UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE –ARDENNE UFR Sciences Exactes et Naturelles

THESE

PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

En SCIENCES, SPECIALITE : MECANIQUE ET MATERIAUX

Par

Abdelilah BENMAROUANE

Sujet

Caractérisation de la régénération osseuse après implantation par diffraction de neutrons et de rayonnement synchrotron

Soutenue le 6 octobre 2005 devant le jury :

MM.

D. CHATEIGNER, Professeur, Université de Caen	Rapporteur
J. LU, Professeur, Université de Technologie de Troyes	Rapporteur
C.H. de NOVION, Docteur, Laboratoire Léon Brillouin, Saclay	Président
A. LODINI, Professeur, Université de Reims	Directeur de thèse
T. HANSEN, Docteur, Institut Laue Langevin, Grenoble	Examinateur
P. MILLET, Professeur, Université de Reims	Examinateur
R. TAIAR, Maître de conférences, Université de Reims	Examinateur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire d'Analyse des contraintes Mécaniques (LACM) de l'université de Reims Champagne-Ardenne en collaboration avec l'Institut Max von Laue-Paul Langevin (ILL) à Grenoble.

Je tiens à remercier Monsieur Christian VETTIER, directeur de la division science, et Alan HEWAT, Chef du groupe diffraction, de m'avoir accueilli au sein de l'ILL pendant 3 ans.

J'exprime ma plus grande reconnaissance envers mon directeur de thèse Monsieur le Professeur Alain LODINI, directeur du laboratoire LACM, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche, et pour tout son dynamisme et ses compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je remercie Monsieur Thomas HANSEN, responsable de l'instrument D20 à l'ILL, pour le soutien et les précieux conseils qui m'a apporté durant tout mon séjour à l'ILL.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Daniel CHATEIGNER d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse ainsi que pour ses commentaires sur mon mémoire, je lui exprime ma profonde gratitude pour ses jugements très pertinents sur mon manuscrit, tant sur le fond que sur la forme.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Jian LU, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse ainsi pour ses commentaires.

Je remercie sincèrement Monsieur Charles DE NOVION de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury et examinateur de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Pierre MILLET mais aussi pour la relecture minutieuse de mon manuscrit, son soutien, son aide scientifique, ses nombreux et justes conseils.

Un grand merci à Monsieur Rheda TAIAR d'avoir participé dans ce travail et pour sa compétence dans le domaine de biomécanique.

2

J'exprime toute mon amitié à tout le personnel de l'ILL et je remercie tout particulièrement Monsieur Jaques TORREGROSSA, technicien de l'instrument D20, pour l'aide apportée durant toutes mes expériences sur D20, aussi pour la préparation des porteséchantillons.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à mes amis de l'ESRF Guillaume GEANDIER, post-doc sur l'instrument ID15B, et Diane EICHERT, post-doc sur ID21, qui ont participé activement à la partie expérimentale effectuée à l'ESRF.

je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à Monsieur Thilo PIRLING, responsable de l'instrument D1A, pour ses remarques pertinentes, ainsi pour la participation active aux expériences effectuées sur les instruments D1A et IN12 à l'ILL.

Merci aussi à tous mes collègues et amis de longue date qui se reconnaîtront ici. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.

3

A mes parents : Mohamed et Mina

A mes frères et sœurs: *Elaydia, Hassan, Ahmed, Noreddine, Abdelhak, Saâdia, Malika, Jawad.*

A ma famille

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	12
REFERENCES	15
Chapitre I : Caractérisation structurale de l'os cortical	17
1. Introduction	18
2. La matrice organique	18
2.1. Le collagène	19
3. La phase minérale	19
4. Structure de l'Hydroxyapatite	20
4.1. Structure cristalline de l'hydroxyapatite	20
5. Implants	23
5.1. Définition des biomatériaux	23
5.1.1. Introduction	24
5.1.2. Biocompatibilité	24
5.1.3. Ostéoconduction	25
5.2. Le choix de Ti-6Al-4V comme biomatériau	25
5.2.1. Introduction	25
5.2.2. Le titane et ses alliages	25
5.2.3. Composition	25
5.2.4. Propriétés mécaniques	26
5.2.5. Propriétés biologiques	26
5.3. Revêtement des implants par HAp	27
5.3.1. Propriétés mécaniques	27
5.3.2. Propriétés biologiques	27
5.3.3 Conclusion	27
6. Le procédé de projection plasma	28
6.1. Principe de la technique	28
6.2. Les paramètres de la torche plasma	29
7. Caractérisation structurale de la partie minérale de l'os par les	
techniques de diffraction neutrons et du rayonnement synchrotron	29
7.1. Introduction	29
7.2. Analyse structurale par diffraction	30
7.2.1. Introduction	30
7.2.2. Exploitation d'un diagramme de diffraction	30
7.2.3. Position des raies de diffraction	31

54

7.2.4. Intensités intégrées	32
7.3. Généralités sur les neutrons	33
7.3.1. Les propriétés du neutron	33
7.3.2. Production de neutrons	34
7.3.3. Description de l'Institut Laue Langevin (ILL)	34
7.3.4. L'instrument D20 à ILL	35
7.3.5. Le détecteur à localisation (PSD)	36
7.4. Etude de l'HAp dans l'os par diffraction neutronique	37
7.4.1. La cristallinité	38
7.4.1.1. Introduction	38
7.4.1.2 Détermination de l'indice de cristallinité	38
7.5. Conclusion	41
8. Etude structurale de l'os cortical par le rayonnement synchrotron	42
8.1 Rayonnement synchrotron	42
8.2 Production du rayonnement synchrotron	42
8.3 Présentation de l'European Synchrotron Radiation Facility	
(ESRF)	43
8.4 ID15B à l'ESRF	44
8-5. Étude structurale de l'os cortical par rayonnement	
synchrotron	45
8-6. Conclusion	46
9. Caractérisation physico-chimique de l'interface os-implant	46
9-1. Introduction	46
9.2 La Fluorescence X	47
9.2.1 Introduction	47
9.2.2 Le principe de la fluorescence X	47
9.2.3 ID21 à l'ESRF	48
9.2.4 Méthodes et résultats	49
9.2.5 Conclusion	52
10. Conclusions	53

Chapitre II : Méthode de caractérisation de la	
neutronique et rayonnement synchrotron à partir de l'analyse de la texture	
cristallographique	59
1. Introduction	60

REFERENCES

2. Définition de	e la texture		61

3. Mesure des figures de pôle expérimentales	64
3.1. Analyse de texture par diffraction sur poudre	64
4. Affinement des diagrammes de diffraction sur poudre	66
4.1. Profils des raies de diffraction	66
4.2. Contribution Instrumentale	66
4.3. Méthodes d'ajustement de profils	67
4.3.1. Affinement de structure par ajustement	
de Profil total	67
4.3.2. Ajustement individuel des profils	
expérimentaux en présence de texture	70
4.3.2.1. La méthode harmonique	70
4.3.2.2. Méthode de Williams-Imhof-Matthies-Vinel	
(WIMV) [Willams 1968, Imhof 1982,	
Matthies et Vinel 1982]	71
4.3.2.3. Le modèle Prolongé de WIMV : E-WIMV	72
4.3.2.4. Facteurs de force de la texture	73
4.3.2.4.1. Indice de Texture	73
4.3.2.4.2. Entropie de Texture	73
5. Le programme MAUD (Material Analysis Used Diffraction)	74
5.1. Introduction	74
5.2. Principaux dispositifs de MAUD	74
6. Caractérisation de la texture de l'os cortical par diffraction	
de neutrons	76
6.1. Introduction	76
6.2. La méthode harmonique	81
6.3. La méthode WIMV	82
6.4. La méthode E-WIMV	82
6.5. Conclusion	84
7. Caractérisation de la texture osseuse par	
rayonnement synchrotron	84
7.1. Introduction	84
7.2. Etude de la texture de l'os cortical sur ID15B	84
7.2.1. Introduction	84
7.2.2. Résultats et discussions	85
7.2.3. Conclusion	88
7.3. Conclusion générale	88

REFERENCES 90

Chapitre III : Application de la méthode de caractérisation de la texture en reconstruction osseuse

93

1. Introduction	94
2. Analyse de l'HAp comme matériau de comble	ement 95
2.1. Protocole expérimental	95
2.2. Résultats et discussions	96
2.3. Conclusion	99
3. Analyse de l'HAp comme matériau d'implan	tologie 100
3.1. Introduction	100
3.2. Protocole expérimental	100
3.3. Analyse de l'HAp sous faible charge	101
3.3.1. Matériel et méthodes	101
3.3.1.1. Les animaux	101
3.3.1.2. Le Biomatériau	101
3.3.1.3. Implantation des bior	natériaux 101
3.3.1.4. Durée d'implantation	102
3.3.1.5. Surveillance post-opé	ratoire 102
3.3.1.6. Extraction des échant	tillons 103
3.3.2. Resultats	104
3.3.5. Discussions	108
3.3.4. Conclusion 3.4. Analyse de l'HAn sous forte charge	108
3.4. Analyse de l'ITAP sous foi le charge	109
3.4.2 Implantation des énrouve	107 Ites 110
3.4.3 Résultats	110
3.4.4. Conclusion	118
3.5. Conclusion générale	110
3.6. Caractérisation de l'interface os-impl	ant
par le ravonnement synchrotron de	haute énergie 120
3.6.1. Introduction	120
3.6.2. Méthodes et résultats	120
3.6.3. Discussion	129
3.6.4. Conclusion	129
3.7. Conclusion générale	130
REFERENCES	131
Chapitre IV :	
Nouvelle méthodologie d'évaluatio	on des
déformations dans l'os cortical	
non diffusation noutronique	10.1
par untraction neutromque	134
1. Introduction	135
2. Méthode et résultats	136
3. Description de l'instrument à 3 axes	137

3.1. Principe de la mesure	137
3.2. Intérêt de l'analyseur dans la caractérisation de la structure	
osseuse en présence de la partie organique	139
3.3. Méthodes et résultats	140
3.4. Conclusion	143
REFERENCES	144

CONCLUSIONS GENERALES 145

INTRODUCTION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les biomatériaux utilisés pour implantologie ou comblement suscitent un intérêt croissant de par leur utilisation fréquente en chirurgie réparatrice ou en chirurgie orthopédique. Ils représentent une alternative aux autogreffes (prélèvements de tissu sur l'individu), aux allogreffes (prélèvement de tissu sur un individu de la même espèce vivant ou mort) et aux xénogreffes (prélèvements de tissu sur une espèce différente). Lors d'une perte osseuse, on utilise des matériaux de substitution du tissu osseux destinés à faciliter la réossification d'un défaut ne pouvant se cicatriser sans apport extérieur [1].

Le marché mondial des biomatériaux est très important et en pleine croissance. La commission européenne a évalué récemment ce marché mondial à 25 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 5 à 7 %, un tiers de ce marché mondial reviendrait à l'Europe. Le taux annuel de croissance du marché américain serait de 20%. La part orthopédique des biomatériaux est évaluée au niveau mondial à 8 milliards d'euros avec un taux annuel de croissance de 7%. Ce marché concerne pour 40% les prothèses de hanche et de genou avec au niveau mondial respectivement 750 000 et 500 000 opérations par an [2]. Si on prend par exemple le cas des prothèses de hanche, on estime à 90% le taux de réussite après dix ans chez les plus de 65 ans alors qu'une opération de révision est nécessaire chez les plus jeunes en moyenne trois ans après la pose. La durée de vie d'une prothèse orthopédique est de l'ordre de vingt ans, il est nécessaire de l'augmenter afin de suivre la croissance permanente de la durée de vie humaine [3].

Les biomatériaux implantés posent le problème de leur devenir dans l'organisme : biotolérance, biofonctionnalité. Pour mieux contrôler l'intégration et obtenir des biomatériaux qui assurent un service amélioré, en termes de qualité, la complémentarité de la recherche fondamentale et appliquée est indispensable [2].

A la croisée de multiples disciplines scientifiques (sciences des matériaux, mécanique, chimie, biologie), le domaine des biomatériaux est sujet à d'importants enjeux

12

sociaux et économiques. Le développement de nouveaux matériaux nécessite l'intervention de presque toutes les disciplines.

L'os est un matériau composite dont les constituants principaux sont le collagène et l'hydroxyapatite. Les cristaux d'apatite et les fibres de collagène sont orientés préférentiellement. Par exemple, dans les os longs, ils sont orientés dans les directions des forces auxquelles les os doivent résister [4,5]. L'os se présente sous deux principales formes structurales : os cortical, qui forme une matrice dense, et os spongieux [6,7]. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'os cortical.

A notre connaissance, il n'existe pas aujourd'hui de travaux quantitatifs *in situ* et non destructifs portant sur la reconstruction osseuse à l'interface os-implant.

Pour la réalisation de ces travaux, notre équipe a constitué un réseau de partenaires, avec des industriels pour la fabrication des biomatériaux, avec des chirurgiens pour la partie implantation et extraction des structures osseuses, ainsi qu'avec l'institut Laue Langevin (ILL) [8], à Grenoble pour toute la partie expérimentale. La confirmation des résultats obtenus a été effectuée à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) [9].

Dans le chapitre I, nous présentons les constituants de l'os, les paramètres essentiels qui permettront la sélection des biomatériaux en implantologie, ainsi que la technique de revêtement. Ensuite, la diffraction de neutrons et de rayonnement synchrotron nous permettront une caractérisation structurale de l'os. La fluorescence à haute résolution va contrôler la biocompatibilité de l'implant.

Dans le chapitre II, nous mettons en place une nouvelle méthode de caractérisation quantitative de l'os cortical par la technique de caractérisation de la texture à l'interface osimplant.

Dans le chapitre III, nous appliquons notre méthode de caractérisation de l'os reconstitué dans deux secteurs d'application des biomatériaux. Dans un premier temps, nous caractérisons des biomatériaux de comblement ou de remplacement, dans un deuxième temps nous caractérisons une interface os-implant.

13

Dans la dernière partie du travail, nous développons une nouvelle méthodologie d'analyse des contraintes par diffraction de neutrons.

En conclusion, nous évoquerons quelques perspectives d'avenir destinées à développer une nouvelle génération d'implants grâce à l'utilisation des technologies innovatrices.

REFERENCES

- A.C. DERRIEN, Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères.
 Application : cinétique de minéralisation de géopolymères et du biomatériau CaCO₃ synthétique. *Thèse, Université de Rennes, (2004)*
- [2] Y. Barbotteau, Recherche des modifications de caractéristiques dans des biomatériaux en verres bioactif par des méthodes nucléaire et physico-chimiques. Combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie. Essai de modélisation par la théorie de percolation de la résorption de biomatériaux. *Thèse, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II,(2002).*
- [3] E. Girardin, Caractérisation microstructurale et analyse des contraintes mécaniques dans les dépôts par plasma d'hydroxyapatite pour prothèses de hanche. *Thèse, Université de Reims (1997).*
- [4] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, The orientation of apatite crystals in bone. *J. Appl. Cryst.*, (1979). **12**, 99-103
- [5] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, Stress distribution in the scapula studied by neutron diffraction. *Pro. R. Soc. Lond. B*, (1979). **204**, 355-362.
- [6] R.B. Martin, Bone as a Ceramic Composite Material. *Materials Science Forum*, (1999).293, 5-16
- [7] J.M.S. Skakle and R. M. Aspden, Neutron diffraction studies of collagen in human cancellous bone. J. Appl. Cryst. (2002). 35, 506-508
- [8] Institut Laue-Langevin, www.ill.fr

[9] European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), www.esrf.fr

Chapitre I :

Caractérisation structurale de l'os cortical

Chapitre I

Caractérisation structurale de l'os cortical

1. Introduction

L'os est généralement défini comme un matériau composite [1], constitué d'un tissu conjonctif spécialisé dans lequel sont associées une phase minérale sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite et une matrice organique constituée de collagène et de protéines non collagéniques [2,3]. Le tissu osseux se présente sous deux aspects bien distincts : l'os cortical et l'os trabéculaire.

Le tissu osseux est constitué de cellules: les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes, ainsi que d'une matrice extracellulaire. Les ostéoblastes sont responsables de la production du nouveau tissu osseux [4].

La matrice extracellulaire occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22 %) et inorganique (69 %). La teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation.

2. La matrice organique

La matrice organique représente 22% de la masse osseuse et forme ce que l'on appelle l'ostéoïde ou substance préosseuse. Les principales classes de macromolécules qui la composent forment la substance fibrillaire (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) ainsi que la substance interfibrillaire (10 %) englobant les glycosaminoglycans (GAG) et protéoglycans, des petites protéines non collagéniques comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses ainsi que des lipides en petites quantités. Dans le tissu osseux, ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation.

2.1. Le collagène

Le constituant essentiel de l'ostéoïde est le collagène de type 1 qui représente un peu moins de 90 % des macromolécules de la matrice organique. Appelé aussi collagène fibrillaire, il est formé de l'assemblage de trois chaînes alpha de polypeptides. Les chaînes polypeptidiques sont synthétisées au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER) de l'ostéoblaste. Elles subissent ensuite des hydroxylations et des glycosylations avant de s'associer en hélices de 3 pro-chaînes. Ces fibrilles sont exocytées et s'accumulent d'abord en amas grossiers de fibres dans l'os embryonnaire fibreux. Par la suite, elles seront hydrolysées par les ostéoclastes pour être remplacées par des fibres plus régulières synthétisées par des ostéoblastes plus spécialisés. Ce processus conduit à la formation d'os lamellaire. Ce réseau fibreux caractéristique favorise la minéralisation par la fixation sur les fibres de collagène de cristaux d'hydroxyapatite qui confèrent sa dureté au tissu osseux. Le cytosquelette des ostéoblastes joue un rôle capital dans la disposition des fibrilles de collagène car il influence les sites et la vitesse d'assemblage des fibrilles. En outre, les ostéoblastes exercent une tension sur la matrice.

Par exemple, dans l'os lamellaire, les fibrilles seront organisées en feuillets où elles sont parallèles entre elles mais perpendiculaires aux fibrilles des plans directement adjacents. C'est l'orientation des fibrilles de collagène qui confère à l'os la capacité de résister aux forces de tension.

3. La phase minérale

En 1771, Scheele nota que le phosphate de calcium était présent dans les os. La plupart des chimistes ont pensé connaître alors la structure minérale des os et de la dent. Cependant, des études de diffraction de rayons X ont montré que le constituant majoritaire des tissus minéralisés se présentait sous forme d'hydroxyapatite déposée sous forme de cristaux de structure variable et associée aux fibres de collagène [5]. L'orientation de ces cristaux est parallèle aux fibres [6].

Les constituants de l'os cortical sont présentés dans la figure 1.



L'os cortical ou compact représente 80 % de la structure osseuse. Il occupe la périphérie de la diaphyse (ou corps des os longs) limitant un canal central de forme allongée dans le sens du grand axe, la cavité médullaire. Cet os cortical est localisé à la périphérie des os plats.

L'os spongieux ou trabéculaire représente 20 % des os. Il est présent dans les extrémités des os longs (les métaphyses) et dans la partie centrale des os courts. Il forme un système de lamelles osseuses irrégulières, les trabécules. On admet que les vertèbres sont constituées de 50 % d'os trabéculaire et 50 % d'os cortical. Cette proportion passe à 30 % d'os trabéculaire et 70% d'os cortical au niveau du col du fémur.

L'os trabéculaire, bien que moins abondant se renouvelle environ 5 fois plus rapidement que l'os cortical, c'est pour cette raison que l'ostéoporose se manifeste cliniquement dans des sites où il existe une proportion importante d'os trabéculaire (rachis, os de la hanche et de l'avant-bras). Le tissu osseux se répartit en phase minérale (60 %), matrice osseuse organique (35 %) et en cellules spécifiques de l'os (5 %).

4. Structure de l'Hydroxyapatite4-1. Structure cristalline de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HAp) fait partie des apatites qui constituent le minéral phosphaté le plus abondant sur terre. Les apatites existent principalement sous la forme de

fluoroapatite ou de carbonate apatite. Tous les phosphates de calcium évoluent en milieu naturel vers la forme apatitique, la plus stable. Parmi les matrices de confinement actuellement développées, les apatites présentent un réel intérêt, étant donné leurs données structurales et physico-chimiques.

Les apatites sont des minéraux de formule générale :

$Me_{10}(XO_4)_6Y_2$

où Me est un métal (Ca, Sr, Pb, Ba, etc.)

XO₄ est un anion trivalent (PO₄ SO₄, VO₄, etc.)

Y peut être, par exemple, un ion Cl^- , OH^- ou F^- . On parle alors de chlorapatite, d'HAp ou de fluoroapatite [7,8].

Les apatites cristallisent dans le système hexagonal, avec le groupe d'espace P63/m. La maille primitive de l'apatite est un hexaèdre de côtés a, b et c tels que a et b soient égaux, mais différents de c. les angles α et β sont égaux à 90° et γ (angle entre \vec{a} et \vec{b})est égal à 120°.

La structure cristallographique de l'HAp est connue depuis longtemps. Ses paramètres de maille sont a= 9,42Å et c= 6,88Å. La maille élémentaire est constituée de groupements Ca, PO₄ et OH.

L'HAp a pour formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ et son rapport Ca/P est de 1,67.

La notation générale des plans cristallins d'un système hexagonal comme l'HAp est présentée par quatre chiffres : (h,k,h+k,l), l'écriture peut se simplifier en utilisant seulement les trois chiffres (h,k,l).



Figure 2 : Maille élémentaire de l'hydroxyapatite



Figure 3 : Projection sur le plan de la structure de l'hydroxyapatite



Les positions des atomes d'HAp cristallisé de l'os cortical sont présentées dans le tableau 1.

atome	quantité	Taux d'occupation	Х	У	Z
O ₁	6	1	0.3205	0.48643	0.25
O ₂	6	1	0.52117	0.11085	0.25
O ₃	12	1	0.33745	0.259	0.07979
O_4	2	1	0	0	0.25
Р	6	1	0.62716	0.0279	0.25
Ca ₁	6	1	0.01	0.25334	0.25
Ca ₂	6	1	0.01	0.25334	0.25
Н	2	0.5	0	0	0.11087

Tableau 1 : Cordonnées des atomes d'HAp

5. Implants

L'utilisation d'implants métalliques est devenue courante à partir des années 1930. Avec le perfectionnement de la technologie, certains métaux sont utilisés dans le domaine médical. Pour qu'une implantation à long terme soit un succès thérapeutique, il est nécessaire que l'implant soit biocompatible, résistant mécaniquement, résistant à la corrosion, résistant à la charge et aux fractures. En considérant les qualités requises pour les applications médicales, ce sont les prothèses en acier inoxydable, en alliage de cobalt, en titane pur ou alliage de titane qui sont les plus utilisées.

5.1. Définition des biomatériaux5.1.1. Introduction

Le terme biomatériau désigne les matériaux fabriqués par l'homme qui sont utilisés pour réaliser des prothèses ou autres dispositifs médicaux implantables dans le corps humain. Il existe de nombreuses définitions de ces matériaux, retenons celle qui a été proposée lors du congrès de la société européenne des biomatériaux en 1986 à Chester : « BIOMATERIAUX : matériaux non vivants conçus et utilisés dans un dispositif médical destiné à interagir avec les systèmes biologiques » [9,10]. L'intérêt croissant pour ces matériaux s'explique par le vieillissement régulier de la population, la fréquence des accidents de travail ou du trafic dans une société où la qualité de vie est un critère dominant. Les interventions orthopédiques thérapeutiques (traitement de tumeurs, de kystes par exemple) limitent la réparation osseuse naturelle. Pour des défauts osseux de taille importante, l'utilisation de matériaux de remplacement s'avère nécessaire. Ils doivent répondre aux critères fonctionnels de la partie qu'ils suppléent sans induire de rejets.

Les matériaux utilisés comme biomatériaux doivent satisfaire à un ensemble de critères comme la biocompatibilité et l'ostéoconduction.

5.1.2 Biocompatibilité

La première condition pour qu'un matériau soit implanté dans le corps humain est qu'il soit biocompatible. Selon une définition très générale, un matériau est biocompatible s'il ne provoque aucune réaction défavorable des tissus. En fait, il s'avère qu'aucun matériau étranger n'est totalement compatible avec le milieu humain dans lequel il se trouve : on dit alors qu'un matériau est biocompatible s'il n'entraîne aucune réaction inflammatoire, ni de toxicité, ni risque carcinologique, ni réaction allergique. De plus, il est demandé aux biomatériaux de résister à toute contrainte physiologique sans changer de morphologie. Pour qu'un implant soit permanent, il doit résister à toute attaque corrosive du milieu physiologique constitué d'une solution aqueuse de NaCl contenant des acides organiques, des protéines, des enzymes.

5.1.3. Ostéoconduction

Processus dans lequel un squelette (matrice) est fourni pour permettre la migration des cellules impliquées dans la formation osseuse (cellules mésenchymateuses, ostéoblastes, ostéoclastes et vaisseaux sanguins). L'os implanté sert de réseau structurel pour la croissance osseuse.

5.2. Le choix de Ti-6Al-4V comme biomatériau5.2.1. Introduction

L'utilisation des métaux et alliages a été découverte depuis longtemps pour des applications biomédicales. Ainsi, un implant dentaire en fer forgé fut découvert sur un jeune homme qui vivait à l'époque galloromaine. De nos jours, le développement des biomatériaux métalliques permet leur utilisation dans plusieurs domaines, principalement en orthopédie (clous, vis, plaques, articulations), en stomatologie (prothèses, implant) et dans les instruments de chirurgie [2].

Le matériau le plus utilisé est le titane et ses alliages [11,12,13,14], nous allons présenter sa composition ainsi que ses propriétés : biologiques et mécaniques.

5.2.2. Le titane et ses alliages

Le titane est un métal abondant sur la terre, c'est le quatrième élément métallique le plus abondant après le fer, l'aluminium et le magnésium. Le titane et ses alliages sont utilisés dans les secteurs aussi distincts que l'aéronautique, la chimie et le biomédical.

Les originalités du titane reposent d'une part sur sa structure cristalline, et d'autre part sur ses propriétés mécaniques, sa résistance à la corrosion et sa biocompatibilité.

Le titane est devenu très répandu dans l'orthopédie, en particulier comme implant en orthodontie.

5.2.3. Composition

Le titane pur compte plus de 99% de titane, les 1% restant sont de l'oxygène, du carbone, de l'azote, de l'hydrogène.

Le titane sous forme d'alliages présente à température ambiante une structure cristalline de type hexagonale compacte, appelée phase α jusque 882°C, dont les paramètres sont : a_{α} =2.9508 Å et c_{α} =4.6855 Å, ces valeurs conduisent à un rapport c_{α}/a_{α} =1.587

25

sensiblement inférieur au rapport de compacité idéale $\left(\sqrt[8]{3} = 1.633\right)$. Au-delà de 882°C, la phase β cristallise dans un réseau cubique centré et qui est stable de 882 à 1720°C, température de fusion. Des éléments comme l'aluminium élèvent la température de la transition entre les deux phases et favorisent par conséquent l'existence de l'alliage α (élément alphagène). D'autres éléments comme le vanadium abaissent suffisamment cette température de transition pour que l'alliage β (élément bétagène) puisse exister à température ambiante.

5.2.4. Propriétés mécaniques

B. Cofino [15] a particulièrement étudié les propriétés mécaniques du titane ainsi que le Ti-6Al-4V et a clairement établi l'intérêt de ce matériau pour des applications en implantologie.

Propriétés	Titane	Ti-6Al-4V
Résistance à la traction MPa	240	1100
Résistance au cisaillement MPa	170	760
Module d'Young	105	110
Allongement	24	10
Coefficient de Poisson	0,37	0,31
Dureté Hv	122	390

Tableau 2 : Propriétés mécaniques du titane et du Ti-6Al-4V

5.2.5. Propriétés biologiques

Le titane est un matériau très toléré par l'organisme c'est-à-dire biocompatible. Sa grande réactivité le conduit à former une couche d'oxyde en surface au contact de l'air. Cette couche varie en épaisseur en fonction du mode de préparation de la pièce et selon qu'il s'agit de titane pur ou de ses alliages.

Ti-6Al-4V répond bien aux définitions données par la société européenne des biomatériaux en 1986 à Chester. Le Ti-6Al-4V n'est pas reconnu comme corps étranger par

l'organisme grâce aux propriétés isolantes de la couche d'oxyde TiO₂ qui limite les échanges électroniques et ioniques [16].

5.3. Revêtement des implants par HAp

On a vu que la partie minérale de l'os était constitué principalement de l'hydroxyapatite (HAp). A partir des années 80, le titane et son alliage, Ti-Al-4V, ont été recouverts d'HAp pour l'utilisation en implantologie dentaire ou orthopédique, afin d'améliorer l'intégration implantaire. L'utilisation d'HAp comme surface de contact avec l'os accélère l'ancrage de l'implant dans l'os grâce à ses propriétés ostéoconductrices. C'est à dire que l'HAp favorise la reconstitution osseuse à l'interface après l'implantation.

5.3.1. Propriétés mécaniques

L'HAp a un comportement mécanique caractérisé par des résistances en traction et en flexion faibles, une bonne résistance à la compression et une mauvaise résistance aux chocs.

5.3.2. Propriétés biologiques

Beaucoup de travaux effectués sur l'hydroxyapatite ont exploré leurs propriétés biologiques et ont montré qu'il est biocompatible donc capable de former une liaison chimique forte avec l'os [17]. D'autres travaux ont montré aussi ses propriétés ostéoconductrices [18,19,20,21,22].

5.3.3. Conclusion

En implantologie, l'HAp peut être utilisée grâce à ses propriétés biologiques, en particulier pour l'ostéoconduction, mais ses propriétés mécaniques ne permettent pas de l'utiliser seule. Il est nécessaire de l'associer à un matériau biocompatible plus apte à supporter le poids du corps et bien intégré dans l'organisme, ce matériau est le titane ou ses alliages. L'utilisation de titane ou ses alliages avec un revêtement d'HAp va permettre à l'implant de combiner les propriétés mécaniques du substrat aux propriétés biologique du revêtement HAp.

6. Le procédé de projection plasma6.1. Principe de la technique

La technique de projection plasma est la plus utilisée pour le revêtement de ce type de matériau [23]. Son principe repose sur l'introduction de particules d'un matériau dans un flux de plasma. Les particules seront projetées sur une surface d'un matériau, ou substrat, préalablement préparé par un sablage. La rugosité de la surface permettra une meilleure surface de contact et un meilleur accrochage du revêtement.



Figure 4 : La torche plasma [24]

L'argon est généralement utilisable comme gaz dans la torche plasma. Il s'ionise à une température s'élevant à 10000°C en traversant l'arc électrique créé entre l'anode et la cathode pour former un plasma qui se déplace à grande vitesse. La poudre d'hydroxyapatite est injectée dans le plasma par un petit canal puis projetée sur le substrat. Les grains d'hydroxyapatite sont partiellement ou totalement fondus lors de leur passage dans le plasma et viennent heurter le substrat qui est à température ambiante. Lors de l'impact, le refroidissement rapide de l'HAp va créer une forte liaison avec le substrat qui ne chauffera pas au-delà de 450°C et conservera par conséquent ses propriétés.

Paramètres	3	5
Puissance (kW)	24	23.2
Intensité (A)	400	400
Tension (V)	60	58
Flux d'argon (l.min-1)	20	20
Flux d'azote (l.min-1)	12	12
Distance de pulverisation (mm)	150	100
Débit de poudre (g/min)	20	20

6.2. Les paramètres de la torche plasma



Tableau 3 : paramètres de torche plasma

Figure 5 : Morphologie de dépôt d'HAp

7. Caractérisation structurale de la partie minérale de l'os par les techniques de diffraction de neutrons et du rayonnement synchrotron 7.1. Introduction

Les grands instruments de l'Institut Max von Laue – Paul Langevin (ILL) et de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) à Grenoble, sont actuellement parmi les plus performants dans le monde, ils utilisent respectivement des faisceaux de neutrons et de rayonnement synchrotron. Ces deux grandes installations sont dédiées à la communauté scientifique en grande partie afin d'étudier la structure de la matière. Les instruments de ces deux instituts permettent de procéder à une caractérisation très précise en résolution spatiale d'HAp dans l'os cortical. La technique la plus adaptée est la diffraction sur poudre.

Rappelons quelques généralités sur cette technique.

7.2. Analyse structurale par diffraction7.2.1. Introduction

L'os cortical est avant tout constitué par un grand nombre de cristallites orientées préférentiellement les uns par rapport aux autres. Chaque cristallite, étant une entité monocristalline.

La préparation de l'échantillon avant l'acquisition des données est une étape nécessaire mais délicate pour l'obtention des meilleurs résultats possibles. Il doit prendre en compte trois paramètres:

➤ La statistique de comptage : elle est liée à la quantité de matière diffractante, c'est-à-dire au nombre de cristallites en position de diffraction. Pour améliorer cette statistique, il faut utiliser le plus grand volume possible de poudre.

> La taille des cristaux : afin d'éviter les problèmes de micro-absorption et d'extinction, il est nécessaire de travailler sur une structure homogène ayant des cristaux de petite taille. Pour un échantillon moyennement absorbant, on travaille en général avec des cristaux de taille inférieure ou égale à 10 µm.

➤ L'orientation des cristaux : une distribution non aléatoire des orientations des grains donne lieu à des orientations préférentielles qui se manifestent par le renforcement de certaines familles de raies de diffraction.

7.2.2. Exploitation d'un diagramme de diffraction

La diffraction de type poudre donne accès à un certain nombre d'informations fondamentales sur la structure des matériaux, bien qu'elle ne représente qu'une projection à une dimension $I = f(2\theta)$ de l'espace réciproque tridimensionnel.

7.2.3. Position des raies de diffraction

Un faisceau monochromatique incident de neutrons, de rayons X ou de rayonnement synchrotron, projeté sur un cristal est diffracté par une famille de plans cristallographiques (hkl), si la différence de marche entre les rayons réfléchis par deux plans cristallographiques parallèles est égale à un nombre entier de longueur d'onde, c'est-à-dire si l'angle θ formé par le faisceau incident et un plan cristallographique satisfait la relation de Bragg.



Figure 6 : loi de Bragg

La loi de Bragg : $n\lambda = 2d_{(hkl)}\sin\theta_{(hkl)}$ d: Distance entre deux plans cristallographiques d'une même famille θ : Angle de Bragg n : Nombre entier λ : Longueur d'onde du faisceau.

De la connaissance des angles de diffraction, on déduit ainsi les distances interréticulaires d_{hkl} . Il est alors possible de déterminer qualitativement les phases en présence par comparaison des distances inter- réticulaires calculées avec celles stockées dans les bases de données (fichiers JCPDS par exemple) si le composé est connu et répertorié et après analyse des intensités intégrées.

7.2.4. Intensités intégrées

L'intensité diffractée contient des informations essentielles sur l'arrangement structural, c'est-à-dire sur la position des atomes dans la maille et les facteurs de déplacements atomiques (isotropes ou anisotropes).

En effet, l'intensité intégrée $I_{\vec{h}}$ d'une raie de diffraction \vec{h} est proportionnelle au carré du module du facteur de structure $F_{\vec{h}}$ défini comme :

$$F_{\vec{h}} = \sum_{j=1}^{\text{maille}} f_j N_j \exp(2i\pi \vec{h}\vec{x}_j) \exp(-B_j \frac{\sin^2 \theta_{\vec{h}}}{\lambda^2})$$

Où, \vec{x}_j de coordonnées (x_j , y_j , z_j), est la position de l'atome j dans la maille. \vec{h} est un vecteur $\vec{h} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$ du réseau réciproque. N_j est le taux d'occupation de l'atome j sur le site.

 f_j est, pour les rayons X, le facteur de diffusion atomique

$$f_i = f_0(\theta) + f_i(\lambda, \theta) + i f_i(\theta)$$

 f_{j} et f_{j} sont appelés facteurs de diffusion anomaux.

Pour les neutrons, f_j est la longeur de diffusion cohérente ou longueur de Fermi (grandeur indépendante de l'angle).

Le facteur
$$D_i = \exp\left(-B_j \frac{\sin^2 \theta_{hkl}}{\lambda^2}\right) = \exp\left(-B_j \frac{1}{4d_{hkl}^2}\right)$$
 est le terme qui prend en

compte l'influence des déplacements atomiques (définis par les Bj) par rapport aux positions d'équilibre. On l'appelle aussi facteur de Debye-Waller. Dans le cas de déplacements atomiques isotropes Di prend la forme :

$$D_i = \exp\left[-8\pi^2 U_i \sin^2 \theta / \lambda^2\right]$$
 et pour des déplacements anisotropes, D_i

prend une forme plus générale qui s'écrit :

$$D_i = \exp\left[-2\pi^2 \left(u_{11}h^{*2} + \dots + u_{12}hka^*b^* + \dots\right)\right].$$

L'intensité diffractée peut s'écrire sous la forme simplifiée : $I_{\bar{h}} = Sm_{\bar{h}}L_p |F_{\bar{h}}|^2$

Où S est un facteur d'échelle commun à toutes les réflexions $hm_{\vec{h}}$ est la multiplicité de la réflexion, L_p est le facteur de Lorentz - Polarisation.

En ajustant les intensités calculées sur les intensités observées, nous affinons la structure cristallographique des composés.

7.3. Généralités sur les neutrons

7.3.1. Les propriétés du neutron

Le neutron est une particule élémentaire qui a été découverte en 1932 par James Chadwick.. Il a été utilisé pour la première fois par Clifford Shull en 1946 comme outil pour des expériences de diffusion. Cette technique s'est depuis constamment développée pour concerner tous les aspects de la matière condensée : physique, chimie, matériaux biologie. Il s'agit d'un outil tout à fait exceptionnel car le neutron possède des propriétés uniques et particulièrement adaptées pour ces études.

Le neutron possède une charge électrique nulle. De ce fait, il peut pénétrer la matière sans se faire arrêter par une barrière coulombienne. Contrairement aux rayons X, les neutrons sondent l'intérieur des échantillons avec une absorption généralement faible.

Avec une longueur d'onde associée donnée par la formule de de Broglie :

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Où h est la constante de Planck, m la masse du neutron et v sa vitesse.

Avec des neutrons thermalisés par un modérateur dont la température est 300K, leur vitesse moyenne est 2200 m/s et leur longueur d'onde moyenne de 1.8 Å, c'est-à-dire une longueur d'onde qui est du même ordre de grandeur que les distances interatomiques dans la matière condensée. Les neutrons thermiques sont donc tout à fait adaptés pour être diffractés par les atomes de la matière.

7.3.2. Production de neutrons

Pour obtenir des flux de neutrons importants permettant l'instrumentation scientifique, il existe deux méthodes :

1- l'utilisation de la fission de ²³⁵U dans des réacteurs

2- l'utilisation de la spallation par bombardement d'une cible par proton de haute énergie.

La première méthode est utilisée par l'institut ILL. La fission d'un noyau d'²³⁵U fournit en moyenne 2,5 neutrons, dont 1,5 servent à maintenir la réaction en chaîne. La limite des installations de ce type est liée à la densité de puissance et donc à la capacité de refroidissement du cœur de réacteur. Le flux maximum actuel est atteint à l'ILL avec $1.5 \ 10^{15}$ n cm⁻²s⁻¹, pour une puissance thermique de 58MW [25] qui est extraite en pompant de l'eau à travers les « nageoires » de l'élément combustible [26,27].

7.3.3. Description de l'Institut Laue Langevin (ILL)

Le nom de l'institut a été formé en associant les noms de deux grands savants allemand et français, Max Von Laue et Paul Langevin.

La construction de l'Institut et de son réacteur Haut Flux à Grenoble a été entreprise conjointement par la France et l'Allemagne. Le réacteur a divergé en août 1971 et a atteint sa pleine puissance de 57 MW en décembre de la même année. Les expériences ont commencé en 1972.



ESRF

Figure 7 : Site de l'ILL à Grenoble

L'ILL est un institut de recherche scientifique fondamentale. Il met à la disposition de la communauté scientifique des pays membres un parc de 35 instruments alimenté en parallèle par le réacteur de recherche offrant le flux de neutrons le plus élevé du monde. Une douzaine d'autres instruments, gérés par des groupes de recherche indépendants, profitent également des neutrons provenant du cœur du réacteur et distribués le long de ses nombreux guides.

Les neutrons offrent la possibilité de répondre à des questions précises touchant tous les domaines de la science de la matière [28].

7.3.4. L'instrument D20 à l'ILL

D20 est un diffractomètre sur poudre doté d'un multidétecteur, Position Sensitive Detector (PSD), fournit un flux élevé, jusqu'à 10^8 n cm⁻² s⁻¹ à la position d'échantillon et un flux moyen en haute résolution.



Figure 8 : Caractéristiques de D20

Nous avons utilisé le monochromateur en graphite pyrolytique hautement orienté (Highly Oriented Pyrolitic Graphite) (HOPG) (002) en position de réflexion avec une focalisation verticale fixe, avec une longueur d'onde de 2.4 Å à un angle de sortie de 42° .

Les collimateurs permettent la réduction de la divergence normale (27 ') du faisceau polychromatique incident (10 'ou à 20 ').

7.3.5. Le détecteur à localisation (PSD)

Le détecteur à localisation (*Position Sensitive Detector* - PSD) est courbé et porte donc souvent le surnom « banane ». Les deux parties courbées de la structure en aluminium enferment un volume de gaz de détection de 4 m de long, 15 cm de haut et de 5 cm en profondeur. Le rayon de cette zone de détection dans le plan de diffraction de l'instrument est de 1.5 m. Le détecteur couvre donc un domaine angulaire de 160° en 20 simultanément et fonctionne selon le principe d'un détecteur à chambre à gaz à micropistes (*micro-strip gas chamber* – MSGC), ce qui donne de nouvelles perspectives pour les expériences en temps réel et sur de petits échantillons. Il permet aussi des expériences stroboscopiques.

Le gaz de détection est constitué en outre de ³He, isotope avec lequel les neutrons subissent avec une grande probabilité une réaction nucléaire de capture en libérant des particules chargés, un noyau de tritium ${}^{3}T^{+}$ et un proton p⁺, avec une énergie cinétique bien définie. Ces particules chargées créent le long de leur parcours une avalanche primaire d'électrons par collisions avec les atomes du gaz de détection. Dans le champ électrique appliqué à cette chambre à gaz, les électrons migrent vers les électrodes positives (anodes) déposé en tant que micro-pistes en chrome sur un substrat de verre conducteur électronique. Proche aux anodes étroites les lignes de champ se rapprochent et le champ devient important, accélérant les électrons au point à libérer des électrons secondaires par collision avec des atomes du gaz. Les cations ainsi créés seront évacués sur les cathodes directement en parallèle à coté des anodes déposés sur le substrat. Par cette amplification gazeuse le nombre des électrons finalement collectés par l'anode devient assez important pour être électroniquement amplifié dans l'électronique en dehors de la chambre à gaz et pour être interprété à l'aide d'un discriminateur en tant que signal de comptage neutronique.
7.4. Etude de l'HAp dans l'os par diffraction neutronique

Le grand problème de l'analyse structurale par diffraction neutronique pour des échantillons d'HAp qui contiennent de l'hydrogène est le bruit de fond dû à la diffusion incohérente de l'hydrogène [29]. Ce bruit de fond masque tous les pics de diffraction. Sans l'élimination de la phase organique qui contient la majeure partie de l'hydrogène, les diagrammes de diffraction ne sont pas exploitables. Deux méthodes permettent alors de préparer les structures osseuses avant la diffraction neutronique : la première consiste à remplacer l'atome de l'hydrogène par du deutérium chimiquement équivalent, la seconde est un traitement thermique permettant de supprimer la partie organique riche en hydrogène.

On a vu que les constituants de l'os sont principalement l'HAp et le collagène. Pour avoir un diagramme de diffraction exploitable, la méthode la plus simple pour la structure osseuse, est le chauffage dans un four à 625°C. Ce traitement thermique permet d'éliminer la partie organique, et n'a pas d'influence sur l'orientation de l'HAp suivant les travaux effectués par G. Bacon et al. [30,31,32,33,34].



Figure 9 : Diagrammes de diffraction de l'os chauffé et non chauffé

La figure 9 montre qu'après traitement thermique à 625°C, le diagramme de diffraction de l'HAp de l'os devient exploitable. Ce chauffage permet de réduire le bruit de fond dans l'os cortical dans un rapport de l'ordre de 15. Il reste cependant à déterminer l'influence de ce traitement thermique sur le taux de cristallinité. Nous avons alors suivi l'évolution de l'indice de cristallinité au cours du chauffage.

7.4.1. La cristallinité7.4.1.1. Introduction

La méthode de calcul de l'indice de cristallinité consiste à déterminer l'intensité d'un pic de diffraction de l'échantillon analysé par rapport à une poudre de référence 100% cristallisé du même échantillon, mesuré dans les mêmes conditions. Comme les constituants de l'os ont une orientation préférentielle dépendant de la force appliquée, il est nécessaire de choisir un pic de diffraction peu dépendant de l'orientation de l'échantillon dans le repère du spectromètre. Les anneaux de Debye collectés sur l'instrument ID15B ainsi que les figures de pôle tracées à partir des données de l'instrument D20, présentées dans le chapitre 2, de l'HAp dans l'os, montrent bien que le seul pic de diffraction d'HAp dans l'os indépendant de l'orientation de l'échantillons est le pic (111). Nous pouvons suivre l'évolution de l'indice de cristallinité en déterminant l'intensité de ce pic (111) en fonction du temps de chauffage dans le four.

7.4.1.2. Détermination de l'indice de cristallinité

La technique de la détermination de l'indice de cristallinité est issue de la norme AFNOR S94-068 (1993) qui se base sur la diffraction d'un mélange bien déterminé de poudre d'HAp contenant de l'alumine cristallisée. Elle consiste à comparer le pic principal (210) de diffraction d'un échantillon à analyser par rapport à l'étalon dans les conditions expérimentales similaires.

Nous nous proposons pour ce travail d'analyser le pic de diffraction (111) qui est peu sensible à la texture afin de déterminer l'indice de cristallinité relatif en fonction du temps de chauffage de l'os cortical dans le four. Pour déterminer l'indice de cristallinité, une poudre d'HAp 100% cristallisée a été utilisée comme référence et a été comparée dans les mêmes conditions expérimentales a de l'os cortical prélevé sur le bœuf $(20 \times 10 \times 5 \text{ mm}^3)$.

L'indice de cristallinité relatif est alors défini par [35] :

 $cristallinité(\%) = \frac{I_{\acute{e}ch}}{I_{r\acute{e}f}} \times 100$

Avec $I_{éch}$: intensité du pic de l'échantillon étudié I_{ref} = intensité du pic de la référence

Nous avons ensuite déterminé l'évolution de l'indice de cristallinité dans l'os cortical avant le traitement thermique et après 1, 2 et 3 jours de maintien au four.



Figure 10 : Variation de la masse d'échantillon en fonction du temps de chauffage

La figure 10 montre que la masse moyenne de l'os chauffé à 625°C a été réduit de 21,5% par rapport à l'os non traité au bout d'une heure de chauffage.



Figure 11 : Diagramme de diffraction d'HAp 100% cristallisé



Figure 12 : Le diagramme complet de diffraction de l'HAp dans l'os chauffé à 625°c (3 jours)

L'indice de la cristallinité calculé pour tous les pics (111) des structures osseuses est donné dans la figure 13.



La courbe montre que l'indice de cristallinité relatif de l'os cortical ne change pratiquement pas au cours du traitement thermique. Ce résultat montre que la calcination des os à 625°C est suffisante et qu'elle ne change pas l'indice de cristallinité relatif, ce qui valide notre méthode expérimentale de préparation de l'os.

7.5. Conclusion

Nous avons pu confirmer la préparation des structures osseuses avant diffraction neutronique. La calcination des os dans le four permet d'éliminer une grande partie de l'Hydrogène, ce qui améliore significativement le rapport signal sur bruit des diagrammes de diffractions sans changer l'indice de cristallinité de l'HAp. Ce résultat va nous permettre d'étudier par diffraction neutronique la texture de l'os seul dans un premier temps, puis la texture de l'os à l'interface os-implant pour caractériser la distribution d'orientation des cristaux d'HAp dans l'os reconstruit à l'interface.

8. Etude structurale de l'os cortical par le rayonnement synchrotron

8-1. Rayonnement synchrotron

Le rayonnement synchrotron est un rayonnement X de haute énergie qui nous permet de nous affranchir de la préparation préalable de l'échantillon. Il est particulièrement intéressant de tester cette technique et de réaliser l'analyse structurale par rayonnement synchrotron afin de compléter les résultats obtenus par diffraction neutronique.

Les propriétés caractéristiques du rayonnement synchrotron sont :

- \blacktriangleright La brillance (le nombre de photons/s/mm²/mrad²/0.1%)
- Le large domaine spectral d'émission
- ➤ La structure temporelle
- ➤ La polarisation.

8.2. Production du rayonnement synchrotron

Dans un synchrotron, on accélère des électrons (ou des positrons) à une vitesse proche de celle de la lumière. Dans le cas le plus simple, ces particules suivent une orbite circulaire définie par des aimants dipolaires. Elles émettent un rayonnement électromagnétique allant de l'infrarouge jusqu'au domaine des R.X. L'émission est localisée dans un cône d'ouverture γ -1, centré sur la tangente à la trajectoire. La longueur d'onde critique d'émission, λc (en nm), définie comme la longueur d'onde seuil au-dessus de laquelle la puissance émise est égale à la moitié de la puissance totale du rayonnement, se détermine de la façon suivante :

 $\lambda c (Å) = 5,59 \text{ R/E}^3$

Où E (en GeV) est l'énergie des électrons et R (en m) le rayon de l'orbite des électrons dans un aimant dipolaire. La dépendance en énergie de λc montre que plusieurs GeV sont nécessaires aux électrons pour obtenir suffisamment de puissance dans le domaine des R.X. durs.

En pratique, on utilise un rayonnement, émis par des paquets d'électrons, où l'énergie perdue par le rayonnement est composée par des cavités radiofréquences qui permettent de maintenir un courant suffisamment important dans un anneau de stockage. Outre les aimants dipolaires, des éléments magnétiques d'insertion constitués d'une suite périodique d'aimants de polarisations alternés et disposés entre les aimants de courbure (sur les portions droites de la trajectoire des électrons), sont utilisés comme source de rayonnement. Ces éléments forcent le faisceau d'électrons à effectuer une trajectoire sinusoïdale dans le plan orbital de l'anneau [36].

8.3. Présentation de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)

L'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility ou Installation Européenne de Rayonnement Synchrotron) est la source de lumière synchrotron la plus puissante d'Europe.

Dix-huit nations exploitent ensemble les faisceaux de lumière extrêmement brillants produits par son anneau de stockage pour étudier une gamme remarquablement large de matériaux, depuis les biomolécules jusqu'aux nano-aimants, en passant par les cosmétiques de l'Egypte antique et les mousses métalliques [37].



Figure 14 : Site de l'ESRF à Grenoble

8.4. ID15B à l'ESRF

ID15B est un diffractomètre à haute énergie (88,4 keV) adapté pour étudier des matériaux polycristallins, monocristallins ou les matériaux amorphes. Son détecteur bidimensionnel, MAR345 (MAR Research, Hamburg) de type « image plate », donne une image en ligne (2300 pixels, un pixel = 0,15 mm). L'image est constituée des anneaux de Debye.



Figure 15 : Configuration de la ligne ID15



Figure 16 : L'instrument ID15B

8-5. Étude structurale de l'os cortical par rayonnement synchrotron

Pour cette étude, nous avons utilisé de l'os cortical bovin. Le premier échantillon n'a subi aucun traitement thermique dans le four et le second échantillon d'os est chauffé à 625°C pendant 3 jours.

La taille de faisceau est $350 \times 350 \mu m^2$, la longueur d'onde est 0,12Å et le temps d'acquisition pour chaque image est 2 minutes (40s d'exposition + 80s de lecture de la plaque image)

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures suivantes :





Figure 18 : Os bovin chauffé à 625°C

Nous constatons clairement que la technique utilisant le rayonnement synchrotron permet d'obtenir un diagramme de diffraction exploitable sur l'os cortical sans chauffage. Nous observons une meilleure résolution après chauffage avec un bruit de fond très faible.

8.6. Conclusion

La technique utilisant le rayonnement synchrotron permet d'étudier la structure de l'HAp dans l'os cortical sans être obligé d'éliminer la partie organique. Après chauffage, nous obtenons des pics de diffraction bien résolus en 2 minutes seulement.

9. Caractérisation physico-chimique de l'interface os-implant 9.1. Introduction

L'étude par la fluorescence X utilisant les rayonnements intenses de synchrotron équipé d'éléments de focalisation, permet d'avoir des informations physico-chimiques de l'interface os-implant. Nous proposons d'utiliser cette méthode avec une résolution de 1 µm afin de connaître exactement la répartition de chaque élément principaux dans l'os ainsi que dans l'implant [38,39,40,41,42,43]

Notre but est de tracer une cartographie de composés minéraux de l'os particulièrement le calcium et le phosphore près de l'interface récemment reconstitué. Nous devons également pouvoir être en mesure d'observer la diffusion éventuelle du titane à l'intérieur de l'os (échange ionique) et avoir accès à l'état chimique du composé de titane à l'interface os-implant.

Cette étude nous permet d'obtenir quelques informations sur la biocompatibilité et le biorésorbabilité de l'implant.

9-2. La Fluorescence X

9.2.1. Introduction

La fluorescence X est une technique d'analyse multi-élémentaire rapide, non destructive. Le perfectionnement continu des spectromètres a permis aujourd'hui d'améliorer la résolution.

9.2.2. Le principe de la fluorescence X

Quand le rayonnement incident possède au moins l'énergie nécessaire à l'éjection d'un électron d'un niveau K ou L d'un des éléments présents dans l'échantillon, un rayonnement de fluorescence X est émis, dont la longueur d'onde λ ' est supérieure à celle du rayonnement incident. Le caractère perturbant de ce rayonnement est très variable suivant la composition de l'échantillon, le type du montage et les caractéristiques du système de détection. La quantité à retrancher de l'intensité produite par l'échantillon $I_{ech}(s)$ s'écrit en fait $\alpha A'(s).I_{fluo}$

Où :

- \succ I_{fluo} est l'intensité indépendante de *s* émise par l'échantillon irradié,
- > α est le taux de fluorescence non-rejeté par le système de détection
- A'(s) est le facteur d'absorption de l'échantillon pour le rayonnement de longueur d'onde λ'

Le facteur A' se distingue du facteur A par le changement du coefficient μ en μ ' au cours du trajet dans l'échantillon. Un calcul validé par l'expérience fait toutefois apparaître que pour le cas courant d'un écart faible entre μ et μ ', les relations établies pour le rayonnement cohérent de longueur d'onde λ restent valables pour le rayonnement de fluorescence de longueur d'onde λ '.



9-2-3. ID21 à l'ESRF

Figure 19 : Caractéristiques de ID21

L'instrument ID21 [44] à l'ESRF est équipé d'un microscope de balayage par rayons X (SXM), utilisant une zone plate de Fresnel en tant que système optique focalisant pour produire de la sonde submicronique avec les divers mécanismes de contraste. Ceci nous permet d'obtenir une image globale *in situ* des différents environnements des ions de phosphore, de calcium et de titane dans l'os en travaillant à l'énergie spécifique près du seuil d'excitation du titane 5 Kev, cette énergie permet d'observer aussi les autres ions puisqu'elle est plus grande que les énergies d'excitations du calcium (3,8 Kev) et du phosphore (2 Kev).

Nous nous proposons d'étudier l'évolution de la reconstitution osseuse à l'interface os-implant (revêtu ou non d'HAp) et d'analyser particulièrement l'état chimique des différents constituants de l'implant ainsi que de l'os reconstitué à l'interface par une analyse de fluorescence à haute résolution. Dans ce but, nous avons réalisé des expériences de cartographie de fluorescence des éléments existant dans l'implant : titane, phosphore et calcium, avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre autour de l'interface.

Cette étude nous permet de confirmer l'existence ou non de composés à l'interface de l'implant-os.

Ces résultats de fluorescence peuvent nous permettre une meilleure compréhension du phénomène de la tolérance de l'implant et de son intégration dans le corps.

9.2.4. Méthodes et résultats

L'échantillon d'os avec l'implant a été placé dans un porte-échantillon, puis il a été mis dans une enceinte sous vide afin de réduire le bruit de fond (Figure 20).



Figure 20 : l'échantillon placé sur le porte échantillon

Nous avons fait un scan de chaque coté de l'implant avec une résolution spatiale de 1µm. Les résultats obtenus sont donnés dans les figures 21, 22, et 23 sur la face revêtue d'HAp et dans les figures 24, 25 et 26 sur la non revêtue d'HAp.



Figure 21 : Cartographie de titane

Figure 22: Cartographie de calcium



Figure 23: Cartographie de phosphore



Figure 24 : Cartographie de titane

Figure 25 : Cartographie de phosphore



Figure 26 : Cartographie de calcium

Les cartes de fluorescence X tracées de chaque coté de l'interface montrent qu'il n'y a pas de diffusion de titane ni à l'interface os-implant ni dans l'os.

Face non revêtue d'HAp:

Les cartographies des principaux constituants de l'os (le phosphore et le calcium) proches de l'implant, montrent que la diffusion du calcium et le phosphore à l'échelle du micromètre semble insuffisante et peut indiquer un décollement ou une absence injustifiée de la structure osseuse au voisinage immédiat de l'interface.

Face revêtue d'HAp:

D'après les trois cartographies tracées, nous n'observons aucune espace libre entre l'os reconstitué et l'implant. A l'échelle du micromètre, les constituants de l'os sont présents au voisinage immédiat de l'implant.

9.2.5. Conclusion

Les résultats obtenus confirment que dans l'échantillon utilisé aucune trace de titane n'a été observée dans le nouvel os constitué.

La face revêtue d'HAp permet la reconstitution osseuse, les cartographies tracées confirment l'ostéoconduction d'HAp, la propriété qui donne à la surface revêtue la capacité de permettre la repousse osseuse.

La technique de la fluorescence X utilisée par les rayonnements synchrotrons et avec une résolution de 1 μ m donne encore une autre preuve de l'intérêt d'opérer à un revêtement des implants par l'HAp.

10. Conclusions

L'utilisation des deux méthodes de caractérisation, rayonnement synchrotron et diffraction de neutrons sont des techniques qui permettent l'étude en résolution spatiale de l'HAp dans l'os cortical. La partie organique de l'os donne un bruit de fond très important qui masque tous les pics de diffraction neutronique. Nous avons résolu ce problème en réduisant ce bruit de fond par traitement thermique. Ce chauffage n'a pas d'effet sur la structure d'HAp, cette méthode de préparation d'os avant diffraction neutronique apparaît la plus adaptée. Les expériences de diffraction de rayonnement synchrotron menées sur l'os cortical permettent une analyse structurale sans être obligé de chauffer l'os, cependant le chauffage améliore la résolution des pics de diffractions de l'HAp de l'os.

La technique de la fluorescence X sur ID21 n'a montré aucune diffusion du titane dans l'os reconstitué.

Jusqu'à présent, aucune étude non destructive n'a été effectuée sur l'os cortical à l'interface os-implant. L'os cortical possède une orientation préférentielle, la compréhension de l'intégration de l'implant dans l'organisme passe alors par la caractérisation du nouvel os reconstruit à l'interface, notre motivation est d'étudier la distribution d'orientation des cristaux d'HAp dans l'os en contact avec un implant revêtu d'HAp et comparer les résultats obtenus avec l'implant non revêtu d'HAp. Cela va nous permettre de bien comprendre l'évolution des propriétés à la surface de l'implant. Nous pouvons alors mettre en place la méthode d'étude de la texture grâce au rayonnement synchrotron et aux neutrons, ce que nous allons présenter dans le chapitre suivant.

REFERENCES

- [1] F. G. Cuisinier, P. Steuer, A. Brisson, J.C. Voegel, High resolution electron microscopy study of crystal growth mechanisms in chicken bone composites. J. of Crystal Growth (1995). 156, 443-453
- [2] H.D. Wagner, and S. Weiner, On the relationship between the microstructure of bone and its mechanical stiffness, *J. Biomech.* (1992), **25**, 1311-1320.
- [3] S. Weiner and H.D. Wagner, The material bone: structure-mechanical function relations. *Ann. Rev. Mater. Sci.* (1998), **28**, 271-298.
- [4] AN Natali, RT. Hart, PG Pavon, Dental Biomechanics. Edited by A. N. Natali, p. 1-17
- [5] Y. Barbotteau, Recherche des modifications de caractéristiques dans des biomatériaux en verres bioactif par des méthodes nucléaire et physico-chimiques. Combinaison de la cartographie PIXE et de l'histopathologie. Essai de modélisation par la théorie de percolation de la résorption de biomatériaux. *Thèse, UNIVERSITE BLAISE PASCAL -CLERMONT-FERRAND II, (2002)*
- [6] R.B. Martin, Bone as a Ceramic Composite Material. *Materials science forum*, (1999).293, 5-16
- [7] Clotilde GAILLARD, Etude de la migration thermique des produits de fission molybdène, technétium et iode dans les apatites. *Thèse, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1,* (2000)
- [8] F. Guillemot, Etude métallurgique d'alliages de titane pour applications biomedicales. *Thèse, Institut national des sciences appliquées de Rennes, (2000)*

- [9] C. Rey, Du minéral osseux aux biomatériaux, un biominéral particulier : l'apatite. L'actualité Chimique, (1995). 41-45
- [10] A.C. DERRIEN, Synthèse et caractérisation physico-chimique de géopolymères. Application : cinétique de minéralisation de géopolymères et du biomatériau CaCO₃ synthétique. *Thèse, UNIVERSITE de RENNES,(2004).*
- [11] Boon Sing Ng, Ingegerd Annergren, Andrew M. Soutar, K.A. Khor, Anders E.W. Jarfors, Characterisation of a duplex TiO₂/CaP coating on Ti6Al4V for hard tissue replacement. *Biomaterials*, (2005). 26, 1087–1095.
- [12] D. Krupa, J. Baszkiewicz, J.A. Kozubowski, A. Barcz, J.W. Sobczak, A. Bilinski, M. Lewandowska-Szumie, B. Rajchel, Effect of dual ion implantation of calcium and phosphorus on the properties of titanium, *Biomaterials* (2005). 26, 2847–2856
- [13] Fu Liu, Fuping Wang, Tadao Shimizu, Kaoru Igarashi, Liancheng Zhao, Formation of hydroxyapatite on Ti–6Al–4V alloy by microarc oxidation and hydrothermal treatment. *Surface & Coatings Technology*, (2005). In press.
- [14] Joo L. Ong, David L. Carnes, Kazuhisa Bessho, Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo, Biomaterials 25 (2004) 4601–4606
- [15] B. Cofino, Analyse des contraintes résiduelles au voisinage des interfaces titane/hydroxyapatite réalisées par torche plasma pour applications implantaires. *Thèse*, *Université de Reims*, (2001)
- [16] O.S. Yildirim, B. Aksakal, H. Celik, Y. Vangolu, A. Okur, An investigation of the effects of hydroxyapatite coatings on the fixation strength of cortical screws. *Medical Engineering* & *Physics*, (2005). 27, 221–228.
- [17] Jarcho M., Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin. Orthop. Rel. Res.* (1981). 157, 259-278.
- [18] Mitsuru Takemoto, Shunshuke Fujibayashi, Mashashi Neo, Jun Suzuki, Tadashi Kokubo and Takashi Nakamura, Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*, (2005). 26, 6014-6023.

- [19] Philip Kasten, Julia Vogel, Reto Luginbühl, Philip Niemeyer, Marcus Tonak, Helga Lorenz, Lars Helbig, Stefan Weiss, Jörg Fellenberg, Albrecht Leo et al. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials*, (2005). 26, 5879-5889
- [20] Hiroshi Kusakabe, Toyonori Sakamaki, Kotaro Nihei, Yasuo Oyama, Shigeru Yanagimoto, Masaru Ichimiya, Jun Kimura and Yoshiaki Toyama, Osteointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem, *Biomaterials*, (2004). 25, 2957-2969.
- [21] Bong-Soon Chang, Choon-Ki Lee, Kug-Sun Hong, Hyuk-Joon Youn, Hyun-Seung Ryu, Sung-Soo Chung, Kun-Woo Park, Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* (2000). 21, 1291-1298.
- [22] A. Boyde, A. Corsi, R. Quarto, R. Cancedda and P. Bianco, Osteoconduction in Large Macroporous Hydroxyapatite Ceramic Implants: Evidence for a Complementary Integration and Disintegration Mechanism. *Bone*, (1999). 24, 579–589
- [23] W. Xue, S. Tao, X Liu, X. Zheng and C. Ding, In vivo evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings having different crystallinity. *Biomaterials*, (2004). 25, 415-421
- [24] http://www.unilim.fr/spcts/index.html?ouvre%3D%27activites/axe2.html%27%3B
- [25] C.J. Carlile, la production des neutrons. J. Phys. IV France, (2003). 103, 51-66
- [26] Bernard Hennion, introduction générale, www.ill.fr/diff_neutrons.
- [27] Institut Max von Laue Paul Langevin (ILL), www.ill.fr
- [28] J.-P. Lauriat, Complémentarité des rayons X et des neutrons, J. Phy. IV France (2003).103, 67-100
- [29] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, the orientation of apatite crystals in bone. J. Appl. Cryst. (1979). 12, 99-103.

- [30] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, stress distribution in the scapula studied by neutron diffraction. *Pro. R. Soc. Lond. B.*, (1979). **204**, 355-362.
- [31] G. E. Bacon and A. E. Goodship, the orientation of the mineral crystals in the radius and tibia of the sheep, an dits varaition with age,. *J. Anat. (1991).* **179**, *15-22*
- [32] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, A neutron diffraction study of the bones of the foot. J. Anat. (1984). 139, 265-273
- [33] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, the study of bones by neutron diffraction. J. Appl. Cryst. (1977). 10, 124-126
- [34] G. E. Bacon, P. J. Bacon and R. K. Griffiths, Orientation of apatite crystals in relation to muscle attachment in the mandible. *J. Biomechanics*, (1980).13, 725-729
- [35] E Girardin, P Millet and A Lodini, X-ray and neutron diffraction studies of crystallinity in hydroxyapatite coatings. *J Biomed Mater Res.*, (2000). **49**, 211-215.
- [36] C. Rieckel, Analyse des contraintes résiduelles par diffraction des rayons X et des neutrons. *Édité par A Lodini et M Perrin, (1996).17-30*
- [37] European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), www.esrf.fr
- [38] D E Ramaker, B L Mojet, D C Koningsberger and W E O'Grady, Understanding atomic x-ray absorption fine structure in x-ray absorption spectra, J. Phys.: *Condens. Matter.*, (1998). 10, 8753–8770.
- [39] J. J. Rehr and R. C. Albers, Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure. *Reviews of Modern Physics*, (2000). 72.
- [40] L. Lemelle, M. Salome, M. Fialin, A. Simionovici, Ph. Gillet, In situ identification and X-ray imaging of microorganisms distribution on the Tatahouine meteorite. *Spectrochimica Acta Part B*, (2004). 59, 1703-1710

- [41] Maria Caterina Camerani, Andrea Somogyi, Mikael Drakopoulos, Britt-Marie Steenari, Synchrotron radiation induced μ-X-ray fluorescence spectroscopy on municipal solid waste fly ashes. *Spectrochimica Acta Part B*, (2001). 56, 1355-1365.
- [42] Benedicte Menez, Pascal Philippot, Michelle Bonnin-Mosbah, Alexandre Simionovici And Francois Gibert, Analysis of individual fluid inclusions using Synchrotron X-Ray Fluorescence microprobe: progress toward calibration for trace elements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, (2002). 66, 561-576,
- [43] E.L. Zelentsov, T.N. Moroz, Yu.P. Kolmogorov, V.E. Tolmachev, G.N. Dragun, N.A. Palchik, T.N. Grigorieva, The elemental SRXRF analysis and mineral composition of human salivary stones. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, (2001). 470, 417–421

[44] http://www.esrf.fr/exp_facilities/ID21/

Chapitre II :

Méthode de caractérisation de la reconstruction osseuse par diffraction neutronique et rayonnement synchrotron à partir de l'analyse de la texture cristallographique

Chapitre II Méthode de caractérisation de la reconstruction osseuse par diffraction neutronique et rayonnement synchrotron à partir de l'analyse de la texture cristallographique

1. Introduction

L'orientation préférentielle ou texture cristallographique est définie par une distribution non aléatoire des cristaux dans le matériau polycristallin [1]. L'étude de l'orientation préférentielle est identifiée comme une technique importante pour la compréhension des structures de matériaux polycristallins. Un des problèmes principaux en science des matériaux est de relier les propriétés physiques anisotropes d'un matériau polycristallin à l'alignement préférentiel des constituants dans certaines directions, et est souvent lié à un procédé d'élaboration des matériaux. Depuis de nombreuses années, le développement de métaux texturés ou de polymères texturés est un axe de recherche essentiel dans l'amélioration du comportement et de la durée de vie des composants. Plusieurs secteurs de recherche sont aujourd'hui concernés comme l'électronique : l'élaboration de films minces, la texture ne contrôle pas seulement les propriétés électriques mais également la stabilité mécanique des films (par exemple : films de polysilicone utilisés dans les déclencheurs). En géologie : la texture fournit des informations sur l'histoire de la déformation des roches et elle permet d'interpréter l'anisotropie observée dans la propagation sismique des vagues dans les océans [2,3,4]. Dans notre étude, la texture est présente dans les biomatériaux, pourtant le rapport entre les propriétés mécaniques des os et l'alignement des cristaux d'hydroxyapatite dans l'os n'a encore jamais été étudié en résolution spatiale, à l'exception des travaux de G. Bacon qui a jeté les bases de l'analyse de la texture dans les biomatériaux [5]. Dans beaucoup de cas, la caractérisation de texture a une influence importante dans la résolution et l'affinement des diagrammes de diffraction sur poudre. Dans un effort de caractérisation des

textures à toutes les échelles, du micromètre au centimètre, les chercheurs ont employé une gamme croissante de techniques pour caractériser quantitativement la texture. Dans ce contexte, l'utilisation de grands équipements tels que les synchrotrons et les sources de neutrons, est particulièrement importante et trouve une nouvelle application dans l'étude des biomatériaux.

2. Définition de la texture

A l'état solide, le polycristal est constitué d'un ensemble de grains. On considère que chaque grain est un monocristal dans l'hypothèse d'une structure homogène.

L'orientation cristalline d'un grain dans un matériau est alors définie par la position des plans cristallographiques de son réseau cristallin dans un repère lié au matériau lui-même. Ce repère est appelé repère macroscopique noté R_E . Le repère cristallographique est noté R_c .



Figure 1 : l'orientation des grains dans l'échantillon

La texture d'un matériau polycristallin est définie par la fraction de volume des cristaux ayant la même orientation g définie par [6] :

$$\frac{dV/V}{dg} = f(g)$$

Beaucoup de représentations sont utilisables pour définir l'orientation g. Parmi les plus répandues citons : la matrice g_{ij} les indices de Miller cristallographiques (hkl)[uvw], les angles d'Euler { ϕ, χ, ω } ainsi que { $d_{(hkl)}, \theta$ }.

On peut les présenter selon l'équation suivante :

$$g = \begin{pmatrix} g_{11} & g_{12} & g_{13} \\ g_{21} & g_{22} & g_{23} \\ g_{31} & g_{32} & g_{33} \end{pmatrix} = (hkl)[uvw] = \{\varphi, \chi, \omega\}$$

En absence de texture la fonction f(g) peut s'écrire : $f_{isotrope}(g) = 1$

Ceci signifie que l'intégrale de l'espace complet d'orientation équivaut à unité

$$\oint f(g) dg = 1 \quad ; \quad dg = \frac{1}{8\pi^2} \sin \chi \ d\varphi \ d\chi \ d\omega$$

Et l'élément d'orientation dg est exprimé en fonction des angles Euler.

La mesure de texture est souvent basée sur la détermination des fonctions de distribution des orientations..



Figure 2 : le repère cristallographique et le repère macroscopique

D'après le schéma ci-dessus si on considère que : $\vec{h} = [h_1, h_2, h_3] = \{\Theta_{(hkl)}, \gamma_{(hkl)}\}$ est l'orientation de la normale aux plans (hkl) du cristal dans le repère relatif R_C et $\vec{y} = [y_1, y_2, y_3] = \{\alpha, \beta\}$ est l'orientation de l'échantillon défini dans le repère R_E lié à l'échantillon.

La fonction de distribution d'axe $A(\vec{h}, \vec{y})$ est l'intégrale de la fonction f(g) de tous ces cristaux pour tout \vec{h} parallèle à \vec{y}

$$A\left(\overrightarrow{h}, \overrightarrow{y}\right) = \frac{1}{2\pi} \int_{\overrightarrow{h/l}} f(g) d\psi = \frac{1}{2\pi} \int_{(hkl) \perp \{\alpha, \beta\}} f(\varphi_1, \phi, \varphi_2) d\psi$$

 ψ est l'angle de la rotation suivant la direction commune h//y

Si la direction du cristal \vec{h} est constante, la fonction $A(\vec{h}, \vec{y})$ est la figure de pôle, si la direction d'échantillon \vec{y} est constante, la fonction $A(\vec{h}, \vec{y})$ est la figure de pôle inverse.

$$A\left(\overrightarrow{h}, \overrightarrow{y}\right) = A\left(\left\{\theta_{(hkl)}, \gamma_{(hkl)}\right\}, \left\{\alpha, \beta\right\}\right) = \begin{cases} P_{\overrightarrow{h}}(\alpha, \beta) & : figures \ de \ p\hat{o}le \\ R_{\overrightarrow{y}}(\theta_{(hkl)}, \gamma_{(hkl)}) & : figures \ de \ p\hat{o}les \ inverses \end{cases}$$

Une figure de pôle permet de représenter la fraction de volume des cristaux ayant une direction cristallographique particulière \vec{h} parallèle à la direction d'échantillon \vec{y} .

Les figures de pôles inverses, en particulier celles des importantes directions du d'échantillon, par exemple roulement, transversales et normales, sont étroitement liés aux propriétés physiques du matériau dans ces directions [7].

$$\frac{dV/V}{d\Omega} = P_{\vec{h}} \left(\stackrel{\rightarrow}{y} \right) = P_{(hkl)}(\alpha, \beta) \qquad ; \quad d\Omega = \sin \alpha. d\alpha d\beta$$

 $d\Omega$ est l'élément d'angel solide.

$$P_{(hkl)}(\alpha,\beta) = \frac{1}{2\pi} \int_{\vec{h}/\vec{y}} f(g) d\psi = \frac{1}{2\pi} \int_{(hkl)\perp\{\alpha,\beta\}} f(\varphi_1,\phi,\varphi_2) d\psi$$

Où ψ est une rotation suivant la direction de diffraction. $\vec{S} // \vec{h} // \vec{y}$, l'équation cidessus s'appelle généralement l'équation de base, dont l'analyse de texture à partir de la fonction de la distribution d'orientation (FDO), f(g), peut être calculée.

Pour un matériau isotrope :

$$P_{(hkl)}(\alpha,\beta)_{isotrope} \equiv 1$$

3. Mesure des figures de pôles expérimentales3.1. Analyse de la texture par diffraction sur poudre

La mesure de la texture est habituellement effectuée au moyen de la technique de diffraction de neutrons et de rayonnement synchrotron. Les instruments doivent être équipés d'un berceau d'Euler ou d'un détecteur bi-dimensionnel.

Déterminer la texture d'un échantillon consiste alors à évaluer les orientations cristallographiques préférentielles des grains qui le composent.

L'analyse de la texture passe par la détermination de figures de pôles qui donnent la densité des pôles (hkl) en fonction de leur orientation par rapport à l'échantillon. La sphère des pôles est une surface sphérique de rayon égal à l'unité, sur laquelle est matérialisé, par un point P, son intersection avec la direction $\vec{n}_{(hkl)}$ considérée ($\vec{n}_{(hkl)}$ étant la normale au plan (hkl)) [8,9].



Figure 3 : la projection stéréographique

Une figure de pôles est la projection stéréographique de l'ensemble des normales à une famille donnée de plans réticulaires (hkl), de tous les grains d'un échantillon, projeté dans un plan de référence. Elle permet de visualiser le point d'intersection P' entre la droite reliant P au pôle Sud (S) de la sphère des pôles et le plan équatorial. Une figure de pôles comporte des lignes de niveaux qui relient les points possédant une même intensité, c'est-à-dire les orientations suivant lesquelles la densité des plans (hkl) est identique.

Pour obtenir une figure de pôles complète, l'échantillon effectue deux rotations autour de deux axes perpendiculaires :

Une rotation de déclinaison d'angle χ autour d'un axe appartenant à la surface de l'échantillon. χ détermine l'angle mesuré à partir de la direction normale (DN), et varie de 0 à 90°.

Une rotation azimutale d'angle φ autour de l'axe perpendiculaire à la surface de l'échantillon. φ détermine l'angle mesuré à partir de la direction de laminage (DL), et varie de 0 à 360°.

La position de chaque normale $\vec{n}_{(hkl)}$ est alors définie par les coordonnées (χ, φ).

4. Affinement des diagrammes de diffraction sur poudre

La technique de diffraction sur poudre doit s'affranchir de quelques difficultés et nécessite une méthode d'affinement. Cette méthode est la méthode Rietveld.

4.1. Profils des raies de diffraction

Le profil expérimental h(x) d'une raie de diffraction est le produit de convolution d'une fonction instrumentale f(x) et du profil lié à la microstructure de l'échantillon g(x) :

$$h(x) = f(x) \otimes g(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)g(x-y)dy$$

4.2. Contribution Instrumentale

Les éléments suivants contribuent à limiter la résolution instrumentale:

- La divergence du faisceau et la dispersion en longueur d'onde de la source,
- La mosaïcité du monochromateur, la largeur des fentes, et la mauvaise planéité de l'échantillon,
- Le fond continu expérimental constitué par le bruit électronique du détecteur, la diffusion par l'air et l'environnement de l'échantillon.

L'élargissement angulaire des raies dû à l'instrument est souvent décrit par la fonction de résolution de C. Gaglioti et al [10] : $H = \sqrt{U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W}$

H représente la largeur à mi-hauteur de la réflexion de Bragg située à l'angle 2θ.

Les profils de raies sont en général décrits par un mélange de fonctions lorentzienne et gaussienne. C'est le cas de la fonction de Voigt normalisée définie par le produit de convolution d'une lorentzienne et d'une gaussienne et qui est bien adaptée à la description des profils expérimentaux.

La fonction gaussienne est définie par :

$$G(2\theta) = \frac{2}{H} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \quad e^{-\frac{4\ln 2}{H^2}(2\theta - 2\theta_{hkl})^2}$$

La fonction lorentzienne est définie par :

$$L(2\theta) = \frac{2}{\pi H} \frac{1}{\left(1 + \frac{4}{H^2} \left(2\theta - 2\theta_{hkl}\right)^2\right)}$$

La fonction de Voigt normalisée est :

$$\Omega(2\theta) = \frac{1}{\beta} \operatorname{Re}\left\{ erf\left(\frac{\sqrt{\pi}}{\beta_G} \left| 2\theta - 2\theta_{hkl} \right| + i\frac{\beta_L}{\beta_G\sqrt{\pi}} \right) \right\}$$

Où erf est la fonction d'erreur complexe : $erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$

 β_L et β_G sont les largeurs intégrales respectives des composantes lorentzienne et gaussienne

La fonction de Voigt peut être approximée par la fonction appelée Pseudo-Voigt, qui représente la combinaison linéaire d'une gaussienne et d'une lorentzienne, soit :

$$\Omega (2\theta) = \eta L(2\theta, H) + (1-\eta) G(2\theta, H)$$

 η indique la proportion de la lorentzienne par rapport à la gaussienne.

4.3. Méthodes d'ajustement de profils

4.3.1. Affinement de structure par ajustement de Profil total

En 1969, Hugo Rietveld [10] a introduit une procédure d'affinement de structure à partir de données sur poudres lorsque la structure de l'échantillon est approximativement connue. Cette méthode est la plus couramment utilisée pour l'affinement des structures cristallographiques. De nos jours, il existe plusieurs méthodes basées sur le calcul *ab-initio*.

La procédure d'affinement minimise, par méthode des moindres carrées ou de maximum de vraisemblance, la fonction : $M = \sum_{i} w_i \{y_{obs_i} - y_{calc_i}\}^2$

Où $w_i = 1/\sigma_i^2$ est la pondération affectée à l'observable y_{obs_i} (nombre de coups observés au pas i) dont σ_i est l'écart type.

Pour les affinements par moindres carrés, le poids statistique est égal à $1/y_{obs i}$, alors que pour un affinement par maximum de vraisemblance, il vaut $1/y_{calc i}$.

 y_{calc_i} est le nombre de coups calculés au pas i et défini par :

$$y_{calc_{i}} = y_{b_{i}} + \sum_{l} S_{l} \sum_{k} m_{lk} L p_{lk} O_{lk} |F_{lk}|^{2} \Omega_{ilk} T$$

 $O\hat{u} \ l = indice \ de \ sommation \ sur \ les \ différentes \ phases \ en \ présence,$ $k = indice \ de \ sommation \ sur \ les \ réflexions \ voisines \ contribuant \ au \ pas \ i,$ $S_l = facteur \ d'échelle \ entre \ les \ valeurs \ observées \ et \ les \ valeurs \ calculées,$ $m_{lk} = facteur \ d'échelle \ entre \ les \ valeurs \ observées \ et \ les \ valeurs \ calculées,$ $m_{lk} = facteur \ de \ multiplicité \ de \ la \ k^{i eme} \ réflexion,$ $Lp_{lk} = facteur \ de \ polarisation \ (et \ de \ Lorentz),$ $O_{lk} = facteur \ décrivant \ les \ effets \ d'orientation \ préférentielle,$ $F_{lk} = facteur \ de \ structure \ (incluant \ les \ termes \ de \ l'agitation \ thermique),$ $T = facteur \ d'absorption,$ $Q_{ilk} = fonction \ de \ profil \ expérimental \ décrivant \ les \ pics.$

La minimisation de la fonction M permet d'obtenir les positions des atomes dans la maille, ainsi que les paramètres de déplacements associés (décrites de façon isotrope ou anisotrope). Il est possible également d'ajuster les taux d'occupation des atomes sur leurs sites cristallographiques.

Les résultats des ajustements sont contrôlés par différents facteurs de confiance, qui déterminent la qualité du traitement :

Le résidu de profil pondéré :
$$R_{wp} = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i} w_i (y_{obs_i} - y_{calc_i})^2}{\sum_{i} w_i (y_{obs_i})^2}}$$

Le résidu de profil non pondéré :
$$R_p = 100 \frac{\sum_{i} |y_{obs} - y_{calc_i}|}{\sum_{i} y_{obs_i}}$$

Où y_{obs_i} est l'intensité intégrée observée de la i^{ème} réflexion.

Elle s'écrit :
$$I_{obs_i} = \sum_{k} I_{calc_i} \Omega_{ik} \frac{y_{obs_k} - y_{b_k}}{y_{calc_k} - y_{b_k}}$$

On utilise parfois le "R-structure facteur" défini par :

$$R_F = \sum_{i} \left| \sqrt{I_{obs_i}} - \sqrt{I_{calc_i}} \right| / \sum_{i} \sqrt{I_{obs_i}}$$

Le résidu lié aux fluctuations statistiques en l'absence d'erreurs systématiques :

$$R_{\rm exp} = 100 \sqrt{\frac{N - P + C}{\sum_{i} w_i (y_{obs_i})^2}}$$

Le test statistique de l'ajustement noté $\chi 2$ ou g.o.f. (goodness of fit) doit tendre vers 1 pour un affinement réussi.

$$\chi^{2} = \left(\frac{R_{wp}}{R_{exp}}\right)^{2} = \frac{M}{N - P + C}$$

Avec N-P+C est le nombre de degré de liberté
N : est le nombre d'observations indépendantes
P : est le nombre de paramètres ajustés
C : est le nombre de contraintes entre ces paramètres
M : est la fonction à minimiser

Cette méthode permet d'affiner, à partir de l'exploitation d'un diagramme de diffraction de rayons X, de neutrons ou de rayonnement synchrotron sur poudre, la structure cristallographique des composés, en connaissant approximativement les paramètres de maille et le modèle structural du composé étudié.

Chapitre II : Méthode de caractérisation de la reconstruction osseuse par diffraction neutronique et rayonnement synchrotron à partir de l'analyse de la texture cristallographique

La principale limitation de cette technique est liée au recouvrement des raies de diffraction. Celui ci peut empêcher une séparation convenable des contributions de réflexions voisines et donc fausser la détermination des intensités intégrées de chacune d'elles.

4.3.2. Ajustement individuel des profils expérimentaux en présence

de texture

Cette méthode consiste à ajuster une fonction analytique sur un profil expérimental, sans aucune référence à la maille ou à la structure cristallographique du composé. La seule contrainte est liée au choix du profil analytique de la raie dont l'intensité, la position angulaire et la largeur à mi-hauteur sont des paramètres ajustables par une méthode de minimisation par moindres carrés ou par maximum de vraisemblance.

Dans le cadre de travail sur les os, on est en présence d'orientations préférentielles, (textures), donc il faut rajouter d'autres algorithmes à la méthode Rietveld pour résoudre ce changement d'intensité des pics de diffraction. Les trois algorithmes les plus utilisés qui seront décrits brièvement sont : la méthode harmonique, WIMV et E-WIMV.

4.3.2.1. La méthode harmonique

Les fonctions de distribution des orientations peuvent être calculées à partir des figures de pôles déterminées expérimentalement $P_{\vec{h}} \begin{pmatrix} \rightarrow \\ y \end{pmatrix}$ en résolvant la relation fondamentale de l'analyse de texture suivante [11,12]:

$$P_{\vec{h}}\left(\stackrel{\rightarrow}{y}\right) = \frac{1}{2\pi} \int_{h/ly} f(g) d\chi, \quad \vec{y} = \{\alpha, \beta\}, \quad g = \{\chi, \varphi, \omega\}$$

Une solution analytique de l'équation est connue par un type spécial de fonctions. Ce sont les fonctions harmoniques $k_l^n(y)$ et. $T_l^{mn}(g)$. Alors l'équation peut s'écrire :

$$\frac{1}{2\pi} \int_{h/ly} T_l^{mn}(g) d\chi = \frac{2}{2l+1} k_l^{*m}(h) k_l^n(y)$$

il y a une telle fonction $T_l^{mn}(g)$ pour chaque combinaison possible des index l, m, n, les fonctions avec des valeurs basses de l étant des fonctions de "longue vague", qui signifie de longues ou courtes distances angulaires entre des voisins maximum et minimum des fonctions.

N'importe quelle fonction f(g) peut se composer en ajoutant des fonctions $T_l^{mn}(g)$ (c.-à-d., chaque fonction est multipliée par un facteur approprié C_l^{mn}):

$$f(g) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^{+l} \sum_{n=-l}^{+l} C_l^{mn} T_l^{mn}(g)$$

C'est le principe général de l'expansion en séries, qui est bien connue sous forme d'analyse de Fourier, où les fonctions spéciales sont des fonctions de sinus ou de cosinus. Les fonctions harmoniques $T_l^{mn}(g)$ sont des fonctions de trois variables, et leurs formes sont plus compliquées que dans l'analyse de Fourier, mais le principe est identique. De même, la fonction $P_{\vec{h}}(\vec{y})$ peut se composer de fonctions $k_l^n(y)$ (c.-à-d., elle peut se développer en séries harmoniques $k_l^n(y)$ avec des coefficients appropriés $F_l^n(h)$) [11]:

$$P_{\overrightarrow{h}}(g) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{n=-l}^{+l} F_l^n(h) k_l^n(y)$$

La fonction $F_l^n(h)$ est définie par :

$$F_{l}^{n}(h) = \frac{4\pi}{2l+1} \sum_{m=-l}^{+l} C_{l}^{mn} k_{l}^{*m}(h)$$

4.3.2.2. Méthode de Williams-Imhof-Matthies-Vinel (WIMV) [Willams 1968, Imhof 1982, Matthies et Vinel 1982]

L'approche de Willliams-Imhof-Matties-Vinel (WIMV) [13,14], pour l'affinement de la distribution des orientations est une manière itérative. Il est basé sur l'affinement de f(g) à l'étape n + 1:

$$f^{n+1}(g) = N_n \frac{f^n(g) f^0(g)}{\left(\prod_{h=1}^{I} \prod_{m=1}^{M_h} P_h^n(y)\right)^{\frac{1}{M_h}}}$$

Le nombre N_n est un facteur de normalisation. Les valeurs $P_h^n(y)$ sont calculées à chaque cycle. La première étape de cette procédure c'est d'évaluer $f^0(g)$:

$$f^{0}(g) = N_{0} \left(\prod_{h=1}^{I} \prod_{m=1}^{M_{h}} P_{h}^{\exp}(y)\right)^{\frac{1}{M_{h}}}$$

Tel que $P_h^{exp}(y)$ représente la valeur mesurée.

L'algorithme WIMV maximise les valeurs minimales des Fonctions de Distributions des Orientations (FDO) et l'acuité de texture.

4.3.2.3. Le modèle Prolongé de WIMV : E-WIMV

La méthode régulière de WIMV nécessite que les fonctions de distribution des orientations se décrivent en nombre fini de cellules régulières. À l'intérieur de chaque cellule une valeur discrète de FDO est associée. Quand le calcul de WIMV est inséré à l'intérieur de la procédure d'affinement de Rietveld, il exige deux étapes additionnelles :

- l'extraction des figures de pôles ou le poids de la texture.
- l'interpolation de ces poids pour affiner la grille régulière.

L'approche E-WIMV peut être employée avec un remplissage irrégulier de l'espace des FDO. Elle est basée sur un concept de projection de la méthode de ADC [15]. La prolongation de la méthode fournit un arrangement itératif de l'affinement des FDO qui est très près de la maximisation de l'entropie [16]. La méthode d'E-WIMV s'appelle souvent le WIMV Entropie-modifié [17,18]. Les valeurs de cellules de FDO sont calculées par un algorithme itératif d'entropie qui inclut les poids de réflexion :
$$f^{n+1}(g) = f^{n}(g) \prod_{m=1}^{M_{h}} \left(\frac{P_{h}(y)}{(P_{h}^{n}(y))} \right)^{r_{n}\frac{W_{h}}{M_{h}}}$$

 r_n est un paramètre de relaxation tels que 0<r $_n$ < 1, M $_h$ est le nombre de points de division pour la discrétisation de l'intégrale de toutes les orientations autour du vecteur de dispersion pour la figure de pôle h. Le poids de réflexion W $_h$ est présenté pour tenir compte de l'exactitude des différentes réflexions plus intenses et moins plus recouvertes en ce qui concerne les plus petites, il est calculé de façon analogue aux facteurs de poids de l'analyse de Rietveld [13].

4.3.2.4. Facteurs de force de la texture

Une fois f(g) obtenue, on peut calculer les facteurs qui donnent une évaluation de la force de texture.

4.3.2.4.1. Indice de Texture

Le premier paramètre de force de texture est l'index de texture [Bunge 1982] (exprimé en m.r.d.²) :

$$F^{2} = \frac{1}{8\pi^{2}} \sum_{i} [f(g_{i})]^{2} \Delta g_{i}$$

Avec $\Delta g_i = \sin \beta_i \Delta \beta \Delta \alpha \Delta \gamma$ est le volume des cellules de la FDO.

4.3.2.4.2. Entropie de Texture

Le deuxième paramètre global de force de la texture est la mesure du désordre de texture, évaluée par le calcul de l'entropie :

$$S = \frac{1}{8\pi^2} \sum_{i} f(g_i) \ln f(g_i) \Delta g_i$$

Nous avons utilisé durant tous nos travaux le logiciel MAUD. Ce logiciel est probablement l'outil le plus complet qui rassemble la méthode Rietveld et les algorithmes de texture [19].

5. Le programme MAUD (Material Analysis Used Diffraction)5.1. Introduction

Dans le domaine de l'analyse des textures, nous avons besoin d'outils de plus en plus sophistiqués pour obtenir le maximum d'informations sur un matériau analysé à l'aide de techniques de diffraction. Actuellement, des outils informatiques très puissants permettent de rassembler en peu de temps une grande quantité de données. Il est cependant difficile de traiter toutes ces données par une manière traditionnelle fastidieuse même avec des stations de travail très puissantes. En bref, le temps de traitement par un ordinateur de la dernière génération est aujourd'hui sensiblement diminué. Cependant, le nombre de données collectées augmente également avec un temps de mesure accordé à l'utilisateur, temps qui est toujours identique et limité. Ceci mène à la conclusion que beaucoup de données et/ou d'informations rassemblées par les instruments sont perdues ou jamais exploitées. La solution consiste alors à développer de nouveaux outils d'analyse qui permettent de traiter plus de données et optimiser le temps de mesure accordé à chaque utilisateur qui souhaite utiliser les grands instruments. Le logiciel MAUD répond à cette attente.

5.2. Principaux dispositifs de MAUD

L. Luttorotti a développé un logiciel particulièrement performant et basé sur la méthode de Rietveld pour une analyse quantitative comportant deux modes d'affinement. MAUD « Material Analysis Used Diffraction» est écrit en Java et permet de l'adopter à toutes les machines actuelles. <u>Chapitre II : Méthode de caractérisation de la reconstruction osseuse par diffraction neutronique et rayonnement</u> synchrotron à partir de l'analyse de la texture cristallographique



Figure 4 : le programme MAUD

Les caractéristiques de Maud sont :

Affinement simultané de la structure du cristal, élargissement des raies, texture, déformation et analyses quantitatives de phase.

Échantillons multiples, phases, spectres de diffraction, et géométries d'instrument utilisées et analysées en même temps.

Les données de diffraction de rayon X, synchrotron, neutron, peuvent être affinées.

➤ L'affinement des diagrammes est effectué en deux modes soit automatique, soit en mode manuel ; le mode automatique appelé « magicien » permet à l'utilisateur de sélectionner le genre d'analyse à exécuter : analyse quantitative de phase, analyse de structure du matériau ou analyse de texture.

➢ beaucoup de méthodologies différentes peuvent être ajoutées au programme par l'utilisateur sans connaître nécessairement la structure interne du programme. Par exemple : la géométrie de l'instrument utilisée, la correction, calibrations, les formats de données, les algorithmes de texture, l'extraction des intensités des pics, etc.

➢ introduire dans la base de données en même temps de nombreuses phases de l'échantillon, des instruments et des ensembles de données etc.

Importer les formats CIF (les fichiers d'informations d'un cristal)

Supporter de multiples formats : par exemple, GSAS, D1B. Pour lire les données de D20, il suffit de suffit de choisir un format compatible des fichiers.

Chapitre II : Méthode de caractérisation de la reconstruction osseuse par diffraction neutronique et rayonnement synchrotron à partir de l'analyse de la texture cristallographique

La seule vraie limite de MAUD est la mémoire de l'ordinateur. Dans notre étude, nous avons traité conjointement 360 diagrammes de diffraction collectés sur D20 et 684 diagrammes de diffraction collectés sur ID15B. Pour affiner simultanément tous ces diagrammes, l'ILL dispose de machines de dernière génération, l'affinement de chacun des diagrammes, de diffraction a nécessité entre 2 et 5 heures.

6. Caractérisation de la texture de l'os cortical par diffraction de neutrons 6.1. Introduction

L'analyse de la texture par la diffraction des neutrons a été appliquée pour la première fois par Brockhouse [20], afin d'essayer de déterminer la structure magnétique d'un acier. Les études de texture par diffraction neutronique sont bien développées avec l'arrivée des nouvelles générations des réacteurs à haut flux comme l'ILL [21,22]. La distribution de longueur d'onde du neutron thermique est un large spectre avec une crête à 1 et 2Å. L'inconvénient principal des neutrons est que l'interaction avec la matière est faible, et de longs temps de comptage sont nécessaires. L'interaction faible est cependant un avantage car elle permet à la fois une pénétration élevée et une faible absorption, rendant la diffraction des neutrons appropriée aux analyses de texture en profondeur [23]. En raison de la faible absorption, des équipements annexes (chauffage, refroidissement, contraintes) peuvent être utilisés pour l'observation *in situ* des changements de texture. Une expérience conventionnelle d'analyse de texture par diffraction de neutrons, emploie le rayonnement monochromatique produit par un monocristal. Un goniomètre permet de couvrir la gamme entière d'orientation angulaire. Un PSD permet l'enregistrement du diagramme complet de diffraction.

La technique de la mesure de la texture doit être mise en place afin de caractériser l'HAp dans l'os cortical prélevé sur des animaux à l'interface os-implant. L'étude de l'interface os-implant nécessite l'utilisation d'une fente pour définir la taille du faisceau de neutrons et doit être conservée dans toutes les positions des angles χ et φ . Cette fente doit être alignée avec le centre de berceau d'Euler, dans l'axe de l'échantillon et le faisceau primaire. Le schéma suivant montre la fente installée au centre de berceau d'Euler, l'épaisseur est ajustable suivant le volume de l'échantillon désiré.



Figure 5 : la fente en cadmium $(0,5 \times 9mm^2)$ placée sur le berceau d'Euler

Pour vérifier l'utilité et l'intérêt expérimental de ce masque, nous avons préparé un bloc osseux constitué de deux cubes d'os cortical prélevés dans le même tibia du bœuf. Les deux morceaux ont été collés pour former un seul échantillon d'os $(10 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3)$ avec deux orientations préférentielles déjà connues au départ de l'expérience selon la figure 6.





La structure osseuse a été placée dans le berceau d'Euler. Nous avons procédé à un balayage à l'interface des deux cubes d'os. La taille du faisceau est 1mm×9mm et la longueur d'onde λ = 2.41 Å. Le bloc osseux ensuite a été tourné avec un pas identique en φ et en χ , $\Delta \varphi = \Delta \chi = 10^{\circ}$, avec φ à partir de 0° à 360° et χ de 0° à 90°, avec des conditions expérimentales exigeant que ω soit constante à 90°. L'acquisition de données a été faite au cours du mouvement φ . Pour chaque degré de rotation, le moteur s'arrête pour une durée de temps constante selon un cycle de rotation φ de 10°, l'acquisition accumulée pendant ces dix étapes de mouvement de moteur est attribuée à l'angle moyen de rotation de φ . Cette méthode permet de gagner une heure de temps mort normalement dépensé sur le mouvement du moteur et sans perdre l'information sur les orientations des cristaux d'HAp. Pour tracer une figure de pôle complète, il faut environ 6 heures d'acquisition pour chaque tranche de 1 millimètre du tibia.

L'échantillon, placé sur l'instrument D20, est en géométrie de réflexion qui est définie par :



figures 8 et 9 présentent les diagrammes de diffraction de la structure osseuse à $\chi=90^{\circ}$ et $\chi=0^{\circ}$



Figure 8 : Diagramme de diffraction à $\chi = 0^{\circ}$



Les figures 8 et 9 montrent clairement l'existence de la texture dans l'os cortical suivant le plan (002).

La figure 10 représente l'affinement de Rietveld de la somme de tous les diagrammes de diffraction de la structure osseuse (360 diagrammes).



Figure 11 : Les figures de pôles de l'os du bœuf montrent la présence de texture).



Pour montrer le changement de la texture à l'interface des deux structures osseuses, les trois algorithmes, harmonique, WIMV et E-WIMV ont été utilisés pour décrire la texture, les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 1, 2 et 3, les figures en haut sont à 1mm de l'interface et en bas à –1mm de l'interface (l'échelle est normalisée).

6.2. La méthode harmonique





6.3. La méthode WIMV





6.4 La méthode E-WIMV

Tableau 3 : Figures de pôle tracées en utilisant la méthode E-WIMV



Toutes les méthodes utilisées (harmonique, WIMV et E-WIMV) confirment le changement de l'orientation préférentielle à l'interface des deux morceaux d'os collés.

Les facteurs de confiance de l'affinement Rietveld de tous les diagrammes de diffraction sont donnés dans le tableau 4.

Méthode	R_{wp} %	$R_p \%$	R_{wpb} %	R_{pb} %
Harmonique	10,6	8,5	14,2	11,1
WIMV	10,5	8,5	14	11
E-WIMV	1,4	0,9	2,4	1,7

Tableau 4 : les facteurs de confiance des trois méthodes

R_{wp}: *Facteur de profil pondéré*

R_p : *Facteur de profil non pondéré*

 R_{wpb} : Facteur de profil pondéré (sans bruit de fond)

 R_{pb} : Facteur de profil non pondéré (sans bruit de fond)

Le tableau 4 montre que la méthode la plus appropriée pour l'étude de la structure de l'os est la méthode de E-WIMV.



Figure 12 : Figures de pôle inverses de l'os cortical

6.5. Conclusion

Nous pouvons constater, d'après les résultats des différentes figures de pôle présentées dans les tableaux 1, 2 et 3, que le volume analysé à l'aide des fentes en cadmium est caractéristique des évolutions de la texture de la structure osseuse sans interactions des autres parties de l'os [24]. Cette méthode d'analyse va nous permettre de suivre la reconstruction osseuse avec une résolution de 0,5 mm à partir de l'interface os-implant de l'os cortical.

7. Caractérisation de la texture osseuse par rayonnement synchrotron

7.1. Introduction

L'utilisation du rayonnement synchrotron dans l'étude de la texture est relativement récente. Elle correspond à l'arrivée des sources de troisième génération et les détecteurs bidimensionnels au milieu des années 90. Le rayonnement synchrotron à haute énergie possède une brillance élevée et permet de mesurer la texture avec une résolution élevée en utilisant la géométrie en transmission [25]. Ceci permet des mesures de texture en résolution spatiale élevée. La taille réduite de rayonnement synchrotron permet de caractériser la texture locale [26]. ID15B est équipé d'un détecteur bi-dimensionnel qui permet de tracer une figure de pôles en moins d'une heure pour nos différents échantillons.

7.2. Etude de la texture de l'os cortical sur ID15B

7.2.1. Introduction

Nous avons conservé le même échantillon d'os cortical caractérisé sur D20 afin de comparer les mesures entre ID15B à l'ESRF et D20 à l'ILL. ID15B est équipé d'un détecteur bi-dimensionnel. Il suffit simplement de contrôler la rotation de l'échantillon suivant l'axe principal de rotation Z. Les conditions expérimentales sont : la taille de faisceau fixée à 350μ m× 350μ m, λ =0.14Å et la distance échantillon détecteur est 766,9 mm, pour chaque image le temps d'acquisition est 120s.

7.2.2. Résultats et discussions

Sur ID15B l'échantillon est placé en géométrie de transmission définie par le montage de l'échantillon est réalisé selon la figure 15.



Figure 13 : géométrie en transmission

L'image enregistrée sur le détecteur est représentée sur la figure 14 :



Figure 14 : l'image constituée par les anneaux de Debye

L'image enregistrée dans la figure 14, nous montre que l'intensité du plan (002) n'est pas constante. Cette variation d'intensité est due à la distribution des cristaux d'HAp dans l'os cortical. Afin de tracer les figures de pôle, les anneaux de Debye ont été intégrés pour toutes les positions de φ mesurées suivant l'axe Z, avec φ compris entre 0° et 180°, le pas de φ est : 10°. Le temps d'acquisition pour chaque pas de φ est de 2 minutes dans notre cas pour chaque image enregistrée. Pour avoir une figure de pôles complète, le temps d'acquisition total est : 2 minutes ×19 (pas de φ) ≈ 40 minutes en ajoutant le temps mort de déplacement des moteurs.



Figure 15 : Intégration des anneaux de Debye



Figure 16 : Affinement Rietveld sans texture de la somme de tous les diagrammes de diffraction $R_w(\%) = 14.78$



Figure 17 : Affinement Rietveld avec la texture de la somme de tous les diagrammes de diffraction $R_w(\%) = 4.81$

Après affinement simultané de tous les diagrammes de diffraction par la méthode E-WIMV, nous avons tracé les figures de pôle des plans (111) et (002) ainsi que les figures de pôle inverses (figures 18 et 19).



Figure 18 : Figures de pôle de l'os cortical du bœuf



Figure 19 : Figures de pôle inverses de l'os cortical du bœuf

7.2.3. Conclusion

L'étude par rayonnement synchrotron a montré l'existence de l'orientation préférentielle de l'HAp dans l'os cortical. Les figures de pôle tracées confirment la texture de fibre caractéristique de l'os et déjà mesurée par le technique de la diffraction des neutrons. La taille du faisceau utilisée sur ID15B est plus petite par rapport à celle utilisée sur D20 et permet de caractériser une texture locale de cristaux d'HAp pour la figure de pôle (002).

7.3. Conclusion générale

Nous avons pu, durant ce chapitre, mettre en place la méthode de caractérisation de la texture de l'os cortical par les techniques de diffraction neutronique et de rayonnement synchrotron. Les travaux de caractérisation à l'aide de la diffraction de neutrons ou de rayonnement synchrotron nous montrent clairement l'existence d'une texture de fibre dans l'os cortical suivant l'axe principal de la force appliquée par le poids de l'animal. Les facteurs de confiance de l'affinement Rietveld de tous les diagrammes de diffraction ont montré que la méthode E-WIMV est la mieux adaptée pour décrire l'orientation préférentielle de l'os cortical. L'utilisation d'une taille de 350 µm pour la sonde de rayonnement de synchrotron est bien adaptée pour une analyse de texture locale dans l'os cortical. Nous avons également confirmé par rayonnement synchrotron que le seul plan peu affecté par la texture est le plan (111) qui permet l'étude de l'indice de cristallinité.

Chapitre II : Méthode de caractérisation de la reconstruction osseuse par diffraction neutronique et rayonnement synchrotron à partir de l'analyse de la texture cristallographique

Les résultats obtenus nous permettent d'étudier la distribution des cristaux d'HAp dans le nouvel os reconstitué à l'interface os-prothèse. Notre étape suivante est de caractériser le réarrangement des cristaux à l'interface os-implant après la reconstruction osseuse. L'implant est composé d'un alliage de Ti avec une première face en contact avec l'os et revêtue d'une couche d'HAp de 80 µm et une autre face non revêtue.

Notre travail consistera à caractériser cette interface os-implant.

REFERENCES

- [1] H. Sitepu, Assessment of preferred orientation with neutron powder diffraction data, J. *Appl. Cryst.* (2002), 25274-277
- [2] H.-R. Wenk and S. Grigull, Synchrotron texture analysis with area detectors, J. Appl. Cryst. (2003). 36, 1040-1049
- [3] H-R Wenk and P Van Houtte, Texture and anisotropy. *Rep. Prog. Phys.* (2004). **67**, 1367-1428.
- [4] H.-R. Wenk, L. Cont, Y. Xie, L. Lutterotti, L. Ratschbacher and J. Richardson, Rietveld texture analysis of Dabie Shan eclogite from TOF neutron diffraction spactra. J. Appl. Cryst. (2001). 34, 442-453
- [5] G. E. Bacon and A. E. Goodship, the orientation of the mineral crystals in the radius and tibia of the sheep, and its variation with age, *J. Anat. (1991).* **179**, *15-22*
- [6] H.J. Bunge, Texture-the key to physics in polycrystalline matter. *Materials Science Forum* (1998). 273, 3-14
- [7] Texture Analysis with a Position Sensitive detector, Edited by H. J. Bunge (1996)
- [8] K. El Ghazouli, Nouvelle méthode d'analyse, par la diffraction des rayons X, des variations de texture dans les couches minces. Thèse de l'Institut supérieur de génie mécanique et productique, Metz (1998)
- [9] H. Chaouni Benabdallah, Etude de l'évolution de la texture cristallographique des couches minces de cuivre et de tellurure de bismuth en fonction des conditions d'électrodéposition. Thèse de l'Institut supérieur de génie mécanique et productique, Metz (1995)

[10] Caglioti G., Paoletti A., Ricci F P., Choice of collimators for a crystal spectrometer for neutron diffraction. Nuclear Instruments, (1958) **3**, 223

- [11] H. M. Rietveld, A profil refinement method for nuclear and magnetic structures, J. Appl. Cryst. (1969) 2, 65.
- [12] H. J. Bunge and C. Esling, The harmonic Method. Dans "Preferred Orientation in Deformed Metals ansd Rocks: An Introduction to modern Texture Analysis" pages: 109-119, *Edited by H. R. Wenk*
- [13] S. Matthies, G. W. Vinel, Physica Status Solidi B (1982). 112, K111-K114
- [14] Matthies S., Wenk H. –R (1985). In "Preferred orientation in deformed metals and rocks: an introduction to modern texture analysis", H. –R. Wenk editor, Academic Press inc. pp 139-147
- [15] K. Pawlik, Materials Science Frum, (1993). 133-136, 151-156
- [16] H. Schaeben (1991). In "Advances and applications of quantitative texture analysis", H.-J. Bunge, C. Esling, Eds. DGM. Oberusel, Germany, pp 109-118.
- [17] L. Cont, D. Chateigner, L. Lutterotti, J. Ricote, M.L. Colzada, J. Mendiola, *Ferroelectrics*, (2002). 267, 323-328.
- [18] M. Morales, D. Chateigner, L. Lutterotti, J. Ricote, *Materials Sciences Forum*, (2002).
 408-412, 1055-1060.
- [19] H. Sitepu, W.W. Schmahl, R.b. Von Dreele, Use of the generalized spherical harmonic model for describing crystallographic texture in polycrystalline NiTi shape-memory alloy with time-of-flight neutron powder diffraction data, *Appl. Phys. A*, (2002). 74, *S1677*.
- [20] B. N. Brockhouse, Phys. Rev., (1953). 94, 781.

- [21] D. Chateigner Ed.: Combined analysis: structure-texture-microstructure-phase-stressesreflectivity analysis by x-ray and neutron diffraction. (2004), http://www.ecole.ensicaen.fr/~chateign/texture/combined.pdf
- [22] Gertel-Kloos, H.G. Brokmeier, H.J. Bunge, High temperature in situ texture measurements at the neutron powder diffractometer D1B. *Journal of materials science letters*, (1994). 13, 547-550
- [23] M. Birsan and J.A. Szpunar, Extinction and grain-size anisotropy correction of texture data obtained using neutron diffraction. J. App. Cryst. (1998). 31, 163-168
- [24] A. Benmarouane, T. Hansen and A. Lodini, Heat treatment of bovine bone preceding spatially resolved texture investigation by neutron diffraction. *Physica B*, (2004). 350, *E611-E614*
- [25] O.V. Mishin, E.M. Lauridsen, N.C. Krieger Lassen, G. Brückner, T. Tschentscher, B. Bay, D. Juul Jensen and H. F. Poulsen, Application of high-energy synchrotron radiation for texture studies. J. Appl. Cryst. (2000). 33, 364-371
- [26] F. Heidelbach, C. Riekel and H-R. Wenk, Quantitative texture analysis of small domains with synchrotron radiation X-rays, J. Appl. Cryst. (1999). 32,841-849.

Chapitre III :

Application de la méthode de caractérisation de la texture en reconstruction osseuse

Chapitre III Application de la méthode de caractérisation de la texture en reconstruction osseuse

1. Introduction

Notre méthode de caractérisation de la texture et de la cristallinité, qui utilise la technique de la diffraction de neutrons et de rayonnement synchrotron en haute résolution spatiale trouve son application en implantologie. Sur le plan mécanique, le succès de la reconstitution osseuse autour des prothèses dentaires ou orthopédiques dépend alors directement de la distribution des orientations des cristaux d'HAp de l'os reconstitué après l'implantation.

La détermination de la texture de l'os reconstitué en contact avec l'HAp qui est utilisé soit comme biomatériau de comblement ou comme prothèse implantaire apporte pour la première fois une analyse quantitative de la reconstitution osseuse. La distribution des cristaux d'HAp dans ce nouvel os doit alors conserver l'orientation préférentielle de l'os d'origine afin qu'il n'y ait ni instabilité ni perturbation mécanique qui augmente le risque de non-ostéointégration du biomatériau par le corps.

Nous allons appliquer notre nouvelle méthode de caractérisation dans deux domaines d'utilisation d'HAp en reconstruction osseuse:

Premièrement : pour caractériser l'HAp utilisé comme biomatériau de comblement avant et après la reconstruction osseuse. Deuxièmement : pour caractériser le nouvel os à l'interface os-implant, l'implant est le Ti-6Al-4V qui possède seulement une seule face revêtue d'une couche d'HAp.

2. Analyse de l'HAp comme matériau de comblement

Plusieurs laboratoires de recherches ont montré le potentiel des cellules souches, Bone Marrow Stromal Cells (BMSC), dans la régénération osseuse. Une quantité considérable de publications a mis en évidence les applications potentielles thérapeutiques de ces cellules [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14]. Une fois implantée *in vivo*, les BMSC semblent reconstituer l'os : à condition d'utiliser un support d'HAp synthétique suffisamment poreux pour former le tissu osseux. Le support en géométrie tridimensionnelle fournit un site de fixation des cellules et peut agir en tant qu'amorce pour la formation de nouveaux foyers de matrice osseuse. Afin d'optimiser le procédé de régénération de l'os, il faut cependant avoir une connaissance détaillée des propriétés structurales et du mécanisme de croissance du tissu nouvellement formé au cours de l'implantation.

Nous allons étudier l'évolution de la texture du biomatériau mis en nourrice sous le derme de la souris. Cette caractérisation va nous permettre de vérifier s'il y a une reconstruction osseuse durant la croissance du tissu reconstitué et d'obtenir ainsi les propriétés structurales de cet os nouvellement formé.

2.1 Protocole expérimental

Le protocole expérimental consiste à prélever des cellules souches de l'embryon du mouton, puis les introduire à l'intérieur d'un support d'HAp poreux (5×5×5mm³). L'échantillon constitué du support d'HAp avec les cellules souches est implanté sous le derme d'une souris pour se retrouver dans un milieu vivant qui permet aux cellules de l'échantillon de se nourrir. Ce milieu permet la régénération d'HAp dans le support afin de former un matériau osseux durant les trois mois de l'implantation. Le but de ce protocole est de prélever ce biomatériau après trois mois d'implantation pour l'employer comme biomatériau de comblement et de remplacement afin de réparer des déformations ou pertes osseuses. Ce travail a été effectué par l'équipe de recherche de l'Istituto di Scienze Fisiche Universita Degli Studi di Ancona (Italie) sous la direction du Pr. F. RUSTICHELLI. Nous allons utiliser notre méthode de caractérisation de la texture de l'échantillon avant chargement avec les cellules BMSC et après implantation sur la souris. Le but de cette expérience est d'observer la possibilité d'une orientation préférentielle du tissu osseux reconstitué.

2.2 Résultats et discussions

L'échantillon avant implantation qui ne contient donc pas du BMSC a été étudié selon la technique d'analyse de texture développée dans le chapitre 2. La taille du faisceau est $(0.5 \times 9 \text{ mm}^2)$ la longueur est 2,4Å.

L'affinement Rietveld en utilisant le programme MAUD de la somme de 360 diagrammes de diffraction de l'échantillon est donné dans la figure 1



Figure 1 : Affinement Rietveld de l'échantillon

L'affinement simultané des 360 diagrammes permet de tracer les figures de pôles de l'échantillon (figure 2).

Reconstructed pole figures



Figure 2 : les figures de pôles de l'échantillon

Le biomatériau chargé en BMSC a été extrait après deux mois d'implantation. L'échantillon a été préparé par traitement thermique selon la technique décrite dans le chapitre 2. L'affinement Rietveld qui utilise le programme MAUD de la somme de tous les diagrammes est donné dans la figure 3 :



Figure 3 : Affinement Rietveld de l'échantillon après avoir été implanté en nourrice

L'affinement des 360 diagrammes de diffraction permet de tracer les figures de pôles (figure 4).



Nous n'observons aucune texture significative sur les figures de pôle tracées avant et après la reconstitution osseuse. La distribution des cristaux de l'HAp du nouveau tissu osseux reconstitué ne suit pas de direction préférentielle. Les résultats de l'affinement des différents diagrammes de diffraction montrent également qu'il n'y a pas de changement structural de l'HAp après l'implantation.

Pour analyser la qualité du tissu formé après la reconstruction osseuse, nous avons déterminé le rapport d'intensité du pic (111) peu sensible à l'effet texture et du pic (002) très sensible à la texture pour l'ensemble des 360 diagrammes mesurés.

	Rapport d'intensité (111)/(002)
Avant l'implantation	1.08
Apres l'implantation	1.10

Tableau 1 : le rapport de l'intensité du pic (111) sur (002)

On observe, d'après le tableau 1, qu'il n'y a pas une différence significative de la qualité du tissu reconstitué après l'implantation.

2.3 Conclusion

La reconstruction osseuse du biomatériau sous le derme de la souris ne présente aucune texture, ceci est dû principalement à deux paramètres :

➤ après deux mois d'implantation la quantité du tissu est faible et ne permet pas de visualiser une grande différence.

➢ le biomatériau a été implanté sous le derme du souris, ce milieu n'est pas mécaniquement sollicité, c'est pourquoi la quantité des cristaux reconstitués ne présente aucune orientation préférentielle significative.

3. Analyse de l'HAp comme matériau d'implantologie3.1 Introduction

Le succès du biomatériau utilisé en implantologie dépend nécessairement de l'interface entre l'implant et l'os, donc de l'os reconstitué après plusieurs mois d'implantation. Parmi de nombreux paramètres biologiques, sur le plan mécanique, la durée de vie de l'implant dépend de la distribution des cristaux de l'HAp de l'os régénéré à l'interface implantaire. L'orientation de ces cristaux reconstruits devrait respecter l'orientation préférentielle des cristaux de l'os d'origine. L'intérêt de ce protocole est de vérifier l'effet du revêtement implantaire par une couche d'HAp sur les propriétés des cristaux de l'os reconstitué. Nous allons utiliser un implant en Ti-6Al-4V parallélépipédique dont une des faces a été revêtue par un dépôt d'HAp en espérant observer un comportement différent de la distribution des cristaux d'HAp dans l'os entre la face revêtue et la face non revêtue.

3.2. Protocole expérimental

Notre protocole consiste à utiliser le Ti-6Al-4V comme implant avec une seule face revêtue d'HAp en contact avec l'os. Le revêtement d'une couche d'HAp de 80 µm a été effectué par torche plasma selon la méthode décrite dans le chapitre 1. L'extraction des échantillons de l'os avec l'implant a été effectuée après plusieurs mois pour observer l'effet de la durée d'implantation. L'effet du poids de l'animal pourrait aussi intervenir en changeant le comportement de la distribution des cristaux de l'os reconstitué. Pour mettre en évidence ce paramètre, nous avons choisi d'implanter deux animaux différents le lapin et le mouton. L'implant se trouve sollicité selon deux forces distinctes, dues aux poids des deux animaux.

3.3 Analyse de l'HAp sous faible charge

3.3.1 Matériel et méthodes

3.3.1.1 Les animaux

Nous avons choisi le lapin comme modèle animal. Trois lapins albinos ont été utilisés de race New-Zealand (ESD@). Les animaux, tous de sexe masculin, âgés de 20 à 22 semaines, pesaient entre 3,5 et 4 kilos au départ de l'expérimentation. Les animaux ont été élevés dans des conditions adéquates de température, de ventilation, d'hygrométrie et en cages individuelles conformément à la réglementation relative aux animaux de laboratoire. La lourdeur de l'expérimentation limite le nombre d'animaux. Nous avons implanté trois animaux, pour obtenir en cas de perte au moins deux lapins pour nos expériences.

3.3.1.2 Le Biomatériau

Il s'agit de parallélépipède de Ti-6Al-4V avec une face revêtue d'HAp et la face opposée non revêtue.



Figure 5 : la géométrie de l'implant utilisé

3.3.1.3. Implantation des biomatériaux

L'implantation a été faite au sein du laboratoire de l'Equipe Biomatériaux en Site Osseux (EBSO) UMR CNRS 6511, Rennes, par Dr. J.-C LAMBOTTE.

Le protocole opératoire est adapté a celui précédemment utilisé dans le laboratoire. Pour l'implantation de biomatériau en site tibial chez le lapin. Après identification, l'animal est anesthésié par une injection intramusculaire dans la fesse de 3,5 ml de Ketalar@ (seringue 5 ml). L'animal est reconduit dans sa cage pour une durée de 10 minutes. La face latérale droite du genou est rasée. La désinfection cutanée est effectuée à l'Hibitane@. La patte est passée dans un champ fenêtré stérile. Une anesthésie locale est réalisée jusqu'au périoste à la Xylocaïne® 1 %.

L'incision, longitudinale, est centrée sur la zone métaphysaire. La progression à travers le plan musculaire est effectuée à l'aide d'une rugine. Un tendon de petite taille doit parfois être sectionné. Un écarteur autostatique est alors mis en place permettant d'exposer la face antéro-externe du tibia. Le forage du site d'implantation est réalisé avec une fraise osseuse de 2 mm de diamètre. La vitesse de rotation utilisée est faible pour éviter un écrasement et un échauffement des travées osseuses. L'implant est mis en place. La bonne coaptation du biomatériau est vérifiée. La suture de l'aponévrose d'une part et de la peau d'autre part est réalisée par un surjet de Vicryl®. Le tibia gauche est abordé avec la même technique et selon le même protocole. L'animal est reconduit dans sa cage.

3.3.1.4 Durée d'implantation

Le but de ce travail étant d'étudier la reconstitution osseuse à l'interface avec l'implant, l'expérimentation doit donc durer plusieurs semaines. Les durées d'implantation sont de 20, 40 et 60 jours. Les trois animaux ont été implantés en même temps.

3.3.1.5 Surveillance post-opératoire

Pour chaque animal, une fiche individuelle de surveillance est réalisée. Toutes les anomalies de comportement, la consommation de nourriture et la capacité à utiliser leurs pattes arrière y sont reportées. En outre, une pesée régulière de chaque animal est effectuée ainsi qu'un examen attentif des sites opératoires.

3.3.1.6 Extraction des échantillons

Finalement, nous n'avons pu étudier que deux animaux, car un lapin est décédé d'hémorragie interne 48 heures après implantation. L'implant a été prélevé et le site d'implantation est présenté figure 6. Nous avons choisi de retirer de notre protocole le sacrifice à 20 jours.

Après 40 et 60 jours d'implantation, les implants on été extraits avec l'os qui les entourent.



Figure 6 : Le site d'emplacement de l'implant dans le tibia du lapin



Figure 7 : La géométrie de l'échantillon placé au centre du berceau d'Euler

Avant de commencer l'expérience par la diffraction de neutrons sur D20, la partie organique a été éliminée de l'os suivant la procédure décrite dans le chapitre 1. Cette fois-ci, à cause de la taille de l'échantillon, le temps de traitement thermique dans le four a été réduit à vingt minutes.

3.3.2. Résultats

L'os avec son implant a été balayé avec un faisceau de neutrons jusqu'à 4,5 mm de la face revêtue d'HAp, la procédure est respectée pour l'autre face non revêtue, la taille était de 0.5×9 mm², $\lambda=2,4$ Å. En utilisant les mêmes paramètres qu'avec l'os bovin, l'affinement de Rietveld de la somme de 360 digrammes de diffraction a donné le résultat suivant :



Figure 8 :L'affinement Rietveld de la somme de 360 diagrammes, $R_w = 8,5\%$

Nous affinons en suite la texture des 360 diagrammes de diffraction simultanément en introduisant la méthode E-WIMV. Les figures de pôles obtenues d'une couche $(0.5 \times 9 \text{ mm}^2)$ d'os du lapin à distance de l'implant.



Les figures de pôles tracées à 0mm de deux faces de l'implant sont données dans les figures suivantes :



Figure 10 : Figures de pôles tracées à 0mm de la face non recouverte



Figure 11 : Figures de pole tracées à 0 mm de la face recouverte d'HAp

L'indice de cristallinité calculé d'après l'intensité des plans (111) de la somme des 360 diagrammes en fonction de la distance de l'implant et suivant la face revêtue ou non revêtue d'HAp est donné dans la figure 12.



Figure 12 : L'indice de la cristallinité du plan (111) en fonction de la distance de l'implant

L'indice maximum de texture des plans (002) en fonction de la distance à partir de l'interface est donné dans la figure 13. Le rapport de la cristallinité sur l'indice de texture est représenté dans la figure 14.



Figure 13 :L'indice de la texture du plan (002) en fonction de la distance de l'implant



Figure 14 : rapport de l'indice de la cristallinité sur l'indice de la texture

3.3.3 Discussions

Les figures 12 et 13 montrent que les cristaux d'HAp dans l'os se comportent différemment suivant la face de contact avec l'implant, cette différence est due à l'existence ou non de l'HAp qui a revêtu la prothèse.

Dans la figure 12 et si on se limite à +/- 2 mm de l'implant, la cristallinité d'HAp est très intense que ce soit à 40 ou 60 jours d'implantation en contact avec la face revêtue par rapport à la cristallinité observée sur l'autre face non revêtue. Sur la face non revêtue d'HAp après 60 jours d'implantation, la cristallinité devient moins intense par rapport à 40 jours. La face non revêtue ne permet pas jusqu'aux jours d'extraction des échantillons à l'os de se reconstruire sur la surface. D'autre part, sur l'autre face, revêtue d'HAp, après 60 jours d'implantation, la cristallinité est plus intense par rapport à 40 jours d'implantation.

La texture d'HAp dans l'os aussi dépend de la face de l'implant, la figure 13 est similaire à celle de la cristallinité, mais indique bien que l'indice maximum de texture de la figure de pôle (002) est très intense en contact avec la face non revêtue. Nous observons aussi que la distribution des cristaux d'HAp présente la même orientation préférentielle en contact avec les deux faces de l'implant.

3.3.4 Conclusion

Les résultats indiquent que les cristaux d'HAp recherchent un état stable afin d'intégrer l'implant mais ceci d'une manière différente. Cette différence est due à la surface de l'implant en contact avec l'os, selon qu'elle est revêtue on non d'HAp. La période de l'extraction des os joue un rôle très important à ce niveau en déterminant le niveau de la reconstitution osseuse à l'interface avec l'implant.

Nous pouvons conclure de la figure 4 que :

L'os présente à l'interface différents comportements de l'implant dont deux en particulier :
• L'implant non revêtu favorise l'indice de texture de l'orientation des cristaux d'HAp de l'os mais pas la cristallinité. Nous pouvons considérer que cette fixation est encore instable à la date du sacrifice.

• L'implant revêtu favorise la cristallinité d'HAp dans l'os mais pas l'indice de texture de l'orientation des cristaux. La fixation mécanique semble plus stable à la date du sacrifice.

Donc l'implant revêtu peut améliorer de manière significative l'intégration des implants [15].

Notre étude en résolution spatiale par la diffraction de neutrons, a pu confirmer l'intérêt de revêtir les implants par une couche d'HAp, les figures de pôle tracées à 0 mm de chaque face de l'implant montre bien qu'il y a une seule orientation préférentielle.

3.4 Analyse de l'HAp sous forte charge

3.4.1 L'animal

L'implantation du mouton a été faite au laboratoire Pius Branzeu Center of Laparoscopic Surgery and Microsurgeru en Roumanie, sous la direction du Pr. Dr. Stefan I. DRAGULESCU.

Le mouton utilisé pour notre travail était de sexe masculin, adulte et pesait 38kg. Les implants ont été chirurgicalement placés pendant 60 jours avant le sacrifice de l'animal et dans des conditions stériles.

Pendant toute la période située entre l'implantation et l'extraction de l'os avec les implants (60 jours), l'animal a été maintenu dans un box isolé, doté de l'air conditionné et a reçu une alimentation standardisée. L'état de santé de l'animal a été soigneusement évalué et surveillé. Aucun signe clinique de pathologie n'a été observé et aucune perte de poids n'a été remarquée.

3.4.2 Implantation des éprouvettes

Le mouton a été opéré avec le benzodiazepine (® de Dormicum) 0.2 mg/kg et Kétamine (® de Calypsol) 15 mg/kg. Après induction avec du barbiturate (® de Thiopental) 6-7 mg/kg, le mouton a été anesthésié par halothane (® de Narcotan) et oxygène. Un abord intraveineux est placé au membre antérieur et une perfusion saline mise en route. Une injection de cephamandol, de cephalosporine (® de Mandol) (1 g) est donnée en intraveineuse.

L'animal est placé sur son dos. La cuisse et la jambe inférieure du mouton ont été rasées et la fourrure a été enlevée avec un aspirateur. Le champ opératoire est nettoyé et préparé avec des solutions antiseptiques.

Deux incisions longitudinales séparées, de 5 centimètres de long, sont faites sur la face ventrale au tiers proximal de la jambe inférieure. La corticale de la tête tibiale est exposée et le périoste est éliminé sur une surface de 20 mm de long sur 5mm de large. Une scie oscillante réalise les fentes longitudinales. L'implant stérile, préalablement rincé en solution saline, est inséré dans la fente osseuse. La fermeture du site implantaire est effectuée en deux plans : un plan profond avec une suture résorbable et un plan cutané avec une suture nylon.



Figure 15: Les deux sites d'implantation dans le tibia du mouton



Figure 16 : l'implant utilisé



Figure 17 : l'implantation des biomatériaux

Après sacrifice et découpe de la tête tibiale, les échantillons sont fixés et maintenus dans l'alcool. Ce type de conservation préserve les morceaux d'os de toute contamination pendant la manipulation des spécimens.

3.4.3. Résultats

L'os du mouton avec son implant a été découpé. Les sections sont présentées dans la figure 18.



Figure 18 : les échantillons utilisés, à droite : la face revêtue d'HAp, à gauche : face non revêtue

L'échantillon d'os avec son implant a été placé dans le berceau d'Euler. Nous avons conservé le protocole expérimental utilisé sur D20 présenté dans le chapitre 2.

Les figures de pôles tracées de l'os cortical du mouton:



Figure 19 : Figures de pôles de l'os loin de l'interface

Nous présentons dans le tableau 2 et 3 les figures de pôle (111) et (002) de chaque face de l'implant.



Tableau 2 : Figures de pôles tracées dans la face non revêtue d'HAp



Distance de l'implant en (mm)	Les figures de pôle
0	111 002 -1 mrd 0.42
0.5	111 002 -1 mrd 0.5
1	111 002 -1 mrd 0.42
2	2.39 -1 mrd 0.46

Tableau 3 : Figures de pôles 111 et 002 de la face couverte d'HAp



Nous présentons dans les figures 20 et 21, les figures de pôle inverses à 0 mm de chaque face de l'implant.



Figure 20 : Figures de pôle inverses à 0 mm de l'interface avec la face non revêtue d'HAp



Figure 21 : Figures de pôle inverses à 0 mm de l'interface avec la face revêtue d'HAp

Après une normalisation par rapport à la quantité de matériau analysé dans le faisceau de neutrons, nous traçons l'indice maximum de texture du plan (002) et l'indice de cristallinité en fonction de la distance de l'implant :



Figure 22 : Indice de la texture du plan (002) en fonction de la distance de l'implant couvert et non d'HAp



Figure 23 : Indice de cristallinité en fonction de la distance de l'implant

Nous observons d'après les figures de pôle présentées dans les tableaux 2 et 3 que Les cristaux d'HAp ont deux orientations différentes à l'interface avec l'implant. L'implant couvert d'HAp permet aux cristaux d'HAp dans l'os reconstitué à l'interface la possibilité de conserver l'orientation préférentielle de l'os, par contre, la face non revêtue d'HAp montre que les cristaux d'HAp changent complètement l'orientation préférentielle sur une épaisseur de 4 millimètres. Après 4 mm, nous avons retrouvé l'orientation préférentielle habituelle de l'os.

L'indice maximum de texture des plans (002) pour les deux interfaces a indiqué qu'à l'interface avec l'implant non revêtu d'HAp, l'orientation préférentielle est plus intense que l'autre face, une grande partie des cristallites de HAp dans le nouvel os reconstruit sont affectés par Ti-6Al-4V. Les cristaux d'HAp se développent dans une autre direction, la surface non couverte ne permet pas aux cristaux d'HAp de retrouver l'orientation initiale de l'os.

L'indice de cristallinité à l'interface avec l'implant revêtu d'HAp est plus grand que celui de la face non revêtue. Ceci s'explique par le fait que la face revêtue a procédé à une reconstitution osseuse plus efficace que sur la face non revêtue, donc l'os reconstruit à l'interface en présence d'HAp est plus cristallisé et donc plus stable que sur l'autre face. Les propriétés mécaniques du nouvel os sont affectées considérablement par le revêtement d'HAp.

3.4.4. Conclusion

Les tableaux 2 et 3, suggèrent que l'orientation des cristaux d'HAp dans l'os reconstruit à l'interface avec l'implant, dépend bien de la présence du revêtement de la face couverte d'HAp du titane. Si l'implant est revêtu d'HAp, les cristaux d'HAp préservent l'orientation préférentielle d'origine à l'intérieur de l'os. Si l'implant n'est pas revêtu, les cristaux changent d'orientation. Les propriétés mécaniques de l'os dépendent également de cette distribution des cristaux d'HAp. Ce changement de l'orientation préférentielle va créer certainement une perturbation à l'interface. Le nouvel os près de l'interface peut devenir instable. En conséquence, cette instabilité augmente le risque de perte de la prothèse implantaire.

La face revêtue d'HAp peut réduire de manière significative le taux de perte d'implants. L'HAp déposé sur alliage de titane représente donc une très bonne combinaison entre la biocompabilité et les propriétés mécaniques.

Cette étude de texture par diffraction de neutrons de l'os tibial du mouton à l'interface avec l'implant a indiqué qu'il est préférable de revêtir des implants d'HAp [16].

3.5 Conclusion générale

Notre méthode de caractérisation de la reconstitution osseuse par diffraction neutronique a trouvé une application intéressante en implantologie. Les résultats ont montré qu'il y a une grande différence entre la distribution des cristaux d'HAp entre l'implant revêtu d'HAp et le Ti-6Al-4V implanté seul. Les figures de pôles tracées de chaque côté de l'implant dans le tibia de lapin ou dans le tibia de mouton montrent clairement que le revêtement par une couche d'HAp permet aux cristaux d'HAp de l'os reconstitué de conserver l'orientation préférentielle d'origine de l'os.

L'indice de cristallinité par rapport aux plans (111) aussi est affecté par la face de l'implant. Il est plus grand en contact avec la face revêtue, donc les cristaux en contact avec la face revêtue sont plus cristallisés et donc plus stables par rapport aux cristaux de la face non revêtue.

Le choix du site de l'implantation et de l'animal peut aussi influencer les résultats. Nous avons observé qu'il n'y avait pas de texture après l'implantation du support chargé par des cellules souches prélevées sur mouton en nourrice sous le derme de la souris, ceci s'explique principalement par l'absence des forces appliquées sur le support. Les forces auraient pu influencer les cristaux d'HAp en leur donnant une direction préférentielle. Les résultats obtenus dans l'implantation du lapin et du mouton ont confirmé par la suite cet arrangement des cristaux d'HAp de l'os reconstitué, avec certaines différences car la force appliquée sur l'implant chez le lapin n'est pas de même niveau que chez le mouton. C'est pourquoi, chez le mouton, les cristaux d'HAp présentent deux orientations en contact avec la face non revêtue d'HAp, cela s'explique par la force exercée par le poids de l'animal sur l'implant. En implantologie, notre méthode a bien montré qu'il est préférable de revêtir les implants par une couche d'HAp afin de garantir une meilleure intégration et donc une durée de vie accrue de la prothèse.

Il nous reste à confirmer par diffraction de rayonnement synchrotron les résultats obtenus par la diffraction de neutrons.

3.6 Caractérisation de l'interface os-implant par le rayonnement synchrotron de haute énergie

3.6.1 Introduction

Nous avons utilisé le même échantillon d'os cortical déjà étudié par la diffraction de neutrons. Cette fois-ci, nous allons le caractériser par diffraction de rayonnement synchrotron afin de comparer les résultats des deux techniques.

3.6.2 Méthodes et résultats

Nous conservons le même protocole utilisé auparavant pour les os de bœuf sur ID15B à l'ESRF. La taille de faisceau est de $350 \times 350 \mu m^2$, le temps d'acquisition est de 2min pour chaque point. Pour tracer une figure de pôle complète, le temps d'acquisition total est 2min×19 (les pas de φ avec $\Delta \varphi$ =10°) =38min. Nous réalisons fait un balayage de 3mm à partir de l'implant et jusqu'à 5mm de chaque côté de la surface revêtue et non revêtue d'HAp.



Figure 24 : l'os avec l'implant monté sur ID15B

Dans les tableaux 4 et 5, nous présentons les résultats obtenus après l'intégration des anneaux de Debye et le traitement des données sur MAUD donne les figures de pôles tracées de chaque face de l'implant.

Distance de l'implant en (mm)	Les figures de pôle
0	111 002 1 mrd 0.33
0.3	111 002 -1 mrd 0.5
0.6	111 002 1.75 1 mrd 0.71

Tableau 4 : Figures de pôle de la face non couverte d'HAp

0.9	111 002 1 mrd 0.62
1.2	11 002 1.84 -1 mrd 0.63
1.5	111 002 1.85 1.85 1 mrd 0.45
1.8	2.09 1 mrd 0.52
2.1	111 002 1 mrd 0.48





Tableau 5 : Figures de pôles de la face revêtue d'HAp

Distance à partir de la face	Les figures de pôle
revelue en (mm)	
0	111 002 1 mrd 0.39
0.3	111 002 1 mrd 0.34
0.6	111 002 1 mrd 0.4







Après la normalisation par rapport à la quantité de la matière immergée dans le faisceau de rayonnement synchrotron, nous traçons l'indice texture de plans (002) et l'indice de cristallinité par rapport aux plans (111) en fonction de la distance des interfaces de l'implant revêtu et non revêtu.



Figure 25: L'indice de texture des plans



Figure 26 : l'indice de cristallinité des plans (111)

Nous traçons dans les figures 27 et 28, les figures de pôle inverses à 0 mm de chaque



Figure 27 : Figures de pôle inverses à l'interface avec l'implant non revêtue d'HAp



Figure 28 : Figures de pôle inverses à l'interface avec l'implant revêtue d'HAp.

3.6.3. Discussion

Les figures de pôles à l'interface os-implant de l'orientation d'HAp à l'intérieur de l'os reconstitué, montrent que l'HAp s'oriente différemment suivant la face en contact avec l'implant selon qu'elle est revêtue d'HAp ou non.

Face non revêtue :

Seule la figure de pôle (002) est affectée par l'orientation préférentielle d'HAp et jusqu'à 2,4 mm de l'implant la reconstitution osseuse présente deux orientations. Après 2,4mm de l'interface, on retrouve l'orientation unique déjà connue dans l'os.

Face revêtue :

La figure de pôle 002 indique une orientation préférentielle des cristaux d'HAp. Nous constatons une seule orientation préférentielle à partir de l'interface, la face revêtue permet aux cristaux d'HAp de préserver l'orientation préférentielle de l'os initial.

3.6.4 Conclusion

L'étude effectuée sur le tibia du mouton à l'interface os-implant en utilisant l'instrument ID15B à l'ESRF permet bien d'observer la différence de l'orientation préférentielle des cristaux d'HAp suivant le contact avec la face non revêtue et revêtue d'HAp. Nous remarquons que la face revêtue d'HAp permet la reconstitution osseuse en une seule direction de l'os, par contre, sur l'autre face, les figures de pôles montre deux orientations différentes. Ce changement d'orientations en absence de revêtement peut créer des perturbations à l'interface et rendre l'interface moins stable donc plus fragile ce qui peut faciliter le décollement de l'implant. Un tel décollement peut entraîner l'échec de l'ostéointegration et nécessite une réintervention chirurgicale.

3.7 Conclusion générale

Les deux techniques utilisées, diffraction de neutrons et diffraction de rayonnement synchrotron, pour la caractérisation de la partie minérale de l'os reconstitué à l'interface osimplant ont permis de caractériser l'orientation des cristaux d'HAp et de confirmer l'effet de la présence sur l'implant d'un revêtement d'HAp. La taille de faisceau de $0,35\times0,35$ mm² du rayonnement synchrotron utilisée sur ID15B a permis d'observer sur les figures de pôles tracées le changement de l'orientation de l'os dans un champ de 2,4mm de l'implant. Sur l'instrument D20, la taille de faisceau était de $0,5\times9$ mm², le champ de changement d'orientation est à 4mm de l'interface.

C'est la première fois que deux méthodes non destructives en haute résolution spatiale confirment l'intérêt de revêtir les implants avec de l'HAp.

REFERENCES

- [1] E. Kon, A. Muraglia, A. Corsi, P. bianco, M. Mariacci, I. Martin, A. Boyde, I. Rospantini,
 P. Christolini, M. Rocca, R. Giardino and R. Cacedda. J. Biomed. Mater. Res., (2000). 49, 328-337
- [2] R. Quarto, M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. Kutepov, V. Muckacev, A. Lavroukov, E.Kon and M. Maracci. *New England J. Med.* (2001)
- [3] Heidi L. Holtorf, John A. Jansen and Antonios G. Mikos, Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold constructs: Effect of initial cell phenotype, *Biomaterials*, (2005). 26, 6208-6216
- [4] Fan Yang, Christopher G. Williams, Dong-an Wang, Hyukjin Lee, Paul N. Manson and Jennifer Elisseeff, The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, (2005). 26, 5991-5998
- [5] Yi-Chin Toh, Saey Tuan Ho, Yi Zhou, Dietmar W. Hutmacher and Hanry Yu, Application of a polyelectrolyte complex coacervation method to improve seeding efficiency of bone marrow stromal cells in a 3D culture system. *Biomaterials*, (2005). 26, 4149-4160
- [6] B.-H Choi, S.-J. Zhu, B.-Y. Kim, J.-Y. Huh, S.-H. Lee and J.-H. Jung, Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, (2005). 34, 537-542

- [7] Ho Sun Jung, Soo Bong Hahn and Jin Woo Lee, The role of MAP Kinase in adipogenesis from human bone marrow-derived stromal cells. *Current Applied Physics*, (2005). 5, 480-484
- [8] Jian Wang, Hui-Ping Zhao, Ge Lin, Chang-Qing Xie, Dong-Song Nie, Qi-Ru Wang and Guang-Xiu Lu, In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by co-culture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. *Cell Biology International*, (2005). 29, 654-661..
- [9] Hsin-Nung Shih, Lih-Yuann Shih, Tseng-Hwa Sung and Yuan-Chia Chan, Restoration of bone defect and enhancement of bone ingrowth using partially demineralized bone matrix and marrow stromal cells. *Journal of Orthopaedic Research*, (2005). 23, 1293-1299.
- [10] Michela Bosetti and Mario Cannas, The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials*, (2005). 26, 3873-3879
- [11] Michelle R. Kreke, William R. Huckle and Aaron S. Goldstein, Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a temporally dependent manner. *Bone*, (2005). **36**, 1047-1055.
- [12] Heungsoo Shin, Johnna S. Temenoff, Gregory C. Bowden, Kyriacos Zygourakis, Mary C. Farach-Carson, Michael J. Yaszemski and Antonios G. Mikos, Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg–Gly–Asp modified hydrogels without dexamethasone and β-glycerol phosphate, *Biomaterials*, (2005). 26, 3645-3654
- [13] Joshua R. Mauney, Claude Jaquiéry, Vladimir Volloch, Michael Heberer, Ivan Martin and David L. Kaplan, In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*, (2005). 26, 3173-3185
- [14] Eduardo F. Sant'Anna, Robert M. Leven, Amarjit S. Virdi and D.R. Sumner, Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *Journal of Orthopaedic Research*, (2005). 23, 646-652

- [15] A. Benmarouane, T. Hansen, P. Millet, J.C. Lambotte and A. Lodini, *Journal of neutron research*, (2004). 12, 123-127
- [16] A. Benmarouane, T. Hansen, P. Millet and A. Lodini, Solid State Phenomena (2005).427-432

Chapitre IV :

Nouvelle méthodologie d'évaluation des déformations dans l'os cortical par diffraction neutronique

Chapitre IV

Nouvelle méthodologie d'évaluation des déformations dans l'os cortical par diffraction neutronique

1. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précèdent que la nature de la surface de l'implant affecte considérablement les orientations des cristaux d'HAp dans l'os reconstitué à l'interface os-implant. Ceci est dû principalement à la contrainte appliquée par le poids de l'animal qui a été implanté. Avec la technique de la diffraction de neutrons, la préparation des structures osseuses par traitement thermique est absolument nécessaire pour minimiser l'influence de la diffusion incohérente de l'hydrogène. Afin de compléter l'étude de la texture des cristaux de l'os reconstitué, nous avons cherché à mettre en place une nouvelle méthodologie permettant l'analyse des contraintes mécaniques induites par les implants sur les cristaux d'HAp. L'étude des contraintes mécaniques dans l'os cortical par la technique des neutrons nécessite cependant de s'affranchir du traitement thermique, ce qui peut se faire deux façons différentes : soit en minimisant l'influence du traitement thermique, soit en supprimant la contribution incohérente de l'hydrogène.

Le traitement thermique utilisé jusqu'à présent, peut relaxer les contraintes mécaniques de l'os. Une autre possibilité envisageable est alors d'utiliser un spectromètre trois axes afin d'obtenir de minimiser l'influence de l'hydrogène et d'obtenir un spectre de diffraction exploitable. Notre but étant de mettre en place une méthode de détermination des contraintes fiable et simple utilisable dans les structures osseuses.

2 Méthode et résultats

Pour cette étude nous avons utilisé un échantillon provenant de l'os cortical du mouton étudié dans le chapitre précèdent.

L'échantillon provenant de l'os cortical a été nettoyé dans l'éthanol. Pour analyser l'influence du traitement chimique, nous avons placé l'échantillon avec l'implant sur un spectromètre deux axes. Le volume de jauge mesuré est $1 \times 1 \times 20$ mm3 et à 2 cm de l'interface implant-os, avec un temps d'acquisition de quatre heures.



Le pic obtenu est donné dans la figure 1.

Figure 1 : diagramme de diffraction de l'os cortical sur D1A

D'après le diagramme de diffraction enregistré, l'utilisation du traitement chimique pour la préparation des os ne permet pas de réduire suffisamment le bruit de fond.

Le bruit de fond est essentiellement dû à la diffusion incohérente de l'hydrogène. Le seul moyen de minimiser ce bruit de fond est de filtrer les neutrons diffractés à l'aide d'un analyseur installé entre l'échantillon et le détecteur.

Nous avons choisi de tester cette méthode sur l'instrument IN12 à l'ILL.

3 Description de l'instrument 3 axes

3.1 Principe de la mesure

Au cours d'une expérience de diffusion inélastique, on cherche à mesurer une intensité diffusée en un point \vec{Q} du réseau réciproque et pour un transfert d'énergie $\hbar\omega$. Cette intensité peut se mettre sous la forme :

$$I(\vec{Q},\omega) \approx \frac{d^2\sigma}{d\Omega \, d\omega} = b^2 \frac{\vec{k}_f}{\vec{k}_i} S(\vec{Q},\omega)$$

Où b représente une longueur de diffusion (nucléaire ou magnétique) caractéristique du système étudié et k_i (k_f) est le vecteur d'onde initial (final) des neutrons. La fonction de diffusion $S(\vec{Q}, \omega)$ est reliée à la susceptibilité dynamique $\chi''(\vec{Q}, \omega)$: $S(\vec{Q}, \omega) = (n(\omega) + 1)\chi''(\vec{Q}, \omega)$

où $n(\omega)+1$ est le facteur de population thermique. Les valeurs limites de ce terme sont 1 lorsque $kT \ll \hbar\omega$ et T_{ω} pour $kT \ll \hbar\omega$. La susceptibilité dynamique est la transformée de Fourier dans le temps et l'espace des diverses fonctions de corrélations existant dans le système. Toute l'information est contenue dans ces fonctions de corrélation: $< \rho(i,0)\rho(j,t)$. L'opérateur $\rho(j,t)$ peut être un opérateur de moment magnétique ou de déplacement atomique pour un atome i au temps 0 et un atome j au temps t. S'il s'agit de corrélations entre atomes différents, on observe de la diffusion cohérente. Les fonctions d'auto-corrélation (sur un même site) dans le temps provoquent de la diffusion incohérente.

La forme de $S(\vec{Q}, \omega)$ dépend de la "physique" du système. Quelle que soit la nature de ce système, magnétique ou mode de réseau cristallin, la présence de modes collectifs propagatifs se manifeste par un pôle à $\omega_0(\vec{Q})$ (courbe de dispersion) et une largeur $\Gamma(\vec{Q})$; en général, on observera un pic dans l'intensité diffusée. Très souvent, on n'observe pas de "pics" fins, mais de larges "bosses" centrées soit à une énergie finie soit autour de la position élastique. Le but de l'expérience est de détecter l'existence de ces pics ou bosses.

On cherche donc à explorer l'espace des (\vec{Q}) et des ω tout en comptant les neutrons diffusés. Le profil de ces explorations nous renseigne sur la présence et l'intensité d'éventuels modes de fluctuations. Les instruments 3-axes classiques sont tels que pour une configuration donnée du spectromètre, on puisse associer un point dans l'espace (\vec{Q}, ω) lié à l'échantillon. Pour cela, on sélectionne les neutrons incidents vers l'échantillon avec une énergie initiale $E_i = \frac{\hbar^2 k_i^2}{2M_d}$, ceux diffusés possédant une énergie finale $E_f = \frac{\hbar^2 k_f^2}{2M_d}$, et un transfert de moment $\hbar Q$. La conservation de l'énergie et du moment de l'ensemble neutron et échantillon se traduit par les relations cinématiques suivantes:

$$\frac{\hbar^2 k_i^2}{2M_d} - \frac{\hbar^2 k_f^2}{2M_d} = \hbar \omega$$

$$\hbar \vec{k}_i - \hbar \vec{k}_f = \hbar \vec{Q}$$

Les modules de \vec{k}_i et \vec{k}_f fixent l'énergie, alors que l'angle de diffusion et l'orientation de l'échantillon déterminent le vecteur \vec{Q} .

Un cristal monochromateur en position de diffraction en amont de l'échantillon extrait un faisceau monochromatique de longueur d'onde $\lambda_i = \frac{2\pi}{k_i} = 2d_d \sin(\theta_d)$. De la même

façon, le cristal analyseur en aval de l'échantillon sélectionne les neutrons de longueur d'onde $\lambda_f = \frac{2\pi}{k_f} = 2d_d \sin(\theta_d)$. Finalement, un détecteur permet de mesurer l'intensité diffusée. L'échantillon est monté sur un plateau tournant équipé d'arcs goniométriques ou d'un cercle d'Euler afin d'offrir un maximum d'orientations possibles.

Notons que sur les 3-axes à neutrons polarisés classiques, le monochromateur (et éventuellement l'analyseur) font aussi office de polariseurs: des cristaux ferromagnétiques judicieusement choisis présentent un facteur de structure nul pour une orientation du spin des neutrons; ils ne diffractent donc qu'un seul état de polarisation des neutrons. De nouveaux développements permettent de découpler la polarisation et la monochromatisation des faisceaux de neutrons.

Une mesure consiste donc à faire varier la configuration de l'instrument (variation d'angles) afin d'explorer une région de l'espace (\vec{Q}, ω) associé à l'échantillon. A chaque pas de l'exploration, on reporte le nombre de neutrons observés, ce qui permet de représenter la variation de la section efficace de diffusion inélastique en fonction de Q et ω . Le maillage peut être aussi fin que le permet la résolution. On peut ainsi remonter aux excitations et fluctuations statiques ou dynamiques existant dans l'échantillon [1,2].

3.2 Intérêt de l'analyseur dans la caractérisation de la structure osseuse en présence de la phase organique

D'une manière pratique, à un angle de diffraction 20 donné, les neutrons analysés sont dus à la diffusion élastique correspondant aux neutrons de même énergie que les neutrons incidents et également à la diffusion inélastique correspondant aux neutrons absorbés ou émis (soit $\lambda_f > \lambda_i$ ou $\lambda_f < \lambda_i$).

L'élimination de la diffusion incohérente de l'hydrogène peut se faire en choisissant les neutrons diffusés ayant la même énergie incidente donc $\lambda_f = \lambda_i$. Dans ces conditions, il est possible de réduire le bruit de fond.

3.3 Méthodes et résultats

Durant ce travail nous avons utilisé l'instrument IN12 dont les caractéristiques sont données dans la figure 4 [3].



Figure4: Caractéristiques de l'instrument IN12 à l'ILL





Figure5: L'os placé sur l'instrument IN12

l'échantillon a été monté sur la table de mesure de IN12, la longueur d'onde est 2,99Å et le temps d'acquisition est de 7 minutes, le diagramme de diffraction obtenu est donné dans la figure suivante :



Figure 6 : diagramme de diffraction de l'os cortical sur IN12

Nous constatons que le pic mesuré de l'os est de meilleur qualité que celui mesuré sur D1A. Cela montre que l'analyseur permet de sélectionner d'une façon relativement efficace les neutrons diffusés avant leur arrivée sur le détecteur. L'analyseur permet de réduire le bruit de fond d'une façon significative.

Pour visualiser cette réduction de bruit de fond nous allons mesurer sur IN12 la structure osseuse avec et sans l'analyseur.

La longueur d'onde est 2,99Å, le temps d'acquisition est de 40 minutes pour chaque pic de diffraction et la taille de faisceau est $5 \times 5 \times 3$ mm³.



Figure 7 : Le pic de diffraction (002) mesuré sans analyseur



Figure 8 : le pic de diffraction (002) mesuré avec analyseur

On observe d'après les figures 7 et 8 obtenues que l'analyseur permet de réduire le bruit de fond et la largeur à mi-hauteur du pic (002) d'un facteur de deux par rapport au pic mesuré sans l'utilisation de l'analyseur.

3.4 Conclusion

Les résultats de la diffraction de neutrons sur le tissu osseux sur l'instrument D1A, confirment la nécessité d'éliminer la partie organique de l'os afin de réduire le bruit de fond. L'étude des déformations induites dans l'os reconstitué nécessite une préparation différente que celle utilisée pour la caractérisation de la texture. Le chauffage à 625°C dans le four relaxe les contraintes mécaniques induites par l'implant. Nous avons utilisé un traitement chimique sur l'os, le diagramme de diffraction obtenu sur D1A a montré clairement que ce traitement est insuffisant et nécessite l'utilisation d'un spectromètre trois axes.

Les spectromètres à trois axes répondent bien à ce genre de problème puisqu'ils sont équipés de l'analyseur qui peut filtrer les neutrons avant qu'ils arrivent sur le détecteur. Les mesures effectuées sur IN12 ont mis en valeur l'intérêt de l'analyseur.

Cette méthode non destructive va ouvrir une nouvelle voie pour l'étude des contraintes mécaniques induites dans l'os reconstitué par l'implant. Le problème majeur pour l'étude des contraintes mécaniques est la résolution spatiale qui nécessite d'installer au sein de l'instrument IN12 les collimateurs provenant de l'instrument D1A. Les collimateurs de l'instrument D1A sont présentés dans la figure 9.



Figure 9 : caractéristiques de l'instrument D1A

Il ne faut pas négliger la réduction de la taille du faisceau qui augmente largement le temps de mesure. C'est le problème que nous devrons résoudre dans le futur.

REFERENCES

- [1] C. Vettier , LES SPECTROMETRES 3-AXES, http://www.ill.fr/Info/diff_neutrons/pinsot/pinsot.htm
- [2] C. H. de Novion, Intérêt des neutrons dans la caractéristique des matériaux, Analyse des ntraintes résiduelles par diffraction des rayons X et des neutrons, édité par A. Lodini et M. Perrin
- [3] http://whisky.ill.fr/YellowBook/IN12/
CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

La technique de diffraction de neutrons et de rayonnement synchrotron a trouvé une application intéressante dans l'étude des biomatériaux. L'utilisation des grands instruments de l'ILL et de l'ESRF a permis la caractérisation structurale de l'os cortical. Nous avons constaté que la technique de diffraction de neutrons devait s'affranchir du bruit de fond dû à la diffusion incohérente de l'hydrogène qui existe dans le tissu osseux. Le traitement thermique a permis d'éliminer une grande partie du collagène ce qui a rendu les diagrammes de neutrons exploitables. Le rayonnement synchrotron permet une analyse structurale direct de l'os cortical sans traitement thermique et confirme l'ensemble des résultats obtenus par diffraction de neutrons menés sur l'os cortical.

Nous avons mis en place une nouvelle méthodologie de caractérisation de la structure osseuse à partir de l'analyse de la texture à haute résolution spatiale, 500×900µm² sur D20 et 350×350µm² sur ID15B, qui a permis d'analyser uniquement le volume souhaité caractéristique de l'échantillon. Nous avons montré que l'algorithme E-WIMV ajouté à la méthode Rietveld et introduit dans le logiciel MAUD était le plus adapté pour affiner les diagrammes de diffraction de la structure osseuse caractéristiques de la texture. Les cristaux d'HAp sont orientés selon la direction de la force appliquée. Le pic de diffraction (002) permet de contrôler l'indice de texture de l'os cortical et le pic de diffraction (111) non affecté par la texture, est le plan choisi pour analyser l'évolution de l'indice de cristallinité.

Durant ce travail, nous avons pu confirmer par les deux techniques non destructives, neutrons et rayonnement synchrotron, l'intérêt majeur du revêtement d'HAp sur le titane. La technique de micro-fluorescence sur ID21 montre qu'il n'y a pas de diffusion de titane dans l'os à deux mois d'implantation.

La présence d'HAp déposé par torche plasma permet à l'os reconstitué de développer une orientation préférentielle unique.

Nous avons également montré durant ce travail les nouvelles possibilités d'évaluation des déformations induites par l'implant dans l'os reconstitué. L'étude des déformations nécessite cependant une autre méthode de préparation des structures osseuses. Le traitement chimique n'a pas permis de réduire suffisamment la diffusion incohérente de l'hydrogène. Actuellement, la seule méthode expérimentale disponible est l'utilisation d'un instrument trois axes équipé de l'analyseur. Les premiers résultats obtenus sont satisfaisants et ont mis en valeur l'intérêt de l'utilisation de l'analyseur. L'installation des collimateurs de D1A sur les instruments trois axes, permet de sélectionner le volume souhaité de l'échantillon.

Les techniques de caractérisation utilisées dans ce travail ont prouvé leur intérêt dans le domaine des biomatériaux. Il est aujourd'hui envisageable d'analyser des implants revêtus de nanoparticules d'HAp.

La mise en place de ces techniques ouvrira certainement de nouvelles voies pour comprendre l'intégration de générations innovantes d'implants.