alpha$  à 20°C) sont résistants à haute température.

Les éléments alphas augmentent le domaine de stabilité de la phase  $\alpha$  et par conséquent élèvent la température de transformation  $\alpha \Rightarrow \beta$ . L'aluminium est, de loin, l'élément d'alliage  $\alpha$ -gène le plus utilisé. Sa grande solubilité, aussi bien dans la phase  $\alpha$  que dans la phase  $\beta$  provoque le durcissement du matériau. Cependant au-delà d'une teneur de 6% en poids, il forme une phase fragilisante :  $Ti_3Al$  (Figure 24). La faible masse volumique de l'aluminium ( $2,69 \text{ g/cm}^3$ ) permet de réduire celle de l'alliage base titane.

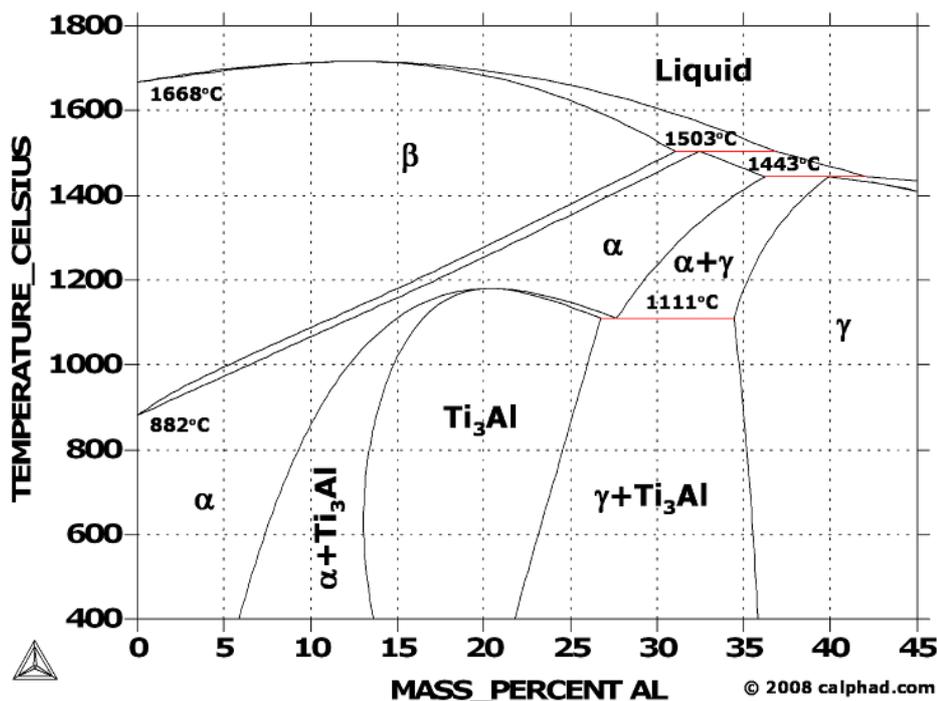


Figure 24: diagramme d'équilibre Ti - Al [158]

### III.1.2.2 Les éléments bétagènes

Les alliages  $\beta$  (100 %  $\beta$  à 20°C) sont déformables et sensibles aux traitements thermiques. Il est possible, en faisant varier les proportions de chaque phase, d'obtenir différents compromis. Les éléments bétagènes stabilisent la phase  $\beta$  en baissant la température de transformation  $\alpha \Rightarrow \beta$ . Ces éléments sont principalement le molybdène (Mo), le vanadium (V), le chrome (Cr) et le manganèse (Mn). Ces deux derniers augmentent la dureté et améliorent la réponse aux traitements thermiques. Le molybdène peut augmenter la résistance à la corrosion dans certains milieux.

Les éléments carbone, azote, oxygène et hydrogène qui forment une solution solide interstitielle, ont tendance à augmenter la résistance mécanique et la dureté du matériau tout en le fragilisant.

Les alliages  $\alpha + \beta$  sont donc mixtes.

### III.1.2.3 L'alliage TiAl6V4

L'alliage *TiAl6V4* est le plus couramment utilisé. Il représente, à lui seul, environ 50 % du marché du titane et de ses alliages. Il présente une structure biphasée :  $\alpha + \beta$ . La phase  $\beta$  étant stabilisée par le vanadium (4% en poids). Ces caractéristiques mécaniques d'élasticité (800-1100 MPa) sont sensiblement supérieures à celles du titane pur pour un grade 1 (170 MPa) et pour un grade 4 (350 MPa).

D'autres éléments d'addition comme Mn, Fe, Cr, Ni jouent un rôle très important ; car ils influencent à la fois les propriétés de résistance à la corrosion, mais aussi les propriétés mécaniques, soit par modification de la morphologie, soit par le biais de solutions solides d'insertion ou de substitution.

### III.1.2.4 Solutions solides d'insertion

Elles se feront avec des éléments non métalliques comme l'oxygène. C'est un élément alphasène, qui occupe les sites interstitiels du réseau hexagonal compact du titane  $\alpha$  et entraîne une modification des paramètres de la maille cristalline. Il en résulte une diminution du nombre de plans de glissement et le métal est donc moins ductile à température ambiante. Ce durcissement est mis en évidence par un test de traction. Il y a également le carbone et l'azote qui sont des éléments alphasènes, et qui ont une influence identique à celle de l'oxygène. L'hydrogène étant un élément bêtagène, il se dissout principalement dans la phase  $\beta$  conduisant, même pour des faibles teneurs, à la formation d'hydrures lors du refroidissement. Ceci peut conduire à des fragilités importantes. C'est pourquoi toute manipulation nécessitant la fusion du métal doit se faire sous vide ou sous argon, pour ne pas entraîner une fragilisation importante du titane (coulée, soudures).

### III.1.2.5 Solutions solides de substitution

Elles se feront avec des éléments métalliques de rayon atomique voisin de celui du titane. Nous pouvons citer l'aluminium qui est un élément alphasène, et qui durcit la phase  $\alpha$ . Nous constatons une amélioration de la résistance et une baisse de ductilité; et la tenue au fluage est améliorée. Nous limitons à 7 % en poids sa concentration dans les alliages. Le molybdène qui améliore la résistance, la ductilité et la résistance au fluage à moyenne température. Il augmente aussi la tenue à l'oxydation. Le vanadium, est un élément bêtagène, qui améliore la ductilité, mais baisse la tenue à l'oxydation. Enfin, le fer qui est un élément bêtagène, et il améliore le compromis résistance-ductilité fluage à moyenne température. Il baisse considérablement  $T_{\beta}$  et permet de travailler à température plus basse.

### III.1.2.6 Propriétés physiques et mécaniques

Parmi les propriétés physiques et mécaniques du titane non allié (**Tableaux V et VI**), il convient de retenir qu'il possède une masse volumique spécifiquement faible ( $\rho = 4,5 \text{ g.cm}^{-3}$ ), presque deux fois plus faible que celle des alliages chrome-cobalt ( $\rho = 8,4 \text{ g.cm}^{-3}$ ). A volume égal, le poids des éléments prothétiques en titane est pratiquement deux fois moindre que ceux réalisés en alliage Ni-Cr ou Co-Cr et environ quatre fois moindre que ceux réalisés en alliage base or (Au) (**Tableau V**). Il a un point de fusion élevé (aux environs de 1720 °C selon le degré de pureté), qui le classe dans la série des matériaux réfractaires ; une conduction

thermique très inférieure à celle des autres alliages utilisés en prothèse. Cette conduction thermique constitue un inconvénient par rapport aux alliages cobalt et chrome (Co-Cr) utilisés lors de la confection de plaques métalliques coulées. Enfin, sa dureté est comparable à celle des alliages précieux base or mais bien inférieure à celle des alliages non précieux (210 à 465 HV).

**Tableau V** : propriétés mécaniques du titane selon sa composition chimique

Types d'alliages	Limite d'élasticité (MPa)	Limite de rupture (MPa)	Module d'élasticité (GPa)	Allongement (%)	Dureté (Vickers)
Ti-cp grade 1	200	290 – 410	105-110	> 30	120
Ti-cp grade 2	250	390 – 540	105-110	>22	150
Ti-cp grade 3	320	460 – 590	105-110	> 18	170
Ti-cp grade 4	390	540 – 740	105-110	> 16	200

La multiplicité des combinaisons chimiques ainsi que les différentes microstructures permettent d'obtenir une variété extrêmement importante de propriétés mécaniques (Tableau VI).

Parmi les propriétés thermiques, le coefficient d'expansion thermique (CET), particulièrement bas du titane, nécessitera l'utilisation de céramiques particulières (Tableau VI).

**Tableau VI** : coefficient d'expansion thermique du titane comparée à celui d'autres matériaux

Matériaux	CET ( $10^{-6} \text{ K}^{-1}$ )
Or	14,3
Dentine	8,4
Email	11,2
Titane commercialement pur (T-cp)	8 – 9

### III.1.2.7 Corrosion

La tenue du titane à la corrosion est très satisfaisante en milieu biologique, toutefois la présence de fluorures en milieu acide diminue cette résistance.

Le comportement vis-à-vis de la corrosion du titane, commercialement pur, coulé, semble être similaire à celui des pièces usinées. En revanche, la rugosité affecte de manière significative son comportement [136].

### III.1.2.8 Mise en œuvre

Actuellement, nous pouvons dénombrer une vingtaine de systèmes différents de mise en forme du titane. Tous ces systèmes utilisent trois grands principes de mise en forme : la coulée, l'usinage et l'électroérosion.

#### a) Les procédés de coulée

Le titane étant très réactif à haute température, il est nécessaire de travailler sous atmosphère raréfiée ou sous vide. En effet, l'incorporation d'oxygène, d'azote ou de carbone modifie les propriétés de l'alliage [137].

Le titane en fusion réagit avec le revêtement et crée en surface de la pièce prothétique, une couche superficielle polluée appelée alpha-case dont l'épaisseur est comprise entre 10 et 100 nm [138]. Cette couche possède des propriétés moindres tant sur le plan mécanique que sur le plan de la résistance à la corrosion et doit être éliminée après coulée, par usinage et/ou par sablage [139] [140].

#### b) Les procédés d'usinage du titane en odontologie et chirurgie orthopédique

Ils sont à ranger dans deux catégories. La première est l'usinage par soustraction comme le décolletage, le taraudage, et le fraisage sont possibles avec le titane. Les outils d'usinage travailleront à vitesse de coupe très lente avec un bon système de refroidissement. Nous obtenons un excellent état de surface des pièces usinées. La seconde, est l'usinage mécanique direct du titane par des systèmes de conception et de fabrication assistée par ordinateur (CFAO) de couronnes et de ponts est aujourd'hui performant et nombreux sur le marché [141].

Cependant ces systèmes ne permettent pas de reproduire des formes très complexes.

#### c) Les procédés d'électroérosion

L'électroérosion du titane met en œuvre une soustraction du matériau à partir de matière forgée. Cette élimination de matière se pratique par étincelage obtenu sous forme de décharges électriques qui provoquent une fonte ponctuelle du métal qui est immédiatement éliminé par le passage d'un liquide diélectrique entre la pièce forgée et l'électrode.

Actuellement, ce procédé est le moins utilisé des trois.

Les techniques de coulée et d'usinage présentent chacune des avantages et des inconvénients. La mise en œuvre par coulée permet la réalisation de pièces complexes et uniques. Cependant

un certain nombre de problèmes subsistent, tels les défauts de coulée et la formation d'alphacase. Cette couche difficilement éliminable provoque une nette diminution de la résistance de la liaison céramo-métallique [142].

Alors que la mise en œuvre par usinage permet la fabrication de pièces sans porosité et sans alphacase, de l'élément unitaire au bridge complet implantaire.

### III.1.2.9 Aptitude à la liaison céramo-métallique du titane

La surface des pièces coulées en titane est sujette à la contamination par l'oxygène et interagit avec les matériaux de revêtement. La couche extérieure d'alpha-case caractéristique d'une oxydation à haute température est un obstacle à l'établissement de la liaison céramo-métallique.

Il est indispensable d'éliminer cette couche par sablage à l'alumine non recyclée avant cuisson de la céramique feldspathique. Ceci crée des rugosités limitant le risque de fissuration à l'interface. Certains auteurs ont préconisé une attaque de surface à l'acide ( $\text{HNO}_3\text{-HF}$ ) pour nettoyer la surface du titane.

Le très faible coefficient de dilatation thermique du titane ( $9,6 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ ) exige l'utilisation de céramiques spécialement conçues pour le titane [143].

Une étude a montré qu'il était préférable de cuire une céramique basse fusion spécifique sous atmosphère réduite d'argon plutôt que sous vide. Un revêtement projeté d'or permet encore d'améliorer la liaison céramo-métallique sans pour autant atteindre les valeurs obtenues avec les alliages conventionnels. Dans les conditions de cette étude et quel que soit le traitement de surface, les alliages coulés présentent une résistance au test de flexion de la liaison céramo-métallique supérieure à celle des échantillons usinés [144].

Les céramiques basse fusion, spécifiques au titane, ont été maintenant développées. Bien que leur coefficient d'expansion thermique ait été adapté à celui du titane, la valeur de la liaison est encore inférieure à celle obtenue avec un alliage base palladium [145].

A la lecture de la bibliographie la céramique à apposer sur un alliage titane qui nous semble intéressant d'étudier est la zircone. Nous allons en expliquer les raisons et en déterminer un intérêt dans notre recherche.

## III.2 LA ZIRCONNE

La zircone est le nom commun de l'oxyde de zirconium ( $\text{ZrO}_2$ ). Ce matériau est une céramique technique d'aspect opaque. Appelé CZ (Cubic Zirconia) lorsqu'il est transparent, il est utilisé pour imiter le diamant. Il ne faut pas le confondre avec le zircon qui est un silicate de zirconium ( $\text{ZrSiO}_4$ ).

La zircone massive peut être mise en œuvre par frittage. Après frittage, elle se caractérise par une très grande résistance à la rupture et à la fissuration.

### III.2.1 Zircone pure

Le diagramme d'équilibre Zr – O décrit à la Figure 25, nous montre que la zircone présente trois structures cristallographiques différentes qui varient selon la température et le pourcentage d'oxygène.

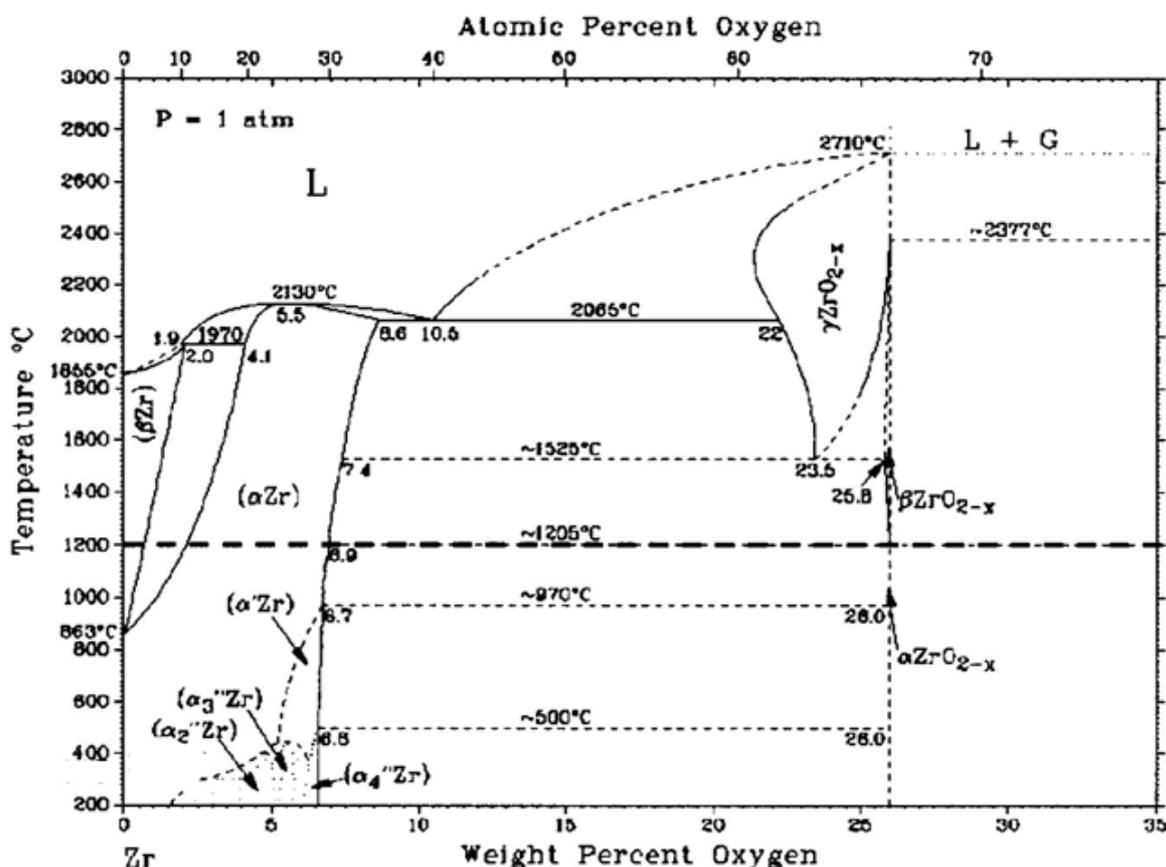


Figure 25: diagramme de phase binaire Zr-O [158]

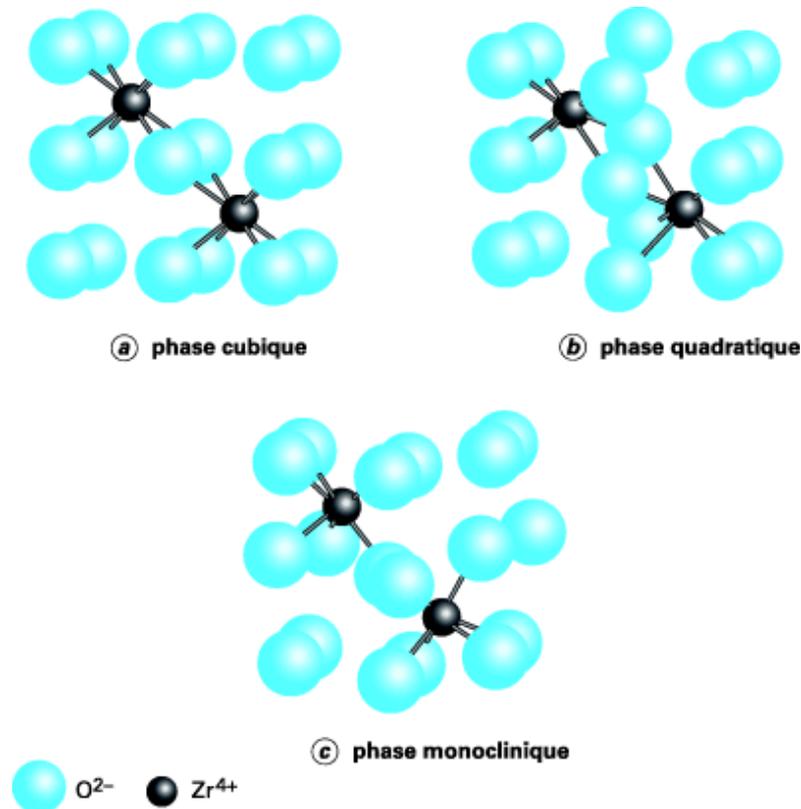
A température ambiante, la zircone pure possède une structure cristalline monoclinique. Le zirconium est alors coordonné par 7 ions oxyde (Figure 26). Cet arrangement relativement irrégulier explique en partie la tendance de la phase monoclinique à former des macles pour minimiser les distorsions du réseau.

La zircone monoclinique présente les paramètres de maille suivants :

$$a = 0,5156 \text{ nm} \quad b = 0,5191 \text{ nm} \quad c = 0,5304 \text{ nm} \quad \beta = 98,9^\circ$$

Cette phase est en fait dérivée de la structure fluorine  $\text{CaF}_2$ , qui est une structure cubique dans laquelle les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont coordonnés par 8 ions  $\text{F}^-$ . Cependant, la faible valeur du rapport du rayon atomique des ions  $\text{Zr}^{4+}$  sur celui des ions  $\text{O}^{2-}$ , fait que la structure fluorine est déformée pour pouvoir être stable à température ambiante. Ceci explique pourquoi les valeurs des paramètres cristallins  $a$ ,  $b$  et  $c$  de la zircone monoclinique sont relativement proches les unes des autres.

Grâce à la dilatation thermique, la structure se relaxe partiellement permettant aussi d'obtenir une plus grande symétrie. Ainsi, la zirconite monoclinique devient quadratique à partir de 1100 °C environ. La phase quadratique est plus dense que la phase monoclinique. La phase cubique s'obtient à haute température (1700°C).



**Figure 26:** représentation de l'environnement de l'ion zirconium pour les phases cubique, quadratique et monoclinique de la zirconite pure. A retenir que la phase tétragonale ou quadratique est stable, la phase monoclinique en prisme déformé est instable. [159]

### III.2.2 Zirconite alliée

La zirconite présente une évolution cristallographique en fonction de sa température, lors de la mise en forme et du refroidissement entre 1 100 °C et 1 000 °C, la phase quadratique devient monoclinique. Ce changement cristallographique s'accompagne d'une variation volumique de 3 % qui pourrait être dommageable au matériau (Tableau VII). En raison de cette caractéristique de la zirconite pure, l'utilisation d'un additif dopant (oxyde) est indispensable afin de stabiliser les formes cubique ou quadratique de la zirconite à température ambiante.

**Tableau VII** : modification des propriétés physiques de  $ZrO_2$  selon la structure cristallographique

ZrO <sub>2</sub>	Structure	T (°C)	Propriétés mécaniques	dilatation T°C
Cubique $\gamma$ (gamma)	$a=b=c$	>2350	faibles	
Quadratique $\beta$ (beta)	$a=b \neq c$	1170-2350	élevées	Volume-3%
Monoclinique $\alpha$ (alpha)	$a \neq b \neq c$ $\beta \neq 90^\circ$	< 1170	faibles	Volume

Le principe de stabilisation de la zirconie pure repose sur la mise en solution d'autres oxydes contenant des ions hétérovalents de valence plus faible que celle du zirconium tels que l'oxyde de calcium (CaO), l'oxyde d'yttrium ( $Y_2O_3$ ) ou l'oxyde de magnésium (MgO), afin de créer des lacunes. Si l'oxyde dopant présente des cations de faible taille ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), ceux-ci forment une solution solide d'insertion dans le réseau de la zirconie. Pour les plus gros cations ( $Y^{3+}$ ,  $Ce^{4+}$ ), ces derniers forment des solutions solides de substitution.

La formation de ces solutions solides agit sur la stoechiométrie de l'oxyde. En augmentant le nombre de lacunes anioniques, le réseau cristallin est de moins en moins contraint, ce qui permet à la zirconie monoclinique de se transformer en zirconie quadratique, voire cubique.

La **Figure 27** présente les phases de zirconie obtenues en fonction de la température et de la quantité d'yttrine introduite en solution solide. Nous pouvons donc obtenir une structure cubique à température ambiante grâce à l'ajout de 16 at.% d'yttrium.

L'yttrine renforce la zirconie, lors de sa déformation martensitique qui survient lors de la transformation de la phase  $\alpha$  en phase  $\beta$ . Elle permet d'agir en surface, contre l'eau, et en profondeur de la structure en s'opposant à la contrainte de variation de volume et de vieillissement lors du refroidissement de la zirconie, aboutissant à la transformation de la phase  $\beta$  en phase  $\alpha$ .

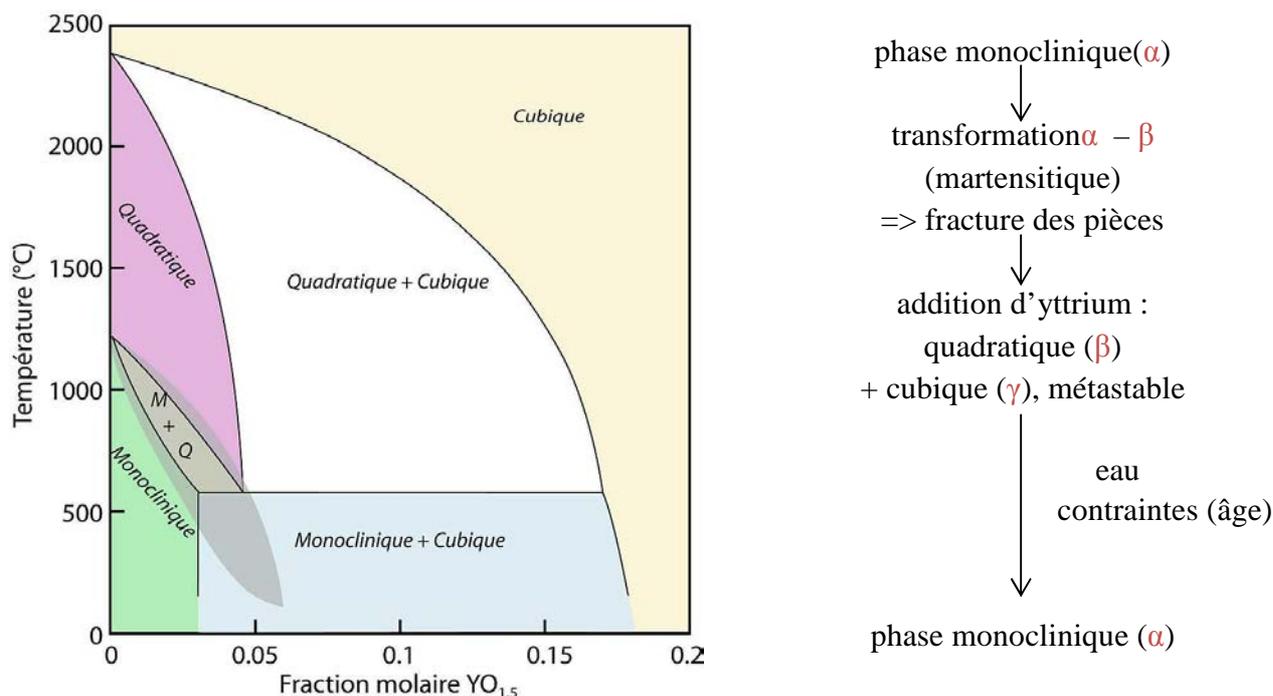


Figure 27: Diagramme de phase binaire du système  $ZrO_2$ - $Y_2O_3$  [146]

### III.2.3 Usages médicaux

La **zircone** est utilisée dans la réalisation de prothèses dentaires (Zircone Y-TZP) ou des têtes fémorales des articulations artificielles de hanches.

La céramique Y-TZP (Ytria Tetragonal Zirconia Polycrystal) est une zircone partiellement stabilisée à l'yttrium qui possède des propriétés particulièrement adaptées au comportement des tissus biologiques [147]. Elle présente, en plus d'une biocompatibilité élevée, des propriétés chimiques, physiques, mécaniques et thermiques qui sont d'un grand intérêt pour l'implantologie dentaire [148].

La zircone Y-TZP est une céramique technique constituée à 100 % de polycristaux quadratiques métastables d'oxyde de zirconium après adjonction d'environ 2 à 3 % molaire d'oxyde d'yttrium ( $Y_2O_3$ ) en tant qu'agent stabilisateur [149]. L'adjonction d'un agent stabilisateur est un élément indispensable à l'obtention d'un polycristal ayant une structure parfaitement stable [150].

### III.2.4 Rugosité

La présence plus ou moins importante d'aspérités à la surface d'un matériau est une propriété dont la prise en compte est indispensable en implantologie. Plus la rugosité est faible, ou encore plus sa surface est lisse, et plus son intérêt sur le plan parodontal grandit : un fois lisse,

la surface de la zircone, associée à sa neutralité électrique, favorise une diminution des sites d'ancrages de la plaque bactérienne et facilite l'hygiène, facteur essentiel dans toute maintenance parodontale, en particulier lors de réhabilitation prothétique sur implants [151] [152].

La rugosité de la zircone dépend de plusieurs facteurs : la taille des grains, sa densité ainsi que sa porosité [153].

### **III.2.5 Processus de mise en forme**

La zircone Y-TZP massive est communément créée par frittage, une des méthodes permettant l'obtention de céramiques techniques et de prototypes de pièces mécaniques. Cette technique peut être décrite comme une consolidation d'un matériau par traitement thermique. La taille des grains et la densité du matériau dépendent étroitement des conditions de frittage. L'emploi d'une presse isostatique à chaud ou HIP (Hot Isostatic Pressing) en post-frittage améliore la microstructure et les propriétés (usure, contrainte à la rupture) des biocéramiques utilisées dans le domaine dentaire (alumine et zircone) [154]. Le frittage de la zircone permet de créer des liaisons atomiques courtes et solides, d'où un module d'Young de l'ordre de 200 GPa, signifiant que ce matériau possède une densité et une rigidité élevées [155].

### **III.2.6 Intérêt en implantologie dentaire**

La biocompatibilité de la zircone Y-TZP en fait un matériau très bien toléré par les tissus mous, permettant d'obtenir dans le cadre d'une implantation zircone-titane, une stabilité des tissus mous péri-implantaires à long terme. L'adhésion des fibroblastes et ostéoblastes est plus importante que dans le cas d'utilisation de titane [156]. L'avantage de prothèses et d'implants dentaires en zircone est la prévention des péri-implantites.

**CHAPITRE IV**  
**REVÊTEMENTS SUR ALLIAGE TITANE : ÉLABORATION, CARACTÉRISATION**  
**ET CULTURES CELLULAIRES**

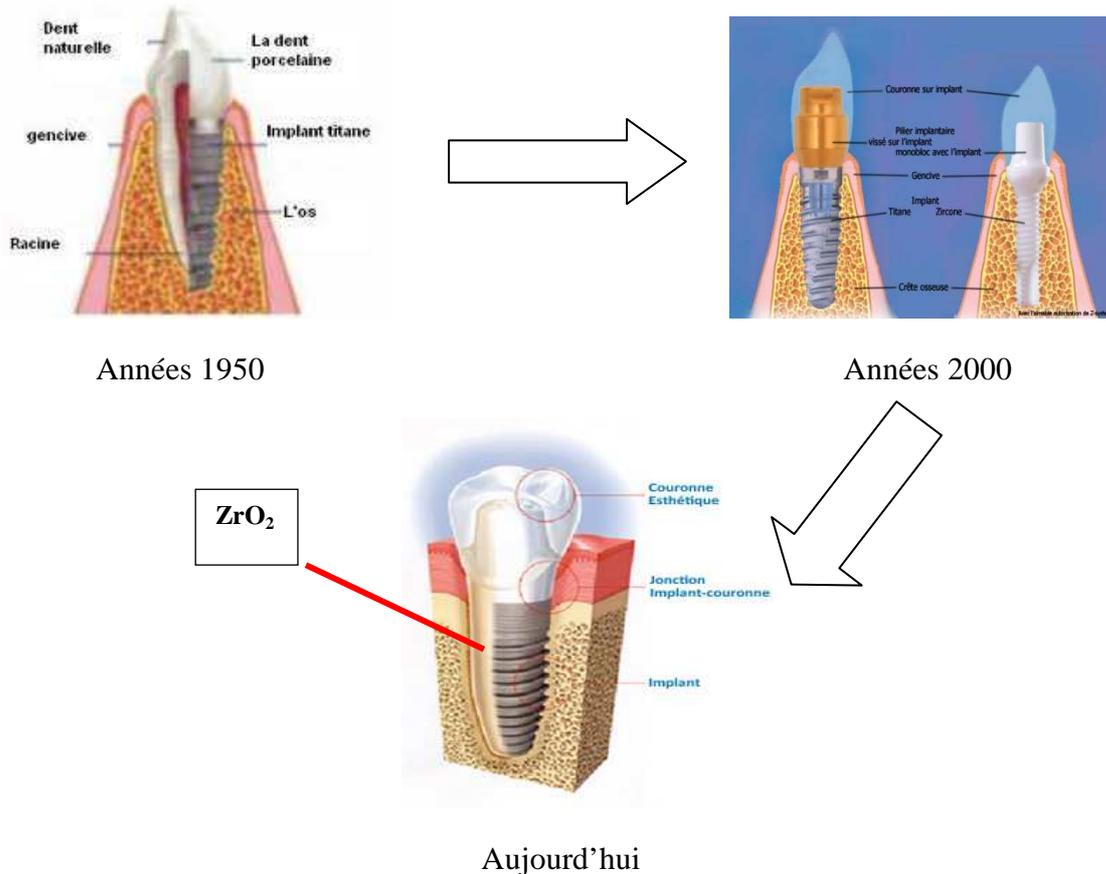
## IV.1 INTRODUCTION

Dans le cadre de notre recherche, nous avons choisi, après avoir étudié la littérature, de travailler sur des matériaux considérés comme étant biocompatibles, en s'appuyant sur la compétence de l'IJL (Institut Jean Lamour) et du LERMPS (Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Matériaux, les Procédés et les Surfaces) à réaliser des revêtements sur des alliages métalliques. Mais également, en envisageant de soumettre nos dépôts sur alliage, à la contrainte de la culture cellulaire de laboratoire.

Compte tenu des informations disponibles dans la littérature et des besoins en chirurgie dentaire, nous avons choisi d'utiliser l'alliage TiAl6V4 de grade 5. Concernant la nature chimique du revêtement, notre choix s'est fixé sur la zircone. Comme cet oxyde peut exister sous plusieurs formes cristallographiques, il nous est apparu opportun d'étudier l'influence de la variante structurale de la zircone sur le caractère biocompatible des revêtements. Dans l'objectif d'apporter des éléments d'information permettant de discuter des résultats obtenus, nous avons étendu notre recherche de fonctionnalité de revêtements à d'autres matériaux comme par exemple, l'alumine, le dioxyde de titane, l'oxyde d'yttrium ou encore le carbone amorphe. Dans le cadre de ce chapitre, nous présentons dans un premier temps le détail de nos protocoles opératoires puis nous focalisons notre propos sur la caractérisation physico-chimique et structurale des films de zircone. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à la discussion du caractère biocompatible de nos revêtements à partir de résultats obtenus après cultures cellulaires.

## IV.2 BUT DE L'ETUDE

Notre axe de recherche étant d'augmenter les propriétés biocompatibles du TiAl6V4 car, la littérature a montré les limites de cet alliage dans certaines chirurgies réparatrices orthopédiques, maxillo-faciales de réparation ou de reconstruction et dentaires. Cependant, il garde encore de très nombreuses applications dans le domaine de la chirurgie réparatrice soumise à une charge pour supporter le poids du corps (vertèbre), ou une fonction (phalange). Alors que la chirurgie orthopédique trouve des limites à l'utilisation du dioxyde de zirconium ( $ZrO_2$ ) et privilégie à nouveau le TiAl6V4, les chirurgies dentaire et maxillo-faciale développent des procédés réparateurs à partir de la zircone, en remplacement du TiAl6V4. Comme représenté à la **Figure 28**, serait-il envisageable d'allier TiAl6V4 et  $ZrO_2$ , afin d'obtenir un alliage revêtu aux propriétés mécaniques et biologiques améliorées et d'en étudier les effets dans un laboratoire de biologie cellulaire ? Un laboratoire où l'alliage TiAl6V4, revêtu par une couche de zircone plus ou moins dopée à l'yttrium  $(Zr,Y)O_{2-x}$ , serait contrôlé par des tests portant sur la colonisation cellulaire, l'analyse de l'augmentation de la bio activité ( $t^\circ C$ , pH), l'analyse comparative d'une modification de la résistance à l'usure en présence d'un revêtement en couche mince, et l'application à la biocompatibilité clinique.



**Figure 28** : évolution des procédés techniques de ces 60 dernières années

### IV.3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### IV.3.1 L'alliage titane

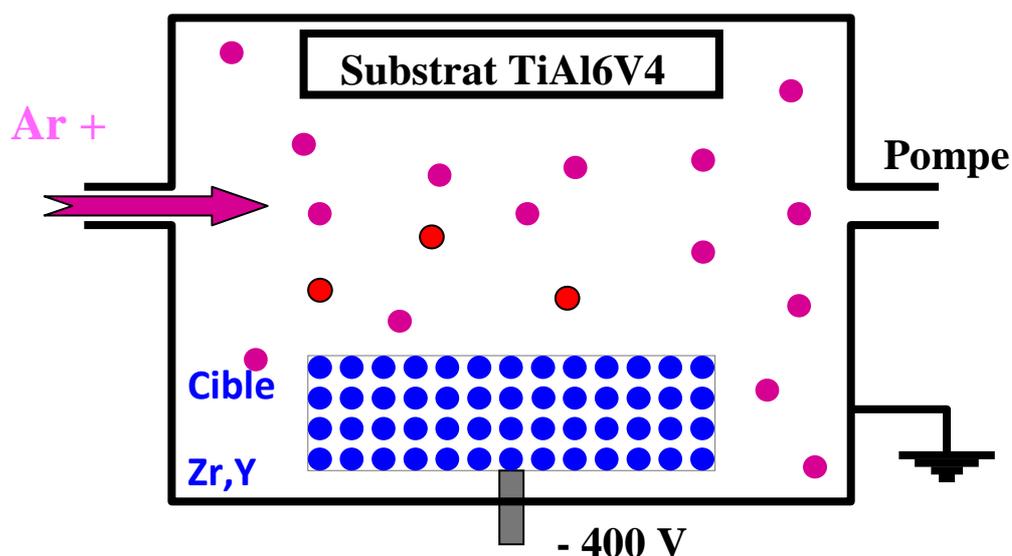
Après lecture de la littérature, la biocompatibilité de l'alliage est influencée par sa composition chimique et son état de surface. Afin d'étudier leurs influences sur la future colonisation cellulaire, il a été choisi la création de modèles de laboratoire à surface lisse (poli miroir), à rugosité variable (Ra) sur des surfaces planes (plot) ou non (vis) à partir de l'alliage titane TiAl6V4.

#### IV.3.2 Autres revêtements

Dans l'objectif de tester les propriétés fonctionnelles des trois formes structurales de zircone, nous avons élaboré par pulvérisation magnétron en conditions réactives ces trois nuances de  $ZrO_2$ . Ces différentes formes peuvent être obtenues en modifiant la concentration en yttrium des films. La méthode la plus simple pour arriver à ce type de résultats consiste à employer cibles de pulvérisation de teneurs variables en Zr et en Y. Ces films seront élaborés sur des substrats en TA6V grade 5, mais aussi en verre ou en silicium pour faciliter les caractérisations physico-chimiques de base.

### IV.3.3 Élaboration de revêtement par procédé PVD

Les dépôts de la zircone pure et alliée (cible), sur le substrat de TiAl6V4, ont été réalisés par pulvérisation magnétron. Nous avons pour cela pulvérisé à basse pression (de l'ordre du Pa), une cible métallique à base de zirconium. La vapeur métallique ainsi produite réagit en surface des substrats avec l'oxygène introduit dans le mélange gazeux de façon à produire un composé céramique sous forme d'un film mince comme schématisé à la [Figure 29](#).



**Figure 29** : schéma d'une enceinte PVD, principe de la pulvérisation magnétron

Les paramètres pour l'utilisation du procédé PVD à l'Institut Jean Lamour sont répertoriés au [Tableau VIII](#). Afin de reproduire les mêmes conditions expérimentales pour nos dépôts sur nos lots (plot et vis) de TiAl6V4 et lame de verre, avec et sans revêtement de zircone intrinsèque  $ZrO_2$ ) ou enrichi à l'yttrium (en utilisant des cibles métalliques de composition :  $Zr_{92}Y_8$  et  $Zr_{84}Y_{16}$ ).

**Tableau VIII** : Paramètres des traitements PVD

Débit d'oxygène	Débit d'argon	Intensité appliquée	Pression de travail	Temps	Distance cible-substrat
3,5 Ncm <sup>3</sup> /min	35 Ncm <sup>3</sup> /min	0,5A	1,7Pa	3 heures	6 cm

A l'issue de nos manipulations, les revêtements ainsi élaborés ont été caractérisés par diffraction des rayons X, par spectrométrie Raman ou encore par microscopie électronique à balayage.

La caractérisation de base de nos revêtements étant achevée, nous avons soumis nos échantillons revêtus et nos implants de commerce de marque IDI, à la culture cellulaire réalisée au laboratoire d’Histologie-Embryologie Microscopie Électronique la Faculté de Médecine de Nancy.

#### IV.3.4 Cultures cellulaires

Pour bien étudier nos revêtements, d’un point de vue biologique, nous devons comparer nos résultats à des échantillons de références où la réponse cellulaire à leur contact est connue, reproductible, et fiable. Nous parlons d’échantillons témoins pour des supports en lames de verre et polymères. Ils serviront à comparer les analyses effectuées sur des implants de commerce (référence), des plots et des vis de TiAl6V4 revêtus ou non d’un film mince en  $(Zr,Y)O_{2-x}$  qui représenteront nos modèles de laboratoire.

Les revêtements de zircone obtenus sur nos supports d’alliage titane (étape 1- IJL), seront comparés à d’autres matériaux céramiques aux propriétés également biocompatibles (étape 2-LERMPS), comme évoqués dans la littérature.

Les cellules retenues servant à nos cultures sont des fibroblastes Balb/3T3. L’ensemble des échantillons revêtus et non revêtus va être mis en contact en présence de nos groupes cellulaires selon la procédure de culture de référence (norme ISO 10.993) précédemment décrite (*cf chapitre II.3*).

Les résultats d’adhésion sont étudiés aux microscopes électroniques à balayage (MEB) et à transmission (MET). Ces analyses ont été réalisées au laboratoire de *médecine* d’histologie-embryologie et microscopie électronique de la Faculté de Médecine de Nancy, et divisées en deux phases.

Concernant la phase I, six analyses ont été appliquées portant sur l’étude des bains pour valider le lot cellulaire en cours de culture. Il a été étudié seul (analyse n°1), en présence des témoins lame de verre et polymères PVC (analyse n°2), en présence des plots de TiAl6V4 sans revêtement (analyse n°3), puis avec revêtement  $Zr_{100}$  (analyse n°4),  $Zr_{92}Y_8$  (analyse n°5), et  $Zr_{84}Y_{16}$  (analyse n°6). Toutes ces cultures ont fait l’objet d’un examen portant sur la mise en évidence de l’adhésion cellulaire sur l’échantillon.

Pour chaque culture de la phase I, la quantité d’échantillons pour chaque lot est au nombre de 7 : 7 lames de verres, 7 polymères, 7 plots de TiAl6V4  $\pm$  7(Zr, Y) $O_{2-x}$ , 7 vis de TiAl6V4  $\pm$  7(Zr, Y) $O_{2-x}$ .

Pour la seconde étape de notre étude des cultures cellulaires appelée phase II, douze analyses ont été réalisées pour valider le lot cellulaire en cours de culture. Nous avons étudié nos bains de cultures seules (analyse n°1), puis en présence des témoins en lame de verre et polymères PVC (analyses n°2). Nous avons continué l’étude de nos bains en présence de plots et vis de

laboratoire en TiAl6V4 sans revêtement (analyses n°3), puis avec différents revêtements tels que la zircone amorphe (a-YSZ) (analyse n°4), l'yttrine ( $Y_2O_3$ ) (analyse n°5), l'alumine ( $Al_2O_3$ ) (analyse n°6), le carbone (DLC) (analyse n°7), le dioxyde de titane amorphe (a-TiO<sub>2</sub>) (analyse n°8). Les critères pour mettre en évidence de l'adhésion cellulaire sur l'échantillon ont été recherchés.

Nous avons voulu également étudier les effets néfastes, sur l'adhésion cellulaire, en y plongeant dans les bains, nos revêtements artificiellement corrodés ou vieillis. Cette dégradation de nos dépôts a été possible par l'étude de cellules évoluant dans des bains de corrosion avec dégradation des revêtements d'alumine ( $Al_2O_3$ ) (analyse n°9), d'yttrine ( $Y_2O_3$ ) (analyse n°10), de zircone cubique massive (YSZ massif) (analyse n°11). La zircone qui a été placée durant 7 heures de cycle en autoclave B, reproduit de manière théorique un vieillissement in vitro de la zircone cubique massive (YSZ massif vieilli) correspondant à 20 ans in vivo. Cette dernière sera comparée à une couche de TiAl6V4 avec revêtement ZrO<sub>2</sub> (analyse n°12), déjà validée en *phase I*.

Ainsi par ce protocole établi en deux temps au laboratoire de biologie cellulaire, il est ainsi possible de comparer les procédés d'élaboration des différents revêtements réalisés en deux temps (étape 1 et 2), avec les mêmes conditions de cultures cellulaires (phase 1 et 2) également étalées dans le temps.

Pour chaque culture de la phase II, la quantité d'échantillons par lot est également au nombre de 7: 7 lames de verres, 7 polymères, 7 plots et 7 vis de TiAl6V4 revêtus d'un film de a-YSZ, de a-TiO<sub>2</sub>, de DLC, de  $Y_2O_3$  et de  $Al_2O_3$ , 7 YSZ massif et 7 YSZ massif vieillis. A cela, nous réalisons deux bains de corrosion d' $Al_2O_3$  et d' $Y_2O_3$ .

Pour les deux phases, chaque culture cellulaire de fibroblastes est soumise aux mêmes lots. Et, une vérification, par les analyses n°1 et n°2 de l'étude, a été automatiquement effectuée afin d'exclure toute contamination des bains de cultures, qui pourrait influencer et invalider les résultats obtenus en présence des témoins (lame de verre, polymère, TiAl6V4 nu), ou des références (DLC, a-TiO<sub>2</sub>, YSZ massif).

Chaque culture soumise aux échantillons témoins a été étudiée selon le cahier des charges issu de la norme ISO 10.993, portant sur des critères qualitatifs comme la vérification des lots de culture en termes de vitalité: ratio cellules vivantes/mortes. Mais également selon des critères quantitatifs par l'étude des populations de fibroblastes sur leur 'état de santé apparente', quand ils sont en contact ou pas avec les échantillons. Nous observerons ces critères morphologiques par la MO (microscopie optique), MORE (microscopie optique rétro éclairée) avec filtres, les morphologiques d'adhérence par le MEB (microscopie électronique à balayage), et cytoplasmiques grâce au MET (microscopie électronique par transmission).

Par ce protocole 'simple', il nous est permis de définir la notion de viabilité cellulaire qui correspond à un critère permettant de définir la notion plus importante qu'est la biocompatibilité sur des caractères d'adhésion et de morphologies cellulaires signalant une compatibilité des revêtements ou pas avec une recherche sur les échanges cellulaires, l'analyse structurale des cellules, les signes de souffrances ou de lyses, la recherche ou pas des cycles mitotiques, etc.

➤ **Lecture des résultats**

Nos analyses, selon la nécessité de caractériser une composition chimique de surface, un état cristallographique de nos alliages TiAl6V4 et (Zr,Y)O<sub>2-x</sub>, s'effectueront par MEB, par l'analyse par dispersion en énergie des photons X (EDX ou EDS), la *diffraction des rayons X* (DRX) en conditions  $\theta/2\theta$ , alors que pour nos cultures cellulaires, nous utiliserons la MO, la MORE, le MEB et le MET.

Pour ces deux dernières méthodes citées, il faut préparer les échantillons cellulaires à la lecture au microscope électronique à balayage par la découpe des échantillons. Elle va nous permettre de voir l'épaisseur et l'adhérence du dépôt. L'enrobage des échantillons dans une résine pour permettre de les polir quand ils sont trop petits pour être manipulés à mains nues. Il permet également d'assurer une bonne préparation des bords. La troisième étape est le polissage, qui permet d'obtenir une surface propre plane spéculaire ou 'polie miroir' pour l'observation au microscope. Puis vient l'attaque chimique (Kroll) dont le but est de créer un contraste révélant la microstructure du matériau lorsque celle-ci n'apparaît pas à l'issue du polissage. Les différents constituants n'ont plus le même pouvoir réfléchissant ou changent de couleur. Ainsi nous pouvons observer la taille, la forme des grains et leur composition. Enfin, la métallisation consiste à venir déposer une fine couche d'or à la surface de l'échantillon pour rendre conducteur l'échantillon revêtu par un dépôt de zircone isolante.

#### **IV.4 CARACTÉRISATION DES SUBSTRATS ET DES REVÊTEMENTS**

Nous rappelons que pour comprendre l'influence de la couche mince (Zr,Y)O<sub>2-x</sub> comme revêtement d'un alliage titane, nous avons créé des modèles de laboratoire sous forme de plots et vis. La préparation de ces modèles fait suite à l'acquisition d'implants dentaire de marque IDI. En étudiant ces implants IDI, dans leur composition chimique et dans la compréhension des procédés contribuant à l'élaboration de leur état de rugosité en surface, nous avons reproduit un modèle de laboratoire (1<sup>er</sup> protocole = *étapes I+II*) utilisable à grande échelle pour la culture cellulaire (2<sup>ème</sup> protocole = *phases I+II*). Que ce soit l'implant de commerce IDI ou nos modèles (plot ou vis), ils ont été analysés et comparés au niveau de leur composition chimique et de leur état de surface.

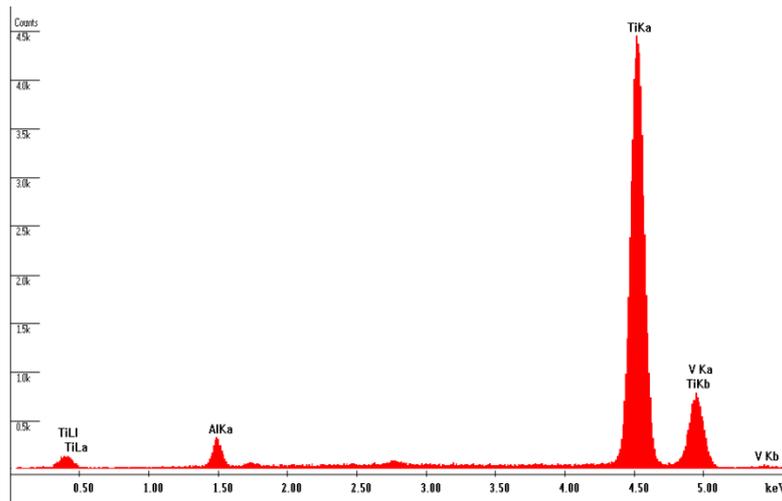
Dans une première phase, une caractérisation des substrats a été réalisée. Ces substrats sont des plots en TiAl6V4 prélevés dans une barre ainsi que des vis commerciales, comparés à des implants dentaires produits et commercialisés par la société IDI.

Cette phase vise notamment à valider le bien fondé du choix de plots et vis pour les essais de prolifération cellulaire ultérieurs.

## IV.4.1 Caractérisation des substrats

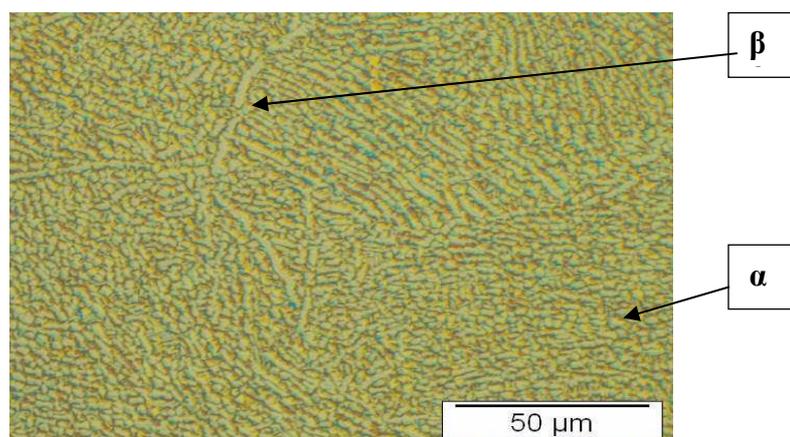
### IV.4.1.1 Plots en TiAl6V4

A partir d'une barre, des plots de 20 mm de diamètre et de 8 mm d'épaisseur sont découpés et polis en vue d'analyses chimiques (EDX) et microstructurales (MEB). Comme l'indique le spectre EDX réalisé sur un plot poli (Figure 30), le substrat contient bien en plus du titane les éléments aluminium et vanadium..



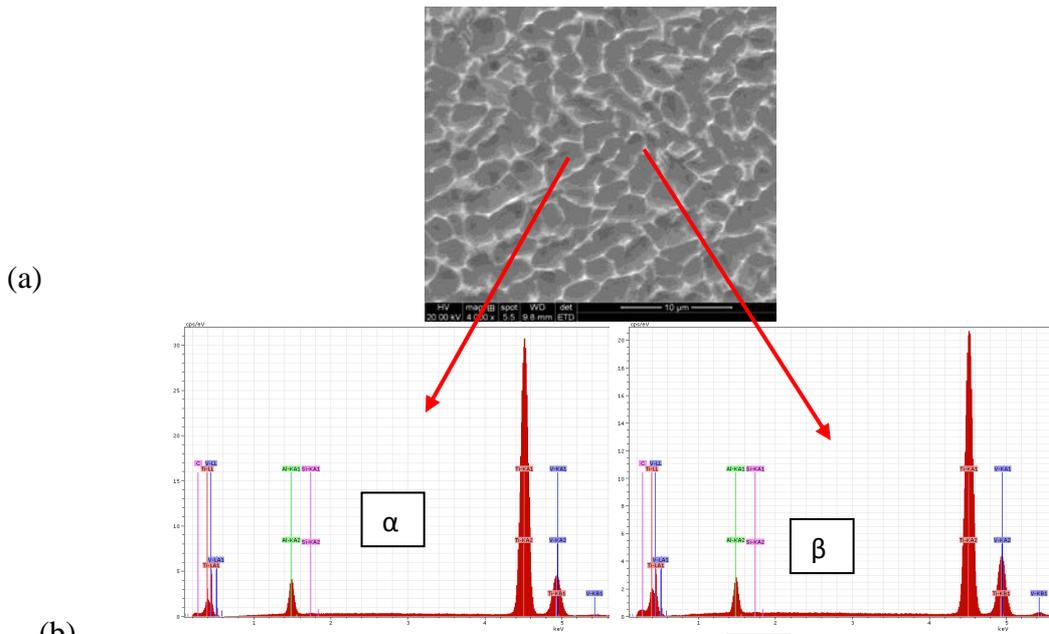
**Figure 30** : spectre EDX effectué sur la surface polie d'un plot de TiAl6V4

Les observations au microscope optique d'un échantillon métallographique poli et attaqué chimiquement avec le réactif de KROLL, mettent en évidence la présence de deux phases (Figure 31). La phase plus claire correspond à la phase  $\alpha$  stable à la température ambiante et la plus sombre est la phase  $\beta$  qui est stabilisée par la présence de vanadium.



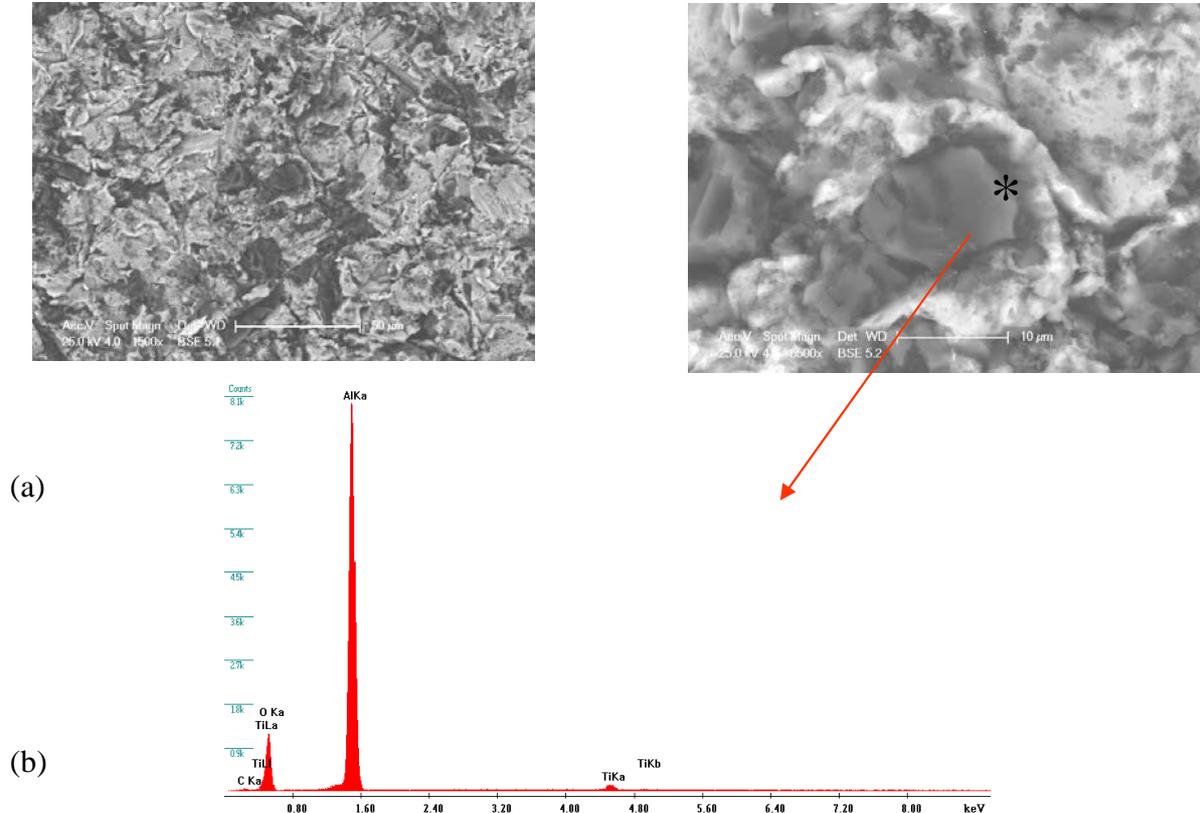
**Figure 31**: micrographie optique relative au substrat TiAl6V4 (coupe sens travers)

Les observations MEB confirment bien évidemment la présence des deux phases  $\alpha$  et  $\beta$  (Figure 32). Nous avons réalisé les analyses chimiques EDX de chaque phase. Nous pouvons voir qu'au joint de grain la composition en vanadium est plus importante.



**Figure 32** : micrographie MEB (a) et spectres EDX(b) des phases  $\alpha$  et  $\beta$

Une fois réalisée l'analyse chimique de surface, le plot de TiAl6V4 poli miroir a été sablé à l'alumine (30s à 120s) jusqu'à l'obtention de reliefs quantitatifs semblables à l'implant IDI. L'examen MEB de la zone rugueuse met en évidence la présence de nombreuses particules incrustées (Figure 33a). Une analyse par EDX de ces particules (Figure 33b) indique clairement qu'il s'agit de grains d'alumine incrustés pendant la phase de sablage.



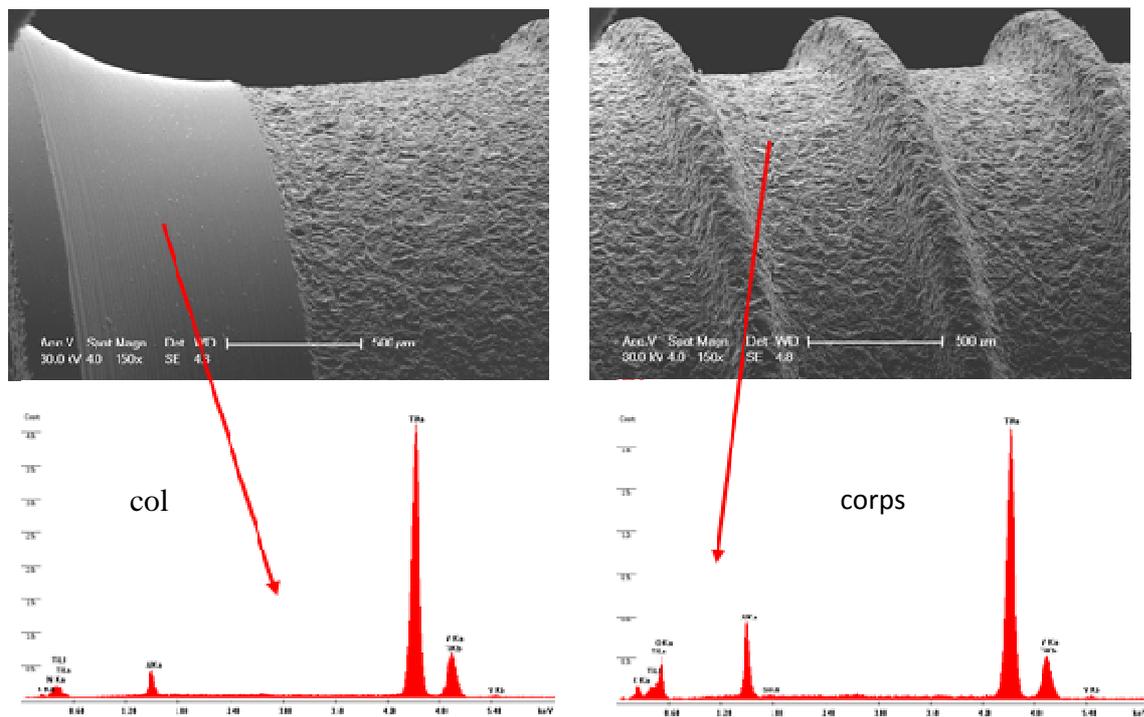
**Figure 33** : micrographie électronique (a) et spectre EDX (b) effectué sur une particule (\*) incrustée à la surface du plot

#### IV.4.1.2 Implant commercial IDI

Les observations au MEB d'un implant dentaire de commerce (Figure 34) nous permettent de mettre en évidence deux parties bien distinctes : le *col* possédant une surface plutôt lisse et le *corps* fileté de la vis qui a manifestement subi un sablage visant à augmenter sa rugosité en surface pour permettre une meilleure accroche primaire de l'os dès sa pose.

Une analyse chimique par EDX de ces différentes zones montre la présence d'une teneur plus importante d'aluminium dans la zone sablée qu'au niveau du col.

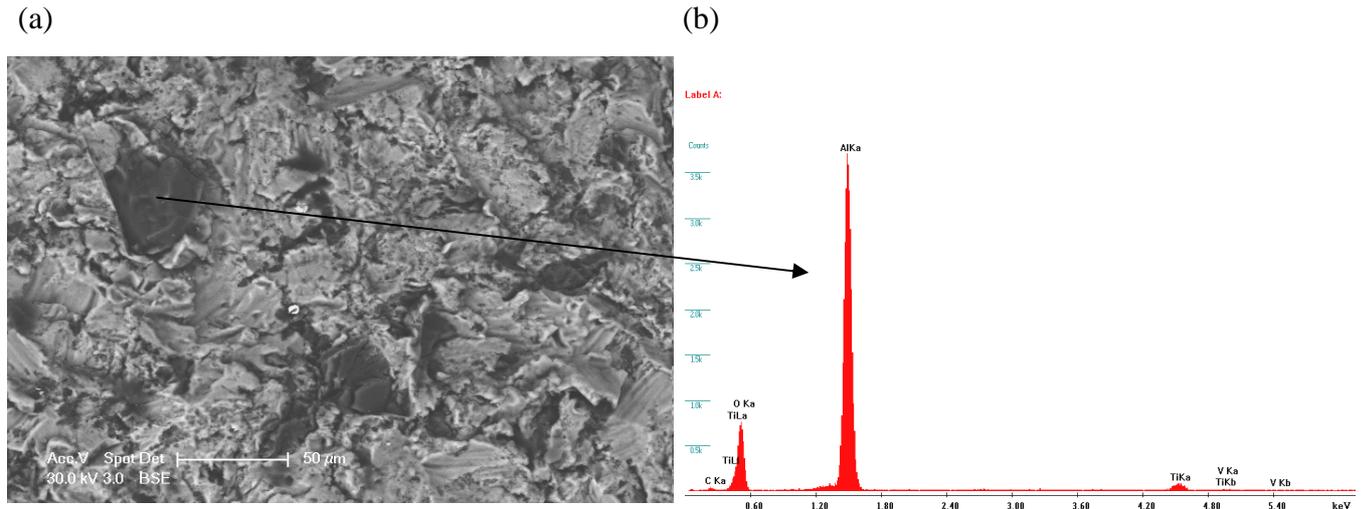
(a)



(b)

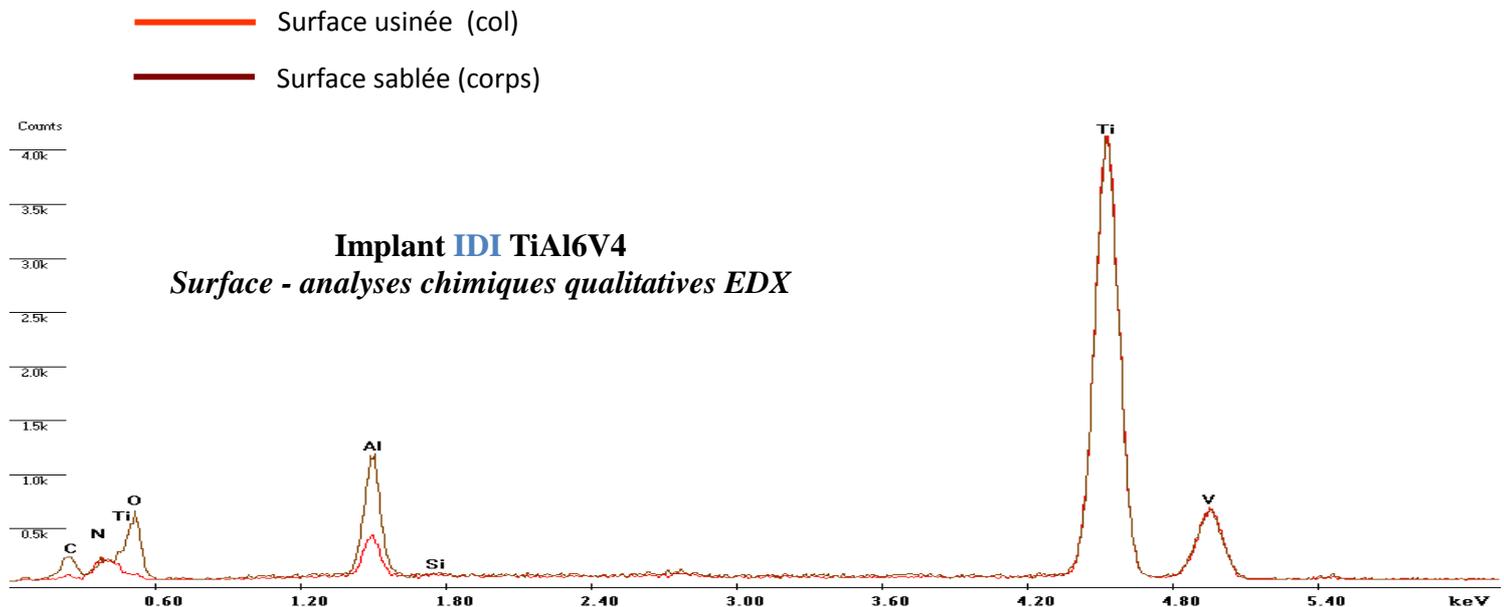
**Figure 34:** micrographies électroniques (a) et analyses chimiques par EDX (b) des deux zones d'un implant commercial IDI

L'examen par microscopie électronique de la zone rugueuse met en évidence la présence de nombreuses particules incrustées (Figure 35a). Une analyse par EDX de ces particules (Figure 35b) indique clairement qu'il s'agit de grains d'alumine incrustés probablement pendant la phase de sablage de ces vis.



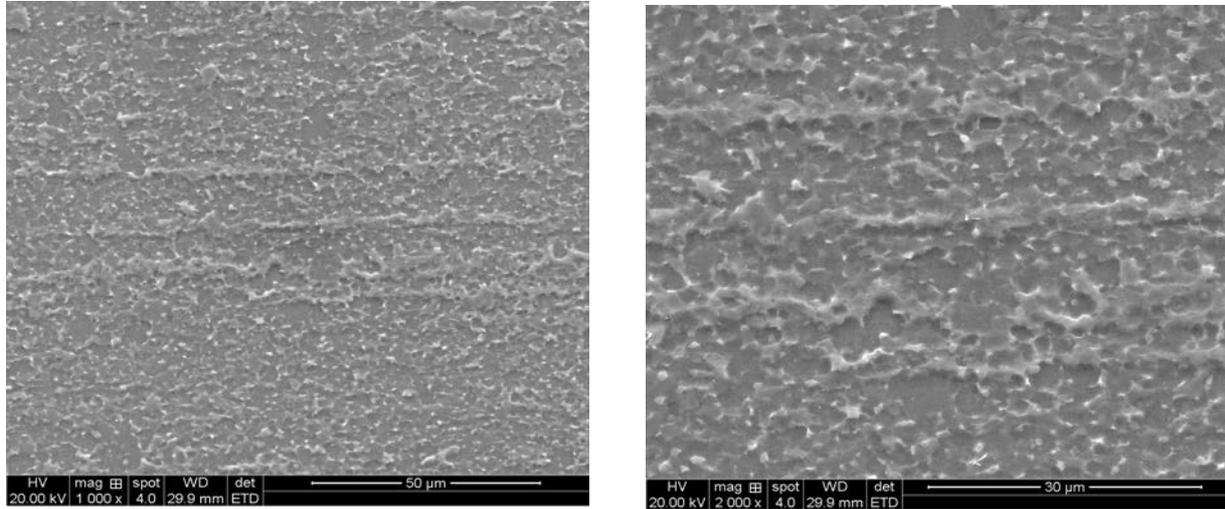
**Figure 35** : micrographie électronique (a) et spectre EDX (b) effectués sur une particule d'alumine (\*) incrustée dans la matrice de la zone fileté de la vis

La préparation de surface d'un implant de commerce est donc réalisée par un sablage à l'alumine combiné à une préparation chimique primaire de surface (double acide). Comme nous le montre l'analyse EXD (Figure 36), la préparation du col présente un taux de particules d'alumine incrusté (\*) en surface moindre que le corps vissé.



**Figure 36** : analyse EXD d'un implant de commerce (IDI), mettant en évidence la présence incrustée plus importante de particules d' $Al_2O_3$  (\*) au niveau du corps de l'implant

Les observations MEB réalisées sur une coupe métallographique sens long (Figure 37) mettent en évidence la présence d'une texture d'orientation consécutive à la déformation plastique du matériau, traduisant l'orientation des plans cristallographiques composant l'implant IDI.



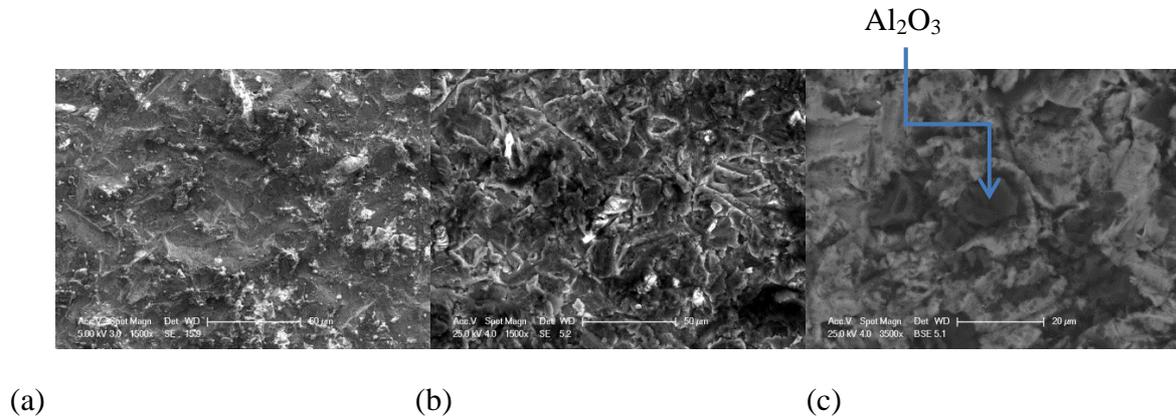
**Figure 37:** micrographies MEB (coupe sens long) présentant la texture d'orientation

#### IV.4.2 Préparation des substrats

Comme mentionné dans les chapitres précédents, la rugosité est un paramètre essentiel dans le comportement des matériaux. L'examen des implants commerciaux (IDI) ayant subi un traitement par sablage confirme la nécessité de créer de la rugosité sur la partie active de nos vis de laboratoire. Afin d'étudier l'influence de la topographie de la surface sur la future colonisation cellulaire, nous avons donc étudié différents traitements mécaniques et chimiques appliqués à des substrats en titane ou alliage de titane. Il s'agit de plots à partir desquels seront ultérieurement réalisés les essais de prolifération cellulaire et de vis commerciales achetées, qui ont été caractérisés préalablement.

Pour cela, nous avons procédé à la préparation des reliefs à la surface de nos échantillons, par la réalisation d'une attaque par un trempage dans un bain électrochimique, seul ou combiné avec un sablage à l'alumine. C'est la technique la plus communément utilisée pour créer une rugosité sur une surface métallique. Une autre technique est l'utilisation d'un sablage par des particules de carbure de silicium, que nous n'utiliserons pas dans notre recherche. A partir de substrats en TiAl6V4 de rugosité grossière, des sables de différentes durées ont été réalisés. Comme observé à la Figure 38, la rugosité croît avec le temps de sablage par l'utilisation de particules de corindon (50 µm). De plus, étant donné la ductilité du substrat, nous notons l'incrustation de certains grains d'alumine en profondeur dans la surface de l'alliage, dont l'effet est accentué par le temps de bombardement des particules d'alumine qui viennent s'incruster ; rendant l'élimination globale de ces particules d'alumine totalement

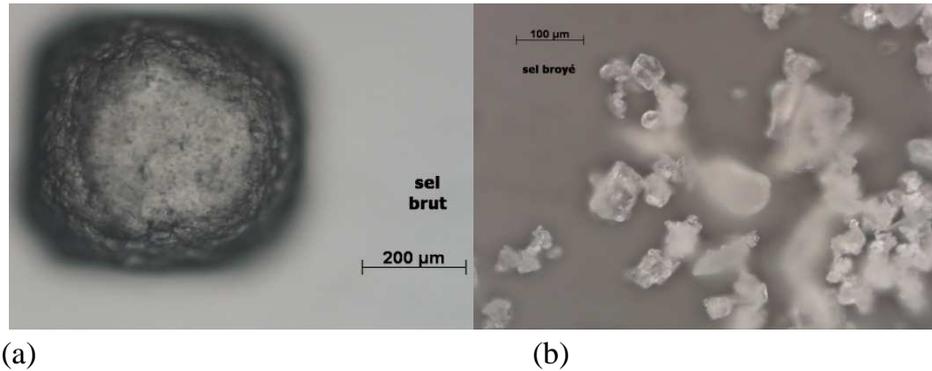
impossible lors du nettoyage de ces pièces ! Rappelons que la littérature rapporte que l'alumine est supposée néfaste vis-à-vis de la biocompatibilité.



**Figure 38:** micrographies MEB à grossissements variables, suite à un sablage par des particules  $Al_2O_3$  (c) identifiables en surface de substrats plans en TiAl6V4 (6-8bars) pour différents temps de sablage : 30 secondes (a), 120 secondes (b)

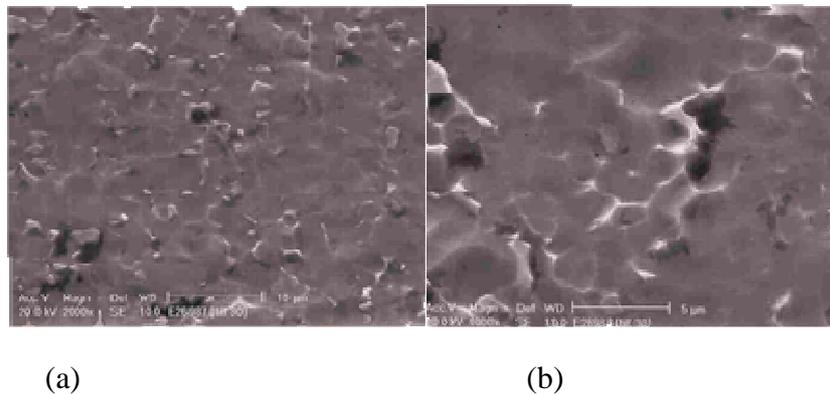
Afin de s'affranchir de l'incrustation de particules dans la matrice métallique d'un implant, des techniques alternatives de sablage ont été envisagées. L'alternative est alors la recherche d'une procédure, où les particules de sablage soient facilement éliminables de la surface après la préparation. Il a été envisagé une attaque par sablage au sel de commerce. Des essais ont ainsi été réalisés à partir de sel en partant du principe qu'en cas d'incrustation, une simple trempe dans de l'eau pouvait permettre d'éliminer les particules incrustées. A partir de grains moyens de 200 μm de diamètre, nous les avons réduits en poudre de 20 à 100μm de diamètre avant d'utiliser le sel broyé dans la sableuse (Figure 39). Malgré une déshydratation poussée au gel de silice, et le travail dans une enceinte à air sec, une très grande difficulté pour sabler les pièces métalliques est apparue, due à l'agglomération des grains de sel réduits à la sortie de la buse (200 à 500 μm). Cela a rendu la mise en œuvre des préparations de surface laborieuse, rajouté à un très faible résultat d'attaque de la surface de l'alliage titane.

Nous avons abandonné cette technique de préparation, même si elle permettait de créer des rugosités similaires à celles obtenues à partir de grains d'alumine en s'affranchissant des phénomènes néfastes d'incrustation. Cela est dû au caractère fortement hydrophile du sel rendant délicat son utilisation pour la création d'une rugosité contrôlée.



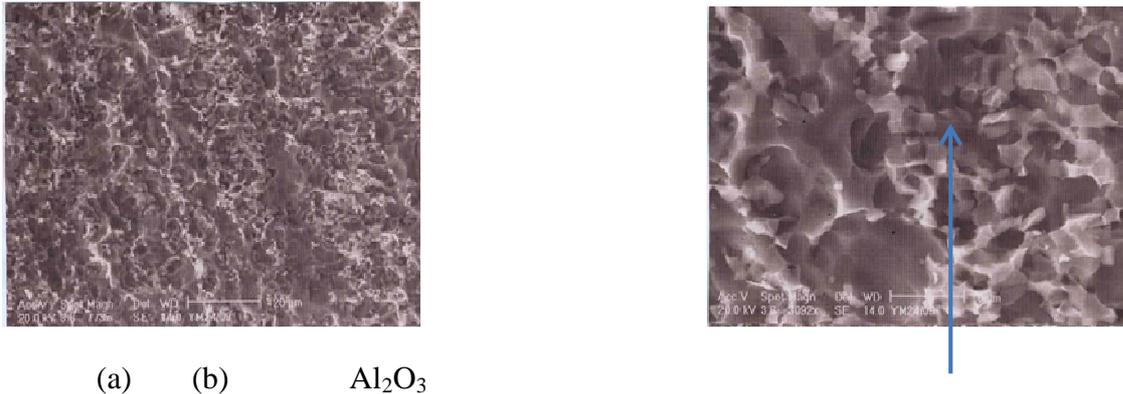
**Figure 39** : photographie de grains de sel de commerce d'un diamètre moyen de 200 µm (a), avant une préparation de broyage mécanique (b) pour en réduire leur diamètre (20 à 100µm) avant utilisation dans une sableuse

L'alternative suivante a été l'utilisation de bain chimique plus agressif, par une attaque par bain d'acide fluoro-nitrique (30% molaire HF-70 % molaire HNO<sub>3</sub>). La Figure 40 montre une modification du relief de surface après 300 secondes d'immersion. La rugosité de surface obtenue semble moindre que celle réalisée par sablage à l'alumine.



**Figure 40** : observation par MEB révélant un état de surface rugueux d'un plot du TiAl6V4 initialement poli après 300 secondes d'immersion dans un bain d'acide fluoro-nitrique

Pour bien mesurer si les rugosités obtenues de nos échantillons sont suffisantes, nous comparons nos résultats de préparations des rugosités de surface (Figures 38) avec ceux des implants dentaires de commerce en TiAl6V4 de marques IDI, car ils bénéficient de procédés industriels performants offrant une optimisation de la réalisation des rugosités des surfaces (Figure 41).



(a) (b)  $\text{Al}_2\text{O}_3$   
**Figure 41** : MEB à grandissement variable d'une surface d'un implant IDI traitée industriellement montrant un état de rugosité plus important sur toute la surface de préparation (a), combinant une attaque double acide et un sablage à l'alumine (b)

Nous observons que la rugosité obtenue par attaque chimique est considérablement moins prononcée que celle obtenue par sablage. De plus, la rugosité est plus prononcée que celle obtenue sur un plot initialement poli spéculaire et se rapproche de celle obtenue par sablage.

Cette étude préliminaire, visant à définir la caractérisation chimique des substrats ainsi que leur mode de préparation de la surface en vue de créer une rugosité, a permis de définir ces deux critères. Ils confirment les similitudes obtenues de nos plots et vis de laboratoire qui serviront de substrat dans le cadre de nos dépôts, par le procédé PVD, et de s'affranchir ainsi de l'utilisation des implants commerciaux. En outre, nous avons pu montrer que la création d'une rugosité sur les implants industriels était obtenue par sablage et que cela conduisait à l'incrustation de grains d'alumine dans la matrice ductile de l'alliage de titane TiAl6V4. Des méthodes alternatives ont été étudiées : le sablage par du sel qui permet de créer une rugosité similaire à celle du sablage par du corindon en s'affranchissant des effets néfastes de l'incrustation de grains d'alumine et une attaque chimique à partir d'un bain acide qui génère une rugosité plus faible que celle obtenue par sablage mécanique.

Nous pouvons conclure sur l'étape d'élaboration de nos modèles de laboratoire, que la préparation des modèles plots et vis sont de même nature que celle des implants de commerce IDI. Cette analyse a également permis de confirmer la structure biphasée des alliages en  $\alpha + \beta$ . Nous avons également démontré que le procédé de préparation de surface utilisé est un sablage à l'alumine pour les implants IDI. Et nous nous sommes attachés à réaliser la même préparation de rugosité de surface sur nos modèles. Cette similitude entre nos échantillons et les implants commerciaux valide nos modèles pour la suite.

### IV.4.3 Développement de couches par pulvérisation cathodique

Afin de substituer les implants en zircone qui possèdent une bonne biocompatibilité mais une fragilité jugée trop importante, l'objectif de notre travail a été de développer des couches déposées de zircone par pulvérisation cathodique sur des implants en titane, bien plus résistants mécaniquement mais moins biocompatibles que ceux élaborés en zircone.

Il apparaît donc naturel de penser que l'un des revêtements susceptibles de convenir à la protection d'implants en titane ou en alliage de titane correspond à la zircone. Une première série d'expériences a donc consisté à déposer des couches de zircone de différentes structures en jouant sur la teneur en yttrium des cibles (*étape 1*).

Afin de conforter le choix de la zircone comme matériau de protection en couche mince, d'autres matériaux ont également été déposés : des oxydes de titane et de zirconium amorphes, du carbone, de l'alumine et de l'yttrine (*étape 2*).

#### IV.4.3.1 Synthèse de couches de zircone

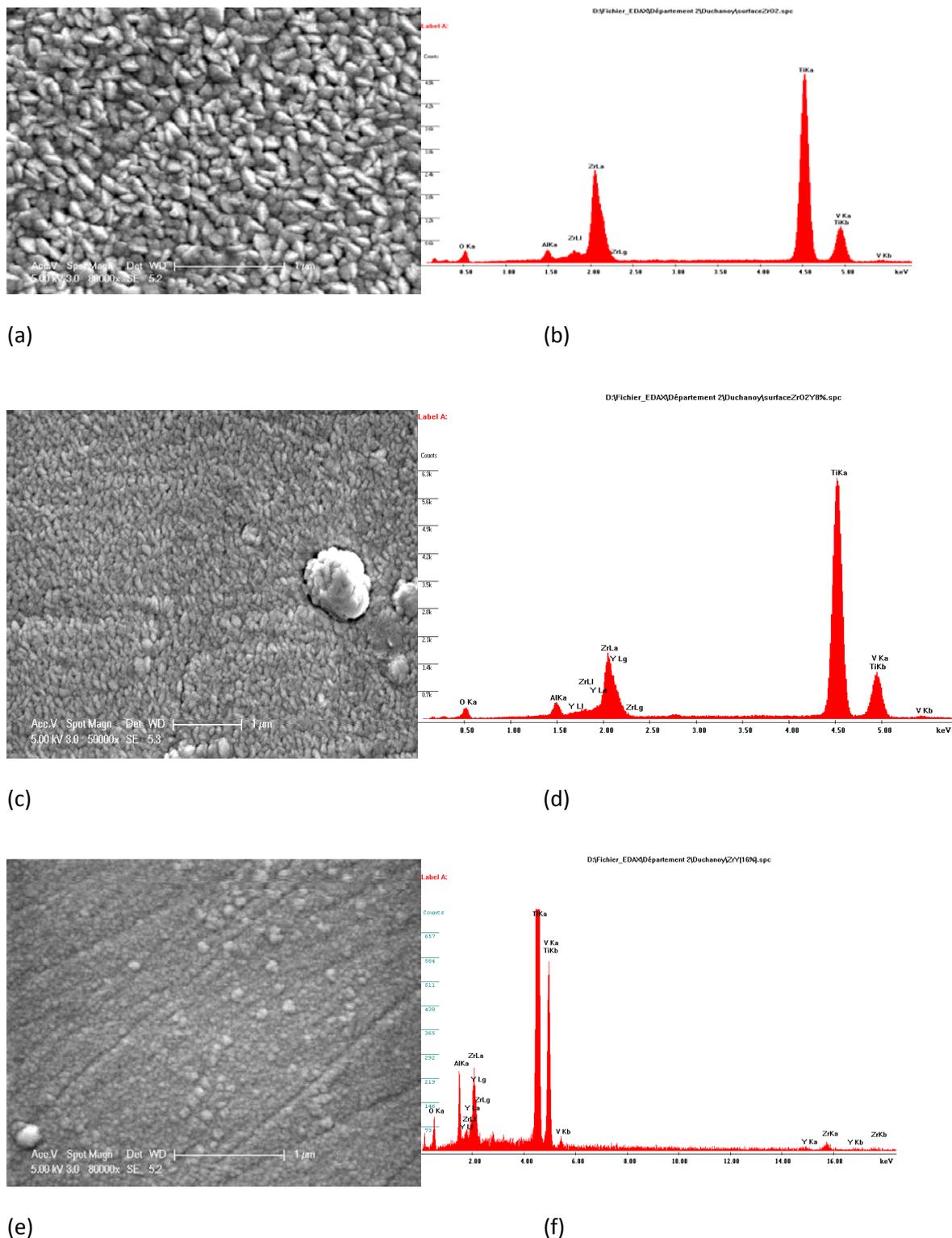
Afin de tenter d'obtenir les différentes variétés allotropiques de la zircone, des cibles Zr-Y de différentes compositions ont été pulvérisées au sein d'une atmosphère réactive Ar-O<sub>2</sub>. Les cibles sont en zirconium pur ou enrichi à 8 ou 16 at.% d'yttrium.

Par le procédé PVD en conditions réactive et à partir des 3 cibles (Zr<sub>100</sub>/Zr<sub>92</sub>Y<sub>8</sub>/Zr<sub>84</sub>Y<sub>16</sub>), nous réalisons des revêtements de zircone déposés à l'aide du réacteur disponible à l'IJL.

Afin de garantir une homogénéité en composition et en épaisseur des couches déposées sur les différents substrats, le porte-substrat est mis en rotation et les substrats sont positionnés à une distance de 6 cm de l'axe du porte-substrat, c'est-à-dire face aux cibles. Elles correspondent à une pulvérisation en régime de composé, c'est-à-dire avec une pression partielle d'oxygène suffisamment élevée pour que toutes les surfaces du réacteur soient totalement oxydées.

#### Analyses morphologique et chimique

Pour permettre l'observation de la surface des revêtements par microscopie électronique à balayage, une métallisation à l'or est réalisée préalablement. La **Figure 42** montre un aspect granulaire de la surface des films qui laisse supposer une croissance colonnaire des couches conforme à la pression de travail adoptée. Toutefois, l'augmentation de la teneur en yttrium dans la cible conduit à un adoucissement de la rugosité de surface.

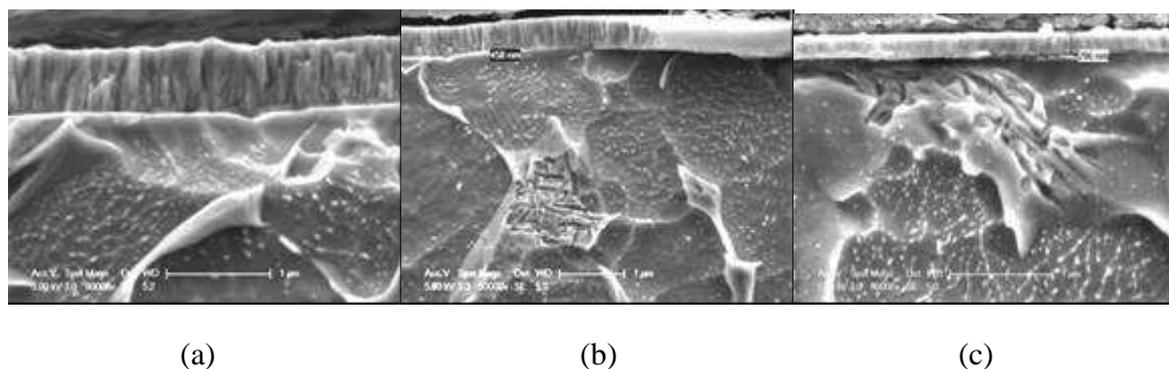


**Figure 42 :** micrographies électroniques (a, c, e) et spectres EDS associés (b, d, f) de la surface des revêtements déposés à partir des cibles en Zr (a, b), Zr-8 at.% Y (c, d) et Zr-16 at.% Y (e, f)

Des analyses EDS ont également été réalisées. Elles laissent apparaître les éléments du substrat (Ti, Al, V) de manière d'autant plus marquée que la teneur en Y au sein de la cible croît, ce qui indique d'une part une faible épaisseur des revêtements et d'autre part, une diminution de leur épaisseur lorsque la teneur en Y au sein de la cible croît. Par ailleurs, nous notons une absence de la raie de l'yttrium pour le dépôt réalisé à partir de la cible en Zr et une intensité croissante de la raie de l'yttrium avec sa teneur au sein de la cible. Cependant, du fait de la convolution des raies de Zr et de Y, aucune analyse quantitative n'a été réalisée. Néanmoins, au regard d'un transfert des éléments de la cible vers le substrat sans changement du rapport des compositions, nous supposons que les couches sont respectivement de la zirconium pure et substituée à 4 et 8% par de l'yttrine.

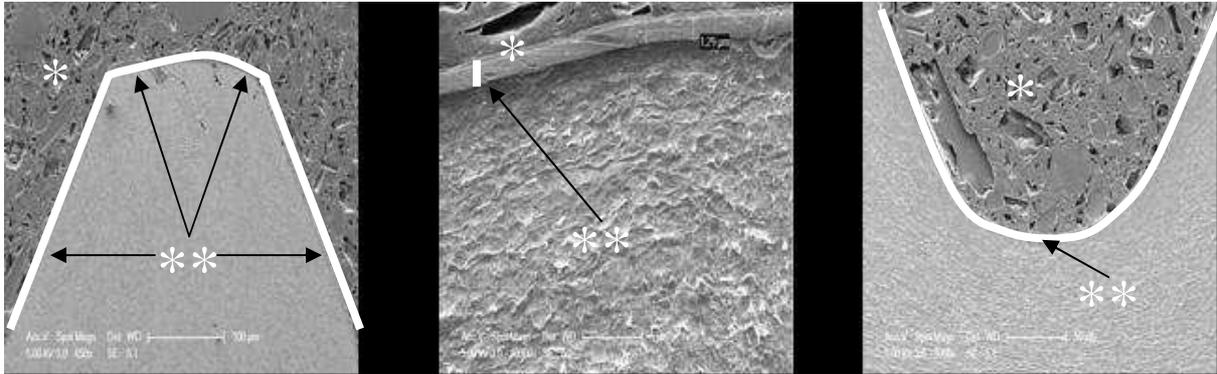
Des fractographies fragiles ont été réalisées sur ces différentes couches déposées sur TiAl6V4 afin d'en déterminer l'épaisseur (Figure 43). Comme le laissait supposer les spectres EDS, l'épaisseur des couches, et donc la vitesse de dépôt, décroît avec l'augmentation de la teneur en yttrium au sein des cibles. D'environ 700 nm pour la zirconium intrinsèque, l'épaisseur du revêtement déposé à partir de la cible titrant 8 at.% Y est d'environ 450 nm et décroît aux alentours de 200 nm pour la couche déposée à partir de la cible titrant 16 at.% Y. Ce phénomène est à imputer à un taux de pulvérisation de l'yttrium inférieur à celui du zirconium.

Il se pose alors la question de l'aspect de surface qui semble plus poreux pour le dépôt exempt d'yttrium. Le caractère colonnaire des couches étant plus prononcé lorsque l'épaisseur croît, l'état de surface moins rugueux des couches avec forte teneur en yttrium semble ne pas dépendre de la teneur en yttrium mais plutôt d'une épaisseur plus faible lorsque la teneur en yttrium croît.



**Figure 43** : fractographies de revêtements déposés sur TiAl6V4 à partir des cibles de Zr (a), Zr-8 at.% Y (b) et Zr-16 at.% Y (c)

L'examen micrographique d'une vis commerciale en TiAl6V4 revêtue d'une couche de zircon a également été effectué (Figure 44). La vue d'ensemble montre que le revêtement est couvrant, ce qui est confirmé par des observations à plus fort grossissement en sommet et en creux de denture.



**Figure 44 :** micrographies électroniques de la coupe d'une dent de vis en TiAl6V4(\*) revêtue d'une couche de zircon monoclinique (\*\*): vue d'ensemble (a) et détails du sommet (b) et du fond (c) du pas de la vis

### Étude structurale

La structure cristallographique de chaque dépôt identifiée par diffraction des rayons X est représentée dans la Figures 45. Pour chaque composition de dépôt, nous comparons le diffractogramme du substrat nu avec celui du substrat revêtu. Dans tous les cas, les raies caractéristiques du substrat sont visibles du fait de la faible épaisseur des couches. Notons que ces raies correspondent bien aux deux phases  $\alpha$  et  $\beta$  du TiAl6V4. Concernant les revêtements, le diffractogramme de la Figure 45a révèle la structure monoclinique de la couche de zircon exempte d'yttrium. En revanche, les diffractogrammes réalisés pour les revêtements titrant 4 et 8 mol.%  $Y_2O_3$  peuvent être indexés dans les systèmes quadratique et cubique de la zircon. Ceci est d'une part lié au fait que les couches sont relativement mal cristallisées; mais également à leur faible épaisseur qui ne permet pas la discrimination des structures.

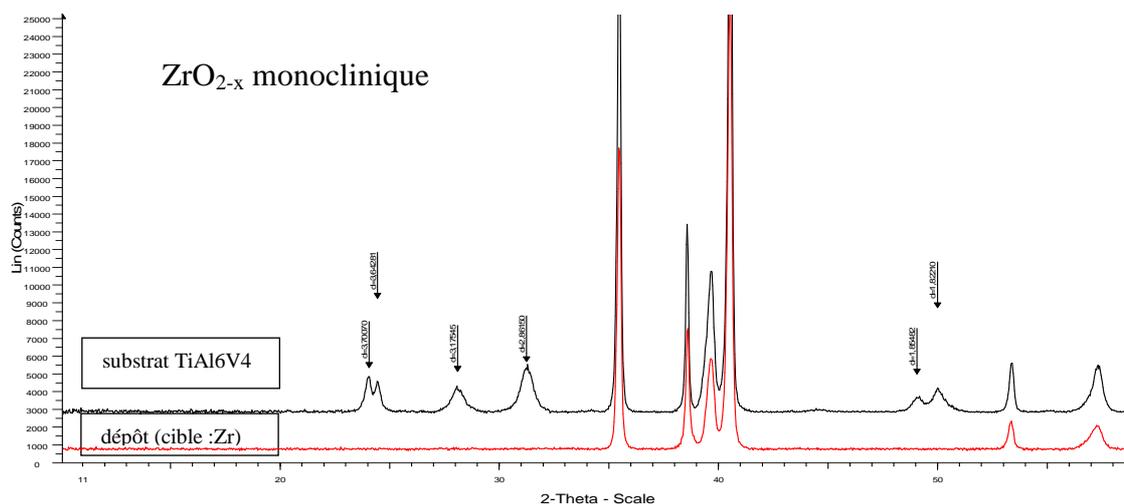


Figure 45a

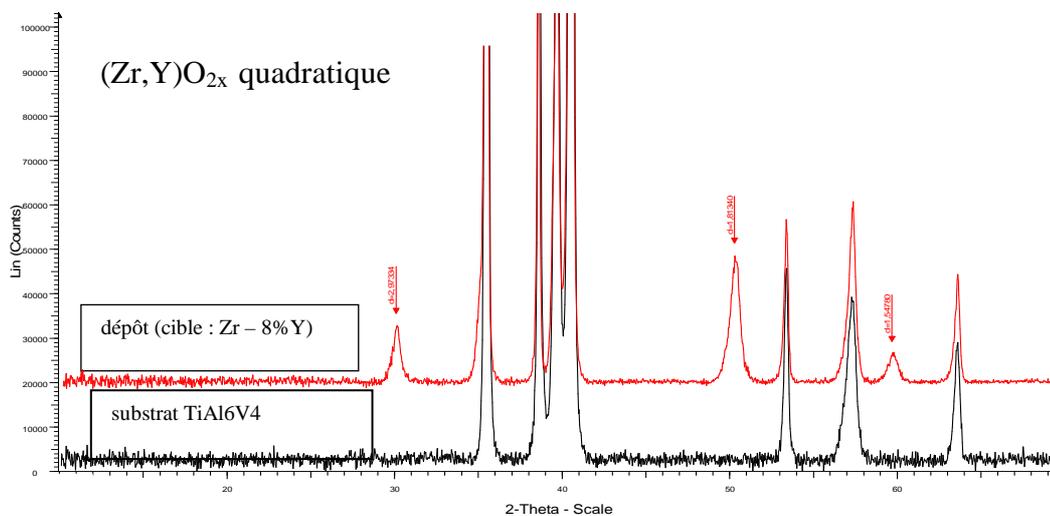


Figure 45b

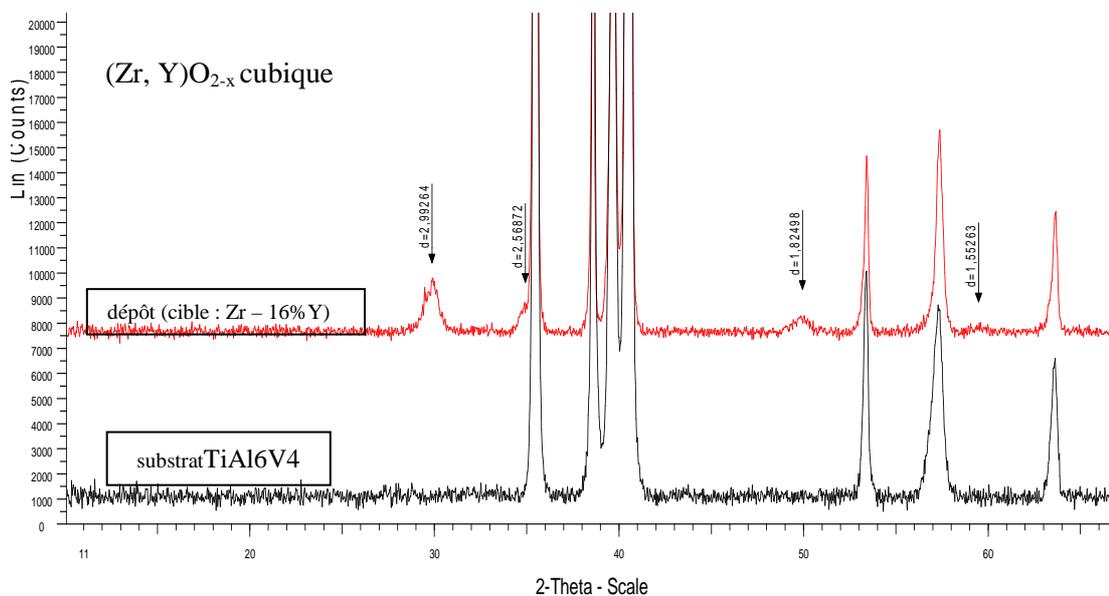


Figure 45c

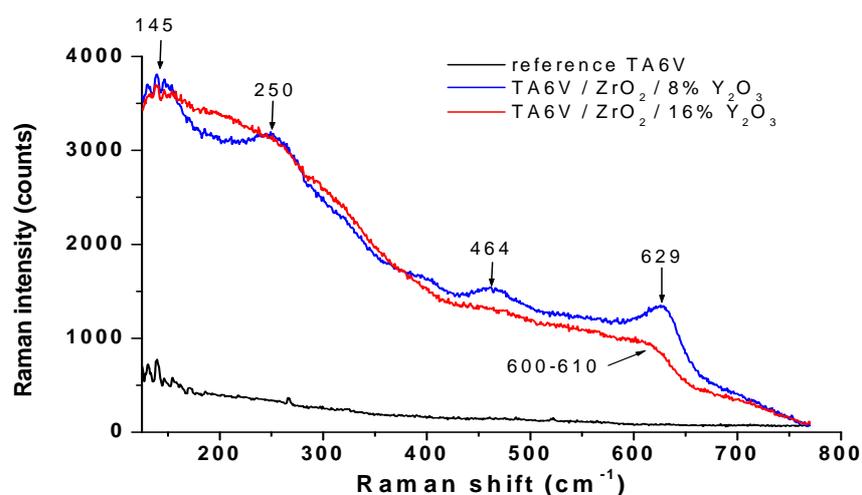
**Figure 45** : diffractogrammes des rayons X réalisés en mode  $\theta$ - $2\theta$  sur des substrats en TiAl6V4 revêtus de revêtements déposés à partir de cibles de Zr (a), Zr-8 at.% Y (b) et Zr-16 at.% Y (c)

En effet, comme le montre le **tableau IX**, il est difficile de différencier les structures quadratique et cubique de la zirconite étant donnée la proximité des angles de diffraction pour ces deux structures. Dans ce cas précis, l'identification des phases par la diffraction des rayons X a donc atteint ses limites.

**Tableau IX :** paramètres cristallographiques de la zirconite présente sous 3 formes

ZrO <sub>2</sub> (monoclinique) a = 5,1489 Å b = 5,2118 Å c = 5.3147 Å	3,697 (16%) (011)	3,639 (11%) (110)	3,164 (100%) (-111)	2,841 (67%) (111)	1,849 (17%) (022)	1,819 (21%) (220)
(ZrY)O <sub>2</sub> (quadratique) a = 3,6309 Å c = 5,1532 Å	2,968 (100%) (101)	2,567 (16%) (110)	1,819 (33%) (112)	1,815 (28%) (200)	1,552 (11%) (103)	1,549 (22%) (211)
(ZrY)O <sub>2</sub> (cubique) a = 5,1390 Å	2,968 (100%) (111)	2,571 (25%) (200)	1,818 (55%) (220)	1,550 (40%) (311)		

Afin de lever l'ambiguïté quant à la structure des couches titrant 4 et 8 mol.% Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, des analyses par spectrométrie Raman ont été réalisées pour les deux couches substituées à l'yttrine ainsi que sur le substrat en TiAl6V4 nu (**Figure 46**). Pour les deux échantillons revêtus, la structure cristallographique des dépôts contient des défauts imputables à la substitution par Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ; les phonons de la phase ZrO<sub>2</sub> sont élargis et le signal est peu intense. Nous avons dès lors employé des temps d'acquisition relativement longs : 10 spectres accumulés de 180 secondes d'acquisition (soit 30 minutes au total par spectre).



**Figure 46 :** spectres Raman réalisés sur substrats nus de TiAl6V4 et revêtus de couches de zirconite substituée à 4 et 8 mol.% Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Nous observons que le substrat de référence TiAl6V4, dans ces conditions, ne donne pas de signal important. En revanche, le dépôt stabilisé avec 4 mol.%  $Y_2O_3$  montre des phonons larges vers 145, 250, 464 et  $629\text{ cm}^{-1}$  caractéristiques d'une structure quadratique mais soumise à un désordre important en raison de la présence d'yttrium.

Enfin, le dépôt stabilisé avec 8 mol.%  $Y_2O_3$  montre la disparition de ces phonons caractéristiques au profit d'une bande très large pointant vers  $600\text{-}610\text{ cm}^{-1}$ , qui indique que le revêtement a cristallisé dans la structure cubique de type fluorite de la zirconite, stabilisée par un taux important d' $Y_2O_3$ .

Nous pouvons ajouter que dans les deux cas, la largeur relativement importante des raies observées traduit une microstructure fine des couches.

Quoiqu'il en soit, les trois revêtements de zirconite déposés possèdent des structures cristallographiques différentes qui ont clairement pu être identifiées.

#### IV.4.3.2 Autres revêtements

Des couches ont également été réalisées au sein d'un réacteur industriel au LERMPS afin d'apporter un complément d'informations quant aux revêtements de zirconite déposés à l'IJL. Dans un tel réacteur, les conditions de dépôt des couches d'oxydes sont instables, ce qui a nécessité l'utilisation d'un système de contrôle en boucle fermée PEM (Plasma Emission Monitoring). Les couches déposées à l'aide de ce réacteur sont des couches de :

- 1) zirconite amorphe (a-YSZ) substituée par 8 mol.%  $Y_2O_3$  : de composition identique à celle de la zirconite cubique (YSZ-8). Ce revêtement doit apporter des informations quant au rôle de la structure sur la réponse en biocompatibilité,
- 2) yttrine ( $Y_2O_3$ ) : cette couche permettra également d'évaluer l'effet de l'élément Y sur la biocompatibilité des couches de zirconite substituée par de l'yttrine,
- 3) alumine ( $Al_2O_3$ ) : sous sa forme corindon, il s'agit en principe d'un poison vis-à-vis du développement cellulaire,
- 4) dioxyde de titane amorphe (a- $TiO_2$ ): doit simuler l'effet de la couche native à la surface d'une pièce en titane ou en alliage de titane
- 5) carbone amorphe (DLC : Diamond Like Carbon) : il s'agit d'un matériau bio compatible qui servira à jauger les performances des couches de zirconite déposées à l'IJL.

A l'exception de la couche d'yttrine qui a nécessité un étalonnage, toutes les autres couches ont été reproduites à partir d'études antérieures. Leurs conditions de dépôt sont rassemblées dans le [Tableau X](#). Dans le cas spécifique de l'yttrine, une consigne de 40% du signal optique ayant permis de réaliser un revêtement transparent, aucune optimisation de la vitesse de dépôt n'a été tentée, une telle consigne correspondant approximativement à l'optimum pour de nombreux oxydes déposés grâce au contrôle en boucle fermée de type PEM.

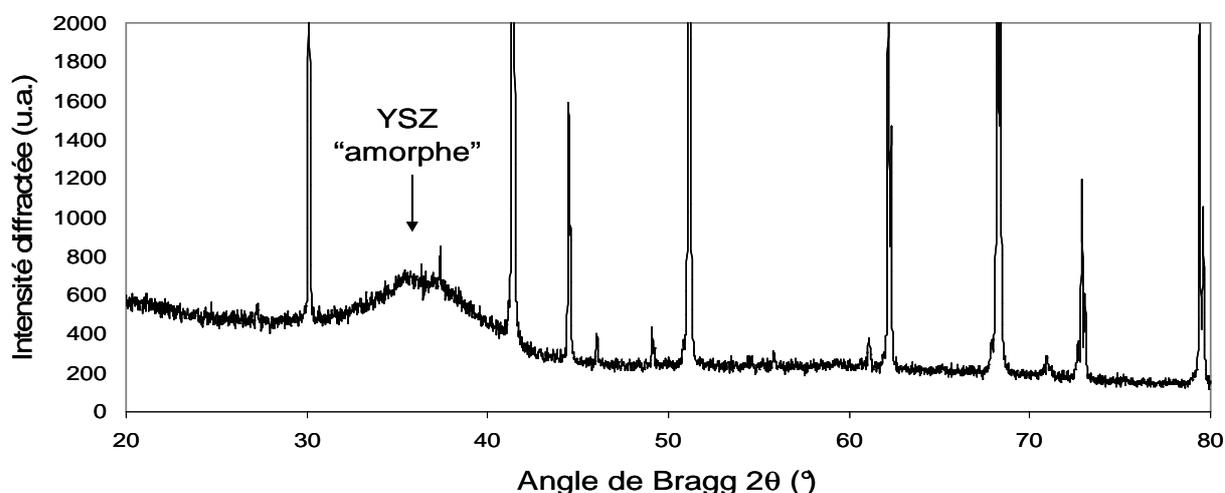
**Tableau X** : conditions de synthèse des différentes couches synthétisées dans le réacteur industriel du LERMPS

dépôt	Cible	intensité (A)	consigne (%)	distance cible-porte substrat (mm)	débit d'argon (sccm)	pression d'argon (Pa)
YSZ	Zr-16 at.%Y	2,5	70	11	200	3,5 *
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Y	2,5	40	11	50	0,4
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Al	2	35	11	20	0,2
TiO <sub>2</sub>	Ti	2,5	40	11	20	0,2
DLC	C / Cr **	3 / 2	-	11	15	0,15

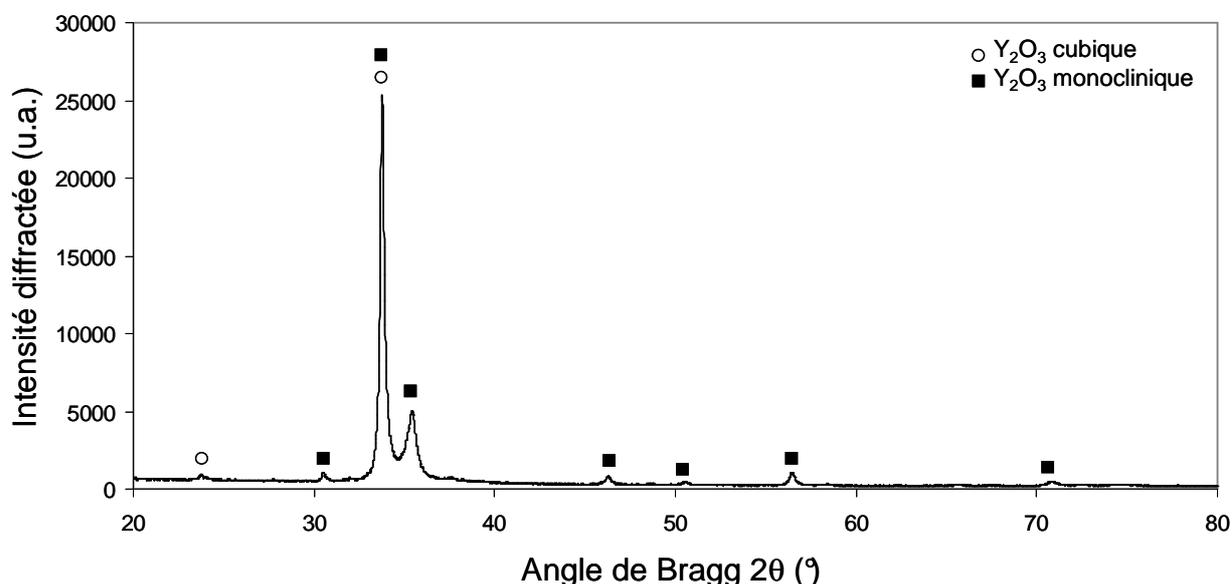
\* : limitation de la vitesse de pompage grâce à une vanne de laminage

\*\* : une précouche de Cr est nécessaire pour garantir l'adhérence. Elle est suivie d'une rampe pendant laquelle l'intensité dissipée sur la cible en Cr décroît tandis que celle de la cible de C croît. Enfin, le traitement se termine avec la pulvérisation de la seule cible de carbone.

Une analyse structurale par diffraction des rayons X a été réalisée sur les différentes couches. La Figure 47 représente le diffractogramme de la couche de zircone substituée par 8 mol.% Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> réalisée à haute pression et déposée sur une membrane en alumine. Les fines raies de diffraction correspondent à la structure corindon du substrat et la signature du revêtement de zircone apparaît sous la forme d'une modulation du fond continu aux alentours de 35° qui valide bien le caractère sinon amorphe de la couche, du moins son extrêmement mauvaise cristallisation.

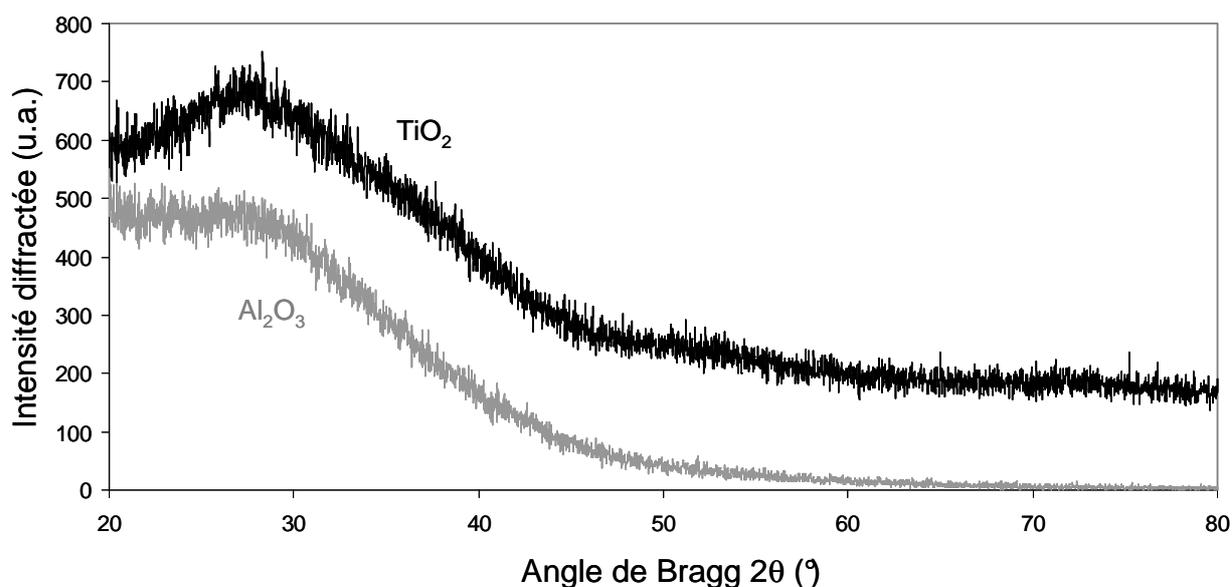

**Figure 47**: diffractogramme des rayons X de la couche de zircone substituée par 8 mol.% Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> déposée sur une membrane en alumine de structure corindon

La couche d'yttrine déposée sur verre présente une structure monoclinique avec la présence supposée d'une faible proportion de phase cubique (Figure 48).

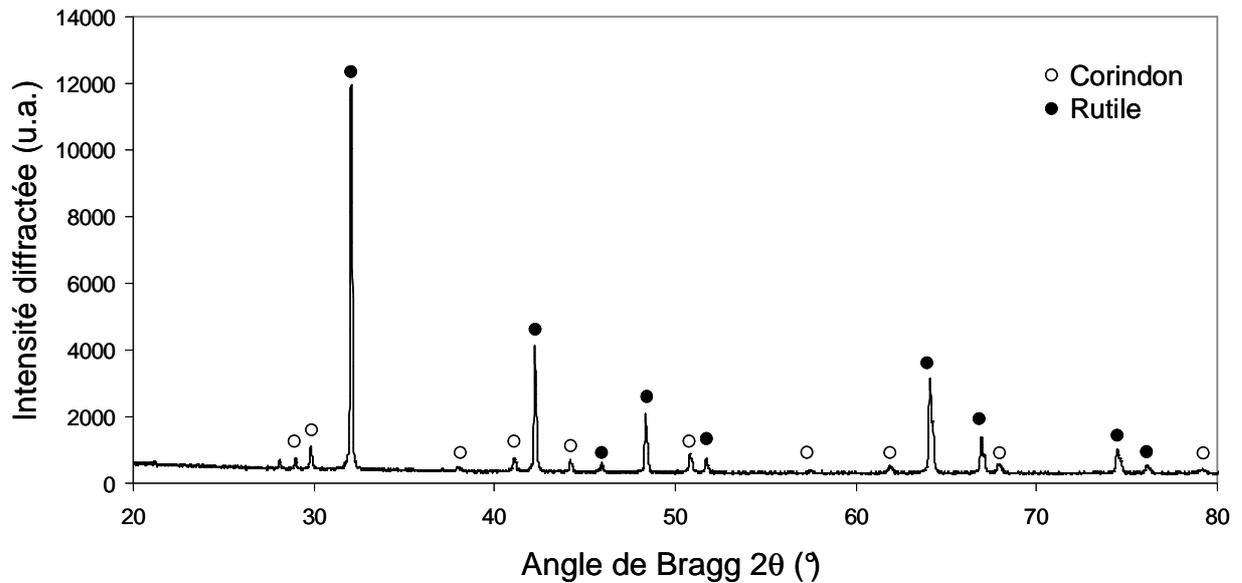


**Figure 48** : diffractogramme des rayons X de la couche d'yttrine déposée sur verre

A l'instar de nombreux oxydes ou nitrures déposés par pulvérisation cathodique, les couches d'alumine et de dioxyde de titane brutes d'élaboration sont amorphes (Figure 49). Afin d'obtenir la structure corindon recherchée pour la couche d'alumine, un traitement thermique des plots revêtus est réalisé à l'air pendant 2h à la température de  $900^\circ C$ . Ce traitement permet effectivement de cristalliser l'alumine sous sa structure corindon mais conduit également à une oxydation du substrat de TA6V en  $TiO_2$  de structure rutile (Figure 50)

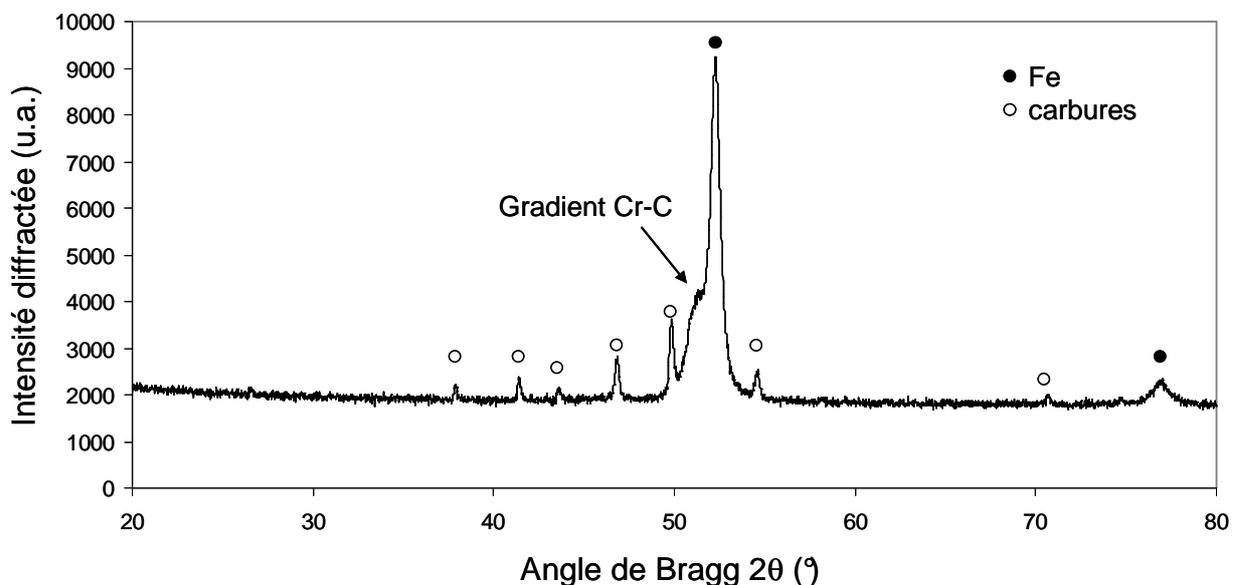


**Figure 49** : diffractogrammes des rayons X des couches de dioxyde de titane et d'alumine déposées sur verre



**Figure 50** : diffractogramme réalisé après recuit à 900°C sous air pendant deux heures de la couche d'alumine déposée sur un plot en TiAl6V4. Mise en évidence de la cristallisation de l'alumine sous sa variété corindon et de l'oxydation du substrat en rutile

Enfin, la **Figure 51** représente le diffractogramme des rayons X réalisé sur un témoin en acier de construction de type AISI M2. En effet, ce type de couche peut difficilement être déposé sur un substrat céramique ou en verre du fait de la phase de décapage ionique préliminaire. Nous distinguons essentiellement les raies diffractées caractéristiques du substrat (Fe, carbures) ainsi que la couche à gradient de composition Cr-C qui cristallise sous la structure cubique centrée du chrome. La couche de carbone a proprement parlé est amorphe et ne présente aucune raie caractéristique.



**Figure 51** : diffractogramme des rayons X réalisé sur un témoin en acier de construction AISI M2 trempé et revenu. Nous distinguons les raies diffractées du fer et des carbures du substrat ainsi que la couche de gradient Cr-C

#### IV.4.4 Résultats – conclusion des dépôts sur alliage titane

Nous pouvons conclure que l'étape 1 de notre travail au sein du laboratoire IJL a permis de caractériser des implants de commerce d'alliage TiAl6V4 (IDI), et de créer des modèles de laboratoire (plot ou vis) également de grade 5, avec une rugosité variable par un traitement de surface d' $\text{Al}_2\text{O}_3$ . La structure des films en fonction de la composition de la cible est résumée dans le tableau XI.

**Tableau XI** : caractéristiques des dépôts sur TiAl6V4

Cible	Dépôt
Zr	$\alpha - \text{ZrO}_2$
$\text{Zr}_{92}\text{Y}_8$	$\beta - (\text{Zr},\text{Y})\text{O}_{2-x}$
$\text{Zr}_{84}\text{Y}_{16}$	$\gamma - (\text{Zr},\text{Y})\text{O}_{2-x}$

L'étape 2 de nos dépôts réalisés au LERMPS, s'est conclue par la réalisation de couches de zircone amorphe (a-YSZ) et de carbone amorphe (DLC), d' $\text{Y}_2\text{O}_3$ , de dioxyde de titane amorphe (a- $\text{TiO}_2$ ), d'oxyde aluminium corindon ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

### IV.5 CULTURES CELLULAIRES

Les cultures cellulaires des fibroblastes (cellules faiblement différenciées), réalisées selon le protocole strict issu de la norme ISO 10.993, ont nécessité la création de cultures témoins (lame de verre et en polymère) à partir desquelles des comparaisons à partir de TiAl6V4 qui servira de référence, ont été effectuées lors de la mise en culture des vis et plots revêtus. Pour cela, nous rappelons que nos protocoles de cultures cellulaires ont été réalisés en deux phases étalées dans le temps.

#### IV.5.1 Résultats des cultures cellulaires (phase I)

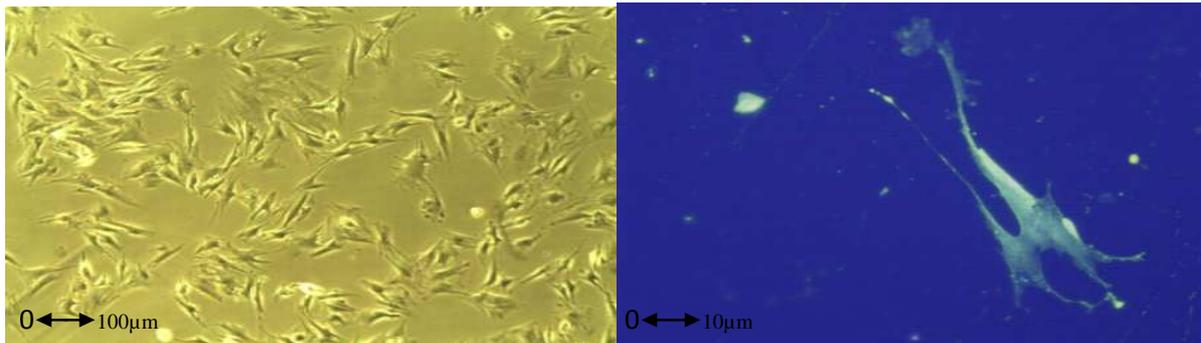
Les cellules Balb/3T3 ont été observées après culture sur 7 lames de verres, 7 polymères, 7 plots et 7 vis de TiAl6V4 revêtus ou non d'un film de  $(\text{Zr}, \text{Y})\text{O}_{2-x}$ .

##### IV.5.1.1 Culture fibroblastes sur lame de verre et polymère

C'est la première étape de contrôle de nos cultures cellulaires. Les cellules Balb/3T3 sont plongées dans des bains, en présence de nos supports témoins (lames de verre et polymères). Elle permet de valider la procédure de laboratoire, confirmant que le lot cellulaire en cours de culture est viable. Et pour permettre également d'étudier l'état cellulaire grâce à l'observation au microscope optique (MO) avec ou sans filtre (MORE): conservation ou perte de l'aspect

morphologique de référence d'une cellule en bonne santé, recherche de mitose, étude de l'étalement de nos cellules sur le support.

Ainsi, nous observons des images prises en MO et MORE, où il apparaît un étalement homogène, des cellules sur la surface du support, toutes interconnectées entre elles (Figure 52a). Elles sont considérées comme en bonne santé par cet aspect étoilé et fusiforme (Figure 52b), qui traduit une parfaite croissance, en plus de présenter des connexions entre les cellules, et un étalement homogène sur le support (lame de verre ou polymère spéculaire).



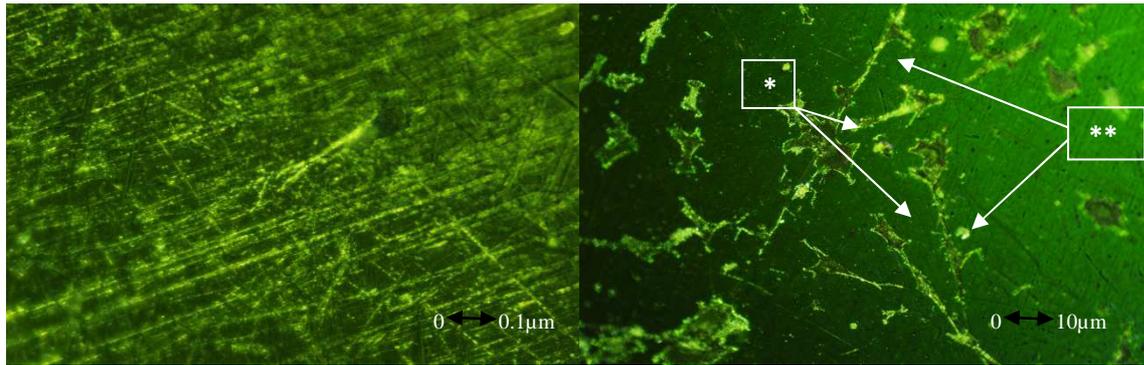
(a) lame de verre (MOx10)

(b) (polymère (MOREx40)-filtre bleu)

**Figure 52** : colonie de fibroblastes Balb/3T3 (a) sur support spéculaire, où l'observation d'un fibroblaste présentant un aspect étoilé (b), est la caractéristique d'un bon développement dans le milieu de culture

Dans un second temps, à partir du même lot de culture que précédemment utilisé, nous observons s'il existe ou pas une modification de la morphologie et de l'étalement cellulaire sur un support rugueux. A partir de lame de verre et polymère de commerce dépolis, et/ou par la réalisation d'une rugosité aléatoire d'une surface spéculaire, obtenue par papier de verre, il a été réalisé une culture cellulaire.

Par observation au MO et MORE, nous constatons que les cellules utilisent, par leurs prolongements cytoplasmiques, les rainures et rayures de surface pour s'étaler sur la surface du support. Le développement cellulaire est influencé par l'état de rugosité de surface (lame de verre, polymère à surface rugueuse) comme observée à la Figure 53. En effet, les cellules utilisent les rainures ou rayures de surface comme guide pour croître. Ainsi, des images de ces prolongements en 'ligne droite' sont observées. Alors que sur une surface spéculaire (Figure 52), le développement des cellules est aléatoire sur la surface miroir (lame de verre, polymère).



(a) *polymère dépoli* (b) *culture cellulaire orientée*  
**Figure 53** : MORE en filtre vert de cellules fibroblastes Balb/3T3 (\*) se développant en ligne droite sur les reliefs rugueux de surface (\*\*) d'un polymère

Si les développements d'étalement et de morphologie cellulaire sont influencés par la rugosité de surface de nos supports, le sont-ils également selon la nature chimique du support ? Afin de répondre à cette question, nous avons, à partir d'un même lot cellulaire, réalisé d'autres cultures cellulaires sur support non témoin.

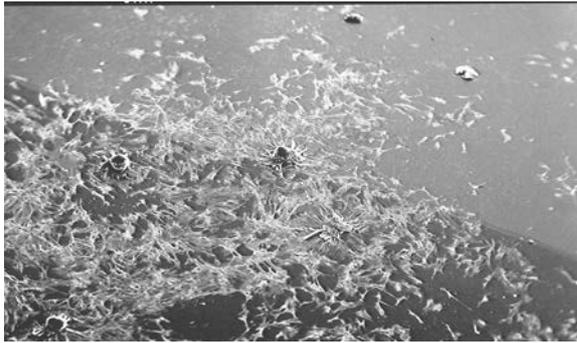
La validation des cultures sur support non témoin, sera systématiquement accompagnée par une culture sur support témoin, et une analyse au MO et MORE, dans le seul but de vérifier la bonne santé cellulaire en observant leur étalement et leur aspect morphologique. Ainsi, les résultats décrits ci-après obtenus au MEB et au MET, sur supports non témoins d'alliage TiAl6V4 revêtus, sont secondaires au contrôle des témoins. Nous ne représenterons plus les observations de nos résultats témoins qui accompagnent les supports non témoins, en raison de l'aspect répétitif du descriptif identique pour chaque culture sur support non témoin.

#### IV.5.1.2 Cultures fibroblastes sur TiAl6V4

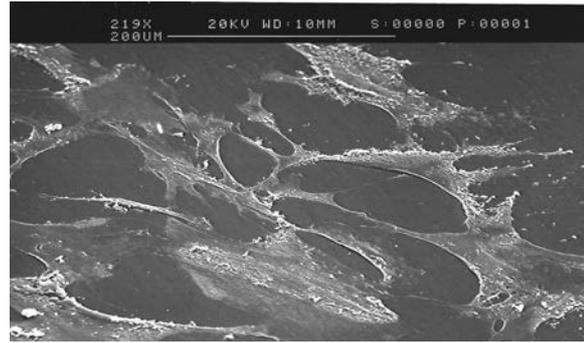
##### ➤ MEB

Nos modèles de laboratoire d'alliage TiAl6V4, utilisés dans les implants dentaires et orthopédiques, sont analysés à leur tour, pour savoir si ces derniers représentent également un support neutre au développement cellulaire et s'ils peuvent être qualifiés de support témoin ou de référence.

En présence de l'échantillon TiAl6V4, nous observons au MEB (Figure 54), les aspects étoilé et fusiforme des cellules qui sont identiques par comparaison avec les résultats obtenus sur supports témoins. Elles sont également interconnectées entre elles, et elles utilisent le maximum de la surface de l'alliage TiAl6V4 pour coloniser, comme en témoigne le bel étalement de la Figure 55. Cette bonne santé morphologique, par le développement des prolongements cytoplasmiques (Figure 56), confirme alors le caractère biocompatible de viabilité des cellules par une adhérence puissante au contact de l'alliage titane non revêtu.

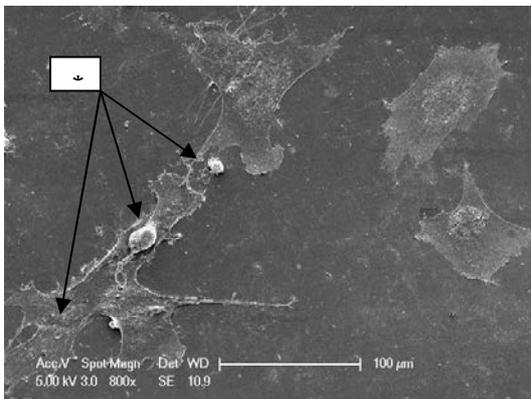


TiAl6V4 = témoin (vis)

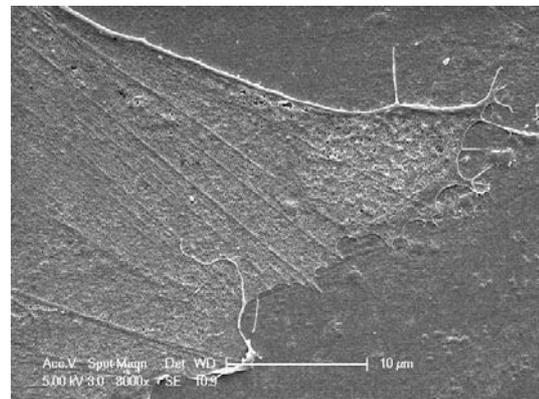


TiAl6V4 = témoin (plot)

**Figure 54** : colonisation cellulaire en étalement homogène sur une surface de TiAl6V4 en relief (vis) et plate (plot). A noter la bonne santé cellulaire observée par la conservation de l'aspect étoilé des cellules ainsi que le maintien du contact entre elles sur chaque image MEB



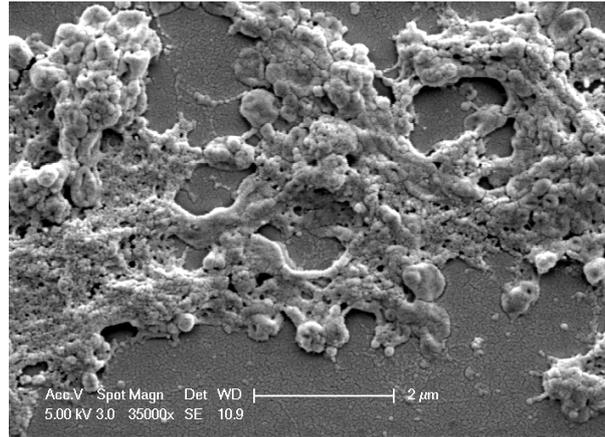
**Figure 55** contacts intercellulaires (\*)



**Figure 56** prolongement cytoplasmique

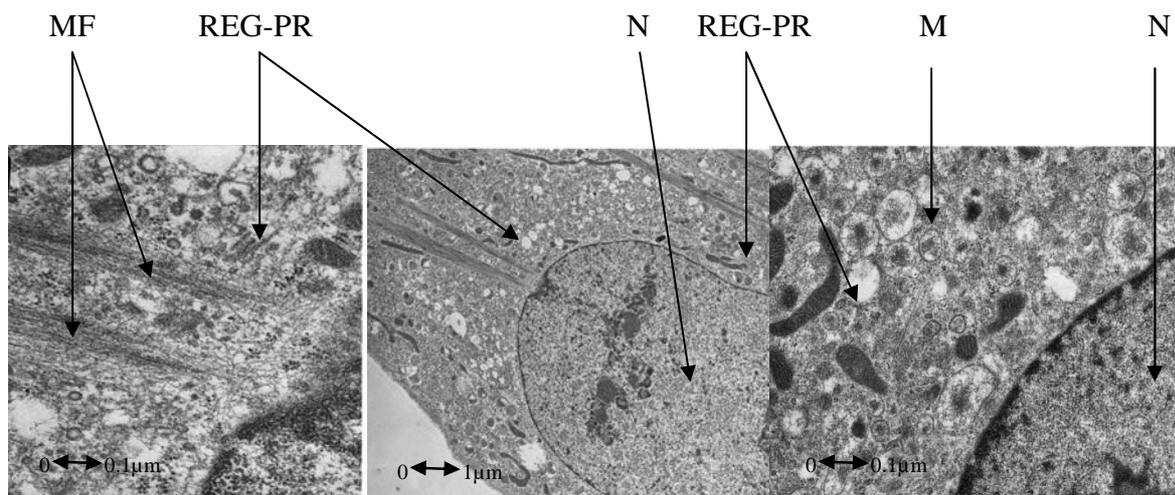
**Figures 55-56** : images MEB où les contacts (\*) et prolongements cytoplasmiques traduisent une activité cellulaire intense de prolifération. Nous parlons alors de tapis cellulaire de prolifération

Nous avons à l'issue de cette première étape de contrôle, validé nos procédés de cultures (norme ISO 10.993), en reproduisant et en obtenant des résultats de culture cellulaires qui sont conformes à ce que nous indique la littérature. Nous savons aussi que si nous obtenons de nos protocoles de cultures cellulaires, un résultat négatif, cela suppose une éventuelle contamination de nos bains. Ainsi, lorsque cela nous arrive, l'étalement étoilé et les interconnexions cellulaires, laissent place à un amas non identifiable d'un paquet cellulaire concentré en un agglomérat comme nous le montre la **Figure 57**.



**Figure 57** : échec de cultures cellulaires par contamination. Aspect non identifiable en grappe

Si par observation au MEB, nous constatons un aspect morphologique et d'étalement de nos cultures qui semblent indiquer la viabilité au contact de nos supports, quel est l'état réel de santé de ces cellules ? Pour répondre à cette question, nous avons effectué des observations au MET, nous permettant une analyse au cœur de la machinerie cellulaire. En effet, pour identifier formellement une activité de prolifération normale de ces cellules jeunes dont nous supposons qu'elles sont en bonne santé, nous avons dû recourir à une étude MET de leurs structures intracytoplasmiques (Figure 58). Nous sommes allés regarder et étudier la bonne répartition des éléments de la machinerie cellulaire tels que le noyau (N), les microfilaments (MF), le réticulum endoplasmique granulaire (REG-PR), les mitochondries (M), les polyribosomes (PR). Ces différents organites qui se retrouvent dans une cellule, traduisent par leur répartition, leur compartimentation, leur densité et leur aspect, la vitalité cellulaire. La Figure 58, est la représentation intracytoplasmique parfaite d'une cellule en bonne santé.



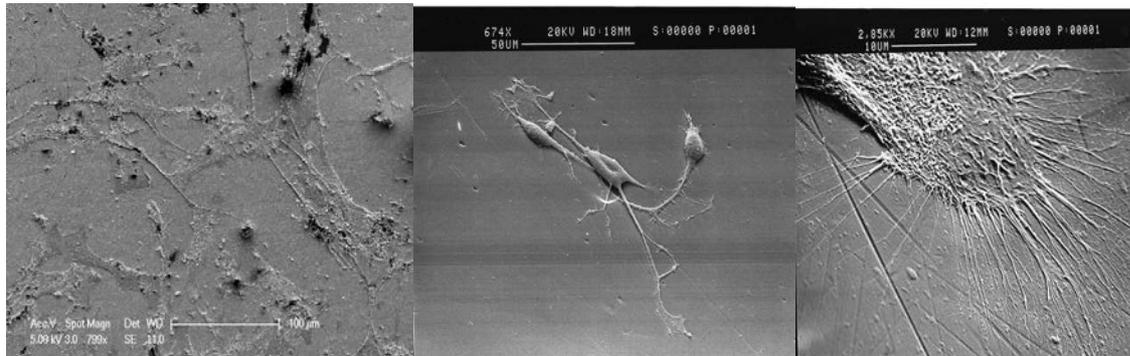
**Figure 58** : cellules fibroblastes sur TiAl6V4 spéculaire : analyse structurelle intracytoplasmique de la machinerie cellulaire : N, MF, REG-PR, M

Après avoir étudié nos cultures sur supports témoins (lame de verre, polymère et alliage TiAl6V4 non revêtu), nous continuons nos analyses au MEB, en présence des échantillons TiAl6V4 revêtus par les trois dépôts  $\alpha$  ou  $\beta$  ou  $\gamma$ .

#### IV.5.1.3 Cultures fibroblastes sur TiAl6V4 +/- (Zr,Y)O<sub>2-x</sub>

##### ➤ MEB: $\alpha$ – ZrO<sub>2</sub>

En présence d'une cible Zr, qui a permis le dépôt  $\alpha$  sur le substrat d'alliage TiAl6V4, cet alliage revêtu a été soumis à la culture cellulaire, issue du même lot que les fibroblastes utilisés dans les précédentes cultures. Après un contrôle des vitalité et viabilité sur nos échantillons témoins (3 séries), les analyses de l'alliage TiAl6V4+ $\alpha$  au MEB, nous ont permis de constater que nous obtenons le même étalement de proliférations cellulaires ainsi que les mêmes aspects morphologiques de connexion qu'avec les cultures sur supports témoins (lame de verres, polymère, TiAl6V4). En effet, les images par microscopie de la [Figure 59](#), montrent un étalement cellulaire uniforme sur toute la surface du support, traduisant un bon étalement de colonisation avec un aspect cellulaire étoilé et connecté entre elles. L'adhérence sur le support est aussi conservée par des prolongements très longs et larges.



(a) tapis de prolifération cellulaires (b) connexion intercellulaires (c) prolongement cytoplasmique d'adhérence

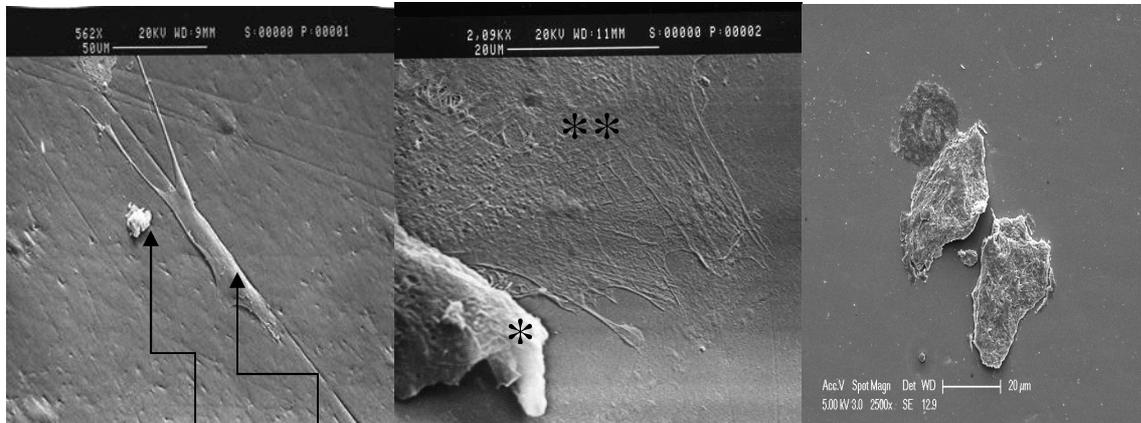
**Figure 59** : colonisation cellulaire Balb/3T3 sur TiAl6V4+ $\alpha$ . Analyses de l'étalement et de la colonisation cellulaire sur toute la surface de l'implant (a), de l'aspect morphologique des cellules (b), ainsi que de sa capacité à adhérer à la surface de l'implant (c)

Nous retenons que la biocompatibilité est obtenue sur TiAl6V4 +  $\alpha$ .

Nous répétons les mêmes observations sur les dépôts  $\beta$  et  $\gamma$  sur TiAl6V4.

Pour les films de zircone quadratique, des cellules encore vivantes (\*\*\*) sont observées et caractérisées par l'aspect étoilé de leur étalement ([Figure 60a](#)). Ceci traduit un état vital de la cellule qui a cherché à s'accrocher au support par la mise en place de prolongements

cytoplasmiques longs (Figure 60a) et étalés (Figure 60b(\*\*)). Mais, la très grande majorité des cellules ne survivent pas (\*) au contact du revêtement  $\beta$  (Figure 60a,b(\*),c).

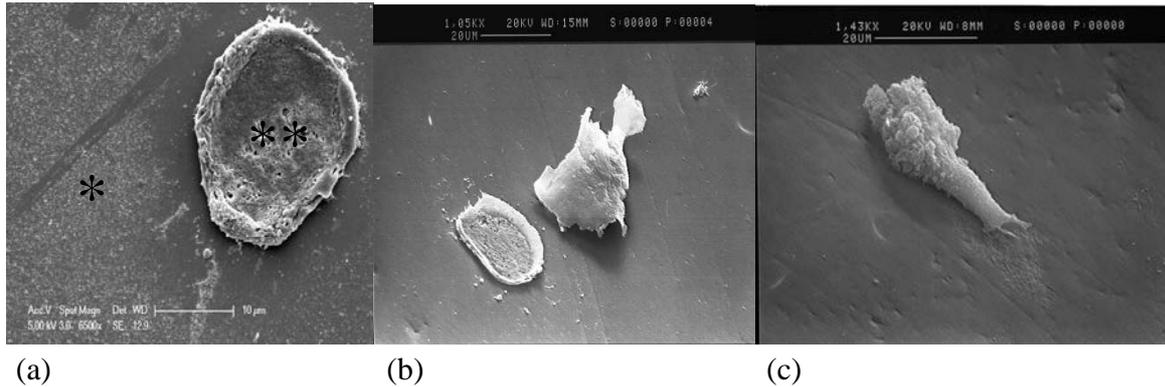


(a) cellules morte et vivante (b) prolongements cytoplasmiques (c) cellules mortes vivants (\*\*) et morts (\*)

**Figure 60** : images MEB de la colonisation cellulaire Balb/3T3 sur TiAl6V4+ $\beta$ . A noter la présence de cellules vivantes (\*\*) côtoyant des cellules mortes (\*) au contact du revêtement  $\beta$ , avec la perte de leur cytoplasme (aspect déshydraté), de leur morphologie d'étalement (aspect étoilé) et de leur connexion intercellulaire

Nous retenons que la biocompatibilité est obtenue que très partiellement sur TiAl6V4 +  $\beta$ .

Pour les dépôts de zircone cubique, nous retenons qu'aucune survie cellulaire n'existe au contact du revêtement (Figure 61). En effet, aucune morphologie étoilée d'étalement n'est observée. Les cellules ne colonisent pas la surface du support, malgré un bain de culture favorable au développement identique aux supports témoins viables. Elles ne développent aucun contact intercellulaire, et expulsent même leur substance intracytoplasmique (Figure 61a (\*)), traduisant un état de souffrance aboutissant à la mort cellulaire immédiate (Figure 61a (\*\*), b, c).



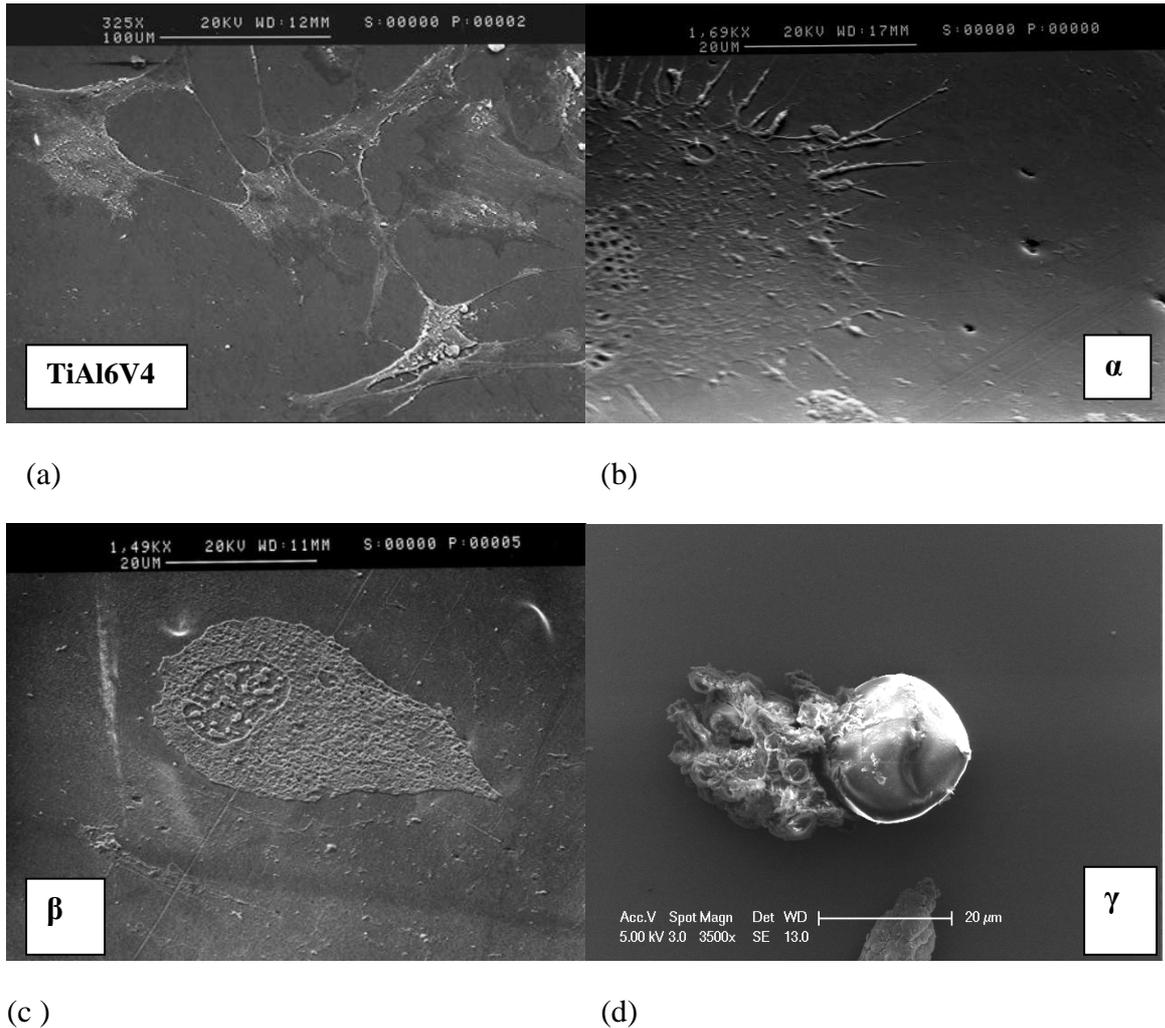
**Figure 61** : MEB, colonisation cellulaire Balb/3T3 sur TiAl6V4+ $\gamma$ . Nous observons un champ de cellules mortes (a, b, c) avec expulsion du cytoplasme (\*) en dehors de la cellule (\*\*): aspect déshydraté

La biocompatibilité n'est absolument pas obtenue sur TiAl6V4 +  $\gamma$ .

Pour conclure sur les résultats obtenus sur supports non témoin, nous les synthétisons ci-dessous, par comparaison des réponses cellulaires obtenus aux contacts du support témoin (TiAl6V4) et des supports non témoin (TiAl6V4+ $\alpha$ , TiAl6V4+ $\beta$ , TiAl6V4+ $\gamma$ ). Le critère retenu, permettant d'affirmer le caractère de biocompatibilité de l'alliage revêtu, est morphologique. Par comparaison aux lots témoins, les conservations de l'aspect étoilé de la cellule, avec des prolongements cytoplasmiques longs et étalés à son extrémité, qui traduisent un caractère d'adhérence au support, des connexions intercellulaires, et une colonisation du support, sont les marqueurs morphologiques cellulaires du fibroblaste Balb/3T3, qui sont la réponse à un support biocompatible.

### **Résultats finaux**

La comparaison des résultats à partir des clichés obtenus sur l'ensemble des cultures de la phase I, nous montre de réelles disparités de la réponse cellulaire selon le type de support en contact avec les cellules Balb/3T3. Comme nous le résume la **Figure 62**, la biocompatibilité a été maintenue sur la surface témoin en TiAl6V4 (plot et vis) non revêtu, amplifiée sur les surfaces TiAl6V4 avec un revêtement  $\alpha$  (plot et vis), diminuée sur les surfaces TiAl6V4 avec un revêtement  $\beta$  (plot et vis), et détruite sur les surfaces TiAl6V4 avec un revêtement  $\gamma$  (plot et vis).



**Figure 62** : résultats MEB comparatifs de cultures fibroblastes sur TiAl6V4 +/- (Zr,Y)O<sub>2-x</sub> où le support en TiAl6V4 (a), permet la conservation morphologique d'une colonisation cellulaire en bonne santé (étalement, contacts intercellulaires, prolongements cytoplasmiques longs et puissants), comme observé sur le support TiAl6V4+α, où les prolongements d'adhérence sont très étalés (b) ; alors que la vitalité résiste au contact du support TiAl6V4+β (c), pour disparaître totalement en présence du support TiAl6V4+γ (d)

#### IV.5.1.4 Conclusion des cultures cellulaires (phase I)

Les lectures des cultures ont démontré le caractère biocompatible conservé des alliages TiAl6V4, augmenté quand ils sont revêtus par une couche de dioxyde de zirconium (ZrO<sub>2</sub>) dite couche α. Cependant, le caractère biocompatible recherché est très fortement mitigée avec la substitution par l'yttrine à 4 mol.% et nul avec à 8 mol.% d'Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Les analyses ont été morphologiques (MO, MORE, MEB) et structurales (MET), avec une mise en évidence du caractère adhésif des fibroblastes sur les différents supports. Le caractère d'accroche des cellules a été soumis à rude épreuve, lors des étapes des préparations au

laboratoire de biologie cellulaire, durant les manipulations de dilution des bains de cultures et de rinçage, notamment avant la métallisation pour les lectures au MEB et MET.

Nous concluons que le développement de la colonisation cellulaire est influencé positivement par la rugosité de surface, par comparaison avec une surface lisse. Il est également influencé par la composition chimique de surface du revêtement sur lequel les cellules entrent en contact. Nous obtenons une réponse positive de la vitalité cellulaire en présence de l'alliage titane TiAl6V4 non revêtu, de l'alliage TiAl6V4 revêtu d'une couche de ZrO<sub>2</sub> noté TiAl6V4+ $\alpha$ , et une réponse négative de l'alliage TiAl6V4 revêtu des dépôts  $\beta$  noté TiAl6V4+ $\beta$  et des dépôts  $\gamma$  noté TiAl6V4+ $\gamma$ .

Nous symbolisons nos résultats de viabilité cellulaire de la manière suivante :

$$\alpha \geq \text{TiAl6V4} > \beta > \gamma$$

$$\text{rugosité} > \text{lisse}$$

La ZrO<sub>2</sub> monoclinique dite  $\alpha$  semble préférable comme revêtement en couche mince pour les alliages TiAl6V4. Elle améliore significativement la réponse cellulaire par rapport à l'utilisation de l'alliage TiAl6V4 sans couche mince. Elle donne une meilleure réponse que les films dopés à l'yttrine.

Pour mieux comprendre les résultats cellulaires obtenus, nous effectuons une seconde série de dépôts avec d'autres revêtements, où le facteur rugosité est étudié sur des échantillons revêtus d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, qui est un toxique cellulaire. L'influence de la composition chimique est envisagée par une étude comparative de l'yttrium comme élément d'addition de la zircone à partir de dépôts d'Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. L'influence de la structure cristallographique de la zircone est comparée à une zircone yttriée amorphe (a-YSZ), à une zircone massive (YSZ massif), et à d'autres revêtements utilisés en bioingénierie: le carbone amorphe (DLC), et le dioxyde de titane amorphe (a-TiO<sub>2</sub>).

Enfin, l'influence d'un problème d'adhésion de la couche mince sur le substrat titane envisagé, est obtenue par la réalisation d'un dépôt artificiellement vieilli par la mise en autoclave (alpklave 23) pendant plusieurs heures à 134°C. Ce vieillissement théorique, repris dans la littérature, permettrait d'obtenir par ce procédé, une équivalence de 15 à 20 ans d'un vieillissement biologique d'un implant du corps humain, par la mise en évidence d'un problème de dilution. Cette quatrième hypothèse n'est pas à négliger. Hypothèse qui rejoindrait alors la réalité clinique évoquée dans la littérature où il a été déterminé des réponses cellulaires anormales à distance des prothèses implantaires.

Cette étape 2 de nos dépôts a été réalisée au LERMPS.

Après avoir défini les paramétrages de notre machine PVD, nous rappelons que nous avons obtenus nos dépôts sur lames de verre, sur des plots et vis de TiAl6V4 et TiAl6V4+ $\alpha$ , de dioxyde de titane amorphe (a-TiO<sub>2</sub>), de zircone amorphe (a-YSZ), de DLC, d'Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, en présence de cellules de même souche que pour les expériences précédentes : fibroblastes type Balb/3T3.

Les résultats d'adhésion sont étudiés par MEB et MET au laboratoire d'Histologie-Embryologie de Microscopie Électronique de la faculté de Médecine de Nancy.

#### **IV.5.2 Résultats des cultures cellulaires (phase II)**

Nous rappelons que les cultures cellulaires ont été examinées sur un nombre de 42 témoins (7 lames de verres, 7 polymères, 7 plots et 7 vis de TiAl6V4, 7 plots et 7 vis de TiAl6V4+ $\alpha$ , 7 plots de TiAl6V4+a-YSZ, 7 plots DLC, 7 plots TiAl6V4+a-TiO<sub>2</sub>, 7 plots Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 7 plots d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Et, nous réalisons en plus, une analyse de la réponse cellulaire en créant deux bains de dilution à partir d'Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et d'Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

##### **IV.5.2.1 Cultures fibroblastes sur ZrO<sub>2</sub>, a-YSZ, a-TiO<sub>2</sub>, DLC, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

###### **➤ Analyses MEB**

Les cellules Balb/3T3 sont plongées dans des bains seuls, ou en présence d'a-YSZ, d'a-TiO<sub>2</sub>, de ZrO<sub>2</sub> non vieilli (YSZ massif) et vieilli (YSZ massif vieilli) par autoclave classe B (7 heures). Elles sont comparées à nos supports témoins (lames de verre et polymères, TiAl6V4 et TiAl6V4+ $\alpha$ ). Ces témoins permettent de valider la procédure du lot cellulaire en cours de culture, pour étudier par comparaison avec les autres dépôts (a-YSZ, DLC, a-TiO<sub>2</sub>, Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) et avec YSZ massif plus ou moins vieilli, l'état cellulaire obtenu, en se focalisant sur la colonisation ou non du support, la conservation ou perte de l'aspect morphologique de référence, la recherche de mitoses, etc.

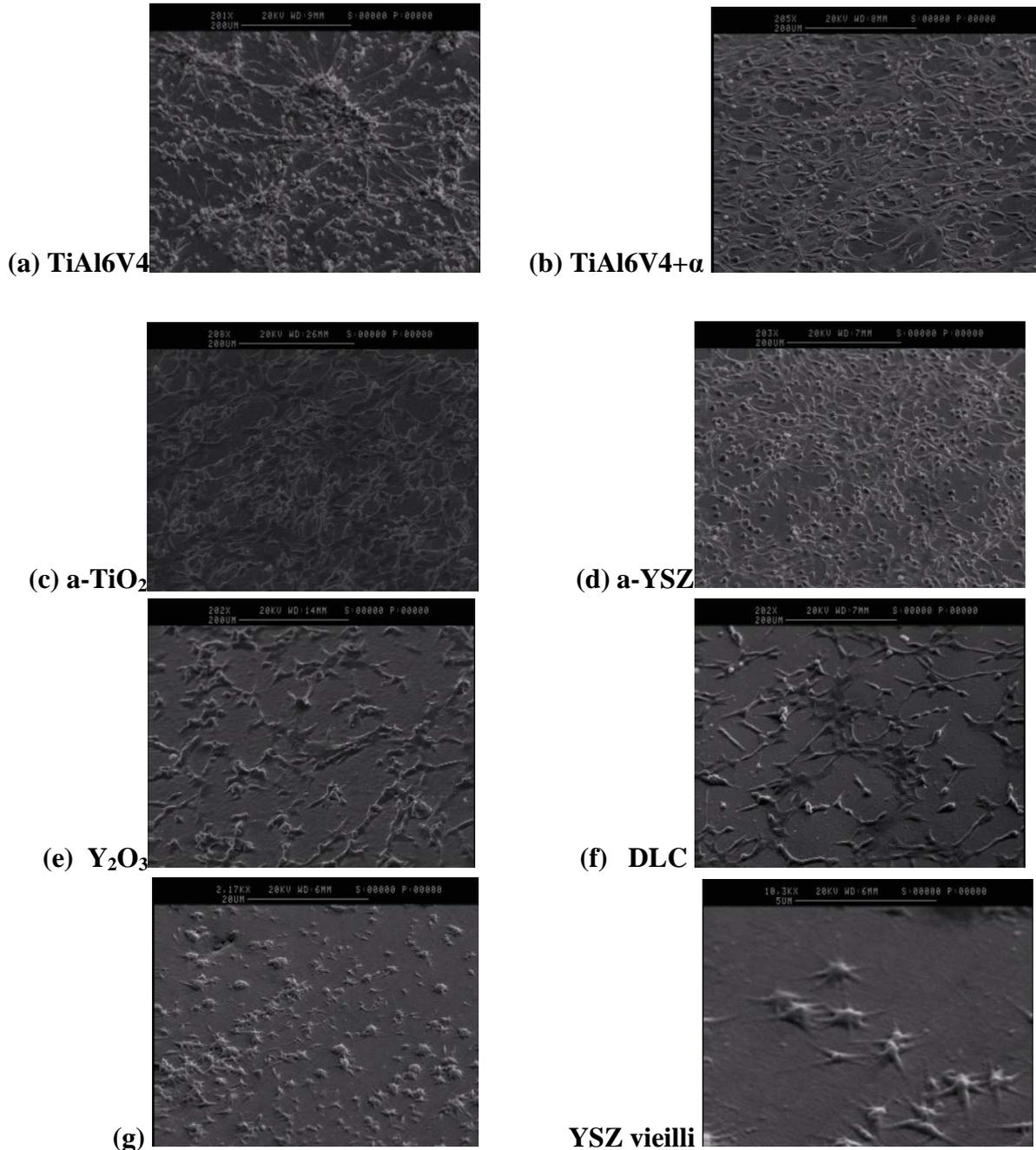
Ainsi, nous observons à la **Figure 63** en MEB, sur tous les résultats obtenus de nos cultures, un étalement homogène de colonisation des cellules sur la surface du support, où seule la densité cellulaire varie. Cette densité cellulaire est très importante en présence de TiAl6V4 et TiAl6V4+ $\alpha$ , importante en présence de a-TiO<sub>2</sub> et de a-YSZ, modérée sur les supports Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et DLC, faible en présence d'un support YSZ vieilli.

Nous considérons ces cellules comme étant en bonne santé par leur aspect étoilé et fusiforme avec des connexions entre les cellules, et un étalement homogène et une taille comparable en comparaison avec les résultats obtenus sur les supports témoins (lames de verre et polymères, TiAl6V4) de la phase I ou II (**Figure 63a**).

Il est cependant à noter concernant les résultats obtenus sur support YSZ vieilli, la taille microscopique des cellules obtenues, avec un aspect en 'étoile de mer', non caractéristique des fibroblastes ; une densité cellulaire et une colonisation du support très moyenne, avec des connexions intercellulaires peu nombreuses (**Figure 63b**).

Cependant, en analysant de manière plus approfondie nos résultats, nous notons qu'il existe de très grandes variations des aspects morphologiques et d'étalement. En effet, si nous appliquons le principe de comparer, avec les cultures témoins, ces deux critères qualitatifs avec celui quantitatif du nombre apparent de cellules étalées, sur tous nos plots de diamètre identique, pour nos analyses de cultures, il existe une différence dans le développement

cellulaire. Ces différences d'étalement et de nombre, nous amènent à retenir que la zircone massive possède ces deux caractères de viabilité cellulaire meilleurs que ceux observés sur TiAl6V4+ $\alpha$ . Ce dernier est lui-même meilleur que l'alliage titane TiAl6V4, lui-même supérieur à l'oxyde de titane amorphe a-TiO<sub>2</sub>, lui-même meilleur que la zircone amorphe stabilisée à l'yttrine a-YSZ, elle-même mieux que l'yttrine Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que le carbone DLC et que la zircone vieillie artificiellement (YSZ), qui termine ce comparatif quantitatif.

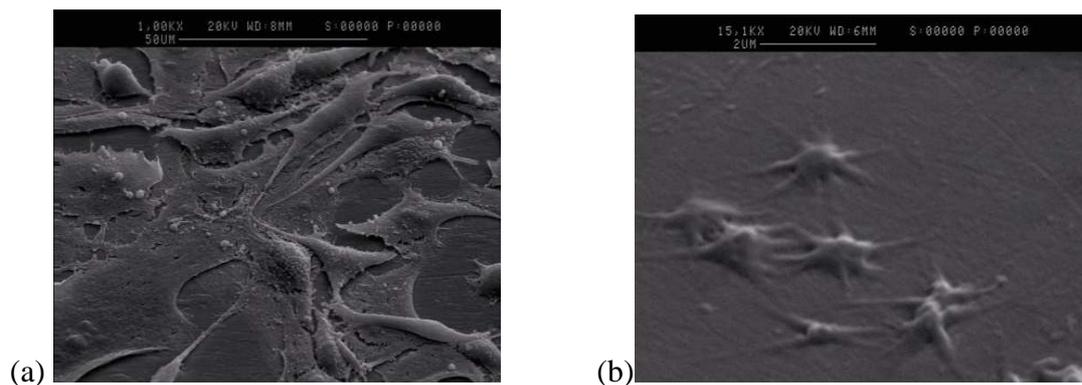


**Figure 63** : MEB, résultats comparatifs de cultures de fibroblastes Bald/3T3 sur différents supports témoins (a et b), et non témoins (c, d, e, f, g). A retenir le processus de colonisation, la densité d'étalement ainsi que les formes et tailles cellulaires qui semblent identiques (a, b, c, d, e, f) et modifiées (g), en fonction de revêtement

Symboliquement, nous pouvons résumer la viabilité cellulaire obtenue telle que :

**YSZ massif > TiAl6V4+ $\alpha$  > TiAl6V4 > a-TiO<sub>2</sub> > a-YSZ > Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> > DLC > YSZ massif vieillie**

De plus, il est évident que la reproduction artificielle du vieillissement d'YSZ massif par un procédé autoclave, a mise en évidence une modification de la surface soit sur le plan de la rugosité, soit sur le plan chimique du dépôt. En effet, nous pouvons noter de très grandes variations entre YSZ et YSZ vieilli tant sur la quantité des cellules qui ont proliféré sur les plots que sur la qualité morphologique des cellules. Ainsi, retenons que les cellules sur YSZ massif vieilli sont beaucoup plus petites (**Figure 63g**), avec un aspect étoilé extrême, et des interconnexions cellulaires minimales. Cela évoque une vitalité des cellules en contact sur le support, mais avec une souffrance qui s'apparente à un manque d'organites. Les cellules sont donc en retard de croissance typées en 'souffrance'. La différence portant sur le nombre et la taille de cellules étalées et accrochées entre YSZ et YSZ vieilli est indiscutable. Comme nous le montre la **Figure 64**. Elle nous indique une perte du caractère de viabilité cellulaire après vieillissement *in vitro*.



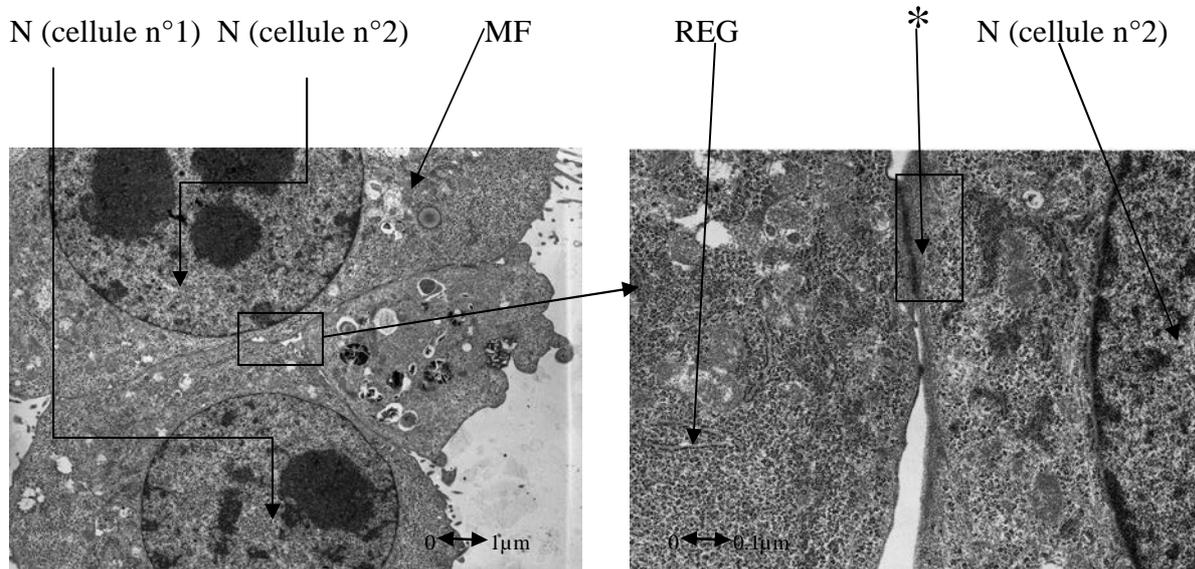
**Figure 64:** MEB cultures cellulaires sur YSZ (a) et YSZ vieillie (b). A noter la différence des agrandissements utilisés pour la lecture des cellules, le nombre des cellules présentes et leurs interconnexions très nombreux (a), à minima(b)

#### ➤ Analyses MET

Les différences observées dans le développement des cellules (taille, morphologie) selon le support sur lequel elles poussent, nous obligent à vérifier au MET la composition ultra-structurale de ces dernières, pour rechercher des caractéristiques de souffrances intracellulaires.

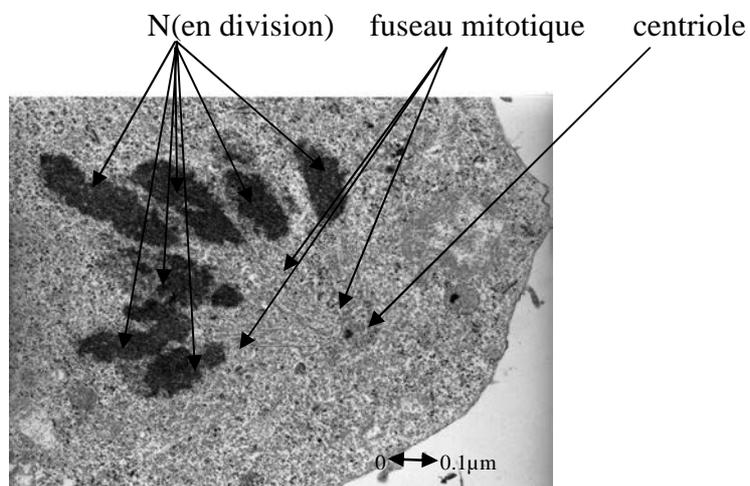
Comme nous l'indique la **Figure 65**, nous observons des structures intracellulaires de très bonne santé dans leur aspect, comme des connexions intercellulaires type Gap (\*), traduisant des échanges d'informations entre elles, ce qui assure la bonne survie du tapis cellulaire en prolifération. Nous identifions les éléments de la machinerie cellulaire tels que : noyau (N),

microfilaments (MF), réticulum endoplasmique granulaire (REG), mitochondrie (M), polyribosomes (PR).



**Figure 65:** MET- connexions intercellulaires type Gap (\*) observée sur YSZ

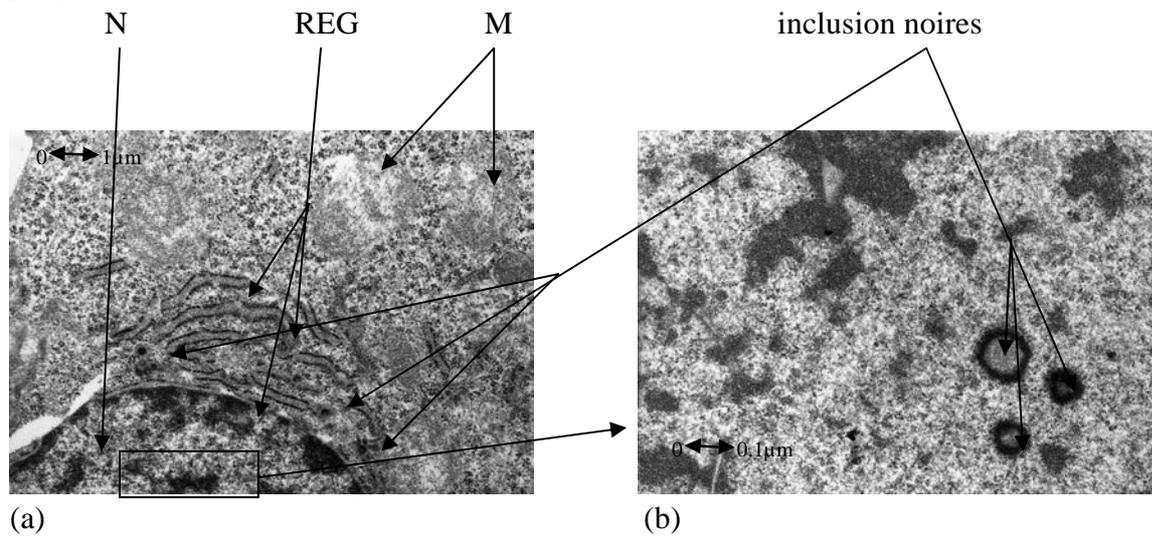
Nous observons également des étapes de divisions cellulaires à tous les stades comme cette phase de la mitose en anaphase (Figure 66).



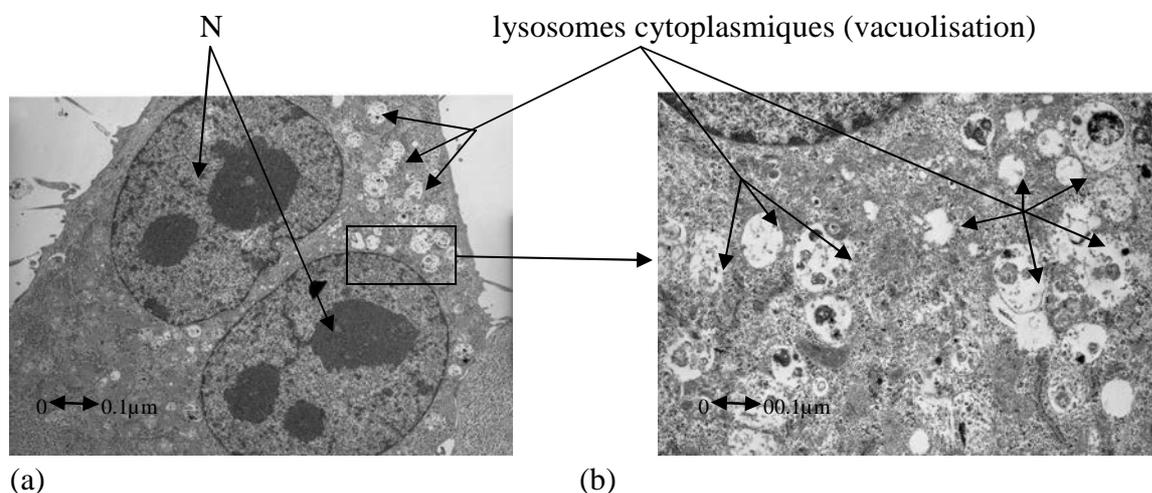
**Figure 66 :** MET - anaphase de la mitose sur  $\alpha$ -TiO<sub>2</sub>

L'aspect caractéristique traduisant des cellules en bonne santé, par les analyses de leurs matériels intracytoplasmiques (organites et agencement de la machinerie), par la capacité à la division cellulaire, se retrouve sur les cultures en présence de zircon massif, de l'alliage titane grade 5, ainsi que du dioxyde de titane amorphe..

En effet, il a été observé sur les autres dépôts, des signes de souffrances cellulaires, malgré un aspect morphologique et une colonisation sur le support acceptables (REG,M). Ces souffrances cellulaires ont été notamment mis en évidence par l'identification de vacuoles d'aspect 'tâches noires' situées dans le noyau au niveau de sa zone périphérique ou à proximité de ce dernier (Figure 67). Des vacuoles cytoplasmiques, ainsi que des lysosomes sont également présents en nombre, évoquant catégoriquement des phénomènes de phagocytose ou d'autophagie (Figure 68).



**Figure 67:** MET d'un noyau et sa proximité (a) sur support  $\alpha$ -YSZ. Mise en évidence d'inclusions noires (b) évoquant une souffrance du noyau et donc de son expression en ARNm



**Figure 68:** MET d'une cellule en phase télophase de mitose (a) présentant une souffrance cytoplasmique par la présence de lysosomes cytoplasmiques (b) sur support YSZ massif vieilli

Nous retrouvons de manière répétée dans nos analyses des lignées de fibroblastes Bald/3T3 en souffrance, où ces caractères sont retrouvés pour les dépôts de zircone yttrée amorphe  $\alpha$ -YSZ, d'yttrine  $Y_2O_3$ , de carbone DLC et enfin pour de la zircone vieillie en laboratoire:

**$\alpha$ -YSZ,  $Y_2O_3$ , DLC, YSZ massif vieilli**

Nous pouvons conclure qu'à la lecture des différents dépôts, nous observons au MEB et au MET des cellules qui conservent leurs caractéristiques morphologiques et d'organites. Mais, s'il apparaît la conservation de la phase de la mitose, permettant la division cellulaire et donc la prolifération des fibroblastes sur leur milieu support, il existe malgré tout, des réponses cellulaires variables selon les dépôts. Nous avons mis en évidence des souffrances cellulaires, tout au long de la vie de la cellule, qui font apparaître des aspects morphologiques boursoufflés (=souffrance) ou restrictifs (=souffrance), des tailles cellulaires variables, un treillis du tapis cellulaire variable, avec une machinerie cellulaire imparfaite au niveau du noyau et du cytoplasme.

Selon nos dépôts, nous distinguons le caractère de viabilité cellulaire, après recoupement des informations recueillis au MEB ou MET, de la manière suivante :

**YSZ massif > TiAl6V4+ $\alpha$  > TiAl6V4 > a-TiO<sub>2</sub> > a-YSZ > Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> > DLC > YSZ massif vieilli**

La souffrance cellulaire observée peut avoir deux origines distinctes : une infection ou une inflammation du milieu de culture. Le milieu de culture DMEM, dans lequel évoluent nos cellules, contient des antibiotiques pour prévenir toute infection cellulaire (*cf* paragraphe II.3.4.3, tableau I). Nous supposons alors que la souffrance observée est liée à un processus inflammatoire, qui peut être lié à l'expression membranaire à la surface des fibroblastes du TNF- $\alpha$ . Le facteur de nécrose tumorale ou TNF (tumor necrosis factor), est une importante cytokine impliquée dans l'inflammation systémique et dans la réaction de la phase aiguë. Une augmentation locale de la concentration en TNF- $\alpha$  cause les signes cardinaux de l'inflammation et l'entretien.

Nous n'avons pas réussi à ralentir, stopper ou inverser les processus de souffrance cellulaire des fibroblastes au contact des différents supports de culture, malgré l'usage d'une molécule inhibitrice de l'inflammation créée par l'action du TNF- $\alpha$ . Cette molécule pharmaceutique n'a jamais permis l'amélioration de l'état cellulaire en souffrance. Et cela, ni en préventif, c'est-à-dire par la mise systématique de l'anti-inflammatoire dans le bouillon de DMEM avant la mise en contact cellulaire avec les revêtements ; ni en curatif par une mise en place du traitement anti-inflammatoire, après que les cellules aient colonisé le support.

Cela signifie que l'état cellulaire de souffrance est caractéristique d'un état de contact entre la cellule et son support. Et, même si elle arrive à assurer ses fonctions basiques, comme la division cellulaire et l'échange intercellulaire, elle ne peut assurer des états de mitose à l'infini. Voilà pourquoi nous observons au MEB et MET, des variations de densités cellulaires (treillis) qui composent le tapis au contact des différents dépôts, malgré des conditions identiques de laboratoire. Quel que soit les critères retenus, qualitatifs et quantitatifs, les résultats sur chaque support de cultures sont bien distinguables.

Les résultats furent répétés trois fois. Et nous concluons que la viabilité cellulaire est donc présente mais variable.

#### IV.5.2.2 Cultures fibroblastes sur des solutions ioniques d' $\text{Al}_2\text{O}_3$ et $\text{Y}_2\text{O}_3$

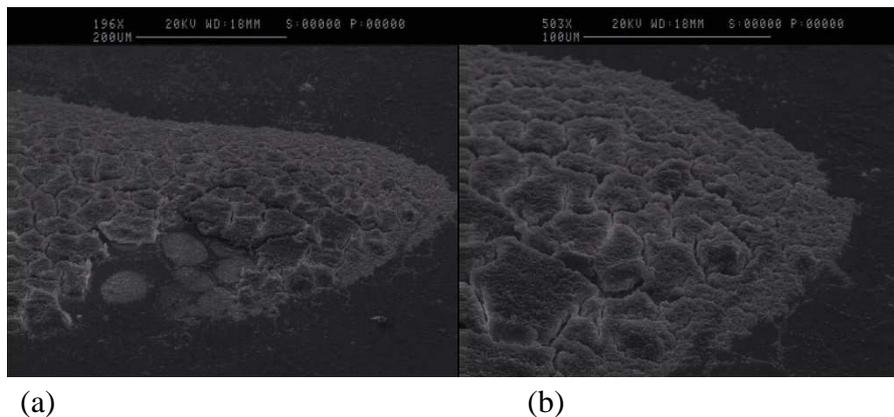
Afin d'étudier les caractères nocifs d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  et de  $\text{Y}_2\text{O}_3$ , non plus sous leur forme oxydée, mais ionique, il a été élaboré une solution ionique obtenue à partir de la dégradation des revêtements en couche mince réalisés. Les éléments ioniques  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Y}^{3+}$  sont en solutions. La concentration ionique n'a pas été mesurée.

Ces solutions ioniques, reproduisent *in vitro*, ce qui a déjà été observé *in vivo* par la littérature, qui rapporte une destruction cellulaire au contact et à distance de la pièce prothétique implantée. Afin de reproduire ces effets, il a été établi un protocole où nous avons recherché un contact direct ou une absence de contact des cellules sur les revêtements dégradés.

Ces solutions ioniques ont permis d'observer le comportement cellulaire de manière directe (au contact) ou indirecte (à distance) des solutions ioniques préparées ; lorsque les cultures en pleine croissance, sont directement déposées sur des plots de TiAl6V4 revêtus par la dégradation du dépôt de l'yttrine  $\text{Y}_2\text{O}_3$  et par celle des revêtements en  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Et indirectement, par l'usage d'une membrane microporeuse unidirectionnelle, qui reproduira l'état de contamination à distance de la solution, avec d'un côté de la membrane, les cellules en croissance, et de l'autre côté, la solution de corrosion déposée. Les échanges s'effectuant au travers de la membrane.

- Analyses MEB
  - $\text{Y}_2\text{O}_3$  en solution de corrosion

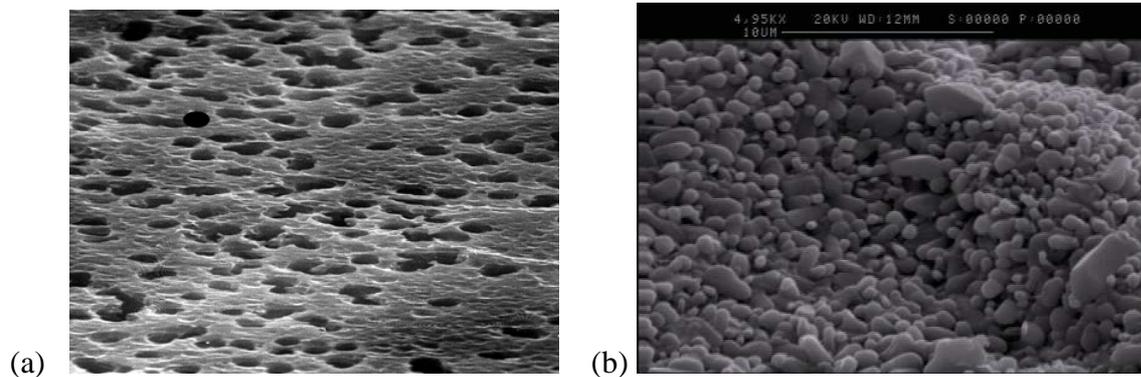
Quelque soit la méthodologie utilisée, par contact direct ou par l'intermédiaire d'une membrane microporeuse unidirectionnelle, la mort cellulaire des fibroblastes est rapide voire immédiate. Elle ne permet pas le moindre développement initial sur le support ou en dilution, comme nous le montre la **Figure 69**. Le dépôt cellulaire au contact du revêtement, n'a pas eu le temps de coloniser la surface. Il reste en 'paquet', avec une perte totale de la morphologie du fibroblaste Balb/3T3, fusiforme et étoilé, qui compose la culture cellulaire.



**Figure 69** : MEB montrant à échelle variable, une mort cellulaire immédiate (aspect en paquet) au contact (a, b) d'une solution de corrosion à partir d' $\text{Y}_2\text{O}_3$

○  $\text{Al}_2\text{O}_3$  en solution de corrosion

Nous observons le même résultat que sur  $\text{Y}_2\text{O}_3$  (Figure 70). A savoir, quelle que soit la méthode de culture, réalisée à travers une membrane microporeuse unidirectionnelle (Figure 70a) ou suite à un dépôt d'aspect granulaire d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  sur TiAl6V4 (Figure 70a), il n'y a absolument aucune possibilité de développement cellulaire.



**Figure 70** MEB : résultats comparatifs de cultures de fibroblastes Bald/3T3 à distance d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  en solution de corrosion (a) ou au contact du revêtement (b). Aucune colonisation cellulaire constatée

Nous concluons que la lyse est complète, totale et absolue en présence d'un bain de corrosion où les éléments ioniques  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Y}^{3+}$  sont en solutions par contact direct ou pas.

Si nous rassemblons les résultats des phases I et II de nos cultures cellulaires, nous retenons que la viabilité cellulaire est présente mais nuancée selon la rugosité de surface et les différents dépôts, que nous concluons tels que :

$$\alpha \geq \text{TiAl6V4} > \beta > \gamma$$

$$\text{rugosité} > \text{lisse}$$

**YSZ massif > TiAl6V4+ $\alpha$  > TiAl6V4 > a-TiO<sub>2</sub> > a-YSZ > Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> > DLC > YSZ massif vieilli**

Et qu'il n'y a pas de viabilité cellulaire en présence de :

**$\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$  dégradés**

## IV.6 DISCUSSION DES RÉSULTATS

Par la lecture de la bibliographie, il était apparu des résultats nuancés voire contradictoires à partir de l'utilisation d'alliages biocompatibles type TiAl6V4 appelés communément alliage titane grade 5. Afin d'améliorer ses propriétés physiques, chimiques et biologiques de surface, des dépôts de toutes sortes ont été réalisés sans succès majeur sur le TiAl6V4. N'ayant pas d'autres choix dans leurs usages en médecine, en attendant la recherche du matériau idéal, d'autres matériaux ont été étudiés et implantés. Mais ils aboutissent tous à une intolérance, une aggravation ou un rejet des tissus biologiques au contact ou à distance de la pièce médicale implantée. L'usage unique des alliages métalliques a laissé notamment place à l'apparition sur le marché des prothèses à base de zircone. Mais comme pour le titane, il a été observé une perte des performances de ce matériau. Pour comprendre pourquoi deux matériaux comme le TiAl6V4 et la zircone perdent leur caractère totalement biocompatible, vers un état de biocompatibilité tout juste acceptable, il nous a fallu tout d'abord analyser des prothèses implantables actuellement sur le marché médical. Nos analyses ont porté sur l'analyse d'implants dentaires. La première étape de notre étude fût d'analyser la topographie et la chimie de surface d'implants dentaires. Tous les implants dentaires étant de même alliage (grade 4 ou 5), les différences existantes portaient sur la topographie de surface. Nous avons choisi de travailler sur des implants de marque IDI pour analyser quel type d'alliage base titane et quelle préparation de surface reproduire sur nos modèles de laboratoire en plot et vis.

Partant de la littérature, nos modèles de laboratoire TiAl6V4, ont été élaborés avec différents dépôts de zircone plus ou moins dopés à l'yttrine par procédé PVD. L'étude de ces revêtements sur le plan biologique a été effectuée en mettant en présence nos modèles aux revêtements supposés 'biocompatibles' avec des cultures cellulaires de type fibroblastes Bald/3T3.

Nous avons observé une différence très significative et sans ambiguïté sur la valeur de nos résultats. Il est apparu que les revêtements de zircone monoclinique permettent d'amplifier la biocompatibilité primaire de TiAl6V4 alors que des revêtements de zircone quadratique ou cubique sont nocifs pour la conserver. Compte tenu des vitesses de dépôt différentes des 3 formes de zircone, l'effet éventuel de la rugosité de surface n'est pas à exclure. Les films de zircone monoclinique conduisant à une rugosité élevée (à cause de leur épaisseur plus importante), le caractère biocompatible de ces films pourrait résulter de ce facteur géométrique. Cela rejoint la littérature, où il avait été noté une accroche primaire meilleure des cellules, dans les premiers temps qui suivent une implantation médicale [50] [51] [53]. Mais, cela n'améliorait pas l'intégration cellulaire finale par rapport à une implantation sur une surface polie miroir. Que la surface soit polie miroir ou non, la colonisation cellulaire se fera [55]. Notre étude en laboratoire a démontré ce caractère d'accroche primaire plus élevée sur nos échantillons à surface rugueuse que sur ceux à surface poli miroir, où le développement cellulaire s'est aussi réalisé (phase I de nos cultures cellulaires).

Notre réflexion, face aux résultats obtenus, fut de rechercher et de comprendre les facteurs qui influençaient la réponse cellulaire au contact des dépôts de zircone plus ou moins substituée par l'yttrine sur les alliages TiAl6V4. Cela pouvait venir soit de la structure cristallographique de l'oxyde de zirconium modifiée par l'oxyde d'yttrium, soit de l'élément dopant Y (phase II de nos cultures cellulaires), soit de l'action du processus de stérilisation.

Concernant l'influence de la structure de la zircone, nous retenons de nos résultats que pour une même quantité d'yttrine fixée à 8 % molaire, la réponse cellulaire est variable selon la structure. En effet, en présence d'un dépôt amorphe de zircone yttrée ou d'un substrat massif en zircone yttrée cubique un développement et une prolifération cellulaire ont été observés tandis qu'aucun développement cellulaire n'est observé en présence d'un dépôt de structure cubique  $\gamma$ . La structure influence la réponse cellulaire, soit au niveau de la rugosité de surface des dépôts, soit de part sa microstructure. En effet, la taille des grains est de l'ordre du nanomètre pour les dépôts amorphes de zircone yttrée et de la dizaine de micromètres pour l'échantillon massif. De plus, nous avons observé une réponse significativement variable des critères de la vitalité cellulaire. Ces critères qualitatifs basés sur l'aptitude à coloniser la surface du dépôt tout en conservant les critères qualitatifs de viabilité qui concernaient la morphologie, les connexions intercellulaires, et l'adhérence ont été conservés en présence de YSZ massif en comparaison avec notre dépôt témoin  $\alpha$ -TiO<sub>2</sub>, et modérés en présence de  $\alpha$ -YSZ et YSZ massif vieilli.

Un autre critère pouvant être considéré pour expliquer les différences de comportement entre les différentes formes cristallographiques de dépôts de zircone correspond à la présence de l'élément yttrium. Dans l'objectif de déterminer si la seule présence de cet élément pouvait être responsable de la perte de biocompatibilité de la zircone yttrée cubique, nous avons testé un film d'oxyde d'yttrium en culture cellulaire. Comme nous l'avons montré dans les paragraphes précédents, les fibroblastes prolifèrent sur le dépôt d'Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> démontrant clairement qu'à lui seul l'élément yttrium ne peut pas être considéré pour expliquer la dégradation graduelle du caractère de biocompatibilité avec la concentration en yttrium des revêtements de zircone. La réponse cellulaire semble donc être influencée par la structure et/ou la rugosité mais non par la seule présence de l'yttrium.

Concernant les autres facteurs qui pourraient amener une modification de la réponse cellulaire, nous avons observé l'influence de la stérilisation. En présence d'YSZ massif, la prolifération cellulaire était la plus importante en comparaison avec tous les autres dépôts. Cette dernière est devenue quasiment nulle avec de très fortes modifications morphologiques cellulaires, après que les échantillons d'YSZ massif aient subi un traitement par autoclave (134°C, 4 bars, 7 heures). En effet, il a été observé une perte de la colonisation de la surface du dépôt, une modification de l'aspect étoilé avec une taille cellulaire atypique, une perte des connexions intercellulaires et de leur potentiel d'adhérence.

Ces observations rejoignent la littérature évoquant l'influence de la réponse cellulaire en fonction du mode de stérilisation utilisé sur le matériel médical implantable [97].

Enfin, nous avons évoqué l'influence de la corrosion des dépôts pour expliquer l'éventuel relargage des ions qui requiert alors une décohésion à l'interface entre le revêtement et son support. Pour avoir dégradé par électrolyse les dépôts  $Y_2O_3$  et  $Al_2O_3$ , les solutions obtenues où  $Y^{3+}$  et  $Al^{3+}$  sont en présence, ne permettent aucun développement cellulaire. Cette dégradation des dépôts de laboratoire reflète de manière théorique, ce qui pourrait se passer au contact ou à distance d'une pièce médicale implantée subissant un état de corrosion biologique. Cette hypothèse rejoint les observations cliniques rapportées par la littérature. Cela serait lié à un défaut majeur de l'interface par une faiblesse des liaisons permettant l'adhérence du revêtement sur son substrat. Si les liaisons sont trop faibles, l'environnement biologique pourrait permettre un processus de libération particulière du revêtement et entraîner par la même occasion une dilution et/ou une corrosion de surface de l'implant. Cette hypothèse est renforcée par l'aspect granulaire des dépôts testés en électrolyse qui entraîne facilement son décollement de la surface de TiAl6V4, par simple manipulation de transport ou de préparation de surface afin de les rendre stériles pour la mise en culture cellulaire.

Ces hypothèses nous invitent à élaborer, dans le futur, des protocoles de recherche complémentaires au laboratoire pour l'obtention d'un dépôt, qui nous permettraient, de mieux répondre de l'action de tous ces facteurs cités qui influencent la viabilité cellulaire d'un revêtement trempé dans un bain biologique.

**CONCLUSION GÉNÉRALE**

L'objectif de notre recherche au sein de l'Institut Jean Lamour (Université de Lorraine) en partenariat avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Matériaux, les Plasmas et les Surfaces (UTBM), a été l'élaboration de revêtements biocompatibles sur alliage titane. Pour atteindre notre objectif, nous avons réparti notre travail en trois temps, en choisissant de travailler sur des matériaux naturellement biocompatibles à savoir l'alliage TiAl6V4 et la zirconie ( $ZrO_2$ ).

En débutant par des analyses physico-chimiques et morphologiques de la surface d'implants de commerce, cela nous a permis de créer des modèles de laboratoire (plot et vis) avec des rugosités de surface plus ou moins prononcées, mais de même composition que des implants commerciaux en TiAl6V4. Le principal résultat de cette première partie correspond à la mise en évidence de l'inscrustation de grains d'alumine dans les implants en TiAl6V4 après leur étape de préparation de surface par sablage.

Dans un deuxième temps, nous avons revêtu ces substrats modèles par des couches minces de  $(Zr-Y)O_{2-x}$  en utilisant un procédé de pulvérisation magétron en conditions réactives. Le contrôle de la teneur en yttrium a été assuré par l'utilisation de cibles en zirconium à concentrations variables en yttrium. Ces revêtements se distinguent entre eux par une structure cristallographique propre à chaque type de dépôt : monoclinique, quadratique ou cubique.

Les modèles en TiAl6V4 revêtus regroupés en 3 lots contenant chacun 7 échantillons ont été acheminés dans un laboratoire biologique de cultures cellulaires, pour être mis en contact avec une souche fibroblastique Balb3T3. Pour obtenir d'une même lignée de culture les quantités suffisantes de cellules contenues dans les bains servant à recevoir les lots, il nous a fallu un temps de 20 semaines par cryotube, selon un procédé de biocompatibilité strict normé ISO. Chaque lot a subi 3 fois les mêmes protocoles de cultures. Par une dernière manipulation en laboratoire de biologie cellulaire, les cellules fibroblastiques Balb/3T3 qui avaient colonisées la surface de nos alliages revêtus de couches minces, subissaient un traitement de déshydratation puis de métallisation, nous permettant ainsi de les étudier par microscopie électronique.

La conclusion de nos analyses nous permet sans ambiguïté, d'affirmer qu'il existe une influence de la rugosité qui oriente spatialement la croissance cellulaire. Mais, le facteur primordial qui détermine une réponse cellulaire optimisée est l'usage d'une couche mince de  $ZrO_2$  monoclinique dite  $\alpha$ , par rapport aux autres structures cristallographiques de la zirconie ( $\beta$  ou  $\gamma$ ). Ces résultats obtenus *in vitro*, pourraient sans doute, mieux nous faire comprendre que, malgré l'utilisation de matériaux spontanément biocompatibles, nous obtenons des réponses d'intolérances ou de rejets au niveau médical. Si le facteur cristallographique de  $ZrO_2$  agit sur la survie cellulaire de nos cultures, il faut penser à l'élément dopant Y, contenu à des pourcentages atomiques identifiables dans les revêtements stabilisés de zirconie. Il faut également ne pas négliger de citer d'autres paramètres qui agissent vers un effet de nocivité cellulaire. Nous pensons que l'étape de préparation de la surface de nos modèles par sablage à l'alumine  $Al_2O_3$  pour obtenir de la rugosité est aussi un facteur nocif. Enfin, la notion de

dilution des éléments composant la surface de l'alliage, seraient le quatrième facteur influençant la biocompatibilité.

Afin de poursuivre cette réflexion et affiner nos recherches, nous avons jugé indispensable de réaliser de nouvelles cultures cellulaires (phase II), avec comme objectifs de chercher des réponses aux hypothèses émises lors de la première phase de cultures cellulaires.

Un second jeu de revêtements a alors été réalisé pour mesurer les conséquences nocives d'une modification chimique de la surface des alliages TiAl6V4 : dépôt de carbone amorphe (DLC), de zircone yttrée amorphe, d'yttrine, de dioxyde de titane amorphe ou encore d'alumine. Des substrats massifs en zircone cubique ont également été employés comme témoins. Enfin, pour mesurer l'influence du vieillissement *in vitro* d'un dépôt de  $ZrO_2$ , nous avons procédé à une dégradation des couches d' $Al_2O_3$  et  $Y_2O_3$  par trempage dans des bains de corrosion.

Conformément à nos hypothèses, il a été confirmé qu' $Al_2O_3$  est nocif pour le bon développement cellulaire. La forme ionique dégradée d' $Al_2O_3$  et  $Y_2O_3$  est également mortelle pour les cellules plongées dans un bain de solution où  $Al^{3+}$  et  $Y^{3+}$  sont présents, au contact ou à distance des revêtements.

La biocompatibilité est très bien conservée avec la zircone massive, TiAl6V4 et  $TiO_2$ , moins bien conservée avec  $ZrO_2$  vieillie et DLC. Enfin, contrairement à nos hypothèses émises lors de nos premières cultures cellulaires (phase I), la biocompatibilité fut conservée en présence de zircone amorphe et d' $Y_2O_3$ . Alors qu'il était valable de penser que rien ne pousserait en présence de l'élément Y, quel qu'en soit sa forme cristallographique ou ionique.

Bien que les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse apportent des éléments essentiels pour le développement de revêtements biocompatibles, ils ouvrent également de nouvelles perspectives d'études. Pour tendre vers le développement d'implants dentaires revêtus par des films de zircone monoclinique il nous faudra d'abord développer une méthodologie *in vitro* de primo cultures telles que des lignées fraîches de fibrocytes, ostéocytes ou par des lignées cancéreuses éternelles. Dans un second temps, des cultures *in vitro* plus longues feraient appel à des cellules souches mésenchymateuses pour y observer les caractères de différenciation en ostéocytes par exemple. Enfin, la finalité de ces cultures en laboratoire pourrait trouver une application *in vivo* par une réelle étude implantaire de nos revêtements sur le modèle animal comme par exemple le cochon nain adulte d'Asie. Dans ce cas, les paramètres biologiques de santé seraient mesurés pendant une année avant le sacrifice de l'animal et l'observation anapathologique des cellules au contact des biomatériaux et à distance serait menée en parallèle. Cela nous permettrait ainsi, d'étudier de manière plus approfondie l'influence du vieillissement des dépôts et de son éventuel corrosion ou dilution.

**RÉFÉRENCES**

1. Analyse Développement & Conseil, OMS Health, Eucomed, Market & Research, 2011
2. [http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg\\_id=0&ref\\_id=NATFPS06302](http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=0&ref_id=NATFPS06302)
3. Le cahier des charges - n°1 et 3, de l'Intercommission 1 de l'INSERM. Systèmes de suppléance fonctionnelle, organes artificiels, biomatériaux
4. La Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomatériaux en 1986 : [averousl.free.fr/fichiers/Bio-materiaux.pdf](http://averousl.free.fr/fichiers/Bio-materiaux.pdf)
5. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen and J.E. Lemons. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medecine, Eds. Elsevier Academic Press, 2nd edition, 2004
6. Zhengwei You, Xiaoping Bi, Xianqun Fan, Yadong Wang. A functional polymer designed for bone tissue engineering Original Research Article Acta Biomaterialia, Volume 8, Issue 2, February 2012, Pages 502-510
7. C. Morrison, R. Macnair, C. MacDonald, A. Wykman, I. Goldie, M.H. Grant. In vitro biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts Original Research Article; Biomaterials, Volume 16, Issue 13, September 1995, Pages 987-992
8. Hoi Man Wong, Kelvin W.K. Yeung, Kin On Lam, Vivian Tam, Paul K. Chu, Keith D.K. Luk, Kenneth M.C. Cheung. A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopaedic implants Original Research Article Biomaterials, Volume 31, Issue 8, March 2010, Pages 2084-2096
9. Takahiro Suzuki, Yasuyuki Mizushima, Tomohiro Umeda, Ryo Ohashi. Further biocompatibility testing of silica-chitosan complex membrane in the production of tissue plasminogen activator by epithelial and fibroblast cells Original Research Article; Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 88, Issue 2, 1999, Pages 194-199
10. Soumitri Pattnaik, Sricharan Nethala, Anjali Tripathi, Sekaran Saravanan, Ambigapathi Moorthi, Nagarajan Selvamurugan. Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering Original Research Article; International Journal of Biological Macromolecules, Volume 49, Issue 5, 1 December 2011, Pages 1167-1172
11. R. Jayakumar, Deepthy Menon, K. Manzoor, S.V. Nair, H. Tamura. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review article; Carbohydrate Polymers, Volume 82, Issue 2, 5 September 2010, Pages 227-232
12. Mihai Chirita. Mechanical Properties of Collagen Biomimetic Films Formed in the Presence of Calcium, Silica and Chitosan Original Research Article; Journal of Bionic Engineering, Volume 5, Issue 2, June 2008, Pages 149-158

13. Rainer Müller, Jochen Abke, Edith Schnell, Dieter Scharnweber, Richard Kujat, Carsten Englert, Darius Taheri, Michael Nerlich, Peter Angele. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 27, Issue 22, August 2006, Pages 4059-4068
14. Rainer Müller, Jochen Abke, Edith Schnell, Frank Macionczyk, Uwe Gbureck, Robert Mehrl, Zbigniew Ruszczak, Richard Kujat, Carsten Englert, Michael Nerlich, Peter Angele. Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 26, Issue 34, December 2005, Pages 6962-6972
15. P. Giusti, L. Lazzeri, S. De Petris, M. Palla, M.G. Cascone. Collagen-based new bioartificial polymeric materials Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 15, Issue 15, December 1994, Pages 1229-1233
16. P. Frayssinet, D. Hardy, N. Rouquet, B. Giammara, A. Guilhem, J. Hanker. New observations on middle term hydroxyapatite-coated titanium alloy hip prostheses Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 13, Issue 10, 1992, Pages 668-674
17. J.C. Fricain, J. Alouf, R. Bareille, F. Rouais, J.L. Rouvillain. Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 23, Issue 3, February 2002, Pages 673-679
18. Xuenan Gu, Yufeng Zheng, Yan Cheng, Shengping Zhong, Tingfei Xi. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys Original Research Article *Biomaterials*, Volume 30, Issue 4, February 2009, Pages 484-498
19. Mark P. Staiger, Alexis M. Pietak, Jerawala Huadmai, George Dias. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review Review Article; *Biomaterials*, Volume 27, Issue 9, March 2006, Pages 1728-1734
20. Gleb Yushin, Elizabeth N. Hoffman, Michel W. Barsoum, Yury Gogotsi, Carol A. Howell, Susan R. Sandeman, Gary J. Phillips, Andrew W. Lloyd, Sergey V. Mikhalovsky. Mesoporous carbide-derived carbon with porosity tuned for efficient adsorption of cytokines Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 27, Issue 34, December 2006, Pages 5755-5762
21. N. More, C. Baquey, X. Barthe, F. Rouais, J. Rivel, M. Trinquescoste, A. Marchand. Biocompatibility of carbon-carbon materials: in vivo study of their erosion using <sup>14</sup>C-labelled samples Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 9, Issue 4, July 1988, Pages 328-332, IN1,333-334
22. P. Laheurte, F. Prima, A. Eberhardt, T. Gloriant, M. Wary, E. Patoor. Mechanical properties of low modulus titanium alloys designed from the electronic approach Original Research Article; *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 3, Issue 8, November 2010, Pages 565-573
23. Y. Song, D.S. Xu, R. Yang, D. Li, W.T. Wu, Z.X. Guo. Theoretical study of the effects of alloying elements on the strength and modulus of  $\beta$ -type bio-titanium alloys Original Research Article; *Materials Science and Engineering: A*, Volume 260, Issues 1-2, February 1999, Pages 269-274

24. T. Hanawa, K. Asami, K. Asaoka. Microdissolution of calcium ions from calciumion-implanted titanium Original Research Article; Corrosion Science, Volume 38, Issue 9, September 1996, Pages 1579-1594
25. Jiang-Xue Wang, Yu-Bo Fan, Yu Gao, Qing-Hua Hu, Tian-Cheng Wang. TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection Original Research Article; Biomaterials, Volume 30, Issue 27, September 2009, Pages 4590-4600
26. I. Cvijović-Alagić, Z. Cvijović, S. Mitrović, V. Panić, M. Rakin. Wear and corrosion behaviour of Ti–13Nb–13Zr and Ti–6Al–4V alloys in simulated physiological solution; Corrosion Science, Volume 53, Issue 2, February 2011, Pages 796-808
27. Qiang Li, Mitsuo Niinomi, Masaaki Nakai, Zhenduo Cui, Shengli Zhu, Xianjin Yang. Effect of Zr on super-elasticity and mechanical properties of Ti–24 at% Nb–(0, 2, 4) at% Zr alloy subjected to aging treatment Original Research Article; Materials Science and Engineering: A, In Press, Corrected Proof, Available online 31 December 2011
28. A.E. Aguilar Maya, D.R. Grana, A. Hazarabedian, G.A. Kokubu, M.I. Luppó, G. Vigna. Zr–Ti–Nb porous alloys for biomedical application Original Research Article; Materials Science and Engineering: C, Volume 32, Issue 2, 1 February 2012, Pages 321-329
29. Nanostructured diamondlike carbon thin films for medical applications Original Research Article; Materials Science and Engineering: C, Volume 25, Issue 3, May 2005, Pages 405-416
30. Xuenan Gu, Yufeng Zheng, Yan Cheng, Shengping Zhong, Tingfei Xi. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys Original Research Article; Biomaterials, Volume 30, Issue 4, February 2009, Pages 484-498
31. Buser D, Schenk R, Steinemann S, Fiorellini J, Fox C, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:889–902
32. Testori T, Wiseman L, Woolfe S, Porter S. A prospective multicenter clinical study of the Osseotite implant: four-year interim report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16:193–200
33. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Pech M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Jt Surg Am* 2000; 82:457–77
34. Browne M, Gregson PJ. Effect of mechanical surface pretreatment on metal ions release. *Biomaterials* 2000; 21:385–92
35. Martini D, Fini M, De Pasquale V, Bacchelli B, Gamberini M, Tiniti A, et al. Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. *Biomaterials* 2003; 24:1309–16
36. Rocuzzo M, Bunino M, Prioglio F, Bianchi SD. Early loading of sandblasted and acid-etched (SLA) implants: a prospective split-mouth comparative study. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12:572–8

37. Bulletin mensuel de veille et de signalement ; Edité par l'Agence pour la Diffusion de l'Information Technologique. Céramiques, p 13 ; Vigie Matériaux avancés - n°25 - Septembre 1997
38. G. Aliprandi. Matériaux réfractaires et céramiques techniques.; Paris ; Editions Septima (1979)
39. C.E. Wen, Y. Yamada, P.D. Hodgson. Fabrication of novel TiZr alloy foams for biomedical applications Original Research Article; Materials Science and Engineering: C, Volume 26, Issue 8, September 2006, Pages 1439-1444
40. X.Y. Zhang, M.H. Shi, C. Li, N.F. Liu, Y.M. Wei. The influence of grain size on the corrosion resistance of nanocrystalline zirconium metal Original Research Article; Materials Science and Engineering: A, Volume 448, Issues 1–2, 15 March 2007, Pages 259-263
41. S. Zinelis, A. Thomas, K. Syres, N. Silikas, G. Eliades. Surface characterization of zirconia dental implants Original Research Article; Dental Materials, Volume 26, Issue 4, April 2010, Pages 295-305
42. J Probst, U Gbureck, R Thull. Binary nitride and oxynitride PVD coatings on titanium for biomedical applications Original Research Article; Surface and Coatings Technology, Volume 148, Issues 2–3, 3 December 2001, Pages 226-233
43. Yogambha Ramaswamy, Chengtie Wu, Annika Van Hummel, Valery Combes, Georges Grau, Hala Zreiqat. The responses of osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells to zirconium modified calcium-silicate-based ceramic Original Research Article; Biomaterials, Volume 29, Issue 33, November 2008, Pages 4392-4402
44. L. Meseguer-Olmo, A. Bernabeu-Escaplez, M. Vallet-Regí, S. Aznar-Cervantes, V. Vicente-Ortega, M. Alcaraz-Baños, M. Clavel-Sainz, A. Herrera-Rodríguez, F. Lopez-Prats, J.M. Moraleda-Jiménez, C.L. Meseguer-Ortiz. Design and development of biologically active vitroceramic-based hybrid materials to be used as bone substitutes. Bone tissue engineering; Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition), Volume 54, Issue 1, January–February 2010, Pages 59-68
45. M. Bosetti, E. Vernè, M. Ferraris, A. Ravaglioli, M. Cannas. In vitro characterisation of zirconia coated by bioactive glass Original Research Article; Biomaterials, Volume 22, Issue 9, 1 May 2001, Pages 987-994
46. Daniel Arcos, María Vallet-Regí. Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration Review Article; Acta Biomaterialia, Volume 6, Issue 8, August 2010, Pages 2874-2888
47. K. Subramanian, D. Tran, K.T. Nguyen. Cellular Responses to Nanoscale Surface Modifications of Titanium Implants for Dentistry and Bone Tissue Engineering Applications; Emerging Nanotechnologies in Dentistry - Chapter 8, 2012, Pages 113-136
48. M. Yaseen, F. Pan, X. Zhao, J.R. Lu. Surface Modification to Improve Biocompatibility; Comprehensive Biotechnology - Second Edition, Volume 5, 2011, Pages 65-81

49. Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behavior of commercially pure titanium shot blasted with different materials and size of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* 2003; 24:263–73
50. Gotfredsen K, Wennerberg A, Johansson C, Skovgaard LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO<sub>2</sub>-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995; 29:1223–31
51. Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO<sub>2</sub> blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12:128–34
52. Rasmusson L, Kahnberg KE, Tan A. Effects of implant design and surface on bone regeneration and implant stability: an experimental study in the dog mandible. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001; 3:2–8
53. Gotfredsen K, Karlsson U. A prospective 5-year study of fixed partial prostheses supported by implants with machined and TiO<sub>2</sub>-blasted surface. *J Prosthodont* 2001; 10:2–7
54. Rasmusson L, Roos J, Bystedt H. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7:36–42
55. Abron A, Hopfensperger M, Thompson J, Cooper L. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J Prosth Dent* 2001; 85:40–6
56. Novaes A, Souza S, de Oliveira P, Souza A. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:377–83
57. Piatelli M, Scarano A, Paolantonio M, Iezzi G, Petrone G, Piatelli A. Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *J Oral Implantol* 2002; 28:2–8
58. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2000; 11:530–9
59. Trisi P, Lazzara R, Rebaudi A, Rao W, Testori T, Porter SS. Bone-implant contact on machined and dual acid-etched surfaces after 2 months of healing in the human maxilla. *J Periodontol* 2003; 74:945–56
60. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 1998; 11:391–401
61. Trisi P, Lazzara R, Rao W, Rebaudi A. Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22:535–45
62. Ellingsen JE. Pre-treatment of titanium implants with fluoride improves their retention in bone. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6:749–58

63. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A. Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:659–66
64. Yokoyama K, Ichikawa T, Murakami H, Miyamoto Y, Asaoka K. Fracture mechanisms of retrieved titanium screw thread in dental implants. *Biomaterials* 2002; 23:2459–65
65. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Roser K, Wennerberg A, Albrektsson T. Oxidized implants and their influence on the bone response. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12:1025–31
66. Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:105–11
67. Sul YT, Johansson CB, Roser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials* 2002; 23:1809–17
68. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13:252–9
69. Rocci A, Martignoni M, Gottlow J. Immediate loading of Branemark System TiUnite and machined-surface implants in the posterior mandible: a randomized open-ended clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003; 5:S57–63
70. Sul YT, Johansson C, Wennerberg A, Cho LR, Chang BS, Albrektsson T. Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:349–59
71. Schupbach P, Glauser R, Rocci A, Martignoni M, Sennerby L, Lundgren A, et al. The human bone-oxidized titanium implant interface: a light microscopic, scanning electron microscopic, back-scatter scanning electron microscopic, and energy-dispersive X-ray study of clinically retrieved dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7:S36–43
72. Sul YT, Johansson CB, Albrektsson T. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:625–34
73. Sul YT, Byon ES, Jeong Y. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clin Implant Dent Relat Res* 2004; 6:101–10
74. D.G. Guo, A.H. Wang, Y. Han, K.W. Xu. Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites *Original Research Article; Acta Biomaterialia*, Volume 5, Issue 9, November 2009, Pages 3512-3523

- 75.** Jeffrey R. Piascik, Scott D. Wolter, Brian R. Stoner. Development of a novel surface modification for improved bonding to zirconia Original Research Article; *Dental Materials*, Volume 27, Issue 5, May 2011, Pages e99-e105
- 76.** Jeffrey R. Piascik, Scott D. Wolter, Brian R. Stoner. Development of a novel surface modification for improved bonding to zirconia Original Research Article; *Dental Materials*, Volume 27, Issue 5, May 2011, Pages e99-e105
- 77.** Xiaobo Chen, Yuncang Li, Peter D. Hodgson, Cuie Wen. In vitro behavior of human osteoblast-like cells (SaOS2) cultured on surface modified titanium and titanium–zirconium alloy Original Research Article; *Materials Science and Engineering: C*, Volume 31, Issue 7, 10 October 2011, Pages 1545-1552
- 78.** Takuya Junior Matsumoto, Sang-Hyun An, Takuya Ishimoto, Takayoshi Nakano, Takuya Matsumoto, Satoshi Imazato. Zirconia–hydroxyapatite composite material with micro porous structure Original Research Article; *Dental Materials*, Volume 27, Issue 11, November 2011, Pages e205-e212
- 79.** S. Joschek, B. Nies, R. Krotz, A. Göpferich. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone Original Research Article;; *Biomaterials*, Volume 21, Issue 16, August 2000, Pages 1645-1658
- 80.** William C. Clem, Shafiul Chowdhury, Shane A. Catledge, Jeffrey J. Weimer, Faheem M. Shaikh, Kristin M. Hennessy, Valery V. Konovalov, Michael R. Hill, Alfred Waterfeld, Susan L. Bellis, Yogesh K. Vohra. Mesenchymal stem cell interaction with ultra-smooth nanostructured diamond for wear-resistant orthopaedic implants Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 29, Issues 24–25, August–September 2008, Pages 3461-3468
- 81.** Christine J. Frandsen, Karla S. Brammer, Kunbae Noh, Laura S. Connelly, Seunghan Oh, Li-Han Chen, Sungho Jin. Zirconium oxide nanotube surface prompts increased osteoblast functionality and mineralization ; Original Research Article; *Materials Science and Engineering: C*, Volume 31, Issue 8, 1 December 2011, Pages 1716-1722
- 82.** Masaki Uchida, Hyun-Min Kim, Fumiaki Miyaji, Tadashi Kokubo, Takashi Nakamura. Apatite formation on zirconium metal treated with aqueous NaOH Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 23, Issue 1, January 2002, Pages 313-317
- 83.** Han-Cheol Choe, Won-Gi Kim, Yong-Hoon Jeong. Surface characteristics of HA coated Ti-30Ta-xZr and Ti-30Nb-xZr alloys after nanotube formation Original Research Article; *Surface and Coatings Technology*, Volume 205, Supplement 1, 25 December 2010, Pages S305-S311
- 84.** The response of bone to nanocrystalline hydroxyapatite-coated Ti13Nb11Zr alloy in an animal model Original Research Article; *Biomaterials*, Volume 29, Issue 11, April 2008, Pages 1730-1736; Adriana Bigi, Milena Fini, Barbara Bracci, Elisa Boanini, Paola Torricelli, Gianluca Giavaresi, Nicolò N. Aldini, Alessandro Facchini, Fausto Sbaiz, Roberto Giardino
- 85.** Ricardo M. Souto, María M. Laz, Rui L. Reis. Degradation characteristics of hydroxyapatite coatings on orthopaedic TiAlV in simulated physiological media

- investigated by electrochemical impedance spectroscopy Original Research Article; Biomaterials, Volume 24, Issue 23, October 2003, Pages 4213-4221
86. S. Joschek, B. Nies, R. Krotz, A. Göpferich. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone Original Research Article; Biomaterials, Volume 21, Issue 16, August 2000, Pages 1645-1658
87. Toshihiro Kasuga, Masayuki Nogami, Mitsuo Niinomi, Tomokazu Hattori. Bioactive calcium phosphate invert glass-ceramic coating on  $\beta$ -type Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy Original Research Article; Biomaterials, Volume 24, Issue 2, January 2003, Pages 283-290
88. K.A Khor, L Fu, V.J.P Lim, P Cheang. The effects of ZrO<sub>2</sub> on the phase compositions of plasma sprayed HA/YSZ composite coatings Original Research Article; Materials Science and Engineering: A, Volume 276, Issues 1-2, 15 January 2000, Pages 160-166
89. M.J Dalby, L Di Silvio, E.J Harper, W Bonfield. Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly(methylmethacrylate) cement Original Research Article; Biomaterials, Volume 22, Issue 13, July 2001, Pages 1739-1747
90. Xuanyong Liu, Anping Huang, Chuanxian Ding, Paul K. Chu. Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO<sub>2</sub>) films fabricated by cathodic arc deposition Original Research Article; Biomaterials, Volume 27, Issue 21, July 2006, Pages 3904-3911
91. Han-Cheol Choe, Won-Gi Kim, Yong-Hoon Jeong. Surface characteristics of HA coated Ti-30Ta-xZr and Ti-30Nb-xZr alloys after nanotube formation Original Research Article; Surface and Coatings Technology, Volume 205, Supplement 1, 25 December 2010, Pages S305-S311
92. Takahiro Suzuki, Ryo Ohashi, Yoshiyuki Yokogawa, Kaori Nishizawa, Fukue Nagata, Yukari Kawamoto, Tetsuya Kameyama, Motohiro Toriyama. Initial anchoring and proliferation of fibroblast L-929 cells on unstable surface of calcium phosphate ceramics Original Research Article; Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 87, Issue 3, 1999, Pages 320-327
93. R. Zimmerman, I. Gürhan, C. Muntele, D. Ila, M. Rodrigues, F. Özdal-Kurt, B.H. Sen. Enhanced biocompatibility of GPC by ion implantation and deposition Original Research Article; Surface and Coatings Technology, Volume 201, Issues 19-20, 5 August 2007, Pages 8020-8023
94. T. Hanawa, K. Asami, K. Asaoka. Microdissolution of calcium ions from calcium-ion-implanted titanium Original Research Article; Corrosion Science, Volume 38, Issue 9, September 1996, Pages 1579-1594
95. Xiaobo Chen, Yuncang Li, Peter D. Hodgson, Cuie Wen. In vitro behavior of human osteoblast-like cells (SaOS2) cultured on surface modified titanium and titanium-zirconium alloy Original Research Article; Materials Science and Engineering: C, Volume 31, Issue 7, 10 October 2011, Pages 1545-1552
96. Masaya Iwaki, Katsuo Takahashi, Toshiharu Hayakawa, Makoto Yuasa, Isao Sekine, Jun T. Surface modification of iron and steel by zirconium or yttrium ion implantation

- and their electrochemical properties Original Research Article; Surface and Coatings Technology, Volume 51, Issues 1–3, 15 April 1992, Pages 1-5
- 97.** The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes; Biomaterials, Volume 31, Issue 8, March 2010, Pages 2055-206
- 98.** Lan Zhang, Yong Han. Enhanced bioactivity of self-organized ZrO<sub>2</sub> nanotube layer by annealing and UV irradiation Original Research Article; Materials Science and Engineering: C, Volume 31, Issue 5, 20 July 2011, Pages 1104-1110
- 99.** Wael Att, Masato Takeuchi, Takeo Suzuki, Katsutoshi Kubo, Masakazu Anpo, Takahiro Ogawa. Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia Original Research Article; Biomaterials, Volume 30, Issue 7, March 2009, Pages 1273-1280
- 100.** Amparo M. Gallardo-Moreno, Miguel A. Pacha-Olivenza, Laura Saldaña, Ciro Pérez-Giraldo, José M. Bruque, Nuria Vilaboa, M. Luisa González-Martín. In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation Original Research Article; Acta Biomaterialia, Volume 5, Issue 1, January 2009, Pages 181-192
- 101.** Steinemann S. Titanium-the material of choice? Periodontology 2000 1998; 17:7–21
- 102.** Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. J Dent Res 2004; 83:529–33
- 103.** Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, et al. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. J Biomed Mater Res A 2005; 74:49–58
- 104.** Bagno A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. J Mater Sci Mater Med 2004; 15:935–49
- 105.** Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L, et al. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. Biomaterials 2003; 24:1583–94
- 106.** Carlsson L, Albrektsson T, Berman C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1989; 4:199–204
- 107.** Wennerberg A, Bolind P, Albrektsson T. Glow discharge pre-treated implants combined with temporary bone ischaemia. Swed Dent J 1991; 15:95–101
- 108.** Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. J Biomed Mater Res 1998; 40:1–11
- 109.** Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Danelli S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. Clin Oral Implants Res 1998; 9:11–9

110. Wennerberg A, Albrektsson T, Albrektsson B, Krol JJ. Histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implant Res* 1996;6:24–30
111. Becker W, Becker BE, Ricci A, Bahat O, Rosenberg E, Rose LF, et al. A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2:159–65
112. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants—past and future, 1966–2042. *J Can Dent Assoc* 2005; 71:327
113. Hansson S, Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model. *J Biomech* 1999; 32:829–36
114. Conner K, Sabatini R, Mealey B, Takacks V, Mills M, Cochran D. Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched and hydroxyapatite-coated implants in the canine model. *J Periodontol* 2003; 74:658–68
115. Esposito M, Coulthard P, Thomsen P, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 25:CD003815
116. Brett PM, Harle J, Salih V, Mihoc R, Olsen I, Jones FH, et al. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 2004; 35:124–33
117. Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002; 60:529–40
118. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 2004; 178:13–22
119. Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen HY, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Implants Res* 1999; 10: 212–8
120. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 2005; 36:745–57
121. Josse S, Faucheux C, Soueidan A, Grimandi G, Massiot D, Alonso B, et al. Chemically modified calcium phosphates as novel materials for bisphosphonate delivery. *Adv Mater* 2004; 16:1423–7
122. Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005; 36:52–60
123. De Groot K, Wolke JG, Jansen JA. Calcium phosphate coatings for medical implants. *Proc Inst Mech Eng* 1998; 212:137–47
124. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14:195–200

- 125.** Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003; 67:932–49
- 126.** Morris HF, Ochi S, Spray JR, Olson JW. Periodontal-type measurements associated with hydroxyapatite-coated and non-HA-coated implants: uncovering to 36 months. *Ann Periodontol* 2000; 5:56–67
- 127.** Barrere F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RA, de Groot K, Layrolle P. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J Biomed Mater Res* 2003; 67:655–65
- 128.** Geurs NC, Jeffcoat RL, McGlumphy EA, Reddy MS, Jeffcoat MK. Influence of implant geometry and surface characteristics on progressive osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:811–5
- 129.** Filiaggi MJ, Coombs NA, Pilliar RM. Characterization of the interface in the plasma-sprayed HA coating/Ti-Al6-4V implant system. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:1211–30
- 130.** Radin S, Ducheyne P. Plasma spraying induced changes of calcium phosphate ceramic characteristics and the effect on in vitro stability. *Mater Med* 1992; 3:33–42
- 131.** De Groot K, Wolke JCG, Jansen JA. State of the art: hydroxylapatite coatings for dental implants. *J Oral Implant* 1994; 20:232–4
- 132.** LeGeros RZ, LeGeros JP, Kim Y, Kijkowska R, Zheng R, Bautista C, et al. Calcium phosphates in plasma-sprayed HA coatings. *Ceram Trans* 1995; 48:173–89
- 133.** Wheeler S. Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated cylinder implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11:340–50
- 134.** Tinsley D, Watson C, Russell J. A comparison of hydroxyapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clin Oral Implant Res* 2001; 12:159–66
- 135.** Briois P. thèse « Synthèse par pulvérisation cathodique et caractérisation d'électrolytes solides en couches minces pour pile à combustible à oxydes solides SSOFC) fonctionnant à température intermédiaire
- 136.** Cai Z, Nakajima H, Woldu M, Berglund A, Bergman M, Okabe T. In vitro corrosion resistance of titanium made using different fabrication methods. *Biomaterials* 20 (2): 183-90, 1999
- 137.** Zinelis S. Effect of pressure of helium, argon, krypton, and xenon on the porosity, microstructure, and mechanical properties of commercially pure titanium castings. *J Prosthet Dent* 84 (5): 575-82, 2000
- 138.** Ohkubo C, Watanabe I, Ford JP, Nakajima H, Hosoi T, Okabe T. The machinability of cast titanium and Ti-6Al-4V. *Biomaterials* 21 (4): 421-8, 2000
- 139.** Sunnerkrantz PA, Syverud M, Hero H. Effect of casting atmosphere on the quality of Ticrowns. *Scand J Dent Res* 98 (3): 268-72, 1990

140. Wang RR, Fenton A. Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence Int* 27 (6): 401-8, 1996
141. Akagawa Y, Abe Y. Titanium: the ultimate solution or an evolutionary step? *Int J Prosthodont* 16 Suppl.: 28-9; discussion 47-51, 2003
142. Meyer JM. Le Titane en dentisterie : quel developpement jusqu'a ce jour. *J. Biomat. Dent.* 8: 5-30, 1993
143. Cai Z, Bunce N, Nunn ME, Okabe T. Porcelain adherence to dental cast CP titanium: effects of surface modifications. *Biomaterials* 22 (9): 979-86, 2001
144. Sadeq A, Cai Z, Woody RD, Miller AW. Effects of interfacial variables on ceramic adherence to cast and machined commercially pure titanium. *J Prosthet Dent* 90 (1): 10-7, 2003
145. Troia MG, Jr., Henriques GE, Nobilo MA, Mesquita MF. The effect of thermal cycling on the bond strength of low-fusing porcelain to commercially pure titanium and titaniumaluminium- vanadium alloy. *Dent Mater* 19 (8): 790-6, 2003
146. Chevalier J, Gremillard L, Virkar AV, Clarke DR. 2009. The Tetragonal-Monoclinic Transformation in Zirconia: Lessons Learned and Future Trends, *J. Am. Ceram. Soc.*, to be published
147. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dentan implantology , *Journal of Biomaterials Reasearch Part B*, 2007
148. Vagkopoulou T, Zirconia in dentistry, Part I: Discovering the nature of an upcoming bioceramic , *European Journal of Esthetic Dentistry, Fribourg*, vol. 4, 2009
149. State of the art of zirconia for dental applications, *Dental Mater*, vol. 24, 2008
150. Koutayas SO, Zirconia in dentistry: Part2. Evidence-based clinical breakthrough, *European Journal of Esthetic Dentistry, Fribourg*, vol. 4, 2009
151. Collagen fiber orientation around machined titanium and zirconia dental implant necks: an animal study, *Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, vol. 24, 2009
152. Scarano A., Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study , *Journal of Periodontology*, vol. 75, 2004
153. Benhamou A., Les implants à émergence zircone, incidences esthétiques et parodontales, dans *Médecine et Culture*, 2004
154. Dan Gutknecht, Élaboration et caractérisation de micro- et nano-composites alumine-zircone pour application orthopédique, dans *Thèse de doctorat, INSA Lyon*, 2006
155. Marzouk J., Two applications of transmucosal milled ceramic in implantology: Preliminary clinical examples, *Quintessence International*, vol. 27, 1996
156. Bianchi A.E., In vitro and in vivo follow up of titanium transmucosal implants with a zirconia collar, *Journal of Applied Biomechanics*, vol. 2, 2004

- 157.** Alain Billard, Frédéric Perry. Pulvérisation cathodique magnétron, Techniques de l'ingénieur. Matériaux métalliques ISSN 1762-8733,2005, vol. MD3, noM1654
- 158.** Wolfgang Hoffelner. Materials for Nuclear Plants: From Safe Design to Residual Life Assessments, p.113
- 159.** Gérard BÉRANGER, Jérôme FAVERGEON, Gérard MOULIN. Zircône - Céramique fonctionnelle, Ed. Techniques Ingénieur, Réf. N3210, 10 oct. 2008.

**ANNEXES**

**ANNEXE 1****Planning prévisionnel du projet biocompatibilité****Phase 1 : Préparer un stock de cellules**

Semaine 1					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Préparation de 1 litre de milieu de culture	Réception du cryotube, décongélation et mise en culture	Changement de milieu observation	observation	Repiquage 1/5 observation comptage et congélation de 4 tubes lot 1
Durée prévue	4 heures	4 heures	1 heure	1 heure	4 heures

Semaine 2					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Repiquage 1/5 observation comptage et congélation de 4 tubes lot 2	Changement de milieu et observation	observation	Repiquage 1/5 observation comptage et congélation de 4 tubes lot 3	Changement de milieu et observation
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	4 heures	1 heure

Semaine 3					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Repiquage 1/5 observation comptage et congélation de 4 tubes lot 4	Observation et comptage du flacon Ø	Décongélation d'un tube du lot 3 mise en culture et observation changement de milieu du flacon Ø	Changement de milieu et observation du flacon lot 3	Changement de milieu et observation flacon lot 3 jeter flacon Ø si lot 3 correct
Durée prévue	4 heures	1 heure	4 heures	1 heure	1 heure

### Phase 2 : Se familiariser avec la souche Balb/3T3

Semaine 4					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Repiquage au 1/6 et préparation de 5 flacons notés de 1 à 6	Comptage du flacon 1	Changement de milieu des flacons 3-4-5-6 et comptage du flacon 2	Comptage du flacon 3	Comptage du flacon 4 et changement de milieu du flacon 5 et 6
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	1 heure	1 heure

Semaine 5					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Comptage du flacon 5  Repiquage au 1/5 du flacon 6 et préparer 5 flacons	Tracer la courbe de croissance et du taux de mortalité  Comptage flacon 6.1	Comptage flacon 6.2	Comptage flacon 6.3	Comptage flacon 6.4
Durée prévue	1 heure	1 heure	4 heures	1 heure	1 heure

Semaine 6					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Comptage flacon 6.5 tracer la courbe de croissance et de mortalité et comparer avec la précédente		Préparation de 1 litre de milieu de culture	Décongélation d'un tube de lot 2 mise en culture et observation	Changement de milieu et observation
Durée prévue	1 heure		4 heures	4 heures	1 heure

**Phase 3 : Tester le protocole biocompatibilité**

Semaine 7					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	observation	Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	4 heures	1 heure

Semaine 8					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	Observation stérilisation des échantillons	Observation	Début du test à 12 heures préparation de la suspension cellulaire comptage préparation des plaques 24 puits avec les échantillons
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	8 heures	8 heures

Semaine 9					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	A 12 heures faire le test MTT	Analyse des résultats	Correction des erreurs	Décongélation d'un tube du lot 2 mise en culture et observation	Changement de milieu et observation
Durée prévue	6 heures	4 heures	4 heures	4 heures	1 heure

#### Phase 4 : test de biocompatibilité

##### Premier essai

Semaine 10					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Premier passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	observation	Deuxièmes passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	4 heures	1 heure

Semaine 11					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Troisième passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	Observation stérilisation des échantillons	Observation	Début du test à 12 heures préparation de la suspension cellulaire comptage préparation des plaques 24 puits avec les échantillons
Durée prévue	4 heures	1 heures	1 heure	1 heure	4 heures

Semaine 12					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	A 12 heures faire le test MTT	Analyse des résultats			
Durée prévue	4 heures	4 heures			

**Deuxième essai**

Semaine 13					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues				Décongélation d'un tube du lot 2 mise en culture et observation	Changement de milieu et observation
Durée prévue				4 heures	1 heure

Semaine 14					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Premier passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	observation	Deuxième passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	4 heures	1 heure

Semaine 15					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Troisième passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	Observation stérilisation des échantillons	Observation	Début du test à 12 heures préparation de la suspension cellulaire comptage préparation des plaques 24 puits avec les échantillons
Durée prévue	4 heures	1 heures	1 heure	1 heure	4 heures

Semaine 16					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	A 12 heures faire le test MTT	Analyse des résultats			
Durée prévue	4 heures	4 heures			

**Troisième essai**

Semaine 17					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues				Décongélation d'un tube du lot 2 mise en culture et observation	Changement de milieu et observation
Durée prévue				4 heures	1 heure

Semaine 18					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Premier passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	observation	Deuxième passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation
Durée prévue	4 heures	1 heure	1 heure	4 heures	1 heure

Semaine 19					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	Troisième passage Repiquage au 1/3 comptage	Changement de milieu et observation	Observation et stérilisation des échantillons	Observation	Début du test à 12 heures préparation de la suspension cellulaire comptage préparation des plaques 24 puits avec les échantillons
Durée prévue	4 heures	1 heures	1 heure	1 heure	4 heures

Semaine 20					
Jours	Lundi	Mardi	Mercredi	jeudi	vendredi
Manipulations prévues	A 12 heures faire le test MTT	Analyse des résultats			
Durée prévue	4 heures	4 heures			



**AUTORISATION DE SOUTENANCE  
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame BERTRAND Ghislaine, Professeur, CIRIMAT-ENSIACET Toulouse,**

**Monsieur STEYER Philippe, Maitre de Conférences HDR, MATEIS-INSA Lyon.**

Le Président de l'Université de Lorraine, autorise :

**Monsieur MARLOT André**

à soutenir devant un jury de l'UNIVERSITE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

**"Synthèse par pulvérisation cathodique magnétron et caractérisation de revêtements d'oxydes biocompatibles pour application aux implants dentaires en alliages de titane"**

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Intitulé du doctorat : **"Sciences des Matériaux - Science et Ingénierie des Matériaux et Métallurgie"**

  
Fait à Vandœuvre, le **15 Novembre 2012**  
Le Président de l'Université de Lorraine,  
Pierre MUTZENHARDT

*Par délégation*  
*La Vice-Présidente du CS*  
*Clotilde BOULANGER*

***Synthèse par pulvérisation cathodique magnétron et caractérisation de revêtements d'oxydes biocompatibles pour application aux implants dentaires en alliage de titane***

**RESUME**

Les procédés de dépôt en phase vapeur sont particulièrement performants pour la synthèse de revêtements à propriétés contrôlées. Plus spécifiquement, ce travail de recherche porte sur l'élaboration de revêtements biocompatibles, sur alliage titane TiAl6V4, obtenus par pulvérisation magnétron en conditions réactives. Dans un premier temps, nous avons décrit les procédés de mise en forme des implants commerciaux pour pouvoir les reproduire au niveau du laboratoire. Dans un second, nous avons focalisé notre étude sur l'effet de la structure cristallographique de films de zircone sur leur caractère biocompatible à partir de cultures cellulaires de fibroblastes. Les résultats ainsi obtenus démontrent très nettement des différences de comportement entre des films de zircone monoclinique, quadratique ou cubique. Dans l'objectif d'apporter des éléments d'information permettant de discuter de ces effets, d'autres séries de revêtements céramiques ont été élaborées comme par exemple des oxydes de titane ou de zirconium amorphes, de l'oxyde d'yttrium, de l'oxyde d'aluminium ou encore du carbone amorphe. Les cultures cellulaires pratiquées sur ces échantillons ont permis de démontrer le caractère biocompatible de l'oxyde d'yttrium excluant ainsi tout effet nocif de cet élément dans les zircons dopés.

**Mots clés :** pulvérisation réactive, TA6V, oxyde de zirconium, biocompatibilité.

***Synthesis by magnetron sputtering and characterization of biocompatible oxide coatings for application to dental implants made of titanium alloy***

**ABSTRACT**

The vapor deposition processes are particularly successful for the synthesis of coatings with tuneable properties. More specifically, this research deals with the development of biocompatible coatings on titanium alloys TA6V obtained by magnetron sputtering in reactive conditions. At first, we described the processes to design the commercial medical implants to be able to reproduce them within the laboratory. In the second, we focused our study on the effect of the crystallographic structure of zirconia-based coatings on their biocompatible character from cell cultures of fibroblasts. The results obtained demonstrate a significant variation of cell behavior for the three the zirconia structures: monoclinic, tetragonal or cubic.

In the purpose to bring relevant information that allow discussing these effects, another series of ceramic coatings were developed as for instance amorphous oxides of titanium or zirconium, yttrium oxide, aluminum oxide or amorphous carbon. The cell response on these samples demonstrates to the biocompatible properties of the yttrium oxide, excluding any harmful effect of this element in the doped zirconia.

**Keywords:** reactive sputtering, TA6V, zirconia, biocompatibility.