



**HAL**  
open science

# Mise en oeuvre de méthodes nucléaires et de diffraction pour l'analyse de la structure de l'hydroxyapatite dopée et des transferts d'éléments métalliques à partir de biomatériaux implantés in vivo

Emmanuelle Chassot

► **To cite this version:**

Emmanuelle Chassot. Mise en oeuvre de méthodes nucléaires et de diffraction pour l'analyse de la structure de l'hydroxyapatite dopée et des transferts d'éléments métalliques à partir de biomatériaux implantés in vivo. Physique des Hautes Energies - Expérience [hep-ex]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2001. Français. NNT: . tel-00001081

**HAL Id: tel-00001081**

**<https://theses.hal.science/tel-00001081>**

Submitted on 1 Feb 2002

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

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

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>3</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE : CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE D'HYDROXYAPATITES UTILISÉES EN TANT QUE BIOMATERIAUX.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE I L'HYDROXYAPATITE SYNTHÉTIQUE.....</b>	<b>9</b>
I. Structure cristallographique.....	9
II. Synthèse de l'hydroxyapatite pure.....	10
III. Synthèse de l'hydroxyapatite dopée .....	11
<b>CHAPITRE II ANALYSE MULTIÉLÉMENTAIRE DE L'HYDROXYAPATITE PAR ACTIVATION NEUTRONIQUE .....</b>	<b>13</b>
I. Intérêt et principe de l'analyse par activation neutronique.....	13
II. Détermination de la teneur d'un élément.....	14
III. Protocole expérimental et conditions d'analyse.....	15
IV. Résultats et discussions .....	17
<b>CHAPITRE III SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION ATOMIQUE À SOURCE DE PLASMA À COUPLAGE INDUCTIF (ICP/AES) .....</b>	<b>19</b>
I. Intérêt et principe de la méthode d'analyse .....	19
II. Dispositif et protocole expérimentaux.....	20
<b>CHAPITRE IV CARACTÉRISATION STRUCTURALE .....</b>	<b>23</b>
I. Diffraction des rayons X.....	23
II. La spectrométrie d'absorption infrarouge .....	26
<b>CHAPITRE V SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X : EXAFS .....</b>	<b>31</b>
I. Principe.....	31
II. Réalisation d'une expérience d'absorption X.....	35
III. Méthode d'analyse des spectres expérimentaux .....	38
IV. Analyse des spectres expérimentaux.....	41
V. Résultats et discussions .....	44
<b>CHAPITRE VI CONCLUSIONS .....</b>	<b>53</b>

<b>DEUXIÈME PARTIE : MISE EN ÉVIDENCE DES TRANSFERTS D'ÉLÉMENTS ATOMIQUES ISSUS DES IMPLANTS MÉTALLIQUES .....</b>	<b>55</b>
<b>CHAPITRE VII PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS À ANALYSER.....</b>	<b>59</b>
I. Prélèvement des échantillons.....	59
II. Préparation des échantillons .....	61
<b>CHAPITRE VIII MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (MET).....</b>	<b>63</b>
I. Principe.....	63
II. Préparation des échantillons .....	63
III. Résultats et discussions .....	65
IV. Conclusion.....	68
<b>CHAPITRE IX PRINCIPE ET CONDITIONS D'ANALYSE PAR PIXE (PARTICULE INDUCED X-RAYS EMISSION) .....</b>	<b>71</b>
I. Principe.....	71
II. Analyse semi quantitative.....	75
III. Traitement et analyse des spectres.....	78
IV. Dispositifs expérimentaux-conditions d'irradiation .....	83
<b>CHAPITRE X ANALYSE DES RESULTATS PIXE ET DISCUSSION .....</b>	<b>89</b>
I. Description des échantillons, but et conditions d'analyse .....	89
II. Méthode de traitement des données.....	94
III. Analyse des résultats des échantillons en coupes épaisses .....	101
IV. Analyse des résultats des échantillons en coupes minces.....	134
V. Discussions .....	144
<b>CHAPITRE XI CONCLUSIONS .....</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXE I : CARACTERISTIQUE DU ZINC.....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXE II ANALYSES D'IMPLANTS MÉTALLIQUES PAR SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION À ÉTINCELLES.....</b>	<b>155</b>
<b>ANNEXE III : GRILLE DES STANDARDS .....</b>	<b>157</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>161</b>

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Physique et médecine sont complémentaires en chirurgie orthopédique. Les mesures cliniques d'utilisation de dispositifs ostéoinducteurs, ostéoconducteurs ou d'apposition à l'os ont en commun des phénomènes physiques de transfert ionique importants. La physique possède des méthodes d'analyse du tissu et donne sa composition en éléments atomiques à l'état majeur ou de trace. Elle apporte des réponses complémentaires à des phénomènes connus. La résorption des biomatériaux, tels que le corail, les hydroxyapatites et les bioverres ainsi que le transfert d'éléments métalliques provenant des prothèses ont été analysés. Nous approfondissons cette étude par des techniques nucléaires qui vont nous permettre de mesurer de très faibles concentrations en éléments.

Parmi les expériences menées dans notre équipe de Physique Appliquée aux Biomatériaux au Laboratoire de Physique Corpusculaire de Clermont-Ferrand, l'étude et l'amélioration de la cinétique de résorption de l'hydroxyapatite par un dopage en éléments métalliques ont été réalisées, notamment avec le zinc et le manganèse [1].

Les propriétés biologiques des céramiques phosphocalciques, particulièrement leur aptitude à la fixation des implants, ont fait l'objet de nombreuses études qui ont confirmé les qualités des revêtements phosphocalciques à offrir une adhésion stable avec l'os adjacent, y compris dans des conditions non idéales de stabilité mécanique [2]. L'hydroxyapatite (HAP) est un matériau qui présente plusieurs avantages comme sa structure cristalline proche de celle de l'os humain et nous connaissons ses caractéristiques de biocompatibilité, ainsi que sa fiabilité dans l'établissement d'une ostéo-intégration *in vivo*. Elle est tolérée aussi bien en tant que matériau de comblement que pour le revêtement des prothèses métalliques. L'ensemble des travaux effectués a permis de mettre en évidence que l'hydroxyapatite est une substance, qui lors de son utilisation en tant qu'implant, n'entraîne pas de réponses cellulaires inflammatoires, ni de réactions pathologiques. Cependant, il a été remarqué, au cours d'une étude menée sur 8 ans après implantation, que l'hydroxyapatite avait une résorption modérée [2].

Dans notre équipe, des HAP pures et dopées utilisées comme biomatériaux de comblement, poreux à 50% et implantées dans des corticales de fémur d'ovins ont été étudiées. Suite à différentes implantations, on a montré que l'HAP dopée au zinc se résorbe beaucoup plus vite que l'HAP pure ou que l'HAP dopée au manganèse. Les causes de cette amélioration sont d'origine biologique et physico-chimique. Pour notre part, nous nous sommes intéressés à ce dernier facteur et la première partie de ce mémoire y est consacrée. Par des méthodes physico-chimiques, nous avons essayé de déterminer les positions occupées par le zinc dans la maille cristalline de l'hydroxyapatite.

Dans la première partie, nous présenterons l'hydroxyapatite synthétique ainsi que ses caractéristiques chimiques et structurales. Les analyses par activation neutronique et par spectrométrie d'émission à source de plasma (ICP/AES), nous permettront de mesurer les concentrations des différents éléments présents, aussi bien majeurs que traces, et d'évaluer la pureté de nos échantillons. Par la suite, des analyses par diffraction de rayons X et spectrométrie infrarouge nous donneront les informations nécessaires sur l'état cristallographique et les différentes phases présentes. Ces études seront affinées avec une analyse plus précise : l'EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine structure). Celle-ci nous permettra de déterminer les positions que peuvent occuper les atomes de zinc dans la structure de l'apatite.

L'hydroxyapatite est utilisée aussi en tant que matériau de revêtement des prothèses métalliques pour améliorer leur fonction et les protéger contre la corrosion. Ainsi, dans la seconde partie de ce mémoire, nous nous intéressons aux relargages des éléments libérés par des implants métalliques dans l'organisme. La prothèse totale de hanche, recouverte de biomatériau ou non, compte aujourd'hui plus de trente ans d'existence. De nombreux progrès furent réalisés quant à la connaissance des relations entre biomatériaux, biomécanique et biologie. Le développement de la chirurgie orthopédique a amené à standardiser des alliages considérés comme biocompatibles, résistant à la corrosion et possédant des qualités mécaniques acceptables. Cependant, tout implant métallique mis en place dans un corps humain est le siège d'une corrosion ou d'échange avec le tissu vivant pouvant entraîner à terme un descellement de prothèse. Les matériaux de fixation utilisés ne permettent pas d'arrêter la migration des éléments

métalliques vers les tissus, ce qui a pour conséquence une contamination des tissus adjacents. Nous pouvons citer par exemple comme « éléments contaminants » le titane, le chrome, le cobalt, le nickel ...et bien d'autres.

Au préalable, nous avons analysé par spectrométrie à étincelles les prothèses qui ont été fournies par le service d'anatomie de la faculté de médecine de Clermont-Ferrand avec qui nous travaillons en collaboration (Professeur G. Vanneuville). Nous pouvons disposer d'implants en alliage de titane, cobalt-chrome mais également en inox. Elles se présentent sous différentes formes : des prothèses vissées, mais aussi recouvertes d'alumine, de céramique ou cimentées avec de la zircone. Les tissus prélevés autour de ces implants sont étudiés par la méthode d'analyse PIXE (Particle Induced X-ray Emission) pour localiser et évaluer qualitativement et quantitativement la contamination. Des analyses complémentaires, comme la microscopie électronique à transmission (TEM), nous ont montré la forme sous laquelle ces éléments ont été relargués. Nous avons travaillé sur deux types d'échantillons.

Le premier type de prélèvement est réalisé sur des pièces au Laboratoire d'Anatomie de Clermont-Ferrand. Ces expériences nous permettent d'effectuer des prélèvements autour du fémur et d'étudier les zones concernées par la migration en éléments métalliques et de quantifier cette contamination en fonction de la distance par rapport à l'implant.

Le deuxième type de prélèvement a été réalisé sur des tissus per-opératoires dans le service d'orthopédie du CHRU de Clermont-Ferrand (Professeur S. Terver). Des analyses ont été effectuées sur couches épaisses (~1cm) au CERI d'Orléans et d'autres, sur couches minces au CENBG de Bordeaux. Dans ce dernier cas, les échantillons sont préparés à l'aide d'un cryomicrotome, afin d'obtenir des coupes minces inférieures à 5  $\mu\text{m}$ . Dans ce cas, nous suivons l'évolution de la migration des éléments métalliques relargués par l'implant selon l'axe perpendiculaire au fémur.

La méthode de préparation des échantillons pour les expériences par PIXE et par TEM sera décrite. Un grand nombre de mesures a dû être traité. Pour ce faire, nous avons adapté une méthode d'analyse et de traitement de données pouvant par la suite conduire à une généralisation de l'étude. En dernier, nous interpréterons ces données afin de mettre en évidence les différents phénomènes qui ont lieu à proximité des implants métalliques.

## **PREMIERE PARTIE**

# **CARACTÉRISATION D'HYDROXYAPATITES UTILISÉES COMME BIOMATÉRIAUX**



## INTRODUCTION

Les biomatériaux de comblement et de remplacement osseux suscitent un intérêt croissant de par leur utilisation fréquente en chirurgie orthopédique et en chirurgie réparatrice. Ils représentent une alternative aux autogreffes (prélèvements de tissu sur l'individu), aux allogreffes (prélèvements de tissu sur un individu de la même espèce vivant ou mort) et aux xélogreffes (prélèvements de tissu sur une espèce différente). Lors d'une perte de substance osseuse, on utilise des matériaux de substitution du tissu osseux destinés à faciliter la réossification d'un défaut ne pouvant se cicatriser sans apport extérieur. On peut définir les biomatériaux comme étant des « substances naturelles ou synthétiques, capables d'être tolérées de façon transitoire ou permanente par le corps humain ». Ils doivent présenter une biocompatibilité et des caractéristiques mécaniques susceptibles de répondre aux mieux à toutes les sollicitations du tissu osseux. Les risques de transmission de virus par les techniques de greffes ont entraîné le développement d'un nombre croissant de biomatériaux.

Pour le choix d'un biomatériau, les facteurs les plus importants sont la biocompatibilité et ses propriétés biomécaniques. Les travaux de recherche s'orientent de plus en plus vers l'étude des relations entre le remodelage osseux et les contraintes mécaniques.

Notre équipe étudie les liaisons entre un implant et le tissu osseux receveur. L'intérêt s'est d'abord porté sur un biomatériau naturel, le corail. L'étude de ses transformations physico-chimiques a été réalisée par activation neutronique, par l'utilisation de traceurs radioactifs et par d'autres techniques d'analyses complémentaires telles que la diffraction de rayons X [3, 4]. Ces études ont montré que le corail, en contact avec de l'os, se résorbe progressivement tout en étant remplacé par de l'os néoformé. Des analyses préliminaires avaient permis de démontrer que les caractéristiques mécaniques de ce matériau étaient comparables à celles de l'os.

L'hydroxyapatite (HAP), utilisée comme matériau de comblement et de revêtement [5], a permis de mettre au point de nouvelles possibilités pour le revêtement des implants.

En 1771, quand Scheele nota que le phosphate de calcium était présent dans les os, la plupart des chimistes ont pensé connaître la structure minérale des os et des dents. Cependant, au XIX<sup>ème</sup> siècle, des études de diffraction de rayons X ont montré que le constituant majoritaire des tissus minéralisés était sous forme d'hydroxyapatite.

Le nom d'apatite, signifiant « trompeur », a été donné il y a environ un siècle à un groupe de minéraux qui étaient souvent confondus avec d'autres minéraux tels que l'aigue-marine, l'améthyste et l'olivine. De tous les composés minéraux phosphatés, l'apatite est la plus importante. Cette apatite et ses composés dérivés sont très importants dans plusieurs domaines, notamment en biologie où elle représente l'un des constituants majeurs de la partie minérale [6].

Des travaux relatifs à la biorésorption ont montré des résultats différents suivant la nature du produit utilisé et ont mis en évidence l'influence de la composition chimique, de la nature de l'hydroxyapatite, de la structure minérale et de l'environnement après implantation [1]. Nous citerons les phosphates tricalciques (TCP) qui se dissolvent beaucoup plus vite que l'hydroxyapatite.

Des études de cinétique d'ossification et de cristallographie ont été réalisées dans notre équipe sur le corail, l'hydroxyapatite pure (HAP) et d'autres matériaux composites tel qu'un mélange (HTCP) composé à 75 % d'hydroxyapatite (pour le maintien de l'intégrité du substitut) et à 25 % de phosphate tricalcique (pour son rôle dans la prolifération des cellules, la revascularisation et l'ostéogenèse). Les résultats obtenus par PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*) et par activation neutronique ont montré que le corail se résorbe plus vite que l'hydroxyapatite pure. Afin d'accélérer cette cinétique de résorption pour l'hydroxyapatite de comblement, des dopages avec des éléments métalliques comme le zinc et le manganèse ont été effectués [1]. Ces éléments ont été choisis en fonction de leur capacité, au niveau biologique, à favoriser la résorption et l'ossification [7, 8]. Des expériences similaires à celles faites avec le corail ont été réalisées et ont mis en évidence que 48 semaines après implantation les pourcentages d'HAP pure et d'HAP Mn restant sont de l'ordre de 20 %, alors que pour le mélange HTCP, il est de

7 %. Par contre, l'HAP Zn est presque entièrement résorbée (il ne reste que 1% d'HAP). Il apparaît donc que le zinc joue un rôle prépondérant lors des phénomènes de résorption des céramiques d'hydroxyapatite. La première hypothèse qui a été émise est que le zinc sert de leurre pour les cellules macrophages et qu'il améliore la qualité et la quantité des ostéoblastes [a]. La seconde hypothèse est que cet élément rend la structure de l'hydroxyapatite beaucoup plus soluble en milieu biologique.

Dans ce travail, nous avons pour but de clarifier le rôle du zinc dans la structure apatite. Dans le premier chapitre, nous présenterons les différentes hydroxyapatites que nous avons analysées et décrivons leurs méthodes de préparation. Dans les chapitres II et III, des analyses par activation neutronique et par ICP/AES (*Induced Coupled Plasma, Atomic Emission Spectrometry*) nous permettront de faire des mesures globales des éléments minéraux majeurs et traces ainsi que de déterminer la nature et la pureté de ces hydroxyapatites.

Dans le chapitre IV, nous décrivons les expériences que nous avons effectuées pour déterminer la structure cristallographique de ces différents biomatériaux. Tout d'abord, l'analyse par diffraction de rayons X permettra de déterminer si nous sommes en présence d'une structure apatite telle qu'elle est décrite dans les fiches ASTM (*American Society for Testing Materials*), et nous montrera si nous n'avons pas la présence d'autres composés. Ensuite, une analyse par spectrométrie d'absorption infrarouge confirmera la nature des liaisons entre les différents groupements présents que nous n'aurons pas pu mettre en évidence au préalable par les autres méthodes.

Afin de clarifier le rôle du zinc dans l'apatite, il est nécessaire de déterminer les différentes positions qu'il peut occuper. La localisation du zinc dans la structure de l'hydroxyapatite devrait permettre d'interpréter l'amélioration de la cinétique d'ossification. Etant donnée la faible concentration en zinc introduite (800 µg/g) pour ne pas atteindre le seuil de toxicité dans l'organisme, la sensibilité de ces méthodes n'est pas suffisante pour nous permettre d'observer des modifications de structure. Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode plus sensible à une faible teneur en zinc. Nous avons opté pour la méthode d'analyse EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) que nous décrivons dans le chapitre V avant de conclure cette première partie.

---

a) Ostéoblastes : Cellules qui édifient la matrice protéique et assurent la nucléation du cristal osseux.

# CHAPITRE I

## L'HYDROXYAPATITE SYNTHETIQUE

Les implants d'hydroxyapatite utilisés pour cette étude sont fabriqués par l'entreprise de Toulouse, BIOLAND avec laquelle notre équipe a travaillé en collaboration [9]. Leurs propriétés mécaniques sont fonction de la composition et de la porosité. Cette dernière varie de 5% à 80% interconnectée ou non [10].

L'hydroxyapatite a pour formule chimique  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , elle appartient à la famille des apatites ainsi que celle des phosphates de calcium [6].

### I. STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE

En 1930, Nàray – Szabo [11] et Mehmel [12] déterminèrent le groupe de symétrie de la fluoroapatite comme étant un système hexagonal (figure 1) de groupe d'espace  $\text{P6}_3/\text{m}$ . Cependant, vu l'importance de la structure dans beaucoup de domaines, d'autres études de structure ont été effectuées et ont mis en évidence la structure de l'hydroxyapatite synthétique. Les paramètres de maille des cristaux d'hydroxyapatite sont  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$  et  $c = 6,881 \text{ \AA}$ . La formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  représente la maille élémentaire de l'hydroxyapatite synthétique [13]. Les analyses par diffraction de rayons X et par diffraction de neutrons ont également déterminé les coordonnées des atomes dans la maille [14].

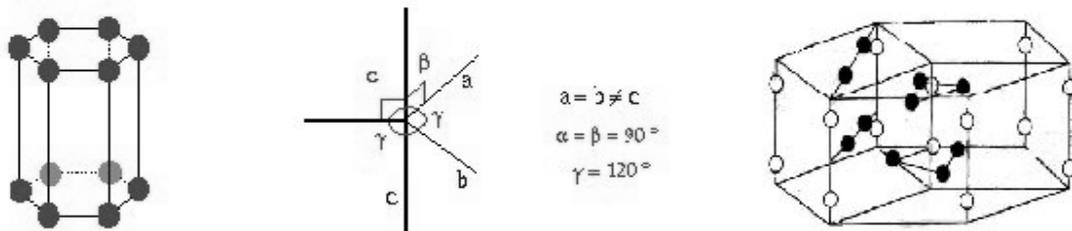


Figure 1 : Caractéristique du système hexagonal avec les nœuds de réseau à gauche et schéma de l'hydroxyapatite à droite avec en noir les calcium en site I et en blanc les calcium en site II.

L'apatite est essentiellement constituée d'un squelette formé d'ions phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) disposés en deux couches par maille dans lesquelles ils constituent des arrangements hexagonaux [15] (figure 2).

La disposition de ces couches de tétraèdres  $\text{PO}_4^{3-}$  est telle qu'il existe, perpendiculairement à elles, deux jeux de tunnels :

le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par les ions calcium notés Ca(I). Ils sont coordonnés par neuf atomes d'oxygène appartenant aux groupements  $\text{PO}_4^{3-}$ .

le deuxième jeu, dont les axes coïncident avec les axes sénaires hélicoïdaux du réseau, sont bordés par des atomes d'oxygène et les autres ions calcium Ca(II). Les axes sont occupés par les ions hydroxydes. Les ions calcium sont coordonnés par six atomes d'oxygène, des tétraèdres  $\text{PO}_4^{3-}$  et par un ion hydroxyde, soit une coordinance globale de 7. Le diamètre de ces tunnels (3 Å) est supérieur au diamètre du premier jeu. Ils confèrent au réseau des apatites des propriétés d'échangeurs d'ions, ou même de réseau hôte de composés d'insertion, les tunnels étant occupés par des molécules.

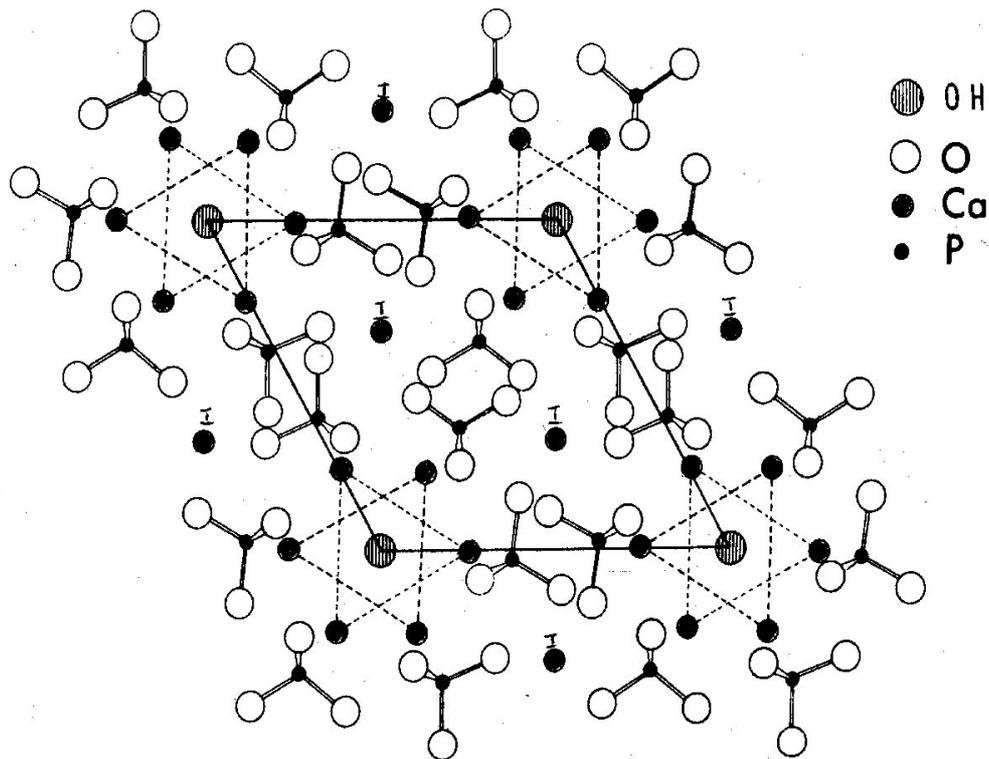


Figure 2 : Représentation schématique de la structure de l'hydroxyapatite pure

Position des dix atomes de calcium :

Quatre atomes occupent la position Ca(I) dont deux sont à la position  $z=0$  et les autres à  $z=0,5$ . Ils forment ainsi les colonnes parallèles à  $c$ , respectivement en  $x=1/3, y=2/3$  et  $x=2/3, y=1/3$ .

Les six autres atomes occupent la position Ca(II) avec trois d'entre eux formant un triangle à  $z=1/4$  et les autres en  $z=3/4$ .

Positions des hydroxydes :

Ils sont disposés selon une colonne sur l'axe parallèle à  $c$  en  $x=0, y=0$  et  $z=1/4$  et  $z=3/4$ .

Positions des ions phosphates :

Ils se trouvent sur un tétraèdre du niveau  $z=1/4$  au niveau  $z=3/4$ . C'est ce motif qui donne sa stabilité à l'apatite.

La grande réactivité chimique des apatites découle de la présence de canaux colinéaires à l'axe  $c$ . En effet, il est possible d'envisager le remplacement partiel ou total de l'anion situé dans le tunnel par d'autres anions tels que le chlore, le fluor... afin d'aboutir par exemple à des chloro- ou fluoroapatites.

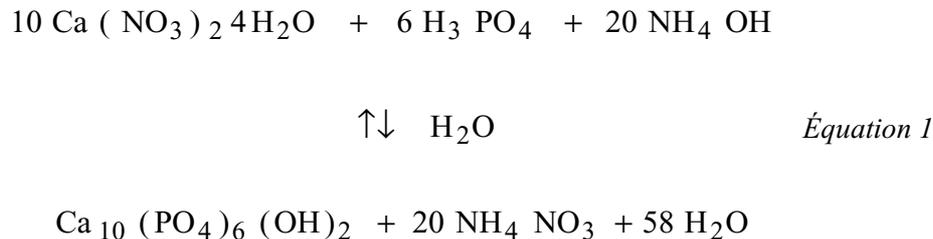
## II. SYNTHÈSE DE L'HYDROXYAPATITE PURE

Les matières premières utilisées pour la fabrication de la poudre d'hydroxyapatite font appel à quatre composés de base présentés dans le tableau 1.

SUBSTANCES	FORMULES	SPECIFICATIONS
Nitrate de calcium	$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2, 2 \text{H}_2\text{O}$	Métaux lourds < 50 µg/g As < 3 µg/g Cd < 5 µg/g Hg < 5 µg/g Pb < 30 µg/g
Acide phosphorique	$\text{H}_3\text{PO}_4$	Métaux lourds < 50 µg/g As < 3 µg/g Cd < 5 µg/g Hg < 5 µg/g Pb < 30 µg/g
Hydroxyde d'ammonium	$\text{NH}_4\text{OH}$	Métaux lourds < 50 µg/g As < 3 µg/g Cd < 5 µg/g Hg < 5 µg/g Pb < 30 µg/g
Eau distillée	$\text{H}_2\text{O}$	Métaux lourds < 50 µg/g As < 3 µg/g Cd < 5 µg/g Hg < 5 µg/g Pb < 30 µg/g

Tableau 1: Composés de base de la poudre d'hydroxyapatite

La réaction chimique de la synthèse de l'hydroxyapatite est décrite par l'équation suivante :



Le procédé de synthèse utilisé conserve les propriétés caractéristiques de cette substance, c'est-à-dire une structure cristallographique et une composition du même type. L'hydroxyapatite résulte de la double décomposition en milieu alcalin d'un sel d'acide orthophosphorique et d'un sel de calcium.

### III. SYNTHÈSE DE L'HYDROXYAPATITE DOPEE

L'entreprise BIOLAND a réussi à doper des hydroxyapatites avec du Mn et du Zn [9]. Le dopage s'effectue par l'introduction d'ions métalliques sous forme de sels de nitrate lors de la préparation de la barbotine [b]. Ils ont été choisis comme dopants car ils possèdent des propriétés biologiques susceptibles d'accélérer la résorption et l'ossification des implants.

#### A. Dopage au manganèse

Des études de l'influence du manganèse sur la croissance osseuse montrent que le manganèse entraîne une réduction de la résorption osseuse [16]. Nous avons observé qu'à différents délais après implantation, l'hydroxyapatite dopée au manganèse n'intervient pas sur la vitesse de diffusion des

b ) Barbotine : Pâte délayée que l'on verse sur un moule en plâtre dans les techniques de façonnage des céramique.

éléments minéraux [1]. D'autre part, des études de Diffraction de Rayons X (*DRX*), de spectrométrie d'absorption Infrarouge (*IR*) et de Résonance Magnétique Nucléaire (*RMN*) ont démontré que le manganèse se substitue au calcium, ce qui entraîne une diminution des paramètres de maille variant avec la quantité de manganèse introduite [17]. Ceci diminuerait l'ostéointégration de l'hydroxyapatite dopée au manganèse et entraîner une moins bonne résorption osseuse.

### ***B. Dopage au zinc***

Dans notre équipe, on avait déterminé la cinétique de résorption de l'hydroxyapatite dopée au zinc implantée dans un fémur d'ovin. On a établi une accélération de la cinétique de transfert des éléments Ca, P et Zn [1]. Ce phénomène est attribué au rôle du zinc aussi bien au point de vue biologique que physico-chimique (cf. Annexe I). En effet, nous savons que le zinc intervient dans plusieurs enzymes et au niveau de l'inhibition de l'activité de la phosphatase acide suivant la teneur introduite. Son métabolisme dans l'organisme joue un grand rôle au niveau de la matrice osseuse. D'un autre côté, cet élément métallique aurait tendance à rendre la maille de l'HAP plus soluble en milieu biologique, ce qui n'est pas le cas pour l'HAP dopée en Mn. L'insertion de cet élément dans l'HAP induit au préalable une déformation de structure et une diminution des énergies de liaison facilitant sa dissolution. Nous considérons qu'il est intéressant de déterminer les positions occupées par le zinc et le manganèse dans la maille cristalline afin de mieux définir leurs rôles.

Des études sur la structure de l'HAP, Zn ont été effectuées suivant la concentration en zinc [18]. D'une manière générale, entre 0 et 20 % d'atomes de zinc nous avons une structure apatite avec un rapport Ca/P qui varie entre 1,5 et 1,7 (rapport pour une apatite pure est de 1.62), alors qu'au-delà de 70 % nous avons la coexistence d'une phase amorphe et de phosphate de zinc.

Au préalable, nous avons déterminé la composition précise par activation neutronique et par ICP. Des études de diffraction de rayons X et de spectrométrie d'absorption infrarouge permettront de déterminer les différentes phases présentes, la nature et les caractéristiques de l'hydroxyapatite. Par la suite, l'analyse de ces échantillons par EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) nous servira à déterminer les positions occupées par le zinc.

## CHAPITRE II

### ANALYSE MULTIELEMENTAIRE DE L'HYDROXYAPATITE PAR ACTIVATION NEUTRONIQUE

Les principales sources de neutrons en radioactivation sont d'une part les réacteurs nucléaires qui fournissent des neutrons thermiques ( $E < 0,025$  eV) et d'autre part les accélérateurs d'ions utilisés pour produire des neutrons rapides ( $E > 2$  MeV).

L'analyse globale des teneurs en éléments majeurs dans les échantillons a été réalisée par irradiation à l'aide de neutrons rapides au cyclotron du CERI (*Centre d'Etude et de Recherche par Irradiation*) d'Orléans.

#### I. INTERET ET PRINCIPE DE L'ANALYSE PAR ACTIVATION NEUTRONIQUE

L'analyse par activation neutronique permet d'identifier et de déterminer la masse d'un ou plusieurs éléments dans une matrice quelconque. En effet, en mesurant la radioactivité induite par l'irradiation de l'échantillon à l'aide de neutrons, il est possible de calculer la masse d'un élément. L'énergie du rayonnement  $\gamma$  émis est spécifique d'un élément et le nombre d'impulsions  $A$  sous un photopic est proportionnel au nombre de noyaux irradiés dans l'échantillon [19].

L'activation neutronique possède plusieurs avantages par rapport à d'autres méthodes d'analyse :

- F Elle est non destructive et permet de réaliser des irradiations répétitives et de préserver les échantillons pour d'autres expériences.
- F La sensibilité est inférieure au  $\mu\text{g/g}$ , selon les matrices dans le cas des neutrons thermiques, grâce aux irradiations qui peuvent être effectuées avec des flux élevés.
- F De plus, dans un même échantillon, nous pouvons doser plusieurs éléments à la fois en une seule irradiation et dans un temps relativement court.

$$A = \frac{m\theta N \Phi \sigma \varepsilon r (1 - e^{-\lambda t_i}) (1 - e^{-\lambda t_c}) e^{-\lambda t_a}}{M \lambda} \quad \text{Équation 2}$$

avec  $m$  : masse de l'élément recherché dans l'échantillon en g  
 $N$  : nombre d'Avogadro  
 $\phi$  : flux neutronique ( $\text{n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )  
 $\sigma$  : section efficace de la réaction en  $\text{cm}^2$   
 $r$  : facteur d'embranchement en %  
 $\varepsilon$  : efficacité du détecteur  
 $\theta$  : abondance isotopique (%)  
 $M$  : masse molaire de l'élément en g  
 $\lambda$  : constante de désintégration en  $\text{s}^{-1}$   
 $t_c$  : temps de comptage en s  
 $t_i$  : temps d'irradiation en s  
 $t_a$  : temps d'attente en s

**Choix des réactions nucléaires :**

Plusieurs facteurs conditionnent le choix de la réaction nucléaire pour le dosage d'un élément :

- F la section efficace qui doit être suffisamment élevée,
- F la période, qui ne doit être ni trop courte ni trop grande pour réaliser des comptages dans de bonnes conditions.

Les réactions nucléaires choisies pour le dosage de nos éléments sont reportées dans le tableau 2.

Réactions nucléaires	Abondance isotopique (%)	Période [20]	Section efficace ( $10^{-21}$ cm <sup>2</sup> ) [21]	Energie de seuil (MeV)	Energie des $\gamma$ (keV) [20] (rapport d'embranchement)
$^{44}\text{Ca}(n, p)^{44}\text{K}^*$	2,1	22 min	3,5	5,4	1157 (88%)
$^{31}\text{P}(n, \alpha)^{28}\text{Al}^*$	100,0	2,3 min	30	2,0	1778 (100%)

Tableau 2: Caractéristiques des réactions nucléaires choisies avec des neutrons rapides.

## II. DETERMINATION DE LA TENEUR D'UN ELEMENT

### A. Méthodes absolue et comparative d'analyse

Cette méthode permet de déterminer directement la masse de l'élément recherchée à partir de la relation suivante :

$$m = \frac{A \lambda M e^{\lambda t_a}}{N \theta \Phi \sigma \varepsilon r (1 - e^{-\lambda t_c}) (1 - e^{-\lambda t_i})} \quad \text{Équation 3}$$

L'utilisation de cette relation nécessite la connaissance de tous les paramètres mis en jeu comme le flux  $\phi$  et la section efficace  $\sigma$ , qui ne sont généralement pas connus avec précision. De plus, le nombre de photons  $\gamma$  détectés dépend de l'efficacité  $\varepsilon$  de détection. Afin de réduire les risques d'erreur, nous utilisons la méthode comparative qui consiste à irradier simultanément l'échantillon et l'étalon et à compter successivement, pendant le même temps, les activités induites dans l'un et l'autre. Le rapport de l'équation 3 entre la masse de l'élément dans l'échantillon et dans l'étalon donne :

$$\frac{m_{ech}}{m_{et}} = \frac{A_{ech}}{A_{et}} e^{-\lambda (t_{aet} - t_{aech})} \quad \text{Équation 4}$$

- $m_{ech}$  : masse de l'élément à déterminer dans l'échantillon en mg
- $m_{et}$  : masse de l'élément connue dans l'étalon en mg
- $A_{ech}$  : nombre d'impulsions nettes sous le photopic considéré pour l'échantillon
- $A_{et}$  : nombre d'impulsions nettes sous le photopic considéré pour l'étalon
- $t_{aech}$  : temps d'attente pour l'échantillon en s
- $t_{aet}$  : temps d'attente pour l'étalon en s

Cette équation permet d'obtenir la teneur  $\tau$  d'un élément dans un échantillon en mg/g par la relation :

$$\tau = \frac{m_{ech}}{m_{tot}} \quad \text{Équation 5}$$

Avec  $m_{tot}$  : masse totale de l'échantillon

La précision des analyses nécessite de réduire les effets d'absorption et de matrice. Nous devons entre autres respecter la géométrie des étalons et des échantillons. Nous avons également tenu compte des possibles interférences entre les éléments ce qui n'est pas notre cas étant donné que nous avons des produits purs.

### B. Calcul d'erreur

L'erreur relative sur la masse d'un élément contenu dans l'échantillon est :

$$\frac{\Delta m_{\text{ech}}}{m_{\text{ech}}} = \frac{\Delta A_{\text{ech}}}{A_{\text{ech}}} + \frac{\Delta A_{\text{et}}}{A_{\text{et}}} \quad \text{Équation 6}$$

Cette formule est obtenue en négligeant les erreurs sur  $\lambda$ ,  $m_{\text{et}}$ ,  $t_{\text{act}}$ ,  $t_{\text{aech}}$ ,  $t_{\text{cet}}$  et  $t_{\text{cech}}$  par rapport aux erreurs statistiques sur  $A_{\text{ech}}$  et  $A_{\text{et}}$  dues aux fluctuations sur les surfaces des pics.

Soient  $A_{\text{ech}}$  et  $A_{\text{et}}$  respectivement le nombre d'impulsions total et le nombre d'impulsions net sous le photopic et BF le bruit de fond, nous pouvons écrire :

$$A_{\text{ech}} = A_{\text{ech}} + \text{BF} \quad \text{Équation 7}$$

Soit l'erreur  $\tau$  sur la mesure :

$$\tau = \sigma_{A_{\text{ech}}} + \sigma_{A_{\text{et}}} \quad \text{Équation 8}$$

$$\tau_r \text{ (en \%)} = \frac{\Delta m_{\text{ech}}}{m_{\text{ech}}} = \left[ \frac{\sqrt{A_{\text{ech}} + 2\text{BF}}}{A_{\text{ech}}} + \frac{\sqrt{A_{\text{et}} + 2\text{BF}}}{A_{\text{et}}} \right] \cdot 100$$

Équation 9

$$\Delta m_{\text{ech}} = m_{\text{ech}} \left[ \frac{\sqrt{A_{\text{ech}} + 2\text{BF}}}{A_{\text{ech}}} + \frac{\sqrt{A_{\text{et}} + 2\text{BF}}}{A_{\text{et}}} \right]$$

## III. PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET CONDITIONS D'ANALYSE

### A. Préparation des échantillons

Afin de pouvoir déterminer la teneur en éléments majeurs dans les échantillons à analyser, nous appliquons la méthode comparative qui nécessite la connaissance parfaite de la teneur en éléments contenus dans l'étalon. Pour ce faire, nous avons utilisé comme étalon un phosphate de calcium (Merck). Celui-ci se présente sous forme de poudre que nous avons disposée dans un tube en polyéthylène afin qu'il ait une géométrie proche de celle des cylindres d'hydroxyapatite. En effet, les échantillons à analyser se présentent sous forme de cylindres de 10 mm de hauteur et de 6 mm de diamètre. Ces derniers sont également disposés dans des tubes en polyéthylène qui s'activent très peu sous un faisceau de neutrons.

### B. Dispositif expérimental

Le cyclotron du CNRS-CERI d'Orléans est un cyclotron à énergie variable adaptée à la production de neutrons. Une feuille mince de molybdène, placée devant la face avant de la cible, permet le refroidissement de celle-ci par établissement d'un courant d'hélium et évite la pollution éventuelle de la ligne de faisceau par du béryllium provenant de la cible. La face arrière de la cible est refroidie par contact avec une plaque de cuivre traversée par un courant d'eau circulant à l'aide d'un système

d'aillettes en forme d'hélice, ce qui évite le contact de l'eau avec la cible qui causerait son oxydation, et permet ainsi d'atténuer le flux neutronique. On obtient un flux de l'ordre de  $10^9$  n.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (la plaque de cuivre derrière la cible absorbe 8% des neutrons émis). Les neutrons produits par ce dispositif ont une densité homogène sur un disque de rayon R (15 mm), dont le centre coïncide avec le centre de la cible de béryllium [22]. La réaction nucléaire est la suivante :  ${}^9\text{Be} (d, n){}^{10}\text{B}$ . L'énergie moyenne des neutrons produits est de 7 MeV (spectre s'étendant de quelques MeV à environ 20 MeV) [22].

### C. Conditions d'irradiation et d'analyse

Le nombre d'échantillons et d'éléments à doser nous a amené à utiliser un dispositif permettant le dosage de plusieurs éléments en une seule irradiation. L'échantillon et les étalons contenant les éléments à doser sont placés chacun dans des porte-échantillons cylindriques en polyéthylène d'un diamètre de 7 mm. Ces derniers sont placés dans un support (figure 3) introduit sur une tige couplée à un moteur, permettant d'irradier six échantillons en même temps. L'ensemble est en rotation continue autour d'un axe coupant virtuellement le centre de la cible en béryllium, afin d'avoir une irradiation homogène.

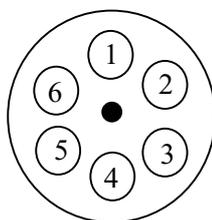


Figure 3 : Profil de la pièce d'irradiation

La durée d'irradiation doit être suffisante pour que toutes les réactions nucléaires choisies produisent une radioactivité suffisante en une seule irradiation. Le meilleur compromis pour l'étude du calcium et du phosphore nous a amené à choisir une durée d'irradiation de 30 minutes pour l'ensemble échantillons et étalons.

### Spectrométrie gamma

Le dispositif expérimental de détection se compose d'un détecteur Ge(Li), d'un préamplificateur de charge à faible bruit de fond et d'un amplificateur qui assure une nouvelle amplification et une mise en forme des impulsions [22]. Ces caractéristiques sont mesurées sur la raie  $\gamma$  à 1332,52 keV du  ${}^{60}\text{Co}^*$ . Les acquisitions sont réalisées à l'aide d'une carte d'analyse et la visualisation des spectres en énergie après calibration linéaire est directe. Un ordinateur avec une carte d'analyse permet à l'aide d'un logiciel Génie 2000 d'obtenir le traitement automatique des spectres.

### Conditions de mesure

Les mesures après irradiation sont faites en tenant compte des périodes des réactions nucléaires dans l'ordre suivant :

- F  ${}^{31}\text{P}(n, \alpha){}^{28}\text{Al}$  : la réaction étant à saturation, on attend l'atténuation du temps mort. L'échantillon est compté pendant 5 min à 5 cm du détecteur.
- F Pour mesurer le phosphore dans l'échantillon, on procède de la même manière que pour l'étalon à 5 cm du détecteur pendant 5 min.
- F L'étalon de phosphate de calcium est compté une deuxième fois pour l'analyse du calcium mais cette fois-ci en contact avec le détecteur et pendant 15 min.
- F L'échantillon est compté de la même manière sur le détecteur pendant 15 min.

#### IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats obtenus pour l'hydroxyapatite synthétique pure et celles dopées au zinc et au manganèse sont présentés dans le tableau 3.

	Ca (mg/g)	P (mg/g)	Ca/P (atomique)
HAP synthétique pure	$390 \pm 17$	$195 \pm 5$	$1,54 \pm 0.08$
HAP dopée au zinc	$342 \pm 16$	$171 \pm 6$	$1,55 \pm 0.10$
HAP dopée au manganèse	$443 \pm 22$	$208 \pm 8$	$1,65 \pm 0.11$

Tableau 3: Teneur en calcium et en phosphore dans les hydroxyapatites

Nous remarquons que les teneurs en éléments majeurs varient d'un échantillon à un autre suivant l'élément dopant. Dans une apatite pure, les teneurs théoriques moyennes en calcium et phosphore sont respectivement de 400 mg/g et 186 mg/g et le rapport atomique Ca/P est de l'ordre de 1.67.

Les valeurs obtenues pour le calcium dans l'hydroxyapatite synthétique pure et dans l'hydroxyapatite dopée au manganèse sont compatibles à  $1\sigma$  près avec la teneur d'une apatite pure. En ce qui concerne l'HAP, Zn nous avons une différence de l'ordre de  $3,6\sigma$ . Pour ce qui est des concentrations en phosphore, les hydroxyapatites dopées montrent une différence de  $3\sigma$  environ avec les concentrations théoriques. Ces mesures semblent montrer que l'hydroxyapatite dopée en zinc a une composition en éléments majeurs différente de celle d'une apatite pure. Ceci peut induire le fait que le zinc remplace un calcium lors de son introduction. Cependant, il faut noter que l'erreur est dominée par des sources d'incertitude systématiques (variation du flux de neutrons, distance cible-échantillons et position par rapport au détecteur).

Ces résultats nous permettent de confirmer que nos apatites sont relativement pures à l'exception de l'HAP, Zn. Pour ce qui est des rapports Ca/P, les valeurs obtenues sont comparables à la valeur théorique de 1,67.

De même, nous avons analysé nos hydroxyapatites par ICP/AES afin de détecter d'une part la présence des éléments dopants (manganèse et zinc) qui sont à l'état de trace, et d'autre part les impuretés qui auraient pu être introduites lors de la fabrication. De plus nous confirmerons les résultats obtenus par activation neutronique et aurons une meilleure précision.



## CHAPITRE III

### SPECTROMETRIE D'EMISSION ATOMIQUE A SOURCE DE PLASMA A COUPLAGE INDUCTIF (ICP/AES)

Cette méthode d'analyse va nous permettre de mesurer, en plus des éléments majeurs (calcium et phosphore), les éléments traces tels que le zinc et le manganèse ou d'autres éléments pouvant provenir de la contamination élémentaire éventuelle. Nous aurons ainsi plus d'informations sur la composition de nos hydroxyapatites synthétiques pure et dopées.

#### I. INTERET ET PRINCIPE DE LA METHODE D'ANALYSE

La spectrométrie d'émission atomique étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre, lorsque son énergie varie au cours du passage d'un de ses électrons d'une orbitale à une autre. La technique d'émission atomique mesure l'énergie perdue par un atome qui passe d'un état excité à un état d'énergie moindre. L'énergie est libérée sous forme de rayonnement lumineux de longueur d'onde  $\lambda$  et plus précisément sous forme d'un photon de fréquence  $\nu$  transportant l'énergie  $h\nu$ . Il s'en suit l'émission d'une onde lumineuse de longueur d'onde, comprise entre l'ultra violet lointain et le proche infra rouge, caractéristique de l'atome émetteur, traduisant sa transition d'un état excité vers un niveau d'énergie plus bas. Pour séparer les différentes longueur d'onde émises, nous utilisons un réseau optique et pour mesurer l'intensité lumineuse, un photomultiplicateur. L'intensité de la raie est une fonction de la concentration de l'élément qui l'a générée. On obtient l'analyse quantitative de l'échantillon par comparaison avec des étalons de concentrations connues.

Pour être excité, l'échantillon est dissocié en atomes dans un plasma. Ce dernier terme désigne un gaz neutre partiellement ionisé. Les températures atteintes par la flamme (4000-15000 K) sont plus élevées que celles des flammes chimiques (3000 K). Le plasma utilisé est un plasma d'argon entretenu au cœur d'une bobine d'induction parcourue par des courants de haute fréquence qui provoquent des températures très élevées (10000 K) du plasma [23]. Les échantillons sont injectés sous forme d'aérosol dans le plasma (figure 4), ils sont dissociés et partiellement ionisés sous l'effet des hautes températures. Lors de l'échauffement thermique, les ions d'argon transfèrent de l'énergie aux atomes des solutions à étudier.

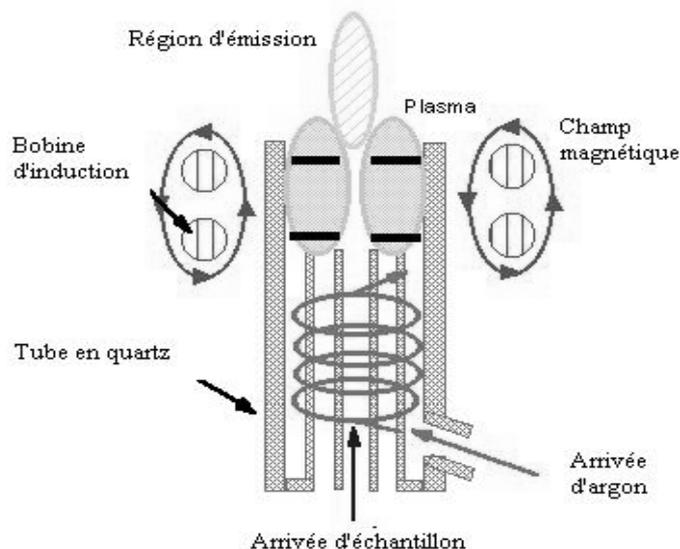


Figure 4 : Principe du spectromètre d'émission atomique à source de plasma

## II. DISPOSITIF ET PROTOCOLE EXPERIMENTAUX

### A. Instrumentation

Nous avons utilisé un spectromètre installé à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand dans le laboratoire de géologie. Il s'agit d'un système JY 70 II (Jobin Yvon) dont le domaine spectral d'analyse se situe entre 180 et 440 nm (UV).

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source : la lampe à cathode creuse, d'un brûleur et d'un nébuliseur, d'un monochromateur et d'un détecteur relié à un amplificateur et à un dispositif d'acquisition.

La lampe à cathode creuse sert à l'ionisation du gaz rare, dans notre cas l'argon. L'échantillon à analyser est en solution, aspirée par le nébuliseur, puis pulvérisée en fines gouttelettes dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Le brouillard homogène ainsi obtenu pénètre alors dans le brûleur puis dans la flamme air/acétylène dont la température est de 2500 °C environ.

### B. Préparation des échantillons

Les échantillons introduits dans le plasma doivent être sous forme de fluides ou de solides finement divisés. Le diamètre des particules ne doit pas excéder la dizaine de microns pour éviter qu'une partie de l'échantillon ne se volatilise.

La mise en solution des échantillons est effectuée par un mélange de 500 mg de métaborate de lithium ( $\text{LiBO}_2$ ) avec 100 mg d'échantillon. Le métaborate de lithium est un réactif d'attaque polyvalent pour la réduction de groupements variés [24]. Le mélange est ensuite chauffé à 1100 °C dans un creuset en graphite dans un four à induction. Une perle de consistance visqueuse est obtenue et reprise dans 200 ml d'acide nitrique 1N afin de réaliser une solution limpide susceptible d'être nébulisée.

Les solutions étalons, dont les concentrations atomiques en éléments sont connues, permettent la détermination de la composition élémentaire des échantillons. Elles ont été réalisées dans les mêmes conditions que les solutions de base. Ces longueurs d'onde sont caractéristiques des atomes émetteurs (tableau 4).

Eléments	Calcium	Phosphate	Zinc	Manganèse
Longueur d'onde caractéristique (nm)	317,933	213,618	206,200	257,610

Tableau 4 : Longueur d'onde caractéristique des éléments analysés.

### C. Résultats et discussion

Les résultats obtenus pour les échantillons d'hydroxyapatite pure, dopées au zinc et au manganèse, sont présentés dans le tableau 5.

Les analyses par ICP/AES montrent que les teneurs en calcium et en phosphore sont similaires à celles que l'on trouve dans une apatite pure. De plus les rapports atomiques Ca/P confirment ce résultat. Nous pouvons conclure que nous sommes en présence d'une phase de même composition que l'apatite. Pour ce qui est des concentrations en zinc et en manganèse, elles sont similaires à celles données par Bioland.

Concentration en (mg/g)	Hydroxyapatite pure	Hydroxyapatite dopée avec du zinc	Hydroxyapatite dopée avec du manganèse
Calcium	417 ± 21	406 ± 20	415 ± 21
Phosphore	190 ± 10	182 ± 9	187 ± 9
Zinc	0,018 ± 0,001	3,84 ± 0,02	0,025 ± 0,002
Manganèse	0	0	2,0 ± 0,2
Ca/P (rapport atomique)	1,69 ± 0,12	1,72 ± 0,12	1,72 ± 0,12

*Tableau 5 : Concentration des différents éléments présents dans les hydroxyapatites étudiées*

En comparant les résultats obtenus par activation neutronique et par ICP/AES, nous constatons que les concentrations obtenues sont compatibles sauf pour les mesures du calcium dans l'HAP, Zn, où nous avons une différence de  $2\sigma$ . La méthode par activation neutronique présente des incertitudes plus importantes et nous privilégions les valeurs obtenues par ICP qui concordent avec ce que nous devrions obtenir pour une apatite.

En conclusion, les résultats par activation neutronique et par ICP/AES confirment, à partir des compositions minérales de nos échantillons, que nos hydroxyapatites ont des rapports phosphocalciques comparables à celle de l'hydroxyapatite pure.

Des analyses complémentaires sur les différentes phases présentes et les différents groupements sont nécessaires et pourront donner des indications supplémentaires sur la structure de nos hydroxyapatites. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de diffraction de rayons X et de spectrométrie d'absorption infrarouge.



## CHAPITRE IV

### CARACTERISATION STRUCTURALE

#### I. DIFFRACTION DES RAYONS X

##### A. Principe de la diffraction des rayons X

Les corps cristallins peuvent être considérés comme des assemblages de plans réticulaires plus ou moins denses, certains contiennent plus d'atomes que d'autres selon la formule chimique du minéral. Ces plans sont séparés par des distances réticulaires caractéristiques ( $d$ ) selon la nature du cristal ou du minéral considéré. Trois ou quatre distances réticulaires ainsi que la connaissance du groupe d'espace déterminant les symétries dans la maille permettent une reconstitution du réseau cristallin du minéral considéré [25].

Avec un rayonnement de longueur d'onde  $\lambda$  suffisamment petit (quelques Angströms, domaine des rayons X), on peut obtenir des diffractions par les plans réticulaires. Cette diffraction est d'autant plus intense que le plan est « dense » c'est-à-dire riche en électrons.

##### B. Dispositif expérimental

Les diagrammes de poudre ont été effectués à l'aide d'un diffractomètre DATA MP-SIEMENS D501 au laboratoire de chimie de Clermont-Ferrand. Ce diffractomètre se compose d'un goniomètre monté verticalement sur un générateur de rayons X « Kristalloflex 800 » et des suprastructures nécessaires à la mesure (figure 5). Le goniomètre positionne l'échantillon qui subit une rotation à vitesse angulaire constante. Le rayonnement issu du tube à rayons X est diffracté par l'échantillon puis capté par un détecteur (compteur à scintillations de type NIM avec lequel les rayonnements de longueur d'onde de 0,01 à 0,27 nm peuvent être mesurés). Ce détecteur raccordé à l'électronique de mesure tourne autour de l'échantillon à une vitesse angulaire double de celle de l'échantillon. Nous avons utilisé la radiation  $K_{\alpha 1}$  du cuivre ( $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$ ) sélectionnée à l'aide d'un monochromateur à lame de graphite. Le diffractomètre, piloté par un ordinateur, permet l'acquisition des résultats et leur représentation graphique (position angulaire et intensité des pics) à l'aide d'un enregistreur à tracé continu.

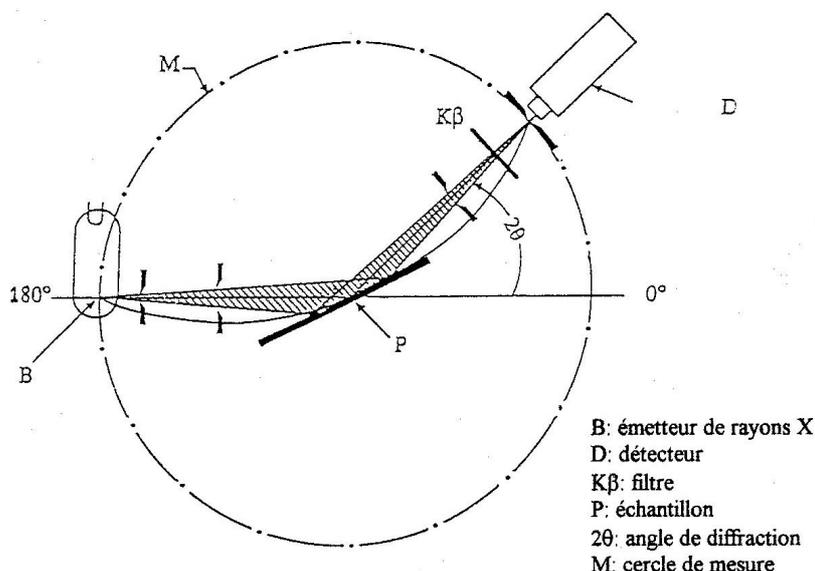


Figure 5 : Dispositif expérimental de l'analyse par diffraction de rayons X.

L'intensité du rayonnement diffracté est mesurée par un détecteur couplé à une électronique de mesure. Un goniomètre indique la position angulaire  $2\theta$ . Toutes les références des structures cristallines sont disponibles dans les fiches ASTM (*American Society for Testing Materials*).

L'échantillon à analyser se présente sous forme de poudre fine formée de cristaux que l'on a obtenue après broyage dans un mortier en agate. Cette poudre est déposée sur une lame de verre et étalée uniformément en une couche mince, pour obtenir une épaisseur inférieure à 0,1 mm.

### ***C. Résultats et discussions***

Trois diagrammes de diffraction de rayons X réalisés respectivement sur l'hydroxyapatite pure, celle dopée au zinc et celle dopée au manganèse sont représentés sur les figures 6 et 7.

Les trois diagrammes de diffraction sont similaires. En se référant aux fiches ASTM correspondant à l'hydroxyapatite, nous remarquons que tous les pics inscrits dans ces fiches sont présents. Il s'agit donc bien d'hydroxyapatites cristallisées comme phase majoritaire.

Cependant la présence d'un pic supplémentaire vers un angle  $2\theta$  voisin de  $31^\circ$  signifie que les HAP contiennent en plus du phosphate tricalcique (TCP) sous la forme  $\beta$ . Sa présence en faible quantité explique que seule la raie majeure soit visible.

D'autre part si nous comparons les spectres de l'hydroxyapatite pure et des différentes hydroxyapatites dopées, les rapports des intensités des pics principaux de ces composés ( $2\theta$  entre  $30$  et  $35^\circ$ ) ne sont pas les mêmes, surtout en ce qui concerne les HAP dopées en zinc (figure 7). La différence d'intensité entre les pics peut provenir de la quantité de poudre analysée qui n'est pas la même mais les rapports différents sont probablement dus à un effet du dopage qui aurait tendance à faire diminuer l'intensité des pics. En effet, des études antérieures de diffraction de rayons X ont montré la diminution des intensités des pics de diffraction et leur élargissement dans le cas d'un dopage plus important [18].

L'analyse par diffraction de rayons X a permis de mettre en évidence que, dans tous les échantillons analysés, nous sommes en présence d'une structure apatite. Nous notons la présence de phosphate tricalcique à l'état de trace. Nous attribuons sa présence au fait que sa formation est plus rapide que celle de l'apatite, cependant l'hydroxyapatite est plus stable que le  $\beta$ -TCP. D'autre part il est connu que l'insertion de zinc dans la structure apatite favorise la formation de phosphate tricalcique [26].

L'élargissement des pics de diffraction pourrait traduire la réduction de la taille des cristaux et l'augmentation du désordre (du à la présence d'éléments étrangers dans la maille) mais ceci n'est pas observable dans notre cas. Si nous avons voulu voir une modification possible des paramètres de maille, il aurait été nécessaire de faire une acquisition plus longue.

Nous pouvons en conclure que la phase apatite est majoritaire, et nous allons considérer dans la suite des expériences les paramètres de maille standard de l'apatite qui sont  $a = b = 9,342 \text{ \AA}$  et  $c = 6,881 \text{ \AA}$ .

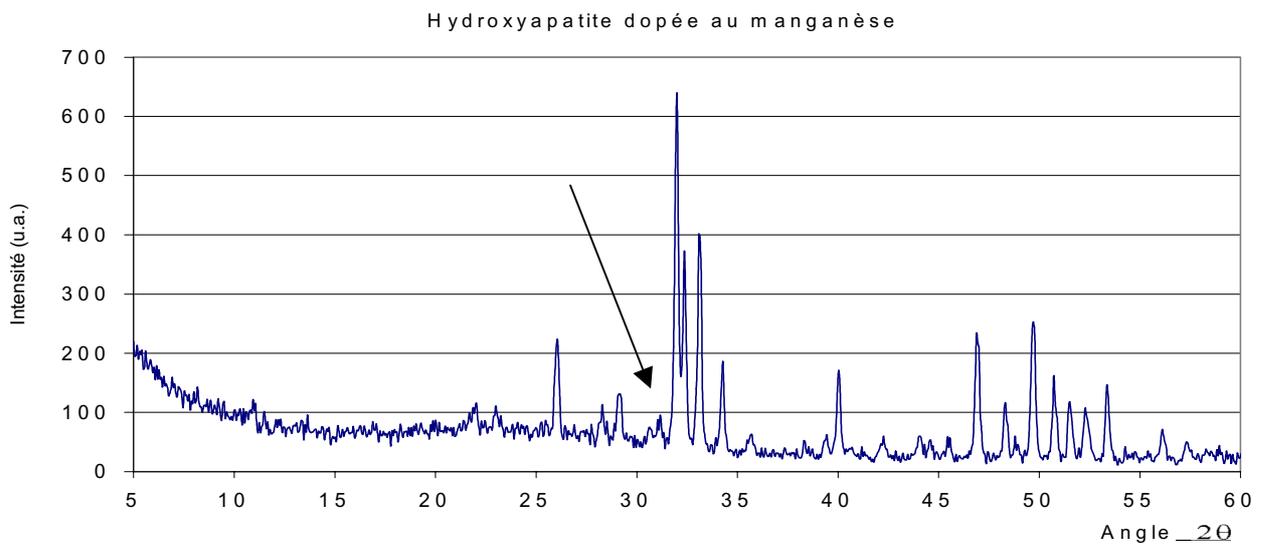
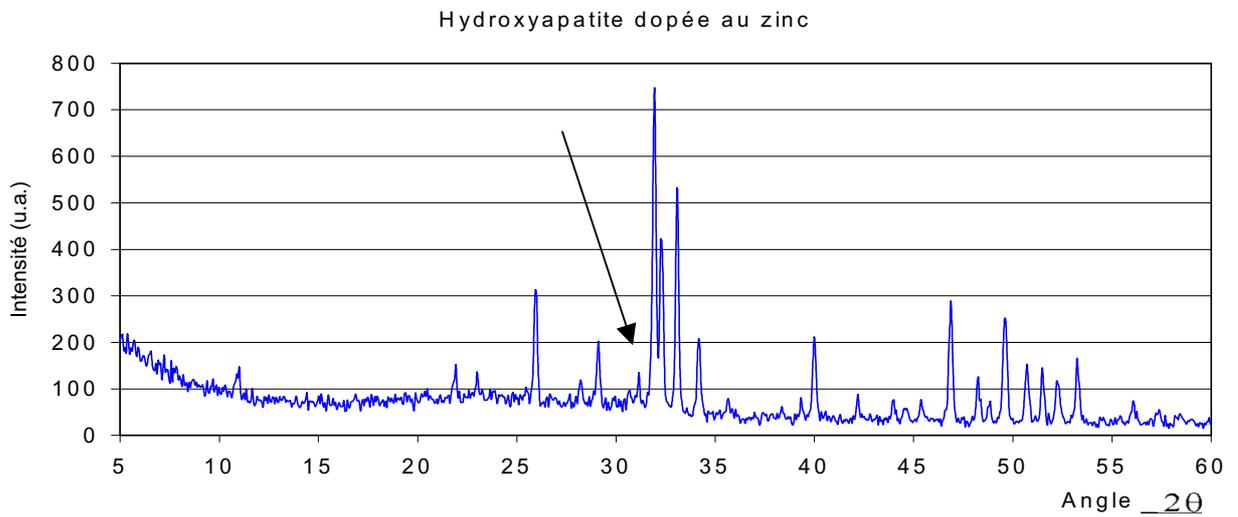
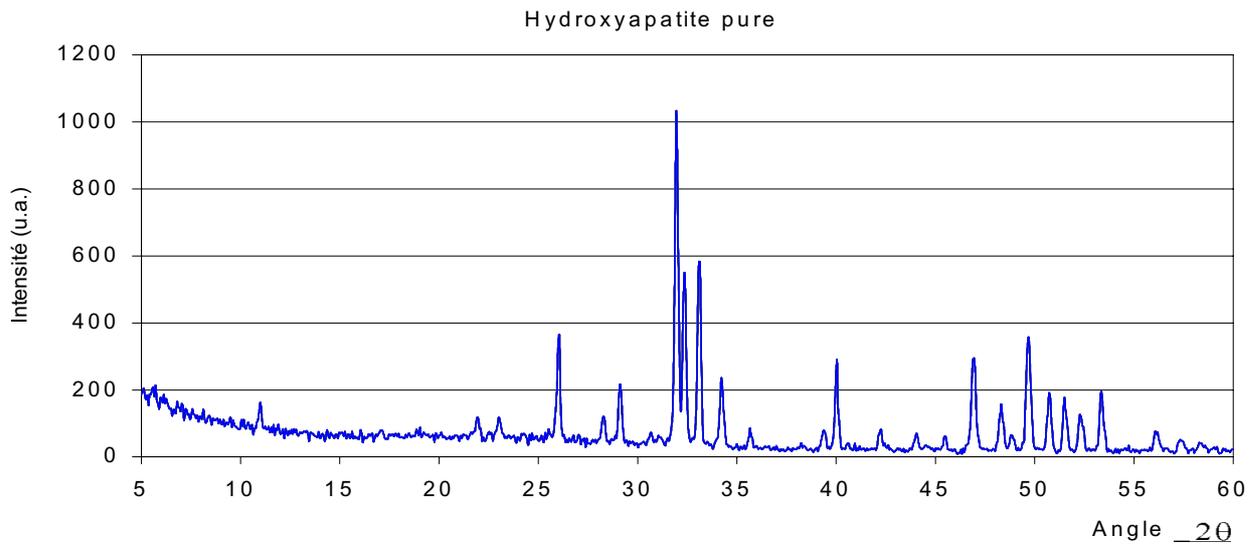


Figure 6 : Diagrammes de diffraction des rayons X des différentes hydroxyapatites.

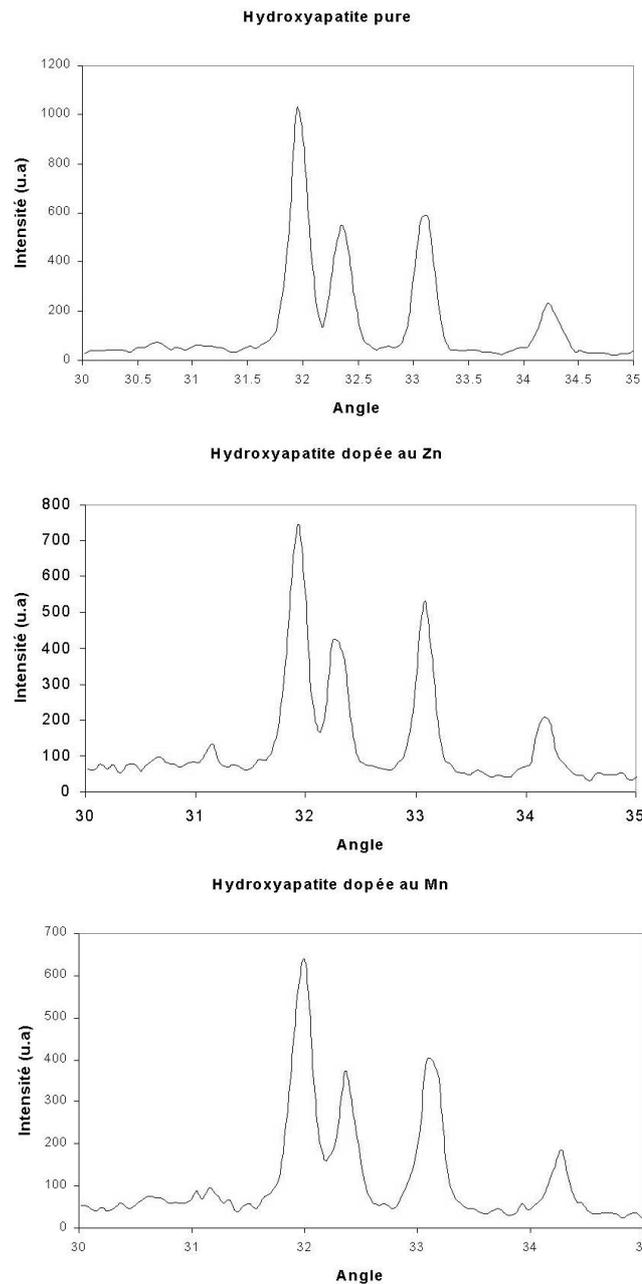


Figure 7 : Diagrammes de diffraction de la partie correspondant à la présence de phosphate tricalcique.

## II. LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION INFRAROUGE

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructives fondées sur l'étude de l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 1 000  $\mu\text{m}$  [25]. Cette bande spectrale est elle-même divisée en infrarouge proche (de 100 000 à  $4000\text{ cm}^{-1}$ ), en moyen infrarouge ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) et en infrarouge lointain (au delà de  $400\text{ cm}^{-1}$ ). La partie la plus riche en informations et la plus accessible d'un point de vue expérimental est celle du moyen infrarouge. Les absorptions dans ce domaine, qui constituent une sorte d'empreinte digitale des composés examinés, permettent de déduire la nature des liaisons et la présence des différents groupements fonctionnels.

## ***A. Principe de la spectroscopie d'absorption infrarouge***

Les bandes d'absorption situées dans le domaine spectral de l'infrarouge proviennent de l'interaction de la composante électrique des radiations électromagnétiques incidentes avec les dipôles électriques des liaisons non symétriques.

L'infrarouge s'intéresse aux excitations des niveaux de vibrations des liaisons entre les différentes molécules. Dès ses origines, l'infrarouge a servi comme méthode semi-empirique d'analyse structurale. Il existe une corrélation entre les positions des maxima d'absorption de certaines bandes et les fonctions organiques, ou les particularités des phosphates dans notre cas. De ce fait nous pourrions avoir des informations sur les déformations des liaisons et le squelette du composé étudié. Les bandes d'absorption sont nombreuses et diffèrent avec chaque composé.

## ***B. Dispositif expérimental***

Le spectromètre utilisé est un appareil à transformée de Fourier qui réalise une analyse simultanée de toute la bande spectrale à partir de mesures interférométriques. C'est un interféromètre de Michelson ou d'un type assimilé, relié à un ordinateur spécifique pour obtenir le spectre classique à partir de l'interférogramme fourni par le banc optique.

Les spectromètres infrarouges représentent, en fonction de la longueur d'onde, le rapport en chaque point des intensités transmises avec ou sans échantillon. Ce rapport, appelé transmittance  $T$ , peut être remplacé par son pourcentage (% $T$ ) ou par l'absorbance  $A = \log(1/T)$ . Enfin, dans le domaine du moyen infrarouge, il est très fréquent d'exprimer les longueurs d'onde sous forme de nombre d'onde (en  $\text{cm}^{-1}$ ).

L'échantillon à analyser se présente sous forme de poudre. Cette dernière va être broyée en présence de KBr sec dans un mortier en agate pour réaliser un mélange qui est ensuite comprimé pour former une pastille translucide. Les spectres d'absorption infrarouge sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre Nicolet type 5 SXC à transformée de Fourier dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Ces expériences sont réalisées à l'école supérieure de chimie de Clermont-Ferrand.

## ***C. Résultats et discussion***

Par cette technique, nous avons mis en évidence les différents groupes présents dans le composé et les particularités de la structure. Le spectre infrarouge est réalisé dans le domaine allant de 400 à 3600  $\text{cm}^{-1}$  (figures 8 et 9).

Dans chaque hydroxyapatite nous observons une bande à 3570  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongation des groupements OH. Vers 3000  $\text{cm}^{-1}$ , un effet arrondi démontre la présence d'eau dans le composé. A 2140, 2070 et 1990  $\text{cm}^{-1}$ , nous avons les bandes des harmoniques des groupements phosphates [27]. Par la suite, le spectre devient beaucoup plus complexe et varie pour chacune des hydroxyapatites.

Dans l'hydroxyapatite dopée au zinc, nous avons vers 1350  $\text{cm}^{-1}$ , un léger pic qui représente les carbonates ainsi qu'une bande vers 840  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à  $\text{HCO}_3^-$ . Ceci peut s'expliquer par le fait que le zinc facilite l'incorporation de  $\text{CO}_3^{2-}$  lors de la fabrication du composé [27].

Entre 1000 et 1100  $\text{cm}^{-1}$ , dont nous présentons un agrandissement figure 9, nous remarquons que les trois spectres diffèrent. L'hydroxyapatite pure et celle dopée en manganèse sont similaires ce qui n'est pas le cas pour celle dopée au zinc. Ce domaine correspond aux vibrations d'élongation des liaisons P-O, les bandes entre 1035-1080  $\text{cm}^{-1}$  correspondent aux vibrations qui sont symétriques et celles vers 960  $\text{cm}^{-1}$  aux antisymétriques. Dans le cas du dopage en zinc, nous avons un élargissement des bandes et

une diminution des fréquences dues aux effets des énergies de liaison et à la masse atomique. Le déplacement vers les basses fréquences est dû à une diminution des énergies de liaison, c'est-à-dire que les liaisons sont moins fortes parce que l'oxygène peut être lié à un autre atome que P.

La différence de position des bandes présentes vers  $1000\text{ cm}^{-1}$  pour l'hydroxyapatite dopée en zinc peut être due à la diminution du nombre d'onde des bandes phosphates provoquées par la présence de  $\beta$ -TCP. Cet effet serait une signature de la composition biphasique de l'hydroxyapatite dopée en zinc avec la présence d'une phase apatite et de trace de phosphate tricalcique. En effet, il a été remarqué pour des dopages supérieurs à ceux que nous avons, l'élargissement des bandes d'absorption de  $\text{PO}_4^{3-}$  et une diminution de l'intensité des bandes d'absorption des  $\text{OH}^-$  [18].

Les bandes entre  $550\text{ et }600\text{ cm}^{-1}$  et  $430\text{-}460\text{ cm}^{-1}$  représentent les vibrations de déformation des groupements O-P-O. Le fait de ne pas observer les mêmes vibrations entre les différentes apatites peut être dû au fait que les éléments Mn et Zn n'agissent pas de la même manière sur les groupements O-P-O mais également peut provenir du dopage qui ne s'est pas fait de la même manière pour l'hydroxyapatite dopée en zinc et celle dopée en manganèse (conditions de pression et de température).

Les bandes caractéristiques de l'hydroxyapatite pure sont situées vers les faibles nombres d'onde ( $472\text{ cm}^{-1}$ ). Or, dans nos spectres nous avons la présence de cette bande mais également de celles correspondant à une apatite carbonatée [28], c'est à dire des vibrations entre  $450\text{ et }470\text{ cm}^{-1}$ .

Les spectres infrarouges montrent que nous avons des bandes supplémentaires dans le cas de l'hydroxyapatite dopée au zinc confirmant la présence d'un composé autre que l'apatite pure qui modifie la structure. De plus, nous devons par la suite tenir compte de la présence d'ions carbonates qui pourraient expliquer la meilleure solubilité de l'HAP, Zn. Les deux autres composés sont semblables, la différence d'intensité des bandes est due à la différence de masse du composé analysé.

Toutes ces analyses physico-chimiques nous permettent d'avoir une première approche de la composition et de la structure des hydroxyapatites. Les résultats obtenus démontrent que les HAP ne sont pas parfaitement purs, mais qu'elles contiennent une faible proportion de phosphate tricalcique, révélée par la diffraction des rayons X. L'analyse par spectrométrie infrarouge montre des traces de carbonates dans nos composés. La quantité de ces phases n'est pas suffisante pour entraîner une modification générale de structure. Les deux techniques confirment bien la structure apatite dans les trois cas, et le fait d'introduire des éléments dopants ne l'altère pas. Cependant, étant donné que le taux de dopage est faible, il peut se produire une déformation locale au niveau de la position de l'élément dopant, n'entraînant pas de modification globale de la structure apatite.

La connaissance de la localisation de ces éléments dopants pourrait nous permettre de déterminer pourquoi l'hydroxyapatite dopée au zinc se résorbe plus vite que l'HAP pure et l'HAP, Mn. Nous n'avons pu étudier la localisation du manganèse car sa teneur est trop faible. Il est intéressant de déterminer la position du zinc dans la structure de l'apatite afin de connaître toutes les modifications du réseau qu'il introduit. Cette description, ajoutée à son rôle biologique, pourrait expliquer la cinétique d'ossification. Pour cela, nous avons effectué des analyses EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) par photoexcitation de l'atome de zinc. Cette spectroscopie nous donne des informations sur la structure locale autour de l'atome excité qui dans notre cas est le zinc.

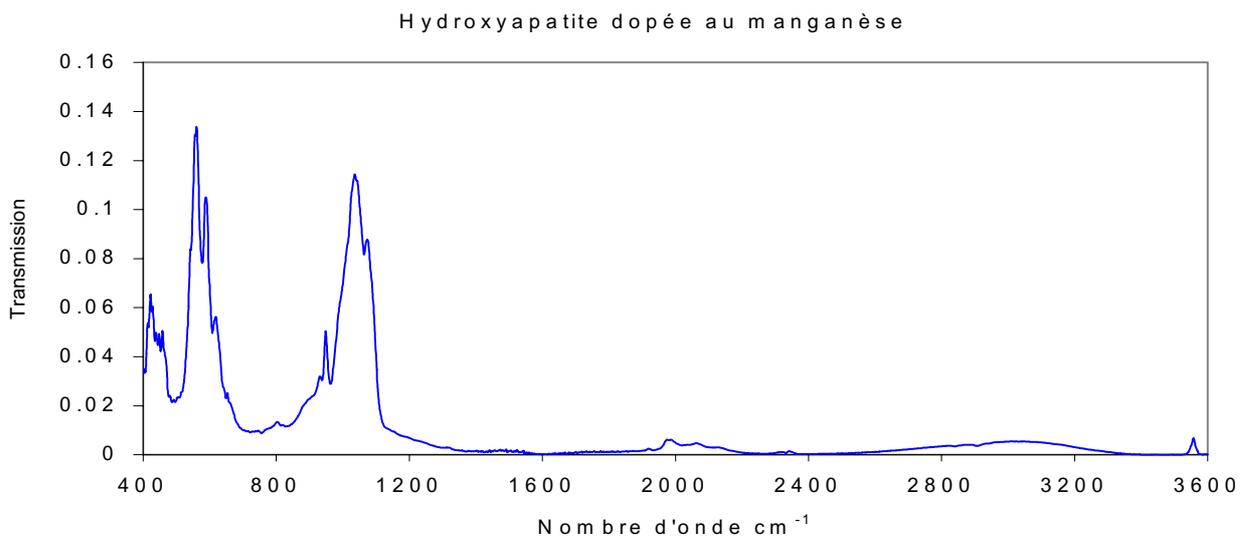
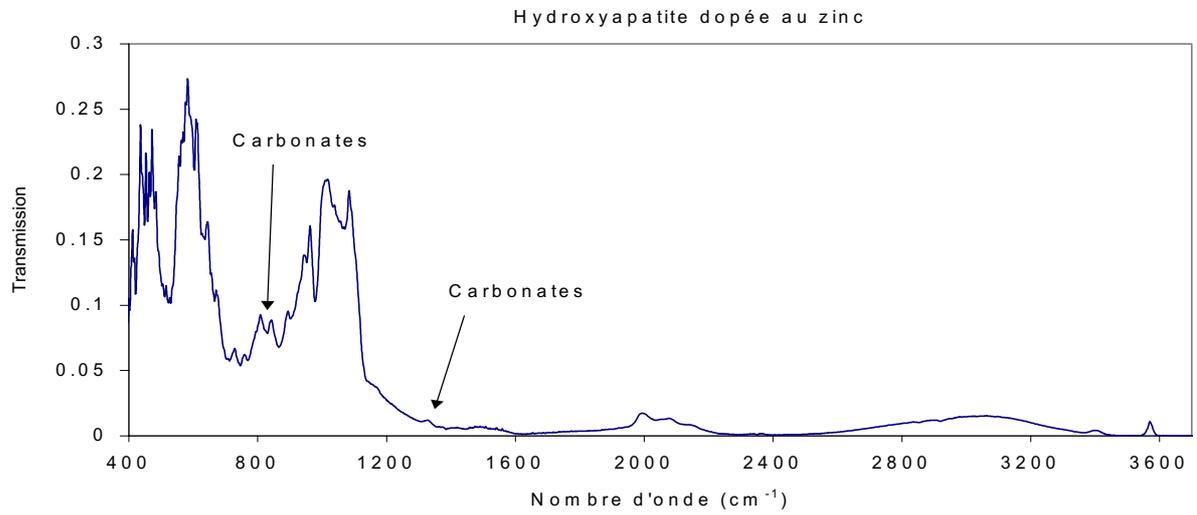
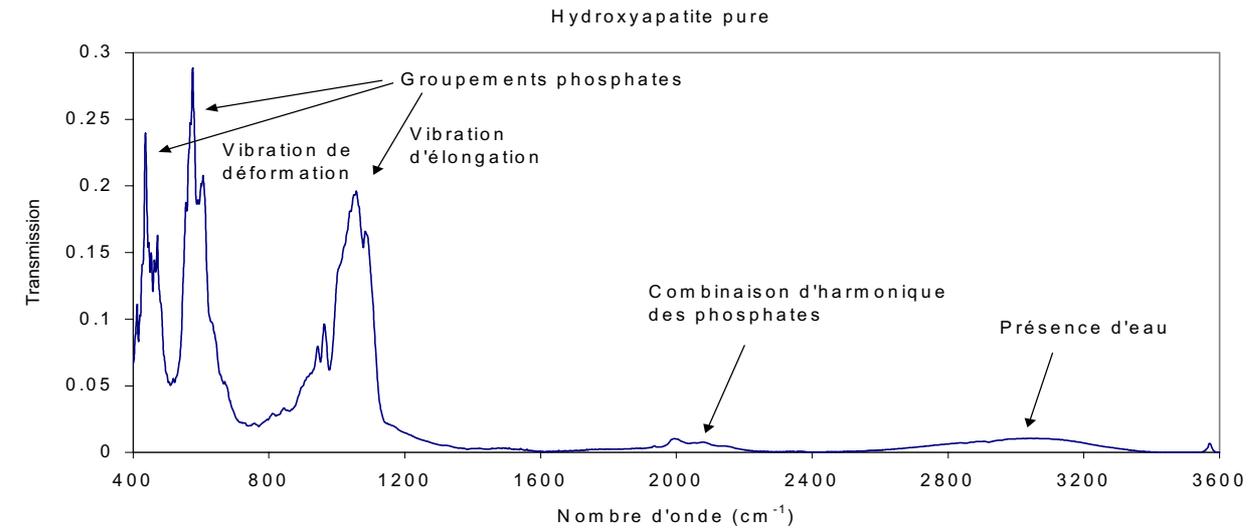


Figure 8 : Spectes infrarouge de l'hydroxyapatite pure, celle dopée en zinc et celle dopée en manganèse

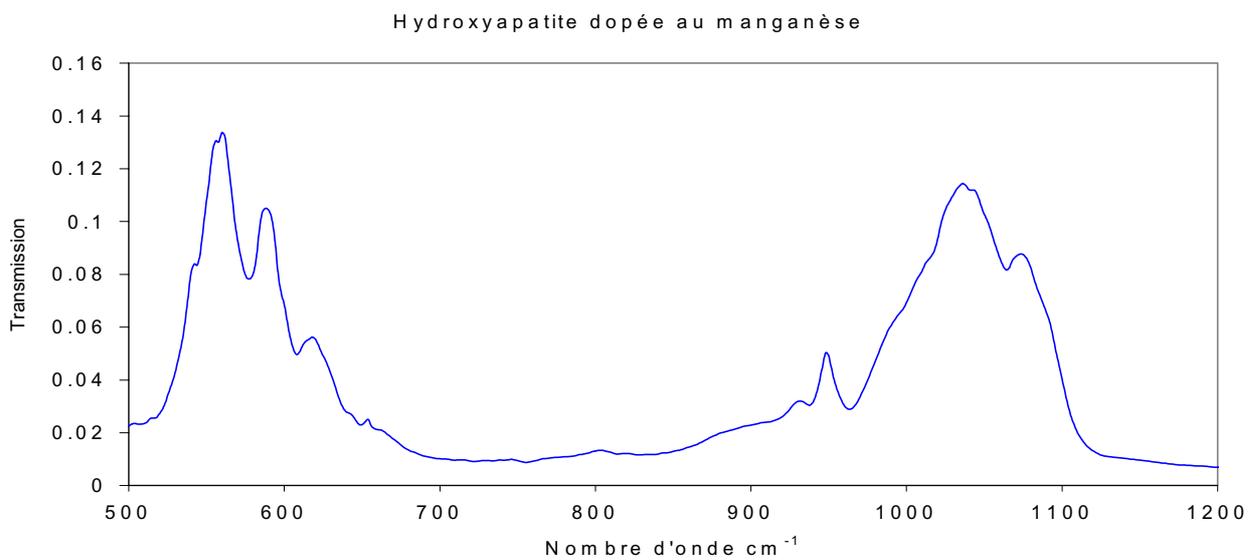
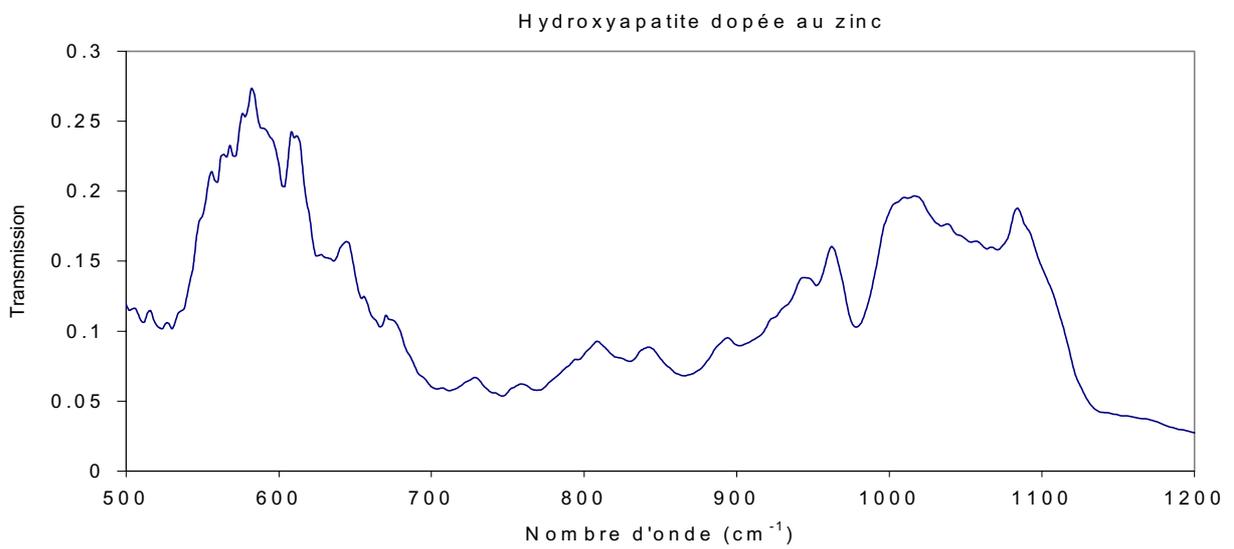
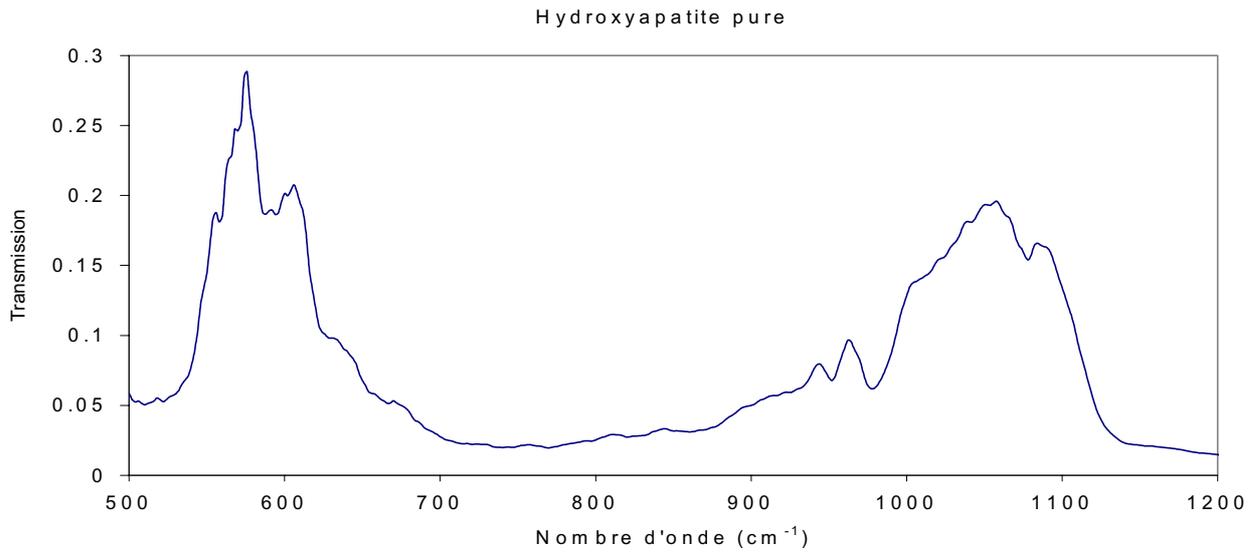


Figure 9 : Diagrammes d'absorption infrarouge dans la région  $500\text{-}1200\text{cm}^{-1}$

# CHAPITRE V

## SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X : EXAFS

La spectroscopie d'absorption X correspond à l'excitation d'électrons de cœur d'un atome donné par absorption d'un photon d'énergie adéquate. Selon l'énergie du photon, différents processus ont lieu conduisant à différentes structures sur un spectre d'absorption X. Ces structures sont observables aussi bien sur des matériaux cristallisés qu'amorphes et donnent des informations sur la structure locale autour de l'atome absorbeur [29].

### I. PRINCIPE

#### A. Le coefficient d'absorption

Lorsqu'on envoie des rayons X sur un échantillon, plusieurs effets peuvent se produire : diffusion (élastique ou non, correspondant à une déviation des photons avec ou sans changement d'énergie), absorption (par effet photoélectrique principalement), matérialisation (par production d'une paire ( $e^+$ ,  $e^-$ )) ou absence d'interaction. La probabilité d'obtenir tel ou tel type d'événement est fonction de l'énergie du photon incident et de la composition de l'échantillon. Dans le cadre de la spectroscopie d'absorption des rayons X, nous nous intéressons à l'absorption par effet photoélectrique qui est le mécanisme prépondérant d'absorption des rayons X pour les énergies utilisées [30].

Quand un faisceau de rayons X traverse un matériau homogène d'épaisseur  $x$ , il subit une perte d'intensité selon la loi de Beer Lambert :

$$I = I_0 \exp(-\mu x) \quad \text{Équation 10}$$

$I_0$  : intensité du rayonnement incident

$I$  : intensité du rayonnement après la traversée de l'échantillon

$\mu$  : coefficient d'absorption linéique du matériau

La réciproque de cette relation permet de déduire le coefficient d'absorption par la mesure des intensités avant et après l'échantillon.

Le coefficient d'absorption  $\mu$  dépend de la nature de l'absorbeur et de la longueur d'onde du rayonnement ; il croît avec le numéro atomique des atomes absorbeurs et décroît d'une manière monotone avec la longueur d'onde si l'on est suffisamment éloigné des seuils d'absorption de tous les éléments.

C'est une réaction au cours de laquelle un photon peut arracher un électron à un atome, pourvu que son énergie  $h\nu$  soit supérieure à l'énergie de liaison  $E_0$  de l'électron. Ce dernier sera éjecté vers le continuum avec une énergie cinétique  $E_c$ . La probabilité d'absorption d'un photon X par excitation d'un électron dépend de l'état final et de l'état initial de l'électron. Dans un domaine s'étendant jusqu'à 1000 eV après le seuil, la décroissance monotone théorique du coefficient d'absorption d'un atome est perturbée par des oscillations d'amplitudes décroissantes nommées oscillations de Krönig. Ces oscillations ont des périodes qui croissent avec l'énergie du photoélectron ( $E_c = h\nu - E_0$ ).

Lorsque l'énergie du rayonnement incident atteint une valeur  $E_0$  correspondant à l'énergie d'excitation d'un électron de cœur d'un des éléments contenus dans l'échantillon, le coefficient d'absorption croît brutalement. Il s'agit d'un seuil d'absorption. On parle de seuil K,  $L_I$ ,  $L_{II}$ ,  $L_{III}$  ...suivant l'état initial de l'électron arraché. Dans nos expériences, nous avons utilisé le seuil K du zinc.

Cette structure, appelée « oscillations EXAFS » n'existe pas si l'atome absorbant est isolé, comme c'est le cas pour un gaz monoatomique, et semble donc être liée à la présence de voisins.

## B. L'EXAFS

Le processus physique est le suivant : une partie de l'onde associée au photoélectron émis lors de l'effet photoélectrique est rétrodiffusée par les atomes voisins de l'absorbant. Les ondes rétrodiffusées interfèrent avec l'onde émise.

Ces interférences sont fonction de l'énergie du photoélectron car le module du vecteur d'onde  $k$  de l'onde associée à l'électron éjecté est :

$$k = \sqrt{\frac{2m(E - E_0)}{\hbar^2}} \quad \text{avec } \hbar = \frac{h}{2\pi} \quad \text{Équation 11}$$

où :

- $k$  : module du vecteur d'onde
- $m$  : masse de l'électron
- $E$  : énergie incidente
- $E_0$  : énergie de seuil de l'atome excité
- $h$  : constante de Planck

L'amplitude et la fréquence des modulations sinusoïdales de l'absorption dépendent du type de l'atome voisin et de sa distance par rapport à l'atome absorbant. Le plus simple trajet correspond à un simple rebroussement par interaction avec les voisins immédiats de l'atome absorbant, on parle de réflexion simple. Lorsque le trajet passe par plus d'un atome autre que l'absorbant, on parle de réflexion (ou diffusion) multiple (figure 10).

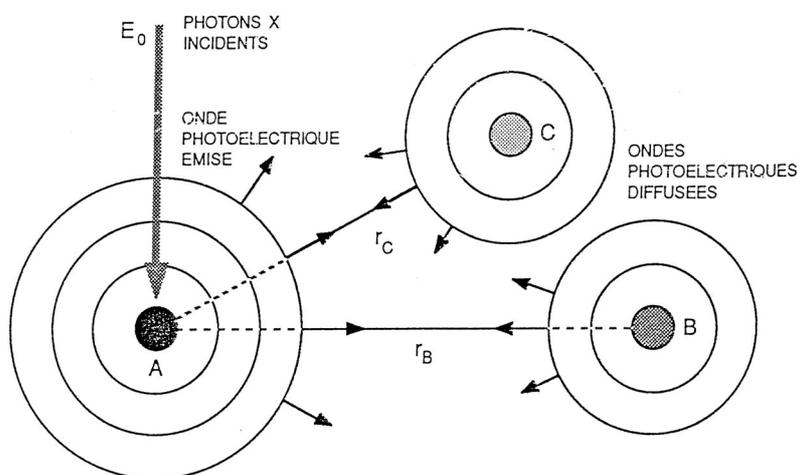


Figure 10 : Interprétation schématique des chemins et des interactions entre voisins pour l'EXAFS

Dans le cas de  $N_j$  atomes rétrodiffuseurs situés sur la couche  $j$  à la distance  $R_j$  de l'atome absorbant, la formulation de l'EXAFS dans l'approximation de la rétrodiffusion simple prend la forme :

$$\chi(k) = S_0^2 \cdot \sum_j N_j \frac{|F(k, \pi)|}{k R_j^2} e^{-2\sigma^2 k^2} \cdot e^{-\frac{2R_j}{\lambda(k)}} \cdot \sin[2kR_j + 2\varphi(k) + \psi(k)] \quad \text{Équation 12}$$

où  $k$  est le nombre d'onde de l'électron arraché par l'ionisation et  $j$  est un indice sur les chemins de réflexion, c'est à dire les différents trajets possibles du photoélectron diffusé lui permettant de revenir à l'origine [30].

Cette formule incorpore deux termes d'amortissement avec l'énergie du photoélectron :

un terme décrivant l'amortissement par l'effet inélastique qui traduit le libre parcours moyen  $\lambda$  des électrons :  $\exp(-2R_j/\lambda)$

un terme de Debye Waller  $\sigma^2$  traduisant l'effet des fluctuations de la distance interatomique  $R$  dues au désordre structural et à l'agitation thermique, considérée comme découlant d'un potentiel harmonique en première approximation :  $\exp(-2\sigma^2 k^2)$

Les autres termes participants à l'expression de la contribution du  $j^{\text{ième}}$  chemin aux modulations EXAFS sont les suivants :

$N_j$  : dégénérescence du chemin (nombre d'atomes de même type de la couche, en diffusion simple)

$F(k, \pi)$  : amplitude de retrodiffusion.  $F(\theta)$  est une fonction complexe dont seule la contribution  $\theta = \pi$  (retour de l'onde vers le site initial) est prise en compte.

$\psi(k)$  : déphasage dû au potentiel diffuseur

$R_j$  : représente la longueur du chemin (demi-longueur du trajet parcouru par l'électron)

$\varphi(k)$  : déphasage de l'atome absorbeur. Le facteur 2 est dû au fait que l'atome central est pris en compte deux fois, pour l'aller et le retour de l'onde.

Cette somme voit ses effets atténués par le terme  $S_0^2$ , inférieur à 1, qui rend compte des effets multiélectroniques négligés dans l'établissement de la formule de l'équation 12.

La diffusion multiple est plus compliquée. L'équation 12 ne s'applique pas car les termes d'atténuation sont plus faibles vers les basses énergies (pics près du seuil).

Lorsque l'on est proche de l'énergie de seuil, l'énergie cinétique du photoélectron est faible, son libre parcours moyen est élevé,  $k$  est petit, donc les coefficients d'atténuation interviennent peu et l'électron sonde une région relativement importante. On obtient alors des fluctuations complexes mais très structurées : c'est la région du XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*). Les contributions des atomes lointains sont plus importantes que dans la région EXAFS et l'onde associée au photoélectron peut participer au phénomène de diffusion multiple qui joue alors un rôle prépondérant.

En revanche, lorsque l'on est assez loin de l'énergie de seuil,  $k$  devient grand et les termes de la somme deviennent pour la plupart négligeables : l'électron ne sonde que le voisinage immédiat de l'atome absorbeur. C'est la région de l'EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*), caractérisée par la prédominance de la réflexion simple.

La limite entre les régions EXAFS et XANES n'est pas très bien définie (figure 11). On admet généralement que l'approximation de la diffusion simple, utilisée pour la région de l'EXAFS, est valable si la longueur d'onde associée au photoélectron est inférieure à la distance  $R$  séparant l'atome absorbant de son plus proche voisin (soit  $k > 2\pi/R$ ).

La théorie du XANES n'est pas aussi simple que celle de l'EXAFS et les calculs sont plus longs. Reste que le formalisme de diffusion multiple a été appliqué à plusieurs systèmes de structure simple, où les résultats ont montré que l'analyse du XANES peut fournir des informations qualitatives sur la structure à moyenne distance, inaccessible à l'EXAFS.

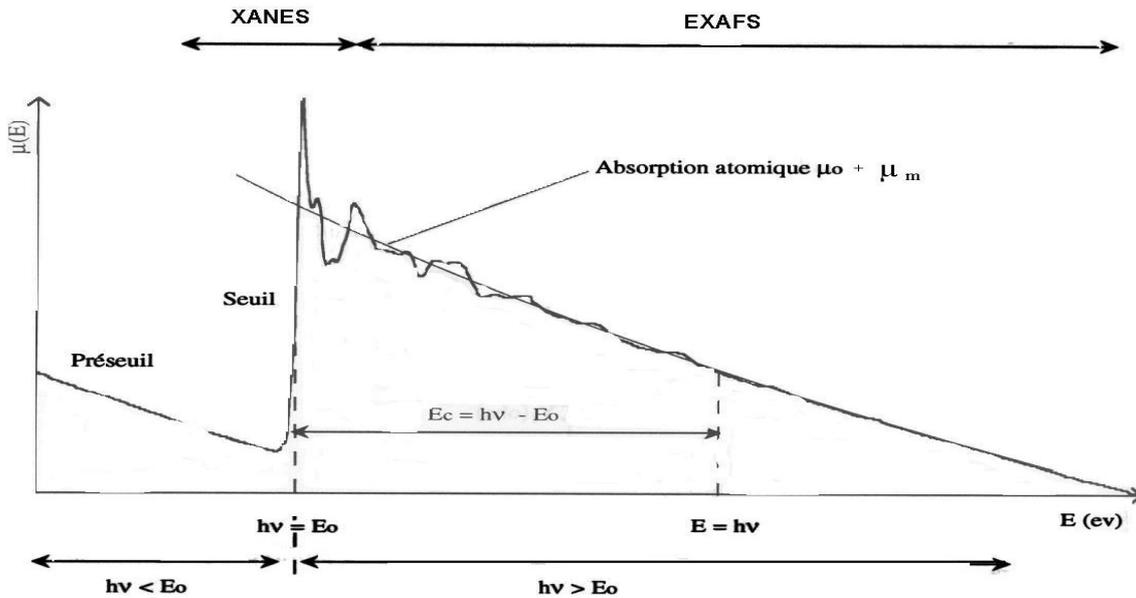


Figure 11 : Localisation de la région du XANES et de l'EXAFS

Les paramètres significatifs du spectre observé sont son amplitude et sa fréquence qui est liée aux distances, mais surtout les fréquences des oscillations du coefficient d'absorption, en fonction de l'énergie par rapport au niveau moyen d'absorption sans interférence de l'atome isolé. L'expression mathématique de ces modulations est la suivante :

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)} \quad \text{Équation 13}$$

$\chi$  : oscillations EXAFS

$\mu$  : absorption de l'atome tenant compte de la diffusion par un atome voisin

$\mu_0$  : absorption de l'atome isolé.

Afin de relier les paramètres de structure et  $\chi(E)$ , il est nécessaire d'exprimer  $\chi$  en fonction du nombre d'onde, ce qui donne  $\chi(k)$  tel que :

$$\chi(k) = \frac{\mu(k) - \mu_0(k)}{\mu_0(k)} \quad \text{Équation 14}$$

### C. Analyse par transformation de Fourier (TF)

La formule modélisant les oscillations EXAFS est, essentiellement, une somme de sinusoides de fréquence  $2R$ . Pour trouver les différentes composantes de cette somme à l'origine des oscillations expérimentales, nous utilisons la transformation de Fourier (TF), qui permet l'analyse en fréquence d'un signal. On attend donc, en calculant la TF du signal expérimental, un pic à chaque valeur de  $R$  pour laquelle existe un chemin contribuant de façon notable.

La transformation de Fourier d'un spectre EXAFS  $\chi(k)$  donne une fonction de distribution radiale modifiée  $f(r')$  du spectre expérimental qui fournit des informations sur la structure locale autour de l'atome absorbant.

$$f(r') = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{k_{\min}}^{k_{\max}} W(k) k^n \chi(k) e^{i2kr'} dk \quad \text{Équation 15}$$

Les pics de  $f(r')$  sont décalés de quelques angströms par rapport aux distances réelles à cause du terme en  $\varphi$  dans l'équation 12. En effet, la distance de l'atome diffuseur à l'atome absorbeur est donnée par la relation suivante :  $R_{\text{réel}} = R_{\text{Fourier}} + \Delta R$ . Stern a démontré que  $\Delta R$  est généralement de l'ordre de 0.3-0.4 Å [31, 32].

Cette TF sert également à filtrer le signal en éliminant le bruit et sépare les contributions des différentes couches pour simplifier l'analyse. Son calcul se fait entre deux bornes en  $k$ , notées  $k_{\min}$  et  $k_{\max}$ . ( $k_{\min}$  et  $k_{\max}$  sont les bornes expérimentales de notre spectre). Pour limiter les inconvénients dus à cette troncature du spectre, on utilise une fonction d'apodisation  $W(k)$  qui évite l'apparition de pic parasite due à l'effet de troncature mais entraîne l'élargissement des pics. Dès que le signal est décomposé en une série de pics, on filtre en effectuant une TF entre deux bornes sur un pic (ce qui revient à faire une transformation de Fourier inverse). La fonction obtenue correspond à la contribution du pic considéré.

#### ***D. Mesure par fluorescence***

Lorsque l'élément étudié n'est présent qu'en faible proportion dans l'échantillon, le seuil dû à cet élément devient indiscernable dans le coefficient d'absorption total. Or ce sont justement les variations autour de ce seuil provenant de l'élément, encore moins intenses que le seuil lui-même, qui nous intéressent. Nous utiliserons pour notre étude la mesure du rayonnement par fluorescence, réémis par l'échantillon lorsqu'il est irradié. La fluorescence est une désexcitation radiative : le trou sur la couche électronique profonde d'énergie  $E_1$  est comblé par un électron d'une couche électronique plus externe d'énergie  $E_2$  avec émission d'un photon d'énergie  $E_2 - E_1$ . Ce rayonnement possède un spectre de raies caractéristiques de l'élément, ce qui permet d'isoler sa contribution, autrement confondue avec le rayonnement diffusé par l'échantillon, si l'on dispose d'un système de détection sélectif en énergie. L'intensité du rayonnement de fluorescence est proportionnelle au nombre de photons absorbés. Dans ce cas, l'absorption due aux atomes autres que celui qui est excité ne donne pas de fluorescence à la raie de l'atome absorbeur, d'où une augmentation de la sensibilité moyennant un temps de comptage plus important. On admet, de plus, que la variation d'intensité observée est la même que lors des mesures par transmission. Les mesures sont réalisées à l'aide de 7 détecteurs. La majorité du flux se situe dans la direction perpendiculaire au faisceau incident et nous aurons :

$$\mu_1(E) \cong I_f / I_0 \quad \text{Équation 16}$$

Sur chacun des détecteurs, nous obtenons un signal que nous pourrions ensuite analyser.

## **II. REALISATION D'UNE EXPERIENCE D'ABSORPTION X**

### ***A. Dispositif expérimental***

Notre étude consiste à analyser des échantillons d'hydroxyapatite dopée au zinc, afin de déterminer la localisation de cet élément dans la maille. Pour cela, nous effectuons nos mesures par fluorescence.

Les expériences au seuil K du zinc ont été réalisées au LURE (Laboratoire d'Utilisation des Rayonnements Electromagnétiques) à Orsay sur la ligne D42 de l'anneau de stockage DCI (Dispositif de Collision sous l'Igloo) (figure 12). L'intensité du faisceau est déterminée en utilisant une chambre d'ionisation remplie d'air. Le faisceau obtenu par fluorescence est détecté par 7 détecteurs au germanium

(Ge) possédant un analyseur multicanal permettant de sélectionner l'énergie des photons afin d'éliminer le diffusé et les fluorescences parasites.

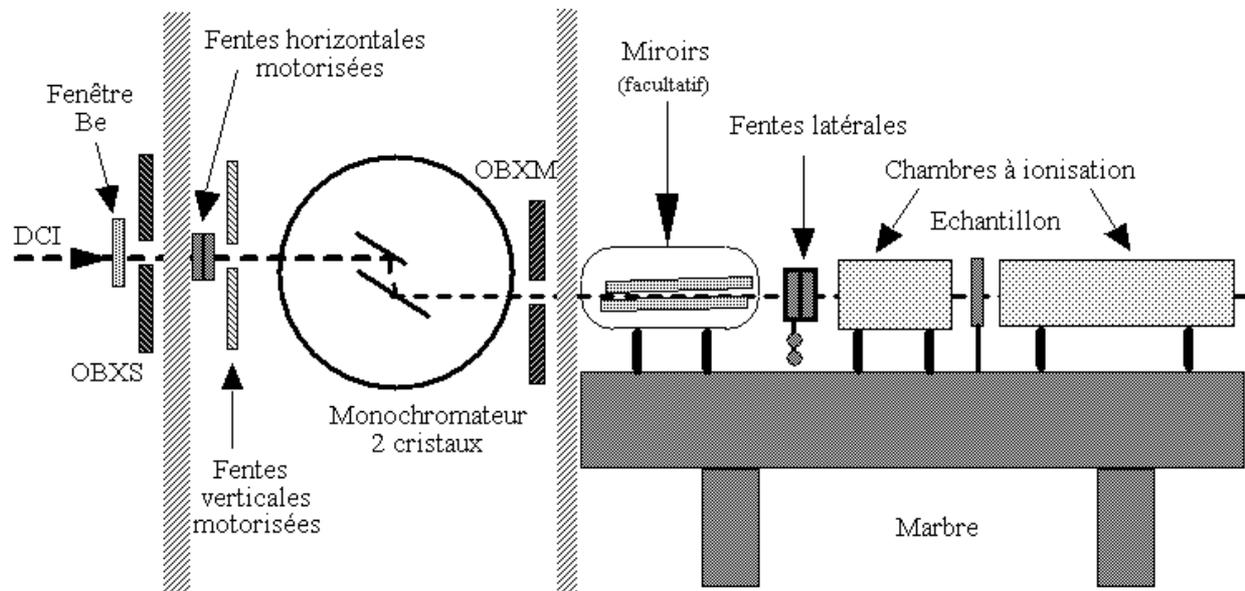


Figure 12 : Montage de mesure d'absorption des rayons X

Auparavant, nous avons réglé le monochromateur Si (111) pour une énergie de 9669 eV (seuil K du zinc) et l'angle entre les cristaux du monochromateur par rapport au faisceau incident est de  $11,799^\circ$ .

Notre échantillon est placé en face du détecteur. Par la suite, nous faisons d'abord un réglage de tous les éléments du détecteur afin d'éliminer le bruit de fond et de garder le signal fondamental correspondant au signal de zinc (figure 13).

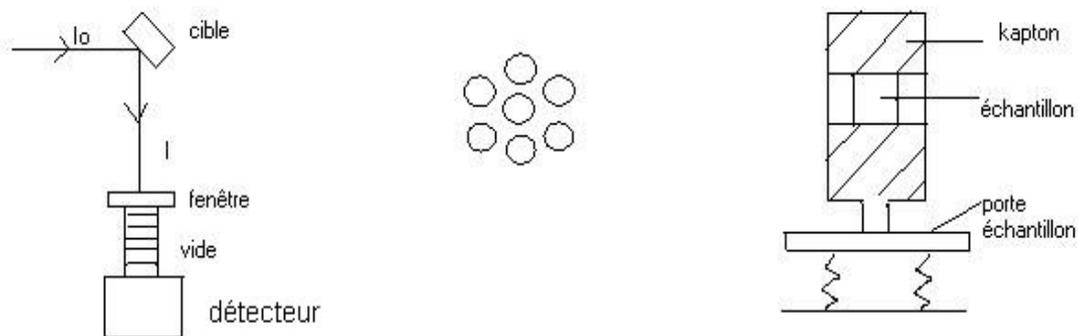


Figure 13: Dispositif expérimental. A gauche, disposition du détecteur par rapport au faisceau incident et à la cible. Au centre agencement des 7 détecteurs au germanium. A droite, maintien de l'échantillon sur la porte échantillon.

Pour chaque échantillon, nous effectuons 10 passages à des énergies comprises entre 9500 eV et 10700 eV par pas de 2 eV en faisant une acquisition de 10 secondes pour chaque point.

### B. Source de rayons X : le rayonnement synchrotron

Pour étudier le seuil d'un élément donné, il faut disposer d'un rayonnement polychromatique tel que :  
 l'énergie  $E_{\max}$  soit supérieure à l'énergie d'excitation  $W_k$  du niveau choisi,  
 l'intensité soit suffisante pour une bonne statistique de comptage, nécessaire pour que les oscillations EXAFS soient bien visibles.

Une particule chargée soumise à une accélération perd de l'énergie en émettant un rayonnement électromagnétique. Dans le cas de particules chargées en interaction avec un milieu extérieur, ce rayonnement est appelé « rayonnement de freinage » (*Bremsstrahlung*). Dans le cas où les particules chargées relativistes dans le vide sont soumises à l'accélération centripète d'un champ magnétique et si elles subissent une accélération par radiofréquence de manière synchrone, ce rayonnement est appelé « rayonnement synchrotron ».

La meilleure source actuelle est le rayonnement synchrotron. C'est une radiation électromagnétique émise par des électrons ou des positrons se déplaçant, à des vitesses ultra-relativistes, le long d'une trajectoire circulaire à grand rayon de courbure. Au LURE, les positrons sont obtenus en bombardant une feuille de tungstène avec des électrons très énergétiques (~1 GeV) puis en les accélérant au moyen d'un accélérateur linéaire. Ils sont ensuite injectés avec une énergie de 1,85 GeV dans l'anneau de stockage de DCI qui est maintenu sous ultra-vide. Le rayonnement synchrotron est émis au niveau des aimants de courbure ou des éléments d'insertion (onduleurs ou *wigglers*). Chaque source de lumière est caractérisée par son énergie critique d'émission et son flux de photons en fonction de l'énergie. Ces paramètres dépendent de l'énergie des positrons dans l'anneau et des caractéristiques de l'aimant.

Pour nos expériences, nous disposons d'un courant de faisceau de 318 mA et d'une énergie de 1.85 GeV.

### C. Sélection de la longueur d'onde : le monochromateur

Pour l'acquisition d'un spectre autour d'un seuil d'absorption choisi, l'énergie des photons incidents sur l'échantillon doit varier et être monochromatique. Cela est réalisé avec un monochromateur placé avant le dispositif expérimental. En faisant varier l'angle d'incidence du faisceau sur une famille de plans réticulaires du cristal du monochromateur, on peut sélectionner telle ou telle longueur d'onde (et ses harmoniques).

La résolution en énergie nécessaire pour exploiter toutes les données de la structure fine du spectre d'absorption doit être de l'ordre de 1,5-2 eV. Avec une source synchrotron, dont le faisceau est fin et de faible divergence, on utilise un monochromateur à doubles cristaux. Ce dernier a l'avantage de fournir un faisceau monochromatique dans la même direction que le faisceau incident; la rotation du monochromateur est combinée à une translation soit du deuxième cristal, soit de la table supportant l'expérience pour le garder à hauteur de sortie fixe sur l'échantillon.

Pour des énergies inférieures à 8 keV, il existe des harmoniques qui polluent le faisceau, il est donc nécessaire de les atténuer en prenant des familles de plans réticulaires d'indice impair (tableau 6) où seuls les harmoniques impairs seront à prendre en compte.

Cristal	Si (331)	Si (111)	Si (311)	Ge (400)
Distance (Å)	1,245	3,135	1,637	1,414

Tableau 6: Distance des plans réticulaires permettant la sélection de la longueur d'onde.

Le cristal est animé d'un mouvement de rotation qui fait varier l'angle  $\theta$  entre le faisceau polychromatique incident et la surface du cristal. L'axe de rotation est tangent à la surface du cristal et la hauteur du monochromateur est réglée de façon à ce que le faisceau vienne frapper le cristal exactement sur cet axe de rotation de façon à illuminer toujours la même partie du cristal, pour limiter les effets des variations de la distance  $d$  entre les deux cristaux avec l'échauffement du cristal sous l'effet des rayons X. La hauteur de sortie du faisceau est fixe.

Nous disposons de deux compositions de cristaux, au silicium et au germanium, taillés selon des plans réticulaires choisis pour obtenir des caractéristiques optiques précises de flux, de résolution et de gamme d'énergie présentées dans le tableau 7.

Cristaux	Si (331)	Si (111)	Si (311)
Domaine d'énergie accessible (eV)	4100 → 31000	4500 → 16200	13000 → ∞

Tableau 7: Domaine d'énergie accessible suivant le monochromateur utilisé

### ***Elimination des harmoniques***

Il existe plusieurs longueurs d'onde pour un indice des plans réticulaires  $hkl$  et un angle  $\theta$  donné. La présence des harmoniques d'ordre  $n$  ( $n > 1$ ) entraîne une erreur sur l'amplitude du coefficient d'absorption. L'élimination des harmoniques peut être réalisée de deux façons différentes :

- En désaccordant le parallélisme des deux cristaux du monochromateur
- En intercalant un miroir au-delà du monochromateur.

Pour des analyses par fluorescence, ces harmoniques sont moins gênantes.

### ***D. Détection des rayons X***

Nous avons utilisé pour nos mesures des chambres d'ionisation et des détecteurs solides à semi-conducteur.

#### *Chambre d'ionisation*

Pour déterminer l'intensité du faisceau avant la traversée de l'échantillon, on doit disposer d'un détecteur qui donne une mesure proportionnelle à l'intensité du faisceau, tout en n'en absorbant qu'une faible partie.

Le choix des gaz ionisables et de la pression dans le détecteur résulte d'un compromis entre l'obtention d'un courant maximal, permettant un rapport signal sur bruit optimal et la nécessité d'avoir une réponse linéaire de la chambre.

L'optimisation du signal pour le zinc se fait en transmission. Nous cherchons à régler le parallélisme des deux cristaux en fonction de l'intensité  $I_0$  pour une énergie de faisceau égale à 9700 eV, correspondant au seuil du zinc. Dans ce cas, l'intensité dans la chambre d'ionisation  $I_0$  doit être maximale ce qui signifie que les cristaux sont bien parallèles. D'une manière générale, l'intensité dans la chambre d'ionisation  $I_0$  est de 0,5 nA et celle dans la chambre I est 1 nA.

#### *Détecteur solide à semi-conducteur*

Nous utilisons une diode à base de germanium qui est polarisée en inverse de façon à augmenter la zone de déplétion (zone de transition entre les régions  $p$  et  $n$  de la diode, seule région utile à la détection).

## **III. METHODE D'ANALYSE DES SPECTRES EXPERIMENTAUX**

Comme indiqué dans la première partie, les informations structurales proviennent des variations du coefficient d'absorption de l'élément sondé. Toutefois, nous n'avons accès qu'au coefficient d'absorption dans son ensemble et pour la totalité de l'échantillon. Nous présentons ici le principe d'obtention des oscillations qui nous intéressent à partir du coefficient d'absorption expérimental  $\mu$  ;

nous noterons  $\chi$  les oscillations du coefficient d'absorption induites par l'environnement de l'atome sondé.  $\mu_o$  représente le coefficient d'absorption intrinsèque de l'atome sondé, c'est à dire le coefficient d'absorption que l'on mesurerait si cet atome était isolé dans l'espace. On appelle enfin le fond continu, noté  $\mu_{bg}$ , la fraction du coefficient d'absorption due à tous les autres effets (absorption par les autres atomes essentiellement). On peut écrire :

$$\mu = \mu_{bg} + \mu_o (1 + \chi) \quad \text{Équation 17}$$

qui est la relation fondamentale utilisée pour extraire les oscillations du spectre expérimental. Toutes les grandeurs introduites ici dépendent de l'énergie.

### A. Elimination du fond continu

La première étape d'analyse consiste à éliminer le « fond continu » d'absorption  $\mu_{bg}$  avant le seuil de l'élément recherché. Ce dernier est créé par les éléments chimiques présents dans l'échantillon autres que l'élément absorbant (on fait une extrapolation sur la partie du spectre après le seuil).

Plusieurs modèles d'estimation de  $\mu_{bg}(E)$  sont utilisés. Tous reposent sur la recherche de la meilleure fonction, parmi une famille donnée, permettant de reproduire le préseuil. Les coefficients de la fonction sont presque toujours obtenus par la méthode des moindres carrés. Les deux familles de fonction les plus utilisées sont les polynômes et les « victorines », ainsi appelées parce qu'elles dérivent du modèle semi-empirique de Victoreen des coefficients d'absorption :  $\mu(\lambda) = C \lambda^3 + D\lambda^4$ , les valeurs C et D étant tabulées pour chaque élément.

En pratique, les victorines ont pour expression :  $\mu_{bg}(E) = B + (C'/E^3) + (D'/E^4)$  Équation 18

Le terme constant B permet de prendre en compte les effets additifs qui ne jouent pas sur la forme du spectre, à commencer par les différents réglages des chambres; l'expérience montre que, ne pas utiliser le terme en  $E^4$  (donc imposer  $D'=0$ ) donne souvent de meilleurs résultats.

En fluorescence, cette étape n'est pas nécessaire, puisqu'en théorie  $\mu_{bg} = 0$ .

### B. Extraction des oscillations EXAFS

#### 1) Elimination du coefficient d'absorption intrinsèque

La deuxième étape consiste à modéliser le coefficient d'absorption intrinsèque  $\mu_o$ , de façon à pouvoir distinguer dans le signal expérimental le terme  $\mu_o$  du terme  $\mu_o\chi$  (coefficient d'absorption extrinsèque). Pour ce faire, nous faisons appel à des méthodes empiriques, qui consistent à faire l'hypothèse que  $\mu_o$  varie peu en fonction de l'énergie et ne contient pas d'oscillation de fréquences comparables aux oscillations EXAFS. Les variantes portent sur la façon de choisir la fonction peu oscillante. Pour cela, on utilise essentiellement des polynômes en E ou en k, ou des *splines* contraintes (une *spline*, ou « courbe du pistolet », est une fonction polynomiale par morceaux, généralement constituée de polynômes de degré 3).

Dans nos analyses, nous avons procédé en trois étapes : tout d'abord la recherche d'un polynôme en E permettant de modéliser  $\mu_o$  sur toute la fin du spectre, puis la recherche d'un polynôme en k sur l'ensemble des oscillations extraites à l'étape précédente permettra de reproduire les oscillations à basse fréquence de  $\mu_o$ . Enfin, on cherche à approcher le spectre par une *spline* contrainte (en k) telle que le paramètre « s » représente l'écart entre cette *spline* et le spectre réel (au sens des moindres carrés, c'est à dire  $\Sigma (y - y_{spline})^2$ ) afin d'éliminer d'éventuelles oscillations à basses fréquences résiduelles.

Pour mieux visualiser les oscillations, on travaille sur  $k^n \chi_{inter}(k)$  aux cours des deux dernières étapes,  $n$  étant un entier choisi en fonction du spectre et  $\chi_{inter}$  représentant les oscillations en cours d'extraction.

## 2) Normalisation des oscillations

Une fois l'extraction de  $\mu_o$  réalisée, nous obtenons le coefficient d'absorption extrinsèque  $\mu_o \chi(k)$ . Pour poursuivre le traitement, il est nécessaire de normaliser ce signal en le divisant par  $\mu_o$ . On peut envisager deux méthodes pour cela : soit nous utilisons le  $\mu_o$  qui a été déterminé précédemment, soit en utilisant une méthode de modélisation semi-théorique de  $\mu_o$  telle que le modèle de Victoreen.

Si la première méthode est a priori préférable, car les modèles théoriques ne reproduisent pas les oscillations de basses fréquences de  $\mu_o$ , la seconde peut toutefois s'avérer intéressante car le  $\mu_o$  extrait peut comprendre des termes autres que le coefficient d'absorption extrinsèque.

### C. Analyse par transformation de Fourier

Le rôle de la transformation de Fourier est de donner une indication sur la qualité de l'extraction des oscillations mais aussi sur le nombre de termes intervenant dans la somme de l'équation 12 afin de nous permettre d'isoler la contribution d'un ou de plusieurs termes de l'équation de l'EXAFS, pour l'étudier séparément. Pour cela, il suffit d'appliquer une fonction d'apodisation ne conservant que le pic souhaité, avant de calculer la transformée de Fourier inverse du signal. Nous avons utilisé la fonction de Kaiser-Bessel décrite ci dessous :

$$W(k) = J_0 \left[ \tau \left( \frac{1 - 4(k - k_{\min})^2}{(k_{\max} - k_{\min})^2} \right)^{1/2} \right] / J_0[\tau]$$

où  $J_0$  est la fonction de Bessel d'ordre 0

Équation 19

$\tau$  : paramètre contrôlant l'étalement de la fonction

### D. Détermination des paramètres structuraux

Pour pouvoir accéder à des paramètres structuraux qui sont nécessaires pour caractériser la structure (distances entre l'atome absorbeur et ses voisins, nombre de voisins et le facteur Debye-Waller), nous avons recours à des modélisations. Nous cherchons, à partir de l'équation de l'EXAFS (équation 12), à reproduire aussi bien que possible le spectre expérimental. En supposant les paramètres électroniques connus, nous allons ajuster les paramètres structuraux de l'équation à leurs valeurs optimales.

L'obtention des paramètres électroniques, paramètres résultants de l'interaction du photoélectron avec son environnement, peut se faire soit à partir de composés de référence (méthode de transfert des paramètres), soit par calcul théorique en employant par exemple le logiciel FEFF [33].

FEFF est un programme pour le calcul de diffusion multiple pour des spectres de *XAFS* (*X-ray Absorption Fine Structure*) et de *XANES* (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) dans le cas de *cluster* d'atomes. Les caractéristiques du modèle, telles que les différents éléments présents, les coordonnées cartésiennes pour une structure particulière sont données à FEFF. A partir de ces données, le logiciel fournit les principaux chemins qui contribuent de façon non négligeable au signal et les décrit en incluant les coordonnées cartésiennes des atomes et leurs dégénérescences.

## IV. ANALYSE DES SPECTRES EXPERIMENTAUX

### A. Extraction des oscillations EXAFS

Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel LASE (Logiciel d'Analyse des Spectres EXAFS) [34]. En premier lieu, nous normalisons les spectres d'absorption provenant de chaque détecteur ce qui permet de faire leur moyenne, malgré les différences de hauteur de seuil dues à la disposition spatiale différente des détecteurs par rapport à l'échantillon (figure 14).

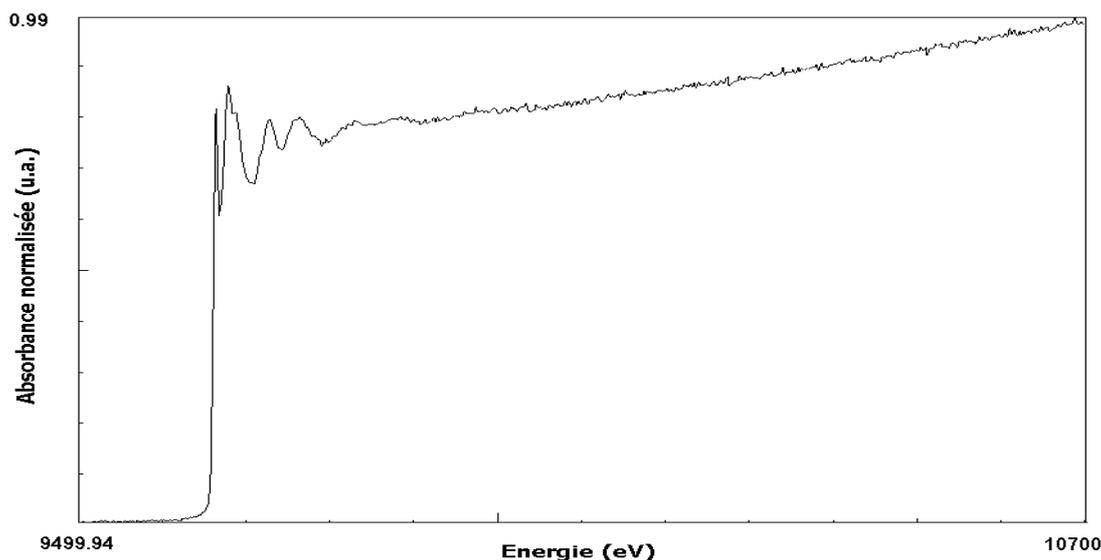


Figure 14 : Normalisation et moyenne des 48 spectres expérimentaux de l'hydroxyapatite dopée au zinc.

L'élimination de l'absorption intrinsèque ( $\mu_0$ ) est effectuée en trois étapes : la première consiste à ajuster avec un polynôme de degré 3 en E dans notre cas. La conversion de l'espace des E en espace des  $k$  est faite à ce niveau et nous pourrions par la suite travailler dans cet espace en pondérant le spectre par  $k^n$  ( $n=1$ ). La troisième étape utilise une *spline* contrainte afin d'éliminer les composantes basse fréquence de  $\mu_0$ . Nous contrôlons l'extraction du  $\mu_0$  grâce à la transformée de Fourier, qui nous permet de vérifier que nous n'avons pas de pic en dessous de 1 Å (les contributions basses fréquences correspondent à des distances trop courtes pour être réalistes) (figure 16).

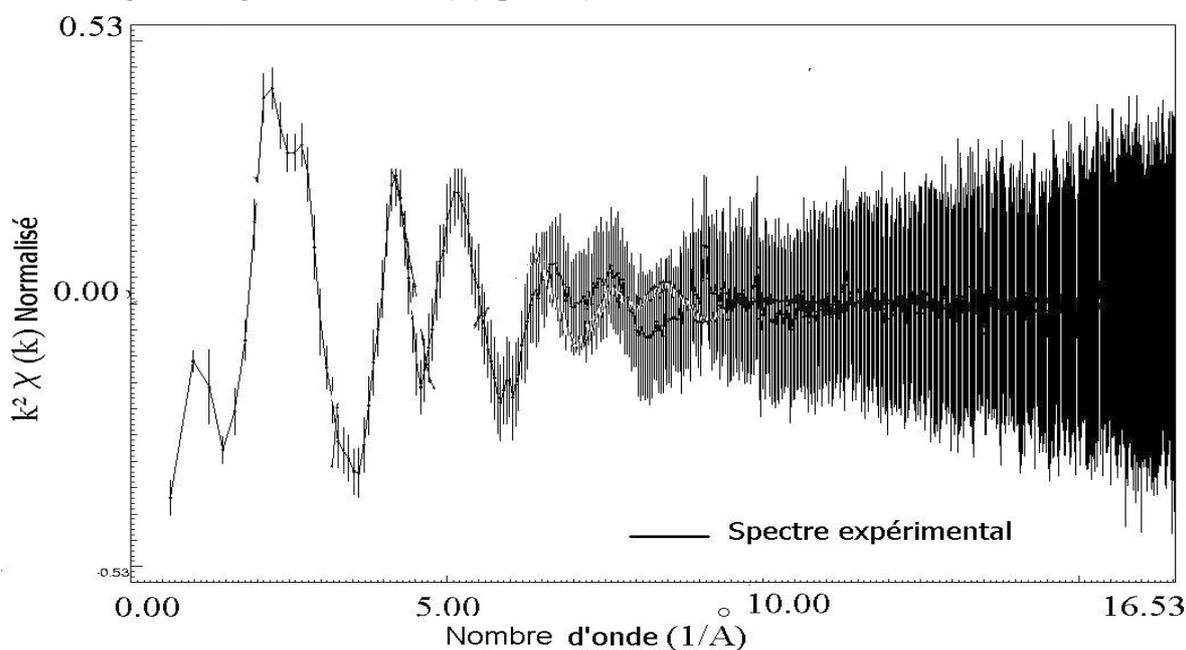


Figure 15 : Oscillations EXAFS de l'hydroxyapatite dopée au zinc.

Pour savoir jusqu'où les oscillations sont significatives, il est nécessaire d'avoir une estimation de l'erreur expérimentale en chaque point du spectre. Nos échantillons sont très dilués, l'erreur prépondérante est d'origine statistique. Nous avons réalisé la moyenne de tous les spectres enregistrés en estimant l'écart type à cette moyenne point par point. Les erreurs ainsi obtenues ont été propagées tout au long du traitement à l'aide des algorithmes intégrés dans LASE [35]. Ces algorithmes permettent en particulier de connaître les erreurs aussi bien sur le spectre en  $k$  que sur la transformée de Fourier. Nous constatons que ces barres d'erreur sont très importantes, ce qui n'est pas surprenant pour un échantillon aussi dilué que celui dont nous disposons (figure 15). Au delà de  $10 \text{ \AA}^{-1}$ , le signal est noyé dans le bruit de fond, il est inutile de chercher à modéliser.

### B. Analyse des spectres

La transformée de Fourier est effectuée sur ces spectres en utilisant une fonction d'apodisation de Kaiser-Bessel (cf. III.C), avec comme paramètre 1,5 entre  $k_{min} = 1 \text{ \AA}^{-1}$  et  $k_{max} = 10 \text{ \AA}^{-1}$ . Cette dernière est présentée sur la figure 16. La correction sur la distance par rapport à l'atome absorbeur n'a pas été effectuée, c'est pourquoi les distances apparaissent plus courtes que dans la réalité. Afin d'avoir les distances réelles entre les atomes, nous devons ajouter environ  $0,5 \text{ \AA}$ .

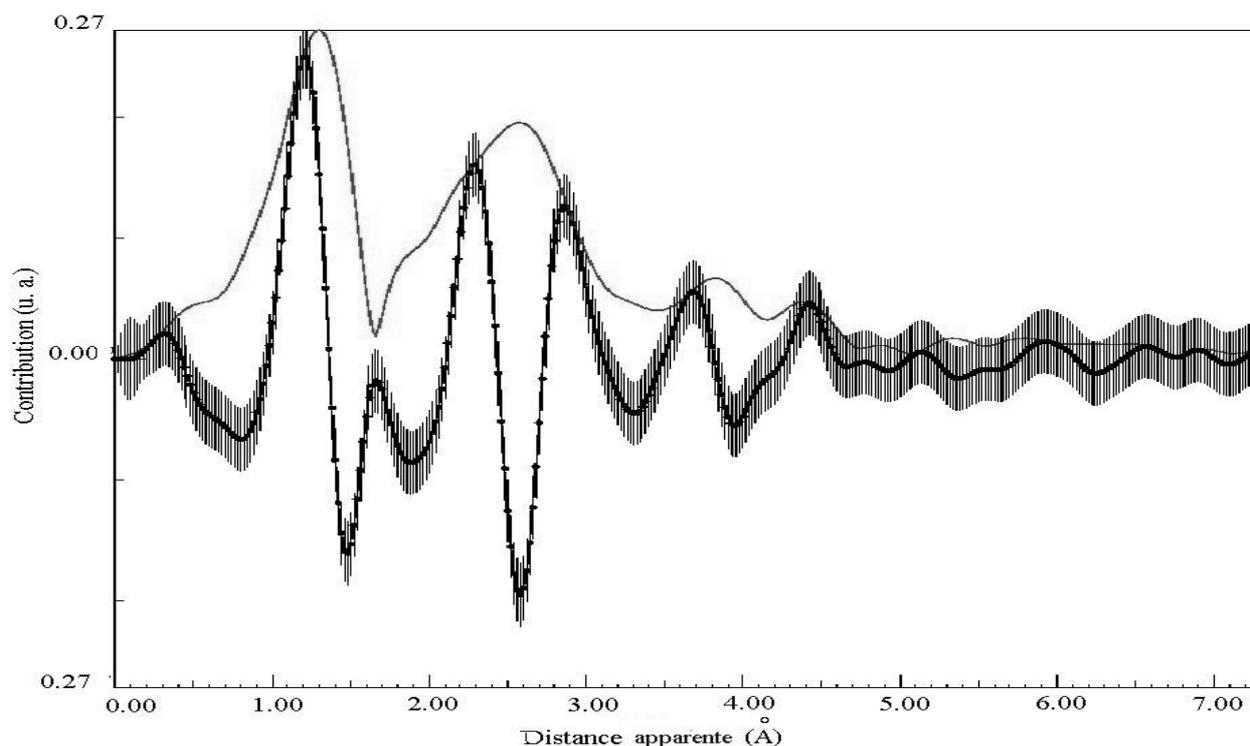


Figure 16: Transformée de Fourier de l'hydroxyapatite dopée avec du zinc. En noir continu est représenté le module, et en noir avec les barres d'erreur, la partie imaginaire.

Avant de poursuivre la modélisation de notre spectre expérimental, nous ferons des hypothèses sur la localisation du zinc dans la structure de l'hydroxyapatite dopée. Nous allons proposer plusieurs possibilités et déterminer celle qui correspond le mieux à notre expérience. La structure de départ de l'apatite est une maille hexagonale de groupe de symétrie  $P6_3/m$  [36, 37]. Nous avons fait les hypothèses suivantes :

- 1) Substitution des groupes phosphates par l'anion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  comme dans l'hydroxyapatite dopée au chrome [38].
- 2) Formation de phosphate de zinc (hopéite)[18] :  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ .
- 3) Le zinc stabilise le phosphate de calcium [39] (TCP), aussi bien sous la forme  $\alpha$  que  $\beta$ . Dans ce cas, le zinc se substituerait à un atome de calcium donné.
- 4) Substitution du calcium en site I dans la maille de l'apatite par le zinc [40].

- 5) Substitution du calcium en site II par le zinc.
- 6) Insertion du zinc entre les deux hydroxydes [41].

Les trois premières hypothèses sont faciles à vérifier du fait de l'existence de ces composés tandis que pour les trois dernières possibilités, nous faisons des modélisations théoriques.

### 1) Modélisation du premier pic

La figure 16 montre que les deux premiers pics sont bien caractérisés, le premier vers 1,3 Å et le second vers 2,6 Å qui prend en compte la contribution des trois derniers pics. Nous allons essayer de reproduire le premier pic à la plus courte distance avant d'étudier le reste du spectre. Nous isolons la première contribution en appliquant une fonction de Hanning dans l'espace des R entre 0,93 et 1,68 Å. Nous considérons que le zinc est entouré d'oxygène, ce qui nous amène à construire un modèle avec un atome de zinc à l'origine et un atome d'oxygène vers 1,8 Å (distance estimée par la transformée de Fourier). Nous utilisons FEFF pour déterminer les phases, les amplitudes et les différents chemins envisageables pour des couples absorbeur/rélecteur. Nous prenons les données calculées par FEFF afin de reproduire aussi bien que possible le premier pic du spectre expérimental. Nous fixons différentes valeurs pour  $N_1$  (nombre d'atomes voisins de l'absorbeur) et autorisons  $R_1$ ,  $\sigma_1^2$  et  $\Delta E_0$  à varier.  $\Delta E_0$  est un terme correctif qui tient compte de la différence de valeur de  $E_0$  entre le spectre expérimental et celui obtenu avec FEFF. Nous ajustons le spectre expérimental par la méthode des moindres carrés en tenant compte des variables précédentes. Le meilleur modèle correspond à deux atomes d'oxygène comme voisins à une distance de 1,77 Å avec un facteur de Debye-Waller  $\sigma_1^2 = 5,74.10^{-3} \text{ \AA}^2$ .

Ce résultat rejette l'hypothèse 1 dans laquelle le zinc est tétraédrique, avec 4 oxygènes comme plus proches voisins.

### 2) Modélisation du spectre total

Pour choisir parmi les autres hypothèses proposées, nous analysons le second pic de la transformée de Fourier. Nous modélisons tout le spectre EXAFS de départ et non le signal filtré pour un pic donné. Cette méthode, conseillée par le comité de recommandations sur les critères et les standards en EXAFS [42], a l'avantage d'éviter les distorsions induites par le filtrage de Fourier.

## C. Construction des modèles théoriques

A cause de la complexité du second pic (figure 17), qui comprend la contribution d'interactions simples et multiples, une reconstruction couche par couche du modèle structural serait trop complexe.

La structure cristallographique de l'hydroxyapatite étant connue [36, 37], nous avons introduit les coordonnées dans LASE afin d'avoir 8 mailles adjacentes. Nous plaçons le zinc en substitution du calcium en site I par exemple. Le résultat est fourni par l'intermédiaire d'un fichier en entrée du logiciel FEFF avec lequel nous commençons la création d'un modèle théorique. Grâce à cette modélisation, nous obtenons un grand nombre de chemins possibles pour chaque hypothèse faite. Le plus difficile est de réduire ce nombre de chemins afin d'obtenir un modèle réaliste.

Le logiciel LASE offre une bonne interface graphique pour utiliser le logiciel FEFF. Pour un modèle donné, il permet de voir quels atomes sont impliqués dans les chemins trouvés, chemin par chemin. Afin de réduire le nombre de paramètres pour l'ajustement, c'est à dire le nombre de chemins dont nous tiendrons compte pour la suite de la modélisation, nous allons :

- ajuster le spectre en utilisant tous les chemins plus courts que 5 Å (puisque la transformée de Fourier a montré que les contributions au delà n'étaient pas significatives),
- analyser les résultats et éliminer les chemins dont les paramètres sont physiquement irréalistes, c'est à dire par exemple que nous considérons seulement ceux dont le facteur de

Debye-Waller est compris entre  $0,1 \text{ \AA}^2$  (plus grand, le chemin qui ne contribue pas au spectre final) et  $10^{-4} \text{ \AA}^2$  (désordre anormalement faible), recommencer l'ajustement en éliminant les chemins exclus.

Cette procédure est répétée jusqu'à ce que nous trouvions un modèle cohérent et que les résultats soient significatifs. Si nous n'arrivons pas à obtenir un modèle correct, l'hypothèse de départ est rejetée.

Nous devons également tenir compte du nombre maximum de paramètres autorisés par le théorème de Nyquist [30] soit :

$$N_{\max} = \frac{\Delta k \Delta R}{\pi} \pm 2 \quad \text{Équation 20}$$

Tous les ajustements sont effectués dans l'espace des  $k$ . Notre hypothèse est que seuls les deux premiers pics jouent un rôle important. On ne peut pas s'attendre à une reproduction exacte du spectre, principalement pour les faibles valeurs de  $k$ . En conséquence, nous faisons aussi la comparaison des transformées de Fourier pour sélectionner le modèle.

#### ***D. Analyse des résultats***

La procédure décrite précédemment donne les valeurs des paramètres ajustés mais pas d'information sur la qualité de leur détermination. La fonction n'est pas linéaire, l'estimation des erreurs sur les spectres EXAFS n'est pas exacte du fait qu'il s'agit d'un spectre expérimental et de plus, les régions de faible  $k$  sont mal reproduites. Ainsi, pour accepter un ajustement, nous nous basons sur le fait que le spectre théorique est compris dans les barres d'erreur du spectre expérimental, dans l'espace des  $R$  et dans l'espace des  $k$  pour la région qui nous intéresse.

Afin de déterminer les incertitudes sur les paramètres ajustés, nous utilisons une simulation Monte-Carlo. Cela consiste à générer 1000 spectres pseudo-expérimentaux, à partir du spectre expérimental et de ses erreurs, pour chacun desquels nous effectuons un ajustement dans les mêmes conditions que pour le spectre expérimental. Nous obtenons ainsi une série de valeurs pour chaque paramètre, sur laquelle nous pouvons appliquer les lois statistiques pour obtenir les valeurs moyennes et leurs erreurs. Cette méthode peut nous permettre également d'avoir une idée sur la validité de l'ajustement et nous renseigner sur la validité de notre modèle.

## **V. RESULTATS ET DISCUSSIONS**

Comme nous l'avons signalé précédemment, l'hypothèse de formation de l'anion  $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$  est éliminée du fait que nous sommes en présence d'un atome de zinc entouré de deux atomes d'oxygène comme plus proches voisins.

En ce qui concerne la deuxième hypothèse (formation d'une hopéite), nous avons fait l'analyse du spectre EXAFS de ce phosphate de zinc hydraté dans les mêmes conditions que pour l'hydroxyapatite. La comparaison des spectres EXAFS est présentée sur la figure 17.

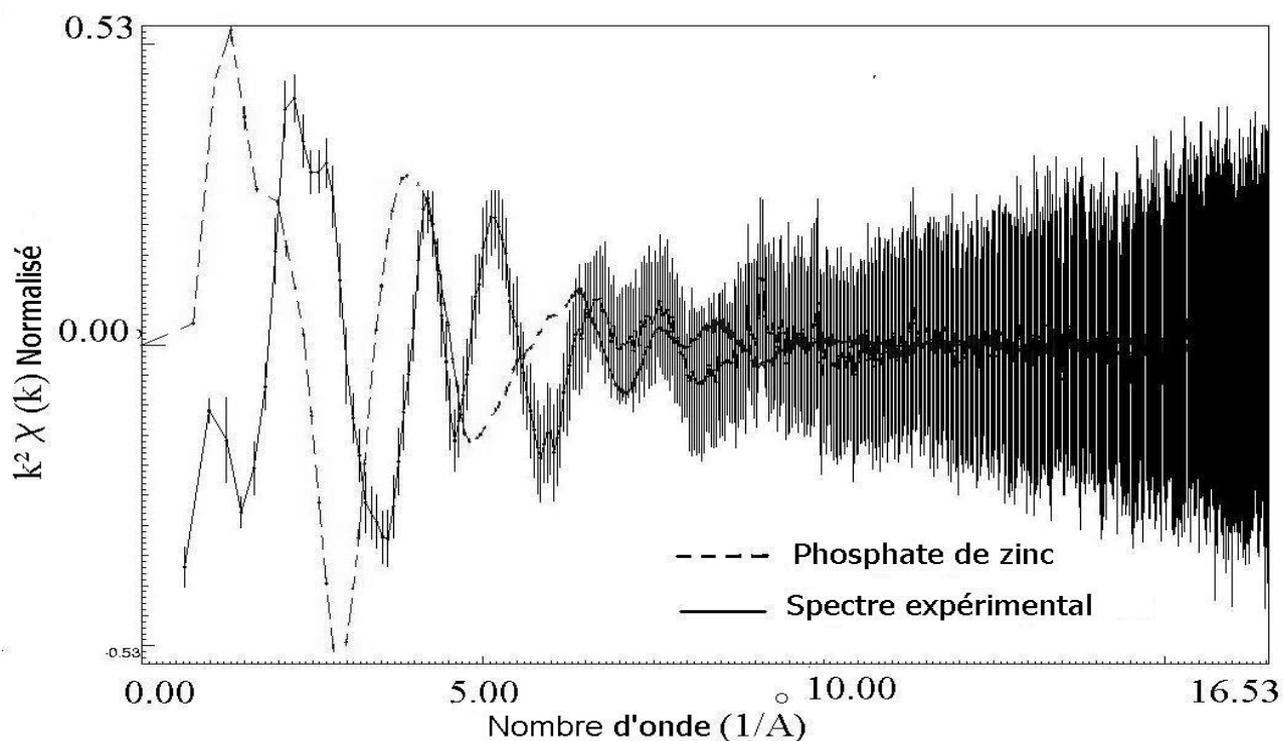


Figure 17 : Comparaison entre le spectre expérimental de l'hydroxyapatite dopée au zinc et le phosphate de zinc.

Nous pouvons remarquer que les spectres sont totalement différents, nous pouvons donc éliminer cette hypothèse.

L'étude des spectres des phosphates tricalciques sous la forme  $\alpha$  et  $\beta$  donne les transformées de Fourier présentée sur les figures 18 et 19.

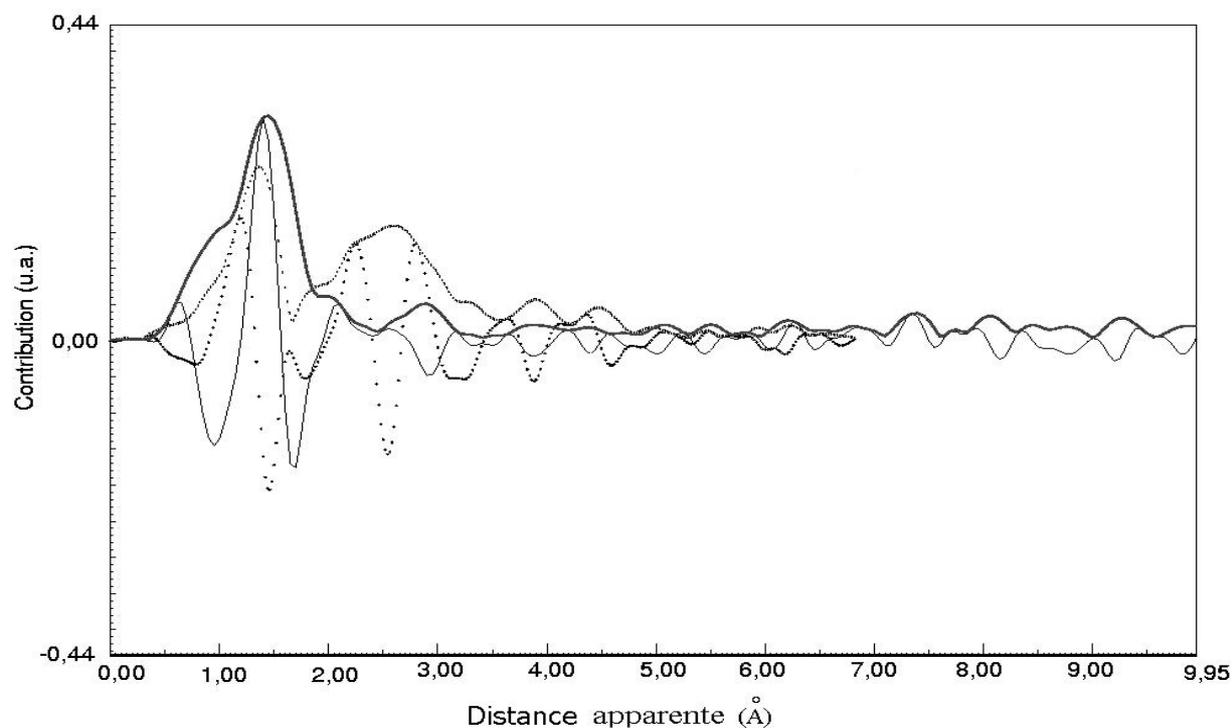


Figure 18 : Comparaison de la transformée de Fourier de l'hydroxyapatite dopée avec du zinc (ligne discontinue) et du phosphate tricalcique sous la forme  $\alpha$  (ligne continue).

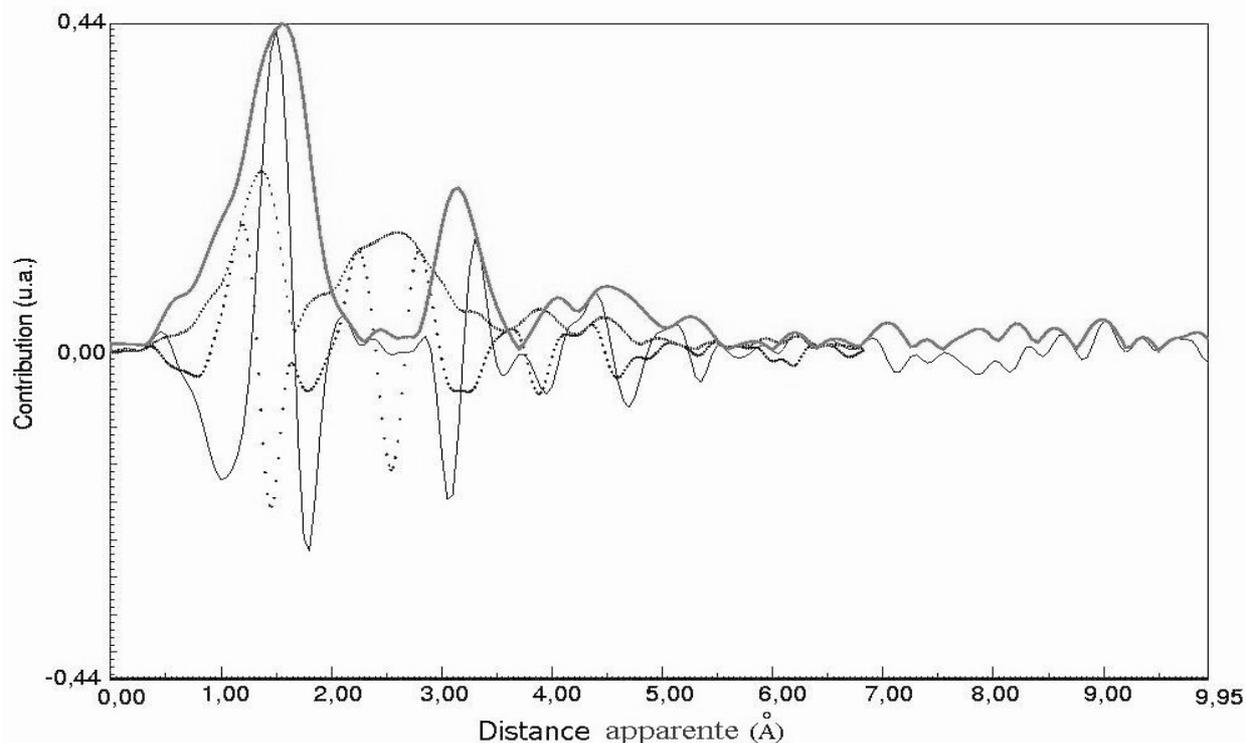


Figure 19 : Comparaison de la transformée de Fourier de l'hydroxyapatite dopée avec du zinc (ligne discontinue) et avec le phosphate tricalcique sous la forme  $\beta$  (ligne continue).

Les trois dernières hypothèses font appel à la structure d'origine de l'hydroxyapatite. Une vue tridimensionnelle d'une maille d'hydroxyapatite est montrée sur la figure 20.

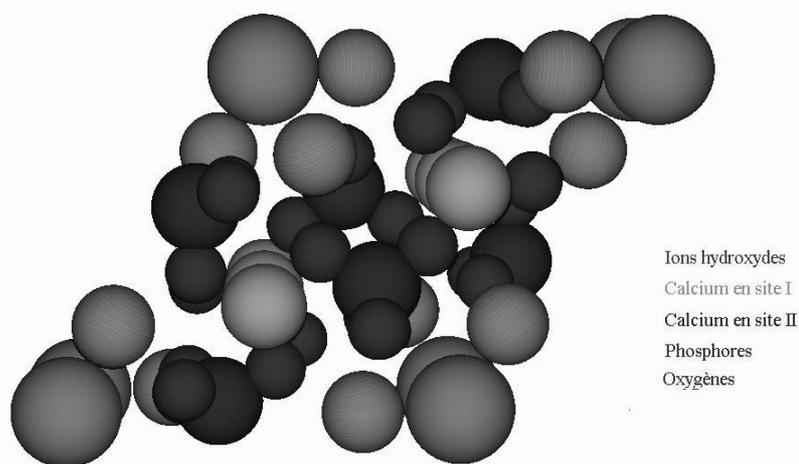


Figure 20: Maille d'hydroxyapatite pure. En vert les ions hydroxydes, en marrons les atomes de calcium en site II, en jaune les atomes de calcium en site I, en violet les phosphores et en rouge les oxygènes.

### Insertion du zinc entre les deux hydroxydes

Nous avons considéré cette possibilité après avoir examiné la structure hexagonale de l'apatite et nous avons observé qu'il existe suffisamment de place entre les deux hydroxydes pour pouvoir loger un atome de zinc. Les résultats finaux sont donnés dans le tableau 8.

Couche	Nombre de voisins	R(Å)	$\sigma^2 \times 10^3$ (Å <sup>2</sup> )	R <sub>crystal</sub> (Å)
1	2	1,757 ± 0,001	3,30 ± 0,18	1.72
2	6	2,926 ± 0,002	18,70 ± 0,30	2.91
3	6	3,051 ± 0,003	39,05 ± 1,52	2.98
7	4	3,630 ± 0,008	19,67 ± 6,36	4.02
16	24	4,605 ± 0,003	80,80 ± 7,25	4.15

Tableau 8: Résultats des ajustements dans le cas du zinc interstitiel.

A chacune de ces couches, nous associons des chemins entre l'atome absorbeur et les réflecteurs tel que :

Couche 1 :	Zn - OH - Zn	(O des anions hydroxydes)
Couche 2 :	Zn - Ca - Zn	(Ca du site II autour des OH <sup>-</sup> )
Couche 3 :	Zn - O - Zn	(O d'un phosphate)
Couche 7 :	Zn - Ca - O - Zn	(Ca du site II, O des phosphates et des OH <sup>-</sup> )
Couche 16 :	Zn - Ca - O - Zn	(Combinaison de Ca du site I et II des oxygènes des phosphates et des OH <sup>-</sup> )

Les spectres obtenus pour ce modèle sont sur les figures 21 et 22.

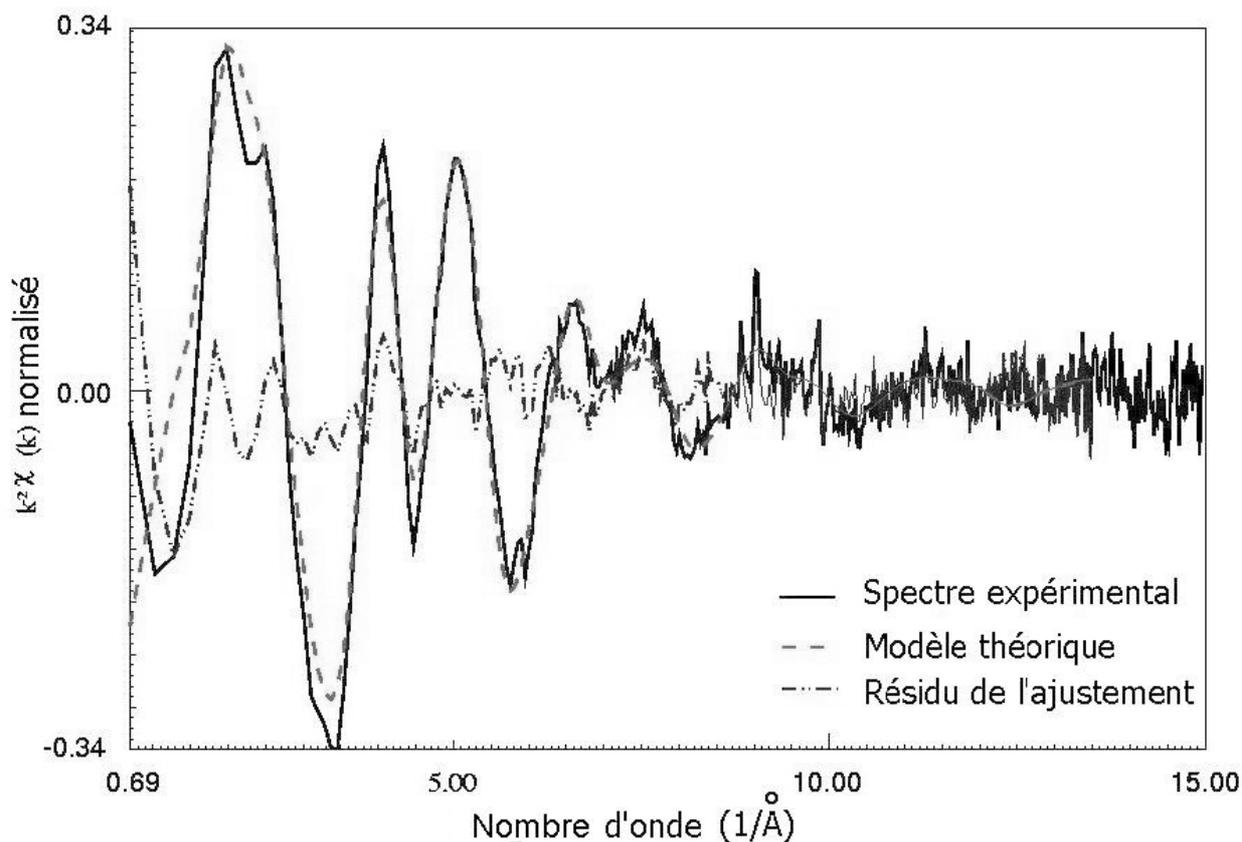


Figure 21 : Spectre des oscillations EXAFS du zinc interstitiel.

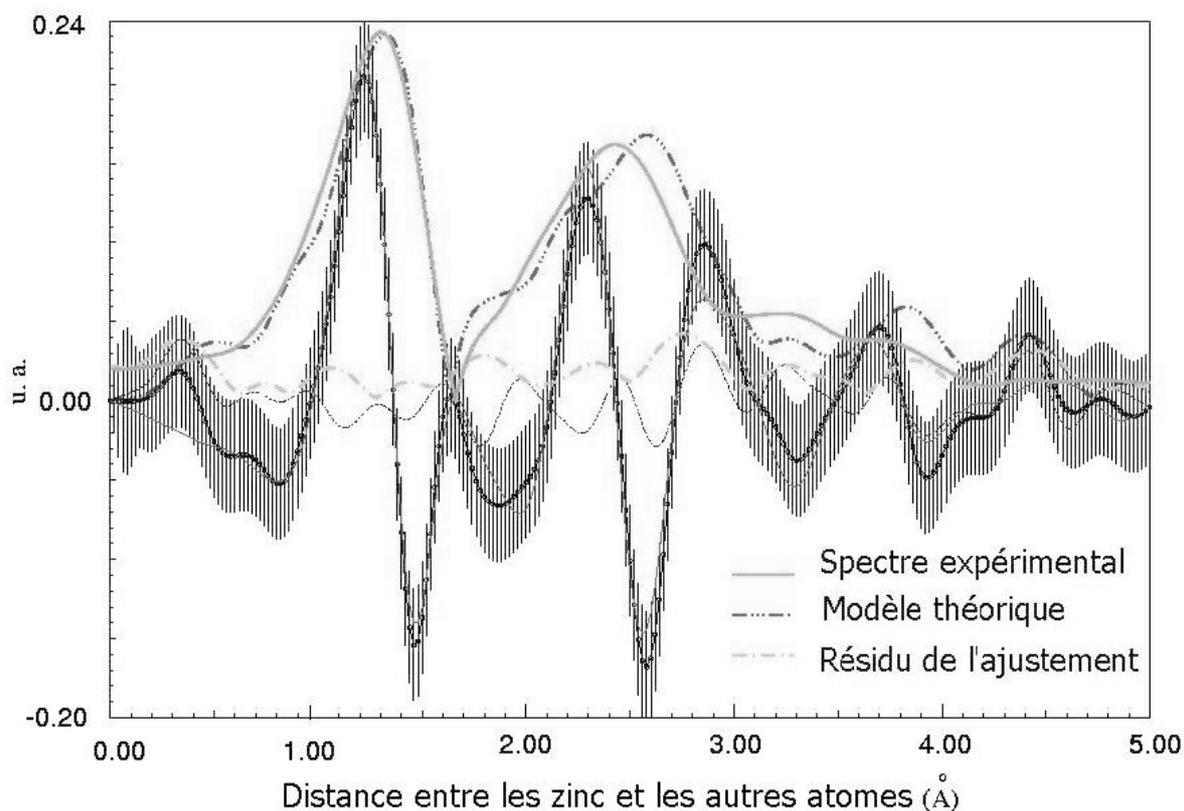


Figure 22 : Transformée de Fourier du zinc interstitiel.

**Substitution du calcium en site I par le zinc :**

Afin d'obtenir des résultats cohérents avec le nombre de voisins sur la première couche, nous avons ajouté une hypothèse. La modélisation du zinc interstitiel a montré que le premier pic est très bien reproduit. Nous allons nous servir de ce résultat pour ajuster aussi bien que possible le premier pic. Pour cela, nous créons un nouveau chemin que nous nommons 1', qui contient deux voisins à une distance de 1,7 Å avec une phase et une amplitude correspondant à celles du zinc en interstice. De plus, nous modifions le nombre de voisins des couches suivantes afin d'imposer le même nombre de voisin pour le zinc que pour le calcium au même emplacement. Tout ceci est effectué au cours des différents ajustements, les résultats sont donnés dans le tableau 9. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 23. Ce modèle suppose une forte déformation locale de la maille par suite de la substitution de Ca par Zn.

Couche	Nombre de voisins	R(Å)	$\sigma^2 \times 10^3 (\text{Å}^2)$
1'	2	1,747 ± 0,002	6,1 ± 0,3
1	2	2,261 ± 0,007	22,0 ± 1,8
2	2	2,629 ± 0,010	9,4 ± 2,7
3	3	2,840 ± 0,005	2,4 ± 2,02
4	3	3,105 ± 0,059	12,7 ± 1,9
5	4	3,459 ± 0,005	15,0 ± 1,1
6	5	3,823 ± 0,008	8,6 ± 0,8

Tableau 9: Résultats des ajustements dans le cas du zinc en site I.

A chacune de ces couches, nous associons des chemins entre l'atome absorbeur et les réflecteurs :

- Couche 1': Zn - O - Zn (2 atomes d'oxygène des phosphates ligand du Ca en site I)
- Couche 1 : Zn - O - Zn (2 atomes d'oxygène des phosphates ligand du Ca en site I)
- Couche 2 : Zn - O - Zn (2 atomes d'oxygène des phosphates ligand du Ca en site I)

Couche 3 :	Zn - O - Zn	(3 atomes d'oxygène des phosphates ligand du Ca en site I)
Couche 4 :	Zn - P - Zn	(P provenant du ligand à côté du Ca en site II)
Couche 5 :	Zn - Ca - Zn	(Ca voisin et 3 Ca d'un autre site)
Couche 6 :	Zn - P - Zn	(P provenant du ligand à côté du Ca en site II)

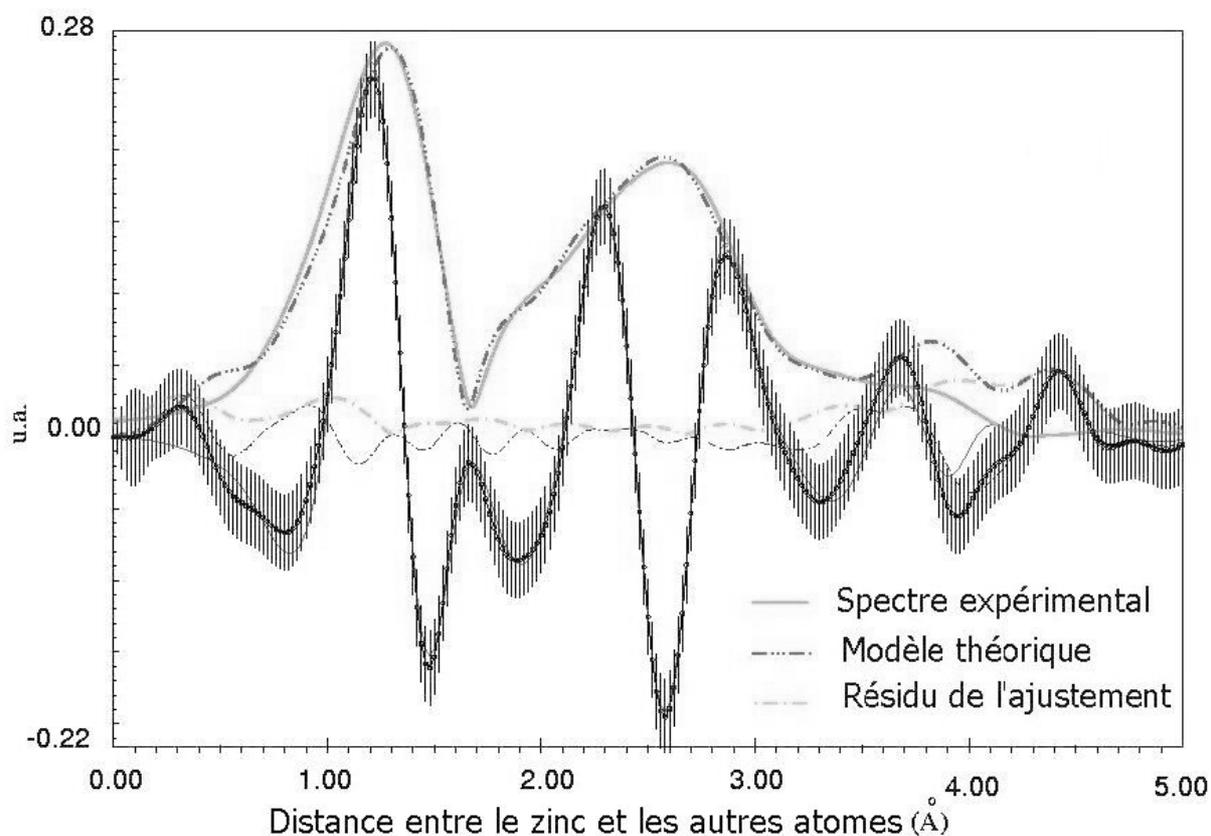
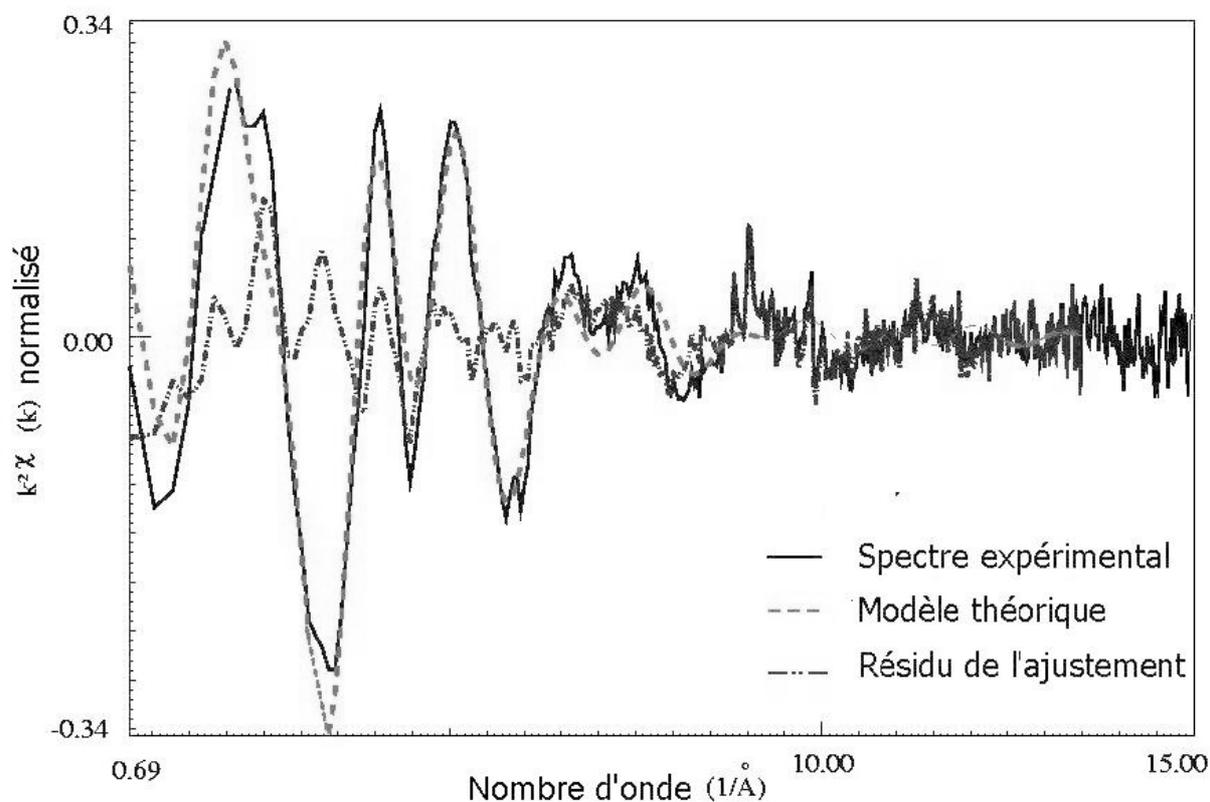


Figure 23 : En haut, le spectre des oscillations EXAFS du zinc en site I du calcium et en bas, la transformée de Fourier .

Substitution du calcium en site II par le zinc :

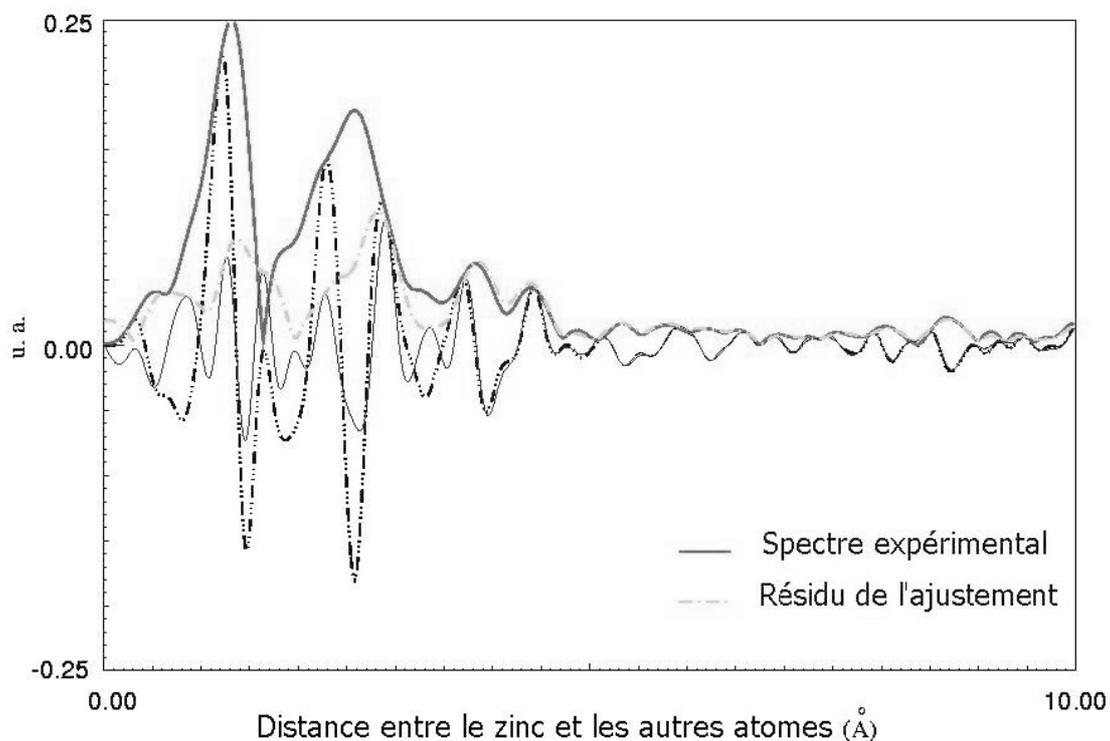
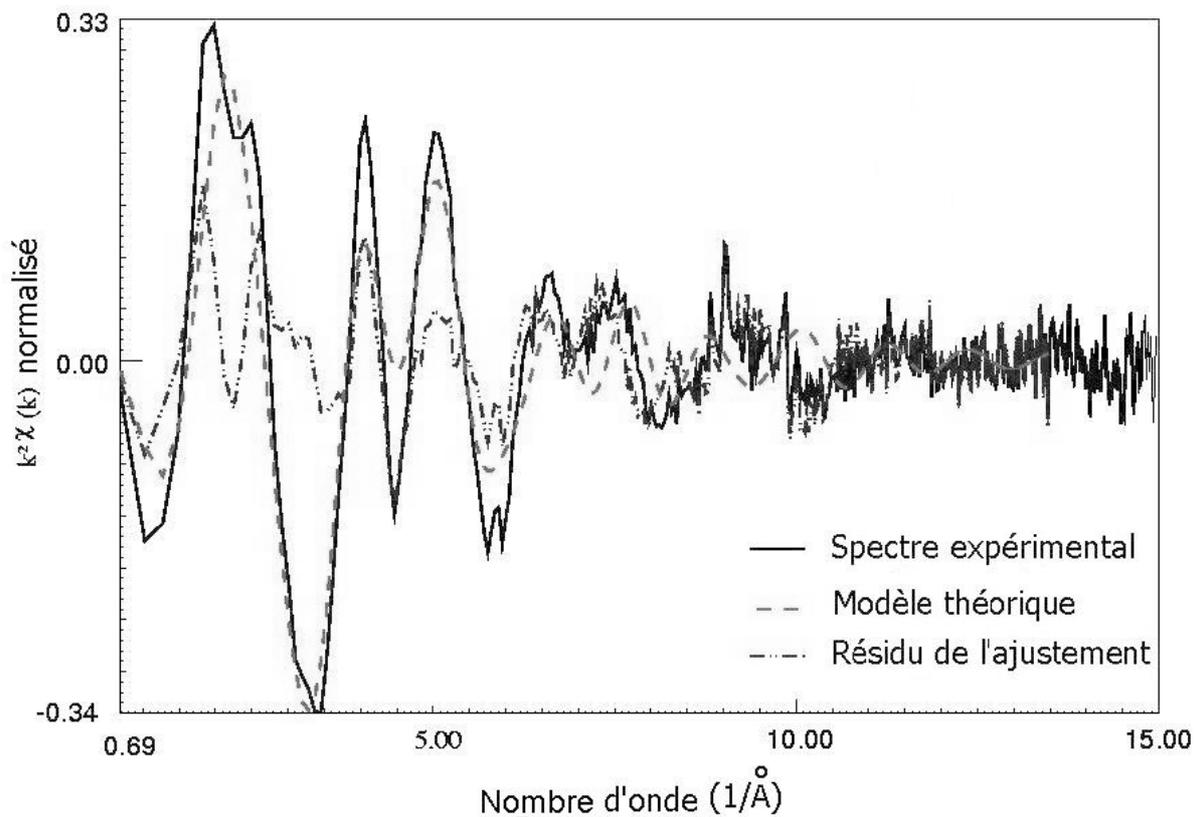


Figure 24: En haut, spectre des oscillations EXAFS du zinc en site II du calcium et en bas, spectre de la transformée de Fourier.

Cette hypothèse n'est pas valable car le résidu est très mauvais, ce qui veut dire que nous n'arrivons pas à reproduire toutes les contributions pour chaque pic.

La première observation des spectres a montré un seuil inhabituel pour le zinc. Cette configuration permet d'éliminer dès le départ l'hypothèse de l'hopéite et du phosphate tricalcique. De plus, l'allure du spectre est en faveur d'une localisation unique et bien définie du zinc.

D'après les différentes hypothèses étudiées et les résultats obtenus, nous sommes amenés à conclure que deux sites sont envisageables pour la localisation du zinc dans la structure de l'hydroxyapatite. En effet, les meilleures reproductions du spectre expérimental sont obtenues pour le zinc en substitution du calcium en site I et pour le zinc interstitiel. La simulation Monte Carlo donnerait le site interstitiel comme meilleur modèle, cependant, d'un point de vue chimique, le fait que le zinc soit en coordinence 2 serait très inhabituel.

Quant au zinc en substitution du calcium en site I, cette solution serait chimiquement plus envisageable, quoique le fait d'avoir deux atomes d'oxygène à une distance de 1,77 Å n'est pas commun. De plus, il est entouré de 9 atomes d'oxygène à des distances différentes. Les coordinences habituelles du zinc sont 4, 5, 6, 8, or nous ne sommes pas dans ce cas pour nos deux modèles. Nous pouvons expliquer ces anomalies en considérant que l'atome de zinc est plus petit que le calcium, ce qui lors de la substitution induit une distorsion de la maille.

Afin de bien mettre en évidence la localisation du zinc dans la structure apatite, il serait intéressant de réaliser d'autres expériences avec des concentrations en zinc plus élevées, comprises entre 800 µg/g, 5000 µg/g et éventuellement 10000 µg/g. De cette manière, nous devrions pouvoir résoudre le problème de sensibilité, mais le fait d'avoir des apatites avec une forte concentration en zinc pourrait entraîner des problèmes de faisabilité lors de l'incorporation en éléments dopants, surtout en conservant une structure apatite. D'autre part, au point de vue implantation, nous devrions tenir compte de la limite de toxicité du zinc.

Nous ne pouvons pas donner une localisation précise du zinc dans la structure de l'hydroxyapatite dopée, toutefois nous pensons plutôt à une substitution du calcium en site I. Les deux hypothèses pourraient expliquer la facilité de résorption de cette apatite lors d'implantation, du fait de l'instabilité de la structure engendrée par l'introduction du zinc. Un tableau récapitulatif (tableau 10) est présenté page suivante.

Hypothèses	Comparaison avec l'expérience	Choix
$Zn(OH)_4^{2-}$	Pas de Zn tétraédrique	Abandon
$Zn_3(PO_4)_2, 4H_2O$	Pas de similitude d'oscillations	Abandon
Phosphate tricalcique $\alpha$ ou $\beta$	Pas le même nombre de pics et pas au même endroit	Abandon
Substitution du calcium en site I	Bonne corrélation	Bonne concordance physico-chimique
Substitution du calcium en site II	Mauvaise reproduction	Abandon
Insertion du zinc entre les deux hydroxydes	Bonne corrélation	Incertitude d'un point de vue chimique

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des différentes hypothèses d'insertion du zinc dans la structure de l'hydroxyapatite.



# CHAPITRE VI

## CONCLUSIONS

Les analyses par activation neutronique et spectrométrie d'émission à source de plasma ont montré que les hydroxyapatites synthétiques étudiées ont des compositions semblables à celles des apatites pures. Les teneurs en calcium et en phosphore pour l'hydroxyapatite pure et pour celle dopée en manganèse sont tout à fait comparables. Pour ce qui est de l'hydroxyapatite dopée en zinc, nous avons noté une différence sur la quantité de calcium présent selon la méthode d'analyse. Cependant, la prise en compte des erreurs sur les mesures nous a permis de confirmer que la composition de l'HAP, Zn est compatible avec celle d'une apatite pure. Pour ce qui est des rapports Ca/P, ils sont du même ordre de grandeur que celui de l'hydroxyapatite théorique.

Afin de confirmer la structure apatite, des analyses cristallographiques par diffraction des rayons X ont été réalisées. Elles ont montré la présence de traces de phosphate tricalcique sous la forme  $\beta$  sans pour autant indiquer de variations des paramètres de maille. Les analyses par spectroscopie infrarouge ont confirmé l'influence du dopage du zinc sur les groupements phosphates avec un déplacement et un élargissement de ces bandes de vibration.

Nous pouvons conclure que nos hydroxyapatites ont bien une structure cristalline de type apatite avec, dans le cas de l'hydroxyapatite dopée en zinc, la présence d'une faible quantité de  $\beta$  - TCP.

L'étude de la localisation du zinc par EXAFS a conduit à deux solutions soit une substitution du calcium en site I par un atome de zinc soit l'insertion du zinc entre les deux hydroxydes. Une étude plus approfondie doit être envisagée pour justifier ce phénomène d'un point de vue chimique. En effet, les considérations physico-chimiques auraient tendance à appuyer la substitution du calcium en site I par un atome de zinc. Cependant, le fait que nous ayons suffisamment de place entre les deux hydroxydes et que nous pouvons avoir une distorsion de maille ne peut pas exclure radicalement la solution de l'insertion du zinc entre les deux hydroxydes, qui conduit à une meilleure modélisation du spectre expérimental.

L'association des résultats cristallographiques et structuraux précédents tendent à montrer que l'insertion du zinc dans l'apatite entraîne une déformation locale de la structure. Nous avons une modification de la longueur des liaisons internes à la maille concernée et pas de modification globale de la structure. Les deux solutions restent donc envisageables jusqu'à ce que nous ayons fait d'autres analyses avec des concentrations en zinc différentes de celles que nous avons utilisées. Ainsi, nous pourrions avoir une meilleure idée de la position de cet élément dans la structure apatite.

L'introduction du zinc dans la structure entraîne une déformation locale de la maille. Dans les deux cas, la position du zinc accélère la dissolution et conduit ainsi à un relargage éventuel de cet élément dans l'organisme. De plus, une analyse par MEB (microscopie électronique à balayage) a montré que l'hydroxyapatite dopée au zinc est beaucoup plus friable que l'hydroxyapatite pure. Cette dernière remarque confirmerait l'observation que nous avons faite sur la friabilité de l'apatite dopée. Le zinc est relargué plus facilement et contribue ainsi à la meilleure résorption de l'hydroxyapatite dopée (cf. Annexe I).



## **DEUXIEME PARTIE**

# **MISE EN EVIDENCE DES TRANSFERTS D'ELEMENTS ATOMIQUES ISSUS DES IMPLANTS METALLIQUES**



## INTRODUCTION

L'hydroxyapatite étudiée dans la première partie, a été utilisée pour un comblement, c'est à dire dans le cas d'un défaut osseux. Ce biomatériau sert aussi pour le revêtement des prothèses métalliques. Dans cette deuxième partie, nous allons nous intéresser aux prothèses métalliques couramment utilisées en chirurgie orthopédique, elles peuvent être recouvertes ou non de biomatériau. Ces prothèses métalliques mises en place dans le corps humain subissent des modifications entraînant le transfert d'éléments métalliques dans l'organisme avec ou sans dégradation. Le but de notre étude consiste à déterminer par une méthode physique d'analyse la contamination des tissus adjacents aux implants.

Les métaux sont utilisés depuis longtemps en tant que biomatériaux en chirurgie. La première mention d'implant métallique remonte au XVI<sup>ème</sup> siècle. Par la suite, à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle l'implantation de métaux dans le corps humain fut une suite d'échec. En effet, des descellements d'implant, dès les premiers jours, sont occasionnés, non seulement par des problèmes liés aux matériaux eux mêmes, mais suite aux infections en cours d'opération.

Au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, un grand nombre de métaux a été utilisé en tant qu'implants tels que le cuivre, l'aluminium, le zinc, l'argent... mais tous ont montré une grande réactivité dans l'organisme, donc ne sont pas utilisables. De nos jours, les matériaux couramment utilisés sont au nombre de trois : l'alliage fer-chrome-nickel, les alliages basés sur du cobalt-chrome et les alliages basés sur le titane.

Ces matériaux doivent répondre à certains critères tels que : la biocompatibilité et la « biofonctionnalité ». La biocompatibilité détermine la capacité du matériau à être toléré par l'organisme en réduisant les risques de rejet et la « biofonctionnalité » définit la capacité du matériau à conserver à long terme la fonction requise. De nombreux matériaux ont été utilisés avec succès en tant qu'implant métallique, cependant il faut prendre en compte les interactions de l'implant avec le milieu physiologique qui entraînent la dégradation du matériel. Cette dernière est principalement due à la présence d'ion chlorure (dans les fluides interstitiels), mais aussi à l'intervention de macromolécules et des protéines dans les fluides extracellulaires [43]. L'importance de la corrosion en chirurgie ne repose pas sur l'intégrité de la structure de l'implant mais sur le relargage de ces produits dans les tissus avoisinants pouvant à long terme conduire à un rejet de l'implant.

L'implant mis en place est protégé par une couche de passivation. La dégradation, résultant d'un ensemble de phénomènes comme la dissolution électrochimique et la présence de débris, induit une rupture de ce film d'oxyde.

Nous avons étudié deux types de tissus, les uns provenant de pièces anatomiques et les autres de prélèvements per-opératoires.

Dans le premier chapitre correspondant à cette deuxième partie (chapitre VII), nous décrirons les différents types d'échantillons que nous analysons, leur mode de prélèvement, leur localisation le long du fémur et leur préparation.

Pour l'analyse de nos tissus et la mise en évidence d'éventuelles contaminations par les éléments métalliques, nous avons utilisé la méthode d'analyse PIXE (*Particles Induced X-ray Emission*). Le principe de cette méthode et les conditions d'analyse seront décrits chapitre IX. Nous avons étudié l'évolution des éléments métalliques dans les tissus en fonction du type d'implant, des éléments présents et des pathologies rencontrées. Nous présenterons dans ce travail les deux types d'analyse réalisées sur des échantillons:

en cibles épaisses (>1mm) au CERI à Orléans afin de quantifier les concentrations présentes et de caractériser sous quelles formes a lieu la contamination. Nous avons également essayé de localiser l'endroit le long du fémur où nous avons la contamination la plus importante.

en cibles minces (<5µm) au CENBG de Bordeaux, pour mettre en évidence un gradient de migration et faire des cartographies pour visualiser la répartition de la contamination sur la surface.

Un grand nombre de mesures a été réalisé et a dû être analysé. Pour ce faire, une méthode d'analyse des données a été utilisée et sera présentée dans le dernier chapitre.

## CHAPITRE VII

### PREPARATION DES ECHANTILLONS A ANALYSER

Les expériences ont été effectuées sur des tissus musculaires et osseux prélevés autour d'implants métalliques. Nous disposons de deux types d'échantillons :

Ceux provenant de pièces anatomiques du Laboratoire d'Anatomie de la faculté de médecine de Clermont-Ferrand en collaboration avec le Professeur Guy Vanneuville. Ces échantillons nous permettront d'avoir une statistique convenable et mettront à notre disposition les différents cas de prélèvement, que nous pourrions rencontrer sur des tissus vivants.

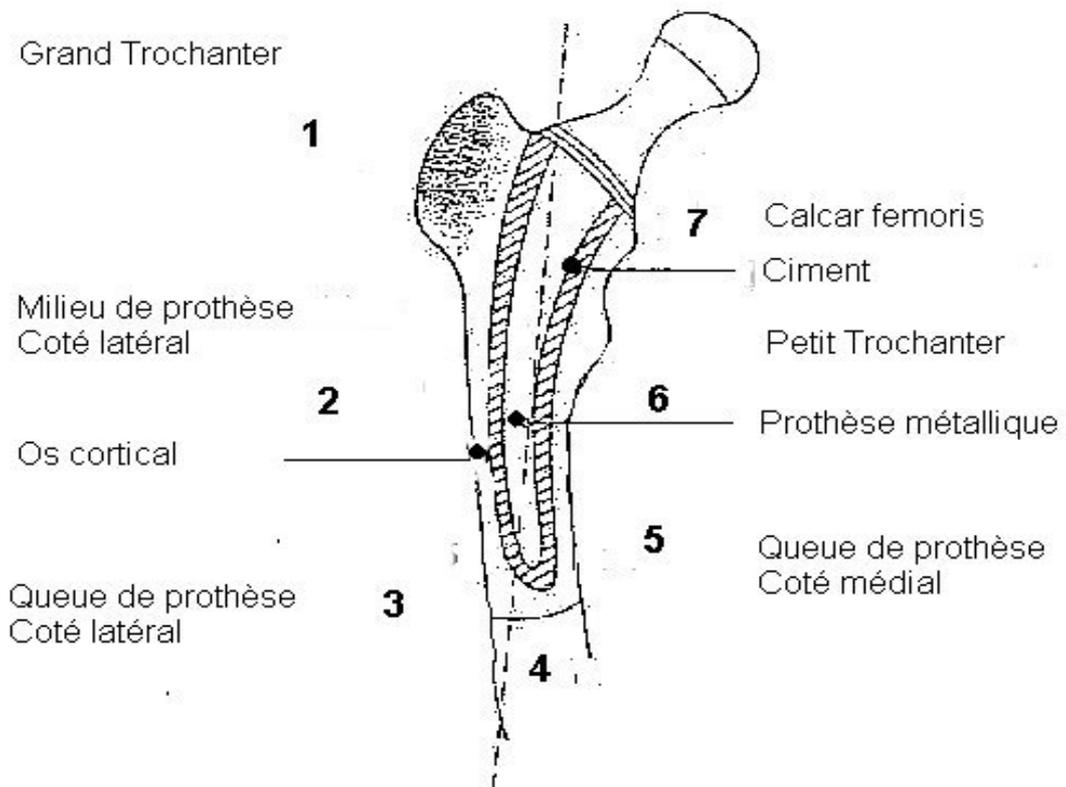
Ceux prélevés en per-opératoire lors d'une reprise de prothèse, au CHRU de Clermont-Ferrand avec le Professeur Sylvain Terver. Ces tissus sont prélevés lors de réopération de patients suite à des inflammations ou des complications médicales. Ils vont nous permettre de faire une corrélation entre l'état des tissus et la quantité d'éléments métalliques retrouvés dans l'organisme, principalement à proximité de l'implant à des profondeurs différentes.

#### I. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Les tissus prélevés au laboratoire d'Anatomie proviennent de pièces anatomiques, sans qu'aucune solution de conservation n'y soit injectée. Ils sont conservés dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les instruments métalliques utilisés pour les découpes des tissus ou des os ont été analysés et les résultats ont montré que le scalpel reste l'instrument le moins polluant [44]. Pour les échantillons découpés avec d'autres instruments, un resurfaçage à l'aide d'une scie diamantée est effectué à l'INRA de Theix. Les prélèvements sont réalisés autour de la prothèse comme le montre la figure 25a, avec à chaque fois que cela est possible des coupes composées de ciment, d'os et de tissu. Dans ce cas, nous avons l'opportunité de récupérer l'implant et d'en faire l'analyse par spectrométrie à étincelle (cf. Annexe II). Les échantillons sont au préalable orientés en précisant la face (P) de l'implant en contact avec le fémur et la face (L) (face la plus éloignée de l'implant). Ils sont placés dans une boîte en polyéthylène et conservés dans un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Les prélèvements per-opératoires se limitent généralement aux tissus capsulaires (figure 25b). Les instruments chirurgicaux utilisés pour la découpe des échantillons sont principalement le scalpel et les pinces. Dans le cas d'une reprise de prothèse totale, l'implant est récupéré et son état analysé. Une fois le prélèvement effectué, l'échantillon est découpé en petit cube de 1cm de côté et placé dans un tube en polypropylène qui est disposé dans un cryoconservateur à la température de l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Comme pour les échantillons anatomiques, le repérage de la face proche de l'implant est effectué à l'aide d'un fil.

a)



b)

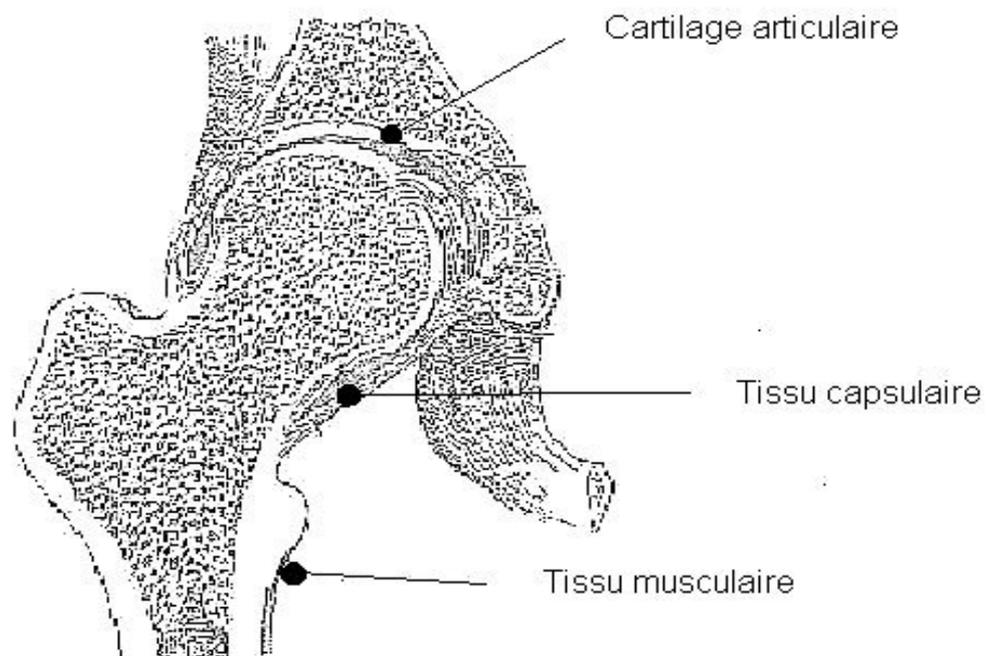


Figure 25 : En (a) prothèse implantée dans le fémur et en (b) coupe de l'articulation coxofémorale avec la localisation des prélèvements .

## II. PREPARATION DES ECHANTILLONS

### A. Echantillons en coupes épaisses

Pour effectuer les analyses par PIXE, il est nécessaire de réaliser une surface plane et régulière. En plus les échantillons doivent être déshydratés pour éviter les problèmes lors de la mise sous vide de la chambre d'analyse. Pour ce faire, ils sont disposés entre deux plaques de polyéthylène serrées à l'aide de 4 vis (figure 26). Une fois lyophilisé, ils sont recouverts avec une couche de carbone pour permettre l'écoulement des charges qui se créent à la surface des échantillons. Nous les conservons au réfrigérateur dans une boîte avec des grains de silice (déshydratant).

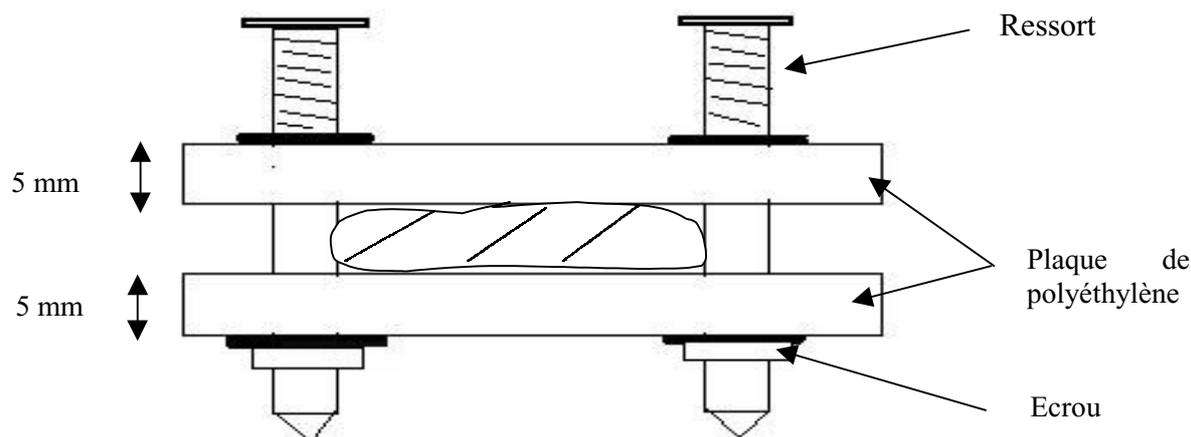


Figure 26 : Préparations des échantillons pour la lyophilisation

### B. Echantillons en coupes minces

Pour ces analyses, nous avons réalisé des coupes de 20  $\mu\text{m}$  dans le sens perpendiculaire à l'axe principal du fémur. Pour ce faire, les prélèvements doivent obligatoirement être à la température de l'azote liquide afin de garder leur rigidité pendant les coupes et ne pas occasionner de dégradation lors d'un réchauffement. Ils sont ensuite déposés sur un support de découpe et placés dans un cryomicrotome dont l'enceinte est fixée à  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Afin d'étudier l'évolution de la migration des éléments métalliques à proximité de l'implant en fonction de la distance, des coupes sériées tous les 40  $\mu\text{m}$  sur une épaisseur de 500  $\mu\text{m}$  à partir de la prothèse ont été réalisées. Par la suite, l'intervalle entre chaque coupe se fera en fonction du nombre total de coupes que nous pourrons effectuer. Ces dernières sont déposées sur un support en aluminium cylindrique de 2 cm de diamètre percé d'un trou de 2 mm en son centre. Pour maintenir l'échantillon et limiter la détérioration due à la lyophilisation, nous disposons au préalable un film de formvar de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les échantillons sont lyophilisés en les plaçant pendant une nuit dans un cryomicrotome.

### C. La lyophilisation

La lyophilisation, ou séchage à froid, est un procédé qui permet de retirer de l'eau contenue dans un produit, afin de le rendre stable à la température ambiante et ainsi faciliter sa conservation. C'est une technique naturelle de séchage.

La lyophilisation utilise le principe de la sublimation. Ceci consiste au passage d'un élément de l'état solide à l'état gazeux directement sans passer par l'état liquide. Dans le cas de l'eau que l'on veut retirer d'un produit, l'opération consiste à :

- congeler l'échantillon pour que l'eau soit sous forme de glace,
- ensuite, sous l'effet du vide, sublimer la glace directement en vapeur d'eau,

recupérer cette vapeur d'eau,  
une fois que toute la glace est sublimée, les échantillons sont séchés à froid et ils sont retirés de l'appareil.

Avantages :

La lyophilisation permet de conserver une grande partie des qualités des échantillons car ceux ci demeurent à une température sous le point de congélation durant la sublimation,  
Les échantillons lyophilisés ne nécessitent pas de réfrigération pour se conserver,  
Elle entraîne une diminution importante du poids.

Inconvénients :

La plupart des échantillons lyophilisés se réhydratent très rapidement si leur texture est poreuse. En effet, la lyophilisation n'entraîne pas de diminution de volume.

Dans notre cas, la lyophilisation permet d'éliminer l'eau mais pas les graisses, ce qui rend nos analyses plus complexes. Pour les conserver, nous les plaçons dans une boîte hermétique avec un dessiccateur, permettant ainsi de limiter leur réhydratation.

## CHAPITRE VIII

# MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)

Cette technique d'analyse est utilisée pour caractériser des échantillons d'un point de vue morphologique mais également pour déterminer leur composition. Elle servira à déterminer la nature des particules retrouvées dans les tissus capsulaires adjacents aux prothèses pollués par le métal.

### I. PRINCIPE

Le microscope électronique est composé d'un canon à électrons, d'un système de condensateurs magnétiques permettant de régler la convergence du faisceau, d'un objectif, d'un système optique de projection permettant de visualiser une image sur un écran phosphorescent, ainsi que d'un système de pompage pour faire le vide à l'intérieur de la colonne du microscope. Les électrons arrêtés se traduisent par des zones sombres sur un film photographique et les électrons transmis par des zones claires. Différents détecteurs sont placés de part et d'autre de l'échantillon tels qu'un spectromètre de dispersion d'énergie des rayons X et des détecteurs d'électrons transmis. Ces derniers sont placés sous l'écran d'observation et permettent d'obtenir une image de l'échantillon.

Cette méthode consiste à envoyer un faisceau d'électrons sur notre échantillon. Les électrons incidents sont principalement transmis, diffusés élastiquement et inélastiquement. L'autre phénomène qui nous intéresse est l'émission de rayons X qui nous permettra de déterminer les éléments présents. L'ensemble des phénomènes est récapitulé figure 27. La microscopie électronique à transmission dans sa configuration de base, ne permet pas d'observation de tissus vivants et nécessite une préparation particulière.

### II. PREPARATION DES ECHANTILLONS

#### *A. La fixation*

Les observations en MET nécessitent la conservation des structures correspondant à l'état vivant. Le but de la fixation chimique est de stabiliser la matière vivante en rendant les molécules instables dans l'eau, dans les solvants et de bloquer les systèmes enzymatiques.

Les contraintes de cette fixation sont de respecter le mieux possible les caractéristiques physico-chimiques des fluides cellulaires. Il est donc nécessaire d'utiliser des fixateurs à pénétration et à action rapides et de traiter des échantillons de petit volume ( $\sim 1\text{mm}^3$ ). Nous fixons nos échantillons dans un mélange d'une solution tampon de cacodylate de sodium et de glutaraldéhyde. Les tissus sont ensuite rincés dans la solution tampon seule.

#### *B. L'inclusion*

Avant toute inclusion dans des résines non hydrosolubles, il est indispensable de déshydrater les échantillons. Ceci s'effectue à température ambiante et dans une série de bains d'alcool éthylique croissant ( $70^\circ$ ,  $95^\circ$ ) jusqu'à l'éthanol absolu ( $100^\circ$ ). Afin de favoriser la pénétration de la résine dans les tissus, ces derniers sont plongés dans une solution d'oxyde de propylène et par la suite dans un mélange de résine époxy et d'oxyde de propylène. La résine époxy est insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants et donne une bonne dureté pour les coupes et une grande stabilité sous le faisceau d'électrons. Les échantillons sont mis dans des gélules et laissés 3 jours dans une étuve afin de réaliser la polymérisation.

La résine est préparée à partir d'une solution mère (Taab) à laquelle nous ajoutons du NMA (Nadic Meyhyl Anhydride), du DDSA (Dodeceny Succenic Anhydride) et du DMP30 qui est un accélérateur de polymérisation (2-4-6 Tridiméthylaminométhyl Phenol).

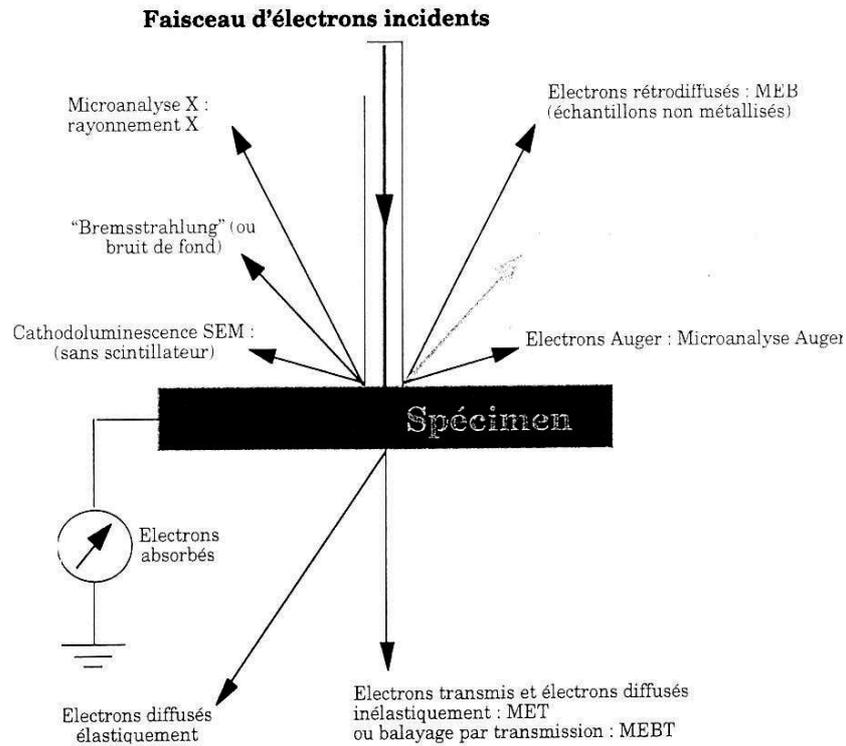


Figure 27 : Schéma récapitulatif des différents phénomènes engendrés au cours de l'interaction électron- matière.

### C. La découpe

Des coupes ultrafines de 200 nanomètres ont été réalisées avec un ultracryomicrotome (Leica Ultracut E) muni d'un couteau en diamant. Les sections non calcifiées ont été recouvertes d'une couche conductrice de carbone afin d'éviter les effets de charges et déposées sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone.

La grille est placée sur un support en béryllium et transférée dans la chambre d'analyse. Les coupes sont observées avec un microscope électronique à transmission Philips CM30 portée à une tension de 100 kV. La taille du faisceau est de l'ordre de 80 nm. Les profils élémentaires sont effectués du centre vers la périphérie de la particule en utilisant un spectromètre à dispersion d'énergie de rayons X. Un détecteur Si(Li) avec une fenêtre ultrafine et couvrant un angle solide de 0.13 sr est utilisé.

### III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### A. Prothèse à base d'alliage titane

Les images obtenues montrent comment sont réparties les particules métalliques dans un tissu fémoral.

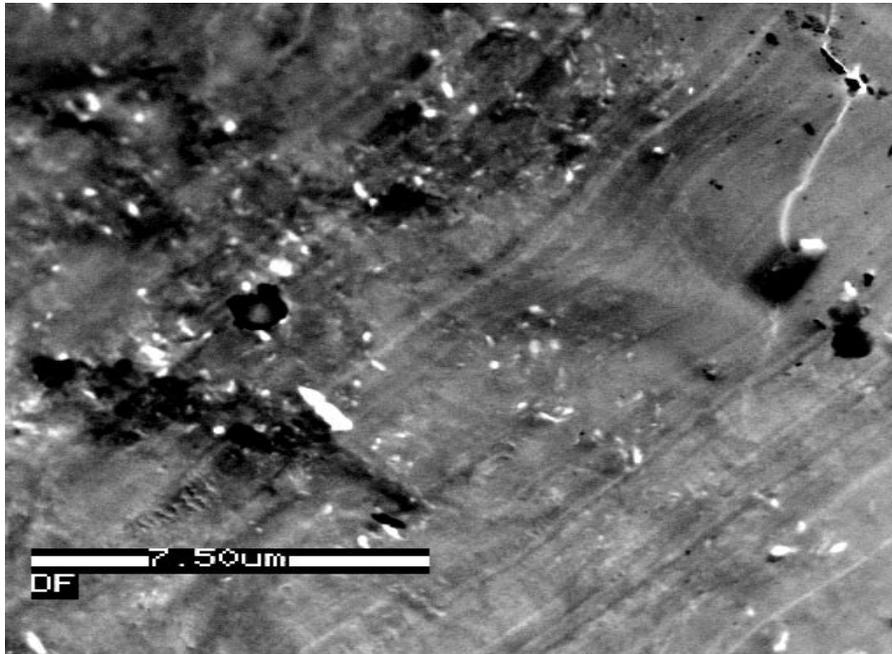


Figure 28 : Image par microscopie à transmission d'un tissu capsulaire «métallosé».

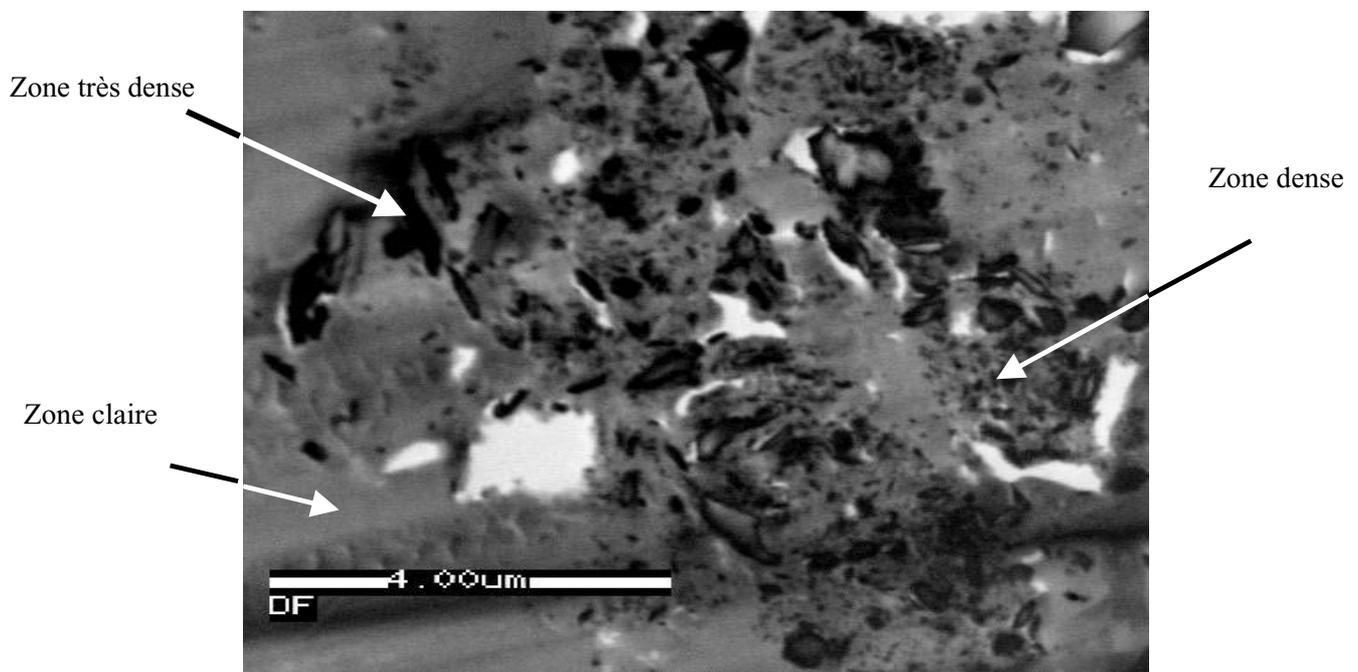


Figure 29 :Grossissement d'une zone contenant des éléments métalliques.

Nous constatons la présence de plusieurs niveaux de gris caractéristiques de la répartition métallique (figures 28 et 29). Les zones denses aux électrons correspondent à des métaux et les zones claires à du tissu mou. La localisation des métaux est hétérogène sur la surface du tissu.

	Zone très dense					Zone dense					Zone claire				
Ti	76	59	67.4	61	32.5	0	0	0	0	0	0	2.3	0.5	0	0.5
Al	5.3	2.1	2.0	2.1	3.2	47	69.1	60.9	57.5	62.1	0.4	0.8	0.8	2.3	0.9

Tableau 11 : Concentration en % de titane et d'aluminium dans les différentes zones

Les zones très denses aux électrons correspondent à des particules provenant de la prothèse. Nous retrouvons en effet le même rapport en éléments métalliques que dans les prothèses. Les zones un peu moins denses représentent des particules en cours de dégradation. Suivant les cas, nous pouvons avoir absence de titane comme dans celui signalé dans le tableau 11, mais nous avons également la présence de trace de titane dans certains autres (de l'ordre de 1%). Pour les zones claires, il ne reste que des traces de métaux. Les débris de prothèse peuvent être dissous au contact des fluides physiologiques ou être présents sous forme ionique et non de particules.

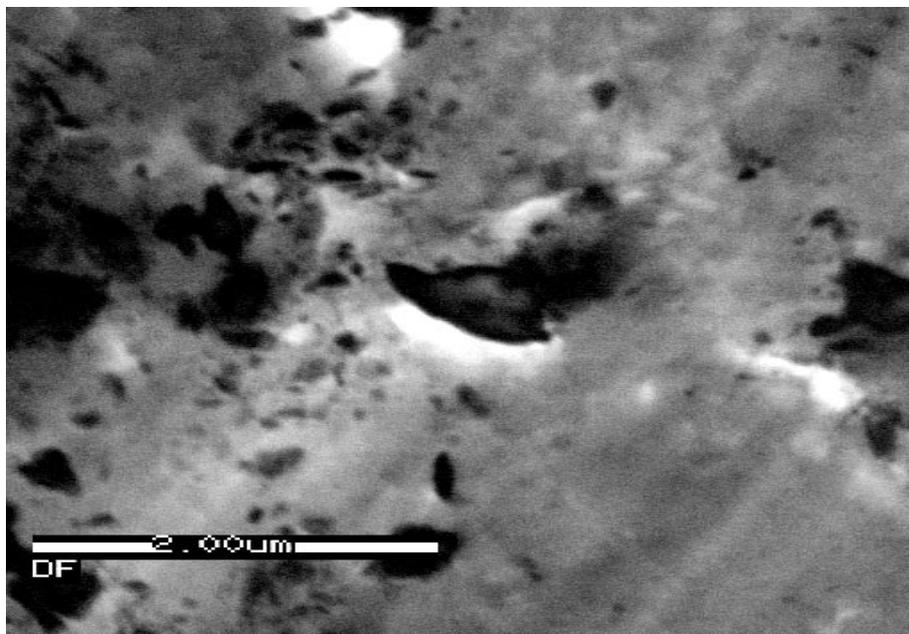


Figure 30 : Taille d'une particule et détermination de sa composition

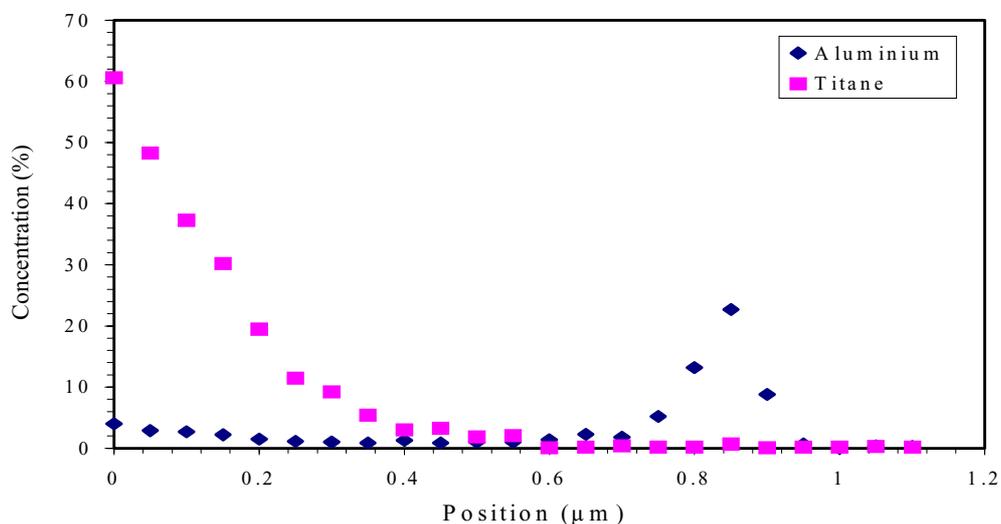


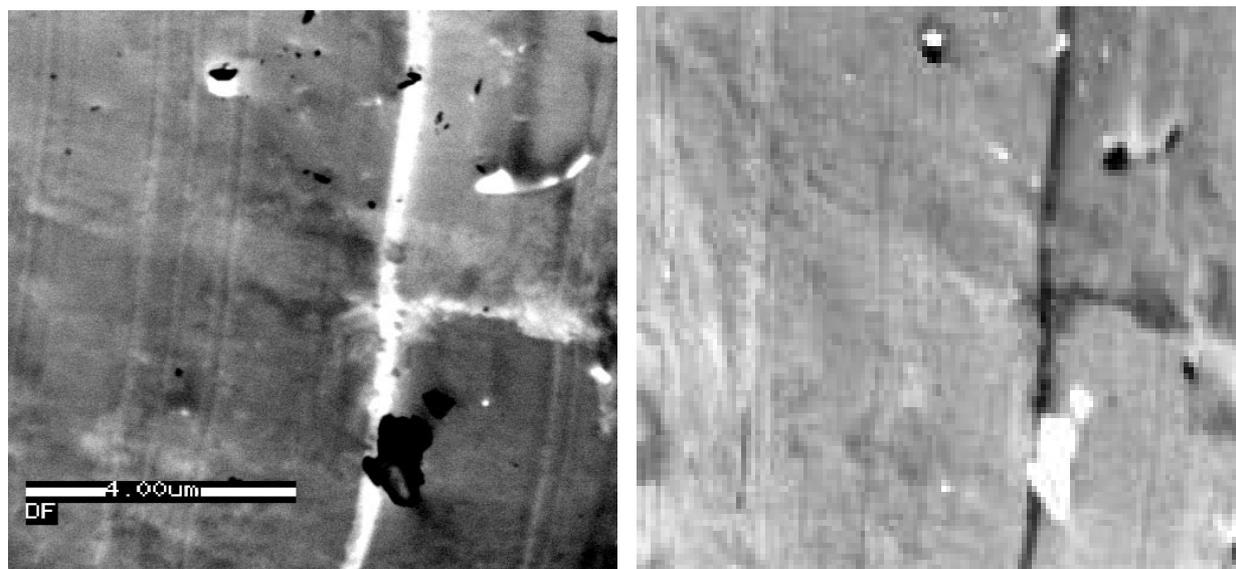
Figure 31 : Profil d'un débris relargué en partant du centre jusqu'au tissu mou.

Nous traversons les trois zones décrites précédemment (figures 30 et 31). Un débris a la même composition que la prothèse en son centre, puis la dissolution dans les liquides physiologiques a permis au titane de migrer, voir de se lier à d'autres molécules et il ne nous reste plus que de l'aluminium. Le profil, porté figure 31, montre que les particules de titane sont entourées d'aluminium et que par la suite, il s'effectue une dissociation entre les deux, probablement due à l'action cellulaire (cf. Annexe IV).

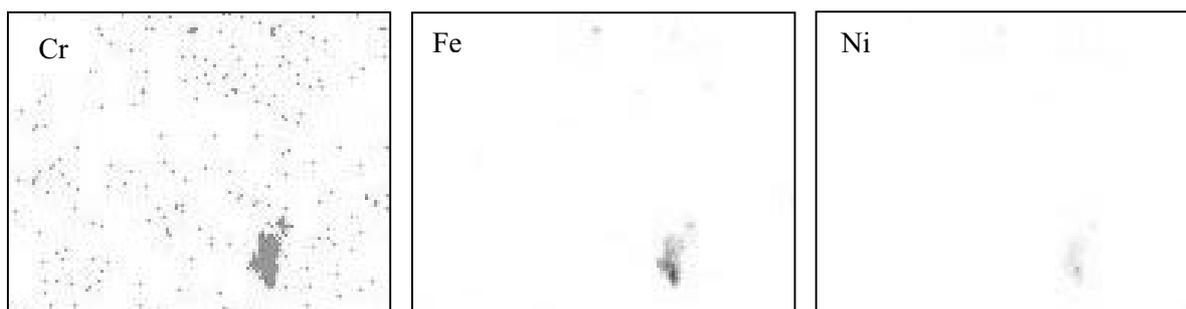
Les particules forment un amas dans lequel nous avons des débris issus de la prothèse, des ions métalliques seuls puis disparition de ces éléments. Cette répartition est hétérogène et aléatoire.

### ***B. Prothèse à base d'inox***

Deux types d'images ont été réalisés, nous aurons des images STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) et des cartographies de chacun des éléments majeurs (figures 32 et 33).



*Figure 32 : Images par STEM et cartographie d'un alliage à base d'inox*



*Figure 33 : Cartographies du chrome, du fer et du nickel.*

Nous constatons que les éléments sont localisés au même endroit dénotant ainsi la présence d'un débris de prothèse. L'emplacement de ce fragment correspond à la tache la plus concentrée. Tout autour, une sorte d'auréole apparaît, pouvant être interprétée comme une dissolution. Cette dernière semble plus ou moins importante suivant l'élément considéré.

### C. Prothèse à base de cobalt

Nous avons pratiqué la même expérience sur un tissu prélevé à proximité d'une prothèse à base de cobalt (figures 34 et 35).

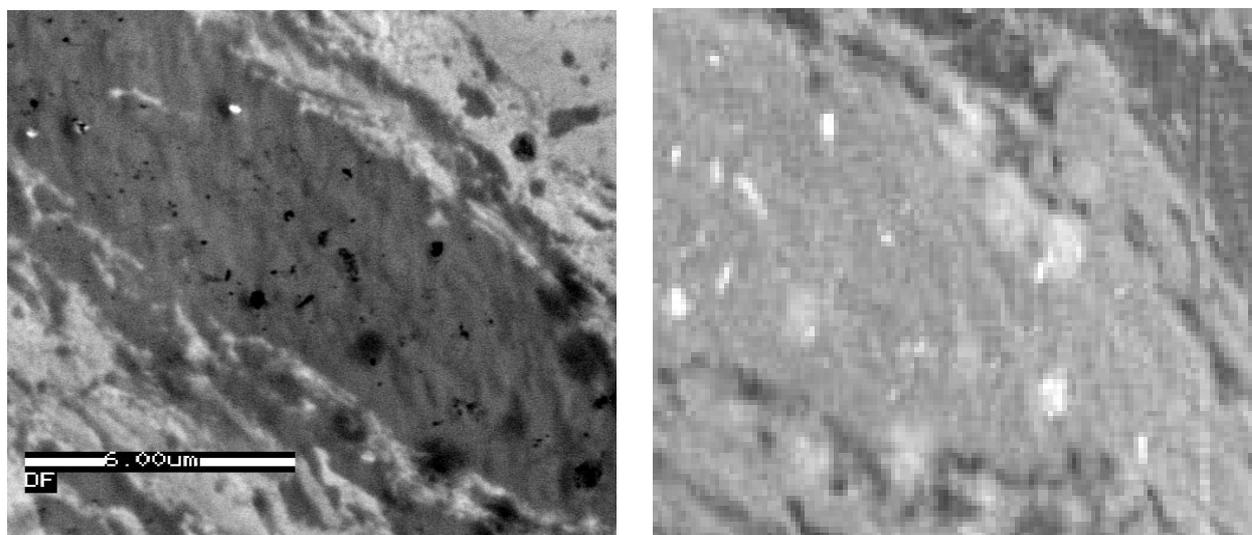


Figure 34 : Images par STEM et cartographie d'un alliage à base de cobalt



Figure 35 : Cartographies du cobalt et du chrome

Nous pouvons constater que la répartition des deux éléments n'est pas identique. En effet, nous observons une sorte de « dissolution ionique » des éléments dans le tissu. Nous avons cependant la présence de quelques débris démontrant que nous devons avoir au préalable une plus grosse particule.

## IV. CONCLUSION

L'analyse de ces trois types d'échantillons métallisés, nous a permis de mettre en évidence différentes possibilités de migration et de comportement des éléments métalliques dans les tissus. En effet, trois cas de figures peuvent se présenter :

- Un fragment de prothèse comprenant tous les éléments majeurs de l'implant (zone très dense aux électrons sur les figures 28, 29, 30, 32 et 34)

- Des particules en cours de dissolution (zone dense sur les figures 30 et 33 pour les cartographies par exemple)

- Des débris dissous agglomérés en certains endroits du tissu (figures 34 et 35).

Lors de la dissolution nous pouvons remarquer que nous avons beaucoup plus de chrome que de cobalt dans le tissu (figure 35). Ceci pourrait suggérer que cet élément migre moins vite que le cobalt. Dans tous les cas, nous avons la présence d'une contamination ionique tout autour du fragment, et dans tout le tissu.

La microscopie électronique à transmission nous a permis d'étudier la structure tissulaire de 3 échantillons métallosés pour chaque type de prothèse. Cette statistique est insuffisante pour faire une conclusion générale sur le comportement des éléments métalliques dans les tissus avoisinants des implants métalliques. Cependant, nous avons pu montrer l'existence de trois phénomènes distincts pouvant nous aider à comprendre le mécanisme réactionnel de l'organisme à un corps métallique.

Des analyses quantitatives plus précises vont être réalisées à l'aide de la méthode PIXE.



## CHAPITRE IX

### PRINCIPE ET CONDITIONS D'ANALYSE PAR PIXE (PARTICULE INDUCED X-RAYS EMISSION)

La méthode PIXE est utilisée pour doser les éléments atomiques majeurs et traces présents dans des échantillons. Dans ce travail, nous avons analysé des tissus autour de prothèses de hanche et réalisé des cartographies élémentaires de certaines zones d'intérêt.

Cette méthode présente des avantages par rapport à d'autres méthodes de fluorescence X :

La sensibilité se situe au niveau du  $\mu\text{g/g}$ .

La précision des analyses est meilleure que 10%.

L'analyse est multiélémentaire, pour des éléments de numéro atomique supérieur ou égal à 11.

La taille du faisceau est réglable et peut atteindre quelques microns.

Une combinaison possible avec d'autres méthodes d'analyse : Nuclear Reaction Analysis (NRA), Particle Induced Gamma Emission (PIGE)...

#### I. PRINCIPE

##### A. Production du rayonnement X

La méthode analytique PIXE est fondée sur la spectrométrie des rayons X produits par des faisceaux de particules chargées issues d'accélérateur. Comme l'indique la figure 36, l'échantillon est bombardé par un faisceau de particules chargées, généralement des protons. Quand un proton interagit avec un atome, il peut éjecter un électron d'une couche profonde (niveau K). Celui-ci est remplacé par un autre électron, venant de la couche supérieure (niveau L ou M), avec émission d'un photon. Ce dernier électron peut être remplacé par un autre venant de la couche plus externe, avec émission d'un second photon appartenant à la raie L ou M...Le cortège est ainsi réarrangé. Le spectre obtenu est caractéristique de l'atome.

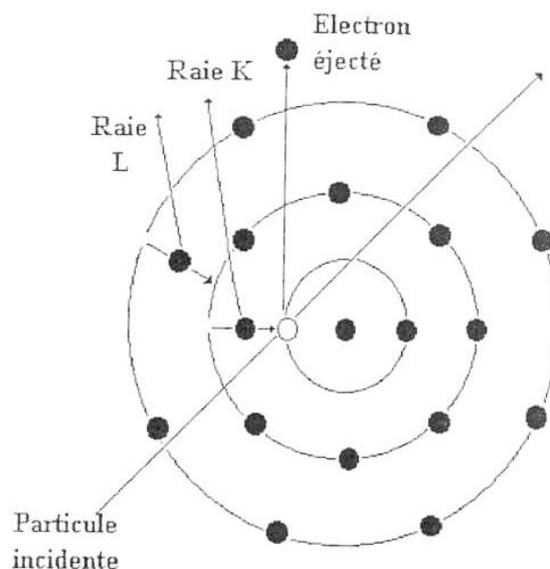


Figure 36 : Interaction d'un proton avec les électrons de cœur d'un atome.

Ce réarrangement s'accompagne de deux phénomènes :

soit d'une émission de rayonnement X d'énergie égale à la différence des énergies de liaison des deux niveaux concernés (transition radiative, fluorescence X),  
soit de l'émission d'un électron Auger, auquel cette énergie est transférée (transition non radiative).

Ces deux modes de désexcitation sont en concurrence et conduisent à un rendement de fluorescence  $\omega_x$  et à un rendement d'émission Auger  $a_k$ . Ce dernier est prépondérant aux plus bas numéros atomiques [45] (figure 37).

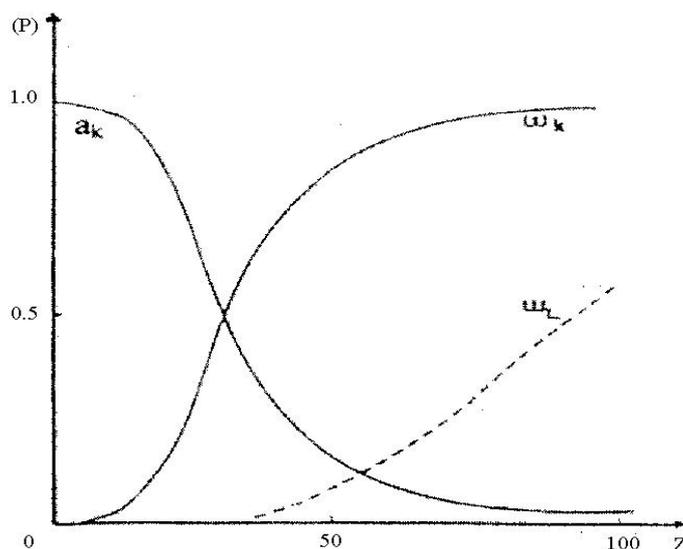


Figure 37 : Variation du rendement de fluorescence  $\omega_k$  et  $\omega_l$  des couches K et L en fonction du numéro atomique Z. Variation du rendement d'émission Auger  $a_k$  pour la couche K.

### B. Section efficace de production des raies X

L'interaction entre un électron lié à un atome et une particule incidente accélérée est de type coulombienne. Pour des particules incidentes d'énergie comprise entre 1 et 5 MeV (gamme d'énergie utilisée en PIXE), deux modèles principaux permettent de calculer la section efficace d'ionisation :

#### Le modèle PWBA (approximation de Born en onde plane)

L'interaction des particules incidentes/cible est traitée comme une perturbation dans laquelle l'atome se retrouve dans un état excité et le calcul de cette probabilité de transition est faite dans les cas de l'approximation de Born en onde plane. Ce modèle rend compte de la dépendance de la section efficace d'ionisation avec l'énergie et le numéro atomique de la cible. Ces prédictions sont meilleures à hautes énergies.

#### Le modèle BEA (approximation du choc binaire)

Il simplifie l'interaction binaire régie par les lois classiques entre le proton et l'électron. On considère qu'il y a échange d'énergie entre la particule et l'électron lié, le reste de l'atome cible étant spectateur de l'interaction.

Les modèles PWBA et BEA sont en bon accord avec l'expérience mais conduisent à des formules théoriques extrêmement complexes, d'où la mise au point de tables de valeurs. Pour les énergies habituellement utilisées en PIXE, la section efficace d'ionisation est une fonction croissante de l'énergie de la particule incidente, et, à énergie fixée, diminue lorsque le numéro atomique de l'atome considéré augmente.

Si  $E/A$  représente l'énergie par nucléon du projectile, la variation de la section efficace est en  $(E/A)^4$ , ce qui explique le choix des protons par rapport aux particules  $\alpha$  : pour une même section efficace, les protons nécessitent moins d'énergie (figure 38).

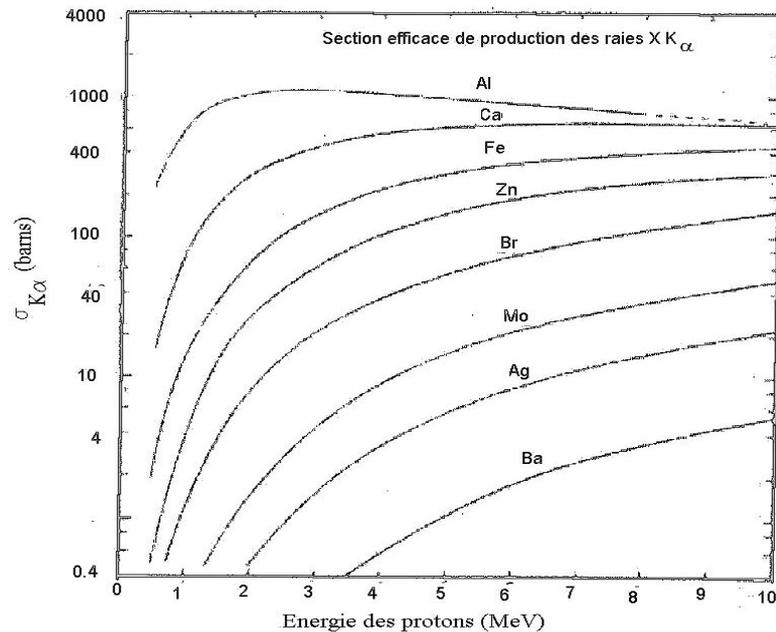


Figure 38 : Variation des sections efficaces de production des rayons X en fonction de l'énergie du proton incident pour des cibles de numéro atomique  $Z$  variable.

### C. Emission d'un spectre continu

Les raies d'émission caractéristiques des atomes de la cible sont superposées à un bruit de fond. Ce phénomène est une limite à la sensibilité de détection puisqu'il peut masquer, partiellement ou totalement, l'émission caractéristique. Il est nécessaire de comprendre le mécanisme de production de ce continuum de rayons X afin de déterminer les conditions permettant de réduire l'intensité de ce rayonnement continu dans une analyse PIXE.

Le bruit de fond est essentiellement constitué par le rayonnement de freinage des électrons secondaires et, à haute énergie, par le rayonnement de freinage des projectiles ou la diffusion Compton des photons  $\gamma$  dans le détecteur.

#### ~ Rayonnement de freinage des projectiles :

Il est dû au ralentissement de l'ion incident lors de l'interaction avec la matière. Il présente une distribution énergétique continue qui s'étale de zéro jusqu'à l'énergie cinétique initiale des projectiles incidents.

La section efficace de ce phénomène est la suivante [46] :

$$\frac{d\sigma}{dE_X} = C \frac{A_p Z_p^2 Z_C^2}{E_p E_X} \left[ \frac{Z_p}{A_p} - \frac{Z_C}{A_C} \right]^2 \quad \text{Équation 21}$$

$C$  : Constant en première approximation, compris entre 2 et 3 eV/barns.

$E_x$  : Energie de rayonnement du bruit de fond.

Indices  $p$  et  $c$  : Correspondent respectivement au projectile et à la cible.

$Z$  et  $A$  : Charge et masse de l'élément considéré.

Cette relation indique que la section efficace de production de ce rayonnement continu diminue lorsque l'énergie des projectiles augmente.

En terme classique, l'intensité de ce rayonnement est proportionnelle au carré de l'accélération, donc au terme  $(F/m)^2$  où  $F$  est la force d'interaction coulombienne et  $m$  la masse du projectile. L'intensité du Bremsstrahlung produit par les protons est en première approximation de l'ordre de  $1836^2$  fois moins intense que celle du Bremsstrahlung produit par les électrons. Cependant, contrairement à l'irradiation par des électrons de 50 keV, des protons d'énergie de quelques MeV/nucléons induisent, dans la matière, des réactions nucléaires, qui engendrent un rayonnement continu se superposant à celui créé par les projectiles incidents.

#### ~ Rayonnement de freinage des électrons secondaires

Il constitue le bruit de fond prépondérant en PIXE aux basses énergies des rayons X. Lorsque les projectiles éjectent des électrons des atomes de la cible, ces électrons secondaires subissent à leur tour des interactions avec les atomes de l'échantillon en perdant leur énergie : ils sont ralentis par interaction coulombienne avec les noyaux atomiques et donnent naissance à un rayonnement continu de basse énergie [47].

L'énergie maximale  $E_{x \max}$  transférable à un électron par une particule d'énergie  $E_p$  est :

$$E_{x \max} = \frac{4m_e}{M_p} E_p \quad \text{Équation 22}$$

$m_e$  et  $M_p$  sont les masses de l'électron et du projectile

Ce rayonnement diminue rapidement au-delà de l'énergie  $E_{x \max}$  mais reste la contribution prépondérante de l'émission continue aux énergies inférieures à  $E_{x \max}^e$  [47]. Pour une énergie de protons de 3 MeV par exemple, la valeur de  $E_{x \max}^e$  est de 6,52 keV.

#### ~ Diffusion Compton

Ce bruit de fond est dû à la présence d'éléments légers qui ont une section efficace de réaction nucléaire non négligeable. Le rayonnement  $\gamma$  émis au cours des réactions nucléaires peut interagir avec le cristal du détecteur par diffusion Compton. Sur le spectre X apparaît alors un continuum jusqu'à l'énergie du front Compton. L'intensité de cette émission augmente avec l'énergie du photon [48].

#### ~ Facteurs instrumentaux

Sur le spectre de rayons X, les raies d'émission peuvent être dissymétriques, ce qui se traduit par la présence d'une traînée du côté des basses énergies des pics caractéristiques. Elle est due à la collection incomplète des charges dans la zone morte du détecteur et à la présence de pics radiatifs Auger situés en général à quelques centaines d'eV avant les raies  $K_\alpha$  et  $K_\beta$ . Il est alors souvent difficile de détecter des éléments de numéro atomique inférieur à celui de l'élément majeur, à l'état de trace.

La diffusion de Rutherford : les protons rétrodiffusés sur la cible par RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry), phénomène important en particulier quand la cible est composée d'éléments lourds, peuvent pénétrer dans le cristal du détecteur qui est alors saturé. On peut augmenter l'épaisseur du filtre placé devant le détecteur et/ou réduire l'énergie du faisceau incident pour diminuer l'intensité de ce bruit de fond.

### **D. Pics d'échappement et pics somme**

En plus des raies caractéristiques des éléments présents dans notre échantillon, nous devons tenir compte des raies représentées par des pics d'échappements et des pics sommes.

### ~ Pics d'échappement

Ils résultent de l'échappement des rayons X du silicium ou du germanium suite aux interactions photoélectriques près de la surface du détecteur. Lorsqu'un photon X pénètre dans un détecteur à semi-conducteur, il est totalement absorbé par effet photoélectrique sur un niveau profond. Cette absorption est suivie soit d'une émission Auger, soit d'une émission radiative. Dans ce dernier cas, une partie de l'énergie initiale est perdue et correspond à l'énergie de photon émis : 1,74 keV dans le cas d'un détecteur au silicium, 9,88 keV pour un détecteur au germanium.

### ~ Pics sommes

Lorsque deux impulsions associées à deux photons X de même énergie caractéristique d'un élément présent en forte concentration arrivent quasi simultanément dans l'amplificateur, ce dernier ne peut les séparer. Il apparaît sur le spectre une augmentation de l'intensité du rayonnement continu s'étalant depuis l'énergie du rayonnement caractéristique au double de cette énergie (pic de la somme des deux énergies confondues). Ces pics peuvent être confondus avec des raies d'éléments existant dans la cible. Néanmoins, ils ont la particularité d'être dissymétriques. On peut avoir des effets d'empilement du continuum sur des raies caractéristiques. Il est possible de réduire ce phénomène d'empilement en utilisant des filtres adaptés devant le détecteur afin de réduire le taux de comptage des rayons X.

## II. ANALYSE SEMI QUANTITATIVE

### A. *Intensité d'une raie caractéristique en cible épaisse.*

L'intensité  $I_j$  d'une raie ( $K_\alpha$  par exemple) caractéristique d'un élément  $j$ , mesurée consécutivement à l'émission des photons produits par une couche d'épaisseur  $\rho dz$  ( $g/cm^2$ ) suite à l'irradiation d'un faisceau de protons d'énergie incidente  $E_0$  [46] est :

$$dI_j = N_p \sigma_j(E) \frac{N_A}{M} C_j \rho dz \quad \text{Équation 23}$$

avec  $N_p$  : Nombre de protons incidents  
 $N_A$  : Nombre d'Avogadro.  
 $\rho$  : Masse volumique de l'échantillon  $g/cm^3$ .  
 $M$  : Masse atomique.  
 $C_j$  : Concentration massique

$$\sigma_j(E) = \sigma_{ion}(E) \varpi P_{K_\alpha} \quad \text{Équation 24}$$

avec  $\sigma_{ion}(E)$  : Section efficace d'ionisation ( $cm^2$ ) du niveau K de l'élément  $j$  à l'énergie  $E$   
 $\varpi$  : Rendement de fluorescence de l'élément  $j$  pour une couche concernée.  
 $P_{K_\alpha}$  : Probabilité de la transition  $K_\alpha$  observée.

La représentation donnée figure 39 définit les grandeurs intervenants dans le calcul de l'intensité mesurée.

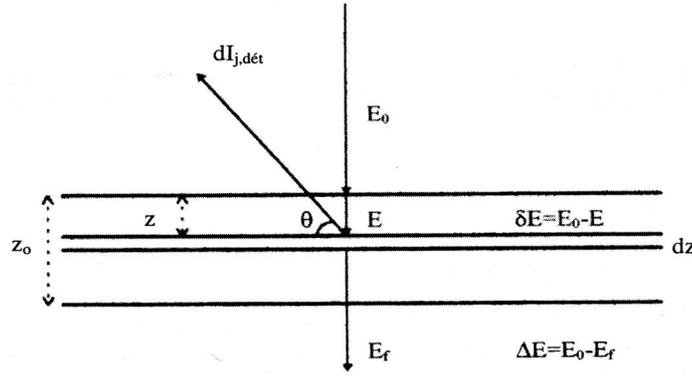


Figure 39 : Signification des paramètres intervenant dans le calcul de l'intensité mesurée

Soit  $Q$  la charge totale reçue par l'échantillon, et  $(+ e)$  la charge du proton, on pose :

$$N_p = \frac{Q}{E} \quad \text{Équation 25}$$

Le nombre de rayons X émis dans la couche  $dz$  est :

$$dI_j = \frac{\rho}{E} Q \sigma_j(E) \frac{N_A}{M} C_j dz \quad \text{Équation 26}$$

Le nombre de rayons X détectés à un angle  $\theta$  est :

$$dI_{j,det} = dI_j \frac{d\Omega}{4\pi} \eta \varepsilon \exp\left(-\frac{\mu \rho z}{\sin \theta}\right) \quad \text{Équation 27}$$

- avec
- $d\Omega$  : Angle solide de détection.
  - $\varepsilon$  : Efficacité du détecteur
  - $\eta$  : Coefficient d'absorption par le milieu compris entre la surface de l'échantillon et le détecteur.
  - $\mu$  : Coefficient d'atténuation massique de l'échantillon pour l'énergie de la radiation  $K_\alpha$  caractéristique de l'élément  $j$ .
  - $\theta$  : Angle entre le faisceau incident et le détecteur

En combinant les deux relations précédentes, on obtient :

$$dI_{j,det} = A Q \sigma_j(E) C_j \exp\left(-\frac{\mu \rho z}{\sin \theta}\right) \rho dz \quad \text{Équation 28}$$

avec 
$$A = \frac{1}{E} \frac{d\Omega}{4\pi} \eta \varepsilon \frac{N_A}{M}$$

$A$  est un facteur constant pour la raie étudiée et ne tient compte que de la géométrie et de l'efficacité du détecteur.

Après intégration de cette dernière relation, on obtient l'intensité mesurée pour l'épaisseur totale de l'échantillon :

$$I_j = \int_0^{Z_0} dI_{j,det} = A Q C_j \int_0^{Z_0} \sigma_j(E) \exp\left(-\frac{\mu \rho z}{\sin \theta}\right) \rho dz \quad \text{Équation 29}$$

$Z_0$  : épaisseur totale de l'échantillon

avec  $S(E) = -\frac{dE}{\rho dz}$  pouvoir d'arrêt en MeV/g/cm<sup>2</sup> et  $T(E) = \exp\left(-\frac{\mu_{jE_0}^E}{\sin\theta} \frac{dE}{S(E)}\right)$  terme de transmission

des protons dans la cible, on obtient en terme d'énergie :

$$I_j = AQC_j \int_{E_0}^{E_f} \frac{\sigma(E) T(E)}{S(E)} dE \quad \text{Équation 30}$$

$E_0$  et  $E_f$  sont respectivement l'énergie initiale et finale.

Cette formule nous montre que l'intensité détectée dépend directement de l'épaisseur de l'échantillon.

### B. Influence de l'épaisseur de l'échantillon sur l'intensité mesurée.

Il faut tenir compte des effets de matrice suivants :

- perte d'énergie des particules due au ralentissement dans la matrice avec variation de la section efficace d'ionisation,
- auto absorption dans la cible du rayonnement X émis,
- effets d'irrégularité de surface.

Cependant, en fonction de l'épaisseur de la cible, l'importance des effets de matrice varie considérablement. La variation de l'intensité mesurée en fonction de la masse superficielle de l'échantillon est représentée figure 40.

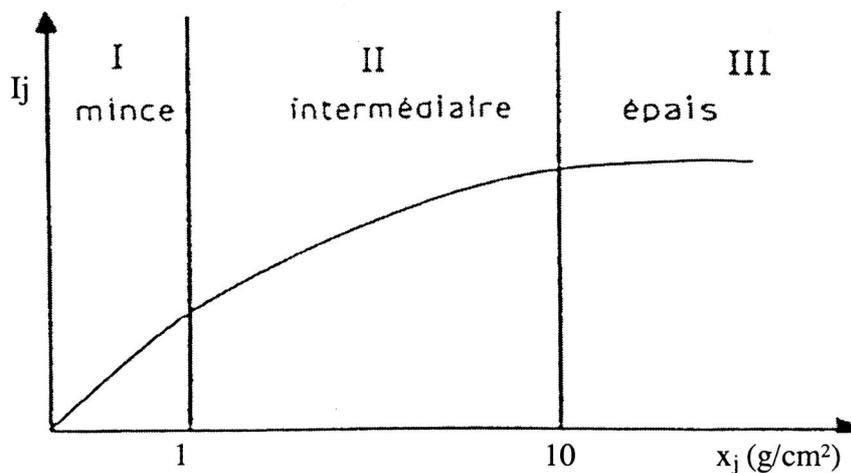


Figure 40 : Variation de l'intensité mesurée suivant la masse superficielle de l'échantillon

On peut définir trois zones suivant l'importance des effets de matrice. Dans notre étude, nous travaillons sur des échantillons considérés comme infiniment épais : dans ce cas, les corrections dues aux effets de matrice sont maximales. Le faisceau est totalement arrêté par la matrice et donc  $E_f = 0$ . Cette perte d'énergie conduit à une variation de la section efficace d'ionisation et à l'absorption d'une partie du rayonnement X caractéristique dans la matrice.

L'intensité mesurée devient :

$$I_j = AQC_j \int_{E_0}^0 \frac{\sigma_j(E) T(E)}{S(E)} dE \quad \text{Équation 31}$$

### C. Aspect semi-quantitatif des résultats

Dans notre cas, nous ne connaissons pas la composition exacte de la matrice constituée d'éléments légers (C, N, H, O) qui sont non détectables. De ce fait, nous ne pouvons pas avoir les valeurs absolues des teneurs mais seulement les concentrations relatives contenues dans nos échantillons. Nous devons prendre en considération la variation des valeurs pour un élément considéré sur une même localisation, calculer sa moyenne et ainsi avoir un ordre de grandeur (cf. Chapitre X). Ceci ne gêne pas les interprétations puisque le but de notre travail est d'évaluer la distribution des intensités en éléments métalliques dans diverses zones d'intérêt et de faire des comparaisons.

## III. TRAITEMENT ET ANALYSE DES SPECTRES

### A. Procédure d'ajustement

L'analyse quantitative par PIXE est une mesure de l'intensité des raies d'émission X caractéristiques des éléments de la cible, et leur conversion en concentration élémentaire. L'intensité d'un rayonnement est donnée par l'aire du pic caractéristique, diminuée de l'aire de la distribution continue dans le même intervalle énergétique.

Les raies caractéristiques sont approximativement de forme gaussienne et souvent complexes à cause des interférences spectrales. Les montrent de nombreux pics de divers éléments superposés sur du bruit de fond continu provenant de plusieurs procédures de Bremsstrahlung [49]. Il est courant d'éliminer la contribution de l'émission continu par filtrage numérique des données expérimentales avant de mesurer l'intensité de chacun des rayonnements caractéristiques.

Un spectre PIXE (figure 41) donné par un détecteur Si(Li) contient des raies de rayons X de plusieurs éléments : les raies K des éléments atomiques compris entre  $Z=11$  (Na) et  $Z=60$  (Nd) et les raies L des éléments qui ont un numéro atomique compris entre  $Z=30$  (Zn) et  $Z=90$  (Th).

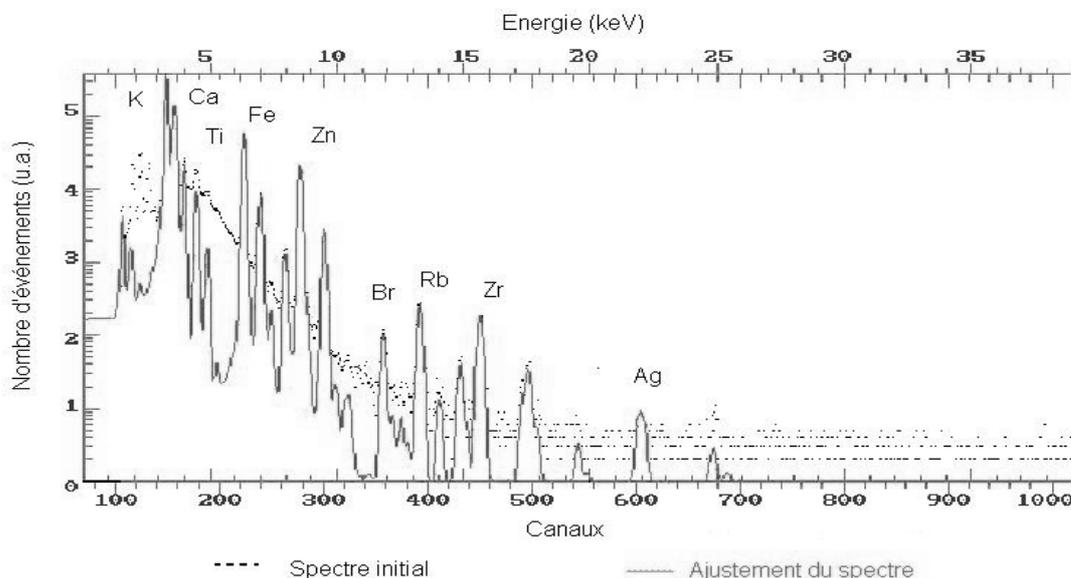


Figure 41 : Exemple de spectre PIXE obtenu avec un détecteur Si(Li) et traité par Gupix.

Le but de notre étude est de déterminer la teneur de nos échantillons en éléments métalliques. Pour ce faire, nous avons utilisé le programme GUPIX (Guelph PIXE Software Package) développé à l'Université de Guelph, Ontario, Canada par Maxwell et Campbell [50]. Ce programme détermine les intensités des pics de rayons X caractéristiques par la procédure d'ajustement des spectres modélisés  $M_j$  au spectre mesuré  $Y_j$  contenant  $j$  pics en utilisant la technique non linéaire des moindres carrés. Le spectre théorique est construit sur la base des données contenant les sections efficaces, les taux

d'émission des rayons X pour les raies K, L, M...[51], le rendement de fluorescence, les coefficients d'atténuation et les intensités relatives des raies. Il permet de déterminer, quantitativement, la composition en éléments présents dans l'échantillon.

Les effets de la matrice sont calculés sur une base de données des sections efficaces d'ionisation des protons, des pouvoirs d'arrêt et des coefficients d'atténuation massique des rayons X.

La description de chaque spectre implique de nombreux paramètres. Pour réduire le nombre de variables dans la procédure d'ajustement, la relation suivante est utilisée pour déterminer l'énergie de chaque rayonnement X :

$$C(E) = P_1 + P_2 (E_x) + P_3 (E_x)^2 \quad \text{Équation 32}$$

où C est la position du canal de mesure correspondant au maximum du pic, E l'énergie de la raie des rayons X et P<sub>3</sub> est en pratique fixé à zéro. Les paramètres P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> sont déterminés à partir des positions des pics intenses de la matrice pour déterminer l'énergie de l'ensemble des raies d'émission dans la totalité du spectre. La relation entre la largeur des pics et l'énergie est déterminée par la formule suivante :

$$\sigma(E) = (P_4 + P_5 (E_x))^{1/2} \quad \text{Équation 33}$$

Les paramètres P<sub>4</sub> et P<sub>5</sub> sont déterminés pour caractériser la largeur des pics.

La procédure d'ajustement permet de traiter un spectre jusqu'à 2048 canaux et un maximum de 60 éléments. Le procédé d'ajustement par minimisation de la valeur du  $\chi^2$  (degré de liberté) sur chaque valeur ajustée est donnée par la relation [52] :

$$\chi^2 = \sum_j (Y_j - M_j)^2 W_j \quad \text{Équation 34}$$

où W<sub>j</sub> représente le poids de chaque canal, Y<sub>j</sub> le spectre mesuré et M<sub>j</sub> le spectre modélisé.

$$(\sigma_j)^2 = \sum_m \left( \frac{\delta Y_j}{\delta Y_m} \right)^2 \sigma_m^2 \quad \text{Équation 35}$$

( $\sigma_j$ )<sup>2</sup> est la variance de Y<sub>j</sub>

Les meilleurs paramètres donnés au modèle théorique sont ceux pour lesquels la quantité  $\chi^2$  est minimum. A partir des résultats d'ajustement des intensités des pics, les erreurs associées sont calculées et converties en concentrations élémentaires.

## B. Calcul d'erreur

Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g/g}$  (partie par million soit des  $\mu\text{g/g}$ ). L'erreur sur les mesures est due essentiellement à l'erreur statistique sur la surface des pics. L'écart type consécutif à l'erreur statistique sur la surface est exprimé par :

$$\sigma_N^2 = \sigma_B^2 + \sigma_T^2 \quad \text{Équation 36}$$

N : Nombre d'impulsions nettes sous le photopic

B : Bruit de fond

T : Nombre total d'impulsions sous le photopic

avec  $\sigma_T^2 = T$  et  $\sigma_B^2 = B$

on en déduit :  $\sigma_N^2 = T + B$  Équation 37

et avec T = B + N :  $\sigma_N = \sqrt{N + 2B}$  Équation 38

Pour des intervalles de confiance de 95 %, l'erreur est de  $2\sigma_N$  sur le nombre d'impulsions nettes N.

### C. Méthode de calibration instrumentale

Afin d'effectuer au mieux nos mesures, il est nécessaire au préalable de faire une calibration. Ceci est effectuée au moyen de la constante instrumentale H [53, 54, 55]. Pour une cible donnée, l'intensité mesurée  $I(Z)$  du rayonnement X caractéristique est donnée par la formule :

$$I(Z) = H Q C_Z \varepsilon_Z^I T_Z I_T(Z) \quad \text{Équation 39}$$

- Q : Charge mesurée
- $C_Z$  : Concentration de l'élément de numéro atomique Z
- H : Constante instrumentale qui inclut l'angle solide du détecteur et les facteurs expérimentaux comme la charge et l'épaisseur du filtre.
- $\varepsilon_Z^I$  : Efficacité intrinsèque du détecteur
- $T_Z$  : Transmission des rayons X par le filtre
- $I_T(Z)$  : Intensité théorique calculée par unité de concentration par stéradian et par microcoulomb pour la matrice.

Dans notre étude, nous avons déterminé cette constante de calibration pour tous les éléments que nous devons analyser par la suite dans les tissus. Afin de l'évaluer, nous avons travaillé sur deux types d'échantillons dont nous connaissons les concentrations en éléments et nous avons ajusté la valeur de H afin d'obtenir la teneur souhaitée.

Nous avons travaillé dans un premier temps avec des pastilles que nous avons fabriquées et dans un deuxième temps avec des standards normalisés obtenu par la société Oxford Instrument. Ces derniers n'étaient pas faciles à obtenir en raison de leur fabrication complexe et les exigences d'analyse posées par la méthode PIXE.

#### 1) Préparation des pastilles

Nous avons choisi des produits chimiques pour confectionner des pastilles de telle sorte qu'il n'y ait pas d'interférences et que les teneurs en éléments qui nous intéressent se rapprochent de celles que nous pourrions rencontrer dans les tissus. Nous avons utilisé comme liant entre les différents produits de l'acide borique. Pour vérifier la pureté de chacun des composés utilisés, nous avons effectué des diffractions de rayons X. De plus, pour limiter la pollution par d'autres éléments lors de la préparation, nous avons homogénéisé le mélange dans des tubes en polyéthylène. Nous avons fabriqué trois pastilles contenant au plus huit éléments. Ces dernières sont obtenues par une pression de 10 N et ont un diamètre de 1,3 cm. Au cours de la préparation, nous avons une perte de matière. Nous avons effectué une analyse par spectrométrie d'émission atomique à source de plasma à couplage inductif (ICP/AES) afin de déterminer la concentration réelle des éléments.

Nous avons dissout 85 mg de chaque pastille dans une solution contenant 0.1ml d'acide nitrique concentré 12M (mol/l) et 1 ml d'acide fluorique (HF) à 48% qui a la capacité de détruire le réseau cristallin et de favoriser la dissolution. Le mélange ainsi obtenu est porté à 75°C pendant une journée sur une plaque chauffante. Par la suite, le flacon est ouvert afin de laisser évaporer tous les fluides pendant une nuit. Pour les solutions contenant du silicium, l'évaporation du mélange induit la volatilisation du Si sous forme de  $\text{SiF}_4$ . Le résidu obtenu est dissout dans 5 ml d'acide nitrique 2M et passé à l'ultrason pendant 5 minutes afin de favoriser la dissolution. La solution obtenue est filtrée dans une fiole et complétée à 25 ml. Les solutions étalons sont préparées exactement dans les mêmes conditions que les solutions à étudier.

#### 2) Valeurs de la constante de calibration H obtenue avec les pastilles et les standards

L'analyse des pastilles se fait dans les mêmes conditions expérimentales que celles de nos échantillons, c'est à dire que le diamètre du faisceau est de l'ordre du millimètre et l'intensité d'environ

2 nA. Etant donné l'hétérogénéité de la composition de la pastille, les résultats obtenus sont moins précis que ceux obtenus pour les standards certifiés.

Les standards (cf. Annexe III) se présentent sous la forme d'une pastille en laiton où sont inclus plusieurs minéraux ayant une concentration connue en éléments métalliques. Comme notre minéral est pur, un seul point par étalon suffit. Les valeurs de la constante de calibration sont présentées dans le tableau 12 et les courbes obtenues sur la figure 42.

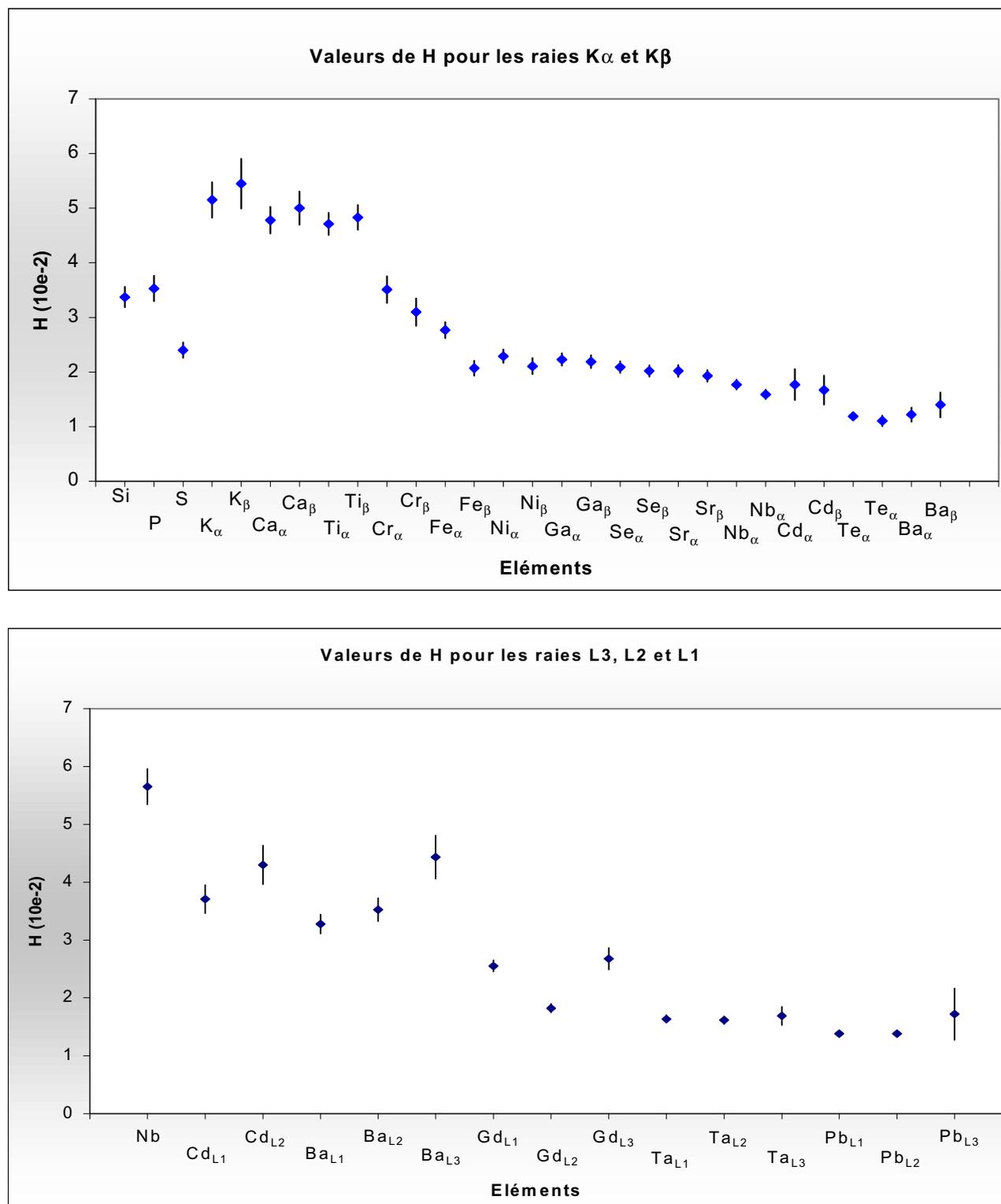


Figure 42 : Spectre modélisant l'évolution de la constante H en fonction de l'énergie des éléments pour les raies K en haut et pour les raies L en bas pour les standards (Mesures effectuées au CERI d'Orléans).

Eléments	H standard pour $K_{\alpha}$ et $K_{\beta}$			H standard pour L3, L2 et L1		
	E des rayons X émis (keV)	H ( $10^{-2}$ )	Erreur ( $10^{-2}$ )	E des rayons X émis (keV)	H ( $10^{-2}$ )	Erreur ( $10^{-2}$ )
<b>Si</b>	1.74	3.37	0.19			
<b>P</b>	2.01	3.53	0.23			
<b>P</b>	2.31	2.40	0.14			
<b>K</b>	3.31	5.15	0.33			
	3.59	5.45	0.416			
<b>Ca</b>	3.69	4.78	0.25			
	4.01	5.00	0.30			
<b>Ti</b>	4.51	4.71	0.20			
	4.93	4.83	0.23			
<b>Cr</b>	5.41	3.51	0.25			
	5.95	3.10	0.25			
<b>Fe</b>	6.40	2.77	0.15			
	7.06	2.07	0.14			
<b>Ni</b>	7.48	2.29	0.12			
	8.26	2.11	0.15			
<b>Ga</b>	9.25	2.23	0.11			
	1.26	2.19	0.12			
<b>Se</b>	11.22	2.09	0.11			
	12.49	2.02	0.10			
<b>Sr</b>	14.16	2.02	0.11			
	15.83	1.93	0.11			
<b>Nb</b>	16.61	1.77	0.09	2.17	5.65	0.31
	18.62	1.59	0.09			
<b>Cd</b>	23.17	1.77	0.28	3.13	3.71	0.24
	26.09	1.67	0.27	3.32	4.30	0.34
<b>Te</b>	27.47	1.19	0.07			
	30.99	1.11	0.10			
<b>Ba</b>	32.19	1.22	0.13	4.47	3.28	0.16
	36.37	1.40	0.23	4.83	3.53	0.20
				5.81	4.43	0.37
<b>Gd</b>				6.06	2.55	0.10
				3.71	1.82	0.08
				8.10	2.68	0.19
<b>Ta</b>				8.15	1.64	0.07
				9.34	1.61	0.07
				10.28	1.69	0.16
<b>Pb</b>				10.55	1.38	0.05
				12.61	1.38	0.05
				15.22	1.72	0.44

Tableau 12 : Résultats de la constante de calibration H pour les standards normalisés.

### 3) Conclusion

Des études antérieures avaient montré que les valeurs de la constante de calibration suivaient une courbe exponentielle [56, 57]. Les valeurs de la constante de calibration obtenues avec les standards montrent que les courbes, aussi bien pour les raies K que pour les raies L, ont une forme exponentielle. Les valeurs de H plus faibles, vers les basses énergies, sont dues à l'effet du filtre. En effet, le funny filter utilisé (filtre en aluminium de 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur avec un trou de 0.5 mm) atténue les éléments légers afin de mettre en évidence les éléments lourds.

## IV. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX-CONDITIONS D'IRRADIATION

### A. Dispositif expérimental du CERI d'Orléans

#### 1) Accélérateur

C'est un accélérateur Van de Graaff qui sert à produire des protons accélérés. L'intensité du faisceau peut atteindre quelques dizaines de  $\mu\text{A}$ . La résolution en énergie du faisceau est de l'ordre du keV. Sur la voie centrale dédiée à la microsonde, le faisceau traverse une succession de fentes et de doublet de quadripôles servant de système de focalisation avant d'atteindre la cible à analyser (figure 43).

#### 2) Chambre d'analyse et détecteur

La chambre d'analyse est construite en duraluminium. Elle comporte des sorties situées dans le plan horizontal (figure 43).

Une sortie est utilisée pour le porte échantillon placé perpendiculairement à la direction du faisceau de protons. Ce porte échantillon peut recevoir 4 échantillons pouvant être analysés sans devoir mettre la chambre à l'air. La première place est réservée à la mesure de la taille et de la position du faisceau. Le porte échantillon possède trois directions de mouvement en X, Y et Z. Les déplacements en X et Y sont télécommandés par deux moteurs pas à pas de 1200 pas par tour (1 pas = 5  $\mu\text{m}$ ).

Deux autres sorties sont utilisées pour le détecteur Si(Li) et le détecteur LEGe (Low Energy Germanium) placés à  $\pm 45^\circ$  par rapport à la direction du faisceau. Les distances entre le détecteur et la cible sont dans notre cas de 3.1 cm pour le détecteur Si(Li). Nous pouvons ajouter des filtres sur le détecteur et les changer suivant le type d'analyse à réaliser.

Un microscope optique rétractable ou endoscope permet de visualiser l'échantillon et de sélectionner ainsi la zone à analyser.

Sur le trajet du faisceau un dispositif « doigt tournant » permet la mesure indirecte du courant qui est calibré initialement par rapport à la charge recueillie dans la cage de Faraday, situé derrière le porte échantillon.

Le vide est de l'ordre de  $10^{-6}$  mbar dans la chambre.

La détection des rayons X est effectuée par un détecteur Si(Li) placé à  $45^\circ$  par rapport à la direction du faisceau incident. Sa résolution est de 145 eV à 5,9 keV. La fenêtre d'entrée en béryllium est de 7.5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et la surface active du détecteur est de 30  $\text{mm}^2$ . Etant donné l'utilisation de ce type de détecteur, il faut tenir compte lors du traitement des spectres, de la confusion possible entre :

Le pic de la raie X  $K_\alpha$  du phosphore (2,01 keV) et le pic d'échappement de la raie X  $K_\alpha$  du calcium (3,69 – 1,74 = 1,95 keV) du détecteur au silicium.

Le pic de la raie X  $K_{\alpha}$  du titane (4,5 keV) et le pic de la raie X  $K_{\alpha}$  du fer (6,4 - 1,74 = 4,66 keV) du détecteur au silicium.

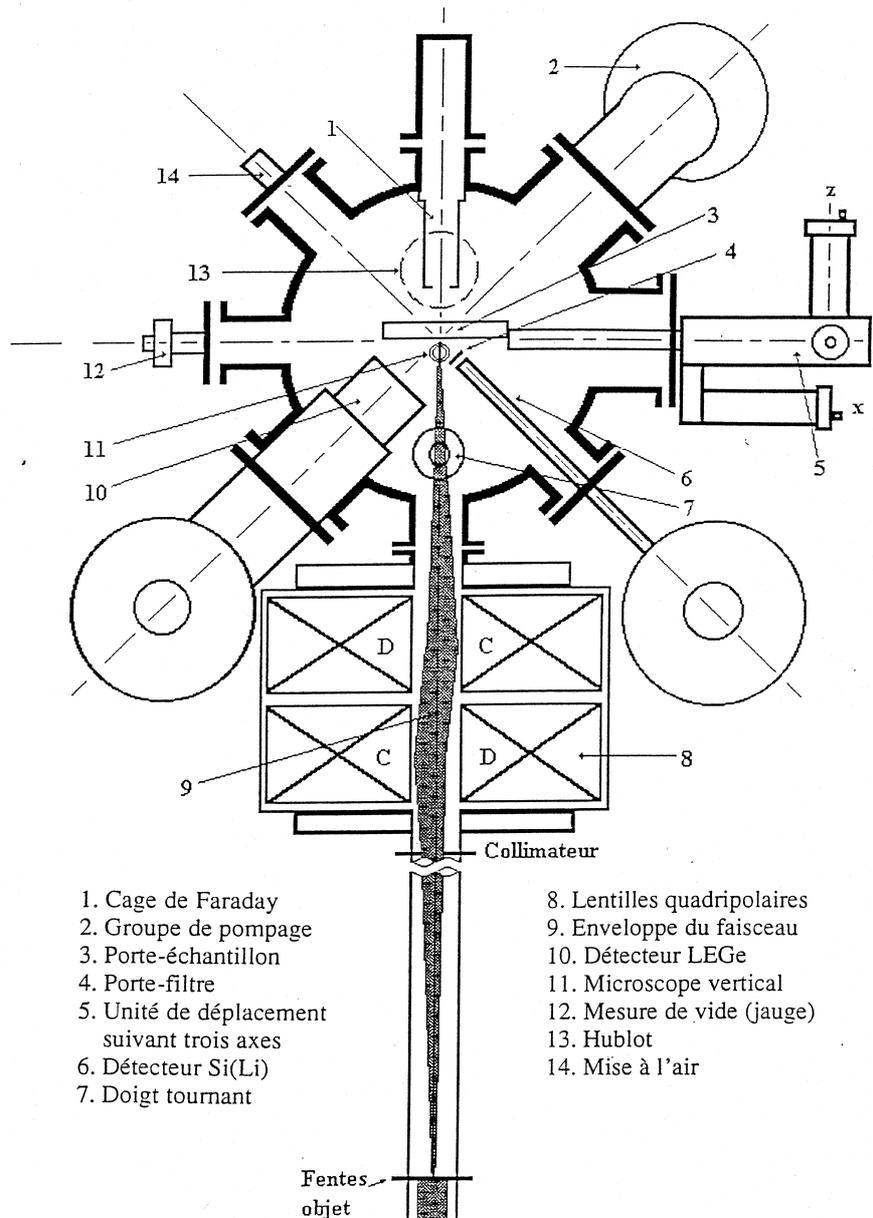


Figure 43 : Schéma de l'aménagement de la chambre d'analyse.

Le détecteur est séparé de la chambre d'analyse par un filtre dit « funny filter » qui correspond à la superposition de deux filtres, un en béryllium d'épaisseur de 138  $\mu\text{m}$  et un en aluminium d'épaisseur variable avec un trou en son milieu (funny filter) ou non. Les filtres permettent de détecter les éléments traces lourds et le trou laisse passer les éléments légers. La chaîne d'acquisition des spectres comporte le détecteur, un préamplificateur, un amplificateur, un convertisseur d'amplitude et un analyseur multicanaux. L'acquisition est pilotée par ordinateur.

### 3) Mesure du courant et normalisation

En vue de l'analyse quantitative élémentaire par spectrométrie de rayons X, il est nécessaire de connaître la charge totale reçue par la cible. A la différence de la microsonde électronique, le faisceau d'ions issu de l'accélérateur n'est pas régulier et fluctue en intensité rendant nécessaire la mesure de la

charge totale déposée sur la cible pendant le temps d'analyse. Dans notre chambre d'analyse, deux dispositifs permettant la mesure du courant sont disponibles : une cage de Faraday et un doigt tournant.

Dans le cas d'une cible très mince, le faisceau peut traverser la cible sans être atténué. La mesure du courant est faite au moyen de la cage de Faraday constituée d'un cylindre de cuivre positionné à l'arrière de la cible suivant la direction du faisceau.

Dans le cas d'une cible épaisse, le faisceau est totalement absorbé et n'atteint pas la cage de Faraday. La mesure du courant se fait directement sur la cible si elle est conductrice. Si la cible est isolante, comme notre cas, la surface de l'échantillon est recouverte d'une couche très mince de carbone pour éviter l'accumulation de charge à la surface. Mais ce recouvrement au carbone ne permet pas d'éviter complètement ce problème de charge à l'intérieur de l'échantillon à cause de la pénétration d'un faisceau de protons de 3 MeV. Pour éviter ces problèmes, la mesure du courant est réalisée indirectement à l'aide d'un doigt tournant. Ce dernier est constitué d'une plaque de tantale tournant à environ 1200 tours/min. Il permet d'intercepter le faisceau deux fois par tour. Le principe de la mesure consiste à recueillir les électrons secondaires émis sur la plaque métallique, et la charge accumulée est mesurée à l'aide d'un intégrateur numérique.

Les quantités de charge  $Q_{\text{doigt}}$  et  $Q_{\text{far}}$  mesurées simultanément sur le doigt tournant et dans la cage de Faraday, après avoir retiré l'échantillon, permettent de faire un étalonnage. Par la suite, on détermine la charge  $Q_{\text{cible}}$  déposée sur la cible durant l'irradiation ( $Q_{\text{cible}} = Q_{\text{far}}$ ) lorsque le faisceau n'atteint pas la cage de Faraday :

$$Q_{\text{cible}} = k Q_{\text{doigt}} \quad \text{Où } k \text{ est le rapport d'étalonnage.}$$

#### 4) Conditions d'irradiation

Le faisceau de protons incidents est utilisé à une énergie moyenne de 2.98 MeV. La surface irradiée de notre tissu est de l'ordre de 1 mm<sup>2</sup>. Nous effectuons plusieurs points par échantillon pour obtenir une moyenne et déterminer un gradient de concentration dans les tissus le long de l'implant. L'intensité du faisceau utilisée est d'environ 2 nA. Pour limiter la contamination des tissus, nous les plaçons dans des porte-échantillons en polyéthylène que nous avons fabriqués. Ce sont des cylindres de 25 mm de diamètre et de 10 mm de haut, creux en leur centre permettant de disposer les produits à analyser. Le filtre utilisé est un « funny filter » en aluminium de 200 µm d'épaisseur avec un trou de 0.5 mm pour les tissus mous. Ces derniers sont doublés d'un filtre en béryllium de 138 µm d'épaisseur afin d'éviter les protons rétrodiffusés. Les rayons X émis sont détectés à l'aide d'un détecteur Si(Li) placé à 135 ° par rapport à la direction du faisceau incident.

### **B. Dispositif expérimental du CENBG de Bordeaux**

#### 1) Accélérateur et système de focalisation

Comme pour les expériences au CERI d'Orléans, nous utilisons un accélérateur de type Van de Graff [58]. La détection des rayons X est effectuée par un détecteur Si(Li) placé à 135° par rapport à la direction du faisceau incident afin de limiter le fond spectral. Sa résolution est caractérisée par une largeur à mi-hauteur de 145 eV à 5,9 keV. La fenêtre d'entrée en béryllium est de 8 µm d'épaisseur et la surface active du détecteur de 50 mm<sup>2</sup>. Tout comme pour Orléans, nous devons tenir compte de la possibilité de confusion des pics (cf. Chapitre IX.IV.A.2). Le détecteur est séparé de la chambre par un filtre en carbone de 500 µm d'épaisseur afin de pouvoir détecter les éléments lourds.

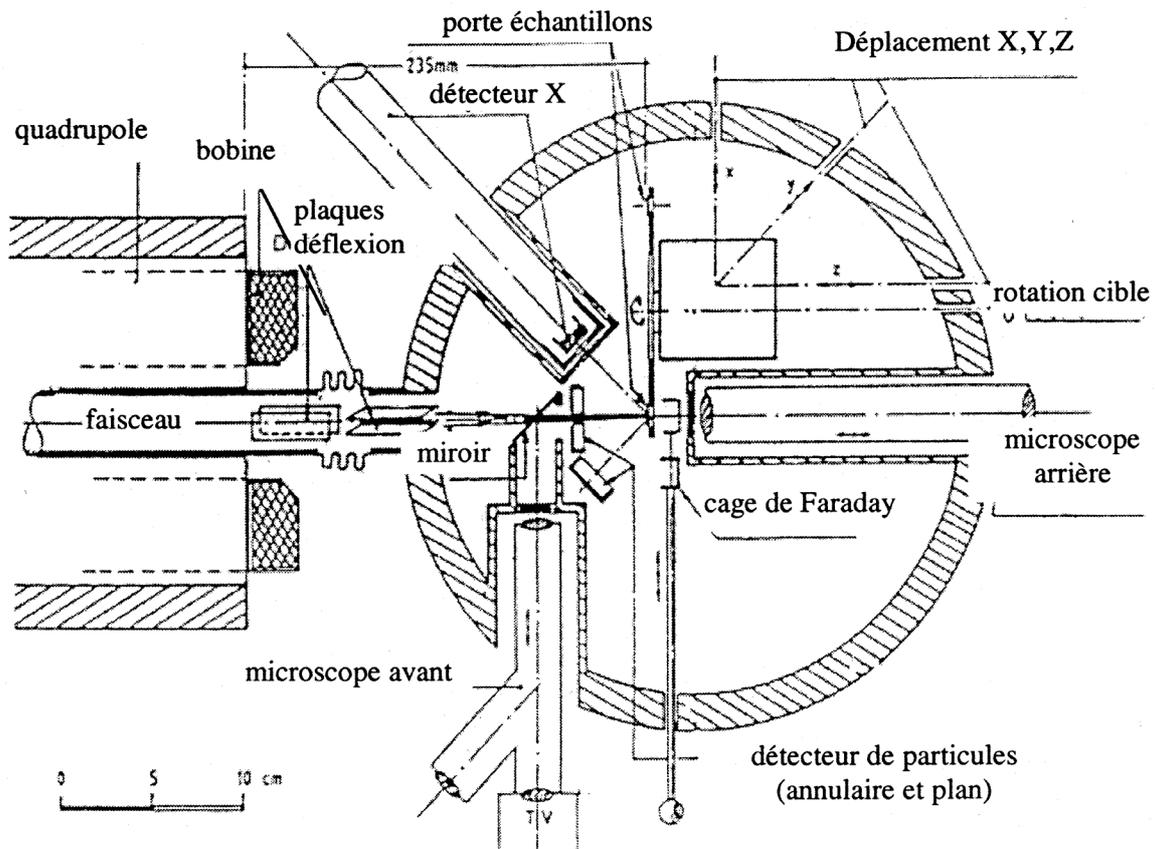


Figure 44 : Chambre d'analyse de la microsonde nucléaire du CENBG

### 2) Mesure du courant de normalisation

Pour comparer les intensités obtenues, le nombre d'impulsions détectées par rapport à la charge totale déposée sur la cible est normalisé. Lorsque l'échantillon est mince, la charge reçue est mesurée à l'aide d'une cage de Faraday placée derrière la cible. Une normalisation des charges à l'aide des spectres RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry) est effectuée (cf. Chapitre IX.IV.C). Ces spectres, suite à la rétrodiffusion des protons sur la cible, permettent de calculer le rapport du nombre de protons par unité de charge pour un faisceau d'énergie connue. L'acquisition simultanée du spectre X et du spectre RBS donnent des résultats en nombre d'événements par proton rétrodiffusé ou en nombre d'événements par microcoulomb. Le spectre RBS est enregistré avec un détecteur silicium de particules chargées de type passivé-implanté. Il est placé à  $135^\circ$  par rapport à la direction du faisceau incident, en opposition par rapport au détecteur Si(Li) utilisé pour la PIXE.

### 3) Système de balayage de la zone analysée

Les dommages causés par l'impact du faisceau de particules chargées de haute énergie sur les échantillons biologiques peuvent conduire à des résultats erronés. Une haute fréquence de balayage d'une zone à analyser permet de réduire les effets associés à des dommages thermiques [59, 60, 61]. Le système de balayage au CENBG consiste en des plaques de déflexion insérées dans l'espace image, après le dernier quadrupôle. La définition est généralement de  $128 \times 128$  points. Un balayage complet d'une zone consiste donc en 16384 points. La durée de balayage dépend de la fréquence. Pour les échantillons biologiques, il est souvent nécessaire d'opérer à grande fréquence de balayage : 1 pixel par

milliseconde [58]. Ainsi, un balayage complet est obtenu en 16 secondes environ. Après plusieurs balayages, on obtient une cartographie élémentaire, pour chaque élément détecté à l'intérieur de la zone balayée.

#### *4) Conditions d'irradiation*

Nous travaillons avec un faisceau de protons incidents monoénergétique de 2,8 MeV. Le faisceau utilisé est défocalisé, et a un diamètre de l'ordre de 150  $\mu\text{m}$ . Un système de balayage permet d'analyser une surface de l'ordre de 600×600  $\mu\text{m}^2$ . La détection des rayons X se fait avec un détecteur Si(Li) placé à 135° par rapport à la direction du faisceau incident. Devant le détecteur, nous plaçons un filtre en carbone de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui a la particularité de réduire le taux de comptage des éléments légers, de s'affranchir d'un temps mort important et de favoriser ainsi la détection des éléments métalliques à l'état de traces. L'intensité du faisceau est de l'ordre de 2 nA.

#### ***C. Traitement des spectres RBS obtenus à Bordeaux***

L'acquisition des spectres RBS s'effectue simultanément à celle de la PIXE. Le détecteur est placé à 45° par rapport au faisceau incident du côté opposé au détecteur Si(Li). Cette technique nous permet de tenir compte des effets de matrice dus à l'hétérogénéité de l'épaisseur de nos coupes qui engendrent des fluctuations d'absorption des rayons X de faibles énergies et des variations de la section efficace de production des X. Nous obtenons ainsi les spectres des principaux constituants de la matière organique (C, N, O). Il est alors possible de déterminer la masse de la surface irradiée [62, 63]. On peut normaliser ainsi les résultats obtenus par GUPIX en  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche analysée.



## CHAPITRE X

### ANALYSE DES RESULTATS PIXE ET DISCUSSION

#### I. DESCRIPTION DES ECHANTILLONS, BUT ET CONDITIONS D'ANALYSE

##### A. Etude par activation neutronique

Une première étude sur la contamination des tissus par les éléments métalliques relargués par les implants a été effectuée dans notre équipe par activation neutronique [44]. Les échantillons ont été prélevés sur des pièces anatomiques dans les mêmes conditions que pour nos analyses. Une fois les prélèvements lyophilisés, ils sont analysés par neutrons thermiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13.

Eléments	Concentrations dans les tissus musculaires (mg/kg)	Concentrations dans les tissus capsulaires (mg/kg)
Co	$0.15 \pm 0.04$	$4.30 \pm 0.13$
Cr	$52.7 \pm 0.5$	$2310 \pm 23$
Fe	$340 \pm 34$	$7910 \pm 158$
Mn	$5.3 \pm 1.0$	$42.0 \pm 1.3$
Mo	$6.4 \pm 1.3$	$319 \pm 3$
Zn	$188 \pm 4$	$18.0 \pm 3.6$

Tableau 13 : Analyse de tissus musculaires et capsulaires dans des fémurs avec implants.

Il existe bien un transfert d'éléments de la prothèse vers les tissus. Ceci montre la possibilité d'un phénomène de migration ionique ou particulaire induit par la dégradation de la prothèse.

##### B. Descriptif des prélèvements

Les tissus que nous analysons par la méthode PIXE n'ont pas les mêmes caractéristiques. Nous avons des tissus témoins qui vont nous servir à établir des références pour nos mesures et des tissus pathologiques. Les échantillons obtenus sur des pièces anatomiques, n'ont pas de pathologies particulières. Les patients, hommes ou femmes, étaient généralement âgés (entre 70 et 95 ans) et possédaient des implants métalliques. Les tissus musculaires et osseux sont prélevés tout le long de l'implant et vont nous permettre d'étudier la quantité d'éléments relargués et la localisation d'un site privilégié (figure 45, tableau 14).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
Sexe	H	Non connu	H	H	F
Age	81 ans	Non connu	86 ans	86 ans	76 ans
Type de prothèse	Ti	Tige : Ti Tête : Co-Cr	Co-Cr	Co-Cr	Cr-Fe-Ni
Etat des tissus	Néant	Néant	Néant	Néant	Métallose

Tableau 14 : Caractéristiques des tissus post-mortem.

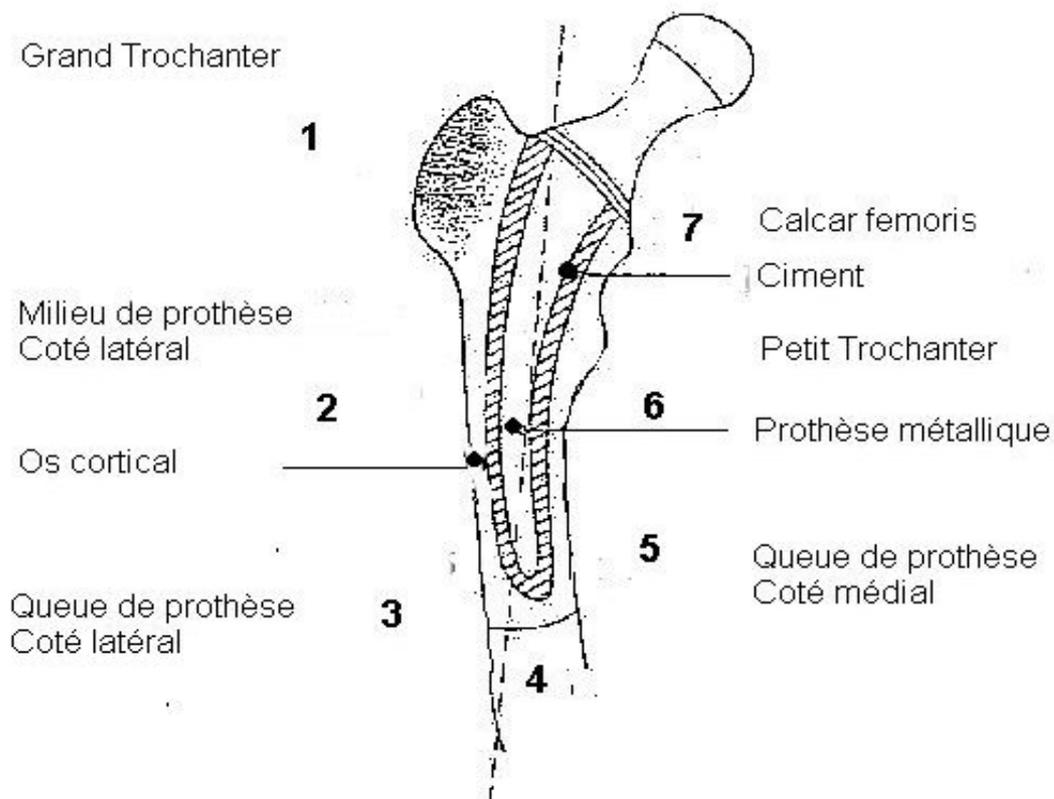


Figure 45 : Localisation des prélèvements le long du fémur pour les échantillons post mortem.

Les prélèvements effectués par le Professeur Sylvain Terver en per-opératoire sont obtenus dans certains cas pathologiques. Il s'agit d'instabilité, due à des mouvements de prothèse dans le fémur, de métallose où nous notons alors la présence de coloration des tissus, de réactions inflammatoires, d'infection ou seulement d'arthrose mais également des prélèvements effectués autour d'implant bien supporté à l'occasion d'ablation de la prothèse. Les patients sont âgés d'environ 70 ans et possèdent des prothèses depuis au minimum 5 ans. La localisation du prélèvement s'effectue au niveau capsulaire dans la majorité des cas. Si nous sommes en présence d'une lyse osseuse, nous pouvons obtenir des échantillons au niveau du fût fémoral. A l'aide de ces tissus, nous allons déterminer la teneur en éléments métalliques relargués et estimer le gradient de concentration en fonction de l'état du tissu (tableau 15).

Les premières expériences sont réalisées au CERI à Orléans sur des cibles épaisses (>1mm). Cette étude nous permet de déterminer la concentration sur les deux faces, proche et loin de l'implant, et de montrer l'existence d'un gradient de migration. Afin d'optimiser nos mesures, nous prenons 9 points adjacents sur la face d'analyse. Pour ce qui est des échantillons analysés au CENBG sur cibles minces (<5 µm), nous effectuons une série de coupes réparties sur 2,6 mm au maximum et nous analysons une quinzaine de coupes à l'aide de 3 points de mesures par coupe pour l'évolution du gradient de contamination en fonction de la distance par rapport à la prothèse.

L'étude porte sur l'évolution des éléments métalliques majeurs provenant des implants. Nous regardons principalement pour les alliages à base de titane : le titane (Ti), pour les alliages à base inox : le chrome (Cr), le fer (Fe) et le nickel (Ni) et pour les alliages à base de cobalt : le cobalt (Co), le chrome (Cr), le nickel (Ni) et le molybdène (Mo).

Patients	T1	T2	PO1	PO2	PO3	BO1	BO2	PO4	PO5/ BO3	PO6/ PO7	BO4	PO8	PO9	PO10	PO11
Sexe	F	H	H	H		F	F	F	F	H	F	F	H		H
Age	66	51	71	65		50	70	75	80	51	73	84	79		42
Type de prothèse	-	-	Tige : Ti Tête : Inox	Ti		Ti	Ti	Co-Cr	Co-Cr	Inox vissée	Inox	Inox	Pl Inox		Plaque Inox
Durée (année)	-	-	5	13		-	-	12	20	1	5	8	-		5
Position	Han Caps	Han Caps	Jonct Méta- emb	Synov	Fût	Han Caps		Han Caps	Gen Caps	Gen Caps	Han Caps	Han Caps	Péripl	Péripl	Sous pl
Etat	Arth	Nécro	Insta	Lyse Lésion superficiel de la tige	Luxa	Infect	Lyse	Méta Lyse Insta	Méta Lyse Insta	Méta	Méta Lyse	Méta Lyse Insta	Néant	Néant	Néant

Abbréviation : **H** : Homme ; **F** : Femme

**Han** : hanche ; **Gen** : genou ; **Caps** : capsule ; **Péripl** : périplaque ; **PI** : plaque ; **Synov** : synovial ; **Fût** : fût fémoral

**Arth** : arthrose ; **Nécro** : nécrose ; **Méta** : métallose ; **Lyse** : lyse osseuse ; **Insta** : Instabilité de la prothèse ; **Infect** : Infecté

**Luxa** : Luxation

**Jonct Méta emb** : Jonction métaphyse embase

Poi : Echantillons analysés au CERI d'Orléans ; Boi : Echantillons analysés au CENBG de Bordeaux

Tableau 15 : Caractéristiques des tissus per-opérateurs

### C. Effets de l'irradiation sur les échantillons

Afin d'étudier le comportement des échantillons sous le faisceau au CERI d'Orléans, nous avons fait des acquisitions à différents temps sur un même point. L'échantillon analysé était au contact avec une plaque en inox. Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution de la concentration des éléments majeurs, c'est à dire le chrome et le fer. Sur la figure 46 est représentée la concentration de ces deux éléments sur un même point pour des acquisitions successives de 100 coups sur le doigt tournant. Le nombre de coups total déposé correspond à la charge totale que nous avons utilisée pour toutes les analyses.

La concentration de ces éléments est constante au cours de l'acquisition. Les quelques variations de concentrations pour chaque mesure peuvent correspondre à des modifications du comportement du faisceau au cours du temps.

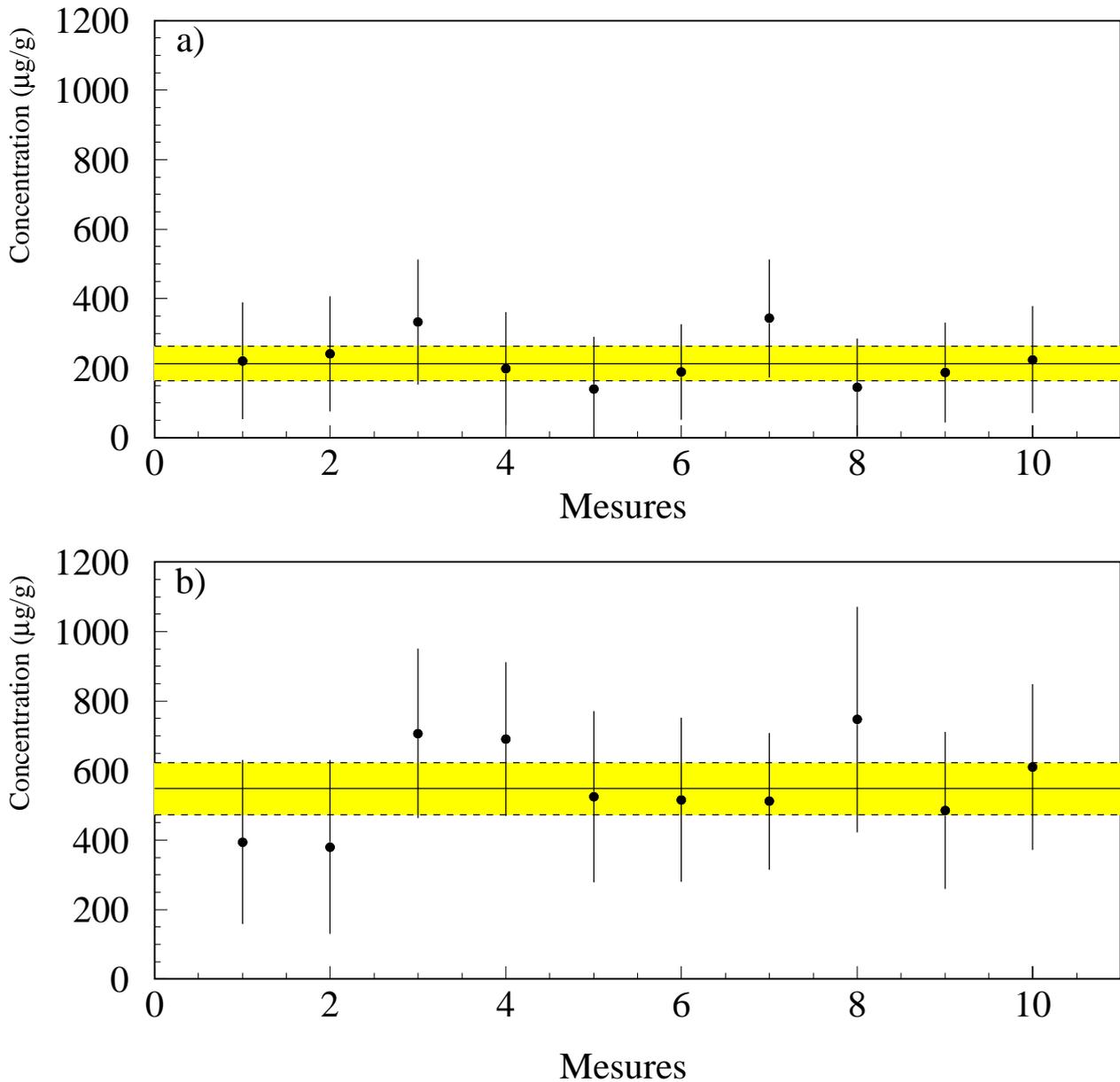


Figure 46 : Evolution au cours du temps d'acquisition de la concentration en Cr (a) et en Fe(b) dans l'échantillon pour 100 événements sur le doigt tournant.

Nous avons fait le même type d'acquisition par intervalles de 500 coups sur le doigt tournant pour un échantillon fortement contaminé. Les graphes de la figure 47 montrent que nous avons de très faibles variations de concentrations dénotant une très faible perte de masse au cours de l'irradiation.

L'effet de l'intensité du faisceau de protons sur les tissus musculaires n'entraîne pas ou peu de perte de masse au cours du temps d'irradiation. Les échantillons sont peu endommagés avec les doses utilisées.

Les échantillons analysés au CENBG de Bordeaux sont très peu endommagés par le faisceau de protons incidents. Afin de réduire au maximum les effets de l'irradiation, nous avons choisi une densité de courant la plus faible possible. De plus, le système de balayage réduit la durée d'acquisition ponctuelle en un point. C'est pour cette raison, mais également en tenant compte de la quantité de faisceau alloué que nous avons dû faire un compromis entre la taille et l'intensité. Nous avons, pour répondre à ces conditions, choisi une dimension de faisceau de l'ordre de  $150\ \mu\text{m}$  et une intensité de  $2\text{nA}$ .

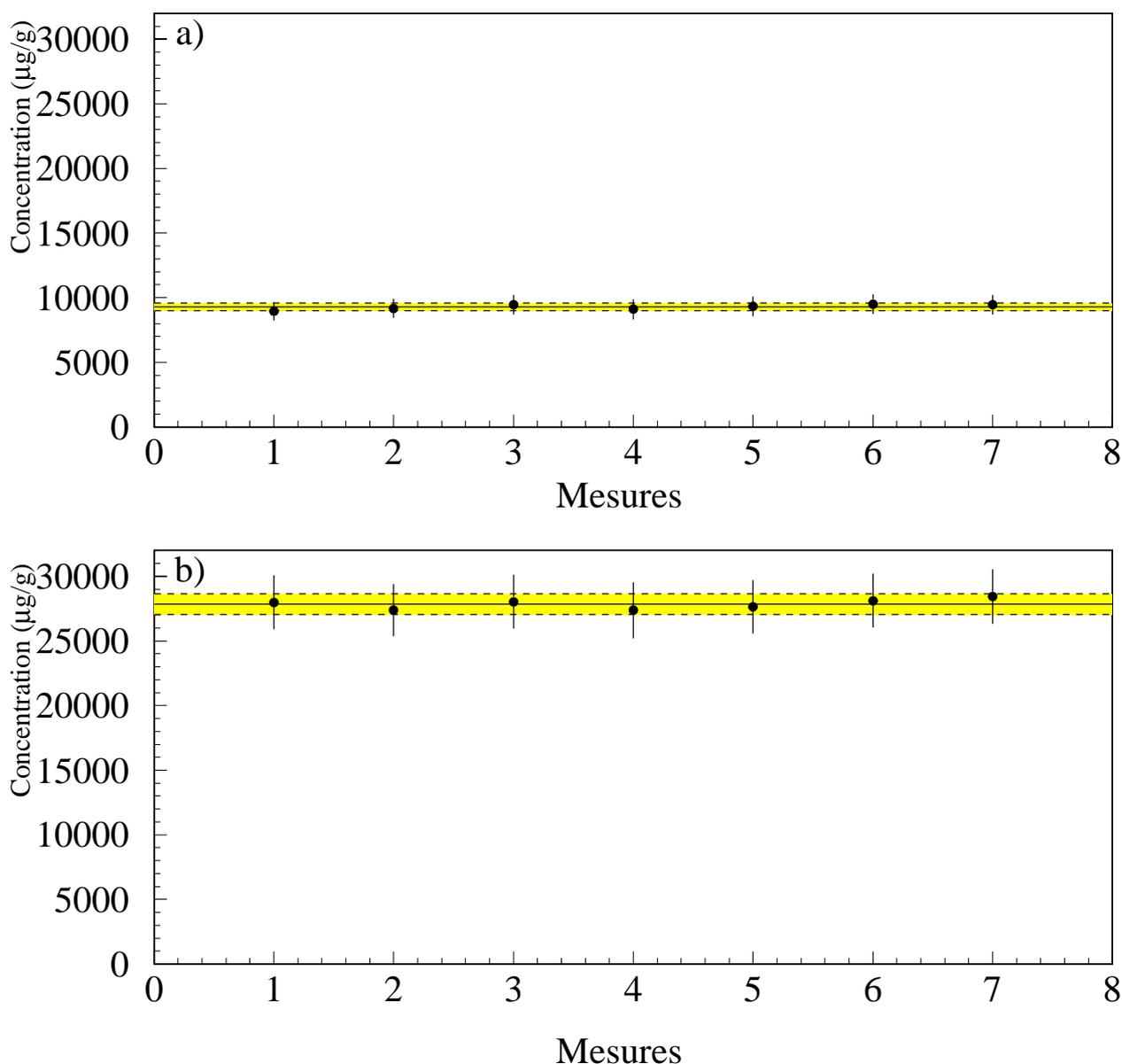


Figure 47 : Evolution au cours du temps d'acquisition de la concentration en Cr (a) et en Fe (b) dans l'échantillon pour 500 évènements sur le doigt tournant.

## II. METHODE DE TRAITEMENT DES DONNEES.

### A. Présentation des résultats par GUPIX

Un ajustement des spectres obtenus est réalisé à l'aide du logiciel GUPIX (cf. Chapitre IX.III.A) ce qui nous permet de mesurer les concentrations. Une limite de détection (LD) est également calculée de la manière suivante.

$$LD = \frac{3 \sigma}{C H Y_t e T} \quad \text{Équation 40}$$

avec  $\sigma = \sqrt{B + O + (0.01 \times O)}$   
où B : bruit de fond  
O : recouvrement  
C : charge en  $\mu\text{C}$   
H : constante de calibration  
 $Y_t$  : intensité théorique calculée par unité de concentration par stéradian et par microcoulomb pour la matrice.  
e : efficacité intrinsèque du détecteur  
T : transmission des rayons X par le filtre

D'autre part, ce logiciel spécifie la signification des mesures en tenant compte de l'écart de chacune d'elle par rapport au LD et les répartit en trois catégories :

Non significatives ou inférieures à  $3 \sigma$  du LD

Les teneurs comprises entre 2 et  $11 \sigma$  sont à discuter par l'expérimentateur

Les concentrations supérieures à  $11 \sigma$  ne posent pas d'ambiguïté.

Une fois le traitement de chaque point de mesure effectué, nous pouvons faire la moyenne et estimer les concentrations en éléments métalliques dans le tissu étudié.

### B. Traitement des mesures

Le but de ces analyses par PIXE est de mettre en évidence la contamination des tissus musculaires par des métaux relargués par des implants métalliques. Les expériences réalisées par TEM ont montré la présence de particules dans les tissus à certains endroits (cf. Chapitre VIII).

Nous pensons qu'il existe plusieurs types de contamination :

des tissus en apparence normaux sans aucune trace d'éléments métalliques ou avec des teneurs en dessous de la limite de détection de notre méthode,  
une contamination ionique faible quand l'implant est stable,  
la présence d'amas ioniques ou moléculaires,  
des fragments de prothèse,  
dans certains cas, nous pouvons avoir une contamination des tissus par apports ioniques provenant des vaisseaux sanguins.

Nous allons faire l'étude de cette contamination sur cibles épaisses et minces, chacune des deux méthodes donnant des informations complémentaires, l'une sur la contamination en fonction de la localisation le long de l'implant et l'autre sur l'évolution en fonction de la distance par rapport à l'os.

La première étape de notre analyse est de déterminer l'existence d'une contamination par les éléments métalliques provenant des prothèses. Pour ce faire, il est naturel de calculer la moyenne pondérée des concentrations en prenant en compte tous les points de mesures sur la surface étudiée. Notons que la série de mesures réalisées peut comporter des résultats appartenant aux trois catégories définies précédemment (cf. Chapitre X.II.A). Un élément peut très bien être présent sous forme de

fragments ayant migré de la prothèse vers les tissus de manière ponctuelle. Nous pouvons ainsi avoir une différence importante de composition en certains éléments d'un point à un autre et ainsi une hétérogénéité sur la surface d'analyse. Ceci est illustré par la figure 49 où sont représentées les concentrations en Cr, Mn, Fe, Co, Ni et Mo déterminées pour les 9 points de mesure effectuées sur un tissu en fonction de leur localisation. La présence d'éléments métalliques à la surface d'un implant peut se révéler sous différentes formes. Deux principaux cas de figures peuvent se présenter : avec des concentrations importantes ou au niveau de la limite de détection. Ainsi, les sources d'hétérogénéité peuvent provenir d'un point particulier avec des teneurs plus importantes (figure 48a) ou d'un milieu avec de très faibles contaminations en éléments métalliques (figure 48b).

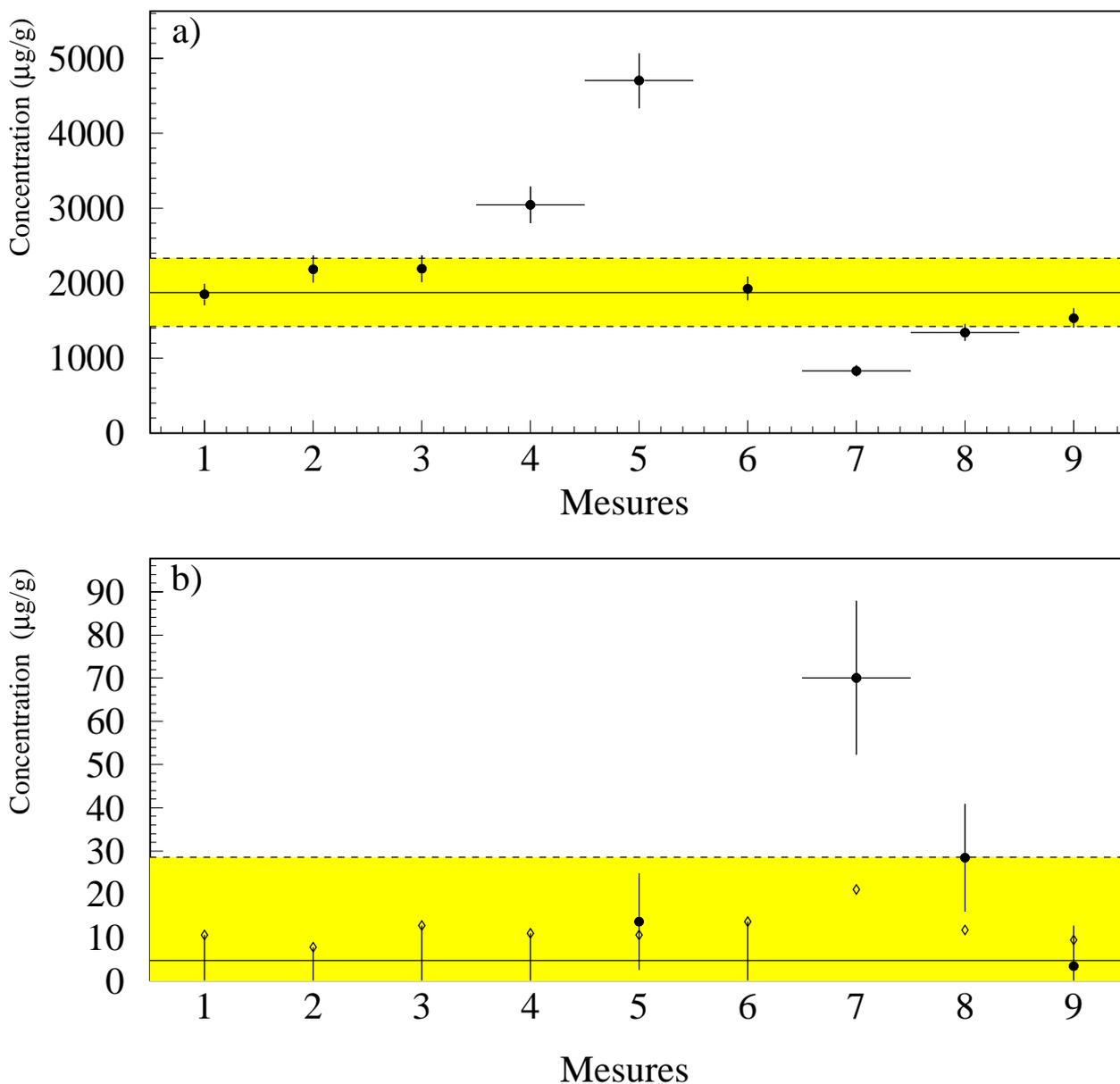


Figure 48: Deux exemples de concentrations en nickel mesurées sur la surface d'un tissu en 9 points différents. Les points noirs représentent les points de mesure avec la barre d'erreur associée. La ligne horizontale correspond à la valeur moyenne et la bande grisée à l'erreur associée. Les limites de détection sont également portées, symbolisées par des losanges blancs.

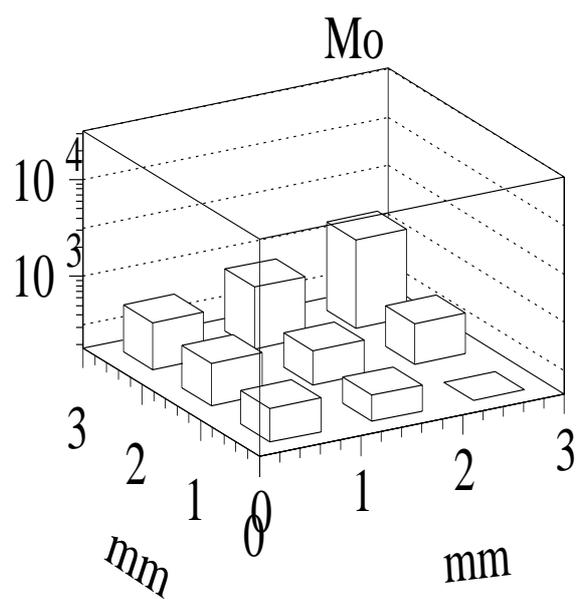
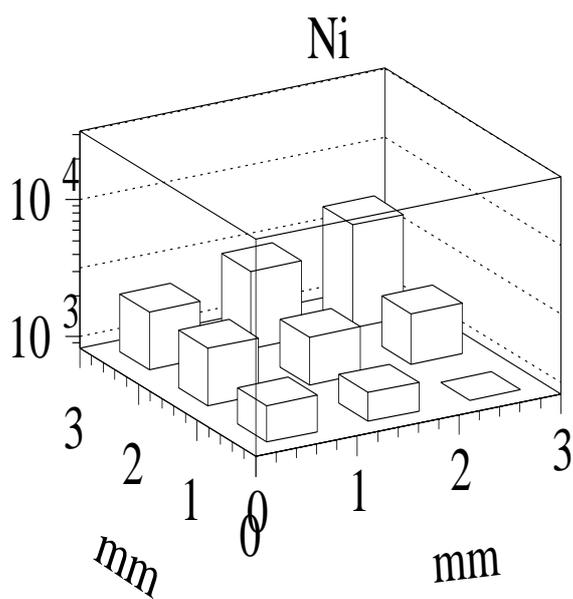
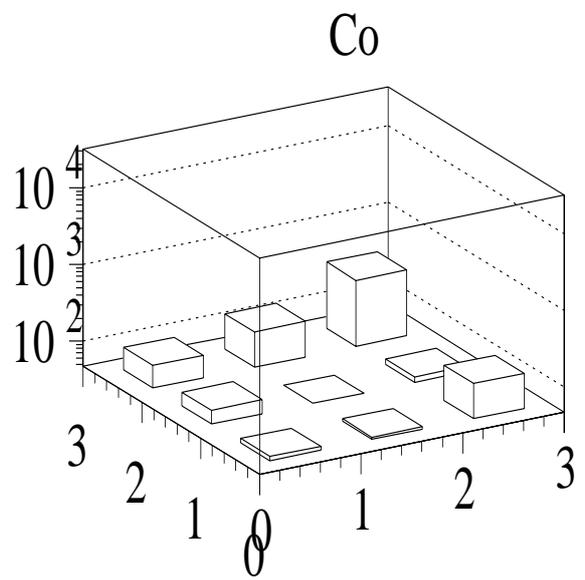
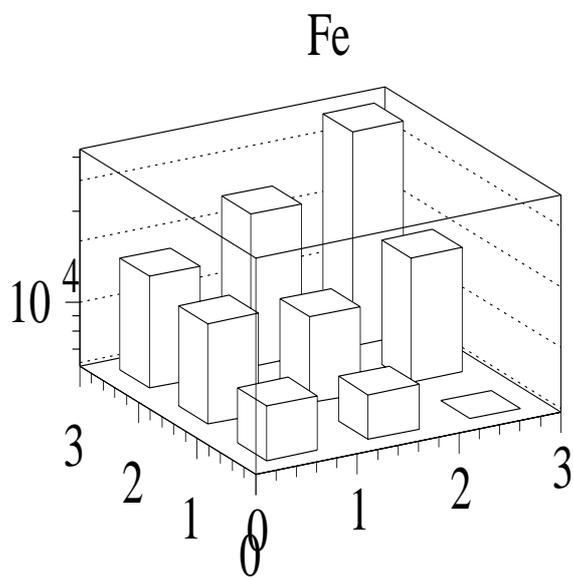
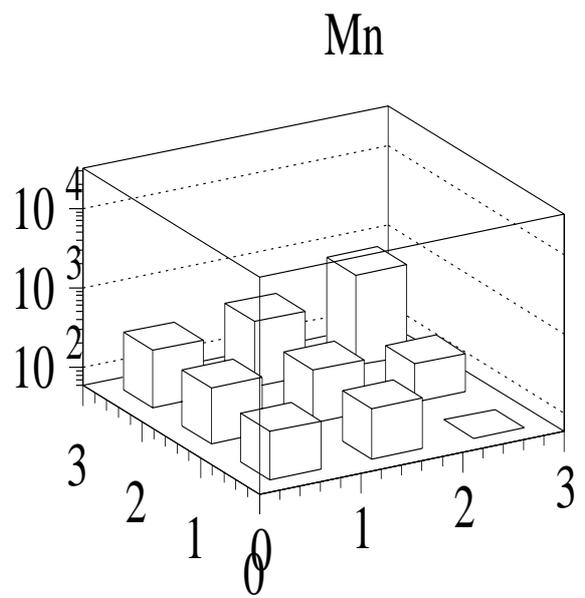
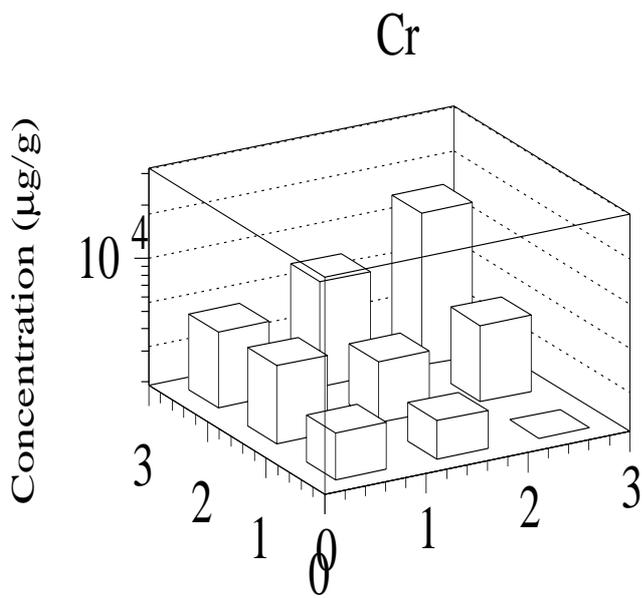


Figure 49: Diagramme montrant la concentration en éléments pour les différentes mesures réparties sur une surface d'analyse.

La moyenne pondérée est donnée par l'expression suivante :

$$\bar{x} \pm \delta\bar{x} = \frac{\sum_i w_i x_i}{\sum_i w_i} \pm \frac{1}{\sqrt{\sum_i w_i}} \quad \text{Équation 41}$$

où

$$w_i = \left( \frac{1}{\delta x_i} \right)^2 \quad \text{Équation 42}$$

Dans le cas où la valeur de la moyenne des résultats est inférieure à la moyenne de la limite de détection, cas où presque toutes les valeurs des concentrations sont inférieures à celle du LD, nous prendrons comme concentration finale, la moyenne des teneurs mesurées avec comme erreur associée la moyenne des LD de chaque mesure.

Il est fréquent que, comme sur les figures 48 et 49, la répartition des points soit hétérogène. La distribution des mesures n'étant pas gaussienne, l'erreur associée à cette moyenne n'est pas représentative. La valeur du chi2 par degré de liberté associée à la moyenne des mesures nous en fournit une appréciation. Le chi 2 est déterminé de la manière suivante :

$$\chi^2 = \sum_i w_i (\bar{x} - x_i)^2 \quad \text{Équation 43}$$

Les résultats obtenus montrent que les valeurs du Chi 2 de chaque mesure de concentration en éléments métalliques sur une surface d'analyse sont parfois très grandes, confirmant la disparité de nos mesures. Ceci est illustré sur la figure 50 correspondant à un alliage inox. Nous pouvons remarquer, sur cet exemple, la forte dispersion des points pour les éléments majeurs issus de l'implant. Cette disparité est variable suivant le type d'implant et l'état des tissus analysés.

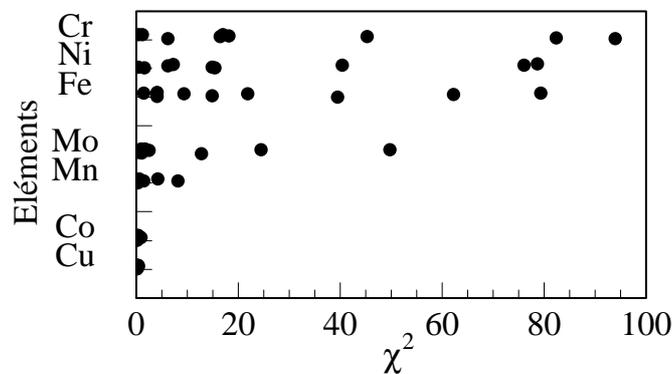


Figure 50 : Valeurs des chi 2 de chaque point de mesures sur une surface pour les différents éléments métalliques présents.

Le calcul de la moyenne pondérée nous donne une idée de la contamination de nos tissus. La détermination de la valeur du  $\chi^2$  à partir de cette moyenne nous permet d'apprécier la différence entre la moyenne obtenue et les concentrations de chacun des points et donc de l'hétérogénéité de la contamination. En plus de cette information, le  $\chi^2$  permet d'estimer la distance entre la valeur moyenne et les différentes concentrations.

L'utilisation du  $\chi^2$  permet de distinguer deux classes de mesures. Une méthode d'analyse discriminante basée sur cette variable a été développée. Elle est utilisée comme une estimation de la distance entre les mesures et permet de les séparer en deux groupes. La classe A comprend la majorité des concentrations mesurées. Elle est distribuée autour de la valeur moyenne. La classe B correspond aux concentrations qui ont une valeur de  $\chi^2$  supérieure à un certain seuil et dont la probabilité d'appartenir à une distribution gaussienne des mesures de la classe A est faible.

Les mesures sont séparées à l'aide de la méthode suivante. La moyenne pondérée des concentrations et le  $\chi^2$  sont calculés. Si la valeur du  $\chi^2$  est supérieure à un certain seuil, la mesure correspondant à ce plus grand  $\chi^2$  est mise dans la classe B si cette valeur est supérieure à la moyenne, dans le cas contraire elle est rejetée. De manière itérative, cette procédure est répétée pour les valeurs restantes tant que le  $\chi^2$  est supérieur au seuil.

La valeur choisie pour la séparation des mesures est grande (16 dans notre cas) car nous voulons séparer des phénomènes distincts. Ce seuil se situe vers un  $\chi^2 \approx 20$ . La sensibilité à cette valeur est faible et la séparation entre les deux classes n'en sera pas affectée.

La première classe (classe A) est attribuée à une contamination ionique, plus homogène et elle va être caractérisée par sa valeur moyenne. Par la suite elle sera nommée «concentration des tissus» et notée «C<sub>moy</sub>». Nous pourrions ainsi comparer cette moyenne à celle obtenue dans les tissus témoins et voir l'importance de la contamination. La seconde classe (classe B) est caractérisée par la valeur maximale de la concentration sur un échantillon et par le nombre de points lui appartenant. Elle peut correspondre aux amas ioniques ou aux possibles fragments. Cette méthode permet également d'éliminer des valeurs très faibles qui pourraient être erronées donnant une indication sur la connaissance de ce phénomène. Avec beaucoup de statistique, nous pourrions envisager d'utiliser sa valeur moyenne.

La valeur de la concentration moyenne de la classe A peut avoir un grand  $\chi^2$ . L'erreur associée ne rend pas compte de la distribution possible des concentrations. Afin de prendre en compte l'hétérogénéité des mesures ou de possibles incertitudes systématiques supplémentaires, nous effectuons une correction de l'erreur par un « facteur d'échelle » suivant la procédure préconisée par le « Particle data group » [64]. Ainsi nous allons comparer le  $\chi^2$  obtenu pour N degrés de liberté à celui de N-1 degrés de liberté.

Si  $\chi^2/(N-1) < 1$  : la moyenne est gardée telle qu'elle est avec son erreur

Si  $\chi^2/(N-1) > 1$  : la valeur de l'erreur est multipliée par un facteur S tel que :

$$S = \left( \frac{\chi^2}{(N-1)} \right)^{1/2}$$

Dans ce raisonnement, nous considérons que la forte valeur du  $\chi^2$  est due à une sous estimation des erreurs. Ne sachant pas quelles erreurs nous avons sous-estimées, nous supposons qu'elles ont toutes été sous-estimée d'un facteur S.

### ***C. Validation de la méthode à l'aide d'un monte-carlo***

La simulation Monte-Carlo va nous permettre de montrer la validité de cette méthode d'analyse que nous utiliserons dans la suite des expériences.

Cette méthode consiste à générer 10000 pseudo-expériences de 9 points de mesure de manière à reproduire ce que nous observons dans les expériences. 7 points sont répartis selon une gaussienne autour d'une valeur ( $x_1 \pm s_1$ ) et 2 autres points sont distribués autour d'une valeur ( $x_2 \pm s_2$ ). Cette configuration représente bien les événements que nous rencontrons dans nos analyses (cf. Figure 51). La séparation entre les deux catégories de mesure est de 6 sigmas.

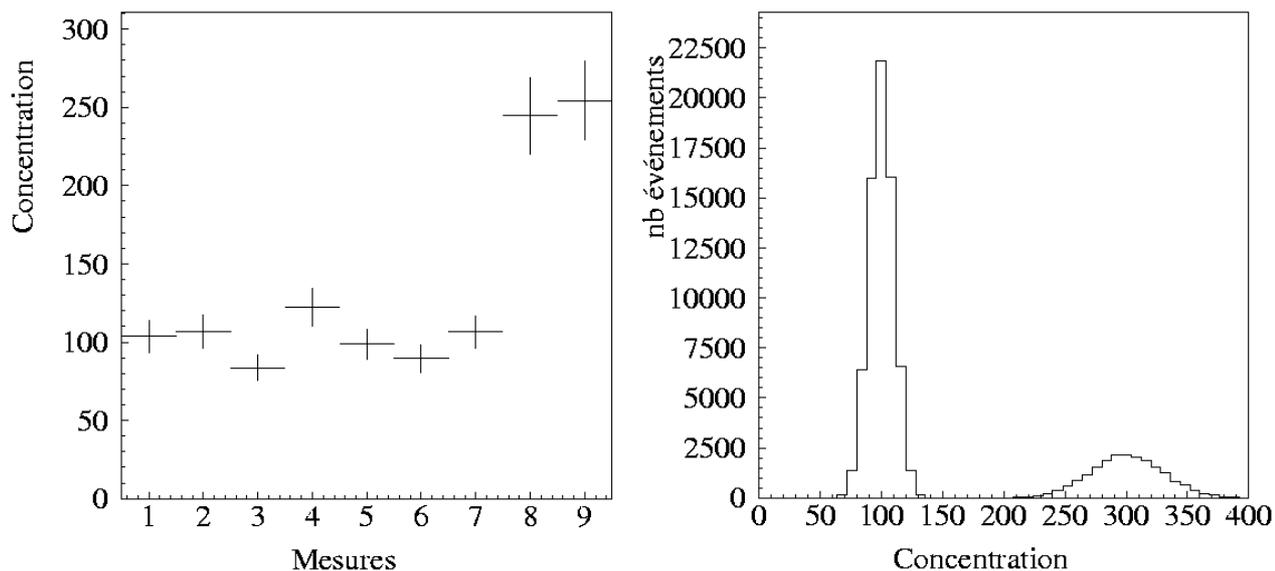


Figure 51 : Simulation des 9 points de mesure sur lesquels les 10000 pseudo-expériences ont été générées. A gauche, un exemple d'une pseudo-expérience et à droite, les distributions gaussiennes suivant lesquelles les points de mesures sont générés. Les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{g}$ .

Le calcul de la moyenne pondérée, prenant en compte tous les points de mesures, montre que cette valeur est légèrement supérieure à 100 (Figure 52). Les fortes concentrations avec des grandes valeurs de  $\chi^2$  augmentent la concentration moyenne. Le grand  $\chi^2$  obtenu pour la moyenne, représenté sur la Figure 52, met en évidence les valeurs des concentrations très éloignées de la moyenne calculée et montre l'hétérogénéité de répartition des mesures.

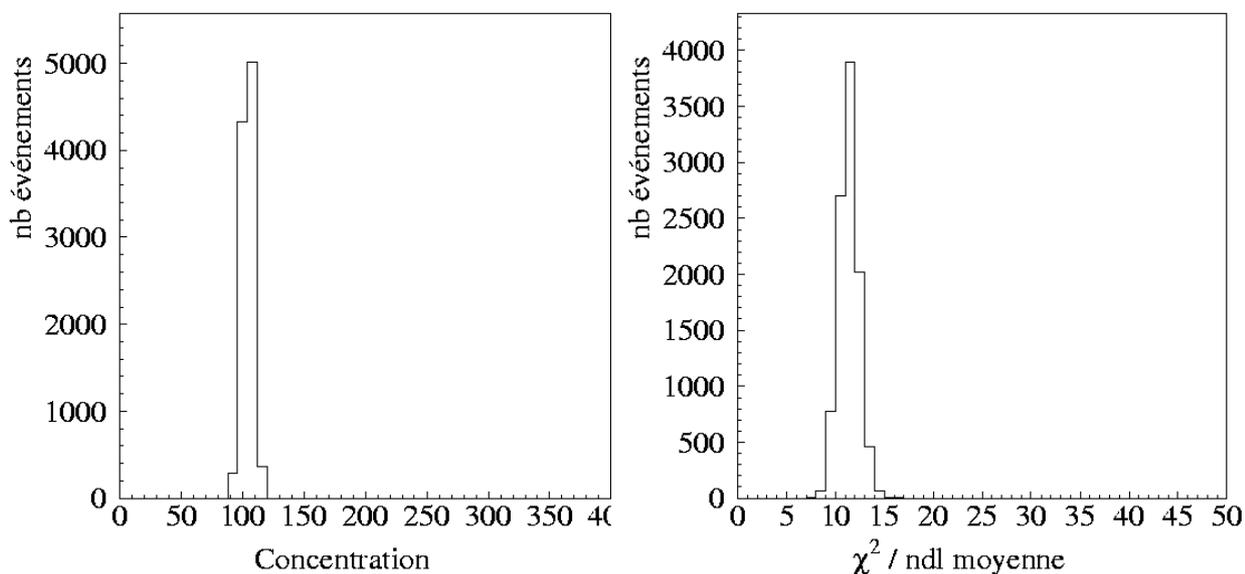


Figure 52 : Concentration moyenne en  $\mu\text{g}/\text{g}$  (à gauche) et valeur du  $\chi^2$  (à droite) en prenant en compte tous les points de mesures. (ndl : nombre de degré de liberté)

L'application de cette méthode de séparation permet de construire les classes A et B. La représentation de ces deux classes en fonction de la concentration et de la valeur des  $\chi^2$  est observée sur les Figure 53 et 54.

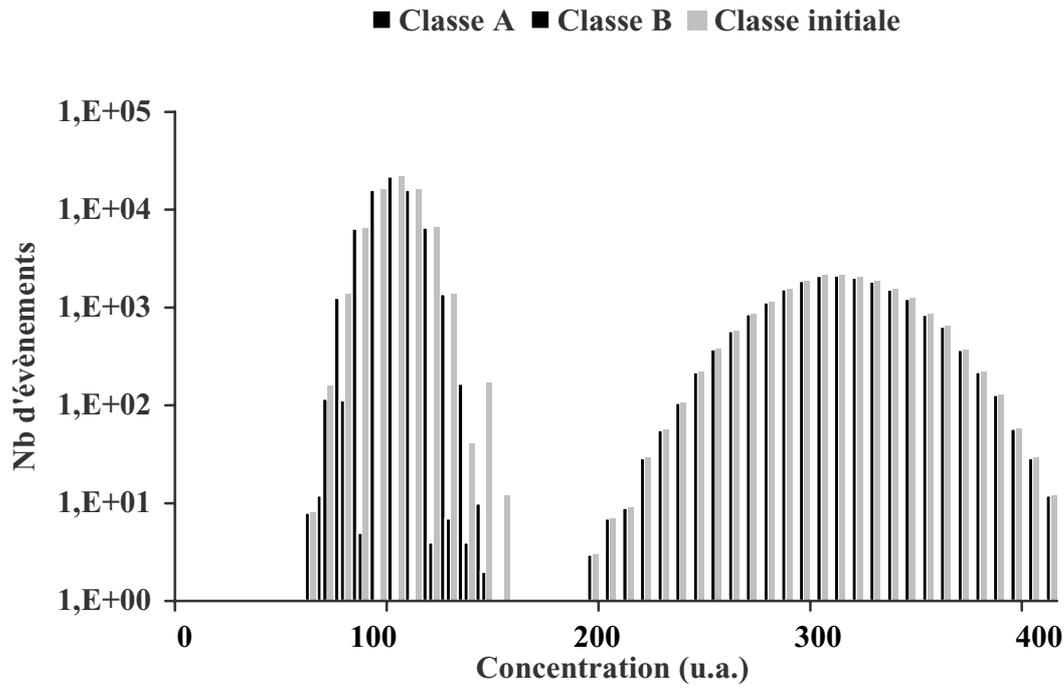


Figure 53 : Représentation logarithmique des deux classes de mesure pour les concentrations.

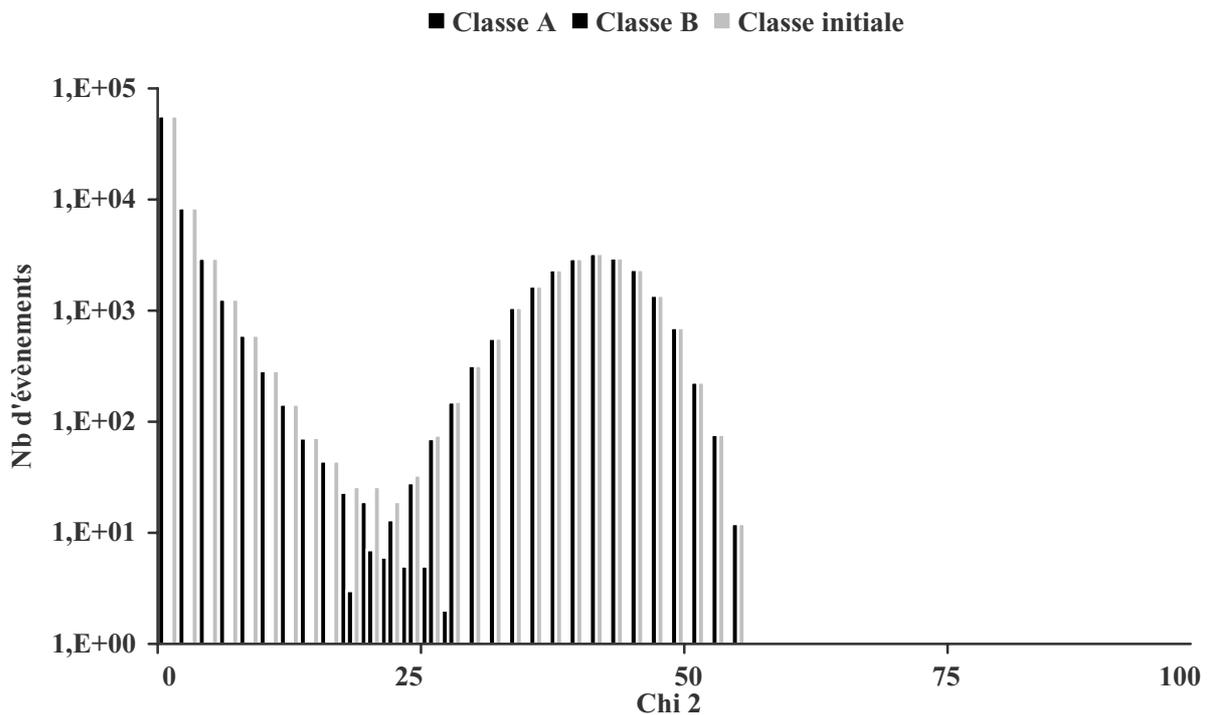


Figure 54 : Représentation logarithmique des deux classes de mesure pour les valeurs du  $\chi^2$ .

Les deux classes initiales sont aisément retrouvées. L'erreur d'association est inférieure à quelques pour mille. La valeur moyenne de la classe A est identique à celle générée. La valeur maximale, qui a permis de caractériser la classe B donne une bonne approximation de la valeur moyenne de ces événements (Figure 55). Les performances de reconstructions des deux classes dépendent peu de la valeur de seuil utilisée pour effectuer la séparation.

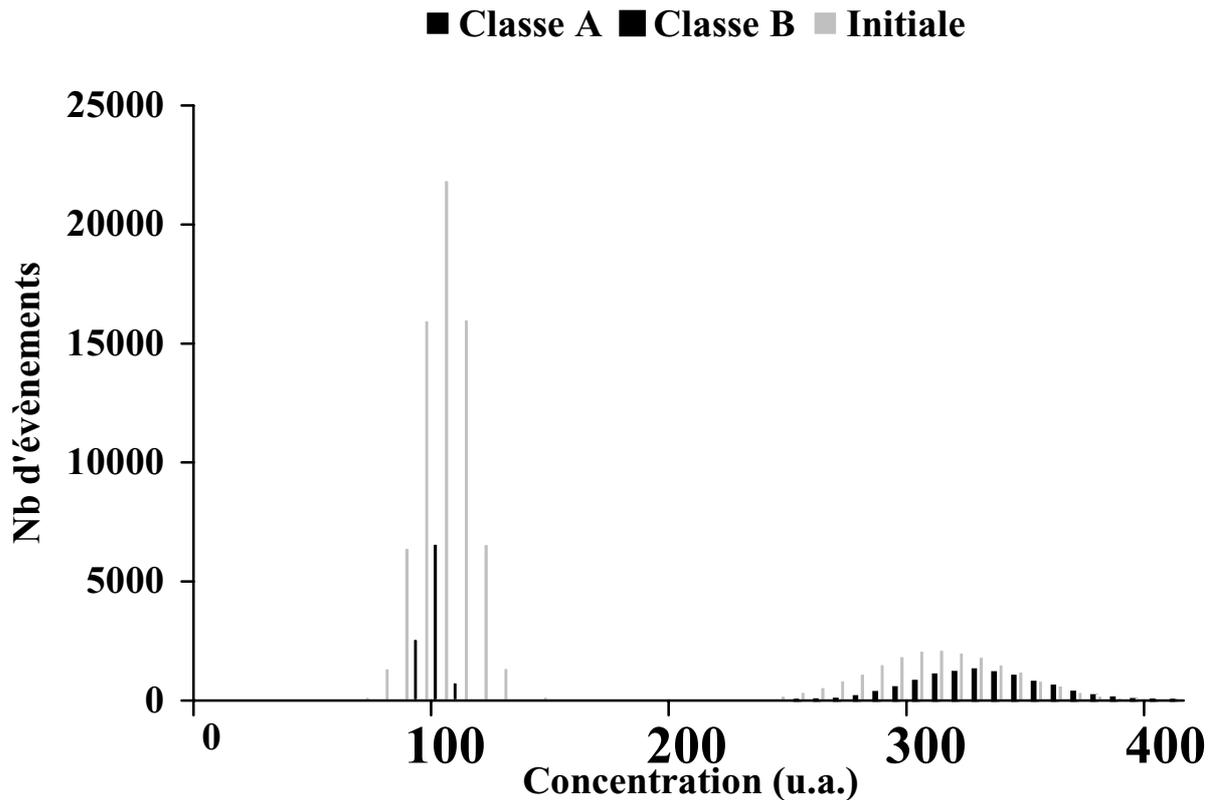


Figure 55 : Moyenne de la classe A et B en comparaison avec les valeurs initiales.

### III. ANALYSE DES RESULTATS DES ECHANTILLONS EN COUPES EPAISSES

#### A. Prélèvements post-mortem

Les premières expériences ont été réalisées sur des tissus post-mortem prélevés tout le long de l'implant (figure 45). Le but de nos expériences consiste à déterminer la localisation de la contamination le long de l'implant et d'estimer un gradient de concentration en éléments métalliques provenant des prothèses. Cette contamination pouvant se faire soit sous forme de fragment soit sous forme ionique, c'est la raison pour laquelle nous avons des variations de concentration importantes d'un point à une autre.

Les tissus analysés n'ont pas de pathologie particulière et ne devraient pas contenir de très fortes concentrations en éléments métalliques. Nous supposons que les patients souffraient seulement d'arthrose et n'avaient pas de réaction particulière à l'implant, sauf dans un cas où nous avons trouvé des traces de métallose au niveau du col fémoral (cf. Annexe II). Nous avons comparé les résultats obtenus pour les échantillons proches d'un implant métallique avec des tissus de référence qui n'étaient pas en contact avec une prothèse.

##### 1) Etude des tissus témoins

Quatre tissus témoins ont été analysés dans les mêmes conditions que les tissus pathologiques. Les seuls éléments métalliques présents sont le fer et le zinc. Les résultats obtenus pour chacun des échantillons peuvent être moyennés du fait qu'ils sont du même ordre de grandeur. Nous allons nous

intéresser à la répartition de ces éléments sur une surface donnée et le long de l'implant. Dans le tableau 16, nous présenterons pour ces deux éléments métalliques les moyennes des concentrations des tissus, la valeur maximale de la concentration des tissus que nous pouvons rencontrer le long de l'implant et le point maximum obtenu sur une surface d'analyse.

Les concentrations ne sont pas identiques à la référence trouvée par Iyengar [65], car la moyenne est obtenue pour un ensemble de tissus musculaires témoins sur l'ensemble du corps. D'autre part, les patients pouvaient avoir un passé médical que nous ne connaissons pas, pouvant induire cette différence.

La distribution sur une surface d'analyse de ces éléments n'est pas très hétérogène. Au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant, la quantité de fer a tendance à diminuer et celle du zinc reste du même ordre de grandeur. Nous pouvons cependant penser que nous allons retrouver des valeurs plus faibles qui vont se rapprocher de celles de référence [65]. Les teneurs en fer sont difficiles à exploiter car nous devons tenir compte du fer sanguin et de celui qui provient de la prothèse. Actuellement, il nous est impossible de faire la distinction entre les deux.

		Réf [65]	Témoin			
			Proche	$\chi^2$	Loin	$\chi^2$
<b>Fe</b> (en $\mu\text{g/g}$ )	$\langle C_{\text{moy}} \rangle$	38	<b><math>114 \pm 4</math></b>	1.39	<b><math>63 \pm 4</math></b>	2.46
	Max ( $C_{\text{moy}}$ )		$188 \pm 31$		$187 \pm 13$	
	Max ( $C$ )		791		455	
<b>Zn</b> (en $\mu\text{g/g}$ )	$\langle C_{\text{moy}} \rangle$	193	<b><math>61 \pm 21</math></b>	1.35	<b><math>76 \pm 3</math></b>	2.78
	Max ( $C_{\text{moy}}$ )		$154 \pm 8$		$189 \pm 8$	
	Max ( $C$ )		1593		286	

Tableau 16 : Moyennes des concentrations des tissus, concentration du tissu maximale, point maximum et valeur du chi 2 par degré de liberté pour le fer et le zinc dans les tissus témoins pour la face proche et la face loin de l'os.

Comme le montre l'évolution du chi 2 par degré de liberté en fonction de la localisation (figure 56), il semble que la répartition du zinc soit plus hétérogène que celle du fer et que cette différence soit accrue au niveau de la tête fémorale. La quantité d'éléments métalliques mesurées dans ces tissus témoins nous servira de référence de comparaison lors de l'analyse des tissus pathologiques.

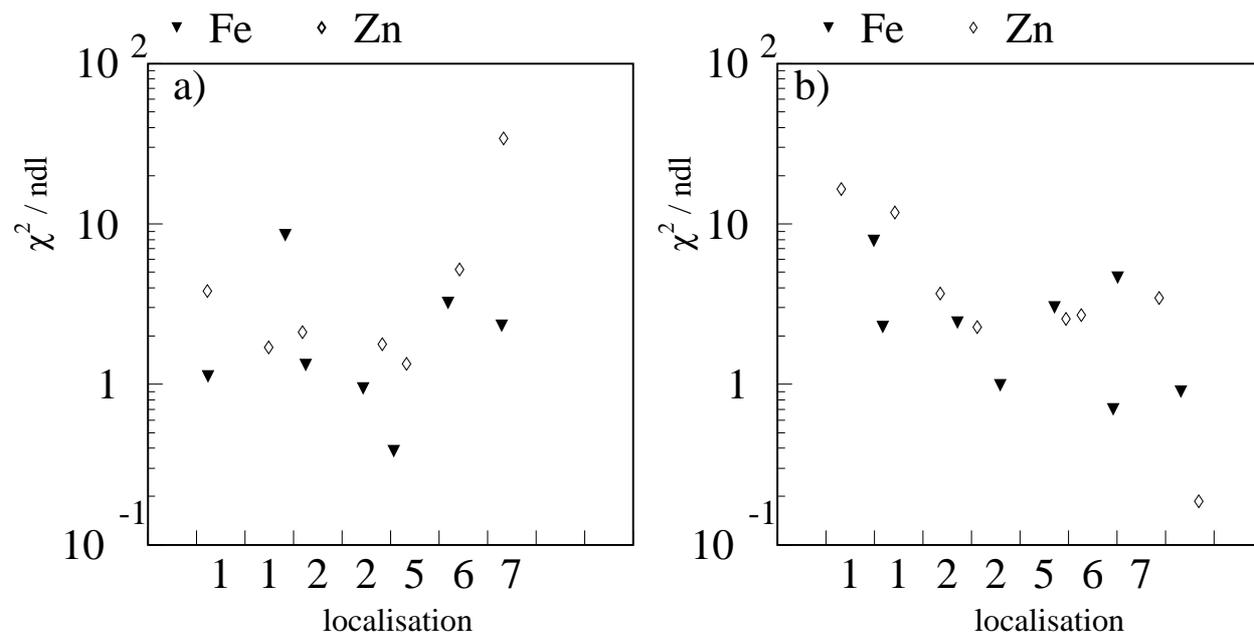


Figure 56 : Evolution de la distribution du chi 2 par degré de liberté en fonction de la localisation pour le fer et le zinc pour deux échantillons témoins.

## 2) Etude des tissus en présence d'implant

Plusieurs études ont été réalisées sur des tissus proches d'implant. Nous présenterons tout d'abord la contamination des tissus par des éléments métalliques, leur répartition aussi bien locale, c'est à dire sur une surface donnée, que le long du fémur, puis l'évolution en fonction de la distance par rapport à la prothèse. Cette étude des prélèvements en contact ou proches de la prothèse nous conduit à plusieurs constatations. Nous allons présenter les résultats en fonction du type de prothèse rencontré.

### a) Contamination et répartition des éléments métalliques dans les tissus

Dans un premier temps, nous avons la présence d'éléments métalliques dans les tissus adjacents aux implants (face P) qui n'étaient pas présents dans les tissus témoins. Ceci se traduit par des concentrations en éléments métalliques supérieures à la limite de détection. Nous pouvons ainsi mettre en évidence la contamination des tissus par des métaux provenant de la prothèse (tableau 17).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
Fraction > LD	60%	70%	18%	17%	70%

Tableau 17 : Fraction de points de mesures supérieurs à la limite de détection (LD) pour les éléments majeurs des différentes prothèses.

Pour chaque tissu, nous avons calculé la moyenne des concentrations en éléments métalliques majeurs (cf. Chapitre X.II.B). Dans le tableau 18, nous avons porté la moyenne des concentrations des tissus qui nous donne une indication sur la contamination des tissus musculaires mesurée sur chaque surface, la valeur maximale de la concentration des tissus obtenue le long de l'implant et le maximum absolu en un point sur les surfaces étudiées.

		<b>P42D</b>	<b>P7</b>	<b>P43G</b>	<b>P43D</b>	<b>P4</b>
		Ti	Ti + Co	Co-Cr	Co-Cr	Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>32 ± 7</b>	<b>36 ± 11</b>	<b>26 ± 6</b>	<b>(&lt;16*)</b>	<b>(&lt;23*)</b>
	Max (C <sub>moy</sub> )	80 ± 49	845 ± 318	73 ± 36	28 ± 16	24 ± 23
	Max (C)	607	12590	1887	824	187
<b>Cr</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>(&lt;28*)</b>	<b>(&lt;55*)</b>	<b>(&lt;24*)</b>	<b>(&lt;18*)</b>	<b>51 ± 12</b>
	Max (C <sub>moy</sub> )	(< 28*)	(<55)	28 ± 23	225 ± 18	4816 ± 631
	Max (C)	26	245	172	865	59549
<b>Fe</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>116 ± 5</b>	<b>440 ± 63</b>	<b>129 ± 14</b>	<b>52 ± 3</b>	<b>220 ± 18</b>
	Max (C <sub>moy</sub> )	168 ± 12	1189 ± 172	305 ± 77	481 ± 22	13409 ± 2313
	Max (C)	305	5089	589	2292	56898
<b>Co</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>(&lt;28*)</b>	<b>(&lt;68*)</b>	<b>(&lt;22*)</b>	<b>(&lt;31*)</b>	<b>(&lt;194*)</b>
	Max (C <sub>moy</sub> )	(<28*)	(<68*)	(<22*)	474 ± 31	(<194*)
	Max (C)	(<28*)	(<184*)	26	705	344
<b>Ni</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>13 ± 2</b>	<b>(&lt;34*)</b>	<b>(&lt;11*)</b>	<b>(&lt;12*)</b>	<b>(&lt;22*)</b>
	Max (C <sub>moy</sub> )	25 ± 3	(<34*)	(<11*)	15 ± 12	1873 ± 457
	Max (C)	31	(<34*)	163	56	696

Tableau 18 : Contamination des tissus sur la face proche de l'implant métallique. Les concentrations sont données en µg/g et les (\*) correspondent aux limites de détection.

Nous pouvons en déduire que la présence d'une prothèse métallique entraîne une contamination des tissus musculaires plus ou moins importante par des métaux provenant de cet implant. Dans la prothèse P43, nous avons une pollution en titane qui ne provient pas de l'implant. Cette contamination est probablement due au fait que le patient avait au préalable une autre prothèse en titane sur la hanche droite. Nous retrouvons cet élément sur les deux fémurs, ceci peut s'expliquer par des transferts par voies lymphatiques ou veineuses croisées.

L'ensemble des points de mesures n'est pas toujours au dessus de la limite de détection et les teneurs moyennes en éléments métalliques sont peu élevées, traduisant une faible contamination. Cependant, nous notons un écart important entre le maximum des concentrations des tissus et la concentration maximale obtenue en un point du tissu ce qui peut traduire un phénomène de contamination locale.

Pour quantifier ce phénomène, nous déterminons pour chaque type de prothèse la distribution du chi 2 par degré de liberté associé à la moyenne des concentrations des tissus pour les éléments majeurs (figure 57). La moyenne des chi 2 par degré de liberté pour ces éléments majeurs est donnée dans le tableau 19 pour les prothèses étudiées.

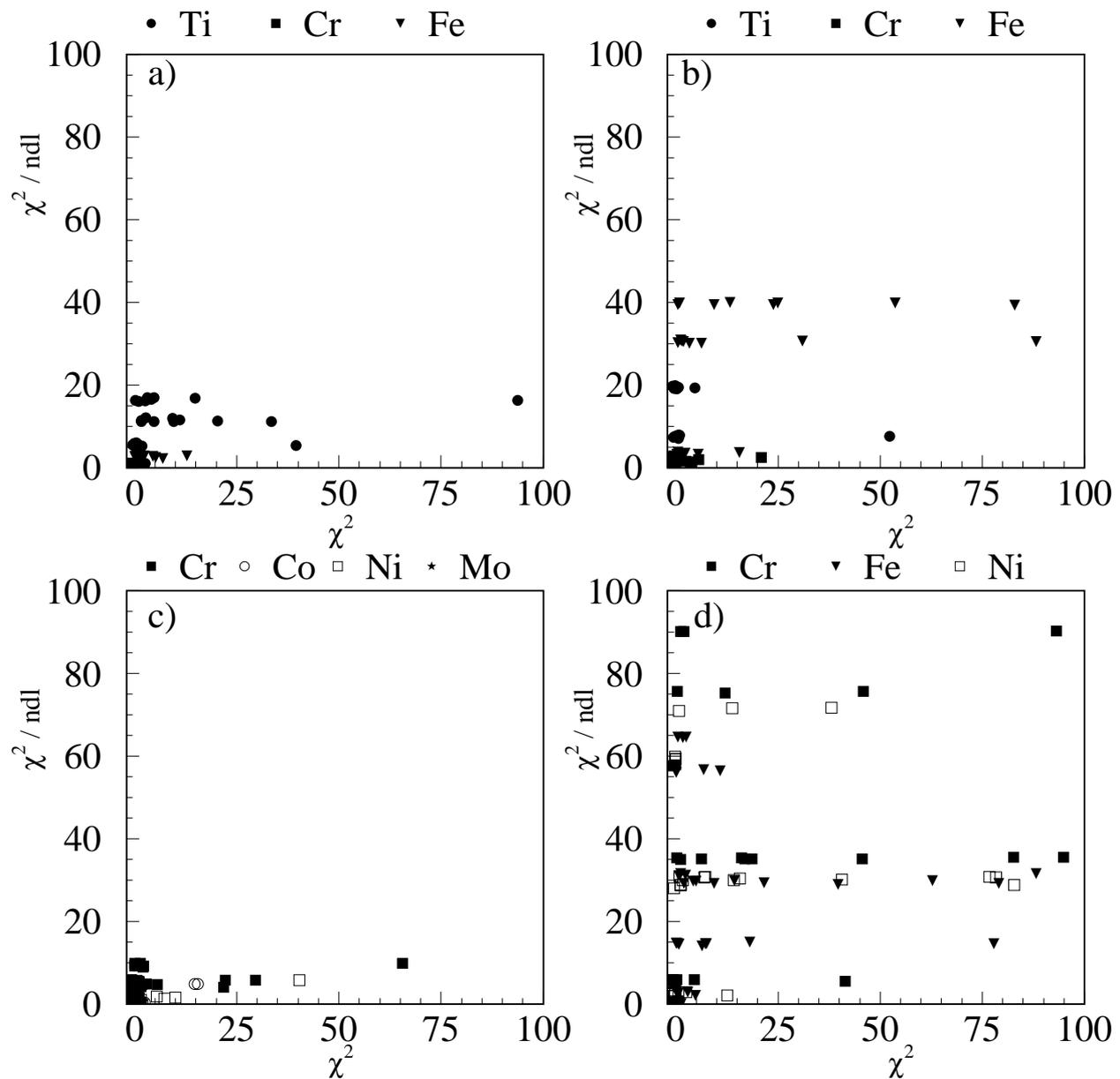


Figure 57 : Répartition du chi 2 par degré de liberté en fonction du chi 2 de chaque mesure pour une prothèse en titane (a), une tête en alliage de cobalt et une tige en titane (b), en inox (c) et en alliage de cobalt (d).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
$\chi^2$	2,5	13	1,05	1,06	31,36

Tableau 19: Tableau de la moyenne des chi 2 par degré de liberté sur une surface pour des prothèses en titane, inox et en chrome- cobalt.

Cette distribution présente des grandes valeurs de chi 2 montrant l'hétérogénéité de la répartition des métaux. Cette dernière varie pour un type d'implant en fonction de la contamination des tissus et de leur pigmentation occasionnée par une métallose. Nous pouvons ainsi voir que pour la prothèse P4 (figure 57d), où nous avons une métallose, l'hétérogénéité est plus grande. Il en est de même pour la prothèse P7 (figure 57b) qui est constituée de deux types d'alliage.

La représentation du nombre de mesures appartenant à la classe B (cf. Chapitre X.II.B) confirme cette hétérogénéité de surface et donne une indication sur la probabilité d'obtenir des fragments ou des amas d'éléments sous forme ionique ou moléculaire (figure 58).

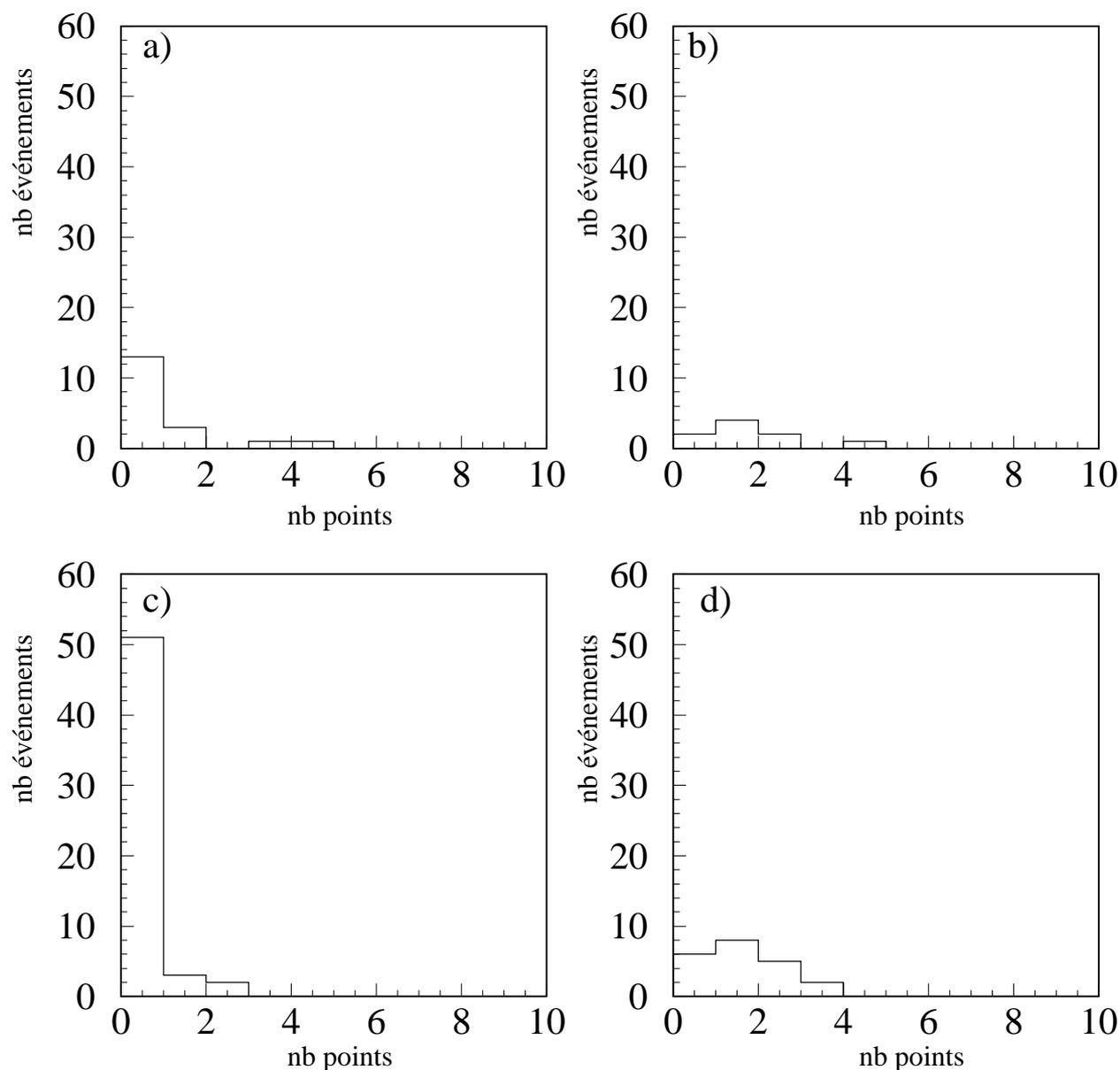


Figure 58: Graphes représentant le nombre de points appartenant à la classe B pour une prothèse en titane (a), une tête en alliage de cobalt et tige en titane (b), en inox (c) et en alliage de cobalt (d).

Nous constatons que le nombre de points appartenant à cette deuxième classe est plus ou moins important. La moyenne de cette distribution varie de 0.63 à 1.83. En effet, si nous avons une forte contamination du tissu (tableau 18) et une hétérogénéité non négligeable (figure 57d), nous aurons plus de points dans cette classe (figure 58d) et moins de points au dessous de la limite de détection. Dans le cas contraire, lorsque les tissus sont faiblement contaminés (figure 57c), nous aurons beaucoup plus de points en dessous de la limite de détection et le nombre de points appartenant à cette deuxième classe sera minime (figure 58c). Nous avons ainsi une idée du degré de contamination des tissus musculaires.

Nous concluons que le phénomène de répartition des éléments métalliques est aléatoire. Ceci est confirmé par une autre méthode d'analyse : l'étude de la localisation du barycentre. Nous considérons les variations des concentrations sur une surface par l'analyse des centres de gravité que nous déterminons de la manière suivante :

$$\overrightarrow{OG} = \frac{\sum_i C_i \overrightarrow{OP_i}}{\sum_i C_i} \quad \text{avec } C_i \text{ correspondant à la concentration}$$

Les neuf points de mesure sont répartis de telle sorte qu'ils forment un carré de 9 mm<sup>2</sup> (figure 49). A chaque point nous associons les coordonnées de son centre (x, y) ∈ [1, 3]×[1, 3] et nous calculons le barycentre « mesuré ». Si la concentration est la même en tous les points, nous aurons le barycentre « attendu ». La comparaison entre le barycentre « mesuré » et celui « attendu » pour chacun des éléments peut être caractérisée par la distance *D* telle que :

$$D = \sqrt{(x_A - x_M)^2 + (y_A - y_M)^2}$$

avec (x<sub>A</sub>, y<sub>A</sub>) les coordonnées du barycentre attendu  
(x<sub>M</sub>, y<sub>M</sub>) les coordonnées du barycentre mesuré.

A partir de ces données, l'étude de la distribution des métaux et de leur possible corrélation pourra être effectuée. Sur les graphes de la figure 59, nous représentons le nombre de fois que nous observons un événement en fonction de la distance *D* entre le barycentre attendu et mesuré pour l'ensemble des éléments majeurs pour un type d'implant. Elle sera notée <d<sub>loc-bary</sub>>.

Cette distribution n'est pas groupée autour de zéro confirmant bien l'hétérogénéité. Cependant, nous n'avons pas d'indication significative de la répartition des éléments sur une surface. Une des questions auxquelles nous nous attacherons à répondre est de déterminer comment se répartissent les éléments sur cette surface. Sont-ils seuls sous forme ionique ou bien sont ils corrélés entre eux ? (figure 49). Deux méthodes peuvent être utilisées. La première consiste à déterminer la distance entre les barycentres de deux métaux correspondant à des éléments majeurs que nous rencontrons dans les implants de la même manière dont nous avons calculé la distance entre le barycentre attendu et mesuré. Nous la noterons <d<sub>éléments</sub>>.

Les couples d'éléments considérés sont les suivants :  
Ti-Cr, Ti-Co, Ti-Ni  
Cr-Ti, Cr-Co, Cr-Ni  
Co-Ti, Co-Cr, Co-Ni  
Ni-Ti, Ni-Cr, Ni-Co

Le tableau 20 représente les corrélations possibles entre les éléments majeurs pour un type d'implant donné.

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
<d <sub>éléments</sub> >	0,43	0,65	0,25	0,32	0,16

Tableau 20 : Moyenne des distances de barycentres pour un couple d'éléments majeurs pour un type de prothèse.

Lors d'une faible contamination des tissus, les corrélations sont plus difficiles à mettre en évidence et moins nombreuses du fait que nous avons plus de points en dessous de la limite de détection. Pour la métallose (prothèse P4), où les points supérieurs à la limite de détection sont plus nombreux et où nous avons plus d'éléments métalliques, cette étude est plus significative. La distance entre les barycentres des éléments métalliques majeurs étant faible, cela montre une corrélation plus marquée entre eux.

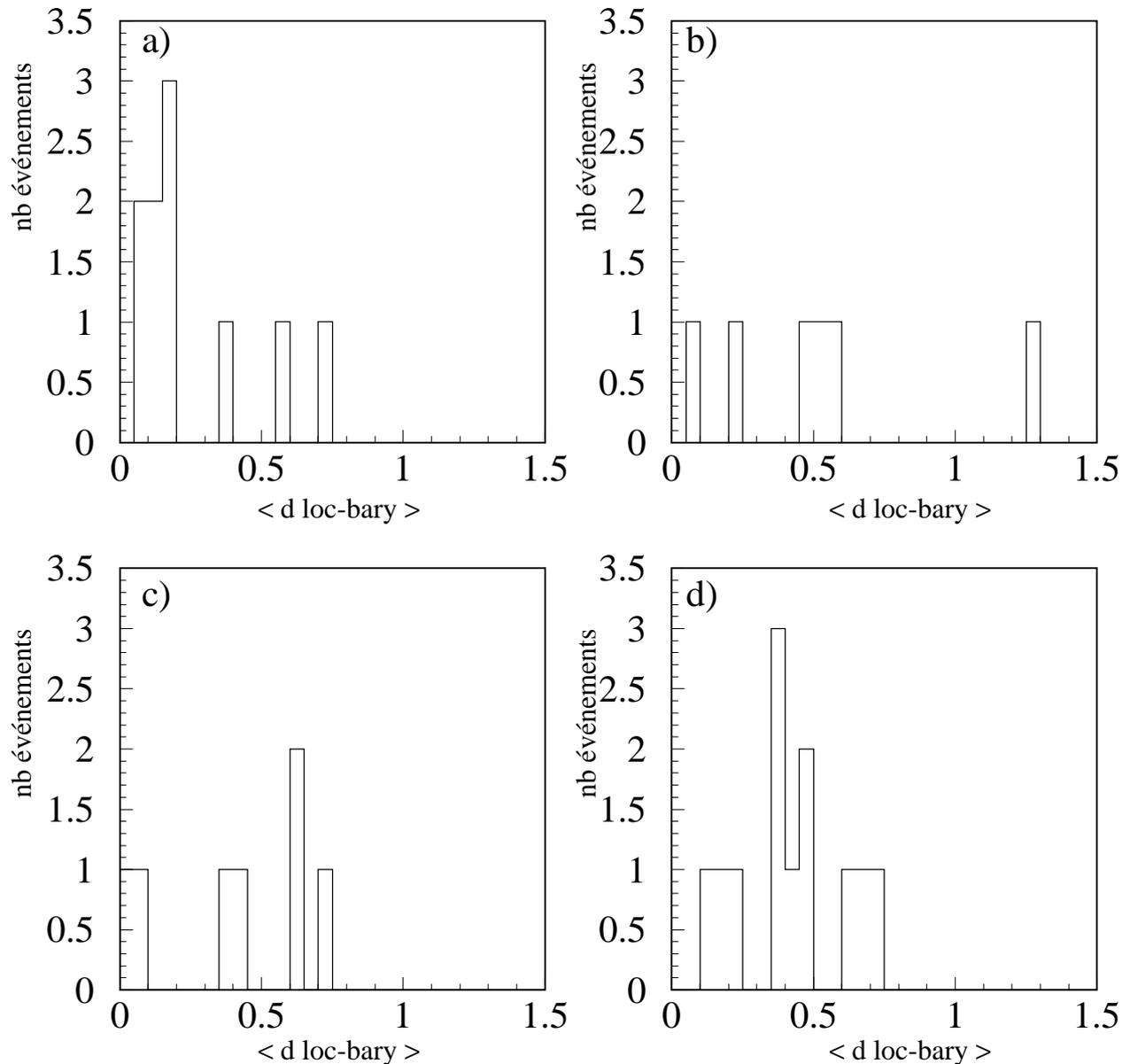


Figure 59 : Distance entre barycentres attendus et mesurés pour les éléments majeurs pour chaque type d'implant ( a) titane, b) tige titane et tête cobalt-chrome, c) alliage cobalt, d) inox). pour les points mesurés supérieurs à la limite de détection. Les valeurs moyennes des distributions sont respectivement 0.26 ; 0.53 ; 0.40 et 0.42.

De manière complémentaire, il nous paraît opportun de regarder la distance entre les maxima pour chaque élément dans les tissus. Nous calculerons les distances entre les localisations des concentrations maximales des différents éléments sur un même tissu. Elle sera notée  $\langle d_{\max} \rangle$ . Nous pensons que certains éléments métalliques issus de la prothèse se trouvent sous forme de fragments dans les tissus, ce qui pourrait correspondre au maximum de concentration. Le fait de localiser ce point et de voir si nous avons des corrélations de localisation entre éléments, traduites par la présence des maxima en un même point, devrait nous permettre d'établir si la contamination des tissus se fait par la présence de fragments ou sous une forme ionique beaucoup plus diffuse. A chaque point maximum, nous

affectons des coordonnées et nous calculons la distance entre ces points pour les mêmes couples d'éléments que ceux traités précédemment (figure 60).

Un pic dans cette distribution montre les corrélations entre éléments. Si le pic est à zéro, la corrélation est entre tous les éléments du tissu. Cette étude nous permet d'établir que nous n'avons pas toujours des corrélations entre tous les éléments métalliques. Par exemple pour la P42 et la P43 (figures 60a et c), tous les éléments ne sont pas corrélés, tandis que pour la métallose (prothèse P4, figure 60d), ils sont presque tous corrélés entre eux. Pour la prothèse en alliage de titane, on a un seul élément majeur, les corrélations sont donc moins significatives.

Il est difficile de faire la comparaison de plusieurs maxima entre eux étant donné qu'ils ne correspondent pas toujours au même point. La deuxième méthode utilisée pour mettre en évidence de possibles corrélations est la recherche sur une surface d'analyse du « point sélectionné » pour lequel la contamination sera plus importante pour l'ensemble des éléments métalliques majeurs. Cette localisation est faite en prenant et en ne prenant pas en compte le fer qui est plus considéré comme un artefact du fait de sa forte teneur dans les éléments sanguins et de la contamination possible par les instruments chirurgicaux. Cette étude consiste à déterminer le point où la somme des  $\chi^2$  par rapport à la valeur moyenne des éléments métalliques est maximale.

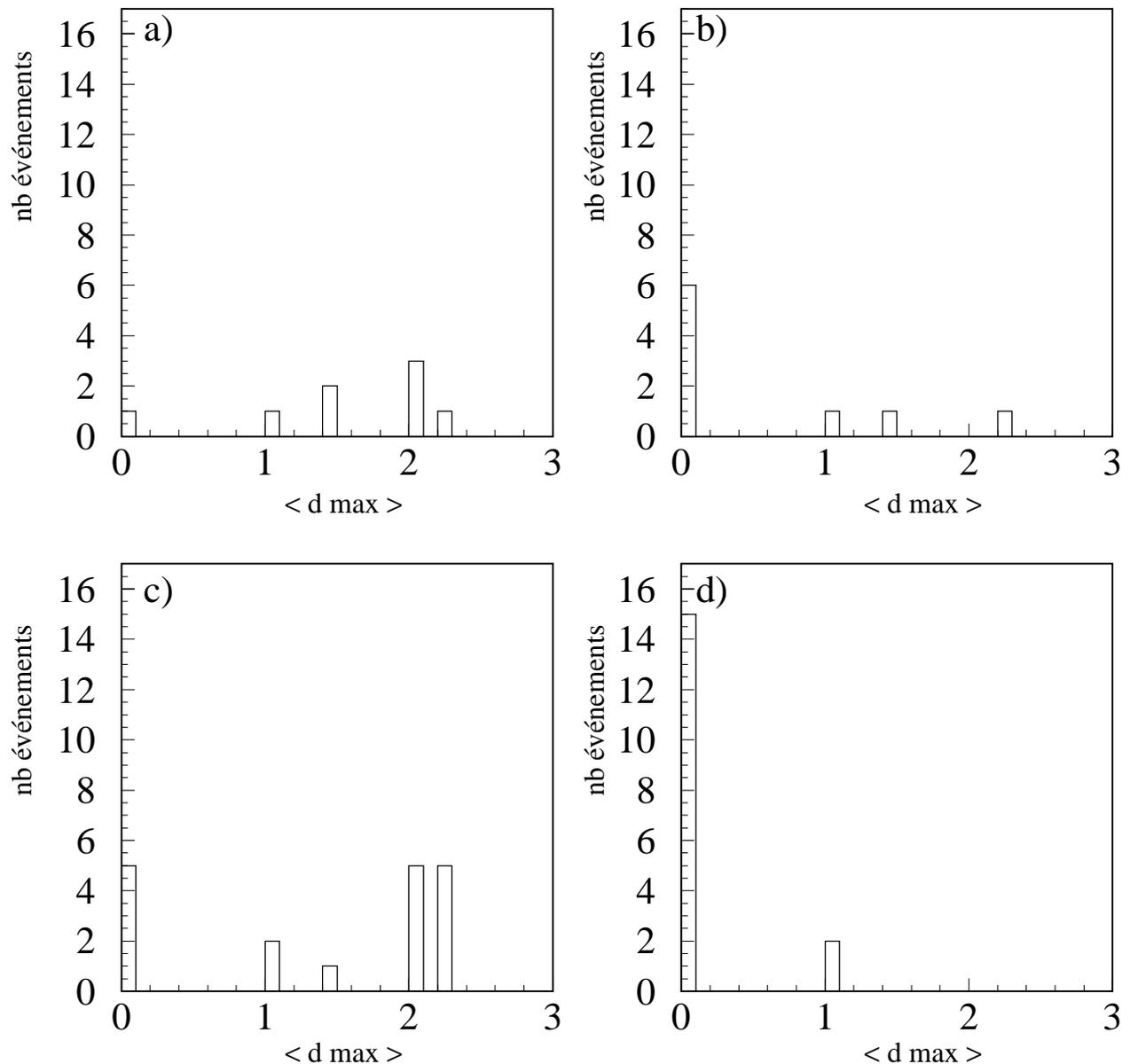


Figure 60: Corrélation entre les maxima des éléments pour chaque type d'implant : (a) titane, (b) tige titane et tête cobalt-chrome, (c) alliage cobalt, (d) inox

La distance entre la localisation du point sélectionné et celle du maximum des concentrations des éléments majeurs étant faible, inférieure à une unité dans tous les cas, montre que leurs positions sont corrélées (tableau 21).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
<b>Avec Fer</b>	0,83	0,41	0	0,34	0,16
<b>Sans Fer</b>	0,92	0,41	0	0,34	0,19

Tableau 21 : Distance entre les points maxima et sélectionné avec et sans fer.

Nous venons de montrer que sur une surface d'analyse, nous avons **la présence d'éléments majeurs provenant de l'implant**. D'autre part, la distribution en éléments métalliques sur une surface d'analyse est variable et il existe des possibilités de corrélation de localisation entre ces éléments. Nous avons défini trois quantités que nous allons reprendre pour étudier l'évolution de ces concentrations en fonction de la localisation le long de la prothèse, il s'agit de la concentration des tissus, de la concentration maximale et du point sélectionné.

#### b) Evolution le long de l'implant

De manière analogue à celle utilisée pour l'analyse d'une face d'un tissu musculaire, nous regarderons la répartition des éléments le long du fémur. La comparaison de la moyenne le long de l'implant des concentrations des tissus avec les concentrations maximales (tableau 18) montre que les concentrations locales importantes peuvent être masquées et suggère que nous avons une hétérogénéité de répartition en fonction de la localisation du prélèvement. Dans un premier temps nous étudierons les variations du  $\chi^2$  correspondant à l'écart des mesures par rapport à leur moyenne pour un type d'implant pour les trois catégories de mesures considérées (tableau 22).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
<b>Moyenne</b>	2,6	6,3	0,7	6,3	16,6
<b>Maximum</b>	12,4	40,6	4,9	8,1	82,4
<b>Sélection</b>	11,4	58,8	2,8	8,4	76,3

Tableau 22: Valeur moyenne du  $\chi^2$  par degré de liberté de la moyenne des variables utilisées moyennée pour les éléments majeurs le long de l'implant en fonction du type d'implant.

Suivant les mesures (moyenne, maximum et sélection) que nous étudions, nous n'avons pas les mêmes variations le long de l'implant. Les valeurs moyennes du  $\chi^2$  par degré de liberté obtenues à partir des teneurs moyennes de chaque surface d'analyse montre une plus grande homogénéité de répartition comparée à celles obtenues à partir des maxima et des points sélectionnés. Ceci dénote l'existence d'une contamination de base tout le long de l'implant. Dans le cas de la métallose, nous avons une plus forte hétérogénéité de cette répartition, mettant en évidence la plus forte contamination due à l'état des tissus. Si nous nous intéressons à l'évolution et à la différence d'homogénéité d'un élément en fonction de sa localisation à l'aide des valeurs du  $\chi^2$  (figure 62), nous constatons que tous les éléments ne vont pas avoir le même comportement. Dans la majorité des cas, il y a plus de variations de contamination au niveau du col de la prothèse, ceci est plus marquant pour la métallose, où nous observons une forte hétérogénéité de tous les éléments, en plusieurs endroits. Suivant la localisation nous aurons des phénomènes différents, particuliers à chaque type d'implant et à chaque pathologie.

L'étude du centre de gravité des teneurs par rapport à leur localisation ainsi que le calcul de la distance entre le barycentre attendu et mesuré vont nous aider à estimer et à mieux comprendre la répartition des concentrations le long de la prothèse (tableau 23). Pour ce faire, nous avons affecté à chaque tissu, suivant la localisation, les coordonnées portées sur la figure 61.

3	1	7
2	2	6
1	3	5
	4	
	1	2

Figure 61 : Coordonnées affectées aux différentes localisations le long de l'implant.

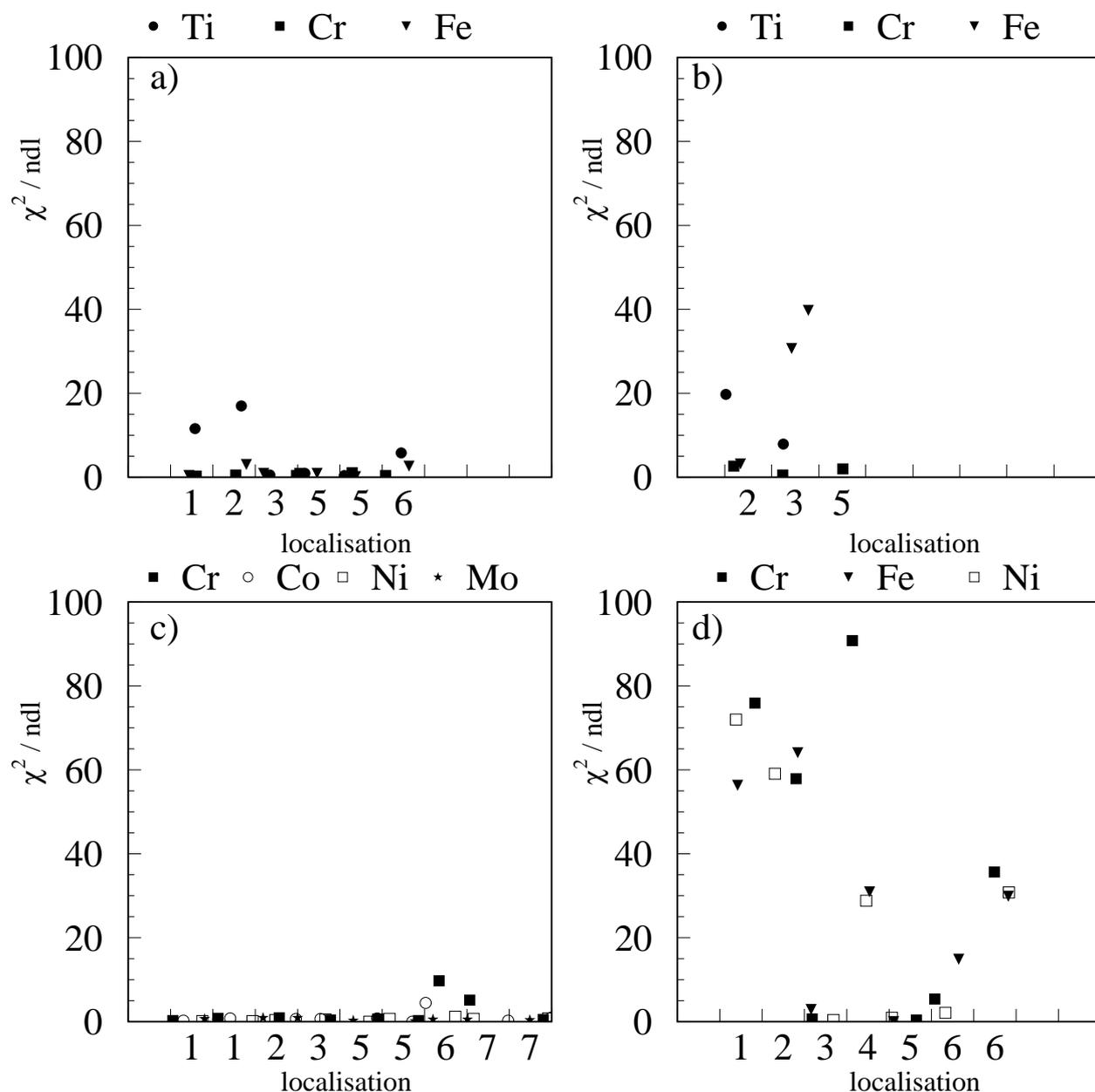


Figure 62: Représentation du chi 2 par degré de liberté de la moyenne des mesures sur une surface donnée en fonction de la localisation le long de l'implant pour les éléments majeurs.

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
<b>Moyenne</b>	0,25	0,83	0	0,78	2,1
<b>Maximum</b>	0,25	0,63	0,65	0,87	0,62
<b>Sélection</b>	0,28	0,74	0,45	1,03	0,65

Tableau 23 : Distance entre le barycentre attendu et mesuré pour les différents types de prothèse en prenant en compte les moyennes des surfaces étudiées, les maxima et les points sélectionnés.

Si nous considérons les moyennes, nous devons prendre en compte le fait que les contaminations locales plus importantes ne seront pas prises en compte. Il est donc normal de trouver, en général, une répartition un peu plus homogène qu'avec les autres quantités. Cependant nous pouvons remarquer que pour la métallose ce n'est pas le cas. Cette différence plus importante peut être induite par de fortes concentrations de base entraînant une délocalisation du barycentre.

L'ensemble de ces distances entre barycentre montre que la contamination des tissus n'est pas uniforme le long de l'implant quels que soient la pathologie et le type de prothèse.

La position des maxima des différentes mesures indique la localisation principale de la contamination, elle sera portée sur un graphe représentant de manière schématique une prothèse (figure 63). Par le calcul de la distance entre les maxima pour un couple d'éléments, nous allons essayer de mettre en évidence des corrélations entre eux.

Quelque soit la quantité mesurée considérée, la localisation de la contamination diffère peu. Les résultats obtenus avec les maxima et les sélections sont fréquemment corrélés. Dans la prothèse en titane, le maximum de pollution se situe en regard de la queue de prothèse tandis que dans les autres cas, la contamination est majoritaire au niveau de la tête fémorale. Ce phénomène peut être induit par la circulation osseuse (cf. Annexe V) ou la gravité transportant des particules vers le bas de l'articulation. Cette constatation ne peut pas nous permettre de dire que dans le cas de prothèse en alliage de titane, nous allons avoir une contamination au niveau de la queue de la tige, la statistique de nos mesures n'est pas assez importante. Les positions des maxima dépendent de l'élément, de la pathologie et du type d'implant.

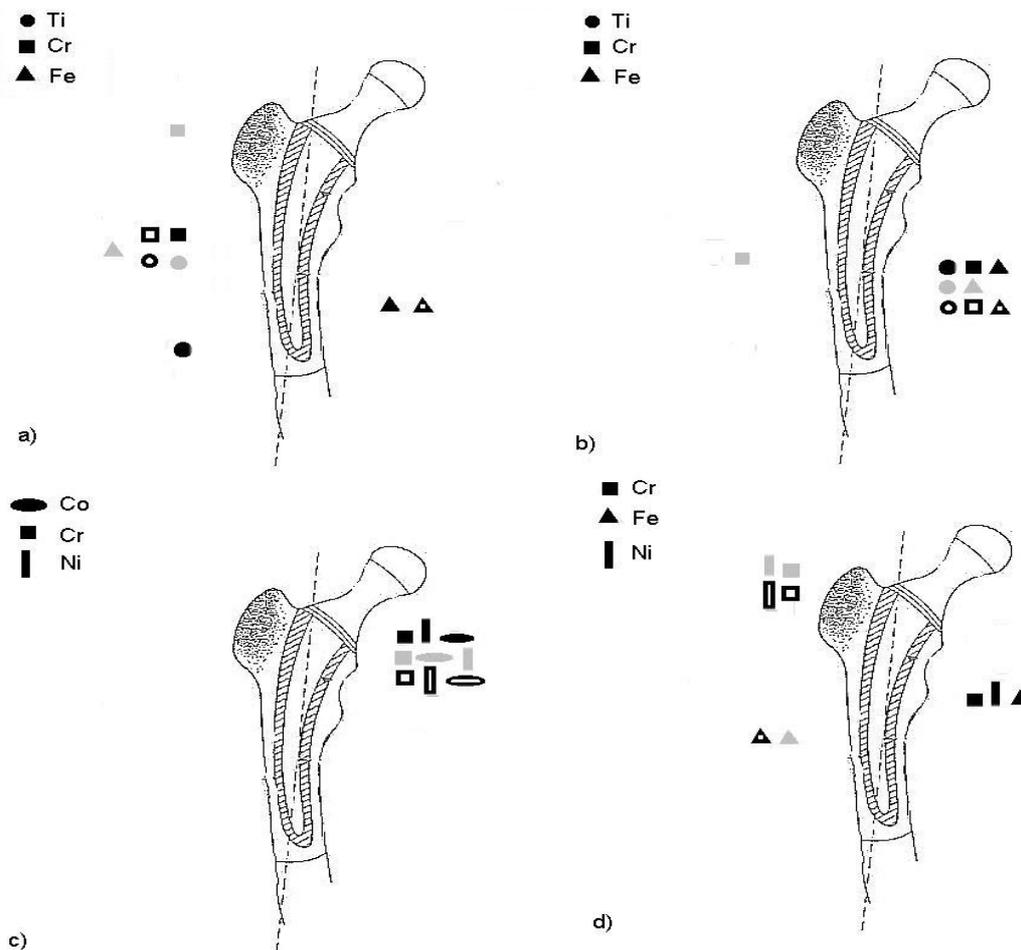


Figure 63 : Localisation des maxima entre les éléments majeurs de la prothèse P42D (a), P7 (b), P43D (c) et P4 (d). Les symboles noirs correspondent aux moyennes, les grisés aux concentrations maximales et les blancs à celles des points sélectionnés

Comme nous avons défini un point sélectionné correspondant au point maximum sur une surface d'analyse, nous pouvons de manière analogue déterminer une surface sélectionnée le long du fémur. La localisation de cette surface correspondant à la position du maximum de concentration de tous les éléments majeurs de la prothèse, est représentée sur la figure 64. Nous constatons que le maximum de contamination se trouve aussi bien sur la face interne qu'externe du fémur quelle que soit la prothèse. L'état du tissu semble rentrer en compte. De plus, nous n'avons pas toujours les mêmes positions analysées sur une surface donnée et le long de l'implant ce qui limite notre comparaison. Cependant, les surfaces sélectionnées à partir des maxima et des points sélectionnés sont corrélées, seule la moyenne semble suivre une autre évolution.

La comparaison entre la position des sélections et des maxima montre qu'ils ne sont pas totalement corrélés. Nous pouvons avoir une contamination maximale à un endroit sans avoir pour autant la présence de tous les éléments majeurs (tableau 24). Ceci est le cas de la prothèse avec métallose (P4).

		P42D	P7	P43G	P43D	P4
<b>Différence entre sélectionné avec fer et max</b>	<i>Moyenne</i>	0	0	0	0	4,03
	<i>Maximum</i>	0	0,49	1,03	0,81	1,03
	<i>Sélectionné sans fer</i>	0,53	0	0	0	1,03
<b>Différence entre sélectionné sans fer et max</b>	<i>Moyenne</i>	0,73	0	0	0	0
	<i>Maximum</i>	0	0,49	1,03	0,81	1,03
	<i>Sélectionné sans fer</i>	0,53	0	0	0	1,03

Tableau 24: Estimation des distances entre les fichiers sélectionnés et les points maxima suivant les trois observables.

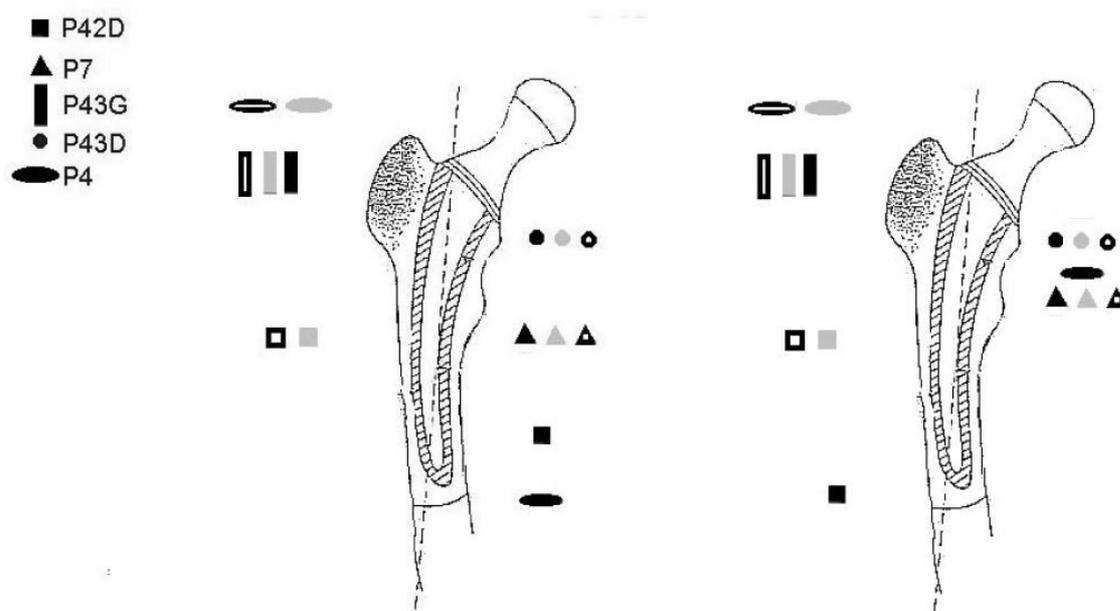


Figure 64: Localisation de la surface sélectionnée avec fer (a) et sans fer (b) pour les différents types de prothèse. Les symboles noirs sont obtenus avec les concentrations moyennes, les gris avec les maxima et les noirs et blancs pour les points sélectionnés.

c) Etude des faces arrières (face L)

Nous allons maintenant nous intéresser à l'étude de la face L, c'est à dire la face la plus éloignée de l'implant. Tout comme la face P, nous regardons la quantité d'éléments métalliques dans les tissus. Dans un premier temps, nous constatons que le pourcentage de points supérieurs à la limite de détection est beaucoup plus faible que sur la face proche de l'implant (tableau 25). Ceci se traduit par des concentrations en éléments métalliques en dessous de la limite de détection (tableau 26).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
Fraction > LD	43%	56%	13%	10%	55%

Tableau 25: Pourcentage de points supérieurs à la limite de détection

		P42D Ti	P7 Ti + Co	P43G Co-Cr	P43D Co-Cr	P4 Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	< C <sub>moy</sub> >	(<21*)	73 ± 15	(<32*)	22 ± 4	(<35*)
	Max (C <sub>moy</sub> )	(<21*)	184 ± 53	(<32*)	43 ± 21	(<35*)
	Max (C)	33	531	268	610	104
<b>Cr</b>	< C <sub>moy</sub> >	(<29*)	(<30*)	(<56*)	(<33*)	(<35*)
	Max (C <sub>moy</sub> )	(< 29*)	(<30*)	(<56*)	(<33*)	1749 ± 277
	Max (C)	23	105	151	211	2500
<b>Fe</b>	< C <sub>moy</sub> >	95 ± 6	246 ± 34	124 ± 10	76 ± 4	94 ± 10
	Max (C <sub>moy</sub> )	189 ± 60	904 ± 137	215 ± 95	122 ± 21	6702 ± 742
	Max (C)	253	2283	449	428	7448
<b>Co</b>	< C <sub>moy</sub> >	(<27*)	(<42*)	(<37*)	(<15*)	0
	Max (C <sub>moy</sub> )	(<27*)	65 ± 54	(<37*)	(<15*)	0
	Max (C)	17	209	53	60	0
<b>Ni</b>	< C <sub>moy</sub> >	10 ± 2	(<20*)	(<25*)	(<11*)	(<16*)
	Max (C <sub>moy</sub> )	15 ± 3	(<20*)	(<25*)	(<11*)	179 ± 107
	Max (C)	23	16	112	271	931

Tableau 26 : Contamination des tissus adjacents aux implants métalliques sur la face L. Les concentrations sont données en µg/g et les (\*) correspondent aux limites de détection.

Par comparaison avec les teneurs de la face P, les concentrations sont plus faibles avec des maxima également moins importants. En effet, la majorité des concentrations en éléments métalliques sont en dessous de la limite de détection, seuls les teneurs en fer convergent vers les valeurs de référence.

De plus la répartition surfacique est plus homogène que sur la face P, le nombre de points de la classe B représentant les points maxima est moins important. La moyenne des distributions variant de 0,5 à 1,61, dénotent le fait que nous avons moins de contamination (figure 65, tableau 27).

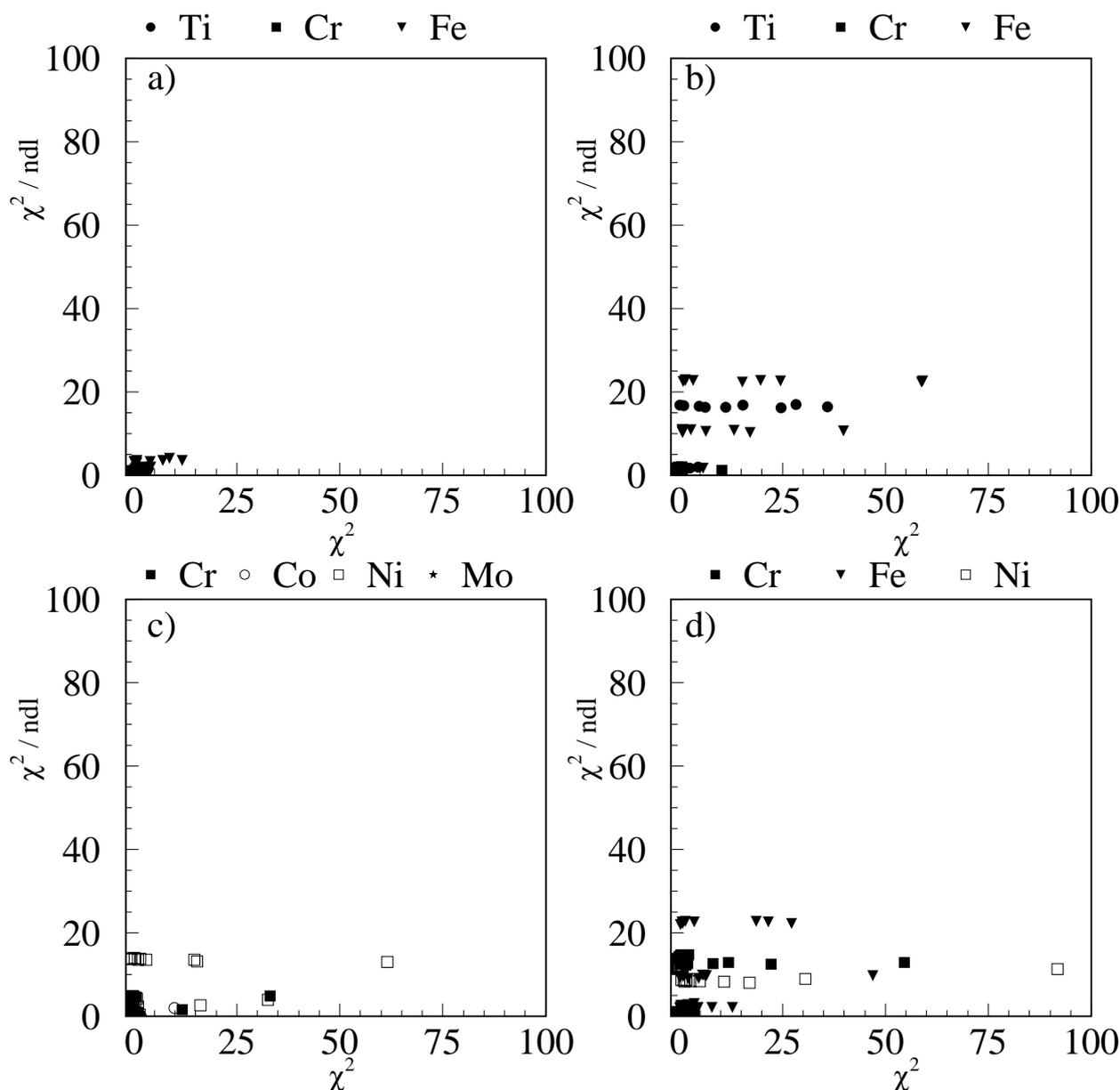


Figure 65: Répartition du chi 2 par degré de liberté des moyennes en fonction du chi 2 de chaque mesure pour des prothèses en titane (a), en titane et en chrome- cobalt (b), en chrome- cobalt (c) et en inox (d).

	P42D	P7	P43G	P43D	P4
$\chi^2$	0,72	6,16	0,75	1,06	4,36

Tableau 27: Tableau de la moyenne des chi 2 des moyennes sur une surface pour des prothèses en titane, inox et en chrome- cobalt.

Nous pouvons constater un retour vers une certaine homogénéité par rapport à la face P, cette dernière étant plus contaminée, quelque soit le type d'implant et l'état des tissus. De ce fait, les corrélations sont plus rares entre les éléments métalliques majeurs.

En ce qui concerne l'évolution le long de l'implant, elle est très difficile à mettre en évidence puisque les teneurs sont proches ou en dessous de la limite de détection. Nous allons tout d'abord considérer l'évolution de la localisation des maxima qui est représenté sur la figure 66, car les valeurs sont au dessus de la limite de détection.

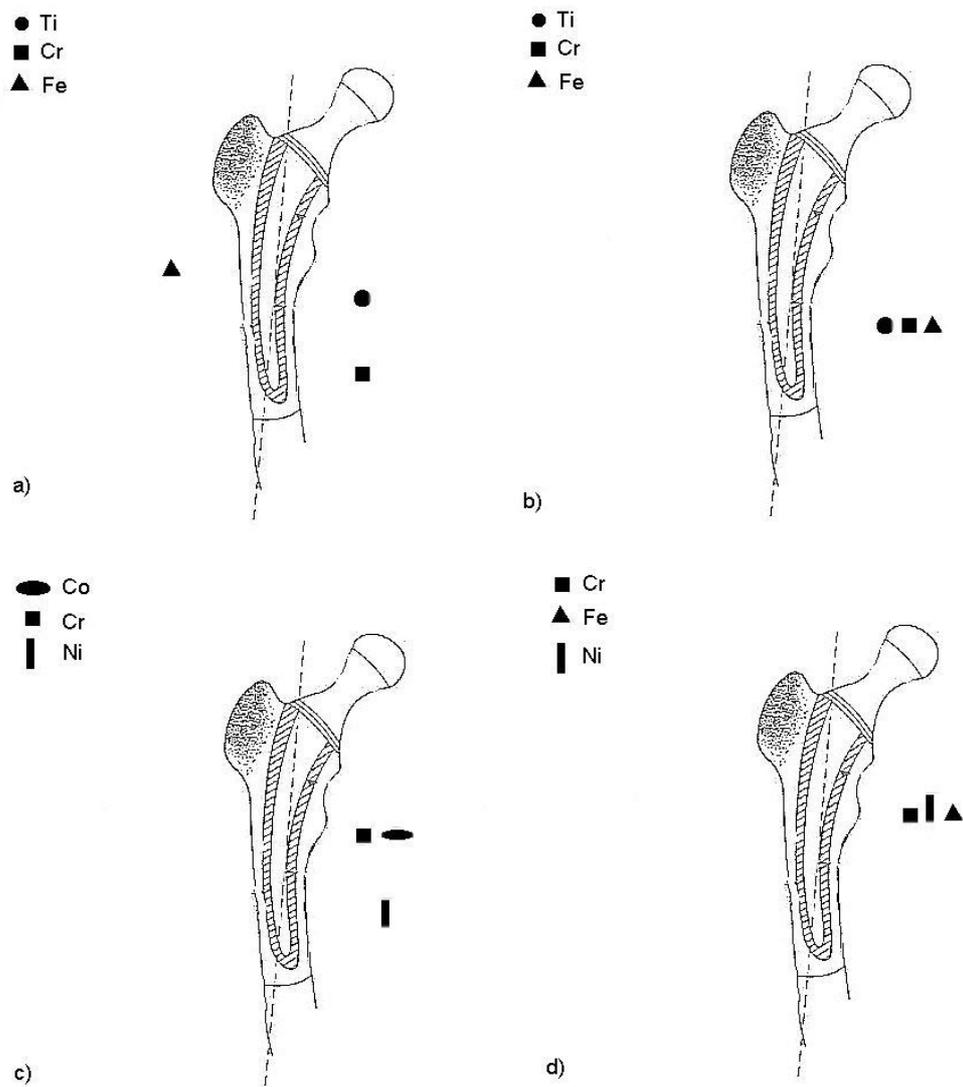


Figure 66 : Localisation des maxima le long de l'implant sur la face L pour des prothèses en titane (a), en titane et en chrome- cobalt (b), en chrome- cobalt (c) et en inox (d).

Quelque soit le prélèvement et l'état pathologique du tissu, le maximum de contamination et la localisation de la surface sélectionnée ont lieu sur la face interne du fémur.

Cependant, la surface sélectionnée est parfois différente de celle de la face P, démontrant que la migration et la prise en charge des éléments ne se font pas de la même manière.

#### d) Etude de l'évolution entre les deux faces d'analyse

Etant donné que nous avons observé des variations de concentration sur une surface et le long de l'implant, nous pouvons nous attendre à une évolution en fonction de la distance séparant le tissu et la prothèse. Pour avoir une idée de la migration en fonction de la profondeur, nous avons analysé ce que nous appelons la face L des tissus de la même manière que la face P.

Par comparaison entre la localisation des points sélectionnés et maxima le long de l'implant entre les deux faces, nous constatons que la contamination est variable. Pour estimer ces deux paramètres, nous avons calculé une variable tenant compte des concentrations que nous avons définie de la manière suivante :

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{C_{\text{avant}} - C_{\text{arrière}}}{C_{\text{avant}}}$$

Selon que cette valeur tend vers 0 ou 1 nous saurons si la particule a migré ou pas. Nous effectuerons cette analyse pour les moyennes des surfaces et pour les points sélectionnés.

Le transfert d'éléments se fait de manière assez homogène entre les deux faces. Nous présenterons dans le tableau 28 les valeurs de ces rapports calculés pour les surfaces sélectionnées de la face P.

Nous remarquons que la majorité des valeurs de  $\Delta F/F$  est comprise entre 0,90 et 1,00. Ceci nous conduit à dire que nous ne retrouvons pas les éléments sur la face L. Trois interprétations sont envisageables :

- l'élément reste sur la face avant du tissu et il n'est pas totalement transféré,
- l'élément est pris en charge par des cellules et il migre vers d'autres organes via le réseau lymphatique ou sanguin,
- la quantité d'éléments métalliques sur la face avant n'est pas suffisante pour contaminer la face arrière du tissu.

Dans le cas de la métallose, nous constatons que les valeurs sont plus faibles et se rapprochent de 0,5 pour les moyennes. Le transfert s'effectue bien entre les faces en ce qui concerne la contamination de base. Pour les deux autres cas, c'est à dire les maxima et les surfaces sélectionnées, les rapports sont supérieurs à 0,90, signifiant que les migrations se font moins bien. Il est normal de penser que suivant l'état du tissu et le degré de contamination, nous n'aurons pas le même transfert d'éléments

		<b>P42D</b> Ti	<b>P7</b> Ti + Co	<b>P43G</b> Co-Cr	<b>P43D</b> Co-Cr	<b>P4</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,77 ± 0,61</b>	<b>0,78 ± 0,11</b>	-	-	-
	Maxima	0,97 ± 0,02	0,98 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,84 ± 0,38	-
	Sélection	0,97 ± 0,02	0,97 ± 0,00	0,86 ± 0,02	-	-
<b>Cr</b>	<b>Moyenne</b>	-	-	-	<b>0,97 ± 0,11</b>	<b>0,64 ± 0,07</b>
	Maxima	-	0,49 ± 0,21	-	0,99 ± 0,02	0,95 ± 0,01
	Sélection	-	0,82 ± 0,11	-	1,00 ± 0,00	0,95 ± 0,01
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	-	<b>0,24 ± 0,16</b>	<b>0,54 ± 0,30</b>	<b>0,80 ± 0,07</b>	<b>0,50 ± 0,10</b>
	Maxima	-	0,54 ± 0,05	0,24 ± 0,13	0,94 ± 0,01	0,91 ± 0,01
	Sélection	-	0,71 ± 0,03	0,53 ± 0,09	0,94 ± 0,01	0,91 ± 0,01
<b>Co</b>	<b>Moyenne</b>	-	-	-	<b>0,98 ± 0,03</b>	<b>1,00 ± 0,00</b>
	Maxima	-	-	-	0,98 ± 0,02	-
	Sélection	-	-	-	0,98 ± 0,02	-
<b>Ni</b>	<b>Moyenne</b>	-	-	-	<b>0,96 ± 0,50</b>	<b>0,64 ± 0,11</b>
	Maxima	-	-	0,97 ± 0,05	0,97 ± 0,07	0,93 ± 0,01
	Sélection	-	0,82 ± 0,25	-	0,97 ± 0,07	0,93 ± 0,01

Tableau 28: Valeur des rapport  $\Delta F/F$  pour tous les types d'implants suivant les trois observables.

#### e) Etude des corrélations

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes III.A.2.a et III.A.2.b, il existe des corrélations de localisation entre les éléments. Le calcul des rapports des éléments métalliques et la comparaison entre ceux obtenus dans les tissus et dans les prothèses peut nous aider à savoir si nous sommes en présence de débris, d'accumulation d'ions ou de molécules (tableau 29).

Nous pouvons remarquer que les rapports des éléments métalliques sont dans la majorité des cas inférieurs à ceux que nous rencontrons dans les prothèses. Dans le cas de la prothèse P42, le rapport n'est pas significatif du fait que le titane est l'élément majeur de l'implant (90 %) et le chrome est un élément trace (0,02 %). De plus la prothèse ne présentait pas de signe d'instabilité. Il est donc normal de ne pas avoir de fragment mettant en jeu des éléments traces, cependant nous pouvons avoir des fragments de titane seul.

Dans le cas de la prothèse P43 et P4, les rapports Cr/Ni, Co/Ni et Cr/Fe sont supérieurs à ceux des implants, tandis que Ni/Fe est proche de ce que nous trouvons dans les prothèses. Les hypothèses suivantes peuvent être formulées :

les éléments sont sous forme ionique,  
nous sommes en présence d'une accumulation moléculaire ou ionique,  
il existe des fragments contenant certains éléments dont le cobalt et le chrome, le nickel ayant migré ou ayant été éliminé.

### 3) *Discussions*

Cette étude nous a permis de montrer que lorsque les tissus sont en contact ou proches d'un implant, il y a **contamination des tissus adjacents de façon plus ou moins importante suivant le type d'implant**. Cette contamination est assez hétérogène. Cependant, la majorité de la contamination en éléments métalliques a lieu au niveau du col fémoral. Pour savoir si elle se fait principalement sur la face externe ou interne, nous ne pouvons conclure vu la statistique insuffisante de nos mesures.

Par comparaison entre les moyennes et les maxima, nous remarquons que la contamination ne se fait pas de manière homogène à la surface d'un tissu puisque nous pouvons séparer nos mesures à l'aide de la distribution du chi 2 en deux catégories :

Un phénomène de pollution de base par des métaux sous forme ionique fonction de la corrosion et de la bioactivité.

Un phénomène particulière dont l'origine des débris est vraisemblablement mécanique et représentant des concentrations maximales d'éléments métalliques.

L'évolution entre les deux faces montre que sur la face en contact ou proche de l'implant, la répartition en éléments métalliques est beaucoup plus hétérogène et nous retrouvons une certaine homogénéité au fur et à mesure que nous nous éloignons de la prothèse.

Nous avons pu montrer que les éléments n'évoluent pas de la même manière entre les deux faces. Le fait de trouver des éléments métalliques sur la face proche de l'implant et de ne plus en avoir sur la face éloignée peut provenir du fait que certains éléments vont être pris en charge par des protéines ou des macrophages, migrer vers d'autres organes ou être éliminés. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que ces agglomérats de particules sont trop volumineux pour être transférés et restent sur place. Ils jouent le rôle de bouchon et empêche la migration par un phénomène actif ou de membrane. Ce phénomène est observable dans le cas où nous avons des teneurs élevées en éléments métalliques.

D'autre part, il existe des corrélations entre les éléments majeurs sur la face proche de l'implant qui ont tendance à disparaître sur la face éloignée ou sont plus difficiles à mettre en évidence du fait que les concentrations sont bien plus faibles. Nous pourrions penser que **les métaux sont liés au départ sous forme d'agglomérats et que par la suite, au cours de l'évolution ils se dissocient et tendent à migrer différemment**.

	<b>P7</b>				<b>P43G</b>				<b>P43D</b>				<b>P4</b>			
	Prot	Avant	Arrière	Prot	Avant	Arrière	Prot	Avant	Arrière	Prot	Avant	Arrière	Prot	Avant	Arrière	
<b>Ti/Cr</b>	Max	91,8 ± 31,7	4,5 ± 1,1	-	86 ± 69	7,5 ± 6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Sel	91,8 ± 31,7	13,1 ± 6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Cr/Ni</b>	Max	-	-	16	0,1 ± 0,1	-	0,7	14,6 ± 3,9	-	1,4	3,1 ± 0,3	2,7 ± 0,3	-	-	-	
	Sel	-	-	-	-	-	-	14,6 ± 3,9	-	-	3,1 ± 0,3	2,7 ± 0,3	-	-	-	
<b>Cr/Fe</b>	Max	-	-	74	0,04 ± 0,03	0,1 ± 0,1	50	0,4 ± 0,1	-	0,3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	-	-	-	
	Sel	-	-	-	-	-	-	0,4 ± 0,1	-	-	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	-	-	-	
<b>Ni/Fe</b>	Max	-	-	4,6	0,3 ± 0,1	-	77	-	-	0,2	0,2 ± 0,1	-	-	-	-	
	Sel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,1	-	-	-	-	
<b>Co/Cr</b>	Max	-	-	2,2	-	-	1,8	0,8 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	
	Sel	-	-	-	-	-	-	0,8 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Co/Ni</b>	Max	-	-	35	-	-	1,2	11,9 ± 3,2	-	-	-	-	-	-	-	
	Sel	-	-	-	-	-	-	11,9 ± 3,2	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau 29: Rapports des éléments métalliques majeurs pour les maxima et les sélections pour tous les types de prothèses. Les rapports pour les prothèses ont été obtenus par spectrométrie à étincelles (Prot).

La métallose est un cas particulier. En effet la présence d'éléments métalliques en un endroit s'accompagne d'une sorte d'auréole tout autour comme s'il existait une décroissance progressive du point pouvant correspondre à une contamination ionique. Ceci n'est pas observable pour des faibles concentrations.

Afin de bien mettre en évidence l'évolution entre les deux faces et le devenir des éléments métalliques nous avons travaillé sur des prélèvements per-opératoires. L'évolution des métaux est étudiée en fonction de la pathologie.

## B. Etude des tissus per-opératoires

### 1) Tissu témoin

L'analyse du tissu témoin a été réalisée dans les mêmes conditions que celles des tissus en contact ou proches des implants métalliques. Ce tissu contient peu d'éléments métalliques comme pour les tissus post-mortem. L'échantillon étudié ne possède que du fer, du cuivre et du zinc. Nous nous intéressons principalement au fer et au zinc qui sont des éléments caractéristiques de l'organisme. Le cuivre ne varie pas d'un prélèvement à l'autre et sa teneur est proche de la limite de détection, son étude ne sera pas effectuée. Le fer est un élément majeur dans le système circulatoire sanguin et le zinc est considéré comme un élément favorisant la cicatrisation.

Dans les tableaux 30 et 31, nous présentons les résultats obtenus pour ces deux éléments sur la face P et L. Les concentrations de référence [65] sont également indiquées.

	Ref [65]	<C>	Max	$\chi^2$	<d <sub>loc-bary</sub> >	<d <sub>max</sub> >
<b>Fe (µg/g)</b>	38	82 ± 44	129 ± 27	2,14	0,07	0,05
<b>Zn (µg/g)</b>	193	34 ± 9	56 ± 10	1,2		

Tableau 30 : Résultats du fer et du zinc sur la face proche du fémur.

	Ref [65]	<C>	Max	$\chi^2$	< d <sub>loc-bary</sub> >	< d <sub>max</sub> >
<b>Fe (µg/g)</b>	38	31 ± 13	63 ± 20	0,86	0,2	2,05
<b>Zn (µg/g)</b>	193	11 ± 3	17 ± 6	0,53		

Tableau 31 : Résultats du fer et du zinc sur la face éloignée du fémur.

Dans tous les cas, les concentrations en zinc sont plus faibles que pour la référence pouvant ainsi mettre en avant le fait que le patient avait une réaction pathologique. Les teneurs en fer sont plus proches de ce que nous devrions avoir dans un tissu sain. La différence peut provenir de la faible statistique que nous avons et de la localisation du prélèvement qui, dans le cas présent, se situe au niveau capsulaire de la hanche. D'autre part, nous constatons que les valeurs maximales sont très proches des valeurs moyennes.

Nous pouvons également remarquer que les concentrations diminuent entre les deux faces analysées. Ce phénomène est observable pour les éléments majeurs des tissus et peut expliquer l'influence de la proximité de l'os sur le comportement de certains éléments.

L'analyse effectuée sur l'hétérogénéité des tissus pour le fer et le zinc nous a montré que 100 % des concentrations sont au dessus de la limite de détection et que nous n'avons pas de points appartenants à la classe B. Nous sommes en présence d'une certaine homogénéité de répartition de ces deux éléments à la surface du fémur. Ceci est confirmé par la faible valeur du chi 2 par degré de liberté calculée sur chacune des deux faces pour la moyenne des concentrations. Apparemment, nous avons un  $\chi^2$  légèrement plus élevé sur la face P, pouvant provenir du fait que les concentrations en fer sont plus élevées et plus hétérogènes proche de l'os probablement à cause du périoste.

Pour ce qui est de la distance entre le barycentre attendu et mesuré ( $\langle d_{loc-bary} \rangle$ ), les centres de gravité sont voisins confirmant une homogénéité de concentrations. Sur la face L, les teneurs sont faibles et les maxima de fer et de zinc ne se trouvent pas au même endroit, la corrélation entre eux est donc plus faible.

Cette étude réalisée sur le zinc sera reprise dans un paragraphe à part pour les tissus au contact d'implants afin d'étudier l'influence des éléments métalliques rélargués sur cet élément.

## 2) Tissus proches ou en contact avec un implant métallique

### a) Contamination et répartition des éléments métalliques dans les tissus

Les prélèvements ont lieu au niveau capsulaire, c'est à dire au pourtour du col de la prothèse. L'étude de ces tissus per-opératoires nous a paru intéressante car l'état des tissus est particulier. Nous pouvons distinguer 4 types de tissus : les métalloses avec coloration des tissus, les implants instables avec les prothèses qui bougent, les prélèvements sur prothèses stables et les plaques en contact direct avec les tissus.

Tout comme dans les tissus post-mortem, nous avons la présence d'éléments métalliques dans les tissus. Ceci est confirmé par la proportion de concentrations au-dessus de la limite de détection (tableau 32).

	<u>PO1</u>	PO2	<u>PO3</u>	PO4	<u>PO5</u>	<u>PO6</u>	<u>PO7</u>	<u>PO8</u>	PO9	PO10	PO11
%>LD	93%	75%	69%	59%	100%	53%	53%	100%	100%	100%	100%

Tableau 32 : Pourcentage de points supérieurs à la limite de détection. Les échantillons soulignés correspondent à une métallose ou une instabilité d'implant.

Cependant, nous pouvons voir que la contamination n'est pas la même partout. Pour la suite de l'analyse, nous allons tenir compte de l'état des tissus afin d'expliquer au mieux les différents phénomènes que nous pouvons observer (tableaux 33 et 34).

		<b>PO1</b> Ti + Cr-Fe- Ni	<b>PO3</b> Ti	<b>PO5</b> Co-Cr	<b>PO6</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO7</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO8</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	$\langle C_{moy} \rangle$	<b>762 ± 97</b>	<b>322 ± 38</b>	<b>(&lt; 6*)</b>	<b>(&lt; 30*)</b>	<b>(&lt; 40*)</b>	<b>561 ± 53</b>
	Max (C)	1734	368	(<14*)	35	(<36*)	1057
<b>Cr</b>	$\langle C_{moy} \rangle$	<b>357 ± 163</b>	<b>(&lt; 21*)</b>	<b>3523 ± 1026</b>	<b>7580 ± 608</b>	<b>10052 ± 1697</b>	<b>1614 ± 349</b>
	Max (C)	1144	(<67*)	4856	12239	18000	2672
<b>Fe</b>	$\langle C_{moy} \rangle$	<b>4460 ± 600</b>	<b>492 ± 167</b>	<b>905 ± 178</b>	<b>57576 ± 26504</b>	<b>50106 ± 3449</b>	<b>5011 ± 832</b>
	Max (C)	6303	969	1196	76200	86321	7779
<b>Co</b>	$\langle C_{moy} \rangle$	<b>57 ± 17</b>	<b>(&lt;19*)</b>	<b>1453 ± 214</b>	<b>(&lt;248*)</b>	<b>(&lt;507*)</b>	<b>117 ± 24</b>
	Max (C)	109	(<70*)	2284	(<547*)	(<441*)	164
<b>Ni</b>	$\langle C_{moy} \rangle$	<b>247 ± 73</b>	<b>7 ± 4</b>	<b>60 ± 31</b>	<b>7259 ± 2459</b>	<b>12295 ± 688</b>	<b>818 ± 132</b>
	Max (C)	432	23	116	9261	13035	1277

Tableau 33 : Concentration en éléments métalliques sur la face proche de l'implant pour des tissus présentant une métallose ou proches d'implants instables. Les concentrations sont données en µg/g.

Nous constatons que les concentrations en métaux dans les tissus métallisés sont plus importantes que dans les autres cas. Nous observons également, dans certains cas, une contamination par des éléments qui ne sont pas présents dans la prothèse. Par exemple, dans l'implant en inox (PO8), nous avons une forte contamination en titane. L'apport de ces éléments provient sans doute d'une source extérieure (traitement médical, implant dentaire ou apport alimentaire).

Les trois derniers tissus portés dans le tableau 34 correspondent à des plaques inox. Leur comportement est apparemment différent de celui des prothèses puisque les concentrations rencontrées sont presque aussi importantes que dans le cas d'instabilité ou de métallose. Ceci peut être dû au fait que les plaques sont directement en contact avec les tissus. Il faudra en tenir compte dans la suite des analyses. Un apport important d'éléments par les voies sanguines grâce au périoste peut expliquer ces fortes concentrations puisque les plaques sont directement en contact avec l'os et le périoste, membrane contenant une multitude de fins vaisseaux, qui apportent des nutriments, et qui recouvre l'os.

		<b>PO2</b> Ti	<b>PO4</b> Co-Cr	<b>PO9</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO10</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO11</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>46 ± 11</b>	<b>15 ± 7</b>	<b>(&lt;23*)</b>	<b>21 ± 8</b>	<b>22 ± 13</b>
	Max (C)	63	190	143	321	47
<b>Cr</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>11 ± 8</b>	<b>29 ± 11</b>	<b>110 ± 31</b>	<b>1257 ± 81</b>	<b>81 ± 77</b>
	Max (C)	34	54	170	5319	1493
<b>Fe</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>167 ± 29</b>	<b>943 ± 202</b>	<b>1273 ± 236</b>	<b>14120 ± 1006</b>	<b>558 ± 101</b>
	Max (C)	328	4358	3381	36342	14578
<b>Co</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>8 ± 6</b>	<b>59 ± 24</b>	<b>30 ± 13</b>	<b>(&lt;68*)</b>	<b>23 ± 14</b>
	Max (C)	12	141	51	(<109)	38
<b>Ni</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>17 ± 3</b>	<b>9 ± 7</b>	<b>26 ± 13</b>	<b>86 ± 49</b>	<b>26 ± 22</b>
	Max (C)	26	25	62	181	573

Tableau 34 : Concentration en éléments métalliques sur la face proche de l'implant pour des tissus ne présentant pas de métallose. Les trois derniers patients possédaient des plaques. Les concentrations sont données en µg/g et les (\*) correspondent aux limites de détection.

Nous avons vu dans le paragraphe III.A.2.a) que la répartition des éléments métalliques sur une surface donnée était hétérogène. Nous allons vérifier que pour les tissus per-opératoires nous obtenons le même phénomène. Pour ce faire nous avons étudié la distribution du chi 2 par degré de liberté des moyennes des concentrations et nous comparerons le comportement des différents tissus suivant leur état (figures 67 et 68).

Les implants stables ne montrent pas de fortes concentrations en éléments métalliques. PO4 est un tissu particulier, il a été prélevé un morceau de capsule de hanche un mois après l'ablation de la prothèse car le patient est resté un mois sans prothèse à cause de réactions inflammatoires. Nous pouvons constater sur le prélèvement effectué, la très faible contamination des tissus démontrant qu'il y a eu une sorte de nettoyage grâce aux réactions tissulaires.

Pour les implants instables, c'est à dire pour les prothèses qui bougent, nous avons plus d'hétérogénéité des concentrations sur une surface d'analyse (figures 68 a et c). Pour les plaques inox, l'hétérogénéité n'est pas négligeable et ce même dans le cas d'implants stables (figures 67 a et b).

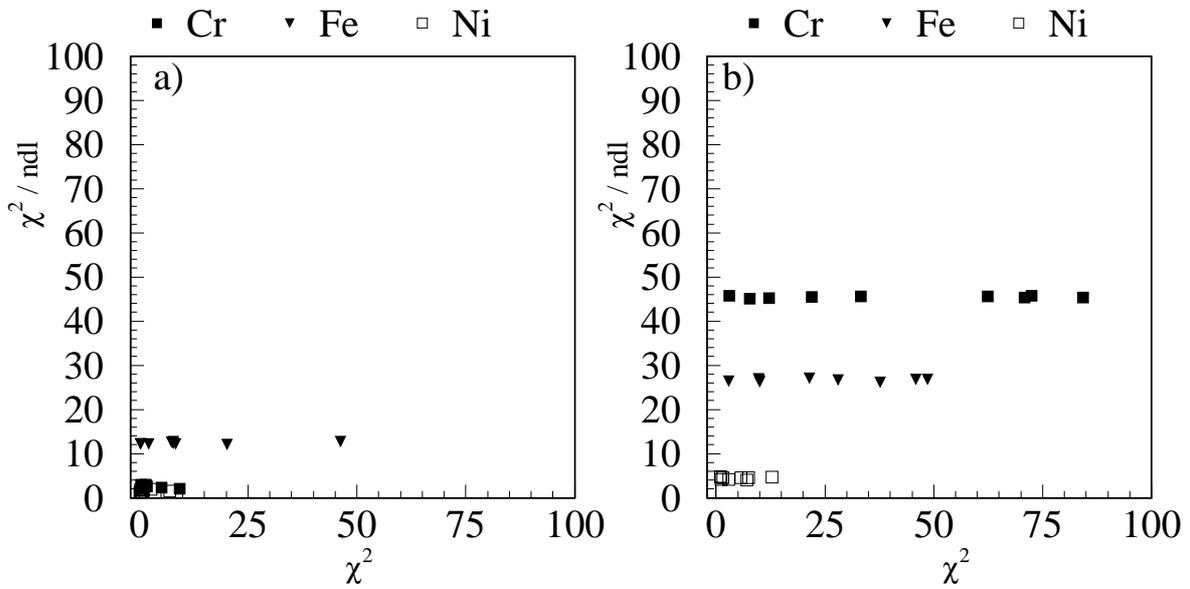


Figure 67: Distribution du chi 2 par degré de liberté des moyennes des concentrations sur les tissus au contact de plaques en fonction du chi 2 par rapport à la moyenne de chaque point de mesure.

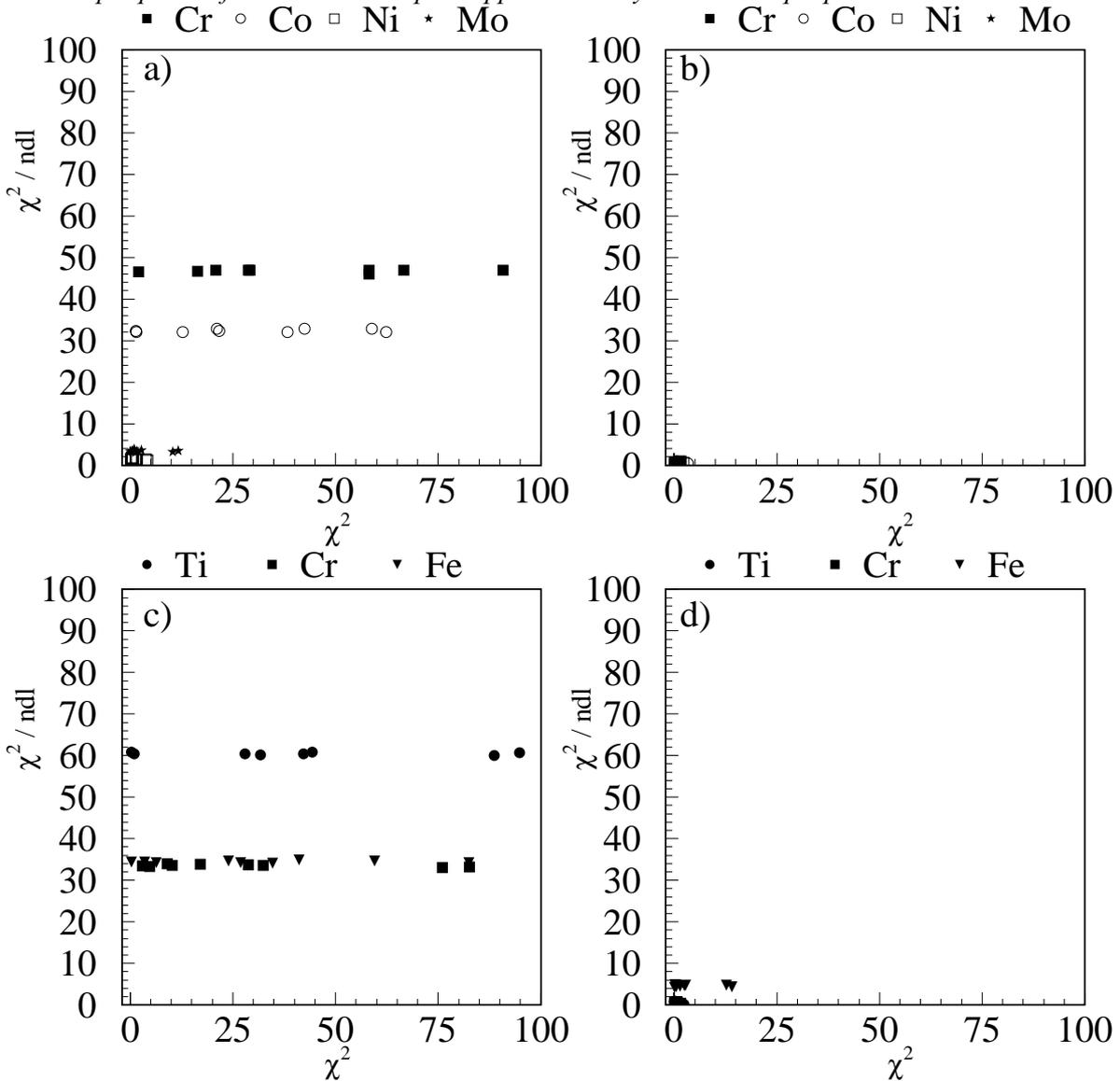


Figure 68: Distribution du chi 2 par degré de liberté des moyennes des concentrations sur chaque tissu en fonction du chi 2 par rapport à la moyenne de chaque point de mesure pour chaque type de prothèse. A gauche (a, c), nous avons des exemples de prothèses instables et métallosées, et à droite (b, d) de prothèses stables ne présentant pas de réactions particulières.

	<b>PO1</b> Ti + Cr-Fe- Ni	<b>PO2</b> Ti	<b>PO3</b> Ti	<b>PO4</b> Co-Cr	<b>PO5</b> Co-Cr	<b>PO6</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO7</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO8</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO9</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO10</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO11</b> Cr-Fe- Ni
$\chi^2$	42,83	1,83	4,17	0,5	21,00	12,75	7,50	7,8	5,5	13,50	35,17

Tableau 35 : Tableau des chi 2 de la moyenne sur une surface donnée pour toutes les prothèses étudiées. Les prothèses instables ou métalloisées sont soulignées et les trois dernières sont des plaques.

La combinaison des résultats obtenus dans le tableau 35 et les graphes des figures 67 et 68 confirment que dans le cas d'instabilité des implants, nous avons beaucoup plus d'hétérogénéité dans les teneurs en éléments métalliques. Pour les plaques, une plus forte dispersion des concentrations est observée, probablement due au contact avec les tissus.

La présence des mesures appartenant à la classe B est montrée sur la figure 69. Nous avons représenté le cumul de chaque type de prothèse sur le même graphe en faisant la distinction entre les instabilités, les métalloises et les implants stables. Nous constatons que l'état des tissus rentre en compte. En effet, dans le cas où nous n'avons pas de réaction particulière à l'implant, le nombre de points de la classe B est faible, voir nul. Dès que nous avons la présence d'instabilité ou de métalloise, nous avons plus de mesures entrant dans cette classe, témoignant ainsi de la plus forte hétérogénéité des concentrations.

Pour les plaques, nous n'avons pas de réactions particulières, cependant la quantité de mesures appartenant à cette deuxième classe n'est pas négligeable (figure 69a). Nous avons pu remarquer par analyse des concentrations que la quantité d'éléments métalliques présents dans les tissus périplaques était assez élevée

En s'intéressant à la répartition des concentrations sur une surface à l'aide de la différence des barycentres, nous remarquons que l'hétérogénéité est moins importante. Ce phénomène peut s'expliquer par une pollution de base des tissus, c'est à dire une contamination moyenne générale des échantillons. Cependant nous avons toujours la présence de pic avec d'importantes concentrations dénotant la présence probable de débris issus des prothèses.

Afin de mettre en évidence les corrélations possibles entre les éléments majeurs de la prothèse, nous allons dans un premier temps étudier la correspondance entre les barycentres pour un couple d'éléments (tableau 36).

	<b>PO1</b> Ti + Cr-Fe- Ni	<b>PO2</b> Ti	<b>PO3</b> Ti	<b>PO4</b> Co-Cr	<b>PO5</b> Co-Cr	<b>PO6</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO7</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO8</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO9</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO10</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO11</b> Cr-Fe- Ni
<d>	0,22	0,15	0	0,45	0,12	0	0	0	0,25	0,22	0,25

Tableau 36: Moyennes des distances de barycentres pour un couple d'éléments majeurs pour tous les types de prothèses.

Dans le cas de métalloise ou d'une instabilité de prothèse, les maxima des différents couples d'éléments majeurs sont généralement corrélés entre eux confirmant l'existence de débris ou d'amas d'éléments. Le cas des prothèses en alliage de titane ne suit pas forcément la même logique. Pour PO1, nous avons une instabilité de prothèse, le prélèvement provient de la capsule et pour PO3, il y a une lyse entre le ciment de scellement et le fût fémoral. Le comportement de ces deux types de tissus est différent car le premier est un tissu vivant et l'autre un tissu non vascularisé. La contamination et l'hétérogénéité dans PO1 est importante du fait de l'instabilité et de l'activité cellulaire sans pour autant avoir de

corrélations entre les maxima, tandis que pour PO3, la quantité de titane est moins importante, plus homogène mais nous pouvons supposer que nous avons des débris de prothèses concentrés à ce niveau de la lésion entraînant des corrélations entre les éléments. La présence de chrome dans la prothèse PO1 est compréhensible du fait que le chrome est un élément trace de la tige et que la tête de prothèse est en alliage inox (Cr-Fe-Ni) (cf. Annexe II). La métallose peut donc impliquer la présence des éléments traces dans les tissus.

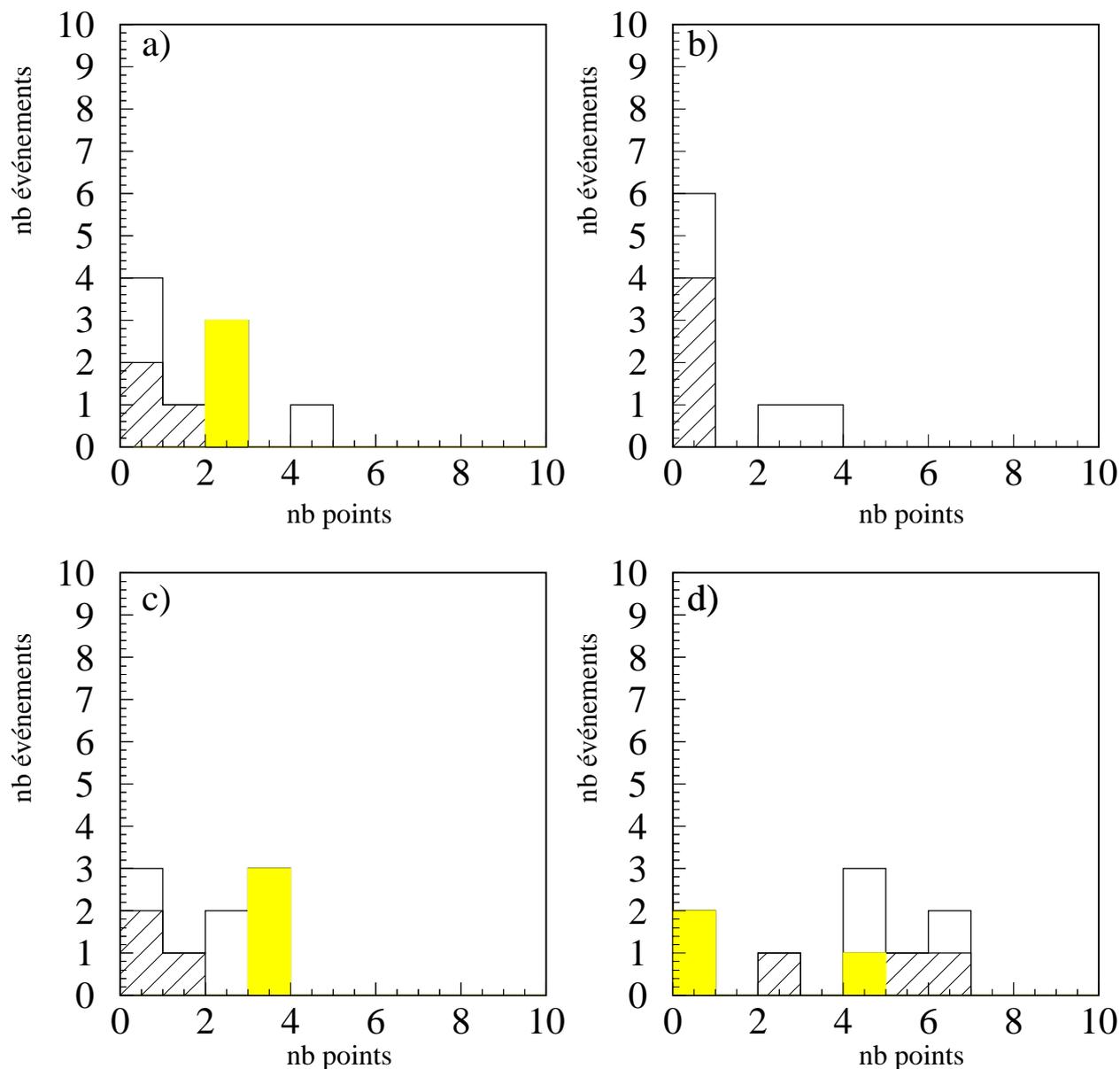


Figure 69: Graphes représentant le nombre de fois où nous avons des points appartenants à la classe B. En a) les prothèses en titane, b) les alliages cobalt, c) la prothèse inox et d) les plaques inox. En blanc les prothèses PO3, PO5, PO7 et PO11. En hachuré : PO2, PO4, PO6, PO10. En gris : PO1, PO8, PO9.

L'analyse de la différence des maxima confirme l'existence de corrélations (figure 70). Deux cas se distinguent : nous avons des **corrélations entre tous les éléments majeurs dans le cas de métallose et d'instabilité de prothèses** et nous avons peu de corrélation dans les autres cas. Pour ce qui est des plaques inox, les maxima ne sont pas toujours au même endroit, ceci peut s'expliquer par des réactions particulières avec l'implant.

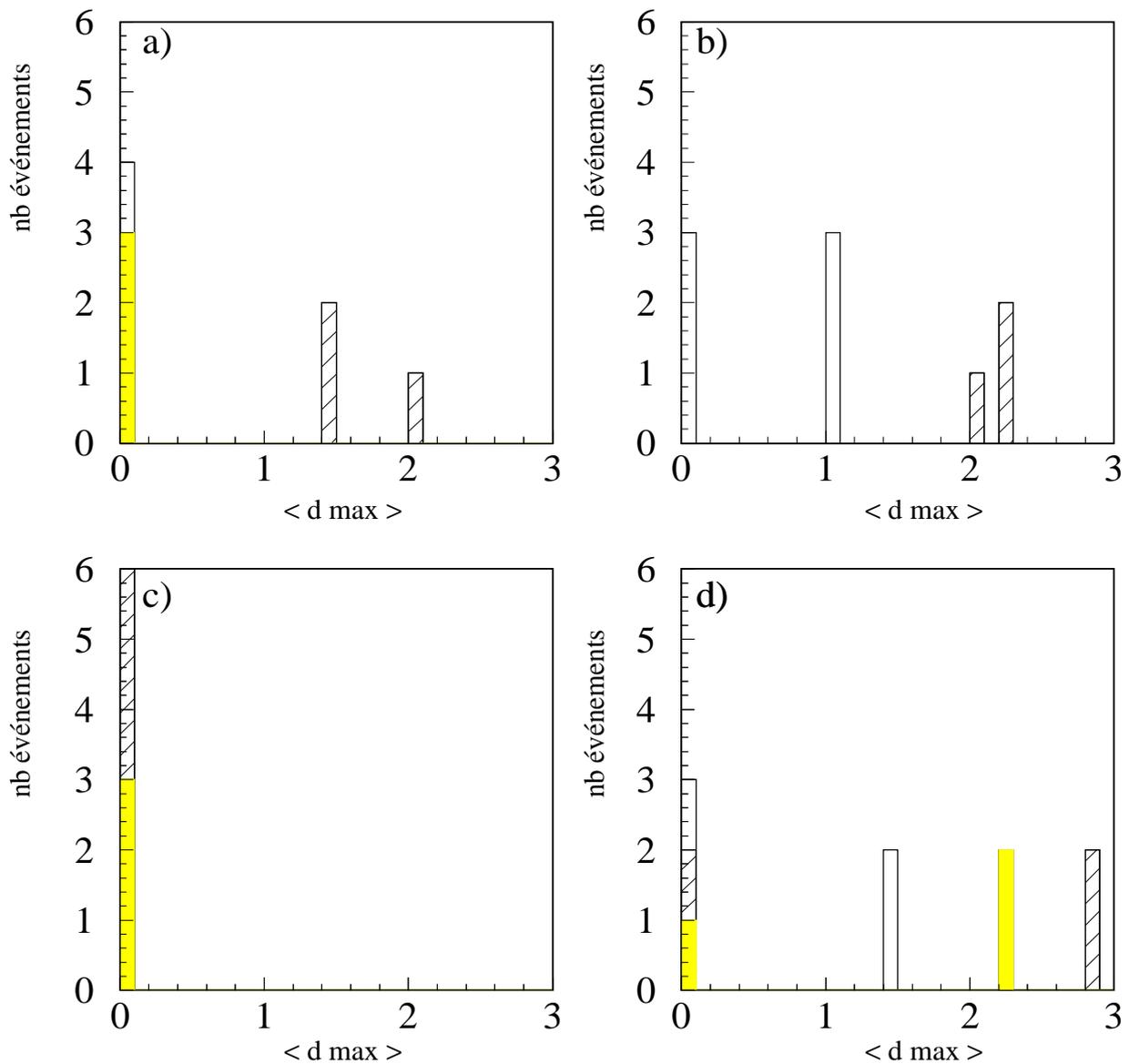


Figure 70: Corrélations entre les maxima des éléments majeurs pour chaque type d'implant. . En a) les prothèses en titane, b) les alliages cobalt, c) la prothèse inox et d) les plaques inox. En blanc les prothèses PO3, PO5, PO7 et PO11. En hachuré : PO2, PO4, PO6, PO10. En gris : PO1, PO8, PO9.

Il existe des corrélations entre les maxima des éléments des prothèses mais pas pour tous les éléments majeurs. Nous allons rechercher sur la surface, le point sélectionné correspondant au maximum de plusieurs métaux. Tout comme précédemment, nous procédons de deux manières différentes, en prenant et en ne prenant pas en compte le fer. La comparaison entre les points maximaux et sélectionnés nous permettra de confirmer les corrélations entre éléments, mais également de faire l'hypothèse de l'existence de débris de prothèse (tableau 37).

	<u>PO1</u> Ti + Cr-Fe- Ni	<u>PO2</u> Ti	<u>PO3</u> Ti	<u>PO4</u> Co-Cr	<u>PO5</u> Co-Cr	<u>PO6</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO7</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO8</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO9</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO10</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO11</u> Cr-Fe- Ni
<b>Avec Fe</b>	0	1,18	0	1,98	0,3	0	0	0	1,52	0,98	0,52
<b>Sans Fe</b>	0	1,18	0	1,12	0,3	0	0	0	0,78	0,98	0,52

Tableau 37: Distance entre les points maxima et sélectionnés avec et sans fer.

Nous avons la confirmation que les points maximaux de tous les éléments majeurs pour un type de prothèse sont corrélés ensemble dans le cas d'instabilité quelle que soit la méthode utilisée. Dans les autres cas, nous avons une assez bonne correspondance sauf pour les plaques. Nous pouvons faire l'hypothèse que nous pouvons **rencontrer des débris de prothèses dans les tissus adjacents des implants métalliques, principalement si nous sommes en présence de métallose et d'instabilité.**

b) Etude de la face opposée au fémur.

Nous avons montré l'existence de contamination, d'hétérogénéité et de possible corrélation sur la face proche de l'implant. Maintenant nous nous intéressons au devenir de ces éléments et de leurs comportements sur la face la plus éloignée de la prothèse. Dans un premier temps, les fractions de points inférieurs à la limite de détection sont un peu plus nombreuses que sur la face P (tableau 38). Nous avons une plus faible contamination des tissus par rapport à la face en contact avec l'implant.

	<u>PO1</u>	PO2	<u>PO3</u>	PO4	<u>PO5</u>	<u>PO6</u>	<u>PO7</u>	<u>PO8</u>	PO9	PO10	PO11
%>LD	53%	73%	56%	30%	70%	58%	50%	94%	56%	98%	94%

Tableau 38 : Fraction de points supérieurs à la limite de détection

L'étude des concentrations sur la face arrière (tableaux 39 et 40) témoigne bien de la diminution de la contamination des tissus. Les valeurs maximales sont également plus faibles. Tout comme pour les tissus post-mortem, nous avons une diminution de la contamination au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant. Cependant nous avons une contamination en titane plus importante sur la face arrière pour PO5, il en est de même pour PO8. Cette teneur est anormale et peut être due à un apport extérieur tel que la prise de médicaments ou l'influence du passé médical du patient que nous ne connaissons pas toujours.

		<b>PO1</b> Ti + Cr-Fe- Ni	<b>PO3</b> Ti	<b>PO5</b> Co-Cr	<b>PO6</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO7</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO8</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>16 ± 13</b>	<b>228 ± 53</b>	<b>43 ± 20</b>	( <b>&lt; 28*</b> )	( <b>&lt; 23*</b> )	<b>524 ± 68</b>
	Max (C)	45	331	81	24	30	811
<b>Cr</b>	< C <sub>moy</sub> >	( <b>&lt;7*</b> )	( <b>&lt;10*</b> )	<b>2454 ± 748</b>	<b>310 ± 35</b>	<b>16 ± 10</b>	<b>78 ± 34</b>
	Max (C)	18	25	3553	14761	405	168
<b>Fe</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>814 ± 152</b>	<b>305 ± 42</b>	<b>494 ± 161</b>	<b>7609 ± 5918</b>	<b>34 ± 9</b>	<b>483 ± 102</b>
	Max (C)	1395	707	837	30200	521	922
<b>Co</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>23 ± 10</b>	( <b>&lt;10*</b> )	<b>267 ± 63</b>	( <b>&lt;170*</b> )	( <b>&lt;6*</b> )	<b>19 ± 6</b>
	Max (C)	45	( <b>&lt;35*</b> )	1224	527	( <b>&lt;12*</b> )	30
<b>Ni</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>5 ± 3</b>	( <b>&lt;4*</b> )	( <b>&lt;11*</b> )	<b>123 ± 25</b>	( <b>&lt;4*</b> )	<b>55 ± 14</b>
	Max (C)	13	( <b>&lt;7*</b> )	19	5173	131	114

Tableau 39 : Concentration en éléments métalliques sur la face éloignée de l'implant pour des tissus présentant une métallose ou une instabilité. Les concentrations sont données en µg/g et les (\*) correspondent aux limites de détection.

L'hétérogénéité est moins importante sur la face L que sur la face P tout comme pour les tissus post-mortem (tableau 41). Pour les plaques, nous observons une plus forte hétérogénéité confirmant la différence de comportement de ces implants par rapport aux prothèses. En général, nous avons moins de

contamination et un retour vers une certaine hétérogénéité au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant.

		<b>PO2</b> Ti	<b>PO4</b> Co-Cr	<b>PO9</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO10</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO11</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>13 ± 6</b>	<b>10 ± 7</b>	<b>14 ± 6</b>	<b>16 ± 11</b>	<b>13 ± 6</b>
	Max (C)	253	20	20	35	26
<b>Cr</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>11 ± 8</b>	<b>(&lt;6*)</b>	<b>16 ± 6</b>	<b>720 ± 214</b>	<b>132 ± 41</b>
	Max (C)	25	(<13*)	28	6939	290
<b>Fe</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>35 ± 14</b>	<b>518 ± 127</b>	<b>744 ± 260</b>	<b>26290 ± 4268</b>	<b>407 ± 111</b>
	Max (C)	85	1541	1695	39244	950
<b>Co</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>6 ± 5</b>	<b>27 ± 14</b>	<b>(&lt;12*)</b>	<b>(&lt;92*)</b>	<b>13 ± 9</b>
	Max (C)	13	49	37	(<463*)	31
<b>Ni</b>	< C <sub>moy</sub> >	<b>(&lt;2*)</b>	<b>7 ± 4</b>	<b>(&lt;7*)</b>	<b>22 ± 11</b>	<b>22 ± 10</b>
	Max (C)	7	22	27	239	37

Tableau 40 : Concentration en éléments métalliques sur la face éloignée de l'implant pour des tissus ne présentant pas de métallose. Les trois derniers patients possédaient des plaques. Les concentrations sont données en µg/g et les (\*) correspondent aux limites de détection.

	<u>PO1</u>	PO2	<u>PO3</u>	PO4	<u>PO5</u>	<u>PO6</u>	<u>PO7</u>	<u>PO8</u>	PO9	PO10	PO11
$\chi^2$	3.18	1.83	2.5	0.5	7	46.5	7.5	4.5	9.5	23.8	5.8

Tableau 41 : Tableau des chi 2 des moyennes sur une surface donnée pour toutes les prothèses étudiées (les prothèses instables sont soulignées). Les trois dernières sont des plaques.

c) Etude de l'évolution entre les deux faces d'analyse.

Par comparaison entre les concentrations en éléments métalliques sur la face proche et éloignée de l'implant, nous avons pu remarquer une décroissance des teneurs. Afin d'avoir une estimation de la contamination et du gradient de migration de ces métaux dans les tissus en fonction de la pathologie, nous avons déterminé une variable  $\Delta F/F$  (cf. Chapitre X.III.A.2.d). Nous représentons l'évolution de cette grandeur pour les éléments majeurs, en fonction de la pathologie et du type d'implant, pour les moyennes, les maxima et les points sélectionnés dans les tableaux 42 et 43. Les valeurs  $-1.00 \pm 1.00$  représentent le cas où nous avons des valeurs inférieures à la limite de détection sur la face avant et supérieures sur la face arrière. Les (-) correspondent au cas où toutes les valeurs sont en dessous de la limite de détection et  $1.00 \pm 1.00$  quand les valeurs sur la face avant sont au dessus de la LD et les valeurs sur la face arrière sont en dessous de la LD.

Les valeurs obtenues pour la prothèse PO1 montrent que les éléments se transfèrent difficilement au fur et à mesure que l'on s'éloigne du fémur. Pour l'autre implant en titane, nous n'avons pas les mêmes caractéristiques car la majorité des éléments migrent bien. Pour PO3, présentant une métallose au niveau du fût fémoral, la variable  $\Delta F/F$  laisse supposer que les éléments sont bien transférés. Si nous comparons les concentrations, nous constatons quelles sont semblables sur les deux faces d'analyse. Ce prélèvement est le seul provenant du fût fémoral et correspond à un tissu fibreux. La différence de comportement peut provenir du fait que PO1 est un tissu vivant vascularisé permettant le transport des éléments vers d'autres organes. Ceci confirme le fait que les métaux sont pris en charges entre les deux

faces par des protéines ou des macrophages, expliquant la faible concentration sur la face arrière. Pour PO3 qui est un prélèvement le long du fémur, nous avons la formation d'un granulôme local (tissu présentant une activité cellulaire mais pas de vascularisation permettant la nettoyage tissulaire). Tous les éléments restent localement.

		<b>PO1</b> Ti	<b>PO3</b> Ti	<b>PO5</b> Co-Cr	<b>PO6</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO7</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO8</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,98 ± 0,06</b>	<b>0,29 ± 0,18</b>	<b>-1,00 ± 1,00</b>	-	-	<b>0,07 ± 0,15</b>
	Maxima	0,97 ± 0,01	0,10 ± 0,15	-5,37 ± 7,67	0,31 ± 0,87	-1,00 ± 1,00	0,23 ± 0,09
	Sélection	0,97 ± 0,01	0,10 ± 0,15	1,00 ± 0,00	-	-	0,23 ± 0,09
<b>Cr</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,98 ± 0,06</b>	-	<b>0,30 ± 0,29</b>	<b>0,96 ± 0,01</b>	<b>1,00 ± 0,00</b>	<b>0,95 ± 0,02</b>
	Maxima	0,98 ± 0,01	1,00 ± 1,00	0,27 ± 0,09	-0,21 ± 0,13	0,98 ± 0,00	0,94 ± 0,02
	Sélection	1,00 ± 0,00	-	0,56 ± 0,06	-0,21 ± 0,13	0,98 ± 0,00	0,96 ± 0,01
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,82 ± 0,04</b>	<b>0,37 ± 0,23</b>	<b>0,45 ± 0,21</b>	<b>0,87 ± 0,12</b>	<b>1,00 ± 0,00</b>	<b>0,90 ± 0,03</b>
	Maxima	0,78 ± 0,03	0,27 ± 0,10	0,30 ± 0,11	0,60 ± 0,04	0,99 ± 0,00	0,88 ± 0,01
	Sélection	0,89 ± 0,02	0,68 ± 0,05	0,55 ± 0,08	0,60 ± 0,04	0,99 ± 0,00	0,88 ± 0,01
<b>Co</b>	<b>Moyenne</b>	-	-	<b>0,82 ± 0,05</b>	-	-	<b>0,84 ± 0,26</b>
	Maxima	0,59 ± 0,39	-	0,46 ± 0,07	-1,00 ± 1,00	-	0,82 ± 0,12
	Sélection	1,00 ± 0,00	-	0,46 ± 0,07	-1,00 ± 1,00	-	0,78 ± 0,19
<b>Ni</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,98 ± 0,05</b>	-	<b>0,88 ± 0,66</b>	<b>0,98 ± 0,01</b>	<b>1,00 ± 0,00</b>	<b>0,93 ± 0,02</b>
	Maxima	0,97 ± 0,02	0,74 ± 0,38	0,84 ± 0,16	0,44 ± 0,06	0,99 ± 0,00	0,91 ± 0,01
	Sélection	0,97 ± 0,02	1,00 ± 1,00	1,00 ± 0,00	0,44 ± 0,06	0,99 ± 0,00	0,91 ± 0,01

Tableau 42 : Valeur des rapport  $\Delta F/F$  pour les tissus présentant une instabilité ou une métallose.

L'implant en inox métallosé laisse présumer que les métaux restent sur la face avant. Seul le titane, provenant d'un apport extérieur puisque non présent dans la composition de la prothèse, semble contaminé tout le tissu.

Pour les implants en alliage cobalt-chrome, les résultats divergent suivant le patient et l'état des tissus. Cependant, le chrome semble être un élément qui migre seulement dans le tissu, car nous le retrouvons sur la face L sauf dans le cas de la prothèse de genou PO5 où le taux de migration est très élevé, laissant supposer qu'il a été pris en charge par des protéines ou des macrophages et transporté vers d'autres tissus.

En raison de la statistique insuffisante de nos mesures nous ne pouvons pas faire de conclusions. Cependant, il semble que suivant le type d'implant et la pathologie, les métaux n'ont pas le même comportement.

Ces valeurs moyennes prennent en considération seulement la contamination de base des tissus sans tenir compte des débris. L'étude des points maxima devrait nous indiquer comment évoluent les éléments entre les deux faces d'analyse. Nous pouvons avoir un bon transfert des métaux alors que lorsque nous considérons la moyenne, la migration s'avérait plus difficile. D'autre part, le phénomène inverse est observé, avec une moyenne traduisant un bon transfert des particules, et au point de vue des sélections une mauvaise migration.

		<b>PO2</b> Ti	<b>PO4</b> Co-Cr	<b>PO9</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO10</b> Cr-Fe-Ni	<b>PO11</b> Cr-Fe-Ni
<b>Ti</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,71 ± 0,45</b>	-	<b>0,31 ± 1,37</b>	-	-
	Maxima	-3,01 ± 1,31	0,89 ± 0,06	0,86 ± 0,10	0,89 ± 0,06	0,44 ± 0,44
	Sélection	-3,42 ± 1,57	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,80 ± 0,37	0,65 ± 0,40
<b>Cr</b>	<b>Moyenne</b>	-	<b>0,88 ± 0,80</b>	<b>0,86 ± 0,19</b>	<b>0,43 ± 0,17</b>	<b>-0,62 ± 1,61</b>
	Maxima	0,27 ± 0,56	0,76 ± 0,27	0,84 ± 0,11	-0,30 ± 0,14	0,81 ± 0,03
	Sélection	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-0,50 ± 0,17	0,81 ± 0,03
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,79 ± 0,09</b>	<b>0,45 ± 0,18</b>	<b>0,42 ± 0,23</b>	<b>-0,86 ± 0,33</b>	<b>0,27 ± 0,24</b>
	Maxima	0,74 ± 0,08	0,65 ± 0,04	0,50 ± 0,06	-0,08 ± 0,12	0,93 ± 0,01
	Sélection	0,79 ± 0,12	0,66 ± 0,05	0,55 ± 0,07	0,26 ± 0,08	0,85 ± 0,02
<b>Co</b>	<b>Moyenne</b>	-	<b>0,53 ± 0,97</b>	-	-	-
	Maxima	-0,06 ± 1,43	0,65 ± 0,21	0,27 ± 0,89	1,00 ± 0,00	0,18 ± 0,75
	Sélection	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-
<b>Ni</b>	<b>Moyenne</b>	<b>0,90 ± 0,48</b>	-	<b>0,74 ± 1,14</b>	<b>0,74 ± 0,19</b>	<b>0,15 ± 0,83</b>
	Maxima	0,75 ± 0,23	0,12 ± 0,51	0,57 ± 0,19	-0,32 ± 0,26	0,94 ± 0,02
	Sélection	1,00 ± 0,00	-0,20 ± 0,78	0,57 ± 0,19	-0,32 ± 0,26	0,94 ± 0,02

Tableau 43 : Valeur des rapport  $\Delta F/F$  pour les tissus ne présentant pas de métallose

d) Etude des rapports des éléments métalliques majeurs

L'analyse des points de corrélation peut nous permettre de montrer la présence de fragments ou d'amas ioniques ou moléculaires. Pour ce faire nous comparons les rapports des éléments métalliques des prothèses et ceux des maxima et des points sélectionnés.

*Cas des alliages titane*

Nous constatons que quelque soit l'état du tissu du patient, le rapport Ti/Cr ne tend pas vers celui de la prothèse (tableau 44). Il faut noter que le titane est l'élément majeur de la prothèse et nous ne pouvons pas le comparer avec le chrome qui est à l'état de trace. Même dans le cas où nous avons une métallose, la quantité de chrome présent dans les tissus n'est pas proportionnelle à ce que nous avons dans l'implant.

			<b>PO1</b>		<b>PO2</b>		<b>PO3</b>	
		Proth	Avant	Arrière	Avant	Arrière	Avant	Arrière
<b>Ti/Cr</b>	Max	560	1,52 ± 0,19	2,41 ± 1,97	1,88 ± 1,09	10,3 ± 6,1	-	13,4 ± 10,8
	Sel		1,52 ± 0,19	-	1,71 ± 1,02	-	-	-

Tableau 44 : Rapport des éléments métalliques pour une prothèse en alliage de titane.

### Cas des alliages cobalt-chrome

Pour ce qui est des tissus proches d'implant en alliage de cobalt, les rapports sont dans la majorité des cas inférieurs à ce que nous devrions avoir si nous avons un débris de prothèse, même en présence de forte métallose comme pour PO5 (tableau 45). Le seul rapport supérieur à celui de l'alliage concerne Cr/Ni, aussi bien sur la face proche qu'éloignée de l'implant. En faisant le parallèle avec la variable  $\Delta F/F$ , nous constatons que la migration du chrome s'effectue relativement bien tandis que pour le nickel, cette valeur tend vers 1 laissant supposer que l'élément migre mal ou est transféré vers d'autres organes rapidement. Ce rapport d'éléments métalliques peut nous inciter à penser que le nickel est un élément qui va migrer ou être pris en charge rapidement par les cellules et être éliminé. Par comparaison avec Co/Ni, les valeurs de ce dernier sont plus faibles, malgré la faible teneur en nickel. Nous supposons que le cobalt est un élément qui est pris en charge rapidement par notre organisme mais qui est moins soluble ou moins réactif que le nickel.

			PO5		PO4	
		Prothèse	Avant	Arrière	Avant	Arrière
<b>Co/Cr</b>	Max	2,15	$0,47 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,05$	$2,63 \pm 1,25$	-
	Sel		$0,43 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,07$	$1,35 \pm 0,79$	-
<b>Co /Ni</b>	Max	34,73	$19,62 \pm 5,32$	-	$5,67 \pm 2,87$	$2,24 \pm 1,51$
	Sel		$19,62 \pm 5,32$	-	$3,97 \pm 2,69$	-
<b>Cr/Ni</b>	Max	16,45	$41,7 \pm 11,2$	-	$2,15 \pm 1,15$	-
	Sel		$45,3 \pm 12,2$	-	$2,93 \pm 1,80$	-
<b>Ni/Fe</b>	Max	4,58	$0,10 \pm 0,03$	-	-	-
	Sel		$0,14 \pm 0,04$	-	-	$0,05 \pm 0,02$

Tableau 45 : Rapport des éléments métalliques pour une prothèse en alliage de cobalt.

### Cas des alliages inox

Pour les alliages inox (tableau 46), l'étude est un peu plus complexe du fait que nous avons des prothèses et des plaques, dont les comportements sont apparemment très différents.

Nous pouvons cependant remarquer que pour les prothèses PO6, PO7 et PO8, les rapports des éléments métalliques sont semblables à ceux de l'implant. Par comparaison avec les valeurs de  $\Delta F/F$ , nous pouvons penser que le chrome et le nickel ne migrent pas ou bien qu'ils sont pris en charge rapidement et éliminés. Cependant ces rapports sur la face L sont aussi semblables à ceux attendus mais ils sont généralement inférieurs à ceux obtenus sur la face P. L'hypothèse qu'une particule a pu migrer jusqu'à la face la plus éloignée tout en restant intacte et en laissant des ions sur son passage qui correspondrait à un début de dégradation, est envisagée. Une autre explication peut être faite, c'est l'apport d'éléments métalliques par les vaisseaux avec les systèmes des protéines par réactions comme celles pouvant être induites par la présence d'un corps étranger.

Dans le cas des plaques, nous remarquons que les rapports Cr/Ni sont toujours largement supérieurs à ceux attendus, aussi bien proche que loin de l'implant. Pour ce qui est des autres rapports, il est difficile d'émettre une hypothèse car les concentrations en fer sont très importantes. En effet, nous pouvons avoir une plus forte contamination en fer à cause du contact direct entre l'implant et le tissu, mais cela peut aussi provenir de la proximité de l'os et du périoste. D'autre part, il serait intéressant d'étudier la composition d'une plaque afin de la comparer à celle de la prothèse.

		PO6		PO7		PO8		PO9		PO10		PO11	
		Avant	Arrière										
<b>Cr/Fe</b>	Max	0,16±0,02	0,49±0,05	0,21±0,02	0,78±0,09	0,34±0,04	0,18±0,05	0,05±0,01	0,02±0,01	0,15±0,02	10,2±0,1	0,10±0,01	0,31±0,05
	Sel	0,16±0,02	0,4±0,05	0,21±0,02	0,78±0,09	0,34±0,04	0,13±0,03	0,11±0,02	-	0,13±0,01	0,26±0,03	0,32±0,34	0,42±0,08
<b>Ni/Fe</b>	Max	0,12±0,01	0,17±0,02	0,15±0,02	0,25±0,03	0,16±0,02	0,12±0,02	-	0,02±0,01	-	-	-	0,04±0,01
	Sel	0,12±0,01	0,17±0,02	0,15±0,02	0,25±0,03	0,16±0,02	0,12±0,02	0,04±0,01	0,04±0,02	-	-	0,12±0,02	0,05±0,02
<b>Cr/Ni</b>	Max	1,32±0,14	2,85±0,30	1,38±0,14	3,10±0,41	2,09±0,25	1,47±0,45	2,72±0,78	1,05±0,76	29,4±4,92	28,9±4,37	2,61±0,34	7,92±2,56
	Sel	1,32±0,14	2,85±0,30	1,3±0,14	3,10±0,41	2,09±0,25	1,01±0,23	2,72±0,78	-	25,6±4,3	28,9±4,37	2,61±0,34	7,92±2,56

Tableau 46 : Rapport des éléments métalliques pour une prothèse en alliage de inox et pour les plaques (Prot = Prothèse)

e) Etude du comportement du zinc.

Le comportement du fer a été étudié avec les prothèses car il est présent dans la composition de certains alliages. Nous allons étudier l'évolution du zinc dans les tissus au contact d'implants métalliques présentant des réactions inflammatoires ou d'autres réactions (tableaux 47 et 48).

		Témoin	PO1	PO3	PO5	PO6	PO7	PO8
Avant	<C>	34 ± 9	107 ± 6	21 ± 8	15 ± 4	145 ± 16	357 ± 122	61 ± 6
	Max	56 ± 10	123 ± 16	36 ± 9	22 ± 7	277 ± 31	446 ± 45	71 ± 13
Arrière	<C>	11 ± 3	28 ± 16	17 ± 4	99 ± 20	52 ± 39	28 ± 6	31 ± 12
	Max	17 ± 6	60 ± 12	23 ± 7	119 ± 18	73 ± 14	48 ± 7	60 ± 10

Tableau 47 : Concentrations moyenne et maximale en zinc observées pour les tissus présentant une métallose ou une instabilité. Les concentrations sont en µg/g.

		Témoin	PO2	PO4	PO9	PO10	PO11
Avant	<C>	34 ± 9	34 ± 12	43 ± 13	26 ± 9	36 ± 8	33 ± 14
	Max	56 ± 10	49 ± 10	72 ± 13	43 ± 9	59 ± 13	514 ± 76
Arrière	<C>	11 ± 3	8 ± 5	21 ± 8	18 ± 10	37 ± 7	18 ± 9
	Max	17 ± 6	13 ± 5	36 ± 9	28 ± 8	49 ± 10	34 ± 8

Tableau 48 : Concentrations moyenne et maximale en zinc pour les tissus ne présentant pas de métallose et pour les trois plaques. Les concentrations sont en µg/g.

Nous constatons que dans la majorité des cas, pour les tissus métallosés ou instables, les valeurs en zinc sont plus importantes que dans le tissu témoin, et même lorsque nous nous éloignons de l'implant. Deux cas peuvent se distinguer par de faibles quantités de zinc : PO3 et PO5. Ces deux tissus ont des caractéristiques particulières provenant dans le premier cas de la localisation au niveau de la tige fémorale et dans le second cas d'un prélèvement capsulaire sur le genou.

Pour les échantillons n'ayant pas de réactions particulières, nous avons des concentrations proches des valeurs de référence sauf dans le cas de PO11 qui présente un pic en zinc sur la face proche de l'os. Ce prélèvement a été effectué entre la plaque et l'os du patient et peut expliquer cette différence de concentration.

L'évolution de la répartition du zinc en fonction de l'état des tissus est étudiée à l'aide de la distribution des chi 2 par degré de liberté pour les moyennes des concentrations sur une surface pour chaque type de prothèse (tableaux 49 et 50).

	<u>PO1</u> Ti + Cr-Fe- Ni	PO2 Ti	<u>PO3</u> Ti	PO4 Co-Cr	<u>PO5</u> Co-Cr	<u>PO6</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO7</u> Cr-Fe- Ni	<u>PO8</u> Cr-Fe- Ni	PO9 Cr-Fe- Ni	PO10 Cr-Fe- Ni	PO11 Cr-Fe- Ni
$\chi^2$	27,5	3,5	1,5	1,5	0,5	5,5	3,5	0,5	1,5	0,5	9,5

Tableau 49 : Tableau des moyennes des chi 2 par degré de liberté des moyennes des concentrations en zinc sur la surface proche de l'implant pour toutes les prothèses. Les prothèses instables ou métallosées sont soulignées.

	<b>PO1</b> Ti + Cr-Fe- Ni	<b>PO2</b> Ti	<b>PO3</b> Ti	<b>PO4</b> Co-Cr	<b>PO5</b> Co-Cr	<b>PO6</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO7</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO8</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO9</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO10</b> Cr-Fe- Ni	<b>PO11</b> Cr-Fe- Ni
$\chi^2$	4,5	0,5	0,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5	1,5

Tableau 50 : Tableau des moyennes des chi 2 par degré de liberté des moyennes des concentrations en zinc sur la surface éloignée de l'implant pour toutes les prothèses. Les prothèses instables ou métalloisées sont soulignées.

Dans le cas d'instabilité de PO1, les valeurs du chi 2 sont plus grandes que pour des implants stables. Ce prélèvement a été effectué au niveau de la jonction métaphyse embase, c'est à dire au niveau du col fémoral à la jonction entre la tête du fémur et le fémur lui-même. A cet endroit nous avons beaucoup plus de contraintes pouvant entraîner des réactions tissulaires. Cependant, nous retrouvons une certaine homogénéité lorsque nous nous éloignons de la prothèse.

Les plaques inox et la prothèse de genou (PO6 et PO7) sont des cas particuliers. Dans le premier cas, nous avons pu constater le comportement différent entre les prothèses et les plaques avec des concentrations nettement supérieures. PO11 est un tissu prélevé entre la plaque et l'os. Pour le genou, le patient avait une réaction inflammatoire très importante avec coloration des tissus. Le faible  $\chi^2$  montre l'homogénéité de la répartition du zinc dans le tissu analysé.

Nous pouvons penser que le zinc est un élément qui est sensible à la présence des éléments métalliques. Nous allons nous intéresser à son évolution en fonction des métaux dans les tissus, afin d'étudier s'il existe une corrélation possible entre les teneurs en zinc et en métaux (tableaux 51 et 52).

	<b>PO1</b>	<b>PO2</b>	<b>PO3</b>	<b>PO4</b>	<b>PO5</b>	<b>PO6</b>	<b>PO7</b>	<b>PO8</b>	<b>PO9</b>	<b>PO10</b>	<b>PO11</b>
$\langle d_{elt} \rangle$	0,07	0,02	0	0,23	0,18	0,05	0	0,23	0,23	0,13	0,07
$\langle d_{max} \rangle$	1,3	1,05	0,15	1,75	0,55	0,75	0,45	1,70	0,30	1,50	1,65

Tableau 51 : Moyennes des distances de barycentres pour les couples d'éléments ( $\langle d_{elt} \rangle$ ) et entre les maxima ( $\langle d_{max} \rangle$ ) concernant le zinc pour tous les types de prothèses sur la face proche de l'implant.

	<b>PO1</b>	<b>PO2</b>	<b>PO3</b>	<b>PO4</b>	<b>PO5</b>	<b>PO6</b>	<b>PO7</b>	<b>PO8</b>	<b>PO9</b>	<b>PO10</b>	<b>PO11</b>
$\langle d_{elt} \rangle$	0	0	0	0	0	0,25	0,40	0,20	0	0,30	0
$\langle d_{max} \rangle$	1,25	0,9	0,47	1,75	1	1,15	0,25	2,10	1,10	0,73	1,8

Tableau 52 : Moyennes des distances de barycentres pour les couples d'éléments ( $\langle d_{elt} \rangle$ ) et entre les maxima ( $\langle d_{max} \rangle$ ) concernant le zinc pour tous les types de prothèses sur la face éloignée de l'implant.

Les distances entre le barycentre du zinc et des éléments métalliques nous indiquent l'existence possible de corrélations. L'étude des maxima montre que les points maximaux de ces éléments ne sont pas corrélés entre eux mais que la plus forte concentration en zinc n'est pas très loin des éléments métalliques.

### 3) Discussions

L'étude des prélèvements per-opératoires a permis de mettre en évidence la différence de comportement des éléments métalliques en fonction de l'état des tissus. **Tout comme pour les tissus post-mortem, nous constatons l'existence d'une contamination plus ou moins importante.** Dans le cas de métallose ou d'instabilité, la teneur en métaux est importante et hétérogène sur la surface d'analyse. Cette répartition semble cependant plus homogène que pour les prélèvements post-mortem avec toutefois la présence de fragments ou d'amas ioniques ou moléculaires.

D'autre part, nous avons pu remarquer pour un patient qui n'avait plus d'implant depuis un mois, le nettoyage des tissus et l'activité cellulaire semblent jouer un rôle important dans les tissus suivant que nous avons des échantillons de tissus vascularisés ou non.

Nous avons pu noter **la présence de corrélations entre les différents éléments majeurs des prothèses.** Ce phénomène est principalement rencontré pour les tissus métallisés ou au pourtour d'implants instables. Dans les autres cas, les relations entre les éléments majeurs sont un peu moins évidentes.

Pour ce qui est de l'évolution entre les deux faces d'analyse, nous constatons également une diminution de la contamination et un retour vers une certaine homogénéité. L'état mort ou vivant du tissu semble rentrer en compte dans l'évolution.

Les rapports entre éléments métalliques sont variables selon l'implant. Pour les alliages de titane nous ne retrouvons jamais les mêmes taux car le titane est l'élément majeur et nous le comparons avec un élément trace. Pour les autres types d'alliages, les rapports sont très souvent inférieurs à ceux attendus. Par comparaison avec l'évolution entre les deux faces, nous pouvons conclure que **le chrome est un élément qui se transfère mal dans les tissus et que le cobalt et le nickel sont pris en charge rapidement et qui probablement vont être transportés vers d'autres organes.** De plus, **les fragments ou amas présents au départ se sont dissociés et les éléments n'ont pas évolué de la même manière dans les tissus.**

Dans le cas où nous avons des tissus en présence d'un implant nous pouvons avoir deux types de réactions :

Une réaction obligatoire, c'est à dire sans réactions particulières où nous avons la présence d'éléments métalliques majeurs. Ce mécanisme est une sorte de modèle de réactions du corps humain à un implant.

Une réaction dite de « métallose », avec coloration des tissus et un amoindrissement de la vascularisation limitant ainsi le transfert des éléments.

Dans les deux cas, nous avons des réactions cellulaires qui vont jouer un rôle important dans le mécanisme réactionnel des tissus pouvant induire des inflammations et un descellement des implants.

Nous avons pu cependant noter la différence de comportement des plaques inox. En effet, dans ce cas nous avons de très fortes concentrations en éléments métalliques dans les tissus sans pour autant avoir la présence de métallose (coloration des tissus). D'autre part, nous avons pu constater une grande hétérogénéité de répartition des éléments sur la surface d'analyse, les corrélations entre éléments sont moins nombreuses et les rapports des éléments métalliques sont très différents de ceux de l'implant. Nous pouvons plus penser à une contamination sous forme ionique que sous forme de fragments.

## IV. ANALYSE DES RESULTATS DES ECHANTILLONS EN COUPES MINCES

Notre étude sur cibles épaisses nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un gradient de migration dans les tissus, ce dernier variant en fonction du type d'implant et de l'état des tissus. Nous nous sommes intéressés de plus près à l'évolution des concentrations en fonction de la distance séparant

le tissu de l'implant. Des prélèvements provenant des mêmes patients que ceux précédemment analysés en cibles épaisses ont été étudiés ainsi que d'autres tissus per-opératoires présentant une instabilité ou des colorations tissulaires témoignant la présence de métallose. La description de ces prélèvements est faite dans la partie Chapitre X.I.

Nous avons fait plusieurs acquisitions par coupe, au total 3 points de mesures, que nous avons moyenné afin d'avoir la concentration en éléments métalliques sur la surface concernée. Ce nombre de points de mesures est un compromis entre le temps de faisceau attribué et la durée d'acquisition. Nous analysons une quinzaine de coupes réparties sur 2600  $\mu\text{m}$  au maximum. Le calcul de la moyenne pondérée se fait de la même manière que pour les cibles épaisses (cf. Chapitre X.II.F). Contrairement à la méthode de calcul de moyenne pour les études effectuées au CERI d'Orléans, nous n'avons pas fait de séparation en deux catégories en fonction de la concentration de certains points. Etant donné que nous avons peu de points de mesures sur une surface, il est inapproprié d'effectuer ce « tri ».

Nous avons considéré l'évolution de la moyenne, des points maximaux et des points sélectionnés sans fer. Une fois que nous avons déterminé ces trois quantités, nous avons essayé de modéliser leurs évolutions à l'aide d'une droite.

### A. Prélèvements post-mortem

#### 1) Tissu témoin

Nous avons analysé un échantillon témoin afin d'avoir une référence. Ce prélèvement a été effectué au niveau de la diaphyse fémorale. La première observation des résultats a montré une certaine homogénéité de l'évolution en fonction de la profondeur dans le tissu, sauf au niveau des premières coupes. Ceci peut s'expliquer par la proximité de l'os et du périoste, entraînant une prise en compte des éléments métalliques dans les vaisseaux sanguins.

Dans le tableau 53, nous représentons la moyenne des concentrations des coupes correspondant à la contamination de base, les maxima et les points sélectionnés de chaque coupe ainsi que la valeur du chi 2 par degré de liberté correspondant qui témoigne de l'hétérogénéité des mesures. Par la suite, nous avons calculé la variable  $\Delta F/F$  afin d'estimer le gradient de migration entre la première et la dernière coupe. Cette évolution a été ajustée par une droite. La pente et le chi 2 par degré de liberté de la droite d'ajustement de l'évolution de la moyenne, des maxima et des sélections confirmeront la tendance observée précédemment.

		Ref [65]	<C> ( $\mu\text{g/g}$ )	$\chi^2$	$\Delta F/F$	Pente	$\chi^2$
Fe	<b>Moyenne</b>	38	<b>250 <math>\pm</math> 66</b>	<b>1,56</b>	<b>0,39 <math>\pm</math> 0,18</b>	<b>-0,02 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>1,61</b>
	Maxima		283 $\pm$ 95	1,53	0,14 $\pm$ 0,27	0,007 $\pm$ 0,04	1,65
	Sélection		258 $\pm$ 88	1,55	0,45 $\pm$ 0,17	-0,03 $\pm$ 0,04	1,63
Zn	<b>Moyenne</b>	193	<b>376 <math>\pm</math> 90</b>	<b>1,51</b>	<b>0,30 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>-0,08 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>1,33</b>
	Maxima		424 $\pm$ 120	1,30	-0,04 $\pm$ 0,32	-0,04 $\pm$ 0,06	1,37
	Sélection		389 $\pm$ 118	1,39	0,34 $\pm$ 0,20	-0,08 $\pm$ 0,05	1,34

Tableau 53 : Caractéristiques du tissu témoin.

Nous constatons que les moyennes des concentrations des tissus, des maxima et des points sélectionnés sont compatibles. La valeur du chi 2 par degré de liberté montre que l'hétérogénéité des points de mesures n'est pas très importante. L'évolution entre la première et la dernière coupe par la variable  $\Delta F/F$  met en évidence la faible évolution des concentrations au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'os. Ce phénomène est confirmé par la faible pente de la droite d'ajustement compatible

avec zéro témoignant de la faible évolution en fonction de la distance par rapport à l'implant. Le chi 2 peu élevé et proche de celui des moyennes montrent la compatibilité des mesures.

## 2) Tissu pathologique

Le prélèvement a été effectué à proximité d'un implant en alliage cobalt chrome, au niveau du petit trochanter (figure 45). La première observation est l'existence d'une contamination par des éléments métalliques et un gradient de concentration en fonction de la profondeur (tableaux 54 et 55).

Fraction > LD	$\chi^2$ de la moyenne		
	Moyennes	Maxima	Sélections
41 %	1,05	2,45	2,45

Tableau 54 : Caractéristiques du tissu pathologique suivant les coupes.

La distribution du chi 2 par degré de liberté (23) de tous les points de mesure, de la moyenne des concentrations des coupes, des maxima et des sélections tend à montrer que nous avons une hétérogénéité à la surface du tissu pour les éléments majeurs. Nous allons étudier cette distribution pour chacun des éléments majeurs et nous essayerons de montrer l'existence du gradient de concentration.

		<C> ( $\mu\text{g/g}$ )	$\chi^2$	$\Delta\text{F/F}$	Pente	$\chi^2$
<b>Cr</b>	<b>Moyenne</b>	( $<3^*$ )	<b>2,69</b>	<b><math>0,00 \pm 1,00</math></b>	<b><math>-0,001 \pm 0,01</math></b>	<b>0,26</b>
	Maxima	( $<5^*$ )	2,19	$0,88 \pm 0,89$	$-0,01 \pm 0,006$	2,11
	Sélection	( $<5^*$ )	2,13	$0,88 \pm 0,84$	$-0,01 \pm 0,07$	2,13
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b><math>336 \pm 312</math></b>	<b>4,73</b>	<b><math>0,89 \pm 0,17</math></b>	<b><math>-0,19 \pm 0,02</math></b>	<b>0,74</b>
	Maxima	$344 \pm 336$	4,12	$0,76 \pm 0,07$	$-0,20 \pm 0,02$	0,79
	Sélection	$145 \pm 549$	11,93	$0,92 \pm 0,02$	$-0,23 \pm 0,01$	1,85
<b>Co</b>	<b>Moyenne</b>	( $<3^*$ )	<b>0,29</b>	<b><math>0,00 \pm 1,00</math></b>	<b><math>-0,001 \pm 0,01</math></b>	<b>0,13</b>
	Maxima	( $<4^*$ )	1,54	$0,00 \pm 1,00$	$0,02 \pm 0,008$	1,21
	Sélection	( $<3^*$ )	1,85	$-1,00 \pm 1,00$	$-0,02 \pm 0,006$	1,36
<b>Ni</b>	<b>Moyenne</b>	<b><math>1,60 \pm 1,48</math></b>	<b>1,96</b>	<b><math>0,77 \pm 0,31</math></b>	<b><math>-0,02 \pm 0,003</math></b>	<b>0,28</b>
	Maxima	( $<5^*$ )	5,58	$0,78 \pm 0,12$	$-0,02 \pm 0,003$	3,52
	Sélection	( $<5^*$ )	5,45	$0,78 \pm 0,12$	$-0,02 \pm 0,002$	3,53
<b>Zn</b>	<b>Moyenne</b>	<b><math>354 \pm 125</math></b>	<b>2,18</b>	<b><math>0,90 \pm 0,26</math></b>	<b><math>-0,14 \pm 0,003</math></b>	<b>0,98</b>
	Maxima	$382 \pm 99$	1,17	$0,54 \pm 0,14$	$-0,09 \pm 0,02$	0,59
	Sélection	$86 \pm 470$	14,69	$0,92 \pm 0,033$	$-0,21 \pm 0,001$	2,07

Tableau 55 : Concentration, distribution du  $\chi^2$  par degré de liberté de la moyenne des moyennes, rapport entre la première et dernière coupe et pente de la droite d'ajustement avec son  $\chi^2$ , des maxima et des points sélectionnés pour les éléments majeurs de la prothèse et pour le zinc. Les \* correspondent aux limites de détection.

Nous constatons dans le cas présent, que nous avons une très faible contamination des tissus par les éléments métalliques provenant de l'implant. Le seul élément majoritairement présent est le fer, mais nous remarquons que sa distribution est hétérogène (tableau 55, valeur du chi 2). D'autre part, la variable  $\Delta\text{F/F}$  montre que cet élément se transfère mal dans les tissus. L'ajustement de son évolution à l'aide d'une droite nous donne une pente négative démontrant ainsi que la concentration de cet élément diminue au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant. Le fait d'avoir une valeur de chi 2 par

degré de liberté nettement plus faible pour l'estimation de la pente souligne la décroissance de la contamination. Nous rencontrons ce même phénomène pour le nickel, même si ses teneurs sont proches de la limite de détection.

L'observation du comportement du fer et du zinc nous conduit à étudier la présence de palier d'évolution en fonction de la distance par rapport à l'implant (figure 71). Nous avons regroupé les coupes de la manière suivante :

- 1<sup>er</sup> palier : 0 à 550  $\mu\text{m}$
- 2<sup>ème</sup> palier : 620 à 1380  $\mu\text{m}$
- 3<sup>ème</sup> palier : 1500 à 2420  $\mu\text{m}$

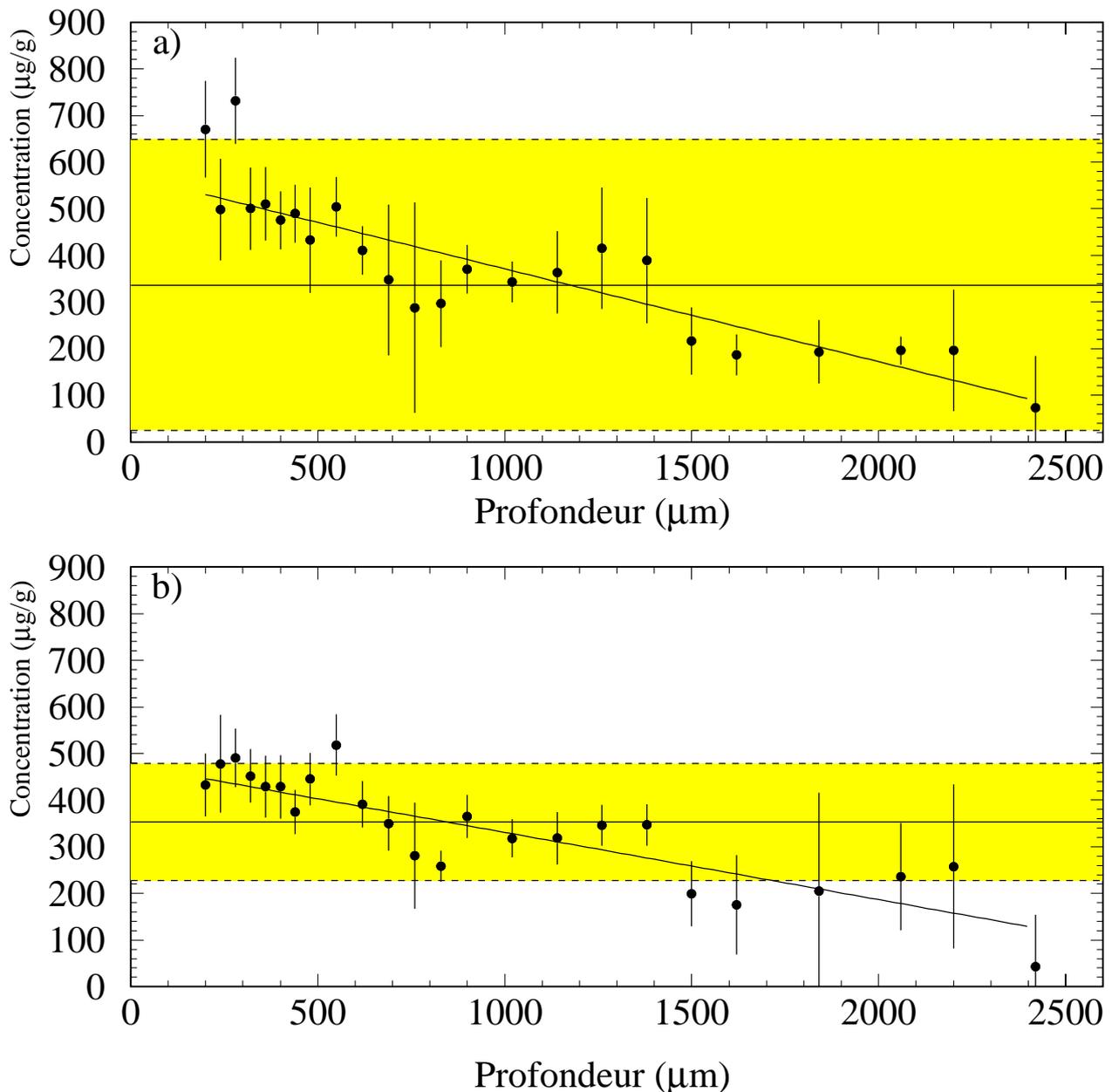


Figure 71: Evolution de la concentration en fer (a) et zinc (b) en fonction de la profondeur. La valeur moyenne des concentrations et la droite d'ajustement sont également montrées.

Le manganèse, le cuivre et le zirconium montrent aussi un premier palier important.

Nous constatons que les concentrations diminuent sur les paliers, montrant une plus faible contamination au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant (tableau 56). Il en est de même pour les maxima et les sélections. Nous confirmons ainsi l'existence d'un gradient de concentration.

Si nous observons les  $\Delta F/F_{(i-j)} = \frac{C_{\text{palier } i} - C_{\text{palier } j}}{C_{\text{palier } i}}$  entre les différents paliers, nous pouvons

dire que les transferts des éléments se font bien entre les deux premiers paliers et qu'entre le deuxième et troisième, les migrations sont plus difficiles. L'évolution globale du transfert des éléments entre la première et la dernière coupe rejoint ce que nous avons observé dans le paragraphe précédent où nous regardions l'évolution de toutes les coupes en général. Nous pouvons penser que proche de l'implant nous avons plus de vascularisation qui va prendre en charge les éléments métalliques et les transporter vers d'autres tissus. Nous avons pu observer l'effet de la proximité de l'os dans le tissu témoin mais nous n'avons pu attribuer de palier vu la faible distance d'application.

		1 <sup>er</sup> palier		2 <sup>ème</sup> palier		3 <sup>ème</sup> palier	
		<C> (µg/g)	ΔF/F (1-2)	<C> (µg/g)	ΔF/F (2-3)	<C> (µg/g)	ΔF/F (1-3)
Cr	Moy	<b>2,80 ± 2,77</b>	<b>0,33 ± 1,15</b>	(<3*)	<b>0,00 ± 1,00</b>	(<3*)	<b>0,65 ± 1,06</b>
	Max	23 ± 5	-0,22 ± 0,39	28 ± 6	0,87 ± 0,07	3 ± 2	0,85 ± 0,09
	Sél	23 ± 5	-0,22 ± 0,39	28 ± 6	0,87 ± 0,07	3 ± 2	0,85 ± 0,09
Fe	Moy	<b>508 ± 88</b>	<b>0,31 ± 0,25</b>	<b>348 ± 114</b>	<b>0,64 ± 0,54</b>	<b>125 ± 182</b>	<b>0,75 ± 0,36</b>
	Max	835 ± 182	0,23 ± 0,24	644 ± 140	0,45 ± 0,17	355 ± 77	0,58 ± 0,13
	Sél	493 ± 108	-0,31 ± 0,40	644 ± 140	0,69 ± 0,10	199 ± 44	0,60 ± 0,12
Co	Moy	<b>4,26 ± 2,72</b>	<b>0,30 ± 0,86</b>	(<3*)	<b>0,00 ± 1,00</b>	(<2*)	<b>0,71 ± 0,56</b>
	Max	31 ± 8	0,47 ± 0,19	17 ± 5	0,84 ± 0,12	3 ± 2	0,91 ± 0,06
	Sél	31 ± 8	0,47 ± 0,19	17 ± 5	0,97 ± 0,14	(<2*)	0,99 ± 0,08
Ni	Moy	(<3*)	<b>0,44 ± 1,03</b>	(<3*)	<b>0,57 ± 0,78</b>	(<1*)	<b>0,76 ± 0,37</b>
	Max	40 ± 9	0,51 ± 0,15	20 ± 4	0,89 ± 0,05	2 ± 1	0,95 ± 0,02
	Sél	35 ± 8	0,43 ± 0,18	20 ± 4	0,89 ± 0,05	2 ± 1	0,94 ± 0,03
Zn	Moy	<b>441 ± 47</b>	<b>0,27 ± 0,15</b>	<b>321 ± 58</b>	<b>0,76 ± 0,83</b>	<b>78 ± 265</b>	<b>0,82 ± 0,60</b>
	Max	602 ± 131	0,21 ± 0,24	476 ± 104	0,10 ± 0,28	429 ± 94	0,29 ± 0,22
	Sél	395 ± 86	-0,21 ± 0,37	476 ± 104	0,47 ± 0,16	250 ± 55	0,37 ± 0,20

Tableau 56 : Répartition en paliers de l'évolution des concentrations en éléments métalliques. Les \* correspondent aux limites de détection.

### 3) Discussions

**L'évolution de la contamination dans le tissu post-mortem pathologique montre l'existence d'un gradient de migration.** L'ajustement par une droite de l'évolution du fer conduit à une pente de - 0,20. Nous pouvons distinguer des « paliers » qui ne sont pas observables dans le tissu témoin. En effet, nous avons pu remarquer de plus fortes concentrations dans les premières coupes et un retour vers une teneur plus faible et homogène au fur et à mesure que l'on s'éloigne. Ceci a été mis en évidence avec la présence d'une distribution du chi 2 de l'ordre de 1,5 pour le fer et le zinc (avec 14 degrés de liberté), les seuls éléments métalliques présents dans le témoin. Dans le cas des tissus pathologiques, cette distribution est beaucoup plus hétérogène dès le départ, montrant que nous devons avoir une forte variation de concentration entre toutes les coupes ou une forte dispersion des teneurs. Le fait de faire la découpe par palier limite l'hétérogénéité des mesures. Nous pouvons penser que lorsque nous aurons de fortes valeurs de chi 2 sur l'ensemble de nos mesures, nous pourrions avoir une évolution par palier.

Ces observations ont été faites sur des tissus post-mortem. Il est intéressant de voir si nous observons le même phénomène dans des tissus per-opératoires métallisés ou instables.

## B. Prélèvements per-opérateurs

Nous avons analysé 5 prélèvements per-opérateurs comprenant un témoin (T2), deux tissus métalloés (BO3 et BO4) et deux échantillons instables (BO1, BO2).

### 1) Tissu témoin

Ce tissu va nous servir de référence pour l'étude des échantillons per-opérateurs. Il a été effectué sur une hanche au niveau capsulaire. La seule caractéristique à prendre en compte est la nécrose importante de ce tissu.

Nous représentons dans le tableau 57 les résultats obtenus pour ce prélèvement. Nous constatons que les moyennes des concentrations des coupes, des maxima et des sélections sont compatibles. Cependant par rapport aux teneurs de référence de la littérature, nous constatons que les concentrations sont plus faibles pour le zinc par rapport à la référence [64] et du même ordre de grandeur que celles mesurées précédemment sur les cibles épaisses. Les autres éléments sont du même ordre de grandeur. Les concentrations et les valeurs du chi 2 par degré de liberté (9) démontrent une certaine homogénéité de la répartition sauf pour les maxima et les sélections du fer. La nécrose du tissu peut induire la faible concentration en zinc. Les valeurs de  $\Delta F/F$  et de la pente de la courbe d'ajustement confirment le fait que nous n'avons pas d'évolution en fonction de la profondeur dans ce tissu. Les valeurs du chi 2 des concentrations et de la pente étant du même ordre de grandeur nous concluons que les concentrations sont homogènes pour ce tissu.

		Réf [65]	<C> ( $\mu\text{g/g}$ )	$\chi^2$	$\Delta F/F$	Pente	$\chi^2$
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b>38</b>	<b>63 ± 11</b>	<b>0,66</b>	<b>0,49 ± 0,75</b>	<b>0,07 ± 0,07</b>	<b>0,62</b>
	Maxima		87 ± 136	6,31	0,78 ± 0,07	-0,03 ± 0,009	6,02
	Sélection		64 ± 96	6,06	0,81 ± 0,06	-0,02 ± 0,007	5,81
<b>Cu</b>	<b>Moyenne</b>	<b>4</b>	<b>5 ± 1</b>	<b>0,61</b>	<b>0,47 ± 0,16</b>	<b>-0</b>	<b>0,53</b>
	Maxima		6 ± 2	1,28	0,48 ± 0,22	-0	1,14
	Sélection		6 ± 2	1,37	0,53 ± 0,20	-0	1,14
<b>Zn</b>	<b>Moyenne</b>	<b>193</b>	<b>32 ± 6</b>	<b>1,10</b>	<b>0,36 ± 0,15</b>	<b>-0</b>	<b>0,85</b>
	Maxima		35 ± 5	0,63	0,34 ± 0,22	-0	0,49
	Sélection		33 ± 6	0,82	0,33 ± 0,22	-0	0,61

Tableau 57 : Caractéristiques du tissu témoin (nous avons 14 degrés de liberté). Les concentrations sont données en  $\mu\text{g/g}$ .

### 2) Tissus pathologiques

Nous procédons de la même manière pour les tissus métalloés et instables. L'analyse des résultats tend à montrer dès le premier abord que nous avons des réactions différentes suivant l'état du tissu. Nous présentons dans le tableau 58, quelques caractéristiques des prélèvements effectués en prenant en compte toutes les coupes.

Echantillons	Fraction > LD	Nombre de degrés de liberté	$\chi^2$ de la moyenne des		
			Moyennes	Maxima	Sélections
<b>BO4</b> (Cr-Fe-Ni)	100%	14	1,17	1,17	1,17
<b>BO3</b> (Co-Cr)	100%	21	1,05	1,75	2,80
<b>BO2</b> (Ti)	76%	13	0,70	3,97	4,9
<b>BO1</b> (Ti)	64%	9	0,70	3,03	3,03

Tableau 58 : Caractéristiques des tissus pathologiques suivant les coupes.

Dans un premier temps, nous pouvons constater que la proportion de points supérieurs à la limite de détection est plus importante dans le cas des tissus per-opératoires que pour les prélèvements post-mortem. La distribution du chi 2 par degré de liberté de tous les points de mesure semble montrer que pour les moyennes, nous avons une plus forte hétérogénéité des concentrations pour les prélèvements métallisés et instables. Si nous nous intéressons aux maxima et aux sélections, cette variable devient plus grande pour BO1 et BO2, montrant une plus forte hétérogénéité de répartition des points sur toute la profondeur étudiée. Le fait d'avoir des chi 2 pour les maxima et les sélections semblables, indiquent que le comportement de ces points est similaire. Nous allons étudier cette répartition en fonction des éléments majeurs rencontrés dans les tissus (tableaux 59, 60, 61).

		<C> ( $\mu\text{g/g}$ )	$\chi^2$	$\Delta\text{F/F}$	Pente	$\chi^2$
<b>Cr</b>	<b>Moyenne</b>	<b>208 ± 52</b>	<b>1,31</b>	<b>0,11 ± 0,36</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>1,15</b>
	Maxima	293 ± 66	1,04	0,36 ± 0,20	0,02 ± 0,02	1,06
	Sélection	293 ± 66	1,03	0,36 ± 0,20	0,02 ± 0,02	1,07
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b>836 ± 169</b>	<b>1,00</b>	<b>0,29 ± 0,31</b>	<b>0,06 ± 0,05</b>	<b>0,95</b>
	Maxima	1187 ± 487	1,86	0,51 ± 0,15	0,02 ± 0,09	2,00
	Sélection	1172 ± 475	1,84	0,51 ± 0,15	-0,03 ± 0,09	1,97
<b>Ni</b>	<b>Moyenne</b>	<b>119 ± 36</b>	<b>1,56</b>	<b>0,13 ± 0,35</b>	<b>0,02 ± 0,01</b>	<b>1,30</b>
	Maxima	169 ± 38	1,04	0,34 ± 0,20	0,02 ± 0,01	1,01
	Sélection	169 ± 38	1,04	0,34 ± 0,20	0,02 ± 0,01	1,02
<b>Zn</b>	<b>Moyenne</b>	<b>46 ± 29</b>	<b>2,18</b>	<b>0,10 ± 0,29</b>	<b>0,01 ± 0,003</b>	<b>3,37</b>
	Maxima	52 ± 25	2,13	-0,11 ± 0,35	0,02 ± 0,004	1,53
	Sélection	49 ± 19	1,74	0,20 ± 0,25	0,01 ± 0,01	1,64
<b>Zr</b>	<b>Moyenne</b>	<b>12118 ± 4943</b>	<b>2,18</b>	<b>0,14 ± 0,26</b>	<b>1,27 ± 0,68</b>	<b>2,25</b>
	Maxima	16091 ± 3985	1,14	0,26 ± 0,23	1,08 ± 1,29	1,18
	Sélection	16048 ± 4007	1,15	0,26 ± 0,23	1,06 ± 1,29	1,19

Tableau 59 : Concentration, distribution du chi 2 par degré de liberté de la moyenne des moyennes, rapport entre la première et la dernière coupe et pente de la droite d'ajustement avec son chi 2, les maxima et les sélections pour le patient BO4 (Cr-Fe-Ni).

Dans les tableaux 59 et 60, nous remarquons que la contamination du tissu est assez importante en ce qui concerne les éléments majeurs de la prothèse. Le fait d'avoir des valeurs de distribution du chi 2 qui soient supérieures à 1 dénote une certaine hétérogénéité des points de mesure. Les valeurs de  $\Delta\text{F/F}$  pour chaque élément montrent qu'il y a un très bon transfert en fonction de la profondeur du tissu. La

pende de la droite d'ajustement, voisine de zéro confirme le bon transfert de répartition en fonction de la distance.

		<C>	$\chi^2$	$\Delta F/F$	Pente	$\chi^2$
<b>Cr</b>	<b>Moyenne</b>	<b>4188 ± 1757</b>	<b>1,50</b>	<b>0,46 ± 0,25</b>	<b>-2,22 ± 0,52</b>	<b>0,69</b>
	Maxima	6886 ± 4697	2,98	0,26 ± 0,23	-3,24 ± 0,65	1,89
	Sélection	5454 ± 6630	5,01	0,26 ± 0,23	-3,81 ± 0,57	3,07
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b>758 ± 118</b>	<b>0,50</b>	<b>0,09 ± 0,44</b>	<b>-0,02 ± 0,09</b>	<b>0,52</b>
	Maxima	1242 ± 898	3,14	-0,17 ± 0,36	-0,21 ± 0,12	3,14
	Sélection	879 ± 1053	4,95	0,38 ± 0,19	-0,35 ± 0,09	4,53
<b>Co</b>	<b>Moyenne</b>	<b>1928 ± 289</b>	<b>0,58</b>	<b>-0,13 ± 0,42</b>	<b>0,29 ± 0,25</b>	<b>0,54</b>
	Maxima	2735 ± 786	1,31	-0,04 ± 0,32	-0,31 ± 0,28	1,31
	Sélection	2337 ± 1342	2,54	-0,04 ± 0,32	-0,95 ± 0,23	1,83
<b>Ni</b>	<b>Moyenne</b>	<b>94 ± 15</b>	<b>0,60</b>	<b>-0,08 ± 0,42</b>	<b>0,01 ± 0,01</b>	<b>0,60</b>
	Maxima	135 ± 39	1,26	-0,05 ± 0,34	-0,02 ± 0,01	1,26
	Sélection	119 ± 57	2,02	-0,05 ± 0,34	-0,04 ± 0,01	1,58
<b>Zn</b>	<b>Moyenne</b>	<b>52 ± 4</b>	<b>0,36</b>	<b>-0,12 ± 0,26</b>	<b>0,01 ± 0,01</b>	<b>0,37</b>
	Maxima	73 ± 30	1,82	0,03 ± 0,31	-0,02 ± 0,007	1,46
	Sélection	63 ± 32	2,21	0,17 ± 0,26	-0,03 ± 0,07	1,53
<b>Mo</b>	<b>Moyenne</b>	<b>276 ± 43</b>	<b>0,68</b>	<b>0,07 ± 0,22</b>	<b>-0,01 ± 0,03</b>	<b>0,70</b>
	Maxima	382 ± 125	1,41	0,17 ± 0,27	-0,09 ± 0,04	1,20
	Sélection	329 ± 212	2,68	0,17 ± 0,27	-0,17 ± 0,03	1,66

Tableau 60 : Concentration, distribution du chi 2 par degré de liberté de la moyenne des moyennes, rapport entre la première et le dernière coupe et pente de la droite d'ajustement avec son chi 2, les maxima et les sélections pour le patient BO3 (Co-Cr).

Nous pouvons également remarquer la présence non négligeable du zirconium qui provient du ciment entre l'implant et l'os. Sa forte teneur montre que cet élément migre bien mais qu'il a une forte dispersion (forte valeur de l'incertitude et chi 2 >2), c'est à dire que nous le trouvons de manière ponctuelle. D'autre part, la présence de zinc en quantité supérieure à celle du tissu témoin signale que nous avons une réaction tissulaire.

Pour cette prothèse en alliage cobalt-chrome (tableau 60), nous avons bien une contamination des tissus par les éléments majeurs (figure 72). Les distributions du chi 2 par degré de liberté pour la moyenne des concentrations des coupes, des maxima et des sélections sont compatibles. Les évolutions de ces différents paramètres sont en tout point semblables. Il faut noter que la pente du chrome est plus importante démontrant ainsi son mauvais transfert dans les tissus en fonction de la profondeur. Nous avons pu remarquer la présence de manganèse (de l'ordre de 70 µg/g) de manière homogène dans toutes les coupes étudiées. Cet élément est présent à l'état de trace dans la prothèse, le fait d'avoir une métallose induit la présence d'éléments traces.

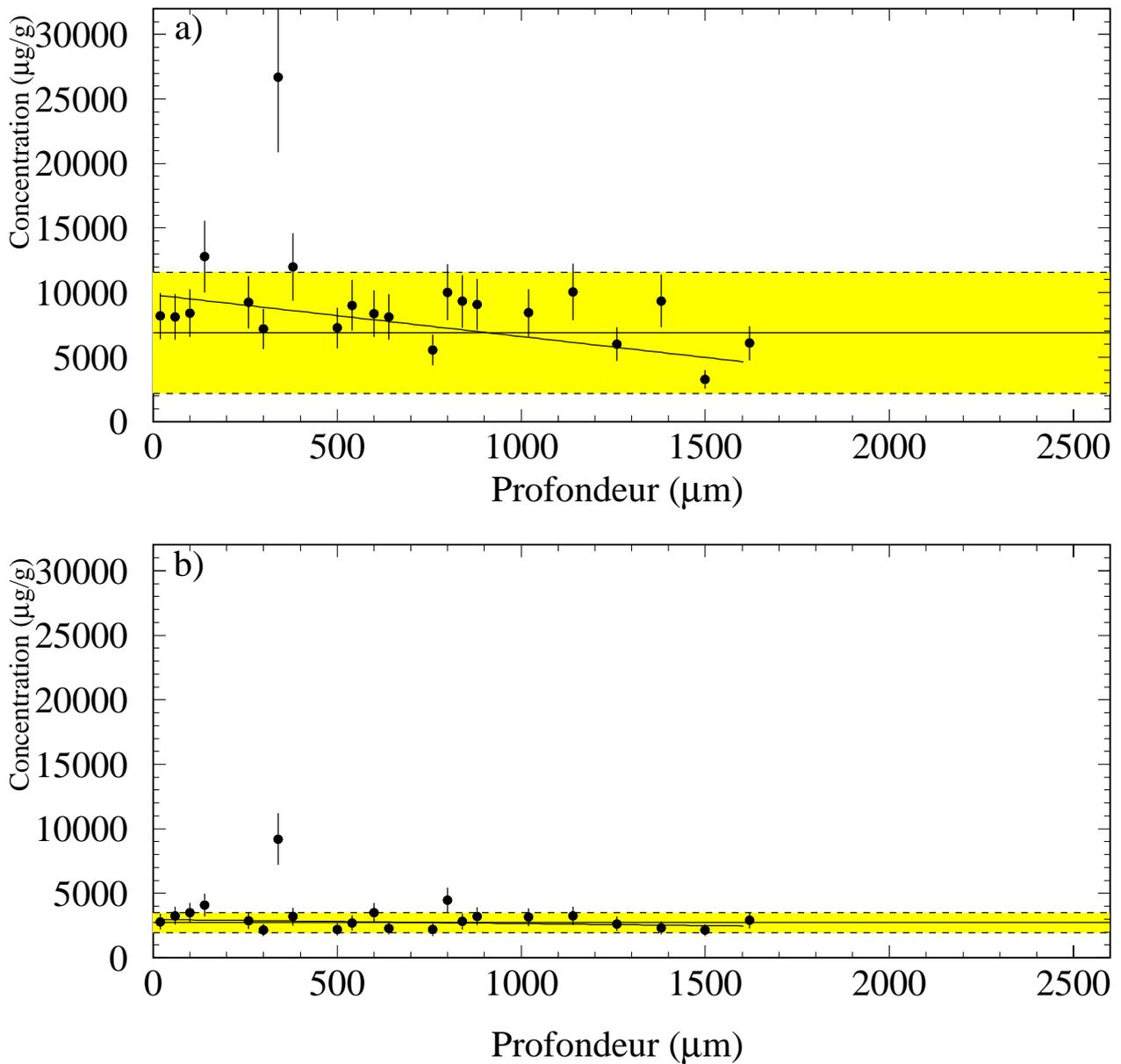


Figure 72: Evolution de la concentration maximale en cobalt et en chrome dans les tissus BO3.

		$\langle C \rangle$ ( $\mu\text{g/g}$ )	$\chi^2$	$\Delta F/F$	Pente	$\chi^2$
<b>Ti</b>	<b>Moyenne</b>	<b><math>8 \pm 1</math></b>	<b>0,25</b>	<b><math>-0,23 \pm 1,52</math></b>	<b><math>0,01 \pm 0,01</math></b>	<b>0,16</b>
	Maxima	$13 \pm 18$	3,18	$-0,81 \pm 0,83$	$0,01 \pm 0,01$	3,43
	Sélection	$14 \pm 19$	3,04	$-0,98 \pm 1,00$	$0,01 \pm 0,01$	3,29
<b>Fe</b>	<b>Moyenne</b>	<b><math>744 \pm 81</math></b>	<b>0,46</b>	<b><math>-0,71 \pm 2,49</math></b>	<b><math>0,08 \pm 0,08</math></b>	<b>0,42</b>
	Maxima	$1094 \pm 573$	2,35	$0,49 \pm 0,16$	$0,05 \pm 0,12$	2,53
	Sélection	$732 \pm 733$	4,29	$0,49 \pm 0,16$	$0,27 \pm 0,09$	3,92
<b>Zn</b>	<b>Moyenne</b>	<b><math>23 \pm 9</math></b>	<b>2,22</b>	<b><math>0,48 \pm 0,15</math></b>	<b><math>0,01 \pm 0,01</math></b>	<b>0,65</b>
	Maxima	$31 \pm 18$	2,49	$0,60 \pm 0,13$	$-0,01 \pm 0,003$	0,78
	Sélection	$25 \pm 12$	2,13	$0,60 \pm 0,13$	$0,01 \pm 0,01$	1,35

Tableau 61 : Concentration, distribution du chi 2 par degré de liberté de la moyenne des moyennes, rapport entre la première et le dernière coupe et pente de la droite d'ajustement avec son chi 2, les maxima et les sélections pour le patient BO1 (Ti). Les \* correspondent aux limites de détection.

Pour la prothèse en titane, nous constatons que nous avons une très faible présence de titane (tableau 61). La répartition de cet élément est homogène en profondeur. Nous avons la présence de traces de nickel, de cobalt et de zirconium. Seul le fer est présent en forte quantité.

Parallèlement à cette étude, nous avons réalisé des cartographies montrant la forme et l'état de surface des échantillons. Nous faisons ainsi la différence entre la contamination ionique, particulaire et la présence d'amas ionique ou moléculaire (figure 68). Nous pouvons constater que les éléments majeurs sont localisés au même endroit, laissant supposer la présence d'un débris de prothèse. Pour ce qui est du zirconium, sa présence est beaucoup plus diffuse comme s'il s'agissait d'une distribution ionique.

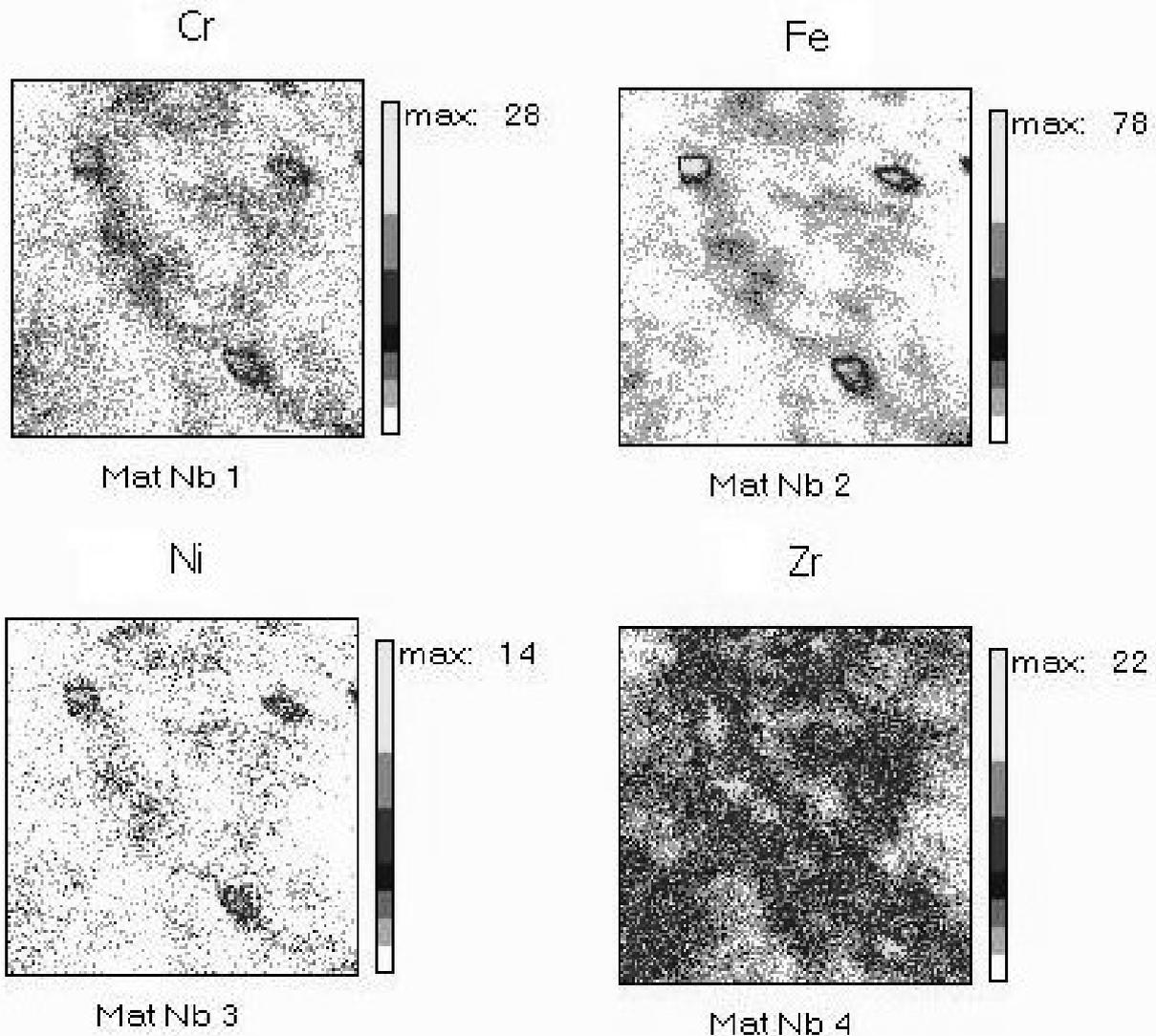


Figure 73 :Cartographie obtenue après irradiation par un faisceau de protons de 3 MeV représentant une surface de  $600 \times 600 \mu\text{m}^2$ . Le chrome, le fer et le Nickel correspondent aux éléments majeurs de la prothèse et le zirconium à la présence de ciment.

### 3) Discussions

Cette étude montre d'une part l'évolution des éléments métalliques en fonction de la profondeur suivant la pathologie mais aussi la différence de comportement entre les tissus post-mortem et per-opératoires.

Dans le premier cas nous avons des paliers mettant en évidence un nettoyage possible des tissus par une diffusion liquidienne. Pour les tissus per-opératoires, c'est l'activité cellulaire qui effectue la répartition des métaux dans l'organisme. Suivant la pathologie et la localisation du prélèvement (tissus morts et vivants), nous pouvons avoir des réactions différentes.

Dès que nous avons la présence de métallose, nous avons de fortes concentrations en éléments métalliques et leur transport se fait plus ou moins bien. Pour BO3, le cobalt semble migrer plus facilement dans les tissus mais pas le chrome qui reste sur la face proche de l'implant. Le nickel, quant à lui, reste constant dans les tissus. Pour le prélèvement BO4, l'évolution est quasi nulle ce qui explique la contamination en profondeur et le transfert des éléments.

Pour BO1 et BO2, les résultats montrent que la quantité de titane est faible mais nous avons une forte contamination en fer aussi importante que dans le cas des métalloses.

## V. DISCUSSIONS

La majeure partie des implants métalliques utilisés en chirurgie se situe dans la catégorie des métaux passifs : c'est à dire qu'ils doivent leur résistance à la corrosion par la présence continue d'une couche stable d'oxyde à leur surface. Par exemple l'inox et les alliages cobalt-chrome sont protégés par une couche d'oxyde de chrome tandis que le titane et ses alliages sont recouverts d'une couche d'oxyde de titane. Le point important sur leur passivité et leur résistance à la corrosion est la nature des conditions qui peuvent causer la rupture de ce film d'oxyde et produire la corrosion.

Quand un métal est immergé dans une solution de Ringer, c'est à dire une solution similaire à une solution physiologique, il existe trois types de comportement de l'implant suivant les caractéristiques des métaux utilisés. Dans le premier cas, nous avons une corrosion générale qui se produit. Dans le second cas, nous sommes en présence d'un métal ayant une résistance à la corrosion tandis que dans le troisième cas, le métal est sensible à l'usure provoquée par le liquide physiologique ce qui entraîne une rupture de la couche de passivation et une contamination de la corrosion de l'organisme [66]. D'après des études ultérieures effectuées sur différents types de prothèse, il a été montré que le titane et ses alliages se corrodent peu dans les fluides physiologiques, que les alliages à base de cobalt-chrome peuvent rarement devenir sujet à une attaque corrosive, seulement dans des circonstances exceptionnelles, tandis que l'acier 316L est susceptible de rompre son film d'oxyde et d'induire une corrosion locale.

Les implants métalliques relarguent une quantité finie de métaux dans les tissus adjacents par des mécanismes variés tel que la corrosion [66], ce qui peut influencer les fonctions biologiques telles que les réactions cellulaires, la cytotoxicité et la sensibilité aux éléments métalliques [67].

La fréquence des réactions tissulaires en présence d'implant instable implique une possibilité de mécanismes cellulaires dont cette apparition des réactions tissulaires. Parmi les hypothèses, la modification de la vascularisation osseuse à la périphérie de prothèses descellées, secondaire à la présence de métal a été évoquée. Parallèlement, il peut donc y avoir nécrose au pourtour d'un descellement entre os et ciment. Ces réactions cellulaires s'accompagnent de libération des facteurs de l'inflammation qui peuvent infiltrer tous les tissus adjacents, ce qui entraîne tous les éléments caractéristiques de la réponse inflammatoire :

infiltration oedémateuse par afflux de fluide extra-cellulaire [66, 68]  
et réactions cellulaires à base de polynucléaires et de macrophages [69, 70].

Les débris de particules sont phagocytés [71] et induisent l'activité des macrophages qui entraînent le relargage de médiateurs cellulaires parmi lesquels nous pouvons citer l'interleukine 1 (IL1), l'interleukine 6 (IL6) et la prostaglandine (PGE2) [72]. Cette cascade de cytokines provoque la prolifération de cellules variées induisant la formation d'ostéoclastes, qui stimulent les macrophages et les ostéoclastes à résorber l'os adjacent [67, 73, 74, 75]. Les réactions tissulaires dépendent de la quantité de débris : si nous avons une faible concentration de métaux, les réactions s'orientent vers une fibrose du tissu, et pour de fortes concentrations, elles s'orientent vers une résorption osseuse.

Les ions métalliques relargués et dissous forment des complexes métalloprotéiques qui se fixent à la surface des cellules influent sur le transport des éléments nutritifs. Koenig [76] a montré que les lysosomes peuvent accumuler les ions métalliques. Par la suite, ceux-ci entraînent une libération des hydrolases acides, enzymes digestives intracellulaires, conduisant ainsi à une lyse des cellules adjacentes

et à une dégradation de la matrice extracellulaire. Le processus est alors auto-entretenu. Ce phénomène de lyse osseuse localisée peut favoriser la formation d'un granulôme inflammatoire et entraîner le descellement de l'implant à long terme.

Nos différentes études ont permis de démontrer que nous avons une contamination des tissus adjacents par les éléments métalliques majeurs provenant de la prothèse [77, 78]. Cette distribution est hétérogène sur une surface d'analyse, cependant nous avons pu mettre en évidence des corrélations de localisation entre métaux.

Nous pouvons donc différencier deux types de contamination :

Une pollution de base produite par les éléments métalliques majeurs de la prothèse, probablement sous forme ionique fonction de la corrosion et de la bioactivité des tissus.

Un phénomène particulière, où les éléments provenant de l'implant sont sous forme de particules plus ou moins dissoutes, représentant une concentration maximale.

L'évolution entre les deux faces montre que sur la face la plus proche de l'implant, les éléments métalliques sont répartis de manière aléatoire et au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant, nous retrouvons une certaine homogénéité de répartition avec moins de contamination. Il apparaît que la présence particulière est très localisée au pourtour de l'implant tandis que la pollution ionique est beaucoup plus diffuse. De par l'étude de la variable  $\Delta F/F$  et des rapports des éléments métalliques majeurs, nous avons pu montrer que les éléments n'évoluent pas de la même manière.

En effet, si nous considérons les prothèses en alliage de titane, nous avons pu constater que l'élément titane est un élément qui reste sur la face proche de l'implant ou qui est rapidement pris en charge par l'organisme. Il peut s'agir d'un transport cellulaire de la particule ou d'une dégradation locale par les lysosomes après phagocytose par les macrophages [79, 80]. Ceci peut permettre à cet élément de rentrer dans le système vasculaire et de se disséminer dans les organes lointains. Il est possible que ces particules soient d'une part transportées par voies sanguines et puis localisées dans les lymphocytes, et d'autre part vont migrer dans les tissus par phagocytose et être transportées par les voies lymphatiques dans les lymphonodes [81, 82].

Pour les alliages contenant du cobalt, du chrome et du nickel, nous avons pu remarquer que ces éléments n'avaient pas le même comportement. Il semble que le cobalt et le nickel sont des métaux qui se transfèrent bien vers d'autres tissus ou bien restent bloqués sur la face la plus proche de l'implant tandis que le chrome semble se propager en profondeur. Des expériences [67, 83, 84] ont montré que le chrome est plus présent que le cobalt dans les tissus adjacents ainsi que dans les fluides articulaires, au niveau capsulaire et dans l'os nécrosé. Ceci semble montrer que le chrome a une plus faible solubilité que le cobalt. Comme cité précédemment, les métaux forment des complexes avec les protéines et de petits composés moléculaires dans les fluides biologiques. Par conséquent, il est probable que le cobalt, plus soluble forme des complexes qui sont facilement transportés vers d'autres organes [85] par voies sanguines ou lymphatiques [81, 86, 87] ou éliminés dans les urines [72, 85, 88], par exemple, tandis que le chrome est gardé par les cellules, stocké et éliminé plus lentement [75]. Le chrome relargué, suivant son état d'oxydation, peut induire un effet toxique sur les organes lymphatiques à l'emplacement où les débris de la prothèse ont été drainés. En effet, il a été démontré que l'ordre de toxicité des ions métalliques dans l'organisme est le suivant :  $Al < Cr^{3+} < V < Ni < Cr^{6+}$ . Le  $Cr^{6+}$  rentre dans les cellules via les canaux membranaires anioniques non sélectifs tandis que le  $Cr^{3+}$  forme des complexes octaédriques en solution aqueuse qui ne peuvent entrer dans les cellules par les canaux [89].

Nous trouvons de fortes concentrations en éléments métalliques sur la face la plus éloignée de l'implant. Ceci conduit à l'hypothèse que certaines particules migrent dans les tissus et se dissolvent par la suite. D'autre part autour d'un pic de concentration, nous observons une sorte de décroissance induisant la présence de forme ionique autour des particules en cours de dégradation. Nous avons déjà observé ceci à l'aide d'analyses par microscopie électronique à transmission. Nous remarquons d'autre part que sur la face proche de l'implant, les éléments pouvaient présenter des corrélations entre eux, c'est à dire que nous retrouvons au même endroit tous les éléments métalliques majeurs provenant de la prothèse. Ce phénomène avait déjà été rencontré dans des études antérieures [90]. L'analyse des

réactions cellulaires propres aux particules et l'étude du phénomène de dissociation de ces particules pourraient nous donner des informations sur le mécanisme intra-cellulaire des métaux.

Les différences de comportement des métaux peuvent également provenir de l'état du tissu, c'est à dire si nous avons un tissu vascularisé ou non avec la présence d'activité cellulaire. Nous avons étudié le comportement du zinc qui est un élément majeur intervenant dans le processus de remodelage osseux et de cicatrisation. Nous avons constaté que la quantité de zinc dans les prélèvements pathologiques est plus importante que pour les témoins, signe vraisemblable d'une réaction des tissus aux implants métalliques. Dans le cas où nous n'avons pas de réactions particulières aux implants, telles que des instabilités de prothèses ou de métallose, les teneurs en zinc sont proches de celles trouvées dans nos échantillons témoins. La localisation de cette contamination est voisine des maxima des métaux. Au fur et à mesure que nous nous éloignons de l'implant les concentrations en zinc diminuent et nous nous rapprochons des valeurs obtenues pour les témoins.

Les techniques physiques que nous avons appliquées sont des méthodes d'analyse complémentaire à celles réalisées dans le domaine biomédical. La méthodologie d'analyse que nous avons adoptée, et qui prend en compte les données du logiciel de traitement GUPIX et le test statistique du chi 2, nous a permis d'aboutir à des résultats compatibles avec ceux obtenus en biologie.

# CHAPITRE XI

## CONCLUSIONS

La méthode d'analyse PIXE a permis de mesurer de faibles concentrations en éléments métalliques présents dans des tissus biologiques environnant un implant. Nous avons travaillé sur des prélèvements post-mortem et per-opératoires au CERI à Orléans, pour les cibles épaisses, et au CENBG de Bordeaux, pour les cibles minces. Les expériences que j'ai effectuées au cours de ma thèse ont été traitées en utilisant une méthodologie d'analyse.

Lors de la première série d'analyse, nous avons constaté que la contamination en éléments métalliques varie en fonction du type d'implant et de l'état des tissus. Les échantillons post-mortem ne présentent pas de réactions particulières à l'implant et nous n'avons pas observé de pollution significative en éléments métalliques. Dans un premier temps, nous avons essayé de montrer l'existence d'une contamination dans les tissus environnant les prothèses. Ceci est réalisé en comparant les différentes concentrations que nous obtenons dans les tissus avec des valeurs de référence déterminées à l'aide de tissus témoins. L'étude de la distribution du  $\chi^2$  nous a permis d'avoir une estimation de l'hétérogénéité des mesures aussi bien sur une surface d'analyse que le long de l'implant. Sur une surface d'analyse, nous avons fait l'hypothèse de deux contaminations : une contamination ionique et une autre sous forme de fragments de prothèse. Une autre méthode d'analyse a confirmé ce résultat : l'étude de la délocalisation des centres de gravité pour les éléments métalliques.

En plus de l'hétérogénéité de répartition des métaux, l'existence de possibles corrélations entre les éléments métalliques est envisagée. Ces phénomènes sont plus importants si les patients présentaient une réaction à l'implant telle qu'une inflammation ou un descellement.

L'étude de la variation des concentrations entre la face proche et éloignée de l'implant, par l'intermédiaire de la variable  $\Delta F/F$ , ainsi que le calcul des rapports des éléments métalliques donnent une idée de leur évolution dans les tissus en fonction de l'éloignement de l'implant.

L'analyse des prélèvements per-opératoires a conduit aux mêmes observations au niveau des tissus capsulaires de la hanche et du genou.

D'un point de vue biologique, nous avons fait plusieurs observations grâce à cette méthode d'analyse. L'évolution des éléments métalliques entre les deux faces montre une différence de comportement suivant l'état des tissus et le type d'implant. Si nous considérons les plaques inox, nous avons plus de contamination par le fer que dans le cas de prothèses inox, et même dans le cas où les plaques n'entraînent pas de réactions pathologiques dans les tissus. La proximité des tissus avec l'implant peut expliquer cette réaction. Nous avons fait l'hypothèse que les éléments métalliques ne vont pas migrer et évoluer de la même manière dans les tissus en fonction du type d'implant et de la pathologie. Deux types de contamination sont possibles : l'une avec des concentrations réparties de manière homogène dénotant une pollution globale probablement ionique et l'autre plus ponctuelle montrant l'existence de fragments ou d'amas. Dans tous les cas, il y a plus de contamination au niveau de la néocapsule au pourtour articulaire.

L'association des résultats obtenus avec la méthode PIXE et la microscopie électronique à transmission (cartographies) a permis de visualiser les différents stades d'évolution des particules dans les tissus. En effet, nous avons pu mettre en évidence trois comportements différents :

La présence de débris comprenant tous les éléments majeurs de l'implant, dont les rapports d'éléments métalliques sont semblables à ceux des prothèses.

Des particules en cours de dissolution laissant sur leur passage des ions. Dans ce cas les rapports des concentrations des métaux sont inférieurs à ceux des implants et identiques sur les deux surfaces d'analyse.

Des fragments dissous agglomérés en certains endroits expliquant le fait que nous ayons parfois des concentrations en éléments métalliques non négligeables mais pas de corrélation entre elles.

La deuxième série d'expériences a été réalisée au CENBG de Bordeaux sur des cibles minces. Nous avons travaillé sur des prélèvements post-mortem et per-opératoires où le phénomène de palier n'a pas été retrouvé. Dans le premier cas, l'existence de paliers de migration pour les métaux a été mis en évidence, laissant supposer un effet de lessivage des tissus par le système lymphatique ou sanguin. Ces derniers ne sont pas obtenus sur les prélèvements per-opératoires où la courbe d'ajustement de la contamination des tissus est décroissante, variable suivant l'état des tissus et le type d'implant utilisé. Pour les tissus per-opératoires, la contamination est plus importante et nous pouvons supposer que les cellules ne peuvent pas prendre en charge tous les éléments métalliques, ce qui explique la pollution en métaux de manière plus profonde dans les tissus.

## CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ce mémoire nous avons effectué des analyses cristallographiques sur un biomatériau synthétique de complément : l'hydroxyapatite. Nous avons remarqué, au cours d'études antérieures dans notre équipe, une différence de comportement entre l'HAP pure et celle dopée au zinc. Le but est de déterminer la localisation du zinc et de comprendre l'influence que peut avoir cet élément sur la résorption de l'HAP. Les analyses par activation neutronique et par spectrométrie d'émission à source de plasma ont permis de mettre en évidence la composition des apatites étudiées. Ces dernières sont semblables aux hydroxyapatites théoriques.

L'analyse de la structure par diffraction de rayons X et spectrométrie à infrarouge a révélé des traces de phosphate tricalcique sous la forme bêta sans pour autant entraîner des variations de paramètres de mailles. Nous avons pu cependant montrer l'influence du dopage en zinc sur les groupements phosphates avec la visualisation du déplacement et de l'élargissement des bandes de vibration.

Une étude plus approfondie par l'EXAFS a ensuite été menée. Elle a permis de sélectionner deux solutions possibles pour l'emplacement du zinc dans la structure apatite : la substitution du calcium en site I par un atome de zinc ou l'insertion entre les deux hydroxydes. Actuellement, nous ne sommes pas en mesure de déterminer laquelle des deux solutions est la plus probable. D'un point de vue physico-chimique, nous aurions tendance à prendre plus en considération la substitution du calcium en site I par le zinc, mais nous ne pouvons pas complètement exclure la solution de l'insertion du fait que nous avons la présence d'une distorsion locale de la maille au niveau de la localisation du zinc.

Des expériences complémentaires sont envisagées avec des taux de zinc plus importants afin de nous permettre de mieux localiser le zinc dans la structure apatite. De cette manière, nous résoudrons le problème de sensibilité.

La seconde partie de cette thèse concerne l'étude du transfert des éléments métalliques dans les tissus musculaires au contact d'implants. Dans un premier temps, nous avons analysé les prothèses afin de déterminer leur composition et ainsi connaître les éléments susceptibles de migrer dans les tissus. Par la suite, nous avons travaillé sur deux types d'échantillons : des prélèvements post-mortem et per-opératoires. Deux séries de mesures ont été réalisées, l'une au CERI d'Orléans sur des cibles épaisses afin de déterminer l'évolution de la contamination en fonction de la localisation le long de l'implant, et l'autre au CENBG de Bordeaux sur des cibles minces, pour évaluer le gradient de migration en fonction de la distance par rapport à la prothèse et obtenir des cartographies de la surface étudiée. Afin de mettre en évidence tous les résultats que nous pouvons observer dans les tissus, nous avons développé une méthodologie d'analyse en utilisant la distribution du chi 2 pour montrer la distribution des éléments métalliques dans les tissus et l'étude des centres de gravité afin de visualiser les corrélations possibles entre ces éléments métalliques.

Les premières expériences menées au CERI d'Orléans, montrent la présence dans les tissus des éléments métalliques provenant de l'implant. Cette contamination ne se fait pas de manière homogène ni sur la surface du prélèvement, ni le long de l'implant. Des corrélations de localisation entre éléments, avec possibilité de fragments comprenant tout ou une partie des métaux composant la prothèse, sont envisagées.

Les analyses effectuées au CENBG de Bordeaux ont montré l'existence d'un gradient de migration en fonction de la distance par rapport à l'implant. Cette contamination est variable suivant l'état pathologique du tissu. Dans le cas des prélèvements post-mortem où nous n'avons pas de réactions particulières à l'implant, nous avons observé une évolution par paliers tandis que pour les prélèvements per-opératoires il n'existe pas de palier apparent mais une décroissance plus progressive.

La présence d'éléments métalliques a été montrée ainsi que les différents comportements et l'évolution des métaux provenant de prothèses métalliques dans des tissus aussi bien post-mortem que per-opératoires. La statistique insuffisante de notre échantillonnage ne nous permet pas actuellement

d'établir précisément les comportements de la migration des éléments métalliques majeurs et de leurs concentrations en fonction de la pathologie. La différence d'évolution de migration des éléments entre les tissus post-mortem et per-opératoires est intrigante ; il serait intéressant de poursuivre cette étude afin de faire une corrélation entre la pathologie et la quantité d'éléments mesurée. D'autre part, il est souhaitable d'améliorer le protocole opératoire d'échantillonnage afin d'obtenir le maximum de prélèvements en un même endroit avec un type de prothèse donnée. Ceci permettrait, à plus long terme, de valider la technique d'analyse des données qui met en évidence les différents phénomènes que nous pouvons rencontrer dans les tissus musculaires.

Nous avons montré que tous les métaux n'avaient pas le même comportement dans les tissus. Nous supposons que la forme sous laquelle nous les trouvons peut influencer cette évolution. L'étude de l'état d'oxydation des éléments majeurs devrait nous permettre de déterminer les possibilités de liaison de ces métaux avec les protéines ou les enzymes des tissus et ainsi voir leur possible devenir. De par cet état, nous aurons une idée de la toxicité de l'élément pour l'organisme.

De plus, nous avons émis l'hypothèse que ces éléments pouvaient migrer vers d'autres organes, il est donc envisagé d'analyser des organes filtres tels que les ganglions lymphatiques, le rein, le foie et la rate....afin de mettre en évidence la présence ou non d'éléments métalliques provenant de l'implant.

# **ANNEXES**



# ANNEXE I

## CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DU ZINC

### Métabolisme du Zinc

Le zinc intervient dans l'activité de plus de 200 enzymes et joue un rôle fondamental dans chacun des compartiments biologiques liés à la perturbation de la vie. Une perturbation de la disponibilité en zinc va agir à tous les échelons du maintien de l'homéostasie (c). Le zinc intervient depuis le maintien de la structure de la double hélice de l'ADN, jusqu'à la synthèse des molécules les plus diverses.

Il se retrouve essentiellement dans les muscles, les os, la peau, le foie, le cerveau, la prostate, les cheveux et les yeux. C'est le plus abondant des métaux à l'état de trace dans l'os minéral, il est présent à des concentrations supérieures à 300 µg/g.

En dehors des très nombreuses enzymes utilisant le zinc comme activateur, il existe au moins deux douzaines de métalloenzymes le requérant. Les principales sont l'anhydrase carbonique (enzyme jouant un rôle dans le remodelage osseux), la lactase déshydrogénase, la glutamate déshydrogénase, la phosphatase alcaline et la thymidine kinase. Le zinc forme facilement des complexes avec les groupes chimiques à charges négatives, mais ces complexes sont moins stables que ceux formés avec le nickel, le cobalt ou le cuivre.

Le zinc est absorbé au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle, son absorption dépend des protéines auxquelles il est lié. Dans les cellules intestinales, il se lie à des métallothionéines (il a une affinité particulière pour les groupes thio-soufre et imidazoles des protéines) qui jouent un rôle de régulateur de la quantité de zinc absorbée : un régime pauvre en zinc va entraîner une diminution de la production de métallothionéines et, lors de la correction alimentaire, le zinc passera plus facilement dans le plasma sanguin.

Le foie joue un rôle très important dans l'utilisation et le stockage du zinc notamment avec des métallothionéines. L'action du zinc se manifeste dans des enzymes clés, au niveau de la stimulation de la sécrétion de l'interleukine 2 et d'autres cytokines.

Normalement, un homme de 70 kg absorbe 10 à 15 mg de zinc par jour et en possède une quantité totale allant de 1.4 à 2.3 g. La plupart des organes humains contiennent entre 20 et 30 µg/g de zinc.

### Rôle du zinc

Le zinc a une fonction physiologique bien définie dans le corps humain. Les grandes fonctions de l'organisme ne sont actives qu'en présence d'un stock de zinc suffisant. Lors d'une poussée inflammatoire, il y a une baisse de zinc sérique qui est due à la libération d'interleukine 1(d) (IL1) qui induit la sécrétion des protéines, celle-ci aboutissant à la production d'ATCH (*adrenocorticotropic*

---

c) Homéostasie : définit la stabilisation des états qui permettent les processus biologiques de la vie. Le concept d'homéostasie se réfère fondamentalement à la notion d'état stationnaire.

d) Interleukine : Protéines de petite taille produites par les lymphocytes permettant aux cellules immunitaires de communiquer entre elles. Interleukine 1 permet l'activation des lymphocytes T et les productions d'un grand nombre d'autres interleukines.

*hormone (e) ou corticostimuline ou cortisone*), de cortisol (f) et de la synthèse de métallothionéines (g) hépatiques. Des concentrations élevées en  $Zn^{2+}$  à proximité de tissus enflammés, de lésions, peuvent accélérer la réponse des neurones. Il semble contrôler les différents événements du métabolisme au niveau moléculaire.

Une augmentation en zinc se manifeste par différentes perturbations:

Une diminution du calcium sérique

Augmentation de la concentration en parathormone (h). Cette dernière provoque une montée du calcium sérique et une baisse du phosphore sérique.

Inhibition de la mobilisation du calcium osseux par la parathormone. Cet effet peut être lié à la baisse d'activité de l'anhydrase carbonique qui est dépendante du zinc.

Le zinc module l'action de la vitamine D3 (i) en agissant probablement sur l'activité de l'hydroxylase rénale (dépendante en zinc). Cette vitamine intervient dans la fixation osseuse du calcium.

Une augmentation de la résorption osseuse

### **Toxicité en zinc**

Le zinc métal ne présente pas de toxicité particulière. Les effets toxiques observés sont surtout le fait d'oxyde ou de chlorure de zinc utilisés dans l'industrie (fièvres des fondeurs).

Les posologies quotidiennes peuvent atteindre sans risque 50 mg/j, seule la prescription de doses supérieures à 100 mg/j peut conduire à des troubles neurologiques, rénaux et favoriser l'apparition d'anémie.

---

e) ACTH : Hormone maintenant le poids du cortex surrénalien chez l'animal privé d'hypophyse, et stimule ses sécrétions. Lors d'une poussée inflammatoire, l'ACTH commande la libération de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Ces glucocorticoïdes sont les agents anti-inflammatoires les plus puissants.

f) Cortisol : Inducteur de la biosynthèse des enzymes de la néoglycogénèse.

g) Métallothionéine : Métalloprotéine du rein

h) Parathormone (PTH): Elle est synthétisée dans les glandes parathyroïdes. Elle est au centre de la régulation de l'homéostasie osseuse par ses effets hypercalcémiant. La PTH intervient sur le remodelage osseux, elle a pour effet d'augmenter le nombre et l'activité des ostéoclastes.

i) Vitamine D3 : autre nom du cholécalciférol. Elle intervient dans l'équilibre de la calcémie et le remodelage osseux en interrelation avec la PTH. C'est un puissant agent de résorption et augmente le nombre et l'activité des ostéoclastes.

## ANNEXE II

# ANALYSES D'IMPLANTS METALLIQUES PAR SPECTROMETRIE D'EMISSION A ETINCELLES

## I. DISPOSITIF ET PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les mesures sont effectuées à l'aide du SPECTROLAB au laboratoire CASIMIR (Centre d'Appui et de Stimulation par les Moyens de l'Innovation et de la Recherche) à l'université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand. Nous amenons aux matériaux une énergie suffisamment forte pour volatiliser l'échantillon. Ceci est réalisé par impact d'étincelle sous argon avec une tension atteignant 15-30 kV. Une petite quantité d'échantillon est volatilisée sous forme d'aérosol. L'excitation est ensuite le résultat des collisions dans le plasma constitué d'argon ionisé.

Les prothèses à analyser peuvent être obtenues soit à partir de pièces anatomiques soit lors d'une reprise totale de hanche ou de genou en per-opératoire. Dans un premier temps, les implants sont nettoyés et désinfectés et par la suite ils peuvent être étudiés.

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons analysé 5 prothèses provenant de pièces anatomiques. Le premier implant analysé est la prothèse P42D. Il s'agit d'une prothèse en alliage de titane. Nous n'avons pas remarqué de réaction particulière lors du prélèvement.

La prothèse P7 est cimentée et vissée dans le fémur. Lors du prélèvement, nous avons remarqué que la cupule était en polyéthylène recouverte de titane. L'analyse de cette prothèse montre que la tige est en alliage de titane et la tête fémorale en inox.

Une des pièces anatomiques analysées possède deux prothèses, une sur chaque hanche. Au niveau du fémur droit P43D, nous avons constaté la présence de broche et d'un morceau de ciment dans lequel était fixée une vis. Ceci peut indiquer que la personne avait subi une reprise totale de prothèse de hanche. L'analyse de ces implants a montré que la prothèse était en alliage de Co-Cr et que les broches étaient en alliage de titane. Pour ce qui est de l'implant dans le fémur gauche P43G, il s'agit également d'une prothèse en alliage Co-Cr.

La prothèse P4 est une prothèse cimentée. Au niveau de la jonction entre l'os et le tissu, nous avons remarqué la présence de traces noires signifiant l'existence d'une contamination des tissus par les éléments métalliques. D'autre part, lors de l'extraction, nous avons observé un déplacement de la prothèse dans le fémur. Nous pouvons conclure en comparant les concentrations en éléments métalliques avec les normes des alliages métalliques utilisés en médecine que nous sommes en présence d'un alliage Cr-Ni-Fe (inox). Les concentrations en éléments métalliques de ces prothèses sont résumées dans le tableau 1.

	<b>Concentration %</b>					
	<b>P42D</b>	<b>P7</b> Tête fémorale	<b>P7</b> Tige fémorale	<b>P43G</b>	<b>P43D</b>	<b>P4</b>
<i>C</i>	0.0203	0.0181	0.024	0.275	0.0261	0.0211
<i>Si</i>	-	0.519	-	0.621	0.0659	0.651
<i>Mn</i>	0.0015	1.49	0.00179	0.204	0.0226	1.7
<i>P</i>	-	0.00891	-	-	0.001	0.0268
<i>S</i>	0.02	0.00349	0.0233	-	0.00593	0.0033
<i>Cr</i>	0.0267	<b>17.43</b>	0.0231	<b>28.91</b>	<b>20.63</b>	<b>17.23</b>
<i>Mo</i>	0.00891	<b>2.85</b>	0.0207	<b>5.51</b>	<b>9.38</b>	<b>2.69</b>
<i>Ni</i>	-	<b>14.91</b>	-	<b>1.79</b>	<b>31.85</b>	<b>12.61</b>
<i>Al</i>	<b>5.91</b>	0.00268	<b>6.09</b>	0.0285	0.088	0.0205
<i>Co</i>	-	0.0138	-	<b>62.16</b>	<b>36.76</b>	0.0421
<i>Cu</i>	0.005	0.0222	0.005	0.0121	0.00758	0.0512
<i>Nb</i>	-	0.0033	-	0.0101	0.0377	0.00438
<i>Ti</i>	<b>89.98</b>	0.00972	<b>89.57</b>	0.0703	0.583	0.00242
<i>V</i>	<b>3.73</b>	0.0361	<b>3.98</b>	0.000233	0.0588	0.0281
<i>Pb</i>	-	0.0005	-	-		0.00106
<i>Sn</i>	0.1	0.003707	0.1	-		0.00506
<i>As</i>	-	0.00415	-			0.0134
<i>B</i>	-	0.0001	-	0.0005	0.00268	0.00186
<i>Ta</i>				0.01	0.032	
<i>W</i>				0.0119	0.0277	
<i>Zr</i>	0.025	-	0.0015	-		
<i>Fe</i>	0.193	<b>62.58</b>	0.16	0.391	0.413	<b>64.89</b>

*Tableau 1: Composition des prothèses*

La connaissance de la composition de ces implants, va nous aider dans la recherche des éléments transférés aux tissus adjacents.

### ANNEXE III

#### GRILLE DES STANDARDS OXFORD INSTRUMENTS

<b>Forsterite</b>	<b>Oxyde</b>	<b>MMolaire</b>	<b>Elément</b>	<b>%wt</b>
d = 3,22-4,39  MMol = 140,69g/mol	SiO <sub>2</sub>	60.0843	Si	0.1999
	TiO <sub>2</sub>	79.8988	Ti	0.0001
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	101.96128	Al	
	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	151.9902	Cr	
	FeO	71.8464	Fe	0.0047
	MnO	70.9374	Mn	
	MgO	40.3044	Mg	0.3413
	CaO	56.0794	Ca	0.0001
	Na <sub>2</sub> O	61.97894	Na	
	K <sub>2</sub> O	94.196	K	0.0001
			<b>O</b>	0.4539
		Total	Total	1.0000
<b>Jadéite</b>	<b>Oxyde</b>	<b>MMolaire</b>	<b>Elément</b>	<b>%wt</b>
d = 3,25-3,35  MMol = 202,14g/mol	SiO <sub>2</sub>	60.0843	Si	0.278
	TiO <sub>2</sub>	79.8988	Ti	0.000
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	101.96128	Al	0.129
	FeO	71.8464	Fe	0.002
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	159.6922	Fe	
	MgO	40.3044	Mg	0.002
	CaO	56.0794	Ca	0.004
	Na <sub>2</sub> O	61.97894	Na	0.110
	K <sub>2</sub> O	94.196	K	0.000
				<b>O</b>
		Total		1.000
<b>Chromite</b>	<b>Oxyde</b>	<b>MMolaire</b>	<b>Elément</b>	<b>%wt</b>
d = 4,97  MMol = 223,84g/mol	TiO <sub>2</sub>	79.8988	Ti	<b>0.0057</b>
	MnO	70.9374	Mn	<b>0.0024</b>
	NiO	74.6994	Ni	<b>0.0019</b>
	ZnO	81.3794	Zn	<b>0.0011</b>
	MgO	40.3044	Mg	<b>0.0550</b>
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	101.96128	Al	<b>0.0856</b>
	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	151.9902	Cr	<b>0.3086</b>
	FeO	71.8464	Fe	0.1567
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	159.6922	Fe	0.0546
				<b>Fe total</b>
			<b>O</b>	<b>0.3284</b>
		Total		1.0000

<b>Apatite (fluoro-)</b>				
	<b>Oxyde</b>	<b>MMolaire</b>	<b>Elément</b>	<b>%wt</b>
	CaO	56.0794	Ca	0.3810
d = 3,1	P2O5	141.94452	P	0.1788
	SiO2	60.0843	Si	0.0042
MMol =	LaO	154.9049	La	0.0029
504,3g/mol	CeO	156.1194	Ce	0.0080
	PbO	223.1994	Pb	0.0004
			F	0.0355
			Cl	0.0002
			O	0.3890
				1.000
<b>Orthoclase</b>				
	<b>Oxyde</b>	<b>MMolaire</b>	<b>Elément</b>	<b>%wt</b>
	SiO2	60.0843	Si	0.3019
d = 2,56-2,63	Al2O3	101.96128	Al	0.1058
-2.6	Na2O	61.97894	Na	0.0276
	K2O	94.196	K	0.0951
	CaO	56.0794	Ca	0.0017
MMol = 278,33g/mol			O	0.4679
				1.0000
<b>CdSe</b>				
d = 5,81	Cd	analysé	58.96 %	
	Se	donc (?)	41.04 %	
MMol = 191,37g/mol				
<b>FeS</b>				
d = 4,74	Fe	analysé	59.59 %	
	S	analysé	40.34 %	
MMol = 87,91g/mol			99.93	
		théorie	63.53	
			36.47	
<b>TiO</b>				
d = 4,93	Ti	analysé	75.4 %	
	O	analysé	24 %	
MMol = 63,90g/mol			99.4	
		théorie	74.96	
			25.04	

<b>LiTaO3</b>		= théorie	
d = 4,74	Li	analysé	2.94
	Ta	analysé	76.71
	O	analysé	20.35
MMol = 471,77g/mol			
<b>NiO</b>		= théorie	
d = 6,67	Ni	analysé	78.58 %
	O	analysé	21.42 %
MMol = 74,70g/mol			
<b>SrTiO3</b>		= théorie	
d = 5,12	Sr	analysé	47.74 %
	Ti	analysé	26.1 %
	O	analysé	26.16 %
MMol = 183,52g/mol			

<b>Celsian</b>	Pas d'analyse fournie		<b>Gadolinium gallium garnet</b>	Pas d'analyse fournie	
d = 3,2-3,4	Ba	0.3658	d = 7,095	Gd	0.466
BaAl2Si2O8	Al	0.1437	Gd3Ga5O12	Ga	0.3443
MMol = 375,46g/mol	Si	0.1496	MMol = 1012,34g/mol	O	0.1897
	O	0.3409			

<b>PbTe</b>	Pas d'analyse fournie		<b>Nb2O5</b>	Pas d'analyse fournie	
d = 8,164	Pb	0.6189	d = 4,47	Nb	0.699
MMol = 334,8g/mol	Te	0.3811	MMol = 265,81g/mol	O	0.301

<b>B2O3</b>	= théorie		<b>SiO2</b>	?	
d = 2,46	B	0.3106	d = 2,65	Si	0.4674
MMol = 69,62g/mol	O	0.6894	MMol = 60,084g/mol	O	0.5326



## REFERENCES

- 1 Edouard JALLOT  
« Influence du dopage en zinc et manganèse sur la cinétique de résorption d'implant d'hydroxyapatite et étude des effets de matrice dans la méthode nucléaire PIXE utilisée. »  
Thèse, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand II), 1997, N°880
- 2 Cahiers d'enseignement de la sofcot n°50, 1-10  
56 rue Boissonade - 75014 PARIS
- 3 Hassane OUDADESSE  
« Etude des phénomènes physiques dans la transformation du corail implanté « in vivo » par des radioactivation nucléaire, par diffraction des rayons X et par spectrométrie infrarouge »  
Thèse, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand II), 1989
- 4 Thierry SAUVAGE  
« Etude par des méthodes nucléaires d'analyse des transformations physico-chimiques du corail implanté *in vivo* »  
Thèse, Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand II), 1992, N°406
- 5 DE GROOT  
« Hydroxylapatite as coating for implants »  
Interceram n°4, Netherland, 1987
- 6 J.R. van WAZER  
« Phosphorus and its compounds »  
New York, ed Intersciences, 1958, vol 1, p 530
- 7 E. KIENHOLZ, D.E. TURK, M.L. SUNDE, W.G. HOEKSTRA  
J. Nutr., 1961, Vol 15, p 211
- 8 J.F. ZAZO  
« Zinc : rôle, carences et aspects thérapeutiques »  
Med. & Hyg., 1993, Vol51, p 2304
- 9 « Société industrielle BIOLAND »  
'BIOCER'  
132 route d'Espagne, 31100 Toulouse
- 10 G.WEBER, G. ROBAYE, F. BRAYE, H.OUDADESSE, JL.IRIGARAY  
«PIXE study of the kinetics of biomaterials ossification »  
Nucl. Instr. and Meth, 1994, B89, p 200
- 11 NÀRAY – SZABO  
Z. kristallogr., 1930, 75, p 38
- 12 MEHMEL  
Z. kristallogr., 1930, 75, p 323
- 13 A.S. POSNER, A. PERLOFF, A.F. DIORIO  
« Refinement of the hydroxyapatite structure »  
Acta cryst, 1958 , 11, p 308
- 14 M.I. KAY, R.A. YOUNG, A.S. POSNER  
« Crystal structure of hydroxyapatite »  
Nature, December 1964, vol 204, p 1050

- 
- 15 JC. HEUGHEBAERT  
« Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques »  
Thèse, Université de Toulouse, 1977
- 16 L. STRAUSE, P. SALTMAN and J. GLOWACKI.  
« The effect of deficiencies of manganese and copper on osteoinduction and on resorption of bone particles in rats »  
Calcif Tissue Int, 1987, 41, p 140
- 17 P.P. MAHAPATRA, A.K. DASH and B. MISHRA  
« X ray, IR and magnetochemical studies on calcium manganese hydroxyapatite »  
J. Indian Chem Soc, 1990, vol 67, p 357
- 18 A. BIGI, E. FORESTI, M. GANDOLFI, M.GAZZANO, N. ROVERI  
« Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization »  
J. Inorg. Biochem., 1995, Vol 58, p 49
- 19 PERDIJON  
« L'analyse par activation neutronique »  
Paris, Masson & Cie, 1967
- 20 G. ERDTMANN, W. SOYKA  
« Die  $\gamma$  Linien des Radionuklide »  
Kernforschungsanlage Jülich (1973)
- 21 « Handbook on nuclear activation cross section »  
Technical report series n°156  
International Atomic Energy. Agency, Vienne (1974)
- 22 S. MELKI  
« Contribution à l'étude des possibilités d'analyse par activation au moyen des neutrons produits du cyclotron : Exemples d'application en archéologie, métallurgie et géologie »  
Thèse, Service du cyclotron CERI, Orléans, 1980
- 23 C. TASSY, J.M. MERMAT  
« Les applications analytiques des plasmas hautes fréquences »  
Technique et documentation, Lavoisier, 1983
- 24 F. CANTAREL, C. PIN  
« Major, Minor and rare earth element determinations in 25 rocks standards by ICP-Atomic Emission spectrometry »  
Geostandards Newsletter, 1994, Vol 18, p 123
- 25 F. ROUESSAC, A. ROUESSAC  
« Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes »  
Paris, Ed Masson, 1995
- 26 X. YANG, Z. WANG  
« Synthesis of biphasic ceramic of hydroxyapatite and  $\beta$ -TCP with controlled phase content and porosity »  
J. Mater. Chem., 1998, Vol 8(10), p 2233
- 27 Z.H. CHENG, A. YASUKAWA, K. KANDORI, T. ISHIKAWA  
« FTIR study on incorporation of CO<sub>2</sub> into calcium hydroxyapatite »  
J. Chem. Soc., Faraday Trans, 1998, Vol 94(10), p 1501

- 
- 28 I. REHMAN, W. BONFIELD  
«Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy»  
J. Mater. Science : Materials in medicine, 1997, Vol 8, p 1
- 29 D. RAOUX & al.  
« Effet Mossbauer et techniques complémentaires : L'EXAFS appliqué aux déterminations structurales de milieux désordonnés »  
Revue de Phys Appl, 1980, Vol 15, p 1079
- 30 B.K. TEO  
« Basic principles and data analysis »  
Berlin, Springer - Verlag, 1986
- 31 F.W. LYTLE, D.E. SAYERS, E.A STERN  
«Extended X ray absorption fine structure technique : experimental practice and selected results »  
Phys Rev B, 1975, Vol 11, p 4825
- 32 F.W. LYTLE, D.E. SAYERS, E.A STERN  
« Extended X ray absorption fine structure technique : Determination of physical parameter »  
Phys Rev B, 1975, Vol 11, p 4836
- 33 J.J. REHR, J. MUSTRE DE LEON, S.I. ZABINSKY, AND R.C. ALBERS  
« Theoretical X-ray Absorption Fine Structure Standards »  
J. Am. Chem. Soc., 1991, Vol 113, p 5135
- 34 <http://www.lure.u-psud.fr/Logicscient/LASE/lase.html>
- 35 E. CURIS, S. BENAZETH  
« propagation of statistical errors across EXAFS extraction and Fourier filtering »  
J. Syn. Rad, 2000, Vol 7, p 262
- 36 A.S. POSNER, A. PERLOFF, A. F. DIORO  
« Refinement of the hydroxyapatite structure »  
Acta Crys., 1958, Vol 11, p 308
- 37 DR. M. I. KAY, PR. R.A. YOUNG AND DR . A. S. POSNER  
« Crystal structure of Hydroxyapatite »  
Nature, December 1964, Vol 204, p 1050
- 38 M. WAKAMURA, K. KANDORI, T. ISHIKAWA  
« Surface composition of calcium hydroxyapatite modified with metal ions »  
Col & Surf A : Physiochemical and engineering aspects, 1998, Vol 142, p 107
- 39 A. BIGI, E. FORESTI, M. GANDOLFI, M.GAZZANO, N. ROVERI  
« Isomorphous substitutions in  $\beta$  tricalcium phosphate : the different effect of zinc and strontium »  
J. Inorg. Biochem., 1997, Vol 66, p 259
- 40 N. K. TRIPATHY, P. N. PATEL AND A. PANDA  
« Preparation, IR and lattice constant measurements of mixed (Ca+Cu+Zn) hydroxylapatites »  
J. Solid State Chem., 1989, Vol 80, p 1

- 
- 41 G. ENDEL AND Q. E. KLEE  
« Infrared spectra of hydroxyl ions in various apatites »  
J Solid State Chem., 1972, Vol 5, p 28
- 42 Ellis HORWOOD Ltd  
« Standards and criteria Comitee recommandations in "X ray Absorption Fine Structure"»  
Edited by S. Hasnain, 1991, p 751
- 43 I.GOTMAN  
« Characteristics of metal used as implants »  
J. endourol., 1997, Vol 11, p 6
- 44 H. OUDADESSE, J.L. IRIGARAY, V. BRUN, A. ZANI, S. TERVER, G. VANNEUVILLE  
« NAA applied to the study of metallic ion transfer induced by orthopaedic surgical tools or by metallic prostheses »  
J. Radioanal. & Chem., 2000, Vol 244, n°1, p 195
- 45 D. BENOIT & al.  
« Microanalyse par sonde électronique : spectrométrie de rayons X »  
Nucl. Instr. and Meth., 1987, Vol 158, p 321
- 46 F. FOLKMANN, C. GAARDE, T. HUUS, K. KEMP  
« Proton induced X ray emission as a tool for trace element analysis »  
Nucl. Instr. and Meth., 1974, Vol 116, p 487
- 47 K. ISHII & S. MORITA  
International Journal of PIXE 3, Continuous background in PIXE, (1990)
- 48 D.B. ISABELLE  
« The PIXE analytical technique : principle and applications »  
Radiat. Phys. Chem., 1994, Vol 44, n° 1/2, p 25
- 49 K. ISHII AND S. MORITA  
Phys Rev, 1984, A33, p 2278
- 50 J.J. MAXWELL, W.J. TEESDALE AND J.L. CAMPBELL  
« The guelph PIXE software package II»  
Nucl. Instr. and Meth., 1995, B95, p 407
- 51 F.H. SCHAMBER  
« X ray fluorescence of environmental samples »  
Ann Arbor Science Publ., ed T. G. Dzubay Michigan, 1977
- 52 P.R. BEVINGTON  
« Data reduction and error analysis for the physical sciences »  
New York , Mc Graw-Hill, 1969
- 53 J.A. MAXWELL, W.J. TEESDALE AND J.L. CAMPBELL  
« The guelph PIXE software package »  
Nucl Instr.and Meth., 1989, B43, p 218
- 54 J. L. CAMPBELL, D. HIGUCHI, J A. MAXWELL AND W.J.TEESDALE  
« Quantitative PIXE microanalysis of thick specimen »  
Nucl Instr.and Meth., 1993, B77, p 95

- 
- 55 J.L. CAMPBELL, W.J.J. TEESDALE AND J.X. WANG  
« Accuracy of thick target micro PIXE analysis »  
Nucl Instr. and Meth., 1989, B50, p 189
- 56 J.L. CAMPBELL & al.  
« PIXE microanalysis of thick specimens »  
Nucl. Instr. and Meth., 1993, B77, p 95
- 57 S. GAMA, M. VOLFINGER, C. RAMBOZ, O. ROUER  
« Accuracy of PIXE analysis using funny filter »  
Nucl. Instr. and Meth., 2001, B
- 58 Y. LLABADOR, Ph. MORETTO  
« Nuclear microprobe in life sciences : an efficient analytical technique for research in biology and medicine »  
World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore 912805, 1998
- 59 B.J KIRBY, G.J.F. LEGGE  
« Ion beam induced damage and element loss during a microanalysis of biological tissue »  
Nucl. Instr. Meth. Phys Res B., 1991, Vol 54B, p 98
- 60 M. CHOLEWA, G. BENCH, B.J. KIRBY, G.J.F. LEGGE  
« Changes in organic materials with scanning particle microbeams »  
Nucl. Instr. Meth. Phys Res B., 1991, Vol 54B, p 101
- 61 K. THEMMEER  
« Elemental losses from organic material caused by proton irradiation »  
Nucl. Instr. Meth. Phys Res B., 1991, Vol 54B, p 115
- 62 L. RAZAFINDRABE  
« Dosage des éléments de faible numéro atomique par microsonde nucléaire : application aux échanges ioniques cellulaires. »  
Thèse, Université Bordeaux 1, 1995, N°1345
- 63 Ph. MORETTO, L. Razafindrabe  
« Simulation of RBS spectra for quantitative mapping of inhomogeneous biological tissue »  
Nucl. Instr. Meth. Phys Res B., 1995, Vol 104B, p 171
- 64 D.E. GROOM & al.  
« Particle Data Group »  
Review of Particle Physics, European Physical Journal, 2000, C15, Vol 1, p 7
- 65 G.V. IYENGAR, W.E. KOLLMER, H.J.M. BOWER  
« The elemental composition of human tissues and body fluids »  
New York, 1978, Verlag chemie, Weinheim
- 66 J.J. JACOBS, J.L. GLIBERT, R.M. URBAN  
« Corrosion of metal orthopaedic implants »  
J. Bone & Joint Surg, 1998, Vol 80 A, n° 2, p 268
- 67 L. SAVARINO, D. GRANCHI, G. CIAPETTI & al.  
« Effects of metal ions on white blood cells of patients with failed total joint arthroplasties »  
J. Biomed. Mater. Res., 1999, Vol 47, p 543

- 
- 68 K. CHRISTIANSEN, K. HOLMES, P.J. ZILKO  
« metal sensitivity causing loosened joint prostheses »  
Annals. Rheum. Dis., 1979, Vol 38, p 476
- 69 R.B. TRACANA, JP. SOUSA, GS CARVALHO  
« Mouse inflammatory response to stainless steel corrosion products »  
J. Mater. Sc. : Mater. in Med., 1994, Vol 3, p 596
- 70 D.R. HAYNES, S.J BOYLE, S.D ROGERS, D.W.HOWIE, B. VERNON-ROBERT  
« Variation in cytokines induced by particles from differents prosthetic materials »  
Clin. Orthop. & Rel. Res., 1998, Vol 352, p 223
- 71 W. WANG & al.  
« Biomaterial particle phagocytosis by bone-resorbing osteoclasts »  
J. Bone & Joint Surg, 1997, Vol 79B, p 849
- 72 M.J. ALLEN, B.J. MYER, P.J. MILLETT, N. RUSHTON  
« The effects of particulate cobalt, chromium and coblat -chromium alloy on human osteoblast like cells in vitro »  
J. Bone & Joint Surg, 1997, Vol 79B, p, 475
- 73 A.S. SHANBHAG, J.J. JACOBS, J BLACK, J.O. GALANTE, T.T GLANT  
« Effects of particles on fibroblast »  
Clin. Orthop & Rel Res, 1997, Vol 342, p 205
- 74 T.K. LIU, S.H.LUI, C.H. CHANG, R.S YANG  
« Concentration of metal elements in the blood and urine in the patients with cementless total knee arthroplasty »  
Tohoku J. Exp. Med, 1998, Vol 185, p 253
- 75 H.C. LIU, W.H.S. CHANG, F.H. LIN, K.H. LU, Y.H. TWSUANG, J.S. SUN  
« Cytokine and Prostaglandin E2 release from leucocytes in response to metal ions derived from different prosthetic materials : an in vitro study »  
Art. Org., 1999, Vol 23, n° 7, p 1099
- 76 KOENIG  
Histochem. Cytochem, 1963, Vol 11, p 120
- 77 F. BETTS, T. WRIGHT, E.A. SALVATI, A. BOSKEY, M. BANSAL  
« Cobalt alloy metal debris in periarticular tissues from total hip revision arthroplasties »  
Clin. Orthp.& Rel. Res., 1992, Vol 276, p 75
- 78 F.F. HENNING, HJ . RAITHEL, K.H. SCHALLER, J.R. DÖHLER  
« Nickel chromium and cobalt concentrations in human tissue and body fluids of hip prosthesis patients »  
J. Trace El. Electr. Health Dis., 1992, Vol 6, p 239
- 79 H. SCHIELPHAKE, G. REISS, R. URBAN, F.W. NEUKAM, S. GUCKEL  
« Metal release from titanium fixtures firing placement in the mandible : an experimental study »  
Inter. J.Oral Maxillofacial Impl., 1993, Vol 8, p 502
- 80 W.W. BRIEN & al  
« Metal levels in cemented total hip arthroplasty »  
Clin. Orthop. & Rel Res., 1992, Vol 276, p 66

- 
- 81 I.R.MATTHEW, J.W. FRAME  
« Ultrastructural analysis of metal particles released from stainless steel and titanium miniplate components in an animal model »  
J. Oral Maxillofacial Surg., 1998, Vol 56, p 45
- 82 V.G. LANGKAMER & al.  
« Systemic distribution of wear debris after hip replacement »  
J. Bone & Joint Surg, 1992, Vol 74B, p 831
- 83 U.E. PAZZAGLIA, & al.  
« Metal ions in body fluids after arthroplasty »  
Acta Orthop. Scand., 1986, vol 57, 415
- 84 K. MERRITT, SA. BROWN  
« Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions »  
Clin. Orthop. & Rel Res., 1996, Vol 329-S, p S-233
- 85 C. SCHNABLE, U. HERPERS, R. MICHEL, F. LÖER, G. BUCHHORN, H.H WILLERT  
« Changes of concentrations of the elements Co, Cr, Sb and Sc in tissues of persons with joint implants »  
Biol. Trace Elem. Res, 1994 , Vol 43-45, p 389
- 86 V. GLEIZES, J. POUPON, J.Y. LAZENNEC, B. CHAMBERLIN, G. SAILLANT  
« Intérêt et limite du dosage du cobalt sérique chez les patients porteur d'une prothèse à couple métal-métal »  
Revue de Chirurgie Orthopédique, 1999, Vol 85, p 217
- 87 J.J JACOBS & al.  
« Metal release in patient who have had a primary total hip arthroplasty »  
J. Bone & Joint Surg, 1998, Vol 80A,n° 10, p 1447
- 88 E. BRAUN, D. SCHMITT, F. ?NABET, B. LEGRAS, H. COUDANE, D. MOLE  
« Concentration urinaire du cobalt et du chrome chez les patients porteurs d'une prothèse totale de hanche non cimentée »  
International Orthopaedics, 1986, Vol 10, p 277
- 89 G.C. MCKAY, R. MACNAIR, C. MACDONALD, MH. GRANT  
« Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line »  
Biomaterials, 1996 , Vol 17, p 1339
- 90 B.F. SHAGALDI, F.W. HEATLEY, A. DEWAR, B. CORRIN  
« In vivo corrosion of cobalt chromium alloy and titanium wear particles. »  
J. Bone & Joint Surg., 1995, Vol 77B, p 962