

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Physique et Chimie-Physique

par

Sorin George GRIGORESCU

Etude des couches nano-structurées obtenues
par ablation laser pour les implants
biomimétiques avancés

Membres du jury

Directeurs de thèse : **M. Jacques WERCKMANN**, IR-HC, Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg
M. Ion N. MIHAILESCU, Professeur, Institut National pour la Physique des Lasers, Plasmas et du Rayonnement de Bucarest

Rapporteurs externes : **Mme Karine ANSELME**, DR, Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse
M. Olivier Gallet, Professeur, Université de Cergy – Pontoise

Examineurs internes : **M. Jean-Claude VOEGEL**, Professeur, Université de Strasbourg
M. Youssef HAIKEL, Professeur, Université de Strasbourg

Examineurs : **Mlle Carmen RISTOSCU**, DR, Institut National pour la Physique des Lasers, Plasmas et du Rayonnement de Bucarest
M. Miroslav JELINEK, Professeur, Institut de Physique de Prague

Strasbourg
le 1er juillet 2010



Remerciements

La thèse a été préparée dans le cadre de la longue coopération entre le laboratoire “Interactions Laser – Surface – Plasma” de l’Institut pour la Physique des Lasers, Plasmas et du Rayonnement de Bucarest et le Département Surfaces – Interfaces de l’Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg. Grâce aux Bourses du Gouvernement Français de type Brancusi offerts par le Service de Coopération et Action Culturelle fonctionnant auprès l’Ambassade de France à Bucarest, le financement pour le déroulement de cette thèse a été obtenu.

En premier je tiens à remercier fortement à mes Professeurs coordonnateurs : M. Jacques Werckmann de l’IPCMS et M. Ion N. Mihailescu de l’INFLPR pour m’avoir accueilli dans leurs laboratoires et d’avoir accepté d’être mes directeurs de thèse. Ils ont conduit d’une manière exemplaire ce travail, en ne cessant jamais de me soutenir tout au long de la période de cette thèse. Je leurs reste profondément reconnaissant.

J’aimerais aussi remercier à tous les Professeurs qui ont donné leurs avis spécialisé et qui ont mis à ma disposition les équipement disponibles dans leurs laboratoires afin d’effectuer une bonne partie des expériences exposées dans la thèse. J’exprime ainsi ma sincère reconnaissance à Mme Karine Anselme de IS2M de Mulhouse et à M. Olivier Gallet de l’Université de Cergy-Pontoise, des professionnels qui ont réussi me faire comprendre un peu le « nouvel » univers de la biologie cellulaire.

J’exprime ma sincère reconnaissance à M. Jacques Faerber pour toutes les images en Microscopie Electronique à Balayage et pour sa patience avec mes demandes, parfois presque impossibles à achever.

Je resterais toujours reconnaissant à ma famille : mes parents, Constantin et Ecaterina, à mon frère Cosmin qui a été toujours un modèle pour moi, et à ma nouvelle famille, Daniela, qui pendant le dernier temps a toujours été à mon coté.

J'aimerais témoigner une vive reconnaissance à mes collègues de Strasbourg et de Bucarest. Il s'agit de deux équipes de vrais amis, toujours disponibles à aider et à donner des conseils très pratiques. Je leurs remercie pour leur soutien permanent et surtout pour leur amitié et confiance.

Un grand merci à Emanuel Axente pour les longues discussions eues les soirs à Bucarest, parfois pleines d'inspiration. Merci Petru et Iuliana pour leur profonde amitié et chaleureuse aide ! Merci à tout le groupe de roumains rencontré à Strasbourg ! C'était un vrai plaisir de vous connaître et de faire partie d'un groupe si dynamique, convivial et surtout sympathique !

Table de matières

Introduction

1. Cadre théorique	1
1.1. Biomatériaux – état de l’art.....	3
1.1.1. Exigences d’un biomatériau.....	6
1.1.2. Structure de l’os.....	8
1.1.3. Biomatériaux métalliques couramment utilisés et leurs limitations.....	10
1.1.4. Biocéramiques à base de phosphates de calcium.....	15
1.1.5. Protéines de la matrice extracellulaire.....	20
1.2. Interactions biomatériau – tissu vivant.....	22
1.2.1. Mécanismes de croissance in vivo du tissu osseux dans l’implantologie dentaire.....	22
1.2.1.1. Le développement des implants ostéointégrés.....	22
1.2.1.2. Réactions du tissu vivant aux implants ostéointégrés..	24
1.2.2. Mécanismes biochimiques impliqués dans le processus d’adhérence cellulaire	27
1.2.2.1. Description de l’adhérence cellulaire osseuse.....	28
1.2.2.2. Interactions ostéoblastes – biomatériau.....	31
1.2.3. La réactivité de surface des céramiques bioactives.....	33
1.2.3.1. L’influence des caractéristiques des céramiques bioactives sur la formation du tissu osseux.....	34
1.2.3.2. Les mécanismes de la bioactivité osseuse.....	35
2. Description de l’expérience : matériaux et méthodes	43
2.1. Méthodes d’obtention des couches minces d’hydroxyapatite.....	45
2.2. Techniques de dépôt laser pulsé (PLD).....	46
2.2.1. Interactions laser – solide	47
2.2.2. Formation et propagation du plasma d’ablation.....	51
2.3. Equipement PLD.....	58
2.4. La technique MAPLE.....	62
2.5. Les techniques de transfert laser direct : LDW, LIFT, MAPLE-DW.....	65
3. Résultats et discussion	73
3.1. Etude des mécanismes de croissance des couches minces d’hydroxyapatite par ablation laser.....	75
3.2. Etude des effets des paramètres de dépôt laser sur les couches obtenues par PLD.....	85
3.3. Etude de l’influence du traitement thermique post-dépôt en vapeur d’eau appliqué aux couches déposées par PLD.....	105
3.4. Obtention d’une interface graduelle entre les couches minces d’hydroxyapatite et le substrat et titane.....	111
3.5. Dépôt de couches minces de protéines de la matrice extracellulaire par la technique MAPLE.....	117
3.6. Transfert de portions de fibronectine par la technique LDW.....	125
4. Conclusions	135

Introduction

Une des directions de recherche actuelles dans le domaine des biomatériaux concerne l'amélioration des procédés d'élaboration des revêtements des pièces prothétiques métalliques (implants dentaires, implants articulaires) au contact avec l'os dans le but d'obtenir une meilleure biocompatibilité et biointégration. Comme les processus biologiques sont essentiellement des processus qui ont lieu au contact du tissu avec l'implant, la nature de cette interface joue un rôle essentiel dans la qualité de leur intégration.

Parmi les matériaux intensivement étudiés, les biocéramiques occupent une place particulière pour plusieurs raisons parmi lesquelles la plus importante concerne l'ancrage de la prothèse dans le tissu osseux, que l'on améliore en modifiant de manière appropriée ses propriétés de surface, telles que la chimie de surface, la morphologie et la nature des tensions superficielles.

Une étude judicieuse des biocéramiques suppose un travail interdisciplinaire qui réunit sur un front commun des cliniciens, des biologistes, des physiciens et des ingénieurs.

Le travail entrepris pour l'obtention des résultats contenus dans cette thèse s'inscrit dans la longue collaboration entre le Laboratoire « Interactions Laser – Surface – Plasma » de l'Institut National pour la Physique des Lasers, Plasma et du Rayonnement de Bucarest et le Département Surfaces – Interfaces de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg. La coopération des deux laboratoires a mené à des progrès dans la connaissance des processus physiques impliqués dans le transfert des biomatériaux par des techniques laser, comme on peut le constater à partir de plusieurs articles scientifiques rédigés en commun. De plus, grâce aux collaborations avec les équipes de biologistes des laboratoires « Interface Matériaux – Objets Biologiques » de l'IS2M Mulhouse et « l'Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire

Cellules » de l'Université de Cergy-Pontoise nous avons pu aborder des approches plus compliquées concernant les propriétés biologiques des surfaces étudiées.

La thèse est structurée en trois parties majeures :

- i. La première partie est constituée par la description du cadre théorique dans lequel les travaux entrepris se situent. Il s'agit d'une présentation des biomatériaux métalliques et céramiques candidats pour la fabrication des implants orthopédiques ou dentaires, les avantages de l'utilisation des couches minces d'hydroxyapatite, ainsi que le potentiel offert par l'utilisation des protéines adhésives de la matrice extracellulaire. Comme l'un des sujets principaux de la thèse est l'obtention des couches minces de phosphates de calcium ou de structures protéiques, diverses méthodes de dépôt des couches sont présentées,
- ii. La deuxième partie décrit les techniques de transfert par le laser utilisées dans le cadre de la thèse. Pour chaque technique de transfert les paramètres jouant un rôle important dans le déroulement des expériences entreprises ont été décrits ;
- iii. La troisième partie est consacrée aux diverses études expérimentales. Dans une première étape, la compréhension des mécanismes de croissance des couches biocéramiques obtenues par transfert laser est présentée à partir des études expérimentales mises en oeuvre. Cette étape nous a permis d'effectuer une étude détaillée de l'influence de la densité de l'énergie du faisceau laser sur la qualité des couches obtenues. Nous avons montré que ce paramètre est un paramètre clé dans l'obtention de couches appropriées pour l'usage biomédical. Une troisième étape a consisté à étudier le changement des propriétés physico-chimiques des couches soumises à un traitement thermique post-déposition en présence de vapeurs d'eau, sur les couches déposées et sur leurs interfaces avec le titane. L'interface entre la couche déposée dans les meilleures conditions de dépôt obtenues antérieurement et le substrat a été caractérisée. Finalement l'interposition d'une couche graduelle de type Ti/HA

a été étudiée et proposée. Au-delà du dépôt d'une céramique bioactive, dans les deux dernières études nous avons exploré de nouvelles voies dans l'amélioration de la fonctionnalité des surfaces, grâce aux développements récents des techniques de transfert laser. En effet nous avons montré la possibilité de déposer par ces techniques des protéines adhésives telles que la fibronectine soit sous forme de couches minces, soit sous forme de portions de dimensions micrométriques qui peuvent induire une croissance préférentielle du tissu osseux autour les implants.

Enfin, une conclusion est proposée sur l'ensemble des recherches entreprises.

CHAPITRE

1

Cadre théorique

1.1 Biomatériaux – état de l’art

Le développement des biomatériaux a démarré à la fin des années '60, avec la première réunion sur les biomatériaux qui a eu lieu à Clemson University, Caroline du Sud. Depuis, il reçoit une attention substantielle, qui augmente chaque année. Les biomatériaux sont définis comme des matériaux synthétiques ou naturels, utilisés pour l’obtention de dispositifs ou d’implants pour le remplacement d’une structure biologique perdue ou malade, afin de restaurer sa forme et sa fonctionnalité initiale [1]. Plus récemment, une nouvelle définition a été donnée : « *Un biomatériau est une substance produite afin de prendre une forme qui, seule ou comme partie d’un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle des interactions avec les systèmes vivants, le cours de toute procédure thérapeutique ou diagnostique, dans la médecine humaine ou vétérinaire* » [2]. Autrement dit, les biomatériaux contribuent à une bonne qualité de vie et à la longévité des humains, leur développement rapide répond aux besoins de santé d’une population vieillissante.

Les biomatériaux sont utilisés dans différentes parties du corps humain : par exemple comme valves artificielles pour le cœur, stents pour les vaisseaux sanguins, implants pour les épaules, genoux, hanches, coude, oreilles et structures orodentaires [3,4,5]. Ils sont également utilisés comme stimulateurs cardiaques et pour la reconstruction du tract urinaire. Parmi tous ces exemples, ceux pour la hanche et le genou sont les plus fréquemment utilisés. Les articulations s’altèrent suite aux maladies dégénératives comme l’arthrite, ce qui conduit à l’apparition de douleurs ou la perte de la fonction. Les maladies dégénératives conduisent à la dégradation des propriétés mécaniques de l’os à cause de la charge excessive ou par l’absence du processus d’auto-guérison biologique naturel. Il a été estimé qu’environ 90% de la population au-dessus de 40 ans souffre de maladies dégénératives. De plus, le nombre de personnes âgées a beaucoup augmenté dans le passé récent. Il a été estimé qu’au niveau mondial il sera multiplié par sept, de 4,9 millions en 2002 à 39,7 millions en 2015 [6]. Les problèmes musculo-squelettiques sont les problèmes de santé les plus répandus, coûtant environ 254 milliards de dollars à la société [7]. Les biomatériaux sont l’une des solutions à ces problèmes, car l’implantation chirurgicale de ces dispositifs artificiels aide à la restauration des fonctions des structures autrement compromises du point de vue fonctionnel. Des exemples d’implants couramment utilisés pour les articulations de hanche et de genou sont montrées dans la Figure 1.1. On peut parler d’une augmentation significative de la

demande des nouveaux implants liée à l'augmentation de la durée de vie. Les données collectées sur la chirurgie de remplacement articulaire totale ont estimé que d'ici la fin de 2030, le nombre d'opérations de hanche augmentera de 174% (572.000 procédures) et le nombre d'arthroplasties du genou augmentera de 673% par rapport à la date présente (3,48 millions de procédures), seulement au niveau de l'Amérique de Nord [8]. Les causes des remplacements articulaires sont attribuées aux maladies comme l'ostéoporose (affaiblissement des os), ostéoarthrite (inflammation des articulations) et les traumatismes. Ce type d'opération est très douloureuse, coûte très cher et son taux de succès est plutôt bas. On estime que le nombre total d'opérations réparatrices pour la hanche augmentera de 137%, et pour le genou de 607% entre les années 2005 et 2030 [8]. De ce fait, une vraie « explosion » de la manufacture des implants est attendue dans les années à venir. Les matériaux utilisés pour les implants orthopédiques, surtout pour les applications où les implants doivent supporter des charges significatives, doivent présenter une excellente biocompatibilité, et résistance à la corrosion en milieu biologique, une combinaison excellente des propriétés mécaniques, de résistance à l'usure, ainsi qu'une cytotoxicité nulle [9,10].



Figure 1.1. Implants pour le remplacement total de hanche et de genou (www.corin.co.uk)

A présent, les matériaux utilisés pour ces applications sont l'acier inoxydable 316L, les alliages cobalt – chrome et le titane et ses alliages. Malheureusement, la liaison os – matériaux a tendance à se détériorer à long terme à cause de diverses raisons dont un module d'élasticité plus grand que celui de l'os, une résistance à la corrosion limitée ou une faible biocompatibilité. Les diverses causes conduisant à l'intervention chirurgicale réparatrice sont

illustrées dans la Figure 1.2. Une autre raison pour la multiplication des interventions réparatrices sera l'augmentation de l'espérance de vie. Au cours des décennies précédentes, l'opération de remplacement total de hanche était réalisée chez des patients dont l'âge ne dépassait pas 65 ans, avec une durée de vie de l'implant prévue d'environ 15 ans [11]. De nos jours, les objectifs dans le domaine de la technologie médicale ont changé. On envisage des implants ayant une durée de vie beaucoup plus longue, augmentée encore dans le cas des traumatismes subis par des patients plus jeunes, suite aux activités sportives, aux habitudes motrices défectueuses ou aux accidents. Enfin on espère éliminer complètement les interventions réparatrices sur le patient implanté. Dans ce sens, le développement de matériaux appropriés ayant une longue durée de vie ou d'usage, donc une excellente biocompatibilité est essentiel.

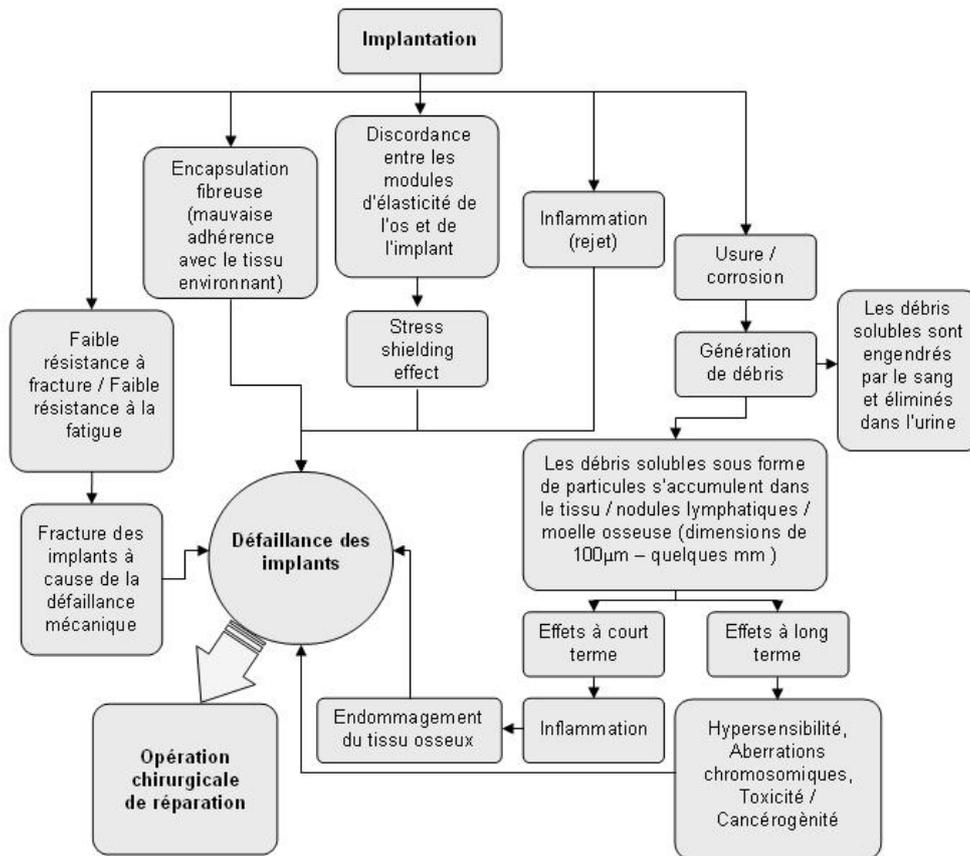


Figure 1.2. Différentes causes de défaillance des implants qui mènent à la re-intervention chirurgicale

De ce point de vue le titane et ses alliages restent les plus attractifs pour la plupart des bio-applications.

1.1.1. Exigences d'un biomatériau

La sélection d'un biomatériau dépend directement de l'application médicale désirée. Dans le cas des implants métalliques – orthopédiques ou dentaires, pour qu'un implant soit en fonction sur une longue période sans être rejeté, il doit posséder plusieurs attributs :

Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques influencent directement le type de matériau qui sera sélectionné pour une application spécifique. Parmi les propriétés d'importance majeure on énumère la dureté, la résistance à la traction, le module d'Young et l'élongation. La réponse du matériau à des charges cycliques est déterminée par la résistance à la fatigue, et cette propriété-ci détermine le succès à long terme d'un implant soumis à des efforts répétés. Si la fracture de l'implant intervient suite à une résistance mécanique inadéquate ou à la différence des propriétés mécaniques entre l'implant et l'os, alors ce fait est défini comme l'incompatibilité biomécanique. Le matériau qui prend la place de l'os doit avoir un module d'Young équivalent à celui de l'os. Le module de l'os varie entre 4 et 30 GPa, selon le type d'os et la direction appliquée pour la mesure [12,13]. Les matériaux qui présentent une rigidité plus grande que l'os empêchent le transfert des contraintes mécaniques à l'os adjacent, fait qui détermine la résorption du tissu osseux autour de l'implant et, par conséquent, l'affaiblissement de la fixation de l'implant. Cette incompatibilité biomécanique qui conduit à la disparition des cellules osseuses est dénommée « stress shielding effect » [14].

La biocompatibilité

Les matériaux utilisés pour les implants doivent être non toxiques et ne devront provoquer aucune réaction inflammatoire ou allergique dans le corps humain. Le succès des biomatériaux dépend principalement de la réaction du corps vis-à-vis de l'implant, fait qui est traduit par la biocompatibilité d'un matériau [15]. Les deux facteurs qui influencent la biocompatibilité sont la réponse du milieu hôte induite par celui-ci et sa dégradation dans l'environnement du corps. La classification des biomatériaux en fonction de leur interaction avec le corps humain est donnée dans le Tableau 1.I. Les matériaux bioactifs sont très bien adaptés, tant qu'ils s'intègrent avec l'os adjacent, même si les matériaux biotolérants sont aussi acceptés pour la fabrication des implants. Quand les implants sont exposés aux tissus et

fluides humains, il y a certaines réactions qui se passent entre l'hôte et le matériel de l'implant, réactions qui établissent l'acceptabilité de ces matériaux par le système vivant. Les problèmes concernant la biocompatibilité sont (1) la thrombose, qui implique la coagulation du sang et l'adhésion des plaquettes sanguines à la surface du biomatériau, et (2) l'encapsulation tissulaire fibreuse des biomatériaux lorsqu'ils sont implantés dans les tissus mous.

<i>Classification</i>	<i>Réponse</i>	<i>Exemples</i>	<i>Effet</i>
Matériaux biocompatibles	Formation d'une capsule fibreuse mince de tissu connectif (0,1 - 10µm). La capsule n'adhère pas à la surface de l'implant	Polymer-polytetrafluoretilene (PTFE), polyméthylmethacrylate (PMMA), Ti, Co-Cr, etc.	Rejet de l'implant
Matériaux bioactifs	Formation du tissu osseux autour de l'implant. Intégration complète de l'implant dans l'os.	Bioverres, phosphates de calcium hydroxylés (hydroxyapatite), etc.	Intégration de l'implant dans le tissu biologique
Matériaux biorésorbables	Remplacement du matériau par le tissu autologue.	Acide polylactique et polymères polyglycoliques, protéines, etc.	Intégration de l'implant dans le tissu biologique

Tableau 1.I. Classification des biomatériaux selon leur interaction avec le tissu environnant

La haute résistance à la corrosion et à l'usure

La faible résistance à la corrosion des implants dans le fluide humain provoque le relâchement d'ions métalliques non compatibles dans le corps. Ces ions sont la cause principale des réactions toxiques ou allergiques [16]. La durée de vie d'un matériau est déterminée principalement par sa résistance à l'abrasion et à l'usure. La faible résistance à l'usure provoque l'affaiblissement de l'implant, les débris d'usure étant la cause principale des réactions dans les tissus où ils se déposent [17]. Dans ce sens, le développement des implants ayant une bonne tenue à la corrosion et à l'usure est d'une importance primordiale pour la longue durée de vie d'un implant dans le système biologique humain.

L'ostéointégration

L'impossibilité d'un implant à s'intégrer avec l'os adjacent et aux autres tissus, due aux micro-mouvements, provoque le détachement de l'implant : un tissu fibreux se forme

entre l'implant et l'os entraînant un rejet de l'implant [18]. Alors, les matériaux possédant des propriétés de surface appropriées sont essentiels pour que l'implant s'intègre bien avec l'os. La chimie de surface, la rugosité et la topographie de surface jouent un rôle clé dans le déroulement de l'ostéointégration.

Afin de trouver les meilleurs paramètres pour la bonne fonctionnalité de l'implant osseux, il sera nécessaire de comprendre la structure intime de l'os et les mécanismes naturels qui rendent possible la formation et le fonctionnement de celui-ci dans son état naturel.

1.1.2. Structure de l'os

L'étude des propriétés physiques, chimiques et mécaniques des tissus durs est très importante pour la détermination des paramètres quantitatifs nécessaires à la fabrication des implants. Les tissus durs, les os et les dents sont des composites organo-céramiques qui ont une microstructure très complexe.

L'os mature existe sous deux formes principales: compact (cortical) et spongieux (trabéculaire). Le tissu osseux connaît plusieurs degrés d'organisation [19]. Les composants principaux de l'os sont: le collagène (20%), le phosphate de calcium (69%) et l'eau (9%), où les pourcentages sont exprimés en poids. En outre, d'autres matériaux organiques comme des protéines, des polysaccharides et des lipides y sont aussi présents en faibles quantités. Le collagène, qui peut être considéré comme la matrice, est structuré sous forme de microfibrilles.

L'observation de fibres isolées de collagène est difficile parce qu'elles se présentent naturellement sous la forme d'amas. Le diamètre des fibres de collagène varie entre 100 et 2000 nm. Le phosphate de calcium, sous forme d'hydroxyapatite cristalline et/ou de phosphate de calcium amorphe, fournit la rigidité de l'os. Les cristallites d'hydroxyapatite, présents sous forme de plaquettes ou de petits bâtonnets, ont environ 40-60 nm de longueur, environ 20 nm de largeur et 1,5 à 5 nm d'épaisseur. Ils sont disposés parallèlement aux fibres de collagène suivant leur axe [19].

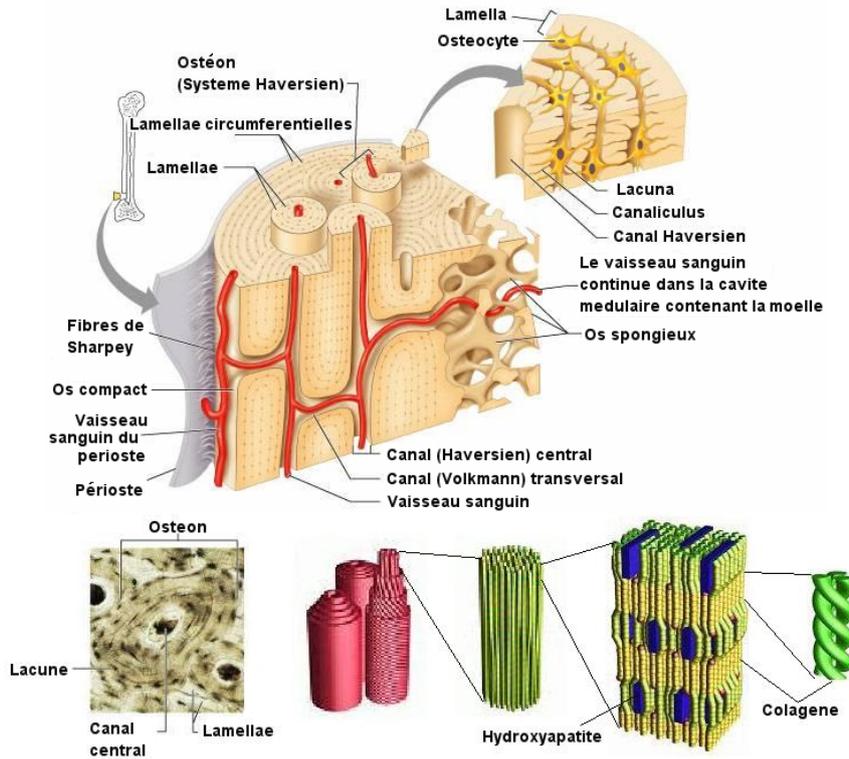


Figure 1.3. Structure interne de l'os, comprenant l'organisation à des divers niveaux hiérarchiques

Les niveaux hiérarchiques d'organisation structurale de l'os compact humain (lamellaire) sont représentés dans la Figure 1.3. Les fibres contenant le matériau minéral sont arrangées en feuilles lamellaires (de 3 à 7 μm de longueur). Un faisceau de 4 à 20 lames disposées en anneaux concentriques autour du canal Haversien forme un ostéon. Une section transversale de l'os compact montre des ostéons cylindriques (nommés système Haversien) comportant des vaisseaux sanguins à l'intérieur des canaux [20].

Les substances métaboliques sont transportées par des systèmes d'intercommunication formés par des lacunes et des canaux de Volkmann qui sont connectés aux cavités de moelle. Les systèmes d'intercommunication contiennent les fluides du corps et leur volume peut atteindre 19%. L'os spongieux, est un matériau friable. Il se présente sous la forme d'un réseau de tiges et de plaquettes [21]. Dans les régions de faibles contraintes, l'os a une structure en tige. La densité est faible et l'os contient des cavités ouvertes. Dans les régions de plus fortes sollicitations, la structure est organisée en plaquette, l'os est dense et contient des cavités fermées. La partie organique de l'os contient la matrice du collagène qui abrite les cristaux d'apatite, la matrice extracellulaire et les cellules (ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes).

Les cellules se différencient en ostéoblastes, qui sont les cellules génératrices de tissu osseux. Les ostéoblastes élaborent le tissu ostéoïde qui sera minéralisé en 8 jours pour devenir un tissu osseux. Les ostéocytes sont des ostéoblastes retenus dans le tissu osseux qu'ils ont formé. Les ostéoclastes sont des cellules géantes multi nucléées. Ce sont des cellules dérivant des macrophages mononucléaires, ayant le rôle d'assurer la résorption osseuse par la sécrétion d'enzymes et d'acides, ce qui conduira à la phagocytose des substances minérales et protidiques.

Le remodelage de l'os est assuré par une succession d'actions de destruction des ostéoclastes, suivies de celles de dépôt des ostéoblastes avant que l'os puisse s'ajuster à la forme et aux proportions en fonction des sollicitations. Dans le cas de la reconstruction d'un os fracturé, le tissu primaire qui apparaît n'est pas organisé. Il est ensuite remodelé par des ostéoclastes et des ostéoblastes dans un tissu osseux organisé.

1.1.3. Biomatériaux métalliques couramment utilisés et leurs limitations

Les matériaux métalliques couramment utilisés pour les implants chirurgicaux incluent les aciers inoxydables 316L, les alliages Co-Cr et le titane et ses alliages. De nombreuses études ont montré le relargage des éléments tels que le Ni, Cr et Co en utilisant l'acier inoxydable ou les alliages cobalt chrome à cause de la corrosion dans l'environnement biologique [22]. Les effets toxiques de ces métaux ont été résumés par Wapner [23]. Des maladies de la peau telles que la dermatite due à la toxicité du Ni ont été rapportées, ainsi que de nombreuses études ont démontré le caractère cancérigène du Co [24]. De plus, l'acier 316L et les alliages Co-Cr ont des modules d'élasticité beaucoup plus élevés que l'os, conduisant à l'effet de « stress shielding », donc à la résorption de l'os et au détachement de l'implant quelques années après son introduction dans le corps [25].

Parmi les matériaux disponibles pour les applications en implantologie, les matériaux à base de titane sont les plus prometteurs à cause de leur combinaison de caractéristiques plus appropriées : haute résistance, faible densité, haute immunité à la corrosion, haute inertie à l'environnement biologique, biocompatibilité augmentée, haute capacité de soudure avec l'os et les autres tissus [26].

<i>Matériau</i>	<i>Standard</i>	<i>Module d'élasticité (GPa)</i>	<i>Résistance à la traction (MPa)</i>	<i>Type d'alliage</i>
<i>Biomatériaux de la première génération (1950-1990)</i>				
Titane pur (cpTi grade 1-4)	ASTM 1341	100	240-550	α
Ti-6Al-4V ELI forgé	ASTM F136	110	860-965	$\alpha + \beta$
Ti-6Al-4V ELI Standard	ASTM F1472	112	895-930	$\alpha + \beta$
Ti-6Al-7Nb forgé	ASTM F1295	110	900-1050	$\alpha + \beta$
Ti-5Al-2.5Fe	-	110	1020	$\alpha + \beta$
<i>Biomatériaux de la seconde génération (1990 – nos jours)</i>				
Ti-13Nb-13Zr forgé	ASTM F1713	79-84	973-1037	β metastable
Ti-12Mo-6Zr-2Fe (TMZF)	ASTM F1813	74-85	1060-1100	β
Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TNZT)	-	55	596	β
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr	-	65	911	β
Ti-35Nb-5Ta-7Zr-0.40 (TNZTO)	-	66	1010	β
Ti-15Mo-5Zr-3Al	-	82		β
Ti-Mo	ASTM F2066			β

Tableau 1.II. Propriétés mécaniques des alliages biomédicaux du titane

Le module d'élasticité des alliages de titane varie de 55 à 110 GPa, en comparaison avec l'acier 316L – 210 GPa et l'alliage Co-Cr – 240 GPa. Les valeurs des modules d'élasticité des divers alliages biomédicaux, par rapport au module de l'os, sont données dans la Figure 1.4. La résistance mécanique des alliages du titane est très proche de celle de l'acier 316L, tandis que sa densité est inférieure de 55% par rapport à celle de l'acier. Donc en prenant en considération la résistance spécifique (le rapport entre la résistance mécanique et la densité), le titane surclasse tout autre matériau implantable. Les propriétés mécaniques du titane pur et de ses alliages utilisées dans le domaine de la production des dispositifs biomédicaux sont données dans le Tableau 1.II. Les applications du titane sont vraiment larges, comprenant les implants dentaires et les dispositifs pour la chirurgie orthodontique, les parties métalliques des implants de hanche, genou, épaule, colonne vertébrale, coude et du poignet, les matériaux de fixation de l'os tels que les clous, les vis, les plaques, les dispositifs de protection des stimulateurs cardiaques et les valves cardiaques artificielles, jusqu'aux instruments chirurgicaux [27,28,29].

Comme dans les premiers instants après l'implantation c'est la surface de l'implant qui sert de médiateur avec le milieu biologique, nous pouvons considérer que la surface est l'un des facteurs clé qui peut provoquer une réponse favorable ou non du corps. Les interactions

spécifiques déterminent la manière et la vitesse du processus de guérison, ainsi que l'intégration à long terme au niveau de l'interface biomatériau - corps. La composition et la topographie de surface vont influencer les interactions qui se déroulent à l'interface, comme les adsorptions d'ions et de biomolécules telles que les protéines, la formation des couches apatitiques biologiques et les interactions avec les différentes cellules : macrophages, cellules souches et ostéoblastes. La compatibilité avec le tissu environnant est le problème le plus important dans l'élaboration d'un biomatériau. Le titane est en général bien toléré par l'organisme, grâce à son caractère inerte. Dans des situations optimales, le titane est capable d'ostéointégration avec l'os [30]. Le caractère inerte du titane est donné par la couche passive très stable d'oxyde TiO_2 , qui lui donne une biocompatibilité augmentée. Même si cette couche est détruite, elle se reformera très vite. Les propriétés physico-chimiques du film d'oxyde qui protège le matériau de l'effet de corrosion telles que la cristallinité et la ségrégation des impuretés ont une grande importance et sont fondamentales pour son comportement dans le milieu biologique.

Même si les alliages de titane – principalement le $Ti6Al4V$ – ont une très bonne réputation pour leur résistance à la corrosion et leur biocompatibilité, leurs performances à long terme ont créé des soucis à cause du relargage d'aluminium et de vanadium dans l'environnement biologique. L'Al et le V ont été souvent associés à des problèmes à long terme comme la maladie d'Alzheimer, la neuropathie et l'ostéomalacie [31]. Le vanadium est très toxique dans son état pur, mais aussi en état oxydé – V_2O_5 [18,32]. Le titane pur a une résistance au cisaillement inférieure, qui le rend moins intéressant pour la production des vis, des plaques ou dans des applications susceptibles de subir les contraintes mentionnées. Le titane et ses alliages ont aussi tendance à générer des débris dus à la friction [33], qui vont dégénérer vers une réaction inflammatoire du corps qui peut provoquer des douleurs et même le détachement de l'implant par ostéolyse [34]. A cause des limitations mentionnées, le temps d'utilisation des implants appartenant à cette première génération de biomatériaux se restreint à, en général, 15 ans.

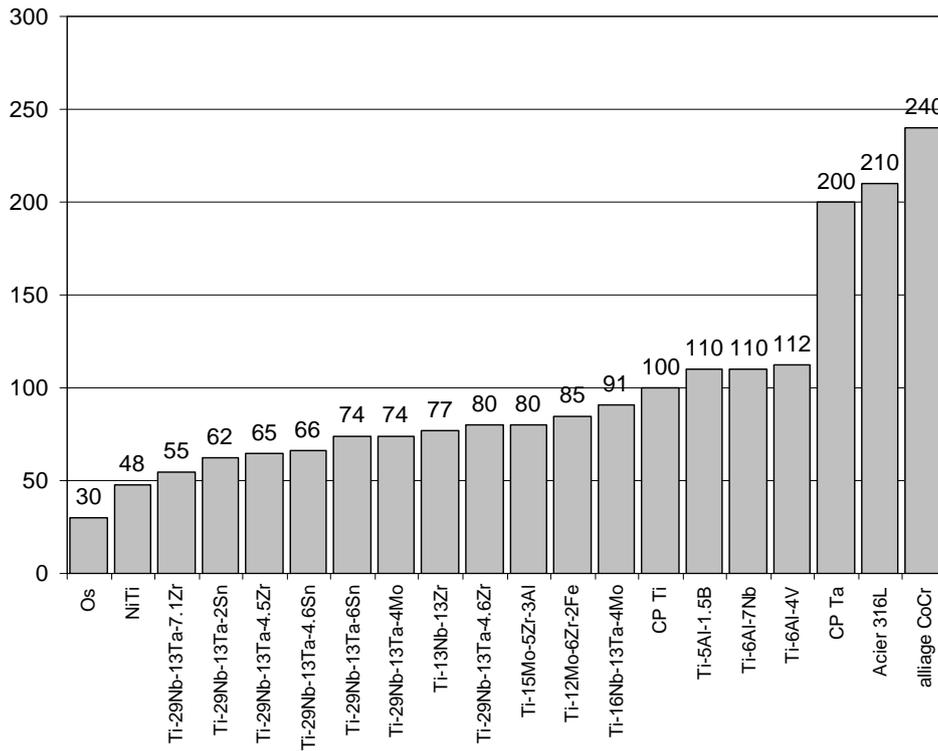


Figure 1.4. Divers modules d'élasticité des alliages biomédicaux

Par ces raisons les recherches les plus récentes ont mené à l'élaboration d'alliages à base de titane d'une nouvelle génération, composés majoritairement de la phase β du titane qui a un module d'élasticité beaucoup plus proche du module de l'os. Les alliages les plus intéressants, ayant un module d'élasticité bas, qui sont couramment recherchés sont résumés dans le Tableau 1.II. Il y a des études qui ont démontré que le Ta réduit considérablement le relargage d'ions métalliques [17,35,36]. Les études entreprises par Okazaki et al [37] ont démontré que la croissance relative des cellules sur l'alliage β Ti-15Zn-4Nb-4Ta a été accéléré par rapport au cas de l'alliage Ti-6Al-4V. Niinomi et al [38] ont montré que la viabilité cellulaire a été supérieure sur l'alliage Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr par rapport au Ti-6Al-4V. Les études concernant la viabilité cellulaire sur les alliages Ti-xTa ont démontré que ces alliages présentent une biocompatibilité supérieure à l'alliage Ti-6Al-4V. De plus, leur résistance à l'usure est supérieure à l'alliage Ti-6Al-4V [32]. Toutes ces données conduisent à la conclusion que les alliages β sont plus prometteurs du point de vue de leur résistance à l'usure, à la corrosion et de leur biocompatibilité.

Une autre approche de l'amélioration du comportement des implants mis en contact avec l'organisme vivant est concentrée sur la compréhension des événements qui conduisent à

l'intégration de l'implant avec l'os. Ces événements se déroulent en grande partie à l'interface tissu - implant. Le développement de cette interface est complexe, incluant de nombreux facteurs parmi lesquels nous pouvons énumérer :

- des facteurs liés à l'implant : la nature du matériau, sa forme, sa topographie, sa chimie de surface ;
- des facteurs généraux : les contraintes mécaniques, la technique chirurgicale d'implantation ;
- des facteurs liés au patient : la qualité et la quantité de tissu osseux

Le but des recherches actuelles dans l'implantologie est d'obtenir des dispositifs qui peuvent induire une guérison contrôlée et rapide. Les implants doivent être entourés par une matrice d'interface ayant une structure et une composition semblable à l'os, en gardant également les propriétés biomécaniques appropriées. Le succès d'un implant est alors directement déterminé par sa surface, qui devrait être capable d'induire l'ostéointégration, indifféremment de la zone d'implantation ou de la quantité ou la qualité de l'os. Conformément à la description donnée par Kasemo et Lausmaa [39], les tissus biologiques interagissent avec les couches atomiques extérieures de la surface. Même s'il y a des produits de réaction secondaires qui apparaissent, la zone principale d'interaction a une épaisseur d'environ 0,1 – 1 nm. En conséquence, la plupart des recherches sont menées dans la direction de modification des surfaces des biomatériaux métalliques existants afin d'obtenir les réponses biologiques désirées.

Une des méthodes intensivement étudiées afin d'améliorer la réponse du corps par rapport à l'implant est le recouvrement des implants avec des couches minces. Les phosphates de calcium constituent des candidats très intéressants grâce à leur similarité chimique avec la partie minérale de l'os [40,41,42], comme expliqué dans les paragraphes antérieurs. A part le fait qu'ils ne sont pas toxiques, ils sont biocompatibles, ne sont pas reconnus comme des matériaux extérieurs par l'organisme et, le plus important, ont un comportement bioactif, en s'intégrant dans le tissu vivant par les mêmes processus qui prennent place dans le remodelage de l'os. Ceci conduit à une liaison physico-chimique intime entre l'implant et l'os : l'ostéointégration [43,44]. Plus précisément, les phosphates de calcium sont connus comme ostéoconductifs (capables d'offrir l'échafaudage ou le support pour la formation du nouveau tissu osseux) et aident l'adhérence et la prolifération des ostéoblastes [45,46]

1.1.4. Biocéramiques à base de phosphates de calcium

Les phosphates de calcium (CaP) appartiennent à la classe des orthophosphates, dans laquelle le matériau est formé autour d'un réseau de groupes PO_4 qui leur confère une bonne stabilité. Il y a de nombreux composés qui diffèrent entre eux par des paramètres clé parmi lesquels on mentionne leur rapport Ca/P et leur solubilité [47]. Dans le cas des composés purs, le rapport atomique Ca/P se situe dans l'intervalle 0.5-2. La solubilité dans l'eau des phosphates augmente en général avec la diminution du rapport Ca/P. Le Tableau 1.III contient la liste des phosphates biocompatibles les plus importants.

<i>Acronyme</i>	<i>Formule chimique</i>	<i>Nom du composé</i>	<i>Rapport Ca/P</i>
HA	$Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$	Hydroxyapatite	1,67
FA	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	Fluorapatite	1,67
CDHA	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ($0 < x < 2$)	Hydroxyapatite déficitaire en calcium	1,33-1,67
BA	$Ca_{8,3}(PO_4)_{4,3}(CO_3:HPO_4)_{1,7}(OH)_{0,3}$	Apatite biologique	1,38-1,93
OHA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-2x}O_x\Delta_x$ ($0 < x < 1$)	Oxyhydroxyapatite	1,67
OA	$Ca_{10}O(PO_4)_6$	Oxyapatite	1,67
MCPM	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	Monocalcium phosphate monohydrate	0,5
MCPA	$Ca(H_2PO_4)_2$	Monocalcium phosphate anhydre	0,5
DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Dicalcium phosphate dihydrate (<i>Brushite</i>)	1
DCPA	$CaHPO_4$	Dicalcium phosphate anhydre (<i>Monetite</i>)	1
OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	Octacalcium phosphate	1,33
α -TCP	$Ca_3(PO_4)_2$ (<i>monoclinique</i>)	Tricalcium phosphate (phase α)	1,5
β -TCP	$Ca_3(PO_4)_2$ (<i>rhomboédrique</i>)	Tricalcium phosphate (phase β , <i>Whitlockite</i>)	1,5
TTCP	$Ca_4O(PO_4)_2$	Tetracalcium phosphate	2
α -DCP	$Ca_2P_2O_7$ (<i>orthorombique</i>)	Dicalcium phosphate (phase α)	1
β -TCP	$Ca_2P_2O_7$ (<i>tétraogonale</i>)	Dicalcium phosphate (phase β) – Calcium pyrophosphate	1
ACP	$Ca_x(PO_4)_y \cdot nH_2O$	Phosphate de calcium amorphe	1,2-2,2

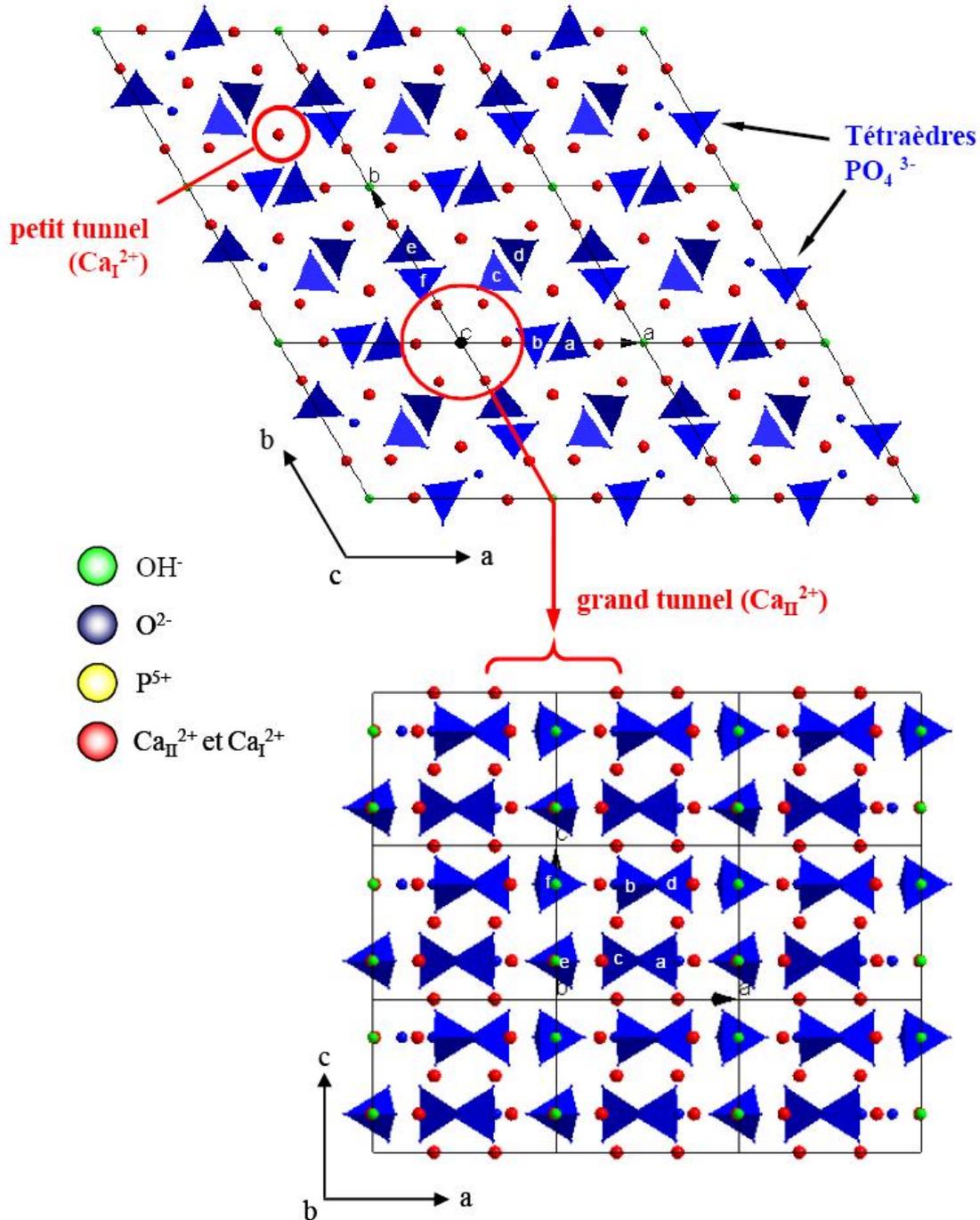
Δ – lacune

Tableau 1.III. Phosphates de calcium biocompatibles et bioactifs

Les apatites constituent une famille de minéraux définie par la formule chimique $Me_{10}(XO_4)_6(Y)_2$ dans laquelle Me représente généralement un cation bivalent, XO_4 un groupement anionique trivalent, et Y un anion monovalent. Le composé type est l'apatite phosphocalcique hydroxylée ou hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

La plupart des apatites cristallisent dans le système hexagonal avec un groupe spatial de symétrie $P6_3/m$ [48]. Les valeurs des paramètres de maille a, b et c dépendent de la nature

des ions Me, XO_4 et Y. Les tétraèdres XO_4 définissent le squelette de la structure apatitique [45]. Aucune lacune n'a jamais été observée sur ces sites [49]. Cet assemblage rigide définit au sein de la maille cristalline deux types de tunnels notés I et II (Figure 1.5).



Le tunnel de type I de diamètre égal à environ 2,5 Å est occupé par des cations Ca (Ca_I). Les sites de ces cations Ca_I , au nombre de quatre par maille, présentent une symétrie

C_h . Ils sont placés sur les axes ternaires et sont entourés de neuf atomes d'oxygène (trois O(1), trois O(2) et trois O(3)) (Figure 1.6).

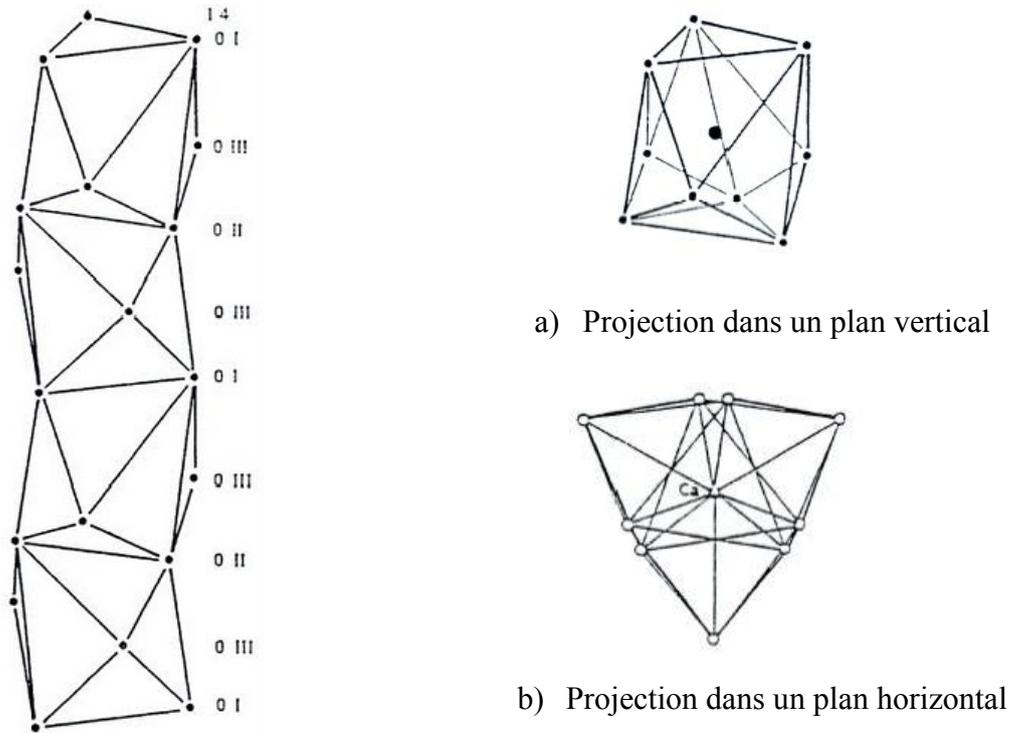
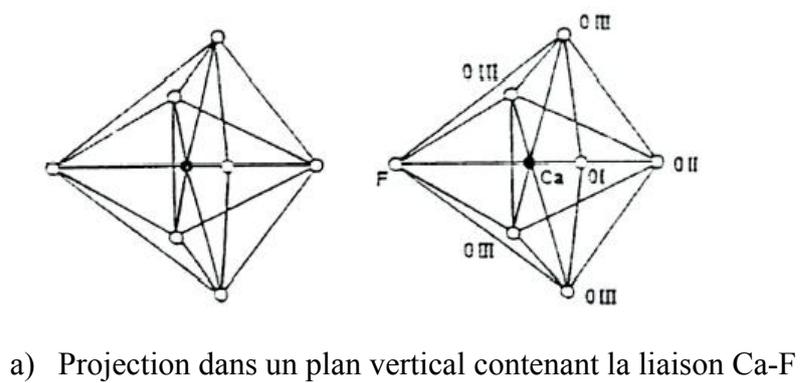
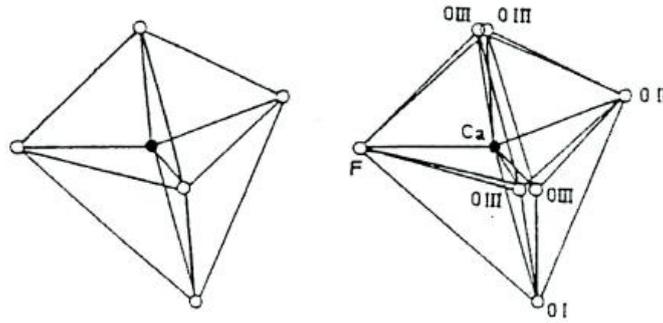


Figure 1.6. Environnement du calcium des sites I





b) Projection dans un plan horizontal

Figure 1.7. Environnement du calcium des sites II (cas de la fluorapatite $Y = F$)

Le second tunnel, de diamètre compris entre 3 et 4,5 Å, contient le reste des cations Ca, soit six cations Ca_{II} par maille. Les sites de ces derniers sont situés à la périphérie du tunnel et présentent une symétrie C_s . Groupés trois par trois aux niveaux $z = 1/4$ et $z = 3/4$ de la maille, ils forment des triangles équilatéraux décalés de 60° autour de l'axe sénaire hélicoïdal (axe c de la maille hexagonale). Leur coordinance est égale à 7 (un (O(1), un (O)3, quatre O(3) et un anion Y) (Figure 1.7).

En fonction de leur nature, les anions Y^- vont occuper des positions diverses le long de l'axe sénaire du réseau. Ils bénéficient d'une grande mobilité (Figure 1.8).

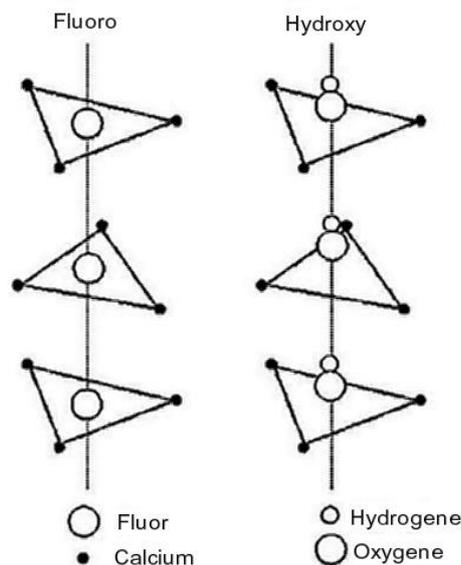


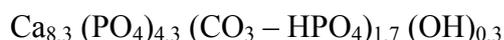
Figure 1.8. Position des ions F^- et OH^- par rapport au triangle Ca_{II} le long de l'axe sénaire hélicoïdal

La substitution des ions OH^- ou PO_4^{3-} de l'hydroxyapatite par des ions CO_3^{2-} conduit à des apatites carbonatées phosphocalciques.

A l'échelle atomique, que ce soit par la création des lacunes et/ou pour des raisons d'encombrement stérique, les substitutions ioniques modifient les paramètres de maille de la structure. A plus grande échelle, les substitutions engendrent, de manière générale, une baisse de cristallinité, une diminution de la stabilité thermique, ainsi qu'une augmentation de la solubilité [50]. La substitution des ions OH^- par les ions F^- (fluoroapatite) déroge cependant à cette règle. En effet, ces substitutions tendent à réduire la solubilité de l'apatite.

L'hydroxyapatite biologique (contenue dans l'os) est carbonatée. La moitié des groupes carbonates (CO_3^{2-}) sont absorbés à la surface des cristaux, l'autre moitié est incorporée dans la structure dans les positions XO_4 et OH^- . La concentration en ions carbonates dans les tissus durs du corps humain est de 3-6% en masse. L'hydroxyapatite biologique contient aussi des ions hydrogène-phosphate HPO_4^{2-} et des ions métalliques alcalins, surtout Na^+ . Le rapport Ca/P peut varier de valeurs plus grandes que 2, pour les apatites riches en ions carbonates, à des valeurs inférieures comme 1,33 pour les apatites riches en ions HPO_4^{2-} . La présence de ces ions entraîne aussi une distorsion du réseau cristallographique.

Les ions carbonates, en faible proportion dans les tissus jeunes, se substituent aux ions HPO_4^{2-} au cours du vieillissement de telle manière que la composition reste toujours en accord avec la formule générale:



L'hydroxyapatite biologique présente des propriétés importantes d'absorption; à la surface, elles sont déterminées par la présence d'ions OH^- et PO_4^{3-} . Plus particulièrement, l'eau peut se fixer fortement à la surface de l'hydroxyapatite. En outre, de nombreuses molécules organiques sont absorbées à la surface de l'hydroxyapatite biologique en jouant un rôle important dans le contrôle de sa croissance.

On note que les processus de minéralisation et de déminéralisation des tissus durs des vertébrés sont influencés considérablement par l'incorporation d'ions alcalins (Na^+) et CO_3^{2-} dans la phase hydroxyapatite de ces tissus.

1.1.5. Protéines de la matrice extracellulaire

Une tendance plus récente visant l'amélioration des implants est constituée par l'optimisation des bio – interfaces implants/tissus minéralisés par le développement de matériaux composites structurés en multicouches alternées de phosphate de calcium et de protéines de la matrice extracellulaire. La matrice protéique de l'os est composée de collagène type I, fibronectine, ostéopontine, laminine, vitronectine et ostéonectine. Le recouvrement des implants osseux d'une bi – couche composée de nanoparticules d'hydroxyapatite associées à des protéines d'adhésion type fibronectine ou vitronectine pourra favoriser l'adhérence des cellules et des tissus sur les implants. De même, le recouvrement localisé des implants peut créer des zones favorables à la croissance des cellules osseuses. Dans des travaux récents, la fibronectine [51], la vitronectine [52] ou des fragments recombinants [53] ont été en effet utilisés avec succès pour favoriser la colonisation de biomatériaux dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse.

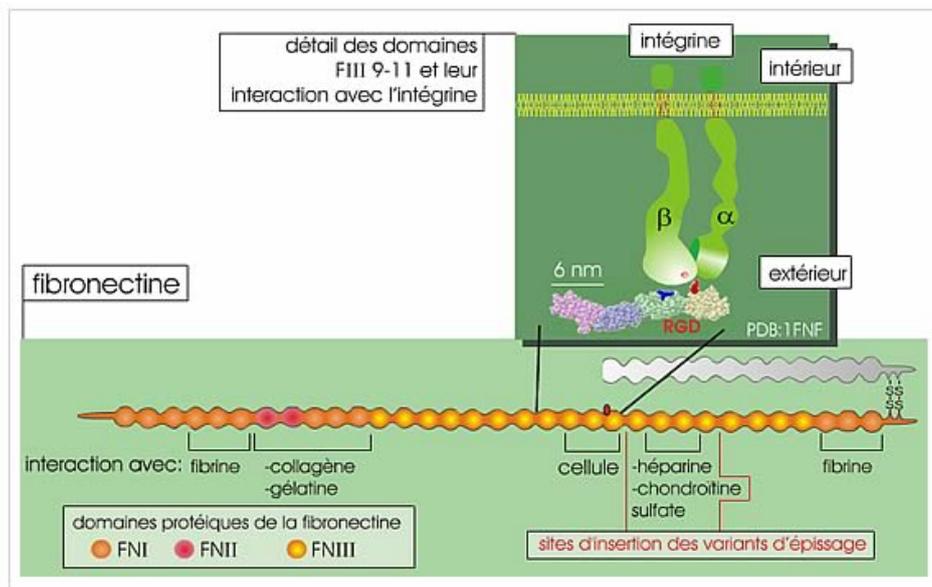


Figure 1.9. Fibronectine, composant de la matrice extracellulaire, et son interaction avec les intégrines

La fibronectine est la protéine qui joue le rôle le plus important dans le processus d'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. Elle a la propriété de lier les intégrines par les séquences RGD (arginine(ARG); glycine(GLY); acide aspartique(ASP)) qui se situent dans le domaine FIII₁₀ de la molécule de fibronectine (Figure 1.9) [54]. Les intégrines sont des protéines cellulaires transmembranaires, récepteurs d'adhérence cellulaire, dont l'une des extrémités interagit avec la matrice située à l'extérieur de la cellule, l'autre extrémité

interagissant avec des constituants intracellulaires. De cette manière, la fibronectine peut simultanément se lier à la cellule et à d'autres molécules de la matrice extracellulaire, y compris à une autre molécule de fibronectine.

Les mécanismes d'interaction des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire ainsi que le déroulement de l'attachement, la prolifération et la différenciation cellulaire seront détaillées dans le sous-chapitre suivant.

1.2. Interactions biomatériau – tissu vivant

Le but principal des recherches dans le domaine de l'implantologie est la création de dispositifs qui peuvent provoquer une reconstruction complète, très rapide et contrôlée du tissu biologique, tout en gardant les caractéristiques biomécaniques initiales.

Les avancements technologiques réalisés dernièrement sont principalement dus à la compréhension des phénomènes qui se passent à l'interface implant – tissu vivant:

- i. au niveau du comportement du tissu environnant considéré comme un système entier, en impliquant la compréhension de l'activité des divers types de cellules qui participent pendant la période post-opératoire à la guérison de la blessure provoquée par l'introduction de l'implant jusqu'à l'acceptation et l'intégration complète de l'implant dans l'organisme;
- ii. au niveau de l'activité cellulaire individuelle, par la compréhension des mécanismes biochimiques incluant l'activité des diverses protéines impliquées dans le processus d'attachement cellulaire à l'implant, mais aussi par l'identification des diverses réponses des cellules osseuses au stimulus de nature chimique ou physique de l'implant;
- iii. au niveau du comportement de l'implant dans l'environnement biologique post-opératoire jusqu'à l'établissement de l'équilibre biologique et la guérison complète du tissu environnant.

1.2.1. Mécanismes de croissance in-vivo du tissu osseux dans l'implantologie dentaire

Le développement des implants ostéointégrés

Le terme « ostéointégration » est apparu au début des années 1960, au moment où le groupe du Prof. Branemark de l'Université de Goteborg a commencé le développement d'un implant innovant dont la fonctionnalité clinique dépendait de l'ancrage direct sur l'os. A l'époque, l'ostéointégration n'était pas un phénomène accepté, la notion générale étant qu'un implant dentaire sera toujours entouré par une capsule fibreuse. Ainsi, la fixation de l'implant

osseux était la meilleure après l'intervention chirurgicale, mais avec le temps la qualité de la fixation diminuait. Les expériences entreprises sur les animaux dans le laboratoire du Prof. Branemark ont démontré la possibilité d'établir un tel ancrage et un premier rapport clinique a été publié en 1977 [55].

Même si l'équipe Branemark a été la première à suggérer les avantages cliniques de l'ancrage direct de l'implant, la communauté scientifique n'était pas convaincue par l'ostéointégration et ses avantages. La raison principale de la non-acceptation des résultats a été de nature méthodologique: dans les années 1970 il n'y avait pas de méthodes de sectionnement des échantillons permettant de garder intacte la partie osseuse, métallique et la partie fibreuse dans le même temps. Ce n'est qu'après que cela ait été rendu possible que l'interface entre l'implant et l'os a pu être analysée. Le premier investigateur qui a mis en évidence l'ostéointégration a été Prof. Schroeder en Suisse. Son activité a été indépendante de celle de Branemark. Au milieu des années 1970, l'équipe de Schroeder a réussi à mettre au point une nouvelle technique de coupe à travers l'os non décalcifié et l'implant sans une séparation préalable de la zone d'interface. Ainsi il a réussi à mettre en évidence pour la première fois le contact direct entre l'os et l'implant [56].

En 1981, Albrektsson et al. [57] présentent une série de facteurs qui doivent être contrôlés afin d'obtenir l'ostéointégration d'un implant. Ces facteurs impliquaient:

- i. la biocompatibilité
- ii. le design;
- iii. les conditions de surface de l'implant;
- iv. l'état du tissu dans lequel on devait faire l'implantation;
- v. la technique chirurgicale d'insertion de l'implant;
- vi. les conditions de charge mécanique appliquées après l'implantation.

Tous ces paramètres doivent être contrôlés plus ou moins simultanément afin d'obtenir l'ostéointégration avec succès de l'implant. Un seul facteur de ceux énumérés ci-dessus peut déterminer si l'implant sera entouré d'une capsule fibreuse ou si le tissu osseux croîtra en contact avec l'implant.

Réactions du tissu vivant aux implants ostéointégrés

Selon [58], les procédures chirurgicales entreprises pour l'introduction de l'implant osseux provoquent des lésions des tissus durs, mais aussi des tissus mous. Le processus de guérison permet la fixation de l'implant dans l'os. Dans la région corticale la résorption du tissu minéralisé nécrosé non vascularisé doit se produire avant la croissance du nouvel os à la surface de l'implant. D'autre part, dans la région trabéculaire la formation de l'os spongieux et l'ostéointégration interviennent tôt dans le processus de guérison.



Figure 1.10. Aspect d'un implant dentaire 24 heures après l'implantation [58]

Dans la Figure 1.10 peuvent être observées quelques caractéristiques de la région d'implantation 24 heures après l'intervention chirurgicale d'implantation d'un pivot dentaire type *ITI Bonelit*. L'implant a une bonne stabilité mécanique, assurée par la technique de fixation « press fit ». Pendant le pressage et la fixation de l'implant, le tissu trabéculaire a été disloqué dans la zone de la moelle et les vaisseaux sanguins ont été abîmés, provoquant ainsi l'hémorragie. La formation du caillot de sang peut aussi être observée dans l'espace entre l'implant et le tissu. Dans les jours suivant l'intervention chirurgicale, le caillot de sang sera remplacé progressivement par un tissu granulaire riche en neutrophiles et macrophages. Les leucocytes commenceront à décontaminer la blessure, et, de la zone adjacente à l'implant, des structures vascularisées qui proliféreront dans le tissu granulaire néoformé commenceront à se former.

Environ une semaine après l'implantation, les macrophages et les cellules mésenchymateuses non différenciées commencent à produire des facteurs de croissance qui stimulent la formation d'un tissu fibreux de fixation non différencié provisoire. Dans cette étape, le rôle principal sera joué par les ostéoclastes qui résorberont graduellement l'os

nécrosé. Le tissu conjonctif provisoire est riche en vaisseaux sanguins néoformés, fibroblastes et cellules mésenchymateuses non différenciées qui se transformeront graduellement en ostéoïde, à partir duquel se formera ultérieurement l'os spongieux qui remplira l'espace entre l'os et l'implant. Cette première étape de la cicatrisation est dénommée *modelage*.

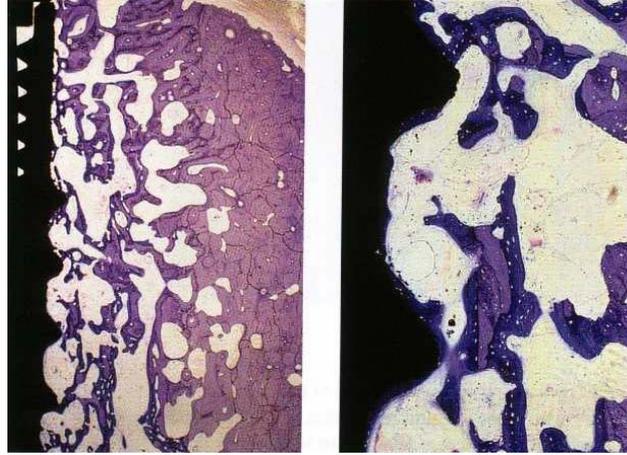


Figure 1.11. Implant dentaire: aspect du tissu après 4 semaines après implantation [58]

Dans la Figure 1.11 est présentée la zone implantée 4 semaines après l'intervention chirurgicale. Dans la zone latérale de l'implant peuvent être observées des réminiscences de l'ancien os qui ont été partiellement remplacées par l'os spongieux néoformé. C'est à noter la présence du nouvel os qui s'est développé au long de la surface de l'implant. La formation de ce nouveau tissu représente la première étape de l'ostéointégration.

L'étape de modelage est suivie par une étape de *re-modelage* dans laquelle l'os spongieux est remplacé par l'os lamellaire capable de prendre et de distribuer la charge mécanique. L'os spongieux est remplacé graduellement par l'os de type lamellaire et par la moelle par des processus d'activité ostéoclastique.

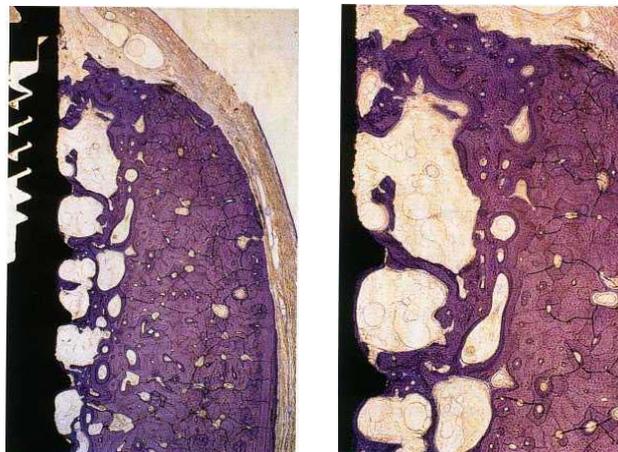


Figure 1.12. Spécimen dentaire 8 semaines après l'implantation [58]

Dans la Figure 1.12 nous pouvons observer la zone implantée 8 semaines après l'introduction de l'implant. La surface du titane est recouverte par une couche mince d'os lamellaire, à côté duquel nous pouvons observer le tissu spongieux. Dans les zones de passage de l'implant, ainsi que dans le tissu osseux adjacent, nous pouvons observer des ostéons secondaires présentant des lamelles concentriques et le canal Haversien central.



Figure 1.13. Spécimen dentaire 4 mois après l'implantation [58]

Au fur et à mesure que la cicatrisation continue, toutes les portions de l'os original sont remplacées par le nouvel os. La Figure 1.13 présente une zone implantée 4 mois après l'installation de l'implant. Le tissu osseux lamellaire néoformé est continu avec l'ancien tissu osseux.

L'ostéointégration représente ainsi le raccordement direct entre l'os et l'implant, sans l'interposition de couches de tissu fibreux. Pourtant, le contact intégral est très difficile à obtenir. En 1983 Albrektsson et al. lancent l'idée selon laquelle le degré d'ostéointégration est fortement lié à des forces de nature physique et chimique qui agissent au niveau de la surface de l'implant [59]. Cette idée est apparue en observant que la croissance complète de l'os n'intervient pas dans des endroits ayant des rugosités inférieures à 100 microns [60]. Pourtant, l'os s'adapte aux irrégularités de surface dans l'intervalle 1- 100 micron, fait qui explique la liaison entre la topographie de l'implant et la force de fixation de l'implant [61]. De ce point de vue, l'influence des irrégularités de surface à l'échelle nanométrique n'est pas significative.

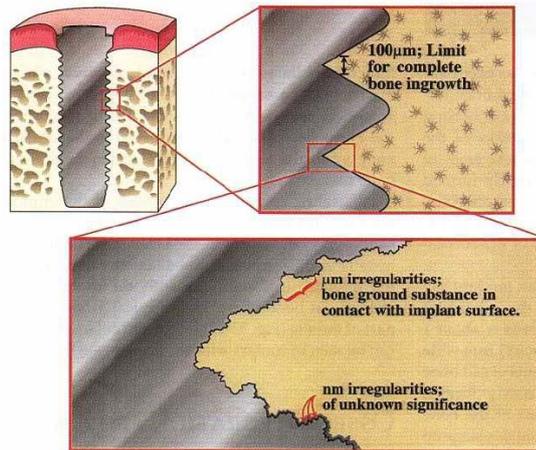


Figure 1.14. Même si naturellement le tissu osseux ne se développe pas dans des cavités ayant un diamètre inférieur à 100 microns, la masse osseuse peut être pressée dans ces cavités, en assurant une meilleure fixation mécanique et biologique de l'implant [58]

Les implants dentaires disponibles sur le marché présentent des valeurs d'amplitude de la rugosité dans l'intervalle 0,5 - 2,5 microns.

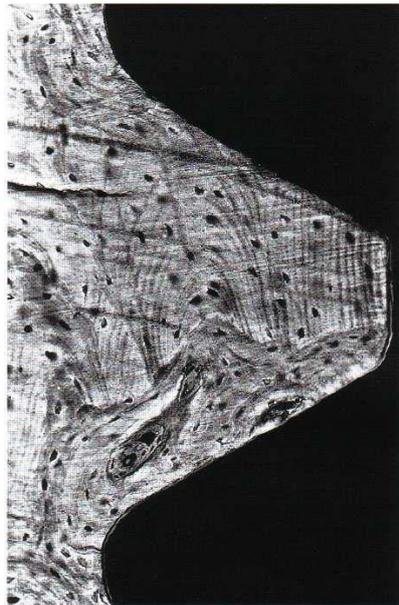


Figure 1.15. Echantillon clinique démontrant un haut degré du contact entre l'os et l'implant [58]

1.2.2. Mécanismes biochimiques impliqués dans le processus d'adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire est impliquée dans divers phénomènes biologiques tels que: l'embryogenèse, le maintien de la structure des tissus, la guérison des blessures, la réponse du

système immunitaire, les métastases, mais aussi l'intégration des biomatériaux au niveau du tissu.

La biocompatibilité des biomatériaux est liée au comportement des cellules qui entrent en contact avec eux et en particulier à l'accrochage des cellules à leur surface. Les caractéristiques de surface des matériaux: la topographie, la chimie ou l'énergie de surface jouent un rôle essentiel dans l'adhérence des ostéoblastes à la surface d'un implant. L'accrochage, la fixation et l'étalement cellulaire appartiennent à la première étape de l'interaction cellule - matériau et la qualité de cette première étape influencera la capacité des cellules à proliférer et différencier après le contact avec l'implant. Comme décrit antérieurement, l'établissement d'une interface solide du point de vue mécanique est essentiel dans l'efficacité d'un implant dentaire, accompagné par la fusion complète entre la surface du matériel et le tissu osseux, sans la formation de tissu fibreux autour de l'implant. Ainsi, la compréhension de l'adhérence cellulaire et en particulier l'adhérence des ostéoblastes sur les matériaux est exigée dans l'optimisation de l'interface os - biomatériau. Celle-ci inclue donc la connaissance des molécules impliquées dans le processus d'adhérence cellulaire, parmi lesquelles nous pouvons énumérer les protéines de la matrice extracellulaire, du cytosquelette, mais aussi les molécules adhésives.

Description de l'adhérence cellulaire osseuse

Le terme „adhérence” utilisé dans le domaine des biomatériaux inclue quelques phénomènes différents: l'étape *d'accrochage* qui se déroule rapidement et implique des événements à court terme tels que les liaisons physico-chimiques entre les cellules et le matériau qui ont à la base des forces ioniques, des forces Van der Waals etc., et l'étape *d'ancrage* qui se déroule dans un intervalle de temps plus long et implique l'activité des diverses molécules biologiques: des protéines de la matrice extracellulaire, des protéines de la membrane cellulaire et du cytosquelette qui interagissent ensemble.

Protéines impliquées dans l'adhérence cellulaire

Protéines de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire de l'os est formée jusqu'à 90% par des protéines collagéniques (97% collagène type I et 3% collagène type V) et 10% par des protéines non-collagéniques: ostéocalcine, ostéonectine, sialoprotéines osseuses, protéoglycanes, ostéopontine, fibronectine, etc. Toutes ces protéines sont synthétisées par les ostéoblastes et la plupart d'entre elles sont impliquées dans le processus d'adhérence cellulaire. In vitro, les protéines telles que la fibronectine et la vitronectine sont impliquées dans l'adhérence des ostéoblastes. Quelques protéines de l'os ont des propriétés adhésives grâce à la présence de la séquence Arg-Gly-Asp (RGD: Arginine – Glycine - Acide aspartique) dans leur structure. Cette séquence est responsable de la fixation des récepteurs de la membrane cellulaire (intégrines) aux protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, sialoprotéine osseuse, ostéopontine, vitronectine) [62,63].

Par des expériences entreprises afin de déterminer les protéines de la matrice extracellulaire qui ont la meilleure influence sur l'adhérence cellulaire, il a été démontré que les ostéoblastes adhèrent beaucoup mieux à la fibronectine par rapport au collagène type I, type IV ou la vitronectine, et beaucoup moins à la laminine et au collagène type V. Les ostéoblastes n'adhèrent pas au collagène type III [64].

Les protéines du cytosquelette

Les points d'adhérence entre les cellules et la surface du substrat utilisé s'appellent *contacts focaux* ou *plaques d'adhérence*. Les contacts focaux sont des jonctions fermées où la distance entre la surface du substrat et la membrane cellulaire varie entre 10 et 15 nm. Ce type de jonction est rarement observable in vivo, en exceptant les cellules endothéliales situées dans les vaisseaux sanguins soumis à des contraintes hydrodynamiques élevées [65].

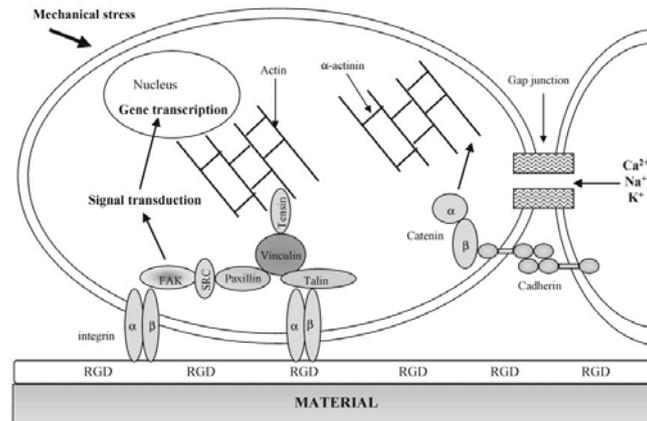


Figure 1.16. Représentation des protéines cellulaires impliquées dans l'adhérence aux matériaux [46]

Les faces externes des points focaux présentent des protéines réceptrices spécifiques telles que les intégrines. Sur la face interne, des protéines telles que la taline, la paxilline, la vinculine ou la tensine servent de médiateur pour les interactions entre les filaments d'actine et les protéines réceptrices de la membrane (intégrines) (Figure 1.16).

La formation des points focaux intervient en particulier dans le cas des cellules à faible motilité. Cette formation est promue par les protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et la vitronectine. L'architecture de l'actine du cytosquelette est essentielle dans le maintien de la forme et de l'adhérence cellulaire. En général les cellules à motilité réduite forment des points focaux puissants, tandis que les cellules motiles forment des points focaux moins adhérents.

Les molécules adhésives

Les molécules adhésives sont caractérisées par leur capacité d'interagir avec un ligand spécifique. Ces ligands peuvent être situés dans la membrane des cellules ou peuvent être des protéines de la matrice extracellulaire.

Il y a quatre grandes classes de protéines adhésives: les sélectines, les immunoglobulines, les cadhérines et les intégrines. Dans le cas des ostéoblastes, les plus étudiées ont été *les cadhérines* et *les intégrines*.

Les intégrines sont responsables de l'adhérence des cellules à un substrat. La chaîne de la protéine est divisée dans un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un

domaine cytoplasmique court. De cette manière, les intégrines se comportent comme des éléments d'interface entre les compartiments extra- et intracellulaire. Elles „traduisent” l'attachement des ligands externes sous forme de signaux porteurs d'information vers l'intérieur de la cellule pour induire l'adhérence, l'étalement ou la migration cellulaire, en régulant par conséquent la croissance et la différenciation des cellules [66,67,68,69].

Les cadhérines sont responsables de l'adhérence intercellulaire. Ce sont des protéines trans-membranaires qui interagissent avec des protéines intracellulaires [70]. L'association avec l' α , β ou γ -caténine est une condition essentielle pour l'adhérence des cadhérines. Il a été déterminé que les ostéoblastes présentent de l'E-cadhérine, cadhérine 11, N-cadhérine et cadhérine 4.

Comme il y a des certaines protéines adhésives de la matrice extracellulaire qui jouent un rôle important pour la fixation des cellules, il existe aussi des protéines anti-adhésives: la tenascine, la trombospondine, la laminine et les protéoglycanes [71]. Celles-ci sont très importantes dans la motilité des cellules.

Interactions ostéoblastes - biomatériau

Les caractéristiques de surface telles que la topographie, la chimie ou l'énergie de surface déterminent la façon dont seront adsorbées les molécules biologiques sur la surface, ainsi que leur orientation. Les cellules n'interagiront jamais avec le matériau brut, ni in vitro, ni in vivo. A chaque étape de l'ostéointégration, le matériau est conditionné par les composants du fluide biologique. Autant le pH que la composition ionique de la solution, la température, les groupes fonctionnelles de protéines et les types de substrat sont de facteurs déterminants dans l'adsorption des protéines. L'énergie de surface peut influencer l'adsorption des protéines et leur arrangement structurel sur le matériau [72]. L'adsorption des protéines est différente sur des substrats de polymère chargés positif ou négatif. Des expériences effectuées dans ce sens sur des matériaux ayant la chimie de surface localement contrôlée par photolithographie ont démontré l'adsorption différenciée des protéines dans les deux régions [73].

Les changements de conformation de la fibronectine plasmatique ont affecté la conformation des domaines de liaison avec les cellules, en affectant ainsi l'affinité des récepteurs de surface des cellules vers la fibronectine [74].

Les propriétés des matériaux en surface sont légèrement différentes des propriétés en volume. Le plus souvent les surfaces contiennent des liaisons non saturées qui conduisent à la formation des couches réactives de surface. Elles déterminent de cette manière le comportement des cellules en contact. Comme décrit antérieurement, les cellules mises en contact avec une surface, vont dans un premier temps s'accrocher pour ensuite adhérer et s'étaler. La première phase dépend des protéines adhésives décrites dans la partie antérieure. La qualité de l'adhérence influencera leur capacité ultérieure de prolifération et de différenciation.

L'influence des propriétés de surface sur le comportement des ostéoblastes

La comparaison du comportement de différents types de cellules sur certains biomatériaux a démontré que les cellules y réagissent différemment, selon leur rugosité [75,76,77,78]. Certaines études ont démontré que les cellules osseuses s'étalent et forment mieux des couches continues sur des surfaces rugueuses que sur des surfaces lisses [79,80,81]. Aussi, l'organisation de la surface en modèles („patterns”) constitue un paramètre important. Les ostéoblastes, sur des surfaces planes lisses vont suivre des directions aléatoires de croissance. Dans le cas des substrats prévus avec des rainures de 5 microns de hauteur, les ostéoblastes s'organisent sur la direction du motif géométrique déterminé par les rainures. Par contre, les cellules ont ignoré les canaux ayant une hauteur inférieure à 0,5 microns [82].

Dans le cas des ostéoblastes humains cultivés sur un alliage de Ti à divers degrés de rugosité, après 1, 7 et 14 jours on a observé la présence de zones denses de vinculine. La distribution des points focaux a illustré le type d'accrochage aux diverses surfaces. Sur les surfaces lisses, les contacts focaux sont uniformément distribués sur toute la surface cellulaire adjacente au substrat. Sur les surfaces rugueuses, les contacts focaux sont visibles seulement aux extrémités des extensions cellulaires où la membrane des cellules est en contact avec le substrat [81].

Ce ne sont pas seulement les caractéristiques de topographie qui influencent la distribution des contacts focaux, mais aussi les caractéristiques physico-chimiques du matériau. L'analyse des contacts focaux par le marquage spécifique de l'actine et de la vinculine a démontré leur présence seulement sur des substrats en titane electro-polis ou corrodés chimiquement, mais pas sur des surfaces du titane soumises au sablage [83].

Les caractéristiques d'hydrophilicité / hydrophobicité d'un matériau peuvent influencer fortement l'adhérence cellulaire. Celle-ci est en général meilleure sur les surfaces hydrophiles [84]. L'aspect des ostéoblastes cultivés sur des substrats polymériques chargés positivement et négativement a été très différent. Sur les substrats présentant une charge positive, les cellules sont aplaties, leur membrane ventrale se situant très proche du substrat. Sur les substrats ayant une charge négative, la membrane ventrale est en contact avec le substrat seulement par les contacts focaux [85]. Dans une autre expérience, des régions de charge négative ont été conçues pour être adjacentes aux régions de charge positive. Après l'immersion dans le milieu de culture, à moins de 30 minutes a été observée la ségrégation des cellules dans les régions chargées positivement. Ce n'est qu'après 2 jours que les cellules ont commencé à se développer vers les régions de charge négative, à cause du manque de surface disponible. La confluence a été obtenue après 4 jours [76].

1.2.3. La réactivité de surface des céramiques bioactives

La réactivité des surfaces est une des caractéristiques communes des céramiques osseuses bioactives. Elle contribue d'une manière significative à la capacité des céramiques de se fixer sur l'os, ainsi qu'à l'amélioration de l'effet de formation du nouveau tissu osseux. Après l'implantation il y a une série de réactions qui interviennent à l'interface implant – tissu osseux. Elles conduisent à des changements dépendant du temps des caractéristiques de surface du matériel implanté et des tissus vivants à l'interface. Dans ce qui suit, nous décrirons quelques concepts actuels concernant la réactivité superficielle des matériaux bioactifs utilisés pour le remplacement des tissus osseux et ses effets sur l'attachement, la prolifération, la différenciation et la minéralisation des cellules osseuses.

L'hydroxyapatite (HA), le phosphate tricalcique (TCP) et les bioverres (BG) sont considérés comme les céramiques les plus bioactives. Ce sont des matériaux qui, en général, se lient au tissu osseux environnant pour accélérer la formation du nouveau tissu osseux. Les propriétés physiques, chimiques et mécaniques de ces matériaux ont été décrites dans des travaux antérieurs [86,87,88]. Les premières observations de croissance directe du tissu osseux ont été faites sur des bioverres et depuis, de progrès considérables ont été faits dans la compréhension des mécanismes de base de la formation des liaisons os – biomatériau et des effets de la formation de l'os. Ces progrès ont été obtenus par deux démarches parallèles: la première a été concentrée sur l'étude de l'interface os - biomatériaux développée dans les processus *in vivo*. L'examen de la zone d'intégration a démontré l'existence d'une couche d'hydroxyapatite [89,90]. Une deuxième démarche a impliqué l'utilisation des études *in vitro* dans des fluides physiologiques simulés ou des milieux de culture cellulaire [91,92]. Ces analyses ont démontré que les réactions qui se déroulent à la surface du matériau sont des dissolutions, des précipitations et des échanges d'ions. Ces réactions sont accompagnées de l'adsorption et de l'engendrement des molécules biologiques [93,94]. La combinaison des études *in vitro* et *in vivo* a conduit à une meilleure compréhension des réactions de surface des céramiques bioactives dans le corps et leurs effets sur la formation de l'os et sur les fonctions cellulaires.

L'influence des caractéristiques des céramiques bioactives sur la formation du tissu osseux

Pendant les années 1970, les études dédiées aux bioverres et à l'hydroxyapatite se sont concentrées sur l'interface de liaison entre ces matériaux et le tissu osseux environnant [95,96]. A ces études ont suivi des données démontrant l'effet bénéfique de la céramique bioactive du point de vue du taux d'intégration des matériaux poreux recouverts [97]. L'utilisation d'une couche mince d'hydroxyapatite sur un tamis en acier a démontré une croissance accélérée de l'os pour des périodes inférieures à 12 semaines par rapport à l'utilisation du même type de tamis non recouvert. Après 12 semaines, le comportement est devenu le même. Ainsi il a été mis en évidence le bénéfice thérapeutique de ce phénomène: la guérison plus rapide des patients traités avec ce nouveau type de dispositif.

L'effet d'amélioration de la croissance du tissu osseux en utilisant des phosphates de calcium a été confirmé par d'autres expériences [98,99,100,101,102,103]. Pourtant, l'amplitude de l'effet a présenté une grande variation entre les études. Ceci s'explique par les différences entre les paramètres expérimentaux utilisés et l'absence d'un protocole d'obtention stricte. Ainsi a été formulée l'hypothèse selon laquelle les différences structurales et de composition des phosphates de calcium surviennent suite au processus d'obtention des recouvrements. Des résultats vraiment reproductibles, ayant une erreur minimale, ne peuvent être obtenus qu'en respectant strictement toutes les conditions expérimentales, avec la moindre variation, y compris en gardant la même source de matériaux utilisés.

Les mécanismes de la bioactivité osseuse

La capacité de se lier avec le tissu osseux environnant est une propriété unique des céramiques bioactives. Les analyses de l'interface os – implant ont démontré que la présence de l'hydroxyapatite est une des caractéristiques – clé dans la zone de liaison. Plus le taux de solubilité est grand, plus la croissance du tissu osseux est plus prononcée [104,105,106,107]. Parmi les matériaux céramiques, l'hydroxyapatite stoechiométrique dense a une réactivité limitée in vitro [108]. De plus, dans les expériences in vivo l'hydroxyapatite a une moindre influence dans la formation du tissu osseux [109]. En prenant en considération des phosphates de calcium plus réactifs comme un mélange biphasique de β -TCP et hydroxyapatite, la dimension moyenne des cristaux a décré alors que la microporosité a augmenté après l'implantation pendant 6 mois dans la mandibule des chiens [110]. Ces observations ont conduit à la conclusion que les phénomènes de précipitation et dissolution sont apparues in vivo. Dans le même temps, il a été mis en évidence une très bonne croissance de l'os dans les régions implantées. Un autre exemple est lié aux verres bioactifs usinables. Dans ce cas, après l'implantation pendant 16 semaines, les profils de rayons X au long de l'interface implant – os ont montré la formation d'une couche riche en phosphates de calcium [111].

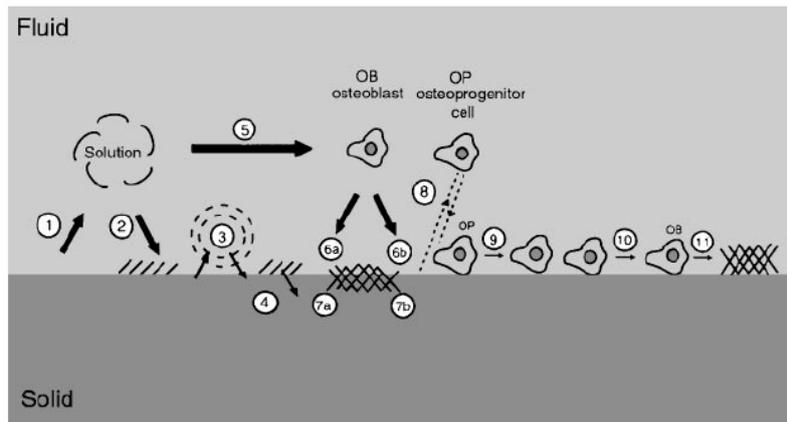


Figure 1.17. Diagramme schématique représentant les événements qui prennent place à l'interface entre une céramique bioactive et le milieu biologique environnant [112]

La Figure 1.17 décrit schématiquement ces phénomènes. La liste des phénomènes ci-dessous n'implique pas un ordre chronologique ou du point de vue de l'importance:

1. Dissolution de la couche céramique
2. Précipitation à partir de la solution sur la couche céramique
3. Echanges ioniques et re-arrangement structural à l'interface céramique – tissu
4. Inter-diffusion de la limite de la couche de surface dans la couche céramique
5. Effets arbitrés par la solution sur l'activité cellulaire
6. Déposition d'une phase soit minérale (a), soit organique (b), sur la couche céramique
7. Déposition par intégration avec la couche céramique
8. Chemotaxis avec la surface céramique
9. Attachement cellulaire et prolifération
10. Différenciation cellulaire
11. Formation de la matrice extracellulaire

La fixation et la croissance améliorées du tissu osseux sont le résultat des réactions multiples parallèles et séquentielles qui se déroulent à l'interface implant – tissu. Ces interactions sont liées soit à des phénomènes physico-chimiques qui se passent en présence ou en absence des cellules, soit à des réactions provoquées par l'activité cellulaire. Un aspect important de ces réactions est qu'en l'absence d'un équivalent biologique, la surface de l'hydroxyapatite carbonatée déficiente en calcium (c-Ap), après implantation, dissolution et précipitation ainsi que les réactions d'échange d'ions détermine une surface apatitique équivalente du point de vue biologique à celle du matériau implanté. Cette réaction est accompagnée par des réactions parallèles comme l'adsorption, la synthèse des molécules

biologiques et l'attachement des cellules adjacentes. De plus, les cellules qui ont adhéré sur la surface du matériau réactif vont induire des changements de surface. En analysant les phénomènes dans le sens inverse, du matériau vers l'environnement, il existe autant un effet arbitré par la solution, mais aussi un effet contrôlé par la surface sur (i) l'activité cellulaire, (ii) le dépôt de matrice organique et (iii) sur la minéralisation. Le changement graduel de la surface céramique afin de devenir une hydroxyapatite similaire à l'hydroxyapatite biologique, avec de petites dimensions de cristallites, est une étape déterminante dans la série des événements qui constituent le comportement bioactif. Tous ces phénomènes considérés comme un ensemble, conduisent à l'intégration graduelle de l'implant bioactif dans le tissu osseux en développement.

Afin de comprendre les mécanismes de la liaison os – matériau, les phénomènes qui apparaissent au niveau atomique et moléculaire à la surface du matériau doivent être élucidées, ainsi que leurs effets sur les réactions au niveau de la cellule et du tissu. De plus, ces phénomènes doivent être identifiées individuellement, le rôle joué par chacun étant très important, ainsi que la séquence de temps quand celui-ci intervient.

Dans ce contexte, les résultats expérimentaux obtenus qui seront présentés en détail dans le troisième chapitre de la thèse vont démontrer le caractère bioactif des couches céramiques de phosphates de calcium obtenues par ablation laser. La viabilité d'application des méthodes de transfert laser pour l'obtention de surfaces propices à l'adhérence et la prolifération des cellules osseuses va être démontrée, pas seulement en ce qui concerne le recouvrement avec des couches minces bioactives, mais aussi en obtenant des transferts localisés contrôlables de protéines adhésives de la matrice extracellulaire, qui peuvent induire une croissance cellulaire préférentielle dirigeable sur la surface des implants.

Bibliographie

- [1] Williams DF. The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool, UK: Liverpool University Press; 1999. p.368
- [2] Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009;30:5897–909.
- [3] Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Keong Kam W. *Compos Sci Technol* 2001; 61: 1189-224.
- [4] Wise DL, *Biomaterials engineering and devices*. Berlin: Humana Press; 2000. p. 205-319.
- [5] Park JB, Bronzino JD, editors. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Rator, FL: CRC Press; 2003. p. 1-241.
- [6] <http://www.datamonitor.com>
- [7] <http://www.orthoinfo.aaos.org>
- [8] Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89; 780-5.
- [9] Long M, Rack HJ. *Biomaterials* 1998;19:1621-39.
- [10] Wang K. *Mater Sci Eng, A Struct Mater: Prop Microstruct Process* 1996; 213; 134-7.
- [11] Data obtained from <http://www.aaos.org/worldhtml/press/arthropl.htm> [accessed 1.08.03]
- [12] Lawrence Katz J. *Nature* 1980; 283; 106-7.
- [13] Black J, Hastings GW. *Handbook of materials properties*. London UK: Chapman and Hall; 1998.
- [14] Sumner DR, Turner TM, Igloria R, Urban RM, Galante JO. *J Biomech* 1998; 31: 909-17.
- [15] Williams DF. *Biomaterials* 2008; 29:2941-53.
- [16] Hallab NJ, Anderson S, Stafford T, Glant T, Jacobs JJ. *J Orthop Res* 2005; 23(2):384-91.
- [17] Sargeant A, Goswami T. *Mater Des* 2006; 27:287-307.
- [18] Viceconti M, Muccini R, Bernakiewicz M, Baleani M, Cristofolini L. *J Biomech* 2000;33:1611-8
- [19] J. B. Park, *Biomaterials Science and Engineering*, Plenum Press, New York (1987)
- [20] J. L. Katz, dans *Symposia of the Society for Experimental Biology, Number XXXIV, The Mechanical Properties of Biological Materials*, Cambridge University Press (1980)
- [21] L. J. Gibson, *J. Biomechanics* 18 (1985) 317
- [22] Okazaki Yoshimitsu, Gotoh Emiko, *Biomaterials* 2005; 26:11-21
- [23] Wapner KL, *Clin Orthop Relat Res* 1991;271:12-20
- [24] McGregor DB, Baan RA, Partensky C, Rice JM, Wibourn. *Eur J. Cancer* 2000:307-13
- [25] Teoh SH. *Int J fatigue* 2000; 22 (10):825-37
- [26] Niinomi M. *Met Mater Trans* 2001; 32A:477-86
- [27] Niinomi M. *Sci Technol Adv Mater* 2003;4:445-54
- [28] Machara K, Doi K, Matsushita T, Susaky Y. *Mater Trans* 2002;43:2936-42
- [29] Boehlert C, Niinomi M, Ikedu M. *Mat Sci Eng C* 2005;25(3):247-52
- [30] Niinomi M, Kuroda D, Fukunaga KI, Fukui H, Kato Y, Yoshiro et al. In: Gorynin IV, Ushkov SS, editors. *Science and technology, proceedings of the IX world conference on titanium, St. Petersburg Russia, CRISM, Promety, vol I-III; 1999. p.223*
- [31] Nag S, Banerjee R, Fraser HL. *Mater Sci Eng C* 2005;25:357-62
- [32] Eisenbarth E, Velten D, Muller M, Thull R, Breme J. *Biomaterials* 2004;25:5705-13
- [33] Miller PD, Holladay JW. *Wear* 1958/59;2:133-40
- [34] Liang Jr PG, Ferguson Jr ES, Hodge ES. *J Biomed Mater Res* 1967;1:135-49
- [35] Okazaki Y, Ito A, Tateishi T, Ito Y. *Mater Trans JIM* 1994;35:58-66
- [36] Steinemann SG. In: Stallforth H, Revell P, editors. *Materials for medical engineering euomat'99, Vol.2*. Weinheim: WILEY-VCH;1999. p.199
- [37] Okazaki Y. *Solid State Mater Sci* 2001;5:45-53
- [38] Niinomi M. *Metall Mater Trans A* 2002;33A:477-86
- [39] Kasemo B, Lausmaa J. *Surface science aspects on inorganic materials*. *CRC Crit Rev Biocomp* 1986;2:335-80
- [40] Lowenstam HA, Weiner S *On biomineralization*, Oxford University Press, New York, 1989
- [41] Weiner S, Wagner HD. *Ann Rev Mater Sci* 1998;28:271
- [42] Doroshkin SV. *J. Mater Sci* 2007;42:1061
- [43] LeGeros RZ, Craig RG. *Strategies to affect bone remodeling: osteointegration*. *J Bone Miner Res* 1993;8(Suppl. 2):S583–96.
- [44] Ong JL, Chan DCN. *Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review*. *Crit Rev Biomed Eng* 1999;28:667–707.
- [45] Davies JE. *In vitro modeling of the bone/implant interface*. *Anat Rec* 1996;245:426–45.
- [46] Anselme K. *Osteoblast adhesion on biomaterials*. *Biomaterials* 2000;21:667–81.

- [47] Elliott, J.C. Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994
- [48] R. A. Young. Physico-chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique. Colloque International CNRS, Paris, 381, 1975
- [49] J. L. Lacout. Contribution à l'étude de l'extraction par vapoméallurgie du manganèse et du vanadium des apatites". Thèse de doctorat, INP Toulouse, 1983
- [50] J. Merry. Preparation and characterization of carbonate hydroxyapatite. Thèse de doctorat, Queen Mary and Westfield College, 2000.
- [51] Pellenc D, Giraudier S, Champion E, Anselme K, Larréta-Garde V, and Gallet O. Removal of surface by-products from sintered hydroxyapatite: Effect of a chelation treatment on fibronectin adsorption and cell adhesion. *Journal of Biomedical Material Research (Applied Biomaterial)* 2006; 76B:136-142
- [52] Schleicher I, Parker A, Leavesley D, Crawford R, Upton Z, and Xiao Y. Surface modification by complexes of vitronectin and growth factors for serum-free culture of human osteoblasts. *Tissue Eng* 2005; 11:1688-1698
- [53] Ku Y, Chung CP, and Jang JH. The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior. *Biomaterials* 2005; 26:5153-5157
- [54] www.ulysse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.103.b3/content/access.htm
- [55] Brånemark P-I, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Öhman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Stockholm: Almqvist and Wiksell; 1977. 132 pp.
- [56] Laney WR, In recognition of an implant pioneer: Professor Dr. André Schroeder. *Int J Oral Maxillofac Impl* 8(2)135-6, 1993
- [57] Albrektsson T; Brånemark P I; Hansson H A; Lindström J. Osseointegrated titanium implants - Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta orthopaedica Scandinavica* 1981;52(2):155-70.
- [58] Albrektsson, T., Berglundh, T., Lindhe J., „Osseointegration:historic background and current concepts” in *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th edition, J. Lindhe editor, Blackwell Munksgaard, 2003
- [59] Albrektsson, T., Brånemark, P.I., Hansson, H.A., Kasemo, B., Larsson, K., Lundsstrom, I., McQueen, D. & Skalak, R. The interface zone of inorganic implants in vivo: Titanium implants in bone. *Annals of Biomedical Engineering* 11, 1983, p 1-27.
- [60] Albrektsson, T. , Healing of bone grafts. In vivo studies of tissue reactions at autografting of bone in the rabbit tibia. PhD thesis. Goteborg: Biomaterials Group, University of Goteborg, 1979.
- [61] Wennerberg, A. On surface roughness and implant incorporation. PhD thesis. Goteborg: Biomaterials/Handicap Research, Goteborg University, 1996.
- [62] Malaval L, Chenu C, Delmas PD, Proteines de l'os. Maladies metaboliques osseuses de l'adulte. Kuntz D, editors. Paris: Flammarion Medecine Sciences, 1996. p. 17-35
- [63] Grzesik WJ, Robey PG. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9:487-96
- [64] Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:1189-97
- [65] Burrige K, Fath K. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *BioEssays* 1989;10:104-8
- [66] Hughes DE, Salter DM, Dedhar S, Simpson R. Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* 1993;8:527-33.
- [67] Saito T, Albelda SM, Brighton CT. Identification of integrin receptors on cultured human bone cells. *J Orthopaed Res* 1994;12:384-94
- [68] Sinha RK, Tuan RS. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 1996;18:451-7
- [69] Pistone M, Sanguineti C, Federici A, et al. Integrin synthesis and utilization in cultured human osteoblasts. *Cell Biol Int* 1996; 20:471-9
- [70] Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:76-85
- [71] Chiquet-Ehrismann R. Inhibition of cell adhesion by anti-adhesive molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:715-9
- [72] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-46
- [73] Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 1998;9:24-9.
- [74] Iuliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA. Effect of the confrontation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res* 1993;27:1103-13

- [75] Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1101-10.
- [76] Healy KE, Thomas CH, Rezania A, et al. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials* 1996;17:195-208
- [77] Thomas CH, McFarland CD, Jenkins ML, Rezania A, Steele JG, Healy KE. The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry. *J Biomed Mater Res* 1997;37:81-93
- [78] Meyle J, GuK Itig K, Wolburg H, Von Recum AF. Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. *J Biomed Mater Res* 1993; 27:1553-7
- [79] Naji A, Harmand M-F. Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 1990;24:861-71
- [80] Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, et al. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* 1996;32:55-63
- [81] Anselme K, Bigerelle M, Noel B, et al. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-66
- [82] Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1101-10
- [83] Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I. Effect of surface processing on the attachment orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1325-41
- [84] Altankov G, Groth T. Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:732-7
- [85] Shelton RM, Rasmussen AC, Davies JE. Protein adsorption at the interface between charged polymer substrata and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 1998;9:24-9
- [86] de Groot K. Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties. In: de Groot K, editor. *Bioceramics of calcium-phosphate*. Boca Raton: CRC Press, 1983. p.99-114.
- [87] Van Raemdonck W, Ducheyne P, De Meester P. Calcium phosphate ceramics. In: Ducheyne P, Hastings GW, editors. *Metal and ceramic biomaterials, vol. II. Strength and surface*. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 143-66
- [88] Ducheyne P, Lemons JE, editors. In: *Bioceramics: materials characteristics versus in vivo behavior*. New York: NY Academic Science, 1988
- [89] Hench L, Splinter R, Greenlee T, Allen W. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Eng* 1971;2:117-41
- [90] Neo M, Nakaruma T, Yamamuro T, Ohtsuki C, Kokubo T. Transmission microscopic study of apatite formation on bioactive ceramics in vivo. In: Ducheyne P, Kokubo T, van Blitterswijk CA, editors. *Bone-bonding biomaterials*. Leiderdorp, The Netherlands: Reed Healthcare Communications, 1993. p. 111-20
- [91] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res* 1990; 24:721-34
- [92] El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials* 1997; 18:295-303
- [93] Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, Kakutani Y, Kitsugi T, Takagi H, Oka M, Kokubo T. The influence of calcium-phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. *J Biomed Mater Res* 1989; 23:1049-66
- [94] El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Effect of serum protein adsorption on osteoblast adhesion to bioactive glass and hydroxyapatite. *J Orthop Res* 1999;17:340-5
- [95] Hench L, Splinter R, Greenlee T, Allen W. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Eng* 1971;2:117-41
- [96] Jarcho M, Kay JF, Gumaer KI, Doremus RN, Drobeck HP. Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng* 1977;1:79-92
- [97] Ducheyne P, Hench L. Comparison of the skeletal fixation of porous and bioreactive materials. *Trans 1st Mtg Europ Soc Biomater* 1977:2PS-P0
- [98] Berry JL, Geiger JM, Moran JM, Skraba JS, Greenwald AS. Use of tricalcium phosphate or electrical stimulation to enhance the bone-porous implant interface. *J Biomed Mater Res* 1986; 20:65-77
- [99] Eschenroeder Jr HC, McLaughlin RE, Reger SI. Enhanced stabilization of porous-coated metal implants with tricalcium phosphate granules. *Clin Orthop Rel Res* 1987;216:234-46

- [100] Rivero DP, Fox J, Skipor AK, Urban RM, Galante JO. Calcium phosphate-coated porous titanium implants for enhanced skeletal fixation. *J Biomed Mater Res* 1988;22:191-201
- [101] Mayor MD, Collier JB, Hanes CK. Enhanced early fixation of porous-coated implants using tricalcium phosphate. *Trans 32nd ORS* 1986. p. 340 (Abstract)
- [102] Cook SD, Thomas KA, Kay JF, Jarcho M. Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment system. *Clin Orthop Rel Res* 1988;230:303-12
- [103] Oonishi H, Yamamoto M, Ishimaru H, Tsuji E, Kushitani S, Aono M, Ukon Y. The effect of hydroxyapatite coating on bone growth into porous titanium alloy implants. *J Bone Jt Surg* 1989;71:213-6
- [104] Ducheyne P, Beight J, Cuckler J, Evans B, Radin S. Effect of calcium-phosphate coating characteristics on early postoperative bone tissue ingrowth. *Biomaterials* 1990;11: 531-40
- [105] Ducheyne P, Cuckler JM. Bioactive ceramic prosthetic coatings [review]. *Clin Orthop Rel Res* 1992;276:102-14
- [106] de Bruijn JD, Bovell YP, van Blitterswijk CA. Structural arrangements at the interface between plasma sprayed calcium phosphates and bone. *Biomaterials* 1994;15:543-50
- [107] de Bruijn JD, Flach TS, Leenders H, van de Brink J, van Blitterswijk CA. Degradation and interface characteristics of plasma sprayed hydroxyapatite coatings with different crystallinities. In: Yamamuro T, Kokubo T, Nakamura T, editors. *Bioceramics*, vol. 5. Kyoto: Kobunshi Kankokai, 1992. p. 291-8
- [108] Maxian SH, Zawadzki JP, Dunn MG. In vitro evaluation of amorphous calcium-phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coating on titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1993;27:111-7
- [109] Schepers E, Declercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehab* 1991;18:439-52
- [110] Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res* 1989;23:883-94
- [111] Holand W, Vogel W, Naumann K, Gummel J. Interface reactions between machinable bioactive glass-ceramics and bone. *J Biomed Mater Res* 1985;19:303-12
- [112] P. Ducheyne, Q. Qiu Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function *Biomaterials* 20 (1999) 2287-2303

CHAPITRE

2

Description de
l'expérience :
matériaux et méthodes

2.1. Méthodes d'obtention des couches minces d'hydroxyapatite

La méthode la plus répandue pour couvrir les prothèses d'hydroxyapatite est l'utilisation de la torche plasma [1, 2, 3, 4]. Cette méthode est devenue commerciale et il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'obtention de revêtements d'hydroxyapatite (d'épaisseurs de dizaines ou de centaines de microns). On connaît bien le principe d'un plasma soufflé que l'on obtient en faisant passer un jet de gaz entre une cathode et une anticathode. La recombinaison à l'extérieur de la torche des électrons et des cations plus ou moins chargés provoque un effet thermique. Une poudre introduite dans le jet gazeux est fondue et projetée sur la cible que l'on souhaite traiter. Afin d'assurer la tenue mécanique de ces revêtements, un traitement de sablage est réalisé avant le dépôt.

Il existe plusieurs techniques physiques ou chimiques qui ont été utilisées pour le dépôt d'hydroxyapatite. Nous les énumérons ici : la pulvérisation dans le plasma magnétron de radiofréquence (RF) [5], le dépôt sous faisceaux d'ions [6], le dépôt chimique sous conditions hydrothermiques [7], le dépôt électrochimique [8], le dépôt métalorganique en phase vapeur (CVD) [9], le dépôt sol-gel [10], l'électrophorèse [11], le dépôt laser pulsé [12, 13, 14]. Certaines méthodes de dépôt (comme le PLD, le RF magnétron, le sol-gel) permettent de créer des couches minces (films) dont l'épaisseur varie de dizaines à des centaines de nm jusqu'à quelques microns.

Les propriétés principales exigées pour les films d'hydroxyapatite sont rassemblées ci-dessus:

- stabilité de la phase;
- haute cristallinité;
- stœchiométrie maintenue (Ca/P=1,67);
- haute pureté chimique;
- tension d'adhésion film – substrat importante (adhérence);
- tension de cohésion importante;
- contrôle de la porosité/densité;
- contrôle de la nucléation et de la morphologie;
- contrôle de la rugosité;
- homogénéité;

- faible résorbabilité dans les tissus;
- imperméabilité aux ions et/ou aux atomes de Ti;
- résistance aux sollicitations mécaniques.

Il y a pourtant une série de désavantages associés aux méthodes de dépôt couramment utilisées :

- la présence de phases de phosphates de calcium autres que l'hydroxyapatite;
- la proportion importante de matériau amorphe, soit une mauvaise cristallinité;
- la modification de la stœchiométrie;
- la tension d'adhésion limitée à l'interface film – substrat, soit une mauvaise adhérence;
- les problèmes de contrôle de la microstructure.

2.2. Techniques de dépôt laser pulsé (PLD)

Le dépôt laser pulsé (en anglais, *pulsed laser deposition*, *PLD*) est apparu comme une technologie essentielle pour la croissance de couches minces [15]. L'acronyme PLD a été attribué pour toutes les méthodes qui ont fait référence à la déposition de matériaux sous forme solide en utilisant un laser comme source d'irradiation. Pour les composés multiéléments comme les supraconducteurs de haute température, les matériaux ferroélectriques et optoélectroniques, la technique PLD est apparue très efficace.

Conceptuellement le PLD est une technique expérimentale extrêmement simple. En PLD, un faisceau laser de très courte durée (20-30 ns) et de forte intensité fait fondre et vaporise sous vide (ou dans une atmosphère gazeuse à basse pression) la surface d'une cible. Le matériau est évaporé sous la forme d'un plasma directionnel et est collecté sur un substrat. L'énergie électromagnétique laser absorbée par la surface est d'abord convertie en énergie d'excitation électronique et ensuite en énergie thermique, chimique ou même mécanique, qui génère l'évaporation, l'ablation, l'excitation, la formation du plasma et l'exfoliation. Les évaporats forment le plasma qui est consisté d'un mélange d'espèces énergétiques incluant des atomes, des molécules, des électrons, des ions, des clusters, des particules micrométriques solides et des globules fondus. Toutes ces espèces seront collectées sur un substrat afin de former graduellement la couche déposée.

2.2.1. Interactions laser – solide

Lorsqu'un matériau solide est soumis à irradiation par un faisceau laser, une série de phénomènes physiques apparaît. Ces phénomènes sont dépendants de la longueur d'onde, de la densité de puissance, de la durée du pulse laser et des propriétés du solide. Pour bien comprendre les processus qui ont lieu lorsque le faisceau laser interagit avec la surface du matériau, il faut partir de l'écriture et de la résolution correcte des équations de Maxwell qui décrivent la propagation des ondes électromagnétiques.

Les milieux physiques réels sont optiquement absorbants. La caractéristique d'un milieu absorbant est liée à la densité des porteurs de charge libre du milieu. Le rayonnement électromagnétique est absorbé par les porteurs de charge qui gagnent ainsi de l'énergie. De cette manière, le milieu absorbant est caractérisé par une conductivité électrique σ non nulle; le cas des diélectriques ($\sigma = 0$) pouvant être vu comme un cas particulier de la propagation dans un milieu absorbant.

Les équations de Maxwell pour les milieux absorbants s'écrivent:

$$\begin{aligned}\nabla \times \mathbf{H} - \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} &= \frac{4\pi}{c} \mathbf{j} \\ \nabla \times \mathbf{E} + \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t} &= 0 \\ \nabla \mathbf{D} &= 4\pi \rho \\ \nabla \mathbf{B} &= 0\end{aligned}\tag{1}$$

où \mathbf{H} , \mathbf{E} , \mathbf{B} et \mathbf{D} sont des vecteurs et représentent, respectivement, l'intensité du champ magnétique, l'intensité du champ électrique, l'induction magnétique et l'induction électrique du milieu. \mathbf{j} est la densité de courant, ρ la résistivité électrique et c la vitesse de propagation de la lumière dans le vide.

Par ailleurs,

$$\begin{aligned}\mathbf{j} &= \sigma \mathbf{E} \\ \mathbf{D} &= \epsilon \mathbf{E} \\ \mathbf{B} &= \mu \mathbf{H}\end{aligned}\tag{2}$$

où σ est la conductivité électrique, ε est la permittivité électrique et μ est la permittivité magnétique.

On obtient l'équation suivante:

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{\mu}{c^2} (\varepsilon + 4\pi\sigma) \mathbf{E} = 0 \quad (3)$$

Pour une radiation monochromatique de fréquence ω

$$\begin{aligned} \mathbf{E} &= \mathbf{E}_0 e^{-i\omega t} \\ \mathbf{H} &= \mathbf{H}_0 e^{-i\omega t} \end{aligned} \quad (4)$$

la dérivée partielle par rapport au temps s'écrit:

$$\left(\frac{\partial}{\partial t} = -i\omega \right) \quad (5)$$

L'équation de propagation devient:

$$\nabla^2 \mathbf{E} + \hat{k}^2 \mathbf{E} = 0 \quad (6)$$

où:

$$\hat{k}^2 = \frac{\omega^2 \mu}{c} \left(\varepsilon + i \frac{4\pi\sigma}{\omega} \right) \quad (7)$$

L'équation (7) est formellement identique à celle de la propagation des ondes électromagnétiques dans les milieux diélectriques avec la différence que les paramètres, comme l'indice de réfraction n , la constante diélectrique ε et la vitesse de phase v , sont des grandeurs complexes ($\hat{k}, \hat{\varepsilon}$ et \hat{v}):

$$\begin{aligned} \hat{n} &= \sqrt{\hat{\varepsilon} \mu} = \frac{c}{\omega} \hat{k} \\ \hat{\varepsilon} &= \varepsilon + i \frac{4\pi\sigma}{\omega} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\hat{v} = \frac{c}{\sqrt{\hat{\epsilon}\hat{\mu}}}$$

D'autre part,

$$\hat{n} = n(1 + i\kappa) \quad (9)$$

où κ est le coefficient d'atténuation.

La solution la plus simple de l'équation de propagation est l'onde harmonique en temps:

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 e^{i[\hat{k}(\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}) - \omega t]} \quad (10)$$

\mathbf{s} est le vecteur unité de la vitesse de phase de l'onde électromagnétique. Après un calcul simple la solution devient:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{-\frac{\omega}{c} n\kappa(\mathbf{r} \cdot \mathbf{s})} e^{i\omega \left[\frac{n}{c}(\mathbf{r} \cdot \mathbf{s}) - t \right]} \quad (11)$$

La solution représente une onde harmonique en temps dont l'amplitude s'atténue exponentiellement avec la propagation. L'intensité de l'onde en propagation est proportionnelle à la moyenne en temps du carré de l'intensité du champ électrique, $I \sim \langle E^2 \rangle$, ainsi on peut écrire:

$$I = I_0 e^{-\alpha(\mathbf{r} \cdot \mathbf{s})} \quad (12)$$

ou, dans le cas de la propagation le long de la direction Oz dans un système de coordonnées convenablement choisi:

$$I = I_0 e^{-\alpha z} \quad (13)$$

$$\alpha = \frac{2\omega}{c} n\kappa = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa \quad \text{est le coefficient d'absorption.} \quad (14)$$

L'expression (13) s'appelle la loi de *Beer-Lambert*. A partir de cette équation on observe que l'interaction laser – solide est décrite par des grandeurs caractéristiques du matériau qui dépendent de la longueur d'onde du faisceau incident. Le type d'interaction est différent si le solide est un métal ou un isolant.

Le modèle de Drude explique les processus qui ont lieu sous l'incidence d'une radiation électromagnétique avec la surface d'un métal. On considère que les électrons libres du métal sont mobiles dans un milieu «visqueux». Ce milieu est caractérisé par un paramètre τ nommé temps de relaxation, caractérisant la diffusion des électrons libres sur les impuretés, les défauts ou les phonons du réseau cristallin.

Les temps de relaxation sont différents en fonction des processus de collision des électrons, à savoir des collisions avec d'autres électrons (τ_{e-e}), des collisions avec des phonons (τ_{e-p}), la diffusion sur des défauts et impuretés (τ_{e-d}).

La constante diélectrique complexe se détermine en résolvant l'équation de mouvement des électrons dans le champ électrique du rayonnement électromagnétique incident:

$$\hat{\varepsilon} \approx 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma^2} - i \frac{\Gamma \omega_p^2}{\omega(\omega^2 + \Gamma^2)} \quad (15)$$

où $\omega_p = \sqrt{\frac{4\pi n_e e^2}{m^*}}$ est la fréquence du plasma et $\Gamma = \frac{1}{\tau}$ est la fréquence de relaxation pour tous les types de collision (l'inverse du temps de relaxation). m^* et n_e sont la masse effective de l'électron, respectivement la densité des électrons libres.

L'inverse du coefficient d'atténuation $d = \frac{1}{\alpha} = \frac{\lambda}{4\pi\kappa}$ est connu sous le nom d'épaisseur de la couche pelliculaire. Cette grandeur est une mesure de la pénétration du rayonnement électromagnétique dans le métal et caractérise le soi-disant effet pelliculaire observé avec les métaux lorsque le rayonnement est absorbé dans une couche d'épaisseur beaucoup plus petite que la longueur d'onde du rayonnement incident.

Dans le cas des non-métaux (matériaux semi-conducteurs et isolants) qui présentent un nombre très petit de porteurs de charge libre, le rayonnement incident peut être absorbé par les processus suivants:

- la transition interbande, lorsque les photons possédant une énergie $h\nu \geq E_g$ (E_g =la bande interdite) sont absorbés. La conséquence est le saut des électrons de la bande de valence dans la bande de conduction. L'absorption de photons d'énergie plus petite que la bande interdite est aussi possible, mais la probabilité est plus faible (transitions multi-photoniques).

- l'absorption sur phonons, lorsque les photons d'énergie $h\nu \leq E_g$ sont absorbés par les phonons optiques conduisant au chauffage du réseau cristallin.

L'absorptivité des non-métaux est favorisée par la présence d'impuretés et de défauts ponctuels (centres de couleur) qui introduisent des niveaux énergétiques dans la bande interdite.

2.2.2. Formation et propagation du plasma d'ablation

Suite à l'irradiation de la surface d'un cible constituée d'un matériau solide avec un faisceau laser de grande intensité, l'absorption des photons peut provoquer la fusion et la vaporisation locale de la cible. A proximité de la surface on génère un nuage de substance de composition complexe: photons, électrons, ions, atomes, molécules, clusters ou même micro-particules liquides ou solides. Ce phénomène est connu sous le nom **d'ablation laser**. Le nuage de substance vaporisée a les caractéristiques d'un plasma et s'appelle le plasma généré par le laser. Après son apparition, le plasma développe son expansion dans le milieu où se produit l'irradiation. Les diverses espèces générées dans le plasma atteignent les niveaux d'énergie thermique et cinétique en se déplaçant vers le substrat où on les collecte sous forme de matière condensée.

L'expulsion du matériau de la cible a lieu dans des conditions éloignées des conditions d'équilibre thermodynamique et peut être associée à des mécanismes thermiques et non thermiques. En fonction du mécanisme physique prépondérant, l'ablation laser se classe en:

- ablation thermique (pyrolytique) quand le chauffage induit par le rayonnement laser et la vaporisation thermique sont prédominants;
- ablation photophysique lorsque les excitations non thermiques influencent directement le taux d'ablation (paires électron - trou, espèces excitées électroniquement qui quittent la cible avant que l'énergie ne soit transférée);
- ablation photochimique (photolitique) quand on produit la rupture des liaisons chimiques par leur photodissociation directe ou par le transfert indirect d'énergie *via* les défauts, les impuretés, etc...

L'épaisseur de la couche ôtée par ablation par pulse doit satisfaire la relation:

$$\Delta h = \max (l_T, l_\alpha) \quad (16)$$

où $l_T \approx 2\sqrt{D\tau_l}$ est l'épaisseur de pénétration de la chaleur. D est la diffusivité de la chaleur, τ_l correspond à la durée du pulse laser et $l_\alpha = \alpha^{-1}$ (α =coefficient d'absorption) est l'épaisseur de pénétration optique. L'expression (16) représente la condition nécessaire à l'obtention du processus d'ablation.

A cause des conditions de chauffage et de refroidissement rapides, la décomposition ou la ségrégation du matériau dans les systèmes multi-composants peuvent souvent être ignorées même dans le cas où Δh est considérablement plus petit que $\max (l_T, l_\alpha)$. Pour de nombreux matériaux, la condition (16) est obtenue en utilisant des lasers émettant dans l'ultraviolet (UV) et fonctionnant par pulses de durée de l'ordre du nano-seconde (ns). Avec des rayonnements laser dans le domaine du visible (VIS) ou de l'infrarouge (IR), la condition est satisfaite beaucoup plus difficilement, à cause des absorptivités faibles des matériaux aux longueurs d'onde plus importantes.

Les processus de fusion et de vaporisation apparaissent seulement lorsque l'intensité du rayonnement laser dépasse une valeur seuil nommée seuil d'ablation. La mesure du seuil d'ablation est donnée par la fluence de seuil F_s , définie comme énergie minimale sur l'unité de surface du pulse laser qui provoque l'apparition du plasma.

Pour la majorité des isolants anorganiques le seuil d'ablation F_s est compris entre 0,5 et 2 J cm⁻², tandis que pour les isolants organiques le seuil d'ablation varie entre 0,01 et 1 J cm⁻².

Les densités de puissance importantes et les pulses laser courts induisent l'ablation congruente de petits volumes de matériaux. Ceci explique l'avantage majeur de la méthode PLD, à savoir la conservation de la stœchiométrie. Cela signifie que le matériau soumis à l'ablation est collecté sur le substrat avec la même composition chimique que la cible irradiée. L'ablation congruente est conseillée pour la synthèse de films de matériaux multi-composants en irradiant une seule cible, constituée des matériaux désirés. La distribution angulaire des produits d'ablation est fortement orientée en avant (perpendiculairement à la surface de la cible vers le substrat). Cette distribution peut être décrite dans une bonne approximation par la loi $\cos^n \theta$, où θ est l'angle entre la normale à la surface de la cible et la direction de propagation des espèces qui s'échappent par ablation et n est un nombre entier. L'orientation «en avant» est plus prononcée avec une augmentation de la fluence laser. En utilisant des lasers avec des paramètres adéquats à ce type de régime d'ablation, n est supérieur à 10.

Dans le cas d'un chauffage laser à l'équilibre ou quasi-équilibre, la surface de la cible est fondue et vaporisée par un processus similaire à l'évaporation thermique conventionnelle. Les concentrations relatives des espèces quittant la cible diffèrent significativement de celles de la cible. Les composants à hautes pressions de vapeurs partent de la cible avant ceux à pression de vapeurs plus basses. Nous parlerons alors d'ablation incongruente. Dans ce cas, la distribution angulaire des espèces sera de type $\cos \theta$, dépendance qui est fréquente dans l'évaporation thermique classique (à l'équilibre). Le régime d'ablation incongruente n'est pas approprié à la déposition stœchiométrique à partir d'une cible multi-composants unique. Pour les matériaux uni-composant, les termes d'ablation congruente et incongruente n'ont plus de signification.

La matière évaporée est fortement excitée et ionisée et constitue un plasma très dense. Ce plasma a des temps de formation courts et son interaction avec le faisceau laser qui le génère ne peut pas être négligée. L'avantage réside dans le fait que, après cette interaction, le plasma est par la suite alimenté par l'énergie (fournie par l'interaction plasma-faisceau laser), en agissant comme un filtre entre la radiation laser et la cible. Le désavantage est que, dans le

plupart des cas, le rayonnement laser incident est puissamment absorbé par le plasma et qu'ensuite l'énergie du faisceau qui aboutit à la cible diminue intensément.

Le plasma commence à s'échauffer par l'absorption des photons par les électrons libres et par des collisions entre les atomes. Ainsi, un plasma initialement faiblement excité, deviendra de plus en plus ionisé. Par la suite, le chauffage du plasma se fait par des collisions électron-ion. Les températures atteintes dans le plasma sont de l'ordre de 10^4 K.

Le coefficient d'absorption du plasma α_p , plasma qui constitue un milieu absorbant pour le rayonnement laser, s'écrit, conformément au modèle de Singh et Narayan [16]:

$$\alpha_p \approx 3,7 \cdot 10^8 (Z^3 \frac{n_i^2}{T^{0,5} v^3}) (1 - e^{-\frac{h\nu}{kT}}) \quad (17)$$

où Z est la charge ionique moyenne, n_i est la densité ionique et T la température du plasma. On remarque la proportionnalité du coefficient d'absorption au carré de la densité ionique. Cela se traduit par le fait que le plasma absorbe intensément à l'endroit où la densité de charge est très importante, proprement dit dans le voisinage de la cible.

Compte tenu que l'expansion du plasma se fait à grande vitesse, la densité de charge diminue rapidement au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la cible. Cela confère au plasma un caractère raréfié et transparent aux grandes distances de la cible.

Le plasma est très dense et fortement absorbant dans une zone étroite (10^{-3} - 10^{-2} cm) localisée au voisinage de la surface de la cible, zone connue sous le nom de *couche de Knudsen*.

Singh et Narayan [2] font l'hypothèse que pendant la durée d'un pulse laser au voisinage de la surface, il s'établit un régime thermodynamique isotherme. Ainsi un équilibre entre l'énergie dans le plasma (mesuré par α_p) et la transformation d'énergie calorifique en énergie cinétique de transport des espèces pendant l'expansion du plasma s'établit. Conformément à cette hypothèse, on peut parler d'un régime d'auto-régulation du plasma dans le voisinage de la cible. A un abaissement de la température T du plasma correspond un

accroissement du coefficient d'absorption α_p selon la loi $\alpha_p = \frac{1}{\sqrt{T}}$, ce qui conduit à une diminution des densités des porteurs de charge n_i . Cela détermine la diminution de α_p qui générera une augmentation compensatoire de la température T . Sa valeur aboutit ainsi à la valeur initiale, en permettant l'établissement d'un régime de température constant des processus de génération du plasma.

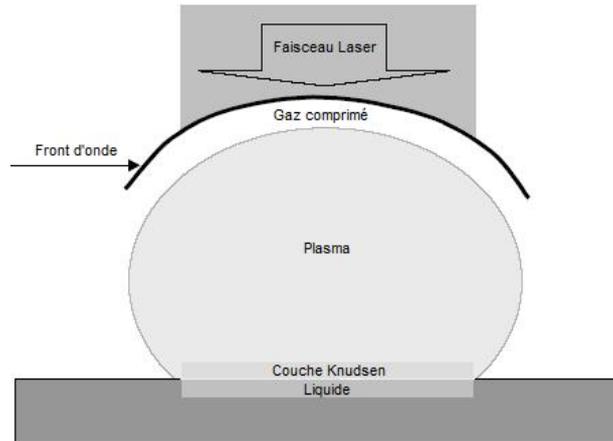


Figure 2.1. Représentation schématique de l'interaction des impulsions courtes avec la matière.

Pour simuler la détente isotherme du plasma juste après sa génération par le rayonnement laser, on admet que la zone très dense de la *couche de Knudsen* est un fluide continu. En utilisant les équations thermodynamiques du gaz parfait, on fait la prédiction que les densités de particules et les pressions du plasma présentent une atténuation exponentielle sur la direction Oz perpendiculairement à la cible. Puisque les dimensions initiales du plasma sont de l'ordre de quelques millimètres dans le plan xOy de la surface de la cible et submicronique dans la direction de l'axe Oz et que les vitesses des particules sont dictées par les gradients de pression, l'expansion du plasma est fortement anisotrope, s'effectuant principalement sur la direction Oz , perpendiculaire à la cible. Autrement dit, les vitesses maximales s'obtiennent le long des plus petites dimensions du plasma; l'expansion continuant principalement dans la direction Oz . Si le profil du faisceau n'a pas la symétrie circulaire, mais rectangulaire ou elliptique dans le plan xOy , le plasma souffre d'une expansion qui garde la forme de départ, orientée cependant à 90 degrés de la distribution de l'intensité laser.

Pour ces raisons, il est généralement considéré comme erroné de comparer des résultats expérimentaux obtenus avec la même valeur de la fluence incidente mais avec des profils du faisceau focalisé différents. Si la même fluence est obtenue en augmentant la

focalisation, le rapport entre les dimensions du spot (x_0, y_0) modifie et le régime d’expansion du plasma est modifié d’un régime d’expansion sphérique à un régime d’expansion cylindrique. Ainsi le taux de dépôt en sera influencé et sa valeur modifiée.

Si initialement le plasma a été considéré comme une source de pertes d’énergie, selon Mihailescu et Gyorgy [17], dans la pratique on a démontré que en l’absence du plasma, les taux de dépôt sont beaucoup diminuées, le matériau ablaté est réparti sur toute la surface de l’enceinte de dépôt et les couches déposées sont non- stoechiométriques et non adhérentes. Au contraire, un plasma bien développé implique une moindre contamination du chambre de dépôt, et l’obtention de couches stoechiométriques et adhérentes. Il a été démontré que le meilleur compromis est achevé dans le cas où la longueur du plasma est égale à la distance de séparation entre la cible et le substrat.

Si l’expansion de la matière ablatée est considérée adiabatique, la longueur du plasma est donnée par la relation :

$$L_p = A[(\gamma - 1)E_0]^{1/3\gamma} V^{(\gamma-1)/3\gamma} P^{-1/3\gamma} \quad (18)$$

où: A est un facteur géométrique lié à la forme du spot laser sur la surface de la cible ;

γ est le rapport de la chaleur spécifique ;

E_0 est l’énergie laser ;

P est la pression du gaz et

V est le volume initial du plasma ($V = v_0 \tau_{las} S_c$, v_0 est la vitesse initiale des espèces, τ_{las} la durée du pulse laser et S_c l’aire du spot)

Dans la relation (18) nous pouvons observer que, si la géométrie de l’expérience reste non modifiée, E_0 et P sont les paramètres qui influenceront la longueur du plasma L_p . Deux comportements différents peuvent être différenciés : la croissance de la pression conduit a la diminution de L_p , tandis que la croissance de l’énergie laser produit des effets inverses, c’est à dire l’augmentation de la longueur du plasma.

Le profil d’un film déposé par PLD a été théoriquement prédit par des calculs numériques [18, 19]. Un diagramme schématisé de l’expansion du plasma est présenté dans la Figure 2.2.

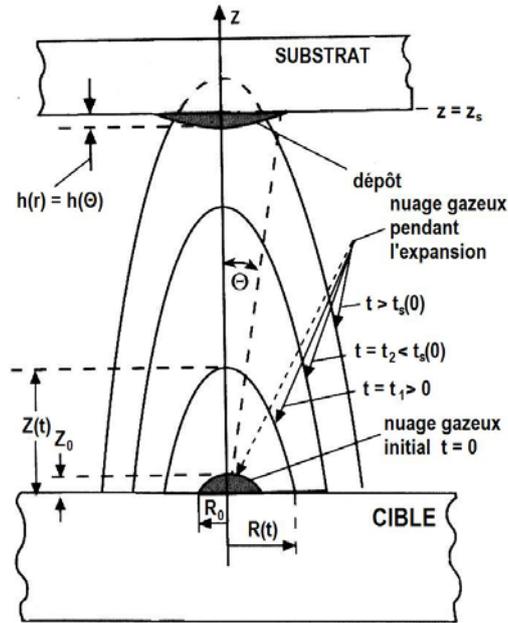


Figure 2.2. Schéma de l'expansion du nuage vapeur/plasma et de la déposition de la couche mince selon [17]

Si l'expansion du plasma se produit en présence d'un gaz à basse pression, il faut aussi considérer la contribution de l'interaction plasma – gaz. En général, la présence d'un gaz dans l'enceinte où se produit l'ablation détermine une atténuation de la propagation du plasma, due aux phénomènes de collision des espèces expulsées avec les molécules ou les atomes du gaz correspondant. L'aspect du plasma en expansion est dépendant de la pression du gaz, du type d'interaction (élastique ou inélastique) entre les atomes de la cible et les atomes ou molécules du gaz, mais aussi de la masse des atomes de la cible. Lorsqu'on utilise des gaz réactifs (oxygène, azote, méthane, etc.), on peut faire apparaître des effets de réactivité chimique qui peuvent même créer des composés nouveaux en fonction du matériau de la cible et de la pression du gaz. A une fluence laser donnée, plus la pression du gaz croît, plus le plasma s'amenuise.

Une des caractéristiques de la méthode de dépôt laser pulsé, considérée comme un désavantage dans certaines applications comme la microélectronique, l'optoélectronique, le micro et nano usinage etc., est la présence des particules et des gouttelettes dans la couche déposée, autant sur la surface que dans son volume. Selon la littérature [20, 21, 22, 23], les gouttelettes sont formées comme effet de :

- la dislocation explosive de la substance déterminée par le surchauffage sous surfacique dans la cible ;

- la condensation de la phase gazeuse du matériau évaporé ;
- l'expulsion de phase liquide sous l'action de la pression de recul de la substance ablatée ;
- l'explosion sous forme d'onde de choc à l'interface matériau fondu / solide.

Des méthodes efficaces pour l'élimination des gouttelettes et des particules sont :

- l'utilisation de cibles présentant une surface lisse. Leur irradiation laser doit être uniforme;
- la rotation et/ou translation de la cible ;
- la fragmentation des particules à l'aide d'un faisceau laser supplémentaire parallèle à la surface de la cible ;
- l'ablation de la même cible avec deux faisceaux laser.

Le choix des paramètres laser adéquats a une grande importance, puisqu'ils déterminent le type et les concentrations relatives des espèces qui partent de la surface de la cible, de leur degré d'ionisation et de leur distribution spatiale et temporelle.

2.3. Equipement PLD

Le montage PLD choisi pour nos expériences, schématiquement représenté dans la Figure 2.3, consiste en deux systèmes séparés, utilisées ensemble :

- *la source laser* à excimères KrF*, émettant à la longueur d'onde $\lambda = 248$ nm . Cette valeur est très convenable parce que la majorité des matériaux absorbent fortement dans la région UV du spectre lumineux. Les coefficients d'absorption croissent lorsque la longueur d'onde diminue. Ainsi la forte absorption amène à la décroissance des valeurs des fluences du seuil d'ablation;
- *l'enceinte de dépôt*, dans laquelle tous les paramètres tels que (i) la pression de l'environnement dans laquelle se produit la propagation du plasma, (ii) la nature du gaz dans lequel se produit l'ablation, (iii) la distance de séparation entre la cible et le substrat et (iv) la température du substrat peuvent être contrôlés.

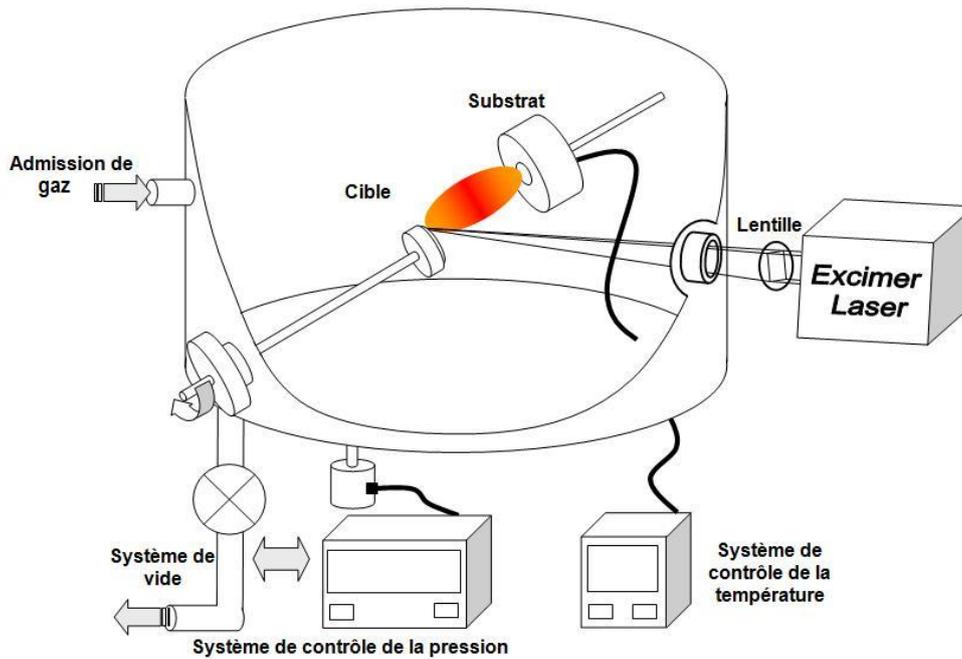


Figure 2.3. Montage PLD utilisé dans nos expériences

Deux types de lasers à excimères KrF* ont été utilisés :

- le premier, un laser expérimental de production ex-soviétique, modèle M 1071 ($\lambda = 248 \text{ nm}$, $E \leq 150 \text{ mJ}$, $\tau_{\text{FWHM}} \approx 7 \text{ ns}$ et $\nu \leq 20\text{Hz}$);
- le deuxième, Lambda Physik Coherent, modèle COMPexPro 205 ($\lambda = 248 \text{ nm}$, $E \leq 750 \text{ mJ}$, $\tau_{\text{FWHM}} \approx 25 \text{ ns}$ et $\nu \leq 50\text{Hz}$).

Les valeurs de l'énergie utilisée pendant les expériences ont été suivies à l'aide d'un système Coherent EM 1000. Les durées des impulsions ont été mesurées à l'aide d'un détecteur à Si Thorlabs DET 210 et d'un oscilloscope Tektronix 350D. La forme temporelle des impulsions fournies par la première source laser, ainsi que leur distribution d'énergie est donnée dans la Figure 2.4.

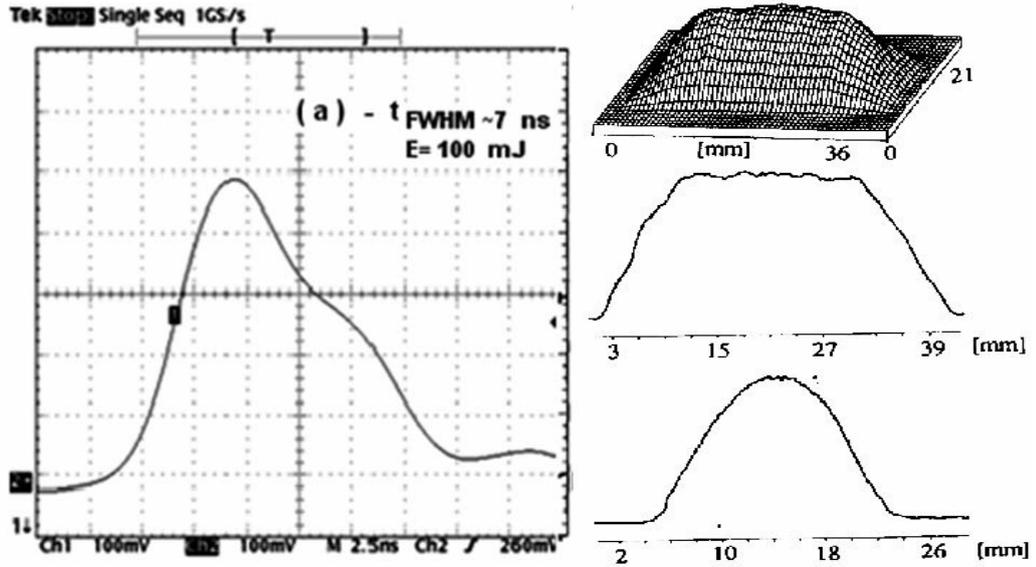


Figure 2.4. Paramètres des impulsions laser fournies par la source M 1071

Dans la Figure 2.5 nous pouvons observer les mêmes paramètres du faisceau pour la source CompexPro 205.

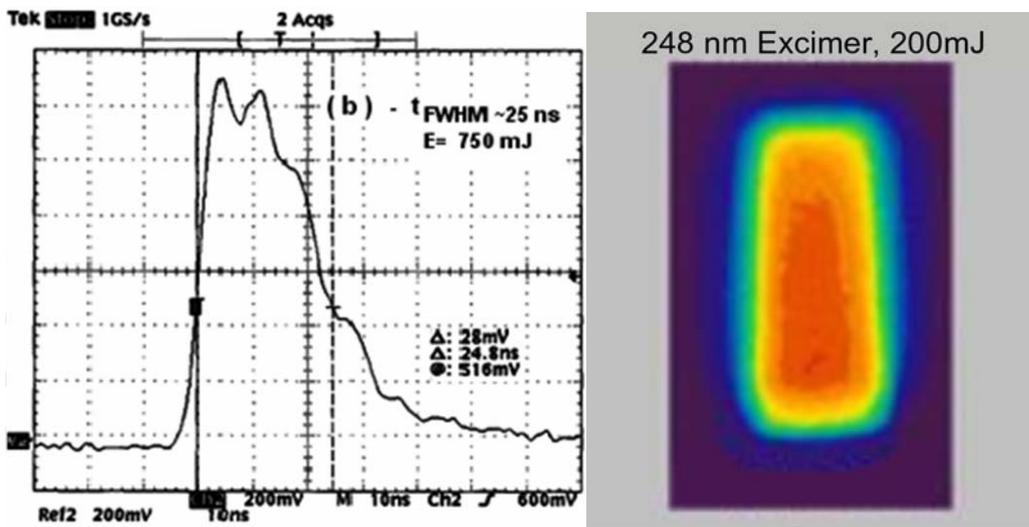


Figure 2.5. Paramètres des impulsions laser fournies par la source CompexPro 205

Le faisceau laser, de forme rectangulaire, est focalisé sur la surface de la cible à l'aide d'une lentille cylindrique en MgF_2 traitée antireflet, ayant une focale de 300 mm. L'angle d'incidence du faisceau sur la cible est de 45° par rapport à la normale.

La fluence laser se détermine en divisant l'énergie laser d'un pulse par l'aire du faisceau sur la surface de la cible. L'aire du faisceau se détermine en mesurant la dimension de la tâche obtenue sur un papier photosensible exposé au faisceau.

Pendant le dépôt, les premières 1000 impulsions sont utilisées pour le nettoyage de la cible. Dans cette étape, les éventuels contaminants trouvés sur la surface de la cible sont ablatés et déposés sur un écran collecteur interposé entre la cible et le substrat. Pourtant, ces 1000 impulsions ne compteront pas pour la procédure proprement dite de dépôt. Au cours du déroulement de l'expérience, la cible est soumise à un mouvement de translation/rotation afin d'avoir toujours exposé le matériau frais pour l'ablation. De plus, par ce moyen on évite la perforation potentielle de la cible.

Dans le processus de dépôt il est possible d'utiliser plusieurs cibles interchangeables, montées sur un dispositif porte cible de type carrousel. En utilisant cette option de la chambre de dépôt, nous pouvons obtenir des recouvrements multicouches dans la même séance expérimentale, sans exposition à l'atmosphère ambiante.

Avant le début de la procédure de dépôt, tous les substrats sont nettoyés dans un bain ultrasonique d'acétone et d'alcool éthylique afin d'éliminer toute trace de matière contaminante de leur surface.

Le substrat est placé parallèlement à la cible sur un support positionné à une distance variable de 3 à 8 cm, en fonction des caractéristiques spécifiques du matériau qui doit être déposé. Généralement, cette distance est choisie selon la longueur du plasma, comme expliqué dans le sous-chapitre antérieur. Le substrat peut être chauffé *in-situ* de manière contrôlée dans une gamme de température comprise entre 20-800°C, à l'aide d'un four électrique, résistif.

La chambre de réaction permet l'insertion de gaz, inertes ou réactifs, qui participent à la synthèse des composées sur le substrat. Les expérimentations peuvent être réalisées en mode de pression statique ou dynamique des gaz introduits dans l'enceinte. Dans le cas du régime dynamique, l'écoulement du gaz dans l'enceinte est contrôlé au moyen d'un régulateur de débit MKS 50.

Les films peuvent être déposés pour des épaisseurs variables (de dizaines de nm jusqu'à quelques microns) en fonction du nombre des impulsions laser. La valeur de l'épaisseur peut être facilement estimée en connaissant le nombre de pulses et le taux moyen de dépôt caractéristique de chaque matériau.

Bien qu'en PLD beaucoup de paramètres jouent sur les propriétés du dépôt, la pression de l'enceinte et la température du substrat en combinaison avec la fluence du laser restent les paramètres critiques pour la synthèse de films de bonne qualité.

Une caractéristique importante de l'installation est la versatilité et l'aisance d'adaptation pour déposer différents composés. Ainsi, outre les films d'hydroxyapatite [24, 25, 26, 27, 28] dont la croissance par ablation laser est étudiée au long de cette thèse, cette installation nous a permis aussi de déposer ou de traiter d'autres composés. Nous énumérons ci-dessous quelques uns d'entre eux:

- la nitrure d'aluminium pour des applications en optoélectronique [29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39] ;
- les oxydes métalliques tels que le ZnO et le SnO₂, pour des applications de détecteurs optiques de gaz [40, 41, 42, 43, 44] ;
- l'Yttrium pour l'obtention de photocatodes [45] ;

2.4. La technique MAPLE

L'obtention de recouvrements organiques par la technique conventionnelle d'ablation laser est limitée parce que l'utilisation de fortes intensités laser peut générer la décomposition photochimique de la cible. Même à des valeurs relativement basses de fluences utilisées, les matériaux organiques vont être détruits [46, 47, 48]. Par conséquent, l'utilisation du laser dans la synthèse de couches minces polymériques nécessite une approche adaptée offerte par la technique de transfert laser pulsé assisté par une matrice (MAPLE – depuis l'anglais *Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation*). La caractéristique principale de cette technique réside dans le processus d'obtention de la cible. Le polymère qui doit être transféré est dissout dans une matrice majoritaire de solvant qui présente une pression de vapeurs élevée et une absorption élevée à la longueur d'onde du faisceau laser [49]. Cette solution est transformée

en cible en l'amenant à l'état solide par congélation dans l'azote liquide, et gardée dans cet état jusqu'à la fin du processus de transfert.

Dans la technique MAPLE, l'interaction entre le laser et la solution polymère – solvant initie deux processus photo-thermiques : (i) la vaporisation de la cible congelée et (ii) l'expulsion du polymère dans la chambre de dépôt, selon les mêmes principes qu'en PLD. L'énergie des photons absorbée par le solvant est transformée en énergie thermique qui induit le chauffage du polymère et la vaporisation du solvant. Les molécules de polymère atteignent une énergie cinétique suffisamment grande pour être déposées sur le substrat sous forme de couche mince. Par une optimisation minutieuse des conditions de dépôt (taux de répétition des impulsions laser, la nature du solvant, sa concentration, la pression du gaz environnant, etc.), ce processus peut se dérouler sans une décomposition significative du polymère.

Une illustration schématique du mécanisme MAPLE est donnée dans la Figure 2.6. Le substrat placé sur la direction du nuage généré par l'irradiation laser va collecter les molécules de polymère, tandis que la plupart des molécules du solvant seront évacuées de la chambre de dépôt par le système de pompage.

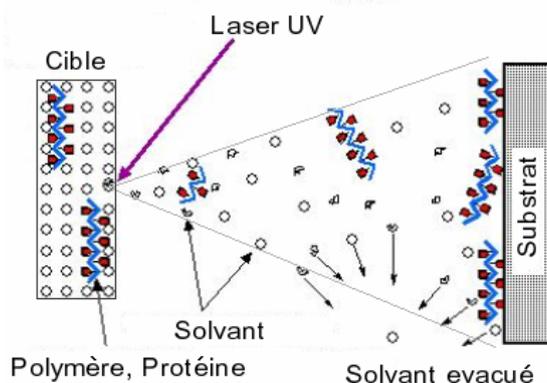


Figure 2.6. Schéma du mécanisme MAPLE

Pour la préparation d'une cible MAPLE le polymère est dissout dans une matrice de solvant. La cible MAPLE contiendra une faible quantité de polymère, en concentration dans le domaine 0,5-5%. Le solvant et la concentration de la solution sont choisis afin de respecter les conditions :

1. le polymère doit former une solution diluée de particules libres ;

2. l'énergie laser doit être absorbée majoritairement par les molécules du solvant et pas par les molécules de polymère;
3. sous l'action du rayonnement laser aucune réaction chimique normale et/ou induite ne doit avoir lieu entre le solvant et le polymère.

Le dispositif expérimental typique MAPLE est présenté dans la Figure 2.7.

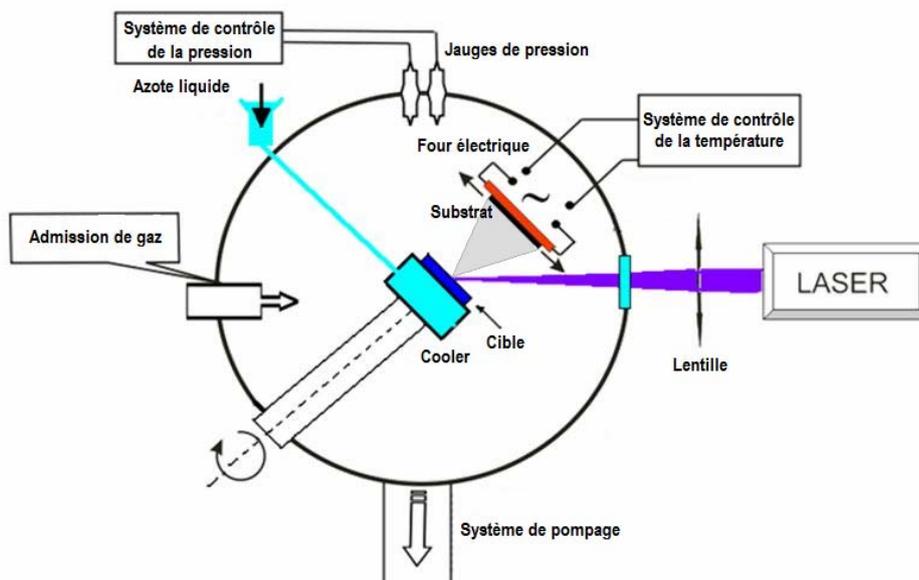


Figure 2.7. Vue schématique du dispositif expérimental MAPLE

Les solutions constituant les cibles ont été amenées à l'état solide par congélation à la température de l'azote liquide (77 K). Le processus cryogénique est induit par trempage dans l'azote liquide et maintenu ultérieurement, pendant l'expérience, en gardant la cible en contact direct avec un refroidisseur [50, 51, 52]. De cette manière, la fusion de la cible est évitée pendant l'expérience.

A l'aide de cette technique, dans le laboratoire nous avons déposé des couches minces de divers polymères/protéines, parmi lesquelles nous pouvons énumérer :

- des couches de fibronectine et de vitronectine, pour des applications d'amélioration des implants chirurgicaux;
- des couches de polyvinyl-alcool [53], polyethylene glycol [54, 55], poly-lactides [56] et des composées à base de pullulan [57, 58], pour des systèmes d'administration contrôlée des médicaments .

2.5. Les techniques de transfert laser direct : LDW, LIFT, MAPLE-DW

Les techniques de transfert laser direct ont été intensivement étudiées dans les dernières années, constituant une méthode simple, versatile et très avantageuse d'obtention de structures de divers matériaux disposés sous forme de motifs géométriques contrôlés.

Le principe de base de ces techniques implique la focalisation d'un faisceau laser pulsé à travers un support (porteur) transparent à la longueur d'onde du laser sur la face arrière d'une couche mince déposée antérieurement et constituée du matériau à transférer (donneur). Ce système constitue la cible. Un substrat (récepteur), sur lequel le matériau donneur doit être transféré, est placé dans le proche voisinage de la cible dans un plan parallèle à une distance bien établie. Une seule impulsion laser, après avoir passé par le support, provoquera l'ablation d'une région étroite de la couche « donneur » trouvée à l'interface. C'est ainsi que l'accumulation de pression à l'intérieur de la couche « donneur » produira la propulsion de la zone de la couche irradiée dans une direction perpendiculaire sur la cible. Une vue schématique est présentée dans les Figures 2.8 et 2.9.

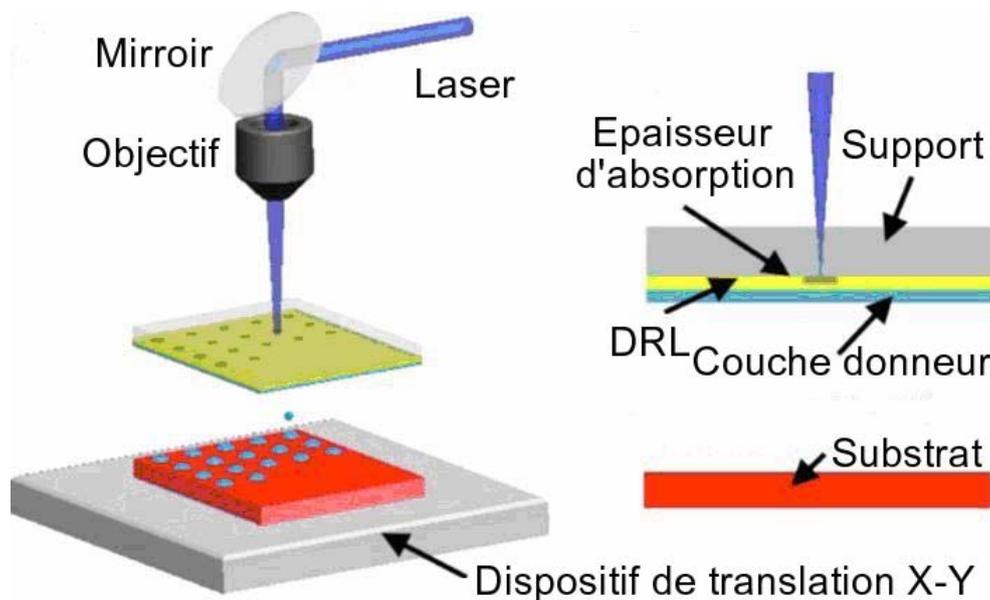


Figure 2.8. Vue schématique du montage de transfert laser direct [59]

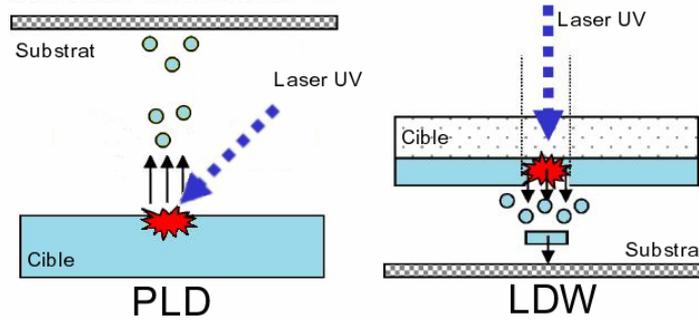


Figure 2.9. Le transfert laser direct, comparé au principe de la PLD

Le matériau transféré constitue un pixel du motif géométrique qui peut être réalisé soit en effectuant le balayage du faisceau laser sur la surface du montage fixe cible – substrat, soit en effectuant la translation sur un système de coordonnées X-Y du montage cible – substrat. Actuellement la meilleure résolution obtenue est de l'ordre de $1\mu\text{m}$ [60].

Les phénomènes physiques sont essentiellement les mêmes qu'en PLD. Conventionnellement, en utilisant des fluences élevées, le transfert direct apparaît suite à un processus de vaporisation du matériau de la couche mince (jouant le rôle de la cible cette fois-ci). La vaporisation du matériau est un effet non désiré parce que la forme du morceau de matériau transféré ne sera plus contrôlable, et de plus, sa composition peut changer sensiblement. Pourtant, si la valeur de la fluence ne dépasse que légèrement le seuil d'ablation et si l'épaisseur de la couche est suffisamment faible, le transfert peut être obtenu juste par la fusion localisée du film (Figure 2.10). Avec un contrôle très précis de la fluence laser, seul le centre du front de fusion peut arriver à la surface libre du film, laissant le matériau fondu sous pression s'étendre vers le substrat dans une région de dimensions inférieures aux dimensions du spot laser [61].

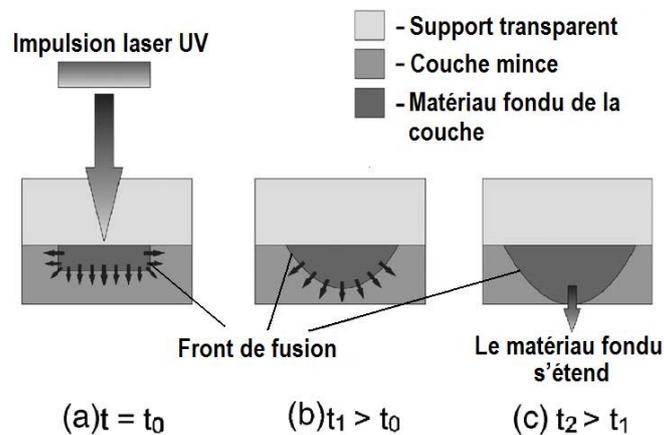


Figure 2.10. Dynamique de la région fondue dans la couche « donneur »

Cette technique, dans laquelle la propulsion est faite par la couche « donneur », est connue dans la littérature sous le nom de Laser Induced Forward Transfer (LIFT).

Pour élargir le domaine d’applicabilité de cette méthode aux matériaux pour lesquels la fusion n’est pas désirable pendant le processus de transfert, certaines variantes de LDW sont apparues. L’amélioration principale consiste dans l’interposition d’une couche sacrificielle entre le support transparent et la couche donneur, qui a le rôle d’absorption de l’énergie laser et de dissipation de l’énergie thermique inhérente dans le cas des lasers UV, et de transformer cette énergie en impulsion mécanique capable de transférer une portion de la couche « donneur ». Cette couche sacrificielle est dénommée en littérature Dynamic Release Layer (DRL) [62], et peut consister en une couche soit métallique, soit polymérique.

Ainsi une classification des variantes de techniques de transfert laser direct a été réalisée [63] :

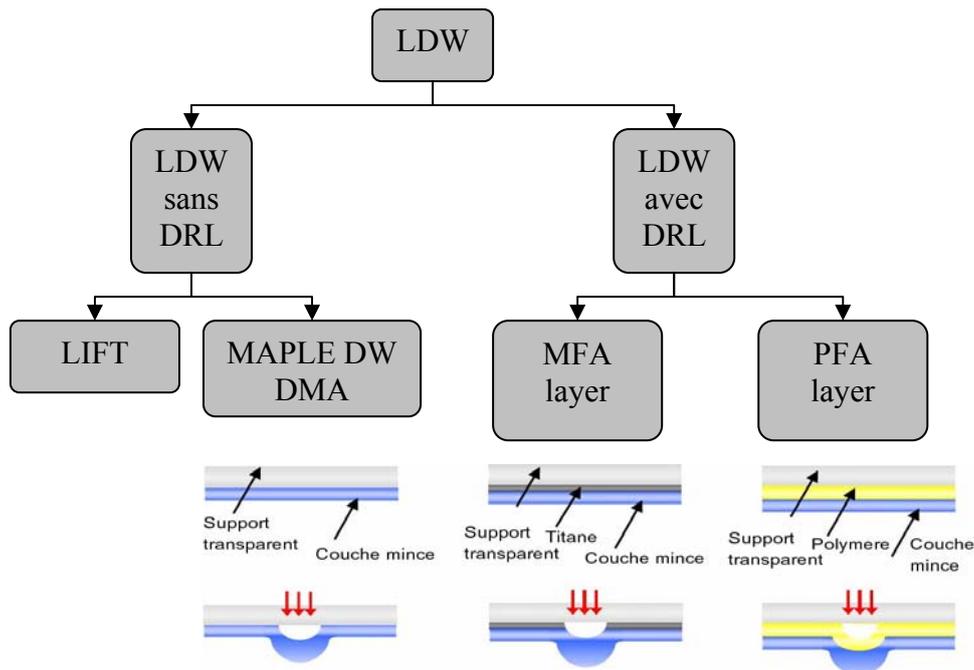


Figure 2.11. Classification des techniques de transfert laser direct

La technique MAPLE-DW (Matrix Assiste Pulsed Laser Evaporation – Direct Write) est une technique où l’absorption se fait directement par une matrice : Direct Matrix Absorption (DMA). Ce processus utilise comme cible une couche mince constituée du matériau à être transféré dissout dans une matrice absorbante à la longueur d’onde du laser. Le principe est semblable à la technique MAPLE conventionnelle : pendant l’irradiation laser,

le solvant sera évaporé dans l'atmosphère tandis que le matériau à déposer se retrouvera sur le substrat récepteur.

MFA correspond à l'abréviation Metal Film Absorptive. Dans ce cas, la couche sacrificielle consiste en une couche métallique. Par contre, dans le cas où cette couche est formée par un polymère (les plus habituellement du polyimide ou triazène), la technique s'inscrit dans la classe PFA (Polymer Film Absorptive).

La méthode utilisée dans notre laboratoire s'inscrit dans la classe MFA. Une couche de titane d'environ 100 nm a été réalisée antérieurement par PLD sur une lame de quartz. Le titane a été choisi grâce à ses propriétés connues, son comportement à l'irradiation étant le plus prédictible parmi tous les autres matériaux disponibles. Le support quartz/Ti a été ultérieurement recouvert d'une couche mince de fibronectine par dip-coating. Afin de réaliser le transfert direct, la source laser CompexPro 205 émettant à 248 nm, 25 ns a été utilisée.

Les techniques de transfert laser direct présentent une série d'avantages parmi lesquelles nous pouvons énumérer :

- i. l'expérience peut se dérouler dans l'atmosphère ambiante, sans aucune utilisation de systèmes de vide ou de chauffage;
- ii. nous pouvons utiliser presque tout type de cible ;
- iii. tout type de substrat peut être utilisé ;
- iv. presque tout type de source laser ayant des durées d'impulsions du domaine des femtosecondes jusqu'au domaine des nanosecondes peut être utilisé ;
- v. les méthodes ont une grande manoeuvrabilité et versatilité, le processus étant complètement compatible CAD/CAM ;
- vi. tout motif géométrique peut être obtenu ;
- vii. la réalisation de structures 3D peut être achevée par la superposition des motifs 2D. Ceci peut être réalisé par le changement successif de plusieurs cibles en gardant le même substrat. En modifiant la composition de cibles, des multi-structures ayant des compositions complexes contrôlées peuvent être obtenues.

Les applications actuelles varient de l'usinage de divers microcircuits électroniques jusqu'au transfert de microorganismes vivants.

Bibliographie

- [1] W. R. Lacefield, dans *An Introduction to Bioceramics*, L. L. Hench, J. Wilson (Eds.), Adv. Ser. Ceram. 1, World Scientific Publishing, Co. Pte. Ltd., London, Hong Kong, Singapore (1993) 223.
- [2] Y. C. Tsui, C. Doyle, T. W. Clyne, *Biomater.* 19 (1998) 2015.
- [3] K. A. Gross, C. C. Berndt, H. Herman, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 407.
- [4] P. A. Campbell, H. C. Gledhill, S. R. Brown, I. G. Turner, *J. Vac. Sci. Technol. B* 14 (2) (1996) 1167.
- [5] K. van Dijk, H. G. Schaeken, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen, *Biomater.* 17 (1996) 405.
- [6] A. M. Ektessabi, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 99 (1995) 610.
- [7] Y. Fujishiro, A. Fujimoto, T. Sato, A. Okuwaki, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 6 (1995) 172.
- [8] S. Ban, S. Maruno, *Biomater.* 16 (1995) 977.
- [9] G. Spoto, E. Ciliberto, G. C. Allen, *J. Mater. Chem.* 4 (1994) 1849.
- [10] S. W. Russell, K. A. Luptak, C. T. A. Suchicital et al., *J. Am. Ceram. Soc.* 79 (1996) 837.
- [11] M. Nagai, K. Yamashita, T. Umegaki, *Phosphorus Res. Bull.* 1 (1991) 167.
- [12] B. E. Tucker, C. M. Cotell, R. C. Y. Auyeung et al., *Biomater.* 17 (1996) 631.
- [13] L. Torrisi, *Thin Solid Films* 237 (1994) 12.
- [14] M. Jelinek, V. Olsan, L. Jastrabik et al., *Thin Solid Films* 257 (1995) 125.
- [15] *Pulsed laser deposition of thin films*, D. B. Chrisey, G. K. Hubler (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1994).
- [16] R. K. Singh, J. Narayan, *Phys. Rev. B* 41 (1990) 8843.
- [17] I.N. Mihailescu, E. Gyorgy, dans *International Trends in Optics and Photonics*, T. Asakura (Eds.), Springer-Verlag, (1999) 201-214
- [18] S.I. Anisimov, B.S. Luk'yanchuk, A. Luches (1995) *JETP*, 81, 129
- [19] S.I. Anisimov, D. Bauerle, B.S. Luk'yanchuk (1993) *Phys. Rev. B*, 48 (16), 12076
- [20] D. Bauerle, *Laser Processing and Chemistry* (2nd Edition), Springer-Verlag (1996)
- [21] M. Von Allmen, A. Blatter, *Laser-Beam Interactions with Materials* (2nd Edition), Springer Ser. Mater. Sci. (1995)
- [22] V. Craciun, D. Craciun, M.C. Bunesco, C. Boulmer-Lebrgne, J. Hermann, *Phys. Rev. B*, 58(1998), 6787
- [23] D. Chrisey, G.K. Huber (Eds.) *Pulsed Laser Interactions with Materials*, J. Wiley (1994)
- [24] S. Grigorescu, A. Carrado, C. Ulhaq, J. Faerber, C. Ristoscu, G. Dorcioman, E. Axente, J. Werckmann, I.N. Mihailescu, *Appl. Surf. Sci.* 254(4) 2007, p.1150
- [25] S. Grigorescu, F. Sima, E. Axente, F. Feugeas, I.N. Mihailescu, *Proceedings of SPIE* (2007), 6606, art. no 66061N
- [26] E. Gyorgy, S. Grigorescu, G. Socol, I.N. Mihailescu, D. Janackovic, A. Dindune, Z. Kanepi, E. Palcevskis, L. Zdrentu, S.M. Petrescu, *Appl. Surf. Sci.* 253(19) 2007, p 7981
- [27] A. Carrado, A. Fabre, L. Barralier, N. Viart, I.N. Mihailescu, G. Socol, S. Grigorescu, J. Werckmann, *Materials Science Forum* 524-525 (2006), p 885
- [28] S. Grigorescu, C. Ristoscu, G. Socol, E. Axente, F. Feugeas, I.N. Mihailescu, *Romanian Reports in Physics* 57(4) 2005, p. 1003
- [29] Bakalova, S., Szekeres, A., Cziraki, A., Huhn, G., Havancsak, K., Grigorescu, S., Socol, G., Axente, E., Mihailescu, I.N., Gavrilă, R. (2009) *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 11 (10), pp. 1479-1482.
- [30] Simeonov, S., Szekeres, A., Minkov, I., Grigorescu, S., Socol, G., Ristoscu, C., Mihailescu, I.N. (2009) *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 11 (9), pp. 1292-1295
- [31] Bakalova, S., Szekeres, A., Huhn, G., Havancsak, K., Grigorescu, S., Socol, G., Ristoscu, C., Mihailescu, I.N. (2009) *Vacuum*, 84 (1), pp. 155-157.
- [32] Szekeres, A., Bakalova, S., Grigorescu, S., Cziraki, A., Socol, G., Ristoscu, C., Mihailescu, I.N. (2009) *Applied Surface Science*, 255 (10), pp. 5271-5274
- [33] S. Bakalova, A. Szekeres, A. Cziraki S. Grigorescu, G. Socol and I. N. Mihailescu (2009) *Procs. of the NATO-Advanced Study Institute on Functionalized Nanoscale Materials, Devices, and Systems for Chem.-bio Sensors, Photonics, and Energy Generation and Storage*, Eds. A. Vaseashta, I.N. Mihailescu, Springer, 2008, pp. 357-364
- [34] Simeonov, S., Bakalova, S., Szekeres, A., Kafedjijska, E., Grigorescu, S., Socol, G., Mihailescu, N. (2008) *Journal of Physics: Conference Series*, 113 (1), art. no. 012050,
- [35] Simeonov, S., Bakalova, S., Kafedjijska, E., Szekeres, A., Grigorescu, S., Popescu, A., Cojanu, C., Sima, F., Socol, G., Mihailescu, I.N. (2007) *Proceedings of the International Semiconductor Conference, CAS, 2*, art. no. 4063220, pp. 261-264
- [36] Bakalova, S., Szekeres, A., Cziraki, A., Grigorescu, S., Socol, G., Axente, E., Mihailescu, I.N. (2007) *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 6785, art. no. 67850H

- [37] Bakalova, S., Szekeres, A., Cziraki, A., Lungu, C.P., Grigorescu, S., Socol, G., Axente, E., Mihailescu, I.N. (2007) *Applied Surface Science*, 253 (19), pp. 8215-8219. Cited 6 times.
- [38] Simeonov, S., Bakalova, S., Kafedjiiska, E., Szekeres, A., Socol, G., Grigorescu, S., Mihailescu, I.N. (2007) *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9 (2), pp. 323-325
- [39] Bakalova, S., Szekeres, A., Grigorescu, S., Axente, E., Socol, G., Mihailescu, I.N. (2006) *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 85 (1), pp. 99-102
- [40] Bakalova, S., Simeonov, S., Kafedjiiska, E., Szekeres, A., Grigorescu, S., Socol, G., Axente, E., Mihailescu, I. (2006) *Plasma Processes and Polymers*, 3 (2), pp. 205-208
- [41] Khandelwal, R., Singh, A.P., Kapoor, A., Grigorescu, S., Miglietta, P., Stankova, N.E., Perrone, A. (2009) *Optics and Laser Technology*, 41 (1), pp. 89-93
- [42] Khandelwal, R., Singh, A.P., Kapoor, A., Grigorescu, S., Miglietta, P., Stankova, N.E., Perrone, A. (2008) *Optics and Laser Technology*, 40 (2), pp. 247-251
- [43] Ristoscu, C., Caiteanu, D., Prodan, G., Socol, G., Grigorescu, S., Axente, E., Stefan, N., Ciupina, V., Aldica, G., Mihailescu, I.N. (2007) *Applied Surface Science*, 253 (15), pp. 6499-6503.
- [44] Mazingue, T., Escoubas, L., Spalluto, L., Flory, F., Socol, G., Ristoscu, C., Axente, E., Grigorescu, S., Mihailescu, I.N., Vainos, N.A. (2005) *Journal of Applied Physics*, 98 (7), art. no. 074312, pp. 1-6.
- [45] Cultrera, L., Grigorescu, S., Gatti, G., Miglietta, P., Tazzioli, F., Perrone, A. (2009) *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (2), pp. 1585-1588
- [46] D.B. Chrisey, G.K. Hübner, (Eds.), *Pulsed Laser Deposition of Thin Films*, John Wiley & Sons, New York, 1994
- [47] H. Niino, A. Yabe, *Appl. Phys. Lett.* 60(21), (1992) 2697-2699
- [48] R. Srinivasan, B. Braren, D.E. Seeger, R.W. Dreyfus, *Macromolecules* 19, (1986) 916-921
- [49] R.A. McGill, D.B. Chrisey, *Method Of Producing A Film Coating By Matrix Assisted Pulsed Laser Deposition*, Patent No. 6,025,036, (2000).
- [50] P.K. Wu, B.R. Ringeisen, D.B. Krizman, C.G. Frondoza, M. Brooks, D.M. Bubb, R.C.Y. Auyeung, A. Pique, B.J. Spargo, R.A. McGill, D.B. Chrisey, *Laser Transfer of Biomaterials: Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation (MAPLE) and MAPLE Direct Write*, *Rev. Sci. Instr.* 74 (4), (2003) 2546-2557
- [51] M. Jelinek, T. Kocourek, J. Remsa, R. Cristescu, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *MAPLE Applications in Studying Organic Thin Films*, *Laser Physics* 17(2), (2007) 66-70(5)
- [52] R. Cristescu, D. Mihaiescu, I. Stamatina, G. Socol, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Deposition of Biopolymer Thin Films by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation*, *Applied Physics A – Material Science & Processing* 79(4-6), (2004) 1023-1026
- [53] Cristescu, R., Popescu, C., Popescu, A.C., Grigorescu, S., Duta, L., Mihailescu, I.N., Caraene, G., Albulescu, R., Albulescu, L., Andronie, A., Stamatina, I., Ionescu, A., Mihaiescu, D., Buruiana, T., Chrisey, D.B. *Functionalized polyvinyl alcohol derivatives thin films for controlled drug release and targeting systems: MAPLE deposition and morphological, chemical and in vitro characterization* (2009) *Applied Surface Science*, 255 (10), pp. 5600-5604
- [54] Cristescu, R., Popescu, C., Popescu, A., Grigorescu, S., Mihailescu, I.N., Mihaiescu, D., Gittard, S.D., Narayan, R.J., Buruiana, T., Stamatina, I., Chrisey, D.B. *Functional polyethylene glycol derivatives nanostructured thin films synthesized by matrix-assisted pulsed laser evaporation* (2009) *Applied Surface Science*, 255 (24), pp. 9873-9876
- [55] Cristescu, R., Popescu, C., Popescu, A.C., Grigorescu, S., Duta, L., Mihailescu, I.N., Andronie, A., Stamatina, I., Ionescu, O.S., Mihaiescu, D., Buruiana, T., Chrisey, D.B. *Laser processing of polyethylene glycol derivative and block copolymer thin films* (2009) *Applied Surface Science*, 255 (10), pp. 5605-5610
- [56] Cristescu, R., Doraiswamy, A., Patz, T., Socol, G., Grigorescu, S., Axente, E., Sima, F., Narayan, R.J., Mihaiescu, D., Moldovan, A., Stamatina, I., Mihailescu, I.N., Chisholm, B., Chrisey, D.B. *Matrix assisted pulsed laser evaporation of poly(d,l-lactide) thin films for controlled-release drug systems* (2007) *Applied Surface Science*, 253 (19), pp. 7702-7706
- [57] Cristescu, R., Jelinek, M., Kocourek, T., Axente, E., Grigorescu, S., Moldovan, A., Mihaiescu, D.E., Albulescu, M., Buruiana, T., Dybal, J., Stamatina, I., Mihailescu, I.N., Chrisey, D.B. *Matrix assisted pulsed laser evaporation of pullulan tailor-made biomaterial thin films for controlled drug delivery systems* (2007) *Journal of Physics: Conference Series*, 59 (1), art. no. 031, pp. 144-149
- [58] Cristescu, R., Dorcioman, G., Ristoscu, C., Axente, E., Grigorescu, S., Moldovan, A., Mihailescu, I.N., Kocourek, T., Jelinek, M., Albulescu, M., Buruiana, T., Mihaiescu, D., Stamatina, I., Chrisey, D.B. *Matrix assisted pulsed laser evaporation processing of triacetate-pullulan polysaccharide thin films for drug delivery systems* (2006) *Applied Surface Science*, 252 (13 SPEC. ISS.), pp. 4647-4651
- [59] N.T. Kattamis, P.E. Purnick, R. Weiss, C.B. Arnold, *Appl. Phys Lett* 91, 171120 (2007)
- [60] J. Bohandy, B.F. Kim, F.J. Adrian, *J. Appl. Phys.* 60, 1538 (1986).
- [61] D.P. Banks, C. Grivas, J.D. Mills, R.W. Eason, I. Zergioti, *Appl. Phys. Rev* 89, 193107 (2006)

- [62] K.S.Kaur, R. Fardel, T.C. May-Smith, M. Nagel, D.P. Banks, C. Grivas, T. Lippert, R.W. Eason, J. Appl. Phys 105, 113119 (2009)
- [63] N.T. Kattamis, N.D. McDaniel, S. Bernhard, C.B. Arnold, Appl. Phys. Lett. 94, 103306 (2009)

CHAPITRE

3

Résultats et discussion

3.1. Etude des mécanismes de croissance des couches minces d'hydroxyapatite par ablation laser

Pour la compréhension des mécanismes de croissance des couches d'hydroxyapatite, il faut tenir compte du fait que la couche est obtenue suite à des dépôts successifs de matériau expulsé de la cible par chaque impulsion laser.

Selon les études de spectroscopie optique d'émission corroborées avec l'imagerie rapide du plasma entreprises par Serra et al [1 – 4], le plasma issu de l'irradiation d'une cible d'hydroxyapatite pure avec un laser à excimères émettant à 248 nm et ayant une durée d'impulsion de 30 ns est formée par trois composantes (Figure 3.1.1), qui varient selon les niveaux de fluence utilisées :

- une composante rapide sous forme de plume, formée des atomes et ions de Ca, qui se déplace avec une vitesse d'environ 2×10^4 m/s. Cette composante présente une expansion latérale dans la direction parallèle au petit axe du spot laser ;
- une deuxième composante formée des radicaux et oxydes de Ca, ayant une vitesse d'environ 2×10^3 m/s. Cette composante présente très peu d'expansion latérale ;
- une composante lente, formée par des particules chaudes et des gouttelettes, qui se déplace avec une vitesse de 3×10^2 m/s à environ 50 μ s après le pulse laser.

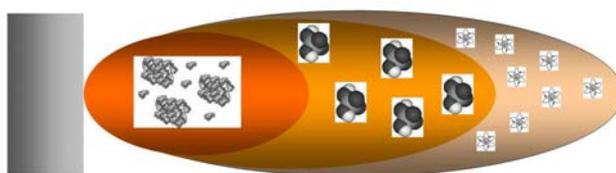


Figure 3.1.1. Vue schématique d'un plasma formé suite à l'irradiation à 248 nm d'une cible d'hydroxyapatite

Le développement de la troisième composante est en effet la partie la plus intéressante. Si le mouvement des premières deux composantes se fait à vitesse constante, en concordance avec le comportement typique d'expansion des plasmas, la composante lente se comporte plutôt comme un amas de particules chaudes, expulsées de la cible soit par des mécanismes explosives sub-surfaciques, soit sous l'action de la pression de recul du matériau ablaté qui entraîne l'expulsion de la phase liquide. Pendant les premières 50 μ s après l'irradiation laser, cette troisième composante reste au niveau de la surface de la cible. Après ce délai, elle commence à se développer vers le substrat d'une manière semblable à la deuxième

composante et aura une durée de vie de l'ordre de quelques millisecondes. C'est à cette composante que sont attribuées les particules et les gouttelettes retrouvées sur les couches déposées. L'émission de lumière de cette partie du plasma correspond à la radiation du corps noir, selon les études mentionnées.

La position des trois composantes du plasma en fonction du temps est donnée dans la Figure 3.1.2.

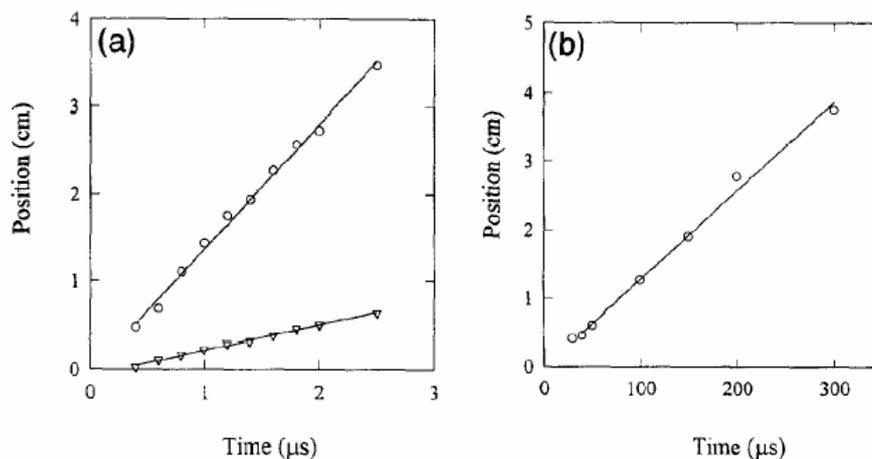


Figure 3.1.2. Position des trois composantes mesurée par rapport à la cible en fonction du temps. a) ○ – le premier nuage rapide ; ▽ - la deuxième composante et b) ○ - la composante lente [2]

On peut observer qu'en plaçant le substrat à une distance de 3 cm, le dépôt réalisé par la même impulsion laser démarrera par la composante rapide à 2 μs et finira au bout de 200 μs, par la participation de la composante lente.

Alors, conformément à ces études, chaque impulsion laser apportera sur le substrat en premier une quantité d'atomes et d'ions de Ca, suivie par une quantité de radicaux et le dépôt sera accompli par l'arrivée des particules et des gouttelettes de matériau fondu. Selon les mécanismes classiques de croissance appliquée en PLD, les atomes, les ions et les radicaux vont se recombinaer au niveau du substrat, en concordance avec sa température, pour former des composés de calcium. Aussi, les dimensions des gouttelettes retrouvées sur le substrat vont varier de quelques dizaines de nanomètres jusqu'à 10 microns.

Les expériences entreprises dans notre laboratoire ont été réalisées avec le même type de laser, émettant à 248 nm, avec une durée de l'impulsion de 25 ns.

Une image classique, ainsi que les déterminations par spectroscopie optique d'émission sur le plasma d'une cible d'hydroxyapatite pure sont présentées dans la Figure 3.1.3. Après l'indexation des lignes d'émission atomique, nous avons montré la présence des ions de calcium (Ca I et Ca II), de l'oxygène (O I et O II) et du phosphore (P II). Il y a aussi des pics qui n'ont pas pu être identifiés comme des pics d'ions, ce qui indiquerait des émissions dues à des espèces moléculaires présentes dans le plasma.

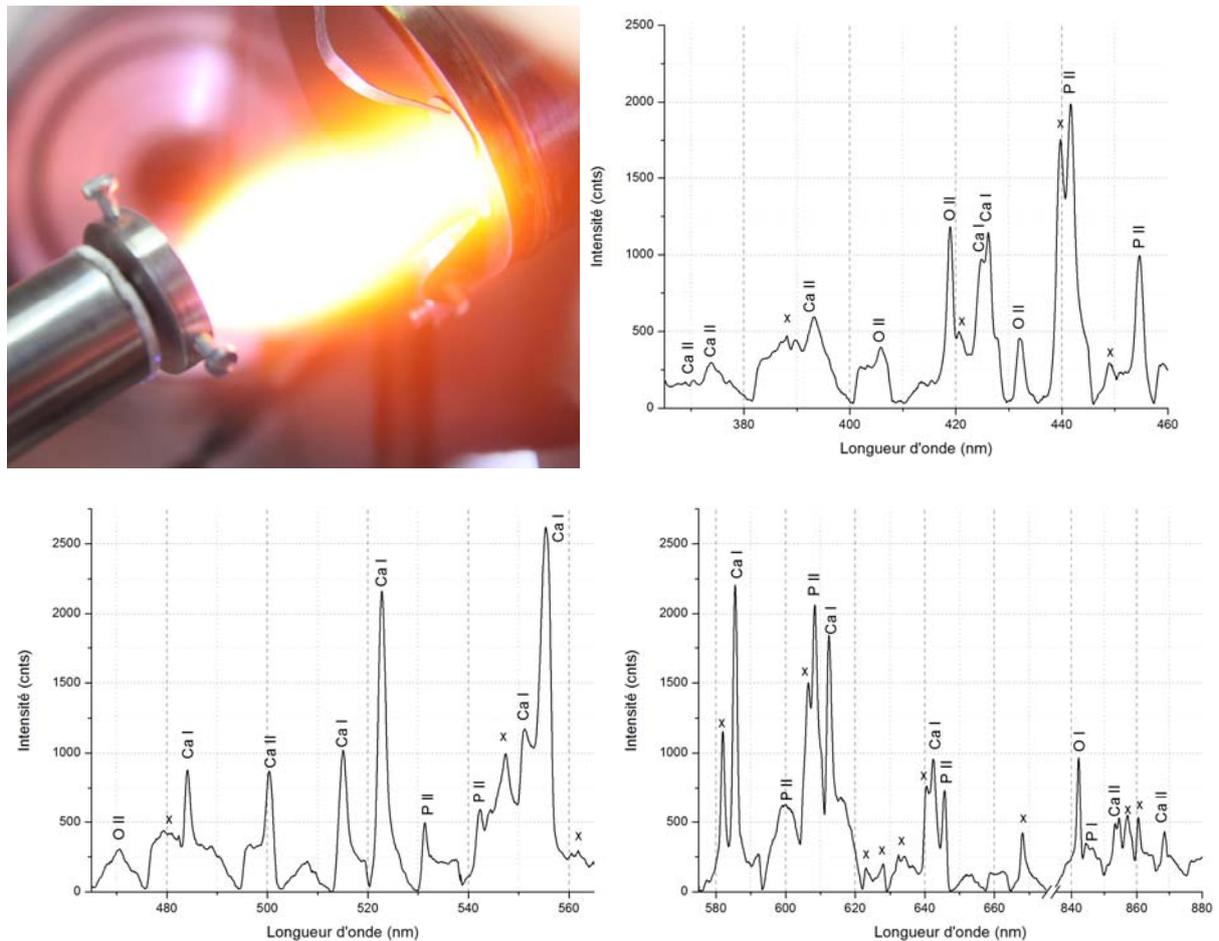


Figure 3.1.3. Spectres d'émission du plasma déterminés à partir d'une cible d'hydroxyapatite

La Figure 3.1.4 présente la surface d'une cible d'hydroxyapatite (a) avant et (b) après avoir été irradiée par le laser. Il peut être observé que l'excitation de la cible a été faite par des mécanismes thermodynamiques. La morphologie est caractéristique à un matériau fondu et re-solidifié. Le détail présenté dans la Figure 3.1.4 c), réalisé à un fort agrandissement, montre le type de solidification caractéristique de l'hydroxyapatite, de forme fractale. Les trous circulaires suggèrent la présence du phénomène de bouillonnement. De plus, les fissures présentes sur la surface de la cible sont liées aux phénomènes de dilatation/contraction cycliques, correspondant au chauffage/refroidissement répété.

Le rapport Ca/P déterminé par analyse dispersive en énergie (EDS) a légèrement augmenté de 1,66 (valeur de la zone initiale non irradiée) à 1,68 (zone irradiée par le laser), valeur qui ne peut pas indiquer un changement compositionnel considérable de la surface de la cible.

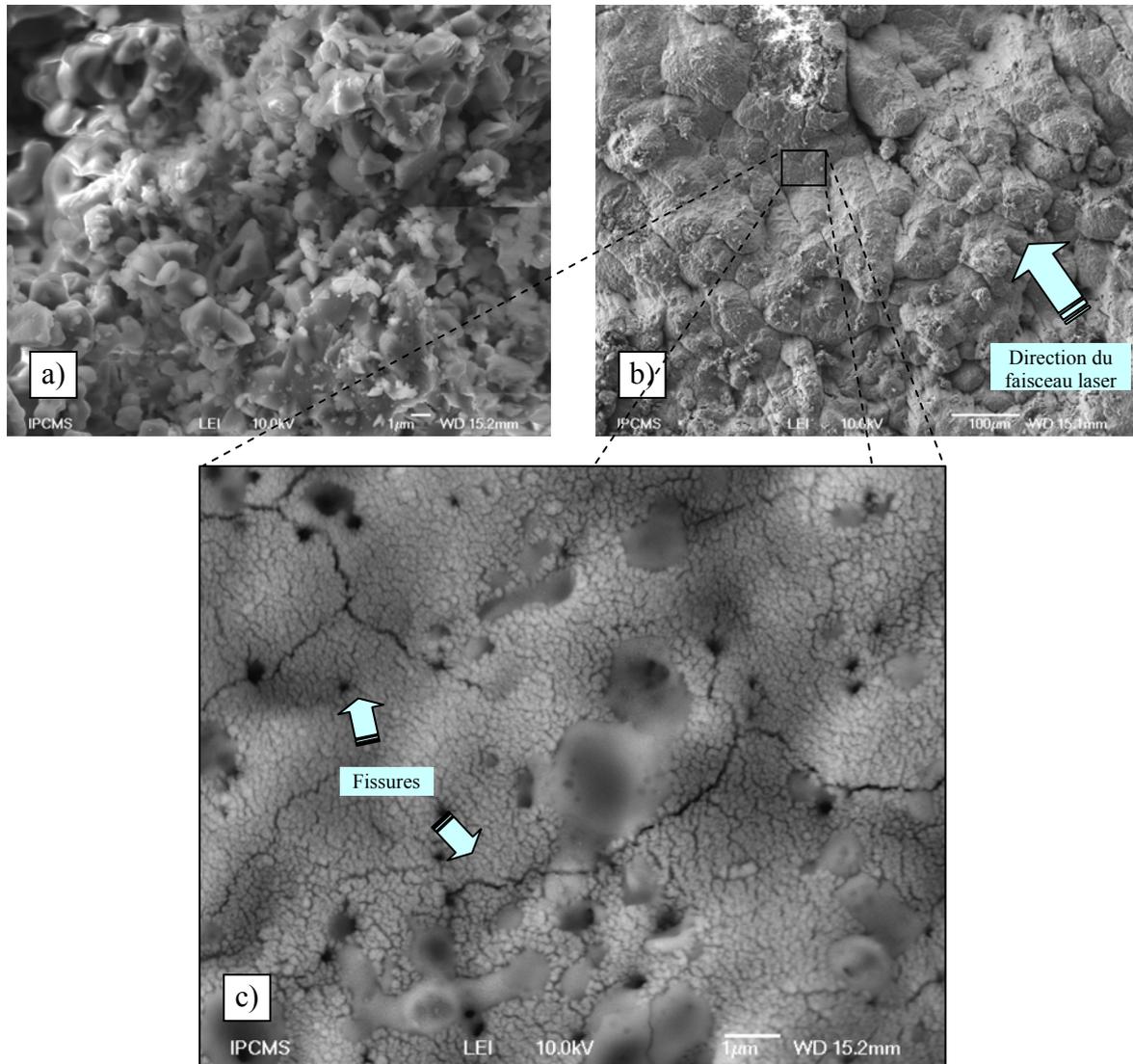


Figure 3.1.4. Aspect de la surface d'une cible d'hydroxyapatite avant (a) et après l'irradiation laser (b et c)

La poudre d'hydroxyapatite utilisée pour l'obtention des cibles a été l'hydroxyapatite commerciale Osprovit®, généralement utilisée dans les interventions chirurgicales maxillo-faciales. Les observations en Microscopie Electronique en Transmission (MET) entreprises ont démontré que les particules de la poudre sont polycristallines, présentant une morphologie hétérogène. Dans les images prises à haute résolution (HRTEM), les plans cristallins (300), (01-1) et (21-1) peuvent être observées.

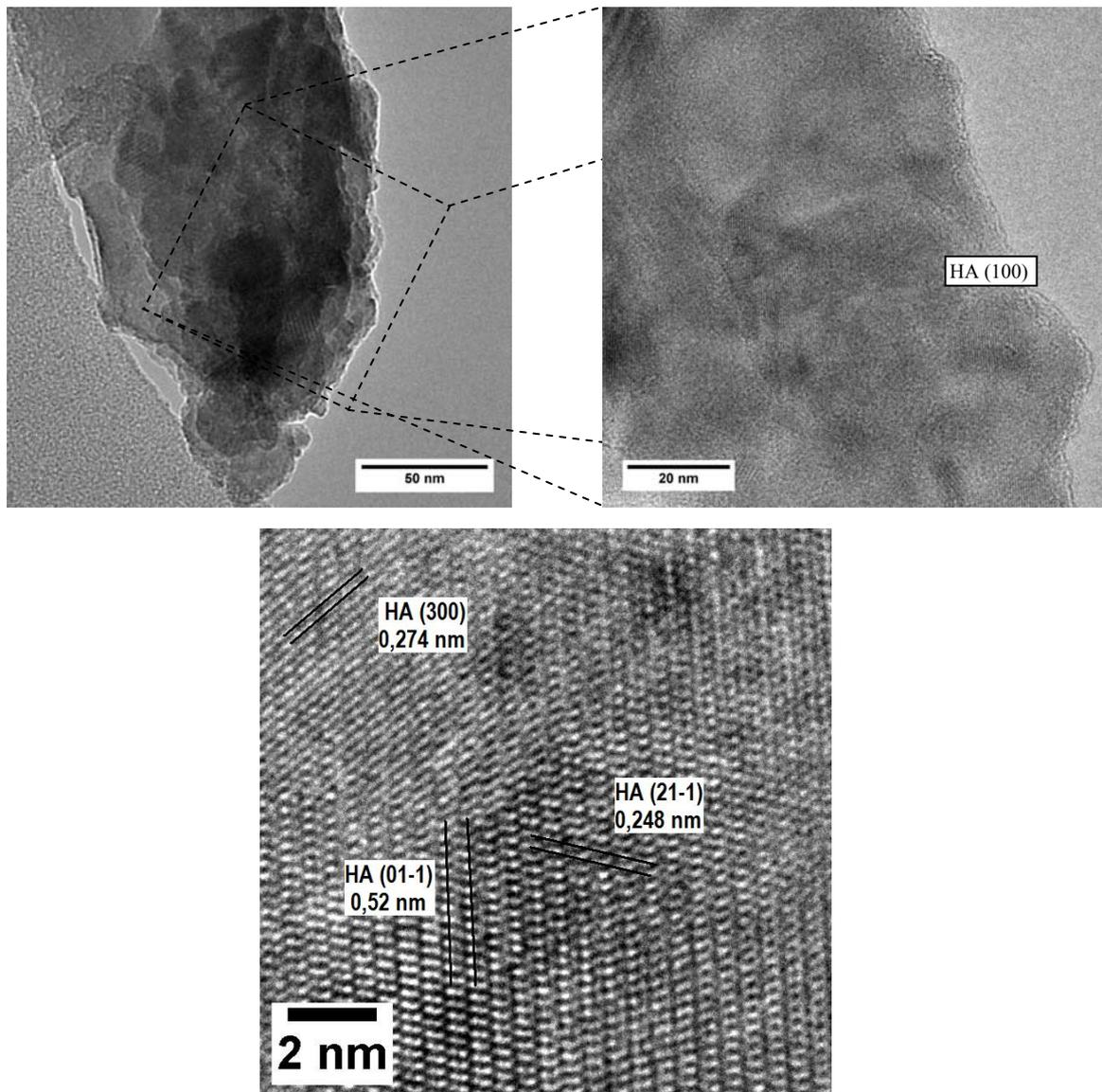


Figure 3.1.5. Images TEM de la cible d'hydroxyapatite

Une structure typique déposée par l'ablation laser de l'hydroxyapatite est présentée dans la Figure 3.1.6. Dans ce cas, afin d'observer seulement la morphologie de la couche, le substrat choisi a été du titane soumis au polissage. La couche présente trois régions distinctes : une région majoritaire lisse, formée par un amas de particules ayant des diamètres dans le domaine des dizaines des nanomètres. Le rapport Ca/P dans cette zone a été mesuré à 2,1. Une autre région est caractérisée par l'agglomération de gouttelettes micrométriques, provenant du plasma d'ablation. Cette zone présente un rapport Ca/P égal à 1,8. La région la plus proche du point de vue compositionnel de l'hydroxyapatite pure est représentée par les gouttelettes ayant les plus grandes dimensions, ou le rapport Ca/P a été mesuré à 1,7.

La variation des rapports Ca/P est due principalement aux différentes espèces de phosphates déposées pendant le processus d'ablation et du processus de croissance de la couche. Conformément aux données présentées antérieurement, la partie lisse de la couche est formée à partir des espèces légères du plasma, qui se sont réorganisées au niveau de la surface du substrat. D'autre part, les gouttelettes proviennent de la composante la plus lente du plasma et se retrouvent sous forme de matériau solidifié. Etant données les dimensions des gouttelettes et la différence entre la température du plasma (10^3 K) et la température du substrat (de l'ordre de 10^2 K), on peut considérer que le refroidissement se fait presque instantanément, ce qui explique leur forme de sphère aplatie.

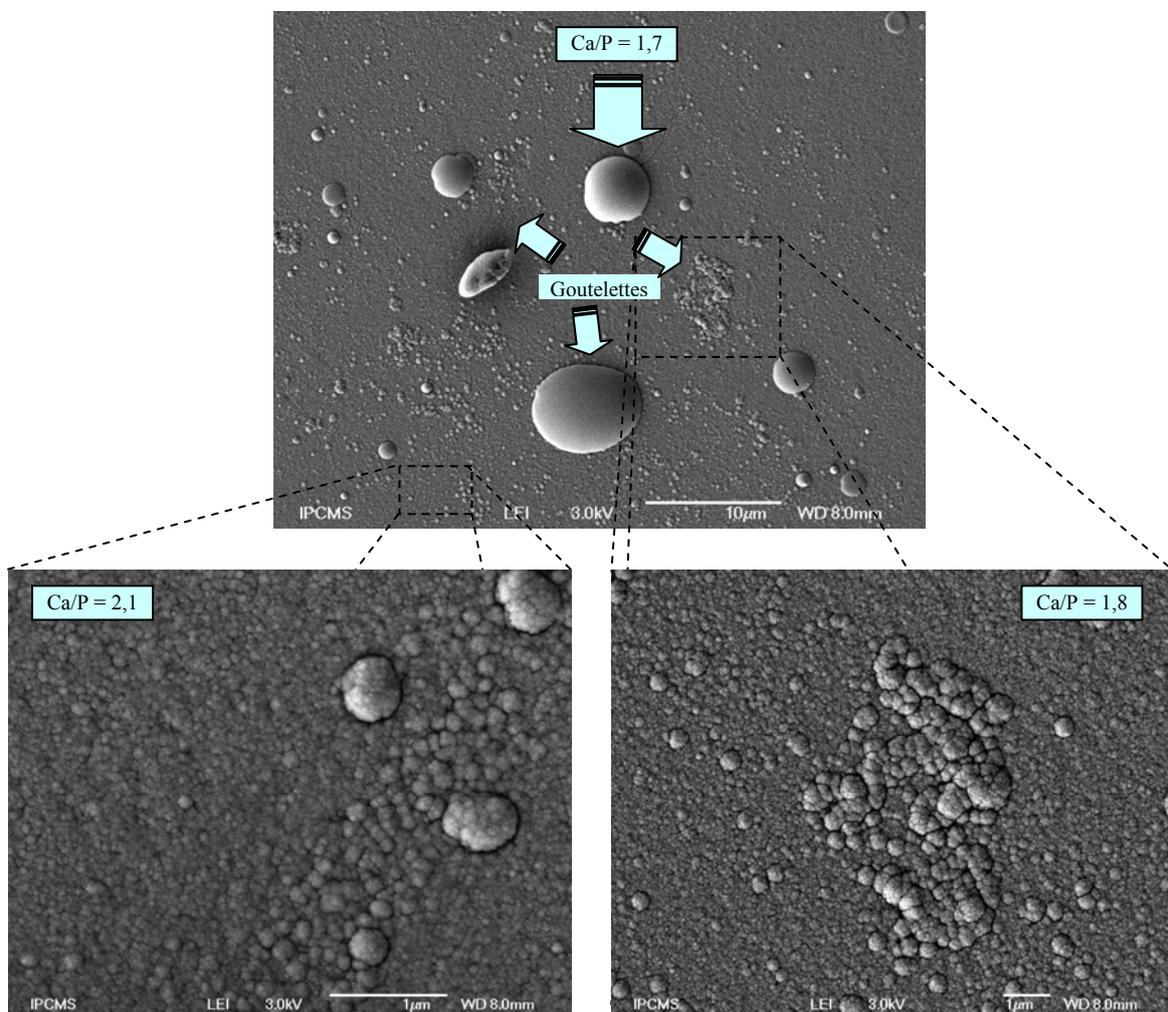


Figure 3.1.6. Image MEB typique d'une couche d'hydroxyapatite déposée par ablation laser

Dans le cas où les gouttelettes arrivent sur le substrat vers la fin de l'expérience de dépôt, donc durant les dernières impulsions laser, les gouttelettes peuvent s'enfoncer sur la

partie « lisse » de la couche déposée antérieurement. Ce cas est présenté dans la Figure 3.1.7. Des microfissures dues au choc mécanique sont visibles autour la gouttelette.

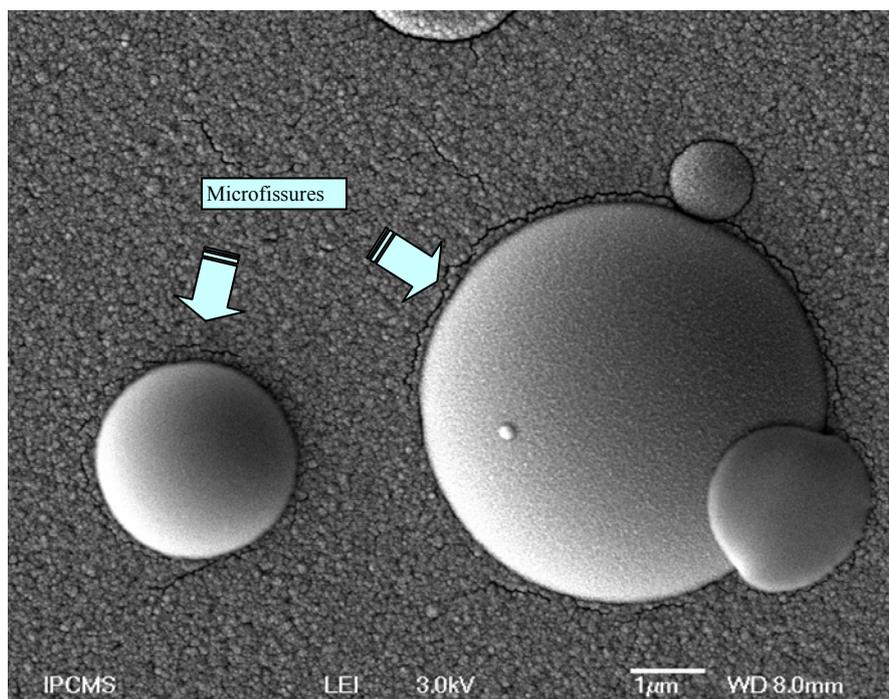


Figure 3.1.7. Microfissures dues au choc mécanique survenu pendant l'arrivée de la gouttelette au niveau du substrat

Les expériences entreprises ont démontré qu'en général la couche lisse est amorphe, ou composée des nanocristaux disposés aléatoirement dans une matrice amorphe, ayant une composition mixte de diverses espèces de phosphates de calcium. Sa tenue mécanique est faible et sa solubilité est supérieure à l'HA cristalline. De plus, elle présente une grande surface spécifique, fait qui entraîne une augmentation de sa réactivité. Aussi pour des applications médicales, il faudra s'assurer qu'il n'y a pas de matériau amorphe ou minimiser sa quantité dans la couche déposée.

Un ensemble d'expériences a été effectué sur des substrats de titane soumis à un polissage qualité miroir suivi d'une passivation avec une solution de silice colloïdale afin de diminuer la cohésion entre la couche d'hydroxyapatite déposée et le substrat. Ceci a permis ainsi de décoller les couches du substrat, ce qui nous a facilité leur observation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) en vue transversale, et même l'observation de l'interface inférieure de la couche.

Dans la Figure 3.1.8 nous pouvons observer une image prise en vue transversale de la couche. L'épaisseur dans la partie lisse est d'environ 500 nm, pour 5000 impulsions laser. La

couche est formée de colonnes disposées perpendiculairement sur la surface du substrat, tandis que la forme des gouttelettes de surface devient conique dans le volume du film.

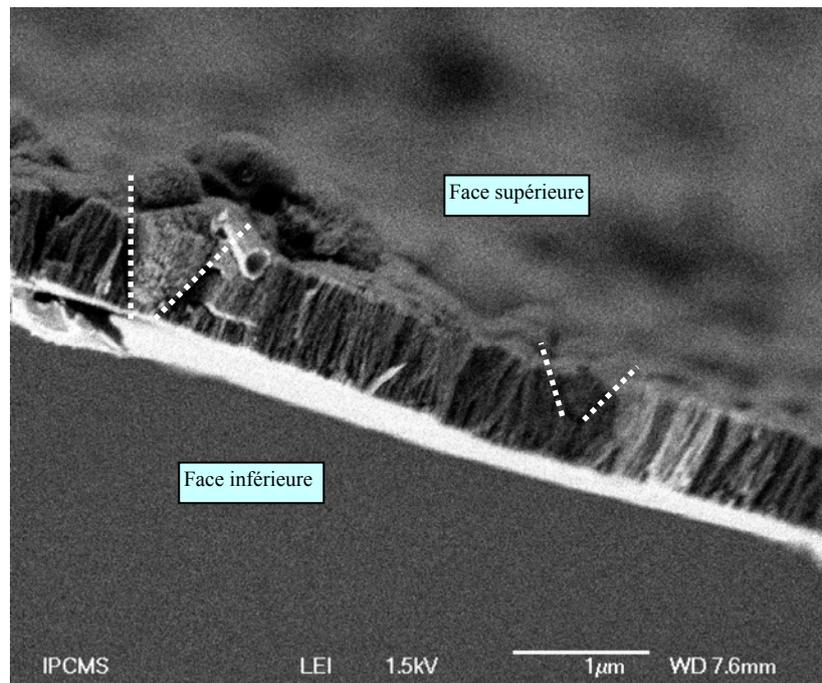


Figure 3.1.8. Vue transversale de la couche déposée

La Figure 3.1.9 présente la partie inférieure de la couche. Les marques en creux ainsi que les vides circulaires sont dues aux gouttelettes qui sont restées collées contre le substrat. La structure fine de la couche présente la même morphologie granulaire qu'en surface, fait qui indique aussi un certain niveau de porosité du film (voir le détail).

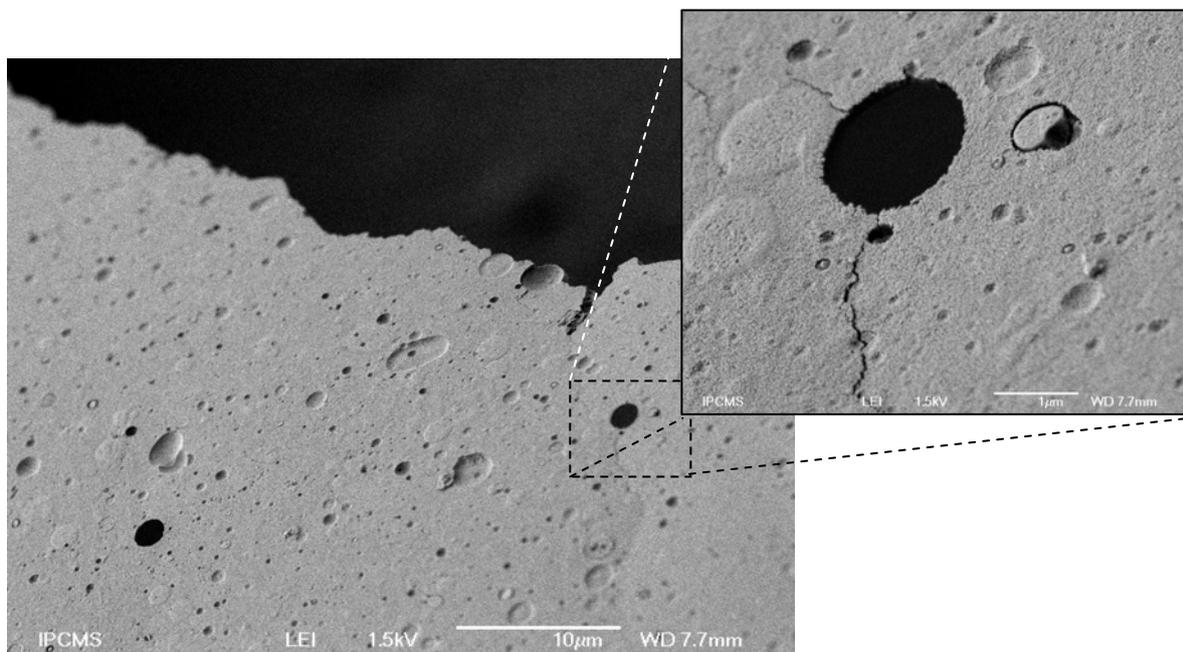


Figure 3.1.9. Vue de la face inférieure d'une couche déposée

En conclusion, de ce sous-chapitre nous avons fait la corrélation entre les diverses zones des couches obtenues par ablation laser d'une cible d'hydroxyapatite pure et la composition du plasma. Les mesures en EDS démontrent la variation du rapport Ca/P dans les diverses zones de la couche. Ceci s'explique par la présence des diverses espèces de phosphates de calcium, autres que l'hydroxyapatite, ayant un rapport Ca/P spécifique supérieur à 1,67, qui augmente le rapport général dans la zone lisse mesurée. Cette zone est formée par la déposition et la recombinaison des particules de petites dimensions, des radicaux, des ions et des atomes provenant du plasma. Ces phosphates de calcium sont en général amorphes et peu détectables par diffraction de rayons X, comme ce sera exposé dans le chapitre suivant. Dans le même temps, au niveau des gouttelettes, le rapport Ca/P reste non modifié. La cristallinité de ces régions est évidente, comme il sera présenté dans le chapitre suivant. Ce fait démontre que le passage de l'état solide à l'état liquide, suivi par la solidification rapide au niveau du substrat des gouttelettes ne modifie pas l'hydroxyapatite de point de vue compositionnel. Ainsi, la clé pour obtenir une couche d'hydroxyapatite pure sera d'utiliser au maximum la composante lente du plasma, et le paramètre le plus utile pour arriver à cet objectif sera la fluence laser.

3.2. Etude des effets des paramètres de dépôt laser sur les couches obtenues par PLD

Ce sous-chapitre présente les principaux résultats obtenus sur les couches déposées par PLD à partir d'une cible d'hydroxyapatite pure. Le but a été de sélectionner les conditions de dépôt permettant l'obtention des couches minces homogènes, cristallines, adhérentes et de composition chimique de surface compatible avec le milieu biologique avec lequel elles seront en contact.

Les principaux paramètres de dépôt laser sont :

1. la fluence du faisceau laser ;
2. la nature et la pression de l'atmosphère de dépôt ;
3. la température du substrat ;
4. la température de recuit ;
5. la distance entre la cible et le substrat ;
6. la nature de la cible et du substrat.

Parmi les paramètres énumérés, dans ce set d'expériences, seule la fluence laser sera étudiée. Selon les expériences antérieures entreprises dans le laboratoire de Bucarest, mais aussi selon la littérature, tous les autres paramètres ont été établis à des valeurs bien connues. Ainsi, il a été démontré que les meilleurs résultats sont obtenus :

- En effectuant l'ablation dans une atmosphère de vapeur d'eau, à une pression dans le domaine 10^{-1} Torr ;
- Pour un température du substrat en titane de 400°C ;

La distance entre la cible et le substrat est établie selon la pratique comme correspondant à la longueur du plasma à la pression donnée. En général, les valeurs mentionnées dans la littérature varient entre 3 et 6 cm. Dans nos études, cette distance a été fixée à 5 cm.

Le recuit thermique post-dépôt en vapeur d'eau constitue une expérience complémentaire, étudiée en détail dans le sous-chapitre suivant, qui a comme rôle l'enrichissement en groupes (OH) des couches obtenues par ablation laser. Dans les

expérimentations décrites dans ce sous-chapitre, tous les échantillons ont été soumis à ce type de traitement, à 400°C pour 6 heures. Les pentes caractéristiques de montée et de descente de la température, établies à 3°C/min ont été contrôlées automatiquement par un ordinateur.

Cette étude rassemble les observations faites sur 5 types d'échantillons, pour lesquels la valeur de la fluence laser a été variée à l'aide d'un atténuateur optique placé dans le faisceau, en gardant les mêmes dimensions du spot laser focalisé. Les types d'échantillons sont résumés dans le Tableau 3.2.I.

Pour toutes les expériences entreprises nous avons utilisé des cibles d'hydroxyapatite Osprovit®, obtenues par pressage mécanique à partir de la poudre commerciale.

<i>Echantillon</i>	<i>Fluence [J/cm²]</i>	<i>Pression [mbar]</i>	<i>Température du substrat [°C]</i>	<i>Distance cible substrat [cm]</i>	<i>Nombre d'impulsions laser</i>
HA1	1,2	40	400	5	5000
HA2	1,8	40	400	5	5000
HA3	2,7	40	400	5	5000
HA4	5	40	400	5	5000
HA5	7,5	40	400	5	5000

Tableau 3.2.I. Conditions de dépôt pour les échantillons déposés en variant la valeur de la fluence

L'obtention de valeurs de la fluence supérieures à 7,5 J/cm² est difficile dans des conditions habituelles d'utilisation de lentilles sphériques simples à cause de la haute divergence du faisceau émis par les sources laser à excimères. Une meilleure focalisation du faisceau peut être achevée qu'en utilisant des dispositifs d'homogénéisation du faisceau, qui sont peu disponibles et coûtent très cher. Ce fait a justifié la limitation à cette valeur pour les expériences entreprises.

Les expérimentations de dépôt ont été suivies par des analyses DRX afin de déterminer la variation du taux d'hydroxyapatite cristalline qui se retrouve au niveau des couches. Des images MEB et MET ont été faites pour estimer l'aspect et la morphologie des couches obtenues, et pour déterminer leur structure intime. Les analyses par EDS et XPS ont relevé des modifications au niveau du rapport Ca/P dans le volume du film et à sa surface. Les études ont été conclues par le suivi du comportement des couches mises en contact avec les ostéoblastes par des tests de croissance cellulaire.

Tous les échantillons ont été déposés sur des substrats en titane, soumis à un processus de corrosion chimique afin d'augmenter la rugosité de surface. L'aspect général de la surface de titane est présenté dans la Figure 3.2.1.

Dans la Figure 3.2.2 nous pouvons observer la morphologie générale des couches, obtenue par imagerie en Microscopie Electronique à Balayage. Il est évident que l'organisation de la couche à la surface varie d'un aspect aciculaire pour les faibles valeurs de fluence vers un aspect sous forme d'empilement des gouttelettes de diverses dimensions accompagné d'une croissance à partir de la phase de vapeur de type fractal, sous forme de choux-fleurs pour les plus grandes valeurs de fluence. Le passage entre les deux types de morphologie est observable dans les images b) – d). Nous pouvons remarquer que même à $2,7 \text{ J/cm}^2$ les aiguilles sont encore présentes, mais cette fois-ci elles semblent être contenues dans le film continu et lisse. La croissance de la couche dans le cas des échantillons HA1 et HA2 semble être réalisée majoritairement par la condensation de la matière provenant du plasma. Les gouttelettes, même si elles sont présentes, sont de petites dimensions.

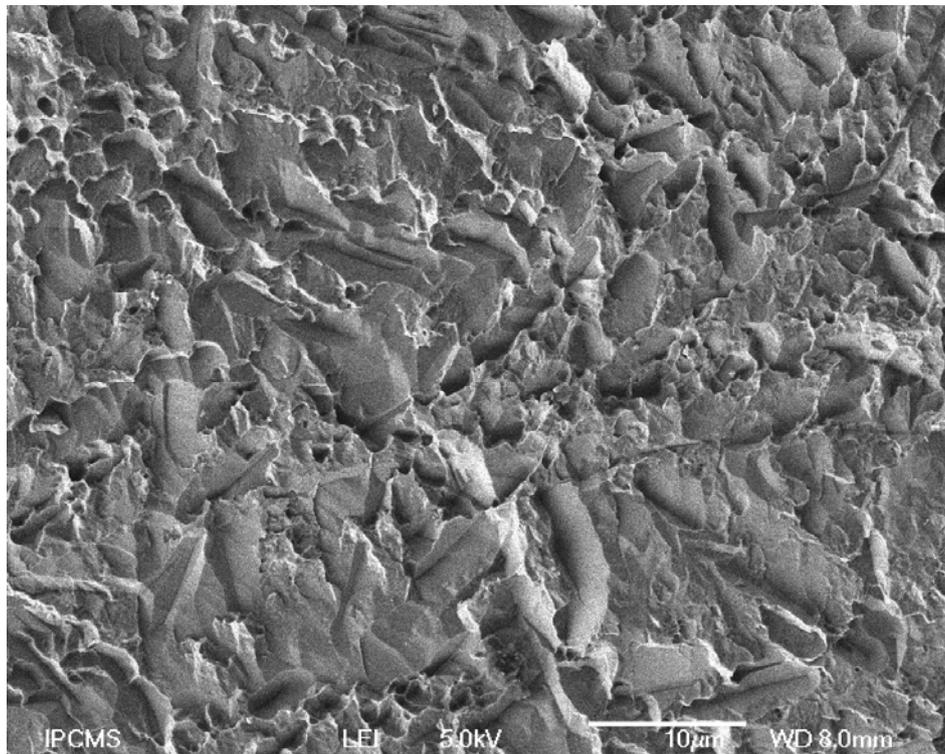


Figure 3.2.1. Aspect général de la surface des substrats de titane utilisés

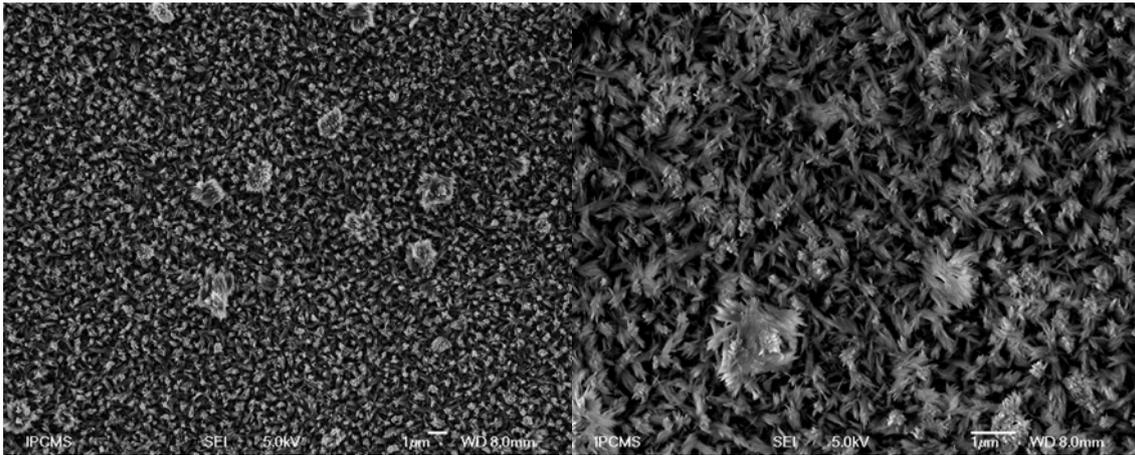


Figure 3.2.2 a) Aspect de la surface de l'échantillon déposé à $1,2 \text{ J/cm}^2$

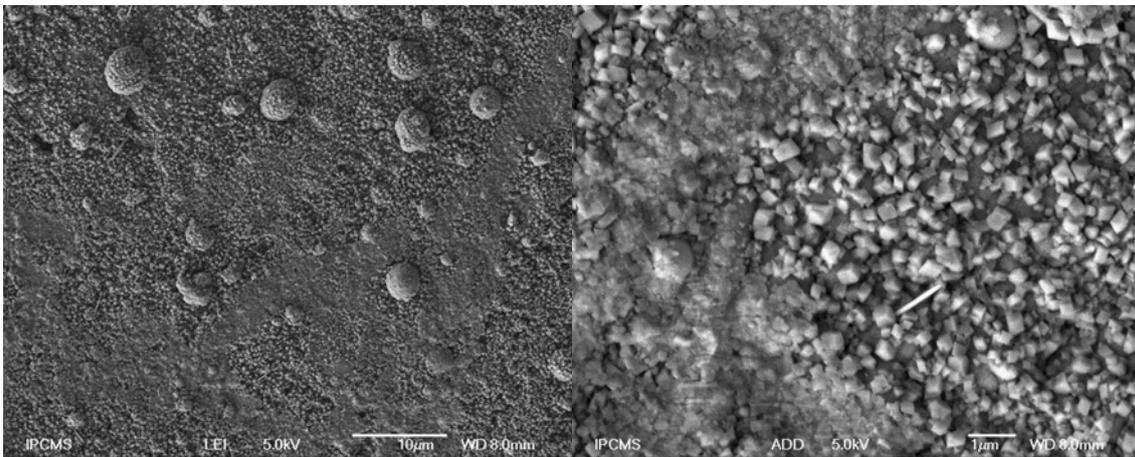


Figure 3.2.2 b) Aspect de la surface de l'échantillon déposé à $1,8 \text{ J/cm}^2$

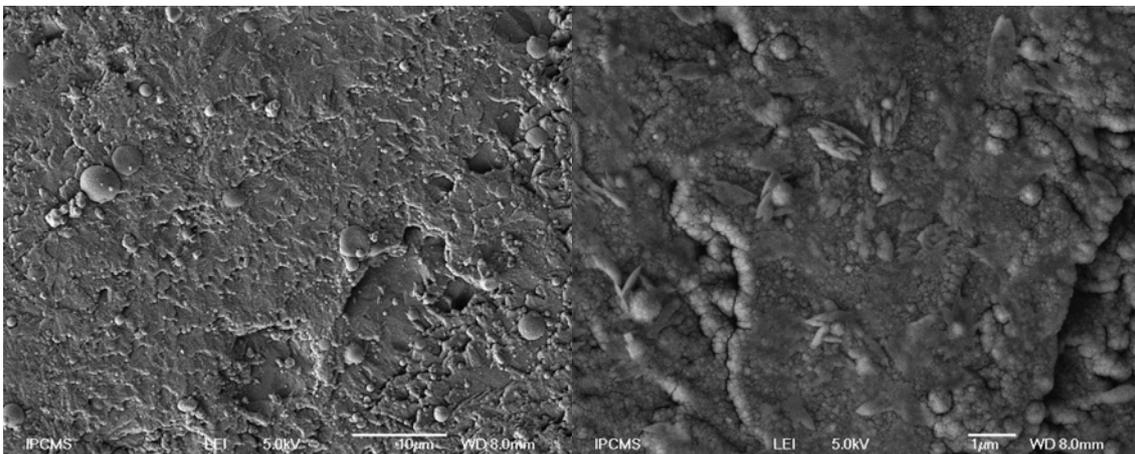


Figure 3.2.2 c) Aspect de la surface de l'échantillon déposé à $2,7 \text{ J/cm}^2$

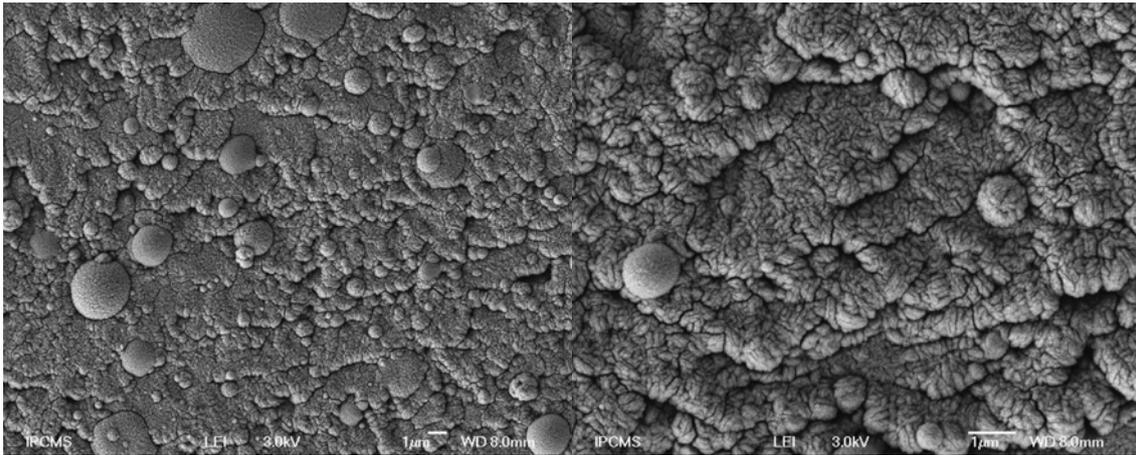


Figure 3.2.2 d) Aspect de la surface de l'échantillon déposé à 5 J/cm²

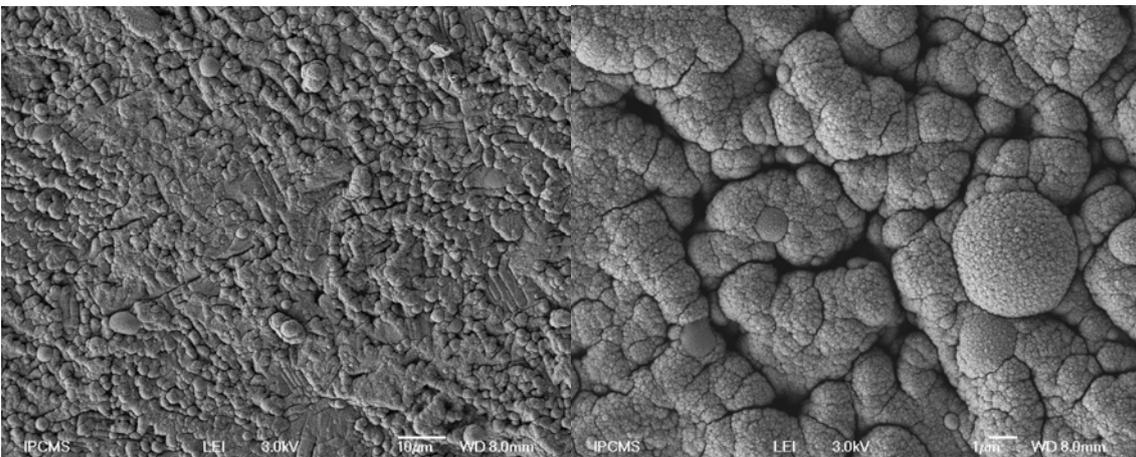


Figure 3.2.2 e) Aspect de la surface de l'échantillon déposé à 7,5 J/cm²

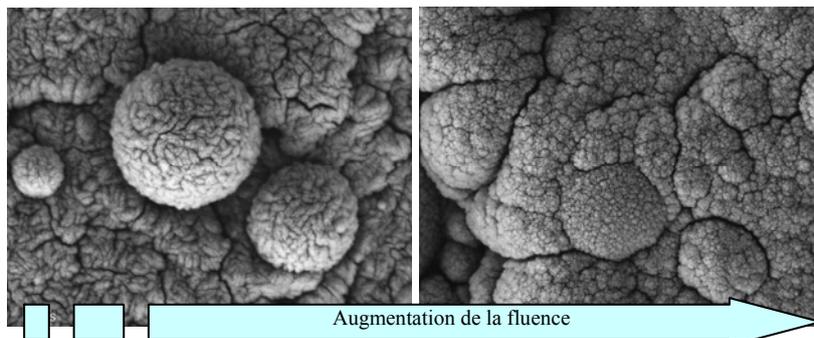
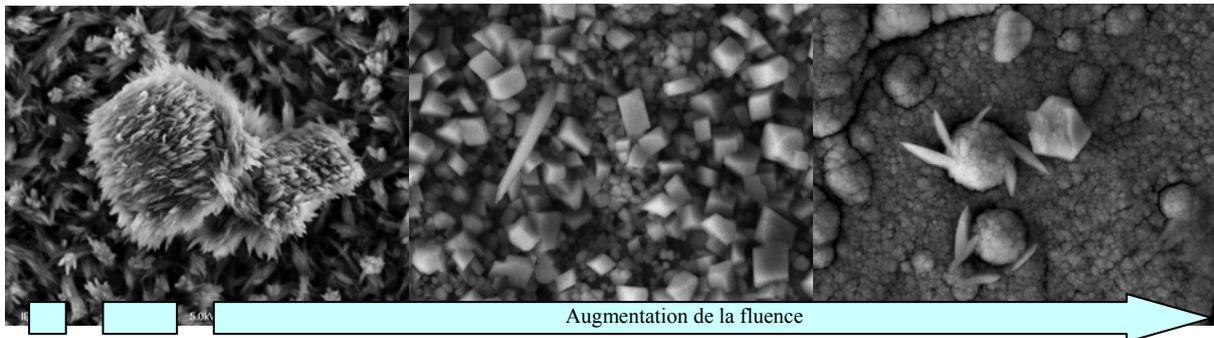


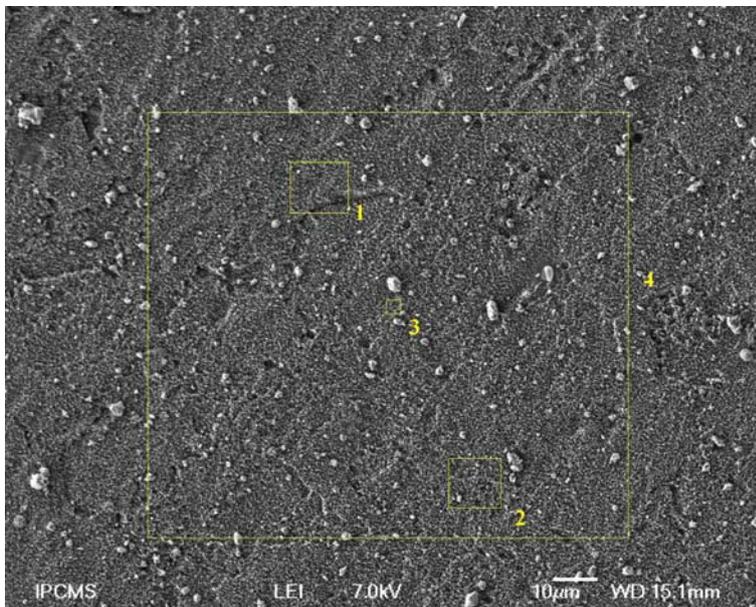
Figure 3.2.3. Détails de la morphologie des couches déposées à divers niveaux de fluence

La composition des couches a été analysée par EDS et XPS. L'EDS donne des informations sur la composition de toute l'épaisseur de la couche, alors que l'XPS fournit des informations exclusivement de la surface. Les valeurs du rapport Ca/P calculées à partir des valeurs des concentrations atomiques obtenues en EDS sur toute la surface des échantillons sont données dans le Tableau 3.2.II.

<i>Echantillon</i>	<i>Valeur Ca/P</i>
HA1	3,26
HA2	2,32
HA3	2,03
HA4	1,73
HA5	1,71

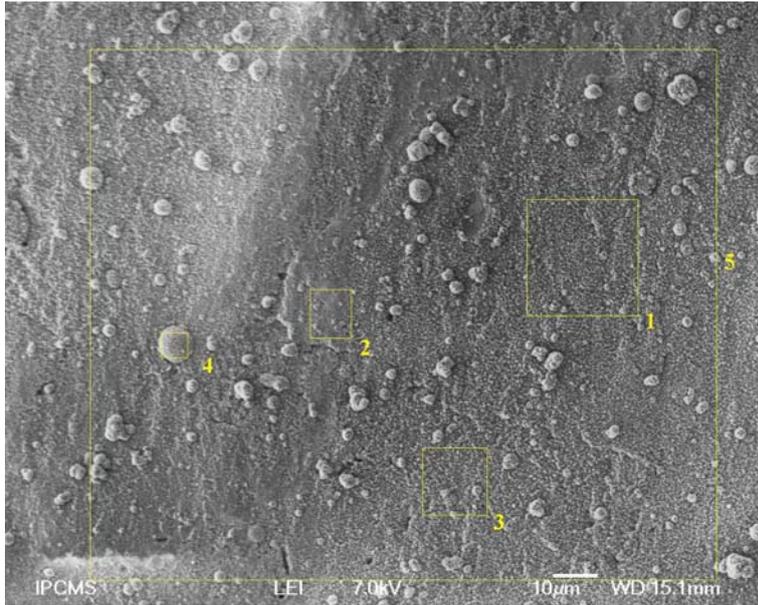
Tableau 3.2.II. Valeurs du rapport Ca/P des échantillons déposés à des divers niveaux de fluence

Afin d'observer si la distribution des éléments Ca, P et O, composant en général les phosphates de calcium, est uniforme sur la surface des couches, des analyses dans divers endroits ont été effectuées. Ces analyses sont présentées dans les Figures 3.2.4, 3.2.5 et 3.2.6, correspondant aux échantillons HA1, HA2 et HA3 respectivement. Les valeurs du rapport Ca/P correspondantes à chaque endroit sont données dans les tableaux attachés.



<i>Zone</i>	<i>Valeur du rapport Ca/P</i>
1	3,21
2	3,25
3	3,24
4	3,26

Figure 3.2.4. Zones d'analyse EDS sur l'échantillon HA1

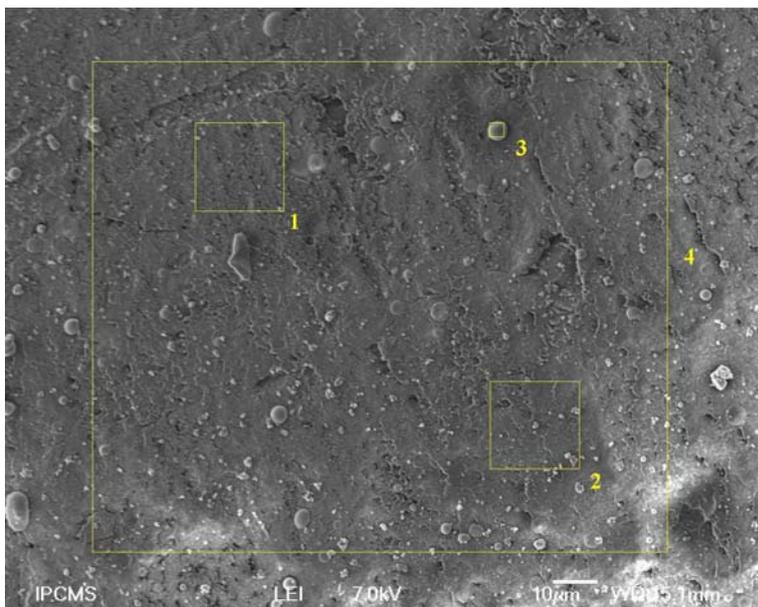


Zone	Valeur du rapport Ca/P
1	2,41
2	1,88
3	2,39
4	1,82
5	2,32

Figure 3.2.5. Zones d'analyse EDS sur l'échantillon HA2

Nous pouvons observer une forte variation des valeurs du rapport Ca/P entre les zones 2 et 4 lisses, appartenant à une croissance à partir de la phase liquide, par rapport aux zones 1 et 3, appartenant à une croissance à partir de la phase vapeur du plasma.

Cette observation est confirmée par les déterminations effectuées dans les zones présentées dans la Figure 3.2.6, sur l'échantillon HA3. Sur cet échantillon, la surface a un aspect lisse, et le rapport Ca/P tend vers le rapport de l'hydroxyapatite.



Zone	Valeur du rapport Ca/P
1	1,99
2	1,85
3	1,72
4	2,03

Figure 3.2.6. Zones d'analyse EDS sur l'échantillon HA3

Ces résultats démontrent une hétérogénéité compositionnelle au niveau de la surface de la couche, plus évidente dans le cas de l'échantillon HA2. A partir de cette fluence (1,8

J/cm^2) la couche commence à se former à partir des gouttelettes liquides de diverses dimensions arrivées sur le substrat, qui vont augmenter la teneur en hydroxyapatite de la couche.

Les mesures en XPS pour les échantillons HA1, HA2 et HA3 sont présentées dans les Figures 3.2.7, 3.2.8 et 3.2.9. Le tableau 3.2.III présente les valeurs des rapports Ca/P déterminés.

Echantillon	Rapport Ca/P
HA1	4,3
HA2	2,26
HA3	1,61

Tableau 3.2.III. Valeurs du rapport Ca/P déterminés par XPS

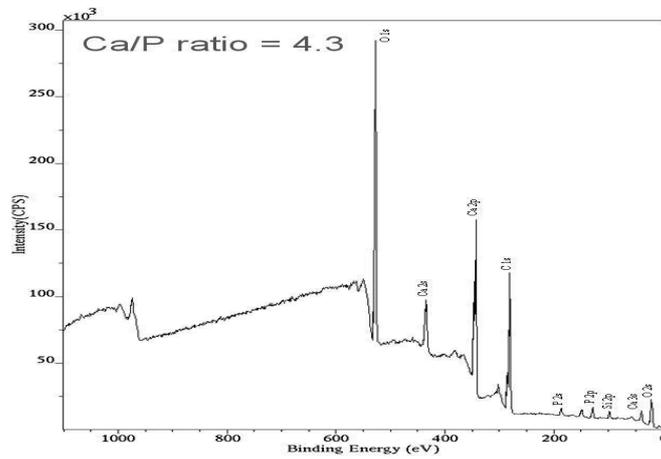


Figure 3.2.7. Spectre XPS de l'échantillon HA1, déposé à $1,2 J/cm^2$

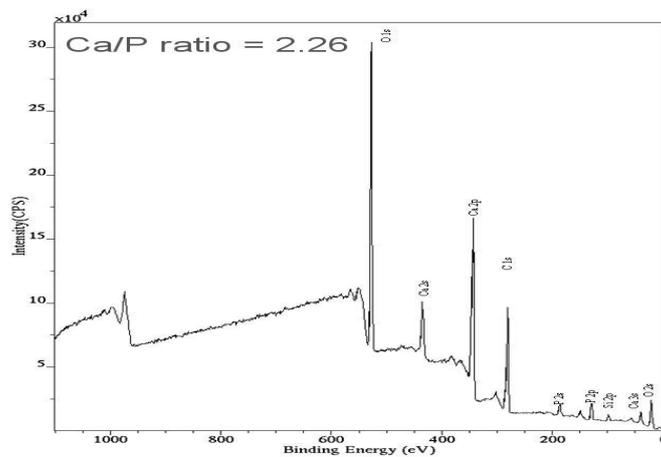


Figure 3.2.8. Spectre XPS de l'échantillon HA2, déposé à $1,8 J/cm^2$

La présence du carbone est attribuée à la contamination provoquée par l'adsorption en surface des hydrocarbures de l'atmosphère. A part du calcium et du phosphore, on a aussi détecté des faibles quantités de silicium. La présence du Si est liée aux précurseurs chimiques utilisés pour la synthèse des poudres d'hydroxyapatite.

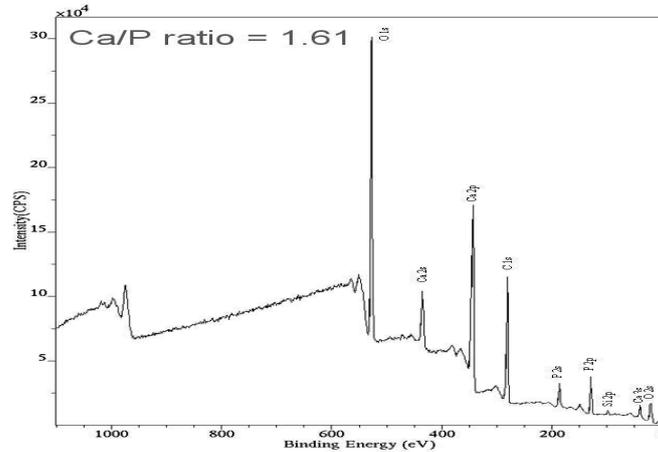


Figure 3.2.9. Spectre XPS de l'échantillon HA3, déposé à 2,7 J/cm²

Les différences entre les valeurs obtenues par EDS et celles obtenues par XPS s'expliquent par la profondeur d'analyse des deux techniques et leur résolution spatiale. Comme nous avons vu par EDS, la composition au niveau de la couche est différente d'un endroit à un autre, mais la composition peut aussi varier dans l'épaisseur de la couche. En effet, cette hétérogénéité sera mise en évidence par les observations TEM en coupe transverse.

Pour rendre possible l'analyse en coupe transverse par Microscopie Electronique en Transmission (MET), des tranches minces de la surface des échantillons ont été coupées par la technique FIB (Focused Ion Beam). Les morceaux coupés contenant une région du substrat et une région de la couche ont été placés sur des grilles en cuivre pour l'observation. Les résultats pour chaque échantillon sont présentés dans les Figures 3.2.10 – 3.2.14.

Nous pouvons observer que dans le cas de l'échantillon HA1 la couche présente une épaisseur d'environ 500 nm. Elle est composée majoritairement de matériau amorphe, qui à des niveaux plus forts de focalisation du faisceau d'électrons commence à se réorganiser. La seule région cristalline a été trouvée au niveau de la gouttelette, qui présente un aspect aplati à cause de la vitesse à l'impact avec le substrat. Les domaines cristallins dans cette zone s'étendent à des dimensions d'environ 50 nm. Les analyses FFT effectuées sur l'image MET en haute résolution montrent la présence des plans cristallins (100), (01-1) et (21-1)

caractéristiques à l'hydroxyapatite, ayant les distances interplanaires de 0,817 nm, 0,526 nm et respectivement 0,281 nm. La couche présente une forte porosité, distinguable dans les régions éclaircies des images.

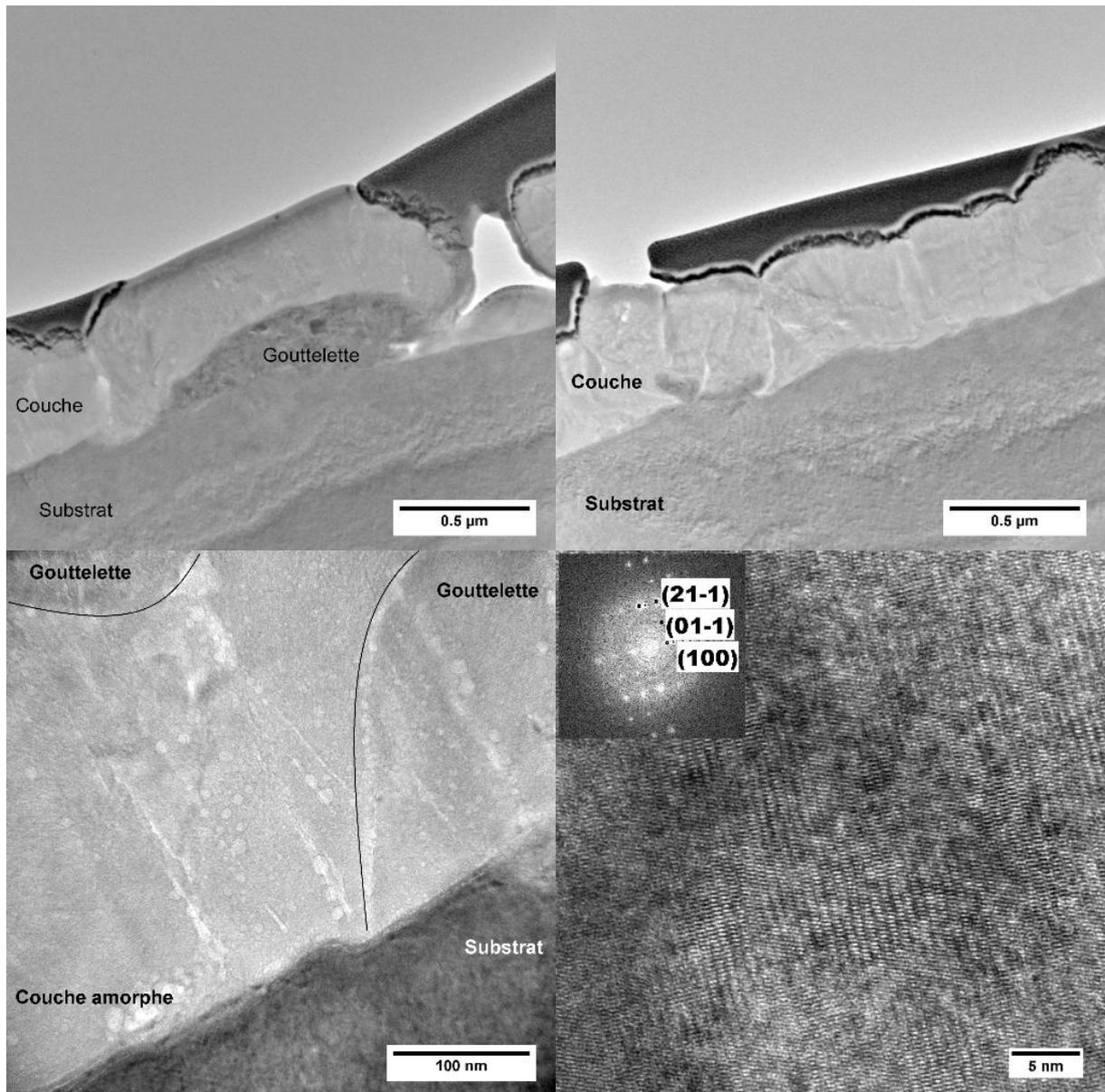


Figure 3.2.10. Images MET et MET HR obtenues sur l'échantillon HA1, déposé à 1,2 J/cm²

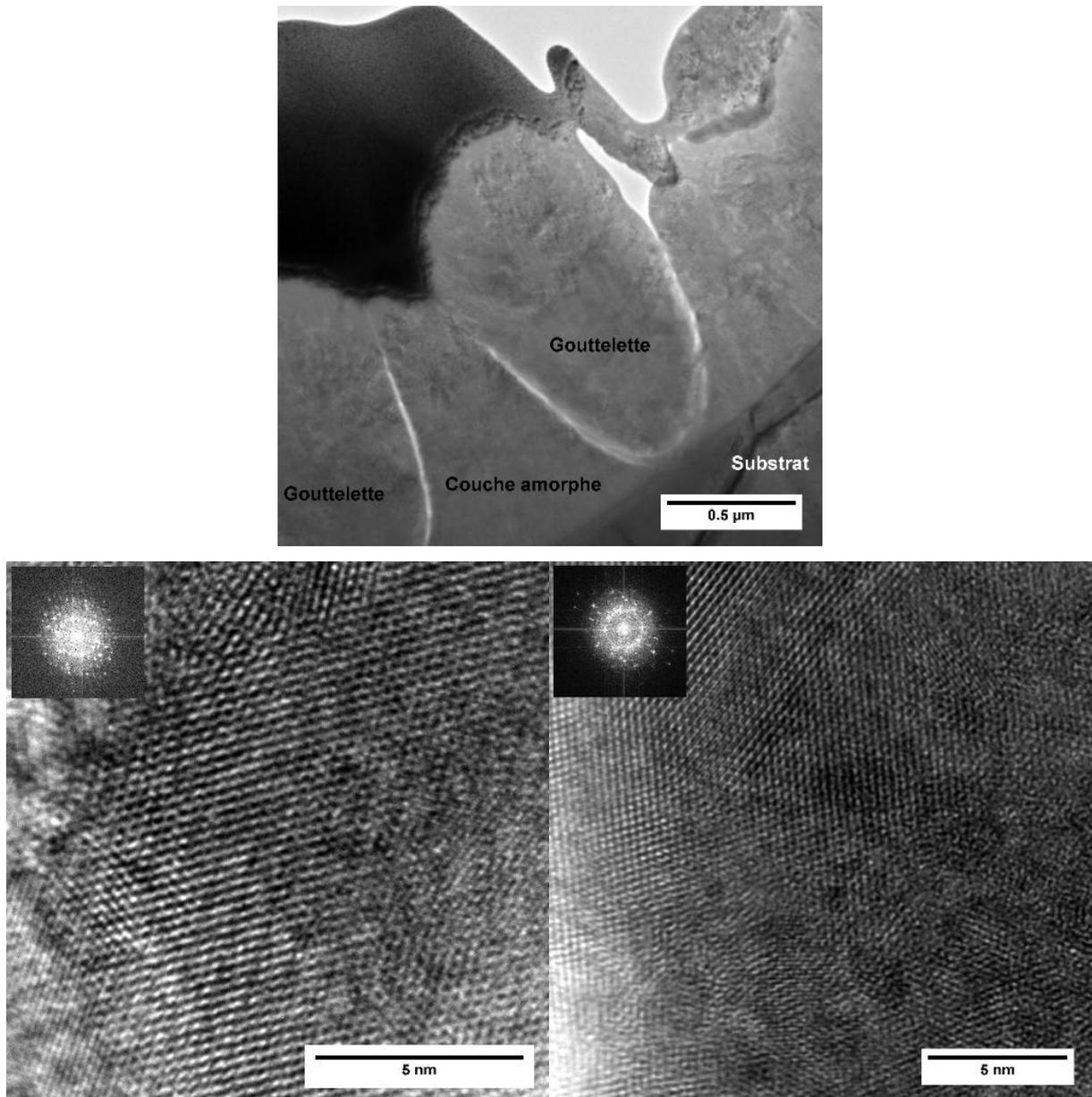


Figure 3.2.11. Images MET et MET HR obtenues sur l'échantillon HA2, déposé à $1,8 \text{ J/cm}^2$

Dans le cas de l'échantillon HA2, déposé à $1,8 \text{ J/cm}^2$, la couche présente une épaisseur d'environ 750 nm. En ressemblance avec l'échantillon HA1, la plupart de la couche est amorphe, les seules régions cristallines se retrouvant au niveau de la gouttelette. Dans les images en haute résolution nous pouvons observer ces régions polycristallines, qui sont composées de diverses espèces de phosphate de calcium, selon les analyses FFT. Les domaines cristallins ont des dimensions plus petites, jusqu'à environ 30 nm.

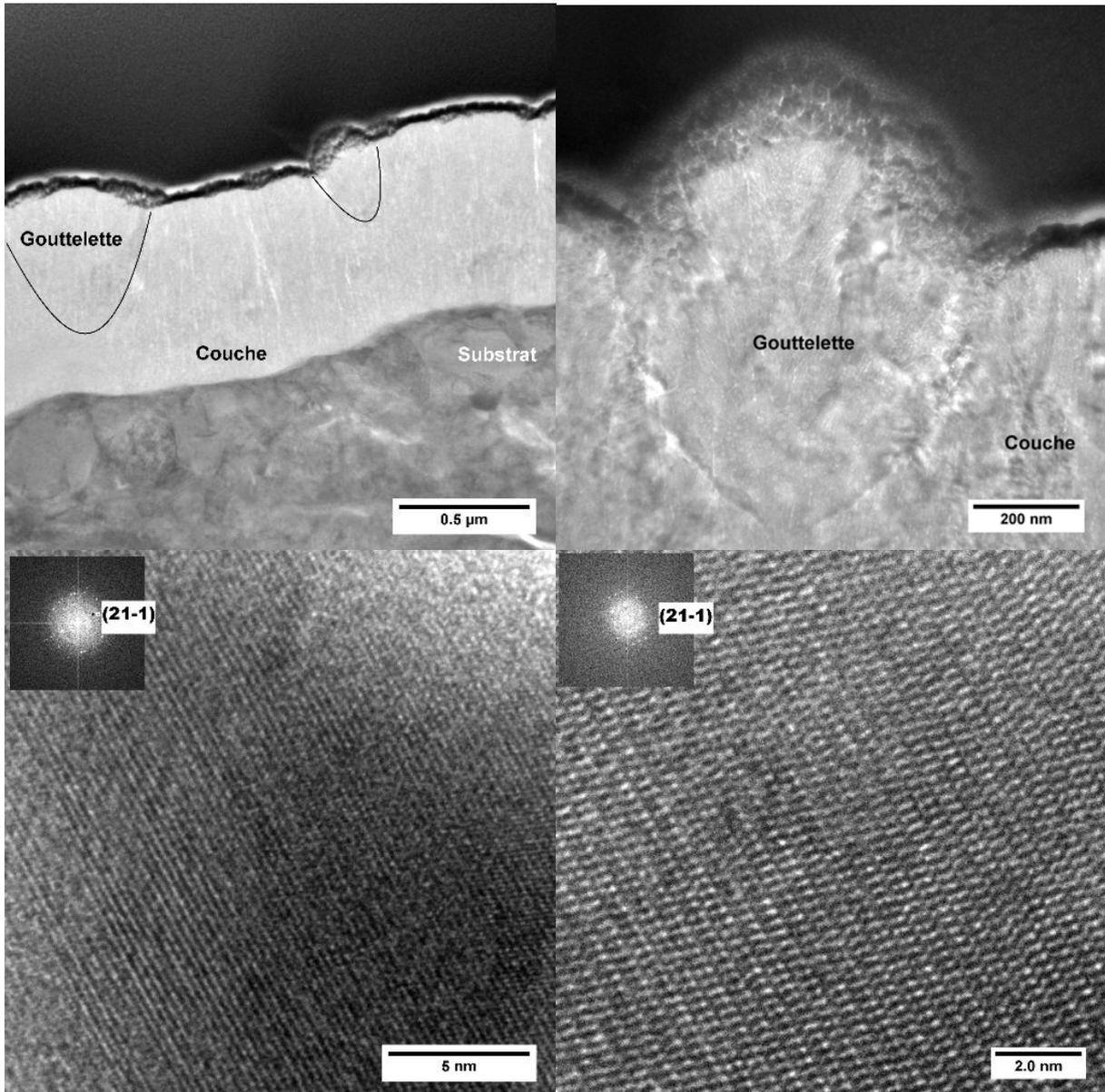
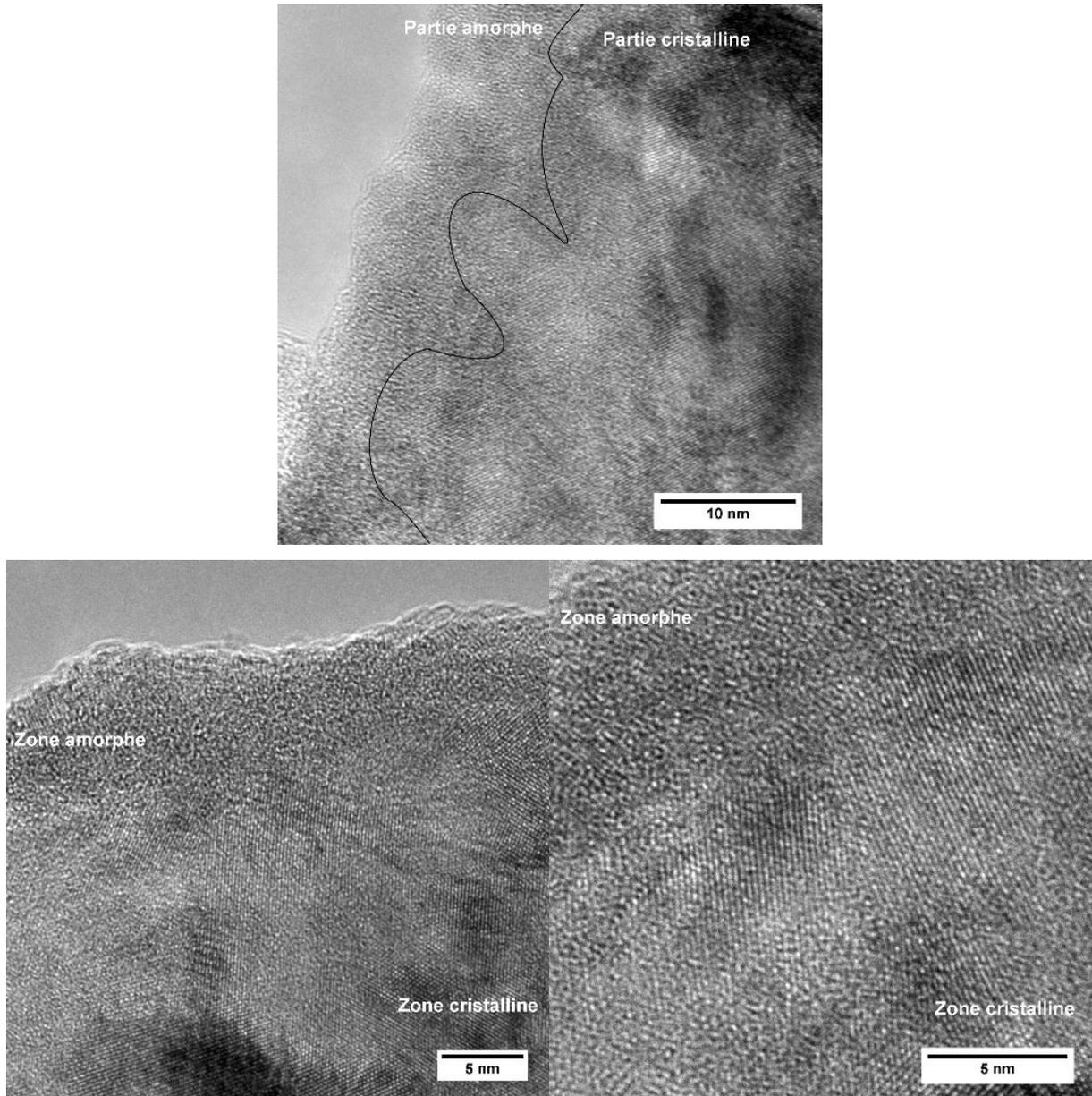


Figure 3.2.12. Images MET et MET HR obtenues sur l'échantillon HA3, déposé à $2,7 \text{ J/cm}^2$

L'échantillon HA3 présente une croissance dendritique. Sa porosité est accentuée, étant mise en évidence par les zones claires des images MET. L'épaisseur de la couche se situe à environ 800 nm. Le nombre de gouttelettes est plus grand pour ce type d'échantillon. Le détail d'une gouttelette est présenté dans la Figure 3.2.12 b). Les images en haute résolution ont été effectuées dans la région inférieure et supérieure de cette gouttelette. La structure intime du matériau consiste en domaines cristallins nanométriques bien orientés, étalés sur des surfaces supérieures à 50 nm. Les plans cristallins (21-1) de l'hydroxyapatite ont été identifiés.



L'échantillon HA4 est caractérisé par une structure beaucoup plus compacte par rapport aux échantillons précédents. La couche d'hydroxyapatite est constituée d'une matrice nanocristalline dans laquelle se retrouvent les gouttelettes de diverses dimensions. La taille des nanocristaux de la couche est de l'ordre de 30 nm. Les zones intergranulaires sont remplies de matériau mal cristallisé. Dans les images effectuées à haute résolution nous pouvons observer qu'au niveau de la surface de la couche il existe une région amorphe, d'une épaisseur de 10 nm, bien délimitée de la partie cristalline de la couche. Par rapport aux échantillons HA1-HA3, à cette valeur de la fluence, la couche est majoritairement composée de nanocristaux d'hydroxyapatite disposés dans des positions aléatoires.

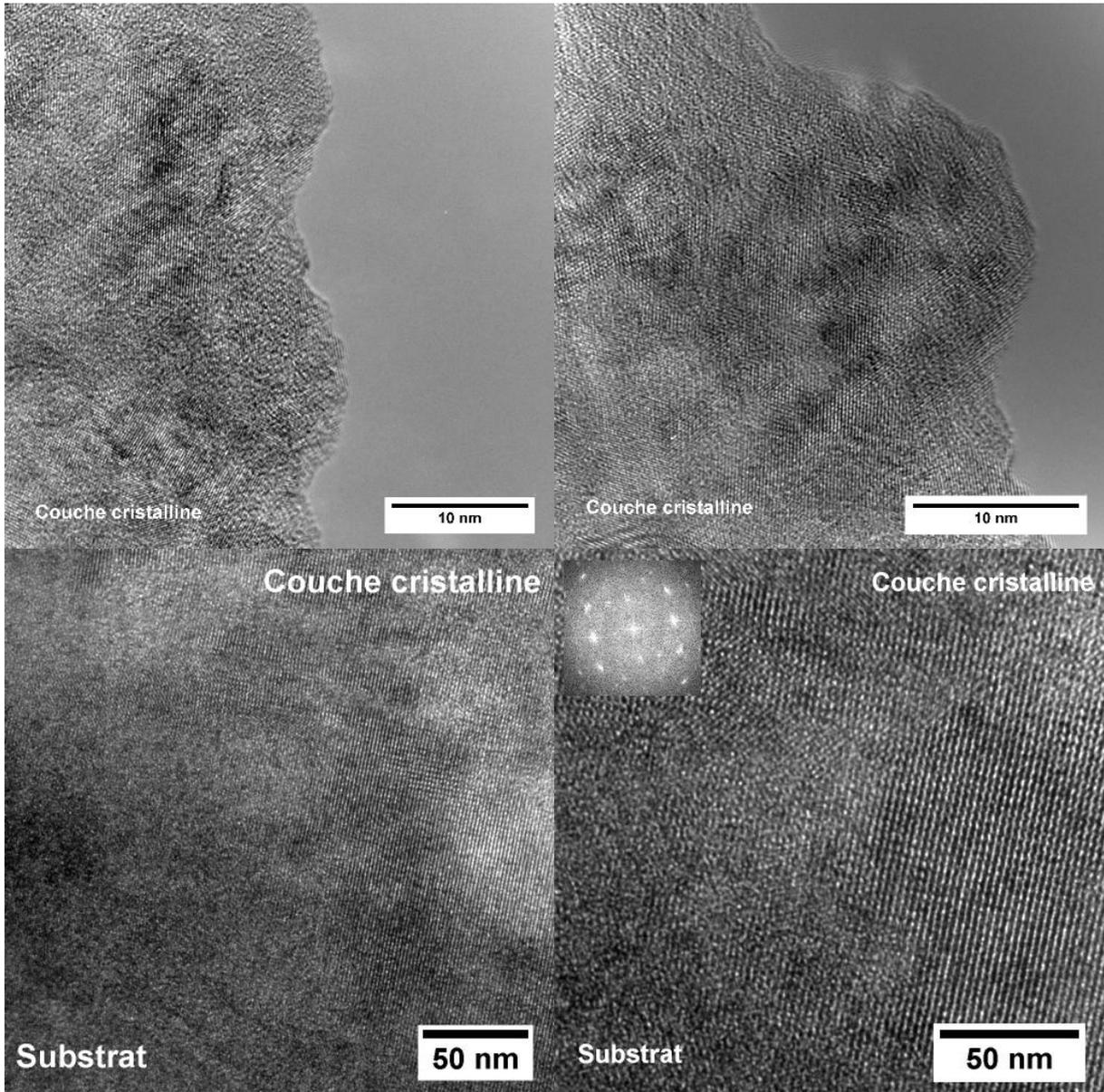


Figure 3.2.14. Images MET et MET HR obtenues sur l'échantillon HA5, déposé à $7,5 \text{ J/cm}^2$

L'échantillon HA5 présente le taux le plus élevé d'hydroxyapatite cristalline. La structure est très compacte, entièrement composée de cristaux d'hydroxyapatite disposés dans des directions aléatoires, ayant des dimensions de l'ordre de 100 nm. La région amorphe à la surface de la couche, détectée dans le cas de l'échantillon HA4, n'a plus été observée. Dans les dernières deux images présentées dans la Figure 3.2.14 nous pouvons observer que l'organisation cristalline de la couche commence dans le voisinage du substrat en titane. Le passage entre la structure du titane et celle de l'hydroxyapatite est fait par un domaine amorphe qui présente une épaisseur entre 50 et 100 nm.

Les déterminations physico-chimiques sur les cinq types d'échantillons ont été accomplies en analysant les couches par diffraction de rayons X. Les mesures ont été effectuées en mode $\theta - 2\theta$ et en incidence rasante, à $0,5^\circ$. Les spectres obtenus sont présentés dans les Figures 3.2.15 – 3.2.19. Les petites figures représentent les résultats obtenus en incidence rasante, dans le domaine $20-55^\circ$ des rayons diffractés.

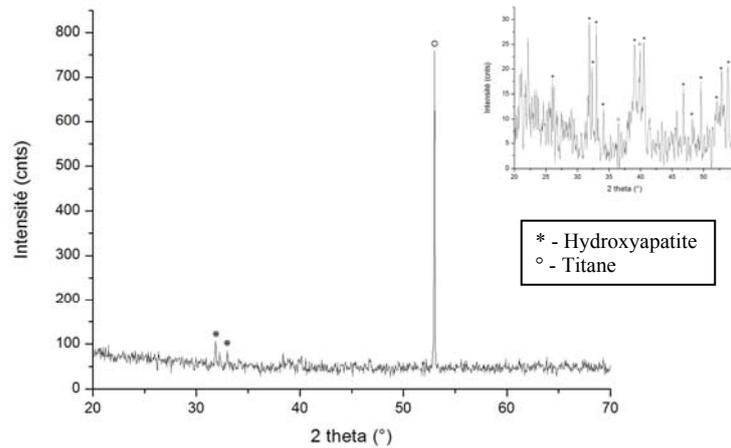


Figure 3.2.15. Spectres DRX obtenu en θ - 2θ et en incidence rasante sur l'échantillon HA1

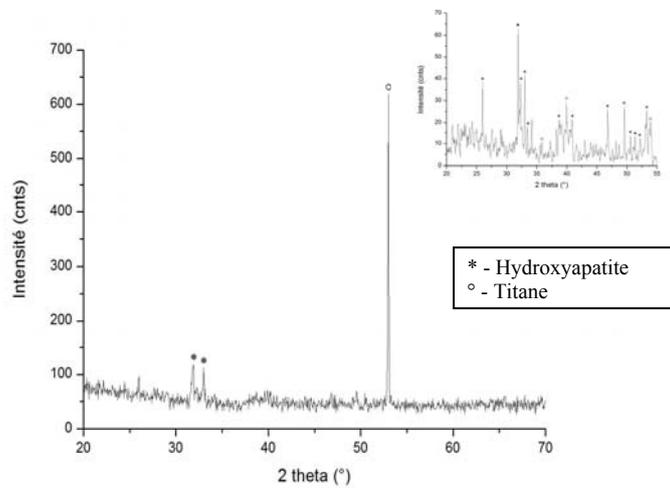


Figure 3.2.16. Spectres DRX obtenu en θ - 2θ et en incidence rasante sur l'échantillon HA2

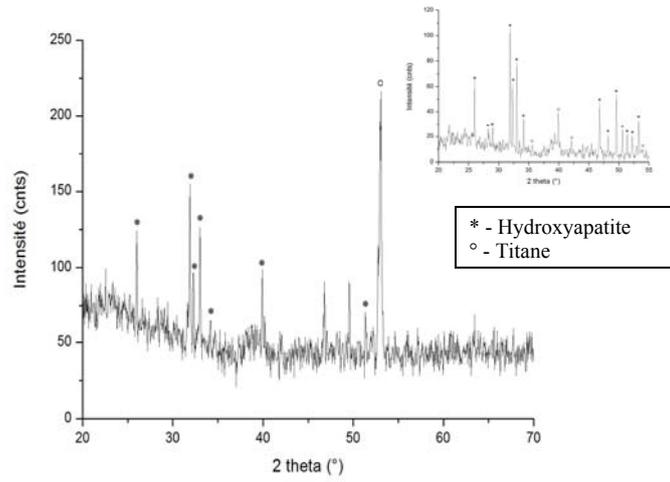


Figure 3.2.17. Spectres DRX obtenu en θ - 2θ et en incidence rasante sur l'échantillon HA3

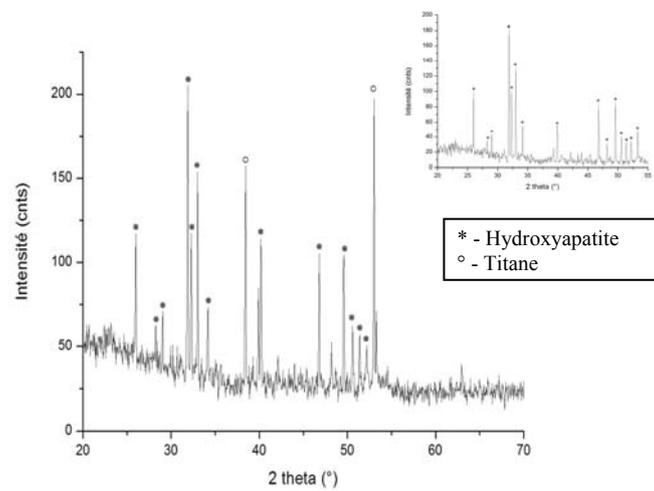


Figure 3.2.18. Spectres DRX obtenu en θ - 2θ et en incidence rasante sur l'échantillon HA4

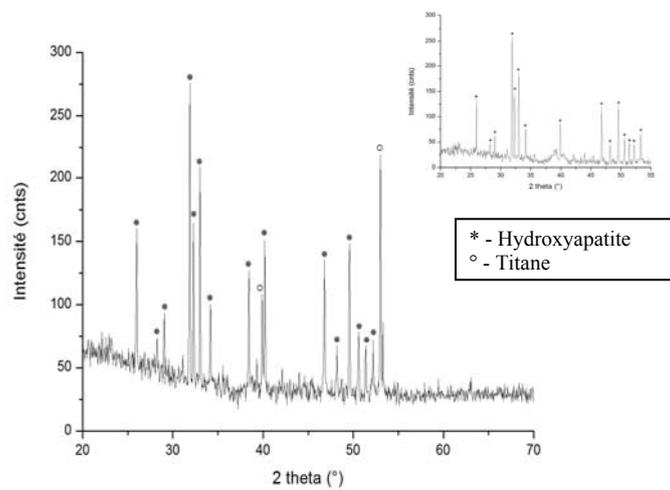


Figure 3.2.19. Spectres DRX obtenu en θ - 2θ et en incidence rasante sur l'échantillon HA5

Les résultats obtenus en diffractométrie de rayons X sont en concordance avec nos observations en microscopie électronique en transmission. L'intensité des lignes de diffraction caractéristiques de l'hydroxyapatite augmente de l'échantillon HA1 jusqu'à l'échantillon HA5, ce qui démontre une meilleure cristallinité au fur et à mesure qu'on augmente la fluence laser. Les lignes constituant le « bruit » dans chaque diffractogramme peuvent être aussi attribuées aux divers phosphates de calcium. Des concordances de certaines lignes du spectre avec des lignes caractéristiques du TCP, du OCP et du TTCP ont été trouvées, mais cette interprétation ne peut pas être démontrée tant que l'intensité des pics identifiés n'est pas supérieure à la moyenne des intensités des autres pics. La « bosse » présente jusqu'à 40° peut aussi indiquer la présence de matériau amorphe dans la composition de la couche, dont l'importance diminue avec l'augmentation de la fluence laser.

Trois types d'échantillons (HA1, HA3 et HA5) ont été soumis à des essais biologiques de croissance cellulaire *in vitro*. Les cellules utilisées lors de cette étude ont été des cellules ostéoprogénitrices humaines (HOP) préparées à partir de la moelle osseuse. Elles ont été cultivées dans le milieu ISCOVE (Sigma I 3390), complété avec 10%(v/v) de sérum de veau foetal, 1%(v/v) de glutamine et 1%(v/v) de pénicilline et de streptomycine. Les cellules ont étéensemencées sur les échantillons dans du milieu, puis placées à 37 °C. Au bout de 5 jours, les échantillons ont été préparés pour l'observation en microscopie électronique à balayage par rinçages successifs en PBS, mélange fixateur électronique, NaK₂P 0,175% et des bains d'alcool 50°, 70°, 80°, 95° et 100°. La déshydratation a été réalisée avec l'HMDS (hexamethyldisilazane).

Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 3.2.20 – 3.2.22.

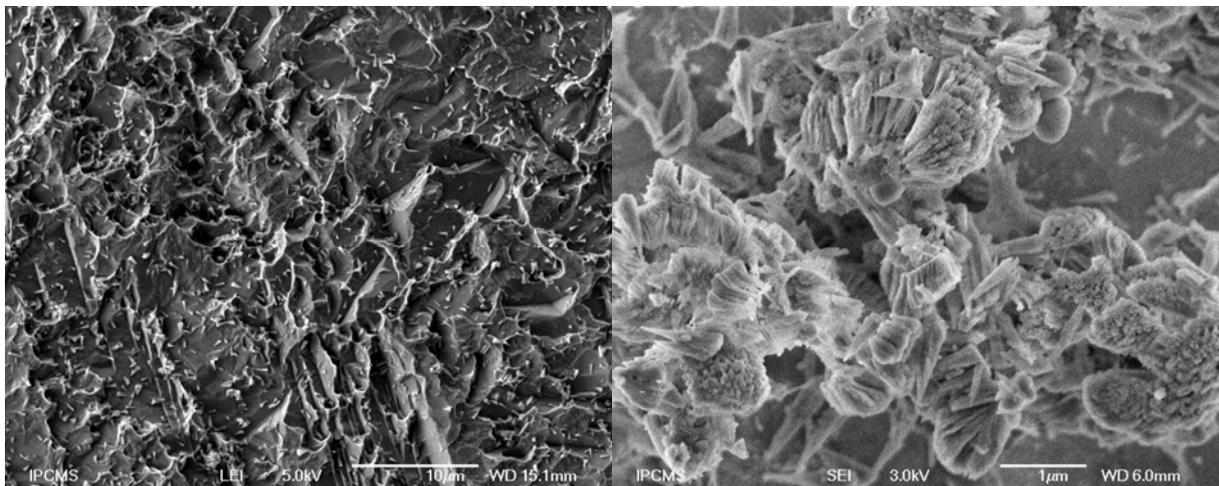


Figure 3.2.20. Surface de l'échantillon HA1 à 5 jours après le début des essais de croissance cellulaire

Nous pouvons observer que l'échantillon HA1 est détruit, la couche étant complètement dissoute dans le milieu de culture. Aucune cellule n'a pas été observée sur l'échantillon. Le substrat en titane est directement observable, en tant qu'au niveau de la surface sont restées les formations submicroniques aiguës observées dans la première partie de l'étude. Elles sont dispersées uniformément sur toute la surface, et les quelques gouttelettes trouvées présentent une forme cassée, où seulement le noyau cristallin est resté non modifié.

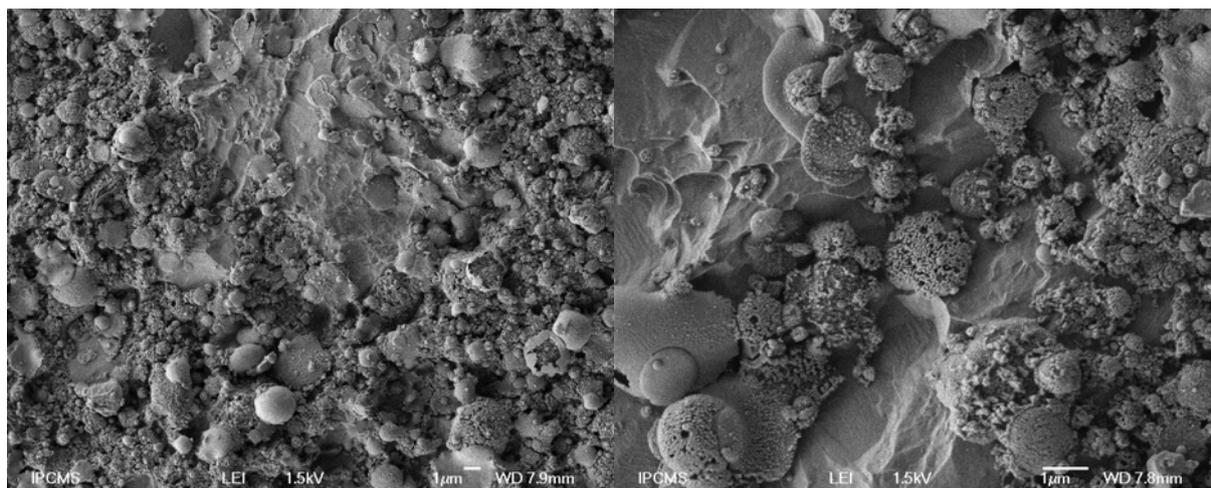


Figure 3.2.21. Surface de l'échantillon HA3 à 5 jours après le début des essais de croissance cellulaire

Les images présentées dans la Figure 3.2.21 démontrent une dissolution partielle de l'échantillon HA3. Aucune cellule n'a été observée au niveau de la surface de l'échantillon. Nous pouvons noter la dissolution de la partie « lisse » de la couche, qui correspondait dans nos études antérieures aux zones peu cristallines. Les gouttelettes compactes semblent être restées intactes, tandis que les autres gouttelettes qui présentaient la structure « choux-fleurs » ont été partiellement dissoutes, laissant intacte un squelette cristallin.

Dans la Figure 3.2.22 on peut observer le grand taux de recouvrement des couches obtenues à $7,5 \text{ J/cm}^2$ avec des cellules. La morphologie du film n'est pas modifiée, tandis que les ostéoblastes présentent une forme polygonale aplatie. Elles ont formé des dendrites longues qui s'étendent dans le milieu environnant. Dans le détail on peut observer que les filopodes suivent le relief de la couche et les points d'ancrage sont très nombreux. Apparemment, le relief de la couche est propice pour les ostéoblastes, les filopodes des cellules voisines entrant en contact, pour former un réseau.

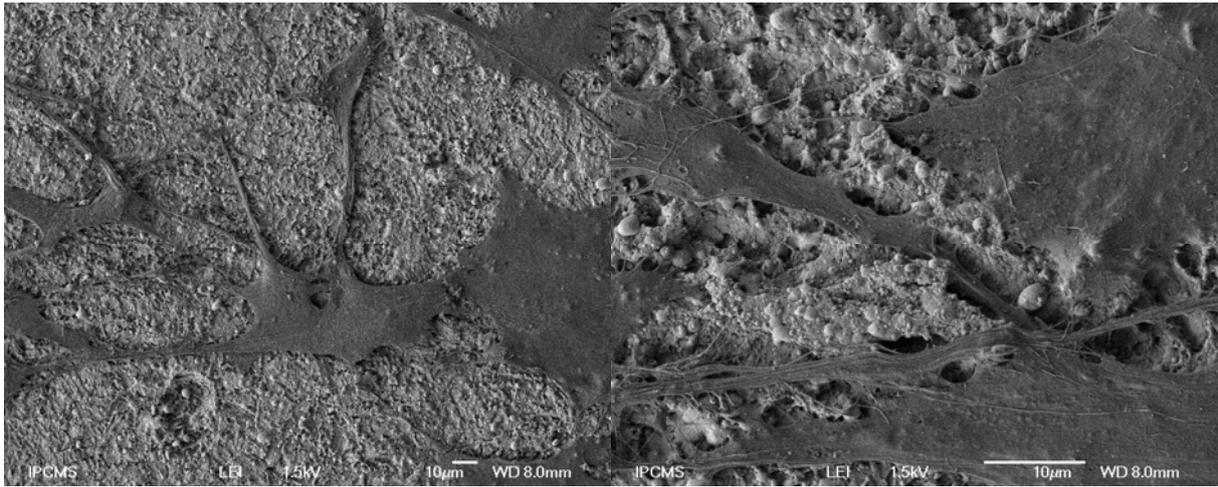


Figure 3.2.22. Surface de l'échantillon HA5 à 5 jours après le début des essais de croissance cellulaire

En conclusion, grâce aux déterminations physico-chimiques, les couches déposées présentent une augmentation de leur teneur en hydroxyapatite cristalline en augmentant la fluence laser. Cette affirmation est soutenue directement par les analyses en DRX et MET présentées, et indirectement par les analyses EDS et XPS par l'intermédiaire du calcul des rapports Ca/P. Dans tous les cas, la présence des phases de phosphates de calcium autres que l'hydroxyapatite est possible, étant évidente pour les échantillons obtenus dans les régimes de fluence inférieure à 5 J/cm^2 . La morphologie des structures obtenues, analysée par MEB, varie d'une manière significative. Si pour les couches obtenues à des faibles fluences l'aspect est aciculaire, avec une petite quantité de gouttelettes présentes sur la surface, pour des valeurs élevées de la fluence les couches ont un aspect uniforme, formé majoritairement par l'empilement des gouttelettes. Les couches présentant la meilleure cristallinité sont polycristallines, composées des cristaux de dimensions dans l'ordre 30 – 200 nm disposés d'une manière aléatoire.

De point de vue du comportement dans le milieu biologique, seul l'échantillon HA5 a été propice pour la croissance cellulaire, en comparaison avec les échantillons HA3 et HA1. Les cellules présentent une morphologie aplatie, étant étalées sur toute la surface de l'échantillon. Dans le cas des deux types d'échantillons, les couches déposées ont été complètement ou partiellement dissoutes, ce qui a provoqué la mort des cellules.

Les résultats obtenus, interprétés dans le cadre exposé dans le sous-chapitre précédent, pointent vers la conclusion que l'utilisation d'un niveau de fluence élevé pendant le processus d'ablation laser, sous les limitations imposées par les autres paramètres de dépôt,

représente la clé pour l'obtention des couches minces, contenant un taux d'hydroxyapatite élevé, qui sont les plus biocompatibles.

3.3. Etude de l'influence du traitement thermique post-dépôt en vapeur d'eau appliqué aux couches déposées par PLD

Le but des études présentées au cours de ce sous-chapitre a été de valider l'hypothèse conformément à laquelle le recuit thermique appliqué après le dépôt PLD va améliorer la structure et la composition des couches déposées. Suite à l'irradiation laser, au cours du déplacement des espèces moléculaires vers le substrat, à cause des excitations subies, les liaisons des groupements (OH) de la structure chimique de l'hydroxyapatite sont susceptibles d'être détruites. Le recuit thermique post-dépôt en présence de vapeur d'eau a comme rôle la reconstruction des radicaux au niveau du substrat, par l'enrichissement de la couche déposée en groupes (OH).

Pour la réalisation des couches, nous avons utilisé une source laser émettant à 248 nm, avec une durée de l'impulsion de 7 ns. Les conditions de dépôt sont données dans le Tableau 3.3.I. Une image de l'installation de traitement thermique est présentée dans la Figure 3.3.1.



Figure 3.3.1. Image de l'installation de traitement thermique en vapeur d'eau

Un premier groupe d'échantillons a été soumis au traitement thermique de reconditionnement, à 400°C pendant 6 heures, tandis qu'un deuxième groupe a été gardé comme référence. Le chauffage et le refroidissement des échantillons ont été contrôlés par un système asservi de régulation des pentes de montée et de descente de la température. La

valeur des pentes a été établie à 3°/minute, afin d'empêcher la formation des fissures dues aux indices de dilatation différents entre la couche et le substrat.

Echantillon	Cible	Substrat	Fluence [J/cm ²]	Pression [mbar]	Température du substrat [°C]	Distance cible substrat [cm]	Nombre d'impulsions laser	Traitement thermique
HA1t	HA	Ti	3	40	400	4	30000	Oui
HA2t	HA	Ti	3	40	400	4	30000	Non

Tableau 3.3.I. Conditions de dépôt pour les échantillons étudiés

Les différences entre les deux types de structures ont été mises en évidence par microscopie électronique à balayage, microscopie à force atomique, diffraction de rayons X, et analyse dispersive en énergie.

Après un premier examen des images acquises en MEB à de faibles agrandissements, il n'y a pas de différences significatives entre les deux types de structures, comme cela est illustré dans la Figure 3.3.2.

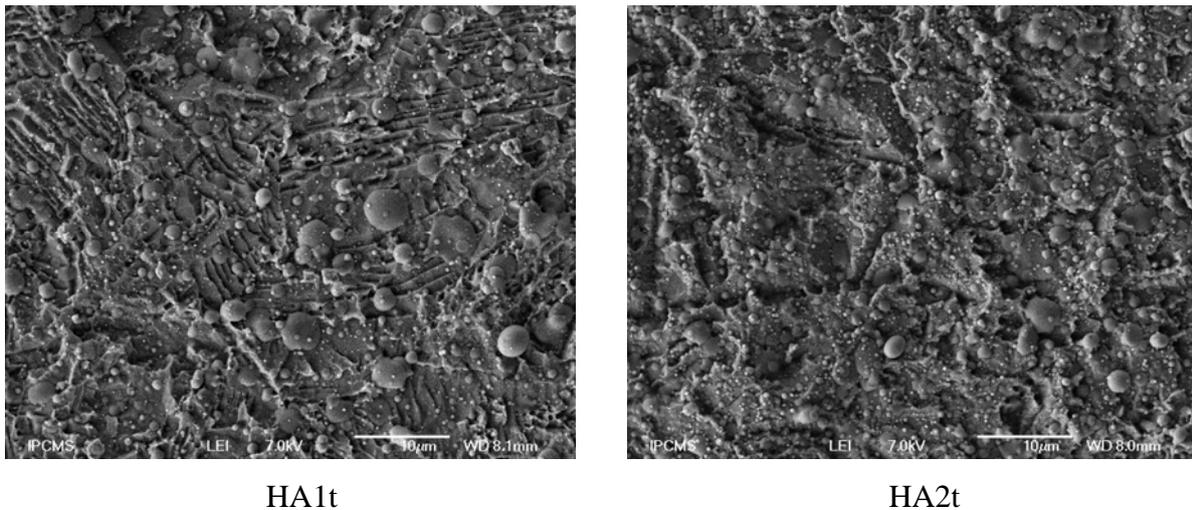
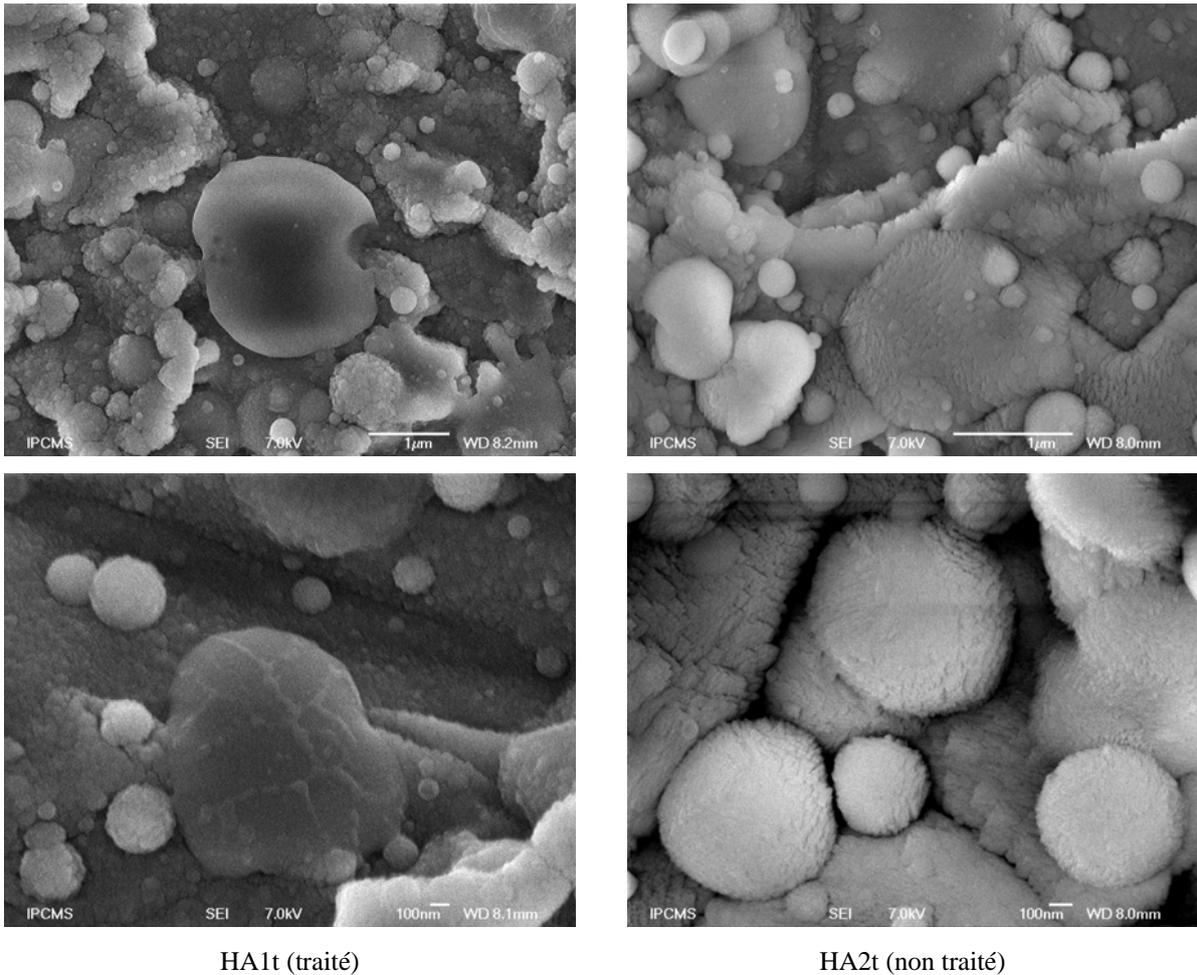


Figure 3.3.2. Aspect général des couches déposées, observé en MEB à faible agrandissement

Pourtant, une observation minutieuse, à des forts agrandissements a révélé des différences, mais à une échelle nanométrique, comme on peut le voir dans la Figure 3.3.3.



HA1t (traité)

HA2t (non traité)

Figure 3.3.3. Aspect des deux types de couches observé à un fort agrandissement

Nous pouvons observer que l'échantillon non soumis au traitement thermique post-dépôt (HA2t) présente une morphologie plus accidentée au niveau nanométrique. Les gouttelettes ont la forme des boules de neige, dont la surface est constituée de structure parallélépipédique formant des marches. Le traitement thermique induit une réorganisation de la structure de surface. On ne retrouve plus d'irrégularités et l'aspect des gouttelettes est lisse.

Les observations par AFM des parties supérieures des gouttelettes ont relevé une différence entre les deux types de structures du point de vue de leurs rugosités. Selon les valeurs obtenues, exposées dans la Figure 3.3.4, la rugosité au niveau nanométrique diminue de 1,01 nm à 0,8 nm, fait qui démontre un lissage de la surface.

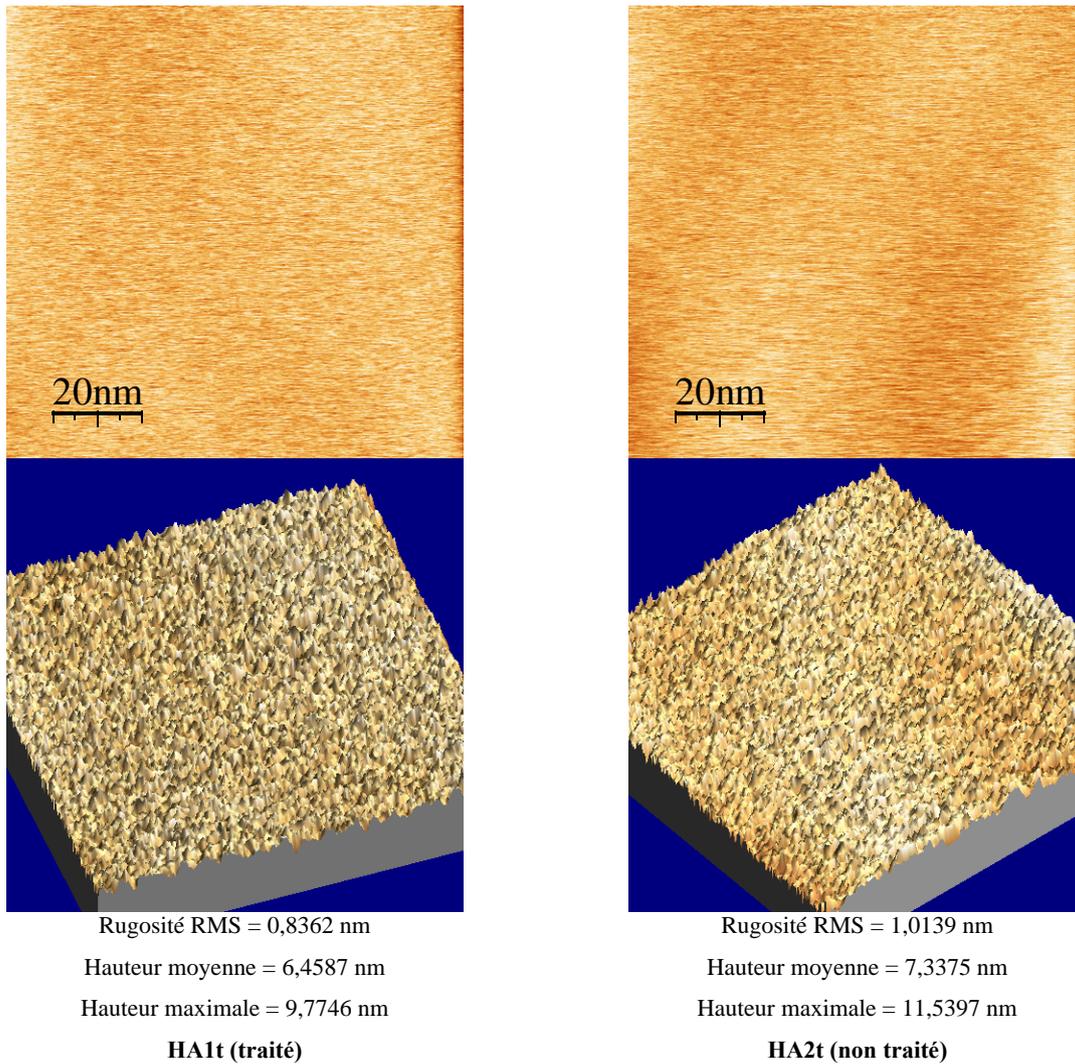


Figure 3.3.4. Déterminations AFM sur les parties supérieures des gouttelettes déposées

Les résultats obtenus en EDS sont en correspondance avec l'hypothèse initiale. Ainsi le rapport Ca/P a diminué de la valeur de 2,04 pour l'échantillon non-traité jusqu'à 1,63 pour l'échantillon traité en présence de vapeur d'eau.

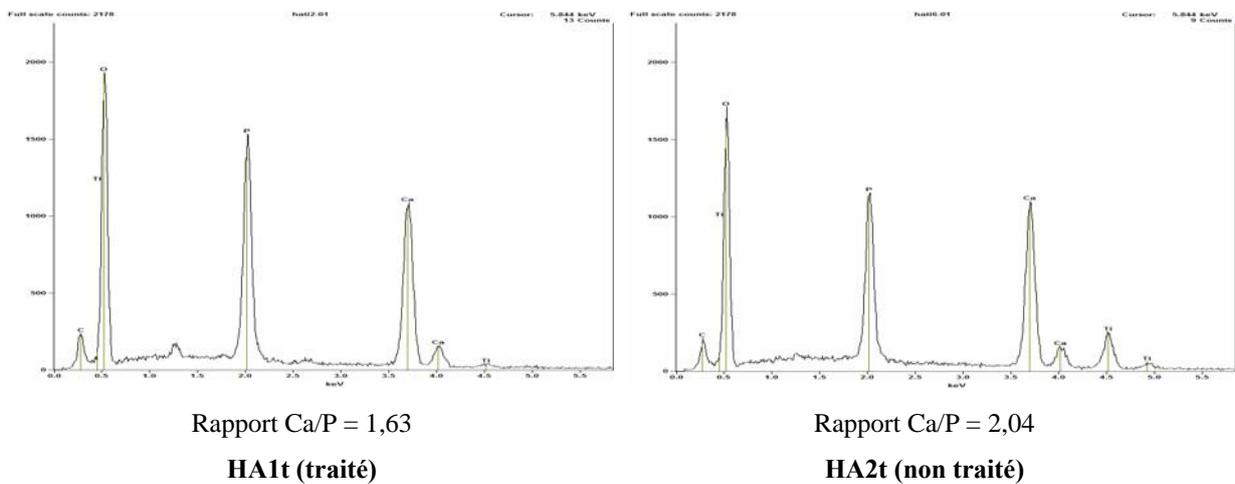


Figure 3.3.5. Spectres EDS et valeurs calculées des rapports Ca/P

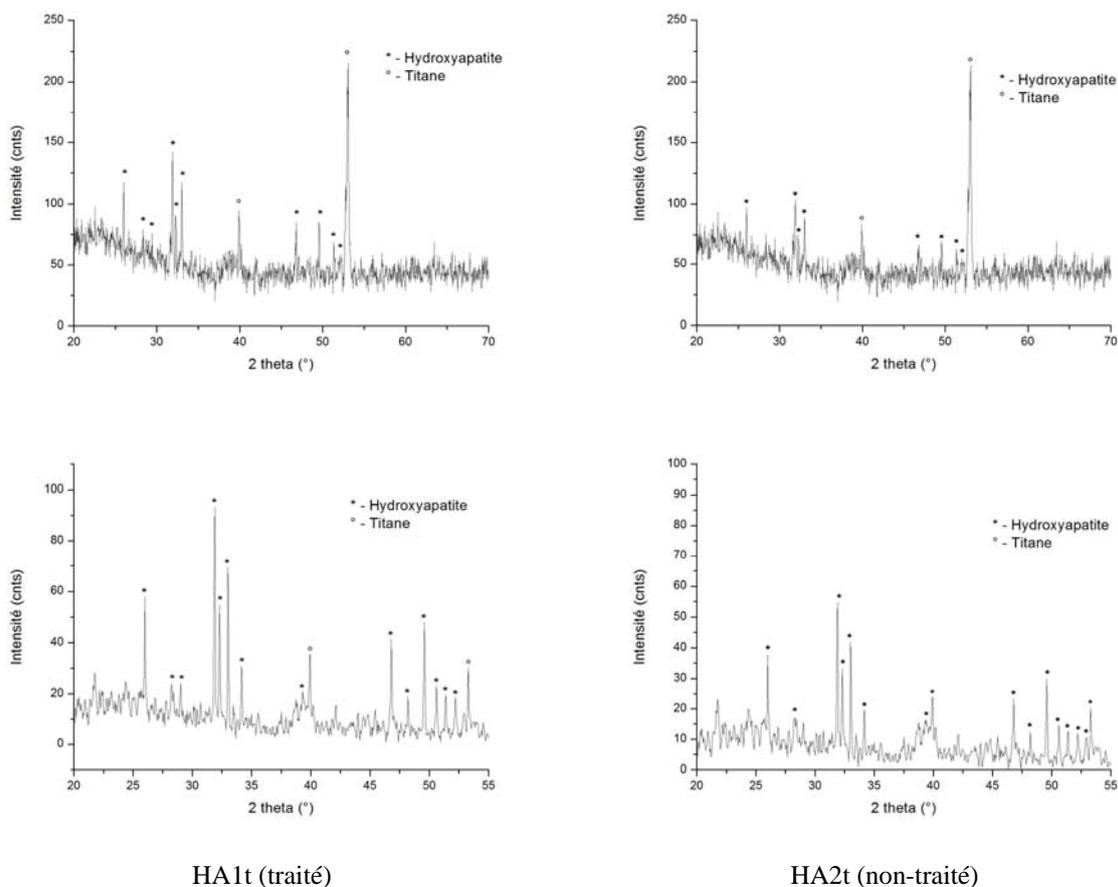


Figure 3.3.6. Spectres XRD en $\theta - 2\theta$ et en incidence rasante obtenus sur les deux types d'échantillons

Les résultats obtenus par diffraction des rayons X, présentés dans la Figure 3.3.6 démontrent le caractère plus cristallin de l'échantillon soumis au traitement thermique, par rapport à l'échantillon non traité.

Suite aux résultats obtenus par les diverses techniques de caractérisation appliquées, nous pouvons noter l'augmentation du taux de cristallinité des échantillons déposés par ablation laser soumis au traitement thermique post-dépôt en présence de vapeur d'eau. Ce type de recuit augmente le rapport caractéristique Ca/P, induisant une réorganisation structurale de la couche déposée. Aussi, les images en microscopie électronique à balayage ont démontré la réorganisation morphologique de la surface, leur surface devenant plus lisse au niveau nanométrique.

En conclusion, le traitement thermique est une étape importante à mettre en oeuvre pour l'obtention de couches d'hydroxyapatite cristallines biocompatibles, ayant une plus proche ressemblance à l'hydroxyapatite stoechiométrique.

3.4. Obtention d’une interface graduelle entre les couches minces d’hydroxyapatite et le substrat en titane

En clinique, suite à l’analyse des implants défailants, il a été constaté que la plupart des défauts apparus pendant le fonctionnement de l’implant sont situées à l’interface entre la couche céramique et le substrat. Cette interface abrupte est fragile, pouvant être la source de rupture en cours d’usage de l’implant par le patient.

En général, le titane constituant les implants est naturellement recouvert d’une fine couche d’oxyde. En effet c’est cette couche qui le rend passif du point de vue chimique et lui donne le caractère biocompatible. Dans ce contexte il existe deux interfaces : HA/TiO₂ et TiO₂/Ti.

Notre objectif a été d’obtenir une interface graduelle en déposant l’hydroxyapatite sur du titane réactif fraîchement déposé sur un substrat « académique » Si(100)/TiN. Nous avons diminué la couche d’oxyde en déposant sous vide la couche de titane sur le substrat Si(100)/TiN réalisé dans la même enceinte sous vide par PLD. Le substrat Si (100) été choisi pour sa faible rugosité et pour sa facilité de préparation sous forme de lames minces pour les observations MET. Afin de ne pas avoir des problèmes de décohésion du titane avec le substrat de silicium à cause des non concordances de paramètres de maille, une couche de nitrure de titane faisant la transition entre les deux matériaux a été interposée.

Les structures obtenues sont organisées comme montré dans la Figure 3.4.1. Elles ont été réalisées sous vide dans la même enceinte par PLD durant la même séance expérimentale. Pour cela nous avons utilisé un système de type carrousel comprenant plusieurs cibles qui nous a permis le changement de la cible sans être obligés d’ouvrir la chambre de dépôt, fait qui aurait causé la formation d’oxydes entre les couches successives. Les conditions de dépôt de chaque couche sont données dans le Tableau 3.4.I.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la source laser émettant à 248 nm, avec une durée de l’impulsion d’environ 7 ns. Après l’obtention des multicouches, les échantillons ont été soumis au traitement thermique de recuit en vapeur d’eau à 400°C pour 6 heures.



Figure 3.4.1. Vue schématique de l’organisation des échantillons utilisés

	Couche TiN	Couche Ti	Couche graduelle	Couche HA
Substrat	Si	Si/TiN	Si/TiN/Ti	Si/TiN/Ti/CG
Cible	TiN	Ti	HA	HA
Fluence [J/cm ²]	2	2	2	2
Pression [Pa]	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	35
Température du substrat [°C]	700	400	400	400
Distance cible – substrat [cm]	4	4	4	4
Nombre d’impulsions	5000	40000	500	20000

Tableau 3.4.I. Conditions de dépôt pour les couches composant l’échantillon

La nature de l’interface entre l’hydroxyapatite et le titane a été observée par microscopie électronique à transmission. Pour l’obtention des lames minces des échantillons obtenus, observables en coupe transverse, nous avons choisi la méthode du tripode. Les observations MET nous ont permis de déterminer la nature de l’interface, tandis que les analyses en diffraction de rayons X ont validé la structure de l’hydroxyapatite dans les couches obtenues.

Les résultats obtenus en diffraction de rayons X en incidence rasante à 0,5° relèvent la présence d’une couche partiellement cristalline d’hydroxyapatite, mélangée avec des phases de phosphate de calcium (Figure 3.4.2). Les raies du substrat en titane sont également observables.

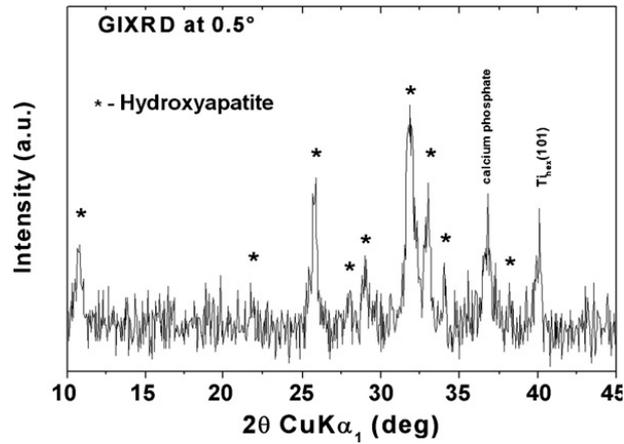


Figure 3.4.2. Spectre DRX de la couche d’hydroxyapatite déposée

A l’interface, les images obtenues en microscopie électronique à transmission haute résolution montrent une structure polycristalline, formée de domaines nanométriques d’hydroxyapatite mélangées dans une phase de phosphate de calcium amorphe (Figure 3.4.4). La couche graduelle présente une épaisseur d’environ 20-25 nm. Les analyses FFT effectuées sur cette couche ont démontré l’existence d’un mélange d’oxyde de titane et de phosphate de calcium (Figure 3.4.5). A partir de cette épaisseur, des centres de cristallisations commencent à apparaître pendant la croissance de la couche, impliquant l’apparition des domaines cristallins mentionnés.

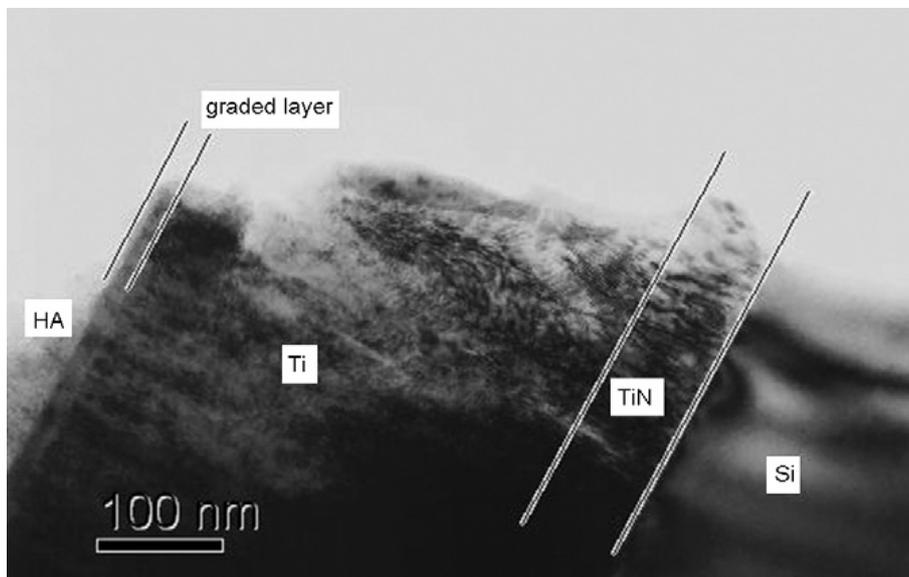


Figure 3.4.3. Vue transverse de la structure multicouche obtenue par PLD

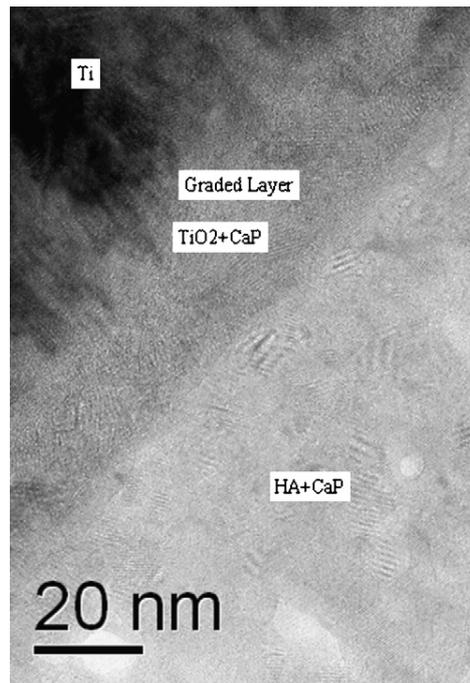


Figure 3.4.4. Image MET en haute résolution de l’interface entre le substrat et la couche d’hydroxyapatite

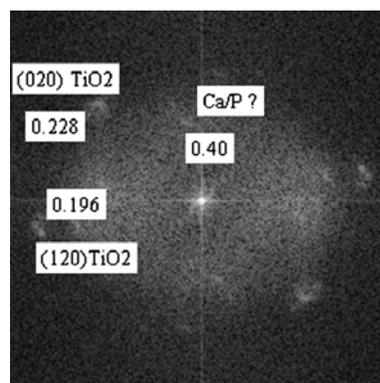


Figure 3.4.5. Analyse FFT dans la région de la couche graduelle

La figure 3.4.6 montre les analyses FFT effectuées dans les régions de la couche de titane (a) et dans la région de la couche d’hydroxyapatite (b).

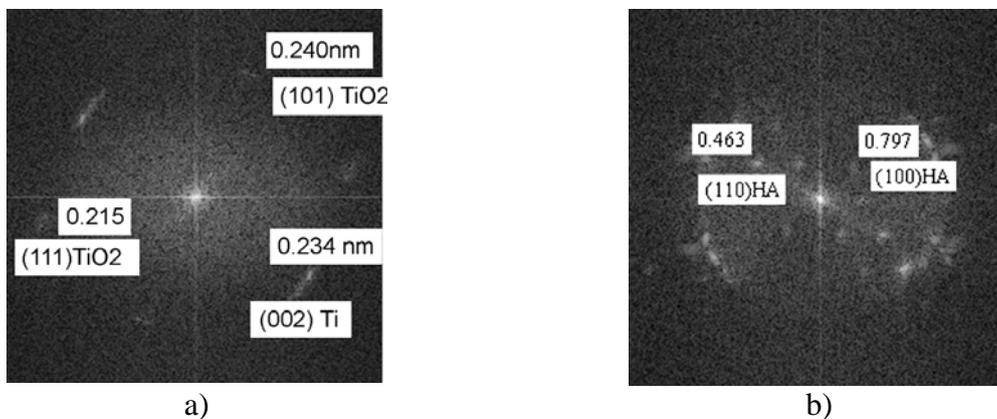


Figure 3.4.6. Analyses FFT dans la région de la couche Ti et la région HA

La présence de l’oxyde de titane est explicable par la réactivité élevée de la couche de titane déposée à l’oxygène résiduel présent dans l’enceinte, ainsi qu’aux premières couches d’HA déposées. Dans la Figure 3.4.7 nous pouvons observer en vue transverse une gouttelette d’hydroxyapatite. Les fissures présentes peuvent être expliquées par les efforts mécaniques relativement grands auxquels sont soumis les échantillons pendant l’amincissement par abrasion mécanique utilisée dans la méthode du tripode. Nous pouvons observer que les fissures se trouvent dans la couche d’hydroxyapatite mais pas dans la zone de l’interface, ce qui suggère un meilleur comportement mécanique de l’interface par rapport à la couche.

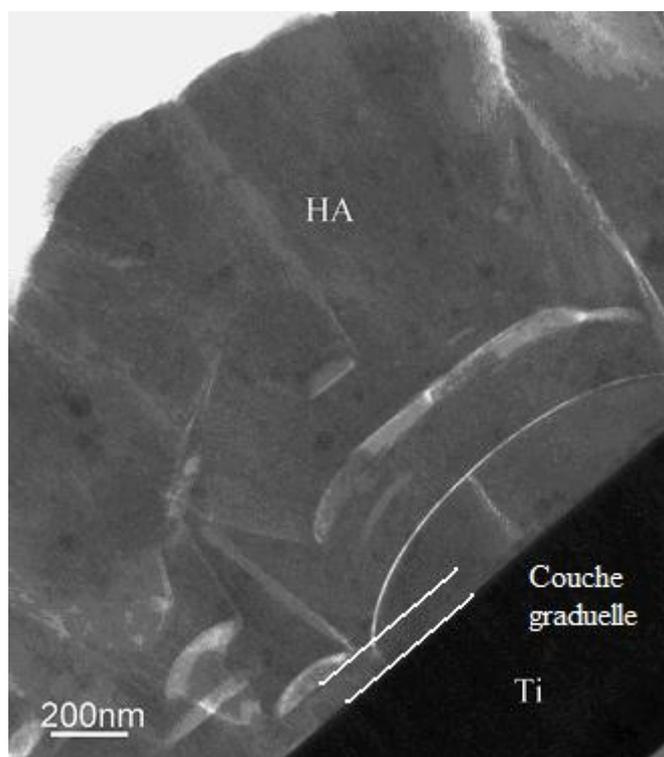


Figure 3.4.7. Image MET HR d’une gouttelette typique d’hydroxyapatite

De ces résultats nous pouvons conclure que la couche graduelle joue un rôle très important dans l’adhérence de la couche d’hydroxyapatite sur le substrat en titane, en améliorant les propriétés mécaniques au niveau de l’interface. De cette manière, l’interface n’est plus le site de formation et de propagation des fissures pendant le fonctionnement de l’implant, les éventuelles faillies pouvant intervenir toute région de l’épaisseur de la couche. La possibilité d’intervention de telles défaillances est pourtant petite, tenant compte de l’épaisseur micrométrique de la couche d’hydroxyapatite déposée, de son homogénéité au niveau des centaines de nanomètres dans l’épaisseur, et des propriétés mécaniques largement suffisantes, comme démontré par des travaux antérieurs présentés dans la littérature.

3.5. Dépôt de couches minces de protéines de la matrice extracellulaire par la technique MAPLE

Une nouvelle direction des recherches dans le domaine des dépôts effectués à l'aide des lasers a été donnée au début des années 2000 avec l'introduction de la technique MAPLE (de l'anglais Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation – Dépôt Laser Pulsé Assisté par une Matrice). Cette technique a permis d'élargir la gamme de matériaux qui peuvent être déposés sous forme de couche mince avec le laser vers les matériaux organiques, qui en PLD auraient été détruits au cours de leur évaporation.

L'utilisation des techniques cryogéniques permet la diminution de l'effet thermique du laser et restreint la zone chauffée dans la cible. Dans le même sens, l'utilisation des solvants qui absorbent fortement le rayonnement à la longueur d'onde du laser permet le couplage de l'énergie d'une manière préférentielle dans le solvant, en diminuant la quantité d'énergie absorbée par le matériau organique.

Ainsi, en plus des paramètres PLD, en MAPLE existent deux autres variables qui présentent une grande importance pour l'obtention de couches de composition identique au matériau de départ : (i) la concentration de substance organique à déposer dans la solution constituant la cible et (ii) la nature du solvant. Par contre, la température du substrat doit être inférieure à la température de décomposition du matériau à transférer, et le plus souvent elle peut rester égale à la température ambiante.

Dans cette étude, nous avons démontré la possibilité de transférer des protéines de la matrice extracellulaire par la technique MAPLE. La fibronectine, une de ces protéines, est responsable de l'attachement des cellules sur un substrat, grâce au groupement RGD (arginine(ARG); glycine(GLY); acide aspartique(ASP)) qui la caractérise. Par l'interposition d'une couche de fibronectine entre l'implant et le milieu biologique, une accélération du processus de colonisation de la surface par les cellules est à attendre.

Par conséquent, le but principal de nos études a été de vérifier la viabilité de cette méthode de transfert, et aussi d'analyser du point de vue physico-chimique la nature de la couche déposée.

La cible a été réalisée à partir d'une quantité de fibronectine humaine, dissoute dans une solution tampon saline contenant 50 mM tris et 150 mM NaCl. Le pH final de la solution contenant 5% fibronectine a été 7,6. La solution tampon a été utilisée afin d'éviter l'agglomération des molécules de fibronectine en suspension et aussi de garder intacte leur structure durant un temps suffisamment long avant le dépôt. Avant la séance expérimentale la cible a été fabriquée en mettant la solution dans un porte-échantillon spécialement conçu pour ces expériences, ensuite trempée dans l'azote liquide de manière contrôlée pour obtenir une solidification progressive afin d'éviter la coalescence des molécules de fibronectine. La cible a été ensuite placée dans la chambre de dépôt contre un dispositif de refroidissement alimenté en azote liquide qui a permis de garder constante sa température à environ -150 °C pendant le déroulement du dépôt.

Afin d'observer la morphologie de la couche déposée, nous avons utilisé un substrat de Si (100) qui présente une rugosité inférieure au nanomètre. Les conditions de dépôt sont présentées dans le Tableau 3.5.I, ci dessous.

Cible	Solution fibronectine 5%
Substrat	Si (100)
Energie	150 mJ
Aire du spot laser	20 mm ²
Pression	1,5 x 10 ⁻¹ Torr
Distance cible-substrat	4 cm
Nombre d'impulsions	2000

Tableau 3.5.I. Conditions de dépôt pour l'obtention de couches de fibronectine par MAPLE

Après le transfert laser, les couches obtenues ont été observées en microscopie électronique à balayage et en microscopie à force atomique. La composition de la fibronectine transférée a été mise en évidence par des essais d'immunomarquage avec les anticorps spécifiques.

Les images obtenues en microscopie électronique à balayage (Figure 3.5.1) montrent la formation d'une couche de matériau transféré sur toute la surface de l'échantillon. La présence de la structure dendritique est due à la présence des sels dans la solution tampon qui ont été transférées pendant le processus MAPLE. Cette cristallisation particulière est obtenue en exposant l'échantillon froid à l'atmosphère ambiante après la séance expérimentale, fait

qui a provoqué la condensation de vapeurs d'eau à la surface de l'échantillon. Suite à l'évaporation de l'eau condensée, la marque de la structure dendritique de sels cristallisés est restée sur la surface de la couche de fibronectine.

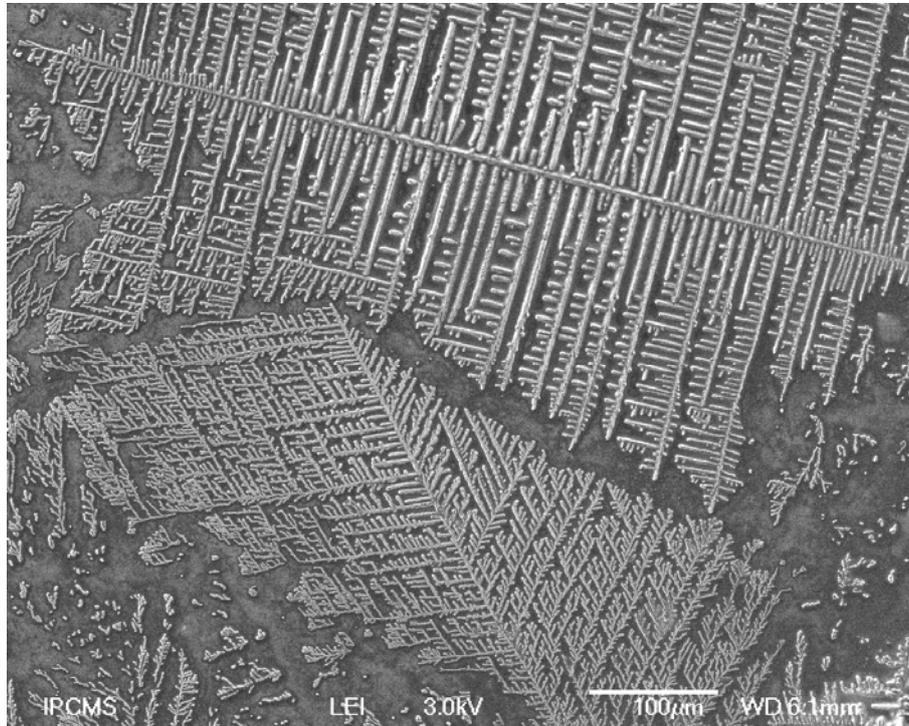
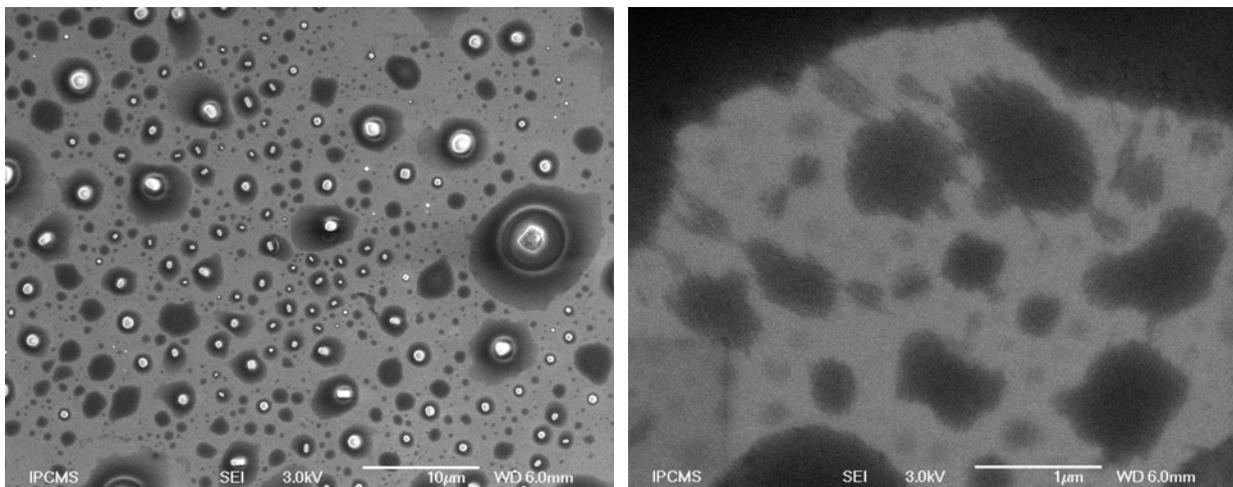


Figure 3.5.1. Aspect général d'une couche de fibronectine transférée

Afin d'éviter ce phénomène et d'observer les couches telles qu'elles ont été déposées, nous avons choisi de chauffer le substrat à 30°C. Ainsi, cette température nous a permis d'empêcher la condensation de l'eau sur la surface de l'échantillon déposé. Les images obtenues à un plus fort agrandissement sont données dans la Figure 3.5.2.



a)

b)

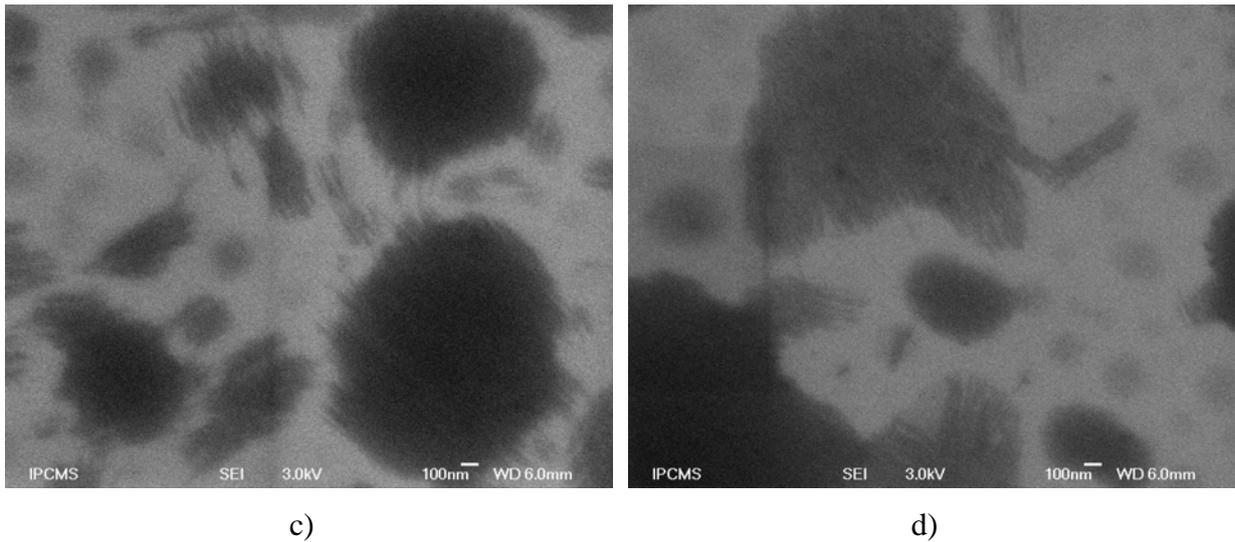


Figure 3.5.2. Observations MEB de la couche de fibronectine déposée

Nous pouvons observer que les sels sont transférés sous forme de cristaux cubiques ayant des diverses dimensions (Figure 3.5.2 a)). La fibronectine se retrouve sur le substrat sous forme d'amas de formations allongées, arrivées sous forme de gouttelettes. On peut noter la conformation du matériau transféré sous la forme de fibres interconnectées, ce qui suggère la conservation de la structure initiale de la fibronectine après le dépôt (Figure 3.5.2 b)-d)).

Les observations par microscopie à force atomique relèvent trois types de zones constituant le matériau déposé, mises en évidence surtout à la frontière des gouttelettes. On a examiné ainsi le passage entre la région de substrat resté non déposé et la région épaisse des gouttelettes. Nous pouvons observer une zone lisse, qui correspond au substrat (en bas de la Figure 3.5.3 a)), une zone où les molécules à la surface sont disposées aléatoirement correspondant à la région épaisse du matériau transféré (Figure 3.5.3 b)) et une troisième zone intermédiaire aux deux zones mentionnées où les chaînes moléculaires individuelles sont alignées selon des directions parallèles (Figure 3.5.3 c) et d)).

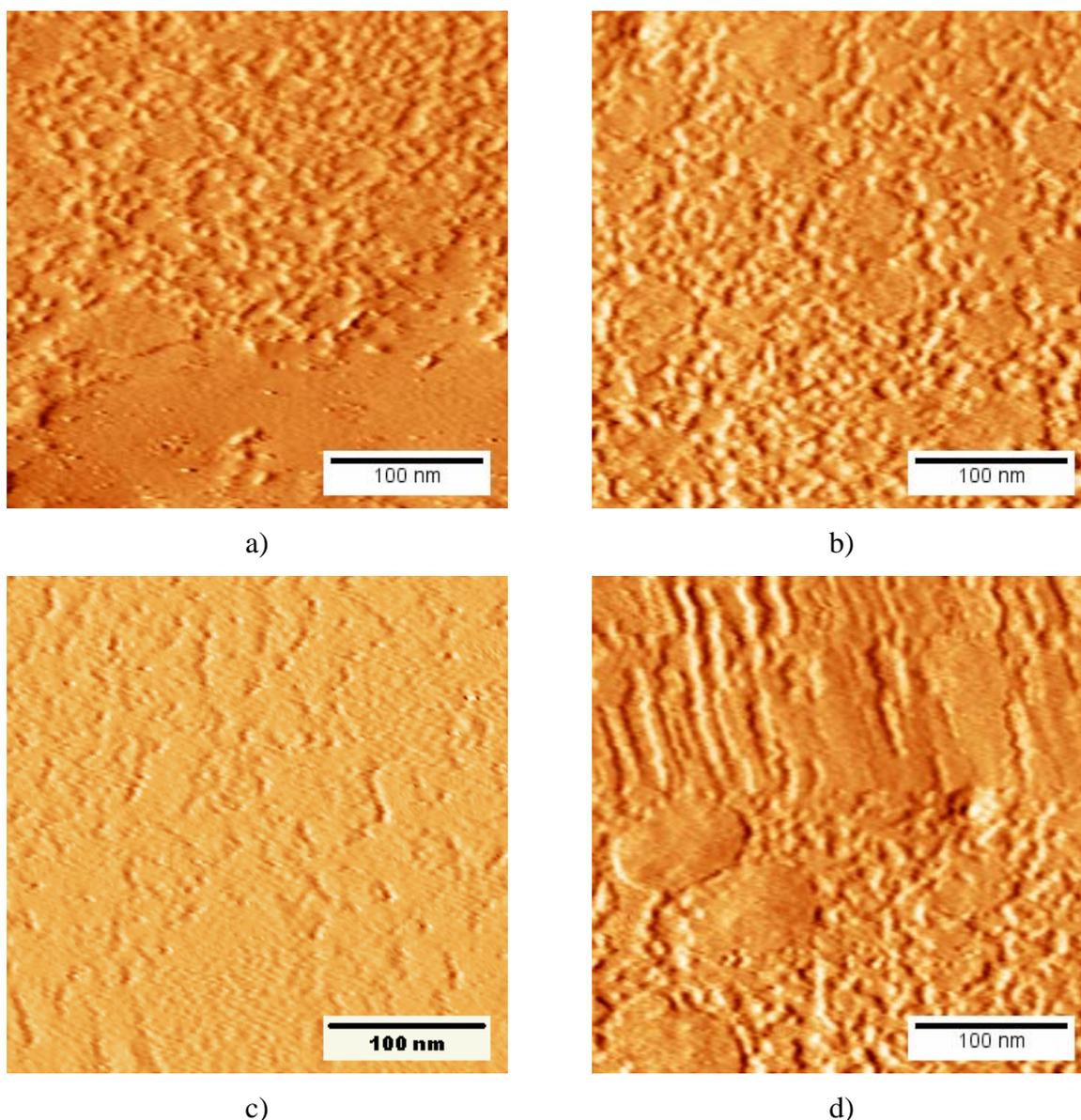


Figure 3.5.3. Images AFM des diverses zones de la couche de fibronectine

Les molécules observées en surface présentent la morphologie caractéristique de la fibronectine, correspondant aux résultats rapportés dans la littérature [5]. Ainsi, les longueurs des chaînes moléculaires observées correspondent à la longueur de la molécule de fibronectine, qui se situe entre 115 et 160 nm. La disposition parallèle des molécules dans les zones c) et d) démontre la tendance de formation de fibrilles, observées par les mesures antérieures en MEB.

Les essais de mise en évidence de la fibronectine ont été réalisés par immunofluorescence. Les surfaces ont été saturées 30 minutes à 37°C dans le tampon d'adsorption. Les échantillons ont été ensuite incubés 1 heure avec un anticorps polyclonal du

lapin anti-FN plasmatique dilué au 1/50 dans le tampon de saturation. Ils ont été ensuite rincés trois fois 10 minutes dans le tampon de saturation et incubés 45 minutes en présence d'un anticorps de chèvre anti-IgG du lapin couplé au FITC dilué au 1/100 dans le tampon de saturation. Enfin, ils ont été rincés deux fois 10 minutes dans le tampon de saturation puis maintenus immergés dans le tampon d'adsorption jusqu'au moment de l'observation. La fluorescence du FITC est observée à l'aide d'un filtre de bande passante centrée sur 570nm. Les photos sont prises à l'aide d'un appareil photo numérique connecté au microscope à fluorescence.

Les images présentées dans la Figure 3.5.4 montrent la différence entre une couche de fibronectine déposée par MAPLE et le contrôle négatif. Nous pouvons observer le recouvrement du substrat, mais surtout le fait que la fibronectine n'a pas été détruite pendant le transfert.

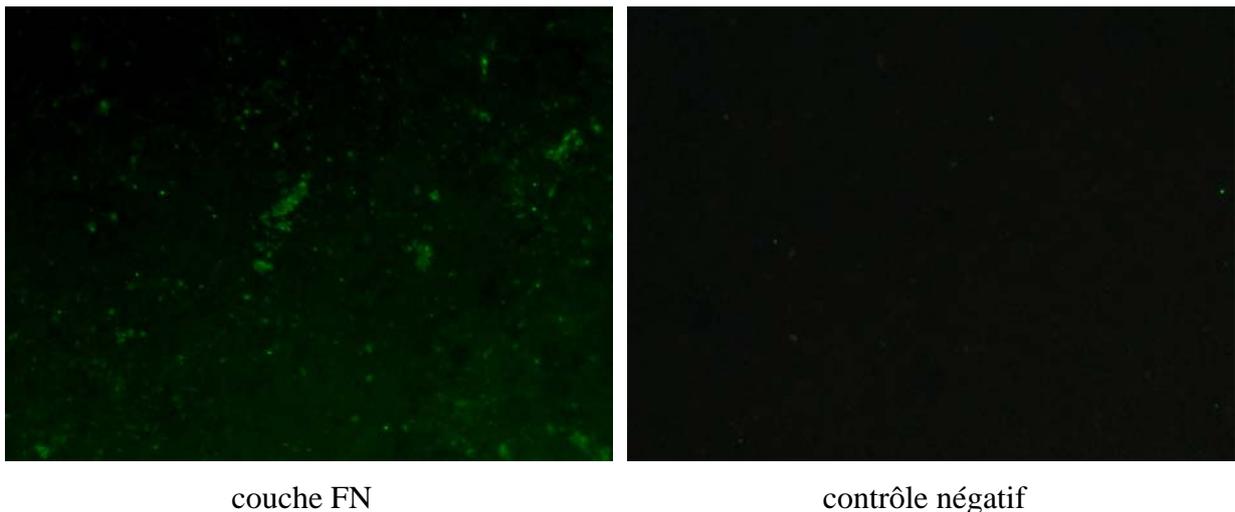


Figure 3.5.4. Mise en évidence de la couche de fibronectine par immunofluorescence, par rapport à un contrôle négatif

Les couches qui présentaient la structure dendritique de sels à la surface ont été aussi examinées. Les images obtenues, montrées dans la Figure 3.5.5, relèvent la présence de la fibronectine sur toute la surface de l'échantillon.

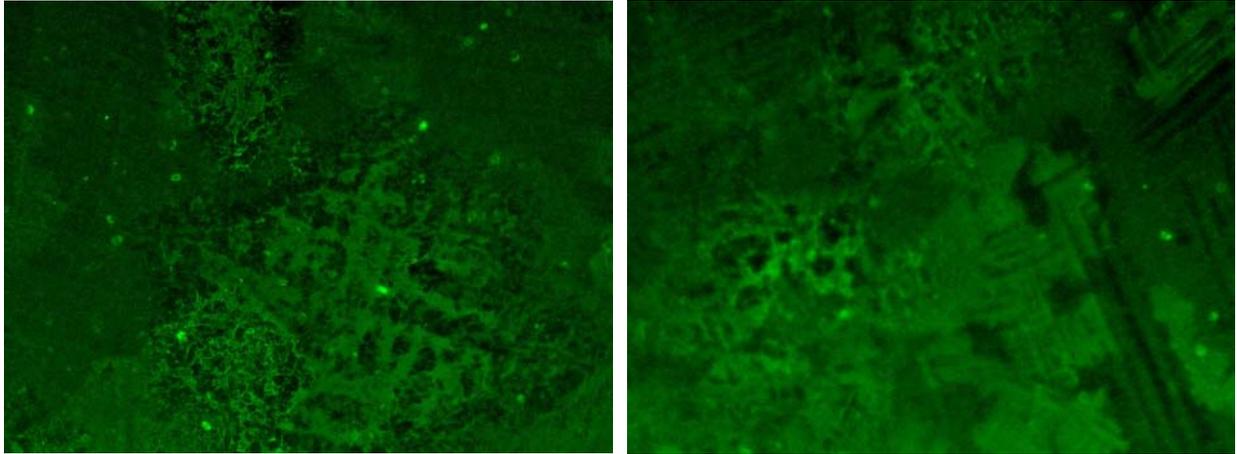


Figure 3.5.5. La distribution de la fibronectine sur la surface des échantillons

En conclusion, dans cette étude nous avons démontré la possibilité de transférer la fibronectine et la déposer sous forme de couche mince par la technique d'évaporation laser assistée par une matrice MAPLE. Des cristaux de sels peuvent être présents au niveau de la surface de la couche transférée, sous l'aspect de formations cubiques ou sous forme de réseau dendritique, mais leur présence ne diminue pas les caractéristiques de la couche de fibronectine obtenue. Dans les zones transitoires entre les régions plus épaisses de la couche, représentant les endroits d'arrivée des gouttelettes provenant de la cible et les zones plus minces, nous avons observé la conformation fibrillaire des molécules de fibronectine, disposées parallèlement. Les observations par microscopie en fluorescence ont démontré que le transfert a été réussi, sans un changement important de la structure des molécules de fibronectine.

3.6. Transfert de portions de fibronectine par la technique LDW

Les techniques LDW (Laser Direct Write), récemment développées dans le domaine des lasers, offrent des possibilités élargies de mise en œuvre de nouveaux matériaux, qui n'étaient pas possibles d'obtenir par des technologies conventionnelles. Ainsi nous pouvons maintenant construire des motifs géométriques contrôlables, constituées de presque tout matériau organique sur un substrat quelconque, avec une bonne résolution latérale et une décomposition minimale du matériau transféré. La vitesse d'obtention des motifs géométriques transférés est grande, permettant d'obtenir des images compliquées dans des périodes de temps très courtes.

L'essor des techniques LDW (Laser Direct Write) ces dernières années a été possible grâce aux développements récents des recherches dans le domaine des lasers. Initialement, cette technique a été proposée en utilisant les lasers émettant en régimes ns, sous la dénomination LIFT (Laser Induced Forward Transfer). Mais, le domaine d'utilisation de cette méthode était restreint aux métaux, aux semi-conducteurs et aux oxydes métalliques [6, 7]. Ces types de matériaux étaient les seules qui ne se décomposaient suite aux effets thermiques induits par les pulses laser dont la durée est de l'ordre de quelques nanosecondes. Les premiers calculs faits sur des polymères ont démontré que le seuil d'ablation de ces matériaux était supérieur au seuil d'endommagement, ce qui a provoqué la diminution de l'intérêt des chercheurs de poursuivre leurs recherches sur ce type de matériaux. Cette technique a commencé à remporter des succès avec l'introduction des lasers émettant en régime fs, qui impliquaient des mécanismes d'excitation par ionisation multiphotonique, sans l'implication du régime thermique [8, 9, 10]. A partir de cette période, la grande majorité des résultats rapportés sont obtenues avec des lasers fs.

La direction principale de ces recherches est l'élaboration de structures contrôlables bien définies de fibronectine sur la surface d'un implant, qui peuvent induire une croissance dirigée des cellules. Dans notre étude nous montrons que le transfert de protéines est également possible avec un laser ns, par l'interposition entre le substrat « donneur » transparent à la longueur d'onde du laser et la couche « source » de protéine d'une couche mince métallique qui a comme rôle d'adsorber l'énergie laser et la transformer en impulsion mécanique capable de transférer un petit volume de protéine correspondant à la zone irradiée par le laser, sans avoir subi des transformations de leur composition.

La vue schématique du système couche « donneur » - substrat « récepteur » est présentée dans la Figure 3.6.1.

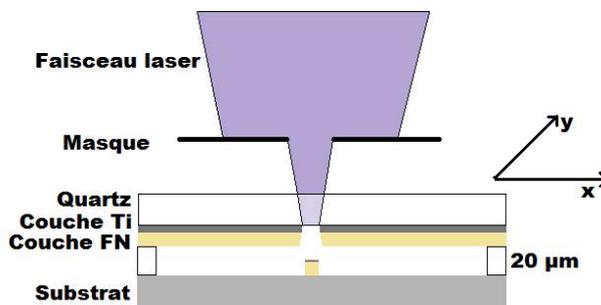


Figure 3.6.1. Système LDW utilisé dans nos expériences

La couche intermédiaire en titane, d'une épaisseur d'environ 50 nm, a été obtenue antérieurement par PLD. La couche de fibronectine, présentant une épaisseur d'environ 15 μm a été déposée sur le substrat Quartz/Ti par dip-coating à partir d'une solution 5% dans une solution tampon contenant 50 mM tris et 150 mM NaCl. Le substrat « donneur » ainsi obtenu a été placé contre le substrat « récepteur » en Si (100) à une distance de 20 μm . Ce système a été fixé sur une table micrométrique coordonnée par un ordinateur, permettant le déplacement X-Y dans le plan perpendiculaire au faisceau laser.

La source laser utilisé dans nos expériences émet à 248 nm, avec une durée de l'impulsion de 25 ns. Afin de restreindre la zone irradiée en minimisant les aberrations optiques subies par le faisceau laser en le focalisant, l'expérience a été entreprise dans un plan antérieur au plan focal. L'aire du spot dans ce plan a été mesurée à 32 mm². Un masque circulaire ayant le diamètre de 200 microns a été placé dans le proche voisinage de la couche « donneur ». Afin de minimiser les effets thermiques, nous avons déterminé les conditions pour éviter la fusion de la couche intermédiaire en titane et de n'utiliser que l'onde de choc provoquée par l'impact laser. Le régime de fluence approprié a été déterminé en utilisant un atténuateur optique placé dans le faisceau, qui a permis le réglage de l'énergie dans l'intervalle 40-100 mJ, avec un incrément de 10 mJ pour chaque transfert.

Les structures transférées ont été observées en microscopie optique. Leurs hauteurs ont été mesurées par profilométrie, tandis que la validation de la conservation structurale de la fibronectine a été obtenue par des essais d'immunomarquage avec les anticorps spécifiques.

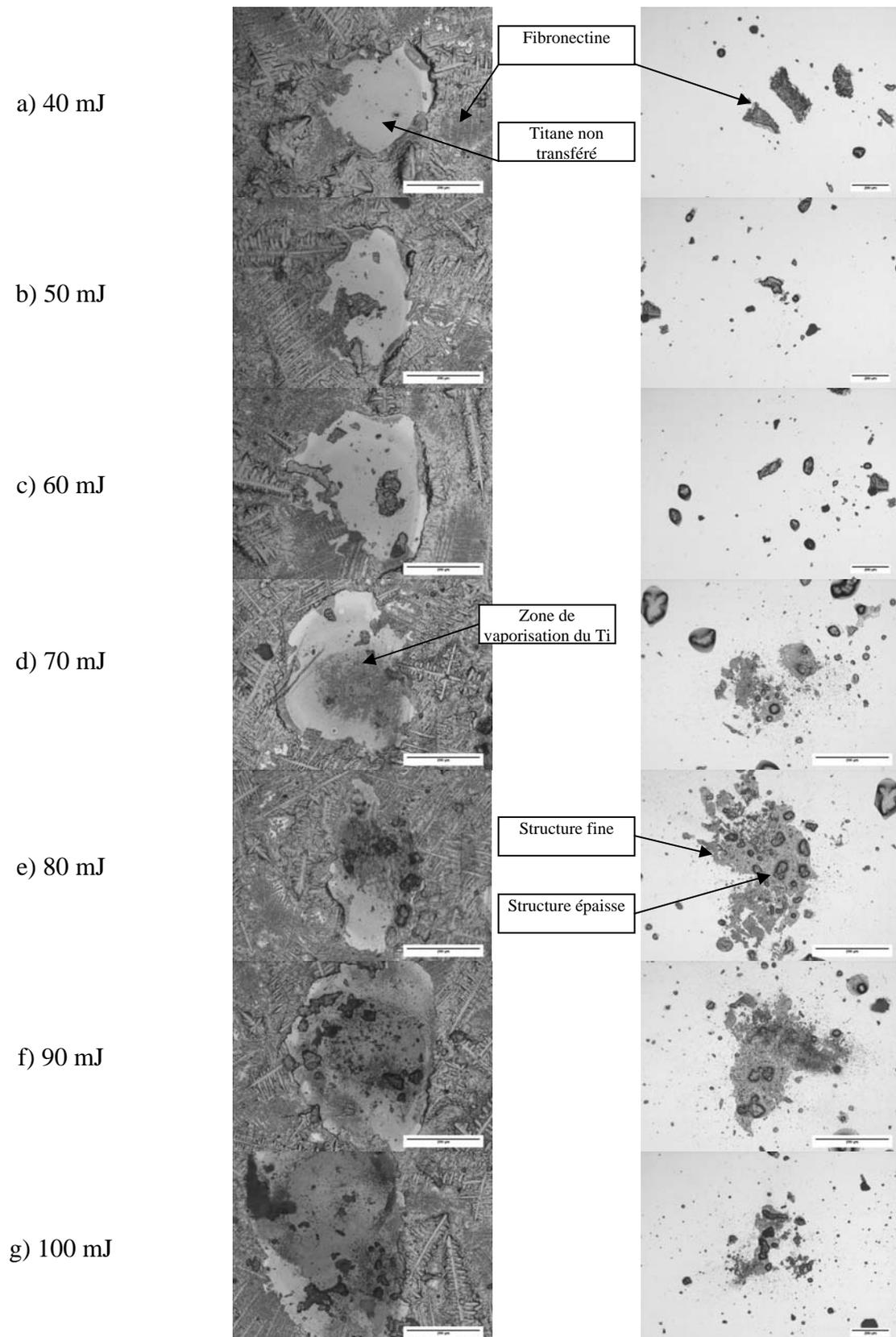


Figure 3.6.2. Images en microscopie optique de la couche « donneur » et des substrats

Les images obtenues en microscopie optique en réflexion de la couche « donneur » et des portions transférées sont présentées dans la Figure 3.6.2.

Nous pouvons observer que pour les faibles énergies laser, la couche intermédiaire en titane est restée intacte. L'aspect des portions de protéine transférées rassemble à l'aspect général de la couche de fibronectine initiale. Pourtant, la forme de la portion transférée ne correspond pas à l'empreinte du faisceau laser observable sur le substrat « donneur ». Dans ce cas, le transfert étant fait par l'onde de choc propagée à l'intérieur de la couche intermédiaire de titane, la morphologie de surface du substrat « donneur » présentant les dendrites de sel caractéristiques a eu un rôle très important, empêchant le transfert de toute la portion correspondante à la surface irradiée. Ce comportement est caractéristique aussi pour les deux autres valeurs d'énergie utilisées : 50 et 60 mJ.

A partir de l'énergie de 70 mJ, la couche intermédiaire commence à présenter des zones de fusion locale au centre du spot laser. La portion de fibronectine transférée est caractérisée par la co-existence de deux types de formations: (i) un type sous forme de morceaux entiers partis du substrat « donneur » et (ii) un type sous forme de matière fine.

Entre 80 et 100 mJ, le régime thermique impliqué pendant le transfert est de plus en plus évident. La zone détruite de la couche intermédiaire devient prépondérante pour le régime d'énergie maximale étudié de 100 mJ. Aussi, il peut être observé que les dimensions des portions transférées augmentent et leur structuration sous forme de couche fine est majoritaire. Dans ces cas, une composition mixte titane/fibronectine est obtenue, en effet la morphologie fine provenant certainement du titane ablaté.

Une analyse des épaisseurs de la matière transférée nous a permis de mettre en évidence les différents régimes de transfert : (i) le transfert réalisé par l'onde de choc, qui provoque l'expulsion de morceaux entières de fibronectine de la couche « donneur » qui se retrouvent au niveau de substrat « accepteur » et qui ont des hauteurs égales à l'épaisseur de la couche initiale ; et (ii) le transfert réalisé par l'ablation de la couche de titane, qui sera toujours accompagné par le régime en onde de choc, et qui provoque la formation d'une structure fine, ayant une épaisseur d'environ 1 μm (Figure 3.6.2 e).

Les profils des diverses portions transférées, par rapport aux images en microscopie optique sont données dans la Figure 3.6.3 (a-e).

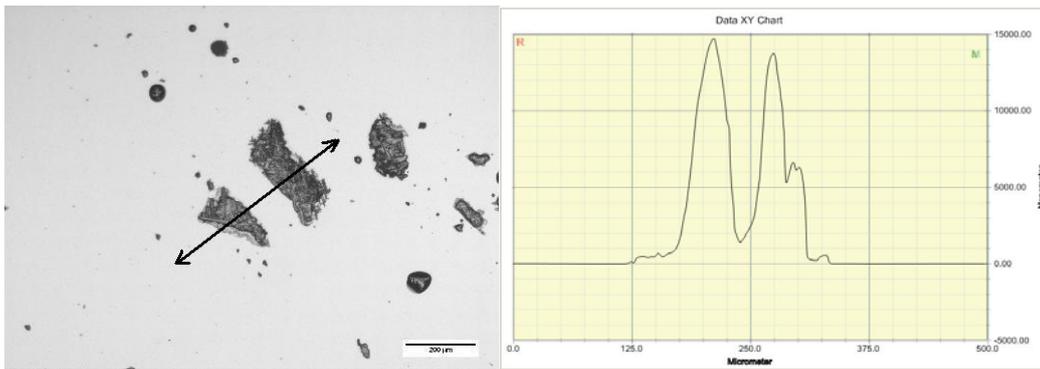


Figure 3.6.3. a) Profil correspondant à la direction présentée dans l'image pour le transfert à 40 mJ

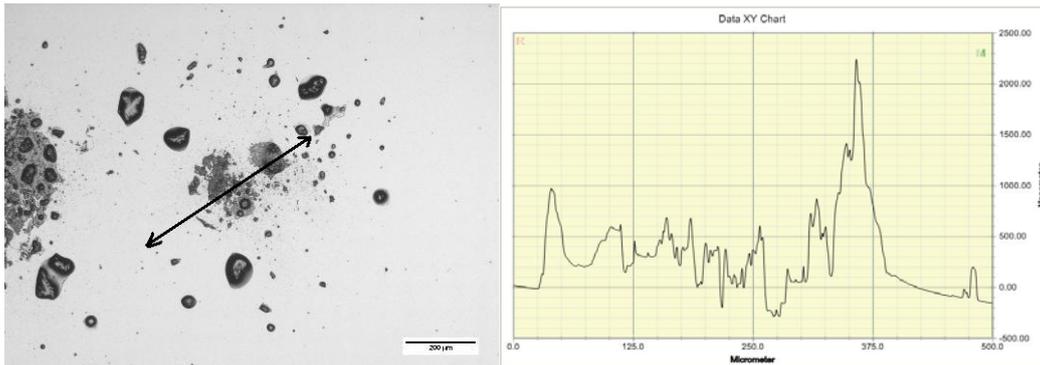


Figure 3.6.3. b) Profil correspondant à la direction présentée dans l'image pour le transfert à 70 mJ

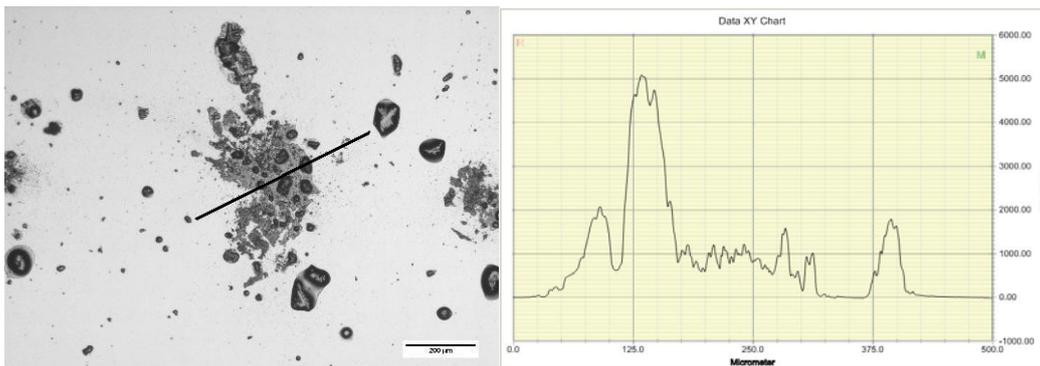


Figure 3.6.3. c) Profil correspondant à la direction présentée dans l'image pour le transfert à 80 mJ

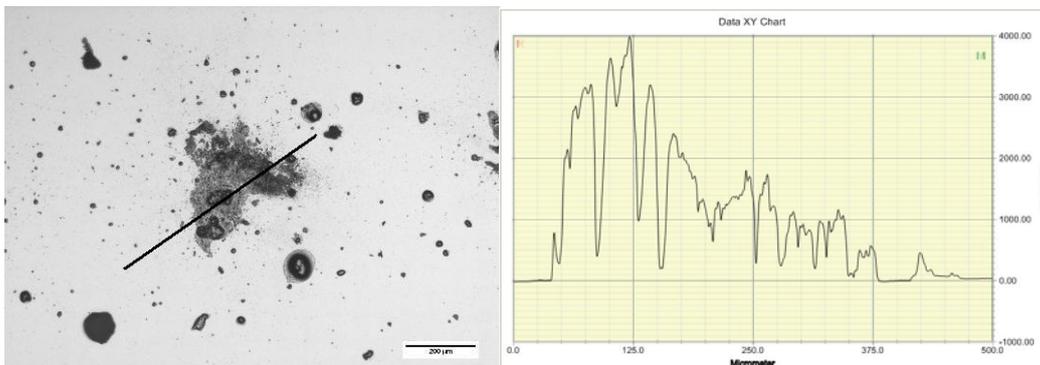


Figure 3.6.3. d) Profil correspondant à la direction présentée dans l'image pour le transfert à 90 mJ

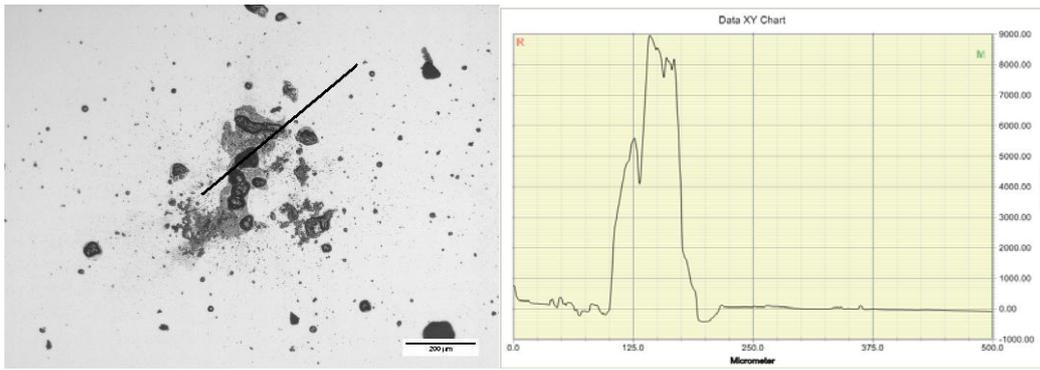
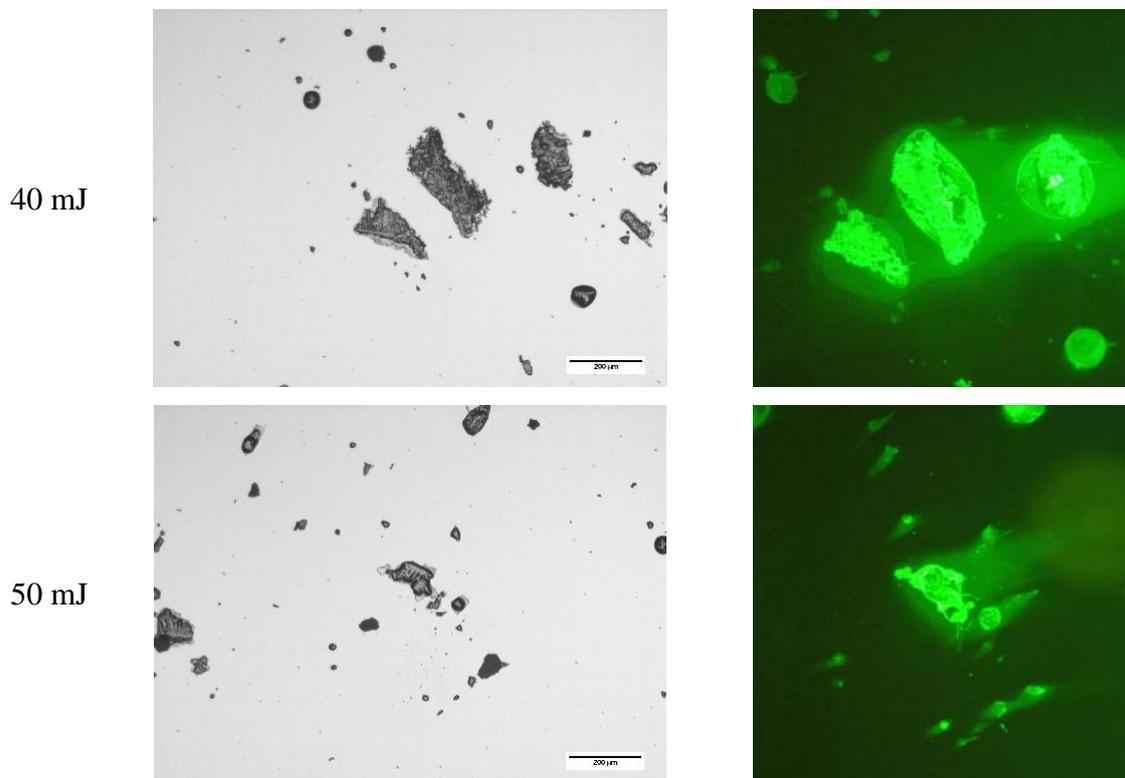


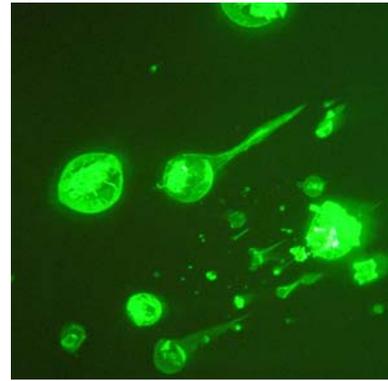
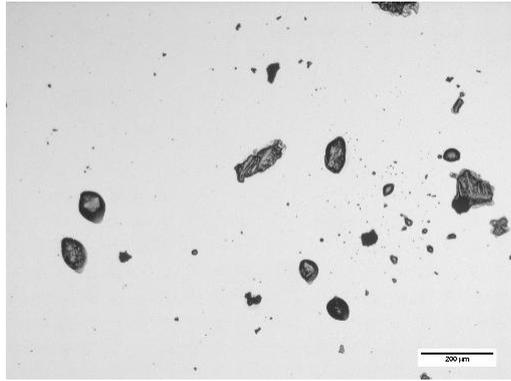
Figure 3.6.3. e) Profile correspondant à la direction présentée dans l'image pour le transfert à 100 mJ

A partir des profils obtenus nous pouvons observer que la matière transférée la plus épaisse a une hauteur maximale de 15 μm , correspondant à l'épaisseur initiale de la couche de fibronectine. Dès que le transfert de la fibronectine intervient suite à l'ablation du titane, la hauteur de la fibronectine transférée se situe à environ 1 μm .

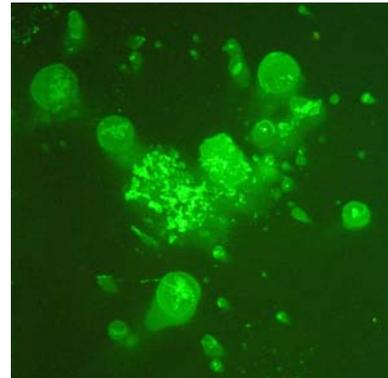
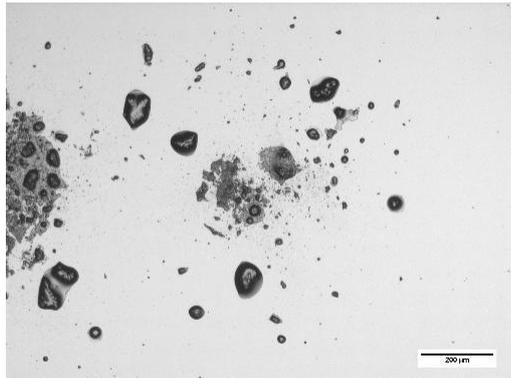
Les images d'immunofluorescence obtenues sur les échantillons obtenus sont présentées dans la Figure 3.6.4 ci-dessous.



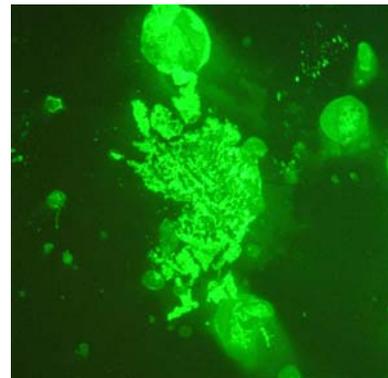
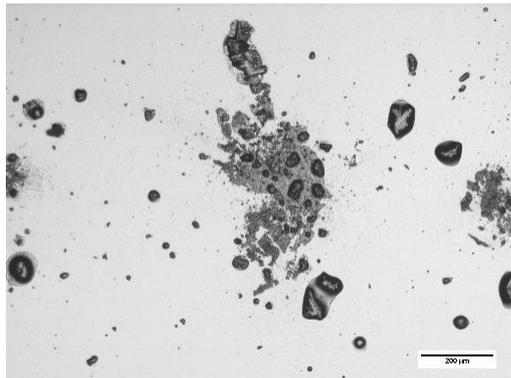
60 mJ



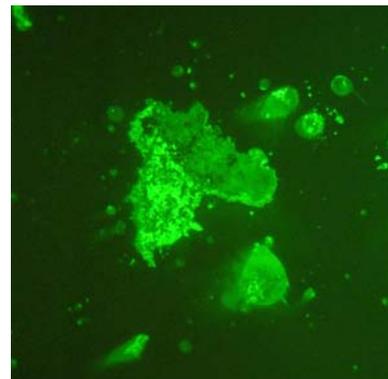
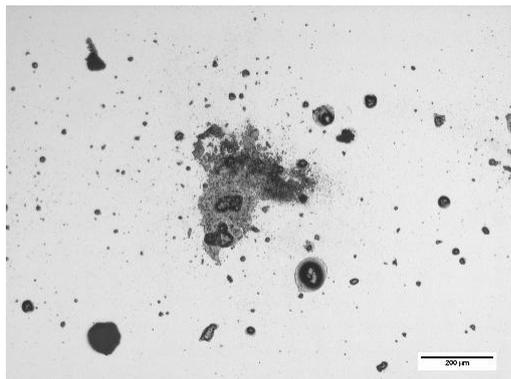
70 mJ



80 mJ



90 mJ



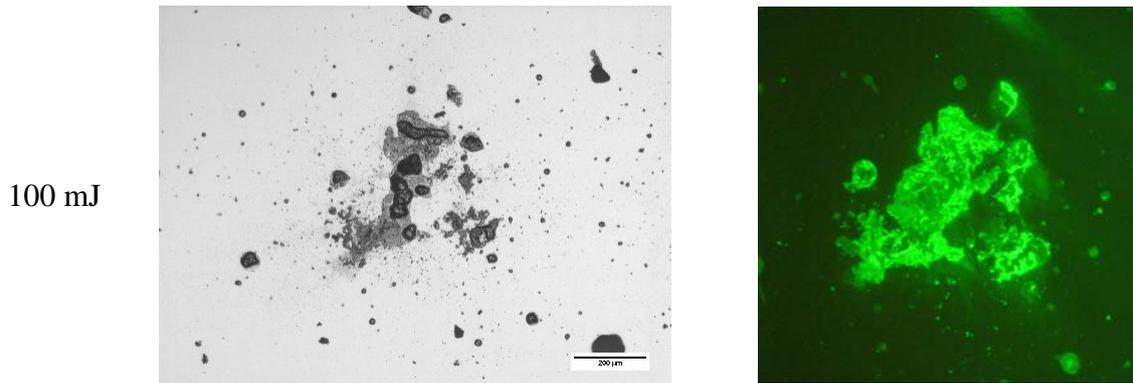


Figure 3.6.4. Images obtenues en microscopie à fluorescence, comparées aux images de microscopie optique

Les auréoles visibles dans certaines images sont des artefacts optiques dues à des bulles d'air engendrées dans le glycérol déposé afin de protéger les surfaces des échantillons.

Nous pouvons observer que dans tous les cas la fibronectine a gardé son affinité pour les anticorps spécifiques utilisés pour les essais d'immunomarquage. Même si pour les valeurs plus grandes de fluence les températures impliquées par le transfert sont attendues d'être plus élevées, selon les résultats obtenus elles n'ont pas atteint une valeur suffisamment grande pour détruire les molécules de fibronectine.

En conclusion, par les expériences entreprises nous avons réussi à transférer des portions de fibronectine à l'aide de la technique de transfert direct en utilisant une source laser ns. Ceci a été possible grâce à la couche intermédiaire en titane interposée entre le substrat en quartz et la couche de fibronectine. En observant le matériau transféré, nous avons pu déterminer l'énergie à laquelle le transfert passe d'un transfert du à l'onde de choc induite par le laser dans la couche intermédiaire de titane à un transfert du à l'ablation de la couche intermédiaire : 70 mJ, qui correspond à une valeur de la fluence de 0,21 J /cm².

Bibliographie

- [1] P. Serra, L Cleries, J.L. Morenza, Appl. Surf. Sci 96-98 (1996) 216-221
- [2] P. Serra, J.M. Fernandez-Pradas, G. Sardin, J.L. Morenza, Appl. Surf. Sci 109/110 (1997) 384-388
- [3] P. Serra, J.L. Morenza, Appl. Surf. Sci 127-129 (1998) 662-667
- [4] P. Serra, J.L. Morenza, Thin Solid Films 335 (1998) 43-48
- [5] Erickson et al, The journal of cell biology, 91 (1981), 673-678
- [6] J. Bohandy, B.F; Kim, F.J. Adrian, Journal of Applied Physics 60 (4) (1986) 1538-1539
- [7] Z. Kantor, T. Szorenyi, Journal of Applied Physics 78 (4) (1996) 2775-2781
- [8] M. Goto et al., Applied Physics A, 79, 157-160 (2004)
- [9] N.T.Kattamis et al., Applied Physics Letters 91, 171120 (2007)
- [10] V. Dinca et al., Biomed Microdevices (2008) 10: 719-725

Conclusions

Cette thèse est constituée de trois grandes parties, dans lesquelles nous avons passé en revue (i) les matériaux utilisés comme implants dans l'ingénierie biomédicale permettant de remplacer les tissus durs endommagés ainsi que des voies possibles d'amélioration des solutions actuellement utilisées ; (ii) les techniques laser applicables pour la réalisation de couches minces de biocéramique ou de protéines de la matrice extracellulaire afin d'augmenter le caractère biocompatible et de donner un caractère bioactif aux nouvelles générations d'implants, et (iii) les résultats des travaux expérimentaux obtenus en appliquant les techniques de transfert laser mentionnées dans la deuxième partie. Dans ce contexte, six études ont été entreprises, chacune apportant de nouvelles perspectives pour de futurs travaux.

Dans notre première étude, grâce aux déterminations entreprises en concordance avec les résultats présentées dans la littérature, nous avons exposé un modèle de croissance des couches de phosphates de calcium par ablation laser en partant d'une cible d'hydroxyapatite pure.

Une deuxième partie a été dédiée à la compréhension de l'influence des paramètres de dépôt laser sur les changements structuraux et compositionnels des couches minces de phosphates de calcium obtenues à partir d'une cible d'hydroxyapatite. L'étude a été réalisée en faisant varier la fluence laser en conservant identiques tous les autres paramètres de dépôt. Ce sous-chapitre, directement corrélé à la première étude expérimentale nous a permis d'affirmer que la fluence est l'un des paramètres clé dans la mise en œuvre des couches biocéramiques de qualité. Pour les faibles valeurs de fluence on observe la formation de phosphates de calcium amorphes, moins biocompatibles, tandis que l'utilisation de régimes de haute fluence détermine la formation de couches stœchiométriques, avec une amélioration de la biocompatibilité. L'obtention de meilleurs résultats est envisageable en augmentant la fluence au-dessus de la valeur de $7,5 \text{ J/cm}^2$ en mettant en œuvre des dispositifs optiques améliorant la focalisation du faisceau,

La troisième partie a été consacrée à mettre en évidence l'importance du traitement de recuit post-dépôt en présence de vapeur d'eau. Celui-ci permet d'obtenir d'une part des couches minces d'hydroxyapatite ayant une stoechiométrie proche de celle de la cible d'HA pure utilisée et favorise d'autre part la présence de groupe hydroxyle en surface de la couche déposée.

Dans la quatrième partie on a pu montrer l'amélioration de l'interface formée entre la couche d'hydroxyapatite et le substrat en titane par l'interposition d'une couche mixte HA/TiO₂ à gradient de propriétés. Les résultats présentés montrent une amélioration de l'adhérence du film déposé, ainsi l'interface ne devrait plus être la source de défaillances mécaniques pendant la durée d'usage de l'implant. Dans cette partie, les avantages de la méthode PLD sont mises en évidence : (i) l'interpénétration à l'interface des deux phases différentes constituant le substrat et la couche grâce aux hautes vitesses d'arrivée des espèces provenant du plasma au niveau de la surface du substrat et (ii) la versatilité de la méthode, elle permettant en effet d'utiliser plusieurs cibles successives sans exposition à l'atmosphère ambiante tout en adaptant, selon les nécessités, les différents paramètres de dépôt tels que la fluence, la pression partielle des gaz nécessaires à l'expérience, la température du substrat etc.

La partie expérimentale s'est achevée par la mise en œuvre de nouvelles techniques laser de transfert de matériaux protéiques (i) sous forme de couches minces en appliquant la technique MAPLE, ou (ii) sous forme de portions micrométriques contrôlables par la technique LDW dans la dernière partie. La validité des deux méthodes de transfert a été démontrée par des essais d'immunomarquage qui ont confirmé la conservation de la fibronectine après le transfert. Pourtant, dans l'avenir la fonctionnalité des structures obtenues reste à mettre en œuvre en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques pour la mise en évidence de la fibronectine et/ou en soumettant les structures obtenues à des essais de croissance cellulaire, qui peuvent démontrer l'amélioration du comportement des surfaces ainsi traitées dans le milieu biologique.

Nous avons montré que toutes les techniques de transfert laser utilisées au cours de la thèse peuvent être utilisées avec succès pour l'obtention de constructions de

couches minces nano structurées biocompatibles. Le PLD offre la possibilité d'obtenir des couches céramiques uniformes, capables d'améliorer le comportement des implants dans le milieu biologique. Le MAPLE peut assurer un transfert plus « doux » de matériaux protéiques sous forme de couches minces uniformes, qui par toute autre méthode impliquant l'existence de phénomènes thermiques seraient détruites. Le contrôle de l'épaisseur des couches obtenues constitue un avantage de cette méthode, ainsi que l'absence de tout contact physique pendant le transfert.

Ces deux dernières méthodes ouvrent de larges champs d'application. Nous avons démontré la possibilité de transférer des portions de fibronectine de dimensions micrométriques dans des motifs géométriques contrôlables par LDW, sans la destruction de la protéine pendant le transfert. Ces « portions » ont comme but principal la facilitation de l'adhésion cellulaire dans divers endroits fonctionnalisés des implants. La technique présentée peut être améliorée par des études sur l'influence de l'épaisseur et/ou de la nature de la couche métallique utilisée comme couche sacrificielle, ou par des études concernant la distance entre le substrat « donneur » et le substrat « récepteur », un paramètre clé dans le processus de transfert.

Les études par MAPLE et LDW peuvent être approfondies en utilisant pour la mise en évidence des protéines transférées des anticorps monoclonaux, qui démontreront le transfert des protéines en gardant intacte leur fonctionnalité.

Les trois techniques présentées sont complémentaires. Elles peuvent être utilisées séparément ou ensemble pour la fabrication de structures bioactives innovantes pour l'obtention d'une nouvelle génération d'implants avec des propriétés de biocompatibilité améliorées. Notamment il serait intéressant d'élaborer des structures composites hybrides multicouches comme le permet la technique PLD (Métal/HA/micropatting) et de tester leurs caractéristiques bioactives.