



N° d'ordre NNT : 2019LYSEI060

## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de  
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Ecole Doctorale N° ED 34  
Matériaux

Spécialité : Science des Matériaux

Soutenue publiquement le 30/07/2019, par :

**Amandine Impergre**

---

# Interactions entre CoCrMo et milieu cellulaire : de la corrosion à la tribocorrosion

---

Devant le jury composé de :

René, SABOT	Professeur – Université de La Rochelle	Rapporteur
Jean, GERINGER	Enseignant chercheur – Mines Saint Etienne	Rapporteur
Pierre, PONTIAUX	Professeur – CentraleSupélec	Président du jury
Laurent, GREMILLARD	Professeur – INSA de Lyon	Examineur
Bernard, NORMAND	Professeur – INSA de Lyon	Directeur de thèse
Christelle, DER-LOUGHIAN	Maître de Conférence - INSA de Lyon	Encadrant



## Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2016-2020

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
<b>CHIMIE</b>	<p><b><u>CHIMIE DE LYON</u></b>  <a href="http://www.edchimie-lyon.fr">http://www.edchimie-lyon.fr</a>                      Sec. : Renée EL MELHEM                      Bât. Blaise PASCAL, 3e étage  <a href="mailto:secretariat@edchimie-lyon.fr">secretariat@edchimie-lyon.fr</a>                      INSA : R. GOURDON</p>	<p><b>M. Stéphane DANIELE</b>                      Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon                      IRCELYON-UMR 5256                      Équipe CDFA                      2 Avenue Albert EINSTEIN                      69 626 Villeurbanne CEDEX  <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a></p>
<b>E.E.A.</b>	<p><b><u>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u></b>  <a href="http://edeea.ec-lyon.fr">http://edeea.ec-lyon.fr</a>                      Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN  <a href="mailto:ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr">ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Gérard SCORLETTI</b>                      École Centrale de Lyon                      36 Avenue Guy DE COLLONGUE                      69 134 Écully                      Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17  <a href="mailto:gerard.scorletti@ec-lyon.fr">gerard.scorletti@ec-lyon.fr</a></p>
<b>E2M2</b>	<p><b><u>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</u></b>  <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a>                      Sec. : Sylvie ROBERJOT                      Bât. Atrium, UCB Lyon 1                      Tél : 04.72.44.83.62                      INSA : H. CHARLES  <a href="mailto:secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr">secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr</a></p>	<p><b>M. Philippe NORMAND</b>                      UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne                      Université Claude Bernard Lyon 1                      Bâtiment Mendel                      43, boulevard du 11 Novembre 1918                      69 622 Villeurbanne CEDEX  <a href="mailto:philippe.normand@univ-lyon1.fr">philippe.normand@univ-lyon1.fr</a></p>
<b>EDISS</b>	<p><b><u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</u></b>  <a href="http://www.ediss-lyon.fr">http://www.ediss-lyon.fr</a>                      Sec. : Sylvie ROBERJOT                      Bât. Atrium, UCB Lyon 1                      Tél : 04.72.44.83.62                      INSA : M. LAGARDE  <a href="mailto:secretariat.ediss@univ-lyon1.fr">secretariat.ediss@univ-lyon1.fr</a></p>	<p><b>Mme Emmanuelle CANET-SOULAS</b>                      INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1                      Bâtiment IMBL                      11 Avenue Jean CAPELLE INSA de Lyon                      69 621 Villeurbanne                      Tél : 04.72.68.49.09 Fax : 04.72.68.49.16  <a href="mailto:emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr">emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr</a></p>
<b>INFOMATHS</b>	<p><b><u>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</u></b>  <a href="http://edinfomaths.universite-lyon.fr">http://edinfomaths.universite-lyon.fr</a>                      Sec. : Renée EL MELHEM                      Bât. Blaise PASCAL, 3e étage                      Tél : 04.72.43.80.46  <a href="mailto:infomaths@univ-lyon1.fr">infomaths@univ-lyon1.fr</a></p>	<p><b>M. Luca ZAMBONI</b>                      Bât. Braconnier                      43 Boulevard du 11 novembre 1918                      69 622 Villeurbanne CEDEX                      Tél : 04.26.23.45.52  <a href="mailto:zamboni@maths.univ-lyon1.fr">zamboni@maths.univ-lyon1.fr</a></p>
<b>Matériaux</b>	<p><b><u>MATÉRIAUX DE LYON</u></b>  <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a>                      Sec. : Stéphanie CAUVIN                      Tél : 04.72.43.71.70                      Bât. Direction  <a href="mailto:ed.materiaux@insa-lyon.fr">ed.materiaux@insa-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Jean-Yves BUFFIÈRE</b>                      INSA de Lyon                      MATEIS - Bât. Saint-Exupéry                      7 Avenue Jean CAPELLE                      69 621 Villeurbanne CEDEX                      Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28  <a href="mailto:jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr">jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr</a></p>
<b>MEGA</b>	<p><b><u>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u></b>  <a href="http://edmega.universite-lyon.fr">http://edmega.universite-lyon.fr</a>                      Sec. : Stéphanie CAUVIN                      Tél : 04.72.43.71.70                      Bât. Direction  <a href="mailto:mega@insa-lyon.fr">mega@insa-lyon.fr</a></p>	<p><b>M. Jocelyn BONJOUR</b>                      INSA de Lyon                      Laboratoire CETHIL                      Bâtiment Sadi-Carnot                      9, rue de la Physique                      69 621 Villeurbanne CEDEX  <a href="mailto:jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr">jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr</a></p>
<b>ScSo</b>	<p><b><u>ScSo*</u></b>  <a href="http://ed483.univ-lyon2.fr">http://ed483.univ-lyon2.fr</a>                      Sec. : Véronique GUICHARD                      INSA : J.Y. TOUSSAINT                      Tél : 04.78.69.72.76  <a href="mailto:veronique.cervantes@univ-lyon2.fr">veronique.cervantes@univ-lyon2.fr</a></p>	<p><b>M. Christian MONTES</b>                      Université Lyon 2                      86 Rue Pasteur                      69 365 Lyon CEDEX 07  <a href="mailto:christian.montes@univ-lyon2.fr">christian.montes@univ-lyon2.fr</a></p>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie





*« Dans le domaine des idées, tout dépend de l'enthousiasme. Dans le monde réel, tout repose sur la  
persévérance. »*

Johann WOLFGANG VON GOETHE

*« Entre  
Ce que je pense  
Ce que je veux dire  
Ce que je crois dire  
Ce que je dis  
Ce que vous avez envie d'entendre  
Ce que vous croyez entendre  
Ce que vous entendez  
Ce que vous avez envie de comprendre  
Ce que vous croyez comprendre  
Ce que vous comprenez  
Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.  
Mais essayons quand même... »*

Bernard WERBER



# RESUME

La durabilité à long terme des prothèses articulaires repose sur leur résistance vis-à-vis de la corrosion et leur comportement à l'usure. Quels que soient les matériaux utilisés, des produits de dégradation (ions métalliques et débris d'usure) se forment, du fait de la corrosivité des fluides corporels et de la biomécanique des articulations. Généralement, ces produits sont associés aux complications post-opératoires et en conséquence, leurs effets constituent des préoccupations cliniques critiques. A cet égard, la tribocorrosion est une considération sérieuse dans la performance des prothèses articulaires.

Ce travail vise à contribuer à l'amélioration de la compréhension des mécanismes de dégradation d'un alliage de CoCrMo, utilisé en tant que prothèse articulaire, en appréhendant le couplage de charges mécaniques et l'activité cellulaire. Cette thèse a été entreprise selon une approche itérative, qui débute par l'étude du comportement électrochimique du milieu physiologique simulé, propice à la culture cellulaire (le RPMI-1640). L'alliage métallique et les cellules ont successivement été ajoutés au système d'étude. Les essais ont révélé que l'oxydation du CoCrMo est accélérée en présence d'espèces carbonées et de composés organiques, et que les cellules interviennent sur la libération d'ions métalliques. Un dispositif de biotribocorrosion a été développé dans le but d'évaluer l'influence des produits de dégradation sur le métabolisme cellulaire. Cette étude multidisciplinaire exhaustive a combiné des techniques expérimentales d'électrochimie, de biologie et de tribologie, afin de souligner l'importance de la chimie de surface du biomatériau sur sa résistance à la tribocorrosion et son caractère cytotoxique.

Finalement, une méthodologie expérimentale a été proposée dans ce travail, en vue de mieux comprendre l'interaction entre les fluides physiologiques simulés et les biomatériaux.



# ABSTRACT

The long-term durability of joint replacements is based on their corrosion resistance and wear behavior. Whatever the materials used, degradation products (metal ions and wear debris) are formed due to the aggressiveness of body fluids and the biomechanics of the joints. Generally, these products are associated with post-operative complications and, as a result, their effects are critical clinical concerns. In this respect, tribocorrosion is a serious consideration in the performance of joint replacements.

This work aims to contribute to the improvement of the understanding of the degradation mechanisms of a CoCrMo alloy, used as a joint prosthesis, by understanding the coupling of mechanical loads and cellular activity. This thesis has been structured according to a progressive approach, which begins with the study of the electrochemical behavior of a simulated physiological environment conducive to cell culture (RPMI-1640). Metal alloys and cells were successively added to the study system. The tests revealed that the oxidation of CoCrMo is accelerated in the presence of carbonaceous species and organic compounds, and that the cells are involved in the release of metal ions. A biotribocorrosion device has been developed to evaluate the influence of degradation products on cellular metabolism. This comprehensive multidisciplinary study combined experimental techniques from electrochemistry, biology and tribology to highlight the importance of biomaterial surface chemistry on tribocorrosion resistance and cytotoxicity.

Finally, an experimental methodology was proposed in this work, in order to better understand the interaction between simulated physiological fluids and biomaterials.



# TABLE DES MATIERES

Liste des écoles doctorales .....	iii
Résumé - Abstract.....	vii
Table des matières .....	xi
Glossaire .....	xvii
Remerciements .....	xxi

## INTRODUCTION

---

1. Contexte .....	1
2. Enjeux.....	1
3. Objectifs .....	2
4. Synopsis du manuscrit de thèse .....	3

## CHAPITRE I : LES IMPLANTS ORTHOPEDIQUES

---

<b>I. 1 Les biomatériaux métalliques en médecine orthopédique.....</b>	<b>6</b>
I. 1.1 Les métaux.....	6
I. 1.1.a Les aciers inoxydables .....	6
I. 1.1.b Le titane et ses alliages.....	6
I. 1.1.c Les alliages à base de cobalt .....	6
I. 1.1.d Les autres métaux.....	7
I. 1.2 Propriétés des biomatériaux métalliques.....	7
I. 1.2.a Propriétés mécaniques.....	7
I. 1.2.b Biocompatibilité.....	8
I. 1.2.c Résistance à la corrosion.....	8
<b>I. 2 Traitement chirurgical de la cheville.....</b>	<b>8</b>
I. 2.1 La biomécanique de l'articulation de la cheville.....	9
I. 2.2 Analyse de marché des prothèses de cheville.....	9
I. 2.3 Les modèles de prothèses de cheville .....	10
<b>I. 3 Les complications de l'arthroplastie de la cheville .....</b>	<b>11</b>
I. 3.1 Réaction aseptique : face aux corps étrangers .....	11
I. 3.1.a Produit de dégradation de nature métallique.....	12
I. 3.1.b Usure de l'insert de polyéthylène.....	12
I. 3.2 Formation de kystes osseux et ostéolyse .....	12
I. 3.3 Le descellement aseptique .....	13
<b>I. 4 Résumé de l'analyse bibliographique.....</b>	<b>13</b>

## CHAPITRE II : METHODES EXPERIMENTALES

---

<b>II. 1 Les matériaux</b> .....	<b>17</b>
II. 1.1 Le platine : Pt .....	17
II. 1.2 L'alliage de Cobalt : CoCrMo .....	17
II. 1.3 Le polyéthylène à très haute masse moléculaire : l'UHMWPE .....	19
<b>II. 2 Les fluides physiologiques simulés</b> .....	<b>20</b>
II. 2.1 Les milieux de culture cellulaire.....	20
II. 2.2 Les solutions inorganiques .....	21
<b>II. 3 Les lignées cellulaires</b> .....	<b>21</b>
II. 3.1 Les ostéoblastes.....	21
II. 3.2 Les macrophages .....	22
<b>II. 4 Dispositifs dédiés aux mesures électrochimiques</b> .....	<b>23</b>
II. 4.1 Le montage expérimental .....	23
II. 4.2 Les techniques électrochimiques .....	24
II. 4.2.a Suivi de l'évolution du potentiel en circuit ouvert ( $E_{OCP}$ ) .....	24
II. 4.2.b Suivi de la densité de courant à un potentiel donné (potentiostatique) .....	25
II. 4.2.c Courbe de polarisation potentiodynamique .....	25
II. 4.2.d La voltampérométrie cyclique.....	25
II. 4.2.e La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	26
II. 4.3 Synthèse des conditions opératoires pour les mesures électrochimiques .....	31
<b>II. 5 Techniques de caractérisation des matériaux</b> .....	<b>33</b>
II. 5.1 Observation de surface par microscopie électronique à balayage (MEB).....	33
II. 5.2 Analyse de la composition de surface par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) .....	33
II. 5.3 Synthèse des techniques expérimentales utilisées .....	35
<b>II. 6 Techniques de caractérisation des cellules</b> .....	<b>35</b>
II. 6.1 Observation de la morphologie des cellules.....	35
II. 6.2 Etude de la viabilité/prolifération et de la cytotoxicité.....	36
II. 6.2.a Test de viabilité/prolifération par le réactif PrestoBlue™ .....	36
II. 6.2.b Test de viabilité par le sel de tétrazolium (MTT).....	37
II. 6.2.c Test de cytotoxicité par la lactate déshydrogénase (LDH).....	38
II. 6.3 Etude de la minéralisation des ostéoblastes .....	39
II. 6.3.a Coloration des dépôts calciques au rouge d'alizarine .....	39
II. 6.3.b Activité de la phosphatase alcaline (ALP) .....	39
<b>II. 7 Conclusion</b> .....	<b>40</b>

## CHAPITRE III : ETUDE DU MILIEU DE CULTURE BIOLOGIQUE RPMI-1640

---

<b>III. 1 Introduction</b> .....	<b>43</b>
<b>III. 2 Notions bibliographiques sur les milieux de culture cellulaire</b> .....	<b>44</b>
III. 2.1 Définition.....	44
III. 2.2 Composition chimique .....	44
III. 2.3 Eléments de base d'un milieu de culture cellulaire .....	44
III. 2.3.a Les acides aminés, les protéines et les vitamines .....	44
III. 2.3.b Les sels minéraux et les oligo-éléments .....	45
III. 2.3.c Les éléments énergétiques : le glucose .....	46
III. 2.4 Eléments additionnés au milieu de culture cellulaire .....	46



III. 2.4.a	Les antibiotiques.....	46
III. 2.4.b	Le sérum.....	47
III. 2.4.c	Le système tampon.....	47
III. 2.5	Influence de la composition chimique des milieux physiologiques simulés sur la réactivité des biomatériaux métalliques.....	49
III. 2.6	Synthèse générale.....	50
<b>III. 3</b>	<b>Evaluation biologique du RPMI-1640 par suivi de la viabilité cellulaire.....</b>	<b>51</b>
III. 3.1	Sélection du milieu de croissance approprié pour la culture <i>in vitro</i> .....	51
III. 3.2	Amélioration du protocole expérimental de viabilité Prestoblue™ par corrélation entre l'absorbance et le nombre de cellules.....	53
III. 3.3	Viabilité/prolifération à long terme des cellules dans le RPMI-1640 supplémenté.....	55
III. 3.4	Evaluation du caractère cytotoxique du PrestoBlue™.....	55
III. 3.5	Synthèse de l'évaluation du RPMI-1640 en tant que milieu de croissance.....	57
<b>III. 4</b>	<b>Réactivité électrochimique du RPMI-1640.....</b>	<b>57</b>
III. 4.1	Conditions potentiodynamiques.....	57
III. 4.2	Conditions potentiostatiques.....	59
III. 4.3	Identification des espèces organiques électroactives.....	64
III. 4.3.a	Le rouge de phénol et la glutamine.....	64
III. 4.3.b	Analyse de surface de l'électrode de platine polarisée.....	65
<b>III. 5</b>	<b>Variables de la réactivité électrochimique du RPMI-1640.....</b>	<b>70</b>
III. 5.1	Influence du sérum de veau fœtal SVF.....	70
III. 5.2	Contribution du dioxyde de carbone.....	72
III. 5.2.a	Conditions potentiodynamiques.....	73
III. 5.2.b	Conditions potentiostatiques.....	74
<b>III. 6</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>76</b>

## CHAPITRE IV : REACTIVITE DE L'ALLIAGE DE CoCrMo EN CONDITION DE CULTURE CELLULAIRE

<b>IV. 1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>80</b>
<b>IV. 2</b>	<b>Notions bibliographiques sur la corrosion des biomatériaux métalliques.....</b>	<b>80</b>
IV. 2.1	L'interface métal/liquide.....	80
IV. 2.2	Corrosion des biomatériaux métalliques.....	81
IV. 2.3	La passivation des biomatériaux métalliques.....	82
IV. 2.4	Mécanismes de formation du film passif.....	83
IV. 2.5	Caractéristiques du film passif des alliages de CoCrMo.....	84
IV. 2.6	Adsorption des protéines.....	85
IV. 2.7	Effet du tampon carbonate/bicarbonate.....	88
IV. 2.8	Synthèse générale.....	89
<b>IV. 3</b>	<b>Réactivité électrochimique du CoCrMo en conditions de culture cellulaire.....</b>	<b>89</b>
IV. 3.1	Domaines de potentiels du CoCrMo en RPMI-1640.....	89
IV. 3.2	Conditions potentiostatiques.....	92
IV. 3.3	Composition chimique de surface.....	97
IV. 3.3.a	Les composés inorganiques : Na <sub>1s</sub> , Cl <sub>2p</sub> , Ca <sub>2p3/2</sub> et P <sub>2p</sub> .....	98
IV. 3.3.b	Les composés organiques : N <sub>1s</sub> , O <sub>1s</sub> et C <sub>1s</sub> .....	99
IV. 3.3.c	Les oxydes métalliques : Pics haute résolution Co <sub>2p3/2</sub> , Cr <sub>2p3/2</sub> et Mo <sub>3d5/2</sub> .....	102
IV. 3.4	Discussion.....	106

<b>IV. 4 Rôle des espèces organiques.....</b>	<b>107</b>
IV. 4.1 Evolution de l'E <sub>OCP</sub> du CoCrMo.....	107
IV. 4.2 Essais potentiostatiques .....	108
IV. 4.2.a Comparaison entre RPMI-1640 et DPBS.....	109
IV. 4.2.b Le sérum de veau foetal (SVF).....	111
<b>IV. 5 Contribution de la teneur de dioxyde de carbone dans l'atmosphère .....</b>	<b>112</b>
IV. 5.1 Condition dynamique.....	112
IV. 5.2 Condition potentiostatique.....	114
IV. 5.3 Conclusion sur la contribution du dioxyde de carbone sur le CoCrMo.....	115
<b>IV. 6 Conclusion .....</b>	<b>116</b>

## CHAPITRE V : INTERACTION DE L'ALLIAGE CoCrMo AVEC LES OSTEOBLASTES ET LES MACROPHAGES

---

<b>V. 1 Introduction .....</b>	<b>121</b>
<b>V. 2 Notions bibliographiques sur la réaction de l'hôte vis-à-vis des biomatériaux métalliques.....</b>	<b>121</b>
V. 2.1 La cellule, premier système d'échange avec le milieu environnant.....	122
V. 2.2 Les cellules osseuses .....	122
V. 2.2.a Les cellules ostéoblastiques.....	122
V. 2.2.b La lignée monocytes-macrophages-ostéoclastes.....	123
V. 2.3 Réponse de l'hôte face aux biomatériaux.....	124
V. 2.3.a Réponse aux corps étrangers.....	124
V. 2.3.b Toxicité des ions métalliques .....	124
V. 2.4 Potentiel/courant induit à la surface de l'implant métallique .....	126
V. 2.4.a Stimulation électrochimique de l'activité cellulaire .....	126
V. 2.4.b Stimulation électrochimique de la matrice osseuse.....	126
V. 2.5 Méthodes de suivi <i>in vitro</i> de l'activité cellulaire exposé aux ions métalliques .....	127
V. 2.5.a La culture des cellules.....	127
V. 2.5.b Les méthodes de production d'ions métalliques.....	128
V. 2.6 Synthèse bibliographique.....	128
<b>V. 3 Interface CoCrMo/cellules à l'état d'équilibre.....</b>	<b>128</b>
V. 3.1 Propriétés électrochimiques de l'interface CoCrMo/cellules en immersion longue..	128
V. 3.1.a Evolution du potentiel E <sub>OCP</sub> .....	128
V. 3.1.b Mesure de SIE à l'E <sub>OCP</sub> .....	129
V. 3.2 Analyses de biocompatibilité des ostéoblastes et macrophages.....	133
V. 3.2.a Effet de l'exposition du CoCrMo sur la viabilité et la prolifération des ostéoblastes et des macrophages .....	133
V. 3.2.b Effet de l'exposition du CoCrMo sur les fonctions de minéralisation des ostéoblastes	134
V. 3.3 Discussion.....	136
<b>V. 4 Caractérisation potentiodynamique de l'interface CoCrMo/cellules .....</b>	<b>137</b>
V. 4.1 Courbes de polarisation du CoCrMo en présence de cellules .....	137
V. 4.2 Influence de la polarisation dynamique du CoCrMo sur la morphologie des cellules	139
V. 4.2.a Suivi par microscopie optique.....	139
V. 4.2.b Observations par microscopie électronique à balayage MEB.....	141
V. 4.2.c Evaluation du pH intracellulaire par microscopie à fluorescence .....	142

V. 4.3	Discussion.....	143
<b>V. 5</b>	<b>Contrôle électrochimique de l'interface CoCrMo/cellules : cytotoxicité induite par l'oxydation métallique.....</b>	<b>144</b>
V. 5.1	Dissolution ionique contrôlée du CoCrMo .....	145
V. 5.2	Taux de libération d'ions .....	145
V. 5.3	Effet de la dissolution ionique du CoCrMo sur la viabilité et morphologie cellulaire 147	
V. 5.3.a	Quantification de la viabilité cellulaire .....	147
V. 5.3.b	Morphologie des cellules.....	148
V. 5.4	Discussion.....	149
V. 5.4.a	Effet de la libération d'ions métalliques CoCrMo.....	149
V. 5.4.b	Influence des ions métalliques .....	150
V. 5.4.c	Limites .....	152
<b>V. 6</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>153</b>

## CHAPITRE VI : PROPOSITION D'UN DISPOSITIF POUR L'ETUDE DE LA BIOTRIBOCORROSION

---

<b>VI. 1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>156</b>
<b>VI. 2</b>	<b>Notions bibliographiques sur la tribocorrosion des prothèses articulaires .....</b>	<b>156</b>
VI. 2.1	La tribologie.....	156
VI. 2.1.a	Le frottement .....	156
VI. 2.1.b	L'usure .....	156
VI. 2.2	La tribocorrosion des métaux passivables.....	158
VI. 2.3	Les systèmes expérimentaux pour l'étude de la tribocorrosion.....	159
VI. 2.4	Limites et défis pratiques des dispositifs de biotribocorrosion.....	160
VI. 2.5	Synthèse .....	162
<b>VI. 3</b>	<b>Développement d'un dispositif pour l'étude de la biotribocorrosion.....</b>	<b>163</b>
VI. 3.1	Origine et motivation .....	163
VI. 3.2	Cahier des charges de l'appareil de biotribocorrosion.....	163
VI. 3.3	Le dispositif expérimental .....	163
VI. 3.3.a	Le système mécanique : le tribomètre .....	164
VI. 3.3.b	La mesure électrochimique : le montage à trois électrodes .....	165
VI. 3.3.c	Observation <i>in situ</i> des cellules vivantes .....	166
VI. 3.4	Les conditions environnementales.....	166
VI. 3.5	Utilisation du microscope à fluorescence dans l'analyse des particules d'usure.....	166
VI. 3.6	Synthèse des fonctionnalités du dispositif de biotribocorrosion.....	167
<b>VI. 4</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>167</b>

### PREMIERS ESSAIS SUR LE DISPOSITIF DE BIOTRIBOCORROSION : ILLUSTRATION D'UN CONTACT CoCrMo/POLYETHYLENE

168

---

- I. Conditions expérimentales
- II. Résultats
  - II.1. La réactivité électrochimique du CoCrMo
  - II.2. Libération d'ions métalliques

II.3. Les mécanismes d'usure	
II.4. Le taux d'usure du pion UHMWPE	
II.5. Analyses de surface	
II.6. Analyse biologique des macrophages	
III. Proposition d'interprétation et discussion	
III.1. Génération d'ions métalliques	
III.2. Production de débris d'usure de polyéthylène	
III.3. Cytotoxicité des produits de dégradation	
III.4. Impact biologique des ions et des débris d'usure	
IV. Limites de l'étude	
V. Conclusion	

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

185

---

Annexes .....	189
Références bibliographiques .....	cxcvii

# GLOSSAIRE

## ● ACRONYMES

<i>ICP-MS</i>	« Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry » ; Spectroscopie de masse à plasma induit par couplage inductif
<i>IRTF</i>	Infra-Rouge à Transformée de Fourier
<i>MEB</i>	Microscopie électronique à balayage
<i>EDX</i>	« Energy Dispersive X-Ray » ; Analyse par dispersion d'énergie des rayons X
<i>UHMWPE</i>	« Ultra High Molecular Weight Polyethylene », polyéthylène de très haut poids moléculaire
<i>XPS</i>	« X-Ray Photoelectron Spectroscopy » ; Spectroscopie de photoélectrons X

## ● NOTATION DES VARIABLES ELECTROCHIMIQUES

$\alpha$	Paramètre du CPE, comparable à un exposant
$C$	Capacité ( $\mu\text{F.cm}^{-2}$ )
$C_{ad}$	Capacité de la couche organique adsorbée ( $\mu\text{F.cm}^{-2}$ )
$C_{dc}$	Capacité de la double couche électrique ( $\mu\text{F.cm}^{-2}$ )
$CE$	« Counter electrode », contre électrode
$CEE$	Circuit électrique équivalent
$C_{eff}$	Capacité effective associée aux paramètres du CPE ( $\mu\text{F.cm}^{-2}$ )
$C_{ox}$	Capacité de l'oxyde ( $\mu\text{F.cm}^{-2}$ )
$CPE$	« Constant Phase Element » ; Élément de phase constante
$\Delta E$	Différence de potentiel entre deux électrodes (mV)
$d_{eff}$	Épaisseur effective de la couche d'interface (nm)
$\Delta I$	Différence de courant entre deux bornes (A)
$E$	Module d'Young (GPa)
$E_{Ox/Red}$	Potentiel de Nernst du couple Ox/Red (mV/ECS)
$E^\circ$	Potentiel standard (mV)
$\epsilon_0$	Permittivité du vide ( $\text{F.m}^{-1}$ )
$ECS$	Électrode au calomel saturé en chlorure de potassium (KCl)
$\epsilon_h$	Constante diélectrique de l'eau (sans unité)
$E_{OCP}$	Potentiel en circuit ouvert (mV/ECS)
$\epsilon_{ox}$	Permittivité de l'oxyde ( $\text{F.m}^{-1}$ )
$F$	Constante de Faraday ( $\text{C.mol}^{-1}$ )
$f$	Fréquence (Hz)
$I$	Courant (mA ou $\mu\text{A}$ )
$j$	Densité de courant ( $\mu\text{A.cm}^{-2}$ )
$L$	Inductance (H)
$M$	Masse molaire ( $\text{g.mol}^{-1}$ )
$n_i$	Valence d'oxydation (sans unité)

$\phi$	Phase ou Déphasage (sans unité)
$Q_{CPE}$	Paramètre du CPE, comparable à une capacité ( $\mu\text{F}\cdot\text{s}^{\alpha-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
$Q_{eff}$	Capacité de charge effective ( $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
$\rho$	Masse volumique ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )
$R_2$	Résistance de transfert de charges ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )
$RC$	Capacité et résistance en parallèle
$R_e$	Résistance de l'électrolyte ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )
$ROS$	« Reactive Oxygen Species » ; Espèces réactives de l'oxygène
$R_t$	Résistance de transfert de charges ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )
$SIE$	Spectroscopie d'Impédance Electrochimique
$t$	Temps de l'essai (h)
$T$	Température ( $^{\circ}\text{C}$ ou K)
$V$	Volume de solution (mL)
$\omega$	Pulsation ( $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ )
$W$	Warburg : élément caractéristique de la diffusion
$WE$	« Working electrode », Electrode de travail
$Z$	Impédance électrochimique (sans unité)
$z$	Nombre de charges (sans unité)
$ Z $	Module d'impédance ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )
$Z_{CPE}$	Impédance de l'élément de phase constante (sans unité)
$Z_{im}$ ou $Im Z$	Partie imaginaire de l'impédance électrochimique ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )
$ZRA$	« Zero Resistance Ammeter » ; Ampèremètre à résistance nulle
$Z_{re}$ ou $Re Z$	Partie réelle de l'impédance électrochimique ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )

- NOTATION DES VARIABLES MECANIQUES

$COF$	Coefficient de frottement (sans unité)
$D_x$	Déplacement horizontal (mm)
$D_z$	Déplacement vertical (mm)
$ECD$	« Equivalent Circular Diameter » ; Diamètre du cercle équivalent ( $\mu\text{m}$ )
$ESR$	« Equivalent Shape Ratio » ; Rapport de forme équivalent (sans unité)
$F$	Force/charge appliquée (N)
$RCC$	Séquence de Relaxation des Contraintes de Compression durant les essais de biotribocorrosion
$Rh$	Séquence de Rhéologie durant les essais de biotribocorrosion
$SiC$	Carbure de silicium
$TTS$	Transformation Tribologique de Surface

- NOTATION DES VARIABLES BIOLOGIQUES

$Abs$	Valeur d'absorbance (sans unité)
$AGE$	« Advanced Glycation Endproducts » ; Produits avancés de glycation

<i>ALP</i>	« Alkaline Phosphatase » ; Phosphatase alcaline ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
<i>AMEM</i>	« Alpha Minimum Essential Medium » ; milieu de culture cellulaire
<i>ATB</i>	Antibiotiques
<i>ATP</i>	Adénosine-Triphosphate
<i>DMEM/F12</i>	« Dulbecco's modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 » ; milieu de culture cellulaire
<i>DPBS</i>	« Dulbecco's Phosphate Buffered Solution » ; solution de tampon phosphate de Dulbecco
<i>EDTA</i>	Éthylènediaminetétraacétique
<i>ELISA</i>	« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » ; Dosage immuno-enzymatique
<i>hFOB 1.19</i>	Lignée ostéoblastique d'ostéoblastes humains
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Interleukine 1 bêta
<i>IL-6</i>	Interleukine 6
<i>IL-8</i>	Interleukine 8
$\lambda_{em}$	Longueur d'onde d'émission (nm)
$\lambda_{ex}$	Longueur d'onde d'excitation (nm)
<i>LDH</i>	Lactate déshydrogénase
<i>MCP-1</i>	« Monocyte Chemoattractant Protein 1 » ; Protéine chimioattractante des monocytes
<i>M-CSF</i>	« Monocyte Colony-Stimulating Factor » ; Facteur de stimulation des colonies de monocytes
<i>MEC</i>	Matrice extracellulaire
<i>MTT</i>	Sel de tétrazolium, bromure de 3--2, 5-diphényl-2H-tétrazolium
<i>NADH</i>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
<i>NADPH</i>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
<i>PGE<sub>2</sub></i>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
<i>PTH</i>	Parathormone
<i>RANK</i>	« Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B » ; Récepteur pour l'activation du facteur nucléaire kappa B
<i>RANKL</i>	« Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand » ; Ligand du récepteur pour l'activation du facteur nucléaire kappa B
<i>RAW 264.7</i>	Lignée cellulaire de macrophages murins
<i>RPMI-1640</i>	« Roswell Park Memorial Institute » ; milieu de culture cellulaire
<i>Saos2</i>	Lignée ostéoblastique d'ostéoblastes murins
<i>SVF</i>	Sérum de veau fœtal
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	« Transforming Growth Factor beta » ; Facteur de croissance transformant bêta
<i>TNAP</i>	« Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase » ; phosphatase alcaline tissulaire non spécifique
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	« Tumor Necrosis Factor Alpha » ; Facteur de nécrose tumorale alpha





# REMERCIEMENTS

Au terme de ce doctorat, je tiens à remercier les chercheurs et enseignants-chercheurs qui ont accepté d'évaluer officiellement ce travail :

- René Sabot et Jean Geringer pour avoir accepté de juger ce travail, de le rapporter et d'avoir émis des remarques pertinentes qui ouvrent à la discussion et à la collaboration.
- Laurent Gremillard, pour avoir consacré du temps à ce travail et apporté des réflexions scientifiques constructives.
- Pierre Ponthiaux pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma sincère gratitude. Je vous remercie tous du temps que vous m'avez consacré et de vos questions et remarques qui ont amélioré mon manuscrit et affûté ma réflexion.

Je tiens à remercier mes trois superviseurs, le professeur Bernard Normand, l'enseignant chercheur Christelle Der-Loughian et l'enseignant chercheur Benoît Ter-Ovanessian pour leurs conseils, leur inspiration et leur soutien durant ce travail. Je les remercie de m'avoir donné leur confiance pour mener à bien ce travail, d'avoir encouragé ma recherche et de m'avoir permis d'évoluer comme chercheur scientifique.

J'aimerais remercier tout particulièrement Yves Berthier, Ana-Maria Trunfio-Sfarghiu et Aline Bel-Brunon de l'Université de Lyon (LaMCoS) pour leurs transmissions des connaissances en matière de tribologie et leurs encouragements pendant nos échanges scientifiques. Je remercie également Leyre Brizuela-Madrid et Saïda Mebarek de l'Université de Lyon (ICBMS) pour leurs conseils scientifiques, leurs connaissances et leur aide lors des réunions du projet.

Je tiens à remercier les technicien(ne)s et ingénieur(e)s des trois laboratoires où j'ai travaillé : Sandra Balvay pour son aide en biologie cellulaire, David Levêque pour son aide dans la conception logistique du dispositif de biotribocorrosion et les trois acolytes Ghani, Kader et Fred pour leur aide dans l'usinage des échantillons et leur bonne humeur à l'atelier.

L'aide et les conseils de mes collègues de l'équipe CORRIS m'ont également été d'une grande aide tout au long de ce projet. Je remercie également les membres de l'équipe I2B pour leur soutien : Dalila Tidadini, Claire Gaillard, Laurence Heinrich et Laurent Gremillard. Enfin, je suis reconnaissante au personnel du laboratoire MATEIS pour leur soutien administratif (Jalila Second, Yasmina Salhi, et Antonia Riccobene).

Je remercie également mes camarades de travail (Nicolas Vaché, Kurt Hermange, Zhiheng Zhang, Quentin Lemarie, Chloé Comas, Yu Shi, Dwaipayan Mallick, Huo Ying, Philippe Martinet, Kathleen Jaffre) au laboratoire pour leur amitié et leurs bons moments de découvertes « culinaires ».

Je suis redevable à mes parents et à ma sœur pour leur compréhension, leur patience et leurs encouragements. Enfin, j'aimerais exprimer ma reconnaissance à mon mari, mon charmant golfeur, Richard, qui a toujours été présent et patient quand j'étais stressée. Il m'a soutenu et a toujours eu confiance en moi dans les moments où je doutais.



# INTRODUCTION

---

## 1. CONTEXTE

Les implants orthopédiques sont de plus en plus utilisés pour substituer une partie ou une fonction du corps, et en partie les articulations qui se fragilisent avec l'âge. L'usure du cartilage naturelle (arthrite) ou qui survient après un traumatisme ou une maladie (arthrose) sont les principales raisons du développement des prothèses articulaires [1]. L'arthroplastie totale des articulations est citée comme l'une des chirurgies courantes les plus efficaces pour les patients souffrant d'arthrose sévère. Bien que l'intervention soit techniquement exigeante et nécessite une équipe chirurgicale qualifiée, les résultats à l'échelle mondiale sont remarquables. Les remplacements articulaires totaux ont connu un grand succès au cours des cinquante dernières années, rétablissant la mobilité et le fonctionnement de millions de personnes chaque année.

Aux États-Unis, plus de 200 000 arthroplasties primaires de la hanche sont pratiquées chaque année chez les personnes de plus de 80 ans [2], et ce nombre devrait atteindre 600 000 par an d'ici 2030 [3]. De même, le nombre total d'arthroplasties du genou et de la cheville pratiquées chaque année augmente [1,2]. Les données montrent qu'à mesure que l'âge moyen de la population s'allonge, un nombre croissant de patients âgés de moins de 65 ans reçoivent une articulation artificielle [3]. Cette population plus jeune et plus active s'attend à ce que les prothèses articulaires s'adaptent à un mode de vie actif sans avoir à subir de multiples révisions, ce qui nécessite un implant conçu pour résister à un grand nombre de cycles de contraintes.

Le taux des procédures de révision est très variable selon les articulations remplacées : et est estimé de 1% jusqu'à 30% après 10 ans d'implantation [4]. Actuellement, le taux d'échec de l'arthroplastie de la cheville est jusqu'à 30 fois supérieur par rapport aux autres articulations. L'augmentation des arthroplasties primaires entraînera également une multiplication des chirurgies de reprise au cours des deux prochaines décennies [2]. Par ailleurs, les patients qui subissent une chirurgie de reprise articulaire développent plus de tissu cicatriciel, ont moins de matrice osseuse saine et ont tendance à récupérer plus lentement [5,6]. Pour ces raisons, la chirurgie de reprise est intrinsèquement risquée et coûteuse. Une meilleure compréhension des défaillances de l'arthroplastie doit permettre aux concepteurs et aux chirurgiens d'optimiser les matériaux, les conceptions et les procédures pour minimiser les échecs, réduire les coûts globaux des soins de santé et améliorer le confort des patients [7,8].

## 2. ENJEUX

D'une manière générale, les prothèses articulaires durent en moyenne 15 ans pour toutes articulations confondues. De nombreux facteurs peuvent modifier cette estimation, tels que les antécédents médicaux du patient (âge, activité physique), l'état de l'os et du cartilage, et l'articulation à remplacer (genou, hanche, cheville, épaule). Dans tous les cas, l'intégrité des prothèses articulaires dans le corps humain est compromise par différents mécanismes de dégradation qui dépendent de la nature des composants de la prothèse. Les études cliniques ont permis de recenser les différents types de sollicitations qui affectent la dégradation des prothèses articulaires :

- Mécanique, la fatigue de surface et les frottements peuvent simultanément provoquer des débris d'usure et des ruptures du film passif et, par voie de conséquence, la dissolution du matériau sous forme d'ions métalliques. Cet ensemble est susceptible d'induire des réactions inflammatoires importantes qui peuvent conduire à une altération de la matrice osseuse (ostéolyse, nécrose, kystes osseux). L'ensemble des réactions biologiques peut aboutir à une perte de contact entre l'os et la prothèse (descellement). Le descellement de l'implant induit par des débris d'usure représente plus de 75 % de toutes les révisions d'implants d'arthroplastie articulaire totale et constitue le principal facteur limitant la longévité des arthroplasties articulaires totales actuelles [9].
- Physicochimique, la présence de protéines, de sels minéraux dans les fluides physiologiques et des cellules en contact avec les biomatériaux métalliques ont également une action significative et locale sur le comportement surfacique de ces derniers. Des phénomènes de corrosion localisée peuvent être induits par l'activité des cellules en réponse à la présence des produits de dégradation. En effet, dans certains cas, les macrophages responsables de la digestion des corps étrangers sont détruits après ingestion et conduisent à une acidification locale du milieu. Le cas échéant, des effets de synergie entre les sollicitations mécaniques et environnementales peuvent exister et induire des endommagements à risques.

Le recul pour prédire le comportement à long terme des prothèses est variable. L'enjeu clinique est considérable. Il s'agit de limiter les complications en allongeant la durée de vie des prothèses articulaires. Ceci est envisageable en comprenant davantage le comportement *in vivo* du contact articulaire de substitution.

### 3. OBJECTIFS

Compte tenu de la grande divergence du taux d'échec entre les prothèses articulaires, cette étude s'est orientée sur la biodégradation des prothèses les moins « performantes » : les prothèses de cheville. L'objectif de cette thèse est d'évaluer les facteurs de leurs détériorations et les réactions inflammatoires des tissus associées. Etant donné que l'alliage métallique de cobalt (CoCrMo) est l'un des deux principal composant de la prothèse de cheville, il constitue le matériau d'étude de référence pour la thèse.

L'accent a été mis sur les interactions entre le fluide physiologique et le CoCrMo et les effets synergiques avec les cellules. Grâce à une approche multidisciplinaire, s'appuyant sur des analyses électrochimiques et physico-chimiques de la réactivité de surface et des études biologiques et mécaniques, le couplage entre les sollicitations mécaniques et l'activité cellulaire à proximité des implants ont été abordés. La perspective finale est de pouvoir reproduire le comportement de l'alliage CoCrMo, utilisé dans la prothèse de cheville, c'est-à-dire les processus électrochimiques et tribologiques impliquant des produits de dégradation (particules d'usure et ions métalliques).

En raison de la complexité du sujet et des nombreux défis associés aux conditions réelles du contact articulaire, une approche itérative a été adoptée. Sur cette base, le système expérimental a été développé autour du milieu physiologique simulé qui a été complexifié par des éléments (alliage métallique et cellules) ou des conditions agressives (sollicitations électrochimiques).

#### 4. SYNOPSIS DU MANUSCRIT DE THESE

Ce manuscrit comporte six chapitres. Les deux premiers sont consacrés à la contextualisation et la présentation des méthodes expérimentales. Les quatre suivants sont dédiés aux résultats de la thèse. Les chapitres sont articulés autour d'une partie bibliographique d'introduction suivie d'une section consacrée aux résultats :

Le chapitre I passe en revue le développement des biomatériaux métalliques, et en particulier de la prothèse articulaire de cheville. Les complications médicales liées à l'intervention chirurgicale sont abordées dans le but de cerner les interactions entre tissus biologiques et implants.

Le chapitre II décrit les matériaux et les liquides utilisés, la préparation des échantillons, les procédures expérimentales et l'équipement utilisés dans cette étude. Le chapitre comprend également un examen approfondi des techniques expérimentales utilisées dans ce travail, à savoir les essais électrochimiques, l'observation et l'analyse de surface, les essais biologiques et les mesures tribologiques. Le dispositif expérimental de biotribocorrosion est présenté dans le chapitre VI.

Le chapitre III passe en revue les utilisations, les caractéristiques et les fonctions biologiques des milieux liquides généralement utilisés pour les études *in vitro* des biomatériaux. Le RPMI-1640, choisi comme milieu de cette étude fait l'objet d'une étude électrochimique et biologique.

Le chapitre IV aborde l'état actuel de la recherche des alliages de cobalt de grade médical. Le rôle du milieu physiologique (protéines, pH) sur les matériaux implantaires est passé en revue. Le chapitre aborde la caractérisation de l'alliage métallique de cobalt (CoCrMo) en termes de résistance vis-à-vis de la corrosion dans le milieu RPMI-1640.

Le chapitre V est consacré à la réactivité biologique des cellules (osseuses et immunitaires) situées à proximité des prothèses métalliques orthopédiques. L'interface cellules/CoCrMo est caractérisée d'un point de vue électrochimique et biologique.

Le chapitre VI aborde la réponse tissu/cellule face aux produits de dégradation générés mécaniquement par le contact articulaire. Cette section décrit le dispositif de biotribocorrosion développé à cet effet. L'envergure de ses fonctionnalités est illustré au travers des premiers essais mettant en jeu le contact articulaire des prothèses de cheville.

Les conclusions et les perspectives sont présentées à la fin du manuscrit.



---

# CHAPITRE I

## LES IMPLANTS ORTHOPEDIQUES

---

**C**e chapitre recense les alliages métalliques utilisés pour le remplacement total des articulations. L'accent est mis sur les prothèses de cheville. Le propos se concentre ensuite sur les complications post-opératoires.

### Sommaire

---

<b>I. 1</b>	<b>Les biomatériaux métalliques en médecine orthopédique.....</b>	<b>6</b>
I. 1.1	Les métaux.....	6
I. 1.1.a	Les aciers inoxydables.....	6
I. 1.1.b	Le titane et ses alliages.....	6
I. 1.1.c	Les alliages à base de cobalt.....	6
I. 1.1.d	Les autres métaux.....	7
I. 1.2	Propriétés des biomatériaux métalliques.....	7
I. 1.2.a	Propriétés mécaniques.....	7
I. 1.2.b	Biocompatibilité.....	8
I. 1.2.c	Résistance à la corrosion.....	8
<b>I. 2</b>	<b>Traitement chirurgical de la cheville.....</b>	<b>8</b>
I. 2.1	La biomécanique de l'articulation de la cheville.....	9
I. 2.2	Analyse de marché des prothèses de cheville.....	9
I. 2.3	Les modèles de prothèses de cheville.....	10
<b>I. 3</b>	<b>Les complications de l'arthroplastie de la cheville.....</b>	<b>11</b>
I. 3.1	Réaction aseptique : face aux corps étrangers.....	11
I. 3.1.a	Produit de dégradation de nature métallique.....	12
I. 3.1.b	Usure de l'insert de polyéthylène.....	12
I. 3.2	Formation de kystes osseux et ostéolyse.....	12
I. 3.3	Le descellement aseptique.....	13
<b>I. 4</b>	<b>Résumé de l'analyse bibliographique.....</b>	<b>13</b>

## I. 1 LES BIOMATERIAUX METALLIQUES EN MEDECINE ORTHOPEDIQUE

Le rôle des biomatériaux a été considérablement influencé par les progrès de la biotechnologie, de la science et de la technologie médicale, chirurgicale et prothétique [10]. La plupart des biomatériaux, encore utilisés de nos jours, ont été développés au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle. La première pièce métallique introduite en 1912 fût de l'acier au vanadium. Par la suite, d'autres alliages ont été développés afin d'améliorer la résistance à la corrosion.

### I. 1.1 Les métaux

Les métaux et alliages ont un large éventail d'applications dans les dispositifs biomédicaux. Ils peuvent être utilisés pour la fixation de fractures, le remplacement partiel ou total des articulations, les valves cardiaques et les implants dentaires [11,12]. Ils peuvent être combinés à d'autres matériaux comme les céramiques ou les polymères afin d'améliorer les propriétés requises. Trois types de métaux biomédicaux prédominent : les aciers inoxydables, les alliages de cobalt et les alliages de titane.

#### I. 1.1.a Les aciers inoxydables

Les aciers inoxydables ont été les premiers métaux à être utilisés en orthopédie [11,13]. Bien que plusieurs types d'aciers inoxydables soient disponibles pour les implants, dans la pratique, les plus courants sont les aciers inoxydables austénitiques de type 316 et 316L. L'ajout de chrome, de nickel et de molybdène améliore la résistance à la corrosion en formant un film passif résistant. La fonction clé du chrome est de permettre le développement d'un oxyde de surface adhérent. Le carbone et d'autres éléments d'alliage conditionnent les propriétés mécaniques des aciers. La principale limite de l'acier inoxydable est associée à sa susceptibilité à la corrosion sous contrainte et à la corrosion par piqûres.

#### I. 1.1.b Le titane et ses alliages

Le titane commercialement pur et les alliages de titane, comme le Ti6Al4V, ont montré d'excellentes performances en matière de propriétés de corrosion électrochimique et biocompatibilité tissulaire pour les implants statiques [11,13]. Le film d'oxyde (TiO<sub>2</sub>), d'épaisseur nanométrique (10 nm) qui recouvre le titane et ses alliages confère une excellente résistance à la corrosion dans les fluides biologiques. Bien que la biocompatibilité de ces métaux soit également vérifiée dans les résultats cliniques, la présence du vanadium (V) est préoccupante du fait de sa toxicité pour les humains [14]. Les alliages de titane ont une faible résistance au cisaillement et une résistance à l'usure moins bonnes que les alliages de cobalt [15]. La déformabilité des alliages de titane peut également être un inconvénient lorsqu'ils sont utilisés comme un matériau support [11].

#### I. 1.1.c Les alliages à base de cobalt

Les alliages cobalt-chrome sont difficiles à usiner et, par conséquent, sont soit coulés soit corroyés. On distingue les alliages coulés CoCrMo (ASTM F75) et les alliages forgés CoNiCrMo (ASTM F90 et F562) [11]. Les alliages coulés sont utilisés depuis longtemps pour des applications dentaires et récemment dans la fabrication d'articulations artificielles. Les alliages corroyés, sont utilisés pour les tiges des articulations



fortement sollicitées, comme le genou et la hanche. Quatre types d'alliages CoCr sont recommandés pour les implants chirurgicaux: **i)** l'alliage CoCrMo coulé (ASTM F75), **ii)** l'alliage CoCrW<sub>Ni</sub> corroyé (ASTM F90), **iii)** l'alliage CoNiCrMo corroyé (ASTM F562) et **iv)** l'alliage CoNiCrMoWFe corroyé (ASTM F563). Seuls le CoCrMo coulé et l'alliage CoNiCrMo corroyé sont largement utilisés dans la fabrication d'implants [11]. Le procédé de mise en forme définit les caractéristiques mécaniques de ces alliages. Le processus de coulée peut entraîner un refroidissement non homogène, ce qui entraîne une variation de la composition, une taille de grain importante et des défauts de coulée tels que des inclusions, qui nuisent aux propriétés de l'implant [13]. La taille des grains des alliages corroyés est invariablement plus fine que celle des alliages coulés. La résistance des alliages corroyés est donc meilleure que celle des alliages coulés [13].

Le cobalt et le chrome, éléments de base des alliages CoCr, forment une solution solide allant jusqu'à 65% de cobalt. Le chrome augmente la résistance à la corrosion de l'alliage d'un ordre de grandeur supérieur à celui des aciers inoxydables par formation d'oxydes de surface fortement enrichis en oxyde de chrome Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. L'addition de molybdène diminue la taille des grains, ce qui confère à l'alliage une meilleure résistance à la ténacité et à la dureté. Le module d'élasticité des alliages de CoCrMo est ainsi plus élevé (210 GPa) que l'os cortical (20-30 GPa), ce qui peut entraîner une variabilité des différents modes de transfert de charge de l'os à la prothèse articulaire. L'addition d'autres éléments tels que le nickel ou le tungstène augmentent les propriétés mécaniques et la résistance à l'abrasion des alliages CoCrMo. La faible usure (4,2 µm/an) a, par exemple, été reconnue comme un avantage pour les articulations de hanche métal sur métal [13].

#### I. 1.1.d Les autres métaux

Plusieurs autres métaux ont été utilisés pour diverses applications d'implants spécialisés. Le tantale poreux (Ta) s'est révélé très biocompatible. Il est utilisé dans les applications où la croissance osseuse est souhaitée. En raison de ses faibles propriétés mécaniques et de sa haute densité (16,6 g/cm<sup>3</sup>), il est limité à peu d'applications telles que les fils de suture en chirurgie plastique. L'alliage de zirconium oxydé (Zr) est utilisé dans des applications d'appareillage (prothèses totales du genou, têtes fémorales pour tiges de hanche) en raison de la résistance à l'usure de sa couche superficielle en oxyde de zirconium (ZrO<sub>2</sub>).

Le revêtement des implants avec des matériaux compatibles avec les tissus tels que l'hydroxyapatite, la céramique oxydée, le Bioglass® et le carbone pyrolytique sont des applications typiques des implants. Le problème principal est la délamination du revêtement ou l'usure éventuelle du revêtement.

#### I. 1.2 Propriétés des biomatériaux métalliques

Les principaux critères de sélection des métaux et alliages pour les applications biomédicales sont la biocompatibilité, la résistance mécanique et la résistance à la corrosion.

##### I. 1.2.a Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques requises pour un biomatériau doivent être aussi proches que possible du tissu biologique. Les prothèses orthopédiques doivent résister à la traction et à la fatigue. En effet, lors de la marche ou de la course, les os sont soumis à des sollicitations dynamiques qui suivent les cycles de charge.

Par exemple, la hanche est soumise à une force qui peut atteindre huit fois le poids du corps pendant la course et trois fois pendant la marche [15].

Comme les prothèses articulaires sont soumises à des charges cycliques répétées, la résistance élastique, la ténacité, la ductilité et le coefficient de frottement sont des facteurs décisifs de résistance mécanique. La fonctionnalité des prothèses articulaires est principalement assurée par l'utilisation de matériaux qui ont des couples de frottements proches de ceux du cartilage. Les forces de frottements qui s'exercent sont faibles grâce au cartilage et au liquide synovial. Ce liquide a des propriétés lubrifiantes. Il limite l'usure de l'articulation. En général, l'alliage CoCrMo donne le taux d'usure le plus faible parmi les combinaisons de matériaux dans les prothèses totales articulaires.

### I. 1.2.b Biocompatibilité

La notion de biocompatibilité correspond à la capacité d'un matériau à accomplir une fonction spécifique sans induire de réponse de l'hôte [16]. Cette définition, introduite en 1987 par D. Williams, prend en compte deux notions :

- La biocompatibilité dépend du site d'implantation et de la fonction du matériau. En effet, selon si un matériau est inerte ou si il est biodégradable, le degré de biocompatibilité attendu ne sera pas le même [17].
- La réponse de l'hôte a toujours lieu quel que soit le matériau implanté. Elle ne peut pas être supprimée et elle implique une réaction inflammatoire plus ou moins intense. La biocompatibilité d'un matériau dépend donc de la réaction de l'hôte jugée admissible et sans risque.

En conséquence, un matériau peut être considéré comme biocompatible dans le cas d'une application et peut être totalement inappropriée pour une autre.

### I. 1.2.c Résistance à la corrosion

Le liquide physiologique humain contient de l'eau, de l'oxygène dissous, des protéines et divers ions tels que des chlorures. Par conséquent, le corps humain est un environnement très agressif pour les métaux susceptibles d'être utilisés. Ils se dégradent dans une certaine mesure sous forme d'ions métalliques solubles et/ou de produits de corrosion solides, ce qui engendre une dégradation locale [18]. La résistance à la corrosion d'un implant métallique est un aspect important de sa biocompatibilité. Toutefois, pour les matériaux biodégradables (alliage de magnésium), la dissolution peut être délibérée. Ainsi, quelle que soit la fonction du biomatériau, sa résistance à la corrosion doit être établie et sous contrôle. Elle est influencée par plusieurs facteurs (composition chimique, microstructure, traitement de surface, design) et paramètres environnants (ions, pH, température, O<sub>2</sub>).

## I. 2 TRAITEMENT CHIRURGICAL DE LA CHEVILLE

À l'ère de la chirurgie de remplacement articulaire, les prothèses de cheville n'ont pas réussi à réaliser ce qui a été accompli pour d'autres articulations. Leur développement a demandé plus de compréhension au niveau de la biomécanique jusqu'alors peu étudiée à cause de sa complexité.

## I. 2.1 La biomécanique de l'articulation de la cheville

Les fonctions principales de la cheville sont de supporter le poids du corps et de transférer la charge corporelle durant les différentes allures [19]. Deux phases interviennent au cours d'un cycle de marche normal [20] :

1. Une phase d'appui décomposée successivement en une phase de double appui, de simple appui puis de double appui. C'est le moment où le poids du corps est transféré sur un des deux membres inférieurs. Durant cette phase, l'articulation de la cheville porte une charge très élevée et le mouvement relatif dans l'articulation est faible.
2. Une phase d'oscillation où la jambe en l'air se déplace vers l'avant. Durant cette phase, même si la charge sur l'articulation est plus faible que dans la phase d'appui, le mouvement de l'articulation est plus important.

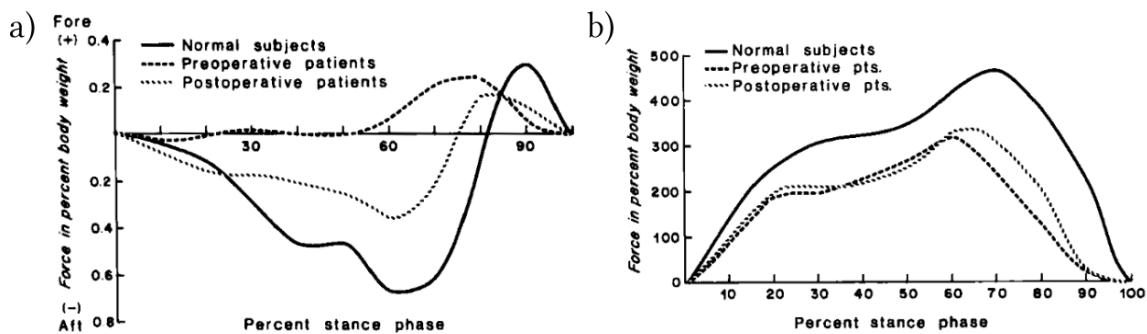


Figure I. 1 Tendances moyennes de la force tangentielle (a) et de compression (b) à la cheville [21].

La phase d'appui occupe environ 60% du cycle de la marche tandis que la phase d'oscillation occupe les 40% restants. Durant la marche, la cheville supporte des forces de compression allant jusqu'à 5 fois le poids corporel, voire plus, lors d'une marche de niveau normal [21–23]. C'est un peu plus que les forces précédemment déterminées pour les articulations de la hanche et du genou. La rareté des maladies dégénératives primaires affectant l'articulation de la cheville peut s'expliquer par une grande surface portante (11 à 13 cm<sup>2</sup>) [21] qui entraîne une contrainte moindre sur l'articulation. Les patients atteints d'une maladie de l'articulation de la cheville tolèrent apparemment mal les forces de compression et de cisaillement dans l'articulation et, par conséquent, modifient leur démarche pour réduire ces forces [21].

## I. 2.2 Analyse de marché des prothèses de cheville

En France, 5 000 prothèses totales de chevilles sont implantées chaque année. Ce nombre représente une faible part du marché des prothèses articulaires, puisqu'il est dominé par les prothèses de hanches (100 000/an en France). Ceci s'explique en partie par l'incidence de l'arthrite de la cheville, cause principale de l'implantation d'une prothèse totale articulaire, qui touche 1984 patients sur 100 000 [24] dans le cas de la cheville, ce qui est huit fois moins fréquent que l'arthrite du genou ou de la hanche [25]. Toutefois, les déficiences physiques et mentales des patients souffrant d'arthrite de la cheville sont équivalentes à celles de l'arthrite de la hanche et d'autres problèmes médicaux gravement invalidants [26].

L'implantation d'une prothèse totale de cheville a été estimée à 19 650 \$ [27]. Ce montant a été calculé à partir des remboursements de Medicare 2007, correspondant à la somme du paiement des diagnostics de gravité de l'assurance maladie, des charges professionnelles et des coûts des implants. La fusion de la

cheville est une alternative moins coûteuse (6580 \$), qui réduit certes la douleur mais au prix d'une perte de mouvement de la cheville, d'une modification de la cinématique de la marche [28] et d'une arthrite accélérée des articulations environnantes. Une autre étude a démontré que l'arthroplastie totale de la cheville a un rapport coût-efficacité plus favorable à la fusion de la cheville et donc qu'il s'agit d'une alternative plus rentable [29].

L'arthroplastie totale de cheville est plus rentable mais plus coûteuse et a ses propres complications engendrant des taux de réopération plus élevés [13, 17, 20, 25]. Le coût de révision de l'arthroplastie de la cheville est presque équivalent à celui de l'opération initiale, i.e. 16 230 \$ [27].

### I. 2.3 Les modèles de prothèses de cheville

Dans les années 1970, les premières prothèses articulaires de la cheville, dites de première génération, furent implantées [30–32]. Établies sur le même modèle prometteur que les prothèses de hanches et de genou, elles sont constituées de deux composants cimentés dans l'os (Figure I. 2a).

L'élimination progressive du ciment osseux, la résection minimale d'os, la diminution de la taille de la prothèse et l'utilisation de nouveaux revêtements poreux pour la croissance osseuse ont considérablement baissé le nombre de complications [33,34]. Ces améliorations ont contribué au développement des prothèses de seconde et de troisième génération [35–37] (Figure I. 2b, c). À titre d'exemple, elles regroupent les modèles Agility, Buechel-Pappas (BP) et STAR de la 2<sup>nd</sup> génération et les modèles Salto, Hintegra, ESKA, Ramses, Takakura Nara Kyocera (TNK), Ankle Evolutive System (AES) et BOX de la 3<sup>ème</sup> génération [35,38–41]. Le système mécanique de ces prothèses actuelles se caractérise par un design anatomique composé de deux pièces métalliques intercalées d'un insert en polymère (ou d'un patin). Ce trio d'éléments permet d'obtenir des caractéristiques d'usure acceptables et une bonne répartition de la contrainte. On distingue trois catégories d'implants selon le type de fixation des composants : les contraints, les semi-contraints et les non contraints :

- La partie en polymère a tout d'abord été fixée à la partie métallique tibiale, ce qui offrait une bonne stabilité mais une faible mobilité de l'articulation [38] (Figure I. 2b).
- Le polymère, formant l'insert, a ensuite été mobile pour éviter de fortes concentrations de contraintes à l'interface os/implant, conduisant à un taux élevé d'usure (Figure I. 2c). Un insert non contraint donne une meilleure mobilité mais engendre une forte contrainte sur la structure ligamentaire environnante. Le modèle Buechel-Pappas (Figure I. 2d) est un des modèles de cheville non contraint.

Les prothèses de cheville sont fixées à l'os, soit par une tige tibiale, soit par l'intermédiaire de vis ou de barres. Il semble que le type de fixation n'améliore pas de façon significative la biomécanique de l'articulation et qu'elle dépend de chaque cas clinique [42,43]. Les paramètres mécaniques comme la répartition des forces de contraintes, sont influencés par la géométrie de la prothèse et les couples de matériaux en contact. La compréhension de la biomécanique a également permis de reproduire des tests *in vitro* plus fidèles des conditions réelles (couples de frottements, contraintes).

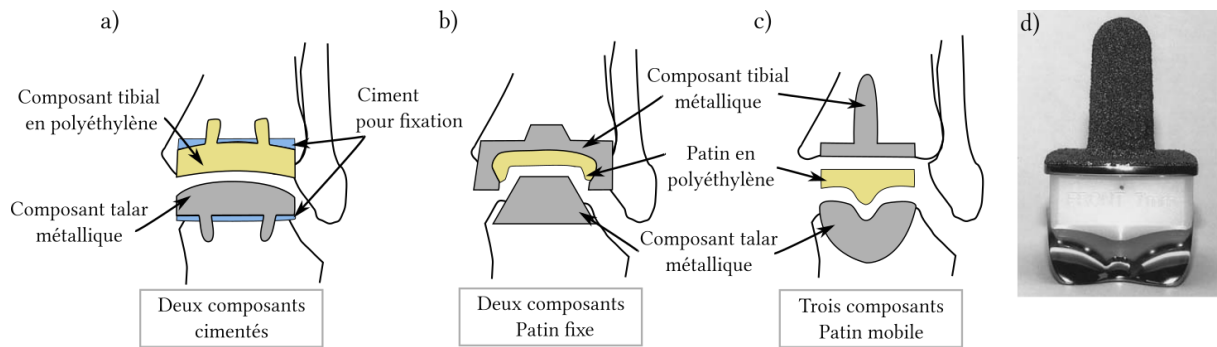


Figure I. 2 a) Modèle de prothèse de cheville de première génération constituée d'un composant tibial en polyéthylène et d'un composant métallique de talon cimentés. b, c) Modèles de prothèses de cheville actuels, composées d'éléments tibial et talar métalliques, stabilisés avec ou sans ciment, et d'un composant en polyéthylène de type ménisque fixé au composant tibial (b), ou mobile et articulé avec les deux composants (c) (Adapté de [1]). d) Modèle de prothèse de cheville non contraint Buechel-Pappas (BP) ([35,41]).

### I. 3 LES COMPLICATIONS DE L'ARTHROPLASTIE DE LA CHEVILLE

Les complications à l'origine des causes d'échec de l'arthroplastie de cheville sont multiples. Elles regroupent l'infection (7 %), les luxations récurrentes (6 %), les fractures (5 %) mais surtout le descellement aseptique, complication la plus fréquente (75%) [44]. Le descellement est généralement classé en deux grandes catégories ; à savoir le descellement aseptique, qui est principalement causé par une réaction d'un corps étranger (particules d'usure ou/et produits de corrosion) et le descellement septique qui est causé par des bactéries (Figure I. 3). Ce dernier n'est pas considéré dans la suite du document.

Type of loosening	Cause	Primary materials of prosthesis
Aseptic	Wear	Polyethylene
		Polymethylmethacrylate
Septic	Corrosion (Ions) Microbial infection	Ceramic
		Metal
		Bacteria
		Fungi

Figure I. 3 Classification du descellement des remplacements total d'articulation [45].

#### I. 3.1 Réaction aseptique : face aux corps étrangers

Le descellement aseptique est souvent associé à une réaction chronique suite à la présence d'un corps étranger comme les particules d'usure ou les ions métalliques. Il est déclaré à la fois comme une complication tardive ou précoce de la chirurgie des prothèses articulaires [46]. Le mécanisme exact responsable du descellement aseptique et les facteurs de risque sont encore mal définis [47]. De même, la réaction biologique indésirable aux débris prothétiques n'est pas encore élucidée entièrement. Ainsi, il est difficile de donner une définition universelle du descellement aseptique et il semble résulter de l'accumulation de multiples facteurs physiques, chimiques et biologiques.

### I. 3.1.a Produit de dégradation de nature métallique

Comme mentionné précédemment, au contact du milieu physiologique, les biomatériaux métalliques se dégradent. La libération excessive de produits de corrosion peut entraîner des réactions biologiques néfastes sur les tissus avoisinants compromettant la santé du patient et la fonctionnalité de la prothèse.

Des niveaux systématiquement élevés de métal (Cr, Co et Ti) ont été signalés dans le sérum de patients, que l'arthroplastie totale fonctionne bien ou mal. Les ions métalliques libérés peuvent être transportés et accumulés dans les organes, induire des changements de métabolisme, des allergies et des carcinomes à haute dose [48,49]. Si une grande quantité d'ions métalliques est libérée, elle pourrait être nocive pour la santé humaine. Les ions dérivés des métaux peuvent entraîner une sensibilisation et, par la suite, des réactions d'hypersensibilité [50]. Les ions métalliques peuvent également se lier à des protéines intactes ou partiellement dégradées de telle sorte que leur dégradation enzymatique ne suit pas la voie habituelle. Au lieu de cela, les complexes métalloprotéines peuvent être dégradés sur un autre site, produisant des peptides contre lesquels l'organisme n'a aucune tolérance. Des études *in vitro* ont indiqué que le cobalt particulaire est toxique pour les lignées cellulaires humaines de type ostéoblastique et inhibe des marqueurs de formation de la matrice osseuse [51–53].

### I. 3.1.b Usure de l'insert de polyéthylène

Les débris d'usure sont en partie formés à l'interface alliage métal/polyéthylène. Les petites particules de polyéthylène (< 20 µm) sont phagocytées par les macrophages tandis que les particules plus grosses (30-100 µm), qui ne peuvent pas être digérées efficacement par un seul macrophage, sont éliminées par des cellules géantes ou des granulomes formés de la fusion de plusieurs macrophages [54]. Les particules d'usure de polyéthylène de 0,1 à 1,0 µm créent une grande surface d'absorption pour les protéines et sont considérées comme étant les plus actives biologiquement. Les débris d'usure induisent la production des cytokines pro-inflammatoires, telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 1 (IL-1) et l'interleukine 6 (IL-6), qui conduit à l'activation d'ostéoclastes multinucléaires résorbant l'os. Ceci entraîne la dégradation des os péri-implantaires, compromettant ainsi la durabilité à long terme des prothèses [55].

Les propriétés physiques de l'insert mobile peuvent varier en fonction du type de polyéthylène. Sa longévité s'améliore avec un accroissement d'épaisseur, mais au prix de résections osseuses plus invasives [56,57]. Bien qu'une épaisseur minimale de 4 à 8 mm soit requise pour la hanche et le genou, aucune norme n'a été établie pour la cheville à ce jour. Les exigences requises pour la fabrication de l'insert de polyéthylène pour la cheville sont contradictoires avec ce qui est nécessaire à la conservation de la solidité osseuse [57].

A ce stade, pour l'arthroplastie de cheville, il y a peu d'accord sur le type de débris de biomatériaux qui est le plus bio-réactif.

## I. 3.2 Formation de kystes osseux et ostéolyse

L'usure de l'insert de polyéthylène ou des surfaces métalliques, génère des particules réparties dans l'espace articulaire, qui peuvent se loger entre l'implant et l'os, causant la perte osseuse, le descellement ou la formation de kystes [58,59].

Les kystes péri-prothétiques sont un problème récemment analysé alors qu'ils représentent 33 % des cas de complications. Plusieurs études ont rapporté une évolution osseuse kystique avec différents modèles de prothèses totales de cheville à deux ou trois composants [60–62]. Même si certains kystes restent stables ou se résorbent (asymptomatiques) [63], ils sont imprévisibles et peuvent gonfler et devenir destructifs (symptomatiques), induisant une douleur et des complications mécaniques, telles que des micro-fractures du tibia et du talon ou un affaissement du composant talar.

L'ostéolyse périprothétique est une manifestation de la réponse cellulaire négative aux particules d'usure et aux débris de corrosion. Elle dépend davantage de la taille que de la nature des particules d'usure. Les données établies sur l'arthroplastie indiquent clairement que l'usure du polyéthylène et la génération subséquente d'ostéolyse sont les facteurs les plus critiques dans le descellement aseptique [35,64].

Certains facteurs peuvent augmenter l'usure des composants, comme un mauvais alignement ou une rotation de l'implant, entraînant des contraintes de contact anormales. Ainsi, le diagnostic préopératoire est un facteur déterminant du potentiel de développement de l'ostéolyse spécifique à l'arthroplastie de cheville.

### I. 3.3 Le descellement aseptique

Le descellement de l'implant est causé par une défaillance ou une interruption de la croissance osseuse. Il peut survenir suite à une mauvaise qualité osseuse, à une résection osseuse trop agressive, à une implantation incorrecte du dispositif, à l'utilisation d'un dispositif trop petit ou à un défaut d'alignement [65]. Ceci entraîne une augmentation de l'usure du polyéthylène et une augmentation du couple de frottement [66]. La perte osseuse périprothétique entraîne une instabilité, une perte de fixation et un affaissement, ce qui nécessite la révision de l'implant. Les options de récupération de la matrice osseuse et d'échange d'inserts de polyéthylène sont des révisions majeures nécessitant une greffe osseuse structurale, des implants à tige sur mesure, ou une arthrodèse<sup>1</sup>.

Avec de nombreux implants cimentés de la première génération, le descellement précoce a été observé en raison de la détérioration rapide de l'interface statique. De nombreux changements de conception ont été apportés dans le but de réduire l'affaissement causé par l'ostéolyse. Les coupes osseuses sont devenues plus conservatrices et la plupart des systèmes prothétiques ont élargi la surface de couverture de l'astragale afin d'obtenir un meilleur soutien [1,67]. La conception récente des prothèses totales de cheville offre une plus grande liberté de mouvement, avec l'abandon de composants contraints au profit d'inserts mobiles.

## I. 4 RESUME DE L'ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le haut module d'élasticité, la limite d'élasticité et la ductilité font que les métaux et alliages sont aptes à une large gamme d'applications dans les dispositifs biomédicaux. Cependant, l'inconvénient des alliages métalliques est qu'ils sont sensibles à la dégradation physicochimique.

Le développement de la prothèse totale de cheville est survenu pour soigner les cas d'arthrite post-traumatiques et remplacer l'arthrodèse, qui immobilise l'articulation. Même si les prothèses totales

---

<sup>1</sup> Intervention chirurgicale destinée à bloquer une articulation lésée par fusion osseuse. Il s'agit d'une opération non réversible.

articulaires présentent un faible frottement, un faible taux d'usure et sont biocompatibles, des produits de dégradation (débris d'usure et ions métalliques) sont toujours générés dans le contact articulaire. Il y a encore de nombreux problèmes associés à la prothèse totale de cheville, comme l'infection, la formation de kystes osseux, le descellement aseptique, l'ostéolyse et les fractures occasionnelles. Les principales causes sont liées aux erreurs durant la pose chirurgicale et aux complications post-opératoires telles que l'usure de l'insert de polyéthylène. Les analyses histopathologiques ont montré que la lignée monocyte/macrophage joue un rôle dominant dans les réactions immunitaires dans le descellement aseptique qui entraînent une défaillance de l'arthroplastie totale de la cheville.

La cheville était la dernière articulation du membre inférieur où l'on a tenté un remplacement total de l'articulation et c'est donc la moins développée. De même, bien que l'arthrite de la cheville soit beaucoup moins répandue que dans la hanche ou le genou, à mesure que la population vieillit, le nombre de cas est susceptible d'augmenter. L'évolution de la prothèse totale de cheville a été rapide, tirant les leçons de l'arthroplastie totale du genou et des implants et qui produisent désormais des résultats cohérents. A mesure que la formation des chirurgiens [68,69], la sélection des patients et la conception des modèles prothétiques se sont améliorées, la fréquence des complications diminue. Ainsi, le système mobile entre les composants de la cheville semble avoir été largement accepté par les fabricants orthopédiques comme une solution satisfaisante pour reproduire la biomécanique de la cheville. Les modèles qui reproduisent avec plus de précision l'anatomie de l'articulation de la cheville deviendront également plus fréquents suite à la compréhension de la biomécanique de la cheville. La surface d'appui, les combinaisons de matériaux et l'état de surface sont des points importants qui peuvent à terme minimiser la friction, l'usure et la corrosion.



---

# CHAPITRE II

## MATERIELS ET METHODES

---

Ce chapitre a pour but de présenter les matériaux, les solutions et les lignées cellulaires utilisés pour simuler l'environnement d'une prothèse orthopédique de cheville. Les expériences sont principalement basées sur des techniques électrochimiques, de caractérisation de surface et de cultures cellulaires. Les dispositifs expérimentaux développés pour l'étude électrochimique des biomatériaux métalliques sont présentés.

### Sommaire

<b>II. 1 Les matériaux.....</b>	<b>17</b>
II. 1.1 Le platine : Pt .....	17
II. 1.2 L'alliage de Cobalt : CoCrMo .....	17
II. 1.3 Le polyéthylène : UHMWPE .....	19
<b>II. 2 Les fluides physiologiques simulés .....</b>	<b>20</b>
II. 2.1 Les milieux de culture cellulaire.....	20
II. 2.2 Les solutions inorganiques .....	21
<b>II. 3 Les lignées cellulaires.....</b>	<b>21</b>
II. 3.1 Les ostéoblastes.....	21
II. 3.2 Les macrophages .....	22
<b>II. 4 Dispositifs dédiés aux mesures électrochimiques.....</b>	<b>23</b>
II. 4.1 Le montage expérimental .....	23
II. 4.2 Les techniques électrochimiques .....	24
II. 4.2.a Suivi de l'évolution du potentiel en circuit ouvert ( $E_{OCP}$ ) .....	24
II. 4.2.b Suivi de la densité de courant à un potentiel donné (potentiostatique) .....	25
II. 4.2.c Courbe de polarisation potentiodynamique .....	25
II. 4.2.d La voltampérométrie cyclique.....	25
II. 4.2.e La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	26
II. 4.3 Synthèse des conditions opératoires pour les mesures électrochimiques .....	31
<b>II. 5 Techniques de caractérisation des matériaux.....</b>	<b>33</b>
II. 5.1 Observation de surface par microscopie électronique à balayage (MEB).....	33
II. 5.2 Analyse de la composition de surface par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) .....	33
II. 5.3 Synthèse des techniques expérimentales utilisées.....	35
<b>II. 6 Techniques de caractérisation des cellules.....</b>	<b>35</b>
II. 6.1 Observation de la morphologie des cellules.....	35
II. 6.2 Etude de la viabilité/prolifération et de la cytotoxicité.....	36
II. 6.2.a Test de viabilité/prolifération par le réactif PrestoBlue™ .....	36
II. 6.2.b Test de viabilité par le sel de tétrazolium (MTT).....	37
II. 6.2.c Test de cytotoxicité par la lactate déshydrogénase (LDH).....	38
II. 6.3 Etude de la minéralisation des ostéoblastes .....	39
II. 6.3.a Coloration des dépôts calciques au rouge d'alizarine .....	39
II. 6.3.b Activité de la phosphatase alcaline (ALP).....	39



## II. 1 LES MATÉRIAUX

Trois matériaux différents ont été utilisés dans ce travail. Le platine a été utilisé pour caractériser le comportement électrochimique du milieu de culture cellulaire. L'alliage de cobalt et le polyéthylène ont été utilisés pour représenter les matériaux constitutifs de la prothèse de cheville.

Cette section décrit les caractéristiques des matériaux utilisés et les conditions de préparation des échantillons.

### II. 1.1 Le platine : Pt

Une feuille de platine de haute pureté (99,95% Goodfellow Cambridge Ltd) d'une épaisseur de 0,025 mm a été utilisée comme électrode de travail (Chapitre 3). La surface (3,5 cm<sup>2</sup>) a été nettoyée avec une solution d'eau de Javel, puis d'éthanol et rincée à l'eau distillée. Le platine étant un alliage inerte, il permet de caractériser l'électroactivité d'un électrolyte.

### II. 1.2 L'alliage de Cobalt : CoCrMo

Les alliages de cobalt-chrome font partie des biomatériaux les plus couramment utilisés dans les implants orthopédiques en raison de leur excellente résistance à l'usure et à la corrosion. L'alliage de cobalt utilisé dans toute cette étude est le Biodur® CCM® (Carpenter). L'alliage de CoCrMo est composé de 64,4% Co, 27,7% Cr, 5,5% Mo conformes aux normes ASTM F-1537 [70] et ISO 5832 :12 [71] pour la fabrication d'implants orthopédiques (Figure II. 1). L'addition de chrome donne une meilleure résistance à la corrosion grâce à la formation spontanée d'une couche passive protectrice, formée principalement d'oxyde de chrome [72,73]. L'ajout de molybdène permet de produire des grains plus fins, et renforce la résistance à la corrosion localisée en milieux chlorurés [74]. L'affinement des grains confère une excellente ténacité et dureté à l'alliage métallique.

Tableau II. 1 Composition chimique (% en poids) de l'alliage de Biodur® CCM® déterminée par fluorescence X complétée par spectrométrie à émission optique avec plasma induit (informations du fabricant).

Eléments	Co	Cr	Mo	Mn	Si	W	N	Fe	C	Ni	Cu	P	S
Composition % massique	64,4	27,7	5,5	0,8	0,6	0,2	0,18	0,18	0,05	0,03	0,01	0,003	0,0005

En théorie, l'alliage CoCrMo forme deux phases cristallographiques : hexagonale  $\epsilon$  et cubique à faces centrées  $\gamma$  (Figure II. 1a). L'analyse par diffraction des électrons rétrodiffusés (EBSD), réalisée au laboratoire MATEIS (Figure II. 1b) confirme que le Biodur® CCM® présente une microstructure typique du CoCrMo corroyé contenant une matrice  $\gamma$  avec de fines plaquettes  $\epsilon$  [74]. Sa microstructure se caractérise par des grains équiaxes d'un diamètre moyen de 0,7  $\mu\text{m}$  avec une distribution aléatoire de l'orientation cristallographique (Figure II. 1c). Sur la base de la teneur en carbone, les alliages de CoCrMo sont regroupés en deux catégories, à savoir les alliages à haute teneur en carbone (0,15 à 0,35 %C en poids) et à faible teneur en carbone (< 0,15 %C en poids) [15]. L'alliage de CoCrMo utilisé dans cette étude présente peu de précipités de carbure du fait d'un faible taux de carbone (0,05 % en poids). Il est généralement admis que les différentes espèces de carbure sont de type  $M_{23}C_6$  et  $M_6C$  et sont formées en fonction de l'histoire métallurgique du matériau [75,76].

Les alliages de CoCrMo ont un module d'élasticité élevé (210-330 GPa) semblable à celui de l'acier inoxydable (environ 200 GPa) qui est beaucoup plus élevé que celui de l'os cortical (20-30 GPa) [11,12]. Ils sont principalement utilisés lorsqu'une grande rigidité ou un matériau extrêmement résistant à l'usure est requis. Les variations de microstructure du carbure, la composition chimique et la dureté de l'alliage métallique sont directement associées à la performance en usure. Les propriétés mécaniques de l'alliage de cobalt Biodur® CCM® sont présentées dans l'Annexe 1, Tableau II. 6.

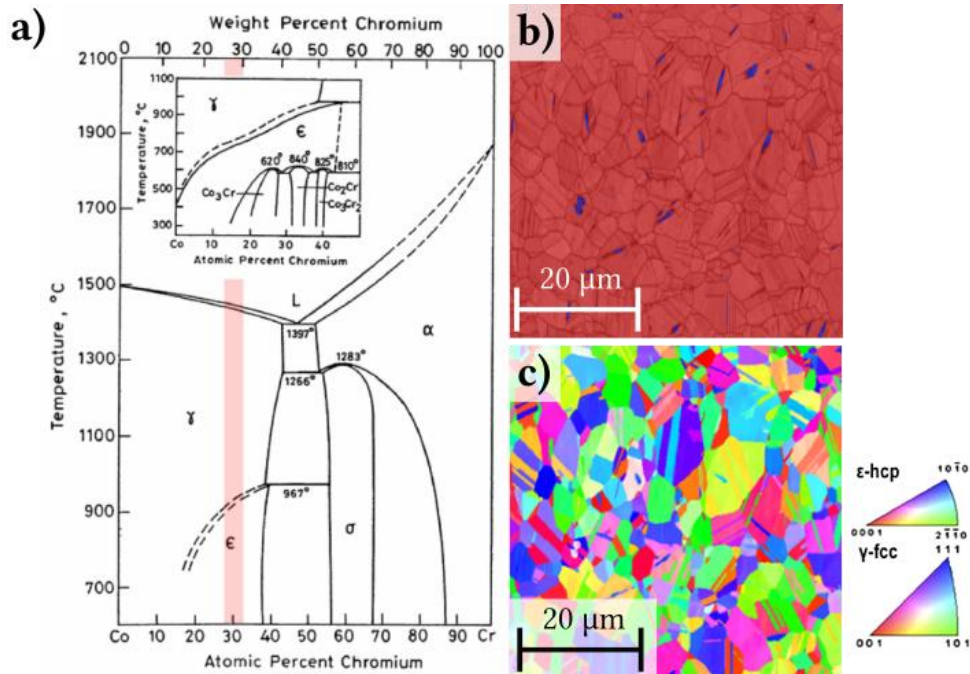


Figure II. 1 a) Diagramme de phase binaire CoCr dont le domaine de phase de 27-30% Cr est surligné en rouge [77]. Cartographies EBSD en mode IPF-X de l'alliage CoCrMo montrant b) la phase cubique à faces centrées  $\gamma$  en rouge et la phase hexagonale  $\epsilon$  en bleu et c) l'orientation cristallographique des grains.

### • Préparation des échantillons

Les échantillons de CoCrMo ont tout d'abord été découpés sous forme de disques de 3 à 5 mm d'épaisseur à partir d'une barre de 20 mm de diamètre. Les surfaces ont été polies manuellement au papier abrasif (SiC) de grade 600 à 2400. Pour les essais de biotribocorrosion (Chapitre VI), les surfaces ont été polies par l'entreprise Marle (France), en suivant la réglementation appliquée aux prothèses articulaires. La rugosité de surface  $R_a$  obtenue est inférieure à  $0,04 \mu\text{m}$  (moyenne arithmétique des écarts à la ligne moyenne).

Par la suite, les échantillons ont été nettoyés à l'éthanol dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes, puis rincés à l'éthanol et à l'acétone et enfin exposés à la lumière UV pendant 30 minutes pour les rendre stériles. Ils ont ensuite été placés pendant 24 heures dans un incubateur (atmosphère humidifiée composée de 95% d'air et 5% de  $\text{CO}_2$  à  $37^\circ\text{C}$ ). Cette dernière étape de préparation a permis d'obtenir un état de surface reproductible avec une chimie contrôlée : un film d'oxydes homogène et stable se forme à la surface. Ces étapes de préparation de surface limitent la dispersion des résultats.

Les disques de CoCrMo ainsi préparés sont placés soit : **i**) dans des boîtes de pétri de diamètre 35 mm, dont le fond a été percé (Figure II. 2), soit **ii**) dans le porte échantillon du dispositif de biotribocorrosion (présenté au Chapitre VI). Un joint est appliqué autour des disques de CoCrMo garantissant l'étanchéité du montage. Le contact électrique est maintenu par un ruban adhésif en cuivre, placé sous l'échantillon

métallique, qui est connecté au montage électrique par des pinces isolées par un revêtement en plastique. L'isolation électrique est vérifiée avant chaque essai.

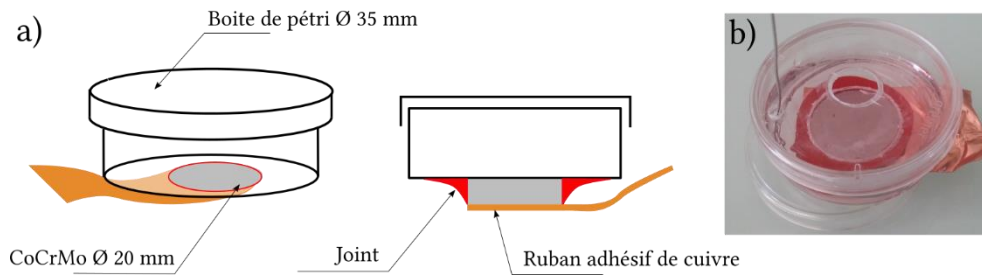


Figure II. 2 a) Schéma et b) Photographie d'un échantillon de CoCrMo placé au contact de la boîte de pétri.

### II. 1.3 Le polyéthylène à très haute masse moléculaire : l'UHMWPE

Le polyéthylène est largement utilisé comme composant orthopédique en raison de son inertie chimique, de sa réaction tissulaire limitée, de sa biocompatibilité, de sa grande ténacité et de sa bonne résistance à l'usure et à la fatigue [78,79]. L'UHMWPE possède une intégrité mécanique exceptionnelle grâce à ses enchevêtrements de chaînes, sa densité moléculaire élevée, sa cristallinité modérée (> 80 %) et son poids moléculaire très élevé supérieur à  $2.10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. L'UHMWPE haute densité est utilisé dans des applications biomédicales car il résiste aux températures de stérilisation [12,80,81]. Le moulage par compression confère au matériau une structure hautement réticulée avec des propriétés tribologiques améliorées (Annexe 1, Tableau II. 7).

L'UHMWPE est utilisé sous forme d'insert méniscal pour les prothèses de hanche, de genou, de coude, de cheville ou d'épaule. Le polyéthylène utilisé dans cette étude est celui commercialisé sous la marque Chirulen® 1050, moulé à partir de la résine GUR® 1050 (Quadrant MediTECH®, USA). Ce polymère d'une haute pureté est conforme aux normes ASTM F648 [82], ISO 5834-1 et 2 [83] et présente une excellente biocompatibilité.

#### • Préparation des échantillons

L'UHMWPE a été utilisé afin en tant que pion frotteur contre le CoCrMo afin de simuler le même contact articulaire des prothèses de cheville. L'étude du tribosystème (objet du Chapitre VI) implique des pions d'UHMWPE carottés à partir d'inserts de prothèses articulaires de hanche de double mobilité (HDM248, TORNIER) (Figure II. 3). Les échantillons obtenus sont des cylindres de 10 mm de diamètre présentant une surface arrondie conservant la géométrie initiale de l'insert. Les inserts de prothèse de cheville n'ont pas été utilisés pour l'usinage des pions en raison de leur surface initiale qui est soit concave soit plate, ce qui ne permettait pas d'atteindre les pressions de contact réelle de la cheville. Ici, la surface arrondie des inserts de hanche permet d'obtenir la pression de contact réelle de la cheville tout en conservant le matériau d'origine et son état de surface.

Les pions de UHMWPE ont été nettoyés à l'eau savonneuse et à l'éthanol et collé au porte pion avec une colle araldite (Figure II. 3). L'UHMWPE présente une morphologie de surface spécifique à l'usinage à grande vitesse, caractérisée par des rainures de fraisage concentriques. La rugosité quadratique de surface, mesurée à l'aide d'une profilomètre optique, est de 10 nm. L'acquisition expérimentale des mesures de rugosité de surface des pions de UHMWPE ont été établis selon la même méthode que les

précédents travaux réalisés au LaMCoS, et qui ont été confirmés par des analyses de surface par AFM [84].

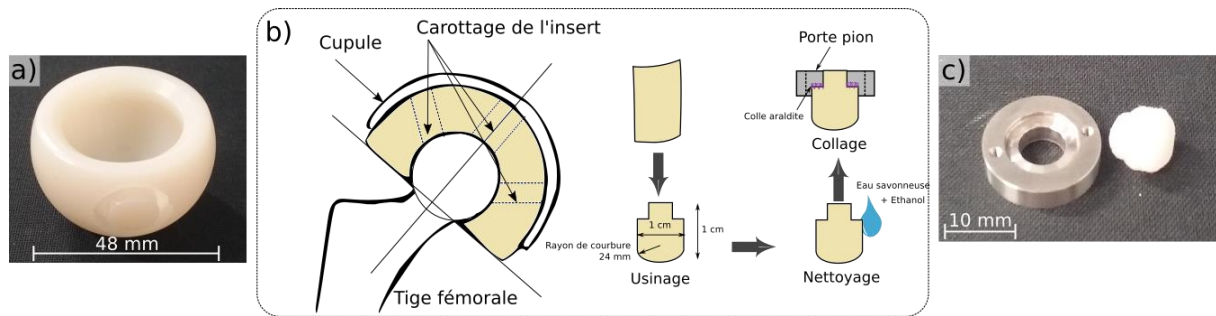


Figure II. 3 a) Insert de prothèses articulaires de hanche de double mobilité, b) Schématisation des composants d'une prothèse de hanche avec plans de coupes des pions de UHMWPE découpés dans l'insert accompagné des étapes de préparation des pions, c) Porte pion et pion en UHMWPE utilisés dans le cadre des essais de validation du dispositif de biotribocorrosion.

## II. 2 LES FLUIDES PHYSIOLOGIQUES SIMULES

Les fluides physiologiques simulés sont formulés dans le but d'imiter la diversité de l'environnement corporel. Tous les essais de cette étude ont été réalisés dans un environnement liquide, dans le but de simuler les fluides corporels. Dans cette étude, plusieurs solutions ont été utilisées à la fois mélangées et seules, afin d'isoler leurs effets synergiques possibles.

### II. 2.1 Les milieux de culture cellulaire

Il existe une grande variété de milieux de culture cellulaire, préconisés pour la culture de chaque type de cellules. Dans cette étude quatre milieux ont été utilisés :

- **Le RPMI-1640** : Roswell Park Memorial Institute
- **Le DMEM/F12** : Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12,
- **Le MEM** : Minimum Essential Media, et
- **Le McCoy's 5a**.

Tous ces milieux ont été complétés avec 5 % Vol. d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine) et 10% Vol. de sérum de veau fœtal (SVF). Seul le RPMI-1640 a été utilisé avec et sans ses composés, d'où une distinction dans la dénomination de ce milieu. Le RPMI-1640 enrichi est dénommé « RPMI-1640 Supplémenté ». Tous ces milieux de culture cellulaire ne présentent pas la même quantité d'ions inorganiques et de composés organiques. Le Tableau II.4 illustre la variation de la concentration ionique molaire des quatre milieux. Le RPMI-1640 a été défini comme le milieu de référence de cette étude (choix expliqué au Chapitre III).

Tableau II. 2 Compositions ioniques molaires des milieux de culture cellulaire utilisés (en mmol/L).

	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	K <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
RPMI-1640	129,3	108,0	23,8	5,6	5,4	0,4	0,4	0,4	0,4
DMEM/F12	149,7	124,9	29,0	1,0	4,2	0	1,5	0,4	0,4
MEM	143,6	122,6	26,2	1,0	5,4	0	1,8	0,8	0,8
McCoy's 5a	138,8	116,4	26,2	4,1	5,4	0	0,9	0,8	0,8

Les milieux de culture cellulaire ont été utilisés à la fois pour stimuler la croissance des cellules et pour jouer le rôle de milieu conducteur (électrolyte). Ainsi, l'utilisation courante de ces milieux en biologie a été étendue au domaine de l'électrochimie. Pour autant, la préparation de ces solutions requiert des conditions essentielles à respecter. Ceci implique d'utiliser une hotte à flux laminaire pour maintenir une zone de travail stérile et un incubateur pour maintenir un environnement cellulaire viable (stérilité, température, pH). En effet, le pH de ces milieux de culture est défini par les espèces carboniques, c'est-à-dire par l'apport de CO<sub>2</sub> gazeux, similaire au tampon carbonate de l'organisme humain. L'utilisation d'un incubateur permet de maintenir une concentration de 50 000 ppm de CO<sub>2</sub> dans l'environnement et ainsi de maintenir un pH viable pour les cellules (7,4 – 7,6).

## II. 2.2 Les solutions inorganiques

Deux autres solutions inorganiques ont été utilisées dans cette étude :

- **La solution saline de tampon phosphate** : DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) qui est composée uniquement de sels de chlorures (CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl) et de phosphates (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).
- **Le RPMI dit « synthétique »** : Il s'agit d'une solution aqueuse préparée de sorte que les concentrations en sels inorganiques, le pH et la conductivité soient identiques à celles du RPMI-1640 commercial. Cette solution ne contient pas de composés organiques.

## II. 3 LES LIGNÉES CELLULAIRES

Dans ce travail, axé sur l'interaction d'un biomatériau avec les cellules, des lignées de cellules immunitaires et osseuses ont été utilisées. Le choix de lignées, plutôt que des cellules primaires, se justifie par leur facilité d'entretien et leur « immortalité » [85,86]. Le type de cellules choisies (macrophages et ostéoblastes) permet d'assurer la représentativité cellulaire du contact articulaire.

### II. 3.1 Les ostéoblastes

Deux lignées cellulaires d'ostéoblastes ont été utilisées dans le cadre de cette étude : il s'agit des cellules humaines Saos2 (ATCC® HTB85™) et hFOB 1.19 (ATCC® CRL-11372™). Ces cellules proviennent d'ostéosarcomes humains (tumeur maligne d'os) [87,88].

Les ostéoblastes ont une morphologie allongée et étalée en forme de fuseaux (Figure II. 4). Les ostéoblastes sont très adhérentes et s'agencent en monocouche. Les cellules ont été cultivées dans les



quatre milieux de culture cellulaire mentionnés précédemment. Lorsque les cellules sont confluentes<sup>2</sup>, elles sont détachées par action enzymatique avec de la trypsine selon la procédure détaillée en Annexe 3. La densité d'ensemencement des ostéoblastes est de  $2,8 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur le CoCrMo et de  $5 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur les disques de boîte de pétri.

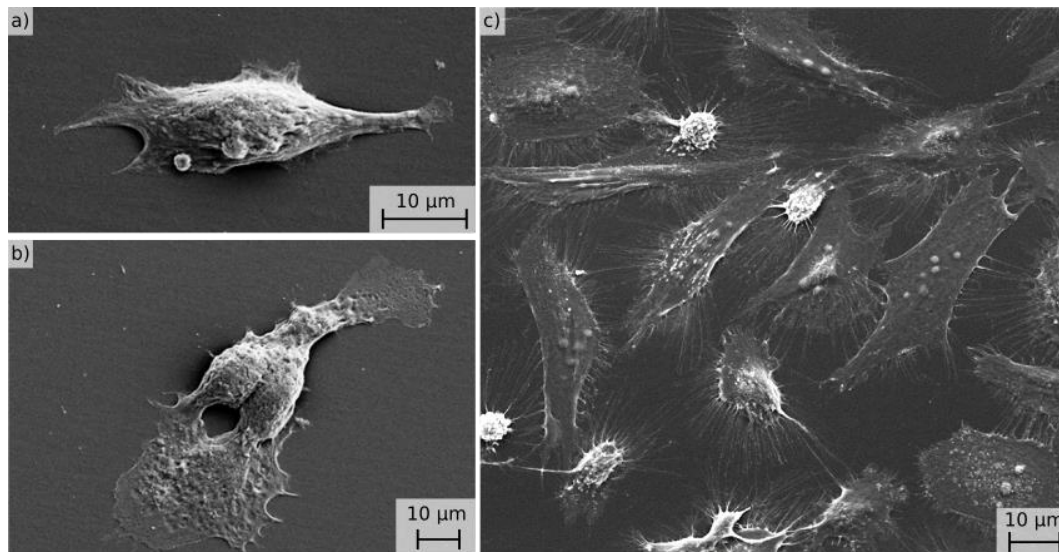


Figure II. 4 Ostéoblastes hFOB1.19 (a, b) et Saos2 (c) cultivés sur boîte de pétri observés au microscope électronique à balayage.

### II. 3.2 Les macrophages

Les macrophages RAW 264.7 (ATCC<sup>®</sup> TIB-71<sup>™</sup>) ont été isolés à partir d'une tumeur induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson chez une souris mâle. La cellule RAW 264.7 représente un système expérimental fiable pour l'étude des voies de signalisation en raison de sa facilité de propagation cellulaire et de la possession de récepteurs pour de nombreux ligands. La lignée cellulaire RAW 264.7 est caractérisée par des cellules en forme de fuseau adhérentes et des cellules arrondies (Figure II. 5). Lorsque la culture devient plus confluente, c'est-à-dire quand le tapis cellulaire ne présente aucun interstice entre les cellules, les cellules attachées peuvent s'empiler jusqu'à perdre leur adhérence et se détacher.

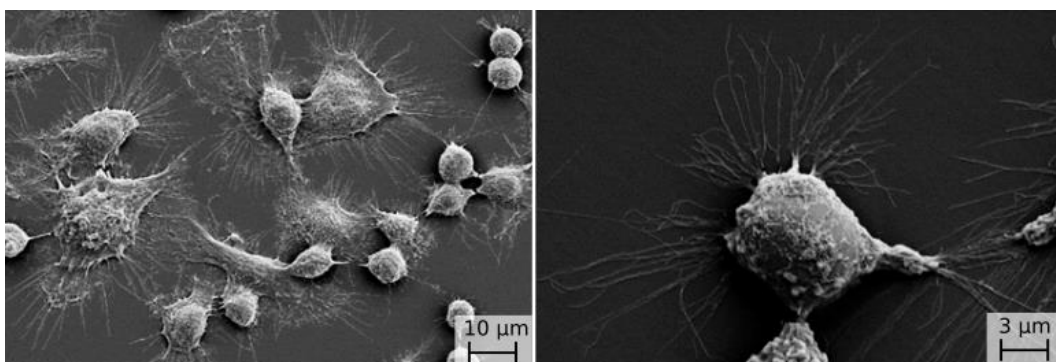


Figure II. 5 Macrophages RAW 264.7 cultivé sur boîte de pétri observés au microscope électronique à balayage.

<sup>2</sup> La confluence est un terme de culture cellulaire qui décrit le degré d'écartement qui existe entre les cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié. Par exemple 100% de confluence décrit un tapis cellulaire ne présentant aucune interstice entre chaque cellule : elles se touchent toutes.



Les cellules RAW 264.7 ont été cultivées dans le milieu RPMI-1640 et incubées à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont à confluence, on effectue un passage (protocole détaillé en Annexe 3). Dans le cas des macrophages, un grattoir est utilisé pour déloger les cellules sans les endommager, puis elles sont à nouveau suspendues sur le support choisi (flasque, boîte de pétri). Les macrophages murins utilisés dans cette étude ont subi un nombre de passages inférieurs à quinze pour éviter la dégénérescence de leur métabolisme.

La densité d'ensemencement des cellules est contrôlée par un compteur cellulaire (Millipore Scepter, Dutscher). Son fonctionnement est basé sur le principe Coulter : le nombre et la taille des cellules en suspension dans le milieu de culture sont déterminés par l'impédance électrique. La densité des macrophages est de  $2,1 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur le CoCrMo et de  $5 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> sur les disques de boîte de pétri.

Finalement, l'interaction du biomatériau a été étudiée au contact de macrophages et des ostéoblastes, car il s'agit des cellules respectivement impliquées dans la réaction inflammatoire proche du contact articulaire et dans la régénération de la matrice osseuse.

## II. 4 DISPOSITIFS DEDIES AUX MESURES ELECTROCHIMIQUES

Des techniques et méthodes électrochimiques ont été utilisées pour étudier la réactivité des biomatériaux métalliques vis-à-vis d'un milieu et des cellules. Les mesures électrochimiques définissent les grandeurs thermodynamiques et cinétiques mises en œuvre dans les processus chimiques à l'interface métal/milieu. Le dispositif électrochimique utilisé permet aussi de simuler le relargage d'ions dans le milieu.

### II. 4.1 Le montage expérimental

Les mesures électrochimiques sont réalisées avec un montage à trois électrodes. Selon l'objectif de l'étude, deux configurations ont été utilisées avec les combinaisons d'électrodes suivantes (Figure II. 6):

- L'utilisation d'une plaque de platine comme électrode de travail (WE ; *Working Electrode*) et d'une grille en platine comme contre-électrode (CE ; *Counter Electrode*) dans le cas de l'étude de l'électroactivité de l'électrolyte (Figure II. 6a). La surface de la contre électrode est supérieure à celle de travail ( $S_{CE} = 3,5 \text{ cm}^2 > S_{WE} = 2,8 \text{ cm}^2$ ). Le platine, chimiquement inerte, permet la mesure de la réactivité du milieu.
- L'utilisation d'un disque de CoCrMo comme électrode de travail et d'un fil de platine (contre électrode) dans le cas de l'étude de l'alliage métallique vis-à-vis du milieu en présence ou non de cellules (Figure II. 6b).

L'électrode de référence est une électrode au calomel saturé ( $E_{ECS} = +222 \text{ mV/ESH}$  à 37°C) quels que soient la configuration et le milieu utilisé. Un potentiostat Gamry Inst. Reference 1000 a été utilisé, piloté par le logiciel Gamry Framework 6.32.

La concentration exacte de gaz dissous (oxygène et dioxyde de carbone) a été contrôlée pour obtenir un pH de 7,4 en solution comme c'est le cas dans le milieu physiologique. La cellule électrochimique a été placée dans un incubateur Heracell 150 (Heraeus, Thermo Electron Corporation). La température et la teneur en CO<sub>2</sub> sont maintenues respectivement à 37°C et 5% (50 000 ppm). L'effet de l'oxygène dissous dans l'électrolyte sur la réaction d'oxydoréduction a été évalué en comparant trois atmosphères: aérée,

désaérée par barbotage d'azote gazeux ou de CO<sub>2</sub> et en incubateur. Ce dernier fait office de cage de Faraday.

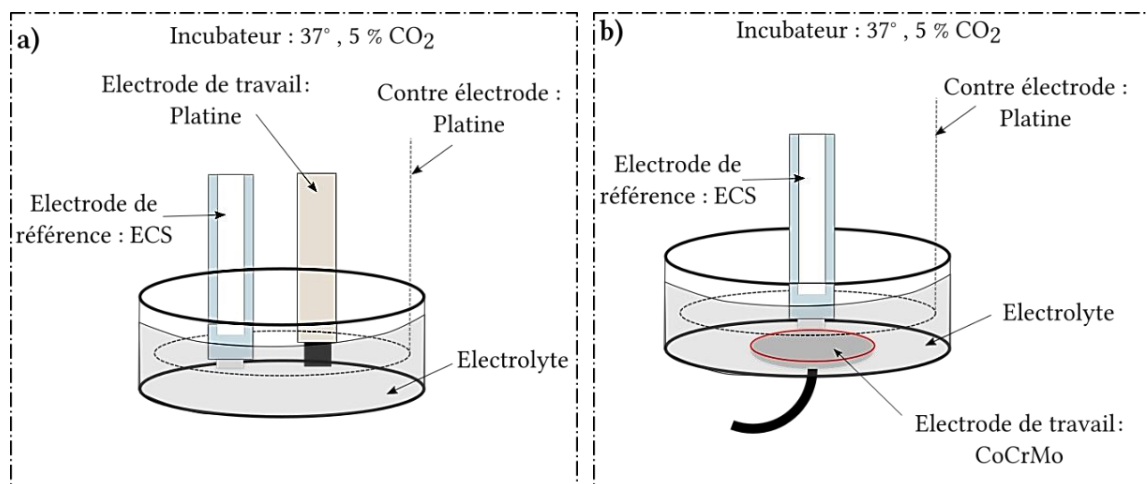


Figure II. 6 Schéma du montage à trois électrodes utilisé pour les mesures électrochimiques avec comme électrode de travail : a) le platine ou b) le CoCrMo.

## II. 4.2 Les techniques électrochimiques

Les techniques électrochimiques permettent de transcrire le comportement électrochimique global d'une électrode métallique et, par conséquent, de fournir des informations sur le comportement à la corrosion d'un matériau dans un environnement. Ces techniques permettent également d'obtenir des grandeurs quantitatives et prédictives et sont regroupées en trois catégories :

- Stationnaire : l'évolution du potentiel en circuit ouvert et la polarisation d'un système à un potentiel fixe (essai potentiostatique),
- Dynamique : le tracé des courbes de polarisation potentiodynamiques et la voltampérométrie cyclique,
- Et transitoire avec la mesure d'impédance électrochimique.

### II. 4.2.a Suivi de l'évolution du potentiel en circuit ouvert ( $E_{OCP}$ )

Il s'agit de la grandeur électrochimique la plus facilement accessible et elle ne perturbe pas le système à l'étude [89,90]. Le potentiel  $E_{OCP}$  est également nommé potentiel de corrosion, d'abandon ou libre. La mesure correspond à la différence de potentiel entre l'échantillon et une électrode de référence, dont le potentiel est fixe (en l'occurrence celui de l'électrode au calomel saturée).

L'allure de la courbe donne accès à des informations sur la nature des processus en cours, à l'interface métal/milieu, telles que la tendance à la corrosion généralisée ou à la passivation [90,91]. Le potentiel en circuit ouvert est défini par l'égalité des vitesses de réactions élémentaires d'oxydation (anodique) et de réduction (cathodique) qui se produisent à la surface de l'échantillon immergé. Cette mesure fournit également des informations sur le temps d'immersion nécessaire pour établir un état stationnaire, qui est indispensable aux mesures potentiodynamiques ou d'impédance électrochimique.

#### II. 4.2.b Suivi de la densité de courant à un potentiel donné (potentiostatique)

La polarisation potentiostatique consiste à imposer un potentiel  $E$  pendant un temps ( $t$ ) et à enregistrer l'évolution de la densité de courant  $i(t)$  en fonction du temps. Le système d'étude est polarisé à une valeur de potentiel choisie selon les réactions à étudier. La valeur et les fluctuations de  $i(t)$  renseignent sur la cinétique de réaction [92].

Dans le cas d'un métal passivable, lorsque la polarisation correspond à un potentiel situé dans le domaine passif, la croissance et l'entretien du film passif sont favorisés. En dehors de ce domaine passif, le potentiel se situe soit dans le domaine cathodique, soit dans le domaine actif du matériau ; la réduction ou la dissolution du matériau sont alors favorisés. L'intégration des courbes potentiostatiques obtenues permet de mesurer la quantité de charge mise en œuvre pour un phénomène électrochimique. Dans le domaine anodique, c'est-à-dire pour lequel la densité de courant est majoritairement positive, la quantité de charge est quasiment proportionnelle à la quantité de métal oxydé.

#### II. 4.2.c Courbe de polarisation potentiodynamique

Le tracé de la courbe potentiodynamique consiste en l'acquisition de la réponse en courant d'un matériau soumis à une perturbation linéaire en potentiel. L'analyse de ces courbes fournit la principale source d'information sur la nature des réactions mises en jeu, sur les facteurs limitants les phénomènes cinétiques et enfin les plages de potentiel pour lesquels ces phénomènes ont lieu. Il est possible d'accéder à la densité de courant de corrosion à partir du principe d'extrapolation des droites de Tafel (dans le cas d'un transfert de charge pur), à la résistance de polarisation, aux paramètres cinétiques et à la nature de l'étape limitante (transfert de charge ou transport de masse) [93,94]. La courbe courant-tension résulte de la combinaison des processus anodiques et cathodiques dont leur identification requiert une connaissance minimale de l'électrochimie du couple métal/milieu.

Dans le cas d'un métal passivable, ce type de courbe renseigne sur l'aptitude à la passivation du matériau, le domaine d'existence du film passif et le courant nécessaire pour maintenir le film passif [94,95]. Toutes ces mesures sont effectuées à des vitesses de balayage qui respectent la réversibilité des phénomènes, c'est-à-dire  $1 \text{ mV.s}^{-1}$ .

#### II. 4.2.d La voltampérométrie cyclique

L'intérêt de la voltampérométrie cyclique résulte dans sa capacité à fournir rapidement des informations sur la thermodynamique des processus redox, sur la cinétique des réactions hétérogènes de transfert d'électrons, sur les réactions chimiques couplées ou les processus d'adsorption. Elle permet de localiser rapidement les potentiels redox des espèces électroactives d'un milieu [96].

La voltampérométrie cyclique consiste à imposer un balayage linéaire en potentiel et à étudier l'évolution de la densité de courant. En fonction de l'information désirée, un ou plusieurs balayages sont effectués. La courbe de la densité de courant  $i(t)$  en fonction du potentiel  $E(t)$  qui en résulte est qualifiée de voltammogramme cyclique. Les changements de forme du spectre, résultant de la réactivité électrochimique d'un élément, peuvent être extrêmement utiles pour élucider quels types de réactions ont lieu. L'utilisation d'un matériau inerte comme électrode de travail permet d'accéder à la réactivité des éléments constitutifs d'un milieu donné en s'affranchissant des phénomènes réactionnels de l'électrode. Ces mesures sont effectuées à des vitesses de balayage rapides de  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ .

Les techniques stationnaires et dynamiques, précédemment évoquées, sont toutefois limitées par la cinétique du processus réactionnel le plus lent. Par conséquent, ces techniques restent insuffisantes pour caractériser des mécanismes complexes, mettant en jeu plusieurs étapes réactionnelles intervenant en parallèle et ayant des cinétiques différentes. L'utilisation des techniques transitoires devient alors indispensable.

#### II. 4.2.e La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) apporte une analyse plus complète du pouvoir protecteur des films passifs comparativement aux autres techniques [97]. Les caractéristiques physiques du film protecteur peuvent en particulier être distinguées du mécanisme de transfert de charge intervenant à l'interface substrat/électrolyte, et quantifiées en fonction de différents paramètres imposés au système. La SIE repose sur l'interprétation d'une relation courant-potentiel faisant appel aux analogies qui, sous certaines conditions de linéarité et de stationnarité du système, existent entre une réaction électrochimique et un circuit électrique.

- **Principe**

La SIE repose sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation volontaire du système électrochimique étudié. Ce système peut être considéré comme étant une « boîte noire » qui réagit en émettant un signal  $\Delta Y$  quand il est soumis à une perturbation  $\Delta X$  (Figure II. 7). Les deux signaux sont reliés par une fonction de transfert  $Z$ .

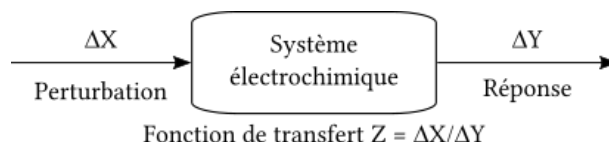


Figure II. 7 Principe d'une fonction de transfert : application de la SIE.

Une sollicitation sinusoïdale de faible amplitude en potentiel  $\Delta E$  en fonction de la fréquence  $f$  est appliquée au système électrochimique. Elle permet de rester sur un domaine de linéarité. La perturbation sinusoïdale induit alors un courant à deux composantes : une fixe  $I_0$  et une sinusoïdale  $\Delta I(t)$  (Eq II. 2), déphasée d'un angle  $\phi$  par rapport au potentiel. Le potentiel  $E(t)$  s'écrit alors selon l'équation II. 1.

$$E(t) = E_0 + \Delta E(t) = E_0 + \Delta E \sin(\omega t) \text{ où } \Delta E(t) = |\Delta E| \sin(\omega t) \quad \text{Eq II. 1}$$

$$I(t) = I_0 + \Delta I(t) = I_0 + \Delta I \sin(\omega t + \phi) \text{ où } \Delta I(t) = |\Delta I| \sin(\omega t + \phi) \quad \text{Eq II. 2}$$

Où  $f$  est la fréquence,  $\omega$  est la pulsation ( $= 2\pi f$ ) et  $\phi$  est le déphasage correspondant au temps de réponse des réactions électrochimiques. Le déphasage est nul lorsque la résistance totale est idéale et égale à 1.

En un point de fonctionnement ( $I_0, E_0$ ) (Figure II. 8), soit pour une polarisation stationnaire, l'impédance électrochimique  $Z$  est définie comme étant le nombre complexe résultant du rapport entre le signal de perturbation  $\Delta E(t)$  et la réponse associée  $\Delta I(t)$  dans une large gamme de fréquences :

$$Z = \frac{\Delta E(t)}{\Delta I(t)} = \frac{|\Delta E| e^{j\omega t}}{|\Delta I| e^{j(\omega t - \phi)}} = |Z| e^{j\phi} \quad \text{Eq II. 3}$$

L'impédance  $Z$  est un nombre complexe caractérisé par son module  $|Z|$  et sa phase  $\phi$  :

$$Z = Z_{Re} + jZ_{Im} \quad \text{Eq II. 4}$$

$$|Z| = \sqrt{(Z_{Re})^2 + (Z_{Im})^2} \quad \text{Eq II. 5}$$

$$\phi = \tan^{-1} \left( \frac{Z_{Im}}{Z_{Re}} \right) \quad \text{Eq II. 6}$$

Où  $j = \sqrt{-1}$ ,  $Z_{Re}$  et  $Z_{Im}$  sont respectivement les parties réelle et imaginaire.

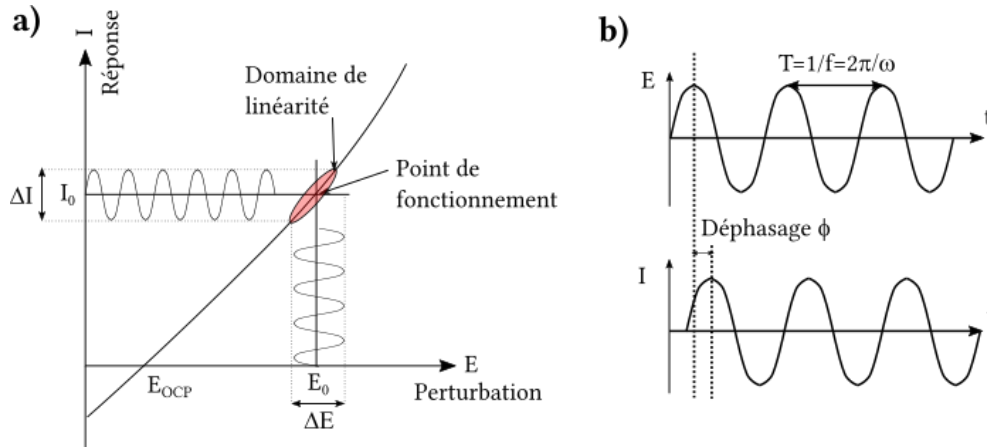


Figure II. 8 a) Schéma d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation sinusoïdale, b) Déphasage entre le courant et le potentiel.

### • Représentation conventionnelle des données d'impédance

Habituellement, il existe deux modes de représentation des diagrammes d'impédance électrochimique :

- La représentation de Bode : le module  $|Z|$  et de la phase  $\phi$  sont tracés en fonction du logarithme de la fréquence ( $\log f$ ),
- La représentation de Nyquist : la partie imaginaire de l'impédance  $-Z_{Im}$  est tracée en fonction de la partie réelle de l'impédance  $Z_{Re}$  sur un repère orthonormé en coordonnées cartésiennes.

Ces deux modes de représentation de l'impédance sont complémentaires. La représentation de Bode sera préférée lorsque des informations observées à haute fréquence sont masquées dans la représentation de Nyquist.

### • Analyse graphique des données d'impédance

D'autres représentations sont parfois utilisées pour accéder graphiquement à certains paramètres [98]. Dans le cas où le système étudié présente une chute ohmique significative ( $R_e$  élevée), la partie haute fréquence du spectre est masquée. Pour avoir une meilleure lisibilité des phénomènes se déroulant dans ce domaine de fréquence, il est possible de tracer une représentation de Bode modifiée en utilisant les relations suivantes :

$$\phi_{adj} = \tan^{-1} \left( \frac{Z_{Im}}{Z_{Re} - R_e} \right) \quad \text{Eq II. 7}$$

$$|Z|_{adj} = \sqrt{(Z_{Re} - R_e)^2 + Z_{Im}^2} \quad \text{Eq II. 8}$$

Quand l'utilisation d'un élément de phase constante CPE (*Constant Phase Element*) dans un circuit électrique équivalent s'avère nécessaire, il est intéressant de tracer le logarithme de la partie imaginaire en fonction du logarithme de la fréquence. La valeur du paramètre  $\alpha$  est alors extraite graphiquement en mesurant la pente de la courbe dans le domaine de fréquence associée au comportement CPE (Figure II. 9a).

Une autre présentation des diagrammes d'impédance peut s'avérer intéressante : le tracé du logarithme de la capacité effective  $Q_{\text{eff}}$  en fonction du logarithme de la fréquence (Figure II. 9b).  $Q_{\text{eff}}$  s'obtient de la manière suivante :

$$Q_{\text{eff}} = \sin\left(\frac{\alpha\pi}{2}\right) \frac{-1}{Z_{\text{Im}}(2\pi f)^\alpha} \quad \text{Eq II. 9}$$

L'asymptote à la courbe donne la valeur du coefficient  $Q$  dans le domaine de fréquence correspondant (Figure II. 9b).

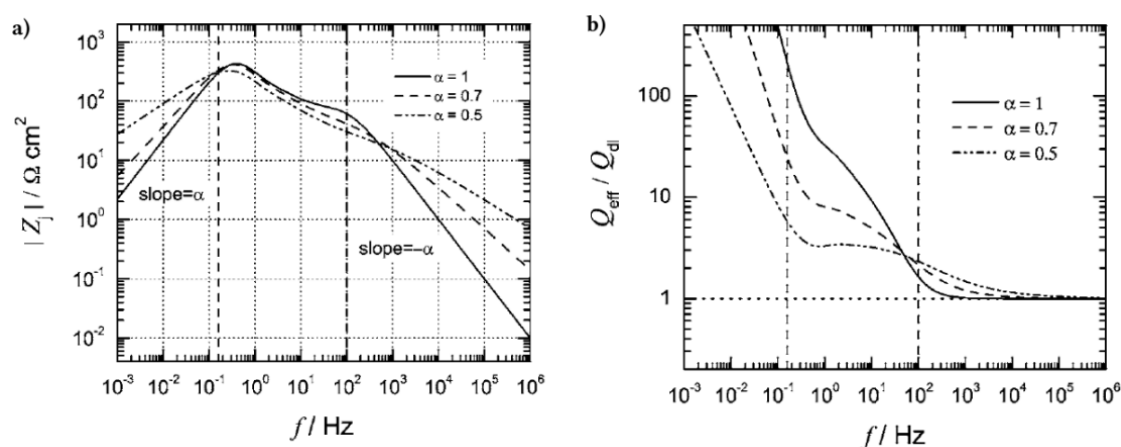


Figure II. 9 a) Détermination du paramètre  $\alpha$  à partir de la pente de la courbe dans la représentation de la partie imaginaire en fonction du logarithme de la fréquence. b) Tracé du rapport de la capacité effective sur la capacité de double couche  $Q_{\text{eff}}/Q_{\text{dl}}$  en fonction du logarithme de la fréquence [98].

- **Exploitation des résultats par l'utilisation des circuits électriques équivalents**

Chaque phénomène physico-chimique se déroulant à l'interface électrode de travail/électrolyte peut être modélisé par un composant électrique constituant un circuit électrique équivalent (CEE). Les éléments électriques les plus courants sont : la résistance  $R$ , la capacité  $C$  et l'inductance  $L$ .

L'impédance permet ainsi de décomposer un processus de corrosion en plusieurs étapes élémentaires par des constantes de temps. La partie suivante recense les différents phénomènes interfaciaux susceptibles d'intervenir dans la modélisation.

a) Transfert de charge

L'interface électrode/électrolyte est représentée par l'association d'une résistance et d'une capacité en parallèle (RC) (Figure II. 10a). La densité de courant globale  $i$  peut être considérée comme la contribution de la densité de courant faradique  $i_F$  et de la densité de courant capacitif, correspondant à la charge de la double couche  $i_{\text{dc}}$  :

$$i = i_F + i_{\text{dc}} \quad \text{Eq II. 10}$$

Dans ce circuit, C correspond à la capacité de double couche et R à la résistance de transfert de charges. Elle est traversée par le courant faradique. Lorsque la fréquence tend vers l'infini ( $\omega \rightarrow \infty$ ), la valeur de l'impédance totale du système correspond à la résistance de l'électrolyte  $R_e$ .

#### b) Hétérogénéités de surface

Parfois les diagrammes d'impédance montrent un écart à l'idéalité, ce qui rend difficile la modélisation de la boucle semi-capacitive, caractéristique d'une capacité. La boucle est aplatie et décentrée (Figure II. 10b). La modélisation du circuit électrique équivalent ne peut plus être définie par une capacité pure. Elle est exprimée par un CPE. Son impédance, selon le cas, présente différents formalismes. Dans ce travail, la formule suivante a été utilisée [97] :

$$Z_{\text{CPE}} = \frac{1}{Q(j\omega)^\alpha} \quad \text{Eq II. 11}$$

Où Q est une constante indépendante de la fréquence ( $\Omega^{-1} \cdot s^\alpha \text{ cm}^{-2}$ ) liée aux propriétés à la fois de la surface et aux espèces électroactives. L'exposant  $\alpha$ , donné sans dimension, traduit l'intensité de la déviation par rapport à un système idéal. En fonction de sa valeur ( $-1 < \alpha < 1$ ), le CPE renseigne sur le mode de contrôle cinétique : si  $\alpha$  est proche de :

- 0, il s'agit d'un phénomène résistif,
- 1, il s'agit d'un phénomène capacitif,
- 0,5, le processus réactionnel est piloté par un phénomène diffusionnel
- -1, l'impédance est proche de l'inductance.

Un CPE traduit ainsi les hétérogénéités de surface ou de volume, d'origine morphologique, chimique ou électrique, qui affectent la distribution des lignes de courant.

#### c) Diffusion

Lorsque les phénomènes réactionnels aux interfaces sont limités par le transport de matière notamment par la diffusion des espèces, le diagramme d'impédance se caractérise par une droite formant un angle à  $45^\circ$  avec l'axe des abscisses (Figure II. 10c).

Le schéma électrique équivalent de l'impédance totale peut s'interpréter par une capacité de double couche  $C_{dc}$  en parallèle avec l'impédance de diffusion Warburg (notée W) montée en série avec la résistance de transfert de charge  $R_t$ .

#### d) Relaxation (inductance)

Le diagramme de Nyquist peut aussi se caractériser par la présence de boucles inductives. Le schéma électrique de l'impédance totale (Figure II. 10d) est alors modélisé par une résistance R et une inductance L, en parallèle avec les éléments RC. L'apparition de boucles inductives à hautes fréquences s'explique facilement par des artefacts instrumentaux, ou par l'inductance de l'électrode, ou par l'inductance des fils de connexion. En revanche, l'interprétation du comportement inductif dans les basses fréquences reste complexe. Nous proposons ici quelques explications.

La présence d'une réponse inductive (associé à l'élément RL) liée à la corrosion ou à la dissolution des interfaces. Ceci indique la présence d'absorbats à la surface du métal, qui ont tendance à s'adsorber et se désorber dans les réactions anodiques et cathodiques [99]. Dans le cas d'un alliage susceptible de se passiver sous conditions transpassives, l'élément RL est associé aux processus d'adsorption/désorption durant la formation du film passif et à la relaxation des produits de corrosion à la surface de l'électrode. La boucle semi-capacitive aux hautes fréquences est liée au transfert de charge dû à la dissolution du métal.

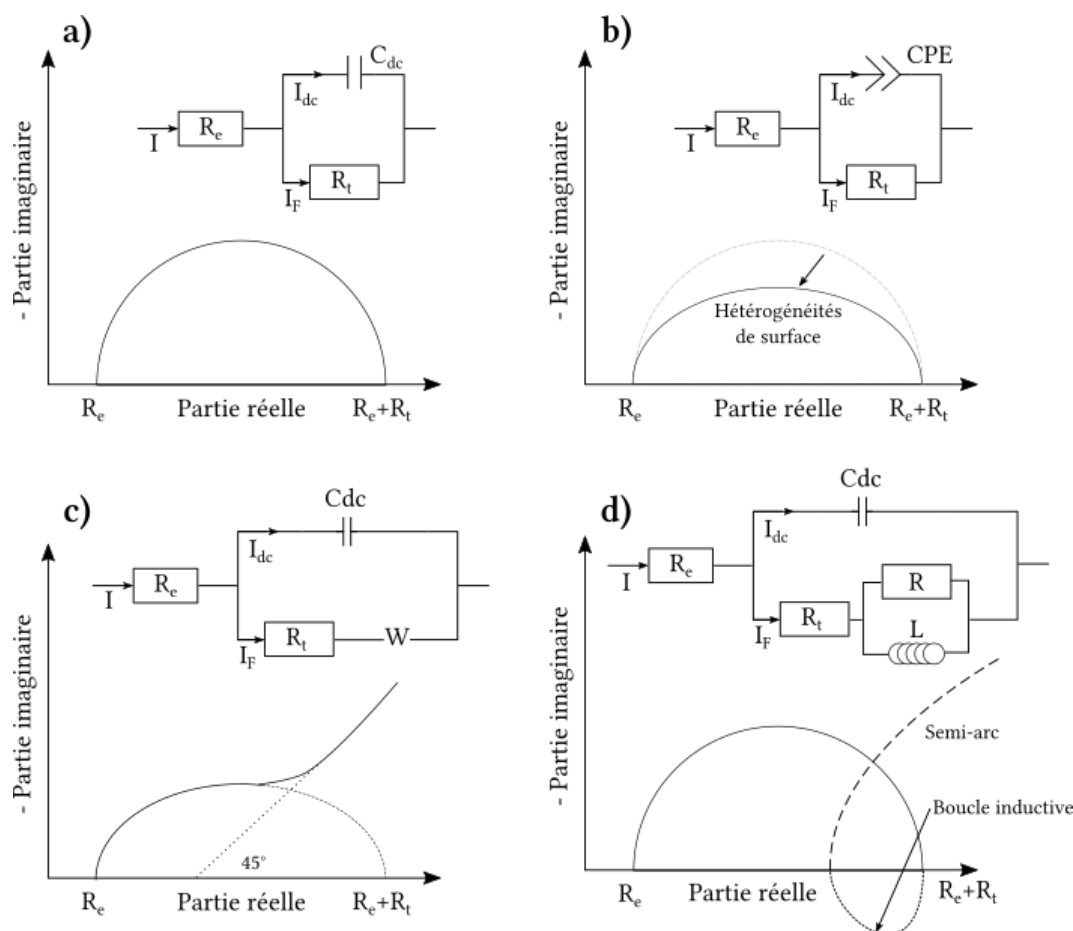


Figure II. 10 Représentations dans le plan de Nyquist, de l'impédance électrochimique et schémas des circuits électriques équivalents, dans le cas : a) d'un processus de transfert de charge de l'interface électrode/électrolyte, b) d'une électrode de surface hétérogène, c) d'une couche de diffusion d'épaisseur infinie limitant le transfert de charge et d) d'un métal dans des conditions transpassives.

- **Conditions expérimentales des paramètres de mesures de SIE**

Les données obtenues par mesure de spectroscopie d'impédance électrochimique ont été analysées avec le logiciel EC-Lab V10.40 en ajustant les courbes à partir d'un circuit électrique équivalent (CEE). Les mesures de SIE ont été effectuées selon la séquence expérimentale suivante (Tableau II. 3) :

- La première étape consiste à obtenir un état de surface contrôlé et reproductible du matériau étudié. Elle est fonction du matériau étudié : dans le cas des mesures d'électroactivité du milieu (Chapitre 3), l'électrode de platine subit un décapage cathodique à  $-900$  mV/ECS de 1 heure pour enlever les oxydes. Dans le cas de l'étude du comportement électrochimique du CoCrMo, l'échantillon métallique ne subit pas de polarisation potentiostatique. Il est immergé en solution durant 1 heure et le potentiel  $E_{OCP}$  est relevé. Après ce délai, une première mesure SIE est effectuée à  $-900$  mV/ECS ou à l' $E_{OCP}$  pour le platine et le CoCrMo respectivement. Ici on suppose que les composés organiques ou les oxydes à la surface du platine ont une réactivité électrochimique mineure.
- La seconde étape est identique pour les deux matériaux. Il s'agit de polariser le système électrochimique pendant 4 heures à l'un des potentiels d'intérêt  $E_p$  suivants:  $-600$ ;  $-450$ ;  $-150$  +300



ou +700 mV/ECS. Par la suite, une seconde mesure SIE est ensuite effectuée au potentiel de polarisation choisi.

Les mesures SIE ont été effectuées dans la gamme de fréquences de 100 mHz à 10 kHz avec 9 points/décades et avec un signal AC de 10 mV d'amplitude autour du potentiel appliqué.

Tableau II. 3 Séquence expérimentale des mesures de SIE des systèmes Platine/milieu et CoCrMo/milieu.

Étapes	1	2
Platine/milieu (Chapitre III)	Décapage à -900 mV/ECS + SIE	Polarisation au potentiel $E_p$ : -600; -450; -150 +300 ou +700 mV/ECS
CoCrMo/milieu avec ou sans cellules (Chapitres IV et V)	$E_{OCP}$ + SIE	+ SIE à $E_p$

#### II. 4.3 Synthèse des conditions opératoires pour les mesures électrochimiques

Les techniques électrochimiques ont été appliquées à trois systèmes d'étude correspondant aux trois chapitres suivant de la thèse. Ainsi le système « Platine/milieu » est utilisé pour l'étude électrochimique du milieu physiologique de référence (le RPMI-1640), le système « CoCrMo/milieu » pour l'étude de la passivité du CoCrMo dans le milieu sous conditions statiques ou dynamiques et enfin le système « CoCrMo/RPMI-1640/cellules » permet de déterminer l'influence des cellules en culture sur le CoCrMo et la cytotoxicité de l'alliage métallique.

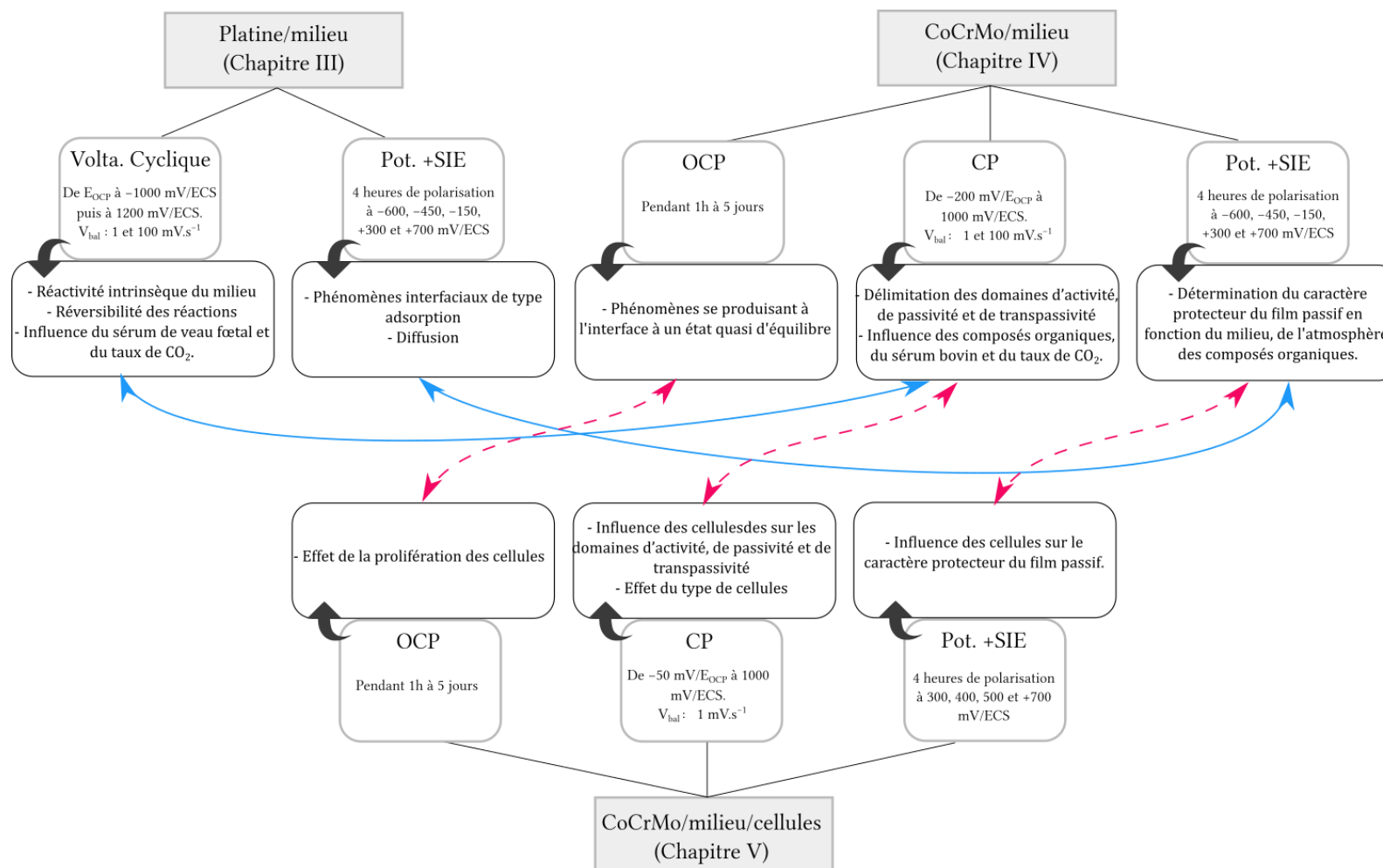


Figure II. 11 Ensemble des séquences expérimentales électrochimiques réalisées et des objectifs pour les trois systèmes « Platine/milieu », « CoCrMo/milieu » et « CoCrMo/milieu/cellules ». Les techniques électrochimiques regroupent la voltampérométrie cyclique (Volta. Cyclique), les essais potentiostatiques (Pot.), le suivi du potentiel de corrosion (OCP), la courbe de polarisation (CP) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Les flèches représentent les comparaisons établies entre les résultats obtenus.

## II. 5 TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION DES MATÉRIAUX

La surface des échantillons (Platine, CoCrMo et UHMPW-PE) a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB) et analysée par spectroscopie de photoélectrons X (XPS).

### II. 5.1 Observation de surface par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique utilisée pour observer finement l'état de surface (topographie et structure) des matériaux et les cellules cultivées. Le fonctionnement du microscope est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux (électrons secondaires (SE), des électrons rétrodiffusés (BSE) et de rayons X provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon.

- **Conditions opératoires**

Les observations ont été effectuées à l'aide de deux appareils : le Zeiss SUPRA™ 55-VP FEGSEM (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscope*) (Carl Zeiss AG) situé au Centre Lyonnais de Microscopie (CLYM) et le FEI Quanta 600 ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscope*) (FEI Company, Quanta™ 600, Tungsten W) situé au laboratoire LaMCoS. Le microscope Zeiss SUPRA™ 55-VP permet de faire des analyses chimiques de composition élémentaire des échantillons grâce à un spectromètre à rayons X à dispersion d'énergie (EDS). L'énergie des photons émis par excitation du matériau par le faisceau d'électrons est directement liée au numéro atomique de l'élément qui l'émet. Le système de microanalyse EDS est équipé d'un détecteur X-Max (MnK $\alpha$ , Oxford Instruments) de 80 mm<sup>2</sup> assurant une bonne résolution en énergie. Le microscope dispose également d'un système de diffraction rétrodiffusée d'électrons (EBSD), utilisé pour cartographier l'orientation des microstructures cristallines.

Les images obtenues à l'aide du détecteur d'électrons secondaires ont été réalisées sous une tension d'accélération de 5 à 10 kV, à une distance de travail de 10 à 13 mm et une ouverture de diaphragme de 60  $\mu$ m. Les images en contraste chimique ont été obtenues dans les mêmes conditions grâce à un détecteur d'électrons rétrodiffusés. L'observation des cellules au MEB requiert une préparation spécifique des échantillons (Cf Section II. 6.1).

### II. 5.2 Analyse de la composition de surface par spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) est utilisée pour analyser chimiquement et quantitativement la surface d'un matériau donné (Principe détaillé en Annexe 4). Cette technique informe sur l'état d'oxydation et sur la nature des liaisons des éléments analysés. Elle est donc adaptée à l'étude de la composition chimique du film passif de l'alliage CoCrMo.

- **Conditions opératoires**

Afin d'évaluer la composition chimique de surface, les échantillons métalliques ont été soumis à des analyses XPS à l'aide d'un spectromètre PHI Quantera SXM (Physical Electronics, Chanhassen, USA) équipé d'un analyseur d'énergie électronique hémisphérique 180° et d'une source de rayons X monochromatique Al K $\alpha$  (1486,6 eV) fonctionnant à 15 kV et 4 mA. La pression dans la chambre d'analyse a été maintenue à 7,1 x10<sup>-9</sup> mbar ou moins pendant la mesure. Les spectres XPS des

photoélectrons émis ont été collectés à partir d'une zone d'environ 200 µm de diamètre avec un angle de détection de 45° par rapport à la surface du substrat. La profondeur analysée a atteint 3 nm.

Les échantillons ont été étudiés avec une neutralisation de charge à double faisceau et la composante C-C/C/C-H du pic C<sub>1s</sub> a été ajustée à 285,0 eV. Les données ont été évaluées à l'aide du logiciel PHI MultiPak™. Les concentrations atomiques ont été déterminées à l'aide des facteurs de sensibilité fournis par le fabricant. Dans la synthèse de crête, la largeur de la ligne (largeur totale à la moitié du maximum) a été maintenue constante pour tous les composants dans chaque spectre particulier (largeur fixée à 1,4 eV pour l'évaluation de C<sub>1s</sub>). Les analyses XPS ont été réalisées par l'entreprise Science et Surface (Ecully, France). L'attribution des pics est indiquée dans le Tableau II. 4.

Tableau II. 4 Attribution de l'énergie de liaison aux éléments C, O, N, P, Cl, Na, Co, Cr, Mo et Ca.

Elément	Pic	Identification	Energie de liaison (eV)	Références
<b>C</b>	1s	C-C, C-H	285,0	[100–103]
		C-N, C-O	286,4-286,8	
		C=N, N-C=C	287,6	
		(C=O)-O(R, H), HCO <sub>3</sub> (carboxyle, ester)	288,2	
		CO <sub>3</sub>	289,4	
<b>O</b>	1s	O <sup>2-</sup> (Oxydes métalliques)	530,2	[73,104–109]
		C=O, HCO <sub>3</sub> (hydroxyle, hydroxyde)	531,6	
		Eau chimisorbée, adsorbat organique	533,9	
<b>N</b>	1s	NH	398,8	[103,106,110]
		Amide, amine	401,2	
<b>P</b>	2p	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	131,9-133,1	[100,106,111]
<b>Cl</b>	2p	Cl-C	196,6	[112]
<b>Na</b>	1s	NaCl	1070,4	
<b>Ca</b>	2p <sub>3/2</sub>	CaO, CaCO <sub>3</sub>	346,0	
	2p <sub>1/2</sub>	CaO	349,6-351,0	
<b>Cr</b>	2p <sub>3/2</sub>	Cr métal	573,8	[112–115]
		Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	576,3	
		Cr(OH) <sub>3</sub>	577,2	
		Cr <sup>+6</sup> et espèces hydratées	578,7	
<b>Co</b>	2p <sub>3/2</sub>	Co métal	778,1	[105,107,116–118]
		Co(III)	779,1	
		Co(II)	780,6	
		Co(II) et (III)	781,4	
		Composés organométalliques	783,6	
		Co(II) satellite	786,6	
<b>Mo</b>	3d <sub>5/2</sub>	Mo métal	227,7	[104,111,119–121]
		Mo(IV) (MoO <sub>2</sub> )	229,3	
		Mo(IV), Mo <sub>x</sub> (OH) <sub>y</sub> ou Mo(V)	231,3	
		Mo(VI)	232,7	

### II. 5.3 Synthèse des techniques expérimentales utilisées

Dans le cadre des essais électrochimiques, correspondant aux Chapitre III et IV, les principales techniques expérimentales de caractérisation des matériaux sont résumées dans le Tableau II. 5

Tableau II. 5 Techniques de caractérisation et d'analyse des matériaux (Platine, CoCrMo, UHMWPE) utilisées dans cette étude.

	Platine	CoCrMo	UHMWPE
MEB	Topographie, morphologie de surface et analyse chimique pointée par EDS.		
XPS	Composition des espèces adsorbées ou des précipités.	Composition du film passif.	X

## II. 6 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES CELLULES

L'interaction entre les matériaux constitutifs des prothèses articulaires et les cellules (ostéoblastes et macrophages) est au cœur du sujet. Des techniques propres à la biologie sont donc utilisées pour caractériser finement le métabolisme des cellules. Pour étudier la viabilité/prolifération et la cytotoxicité, il convient de couvrir un large champ de techniques qui part de l'observation par microscopie au dosage des réactifs spécifiques à la viabilité et la réaction inflammatoire.

### II. 6.1 Observation de la morphologie des cellules

La morphologie cellulaire a été évaluée à l'aide d'un microscope optique et électronique. La microscopie optique par réflexion permet de comptabiliser les cellules et de visualiser la morphologie générale tandis que la microscopie électronique à balayage fournit des observations à une échelle plus fine. Ce mode de visualisation nécessite toutefois une étape de fixation des cellules.

- **Conditions opératoires**

#### Microscopie optique numérique

Les images ont été prises au microscope numérique KH-7700 (HIROX) avant et après les tests électrochimiques pour évaluer les principaux changements quantitatifs des cellules.

#### Microscopie électronique à balayage

Les cellules n'étant pas conductrices, il faut les préparer selon la procédure suivante (Figure II. 12) :

- La « fixation » consiste à incuber les cellules avec un fixateur (glutaraldéhyde à 2% dans du tampon cacodylate de sodium à 0,1M pH 7,2).
- Les échantillons sont ensuite rincés avec le tampon cacodylate et déshydratés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 30% jusqu'à l'éthanol absolu).
- Pour que l'échantillon soit conducteur, celui-ci doit être recouvert d'une fine couche d'or d'environ 2 à 3 nm d'épaisseur avec un métalliseur sous atmosphère d'argon (90 secondes à 30 mA).
- Une fois la métallisation finalisée, l'échantillon est fixé sur un support spécifique au MEB (plot métallique) à l'aide d'un ruban de carbone adhésif double face.

Les images des cellules sont obtenues à l'aide du détecteur d'électrons secondaires sous une tension d'accélération de 6 kV, une distance de travail de 10-15 mm de l'échantillon, lui-même incliné à 5° et une ouverture de diaphragme de 60 µm.

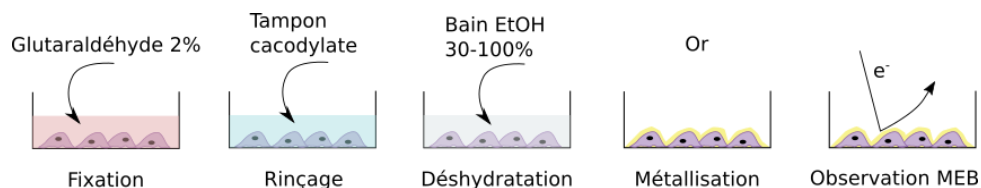


Figure II. 12 Etapes de préparation des cellules pour l'observation au MEB.

### II. 6.2 Etude de la viabilité/prolifération et de la cytotoxicité

#### II. 6.2.a Test de viabilité/prolifération par le réactif PrestoBlue™

- **Principe**

Lorsque les cellules sont vivantes et saines, elles maintiennent un environnement réducteur au sein de leur cytosol. En entrant dans une cellule vivante, la résazurine, présente dans le réactif PrestoBlue™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), est réduite par l'activité mitochondriale des cellules en résosfurine (Figure II. 13). Ainsi, un produit bleu et non fluorescent (résazurine) est transformé en produit rose et fluorescent (résosfurine), facilement détectable par fluorométrie. Le PrestoBlue™ évalue la capacité réductrice des cellules vivantes et par conséquent la prolifération cellulaire [122]. La quantité de produit analysé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. L'un des principaux avantages de ce test réside dans son caractère non toxique, contrairement à certains autres réactifs de ce type (Alamar Blue® et MTT) [122]. Il permet ainsi d'effectuer l'analyse sur les mêmes cellules aux différents temps tout au long de l'expérience.

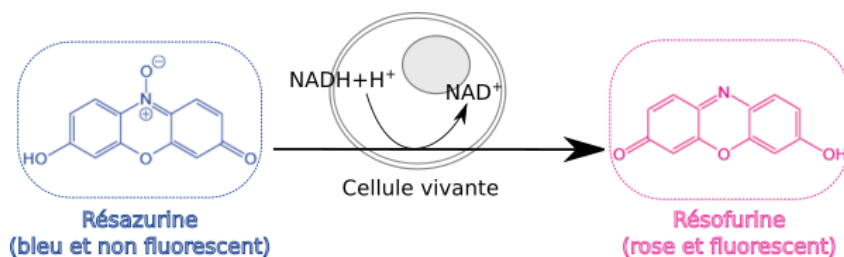


Figure II. 13 Réaction de réduction de la résazurine en résosfurine par l'activité mitochondriale des cellules vivantes. Le NAD intervient dans le métabolisme comme transporteur d'électrons dans les réactions d'oxydoréduction : le NAD<sup>+</sup> est la forme oxydée et le NADH est la forme réduite.

- **Conditions opératoires**

Le PrestoBlue™ a été utilisé pour évaluer la croissance et la viabilité des deux lignées cellulaires, mises en culture dans le RPMI-1640 durant 10 jours. Aux temps déterminés, les boîtes de pétri sont vidées de leur milieu de culture et rincées avec du DPBS puis 1 mL de RPMI-1640 avec 10% de PrestoBlue™ est ajouté. Les échantillons sont placés dans l'incubateur pendant 1,5 h. Le milieu résultant est homogénéisé par agitation et 100 µL de surnageant est prélevé pour analyse. La fluorescence est mesurée à l'aide du fluorimètre INFINITE PRO 200 (Tecan) à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et d'émission de 615 nm. Les valeurs de fluorescence obtenues sont soustraites à celles des puits sans cellules, pour s'affranchir de la fluorescence du milieu de culture cellulaire. Après chaque mesure, les cellules sont rincées deux fois et incubées jusqu'à la mesure suivante avec le milieu RPMI-1640.

Étant donné que l'absorbance est une grandeur difficilement perceptible, nous avons tenté de définir une corrélation quantitative entre le taux de conversion métabolique de la résazurine et le nombre de cellules (détaillé dans le Chapitre III).

## II. 6.2.b Test de viabilité par le sel de tétrazolium (MTT<sup>3</sup>)

### • Principe

L'activité mitochondriale d'une cellule est constante et, par conséquent, l'activité de plusieurs cellules est linéairement dépendante du nombre de cellules viables. Ces dernières réduisent le sel de tétrazolium (MTT) de couleur jaune par la succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan de couleur violette (Figure II. 14). Toute augmentation ou diminution du nombre de cellules viables peut être détectée en mesurant l'absorbance à 570 nm, caractéristique du formazan [123]. Ce dosage colorimétrique, largement utilisé, permet d'évaluer l'activité mitochondriale des cellules viables et par conséquent les effets cytotoxiques *in vitro* d'un réactif [124].

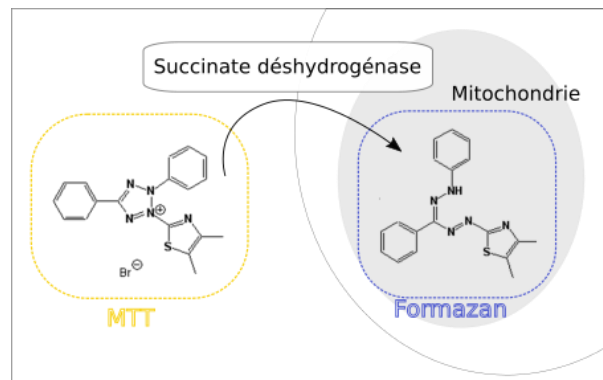


Figure II. 14 Réaction de réduction du MTT en formazan par l'activité mitochondriale des cellules vivantes.

### • Conditions opératoires

Le test de viabilité MTT a évalué la cytotoxicité induite par le CoCrMo sur les macrophages et les ostéoblastes. Pour ce faire, les cellules ont été cultivées directement sur des disques de CoCrMo. La viabilité des cellules a été évaluée après 4, 24, 48 et 72 heures. Ces mesures permettent d'évaluer la cytotoxicité du CoCrMo par simple contact en immersion longue. Une autre série d'essais a été réalisée de manière à accélérer la dissolution du matériau et ainsi de relarguer dans le milieu de culture des ions métalliques. Dans ce cas, différents potentiels ont été sélectionnés et appliqués au système CoCrMo/cellules durant 4 heures. Après ce délai, l'activité mitochondriale des cellules a été évaluée. Pour cela, le réactif MTT est ajouté aux échantillons (50 µl) et incubé pendant 3h ou 15h. Ce paramètre expérimental variable est le seul dont l'influence a été étudiée. Après ce laps de temps, il suffit de dissoudre les cellules et les mitochondries contenant les cristaux de formazan violet dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) et de réaliser un dosage optique par spectroscopie à 570 nm. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à un échantillon contrôle, c'est-à-dire sans la présence du CoCrMo.

<sup>3</sup> 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

## II. 6.2.c Test de cytotoxicité par la lactate déshydrogénase (LDH)

- Principe

La cytotoxicité *in vitro* des cellules a été évaluée par un dosage colorimétrique de l'activité de l'enzyme cytosolique, la lactate déshydrogénase (LDH), présente dans de nombreuses cellules. En cas d'endommagement de la membrane plasmique ou de lyse, la LDH est libérée dans le milieu de culture cellulaire. La LDH catalyse la conversion du lactate en pyruvate via la réduction de  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (Figure II. 15) [125]. Ensuite, la diaphorase, un médiateur d'électrons, utilise la  $\text{NADH}+\text{H}^+$  pour réduire un sel de tétrazolium<sup>4</sup> jaune en un produit de formazan rouge soluble dans l'eau avec une absorption maximale à 490 nm. Le dosage colorimétrique s'effectue par absorbance spectrophotométrique. Ainsi la formation du formazan est directement proportionnelle à la quantité de LDH sécrétée dans le milieu, et donc aux cellules mortes ou endommagées.

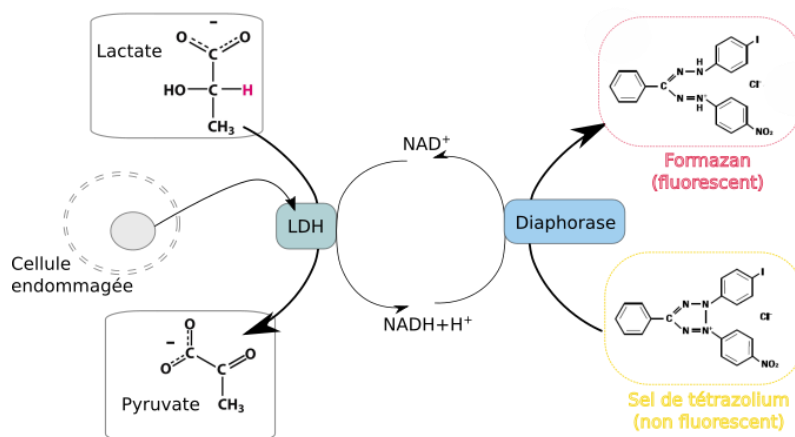


Figure II. 15 Principe du dosage colorimétrique de cytotoxicité par la LDH. Dans la première étape, la LDH libérée réduit le  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}+\text{H}^+$  par oxydation du lactate en pyruvate. Dans la seconde réaction enzymatique, le sel de tétrazolium jaune forme le formazan par catalyse.

- Conditions opératoires

Le kit Cytotoxicity Detection Assay LDH (Roche, Thermofisher) a été utilisé afin d'évaluer la cytotoxicité induite par le CoCrMo stimulé électrochimiquement ou non sur les macrophages et les ostéoblastes selon les mêmes conditions exposées précédemment. Seul 50  $\mu\text{l}$  de surnageant est nécessaire pour mesurer l'activité de la LDH auquel est ajouté 50  $\mu\text{l}$  d'une solution de lactate, de diaphorase, de  $\text{NAD}^+$  et de sel de tétrazolium. Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 490 nm et à 680 nm. L'absorbance de l'échantillon correspond à la valeur d'absorbance mesurée à 490 nm, correspondant au formazan, soustraite de la valeur d'absorbance du milieu de culture RPMI-1640, lui-même coloré, mesurée à 490 nm et de la valeur d'absorbance à 680 nm, correspondant au signal de fond de l'appareil de mesure :

$$\text{Abs}_{\text{Ech}} = \text{Abs}_{490} - \text{Abs}_{\text{RPMI-1640 (490)}} - \text{Abs}_{680} \quad \text{Eq II. 12}$$

Le pourcentage de cytotoxicité, correspondant à la moyenne de trois essais, se calcule selon l'expression suivante :

<sup>4</sup> 2-(4-Iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-phényl-2H-tétrazolium chlorure



$$\% \text{ Cytotoxicité} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{Ech}} - \text{Abs}_{\text{Témoin négatif}}}{\text{Abs}_{\text{Témoin positif}} - \text{Abs}_{\text{Témoin négatif}}} \right) \times 100 \quad \text{Eq II. 13}$$

Où le « Témoin négatif » correspond aux cellules sans stimulation, cultivées en boîte de pétri, et le « Témoin positif » représente les cellules mortes après un traitement TritonX-100. Ce composé désintègre la membrane cellulaire de manière irréversible entraînant la mort cellulaire en quelques minutes selon la concentration [126].

### II. 6.3 Etude de la minéralisation des ostéoblastes

Les ostéoblastes en phase de minéralisation se caractérisent par l'induction de gènes associés à la production de la matrice extracellulaire (phosphatase alcaline, collagène de type 1, fibronectine, ostéopontine). Pour cela, les cellules ont été stimulées en présence d'acide ascorbique (5mg/mL) et de  $\beta$ -glycérophosphate (100 mM) de manière à ce que les pré-ostéoblastes deviennent des ostéoblastes matures capables de synthétiser la matrice extracellulaire. La minéralisation des ostéoblastes hFOB1.19 au contact avec l'alliage de CoCrMo a été étudiée pendant 14 jours en mesurant le taux de phosphatase alcaline et en colorant les dépôts calciques de la MEC.

#### II. 6.3.a Coloration des dépôts calciques au rouge d'alizarine

- **Principe**

Les alizarines sont des colorants végétaux naturels dérivés de la garance. Le rouge d'alizarine S est couramment utilisé en histologie pour mettre en évidence les dépôts calciques en se fixant au calcium par un processus de chélation [127]. Cette réaction permet la formation de rouge alizarine S-Calcium, composé biréfringent dont les dépôts apparaissent en rouge au microscope optique.

- **Conditions opératoires**

Au jour 14, les cellules ont été lavées une fois avec 1 mL de DPBS, fixées 20 min à 3,7% de paraformaldéhyde, puis rincées dans du DPBS et incubées dans 40 mM de rouge d'alizarine (pH 4,2 ; Sigma-Aldrich, A5533) pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées à l'eau trois fois et séchées à l'air. Enfin, 1 mL de chlorure de cétalpyridinium (100 mM) a été ajouté pendant au minimum deux heures pour solubiliser le colorant. L'absorbance est mesurée à 570 nm et le cétalpyridinium seul correspond au témoin.

#### II. 6.3.b Activité de la phosphatase alcaline (ALP)

- **Principe**

La phosphatase alcaline est une enzyme exprimée durant les phases initiales du processus de calcification (os et cartilage calcifiant). L'ALP est observée à la surface des cellules osseuses et dans les vésicules de la matrice et est retenue jusqu'à la formation d'ostéocytes précoces, ensuite elle diminue [128]. Chez l'homme, il existe plusieurs ALP nommés d'après les tissus où ils sont principalement exprimés. La phosphatase alcaline tissulaire non spécifique (TNAP) est la plus exprimée dans les os et de ce fait celle habituellement dosée [1]. Les autres présentent une expression tissulaire beaucoup plus restreinte. L'ALP a un certain nombre de fonctions différentes dans la minéralisation : **i**) elle peut servir de protéine liant

ou de transport le calcium ; **ii**) elle peut servir de générateur de phosphate libre ; **iii**) elle peut dégrader les inhibiteurs de minéralisation [129].

- **Conditions opératoires**

La mesure qualitative de l'activité de la phosphatase alcaline a été effectuée à l'aide du kit de phosphate alcaline (ab83369, Colorimetric). Il utilise du phosphate de p-nitrophényle (pNPP) comme substrat de phosphatase qui devient jaune lorsqu'il est déphosphorylé par l'ALP. La concentration et l'intensité de ce pigment reflètent l'activité de l'enzyme.

Les échantillons sont lavés avec 1 mL de DPBS, puis 1 mL de Nonidet NP40 0,2% (4°C) est ajouté par boîte de pétri avant de récolter les cellules avec un râteau. Afin d'extraire les multiples composés, les échantillons, subissent un traitement par ultrasons (sonication) puis ils sont centrifugés (5000 rpm, 5 min, 4°C). Le réactif est préparé à partir de 10 mM de pNPP, 0,56 M d' amino 2 méthyl 2 propanol 1 (AMP) et de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. Dans une plaque noire de 96 puits, 200 µl de surnageant et 10 µl de réactif sont ajoutés par puit. La plaque est ensuite chauffée à 37°C et la mesure d'absorbance est effectuée à 405 nm. Les valeurs sont converties à partir de la gamme étalon établie précédemment. La concentration est normalisée par la quantité de protéines. On obtient ainsi le rapport ALP/protéines exprimé en µmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> ou U.mg<sup>-1</sup>. Le contrôle représente des pré-ostéoblastes, c'est-à-dire des ostéoblastes non stimulés.

Comme précédemment, les ostéoblastes hFOB 1.19 ont été stimulés pour devenir des ostéoblastes matures capables de synthétiser la matrice extracellulaire puis l'activité de l'ALP a été mesurée pendant 14 jours.

## II. 7 CONCLUSION

Ce chapitre présente les matériaux, les solutions, les dispositifs et les protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail. Il a été montré que les dispositifs expérimentaux classiquement utilisés en électrochimie sont adaptables aux conditions de culture cellulaire. Toutefois, il y a un certain nombre de précautions à prendre pour que les mesures soient correctes (préparation de surface des échantillons, stérilité à respecter, ...).

Les deux chapitres suivants seront consacrés à l'étude de deux systèmes électrochimiques :

- Dans un premier temps, le développement expérimental électrochimique principal permet d'évaluer le comportement électrochimique d'un milieu de culture cellulaire biologique (Chapitre III).
- Dans un second temps, par substitution du platine avec le CoCrMo, le dispositif électrochimique permet d'établir l'interaction entre cet alliage métallique et un environnement biologique avec ou sans cellules. Les propriétés du film passif du CoCrMo et sa toxicité vis-à-vis des différentes cellules d'intérêt seront évalués (Chapitre IV).

---

# CHAPITRE III

## ETUDE DU MILIEU DE CULTURE BIOLOGIQUE

### RPMI-1640

---

Le milieu de culture cellulaire RPMI-1640 est utilisé dans le cadre de ce travail à la fois comme solution support au développement des cellules et comme électrolyte. Ce chapitre présente les caractéristiques biologiques et électrochimiques du RPMI-1640. Tout d'abord, ses capacités biologiques ont été approfondies en étudiant la prolifération et la viabilité de plusieurs lignées cellulaires. Par la suite, la réactivité électrochimique du RPMI-1640 a été définie par des techniques électrochimiques.

#### Sommaire

---

<b>III. 1 Introduction</b> .....	<b>43</b>
<b>III. 2 Notions bibliographiques sur les milieux de culture cellulaire</b> .....	<b>44</b>
III. 2.1 Définition .....	44
III. 2.2 Composition chimique .....	44
III. 2.3 Eléments de base d'un milieu de culture cellulaire .....	44
III. 2.3.a Les acides aminés, les protéines et les vitamines .....	44
III. 2.3.b Les sels minéraux et les oligo-éléments .....	45
III. 2.3.c Les éléments énergétiques : le glucose .....	46
III. 2.4 Eléments additionnés au milieu de culture cellulaire .....	46
III. 2.4.a Les antibiotiques .....	46
III. 2.4.b Le sérum .....	47
III. 2.4.c Le système tampon .....	47
III. 2.5 Influence de la composition chimique des milieux physiologiques simulés sur la réactivité des biomatériaux métalliques .....	49
III. 2.6 Synthèse générale .....	50
<b>III. 3 Evaluation biologique du RPMI-1640 par suivi de la viabilité cellulaire</b> .....	<b>51</b>
III. 3.1 Sélection du milieu de croissance approprié pour la culture <i>in vitro</i> .....	51
III. 3.2 Amélioration du protocole expérimental de viabilité Prestoblu <sup>TM</sup> par corrélation entre l'absorbance et le nombre de cellules .....	53
III. 3.3 Viabilité/prolifération à long terme des cellules dans le RPMI-1640 supplémenté .....	55
III. 3.4 Evaluation du caractère cytotoxique du PrestoBlue <sup>TM</sup> .....	55
III. 3.5 Synthèse de l'évaluation du RPMI-1640 en tant que milieu de croissance .....	57
<b>III. 4 Réactivité électrochimique du RPMI-1640</b> .....	<b>57</b>
III. 4.1 Conditions potentiodynamiques .....	57
III. 4.2 Conditions potentiostatiques .....	59
III. 4.3 Identification des espèces organiques électroactives .....	64
III. 4.3.a Le rouge de phénol et la glutamine .....	64
III. 4.3.b Analyse de surface de l'électrode de platine polarisée .....	65
<b>III. 5 Variables de la réactivité électrochimique du RPMI-1640</b> .....	<b>70</b>
III. 5.1 Influence du sérum de veau foetal SVF .....	70
III. 5.2 Contribution du dioxyde de carbone .....	72

III. 5.2.a	Conditions potentiodynamiques.....	73
III. 5.2.b	Conditions potentiostatiques.....	74
<b>III. 6</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>76</b>

---

### III. 1 INTRODUCTION

Les fluides physiologiques (liquide synovial, sang) sont des liquides difficilement reproductibles du fait de leur composition complexe et variable. Habituellement, les tests de corrosion et de biocompatibilité des biomatériaux métalliques sont effectués dans des solutions inorganiques simplifiées, limitées essentiellement à des solutions salines diluées [119,130–134]. Même si ces solutions permettent d'étudier précisément l'influence d'un élément sur la résistance à la corrosion des biomatériaux métalliques, elles limitent significativement la compréhension du vieillissement lorsqu'il s'agit d'intégrer les cellules. Biologiquement, il est impossible de cultiver des cellules dans ces milieux synthétiques. En effet, la croissance et la prolifération des cellules est concevable uniquement si ces conditions sont réunies :

- i) La présence d'éléments nutritifs tels que les acides aminés, les vitamines et les facteurs de croissance. L'ajout de ces éléments organiques est essentiel au fonctionnement du métabolisme cellulaire puisque les cellules ne peuvent pas les synthétiser,
- ii) L'apport contrôlé du dioxyde de carbone qui maintient une valeur de pH et une osmolarité dans des limites acceptables de la culture cellulaire.

Pour ces deux raisons, une proposition visant à améliorer les essais de corrosion des biomatériaux métalliques a été formulée en termes de représentativité des milieux. A cette fin, une des solutions conventionnellement utilisées en biologie, le RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), a été utilisée au lieu d'une solution saline. Son utilisation implique également la présence d'un incubateur pour maintenir une atmosphère adaptée à la culture cellulaire.

L'objectif de ce chapitre est d'établir les caractéristiques biologiques et électrochimiques du milieu RPMI-1640. L'effet des composés chimiques et organiques du RPMI-1640 et du taux de CO<sub>2</sub> a tout particulièrement été considéré :

- Dans un premier temps, nous avons évalué les caractéristiques biologiques du RPMI-1640 comme milieu de croissance cellulaire par des tests de prolifération/viabilité de plusieurs lignées cellulaires.
- Dans un second temps, nous avons étudié la réactivité intrinsèque spécifique du RPMI-1640, choisi pour sa composition chimique proche du sang.
- Dans un troisième temps, nous soulignons les contributions du CO<sub>2</sub> qui contrôle le pH du fluide du corps humain, et du sérum de veau fœtal et de l'albumine, éléments indispensables à la croissance cellulaire.

Des techniques électrochimiques telles que les courbes de polarisation, les tests potentiostatiques et la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été utilisées. Les tests électrochimiques ont été effectués à l'aide d'une électrode inerte de platine immergée dans le RPMI-1640. Comme ce métal est inerte, la réponse électrochimique incombe au milieu uniquement. L'analyse électrochimique a été complétée par des analyses EDX et de surface par XPS pour caractériser la composition chimique en surface.

Dès lors, cette recherche a pour finalité de sélectionner le milieu d'étude représentatif du milieu physiologique adapté aux conditions cellulaires et d'identifier son comportement électrochimique.

## III. 2 NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

Les milieux de culture cellulaire sont conçus pour assurer la viabilité des cellules. A cet égard, ils sont composés d'espèces organiques et inorganiques qui favorisent l'oxygénation, l'apport de nutriments et la régulation du pH du milieu. Etant donné que ce travail porte sur les interactions entre les biomatériaux et l'environnement physiologique, cette section identifie les contributions possibles du milieu qui peuvent intervenir sur les mécanismes de corrosion. De plus, l'évolution métabolique des cellules peut également interagir avec le milieu et le modifier.

Cette partie présente les espèces susceptibles de modifier le potentiel de l'environnement (oxygène dissous, présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicaux libres, pH), ou de fragiliser le film passif (pH, présence d'halogénures). Le RPMI-1640 est le milieu de culture cellulaire choisi pour structurer notre propos.

### III. 2.1 Définition

Un milieu de culture est un liquide ou un gel conçu pour permettre la croissance de microorganismes, de cellules ou de petites plantes. Il existe des milieux naturels, provenant uniquement de fluides biologiques d'origine naturelle et des milieux artificiels préparés par addition de plusieurs nutriments. Les milieux de culture cellulaire appartiennent à la deuxième catégorie.

### III. 2.2 Composition chimique

Un milieu de culture cellulaire est composé essentiellement de sels minéraux, d'acides aminés, de vitamines et d'éléments énergétiques, qui remplissent chacun une fonction spécifique (Tableau III. 1). Ces éléments agissent sur la croissance et l'adhésion des cellules, l'équilibre osmotique et le pH du milieu. Pour autant, d'autres éléments sont additionnés au milieu de culture cellulaire pour que les cellules puissent proliférer.

Tableau III. 1 Fonction des composants élémentaires et additionnés définissant un milieu de culture cellulaire.

Eléments de base	Fonction	Eléments additionnés	Fonction
Acides aminés	Croissance, viabilité	Antibiotiques	Antibactérien
Vitamines	Prolifération	Sérum	Croissance, adhésion
Sels minéraux	Equilibre osmotique, potentiel membranaire	Tampon	pH
Source carbone	Croissance, stress oxydant		

### III. 2.3 Eléments de base d'un milieu de culture cellulaire

#### III. 2.3.a Les acides aminés, les protéines et les vitamines

Les acides aminés, composants des protéines, ne peuvent pas être synthétisés par les cellules. Ils sont ajoutés directement dans le milieu biologique à des concentrations totales comprises entre 0,1 et 2mmol/L. Trois acides aminés représentent à eux seuls 40 % de l'ensemble des acides aminés : la glutamine, la glycine et l'alanine. La glutamine peut spontanément se dégrader en produits cytotoxiques sous exposition aux UV ou à la lumière visible [135]. De même, l'oxygène réagit avec les protéines en oxydant leurs acides aminés par la photo-oxydation et la photo-ionisation [136]. Au pH physiologique, les acides

aminés les plus sensibles à l'action de l'oxygène sont l'histidine, la tyrosine, la méthionine, la cystéine et le tryptophane. Les produits générés sont eux-mêmes des photo-sensibilisateurs qui peuvent générer à leur tour de l'oxygène [137,138]. Ces processus ont des conséquences négatives qui affectent la fonction cellulaire impliquant parfois des intermédiaires comme des espèces peroxydées et des radicaux libres.

Les protéines les plus couramment employées sont l'albumine et la fibronectine. L'albumine est la protéine majeure dans le sang et a l'affinité de se lier avec l'eau, les sels, les acides gras, les hormones et les vitamines. Elle permet d'éliminer convenablement les substances toxiques du milieu de culture. La fibronectine est quant à elle nécessaire à l'adhésion cellulaire, qui dépend de la composition chimique du matériau utilisé comme support de culture [139,140].

Les vitamines sont une source élémentaire à la prolifération cellulaire. Le sérum constitue la source majeure de ces éléments.

### III. 2.3.b Les sels minéraux et les oligo-éléments

Les sels inorganiques ont plusieurs rôles physiologiques :

- i) maintenir l'équilibre osmotique des cellules,
- ii) tamponner le milieu au pH physiologique,
- iii) maintenir le potentiel membranaire des cellules et,
- iv) agir comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et l'attachement cellulaire [141].

Le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le chlorure, et le phosphate sont nécessaires pour la multiplication des cellules. Le sodium est l'élément prépondérant dans le sang et dans les liquides extracellulaires du corps (130-155 mmol L<sup>-1</sup> dans le plasma et le liquide synovial ; 79-91 mmol L<sup>-1</sup> dans le sang [81]). Il détermine l'équilibre hydrique de l'organisme et maintient l'hydratation des cellules (avec le potassium).

Les cellules ont également besoin d'oligo-éléments inorganiques tels que le fer, le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse, le molybdène et le vanadium [142]. Leur rôle est essentiel dans la fabrication des protéines, le transport de l'oxygène et dans la régulation du taux de sucre par l'insuline. A titre d'exemple, le cuivre ou le chrome sont utilisés comme accélérateurs de réactions enzymatiques (catalyseurs).

Même si les concentrations de sels inorganiques sont globalement proches entre les différents milieux de culture cellulaire, il n'y a pas d'harmonisation au sujet des concentrations en ions calcium, magnésium, sulfates et phosphates (Figure III. 1).

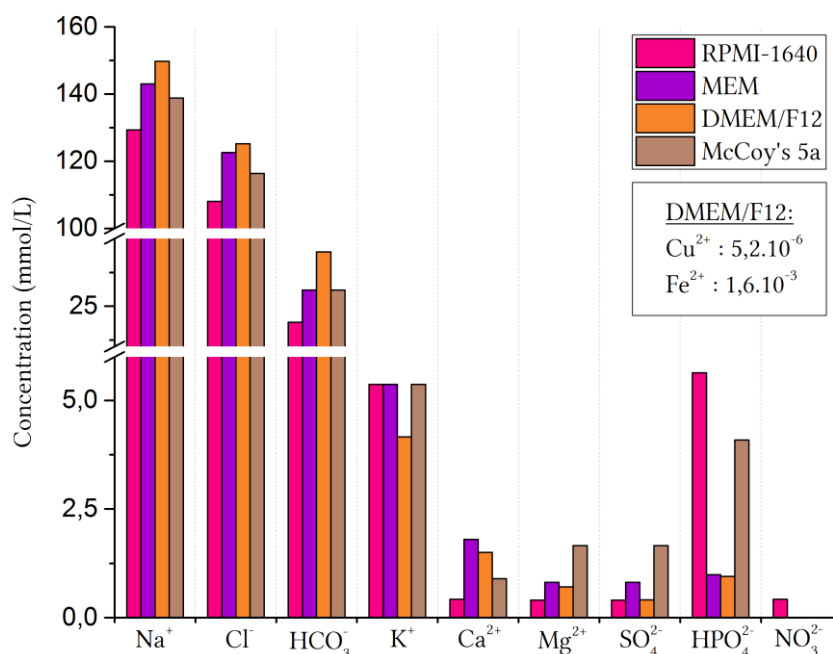


Figure III. 1 Composition chimique des sels inorganiques des milieux de culture cellulaire RPMI-1640, MEM, DMEM/F12 et McCoy's 5a.

### III. 2.3.c Les éléments énergétiques : le glucose

Le glucose est le principal substrat carboné des cellules. Il est présent à 5,5 mmol/L dans le sang et correspond à un état d'hyperglycémie au-delà de 7 mmol/L. A ces taux élevés, le glucose se fixe aux groupements amines des protéines par réaction de glycation non enzymatique [143]. Elle conduit à la formation de produits de glycation avancées, qui modifient la structure et la fonction des protéines, entraînent la production de radicaux libres oxygénés et induisent un état de pro-inflammation et un stress oxydant intracellulaire [143–146]. Au-delà de 10 mmol/L, le niveau est proche des cas pré-diabétiques. Pour autant, certains milieux de culture cellulaire, comme le DMEM et le DMEM/F12, présentent des concentrations élevées de glucose (entre 17,5 et 25,0 mmol/L) ce qui pourrait induire un stress oxydatif et carbonylé aux cellules et ainsi perturber leur développement

### III. 2.4 Eléments additionnés au milieu de culture cellulaire

Pour que la culture cellulaire soit possible, le milieu doit être complété de trois éléments indispensables : des antibiotiques qui empêchent les contaminations bactériennes, le sérum qui apporte des éléments de croissance essentiels et un tampon qui limite les fortes variations du pH, mortelles pour les cellules.

#### III. 2.4.a Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance qui provoque la destruction de certaines bactéries pour éviter leur prolifération. Dans le cas de culture cellulaire, l'antibiotique doit être compatible avec les autres éléments du milieu et ne doit pas affecter la viabilité ou le métabolisme des cellules [147]. Les antibiotiques utilisés au cours de cette étude sont :



- *La pénicilline* : Il s'agit d'une toxine obtenue à partir de moisissures de genre *Penicilium*. Il existe plusieurs types de pénicilline que l'on classe selon leur spectre d'action. Les pénicillines appartiennent à la famille des antibiotiques  $\beta$ -lactamines.
- *La streptomycine* : Il s'agit d'un antibiotique antibactérien cytostatique et cytotoxique appartenant à la classe des aminosides.

### III. 2.4.b Le sérum

Le sérum est un des composants les plus essentiels du milieu de culture. Le sérum le plus largement utilisé en culture cellulaire est le sérum de veau fœtal (SVF) (ou FBS pour *Fœtal bovin serum*) car il possède la plus forte capacité de croissance et le plus faible taux d'immunoglobuline (IgG) [148].

La composition de sérum animal est difficilement connue avec exactitude car elle varie selon le sexe, l'âge, l'état de santé et le régime alimentaire des animaux donneurs. A mesure que les animaux vieillissent, les niveaux de protéines totales, de globulines et de cholestérol augmentent [148]. Pour autant les constituants du SVF sont présents dans une gamme restreinte de concentrations (Tableau III. 2). Le sérum est source de nombreux éléments tels que les acides aminés, les protéines, les vitamines, les facteurs de croissance et d'adhésion, les minéraux, les hormones et les oligo-éléments. Il joue un rôle étendu sur la croissance, la prolifération, la protection et la perméabilité des membranes cellulaires. Le sérum, d'origine animale ou humaine sert aussi au transport des lipides, des minéraux, de la globuline et des facteurs de croissance.

Tableau III. 2 Composition biochimique du sérum de veau fœtal SVF [148].

pH	Osmolalité (mOsm/kg)	Acide urique ( $\mu\text{mol/L}$ )	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chlorure (mmol/L)	Calcium (mmol/L)	Phosphore (mmol/L)
7,1-7,5	298-325	89-190	66,5-71	9,7-12,7	93-101	3,4-3,7	2,9-3,7
LDH (U/l)	Phosphatase alcaline (U/l)	Cholestérol (mmol/L)	Glucose (mmol/L)	Albumine (mmol/L)		Globulines $\alpha, \beta, \gamma$ (g/L)	Protéines (g/L)
409-605	165-247	0,7-1,5	4,6-7,3	18-43		5-35	30-45

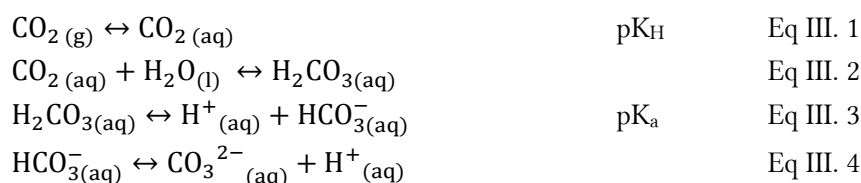
Le taux de protéines dans un milieu de culture additionné de sérum atteint 6,2 à 10 g/L au lieu de 0,05 à 1 g/L sans sérum. Parmi elles, l'albumine est la principale, représentant environ 60 % de la teneur totale en protéines. Elle protège les cellules contre les forces de cisaillement (générées par la manipulation de pipettes), transporte les petites molécules et se lie aux métaux lourds et aux pyrogènes [148,149]. Au pH de 7,4, l'albumine porte une charge négative (point isoélectrique de 4,7), et elle se lie facilement aux ions tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$  ainsi qu'aux acides gras libres, aux vitamines et aux hormones.

### III. 2.4.c Le système tampon

L'organisme consomme des sucres et des graisses, utilise de l'oxygène et produit de l'eau et du gaz carbonique. Lorsque cette réaction n'est pas complète, il se forme des acides faibles métaboliques, entraînant une diminution du pH sanguin, ce qui constitue une agression contre les cellules. Pour

neutraliser les charges acides, l'organisme utilise des systèmes tampons plasmatiques. Les ions  $H^+$  libérés de l'activité métabolique sont neutralisés dans le sang par des bases faibles. Le système tampon sanguin le plus actif est le tampon  $CO_2$ /bicarbonate qui représente 75 % de la capacité tampon. Le cycle de respiration fournit la quantité majeure de  $CO_2$ , qui est dissous dans le sang. Le  $CO_2$  stabilise le pH à des valeurs compatibles avec l'activité cellulaire, soit entre 7 et 7,8 ( $10^{-7}$  et  $1,56 \cdot 10^{-8}$  mol/L).

En solution, le  $CO_2$  réagit avec l'eau pour former de l'acide carbonique  $H_2CO_3$ , un acide faible, qui se dissocie dans une moindre mesure en bicarbonate (ou hydrogénocarbonate)  $HCO_3^-$  (Eq III. 1-3). A des valeurs de pH élevées ( $> 6$ ),  $HCO_3^-$  se dissout davantage en  $H^+$  et en ion carbonate  $CO_3^{2-}$  selon l'équation III. 4. Cette dernière dissociation se produit normalement dans une très faible mesure. Le  $CO_2$  en solution atteint un équilibre avec le  $CO_2$  en phase gazeuse (Figure III. 2). L'apport d'ions  $H^+$  aboutit à la production de  $CO_2$  tandis que l'augmentation de  $CO_2$  entraîne la dissociation de l'acide carbonique en ions  $H^+$  et bicarbonate.



L'équilibre du tampon bicarbonate s'exprime par l'équation d'Henderson-Hasselbalch :

$$pH = pK_a + pK_H + \log \frac{[HCO_3^-]}{PCO_2} \text{ avec } pK_a = 6,10 \text{ et } pK_H = 1,61 \text{ à } 37^\circ C$$

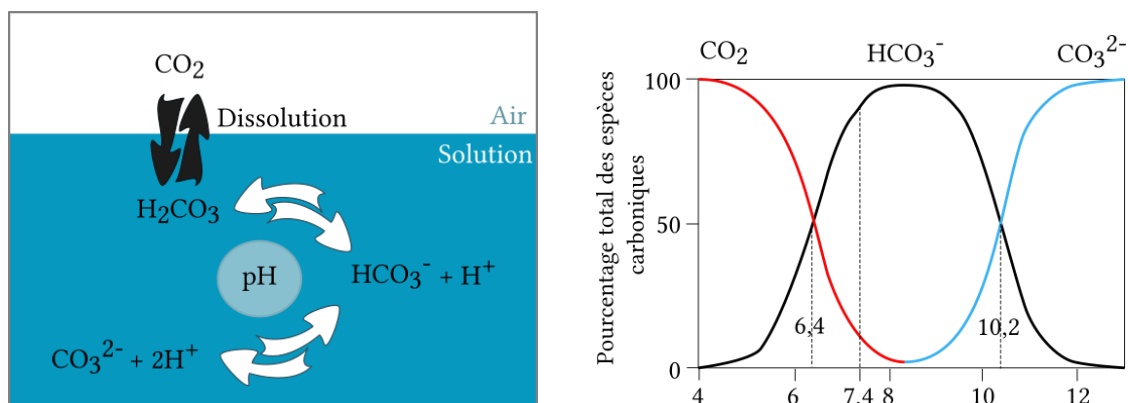


Figure III. 2 Le mécanisme de contrôle du pH des milieux de culture, basé sur le système tampon bicarbonate.

En culture cellulaire, on utilise un incubateur pour injecter 5%  $CO_2$  dans l'atmosphère d'une pression atmosphérique moyenne de 1013 hPa, ce qui signifie que la pression partielle de  $CO_2$  correspond à :

$$PCO_2 = 5\% Patm = 5,06 \text{ kPa} \quad \text{Eq III. 5}$$

Ainsi, le pH de la solution dépend de la concentration en ions carbonates présents en solution. Dans le cas du RPMI-1640 (23,81 mmol/L de  $HCO_3^-$ ) le pH est de :

$$pH = 6,10 + 1,6 + \log \frac{23,81 \cdot 10^{-3}}{0,05} = 7,4 \quad \text{Eq III. 6}$$

Une autre équation (Eq III. 4) proposée par Kassirer et Bleich permet également d'établir l'interdépendance entre les ions  $H^+$  et  $HCO_3^-$  et la pression partielle de dioxyde de carbone  $PCO_2$ . Cette relation donne rapidement la concentration de l'un en connaissant les deux autres :

$$[H^+](\text{nmol/L}) = 24 \times \frac{PCO_2(\text{kPa})}{HCO_3^-(\text{mmol/L})} \quad \text{Eq III. 7}$$

Appliquée au RPMI-1640, on obtient une concentration de  $[H^+]$  de 37,8 nmol/L soit un pH de 7,4. Les concentrations moyennes de bicarbonate et d'ion hydrogène dans le sang sont respectivement de 24 mmol/L et 35 nmol/L.

L'augmentation de la concentration de  $CO_2$  en phase gazeuse augmente la quantité de  $CO_2$  dissous dans le milieu de culture, ce qui augmente la concentration de  $H_2CO_3$  et abaisse le pH. En revanche, si la concentration de  $CO_2$  en phase gazeuse est abaissée, le pH augmente en raison de la réaction inverse.

D'autres systèmes complètent l'action tampon du bicarbonate pour maintenir le pH sanguin dans la limite de la viabilité cellulaire : l'hémoglobine, les protéines plasmatiques qui représente 24% de la capacité tampon ( $HPr/Pr^-$ ,  $pK=6,8$ ) et les phosphates inorganiques représentant moins de 1% ( $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ ,  $pK=7,2$ ) [150]. En théorie, le système tampon phosphate est plus efficace que le bicarbonate sauf qu'il n'existe que peu de phosphate dans le plasma (2 milliéquivalents par litre).

### III. 2.5 Influence de la composition chimique des milieux physiologiques simulés sur la réactivité des biomatériaux métalliques

Le recensement des espèces chimiques ci-dessus indique que le milieu de culture cellulaire contient des éléments susceptibles de provoquer la corrosion des prothèses métalliques. Ainsi, il convient de connaître dans un premier temps, les propriétés électrochimiques de ces solutions simulées. Le rôle de certains composés organiques (albumine [151,152] fibrinogène [153]) a déjà été étudié en détail, mais dans des solutions inorganiques salines. Seul un petit nombre d'études a utilisé des solutions enrichies en composés organiques, tels que les milieux de culture cellulaire. La solution d'étude simulant le fluide physiologique dispose d'éléments, présent dans les nutriments ou le tampon susceptibles de nuire à l'intégrité des biomatériaux métalliques :

1. Les ions chlorures sont à l'origine de l'amorçage de la corrosion par piqûre. D'autres ions présents peuvent aussi s'adsorber sur la surface métallique et modifier la résistance à la corrosion de ces alliages [111,119,151]. Les concentrations en sels inorganiques sont globalement respectées (Tableau III. 3), mais la concentration en chlorure est souvent surestimée et peut, par conséquent, limiter significativement la compréhension du vieillissement des biomatériaux voire fausser leur classements vis-à-vis de la résistance à la corrosion [151].

Tableau III. 3 Concentration molaire ionique des milieux généralement utilisés pour tester les biomatériaux métalliques et du plasma et du liquide synovial (en mmol/L).

Concentration (mmol/L)	Plasma (Sérum) [81]	Fluide synovial [81]	DPBS	Hank's solution	Kokubo SBF [154]	RPMI-1640
$Na^+$	130-155	133-139	140,9	142,9	142,0	129,3
$Cl^-$	77-86	87-138	139,6	144,1	148,0	108,0
$HCO_3^-$	24-30	-		4,2	4,2	23,8
$K^+$	4,0-5,6	3,5-4,5	3,8	5,4	5,0	5,4
$Ca^+$	4,0-5,5	2,3-4,7		1,7	2,5	0,4
$Mg^{2+}$	1,6-2,2	-		2,5	1,5	0,4
$SO_4^{2-}$	130-155			0,5	0,5	0,4
$HPO_4^{2-}$	1,6-2,7		9,2	0,4	1,0	5,6

2. Les molécules organiques telles que les protéines, les vitamines et le glucose agissent comme nutriments pour les cellules. Ces éléments ont la faculté de s'adsorber sur les surfaces solides. Elles forment une couche modifiée par plusieurs facteurs comme : **i)** les propriétés de surface du matériau (topographie, physico-chimie, mouillabilité, charges) [155,156], **ii)** la solution protéique (concentration, pH, force ionique, synergies) [157], **iii)** le temps d'exposition [158] et **iv)** la température.

L'adsorption des biomolécules peut accélérer la dissolution de certains métaux en raison de leur capacité à former des complexes solubles (effets chélatants) avec les ions métalliques [159–165]. La couche protéique adsorbée semble réduire le transport d'oxygène ou inhiber la réaction de l'hydrogène en générant une barrière de diffusion [166,167]. En présence de deux ou plusieurs protéines, il se produit également un processus dynamique d'échange de protéines régi par le transport de matière et l'affinité d'une protéine donnée avec la surface [168]. La compétition protéique en surface peut conduire à l'évolution du film passif des biomatériaux métalliques et modifier ainsi ses propriétés protectrices. Certaines protéines contrôlent également l'adhésion cellulaire à la surface solide [169].

L'un des composés organiques les plus étudiés est l'albumine (ou Bovin Serum Albumin BSA) présent à 60% dans le sérum de veau foetal [163,168]. Cette protéine agit comme un inhibiteur cathodique ou accélère au contraire la dissolution des biomatériaux métalliques en fonction de la nature chimique du métal (Ti, Zr [134,153], Co [152,170,171], SS [101,172]) et de la chimie de la solution (présence de phosphates). Par exemple, dans le cas de l'acier 316L, l'albumine augmente la vitesse de réaction cathodique et agit comme inhibiteur anodique [173]. En présence d'alliage CoCrMo, l'albumine agit comme un inhibiteur cathodique [152,170,171]. Ainsi, la vitesse de réaction de réduction de l'oxygène et, par conséquent, la réaction d'oxydation associée est ralentie. Il en résulte une diminution globale du taux de corrosion ainsi qu'une diminution du potentiel de corrosion libre. L'albumine modifie également la cinétique d'adsorption d'autres espèces telles que les phosphates [134,152]. Lee et al. [174] ont proposé que l'adsorption de protéines, comme l'albumine, peut limiter les sites de nucléation du phosphate de calcium.

3. L'équilibre acido-basique du système physiologique est une exigence fondamentale au développement des cellules. Il régule la plage de pH et limite les effets des déchets acides produits par les cellules. Le pH physiologique est régulé par le rapport  $[\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$  et est lié à la quantité de  $\text{CO}_2$  dissous dans le sang [175,176]. Très peu d'études ont considéré le tampon carbonate et portent davantage sur le tampon phosphate. Pourtant, le carbonate et le bicarbonate accélèrent la dissolution de certains alliages métalliques [177–179]. Par ailleurs, la corrosion est contrôlée par la pression partielle de l'oxygène [72].

Avant de procéder à des tests de biocompatibilité impliquant des alliages métalliques ou/et des cellules (Chapitres III et IV), nous avons établi le comportement électrochimique de la solution d'étude.

### III. 2.6 Synthèse générale

Le milieu de culture cellulaire présente une source incontestée de divers éléments qui favorisent la viabilité et la croissance des cellules mises en culture :

- Les éléments organiques (acides aminés, glucose, vitamines) sont ajoutés au milieu en raison de l'impossibilité pour les cellules de les synthétiser. Pour autant, ces éléments bénéfiques peuvent se révéler nocifs : la dégradation des acides aminés engendre des produits cytotoxiques et le

glucose peut entraîner un stress oxydant et un état inflammatoire aux cellules. Les protéines, d'une grande importance dans la composition du sérum animal, ont une affinité avec les métaux lourds et certains ions.

- Les éléments inorganiques interviennent dans l'équilibre chimique et pH du milieu de culture cellulaire. Les éléments carbonates neutralisent les ions  $H^+$  résultant de l'activité des cellules.

### III. 3 EVALUATION BIOLOGIQUE DU RPMI-1640 PAR SUIVI DE LA VIABILITE CELLULAIRE

Cette partie a pour but d'évaluer le rôle du RPMI-1640 en tant que milieu de croissance pour les cellules. Pour cela, des tests de prolifération/viabilité de trois lignées cellulaires ont été réalisés dans quatre milieux de culture dont le RPMI-1640. La viabilité a été évaluée avec le PrestoBlue™ qui, contrairement aux autres tests de viabilité/prolifération (MTT), est un réactif qui ne tue pas les cellules en fin de réaction. Cette spécificité permet de réduire le nombre de cellules à utiliser, ce qui est avantageux notamment dans le cas de cellules sensibles. De plus, il s'agit d'un réactif économique pour l'étude de la biocompatibilité de nouveaux matériaux, puisqu'ils sont souvent disponibles en faible quantité. Néanmoins, certaines incertitudes sont susceptibles de remettre en question les caractéristiques avantageuses du PrestoBlue™, ainsi que la méthode d'obtention des résultats :

- ✓ La viabilité par PrestoBlue™ est comparée à des témoins avec et sans cellules et ne se réfère pas à une courbe d'étalonnage. Comment corrélér l'absorbance au nombre de cellules pour comparer plusieurs lignées cellulaires entre elles ?
- ✓ Etant donné que la réduction de résazurine en résosufurine résulte de l'activité mitochondriale des cellules, dans quelle mesure le métabolisme des cellules est-il affecté par cette réaction ? Par conséquent quel doit être le temps imparti entre chaque mesure de viabilité ?

Ces questionnements concernant le protocole expérimental et l'analyse des résultats du PrestoBlue™ sont discutés à partir des résultats de viabilité/prolifération des lignées cellulaires obtenus en milieu RPMI-1640.

#### III. 3.1 Sélection du milieu de croissance approprié pour la culture *in vitro*

Chaque lignée cellulaire doit être cultivée dans un milieu recommandé par le fabricant. Ainsi, les trois types de cellules sélectionnées pour cette étude nécessitent trois milieux de culture différents : les ostéoblastes hFOB1.19 dans le DMEM/F12, les ostéoblastes Saos2 dans le McCoy's 5a et les macrophages RAW264.7 dans le MEM. Cependant, comme mentionné plus haut, chaque milieu apporte une concentration variable de nutriments, ce qui peut modifier le développement cellulaire. Le but de cette partie est de sélectionner le milieu de culture qui provoque le moins de dérèglement métabolique pour les trois cellules d'intérêt.

La viabilité/prolifération cellulaire a été mesurée par le réactif PrestoBlue™ après 1, 4, 7 et 10 jours dans les trois milieux de culture cellulaire recommandés et le milieu RPMI-1640, car il est habituellement utilisé dans le laboratoire MATEIS. La Figure III. 3 présente les valeurs d'absorbance, proportionnelles au nombre de cellules obtenues pendant 10 jours. Les résultats des tests de prolifération mettent en évidence que les milieux de culture affectent le développement des cellules différemment selon les types de cellules. Les ostéoblastes Saos2 et hFOB1.19 suivent une courbe de croissance similaire, où le nombre de cellules est relativement constant jusqu'à J7 suivi d'une croissance plus marquée à J10 (Figure III. 3 b et c). Celle-ci est davantage favorisée dans le milieu RPMI-1640, suggérant que ce milieu de culture

favorise la croissance et la prolifération des ostéoblastes. Les macrophages RAW264.7 suivent la même évolution de prolifération que les ostéoblastes mais avec un pic de croissance marqué plus tôt, à partir de J7 (Figure III. 3 a). Deux milieux de culture augmentent significativement le nombre final de macrophages vivants : le RPMI-1640 et le McCoy's 5a.

Au temps final J10, toutes cellules confondues, le DMEM/F12 présente le moins de cellules vivantes par rapport aux autres milieux de culture cellulaire (Figure III. 3). Cette différence s'explique par la composition chimique. Effectivement, le DMEM/F12 se caractérise notamment par la présence d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  et par un taux élevé de glucose. Il est connu que les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  inhibent la prolifération de cellules, diminuent la viabilité des cellules et activent la formation d'espèces réactives à l'oxygène [180]. D'autre part, les ions cuivre présentent une meilleure affinité avec les biomolécules ce qui augmente leur caractère toxique [9]. Le taux de glucose élevé du DMEM/F12 peut aussi être à l'origine d'un état pro-inflammatoire ou un stress oxydant intracellulaire causant une plus faible croissance cellulaire (Section III. 2.3.c).

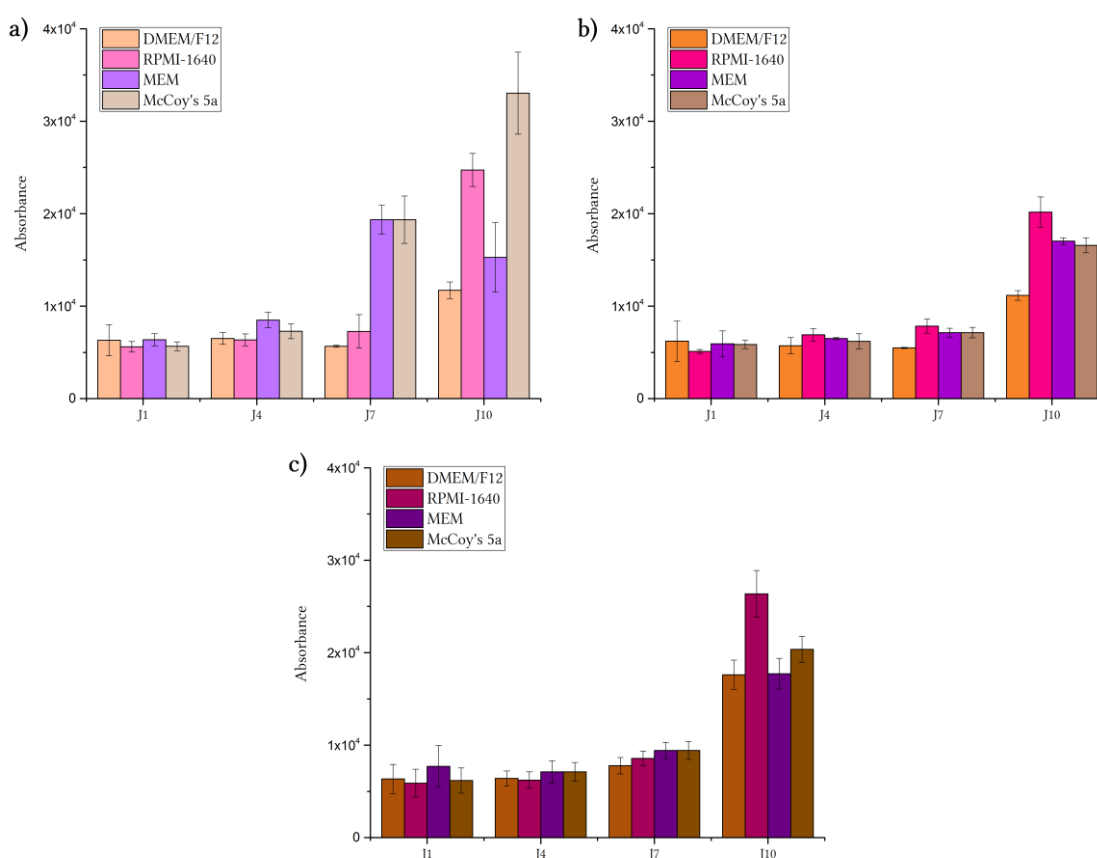


Figure III. 3 Influence des milieux de culture cellulaire DMEM/F12, RPMI-1640, MEM et McCoy's 5a sur la prolifération des cellules a) RAW264.7, b) Saos2, c) hFOB1.19 mesurée par PrestoBlue™.

Le RPMI-1640 a tendance à favoriser la prolifération des cellules Saos2, hFOB1.19 et RAW264.7. Suite à ces tests préliminaires de viabilité des cellules, le RPMI-1640 a été choisi comme milieu de culture cellulaire de référence pour toute cette étude.

### III. 3.2 Amélioration du protocole expérimental de viabilité Prestoblue™ par corrélation entre l'absorbance et le nombre de cellules

Etant donné que l'absorbance fait référence au taux de conversion métabolique de la résazurine, il serait plus judicieux de convertir les résultats en fonction du nombre de cellules pour faciliter l'interprétation des résultats. En résumé, il s'agit d'effectuer un étalonnage préalable permettant de convertir la valeur d'absorbance, caractéristique d'un type de cellules dans un milieu de culture, au nombre de cellules vivantes.

Les cellules Saos2 et hFOB1.19 ont été mises en culture dans du RPMI-1640 supplémenté avec une densité d'ensemencement de 0,2 à  $2,7 \cdot 10^5$  cellules/puits. Après 24 h d'incubation, le temps que les cellules adhèrent, une mesure de viabilité par PrestoBlue™ est réalisée (Figure III. 4). Les cellules sont ensuite décollées avec ajout de trypsine (agent enzymatique de dissociation cellulaire) et sont comptées de la même manière que lors de l'ensemencement, c'est-à-dire à l'aide d'un compteur cellulaire. Les valeurs d'absorbances sont comparées au nombre de cellules mesuré ensemencement (Figure III. 4).

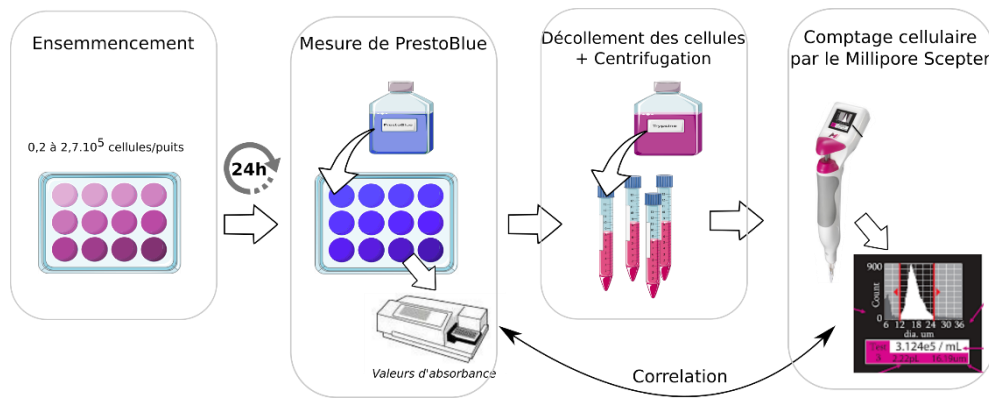


Figure III. 4 Protocole permettant d'établir la corrélation entre valeurs d'absorbance et nombre d'ostéoblastes.

La Figure III. 5 montre que le nombre de cellules vivantes des Saos2 et hFOB1.19 mises en culture dans le RPMI-1640 supplémenté peut être corrélé à la valeur d'absorbance obtenu à partir de l'essai de viabilité Prestoblue™. Les données sont reliées entre elles par une relation exponentielle  $y=ae^{bx}$ . Les paramètres a et b sont du même ordre de grandeur quelles que soient les cellules, ce qui suggère que ces deux types de cellules ont une croissance similaire. Après 24 h de culture, le nombre de cellules mesuré était largement supérieur au nombre initial, lors de l'ensemencement (résultats non montrés). Cela suggère que soit les ostéoblastes prolifèrent rapidement dès les premières 24 heures soit que des débris cellulaires sont comptabilisés comme des cellules vivantes faussant ainsi le nombre réel de cellules.

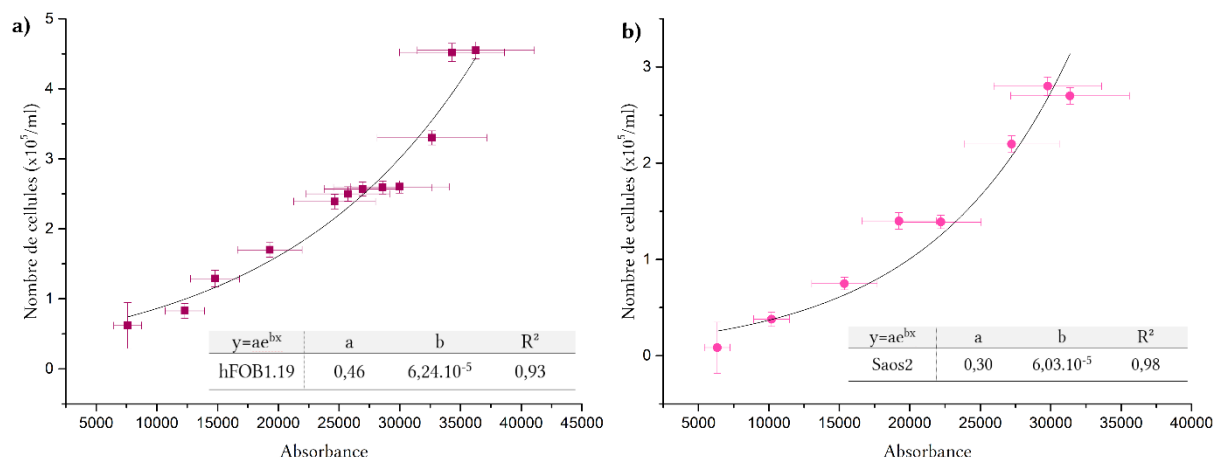


Figure III. 5 Corrélation exponentielle ( $y=ae^{bx}$ ) reliant le nombre de cellules vivantes (y) a) hFOB1.19 et b) Saos2 et l'absorbance (x) obtenue après ajout du réactif PrestoBlue™. Les cellules sont cultivées dans le RPMI-1640 en incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Cette étape d'étalonnage, simple à mettre en place mais non présente dans la bibliographie, permet d'exprimer non plus l'absorbance, mais un nombre de cellules en fonction du temps. Ainsi, cette relation permet de corréliser des essais de viabilité/prolifération par PrestoBlue™ de mêmes conditions expérimentales (cellules, milieu), dont les temps de mesure sont dissemblables. Dans cette étude, il a été possible d'établir la prolifération des cellules ostéoblastes dans le RPMI-1640 supplémenté durant dix jours en comparant quatre séries de tests. Les mesures de viabilité ont été effectuées pour le Test 1 à J1, J2 et J6 ; le Test 2 à J1, J2, J3, J4 ; le Test 3 à J1, J4, J8, J10 et le Test 4 à J2 et J8.

La Figure III. 6 montre que le nombre de cellules vivantes augmente jusqu'à 200 000 et 600 000/puits pour les Saos2 et les hFOB1.19 respectivement après 10 jours de culture. A un jour donné, le nombre de cellules obtenus à partir des différentes séries de tests sont similaires. Ces résultats confirment que l'étalonnage permet de comparer des essais de viabilité réalisés à différents temps de mesure. Par conséquent, il est désormais possible d'établir la prolifération d'un type de cellule dans un milieu de culture donné comme référence à des tests ultérieurs.

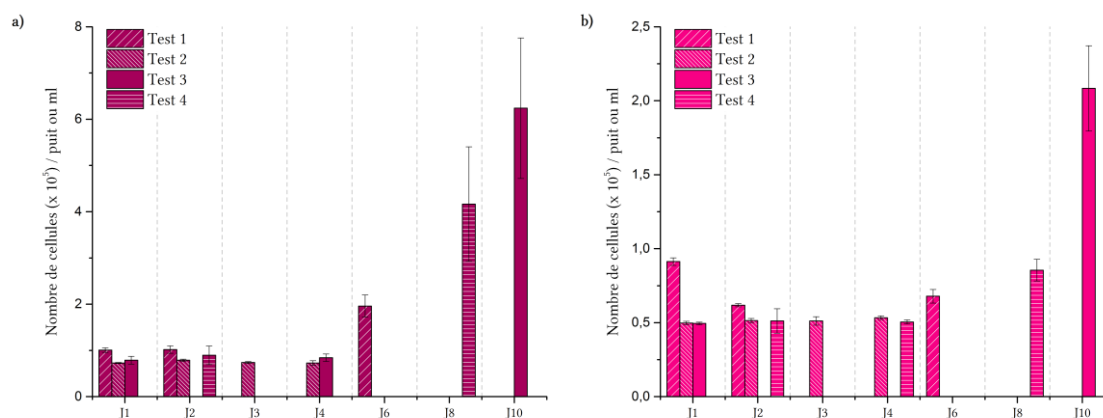


Figure III. 6 Comparaison des tests de viabilité des cellules hFOB1.19 (a) et Saos2 (b) cultivées dans le RPMI-1640 supplémenté pendant dix jours. Le nombre de cellules est obtenu par conversion de l'absorbance par une relation exponentielle.



### III. 3.3 Viabilité/prolifération à long terme des cellules dans le RPMI-1640 supplémenté

Grâce à l'étape d'étalonnage proposée et validée précédemment, il est également possible de comparer plusieurs types cellulaires cultivés dans le même milieu de culture. A partir de l'étalonnage de chacune des trois lignées hFOB1.19, Saos2 et RAW264.7, la viabilité et par conséquent le nombre de cellules vivantes après 10 jours de culture dans le RPMI-1640 a été évalué. Les résultats sont présentés à la Figure III. 7 et correspondent à la moyenne d'au moins deux tests de viabilité/prolifération.

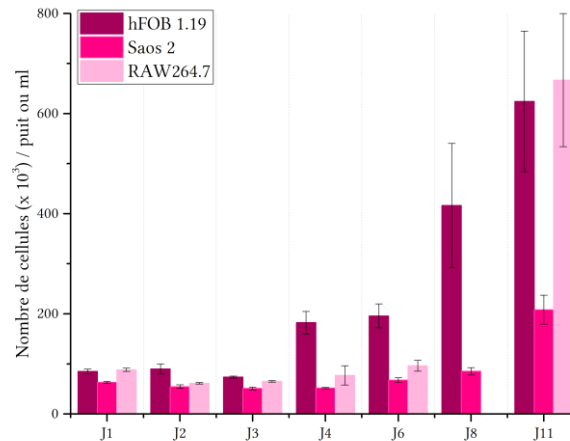


Figure III. 7 Nombre de cellules cultivées dans le RPMI-1640 supplémenté pendant dix jours obtenus par le test PrestoBlue™. Les valeurs sont obtenues après conversion des valeurs d'absorbance par une équation de type exponentielle.

Durant les trois premiers jours de culture, les cellules sont peu nombreuses (inférieure à 100 000) et diminuent légèrement en nombre. Au-delà de J4, les cellules prolifèrent mais diffèrent en nombre selon le type de cellules. Les Saos2 présentent la plus faible croissance, atteignant à peine 200 000 cellules après 10 jours de culture dans le RPMI-1640 supplémenté. Concernant les cellules hFOB1.19 et RAW264.7, leur prolifération est nettement à la hausse puisqu'elles atteignent 600 000 et 700 000 cellules après 10 jours. Ainsi, cette étude centrée sur la prolifération des cellules dans le RPMI-1640 supplémenté a permis d'une part de sélectionner les ostéoblastes qui sont les moins affectés par le milieu, les hFOB1.19, et d'autre part d'établir une courbe de croissance à long terme pour chaque cellule dans le RPMI-1640.

### III. 3.4 Evaluation du caractère cytotoxique du PrestoBlue™

L'une des interrogations relative au protocole expérimental du PrestoBlue™ porte sur ses effets secondaires sur le métabolisme des cellules et plus largement sur son caractère cytotoxique. L'objectif de cette partie est de déterminer si la réduction de résazurine en résosfurine due à l'activité mitochondriale des cellules influe sur la viabilité/prolifération des cellules.

Le PrestoBlue™ étant commercialisé comme un marqueur de viabilité non toxique, nous avons voulu estimer le temps minimum nécessaire entre deux mesures pour ne pas altérer l'activité mitochondriale des cellules. Pour cela, des mesures de viabilité/prolifération par PrestoBlue™ ont été réalisées une ou deux fois à différents temps sur les ostéoblastes humains hFOB1.19. La Figure III. 8 présente les conditions expérimentales : les séries dénommées J2, J4 et J8 correspondent à une seule mesure de viabilité aux temps analogues tandis que les séries J2+J4, J4+J8 et J2+J8 correspondent à deux mesures par PrestoBlue™ espacées de 2, 4 et 6 jours respectivement.

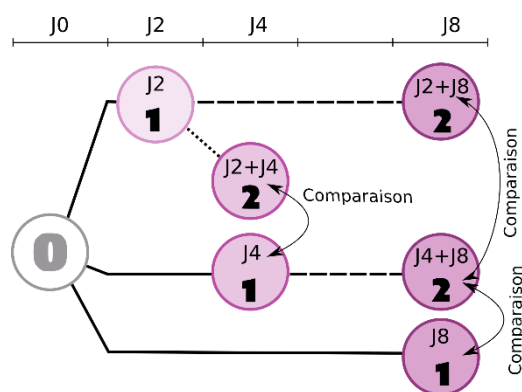


Figure III. 8 Conditions expérimentales des tests d'évaluation du caractère cytotoxique du PrestoBlue™ indiquant le nombre de mesures effectuées et le nombre de jours après l'ensemencement.

La Figure III. 9 présente les résultats de viabilité/prolifération pour les cellules hFOB1.19 cultivées dans le RPMI-1640 supplémenté. Lorsque les cellules ont subi une seule mesure de PrestoBlue™, le nombre des cellules augmente de  $1,02 \cdot 10^5$  (J2) à  $2,5 \cdot 10^5$  (J4) à  $6,7 \cdot 10^5$  (J8). Les cellules ayant subi une mesure de PrestoBlue™ à J2 puis à J4 (J2+J4) sont nettement moins nombreuses ( $1,3 \cdot 10^5$ ) que celles à J4 ( $2,5 \cdot 10^5$ ). Il s'avère que deux tests de PrestoBlue™ espacés seulement de deux jours impactent la viabilité des cellules. De même, le nombre de cellules mesurées à J8 après 4 ou 6 jours de délais (J4+J8 et J2+J8) montre une nette diminution au regard de la mesure effectuée une seule fois à J8. La différence est de  $4 \cdot 10^5$  cellules.

Ainsi, les cellules soumises à deux mesures consécutives de PrestoBlue™ espacées de 2 à 6 jours décroissent de 50 à 63%. Ces résultats suggèrent que le PrestoBlue™ est un marqueur de viabilité qui influe de manière conséquente le métabolisme des cellules hFOB1.19 cultivées dans le RPMI-1640 supplémenté. Ces résultats mettent en évidence un possible caractère toxique du Prestoblue™ sur les cellules hFOB1.19. Par la suite, nous avons choisi d'utiliser d'autres marqueurs de la viabilité/prolifération tel que le MTT.

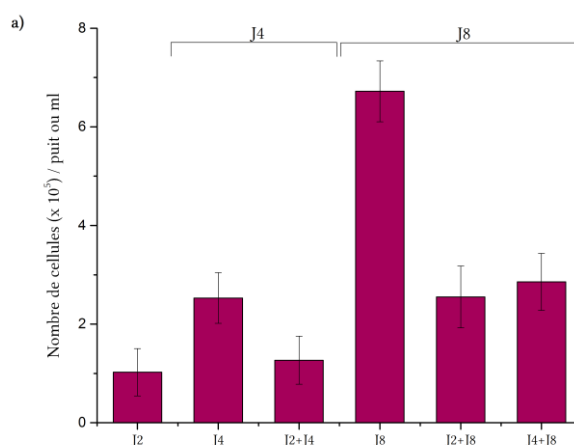


Figure III. 9 Viabilité/prolifération obtenu par PrestoBlue™ sur les cellules hFOB1.19 dans le RPMI-1640. Les séries dénommées J2, J4 et J8 correspondent à une seule mesure de viabilité aux temps analogues tandis que les séries J2+J4, J4+J8 et J2+J8 correspondent à deux mesures espacées de 2, 4 et 6 jours respectivement.

### III. 3.5 Synthèse de l'évaluation du RPMI-1640 en tant que milieu de croissance

L'objectif de cette partie était d'évaluer le RPMI-1640 en tant que milieu de croissance. Cela a permis d'établir que les ostéoblastes hFOB1.19 sont les cellules qui se développent le plus vite dans le RPMI-1640.

L'étude a également mis en évidence l'intérêt d'ajouter une étape d'étalonnage, non utilisée jusqu'à présent, pour faciliter la comparaison des tests de viabilité/prolifération Prestoblué™ entre différentes cellules dans un même milieu et entre les mesures de viabilité réalisées à des temps dissemblables. Ainsi, la courbe de croissance à long terme pour chaque cellule dans le RPMI-1640 a été établie et sert de référence.

Enfin, les effets secondaires potentiellement cytotoxiques du réactif Prestoblué™ sur le métabolisme des cellules ont été étudiés. Les résultats montrent que la viabilité est réduite entre 50 et 63% entre deux mesures de Prestoblué™ espacées de 2 à 6 jours pour les hFOB1.19 cultivés dans le RPMI-1640. Le Prestoblué™ n'a pas été retenu pour la suite de l'étude en raison de son potentiel caractère cytotoxique.

## III. 4 REACTIVITE ELECTROCHIMIQUE DU RPMI-1640

Etant donnée sa composition chimique complexe, il convenait d'identifier la réactivité électrochimique du milieu de culture cellulaire RPMI-1640 en comparaison avec d'autres milieux physiologiques simulés. Il s'agit de l'électroactivité du milieu, qui peut masquer ultérieurement celle du biomatériau lorsqu'il est étudié.

Des essais électrochimiques par méthode stationnaire et transitoire comme la SIE ont été mis en œuvre en utilisant une électrode inerte de platine. Ces tests ont été réalisés dans un incubateur : sous une atmosphère humidifiée maintenue à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Des analyses fines de surface par XPS ont été effectuées pour caractériser la nature chimique de la surface et compléter l'analyse électrochimique.

### III. 4.1 Conditions potentiodynamiques

Différents électrolytes sont comparés afin d'estimer la réactivité du RPMI-1640 supplémenté. La Figure III. 10 montre les voltammogrammes cycliques obtenus à partir d'une électrode de platine immergée dans trois solutions. La vitesse de balayage en potentiel est de 1 mV.s<sup>-1</sup> (Figure III. 10a) et 100 mV.s<sup>-1</sup> (Figure III. 10b). La solution DPBS et la solution synthétique RPMI-1640 ne contiennent pas de composés organiques, alors qu'ils sont présents dans la solution de RPMI-1640 supplémenté.

A 1 mV.s<sup>-1</sup> (Figure III. 10a), les voltammogrammes cycliques des trois milieux présentent un plateau de diffusion caractéristique de la réaction de réduction de l'O<sub>2</sub> dissous entre 0 et -600 mV/ECS. Dans le RPMI-1640 supplémenté, ce plateau est caractérisé par une densité de courant plus faible (en valeur absolue) que les deux autres solutions inorganiques. Cela suggère que certains composés organiques limitent les mécanismes de diffusion. Leur adsorption sur l'électrode de platine réduit probablement l'accessibilité de la surface active. En dessous de -700 mV/ECS, la réduction du proton (évolution de l'hydrogène) se produit avec le dégagement de gaz H<sub>2</sub> quelle que soit la solution. Le pic de réduction à -720 mV/ECS observé dans le DPBS a été identifié par Hudak et al. comme la réduction de phosphate H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [181] (Figure III. 10a).

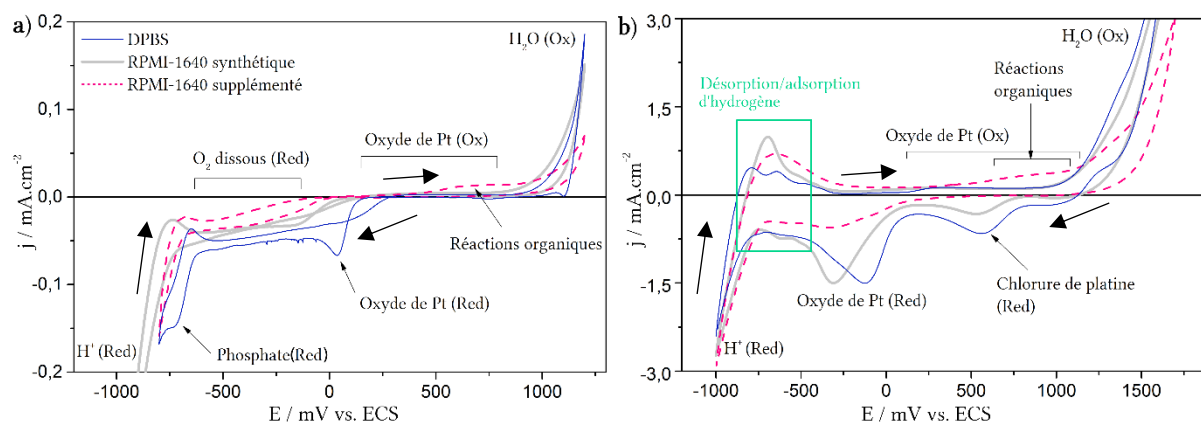


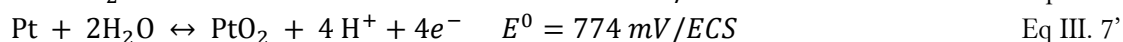
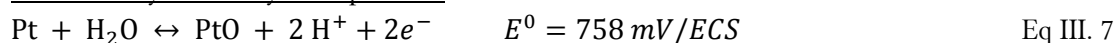
Figure III. 10 Voltammogrammes cycliques (1<sup>er</sup> cycle) d'une électrode de platine immergée dans le DPBS (ligne bleue), une solution synthétique du RPMI-1640 (ligne grise) et le RPMI-1640 supplémenté (pointillés roses) aux vitesses de balayage de 1 (a) et 100 mV.s<sup>-1</sup> (b). Les tests ont été réalisés dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

La partie positive des voltammogrammes des solutions inorganiques sont similaires et se caractérisent par une faible densité de courant jusqu'à 900 mV/ECS. Au-dessus de ce potentiel, l'augmentation de la densité de courant correspond à l'oxydation de l'eau. Le comportement du platine dans la RPMI-1640 supplémenté diffère de celui des solutions inorganiques. En effet, une oxydation proche de 700 mV/ECS a lieu dans le premier cas. Cela se traduit par un épaulement de la densité de courant, qui est attribué à l'oxydation ou à l'adsorption d'espèces organiques réactives à la surface du platine.

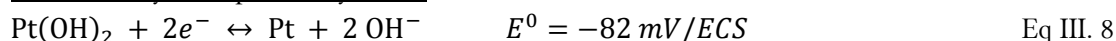
Augmenter la vitesse de balayage de 1 à 100 mV.s<sup>-1</sup> permet de mettre davantage en évidence certaines réactions d'oxydoréduction [182]. La Figure III. 10b confirme les réactions électrochimiques expliquées précédemment et met en évidence de nouvelles :

1. Le plateau d'O<sub>2</sub> présente une densité de courant plus faible dans le RPMI-1640 supplémenté que dans les autres solutions inorganiques à 100 mV.s<sup>-1</sup>. Ceci est principalement contrôlé par la cinétique de diffusion.
2. La vitesse de balayage plus élevée met en évidence un pic à -310 mV/ECS dans le DPBS qui n'est pas apparent à 1 mV.s<sup>-1</sup> et exacerbe le pic à -120 mV/ECS dans le RPMI synthétique. Cette signature électrochimique est attribuée à la réduction de l'hydroxyde de platine, qui se présente généralement en monocouche [183]. La nature du film d'oxydes est généralement composée de PtO, PtO<sub>2</sub>, Pt(OH)<sub>2</sub>, Pt(OH)<sub>4</sub> et PtO(OH)<sub>2</sub> [109,184–186] variant selon le potentiel, le pH [183] et le prétraitement de l'électrode. Les réactions impliquant des formes anhydres et hydratées de l'oxyde de platine sont régies par les équations suivantes [186,187].

Formes anhydres d'oxyde de platine :

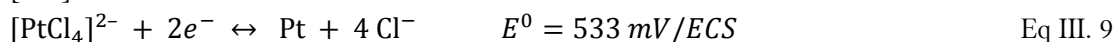


Formes d'oxyde de platine hydraté :



Tous les oxydes hydratés sont réduits à des potentiels bien inférieurs à la valeur thermodynamiquement réversible mentionnée par Pourbaix et al. (< 778 mV/ECS) [188]. Cela montre que la cinétique de réaction contrôle la réaction.

3. Une réaction de réduction à 550 mV/ECS est observée pour les deux solutions inorganiques. Elle est attribuée à la réduction du complexe de chlorure de platine (PtCl<sub>4</sub>)<sub>2</sub> selon les équations suivantes [181] :



Les scans enregistrés avec un taux de balayage élevé montrent que les réactions d'oxydoréduction sur platine ont une densité de courant plus faible en présence d'espèces organiques (protéines, acides aminés, vitamines et glucose). Par exemple, à 550 mV/ECS, la densité de courant dans le RPMI-1640 est trois fois plus faible que dans les solutions inorganiques. Il est bien connu que les biomolécules interagissent avec les surfaces solides par le biais de liaisons intramoléculaires et ioniques, ce qui conduit à un phénomène d'adsorption [168,189]. L'adsorption des composés organiques du RPMI-1640 pourrait avoir bloqué les sites actifs à la surface du platine, inhibant ainsi les réactions de réduction et la formation de complexes chlorurés ou limitant la surface active du platine.

4. De -780 à -450 mV/ECS, des pics sont enregistrés. Ils sont habituellement assignés à l'adsorption-désorption de l'hydrogène [109], qui est moins perceptible à une faible vitesse de balayage (1 mV.s<sup>-1</sup>) (Figure III. 10a) [190].
5. En comparant les solutions inorganiques et organiques, le potentiel d'oxydation de H<sub>2</sub>O passe à des valeurs plus élevées pour la solution organique, ce qui confirme l'effet bloquant des composés organiques adsorbés.
6. La réaction d'oxydation présente à 700 mV/ECS à la Figure III. 10a est confirmée à une vitesse de balayage plus rapide. La densité de courant dans le RPMI-1640 atteint une valeur trois fois plus élevée que dans les solutions inorganiques. Cette observation met en évidence la réactivité des composés organiques.

En conclusion, l'allure des voltammogrammes dans les deux solutions inorganiques (DPBS et RPMI-1640 synthétique) sont typiques de la réactivité des sels inorganiques et de l'oxyde de platine. Dans le cas du RPMI-1640 additionné de composés organiques, des modifications de surface ont été enregistrées :

- i) L'absence de complexation du platine en présence de Cl<sup>-</sup>,
- ii) la limitation de la diffusion de l'O<sub>2</sub>,
- iii) l'augmentation de la réaction anodique, probablement par complexation des espèces organiques tels que les vitamines, les acides aminés ou le glucose.

Pour évaluer la réactivité électrochimique de ces composés organiques présents dans le RPMI-1640, le système (Pt/RPMI-1640) a été polarisé à des potentiels d'intérêt, puis des mesures SIE sous polarisation potentiostatique ont été réalisées.

### III. 4.2 Conditions potentiostatiques

Des mesures de SIE ont été effectuées en conditions potentiostatiques en RPMI-1640 supplémenté dans les mêmes conditions. L'électrode de travail est tout d'abord maintenue à -900 mV/ECS pendant 1 h. A ce potentiel, tous les composés organiques sont éliminés de la surface, ce qui améliore la reproductibilité de l'état de surface. Par la suite, cinq potentiels d'intérêt ont été sélectionnés :

- Deux potentiels anodiques à +300 et +700 mV/ECS, où l'on suppose que les espèces organiques sont réactives et,
- trois potentiels cathodiques à -600, -450 et -150 mV/ECS où les réactions de réduction sont dominantes (Figure III. 10).

Les Figure III. 11a et b présentent les diagrammes de Nyquist de la réponse d'impédance électrochimique pour les potentiels d'intérêt précédents. Les représentations dans le plan de Nyquist présentent des demi-cercles quels que soient les potentiels. Le diamètre augmente avec le potentiel jusqu'à 300 mV/ECS. Il correspond à une boucle RC typique : comportement capacitif et résistance de transfert de charge. A 700 mV/ECS, le diamètre du demi-cercle est plus petit qu'à 300 mV/ECS, ce qui suggère une diminution de la résistance de transfert à la surface du platine.

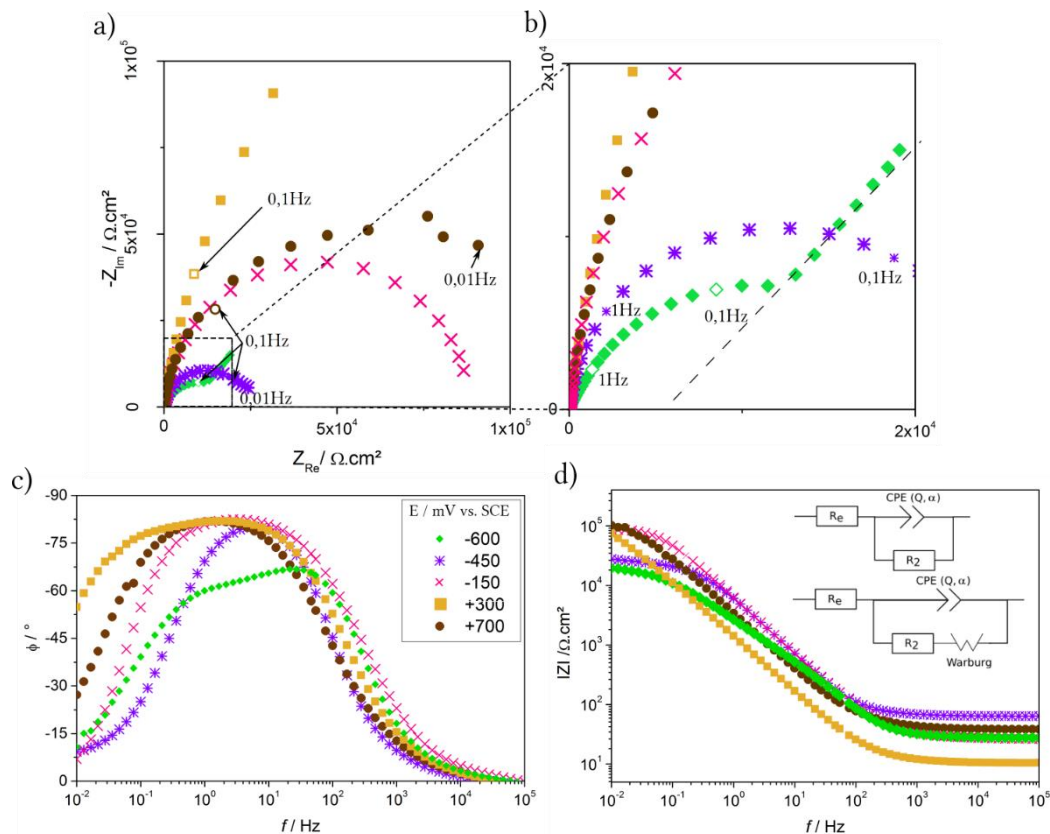


Figure III. 11 a), b) Représentations de Nyquist et c), d) de Bode de l'impédance d'une électrode de platine immergée dans le RPMI-1640 supplémenté polarisée de -600 à +700 mV/ECS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Les diagrammes de Bode (Figure III. 11c et d) révèlent trois parties distinctes selon la gamme de fréquences. A haute fréquence, le module de la valeur absolue de l'impédance  $|Z|$  tend à devenir constant pour l'ensemble des potentiels de polarisation. Il correspond également à une valeur d'angle de phase de 0°. Il s'agit d'une propriété typique d'un comportement résistif correspondant à la résistance du RPMI-1640 supplémenté. Dans la gamme de fréquence de 1 à 100 Hz, une relation linéaire apparaît entre  $\log Z$  et  $\log f$  avec une pente inférieure à -1 et un angle de phase maximal d'environ -80°. Cela correspond à un comportement capacitif non idéal. Dans la région de basses fréquences, le comportement résistif est lié à la résistance de polarisation.

Les réactions électrochimiques peuvent être modélisées par un circuit électrique équivalent (CEE). Dans ce cas présent, il s'agit d'une résistance en parallèle d'un élément à phase constante (R-CPE) (Figure III. 11d). Le CPE est introduit au lieu d'utiliser un élément de capacité idéale en raison d'une distribution de la constante de temps. L'oxyde de platine étant électrochimiquement stable sous polarisation statique, sa

contribution est prise en compte avec le même CPE [191–193]. Appliqués à l'interface RPMI-1640/platine, les éléments électroniques du CEE ont les significations suivantes :  $R_e$  représente la résistance de l'électrolyte RPMI-1640,  $R_2$  est la résistance de transfert de charge et les paramètres CPE ( $\alpha$  et  $Q$ ) caractérisent le comportement capacitif de l'interface. Les paramètres  $\alpha$  et  $Q$  ont été obtenus en utilisant les méthodes graphiques présentées par Orazem et al. [98,194,195]. Un élément Warburg a été introduit au potentiel de -600 mV/ECS pour représenter le processus de diffusion observé lors de la réaction d'évolution de l'hydrogène (Figure III. 10) qui est caractéristique de la pente à 45° de l'angle de phase par rapport au log  $f$  (Figure III. 11d).

La capacité est exprimée sous la forme d'une capacité effective  $C_{eff}$  associée aux paramètres du CPE. A l'interface platine /RPMI-1640, elle implique les contributions de l'interface de la double couche  $C_{dc}$ , de la couche organique adsorbée  $C_{ad}$  et de l'oxyde de platine  $C_{ox}$  [196,197]. Chacune de ces interfaces peut être considérée comme un élément de capacité en série (Eq III. 10). Selon le potentiel appliqué, l'un de ces mécanismes électrochimiques est prédominant, ce qui se traduit par une valeur de capacité élevée. Les valeurs  $C_{eff}$  sont liées à l'épaisseur de la couche d'interface  $d_{eff}$  [194,198]. Ainsi, comme mentionné précédemment, la couche pourrait correspondre à la double couche, à la couche organique adsorbée et/ou au film d'oxydes selon les conditions électrochimiques (Eq III. 11).

$$C_{eff} = [(C_{dc})^{-1} + (C_{ad})^{-1} + (C_{ox})^{-1}]^{-1} \text{ (en } \mu\text{F cm}^{-2}\text{)} \quad \text{Eq III. 10}$$

$$d_{eff} = \left( \frac{\epsilon_h \cdot \epsilon_0}{C_{dc}} + \frac{\epsilon_h \cdot \epsilon_0}{C_{ad}} + \frac{\epsilon_{ox} \cdot \epsilon_0}{C_{ox}} \right) \times 10^{-10} \text{ (en nm)} \quad \text{Eq III. 11}$$

Il est considéré que la double couche et la couche adsorbée sont composées principalement de molécules hydratées.  $\epsilon_h$  correspond à la constante diélectrique relative de l'eau (74,125) qui a été calculée à 37°C selon Malmberg et al. [199].  $\epsilon_{ox}$  et  $\epsilon_0$  correspondent à la permittivité de l'oxyde de platine (12) et du vide ( $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ ) respectivement.

La capacité effective  $C_{eff}$  de l'électrode de platine immergée dans le RPMI-1640, est calculée à partir du modèle proposé par Brug et al. [200], c'est-à-dire caractéristique d'une distribution de surface de la constante de temps (Eq III. 12). Les paramètres obtenus de la SIE, associés à l'interface platine/RPMI-1640, sont donnés dans le Tableau III. 4 pour chaque potentiel d'intérêt. Chaque valeur correspond à la moyenne et à l'écart-type d'au moins deux tests.

$$C_{eff} = Q^{1/\alpha} R_e^{(1-\alpha)/\alpha} \text{ (en } \mu\text{F cm}^{-2}\text{)} \quad \text{Eq III. 12}$$

La valeur de  $R_e$  entre 35 et 60  $\Omega \text{ cm}^2$  est attribuée à la résistance de l'électrolyte. La résistance du RPMI-1640 supplémenté est proche d'autres milieux de culture cellulaire tel que le milieu DMEM (45  $\Omega \text{ cm}^2$ ) [201]. La variation de  $R_e$  entre les potentiels n'est pas significative ( $p = 0,25$ ) et peut résulter de plusieurs facteurs liés à la conductivité (inversement proportionnelle à la résistance) et aux caractéristiques des électrodes de mesure (surface et distance entre les électrodes). Néanmoins, l'utilisation de porte-électrodes fixes limite les variations dues au montage électrochimique.

La résistance du RPMI-1640 a également été calculée théoriquement et mesurée expérimentalement par conductivité (température ambiante et hors incubateur). Les valeurs obtenues sont bien supérieures à celles obtenues par la mesure SIE : entre 93 et 143  $\Omega \text{ cm}^2$ . Dans ces conditions, la température d'étude était de 25°C au lieu de 37°C. Or la mobilité des ions et donc la conductivité augmente avec la température, et par conséquent la résistance diminue avec la température. En ajustant ce paramètre aux calculs, la  $R_e$  à 37°C varie entre 62 et 115  $\Omega \text{ cm}^2$  selon la méthode de calcul utilisée. Par ailleurs, le dioxyde de carbone

(CO<sub>2</sub>) dissous en solution forme des espèces ioniques qui influent significativement sur la mesure de la conductivité. Il a été suggéré que seulement 0,5 mg/ml d'ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en solution augmente la conductivité de l'eau pure d'un facteur 25 [202]. Il est donc difficile de déterminer en quelle proportion le CO<sub>2</sub> diminue la R<sub>e</sub> du RPMI-1640 car seulement 0,2 % environ des molécules réagissent pour former de l'acide carbonique. Ainsi, la gamme des valeurs de R<sub>e</sub> obtenue par mesure SIE est du même ordre de grandeur que les valeurs théoriques calculées. Les différences proviennent des variations de température et de la quantité de dioxyde de carbone atmosphérique qui a été dissous dans l'eau. Il est également possible que certaines espèces organiques forment une couche sur les électrodes et fausse la réponse de la cellule et entraîne des mesures erronées. Par rapport aux solutions simplifiées (solution de Hank : 90,3 Ω cm<sup>2</sup>), les espèces organiques semblent diminuer la valeur de R<sub>e</sub>, ce qui suggère qu'elles ont un caractère conducteur.

Tableau III. 4 Paramètres électrochimiques d'une électrode de platine polarisée dans le RPMI-1640 supplémenté. Les valeurs de résistance R<sub>e</sub> du RPMI-1640 supplémenté en incubateur ont été traitées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) : p = 0,25 par comparaison des différents potentiels.

E / mV vs. ECS	R <sub>e</sub> /Ω cm <sup>2</sup>	R <sub>2</sub> /kΩ cm <sup>2</sup>	α	Q /μF s <sup>α-1</sup> cm <sup>-2</sup>	W / Ω s <sup>-0.5</sup> cm <sup>2</sup>	Distribution de surface (Brug)	
						C <sub>eff</sub> /μF cm <sup>-2</sup>	d <sub>eff</sub> /nm
700	53,5 ± 11,9	126,7 ± 38,0	0,918 ± 0,015	55,9 ± 1,8		115,0 ± 9,8	0,09* ± 0,01
300	45,5 ± 6,8	778,8 ± 326,8	0,907 ± 0,002	42,6 ± 5,7		93,2 ± 17,5	0,12* ± 0,02
-150	35,0 ± 3,0	108,7 ± 61,4	0,936 ± 0,024	25,1 ± 2,7		36,5 ± 8,8	1,87 ± 0,42
-450	31,6 ± 17,3	20,5 ± 4,4	0,935 ± 0,008	30,4 ± 2,6		50,3 ± 6,2	1,32 ± 0,16
-600	56,8 ± 11,3	15,4 ± 1,8	0,796 ± 0,069	88,1 ± 35,7	355,7 ± 54,6	782,6 ± 130,8	0,17 ± 0,12

\* Epaisseurs de l'oxyde et de la couche adsorbée sous-estimées.

A -450 et -150 mV/ECS, les valeurs C<sub>eff</sub> sont proches de la capacité de double couche C<sub>dc</sub> d'un solide en solution aqueuse (10 à 40 μF cm<sup>-2</sup>) [203]. La valeur de α est proche de 1 à ces deux potentiels, ce qui indique une homogénéité des phénomènes réactionnels, généralement observée lors de réactions de réduction sur le platine.

Au potentiel cathodique le plus faible (-600 mV/ECS), l'augmentation du C<sub>eff</sub> (782,6 μF cm<sup>-2</sup>) peut être attribuée au dégagement continu de H<sub>2</sub>. La diminution de α (0,796) reflète une interface perturbée, principalement par la présence des bulles de gaz H<sub>2</sub>. A -600 mV/ECS, la capacité globale est dominée par la double couche. Pour autant, l'équation III. 11 ne permet pas d'établir la valeur de l'épaisseur effective des zones capacitives. Des résultats identiques ont été obtenus par Ehrensberger sur un alliage de titane immergé dans un milieu de culture cellulaire AMEM [204].

La résistance de transfert de charge R<sub>2</sub> augmente de manière significative avec le potentiel jusqu'à atteindre la valeur la plus élevée à +300 mV/ECS (778,8 kΩ cm<sup>2</sup>). Cependant, au potentiel anodique élevé (700 mV/ECS), R<sub>2</sub> diminue significativement, ce qui suggère un film moins protecteur. Ceci est confirmé par l'augmentation du C<sub>eff</sub> de +300 à +700 mV/ECS. Ceci reflète un comportement capacitif élevé au niveau de l'interface. Comme mentionné dans la section III. 4.1, les réactions les plus probables aux potentiels anodiques impliquent l'adsorption et l'oxydation de composés organiques réactifs et l'oxydation du platine. La contribution prédominante de la capacité effective est alors C<sub>ad</sub>. Cependant, dans le cas de plusieurs contributions, la C<sub>eff</sub> (i.e. d<sub>eff</sub>) est régie par la plus petite des valeurs de capacité (voir Eq III. 10 et Eq III. 11). A +300 et +700 mV/ECS, les faibles épaisseurs (0,12 et 0,09) sont principalement représentatives de la couche d'oxyde de platine et ne tient pas compte de la couche



organique adsorbée. L'épaisseur de l'oxyde et de la couche adsorbée sont alors sous-estimée avec cette méthode de calcul.

La faible variation du paramètre  $\alpha$  entre les potentiels cathodique (0,93) et anodique (0,91) peut provenir des protéines adsorbées et des acides aminés présents dans la double couche. La couche adsorbée constituée de protéines est probablement hétérogène en raison de la distribution des charges à la surface des protéines même et de la surface solide (Figure III. 12). Les molécules sont capables de s'adsorber à la surface selon différentes conformations [155]. Par exemple, le fibrinogène augmente l'hétérogénéité de surface sur une électrode de platine, diminuant ainsi la valeur de  $\alpha$  [193].

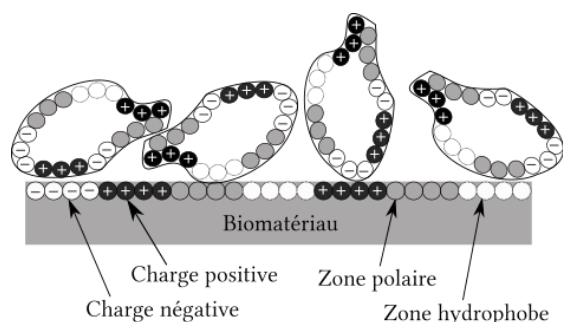


Figure III. 12 Différentes orientations des molécules de protéines adsorbées résultant de l'hétérogénéité de la protéine et de la surface. (Adapté de Dee et al. [155]).

Selon les spectres de voltampérométrie cyclique du platine immergé dans le RPMI-1640 supplémenté, différents mécanismes électrochimiques sont impliqués selon les potentiels testés SIE :

- A -600 mV/ECS, la réaction prédominante est la formation et la désorption de  $H_2$  sur une surface active hétérogène.
- A -150 et -450 mV/ECS, des réactions cathodiques typiques se produisent impliquant la diffusion et la réduction de l'oxygène, la réduction de l'oxyde de platine et l'adsorption plus ou moins importante de  $H^+$ .
- A +300 mV/ECS, la valeur  $C_{eff}$  élevée correspond davantage à une couche adsorbée homogène ou compacte par rapport aux autres potentiels cathodiques. Les composés organiques adsorbés induisent un comportement résistif plus élevé. La nucléation de l'oxyde de platine a également lieu à ce potentiel.
- A +700 mV/ECS, les mêmes composés organiques qu'à +300 mV/ECS sont probablement impliqués. Cependant, la diminution de  $R_2$  suggère quelques modifications de la surface. Différents mécanismes peuvent être proposés :
  - i) La compétition des espèces réactives : Un échange dynamique est généralement observé lorsque deux ou plusieurs biomolécules (protéines) peuvent être adsorbées simultanément sur une surface. Des changements de composition de la couche adsorbée en fonction du temps peuvent se produire jusqu'à ce qu'un état pseudo-stationnaire soit atteint. Cela implique des échanges compétitifs entre les protéines déjà adsorbées et les molécules provenant de la solution [155], qui est nommé « l'effet Vroman » [158,205].
  - ii) La réorientation/dénaturation des composés organiques par modification de conformation [206,207]. En effet, Stoner et Ivarsson [208,209] ont observé que la quantité d'adsorption et la conformation des protéines telles que l'albumine et le fibrinogène changent avec le potentiel et le pH local. Le changement des biomolécules adsorbées en fonction du potentiel pourrait expliquer l'hétérogénéité de la couche adsorbée.

- iii) L'évolution de l'oxygène à potentiel anodique élevé.
- iv) Les réactions d'oxydation des espèces organiques réactives sont favorisées par la présence d'oxyde de platine à la surface et par la présence d'oxygène.

Enfin, il est important de rappeler que les liquides physiologiques réels ou simulés *in vitro* interagissent avec le film d'oxydes des biomatériaux métalliques. Cette étude met en évidence que la réactivité des composés organiques du RPMI-1640 supplémenté se situe dans la même gamme de potentiel que le domaine passif des alliages de cobalt. Ces composés sont très probablement impliqués dans le processus de passivation du métal. En effet, la réactivité de l'alliage CoCrMo a été largement étudiée dans diverses solutions physiologiques, montrant une réduction de la résistivité des oxydes au-delà de 500 mV/ECS [210]. Cela a été attribué à l'oxydation du Cr(III) en Cr(VI) et du Co(II) en Co(III) [105,211]. Toutefois, ces travaux mettent également en évidence une diminution de la résistance mais en absence de CoCrMo. Cela suggère qu'au-delà de 500 mV/ECS, à la fois l'oxydation des ions métalliques, l'adsorption et l'oxydation des espèces organiques se produisent. Par conséquent, la réactivité intrinsèque du RPMI-1640 supplémenté peut impliquer des variations locales dans l'interface électrolyte/matériau qui peuvent modifier la dissolution d'une prothèse métallique. De plus, le contrôle de l'adhésion cellulaire du biomatériau est assuré par la couche de protéines de surface sur laquelle les cellules se lient [212]. Ainsi, l'adsorption des espèces organiques est un paramètre clé qui gouverne à la fois l'intégrité physique et la biocompatibilité des matériaux métalliques.

### III. 4.3 Identification des espèces organiques électroactives

Identifier les espèces organiques électroactives du RPMI-1640, mises en évidence précédemment, est une tâche ardue du fait de la complexité du milieu. Il est difficile d'isoler un seul élément organique ou de le supprimer du RPMI-1640. Pour autant, nous avons essayé d'apporter des éléments de réponse en procédant par élimination. La première intention a été de comparer des solutions de RPMI-1640 de compositions légèrement variables et commercialement disponibles. La seconde a été d'analyser les précipités à la surface de l'électrode de platine, après polarisation aux potentiels d'intérêt, par spectroscopie Raman, Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF), par XPS et par des pointés EDX.

#### III. 4.3.a Le rouge de phénol et la glutamine

Etant donné les variantes de composition du RPMI-1640 disponibles à l'achat, nous avons pu isoler la réactivité électrochimique du rouge de phénol et de la glutamine. Rappelons que le rouge de phénol est un indicateur pH et que la glutamine est un précurseur des protéines et de la synthèse de vitamines. Bien qu'essentielle, la glutamine est très instable en solution et son métabolisme entraîne la formation d'ammoniac, qui en excès est cytotoxique [213].

La réactivité électrochimique de trois solutions variantes du RPMI-1640 a été confrontée par des essais de polarisation potentiodynamique suivant les mêmes conditions que précédemment (Section III. 4.1). L'une des solutions ne contient pas de glutamine, la seconde est démunie de rouge de phénol et la troisième ne contient aucun de ses deux éléments (Figure III. 13).

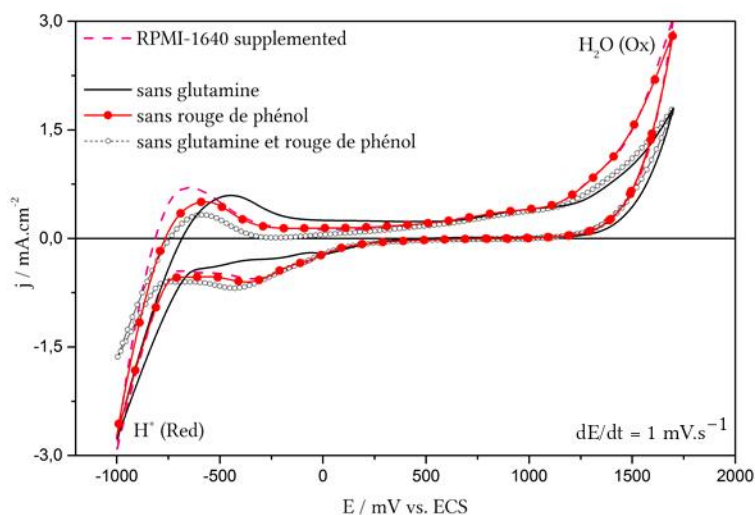


Figure III. 13 Voltammogrammes cycliques d'une électrode de platine immergée dans le RPMI-1640 supplémenté (pointillés roses), le RPMI-1640 sans glutamine (en noir), le RPMI-1640 sans rouge de phénol (cercles rouges) et le RPMI-1640 sans aucun de ces éléments (cercles gris). Les tests sont réalisés dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

L'allure des voltammogrammes cycliques obtenus pour ces trois milieux de RPMI-1640 est globalement similaire, caractérisé par le palier de diffusion de l'oxygène dissous, la réduction et l'oxydation du solvant. L'oxydation du platine dans le RPMI-1640 sans glutamine est ralenti du fait des valeurs de densité de courant plus faible, ce qui peut expliquer qu'il n'y a pas de pic de réduction du platine entre 0 et -500 mV/ECS. Dans la zone d'intérêt (autour de 700 mV/ECS), la densité de courant est similaire, que le RPMI-1640 contienne ou non de la glutamine et/ou du rouge de phénol. Ainsi, par élimination, la glutamine et le rouge de phénol ne sont pas considérés comme les espèces organiques réactives du RPMI-1640. Il est également possible que les quantités adsorbées soient si faibles qu'elles ne peuvent être identifiées comme électroactives.

### III. 4.3.b Analyse de surface de l'électrode de platine polarisée

La seconde approche est d'analyser par spectroscopie Raman et par Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) la surface de l'électrode de platine polarisée aux potentiels d'intérêts. Ces deux méthodes d'analyse n'ont malheureusement pas permis de dé-corréler les pics caractéristiques des acides aminés ou de protéines du bruit de fond des spectres et donc d'identifier avec précision les composés adsorbés. Les résultats, non exposés ici, témoignent de la complexité d'identifier des éléments organiques adsorbés sur une électrode de platine par ces techniques. Ceci peut s'expliquer par la très faible épaisseur d'éléments présents à la surface.

Des analyses XPS ont été réalisées sur la surface de l'électrode de platine après polarisation pour déterminer les sels précipités et les composés organiques réactifs adsorbés. Les échantillons sont retirés de la solution et placés sous vide jusqu'à analyse de la surface. La Figure III. 14 et le Tableau III. 5 montrent les résultats des analyses XPS impliquant les éléments : carbone (C), oxygène (O), azote (N), calcium (Ca), phosphore (P), sodium (Na) et chlorure (Cl).

Les ions sodium et chlore sont caractérisés par l'énergie de liaison des électrons Na<sub>1s</sub> à 1070,4 eV et celle des électrons Cl<sub>2p</sub> à 196,6 eV respectivement. Le sodium et le chlore sont détectés aux potentiels cathodiques (-900 et -150 mV/ECS). Il est possible que des cristaux de NaCl précipitent lors du séchage.

Tableau III. 5 Résultat de l'analyse XPS réalisé sur une électrode de platine immergée dans du RPMI-1640 supplémenté et polarisée à -900, -150 et +300 mV/ECS montrant la concentration relative des différents éléments détectés (en %).

Elément		C	O	N	Na	Cl	Ca	P	[Ca]/[P]	[C]/[N]
Energie de liaison (eV)		285,0-289,5	531,6	398,8	1070,4	196,6	346,0-349,6	131,9		
At %	Potentiels d'intérêt									
	-900	59,0	20,6	12,8	3,6	2,8	1,3	0,8	1,7	4,6
	-150	57,9	22,2	12,2	2,8	1,0	1,9	1,7	1,1	4,7
	+300	39,1	38,5	8,1	-	-	8,1	6,4	1,3	4,8

L'énergie de liaison des électrons  $Ca_{2p_{3/2}}$  a été déconvoluée en deux pics à 346,0 et 349,6 eV et celle de l'électron  $P_{2p}$  en un pic à 131,8 eV. Du calcium et du phosphore ont été détectés pour tous les échantillons polarisés indiquant une précipitation du phosphate de calcium. Ceci est cohérent avec d'autres études impliquant des solutions inorganiques classiques [214] ou d'autres milieux de culture cellulaire [103]. La teneur en phosphate de calcium dans la couche d'adsorbat augmente aux potentiels anodiques (+300 mV/ECS) (8,1 et 6,4 %), par rapport aux potentiels cathodiques (1,3-1,9 % pour P et 0,8-1,7 % pour Ca). Le rapport  $[Ca]/[P]$  donne des informations sur la structure des précipitations. A -900 mV/ECS, Ca et P précipitent pour former de l'hydroxyapatite de calcium  $Ca_5(OH)(PO_4)_3$  (de rapport  $[Ca]/[P]$  de 1,67) alors qu'à -150 et +300 mV/ECS, il s'agit d'un mélange de brushite  $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$  ( $[Ca]/[P]$  de 1,0) et de phosphate d'octacalcium  $Ca_8H_2(PO_4)_5 \cdot 5H_2O$  ( $[Ca]/[P]$  de 1,33) [102,215,216].

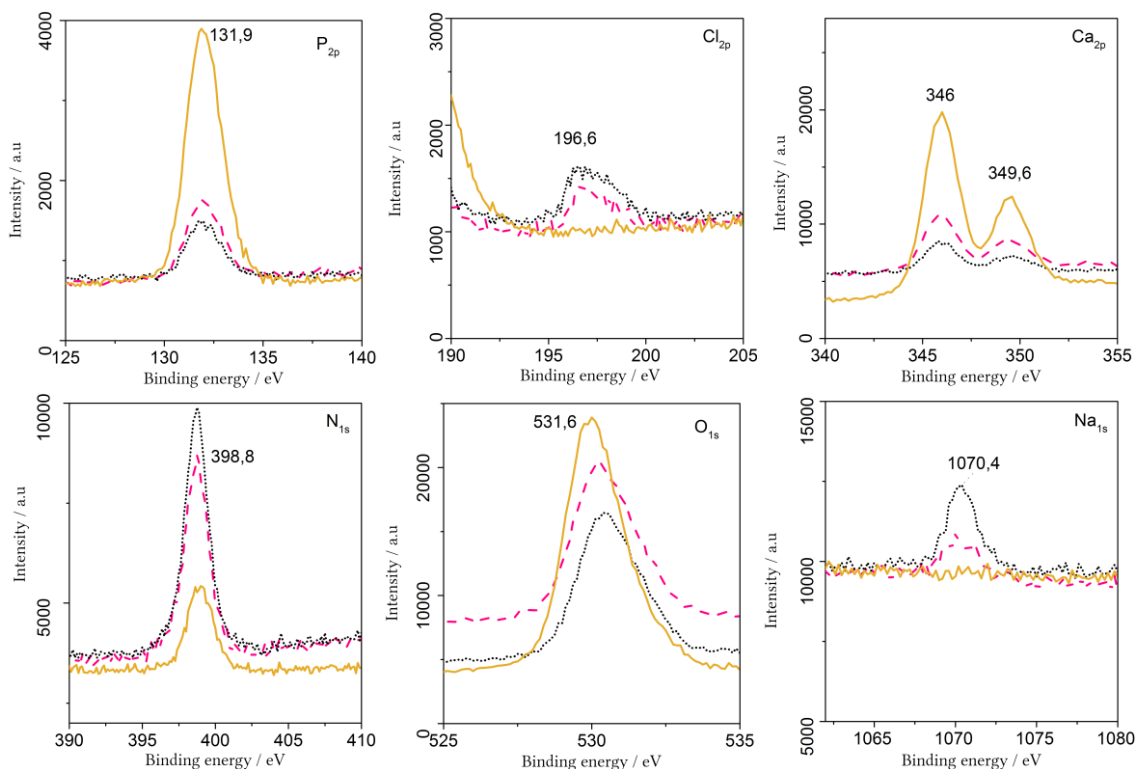


Figure III. 14 Résultats des analyses XPS de l'électrode de platine immergée dans le RPMI-1640 supplémenté après polarisation à -900 (en noire), à -150 (en rose) et à +300 mV/ECS (en jaune).

Le carbone, l'oxygène et l'azote sont des éléments prédominants et spécifiques des éléments organiques. La fonction amide et la teneur en azote dans les spectres  $C_{1s}$  sont typiquement identifiées en présence de protéines. On s'est donc davantage intéressé au carbone et à l'azote pour déterminer l'implication des protéines dans les réactions électrochimiques décrites précédemment (Section III. 4.2). Le Tableau III. 5

présente le pourcentage atomique de C et N et le rapport[C]/[N]. La Figure III. 15 et le Tableau III. 6 présentent les résultats XPS de haute résolution et la déconvolution du spectre C<sub>1s</sub>.

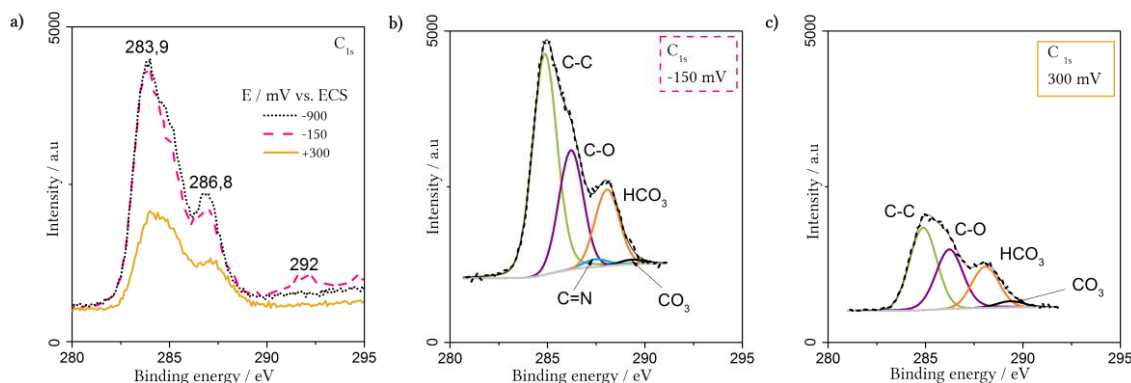


Figure III. 15 Spectre XPS du carbone C<sub>1s</sub> de l'électrode de platine immergé dans le RPMI-1640 supplémenté après polarisation et déconvolution en éléments C-C, C-O, C=N, HCO<sub>3</sub> et CO<sub>3</sub> à -150 (b) et 300 mV/ECS (c).

Les électrodes de platine polarisées cathodiquement (-900 et -150 mV/ECS) présentent plus de carbone et d'azote (57,9-59,0 % C, 12,2-12,8 % N) que les échantillons polarisés anodiquement (39,1 % C, 8,1 % N). La concentration de O et N est cohérente puisque les composés organiques sont présents dans le RPMI-1640. La présence de contaminations peut également expliquer la teneur en C et N, correspondant aux pics C<sub>1s</sub> (liaisons C-C et C-H) à 285 eV. La réactivité des espèces organiques n'est pas forcément identifiée par des expériences électrochimiques (Section III. 4.2). Le rapport[C]/[N] pourrait être lié aux acides aminés compte tenu de leur type et de leurs concentrations respectives [102]. La valeur de rapport similaire (4,6-4,8), pour les trois potentiels, suggère que les acides aminés sont réactifs mais réagissent indépendamment du potentiel.

Tableau III. 6 Résultats des analyses XPS de l'électrode de platine immergée dans du RPMI-1640 supplémenté et polarisée à -900, -150 et +300 mV/ECS qui montrent la concentration relative de la déconvolution du pic C<sub>1s</sub> (en pourcentage atomique).

Identification		C-C/C-H	C-O/C-N	C=N/N-C=C	O-C=O/N-C=O/HCO <sub>3</sub>	CO <sub>3</sub>	
Energie de liaison (eV)		285,0	286,4	287,6	288,2	289,5	
At % total	Potentiels d'intérêt	-900	48,0	31,3	0,2	19,7	0,9
		-150	51,4	28,6	0,3	19,0	0,8
		300	43,6	31,8	0	21,8	2,9

Le platine polarisé anodiquement présente la teneur la plus élevée en HCO<sub>3</sub>/N-C=O (288,2 eV) et en CO<sub>3</sub> (289,5 eV). Ceci suppose que le dioxyde de carbone, concentré à 5 % en volume dans l'atmosphère de l'incubateur pourrait être co-adsorbé à la surface [113]. L'action tampon du CO<sub>2</sub> peut s'accompagner de la formation de dépôts de carbonates de calcium à la surface sous forme de calcite ou d'aragonite (8,1 % Ca à +300 mV/ECS). Les liaisons C-O/C-N (286,4 eV) indiquent la présence d'espèces organiques structurées. Par conséquent, l'échantillon de platine immergé dans le RPMI-1640 est recouvert d'une couche d'espèces organiques adsorbées [102,106,165,216].

L'analyse XPS de la surface de l'électrode de platine a été complétée par une observation au MEB et une analyse dispersive de rayons X (EDX) (Figure III. 16 et Figure III. 17). On constate que la surface du platine est différente selon les potentiels de polarisation.



A-900 et -150 mV/ECS, on constate que l'oxyde de platine est présent de manière non uniforme et a tendance à s'écailler. Le platine, sous l'oxyde, est identifiable (pointé EDX N°2 de la Figure III. 16). Ces arrachements de matière peuvent résulter des bulles de H<sub>2</sub> qui érodent mécaniquement l'oxyde de platine. Précédemment mis en évidence par l'analyse XPS, le NaCl est effectivement présent sous forme de précipités (entouré en jaune). La précipitation du phosphate de calcium prend quant à elle la forme de monticules sinueux et tortueux (pointé EDX N°6).

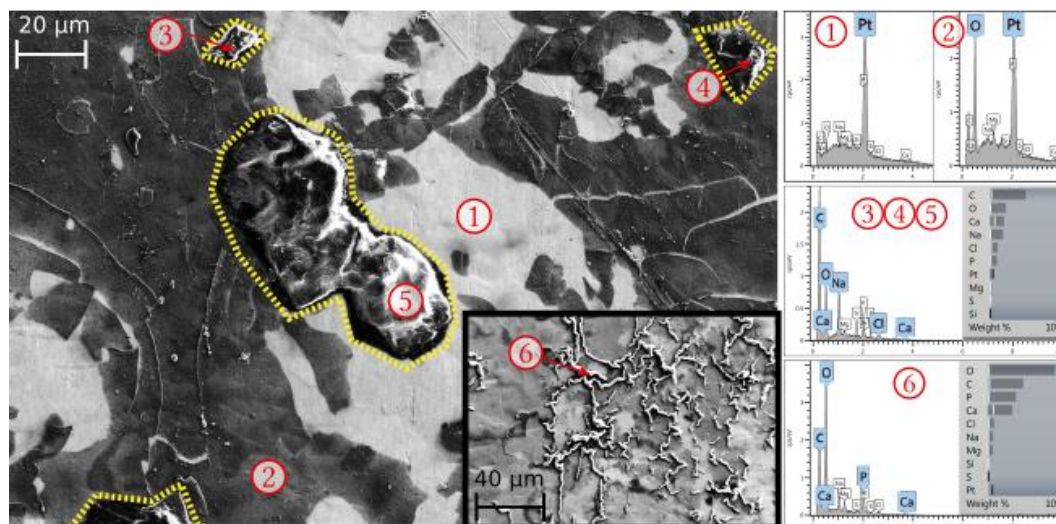


Figure III. 16 Image au MEB de l'électrode de platine après polarisation à -900 mV/ECS complétée par les analyses EDX marqués par les cercles rouges numérotés. Cet état de surface est similaire à -150 mV/ECS et donc représentatif des potentiels de polarisation cathodique.

L'observation au MEB du platine polarisé à 300 mV/ECS illustre l'absence d'oxyde de platine et la présence de nodules carbonatés distribués à la surface (pointés EDX N°2, 3, 4 de la Figure III. 17). Le phosphate de calcium est présent sous forme de précipités arrondis de taille significative (pointé EDX N°5) contrairement aux petites tailles observées dans le cas des potentiels cathodiques. Cette variation peut supposer que les composés organiques interagissent préférentiellement à ce potentiel avec le calcium et le phosphate.

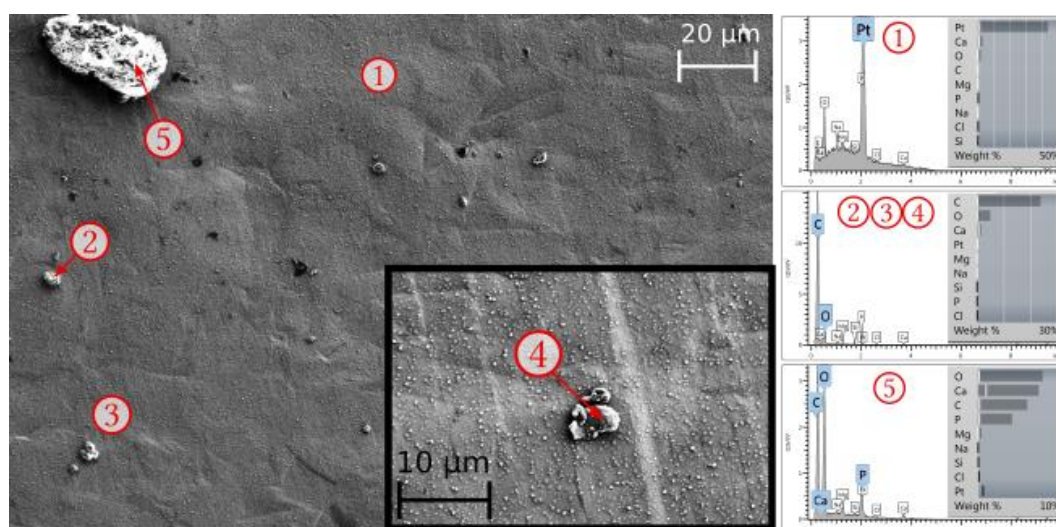


Figure III. 17 Image au MEB de l'électrode de platine après polarisation à +300 mV/ECS complétée par les analyses EDX marqués par les cercles rouges numérotés.

L'analyse XPS complétée par l'EDX démontre que l'état de surface du platine est modifié selon le potentiel de polarisation et gouverné par l'adsorption et la précipitation de sels inorganiques et de composés organiques.

Pour autant, la précipitation d'ions inorganiques est un facteur décisif dans la composition des films d'oxydes présents sur les biomatériaux métalliques. Le calcium et le phosphate peuvent être incorporés sélectivement dans le film d'oxydes pour former une couche d'apatite [112,178]. Sur l'acier inoxydable [100], les cations divalents, c'est-à-dire  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , favorisent l'adsorption de l'albumine, alors que les cations monovalents  $\text{Na}^+$  n'ont aucun effet. Sur les alliages de titane, la co-adsorption des ions à l'intérieur d'une couche de protéines se produit, régie par le pontage des cations divalents entre l'albumine et les films d'oxyde de titane chargés négativement [9,214,217,218]. A contrario, l'adsorption de l'albumine sur le titane est réduite par les ions phosphate et elle se lie en premier lieu aux ions calcium, qui à leur tour se lient aux ions phosphate [153,217,219].

Le potentiel des électrodes peut influencer la surface d'adsorption des espèces organiques et inorganiques par des interactions électrostatiques. La plupart des acides aminés ont leurs points isoélectriques en dessous d'un pH physiologique (7,4) et sont donc chargés négativement dans le RPMI-1640 (albumine 4,7-4,9 [218]). L'adsorption d'une molécule organique chargée négativement est favorisée sur les surfaces métalliques chargées positivement. Dans ce sens, il est possible qu'il se produise une co-adsorption d'ions et de protéines.

Le travail d'identification des espèces organiques électroactives du RPMI-1640 adsorbées à la surface de l'électrode de platine a permis d'établir que :

- La glutamine et le rouge de phénol ne sont pas les composés responsables de la réactivité intrinsèque du RPMI-1640,
- La spectroscopie Raman et Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) ne permettent pas d'identifier la nature des composés adsorbés, probablement du fait d'une trop faible quantité,
- Le platine polarisé dans le RPMI-1640 présente une modification de surface relative au potentiel de polarisation (Figure III. 18) :
  - La précipitation du chlorure de sodium provient du séchage.
  - La présence de Ca, P et  $\text{CO}_3$  aux potentiels anodiques indique une interaction entre les biomolécules de RPMI-1640 et les ions inorganiques à la surface.

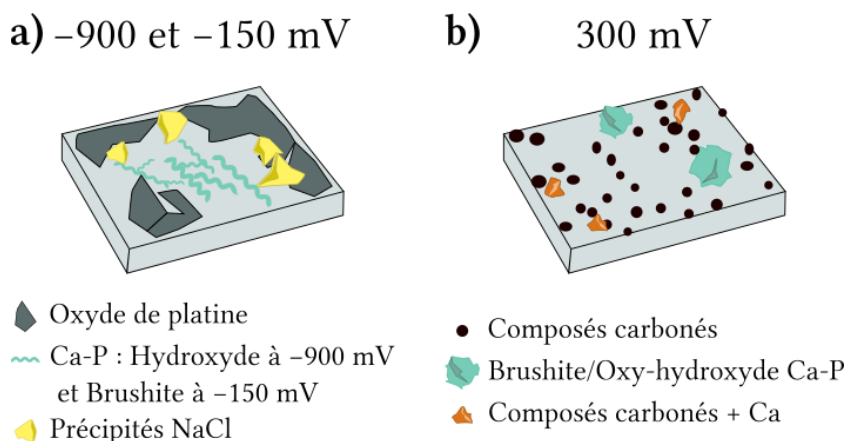


Figure III. 18 Schématisation de l'état de surface de l'électrode de platine après polarisation dans le RPMI-1640 supplémenté.

### III. 5 VARIABLES DE LA REACTIVITE ELECTROCHIMIQUE DU RPMI-1640

Suite à l'identification de la réactivité électrochimique du RPMI-1640 supplémenté, la contribution de deux éléments essentiels en culture cellulaire a été abordée :

- le sérum de veau fœtal SVF, liquide riche en composés nutritifs et,
- le CO<sub>2</sub> qui maintient le pH dans une gamme de viabilité cellulaire.

#### III. 5.1 Influence du sérum de veau fœtal SVF

En raison de sa concentration élevée dans le sang, l'albumine (ou *Bovin Serum Albumin BSA*) est l'une des protéines les plus étudiée. Comme mentionné dans les sections III. 2.4.a et III. 2.5, l'albumine modifie les réactions de corrosion des matériaux. Etant donné la variabilité des résultats, des essais potentiodynamique et potentiostatique couplés à des mesures SIE ont été réalisés avec une électrode de platine immergée dans le RPMI-1640 supplémenté avec différentes concentrations de SVF (de 0 à 30 % en volume). Les conditions expérimentales (environnement, vitesse de balayage, état de surface) sont identiques à celles des essais précédents.

La Figure III. 19 présente les spectres voltamétrie cyclique obtenus dans le RPMI-1640 supplémenté aux différentes concentrations de SVF (correspondant à un taux de protéines total variant de 1 à 20 g/L). Les réactions cathodiques impliquées sont les mêmes que précédemment : la dissolution de l'oxygène dissous, la réduction de l'oxyde de platine et la réduction du solvant. Sans SVF, la réduction de l'oxyde de platine est plus identifiable (épaulement à -100 mV/ECS). En revanche en présence de SVF, la réduction de l'oxyde de platine est masquée par l'adsorption de biomolécules telles que l'albumine, ce qui modifie la réaction de réduction. La réduction de l'oxygène dissous est modifiée à partir de 30 % vol de SVF dans le RPMI-1640. Cela se traduit par un palier moins marqué et une densité de courant plus grande en valeur absolue. La couche protéique adsorbée semble accélérer le transport de l'oxygène dissous. Il serait intéressant de déterminer pourquoi cette modification a lieu à partir de 30% vol seulement. Peut-être que la couche protéique a des propriétés conductrices, ce qui augmenterait la réelle surface active.

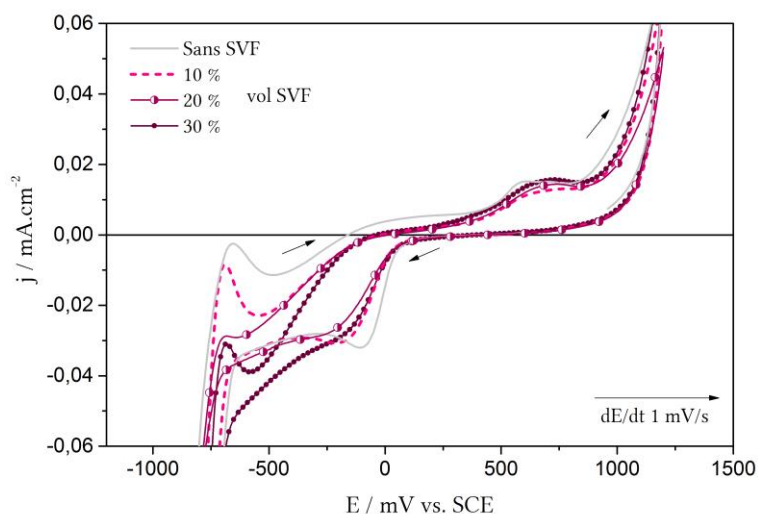


Figure III. 19 Courbes voltamétriques du platine immergé en solution RPMI-1640 avec différentes concentration en volume de sérum de veau fœtal (de 0 à 30 %) sous incubateur.

Les réactions anodiques établies de 0 à 1200 mV/ECS sont identiques quelle que soit la concentration de SVF. Ceci suggère que : **i**) les composés organiques réactifs autour de 700 mV/ECS, précédemment



identifiés, ne proviennent pas du SVF ou **ii**) d'autres composés organiques préalablement adsorbés bloquent les sites actifs de la surface de l'électrode.

Pour confirmer l'implication du SVF sur la réactivité du RPMI-1640, des essais de polarisation couplés à des mesures SIE ont été réalisés aux mêmes potentiels d'intérêt que la section précédente. Les spectres d'impédance obtenus avec et sans SVF (10% vol), ainsi que les paramètres électrochimiques extraits à partir des circuits électriques équivalents sont présentés en Figure III. 20 et Figure III. 21.

L'ajout de 10% en volume de SVF au RPMI-1640 n'affecte pas significativement la réactivité du milieu. L'ensemble des paramètres électrochimiques ( $R_2$ ,  $\alpha$ ,  $Q$ ,  $C_{\text{eff}}$  et  $d_{\text{eff}}$ ) avoisine les mêmes valeurs pour un même potentiel avec ou sans SVF ( $p > 0,10$ ). Seule une différence est notifiée à  $-600$  mV/ECS, potentiel pour lequel la capacité effective augmente de  $150$  à  $750 \mu\text{F cm}^{-2}$  avec 10% de SVF. Les espèces protéiques et organiques du SVF pourraient éventuellement favoriser l'adsorption de l'oxygène dissous, ce qui augmente le caractère capacitif. A  $-600$  mV/ECS, la capacité globale est dominée par la double couche.

Pour autant, cela ne signifie pas que le SVF n'agit pas comme accélérateur de la dissolution des biomatériaux métalliques comme le suggèrent de nombreuses études [159–164]. Les résultats montrent l'importance de la composition d'un milieu d'étude sur le rôle d'une espèce en particulier. Il est clair que des espèces organiques interagissent avec la surface avant le SVF ou l'albumine. Ces espèces limitent leur contribution électrochimique. Une compétition de type Vroman entre les espèces peut effectivement avoir lieu [168]. Cette compétition protéique en surface peut conduire à l'évolution du film passif des biomatériaux métalliques et modifier ainsi ses propriétés protectrices.

Ces résultats indiquent que l'étude des biomatériaux métalliques doit s'effectuer dans un milieu représentatif du milieu physiologique.

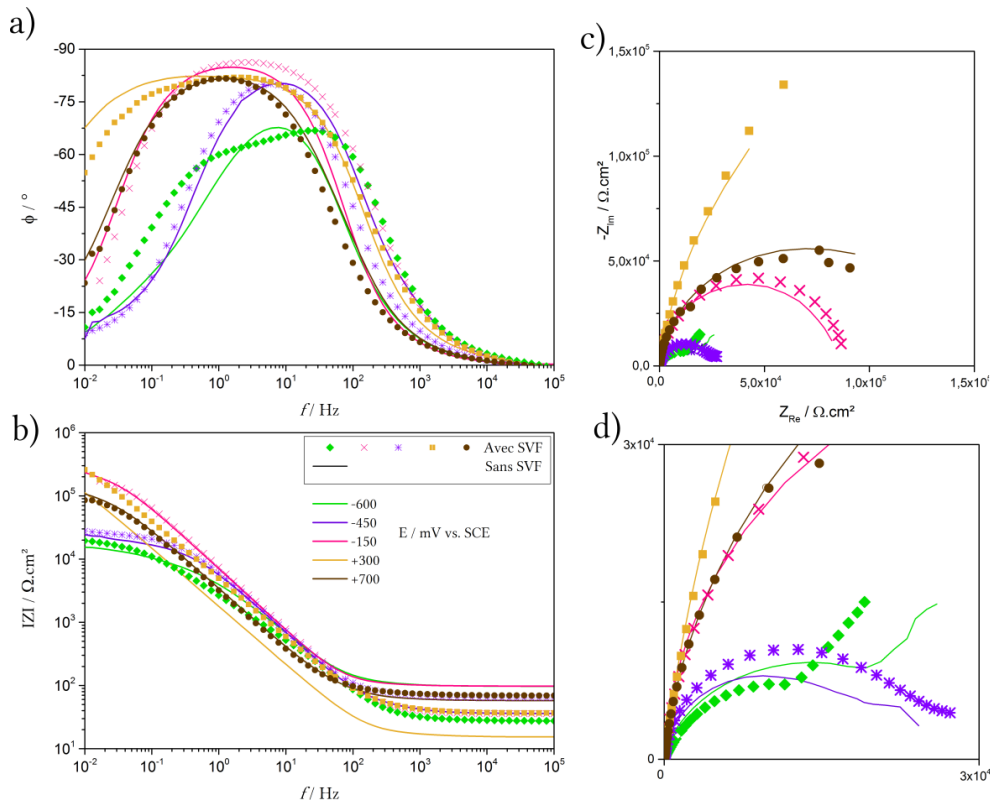


Figure III. 20 Spectres d'impédance d'une électrode de platine immergée dans le RPMI-1640 avec 10% vol de SVF (symboles) ou sans SVF (ligne) polarisée de  $-600$  à  $+700$  mV/ECS ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ).

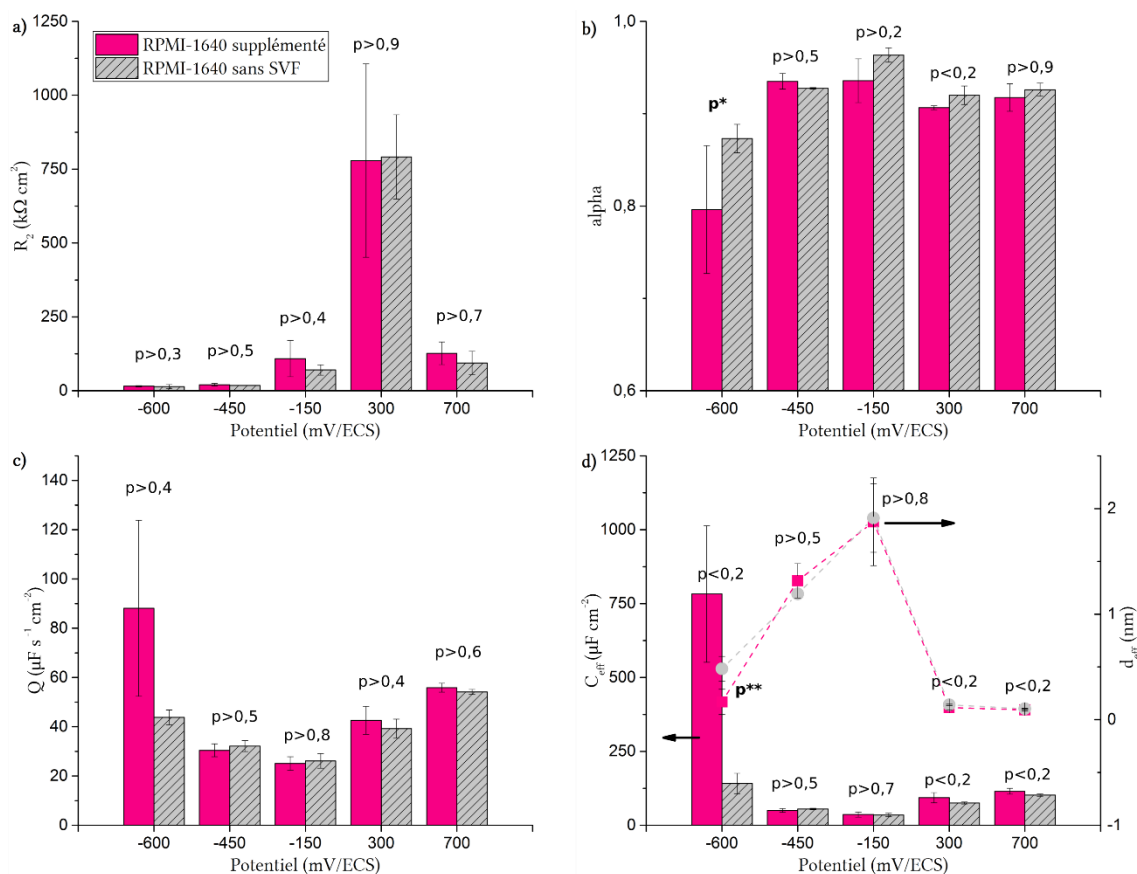


Figure III. 21 Résultat des paramètres électrochimiques d'une électrode de platine polarisée dans le RPMI-1640 supplémenté de 10 % de SVF (rose) et sans SVF (gris). Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois échantillons (détail à l'Annexe 5) et l'incertitude à l'écart type de la moyenne. Les données ont été traitées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un essai de comparaison multiple : les valeurs des paramètres électrochimiques comparés entre les deux milieux ne sont pas significativement différents ( $p > 0,10$ ) excepté à -600 mV/ECS pour  $d_{\text{eff}}$  où  $p^{**}$  correspond à 0,02 et  $\alpha$  où  $p^*$  correspond à 0,09.

### III. 5.2 Contribution du dioxyde de carbone

Comme mentionné dans la section III. 2.4.c, le dioxyde de carbone dissous dans le sang joue le rôle de tampon pH [220]. Son taux de concentration peut varier selon le fluide corporel et les conditions physiologiques. Il est toutefois toujours maintenu dans une gamme viable pour les cellules entre 7 et 7,8. Dans un milieu de culture cellulaire comme le RPMI-1640, le pH physiologique est également régulé par la quantité de  $\text{CO}_2$  dissous en solution, c'est-à-dire par le rapport  $[\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$  [175,176]. La culture cellulaire doit s'effectuer sous atmosphère contenant 5 % de  $\text{CO}_2$  sinon la solution s'acidifie et engendre la mort cellulaire. L'équilibre acido-basique est une exigence fondamentale pour le développement des cellules puisqu'il régle la plage de pH et limite les effets des déchets acides produits par les cellules.

Le carbonate et le bicarbonate peuvent accélérer la dissolution de certains alliages métalliques en modifiant le pH. Le taux de dégradation peut également être influencé par la pression partielle du gaz dans l'atmosphère, comme l'oxygène [72].

Pour ces raisons, liées aussi bien au développement cellulaire qu'aux interactions biomatériaux/milieu, les gaz dissous ( $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$ ) doivent être pris en compte pour prédire le comportement *in vivo* des biomatériaux métalliques. L'objet de cette partie est de déterminer l'effet du  $\text{CO}_2$  sur la réponse électrochimique du RPMI-1640 en utilisant comme précédemment une électrode de platine soumise à des

essais voltamperocycliques couplés à des mesures SIE. Différentes conditions d'atmosphère ont été fixées :

- En milieu aéré, sous atmosphère ambiante contenant 0,035 % de CO<sub>2</sub>,
- Sous atmosphère d'un incubateur composée de 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>,
- En milieux désaérés sous atmosphères saturées de CO<sub>2</sub> ou de N<sub>2</sub>.

### III. 5.2.a Conditions potentiodynamiques

La Figure III. 22 présente la réactivité du RPMI-1640 supplémenté en conditions dynamiques sous ces quatre conditions atmosphériques à une température fixe de 37°C. La densité de courant globale dans la plage de potentiel d'étude (-1000 à 1200 mV/ECS) est la plus élevée sous atmosphère aérée. Cela se caractérise par la réduction de l'oxygène dissous avec une densité de courant absolue plus élevée (0,1 mA.cm<sup>-2</sup>). Elle est représentative de la quantité d'oxygène dissous dans la solution. Dans des conditions aérées, la densité de courant dans le domaine anodique (à 700 mV/ECS) atteint des valeurs de densité de courant jusqu'à huit fois plus élevées que dans les environnements désaérés ou en incubateur. La réactivité du RPMI-1640 supplémenté dépend de la teneur en oxygène.

Dans l'incubateur, la densité de courant diminue mais se caractérise toujours par la diffusion de l'oxygène dissous entre -250 et -700 mV/ECS et par une réaction anodique autour de 700 mV/ECS. La présence de 5% de CO<sub>2</sub> ou autrement dit la diminution de 20,95 à 19,90% d'O<sub>2</sub> pourrait expliquer la diminution de l'intensité de ces réactions. Soit la surface active est bloquée, soit la quantité de composants réactifs a diminuée. Deux autres conditions sous désaération, c'est-à-dire par saturation du milieu en N<sub>2</sub> ou en CO<sub>2</sub>, ont été choisies pour distinguer les phénomènes mis en jeu.

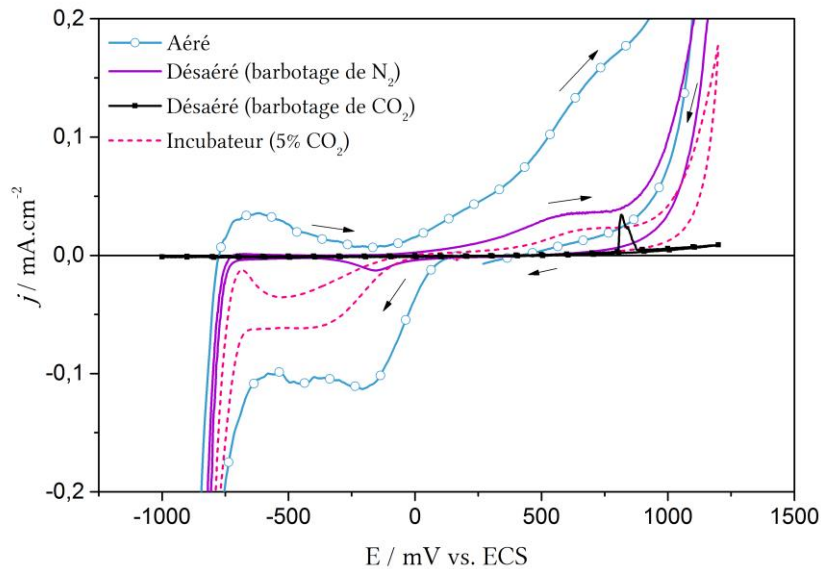


Figure III. 22 Voltammogrammes cycliques de l'électrode de platine immergée dans le RPMI-1640 supplémenté sous condition aéré (ligne bleue), désaéré par saturation de N<sub>2</sub> (ligne violette) ou de CO<sub>2</sub> (ligne noire) et sous 5% CO<sub>2</sub> (ligne rose pointillée). Les spectres ont été tracés après 1 h de mesure du potentiel de circuit ouvert  $E_{OCP}$ . La température est fixée à 37°C et la vitesse de balayage à 1 mV.s<sup>-1</sup>.

Purgé au dioxyde de carbone ou à l'azote, le RPMI-1640 ne présente pas de réduction de l'oxygène. Un seul pic cathodique à -150 mV/ECS est observé. Il correspond à la réduction de l'oxyde de platine formé spontanément ou à l'adsorption d'éléments organiques (voir Section III. 4.1).

Au-delà de 0 mV/ECS, la densité de courant dans le RPMI-1640 purgé à l'azote est plus faible que dans les conditions aérées mais plus élevée que dans l'atmosphère de l'incubateur (contenant 19,90% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>). Ceci indique que la teneur en azote naturellement présente dans l'air (78%) n'est pas impliquée dans les réactions d'oxydation. Cela confirme que le pic anodique autour de 700 mV/ECS, mis en évidence à la Section III. 4.1, correspond davantage aux espèces organiques qu'à l'oxyde de platine. La densité de courant enregistrée lorsque le RPMI-1640 est purgé au dioxyde de carbone présente une valeur proche de zéro (0,008 mA.cm<sup>-2</sup>) sur l'ensemble du test. Trois réactions sont envisagées : **i**) le dioxyde de carbone dénature la structure ou modifie la structure conformationnelle des espèces organiques (comme l'adsorption du CO<sub>2</sub> par les acides aminés [221]) et inhibe ensuite leur réactivité, **ii**) les ions bicarbonates sont adsorbés de préférence sur des sites réactifs à la surface du platine et inhibent l'oxydation des composés organiques, **iii**) l'oxygène participe aux réactions d'oxydation des espèces organiques.

Les réactions d'oxydation qui ont lieu dans le RPMI-1640 sont dépendantes du rapport O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> :

1. L'augmentation de la teneur en oxygène de 19,90 à 20,95% (de l'atmosphère de l'incubateur à l'aération) accélère la cinétique des réactions anodiques impliquant l'oxyde de platine, l'eau et les espèces organiques.
2. Le comportement électrochimique sous barbotage de N<sub>2</sub> confirme la réactivité des espèces organiques autour de +700 mV/ECS.
3. L'ajout de 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air contribue à bloquer les sites actifs. Les ions carbonates et bicarbonates sont impliqués dans les processus de transfert de charges et de transport de matière.

Pour évaluer la contribution du dioxyde de carbone sur la réactivité du RPMI-1640, le système a été polarisé à des potentiels d'intérêts couplé à des mesures par SIE.

### III. 5.2.b Conditions potentiostatiques

De la même manière que précédemment, des mesures SIE ont été réalisées après polarisation de l'électrode de platine immergée dans le RPMI-1640. La Figure III. 23 donne une représentation de Nyquist des spectres d'impédance obtenus en milieu aéré et dans l'incubateur. Les diamètres des demi-cercles obtenus en milieu aéré et en incubateur sont semblables aux différents potentiels de polarisation. Les conditions d'aération ont peu d'effet sur la résistivité des composés organiques électroactifs. A -450 mV/ECS uniquement, le diamètre augmente considérablement en milieu aéré, ce qui traduit un phénomène interfacial plus résistif. A ce potentiel la réduction de l'oxygène dissous a lieu à la surface de l'électrode de platine.

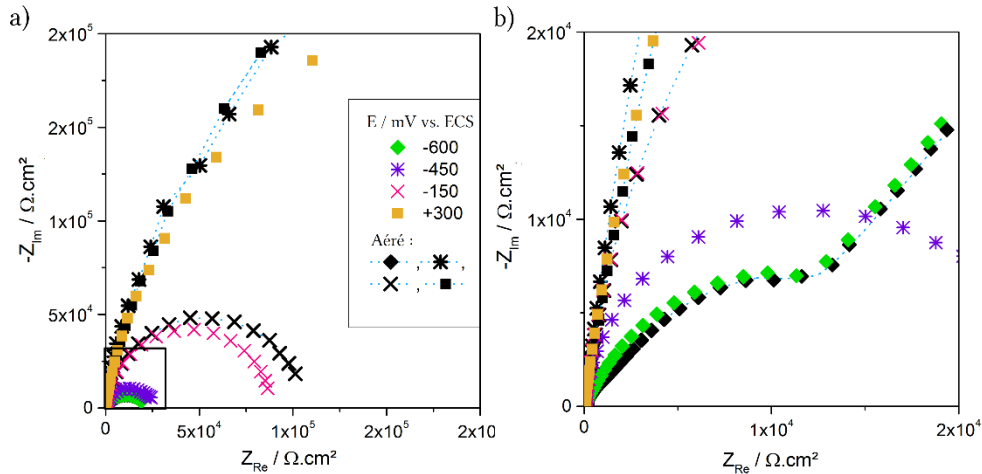


Figure III. 23 Spectres d'impédance d'une électrode de platine polarisée dans le RPMI-1640 supplémenté de -600 à + 300 mV/ECS sous l'atmosphère d'un incubateur (5 % CO<sub>2</sub>) (symboles colorés) et en milieu aéré (0,035 % CO<sub>2</sub>) (symboles noirs).

Les paramètres d'impédance sont obtenus à partir de la même méthode et des mêmes circuits électriques que ceux appliqués précédemment [98]. La moyenne des valeurs de  $R_2$ ,  $\alpha$ ,  $Q$ ,  $C_{\text{eff}}$  et  $d_{\text{eff}}$  obtenues en milieu aéré sont présentées graphiquement en comparaison de celles obtenues en incubateur (Figure III. 24).

Aux potentiels -150 et +300 mV/ECS, la contribution du CO<sub>2</sub> sur la réactivité du milieu est peu visible. Les paramètres électrochimiques sont semblables en termes de valeurs et d'évolution en fonction du potentiel de polarisation. Pour autant la  $C_{\text{eff}}$  et la  $d_{\text{eff}}$  sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ), suggérant que les composés carbonatés s'adsorbent sur la surface métallique.

A -450 mV/ECS la résistance de transfert de charge  $R_2$  augmente de manière significative en milieu aéré jusqu'à atteindre 250 kΩ.cm<sup>2</sup> (par comparaison, elle est de 48 kΩ.cm<sup>2</sup> en incubateur) ( $p = 0,01$ ). L'augmentation de la résistance dans le cas présent est représentative de l'adsorption de l'oxygène dissous sur la surface métallique. L'ajout de 5% de CO<sub>2</sub>, augmente la vitesse de réduction globale ce qui suggère que les espèces carbonées sont en compétition avec la réduction d'O<sub>2</sub> dissous. Ceci se traduit également par une différence significative de  $Q$ ,  $C_{\text{eff}}$  et  $d_{\text{eff}}$  ( $p < 0,08$ ).

A -600 mV/ECS, l'augmentation de  $C_{\text{eff}}$  (760 μF cm<sup>-2</sup>) est attribuée à l'évolution de H<sub>2</sub>. L'interface platine/solution est perturbée par la présence de bulles de dihydrogène ( $\alpha = 0,8$ ). La contribution prédominante de la capacité effective est  $C_{\text{ad}}$ . Les conditions d'aération semblent affecter la capacité de la double couche en augmentant les valeurs de capacité dans les solutions contenant plus d'oxygène mais pas de manière significative ( $p > 0,3$ ).

Le rapport de concentration des ions OH<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> doit être pris en compte dans les études sur les biomatériaux métalliques. Il modifie la composition et la stabilité du film d'oxydes [222]. Les ions carbonates pourraient en effet retarder la dissolution des alliages de magnésium en formant une couche de MgCO<sub>3</sub> [178]. Dans le cas des alliages de cobalt, les espèces carbonatées dérivées interfèrent avec les ions cobalt donnant lieu à la précipitation d'un complexe solide CoCO<sub>3</sub> [177,179]. Les solutions oxygénées conduisent à la formation de complexes métalliques de CoCrMo et accélèrent ensuite la dissolution transpassive [72,223].

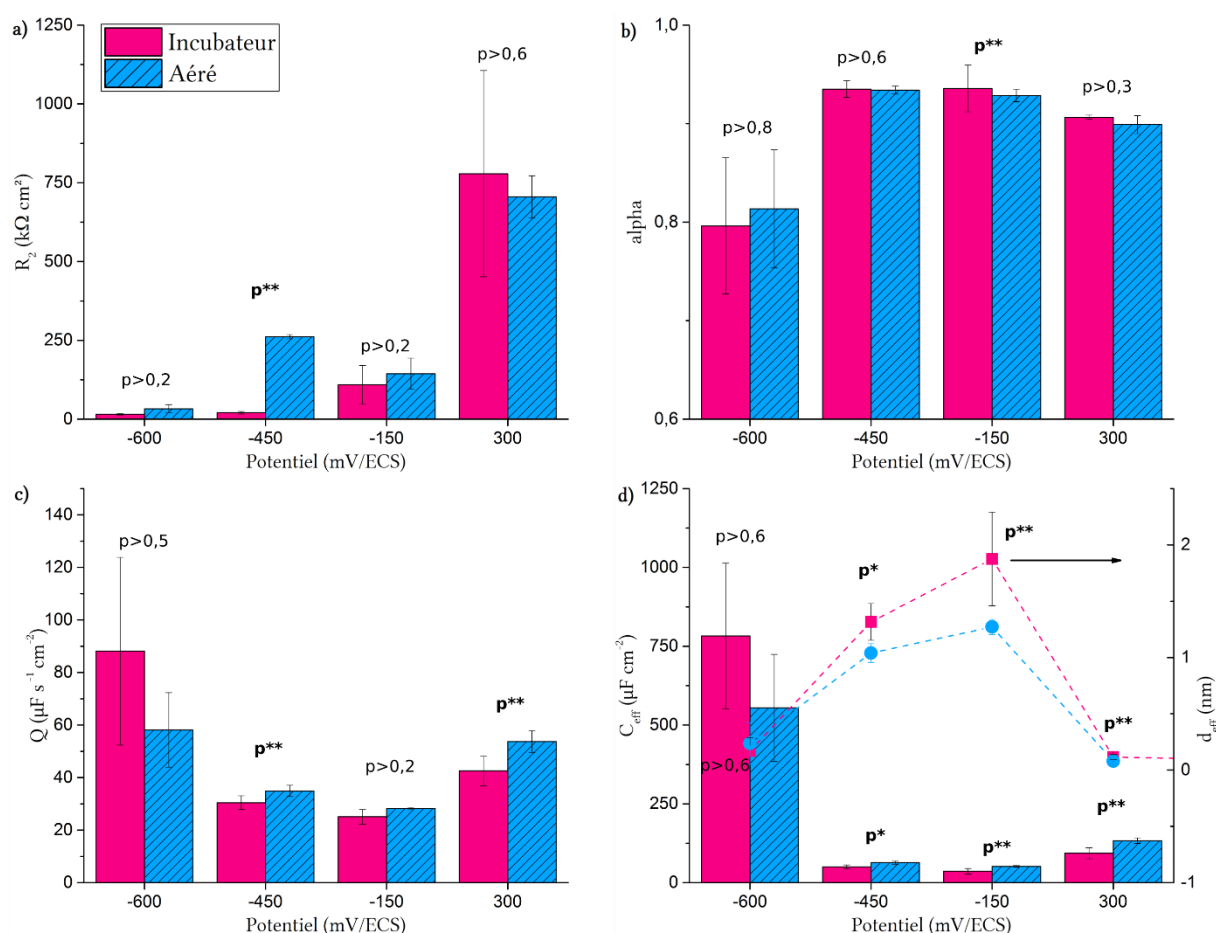


Figure III. 24 Résultat des paramètres électrochimiques d'une électrode de platine polarisée dans le RPMI-1640 supplémenté sous atmosphère d'un incubateur (5 % CO<sub>2</sub>) (rose) et en milieu aéré (0,035 % CO<sub>2</sub>) (bleu). Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois échantillons et l'incertitude à l'écart type de la moyenne. Les données ont été traitées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un essai de comparaison multiple : p\*\* correspond une probabilité inférieure à 0,05 et p\* = 0,08.

### III. 6 CONCLUSION

Le RPMI-1640, un milieu de culture cellulaire, a été utilisé comme fluide physiologique simulé au lieu de solutions inorganiques simplifiées. Ce milieu a été sélectionné en raison de son intérêt pour la culture cellulaire et pour sa meilleure représentativité des conditions physiologiques *in vivo*. Son comportement biologique et électrochimique a été évalué par des méthodes biologiques et techniques électrochimiques. Les résultats conduisent aux conclusions suivantes :

1. Le RPMI-1640 est le milieu de culture le plus favorable aux ostéoblastes et aux macrophages sélectionnés pour cette étude.
2. Un seul milieu de culture peut être utilisé pour plusieurs lignées cellulaires sans perturber le métabolisme et la viabilité des cellules.
3. Les composés organiques (acides aminés, vitamines) du RPMI-1640 sont électrochimiquement réactifs. Ils limitent la diffusion de l'O<sub>2</sub> et la formation de complexes de platine. Ils accélèrent l'activité anodique autour de 300 mV/ECS, ce qui correspond à l'adsorption d'espèces organiques et éventuellement à leur oxydation.
4. Le SVF et l'albumine ne sont pas les composés organiques les plus électroactifs dans le RPMI-1640 : d'autres espèces entrent en compétition à la surface du substrat d'étude.

5. Les analyses de surface indiquent que l'adsorption des espèces organiques est couplée à la précipitation des sels inorganiques (calcium, phosphate et carbonate).
6. L'ajout de 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air diminue l'intensité des réactions redox du RPMI-1640.

Ces travaux démontrent que les espèces organiques du RPMI-1640 sont réactives et tout particulièrement dans le domaine passif de certains alliages biomédicaux. Par conséquent, la présence de plusieurs espèces biologiques dans l'électrolyte et la pression partielle du gaz sont des facteurs déterminants dans la stabilité du film passif et l'intégrité des biomatériaux métalliques. Les résultats démontrent que le comportement de passivation des biomatériaux doit être étudié dans des conditions les plus réalistes possibles.

Bien que le RPMI-1640 ne corresponde pas parfaitement au liquide synovial *in vivo*, de par sa composition chimique et sa structure lipidique, il permet de prendre en compte la représentativité et l'adaptabilité des conditions externes. L'étude de ce milieu est intéressante car il permet aux cellules de se développer. La proposition visant à améliorer les essais de corrosion des biomatériaux métalliques, concernant la représentativité des milieux, est validée. Cette étude n'est pas exhaustive et représente qu'une étape dans la démarche d'analyse des milieux physiologiques simulés complexes vers l'environnement naturel *in vivo*.





---

# CHAPITRE IV

## REACTIVITE DE L'ALLIAGE DE CoCrMo EN CONDITION DE CULTURE CELLULAIRE

---

Le biomatériau métallique retenu pour la présente étude est le CoCrMo. Ce chapitre est consacré à la réactivité de cet alliage passivable dans les conditions favorables à la culture cellulaire établies au chapitre précédent (RPMI-1640 et incubateur). La stabilité et la composition du film passif ont été évaluées en tenant compte de la réactivité spécifique des composés biologiques de l'électrolyte et de la pression partielle en dioxyde de carbone.

### Sommaire

---

<b>IV. 1 Introduction</b> .....	<b>80</b>
<b>IV. 2 Notions bibliographiques sur la corrosion des biomatériaux métalliques</b> .....	<b>80</b>
IV. 2.1 L'interface métal/liquide.....	80
IV. 2.2 Corrosion des biomatériaux métalliques .....	81
IV. 2.3 La passivation des biomatériaux métalliques .....	82
IV. 2.4 Mécanismes de formation du film passif.....	83
IV. 2.5 Caractéristiques du film passif des alliages de CoCrMo .....	84
IV. 2.6 Adsorption des protéines.....	85
IV. 2.7 Effet du tampon carbonate/bicarbonate .....	88
IV. 2.8 Synthèse générale.....	89
<b>IV. 3 Réactivité électrochimique du CoCrMo en conditions de culture cellulaire</b> .....	<b>89</b>
IV. 3.1 Domaines de potentiels du CoCrMo en RPMI-1640 .....	89
IV. 3.2 Conditions potentiostatiques .....	92
IV. 3.3 Composition chimique de surface.....	97
IV. 3.3.a Les composés inorganiques : $\text{Na}_{1s}$ , $\text{Cl}_{2p}$ , $\text{Ca}_{2p_{3/2}}$ et $\text{P}_{2p}$ .....	98
IV. 3.3.b Les composés organiques : $\text{N}_{1s}$ , $\text{O}_{1s}$ et $\text{C}_{1s}$ .....	99
IV. 3.3.c Les oxydes métalliques : Pics haute résolution $\text{Co}_{2p_{3/2}}$ , $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$ et $\text{Mo}_{3d_{5/2}}$ .....	102
IV. 3.4 Discussion.....	106
<b>IV. 4 Rôle des espèces organiques</b> .....	<b>107</b>
IV. 4.1 Evolution de l'E <sub>OCP</sub> du CoCrMo.....	107
IV. 4.2 Essais potentiostatiques .....	108
IV. 4.2.a Comparaison entre RPMI-1640 et DPBS .....	109
IV. 4.2.b Le sérum de veau foetal (SVF).....	111
<b>IV. 5 Contribution de la teneur de dioxyde de carbone dans l'atmosphère</b> .....	<b>112</b>
IV. 5.1 Condition dynamique.....	112
IV. 5.2 Condition potentiostatique.....	114
IV. 5.3 Conclusion sur la contribution du dioxyde de carbone sur le CoCrMo.....	115
<b>IV. 6 Conclusion</b> .....	<b>116</b>

## IV. 1 INTRODUCTION

Dans la pratique clinique, les alliages à base de cobalt sont largement utilisés comme implants orthopédiques pour leur résistance élevée à la corrosion, conférée par la présence d'un film d'oxydes mince [72,105,119,224]. Ses propriétés physico-chimiques contrôlent également l'interaction avec les tissus et l'environnement physiologique. Par conséquent, il est considéré comme biocompatible [225–229]. En effet, après l'implantation, la première interaction entre les tissus et le biomatériau est l'adsorption de constituants plasmatiques, des protéines en particulier, sur la surface solide. Il a été reconnu très tôt que les molécules organiques, sous forme de couche d'adsorption, contribuent à la dissolution des métaux et alliages de grade médical [111,161,166,170,230–233], qui sont à l'origine d'effets physiologiques néfastes (allergie, toxicité, effet cancérigène) [216,234,235].

Il s'agit de considérer :

1. Comment les environnements biologiques influencent la sensibilité à la corrosion de l'alliage CoCrMo et selon quels mécanismes?
2. Quelle est la composition et les propriétés du film passif du CoCrMo en présence d'un mélange mixte de protéines ?

Le but de ce chapitre est de définir le comportement électrochimique de l'alliage biomédical de CoCrMo dans le RPMI-1640.

- Dans un premier temps, nous avons établi le comportement électrochimique passif du CoCrMo,
- Dans un second temps, nous avons discerné les biomolécules réactives,
- Dans un dernier temps, nous avons détaillé les contributions du CO<sub>2</sub> qui contrôle le pH du fluide physiologique.

Les mêmes techniques électrochimiques que précédemment ont été utilisées. La SIE permet d'obtenir des informations sur la vitesse de dissolution dans un film passif, la conductivité et l'épaisseur en mesurant respectivement la  $R_p$  et la capacité d'interface [119]. Des analyses de surface par XPS complètent l'analyse électrochimique.

## IV. 2 NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA CORROSION DES BIOMATERIAUX METALLIQUES

La plupart des biomatériaux ont été choisis en fonction de leur aptitude à se passiver. Toutefois, de nombreuses substances actives de l'environnement physiologique peuvent interagir avec les biomatériaux et, éventuellement les dégrader. Il convient de caractériser ces aspects de dégradation et de corrosion des biomatériaux métalliques, c'est l'objet de cette section.

### IV. 2.1 L'interface métal/liquide

Lorsqu'un métal est immergé dans un milieu aqueux, comme dans le cas de biomatériaux, l'interface métal/liquide se caractérise par la formation d'une double couche électrochimique, c'est-à-dire de la présence d'une différence de potentiel électrochimique (Figure IV. 1). La double couche est modifiée par l'existence et la distribution de charges, qui est fonction de la solution (nature, composition, molécules et la physisorption des cations et anions [236]) et de son interaction avec la surface métallique (propriétés électroniques).

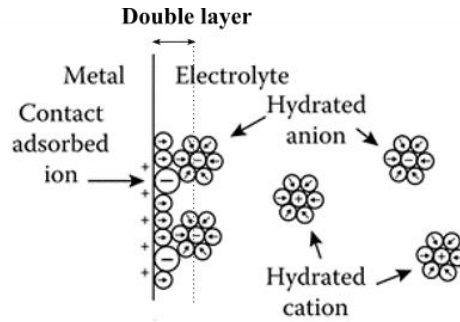


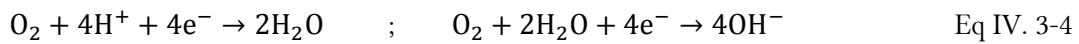
Figure IV. 1 a) Double couche électrochimique à l'interface métal-électrolyte en présence d'anions. La surface métallique est excédentaire en charges positives [95].

#### IV. 2.2 Corrosion des biomatériaux métalliques

Deux réactions se produisent simultanément : la réaction anodique, qui produit des ions métalliques en solution et une perte d'électrons circulant par le circuit électrique, telle qu'exprimée par l'équation IV.1 :



Et les réactions cathodiques, dans lesquelles les électrons sont consommés. En solution, deux réductions peuvent avoir lieu : la réduction du proton et de l'oxygène dissous :



A l'abandon, la vitesse de la réaction d'oxydation est égale à la vitesse de la réaction de réduction. Ce principe de base de la corrosion électrochimique explique comment les variations de l'environnement peuvent affecter la vitesse de corrosion. L'ensemble du processus de corrosion peut être limité en empêchant l'une ou l'autre de ces réactions.

La force motrice thermodynamique des réactions est l'énergie libre résultant de l'oxydation des atomes métalliques. La différence de potentiel entre le milieu et le métal donne lieu au potentiel de corrosion. Les diagrammes de Pourbaix mettent en relation ces potentiels avec le pH. Ils sont très utiles pour déterminer les régions de corrosion, de passivité et d'immunité en fonction de considération thermodynamique [187].

Dans les fluides physiologiques, la corrosion aqueuse se produit dans la région de stabilité de l'eau, entre les deux diagonales (Figure IV. 2). Lorsque les produits de corrosion du métal sont solides (oxydes, hydroxydes, hydrures ou sels de métal) et recouvrent le métal, la corrosion est généralement ralentie et le métal se passive (domaine de passivité). Si ces produits sont solubles, la corrosion se poursuit (domaines de corrosion respectivement acide ou basique selon le pH de la solution). Lorsque la différence de potentiel entre le métal et une électrode de référence, est située dans la zone où le métal est stable, celui-ci est protégé. Ce domaine de potentiel et de pH est celui d'immunité. La Figure IV. 2 montre un diagramme adapté de pH-potential qui illustre les conditions dans lesquelles les biomatériaux peuvent être soumis. Les différentes parties du corps ont des valeurs de pH et des concentrations d'oxygène différentes. Par conséquent, un alliage métallique qui se comporte bien à un endroit peut souffrir d'une quantité inacceptable de corrosion ailleurs.

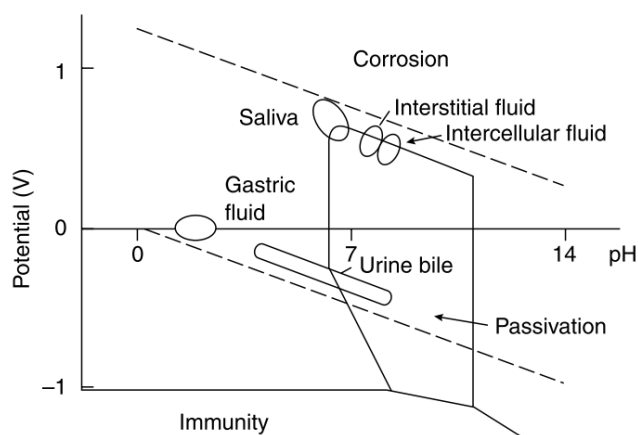


Figure IV. 2 Diagramme de Pourbaix d'alliages métalliques, montrant les régions associées aux différents fluides physiologiques [237].

Les diagrammes de Pourbaix sont souvent peu représentatifs de la réalité. Ils correspondent à des équilibres thermodynamiques. Ils ne permettent ni d'estimer la vitesse de corrosion d'un métal au contact d'une solution, ni de prévoir le type de corrosion du métal. Dans tous les cas, il convient de considérer une approche cinétique de la corrosion.

#### IV. 2.3 La passivation des biomatériaux métalliques

Le comportement électrochimique des biomatériaux métalliques est gouverné par des limitations cinétiques qui préviennent ou empêchent la corrosion en limitant la vitesse à laquelle les processus d'oxydation ou de réduction peuvent avoir lieu. La formation d'une fine couche d'oxyde ou d'hydroxyde sur une surface métallique, appelée passivation, est un exemple de limitation de la corrosion [95,238].

La courbe de polarisation théorique d'un métal passif est présentée à la Figure IV. 3. Quatre domaines de potentiels sont observés : les domaines cathodique, anodique, passif et transpassif. Lorsque le potentiel est inférieur au potentiel de corrosion ( $E_{corr}$ ), le métal se trouve dans la région cathodique et dans ce cas, le courant est gouverné par la réduction du proton et la quantité d'oxygène dissous. Au fur et à mesure que le potentiel augmente, le métal devient anodique (actif) jusqu'au potentiel critique de passivation ( $E_{pp}$ ) [95]. Lorsque le potentiel dépasse le potentiel critique de passivation  $E_{pp}$ , la densité du courant diminue de plusieurs ordres de grandeur pour atteindre une valeur inférieure ou égale au  $\mu A.cm^{-2}$ . La densité de courant passif ( $i_p$ ) caractérise la vitesse de dissolution du métal passivé. Il délimite le palier de passivité et est liée à la formation du film passif protecteur sur la surface du métal. Le potentiel de transpassivation ( $E_{tp}$ ) indique la fin du palier du courant qui correspond au domaine passif. Au-delà, la densité de courant partiel anodique augmente en raison de la dissolution transpassive et de l'oxydation de l'eau [211]. C'est le cas du chrome, qui forme  $Cr_2O_7^{2-}$  ou  $CrO_4^{2-}$  solubles dans des solutions acides ou alcalines, respectivement.

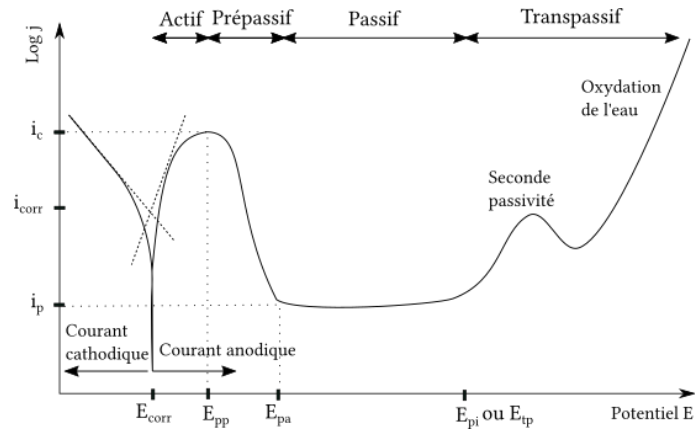


Figure IV. 3 Courbe de polarisation des métaux et alliages passivables montrant les domaines cathodique, actif, passif et transpassif délimités par le potentiel libre de corrosion ( $E_{corr}$ ), le potentiel critique de passivation ( $E_{pp}$ ), le potentiel de passivation ( $E_{pa}$ ), le domaine transpassif à partir du potentiel transpassif ou de piqûre ( $E_{tp}$  ou  $E_{pi}$ ) et l'oxydation de l'eau.

#### IV. 2.4 Mécanismes de formation du film passif

Le phénomène de passivité se caractérise par la présence d'un film d'oxydes mince (épaisseur de 2 à 10 nm), appelé film passif ou couche passive, à la surface du métal qui rend alors la vitesse de corrosion du matériau négligeable. Les films passifs présentent une structure atomique complexe qui ralentit les mécanismes de transport ionique et de transfert électronique [239]. Le champ électrique à travers l'oxyde entraîne le déplacement des cations métalliques vers l'électrolyte et des anions (ions oxygène) dans la direction opposée (Figure IV. 4). Le transport des électrons et des trous électroniques à travers les films d'oxyde est modifié par la nature électronique du film d'oxydes présent (Figure IV. 4a). L'eau joue un rôle important sur la passivation en créant des "ponts" d'oxyde à la surface du métal. A l'interface métal/électrolyte, les cations métalliques forment des espèces  $M_xOH_y$  qui précipitent sous la forme d'un film solide. Des complexes métalliques se forment également en fonction des espèces chargées en solution (Figure IV. 4b).

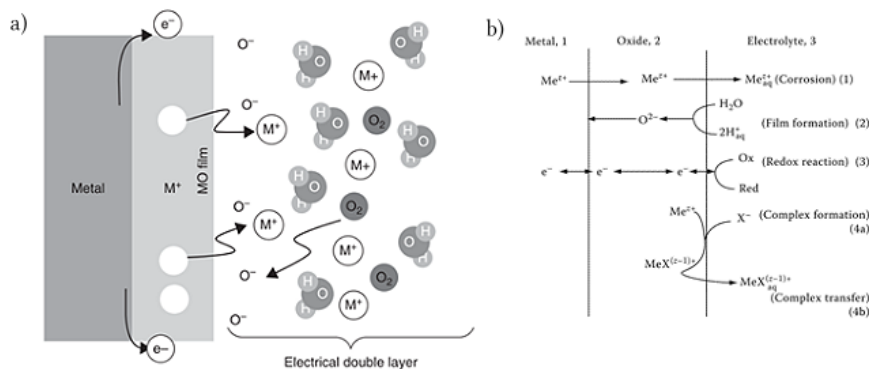


Figure IV. 4 Modèle de la couche passive avec a) Dissolution électrochimique de l'interface en contact avec un environnement biologique [240] et b) le détail des réactions relatives à la corrosion, la formation du film et les complexes [107].

La passivation inhibe la corrosion et entraîne une faible libération de produits de corrosion. Pourtant, en raison de l'agressivité du milieu physiologique, tous les matériaux d'implant sont susceptibles de subir la corrosion. La libération lente d'espèces métalliques sous formes solubles en excès (en particulier le  $Cr^{3+}$ ,

le  $\text{Co}^{2+}$  et le  $\text{Ni}^{2+}$ ) est soupçonnée de jouer un rôle dans l'induction de tumeurs et de l'ostéolyse [235,241]. Pour les applications orthopédiques, la stabilité mécanique du film d'oxydes passif et sa capacité de repassivation sont essentielles pour la protection contre la corrosion.

#### IV. 2.5 Caractéristiques du film passif des alliages de CoCrMo

Le domaine passif de l'alliage de CoCrMo dans les solutions aérées de chlorures (0,15 M NaCl) et de salive artificielle est large : de -1 045 à -45 mV/ECS [242]. En milieu physiologique, il s'étend de -500 à 600 mV/ECS [105,211,239]. Le comportement électrochimique du CoCrMo est similaire à celui du chrome pur [72,242,243]. Son comportement passif est dominé par le chrome et est attribué à la formation des oxydes  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  [119].

Les alliages de CoCrMo se passivent aussi bien au contact de l'air qu'au contact des solutions aqueuses. Les techniques d'analyse de surface ont été utilisées pour déterminer la nature des films passifs. Celui formé spontanément dans l'air est constitué d'une couche supérieure (1,6 nm) de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CoO}$  et  $\text{MoO}_3$  [105] et d'une couche interne contenant du  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  et des oxydes de cobalt et de molybdène en faibles proportions [242]. L'épaisseur totale du film passif sur les alliages de CoCrMo dans l'atmosphère est d'environ 4-5 nm [244]. La nature de la surface du CoCrMo varie en fonction de la solution dans laquelle l'alliage a été immergé (Figure IV. 5) [233] :

- Au contact de l'eau, l'extrême surface est recouverte d'une couche de 3 à 3,5 nm de  $\text{Co}(\text{OH})_2$  sous laquelle une couche de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  hydraté est identifiée [233],
- En solutions physiologiques simulées (NaCl, salive artificielle), les espèces du cobalt sont remplacées par  $\text{Co}(\text{OH})_2$ , de même que le  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  se transforme en  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  [242],
- En présence de sérum (humain, et bovin fœtal), il se forme un mélange complexe d'oxydes mixtes de Cr(III) et de Co(II) avec un dépôt de phosphate de calcium.

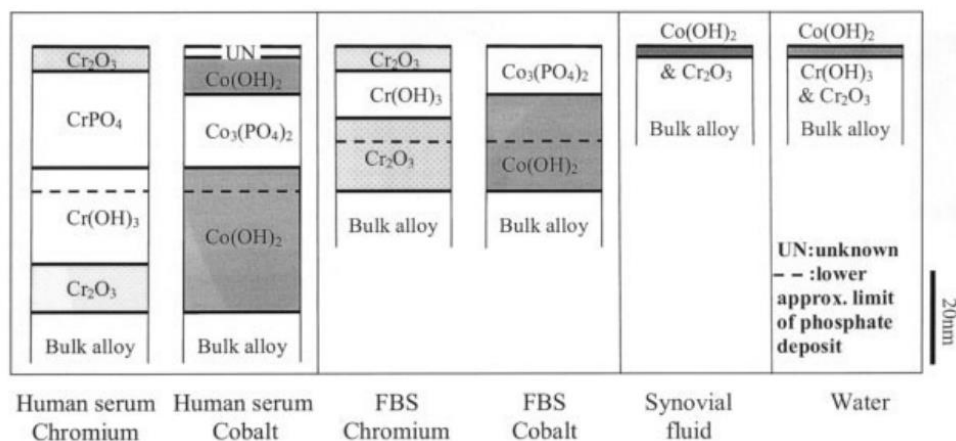


Figure IV. 5 Profils de profondeur des produits de corrosion du cobalt et du chrome identifiés par ToF-SIMS après 5 jours d'immersion de l'alliage CoCr dans différentes solutions. On suppose que tous les composés sont hydratés et/ou hydrolysés [233].

L'exposition prolongée en milieu aqueux aura tendance à enrichir le film passif davantage en oxydes de chrome en raison de la forte tendance à la passivation du chrome en surface [72], tandis que sa teneur en cobalt est trois fois moins élevée [243]. La composition du film formé dans des solutions physiologiques simulées dépend du potentiel et du temps d'exposition [72,105,119,224]. Aux potentiels allant jusqu'à 300 mV/ECS, le film passif du CoCrMo est composé principalement d'oxyde de Cr(III), et dans une moindre mesure, d'hydroxyde de Cr(III) avec une faible contribution d'oxyde de Co et presque aucun oxyde de

Mo [105,119]. L'épaisseur du film atteint jusqu'à 3,5 nm. La fraction cationique de cobalt dans les alliages de CoCrMo immergés en solution de Hank ou de NaCl augmente nettement au-dessus de 200-300 mV/ECS, atteignant un maximum à environ 600 mV/ECS [105,119,210]. Le Cr(VI) a été détecté dans l'oxyde à partir de 500 mV/ECS [72,119].

Dans le domaine transpassif, les oxydes de cobalt et de molybdène interviennent essentiellement sous forme de CoO et de MoO<sub>3</sub>. La formation de ces espèces est accompagnée d'un épaissement de la couche passive dans laquelle la concentration en oxydes de chrome et de molybdène est élevée dans la partie externe du film (interface oxydes/solution). Le molybdène confère ici une résistance à la corrosion supérieure à celle du chrome [211]. D'autres espèces comme le Cr(VI) sont détectées, témoins d'une accélération de la dissolution du CoCrMo. La présence de Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et/ou Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dans ce domaine de potentiel n'est pas exclue mais leur détection semble ambiguë [105].

On sait que les phosphates s'adsorbent également à la surface des alliages de CoCrMo [103,110,111]. Le phosphate de calcium précipite à la surface des alliages de CoCrMo pendant l'immersion dans une solution de Hank et dans un milieu de culture cellulaire [103]. La concurrence entre l'adsorption de l'albumine et du phosphate sur les alliages de CoCrMo semble dépendre de la concentration du phosphate. Il semblerait que l'albumine s'adsorbe de façon compétitive avec le phosphate dans le PBS contenant 0,5 g/L d'albumine [111]. En revanche, Ouerd et al. ont constaté qu'il n'y a aucune preuve de compétition entre les ions phosphate et les protéines en termes d'adsorption lorsque les concentrations en ions phosphate sont plus élevées [110,131].

La repassivation, suite aux sollicitations mécaniques, entraîne la libération préférentielle de l'ion Co pour les alliages CoCrMo. Celle de Mo est signalée comme insignifiante [119,245]. En solution biologique à un pH 4, les ions Cr et Mo sont dissous en plus grande quantité. Il a également été suggéré que la formation d'oxydes ou d'hydroxydes d'ions métalliques était moins toxique que les complexes organométalliques [246].

Pour résumer, la composition du film passif du CoCrMo peut aller de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à des oxydes mixtes comme le CoO-Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (un oxyde de spinelle) ou des oxydes amorphes hétérogènes dont la chimie varie avec la profondeur et le potentiel [239,247].

#### IV. 2.6 Adsorption des protéines

Dès que les biomatériaux sont implantés dans le corps humain, un film biologique complexe se forme en quelques secondes par adsorption. Les caractéristiques de surface du biomatériau contrôlent cette accumulation de protéines, qui elles-mêmes jouent un rôle crucial dans le devenir de l'interface tissu-implant puisqu'elles influencent les processus de dégradation du film, de libération des ions métalliques et de repassivation du film.

Sur la base des considérations relatives au transport de masse, les protéines présentes à la concentration la plus élevée sont les premières à arriver à la surface du biomatériau. Ainsi, en raison de sa concentration élevée et de sa taille modérée, l'albumine domine les interactions initiales avec la surface suivie de l'Immunoglobuline G (IgG) (Figure IV. 6) [155,168]. D'autres protéines arrivent à plus faible vitesse à la surface, et selon leur affinité pour le biomatériau, peuvent remplacer les molécules précédemment adsorbées. Par exemple, le fibrinogène peut dominer la surface en raison d'une plus grande affinité, même si sa vitesse d'arrivée est plus de 100 fois inférieure à celle de l'albumine.

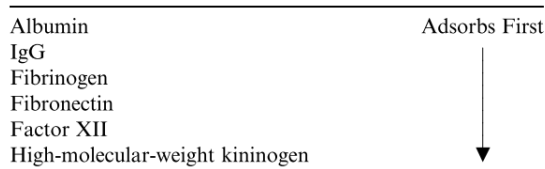


Figure IV. 6 Hiérarchie d'échange des protéines plasmatiques sur le verre et les oxydes métalliques [155].

Le processus d'adsorption des protéines est gouverné par l'attraction électrostatique entre une surface et une protéine inversement chargée. La charge protéique globale est fortement dépendante du pH du milieu environnant [248–251]. Lorsqu'une protéine est présente dans une solution plus acide que le point isoélectrique (pI), elle présente une charge positive nette, sinon elle est chargée négativement [248]. L'adsorption maximale se situe généralement près du point isoélectrique (pI). Les pI des principales protéines sont : l'albumine pI~4,5 [248], la gammaglobuline pI~8 [248], la transferrine pI~5,7 [249], le fibrinogène pI~5,0 [250].

Il est raisonnable de supposer que la présence de macromolécules biologiques ne provoquera pas un mécanisme de corrosion complètement nouveau. Cependant, elles peuvent influencer la vitesse de corrosion en interférant d'une manière ou d'une autre avec les réactions anodiques ou cathodiques mentionnées précédemment. Les protéines peuvent avoir des effets multiples :

1. Les molécules biologiques pourraient perturber l'équilibre des réactions de corrosion en consommant l'un ou l'autre des produits de la réaction anodique ou cathodique. Par exemple, les protéines peuvent se lier aux cations métalliques ce qui pourrait favoriser les réactions de dissolution des métaux et les transporter loin de la surface de l'implant.
2. La stabilité de la couche d'oxyde dépend du potentiel de l'électrode et du pH de la solution. Les protéines ont souvent des rôles porteurs d'électrons et affectent le potentiel de l'électrode.
3. Les protéines peuvent s'adsorber sur les surfaces métalliques et ces couches d'adsorption de protéines peuvent induire une protection contre la corrosion en bloquant les sites actifs de la surface [110,166]. L'adsorption des protéines est influencée par l'énergie de surface et les charges de surface.
4. La stabilité de la couche d'oxyde dépend également de la disponibilité de l'oxygène. L'adsorption des protéines sur la surface des matériaux pourrait limiter la diffusion de l'oxygène dans certaines régions de la surface. Ces zones occupées par les protéines créent des zones appauvries en oxygène dissous et deviennent le siège de réactions d'oxydation (corrosion par aération différentielle).
5. Dans un scénario de tribocorrosion (Chapitre VI), les biofilms qui se forment à la surface sont influencés par les protéines et peuvent agir comme lubrifiants réduisant la friction.

Par ailleurs, les protéines s'adsorbent différemment selon la nature des métaux en raison de leur structure moléculaire qui ont des énergies de liaison différentes et donc des affinités différentes pour des cations spécifiques [252]. L'adsorption des protéines implique également des changements de conformation ou d'orientation vers une position plus stable sur la surface et parfois la désorption des protéines vers la solution [253]. Les protéines ont tendance à se déplier ou à se dénaturer à la surface de certains matériaux afin de minimiser l'énergie libre du système.

La variété d'interactions des espèces avec les surfaces conduit à un comportement dynamique du système fortement dépendant du temps [254]. Les arrivants précoces (faible poids moléculaire/concentration élevée) sont potentiellement déplacés par les arrivants tardifs (poids moléculaire élevé/concentration faible). Ce processus (effet Vroman), implique que même si la concentration totale de protéines en surface atteint une valeur stable, la composition du film à l'interface continue à changer. L'influence des protéines



sur la corrosion a largement été étudiée, mais les résultats ne sont pas tout à fait clairs en ce qui concerne l'influence des protéines sur la vitesse de corrosion.

#### Cas de l'albumine en contact du CoCrMo

L'albumine présente une forte affinité avec l'alliage de CoCrMo [171]. Il semble que les ions Co et Cr se lient à l'albumine soit en position carboxylate et tyrosine, soit se lient au groupe -SH d'un seul résidu de cystéine [255,256]. La protéine se lie aux ions métalliques pour former des complexes métal-protéines ou des métalloprotéines. L'albumine joue un rôle important sur les propriétés du film passif suivant deux mécanismes, illustrés à la Figure IV. 7 :

- D'une part, l'albumine peut réduire la vitesse de corrosion. En agissant comme une barrière chargée négativement, la protéine empêchant les anions corrosifs ( $\text{Cl}^-$  par exemple) de s'approcher de l'interface CoCrMo. L'albumine agit comme un inhibiteur cathodique. De la même manière l'oxygène dissous n'accède plus à la surface du métal, ce qui réduit sa vitesse de corrosion (Figure IV. 7 flèche 1). Son mode d'action dépend toutefois des conditions de formation du film et des potentiels appliqués [111]. Contu et al. [196] ont attribué l'augmentation de la résistance à la corrosion du CoCrMo dans le sérum bovin à l'effet d'inhibition des protéines sur la réaction d'évolution de l'hydrogène, générant une barrière de diffusion qui rend la dissolution anodique sous contrôle de diffusion. Goldberg et al. [231] ont trouvé une diminution du taux de corrosion en présence de protéines. Ceci a été attribué à l'effet barrière de la protéine adsorbée qui empêche l'eau d'atteindre la surface de l'échantillon. Enfin il a été noté que le courant du domaine passif du cobalt est abaissé en présence d'albumine du fait de l'affinité entre le Co et la BSA [233,257].
- D'autre part, l'albumine peut avoir un effet néfaste sur les propriétés du film passif en favorisant un mécanisme de dissolution induit par la complexation. En solution saline, l'albumine entraîne une diminution de l'activation d'énergie ce qui donne lieu à une adsorption sous forme de complexes c'est-à-dire une couche passive moins protectrice (Figure IV. 7 flèche 2) [161,230]. La présence d'albumine bovine peut conduire à la dissolution préférentielle du Mo dans le domaine transpassif atteignant jusqu'à 53-62% des cations métalliques [258]. La présence du molybdène dans le film améliore ses capacités de reformation du film après dépassivation.

Finalement, il semblerait qu'à de faibles concentration ( $< 0,2 \text{ g/L}$ ), l'albumine agit comme un agent complexant favorisant la dissolution métallique, tandis qu'à des concentrations supérieures, il agit sous forme d'inhibiteur [152,257].

L'adsorption de l'albumine sur l'alliage de CoCrMo dépend de l'électrolyte dans laquelle la protéine est immergée. Valero et al. ont remarqué que la résistance de polarisation du film  $R_p$  diminue avec le temps dans une solution de NaCl mais augmente dans le PBS [170]. Les deux espèces s'adsorbent de manière compétitive sur la surface de l'alliage, ce qui n'est pas surprenant car à pH 7,4, l'albumine est chargée négativement comme les ions phosphate. L'adsorption des phosphates conduit à une réduction de la vitesse de corrosion (Figure IV. 7 flèche 0) [111]. Lewis et al. suggère que l'albumine perturbe le processus de formation des ions de cobalt et de chrome, piégés sur la surface métallique dans les dépôts de phosphates de calcium, ce qui peut ainsi accélérer la corrosion de l'alliage [232,233].

Enfin, Karimi et al. ont montré que l'adsorption de l'albumine sur la surface métallique peut s'accompagner d'un changement structural de conformation causé par un dépliage partiel [257]. L'adsorption se poursuit de manière à minimiser l'énergie de surface. Soit la protéine présente forme une seconde couche de protéines ce qui lui confère une structure compacte comme sur le Cr soit elle continue à s'étaler pour occuper les surfaces libres comme sur le Mo.

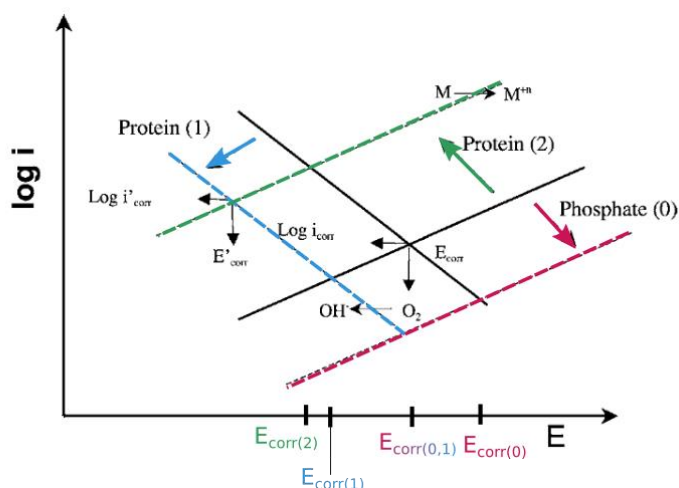


Figure IV. 7 Théorie du potentiel mixte appliquée pour interpréter l'effet de l'albumine et des phosphates sur le potentiel libre de corrosion du CoCrMo et le courant de corrosion. Les ions phosphates agissent comme inhibiteurs anodiques (flèche 0). L'albumine agit comme un inhibiteur cathodique (flèche 1) mais peut accélérer l'oxydation anodique du métal en liant les ions métalliques (flèche 2) [111].

#### IV. 2.7 Effet du tampon carbonate/bicarbonate

Le pH physiologique du milieu de culture cellulaire RPMI-1640 est régulé par la quantité de  $\text{CO}_2$  dissous en solution, c'est-à-dire par le rapport  $[\text{CO}_3^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$  [175,259]. Il s'établit par un équilibre entre les espèces de l'acide carbonique ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), l'ion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) et l'ion carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), comme cela a déjà été mentionné au chapitre précédent. L'introduction de 5 % de  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère a mis en évidence un blocage des sites actifs sur l'électrode de platine.

Dans le cas des biomatériaux métalliques, la littérature mentionne que les ions bicarbonate retardent la dissolution des alliages de magnésium en formant une couche de  $\text{MgCO}_3$  [105,260,261]. Dans le cas des alliages de cobalt, plusieurs auteurs [177,179,262,263] ont montré que les ions bicarbonates  $\text{HCO}_3^-$  interfèrent avec les couches passives de  $\text{Co(II)}$  donnant lieu à la précipitation d'un complexe solide  $\text{CoCO}_3$  qui est partiellement dissous par  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{Co}(\text{CO}_3)_2$ . La réaction est limitée par la diffusion. A notre connaissance, aucune étude ne fait mention de l'effet du  $\text{CO}_2$  et des espèces dérivées sur la réactivité d'un alliage CoCrMo ou de chrome.

Si les fluides corporels sont tamponnés par le système carbonate jusqu'à un pH de 7,5, des variations locales du pH peuvent se produire dans les tissus qui ont été blessés ou infectés (conditions inflammatoires) [264]. Dans une plaie, il peut être aussi bas que 3,5, et si elle est infectée, le pH peut atteindre 9,0 [13]. De même la quantité de gaz de  $\text{CO}_2$  et  $\text{O}_2$  dissous dans le liquide extracellulaire peut varier considérablement à proximité d'un implant [9]. Ces exemples démontrent que le tampon pH intervient dans les réactions de corrosion des biomatériaux. Dans tous les cas, une simple solution physiologique saline ne peut pas simuler le comportement des biomatériaux métalliques dans l'organisme, ni en ce qui concerne la vitesse de dégradation ni la composition des couches superficielles qui se forment pendant la corrosion.

#### IV. 2.8 Synthèse générale

La résistance à la corrosion des alliages métalliques est due aux propriétés, à la structure et à la composition du film passif formé à la surface. La composition du milieu affecte également la dissolution du métal et elle doit être prise en compte dans l'évaluation des phénomènes de corrosion et de biocompatibilité des métaux.

Dans le cas d'un alliage de CoCrMo, l'exposition prolongée en milieu aqueux aura tendance à enrichir le film passif en oxydes de chrome [72]. La composition du film formé dans des solutions physiologiques simulées dépend du potentiel et du temps d'exposition [72,105,119,224]. On sait également que les phosphates précipitent à la surface des alliages de CoCrMo [103]. De même, l'existence de biomolécules et de cellules influence le comportement de l'interface entre le métal et la solution. Les protéines ont des effets multiples sur la corrosion des métaux. L'albumine présente une forte affinité avec l'alliage de CoCrMo [171] qui agit comme un agent complexant favorisant la dissolution métallique à de faibles concentrations, tandis qu'à des concentrations supérieures, l'adsorption est le phénomène majoritaire [152,257]. Toutes ces interactions peuvent entraver le transfert de charge responsable de la formation du film passif. Enfin, le pH de l'environnement biologique peut considérablement favoriser la corrosion et modifier les propriétés du film passif.

### IV. 3 REACTIVITE ELECTROCHIMIQUE DU CoCrMo EN CONDITIONS DE CULTURE CELLULAIRE

Cette partie a pour but d'évaluer les propriétés du film passif de l'alliage CoCrMo en milieu organique biologique (RPMI-1640). L'étude intègre l'utilisation de techniques électrochimiques, à savoir le suivi du potentiel de corrosion avec le temps, le tracé des courbes de polarisation et la spectroscopie d'impédance électrochimique, et une caractérisation physico-chimique de l'interface.

#### IV. 3.1 Domaines de potentiels du CoCrMo en RPMI-1640

La courbe de polarisation du CoCrMo immergé en RPMI-1640 supplémenté a été tracée après 1 h de stabilisation au potentiel de circuit ouvert  $E_{OCP}$ . Cette étape permet à la fois de déterminer la stabilité du CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté durant le temps d'immersion et d'établir le potentiel de balayage de l'essai potentiodynamique. L' $E_{OCP}$  correspond au potentiel d'équilibre où les réactions anodiques et cathodiques sont de même intensité, à courant nul. Dans ces conditions, l' $E_{OCP}$  du CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté est de  $-340 \pm 80$  mV/ECS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

La polarisation débute du domaine cathodique vers les potentiels anodiques (Figure IV. 9). Le CoCrMo présente les caractéristiques typiques du comportement des alliages métalliques passifs dans les solutions neutres, incluant les quatre domaines de potentiels mentionnés en Section IV. 2.3. L'attribution des réactions électrochimiques aux domaines de potentiel ne peut se faire qu'avec l'inventaire des espèces présentes en solution. Le potentiel redox correspondant à chaque espèce est établi en prenant en compte les conditions de pH (7,6), de température (37°C) et d'atmosphère (5% CO<sub>2</sub>). Cependant, les espèces présentes dans le RPMI-1640 sont très nombreuses, comme cela a pu être constaté au chapitre précédent. Excepté les composés organiques, les principales espèces réactives sont : H<sub>2</sub>O (H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>), O<sub>2</sub> dissous ainsi que le Co, Cr et Mo.

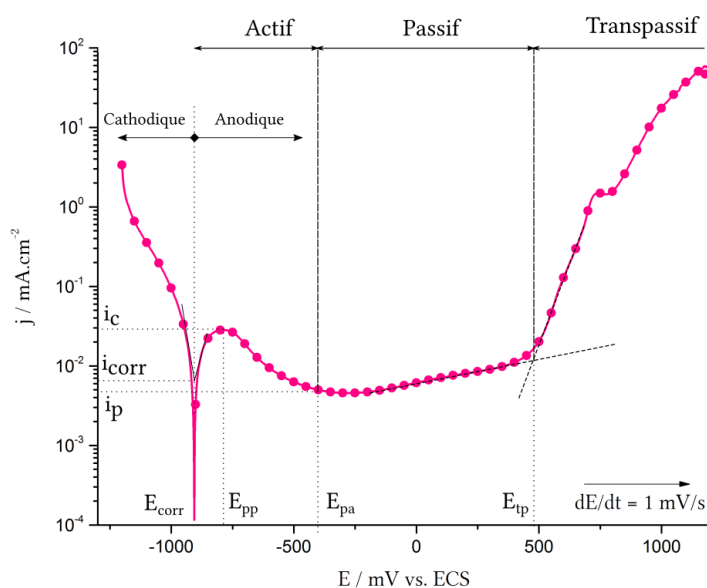


Figure IV. 8 Courbe de polarisation du CoCrMo dans le RPMI-1640 supplémenté et sous atmosphère d'un incubateur. Attribution des domaines de potentiel caractéristiques délimités par  $E_{\text{corr}}$  : le potentiel libre de corrosion,  $E_{\text{pp}}$  : le potentiel passif primaire,  $E_{\text{pa}}$  : le potentiel passif,  $E_{\text{tp}}$  : le potentiel transpassif,  $i_{\text{corr}}$  : la densité de courant de corrosion,  $i_c$  : la densité de courant critique,  $i_p$  : la densité de courant passif.

Dans la région cathodique,  $E < E_{\text{corr}}$ , le courant est dominé par la réduction du proton et la réduction de l'oxygène dissous selon les réactions établies au Tableau IV. 1.

Tableau IV. 1 Réactions électrochimiques impliquées dans le domaine cathodique dans le cas du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté.

Réaction	Espèce	Potentiel
$2\text{H}^+_{(\text{aq})} + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_{2(\text{g})}$	Proton	$E = -0,062^5 \text{ pH}$
$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \leftrightarrow 4\text{OH}^-$	Oxygène dissous	$E = E^\circ_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}} - 0,062 \text{ pH}$

Lorsque la polarisation débute à  $-200 \text{ mV}/E_{\text{OCP}}$  (Figure IV. 9a), un pic anodique est mis en évidence vers  $-800 \text{ mV}/\text{ECS}$ . Il traduit la transition active/passive du CoCrMo, indiquant la formation d'un film d'oxydes à la surface de l'électrode. Selon le potentiel, il y a oxydation du métal passivé  $\text{M}_{(\text{s})}$  en ions  $\text{M}^{n+}$  ou en oxydes métalliques  $\text{M}_x\text{O}_n$  selon les réactions présentées au Tableau IV. 2. Les oxydes peuvent être aussi des hydroxydes métalliques de la forme  $\text{M}(\text{OH})_2$  et  $\text{M}(\text{OH})_3$ . La formation de l'oxyde  $\text{M}_x\text{O}_n$  freine la dissolution du substrat métallique et on note une diminution de la densité de courant.

Tableau IV. 2 Réactions électrochimiques impliquées pendant la transition active/passive dans le cas du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté.

Condition	Réaction	Potentiel
$E_{\text{corr}} < E < E_{\text{pp}}$	$\text{M}_{(\text{s})} \rightarrow \text{M}^{n+}_{(\text{aq})} + n\text{e}^-$	$E = E^\circ_{\text{M}/\text{M}^{n+}} - 0,062/n \log [\text{M}^{n+}]$
$E_{\text{pp}} < E < E_{\text{pa}}$	$x\text{M}_{(\text{s})} + n\text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} \rightarrow \text{M}_x\text{O}_n + 2n\text{H}^+_{(\text{aq})} + 2n\text{e}^-$	$E = E^\circ_{\text{M}/\text{M}_x\text{O}_n} - (2n) \times 0,062 \text{ pH}$
<u>Exemples :</u>	$\text{Cr}_{(\text{s})} \rightarrow \text{Cr}^{2+}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^-$ et $\text{Cr}_{(\text{s})} \rightarrow \text{Cr}^{3+}_{(\text{aq})} + 3\text{e}^-$	
	$2\text{Cr}_{(\text{s})} + 3\text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} \rightarrow \text{Cr}_2\text{O}_3 + 6\text{H}^+_{(\text{aq})} + 6\text{e}^-$	
	$3\text{Cr}_{(\text{s})} + 4\text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} \rightarrow \text{Cr}_3\text{O}_4 + 8\text{H}^+_{(\text{aq})} + 8\text{e}^-$	

<sup>5</sup>  $-0,062$  correspond à la valeur du rapport  $RT/F$  de la loi de Nernst calculé à une température de  $37^\circ\text{C}$ .

L'établissement de la courbe de polarisation à partir de -50 mV/E<sub>OCP</sub> ne révèle pas la région active ou la transition active-passive (Figure IV. 9a). En effet, ces réactions se produisent dans une gamme de potentiel plus cathodique que le potentiel de départ imposé à -50 mV/E<sub>OCP</sub>. Gilbert et al. ont notamment constaté que la transition active-passive des surfaces CoCr s'étend de -760 à -540 mV/ECS [239]. Même si les solutions sont différentes, cela confirme que les réactions cathodiques provenant du milieu ont lieu que partiellement. Le potentiel de corrosion établi à partir de -50 mV/ECS met davantage en jeu la réduction métallique du CoCrMo que les réactions cathodiques du milieu (hydrogène, oxygène). Ainsi, polariser le CoCrMo à partir de -50 mV/E<sub>OCP</sub> ne permet pas au film passif d'être réduit. Le potentiel E<sub>corr</sub> de -533 mV/ECS correspondant à un état passif du CoCrMo.

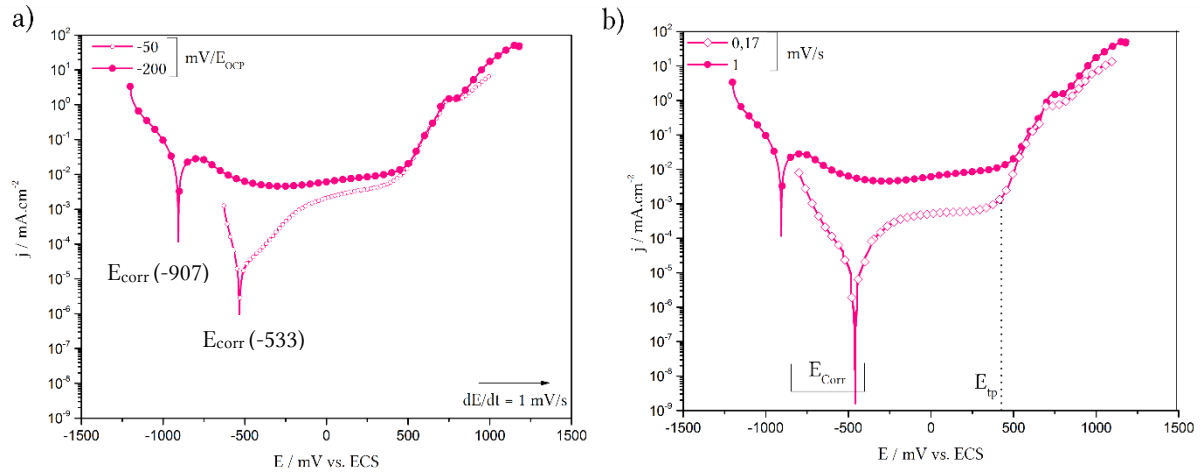


Figure IV. 9 Variation de la séquence de polarisation du CoCrMo en milieu RPMI-1640 supplémenté et en incubateur : a) modification du potentiel initial de polarisation, b) vitesse de balayage variable.

Le CoCrMo présente une plage de potentiel passif étendue de -310 à 480 mV/ECS, délimitée par les potentiels passif E<sub>pa</sub> et transpassif E<sub>tp</sub> (Figure IV. 9a). La densité de courant passif i<sub>p</sub> reste inférieure à 48 μA cm<sup>-2</sup>. Dans cet état stationnaire, les réactions se déroulant à l'interface substrat métallique/film passif sont identiques aux précédentes correspondant à la formation d'oxydes et d'hydroxydes (Tableau IV. 2). A l'interface film passif/solution, la dissolution du film passif peut également avoir lieu (Tableau IV. 3). Toutefois, la passivité du CoCrMo se caractérise par une cinétique de dissolution lente des oxydes métalliques [105,243].

Tableau IV. 3 Réaction électrochimique impliquée dans le domaine passif dans le cas du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté.

Réaction	Espèce	Potentiel
$M_xO_n + 2nH^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow xM^{x+}_{(aq)} + nH_2O(l)$	Oxyde métallique	$E = E^{\circ}_{M^{x+}/M_xO_n} - 0,062/2 [\log [M^{x+}]^x - pH^{2n}]$
<u>Exemples :</u>		
$Cr_2O_3 + 6H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow 2Cr^{2+}_{(aq)} + 3H_2O(l)$		
$Cr_3O_4 + 8H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow 3Cr^{3+}_{(aq)} + 4H_2O(l)$		
$CoO + 2H^+_{(aq)} + 2e^- \rightarrow Co_{(aq)} + H_2O(l)$		

Cette étude polarise le CoCrMo à vitesse de balayage variable entre 1 à 0,17 mV.s<sup>-1</sup> pour étudier les aspects cinétiques des réactions qui se produisent, ainsi que les étapes supplémentaires associées aux processus d'oxydation secondaire. Une vitesse de balayage suffisamment lente permet de mettre en évidence la réversibilité des réactions. La Figure IV. 9b montre que le comportement électrochimique du CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté est affecté par la vitesse de balayage. La densité de courant du domaine passif augmente et la plage de potentiel passif est déplacée vers la gauche à mesure que la vitesse

de balayage augmente. La densité de courant augmente brusquement à 480 mV/ECS ( $E_{tp}$ ). Il s'agit du domaine transpassif où a lieu l'oxydation d'oxydes et hydroxydes par formation d'espèces de valence supérieure (Tableau IV. 4). L'épaulement présent à 750 mV/ECS est associé à l'oxydation du Cr(III) en ion chromate  $CrO_4^{2-}$  en solution neutre et alcaline, tandis que les espèces bichromatées  $Cr_2O_7^{2-}$  sont formées dans une solution acide [73,265]. Les espèces de chromate et de bichromate sont très solubles dans un environnement aqueux. Le cobalt agit selon une passivation secondaire après un enrichissement suffisant de la couche primaire en hydroxydes Co(II) oxydés en Co(III) [107,266]. A des potentiels plus élevés, ces réactions sont accompagnées de l'oxydation de l'eau.

Tableau IV. 4 Réactions d'oxydation impliquées dans le domaine transpassif du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté.

Réaction	Espèce	Potentiel
$Cr_2O_3 + 5H_2O(l) \rightarrow 2CrO_4^{2-} + 10H^+(aq) + 6e^-$ ou $Cr_2O_3 + 4H_2O(l) \rightarrow Cr_2O_7^{2-} + 8H^+(aq) + 6e^-$	Cr(III) en Cr(VI)	$E = E^\circ_{Cr_2O_3/CrO_4^{2-}} - 0,103 \text{ pH} + 0,021 \log [CrO_4^{2-}]$ $E = E^\circ_{Cr_2O_3/Cr_2O_7^{2-}} - 0,083 \text{ pH} + 0,010 [Cr_2O_7^{2-}]$
$3CoO + H_2O(l) \rightarrow Co_3O_4 + 2H^+(aq) + 2e^-$	Co(II) en Co(III)	$E = E^\circ_{CoO/Co_3O_4} - 0,062 \text{ pH}$
$2H_2O \leftrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$	Eau	$E = E^\circ_{O_2/H_2O} - 0,062 \text{ pH}$

Le comportement électrochimique du CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté présente les caractéristiques suivantes :

- La transition active/passive est davantage présente en milieu organique, ce qui signifie que le film passif, formé spontanément à l'air, est réduit cathodiquement,
- Le domaine passif présente des variations de densité de courant qui semblent liées à l'entretien et à la dissolution des oxydes métalliques. Cependant il reste à vérifier l'implication des éléments organiques présents dans le RPMI-1640 et des espèces carbonées (taux de  $CO_2$ ) sur la composition du film passif. En effet, les propriétés protectrices du film passif sont liées à la capacité de transfert des ions à travers celui-ci [254].

De ce fait, la réactivité électrochimique des espèces organiques et carbonées a été évaluée en polarisant le CoCrMo à des potentiels d'intérêt, conformément aux courbes de polarisation, suivie de mesures SIE sous polarisation potentiostatique. L'évolution des paramètres électrochimiques (résistance de polarisation, capacité effective) avec le potentiel a été suivie.

#### IV. 3.2 Conditions potentiostatiques

Dans la continuité du Chapitre III, les mêmes potentiels de polarisation ont été fixés durant 4 heures, correspondant aux domaines électrochimiques du CoCrMo : **i)** la transition active/passive à -600, -450 mV/ECS, **ii)** le domaine passif à -150 et +300 mV/ECS et **iii)** le domaine transpassif à +700 mV/ECS. Les paramètres d'essai ont été spécifiés au Chapitre II 4.

Les spectres d'impédance, illustrés à la Figure IV. 10, présentent trois régions distinctes. Dans la région des hautes fréquences, le module de l'impédance  $|Z|$  est indépendant de la fréquence avec un angle de phase tendant vers zéro degré. Il traduit un comportement résistif et correspond à la résistance de l'électrolyte  $R_e$ . Dans la région basse à moyenne fréquence (1 à 100 Hz), on observe une relation linéaire entre  $|Z|$  et la fréquence. Cette réponse correspond à un comportement capacitif non idéal de l'interface

CoCrMo/solution. Dans la région des basses fréquences, le comportement résistif est lié à la résistance de polarisation, ce qui caractérise le transfert de charge à travers l'interface. Dès lors, les spectres signifient qu'un comportement capacitif interfacial domine avec une seule constante de temps.

D'après le système Platine/RPMI-1640 étudié précédemment, il conviendrait d'attribuer, dans le cas du CoCrMo, deux constantes de temps afin de prendre en compte, d'une part la réactivité des espèces adsorbées et, d'autre part le film passif. De même, l'étalement du pic de la phase (Figure IV. 10c) pour la majorité des potentiels laisse suggérer que les phénomènes interfaciaux sont pilotés par deux cinétiques différentes. Après analyse et modélisation des diagrammes d'impédance électrochimique, seule une constante de temps est suffisante pour traduire les réactions à l'interface. A ce stade, il semblerait que le film passif écrante la réactivité des espèces organiques adsorbées.

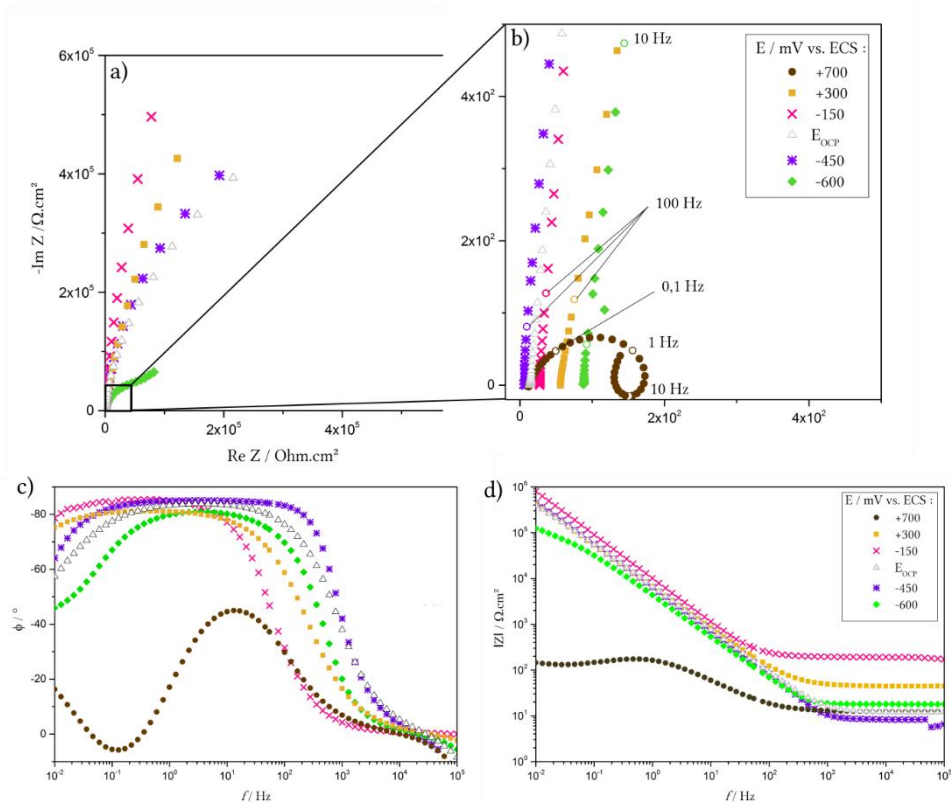


Figure IV. 10 a), b) Représentations de Nyquist et c), d) de Bode de l'impédance du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté polarisée de -600 à +700 mV/ECS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

L'introduction d'autres composants électriques est nécessaire pour les deux potentiels limites. La justification de chacun d'entre eux est abordée avant de discuter des valeurs des paramètres électrochimiques :

- Le spectre d'impédance en conditions transpassives (700 mV/ECS) est caractérisé par une boucle capacitive liée au transfert de charge dû à la dissolution du métal et d'une boucle inductive caractéristique de la relaxation des espèces à la surface du film passif du fait de la présence d'absorbats à la surface du métal (Chapitre II.4.d). Le CEE proposé pour décrire le système est illustré à la Figure IV. 11b et comprend une résistance et une inductance en parallèle.
- A -600 mV/ECS, le diagramme d'impédance se caractérise par un petit demi-cercle et par une droite formant un angle à 45° avec l'axe des abscisses. La courbe de polarisation du CoCrMo dans ce milieu indique que le potentiel de -600 mV/ECS correspond au début du domaine passif (Figure

IV. 9a). La même signature électrochimique a été relevée à ce potentiel dans le cas du platine, suggérant les mêmes phénomènes physiques mis en jeu. Théoriquement, ceci suggère que les phénomènes réactionnels sont limités par la diffusion des espèces. Ici, cela correspond certainement à la diffusion de l'oxygène dissous dans le milieu non agité. Ainsi, le CEE appliqué au potentiel de -600 mV/ECS se caractérise par une impédance de diffusion Warburg (notée W) montée en série avec la résistance de transfert de charge  $R_t$  (Figure IV. 11c).

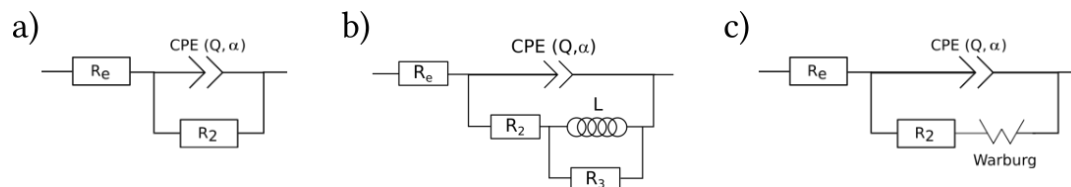


Figure IV. 11 Circuits électrochimiques équivalent (CEE) modélisant l'interface CoCrMo/RPMI-1640 dans le domaine passif (a), dans le domaine transpassif (b) et dans la transition active/passive (c).

A l'interface CoCrMo/RPMI-1640, la capacité effective  $C_{eff}$  implique les contributions de l'interface de la double couche  $C_{dl}$ , de la couche organique adsorbée  $C_{ad}$  et des oxydes du film passif  $C_{ox}$ . Selon le potentiel appliqué, l'un de ces mécanismes électrochimiques est prédominant, ce qui correspond à une valeur de capacité élevée. Deux types de distribution de la constante de temps ont été utilisés selon le potentiel d'étude : **i)** normal aux potentiels allant de -600 à +300 mV/ECS selon la relation de Hsu et Mansfeld [267] et **ii)** surfacique pour le potentiel transpassif à +700 mV/ECS, selon la formule de Brug [200]. La valeur de  $C_{eff}$  implique soit la  $R_e$ , dans le cas d'une distribution surfacique des constantes de temps, soit la  $R_p$  si la distribution est normale par rapport à la surface :

$$C_{eff} = Q^{1/\alpha} R_{e,p}^{(1-\alpha)/\alpha} \quad \text{Eq III. 13}$$

Les valeurs  $C_{eff}$  sont liées à l'épaisseur de la couche d'interface  $d_{eff}$  par la relation suivante [194] :

$$d_{eff} = \frac{\epsilon_h \cdot \epsilon_0}{C_{dl}} + \frac{\epsilon_h \cdot \epsilon_0}{C_{ad}} + \frac{\epsilon_{ox} \cdot \epsilon_0}{C_{ox}} \quad \text{Eq III. 14}$$

Le film passif du CoCrMo est composé majoritairement d'oxydes de chrome  $Cr_2O_3$  et minoritairement d'oxydes de cobalt  $CoO$  [105]. La valeur de la permittivité des oxydes  $\epsilon_{ox}$  est choisie en fonction de la composition du film passif. La valeur de la constante diélectrique du  $Cr_2O_3$  varie entre 9,2 et 13,3 [268,269] et celle du  $CoO$  12,9 et 13,4 à 25°C [268,270]. Fang et al. suggère que la constante diélectrique du  $Cr_2O_3$  augmente de  $10^{-3}$  tous les 1°C [269]. Rao et al. estime que celle du  $CoO$  augmente exponentiellement avec la température [270]. Pour le CoCrMo, nous avons fixé  $\epsilon_{ox}$  à une valeur moyenne de 12,9 pour toute la gamme de potentiel [245].

La double couche et la couche adsorbée sont composées principalement de molécules hydratées. D'où  $\epsilon_h$  est la constante diélectrique relative de l'eau (74,125) calculée à 37°C [199,268] et  $\epsilon_0$ , celle du vide ( $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ ).

L'application des circuits électriques équivalents au présent système CoCrMo/RPMI-1640 supplémenté permet d'extraire les paramètres électrochimiques. Les valeurs présentées au Tableau IV. 5 correspondent à la moyenne et à l'écart-type d'au moins trois tests.

Bien que les écarts types pour les valeurs de résistance d'électrolyte  $R_e$  soient relativement haute pour quelques potentiels, l'analyse statistique montre que les résultats ne sont pas significativement différents ( $p = 0,74$ ). La résistance du RPMI-1640 supplémenté est similaire avec le platine ou le CoCrMo, variant



entre 16 et 60  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . La variation a été attribuée à la présence des ions  $\text{HCO}_3^-$  et aux composés organiques qui peuvent s'adsorber sur l'électrode de travail et fausser la mesure.

Tableau IV. 5 Résultats des paramètres électrochimiques du CoCrMo polarisé dans le RPMI-1640 supplémenté. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins deux échantillons. Les valeurs de résistance du RPMI-1640 supplémenté en incubateur ont été traités par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) :  $p = 0,74$  par comparaison des différents potentiels.

E / mV vs. ECS	$R_e / \Omega \text{ cm}^2$	$R_2 / \text{k}\Omega \text{ cm}^2$	$\alpha$	$Q / \mu\text{F s}^{\alpha-1} \text{ cm}^{-2}$	$C_{\text{eff}} / \mu\text{F cm}^{-2}$	$d_{\text{eff}} / \text{nm}$	Type de distribution		
700	$16,4 \pm 6,6$	$0,2 \pm 0,05$	$0,77 \pm 0,02$	$757 \pm 27$	$12560 \pm 2300$	$0,0010 \pm 0,0002$	Surface	$19,6 \pm 1,4$	Inductance /H $\text{cm}^{-2}$
300	$29,3 \pm 20,1$	$3413 \pm 1076$	$0,90 \pm 0,01$	$29,5 \pm 4,5$	$222 \pm 101$	$0,06 \pm 0,02$	Normal		
-150	$59,5 \pm 5,8$	$6449 \pm 594$	$0,95 \pm 0,01$	$17,4 \pm 0,7$	$43,5 \pm 2,7$	$0,26 \pm 0,02$	Normal		
$E_{\text{OCP}}$ [-350; -450]	$26,8 \pm 19,0$	$871 \pm 406$	$0,95 \pm 0,01$	$23,2 \pm 4,2$	$57,4 \pm 20,3$	$0,21 \pm 0,09$	Normal		
-450	$16,5 \pm 11,7$	$1190 \pm 112$	$0,95 \pm 0,02$	$26,5 \pm 2,0$	$75,7 \pm 31,9$	$0,17 \pm 0,06$	Normal		
-600	$40,7 \pm 0,5$	$28,3 \pm 3,1$	$0,92 \pm 0,02$	$36,8 \pm 3,4$	$134,1 \pm 36,1$	$0,51 \pm 0,13$	Normal	$14,6 \pm 4,1$	Warburg/ $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$

Comme les propriétés du film ( $Q$  et  $R_2$ ) varient nettement en fonction du domaine électrochimique, les spectres SIE sont discutés en fonction des différents potentiels appliqués (passif, transpassif et actif).

Les valeurs de résistance du film sont supérieures à la centaine de  $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  lorsque le CoCrMo est polarisé dans le domaine passif (de l' $E_{\text{OCP}}$  à +300 mV/ECS). Elles sont comprises entre 871 et 6450  $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ , indiquant une très grande stabilité de l'alliage dans la solution RPMI-1640. Le CPE est essentiellement de nature capacitive, comme le montre la valeur élevée de l'exposant  $\alpha$  (0,90 à 0,95). En dessous de 300 mV/ECS, la  $C_{\text{eff}}$  est proche de la capacité de double couche  $C_{\text{dl}}$ . Les valeurs de capacité faibles signifient que la couche de protéine adsorbée est plus homogène ou compacte [166]. Ainsi, dans le domaine passif, l'adsorption de protéines semble conférer une bonne résistance à la corrosion en agissant sur le transfert de charges. L'accroissement de la résistance du film aux potentiels du domaine passif, contribue à la tenue à la corrosion de l'alliage CoCrMo.

A la fin du domaine passif, la résistance de polarisation, l'exposant  $\alpha$  et l'épaisseur du film diminuent, témoignant d'un film passif plus fin, moins résistant et plus hétérogène (Tableau IV. 5 et Figure IV. 12). Ces variations dans le domaine passif peuvent provenir de processus concurrents entre les protéines, se déroulant simultanément [230] : **i)** Le cobalt est instable dans le RPMI-1640 et se dissout pour former des complexes métal-protéine [166] et donc accélère la dissolution du métal ; **ii)** la couche protéique adsorbée réduit le transport de l'oxygène et/ou des produits de dissolution vers et depuis la surface du CoCrMo [196,271] ; **iii)** les différentes protéines peuvent influencer la structure de la couche adsorbée (structure moléculaire, conformation), ce qui affecte ensuite la structure/compacité (densité de remplissage) du film adsorbé.

Le domaine transpassif (+700 mV/ECS) se caractérise par la dissolution des oxydes de chrome et de molybdène et par l'oxydation de l'eau aux potentiels plus anodiques. Les propriétés du film ( $Q$  et  $R_2$ ) reflètent que le film passif n'est plus présent. L'hétérogénéité (diminution de l'exposant  $\alpha$  à 0,77) peut résulter d'oxydes ayant une structure spinelle (contribution  $\text{O}^{2-}$ ) ou d'un mélange désordonné de cations résultant des oxydations supplémentaires de la couche passive primaire. De même, la libération et la dissolution des ions métalliques peuvent favoriser la production de complexes métalliques. Le CoCrMo se comporte comme une surface réactive.

Entre -600 et -450 mV/ECS, l'épaisseur du film est réduite, ce qui confirme qu'il y a une dissolution sélective des oxydes dans le film passif. La différence entre les valeurs de  $R_2$  (1190 et 28 k $\Omega$  cm<sup>2</sup>), indique que le film a une meilleure stabilité à -450 mV/ECS puisqu'il correspond à la limite avec le domaine passif. Au potentiel plus cathodique, la diminution de  $\alpha$  (0,92) reflète une interface perturbée, principalement par la présence d'OH<sup>-</sup>, produit de la réduction de l'oxygène dissous. La Warburg traduit justement la limitation par diffusion de l'O<sub>2</sub> de l'électrolyte à l'interface.

La Figure IV. 12 présente l'épaisseur  $d_{\text{eff}}$  et la résistance  $R_2$  du film en fonction du potentiel, obtenus à partir des tests SIE mis en corrélation avec la courbe de polarisation du CoCrMo en RPMI-1640. Les mesures de la SIE indiquent que l'oxyde sur le CoCrMo en RPMI-1640 est plus fin que ceux obtenus en solution de PBS [245] et Hank [105] de 0,7 et 1,8 nm respectivement. L'adsorption des protéines forme généralement une monocouche d'environ 3-4 nm [105,272]. Plusieurs facteurs contribuent à la différence entre ces valeurs analytiques de l'épaisseur. Tout d'abord, les valeurs de  $d_{\text{eff}}$  ont été calculées en supposant la même constante diélectrique. Les films passifs du CoCrMo sont cependant susceptibles de différer dans une certaine mesure dans leur composition et donc dans leurs constantes diélectriques. Le film passif peut effectivement contenir du Cr(OH)<sub>3</sub>, et donc la valeur de  $\epsilon_{\text{ox}}$  choisie pourrait être un peu différente de celle de Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Au-delà de 300 mV/ECS, il y a une forte diminution de  $d_{\text{eff}}$  ce qui est contradictoire avec la littérature [105,272]. Habituellement, l'épaisseur du film des alliages de CoCrMo augmente avec le potentiel. Toutefois, les milieux utilisés ne présentent pas autant de composés organiques que le RPMI-1640 supplémenté. Cette différence illustre que les espèces organiques du RPMI-1640 sont impliquées dans les mécanismes de formation et de dissolution du film passif et que la transpassivité a lieu à des potentiels inférieurs à 300 mV/ECS.

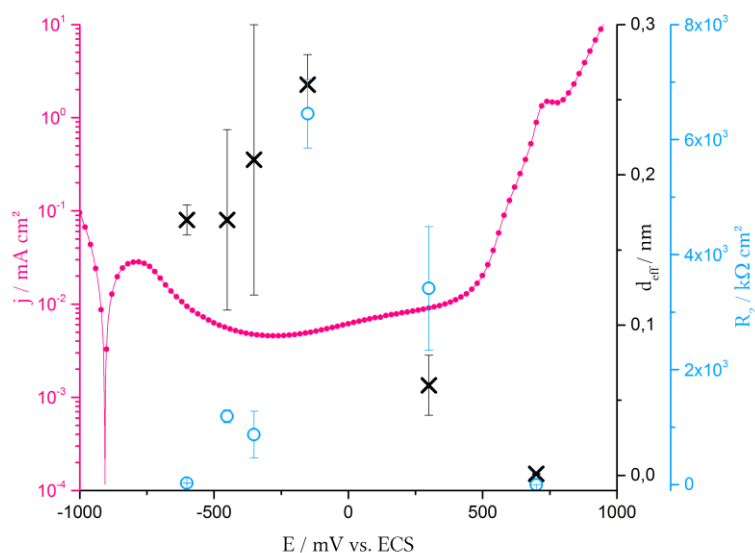


Figure IV. 12 Courbe de polarisation du CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté mis en corrélation avec l'évolution de  $d_{\text{eff}}$  et  $R_2$  résultant des polarisations potentiostatiques et mesures SIE.

En termes de résistance à la corrosion, ces résultats confirment ceux des courbes de polarisation potentiodynamique (Figure IV. 12), à savoir que les composés organiques présents dans le RPMI-1640 agissent essentiellement sur les cinétiques de transfert de charge de l'alliage de CoCrMo.

### IV. 3.3 Composition chimique de surface

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) est capable de fournir des informations plus détaillées sur la composition et la quantification de l'épaisseur du film d'adsorption. L'analyse XPS a été réalisée sur quatre échantillons de CoCrMo : un non polarisé et non immergé en solution (poli et incubé pendant 24 heures (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)) et trois autres échantillons, ayant subi la même préparation de surface, qui ont été immergés en milieu RPMI-1640 pendant 1 heure (après le suivi de l'E<sub>OCP</sub>) ou 5 heures après polarisation à -450 ou 300 mV/ECS. L'analyse des spectres XPS généraux a permis d'identifier les éléments cobalt, chrome, molybdène, carbone, oxygène, azote, calcium et phosphore. L'identification des pics est réalisée sur la base des énergies de liaison rapportées au Chapitre III (cas de l'électrode de platine). Des spectres haute résolution sont réalisés sur les éléments C, O, Co, Cr et Mo afin d'identifier les oxydes recouvrant l'alliage CoCrMo et de mettre en évidence les groupements fonctionnels des composés organiques.

La Figure IV. 13 présente les spectres XPS généraux de la surface des échantillons de CoCrMo. Les constituants majoritaires de l'alliage métallique sont identifiés (Co, Cr, Mo). De l'oxygène, issu des oxydes, et du carbone, issu des carbures et/ou des contaminations organiques, apparaissent également en surface. Après immersion dans le RPMI-1640 supplémenté, les éléments P et N sont détectés : ils sont issus de la solution.

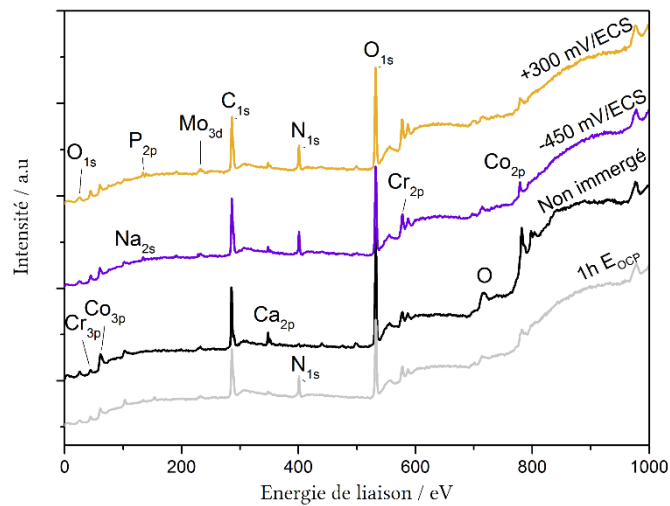


Figure IV. 13 Spectre XPS généraux enregistrés sur l'alliage CoCrMo non polarisé et non immergé, après 1 h d'immersion en milieu RPMI-1640 supplémenté ou 5 h après polarisation potentiostatique à 300 ou -450 mV/ECS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Le CoCrMo non immergé en milieu RPMI-1640 présente une nette distinction dans la composition de l'état de surface par rapport aux trois échantillons polarisés (Tableau IV. 6) :

- Le CoCrMo non polarisé présente plus de cobalt et de calcium (7,2 % Co et 1,0 % Ca) que les échantillons immergés en RPMI-1640 (de 0,9 à 2,3 % Co et 0,3 à 0,6 % Ca),
- Inversement, le chrome, l'azote et le phosphore sont plus présents à la surface des trois échantillons polarisés (de 3,0 et 4,7% Cr, de 7,3 et 9,4% N, de 0,6 et 1,6% P) que le CoCrMo non polarisé (2,3% Cr, 0,7% N et pas de phosphore détecté),
- Enfin, du sodium (0,5%) et du chlore (0,7%) sont présents en faibles concentrations uniquement sur la surface du CoCrMo non polarisé.

Le pourcentage atomique des éléments Mo, C et O est relativement similaire indépendamment des échantillons de CoCrMo.

Tableau IV. 6 Résultats de l'analyse XPS des quatre échantillons de CoCrMo montrant les différents éléments détectés et leur concentration relative (en %). La polarisation et le suivi de l' $E_{OCP}$  ont eu lieu en milieu RPMI-1640 supplémenté et en incubateur.

Elément		Co	Cr	Mo	C	O	N	P	Ca	Autres	[Cr]/[Co]	[C]/[N]
Energie de liaison (eV)		775-790	570-582	225-240	282-292	531,6	398,8	131,9	346-350			
At %	Potentiels d'intérêt											
	Non polarisé	<b>7,2</b>	2,3	0,5	49,1	37,7	0,7	-	<b>1,0</b>	Na = 0,5 Cl = 0,7	0,32	75,46
	1h $E_{OCP}$	2,3	<b>3,0</b>	0,5	52,7	32,5	<b>7,3</b>	<b>0,6</b>	0,3	Si = 2,3	1,28	7,26
	-450	0,9	<b>3,3</b>	0,5	55,2	28,5	<b>9,2</b>	<b>1,2</b>	0,6	Si = 0,6	3,87	6,00
	+300	1,1	<b>4,7</b>	0,6	48,5	32,8	<b>9,4</b>	<b>1,6</b>	0,8	Si = 0,3	4,48	5,18

IV. 3.3.a Les composés inorganiques :  $Na_{1s}$ ,  $Cl_{2p}$ ,  $Ca_{2p_{3/2}}$  et  $P_{2p}$

A la surface du CoCrMo non polarisé, le sodium et le chlorure sont présents, ce qui suggère la précipitation du chlorure de sodium. Les analyses de surface antérieures, réalisées sur l'électrode de platine (Chapitre III), indiquaient également la présence de NaCl après polarisation cathodique (-900 mV/ECS). Le présence de ces cristaux peut résulter du séchage (évaporation du milieu) ou être une contamination résultant des étapes de préparation de surface.

Dans le Chapitre III, les analyses de surface XPS du platine ont montré que le phosphate de calcium s'adsorbe indépendamment des conditions de polarisation de l'électrode. Dans le cas du CoCrMo, seul l'échantillon non polarisé, c'est-à-dire non immergé en solution, est exempt de phosphore (Figure IV. 14 et Tableau IV. 6). La solution RPMI-1640 est donc la source des éléments phosphore et calcium comme cela a été mentionné pour le MEM [273]. On sait que les phosphates s'adsorbent à la surface des alliages de CoCrMo après immersion dans une solution de Hank et dans un milieu de culture cellulaire [103,111,131]. Toutefois, l'adsorption du phosphate de calcium a lieu suite à celle du phosphate [103]. Il n'est donc pas étonnant de constater une augmentation de la concentration de phosphore avec les temps d'immersion dans le RPMI-1640 (0,6% après 1 heure à 1,2-1,6% après 5 heures). Les faibles taux de calcium (<1,0%) suggèrent que la précipitation du phosphate de calcium est retardée dans le RPMI-1640. Les espèces organiques comme les composants du liquide synovial empêchent effectivement la formation d'oxydes métalliques et de phosphate de calcium [273].

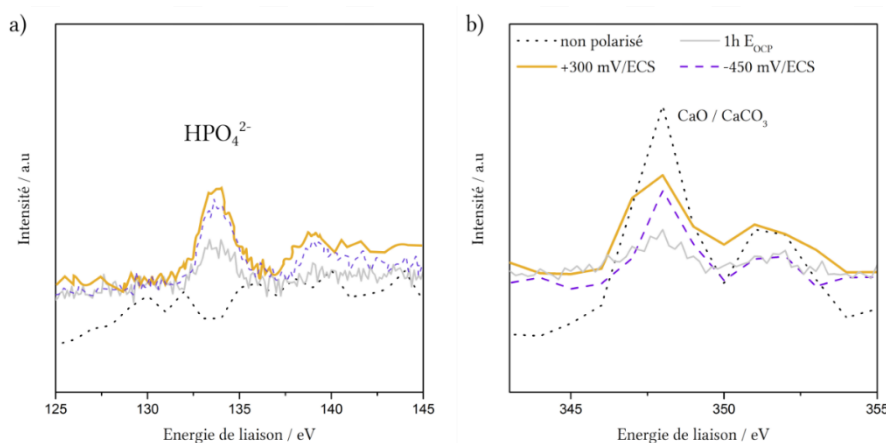


Figure IV. 14 Spectres  $P_{2p}$  (a) et  $Ca_{2p}$  (b) du CoCrMo non polarisé et immergé ou polarisé dans le RPMI-1640 supplémenté (37°C, 5%  $CO_2$ ).

Finalement, les mécanismes de précipitation et/ou d'adsorption des sels inorganiques issus du RPMI-1640 ont lieu de manière analogue sur l'électrode de platine et sur le CoCrMo. Sur ce dernier, l'adsorption du phosphate de calcium est retardée. Les composés organiques s'adsorbent probablement de manière compétitive avec le phosphate, comme c'est le cas pour l'albumine [111].

Compte tenu de la forte affinité électronique du silicium, il n'est pas surprenant de constater la présence de silicium à la surface de l'alliage à des taux inférieurs à 2,3%. Le silicium est également présent dans le CoCrMo à 0,6%.

#### IV. 3.3.b Les composés organiques : N<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub> et C<sub>1s</sub>

Le carbone, l'oxygène et l'azote sont des éléments prédominants et spécifiques des éléments organiques. L'analyse XPS de ces trois éléments permet d'établir l'implication des protéines et acides aminés sur le film passif du CoCrMo.

Le pic N<sub>1s</sub> à 401,2 eV est très prononcé dans tous les spectres à l'exception de l'échantillon non polarisé qui n'a pas été immergé en RPMI-1640 (Figure IV. 15). Le pic N<sub>1s</sub> est associé aux groupes amine ou amide, caractéristiques de la quantité de protéines adsorbées sur la surface métallique [100]. Ici, l'azote est vraisemblablement lié au carbone de la matrice organique de divers composés présents dans le RPMI-1640 (tous les acides aminés et les vitamines B1, B2, B3, B5, B7, B9 et B12). La teneur en azote est presque dix fois plus élevée en surface du CoCrMo après immersion, ce qui indique une forte contribution des espèces azotées dans l'électrolyte. A +300 mV/ECS, le taux d'azote sur le CoCrMo (9,4 %) est proche de celui mesuré sur le platine (8,1 %), suggérant que les processus d'adsorption sont indépendants de la nature des électrodes (Tableau IV. 6).

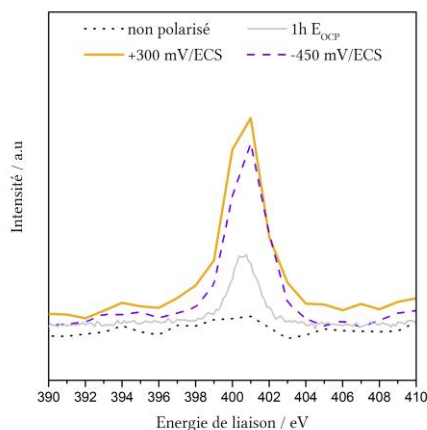


Figure IV. 15 Spectres N<sub>1s</sub> haute résolution du CoCrMo non polarisé et immergé ou polarisé dans le RPMI-1640 37°C (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Le pic C<sub>1s</sub> a été décomposé en cinq composantes: à 285,0 eV ce qui indique la présence d'espèces de carbone aliphatiques et de carbone lié à l'oxygène; à 286,4 eV dû au carbone faisant une liaison simple avec un oxygène et/ou un azote C-(O, N) dans un alcool, une amine ou un amide ; à 287,6 eV dû au carbone faisant une double liaison ou deux liaisons simples avec l'oxygène (C=N/O, O-C-O, N-C=C.) ; à 288,2 eV attribué à des fonctions carboxyle ou ester (C =O)-O-H/R) et une dernière composante à 289,4 eV correspondant au CO<sub>3</sub>.

Le carbone est fortement présent à la surface du CoCrMo (environ 50 %) ce qui suggère l'adsorption de composés organiques (Tableau IV. 6). Excepté la composante C<sub>1s(285,0)</sub>, attribuée aux contaminations [172], la déconvolution du carbone indique que les deux composantes majoritaires sont C<sub>1s(286,4)</sub> et C<sub>1s(288,2)</sub>

pour les trois CoCrMo immergés en RPMI-1640 (Figure IV. 16b-d). Elles sont typiques de la présence d'espèces organiques structurées telles que les protéines [100,103]. Les résultats XPS des pics  $C_{1s}$  et  $N_{1s}$  indiquent que dans les solutions contenant des acides aminés et des protéines (biomolécules), la couche superficielle du CoCrMo contient des espèces azotées et carbonées des biomolécules. Cette couche se forme de préférence à un potentiel d'électrode plus élevé de  $-450$  mV/ECS. Du fait des pourcentages similaires de  $C_{1s}$  et  $N_{1s}$  entre les échantillons polarisés, le potentiel de polarisation n'affecte pas significativement la quantité d'adsorbats. L'adsorption des espèces organiques n'est pas gouvernée par des réactions électrochimiques. La formation d'une couche contenant des biomolécules a également été observée sur le CoCrMo exposé à une solution MEM contenant du sérum bovin fœtal [273]. On suppose que les acides aminés et les protéines sont intégrées dans le film passif (et non présents sous forme de couche de contaminants).

Par ailleurs, le CoCrMo non polarisé présente des concentrations élevées de  $CO_3$  (289,5 eV) et C-C/C-H (285,0 eV) par comparaison avec les trois autres échantillons. Les liaisons C-C/C-H sont attribuées à des contaminations. La présence de  $CO_3$  est liée à la composition de l'atmosphère de l'incubateur, où le  $CO_2$  est concentré à 5 % en volume. En effet il semblerait que le  $CO_2$  contribue à la formation d'un film passif plus riche en ions  $CO_3^{2-}$  adsorbés. Les autres échantillons de CoCrMo ont certes subi la même préparation de surface mais présente des taux de  $CO_3$  plus faibles (entre 1,6 et 3,2 %). Ainsi l'immersion du métal dans l'électrolyte RPMI-1640 entraîne la dissolution du  $CO_3$  adsorbés et favorise l'adsorption de composés organiques. Au chapitre précédent, nous avons mis en évidence que le taux de  $CO_3$  sur le platine était maximal à 300 mV/ECS (2,9 %  $CO_3$ ). Dans le cas du CoCrMo, il n'y a pas d'adsorption spécifique dans le domaine passif. L'implication des espèces carbonées sur les propriétés de film passif de CoCrMo sera étudiée à la section IV. 5.

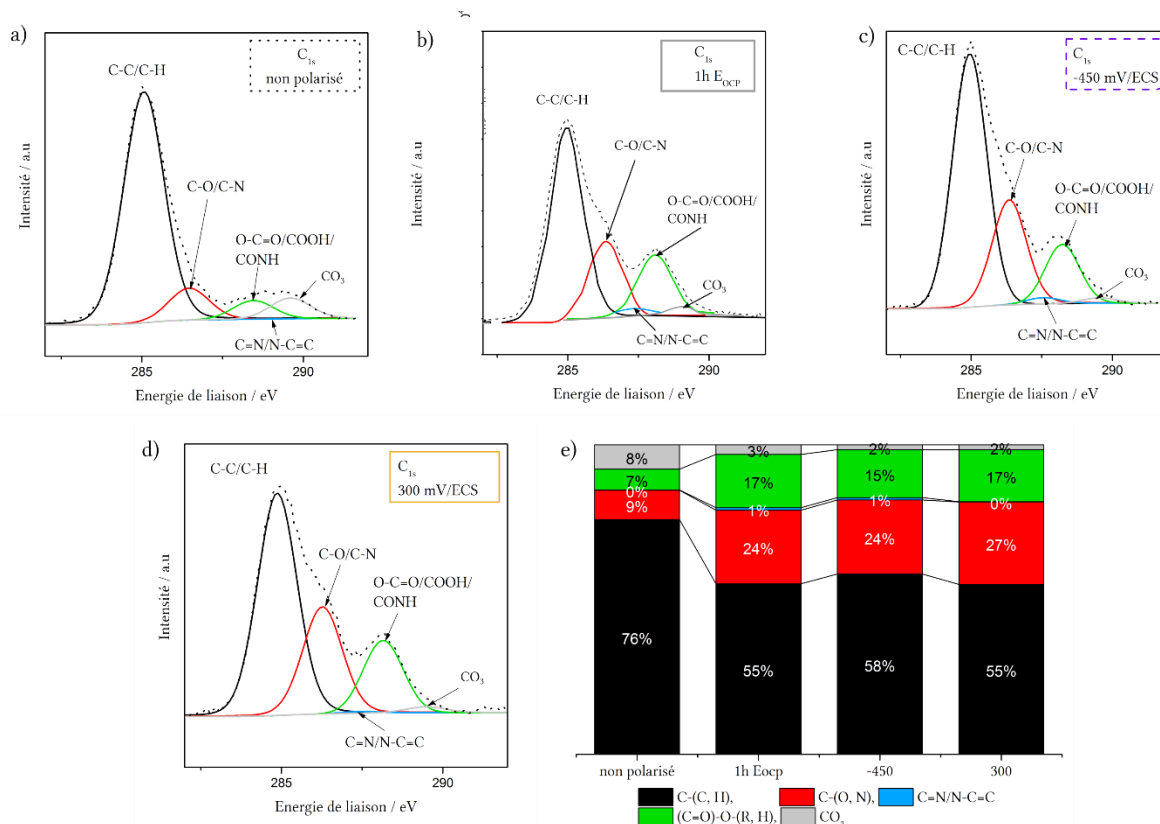


Figure IV. 16 Spectres  $C_{1s}$  haute résolution du CoCrMo: a) poli et incubé pendant 24h sus atmosphère d'un incubateur et b) immergé en RPMI-1640 et polarisé à  $-450$  mV/ECS.



Le spectre haute résolution relatif à l'oxygène  $O_{1s}$  (Figure IV. 17) a été décomposé en trois composantes principales : à 530,2 eV dû à l' $O^{2-}$  dans les oxydes [107,108] ; à 531,6 eV la composante est attribuée aux groupements hydroxyles, hydroxydes ( $OH^-$ ) et à la liaison double avec un atome de carbone ( $C=O$ ) provenant d'une espèce semblable au carbonate [106] et une dernière composante à 533,9 eV attribuée à l'eau chimisorbée ( $H_2O$ ) et à la liaison simple avec un atome d'oxygène ( $C-O$ ) d'adsorbats organiques ( $CO-H$  des alcools et carboxyles ou  $CO-C$  des éthers et esters) [73,104–109].

Par ailleurs, le CoCrMo non polarisé présente des concentrations élevées de  $CO_3$  (289,5 eV) et  $C-C/C-H$  (285,0 eV) par comparaison avec les trois autres échantillons. Les liaisons  $C-C/C-H$  sont attribuées à des contaminations. La présence de  $CO_3$  est liée à la composition de l'atmosphère de l'incubateur, où le  $CO_2$  est concentré à 5 % en volume. En effet, il semblerait que le  $CO_2$  contribue à la formation d'un film passif plus riche en ions  $CO_3^{2-}$  adsorbés. Les autres échantillons de CoCrMo ont certes subi la même préparation de surface mais présentent des taux de  $CO_3$  plus faibles (entre 1,6 et 3,2 %). Ainsi, l'immersion du métal dans l'électrolyte RPMI-1640 entraîne la dissolution du  $CO_3$  adsorbés et favorise l'adsorption de composés organiques. Au chapitre précédent, nous avons mis en évidence que le taux de  $CO_3$  sur le platine était maximal à 300 mV/ECS (2,9 %  $CO_3$ ). Dans le cas du CoCrMo, il n'y a pas d'adsorption spécifique dans le domaine passif.

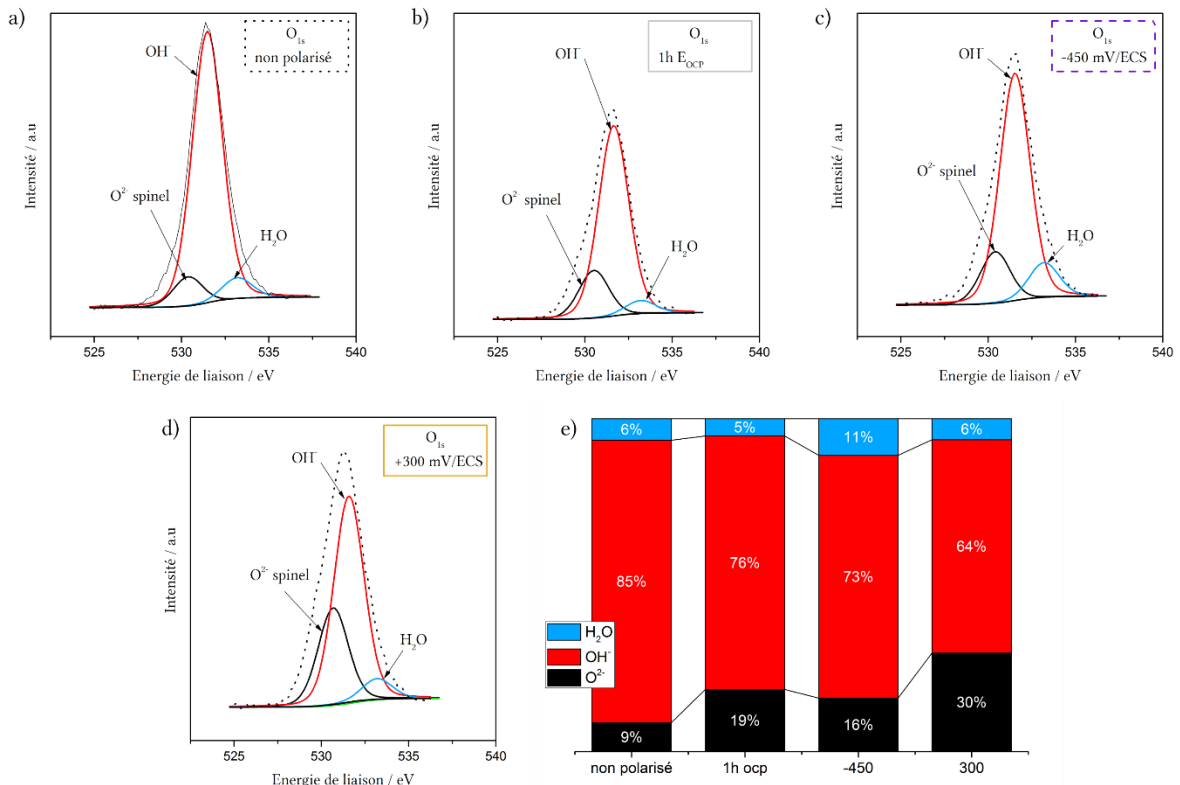


Figure IV. 17 Spectres haute résolution  $O_{1s}$  déconvolués (a-d) du CoCrMo poli et incubé pendant 24 h sous atmosphère d'un incubateur et immergé en RPMI-1640 supplémenté suite au suivi de l' $E_{ocp}$  ou polarisation à -450 et +300 mV/ECS (37°C, 5%  $CO_2$ ). e) Pourcentages atomiques relatifs aux trois composantes  $O^{2-}$ ,  $OH^-$  et  $H_2O$ .

Ainsi, l'analyse XPS illustre que le carbone et l'azote, les éléments prédominants et spécifiques des éléments organiques, sont très présents à la surface du CoCrMo (entre 50 et 57 % C+N). Il n'est pas exclu qu'une partie provienne de contaminations extérieures bien que les échantillons aient été stockés sous vide après la fin des essais. Les analyses XPS confirment la présence de protéines et d'acides aminés adsorbés sur le film passif. Concernant l'oxygène, il intervient dans la formation des oxydes et des hydroxydes du film passif et doit être corrélé avec les composants métalliques de l'alliage.

IV. 3.3.c Les oxydes métalliques : Pics haute résolution  $\text{Co}_{2p_{3/2}}$ ,  $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$  et  $\text{Mo}_{3d_{5/2}}$

La concentration relative des différents éléments métalliques oxydés  $\text{M}_{\text{ox}}$  a été représentée sur la Figure IV. 18. La composition en oxyde et en hydroxyde du film passif obtenu sous atmosphère d'incubateur est proche de celle de la composition chimique de l'alliage CoCrMo (Tableau II. 1). Cependant, en raison de l'immersion dans le RPMI-1640, on peut observer un fort enrichissement en  $\text{Cr}_{\text{ox}}$  par rapport au  $\text{Co}_{\text{ox}}$  et au  $\text{Mo}_{\text{ox}}$ . En fait,  $\text{Cr}_{\text{ox}}$  représente environ 18% du total des éléments métalliques oxydés dans l'échantillon de référence et entre 55 et 86% dans les échantillons immergés. Le rapport entre la concentration atomique de chrome et celle de cobalt  $[\text{Cr}]/[\text{Co}]$  (Tableau IV. 6) confirme l'enrichissement en chrome pour les trois échantillons immergés en RPMI-1640 (1,28-4,48) par rapport au CoCrMo non polarisé (0,32). La surface est également enrichie en  $\text{Mo}_{\text{ox}}$ , ce qui correspond à 3% de la totalité des éléments métalliques oxydés dans l'échantillon non polarisé et entre 5 et 7% dans les échantillons immergés. Cette augmentation des proportions de  $\text{Cr}_{\text{ox}}$  et  $\text{Mo}_{\text{ox}}$  est associée à une diminution des proportions de  $\text{Co}_{\text{ox}}$ . Le cobalt oxydé est principalement libéré dans la solution et ne contribue pas de manière significative à la croissance des oxydes [119].

Ainsi, l'immersion du CoCrMo en milieu RPMI-1640 provoque une dissolution préférentielle en cobalt et un enrichissement en oxydes de chrome dans le film passif. Le mécanisme possible peut être la complexation préférentielle des cations métalliques par des protéines ou des composés contenant des protéines [103,274]. Le pouvoir de dissolution de l'alliage CoCrMo par des agents complexants comme l'EDTA ou des protéines comme l'albumine a déjà été mentionné [72,105], ce qui peut également être valable dans des systèmes complexes tels que le RPMI-1640. L'analyse XPS concernant les éléments  $\text{C}_{1s}$  et  $\text{N}_{1s}$  discutée précédemment, a justement montré que le CoCrMo était sujet à l'adsorption de composés organiques tels que les protéines, dès son immersion dans l'électrolyte. De ce fait, les composés organiques du RPMI-1640 sont capables de se complexer avec les cations métalliques et par conséquent, diminuer le caractère protecteur de l'alliage de CoCrMo.

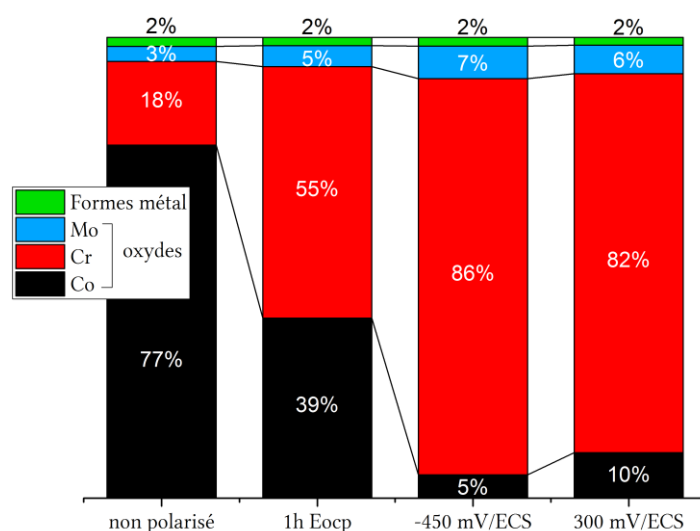


Figure IV. 18 Fraction atomique des éléments Co, Cr et Mo à l'état d'oxyde et métallique en fonction des conditions électrochimiques appliquées (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Le pic  $\text{Co}_{2p_{3/2}}$  peut être décomposé suivant quatre contributions différentes [105,107,116,117]: à 778,1 eV pour le cobalt métallique, à 781,4 eV relatif au Co(II) dans les espèces  $\text{CoO}$ ,  $\text{Co}_2\text{O}_3$  [107,116] mais qui peut aussi inclure la contribution d'espèces  $\text{Co}_3\text{O}_4$  [105]; vers 783,6 sous forme de composés organométalliques (et parfois à 781,4 eV [118]), et enfin à 780,6 et 786,6 eV sous la forme de Co(II). Une



faible proportion de Co(III) peut également être prise en compte à environ 779,1 eV. Notons que l'énergie de liaison de Co(III) ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) est inférieure à celle de Co(II). De ce fait, l'énergie de liaison 781,4 eV peut être attribuée aux espèces Co(II) comme Co(III).

Le signal issu du pic  $\text{Co}_{2p_{3/2}}$  obtenu pour l'échantillon non polarisé (Figure IV. 19a) indique que le CoCrMo est majoritairement recouvert d'oxydes de cobalt de type Co(II). Le film passif, formé spontanément sous atmosphère de l'incubateur (5 % de  $\text{CO}_2$ ), a une composition similaire à celle obtenue en milieu aéré [103,116,177].

L'immersion du CoCrMo en milieu RPMI-1640 (cas des trois autres échantillons) entraîne un appauvrissement des  $\text{Co}_{\text{ox}}$  par rapport au cobalt métallique (Figure IV. 19b-e). En fait, le  $\text{Co}_{\text{met}}$  représente environ 12% du total des éléments métalliques oxydés dans l'échantillon non polarisé et entre 21 et 66% dans les échantillons immergés (Figure IV. 19e). Ceci indique que l'épaisseur du film d'oxydes est plus faible après immersion en RPMI-1640. Elle est minimale à -450 mV/ECS, c'est-à-dire dans le domaine de transition active/passive du CoCrMo (Figure IV. 8). Le film passif du CoCrMo après immersion est majoritairement constitué de Co(II) sous forme de  $\text{CoO}$ ,  $\text{Co}_2\text{O}_3$ , ce qui correspond à 20-70% de cobalt par rapport au Co(III) présent à des pourcentages inférieurs à 3%. Cela est cohérent avec d'autres études qui suggèrent que le Co(III) n'intervient qu'au-delà du potentiel de 750 mV/ECS [107].

A +300 mV/ECS, le pic à 783,6 eV indique que le cobalt est présent sous forme organométallique (32%). Il a d'ailleurs été établi que le Co et le Cr peuvent s'incorporer à l'albumine ou se lier à la cystéine [168]. Le cobalt sous forme métallique montre que le film passif est très fin.

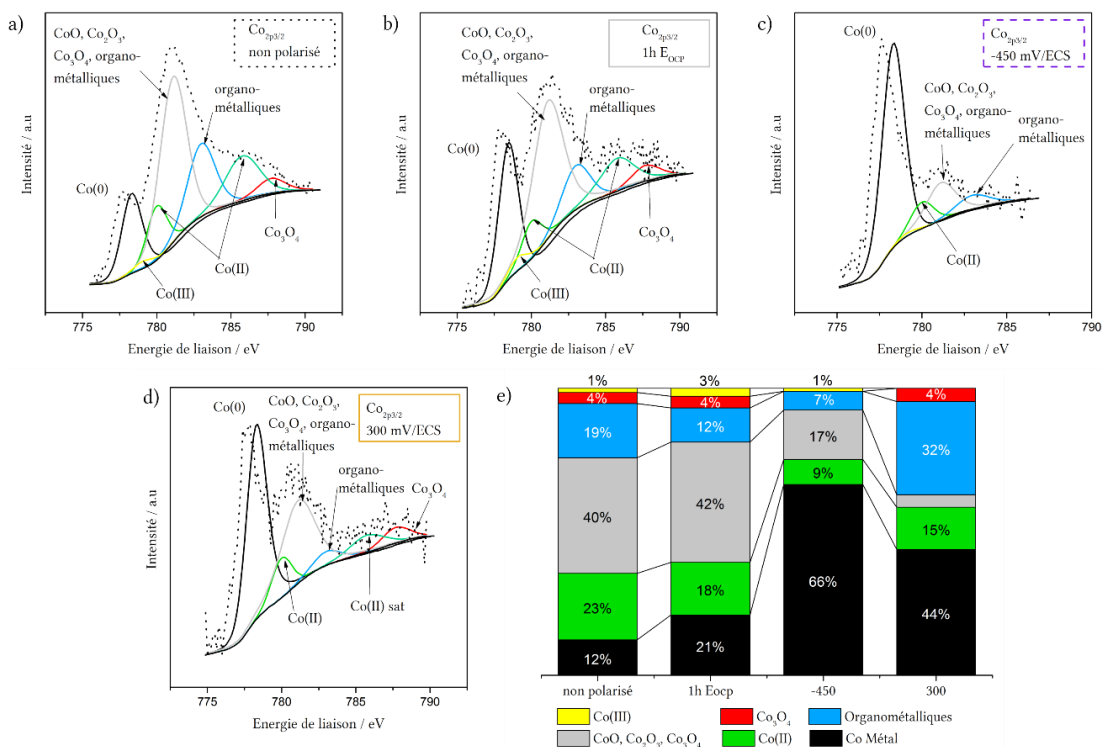


Figure IV. 19 Spectres haute résolution  $\text{Co}_{2p_{3/2}}$  du CoCrMo exposé ou non dans le RPMI-1640 supplémenté et après suivi de l'E<sub>OCP</sub> ou la polarisation à -450 et +300 mV/ECS (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) (a-d). Répartition des liaisons du signal du pic  $\text{Co}_{2p_{3/2}}$  en pourcentage atomique relatif au Co (e).

Le comportement passif de l'alliage de CoCrMo dans les solutions biologiques est habituellement attribué à la formation, à sa surface, d'un film d'oxydes de chrome, de teneur en  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  estimée à 90% [119]. Il convient donc d'analyser finement la contribution des oxydes de chrome. Le pic  $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$  peut correspondre

à quatre contributions différentes : 573,8 eV pour le chrome métallique, 576,3 eV relatif aux espèces  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , 577,2 eV pour le  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  [114,115] et enfin 578,7 eV sous la forme d'oxydes de Cr(VI) et d'espèces hydratées (Figure IV. 20a-d). La répartition des liaisons du signal du pic  $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$  pour chaque condition expérimentale est exprimée en pourcentage atomique relatif au chrome (Figure IV. 20e).

L'enrichissement en chrome dans le film passif, mentionné précédemment, correspond à une augmentation des oxydes de chrome (entre 65 et 81%) par rapport au chrome métallique (19 à 24%). Ils sont majoritairement présents sous forme d'hydroxyde de Cr(III), i.e.  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (entre 40 et 55%) et dans une moindre mesure, d'oxyde de Cr(III) (Figure IV. 20e). Le  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  a déjà été détecté dans le film passif du CoCrMo immergé en solutions NaCl ou NaOH, mais il est souvent minoritaire par rapport au  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  [103,105,119,211,245,275]. D'autres auteurs ont confirmé que la couche passive de chrome est très hydratée [114,276]. Moffat et Latanision ont proposé qu'elle se compose d'ions chromiques reliés entre eux par un réseau d'eau, d'hydroxyde et de ligand d'oxyde [114]. Haupt et Strehblow ont proposé une matrice de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  contenant de l'eau [276]. Dans le RPMI-1640 supplémenté, l'eau et les composés organiques réagissent très probablement avec le  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  pour former du  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  à la surface.

Excepté à -450 mV/ECS, l'immersion en RPMI-1640 entraîne un enrichissement en hydroxyde de Cr(III) par rapport à l'oxyde de Cr(III). A ce potentiel, correspondant à la transition active/passive (Figure IV. 8), le  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  est très faiblement présent (7 %). La réduction de l' $\text{O}_2$  dissous ayant lieu dans ce domaine, produit des ions  $\text{OH}^-$  et de ce fait alimente la réaction de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ .

La présence de Cr(VI) est généralement observée aux potentiels élevés, dans le domaine transpassif ( $E > 480$  mV/ECS) [103,105,119,211,245,275]. Bien que sa contribution soit faible, le CoCrMo présente tout de même 4 à 6 % de Cr(VI) dans le film passif. Le milieu RPMI-1640 favorise la formation des oxydes de Cr(III) tout comme les hydroxydes de Cr(VI).

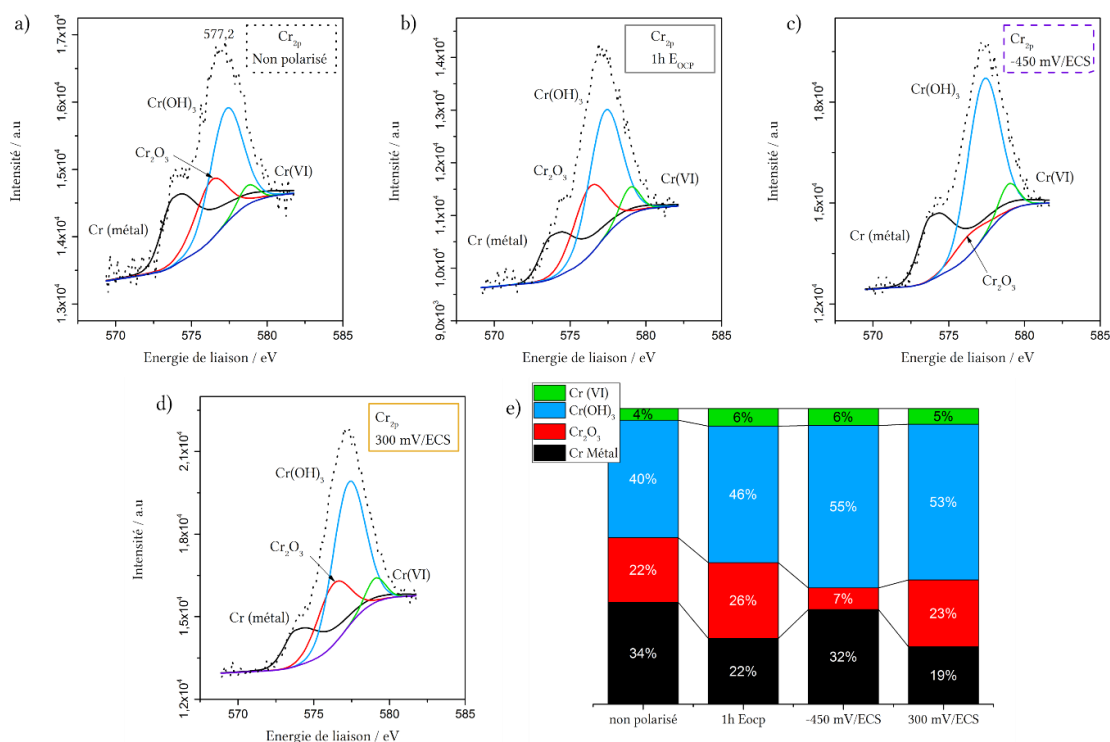


Figure IV. 20 Spectres haute résolution  $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$  du CoCrMo exposé ou non dans le RPMI-1640 supplémenté et après suivi de l' $E_{\text{OCP}}$  ou la polarisation à -450 et +300 mV/ECS (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) (a-d). Répartition des liaisons du signal du pic  $\text{Cr}_{2p_{3/2}}$  en pourcentage atomique relatif au Co (e).

Le pic  $Mo_{3d}$  a été décomposé en quatre doublets  $Mo_{3d5/2}$ - $Mo_{3d3/2}$  (Figure IV. 21a-d). Du fait du chevauchement des états d'oxydation de la région  $Mo_{3d}$ , les composantes  $3d5/2$  et  $3d3/2$  ont été imposées avec un écart d'énergie de 3,1 eV, avec la même largeur à demi-hauteur, et avec un rapport d'intensité de 1,5 [104,120]. Les composantes  $3d5/2$  de 227,7 et 229,3 eV ont été attribuées respectivement au Mo(0) et au Mo(IV) sous la forme d'oxyde  $MoO_2$  [120,121]. La composante du troisième doublet  $3d5/2$  à 231,3 eV correspond à l'oxyde Mo(IV) ou l'hydroxyde hydraté sous forme  $Mo_x(OH)_y$  [119–121]. Certains auteurs attribuent aussi ce troisième doublet au Mo(V) [131]. Enfin, la composante du dernier doublet  $3d5/2$  à 232,7 eV correspond à l'oxyde Mo(VI).

La concentration de molybdène dans le film est faible (inférieure à 7 %) (Figure IV. 18). Lorsque le film est formé à l'air, le molybdène est majoritairement présent sous forme d'oxydes ou d'hydroxydes à une teneur de 87 %. Il est constitué à moitié de Mo(VI), probablement  $MoO_3$ , ce qui est cohérent avec les études antérieures [119,121,211]. Une fois le CoCrMo immergé en RPMI-1640, la concentration d'oxydes Mo(VI) diminue (Figure IV. 21e), suggérant que la dissolution de l'alliage intervient à la fois pour les oxydes de molybdène que de cobalt, comme évoqué précédemment. Dans le domaine de dissolution active (-450 mV/ECS), le Mo(VI) se dissout davantage par rapport aux oxydes/hydroxydes Mo(IV). Hanawa et al. ont montré que le molybdène est plus oxydé en surface extérieure, ce qui suggère que le Mo(VI) est dissout de préférence en raison de sa plus grande exposition à l'électrolyte [103].

Dans le domaine de faible passivité ( $E_{OCP}$ ), la contribution majeure est l'oxyde  $MoO_3$  aux dépens de l'hydroxyde Mo(IV) hydraté (environ 41% contre 12%) (Figure IV. 21e). Les études par XPS des films obtenus dans les solutions physiologiques corroborent la présence de molybdène de degrés d'oxydation 4, et 6 comme c'est le cas dans le RPMI-1640 [103,119–121,277].

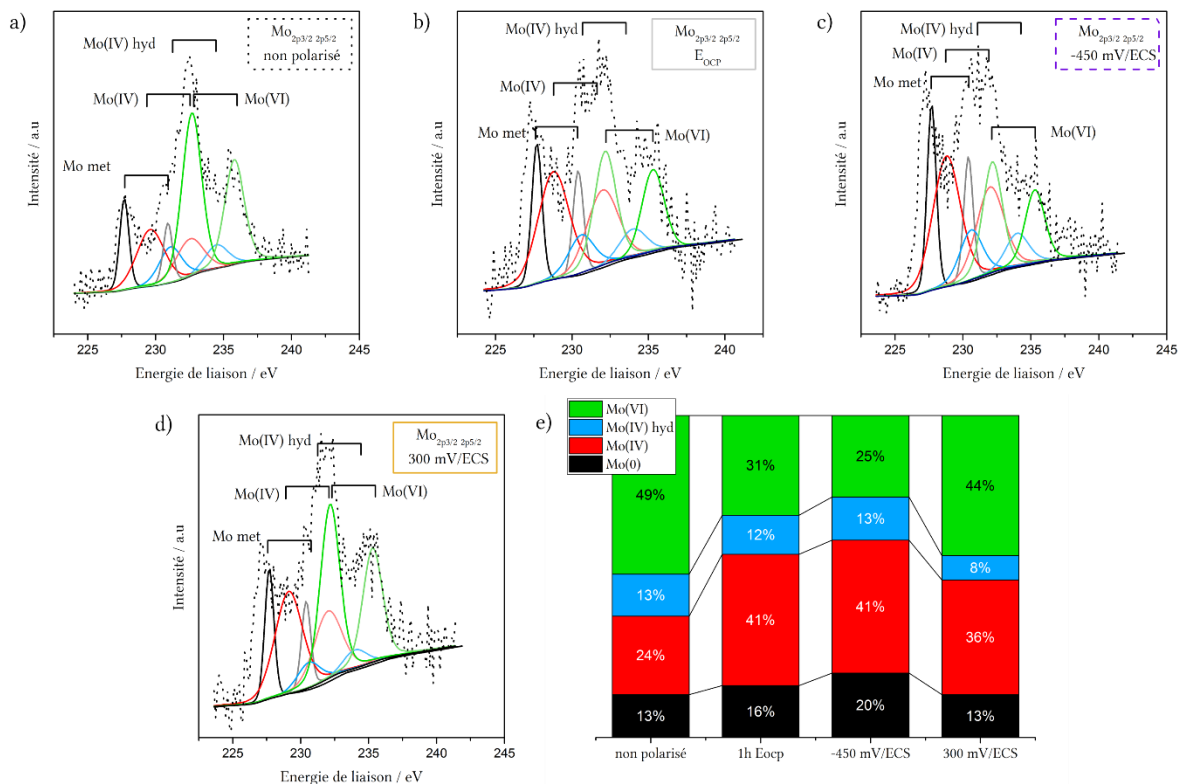


Figure IV. 21 Spectres haute résolution  $Mo_{3d5/2}$  et  $Mo_{3d3/2}$  du CoCrMo exposé ou non dans le RPMI-1640 supplémenté et après suivi de l' $E_{OCP}$  ou la polarisation à -450 +300 mV/ECS (37°C, 5%  $CO_2$ ) (a-d). Répartition des liaisons du signal du pic  $Cr_{2p3/2}$  en pourcentage atomique relatif au Mo (e).

Les oxydes Mo(VI) sont habituellement détectés dans le domaine transpassif ( $E > 480\text{mV/ECS}$ ) [119,243,273]. Dans ce présent travail, dès la fin du domaine passif ( $300\text{ mV/ECS}$ ), une nette augmentation en Mo(VI) a lieu, passant de 25 à 44% (Figure IV. 21e). Ceci est en accord avec les résultats précédents, confortant que le domaine passif débute avant  $480\text{ mV/ECS}$ . Le RPMI-1640 semble contribuer à l'oxydation du Mo(IV) en Mo(VI) de manière plus précoce qu'en solution physiologique simulée.

#### IV. 3.4 Discussion

L'immersion du CoCrMo dans le RPMI-1640 supplémenté entraîne des différences significatives dans la composition du film passif, notamment :

- l'enrichissement en oxydes et hydroxydes de Cr(III) à la surface, ce qui confère un caractère plus protecteur au film,
- l'appauvrissement des oxydes de cobalt, présent lors de la préparation de l'échantillon et résultant de l'oxydation avec l'air,
- l'adsorption préférentielle de phosphore, correspondant à l'étape initiale de la précipitation du phosphate de calcium,
- l'adsorption de composés organiques tels que les acides aminés ou les protéines.

Par ailleurs, la composition du film passif dépend du domaine de potentiel. D'après les résultats des analyses XPS, mis en corrélation avec les essais électrochimiques (CP et SIE), il est établi que :

- L'immersion du CoCrMo en milieu RPMI-1640 entraîne une dissolution des oxydes de cobalt et de molybdène formés au préalable par oxydation avec l'air. Dans le domaine de transition active/passive, le film passif est en cours de formation. Son caractère semble dépendre de la concentration en ions  $\text{OH}^-$  : faiblement présents, ils améliorent la formation d'hydroxydes de chrome et de molybdène et fortement présents, ils la ralentissent.
- Dans le domaine passif (à l' $E_{\text{OCP}}$  et de  $-150$  à  $+300\text{ mV/ECS}$ ), le CoCrMo présente la plus grande épaisseur de film avec un maximum à  $-150\text{ mV/ECS}$ . Le film passif se compose majoritairement d'oxydes et hydroxydes de Cr(III) et dans une moindre mesure, d'oxydes de Co sous forme organométalliques dont la teneur a doublé dans le domaine passif. Les propriétés protectrices sont attribuées aux oxydes métalliques de chrome et/ou aux complexes organométalliques de cobalt. La SIE a décelé des variations au sein même du domaine passif sur une large gamme de potentiels. A  $300\text{ mV/ECS}$ , la résistance et l'épaisseur du film passif diminuent sensiblement. Ceci peut être dû à l'oxydation du Mo en Mo(VI), qui est alors présent à 44% au lieu de 25% par rapport aux autres potentiels passifs. En résumé, le domaine passif du CoCrMo en milieu RPMI-1640 confèrent de bonnes propriétés protectrices au film passif, dont l'origine peut provenir : **i**) de la présence de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (23% au lieu de 7%), **ii**) des complexes organométalliques de cobalt (10% au lieu de 5%) et par conséquent **iii**) de la présence de protéines. Inversement, la formation de Mo(VI) réduit le caractère protecteur.
- Dans le domaine transpassif (à  $700\text{ mV/ECS}$ ), le film est absent en surface, représentatif de la dissolution anodique du CoCrMo et à l'origine d'un relargage de cations métalliques.
- L'adsorption préférentielle des composés organiques (acides aminés, protéines) est dépendante du potentiel électrochimique tandis que la précipitation des sels inorganiques (phosphate de

calcium) est probablement régit par le temps d'immersion, le pH de la solution et la concentration.

Les résultats de l'analyse XPS, corrélés aux essais électrochimiques (CP et SIE), ont permis d'établir la composition et les propriétés du film passif du CoCrMo en fonction des domaines électrochimiques. Sur la base du chapitre précédent, la réactivité du biomatériau métallique a été évaluée à partir de celle intrinsèque du milieu RPMI-1640, qui dans ce cas n'est pas révélée. Le système CoCrMo/RPMI-1640/incubateur correspond aux conditions de référence pour évaluer par la suite le rôle des espèces organiques, telles que le sérum bovin, et le CO<sub>2</sub>.

## IV. 4 ROLE DES ESPECES ORGANIQUES

En raison de la composition complexe du RPMI-1640, il est difficile de savoir précisément quels composés organiques adsorbent spécifiquement le CoCrMo. La comparaison avec un milieu inorganique simulé tel que le DPBS permet de discriminer ou d'attribuer un rôle à des espèces organiques telles que le sérum de veau foetal (SVF). Cette section traite de la réactivité des composés organiques sur le biomatériau CoCrMo en suggérant des mécanismes d'interactions.

### IV. 4.1 Evolution de l'E<sub>OCP</sub> du CoCrMo

L'évolution du potentiel E<sub>OCP</sub> traduit le comportement passif du CoCrMo en milieu RPMI-1640 avec ou sans sérum de veau foetal (SVF) et en milieu DPBS (Figure IV. 22). Plus les composés organiques sont présents en solutions, plus la valeur de E<sub>OCP</sub> diminue : de -166 à -400 mV/ECS (p = 0,007). Cette évolution significativement différente entre les milieux va de pair avec la littérature et ce même pour de faible concentration en protéines (0,5 % d'albumine de sérum bovin ajoutée à des solutions de NaCl ou de PBS [111]) [166,244]. Il est en effet connu que les complexes métal-protéine déplacent l'équilibre chimique dans le sens de la formation d'ions métalliques, ce qui favorise la dissolution de l'alliage métallique [167]. L'albumine, contenue dans le SVF est également connue pour accélérer la dissolution du cobalt pur [160]. Ainsi, la présence des composés organiques du RPMI-1640 accélèrent la dissolution du CoCrMo. Les analyses XPS précédentes confirment qu'après immersion dans le RPMI-1640 supplémenté, la surface du CoCrMo est recouverte de composés azotés et carbonés (vitamines, protéines et acides aminés).

La quantité d'adsorption, la conformation et le type de protéines [158] qui s'adsorbent sur l'alliage CoCrMo varient en fonction du temps d'immersion [103]. La Figure IV. 22 présente également les valeurs du potentiel E<sub>corr</sub> du CoCrMo après l'immersion et 1 heure dans les trois milieux. Quelle que soit la solution, le potentiel E<sub>corr</sub> augmente avec le temps d'immersion mais non significativement (p de 0,11 à 0,36 selon les milieux par comparaison du temps d'immersion). Cette évolution est en concordance avec la littérature [119] et indique probablement une amélioration générale du comportement passif à mesure que le film passif mûrit avec le temps. L'augmentation est d'autant plus prononcée que les composés organiques sont faiblement présents en solution (p = 0,0007).

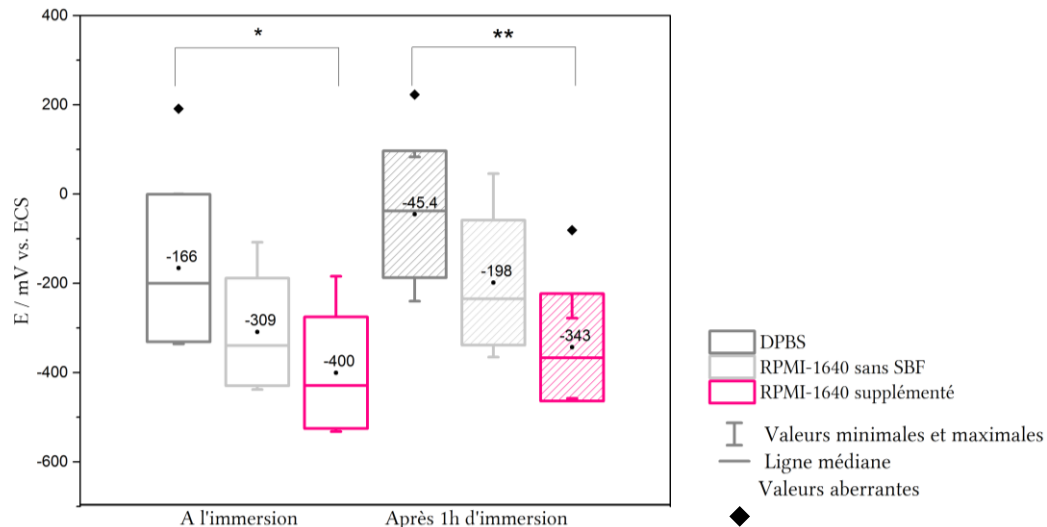
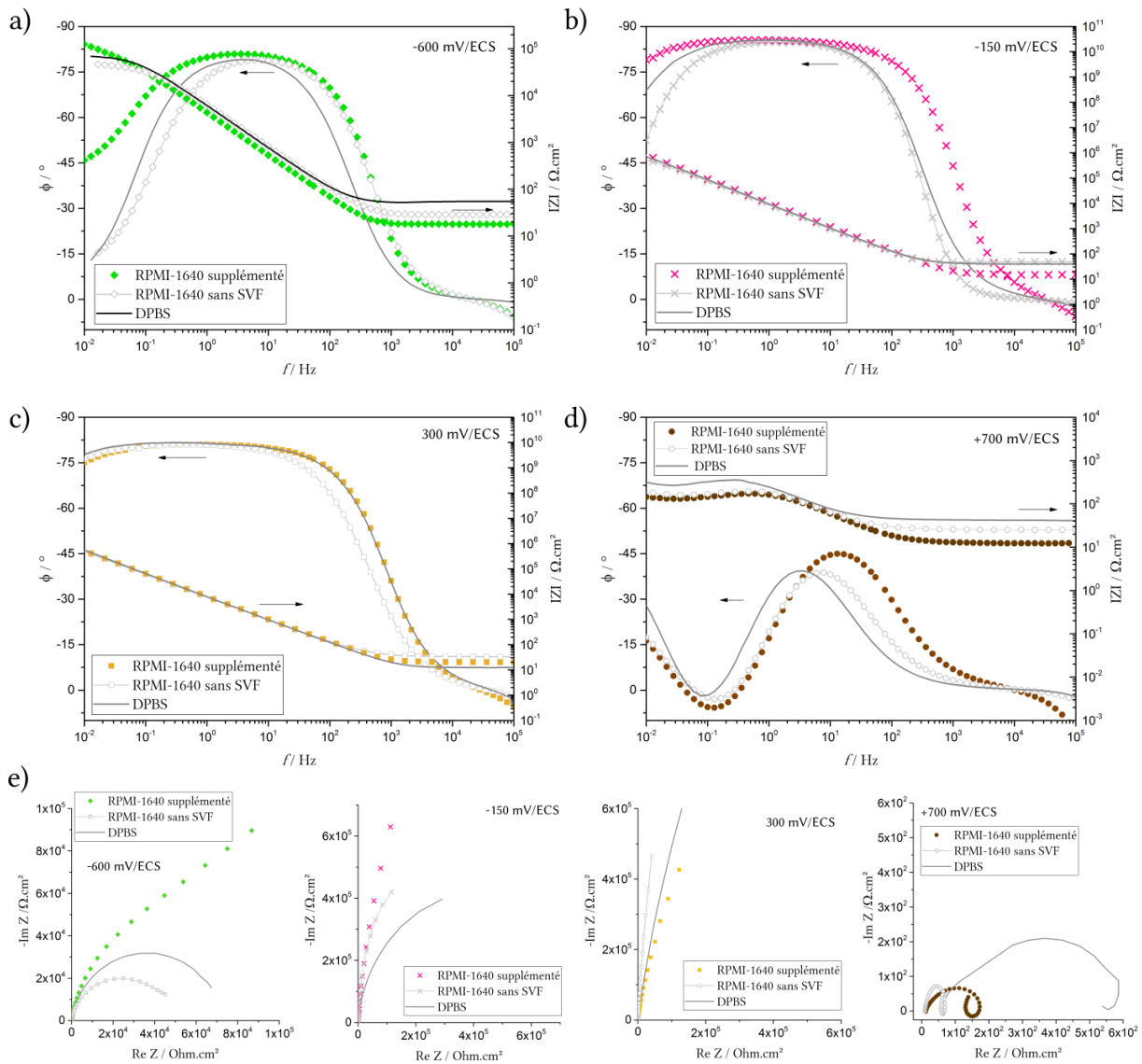


Figure IV. 22 Evolution du potentiel d'abandon du CoCrMo dans le RPMI-1640 supplémenté (rose), le RPMI-1640 sans sérum de veau fœtal (gris clair) et le DPBS (gris foncé) à l'immersion et après 1 h d'immersion (37°C). Les boîtes correspondent à la valeur moyenne  $\pm$  l'écart type (N=10). Les données ont été traitées par ANOVA suivie d'un essai de comparaison multiple : \* correspond à  $p = 0,007$  et \*\* à  $p = 0,0007$  entre les trois milieux.

#### IV. 4.2 Essais potentiostatiques

La réactivité spécifique des composés organiques, et précisément du SVF, a été étudiée en réalisant les mêmes essais potentiostatiques et de SIE qu'au chapitre précédent. La Figure IV. 23 présente l'évolution de la phase et du module de l'impédance en fonction de la fréquence pour les potentiels représentatifs des domaines : de la transition active/passive (-600 mV/ECS), passif (-150 et 300 mV/ECS) et transpassif (700 mV/ECS). L'application des modèles électriques équivalents, utilisés précédemment (Figure IV. 11), donne les résultats rassemblés à la Figure IV. 24. Chaque valeur correspond à la moyenne et à l'écart-type d'au moins trois tests.



#### IV. 4.2.a Comparaison entre RPMI-1640 et DPBS

La résistance du film  $R_2$  est du même ordre de grandeur dans les trois solutions lorsque le CoCrMo est polarisé aux potentiels de -600 et 700 mV/ECS. On suggère qu'à ces potentiels les phénomènes de diffusion et de dissolution sont respectivement majoritaires, masquant la réactivité des composés organiques. Dans le domaine passif, la contribution des espèces organiques est significative ( $p = 0,06$  entre les trois milieux). Elle se traduit par une résistivité élevée à -150 mV/ECS dans le RPMI-1640 supplémenté, atteignant 6000 k $\Omega$  cm<sup>2</sup> contrairement aux autres solutions où elle ne dépasse pas 1000 k $\Omega$  cm<sup>2</sup> (Figure IV. 24). L'épaisseur du film est plus élevée à -150 mV/ECS pour les deux solutions organiques mais non significative ( $p = 0,48$ ). Ces résultats indiquent que le SVF contribue à une amélioration de la tenue à la corrosion de l'alliage CoCrMo. L'hypothèse mentionnée précédemment est confirmée : une espèce organique s'adsorbe préférentiellement à ce potentiel. Il se peut que l'albumine, présent dans le SVF joue ce rôle.



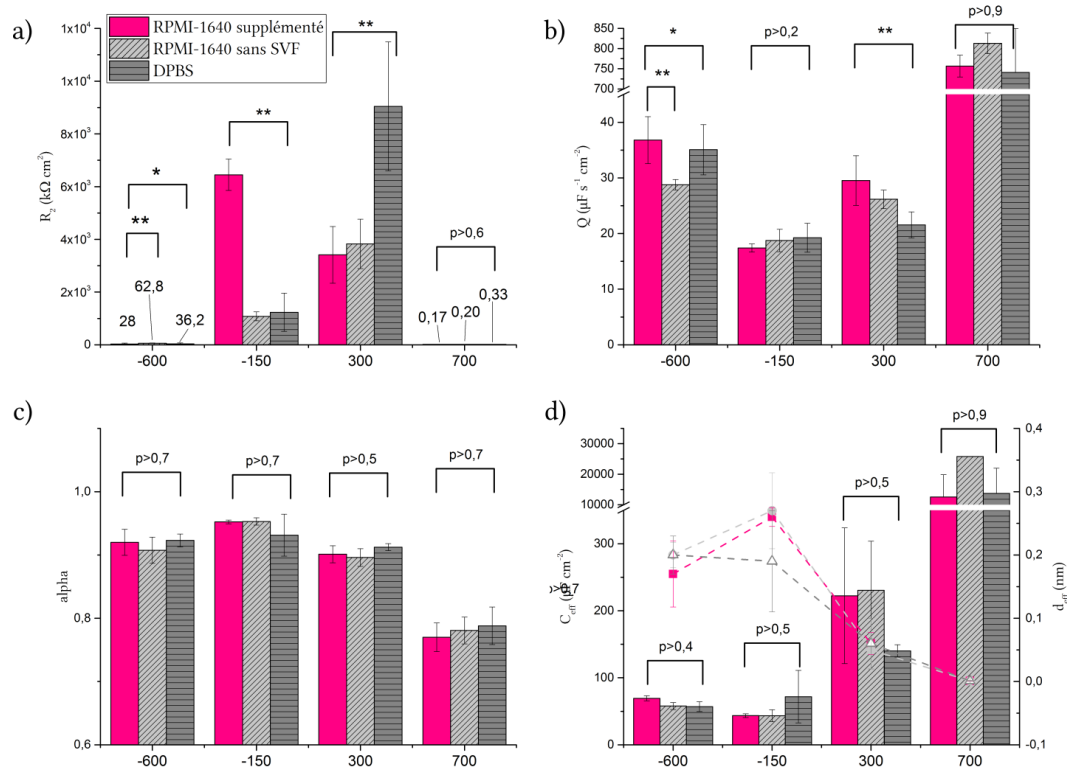


Figure IV. 24 Evolution des paramètres électrochimiques issus des essais de SIE sur le CoCrMo immergés dans une solution inorganique (DPBS, en gris foncé) et deux solutions organiques avec (en rose) ou sans SVF (en gris clair) :  $R_p$  (a),  $Q$  (b),  $\alpha$  (c),  $C_{eff}$  et  $d_{eff}$  (d). T : 37°C, 5%  $CO_2$ . Les données ont été traitées par ANOVA suivie d'un essai de comparaison multiple entre les trois milieux : \*\* correspond à  $0,002 < p < 0,06$  et \* correspond à  $p < 0,17$ . Les autres valeurs de probabilité non significativement différentes sont inscrites.

La diminution de la résistance de polarisation, de l'exposant  $\alpha$  et de l'épaisseur du film, témoignent que le film passif établi vers 300 mV/ECS en solutions organiques est plus fin, moins résistant et plus hétérogène. Dans le DPBS, soit en l'absence de composés organiques, les propriétés de résistance à la corrosion sont nettement améliorées ( $R_p$  de 9000  $k\Omega \cdot cm^2$ ) ( $p = 0,006$  entre le RPMI-1640 supplémenté et le DPBS et  $p = 0,06$  entre le RPMI-1640 sans SBF et le DPBS). Les valeurs de l'exposant  $\alpha$  et de l'épaisseur du film ne sont pas significativement différentes ( $p = 0,5$  et  $0,2$  respectivement). Ainsi, dans le domaine passif, les composés organiques agissent significativement sur le transfert de charges, soit en améliorant les propriétés du film passif, soit en accélérant sa dissolution en formant des complexes métal/protéines.

L'exposant  $\alpha$  tend à être faible, plus les composés organiques sont présents en solution mais pas de manière significative. Il pourrait être suggérer que l'interface est recouverte d'espèces provenant du RPMI-1640 qui perturbent le transfert de charges. Au potentiel de -150 mV/ECS, les espèces organiques ne confèrent pas de structure significativement différente ( $p = 0,75$ ). A 300 mV/ECS, la valeur plus élevée de  $C_{eff}$  pour les milieux RPMI-1640 suggère un possible état d'adsorption différent ( $p = 0,19$  par comparaison avec le DPBS).

Dans le domaine transpassif, la libération et la dissolution des ions métalliques peuvent favoriser la production de complexes métalliques. L'interface est hétérogène, très fine et non protectrice.

En résumé, il y a donc une signature évidente des composés organiques du RPMI-1640 sur la réactivité du CoCrMo : elle se traduit dans le domaine passif selon deux mécanismes : **i)** l'adsorption spécifique au début du domaine passif qui augmente l'épaisseur et la résistance du film passif et **ii)** l'accélération de la corrosion par formation de complexes organométalliques ioniques dans la fin du domaine passif.



IV. 4.2.b Le sérum de veau fœtal (SVF)

A -150 mV/ECS, l'épaisseur du film formé dans le RPMI-1640 avec et sans SVF est supérieure à celle du film immergé en DPBS. Comme dit précédemment, les divergences entre milieu organique et inorganique proviennent avant tout de l'adsorption de composés intrinsèques du RPMI-1640, qui peuvent être les acides aminés, les protéines ou les vitamines. L'épaisseur semblable du film entre les deux milieux organiques montre que le SVF ne forme pas une couche protéique supérieure à celle des composés organiques préalablement adsorbés. Pourtant la nette augmentation de la résistance de polarisation en présence de SVF montre qu'il améliore la résistance à la corrosion de l'alliage CoCrMo. Ce caractère peut être attribué à l'albumine qui est fortement concentrée dans le SVF et possède des propriétés électrostatiques. En présence d'albumine bovine dans une solution saline, le film passif subit aussi un enrichissement en chrome améliorant sa résistance à la corrosion [159].

L'interface solide/liquide étant un lieu dynamique d'adsorption, désorption et déplacement des différents adsorbats, plusieurs phénomènes peuvent expliquer que l'épaisseur effective du film adsorbé n'augmente pas en présence de SVF :

- L'analyse XPS menée précédemment a montré que la composition du film passif varie selon le potentiel : il se compose principalement de  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  mais au potentiel limite du domaine transpassif, le  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  contribue à 23%. Comme les surfaces métalliques et les protéines sont des entités chargées, il se produit des interactions électrostatiques qui sont étroitement liées à la densité de charges de surface des oxydes. Ainsi, le  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  pourrait être à l'origine d'une forte répulsion entre les charges électrostatiques et modifier l'adsorption préférentielle ou la conformation de la protéine responsable dans le SVF [278]. Fukuzaki et al. ont d'ailleurs montré que le taux de BSA adsorbée dépend de la densité de charges de surface de l'oxyde [279].
- En plus des propriétés des protéines et du substrat, la quantité de protéines adsorbées à la surface d'un solide est affectée par les conditions environnementales d'adsorption. La force ionique et la composition de la solution sont des facteurs qui déterminent la quantité de protéines adsorbées et leur conformation [131]. Ainsi, il est possible que l'adsorption des protéines du SVF soit perturbée par la présence d'ions de la solution tampon par plusieurs mécanismes : **i)** un étirement du fait de l'action d'écrantage des ions du tampon, ce qui implique une baisse de la densité moléculaire et une surface d'adsorption plus grande et de ce fait une diminution du taux d'adsorption, **ii)** une décroissance de la densité de charges positives de la surface des oxydes causée par l'adsorption des anions à leur surface et **iii)** une adsorption compétitive avec les anions (ions carboxyliques ou phosphates libres) entraînant la désorption partielle de la protéine adsorbée [111,280]. Pour autant, il est peu probable que ce type d'échange dynamique avec les phosphates ait lieu puisque le pH du RPMI-1640 est maintenu par un tampon carbonate.
- La présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  observée à la surface du CoCrMo peut également avoir des effets sur les changements structuraux [281] ou l'augmentation du taux d'adsorption [282,283] des protéines. Ceci serait dû à la formation de multicouches de protéines, dans lesquels les cations bivalents jouent le rôle de ponts entre les groupes chargés négativement des protéines, permettant de stabiliser la structure multicouche [280]. Les ions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  peuvent générer une faible déformation de la protéine en raison de leur contribution à la variation de la force ionique de la solution [283].

En résumé, le film passif a des propriétés protectrices améliorées en présence de SVF au début du domaine passif mais fortement réduites à la fin du domaine passif. Deux effets antagonistes sont à considérer dans le domaine passif du CoCrMo :

- En dessous de -150 mV/ECS, il y a une adsorption spécifique des composés du SVF, améliorant les propriétés du film passif,
- Au-delà de -150 mV/ECS, il se produit une désorption du SVF, résultant soit de la variation des oxydes dans le film passif, soit de la précipitation de cations bivalents, soit de la compétition avec d'autres composés organiques. Les propriétés protectrices et l'épaisseur du film sont réduites suite à la formation de complexes organométalliques ioniques.

Le présent travail illustre l'effet des composants organiques du RPMI-1640 sur la résistance à la corrosion du CoCrMo. Les études *in vitro* doivent donc être orientées vers des solutions physiologiques simulées riches de composants pertinents pour les cas physiologiques et cliniques afin de mieux comprendre le comportement à long terme des implants métalliques dans le corps humain. Toutefois, le RPMI-1640 reste un milieu simplifié par rapport aux conditions réelles où le CoCrMo est au contact du liquide synovial ou de l'os vascularisé soumis à des chargements.

## IV. 5 CONTRIBUTION DE LA TENEUR DE DIOXYDE DE CARBONE DANS L'ATMOSPHERE

Le chapitre précédent a mis en évidence que les réactions d'oxydation qui ont lieu dans le RPMI-1640 sont dépendantes du rapport  $O_2/CO_2$  : l'ajout de 5% de  $CO_2$  dans l'air contribue notamment à bloquer les sites actifs à la surface de l'électrode de platine. Les travaux de recherche antérieurs ont mis en évidence que les espèces carbonatées modifient la composition et la stabilité du film des alliages de cobalt et de magnésium [284].

Cette section a pour but d'évaluer dans quelle mesure le dioxyde de carbone dissous et les espèces carbonatées dérivées modifient la résistance à la corrosion de l'alliage CoCrMo. Pour ce faire, des essais électrochimiques en conditions dynamique et statique ont été réalisés en milieu aéré et en atmosphère d'un incubateur.

### IV. 5.1 Condition dynamique

Le CoCrMo a été étudié en milieu RPMI-1640 sous deux atmosphères : en incubateur (résultats présentés jusqu'à maintenant) et en atmosphère non contrôlée c'est-à-dire en aéré (Figure IV. 25). Le taux de dioxyde de carbone  $CO_2$  dans ces deux environnements est de 5 et 0,035% vol respectivement.

La Figure IV. 25 montre que le potentiel  $E_{corr}$  du CoCrMo est indépendant de la teneur en ions carbonates et bicarbonates dissous dans l'électrolyte. La dissolution sélective après immersion provient uniquement des espèces ioniques ou organiques du RPMI-1640. De même, quelle que soit la teneur de  $CO_2$  dans l'atmosphère, le CoCrMo présente les mêmes domaines électrochimiques caractéristiques des alliages passivables : la transition active/passive, le plateau passif et le domaine transpassif. Les potentiels qui délimitent ces domaines sont équivalents. Les fluctuations de la densité de courant indiquent que carbonate et le bicarbonate sont des espèces qui participent aux processus de transfert de charge et de transport de masse.

Dans la transition active/passive, la densité de courant diminue inversement à la teneur en  $CO_2$  atteignant un maximum de  $0,2 \text{ mA cm}^{-2}$  au lieu de  $0,9 \text{ mA cm}^{-2}$  en aéré. Le dioxyde de carbone dissous pourrait modifier principalement le taux d' $O_2$  dissous et la quantité de  $H^+$  et de ce fait la cinétique cathodique.

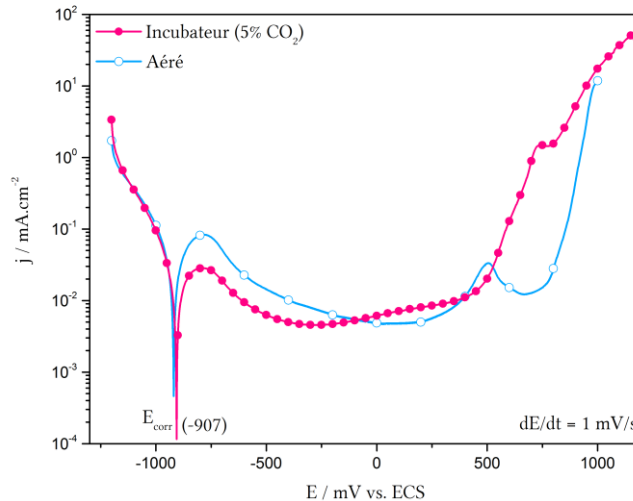


Figure IV. 25 Courbe de polarisation du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté en milieu aéré (ligne bleue) et sous 5% CO<sub>2</sub> (ligne rose). Les spectres ont été tracés après 1 h de mesure du potentiel de circuit ouvert. La température est fixée à 37°C et la vitesse de balayage à 1 mV.s<sup>-1</sup>.

En présence de 5 % de CO<sub>2</sub>, le plateau passif se caractérise par une densité qui croît à mesure que le potentiel devient anodique. Elle est minimale vers -300 mV/ECS. Cette constante augmentation suggère que les propriétés du film passif s'amenuisent soit par un changement structurel ou de composition. En aéré, la densité de courant évolue différemment : elle diminue avec le potentiel avec un minimum vers 250 mV/ECS. Le transfert de charges relatif à la formation du film passif est ralenti. La variation du taux de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère permet de distinguer deux zones dans le domaine passif où les ions bicarbonate et carbonate réduisent et favorisent successivement les réactions de formation du film passif.

La diminution de 5 à 0,035 % du taux de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère met en évidence un pic à 500 mV/ECS dans le domaine transpassif. Il correspond à l'oxydation transpassive du Cr accompagnée de la formation d'espèces de valence supérieure [285].

La nette augmentation de la densité de courant à partir de 400 mV/ECS suggère une contribution significative du CO<sub>2</sub> sur la seconde passivité et/ou l'oxydation des cations métalliques sous forme solubles. En effet, à 400 mV/ECS, la conversion du Cr(III) en Cr(VI) s'accompagne du Co(II) en Co(III) [107,286]. Ceci est confirmé par les analyses XPS du CoCrMo en incubateur présentées précédemment qui reflètent une modification significative de la composition de l'oxyde de cobalt. A 300 mV/ECS, le cobalt est présent à 30% sous forme d'espèces organométalliques au dépend des oxydes de Co(II) et (III). Plusieurs auteurs [177,179,262,263] ont démontré que les ions bicarbonates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sont agressifs pour les couches passives de Co(II) par dissolution des oxydes de CoCO<sub>3</sub> et Co(OH)<sub>2</sub> en Co(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>-</sup>.

À des potentiels plus élevés, où le Co(III) se forme dans le film d'oxydes, le bicarbonate cause relativement peu de dégradation du film [287]. Pour autant les oxydes de type spinelle tels que le Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> catalysent la réaction d'évolution de l'oxygène [284]. En atmosphère de l'incubateur, le film passif peut également favoriser la réaction d'évolution de l'oxygène qui se produit avec une surtension diminuée de 300 mV.

Pour confirmer l'implication des espèces carbonées sur la réactivité du CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté, des essais de polarisation couplés à des mesures SIE ont été réalisés aux mêmes potentiels d'intérêt que la section précédente.

IV. 5.2 Condition potentiostatique

Les spectres d'impédance obtenus avec et sans CO<sub>2</sub> (5 et 0,035% vol), ainsi que les paramètres électrochimiques extraits à partir des circuits électriques équivalents sont présentés aux Figure IV. 26 et Figure IV. 27.

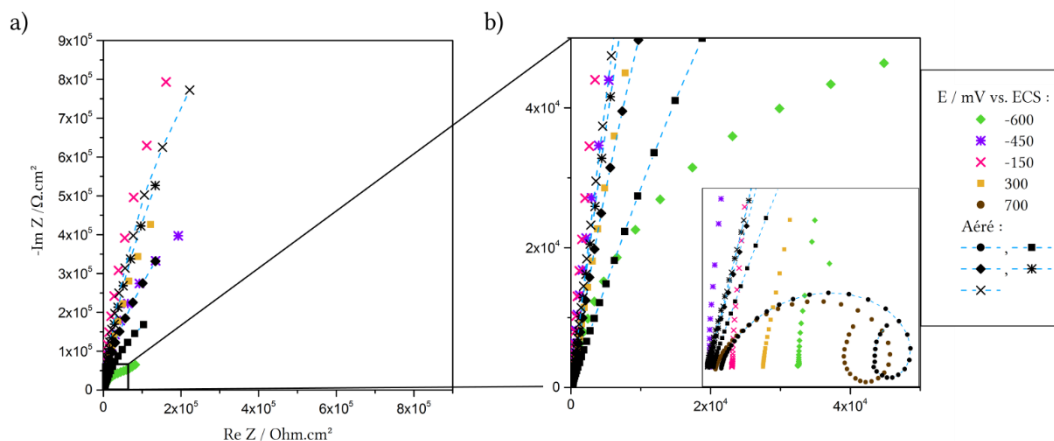


Figure IV. 26 Spectres d'impédance du CoCrMo polarisé dans le RPMI-1640 supplémenté de -600 à +700 mV/ECS sous l'atmosphère d'un incubateur (5 % CO<sub>2</sub>) (symboles colorés) et en milieu aéré (0,035 % CO<sub>2</sub>) (symboles noirs reliés par une ligne bleue en pointillés).

Les propriétés du film passif du CoCrMo suivent la même évolution dans la gamme de potentiel de -600 à +700 mV/ECS en présence ou en absence de CO<sub>2</sub> : la capacité diminue avec le potentiel jusqu'à un minimum à -150 mV/ECS (10-20  $\mu\text{Fs}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ) puis augmente rapidement (800  $\mu\text{Fs}^{-1}\text{cm}^{-2}$ ). La résistance suit l'évolution inverse avec un maximum à -150 mV/ECS (700-800  $\text{k}\Omega \text{cm}^2$ ). Il est intéressant de noter que le potentiel de -150 mV/ECS délimite un changement dans le transfert de charges sur le CoCrMo comme sur le platine (Chapitre III) : l'interface est de type capacitif en incubateur avant -150 mV/ECS puis résistif au-delà. Le comportement inverse a lieu en quasi absence de CO<sub>2</sub> (aéré). Ces résultats traduisent une réactivité particulière des espèces carbonées à l'interface solide/RPMI-1640. Les changements de composition du film passif de CoCrMo avec le potentiel peuvent être à l'origine de ces différences puisque les oxydes de cobalt sont dissous préférentiellement par les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Par ailleurs, la résistance R<sub>2</sub> du film passif du CoCrMo augmente avec le potentiel jusqu'à un maximum de -150 mV/ECS (6000-9000  $\text{k}\Omega \text{cm}^2$ ) puis diminue rapidement (0,2  $\text{k}\Omega \text{cm}^2$ ). Par rapport aux valeurs relevées dans le cas de l'électrode de platine, celles-ci sont 10 fois supérieures. Cet écart pourrait correspondre à la résistance intrinsèque du film passif de l'alliage de CoCrMo. Contrairement au platine, la résistance R<sub>2</sub> du CoCrMo présente un maximum à -150 mV/ECS, indépendant de la concentration en CO<sub>2</sub>, (p = 0,63) ce qui suggère qu'il ne modifie pas la réactivité intrinsèque des espèces organiques du RPMI-1640.

A -600 mV/ECS, la différence de résistance R<sub>2</sub> entre les deux atmosphères est significative (p = 0,07), de près de deux ordres de grandeurs suggère que le CO<sub>2</sub> diminue les propriétés du film, ce qui est contraire à la courbe de polarisation. Les couches insolubles de carbonate pourraient précipiter à la surface du CoCrMo et accélérer sa dissolution ou agir sur la composante cathodique [105,260,261].

Le coefficient  $\alpha$  traduit une homogénéité proche quelle que soit l'atmosphère aux potentiels de polarisation inférieur à -150 mV/ECS. Au-delà, la variation du taux de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère modifie significativement l'hétérogénéité de surface (p = 0,009 et 0,02 à 300 et 700 mV/ECS) Les espèces

carbonées en solution pourraient engendrer un gradient de concentration de l'interface vers la solution et des phénomènes de diffusion.

La capacité effective  $C_{eff}$  évolue similairement avec ou sans dioxyde de carbone en atmosphère excepté à 300 et 700 mV/ECS où elle est significativement supérieure dans le milieu aéré par rapport à l'incubateur ( $p = 0,03$  et  $0,09$ ). A partir des analyses XPS réalisés précédemment, et comme ce fût déjà mentionné, il paraît évident qu'à ce potentiel une grande affinité à lieu entre les oxydes de cobalt et les ions  $HCO_3^-$  d'où la diminution de  $C_{eff}$ . L'estimation de l'épaisseur effective  $d_{eff}$  donne des valeurs relativement faibles, inférieure à 0,5 nm, probablement sous estimées par le calcul. Si on s'attarde sur l'évolution de  $d_{eff}$ , on remarque qu'elle est similaire quel que soit le pourcentage de  $CO_2$  excepté à -600 mV/ECS. Similairement à la résistance  $R_2$  ( $p = 0,06$ ), la  $d_{eff}$  est plus élevée ( $p = 0,03$ ) en l'absence de  $CO_2$ , autrement dit en milieu alcalin. En effet, la dissociation du  $CO_2$  en solution en ions bicarbonate et carbonate entraîne aussi une production d'ion  $H^+$  ce qui neutralise les ions  $OH^-$  présent en solution résultant de la réduction de l' $O_2$ .

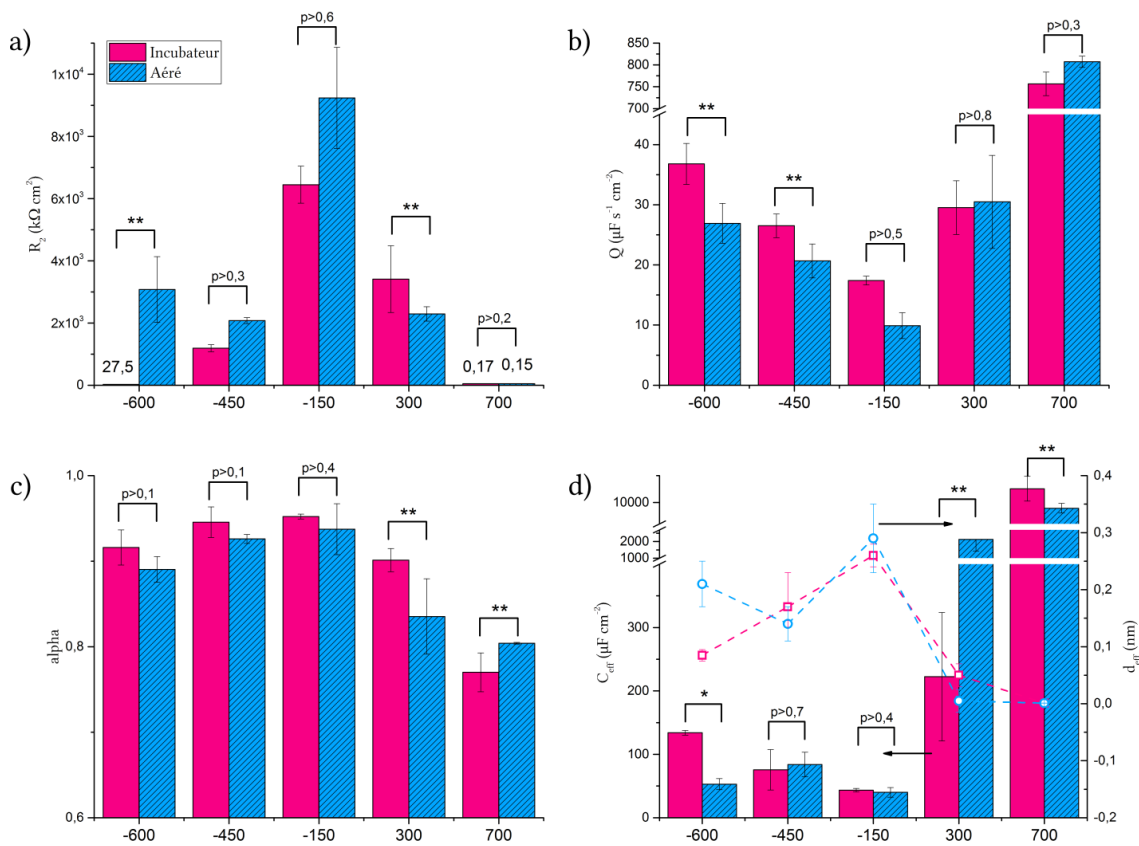


Figure IV. 27 Résultat des paramètres électrochimiques du CoCrMo polarisé dans le RPMI-1640 supplémenté sous atmosphère d'un incubateur (5%  $CO_2$ ) (rose) et en milieu aéré (bleu). Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins trois échantillons.

#### IV. 5.3 Conclusion sur la contribution du dioxyde de carbone sur le CoCrMo

En résumé, les essais électrochimiques potentiodynamiques et potentiostatiques révèlent que le  $CO_2$ , par le biais des espèces carbonates et bicarbonates, sont des espèces actives qui participent aux processus de transfert de charges sur le CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté. L'alliage métallique présente un comportement typique des matériaux passifs avec les caractéristiques suivantes :

- Dans le domaine actif et de transition active/passive, les espèces carbonées réduisent les réactions cathodiques selon plusieurs mécanismes possibles : **i)** Les ions  $\text{OH}^-$  sont neutralisés suite à la dissociation du  $\text{CO}_2$  en solution qui produit des ions  $\text{H}^+$  **ii)** des couches insolubles de carbonate se forment à l'interface CoCrMo/RPMI-1640 et retarde la dissolution des oxydes métalliques dès immersion dans la solution. A ce potentiel, une augmentation de la variation de la résistance d'oxyde se produit, en accord avec les changements dans le taux d'épaississement de la couche.
- Les espèces issues de la dissolution du dioxyde de carbone déplacent le début du domaine transpassif vers des potentiels plus faibles. Ceci implique qu'elles ont une contribution significative sur la passivité secondaire, l'oxydation des cations métalliques solubles et/ou l'évolution de l'oxygène. La modification de la composition du film passif se reflète dans la modification des paramètres de la SIE (300 mV/ECS). L'interaction des ions Co(II) avec les ions bicarbonate conduisant à des espèces solubles explique la diminution des propriétés du film passif du CoCrMo en présence de 5% de  $\text{CO}_2$ .
- Enfin, les propriétés de résistance à la corrosion du CoCrMo en milieu RPMI-1640 sont supérieures à -150 mV/ECS par rapport à l'ensemble des conditions testées, ce qui confirme un effet particulier des composés organiques.

## IV. 6 CONCLUSION

Le comportement électrochimique du CoCrMo en milieu RPMI-1640 supplémenté a été évalué avec précision par des techniques électrochimiques complétées par des analyses de surface. Les résultats conduisent aux conclusions suivantes :

1. Le CoCrMo présente un comportement typique d'un alliage passivable, qui après immersion dans le RPMI-1640 supplémenté est sujet à une adsorption préférentielle des espèces organiques qui implique un enrichissement en oxydes de Cr et une dissolution préférentielle des oxydes de Co. La surface métallique est également le siège de la précipitation du phosphate de calcium.
2. Le domaine actif entraîne une réduction d'épaisseur du film suite à la dissolution des oxydes de Co et de Mo formés préalablement à l'air. La réaction cathodique de l'oxygène dissous régule la dissolution par le biais des  $\text{OH}^-$  produits.
3. Le film passif possède de bonnes propriétés protectrices. Elles sont attribuées aux oxydes et hydroxydes de Cr(III) et/ou aux complexes organométalliques de cobalt. Le milieu de la plage de potentiel du domaine passif (-150 mV/ECS) est caractérisé par une épaisseur du film maximale en concordance avec une forte adsorption d'espèces organiques. Elles confèrent une structure plus homogène, qui peut être liée à une conformation différente des protéines.
4. Dès la fin du domaine passif (à partir de 300 mV/ECS), le film passif devient plus fin, moins protecteur et hétérogène. La proportion d'oxydes de cobalt et de Mo(VI) augmente. Le domaine transpassif réduit les propriétés de résistance à la corrosion suite à l'oxydation du Cr(III) en Cr(VI) et de Co(II) en Co(III) en composés solubles.
5. Les composés organiques du RPMI-1640 ont un rôle évident sur la réactivité du CoCrMo : **i)** une adsorption spécifique au début du domaine passif qui augmente l'épaisseur et la résistance du film passif et **ii)** une accélération de la corrosion par formation de complexes organométalliques beaucoup plus solubles que les oxydes dans la fin du domaine passif. Ce double mécanisme est corrélé à la nature des oxydes de chrome, qui modifie l'adsorption préférentielle ou la conformation des protéines.

6. L'introduction de dioxyde de carbone permet de stabiliser le pH. Les dérivés carbonés se lient préférentiellement avec le cobalt pour former soit des couches protectrices de carbonates (domaine de transition active/passive) soit des complexes solubles accélérant la libération des ions métalliques en solution (avancement du début du domaine transpassif).
7. Le taux d'O<sub>2</sub> étant relativement proche dans les deux types d'atmosphères (20,95 et 19,90%vol), la dissolution de l'oxygène dissous a été considéré comme minoritaire sur la réactivité du système.
8. La présence d'ions Ca<sup>2+</sup> augmente le taux d'adsorption des protéines en jouant le rôle de ponts entre les groupes chargés négativement des protéines, et ainsi stabilise une structure multicouche.

Comparativement à l'application réelle (scénario de corrosion *in vivo*), cette étude présente plusieurs limites :

- Après adsorption des protéines, l'adhésion cellulaire a lieu à la surface du biomatériau et dépend de l'emplacement de l'implantation. Cette étude ne prend malheureusement pas en compte les variations spatiales et temporelles des interactions surface/biologie de l'implant. Par exemple, on peut s'attendre à ce que le flux sanguin (et par conséquent le niveau d'oxygène) à la surface de l'implant influence les réactions électrochimiques contrôlées par la diffusion.
- L'environnement biologique est non constant : la disponibilité des radicaux libres et l'activité cellulaire peuvent causer des variations de la corrosivité de l'environnement.

Finalement, la composition du film d'oxydes de surface change même si le film est macroscopiquement stable. Sa formation a lieu dès le contact avec les électrolytes, par un processus continu de dissolution partielle et de re-précipitation.





---

# CHAPITRE V

## INTERACTION DE L'ALLIAGE CoCrMo AVEC LES OSTEOBLASTES ET LES MACROPHAGES

---

Les cellules retenues dans ce travail sont les ostéoblastes et les macrophages. Ce chapitre est consacré à l'interaction de l'alliage CoCrMo avec ces cellules. Le système est soumis à des conditions représentatives et accélérées de l'état des prothèses orthopédiques dans le corps humain. La stabilité du film passif et la viabilité des cellules ont été étudiées en tenant compte du temps d'exposition, des réactions d'oxydoréduction et de la concentration en ions métalliques dans le milieu.

### Sommaire

---

<b>V. 1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>121</b>
<b>V. 2</b>	<b>Notions bibliographiques sur la réaction de l'hôte vis-à-vis des biomatériaux métalliques.....</b>	<b>121</b>
V. 2.1	La cellule, premier système d'échange avec le milieu environnant .....	122
V. 2.2	Les cellules osseuses .....	122
V. 2.2.a	Les cellules ostéoblastiques.....	122
V. 2.2.b	La lignée monocytes-macrophages-ostéoclastes.....	123
V. 2.3	Réponse de l'hôte face aux biomatériaux.....	124
V. 2.3.a	Réponse aux corps étrangers.....	124
V. 2.3.b	Toxicité des ions métalliques .....	124
V. 2.4	Potentiel/courant induit à la surface de l'implant métallique .....	126
V. 2.4.a	Stimulation électrochimique de l'activité cellulaire .....	126
V. 2.4.b	Stimulation électrochimique de la matrice osseuse .....	126
V. 2.5	Méthodes de suivi <i>in vitro</i> de l'activité cellulaire exposé aux ions métalliques .....	127
V. 2.5.a	La culture des cellules.....	127
V. 2.5.b	Les méthodes de production d'ions métalliques.....	128
V. 2.6	Synthèse bibliographique.....	128
<b>V. 3</b>	<b>Interface CoCrMo/cellules à l'état d'équilibre.....</b>	<b>128</b>
V. 3.1	Propriétés électrochimiques de l'interface CoCrMo/cellules en immersion longue..	128
V. 3.1.a	Evolution du potentiel $E_{OCP}$ .....	128
V. 3.1.b	Mesure de SIE à l' $E_{OCP}$ .....	129
V. 3.2	Analyses de biocompatibilité des ostéoblastes et macrophages.....	133
V. 3.2.a	Effet de l'exposition du CoCrMo sur la viabilité et la prolifération des ostéoblastes et des macrophages .....	133
V. 3.2.b	Effet de l'exposition du CoCrMo sur les fonctions de minéralisation des ostéoblastes	134
V. 3.3	Discussion.....	136
<b>V. 4</b>	<b>Caractérisation potentiodynamique de l'interface CoCrMo/cellules .....</b>	<b>137</b>
V. 4.1	Courbes de polarisation du CoCrMo en présence de cellules .....	137
V. 4.2	Influence de la polarisation dynamique du CoCrMo sur la morphologie des cellules	139

V. 4.2.a	Suivi par microscopie optique.....	139
V. 4.2.b	Observations par microscopie électronique à balayage MEB.....	141
V. 4.2.c	Evaluation du pH intracellulaire par microscopie à fluorescence .....	142
V. 4.3	Discussion.....	143
<b>V. 5</b>	<b>Contrôle électrochimique de l'interface CoCrMo/cellules : cytotoxicité induite par l'oxydation métallique.....</b>	<b>144</b>
V. 5.1	Dissolution ionique contrôlée du CoCrMo .....	145
V. 5.2	Taux de libération d'ions .....	145
V. 5.3	Effet de la dissolution ionique du CoCrMo sur la viabilité et morphologie cellulaire	147
V. 5.3.a	Quantification de la viabilité cellulaire .....	147
V. 5.3.b	Morphologie des cellules.....	148
V. 5.4	Discussion.....	149
V. 5.4.a	Effet de la libération d'ions métalliques CoCrMo.....	149
V. 5.4.b	Influence des ions métalliques .....	150
V. 5.4.c	Limites .....	152
<b>V. 6</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>153</b>

---

## V. 1 INTRODUCTION

La biocompatibilité des biomatériaux et l'ostéo-intégration sont étroitement liées au comportement cellulaire [288]. Au contact de matériaux métalliques, des réactions tissulaires indésirables telles que l'inflammation et l'hypersensibilité peuvent survenir [55,252,289]. Elles résultent, entre autres, de la présence d'ions métalliques dans les tissus, libérés au fil du temps. Le cobalt et le chrome sont connus pour être des éléments nocifs ayant des effets indésirables sur le système immunitaire *in vivo* et *in vitro* [14,48,290–295] et le comportement cellulaire [247,288,296,297]. L'accumulation d'ions métalliques dans les organes vitaux peut être jusqu'à huit fois supérieures à celles de patients sans prothèses [49,298].

Les cellules peuvent également être perturbées par les variations du potentiel de corrosion suite à l'abrasion des surfaces métalliques [196,298]. Ceci peut affecter le comportement cellulaire (morphologie, migration, transport membranaire, adhésion) et modifier la croissance osseuse [299–306]. Inversement, les cellules peuvent modifier les propriétés protectrices des films passifs. La résistance à la corrosion de l'acier inoxydable est, par exemple, améliorée en présence de macrophages [288,307,308].

Il est donc essentiel de comprendre aussi bien l'effet de la dissolution ionique spontanée et forcée du film passif, et des écarts de tension des surfaces des biomatériaux métalliques sur le comportement cellulaire, que l'effet des cellules sur la sensibilité à la corrosion des implants [289,309]. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer ces effets d'interactions entre un alliage de CoCrMo et les macrophages et les ostéoblastes. Les réponses cellulaires étudiées comprennent la morphologie, la viabilité et la prolifération. Les courants électrochimiques et les niveaux d'ions métalliques ont également été mesurés et reliés à la réponse observée.

- Dans un premier temps, nous avons étudié la phase de colonisation des cellules sur le biomatériau en suivant l'évolution des propriétés du film passif du CoCrMo ainsi que son caractère cytotoxique sur les cellules.
- Dans un second temps, nous avons évalué comment les ostéoblastes et les macrophages affectent les réactions redox et le domaine de potentiels dans lequel se produit la formation du film passif.
- Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet des tensions anodiques, c'est-à-dire des ions métalliques produits par oxydation, sur la réponse des cellules cultivées à la surface d'un alliage de CoCrMo.

La finalité de ce chapitre est de corréler le comportement électrochimique du CoCrMo en présence de cellules immunitaires et osseuses avec les effets néfastes dus à la libération d'ions métalliques produits par stimulation électrochimique.

## V. 2 NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA REACTION DE L'HOTE VIS-A-VIS DES BIOMATERIAUX METALLIQUES

La biocompatibilité est le premier prérequis de tout biomatériau ou implant. Elle a été définie comme « la capacité d'un matériau à fonctionner avec une réponse appropriée de l'hôte dans une application » [17]. Ainsi, l'implantation de tout matériau dans le corps humain génère une réponse biologique locale des tissus et des cellules avoisinantes. Les divers mécanismes d'interaction entre ces entités biologiques et le matériau sont abordés dans cette section.

### V. 2.1 La cellule, premier système d'échange avec le milieu environnant

La cellule extrait du milieu environnant des nutriments et exclut les substances indésirables grâce à la membrane plasmique. Cette dernière assure le rôle d'une barrière à perméabilité sélective. Le mouvement des substances se produit avec ou sans énergie et contre des gradients de concentration ou de tension (pompes) ou en réponse à ceux-ci (canaux) (Figure V. 1). La principale pompe cellulaire implique le rejet des ions sodium hors du volume intracellulaire, et l'ingestion d'ions potassium. Ces flux ioniques génèrent une différence de potentiel de la membrane plasmique de l'ordre de 100 mV [310]. Si les membranes cellulaires biologiques sont soumises à des flux de courtes impulsions électriques (1-20 kV/cm, 1-20  $\mu$ s), elles peuvent transitoirement devenir perméables [311-313], voire induire des pores dans les membranes (électroporation) [313,314].

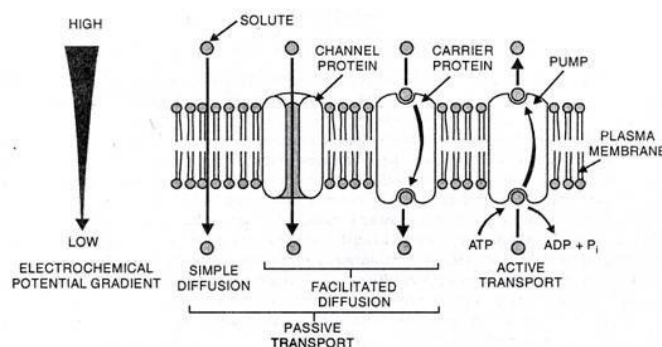


Figure V. 1 Représentation du transport actif et passif des solutés à travers la membrane plasmique [127].

### V. 2.2 Les cellules osseuses

L'implantation d'un biomatériau orthopédique dans le corps humain génère une réponse biologique locale de la matrice osseuse, elle-même gouvernée par l'action des ostéoblastes, des ostéoclastes et des macrophages.

#### V. 2.2.a Les cellules ostéoblastiques

Les ostéoblastes proviennent de cellules ostéoprogénitrices (ou préostéoblastes) suite à un mécanisme de régulation impliquant des facteurs de transcription [315]. Ils contribuent à la synthèse de la matrice osseuse organique et au contrôle de la minéralisation. Ce sont des cellules mononucléées de 20 à 50  $\mu$ m de diamètre. Lors de la phase de maturation, les ostéoblastes sécrètent différentes substances nécessaires à la minéralisation osseuse qui régulent leur fixation à la matrice osseuse [316].

La membrane cellulaire des ostéoblastes est riche d'une ectoenzyme : la phosphatase alcaline (Figure V. 2). Cette enzyme passe dans le sang et peut être dosée comme un index de la formation osseuse, puisqu'elle disparaît dès que les cellules sont piégées dans la matrice osseuse (ostéocytes ou cellules bordantes). Les ostéoblastes produisent de nombreux facteurs de croissance dont certains sont incorporés dans la matrice par adsorption à l'hydroxyapatite [316].

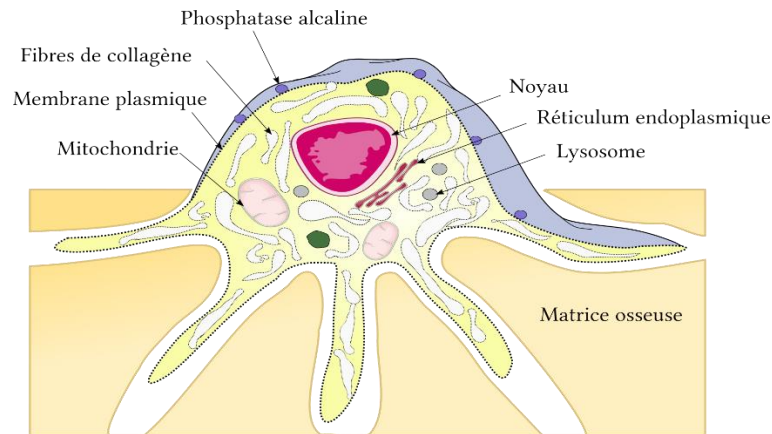


Figure V. 2 Structure d'un ostéoblaste localisé en surface de la matrice osseuse.

### V. 2.2.b La lignée monocytes-macrophages-ostéoclastes

Les ostéoclastes ont pour fonction principale de résorber la matrice osseuse. Pour ce faire, ils creusent des cavités peu profondes appelées "lacunes de Howship" (ou de résorption) par acidification de la matrice osseuse. Ils sont capables d'excréter des ions  $H^+$  grâce à des « pompes » spécifiques [316]. Le pH du microcompartiment peut atteindre des valeurs entre 4 et 5 [317,318]. Le cytoplasme des ostéoclastes est chargé de très nombreuses vacuoles, de vésicules et de lysosomes qui contiennent des enzymes qui participent également à la dissolution de la phase minérale de la matrice osseuse [316]. Les débris organiques et minéraux restants sont englobés par de petites vésicules et ingérés dans le corps des ostéoclastes [319].

Les macrophages sont les cellules responsables de trouver, d'engloutir et de détruire des agents pathogènes et les cellules apoptotiques. Ils sont produits par la différenciation des monocytes quand ils partent du sang. Les macrophages jouent également un rôle en alertant le système immunitaire suite à la présence des corps étrangers. Ainsi, ces cellules jouent un rôle central dans la protection de l'hôte [320]. Les macrophages activés ont une fonction phagocytaire qui comprend la libération d'enzymes protéolytiques qui dégradent les débris cellulaires, la matrice extracellulaire, les bactéries et toutes substances étrangères (Figure V. 3).

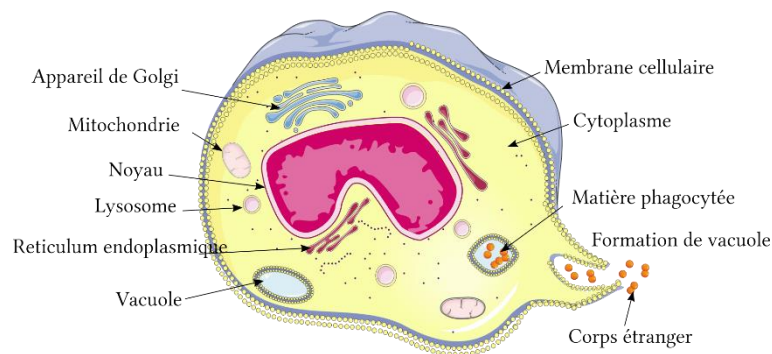


Figure V. 3 Structure d'un macrophage qui phagocyte un corps étranger.

Des cellules géantes multi-nucléées de corps étrangers se forment lorsque les monocytes et les macrophages fusionnent pour tenter d'engloutir des matières ou des débris d'une taille supérieure à 50-100  $\mu m$  de taille [54]. Les macrophages réagissent à tous les matériaux implantés, y compris les matériaux synthétiques comme les métaux, les céramiques et les ciments. Leur réaction est donc essentielle quand il faut évaluer le devenir d'un implant. Les macrophages peuvent être activés vers un phénotype

constructif pro-inflammatoire (de type M1) ou régulateur (de type M2). Lorsqu'ils sont activés, les macrophages pro-inflammatoires produisent des cytokines et des chimiokines, telles que IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ , et peuvent induire une réponse inflammatoire. Il a été démontré qu'un phénotype de type M2 est associé à l'atténuation de l'état pro-inflammatoire, au remodelage constructif et à l'immunorégulation [321,322].

### V. 2.3 Réponse de l'hôte face aux biomatériaux

Suite à l'insertion d'une prothèse dans le corps humain, des modifications chimiques et physiques ont lieu, entraînant des réactions biologiques des cellules avoisinantes. La première étape suivant l'implantation d'une prothèse est la réaction inflammatoire. Elle correspond à l'intense activité des cellules du système immunitaire, tels que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages [323–325]. La séquence des événements et le type de cellule prédominant varient en fonction de l'avancement de la lésion. Par conséquent, les réactions biologiques modifient l'interface matériau/milieu vivant.

La taille, la forme et les propriétés chimiques et physiques du biomatériau peuvent également être responsables des variations de l'intensité et de la durée du processus inflammatoire ou de cicatrisation [81]. Ainsi, l'intensité et/ou la durée de la réaction inflammatoire peuvent caractériser la biocompatibilité d'un biomatériau.

#### V. 2.3.a Réponse aux corps étrangers

Tandis que la blessure déclenche la réponse inflammatoire, les substances chimiques libérées par le plasma, les cellules et les tissus lésés agissent comme médiateurs de la réaction inflammatoire. Lorsqu'un matériau est implanté, il est reconnu comme corps étranger par des processus immunologiques et des macrophages adhèrent à la surface du matériau [326]. Les macrophages génèrent des espèces réactives de l'oxygène en réponse aux particules qui peuvent être phagocytées. Pour les objets de plus de quelques microns, les macrophages sont incapables de les englober et subissent une « phagocytose frustrée » [323,324]. Ils tentent ainsi de dégrader la surface du matériau, et ce qui conduit à la formation d'une capsule qui sépare l'implant du tissu qui l'entoure. Afin de former une capsule continue, les cellules phagocytaires fusionnent en cellules géantes multinucléées. Ces cellules se combinent aux composants de la matrice extracellulaire et aux fibroblastes pour former une capsule cellulaire [323,324], avec une épaisseur qui varie de quelques dizaines à quelques centaines de microns [327]. Une fois l'implant entouré avec succès, la capsule atteint généralement une phase de repos [323]. La phase de cicatrisation est caractérisée par trois étapes : inflammation, prolifération, et remodelage.

#### V. 2.3.b Toxicité des ions métalliques

Le terme "cytotoxicité" signifie causer des effets toxiques comme la mort, des altérations de la perméabilité de la membrane cellulaire et l'inhibition enzymatique au niveau cellulaire. Les effets systémiques des biomatériaux peuvent être dus à : **i)** une toxicité chimique directe, **ii)** l'accumulation de produits résultant de l'usure, de la corrosion ou de la dégradation, **iii)** des réactions inflammatoires excessives, y compris la production des divers radicaux oxygène ou **v)** aux réactions du système immunitaire.

Le principal mécanisme de corrosion des alliages métalliques dans les fluides corporels est la dissolution passive [328]. Différents phénomènes liés à la libération d'ions métalliques se produisent dans le corps humain, tels que le transport, le métabolisme, l'accumulation dans les organes, les allergies et les carcinomes [329]. Les ions causent des effets physiologiques néfastes tels que la toxicité, la cancérogénicité, la génotoxicité et l'allergie aux métaux (Figure V. 4) [52,53,330]. Dans le cas du CoCrMo, les éléments d'alliage chrome et cobalt génèrent un risque élevé de cancérogénicité. Une attention particulière a d'ailleurs été accordée à la libération des ions chrome en raison du danger potentiel de l'état de valence du Cr(VI) [331], connu pour être cancérogène, cytotoxique et génotoxique [332]. La toxicité du Cr(VI) serait due à sa réduction intracellulaire en Cr(III) et à la génération d'ions Cr(IV) et Cr(V) instables et d'espèces réactives de l'oxygène (hydroxyle, oxygène singlet, anion superoxyde) [289]. En effet, la formation du Cr(VI) dans le corps humain est peu probable car le diagramme de Pourbaix pour le chrome dans l'eau à 25 °C suggère que le chrome VI toxique n'est libéré qu'à pH > 7 et à fort potentiel d'électrode. L'espèce produite dans des conditions acides est le Cr<sup>3+</sup>, qui a une corrélation beaucoup plus faible avec les problèmes toxicologiques [333,334]. Catelas et al. ont testé l'effet des ions Co<sup>2+</sup> et le Cr<sup>3+</sup> sur des cellules macrophages, en fonction de la dose et du temps. La mort cellulaire maximale avec le Co<sup>2+</sup> se produit à une concentration plus faible que pour le Cr<sup>3+</sup> [234]. Caicedo et al. ont montré que tous les ions métalliques testés (Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup> et Mo<sup>5+</sup>) produits à partir de sels solubles de CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub> et MoCl<sub>5</sub> peuvent induire des réponses pro-inflammatoires des macrophages humains par des complexes multiprotéines inflammatoires d'une manière dépendant de leur concentration [246]. Akbar et al. ont étudié les effets du Co<sup>2+</sup> et du Cr<sup>6+</sup> exposés aux lymphocytes humains et ont constaté que les cellules étaient plus sensibles au Co<sup>2+</sup>. Avec des doses plus élevées, la prolifération cellulaire et la libération de cytokines ont diminué et l'apoptose a augmenté.

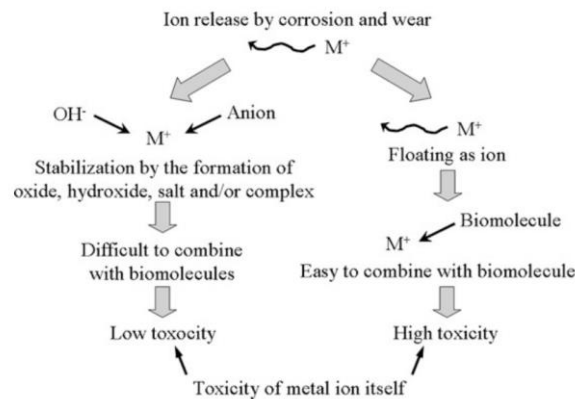


Figure V. 4 Réaction des ions métalliques libérés dans le fluide corporel et leur toxicité [9].

La plupart des protéines sont chargées négativement, tandis que le cobalt et le chrome sont des ions chargés positivement. Une fois qu'un métal est lié à une protéine, il peut être transporté et stocké ou excrété (Figure V. 4). L'accumulation de chrome dans les tissus et les globules rouges [48] est très préoccupante car elle cause des effets physiologiques néfastes tels que l'ostéolyse [293]. Des taux élevés peuvent également causer la fibrose, la granulomatose, la résorption osseuse, la nécrose de l'os et le relâchement de l'implant [291,335]. Les ions métalliques engendrent la mort apoptotique ou nécrotique des cellules en fonction de leurs concentrations [292], du temps [336], du type de cellule [337] et du type d'ion métallique. Généralement, une faible dose d'ions métalliques entraîne la mort apoptotique, des doses plus élevées induisent une nécrose [292,338].

Les macrophages peuvent également générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en réponse aux particules qui peuvent être phagocytées [44]. Par exemple, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est issu de la dismutation intracellulaire d'O<sup>2-</sup>. La surface des alliages métalliques est hyperoxydée par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui peut induire la

libération d'ions métalliques [156] et d'ions OH<sup>-</sup>. En d'autres termes, lorsqu'un implant métallique est implanté dans le corps et que les macrophages accumulent de l'oxygène actif, l'implant métallique tend à se dissoudre durant la réaction inflammatoire.

#### V. 2.4 Potentiel/courant induit à la surface de l'implant métallique

##### V. 2.4.a Stimulation électrochimique de l'activité cellulaire

La stimulation électrochimique concerne les processus électrochimiques induisant des effets diélectriques, électrophorétiques, électrolytiques et interactifs pile/électrode [339]. L'électroporation et l'électrofusion des cellules sont des exemples bien étudiés de l'effet diélectrique, dans lequel une impulsion de stimulation à haute tension entraîne la rupture diélectrique de la membrane et la formation de pores ou la fusion des membranes cellulaires [313,340,341]. L'effet électrophorétique, fait référence à la migration de cellules dans une solution le long d'un gradient de potentiel entre deux électrodes.

La variation du potentiel de corrosion peut affecter de manière significative le comportement cellulaire et la biocompatibilité [247,288,296,297]. Généralement, le comportement cellulaire modifié par des électrodes métalliques polarisées inclut des changements dans la morphologie cellulaire [342], la prolifération [343], l'adhésion [344], le transport membranaire [345], l'organisation cytosquelettique [346,347], l'activité mitochondriale [348] et la production de protéines [339]. La polarisation électrochimique d'une surface métallique modifie également les propriétés et les réactions de surface du biomatériau [132,349], qui peuvent influencer l'adsorption, la structure et la stabilité des protéines [350]. Il en résulte des changements dans la matrice extracellulaire et au niveau des points d'adhérences. L'adhésion des ostéoblastes à la surface des biomatériaux étant une condition préalable à une ostéo-intégration réussie de l'implant *in vivo*, il est donc judicieux de comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions entre la surface du biomatériau métallique et les cellules.

D'autre part, des effets électrochimiques surviennent en raison des réactions d'oxydoréduction des composants électroactifs de la solution à la surface de l'électrode ou des composants de la cellule. Des réactions électrochimiques irréversibles de substances physiologiquement importantes sur la membrane cellulaire ou la formation électrochimique d'espèces actives telles que les ROS dans l'environnement de culture cellulaire peuvent entraîner la mort cellulaire (effet électrolytique) [351]. Il a été démontré que le stress oxydatif et la génération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la cellule dépolymérisent l'actine [347] et modifient l'adhésion cellulaire [344]. Les environnements hautement oxydants, où le peroxyde d'hydrogène est présent, comme ce peut être le cas dans les sites fortement inflammatoires de l'organisme, peuvent entraîner des potentiels plus positifs [352]. Le rôle des variations du potentiel sur la viabilité cellulaire a rarement été étudié [247,296,353].

De plus, les surfaces polarisées peuvent perturber l'homéostasie d'oxydoréduction cellulaire, qui est régulée par des voies de signalisation intracellulaire et intercellulaire déterminant l'état redox d'une cellule. Les mouvements ioniques régulés à travers la membrane cellulaire sont essentiels à la survie des cellules, et les surfaces polarisées peuvent perturber l'équilibre ionique et l'état redox d'une cellule [310].

##### V. 2.4.b Stimulation électrochimique de la matrice osseuse

Lorsque l'os est soumis à une contrainte mécanique, il se produit une réponse en termes de signaux électriques [304,306] qui est impliquée dans le maintien de la matrice osseuse. Des recherches



approfondies ont été menées sur l'application de la stimulation électrique faradique, à la fois à courant constant [303–306] et à potentiel constant [299–301], pour favoriser la croissance osseuse à la cathode, *in vivo*. Les réactifs consommés (oxygène) et les produits créés (ions hydroxyle) par les réactions électrochimiques dans le microenvironnement de la cathode seraient responsables de ce résultat ostéogénique [301,354]. Les résultats sont concordants avec les connaissances actuelles selon lesquelles la croissance osseuse est favorisée dans des conditions de tension d'oxygène réduite [355] et de pH élevé [356]. La vitesse et le type de ces réactions électrochimiques, déterminés respectivement par le courant et le potentiel, régissent la croissance osseuse [299]. Baranowski et al. ont estimé que pour obtenir une stimulation osseuse optimale, un potentiel constant est plus essentiel qu'un courant constant [299]. Un dispositif breveté en 1995 [357] maintient précisément le stimulus faradique optimal.

Plus récemment, des méthodes de culture cellulaire *in vitro* ont été utilisées pour examiner divers aspects liés à la stimulation électrique de la croissance osseuse. Wang [302] a examiné les effets d'un courant constant (100  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) délivré par deux électrodes en fil de platine suspendues dans le milieu de culture au-dessus de cellules de type ostéoblaste cultivées sur des boîtes de Pétri. Ces études se sont concentrées sur les altérations électrochimiques des milieux de culture plutôt que sur l'interface entre les cellules cultivées directement sur la cathode. Les résultats ont montré que la stimulation électrique augmentait la prolifération cellulaire, la calcification, la résistance et le pH du milieu de culture.

Les champs électriques statiques faibles sont également connus pour provoquer le mouvement et la migration de divers types de cellules, y compris des cellules osseuses, *in vivo* et *in vitro*. Les revêtements qui modifient la charge ou la disposition spatiale des charges d'une surface d'implant sont connus pour améliorer l'adhérence et induire l'orientation et la prolifération cellulaire [358].

#### V. 2.5 Méthodes de suivi *in vitro* de l'activité cellulaire exposé aux ions métalliques

En raison des préoccupations médicales croissantes concernant les ions métalliques libérés par les implants métalliques, des études ont été menées pour élucider le problème de rejet des prothèses. Les conditions *in vivo* sont simulées en exposant différents types de cellules à des concentrations variées d'ions métalliques.

##### V. 2.5.a La culture des cellules

Les méthodes *in vitro* constituent un complément nécessaire et utile aux études *in vivo* pour tester des biomatériaux. Les tests *in vitro* minimisent l'utilisation d'animaux et évaluent la cytotoxicité du matériau. Les lignées cellulaires sont utilisées pour les techniques *in vitro*, de par leur sensibilité relative et le temps nécessaire à la réalisation de l'essai. En général, les méthodes de culture cellulaire *in vitro* ont montré de bonnes corrélations avec les essais sur les animaux même si les lignées cellulaires engendrent une variabilité dans les réponses biologiques.

La fonction la plus importante des tests de biocompatibilité est d'exclure les matières qui exercent des effets toxiques ou nocifs sur les systèmes biologiques, c'est-à-dire les matières qui libèrent en quantités suffisantes des substances qui affectent les fonctions biochimiques cellulaires. Le spectre des changements induits va de la mort cellulaire aux altérations de l'adhésion, de la prolifération et de l'activité biosynthétique des cellules [359].

#### V. 2.5.b Les méthodes de production d'ions métalliques

Les systèmes d'essai *in vitro* peuvent impliquer un contact direct des cellules avec des biomatériaux ou l'utilisation de composés solubles, comme des sels métalliques (CoCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, MoCl<sub>5</sub> et NiCl<sub>2</sub>) [52,246,307,309,360–362]. Ces sels permettent de contrôler précisément la concentration souhaitée d'ions métalliques. D'autres systèmes peuvent être envisagés pour éviter une concentration élevée d'ions chlorure dans le milieu en ayant recours, par exemple, à la polarisation électrochimique des biomatériaux métalliques ensemencés de cellules. Cette technique permet de produire uniquement des ions métalliques dans le milieu.

#### V. 2.6 Synthèse bibliographique

Les implants métalliques et les prothèses utilisées dans le corps humain peuvent se dégrader par corrosion, raccourcissant leur durée de vie et limitant ainsi la qualité de vie des patients. La dégradation entraîne la libération d'ions métalliques dans les fluides corporels. La concentration des ions métalliques libérés semble varier selon le type d'implant, la technique analytique de mesure, le temps de suivi des patients, le type de fluide/tissu analysé, etc. Cependant, dans toutes les études *in vivo*, la conclusion générale est que la présence d'ions métalliques dans l'organisme entraîne des réponses biologiques de nature cancérogène, allergisante, toxique pour les tissus locaux, inflammable et génotoxique.

Les méthodes permettant d'identifier ou de prédire l'origine et la quantité d'ions métalliques libérés *in vivo* dans le corps humain sont d'un grand intérêt afin de discuter de la sécurité et de la biocompatibilité des matériaux implantables. A cette fin, le test *in vitro* est un bon outil pour établir des références.

### V. 3 INTERFACE COCRM/CELLULES A L'ETAT D'EQUILIBRE

La culture de cellules sur un matériau est variable et dépend de nombreux facteurs externes difficiles à maîtriser. Le chapitre précédent a démontré que le CoCrMo immergé en milieu RPMI-1640 subissait une dissolution préférentielle des oxydes de cobalt et un enrichissement en chrome. D'un point de vue expérimental, un délai d'incubation doit être respecté (entre trois à sept jours) pour obtenir un taux de recouvrement total des cellules sur le matériau d'étude. Cette durée est fonction du type de cellules et des conditions de culture (type et volume du milieu, température, nombre de passage). De ce fait, il est intéressant de comprendre quelle est l'influence des ions relargués sur le métabolisme cellulaire et comment le film passif évolue à leur contact durant le délai d'incubation.

#### V. 3.1 Propriétés électrochimiques de l'interface CoCrMo/cellules en immersion longue

##### V. 3.1.a Evolution du potentiel E<sub>OCP</sub>

L'alliage de CoCrMo a été immergé dans le milieu biologique de culture RPMI-1640 durant 2 à 5 jours, avec et sans cellules (ostéoblastes et macrophages) afin d'établir l'évolution du film passif, et notamment ses propriétés protectrices à « long terme ». Pour cela, le potentiel E<sub>OCP</sub> a été relevé, ponctués par des mesures de SIE après 3, 6 et toutes les 24 heures (Figure V. 5).

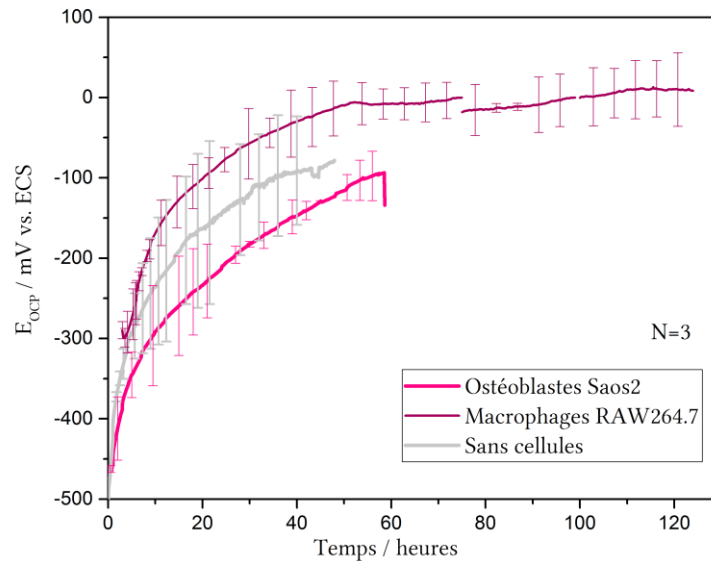


Figure V. 5 Evolution du potentiel  $E_{OCP}$  du CoCrMo en milieu RPMI-1640 supplémenté avec ensemencement d'ostéoblastes Saos2 ou de macrophages RAW264.7 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Les barres d'erreur correspondent aux écarts entre les valeurs minimales et maximales de trois essais identiques.

En absence de cellules, la valeur d' $E_{OCP}$  du CoCrMo augmente rapidement de -450 mV/ECS jusqu'à atteindre une pseudo-phase de stabilisation à partir de 48 heures. L'augmentation de la valeur d' $E_{OCP}$  en fonction du temps dans le RPMI-1640 indique la formation et la croissance de films protecteurs stables à la surface du CoCrMo. Le chapitre précédent a montré qu'un mince film d'oxydes de chrome se forme spontanément à la surface du CoCrMo une fois exposé au RPMI-1640 et qui continue de croître pendant le processus d'immersion. L' $E_{OCP}$  atteint une valeur stable lorsque la vitesse de croissance et de dissolution du film d'oxyde et l'adsorption des composés organiques ont approché le quasi-équilibre.

En présence de cellules, l' $E_{OCP}$  du CoCrMo évolue similairement atteignant un plateau à partir de 48 h autour de 0 mV/ECS. En présence de macrophages RAW264.7 et d'ostéoblastes Saos2, les variations ne sont pas significatives. Les barres d'erreurs peuvent résulter de dissimilitudes dans le nombre de cellules, de leur répartition sur le CoCrMo et de leur vitesse de croissance. D'autres essais doivent être poursuivis pour déterminer si les cellules modifient le potentiel d'équilibre du CoCrMo par d'autres réactions électrochimique liées à leurs métabolismes.

### V. 3.1.b Mesure de SIE à l' $E_{OCP}$

L'évolution des propriétés du film passif du CoCrMo en présence de cellules a été suivie par des mesures de SIE. Les conditions expérimentales ne varient pas de celles réalisées dans les chapitres précédents (RPMI-1640 supplémenté, incubateur). En présence de cellules, les mesures SIE débutent 3 heures après l'ensemencement sur l'échantillon métallique. Les représentations de Bode et de Nyquist et les résultats de la modélisation des données d'impédance sont présentées à la Figure V. 6.

Dans des études similaires, le circuit électrique équivalent (CEE) généralement proposé prend en compte les contributions d'impédance de la couche cellulaire et de la couche d'oxyde [103,201,363]. Plus précisément, la couche de cellules et la couche d'oxyde ont été modélisées chacune comme une combinaison parallèle d'une résistance et d'un condensateur. Ces deux unités RC ont été placées en série pour modéliser l'interface. Kyle et al. [364] ont même discerné deux composantes pour les cellules : une résistance intracellulaire, et extracellulaire. Malgré les tentatives de modélisation avec un CEE à deux

constantes de temps, la principale contribution de l'interface semble davantage relever d'une seule constante de temps qui contrôle le processus électrochimique se produisant au niveau du film passif, les protéines adsorbées, et les cellules sur le CoCrMo. Ainsi, les surfacesensemencées et nonensemencées ont été modélisées par le même CEE que celui mentionné dans les chapitres précédents. L'écart se situe dans les valeurs des paramètres du circuit plutôt que dans le modèle lui-même. La résistance de transfert de charge  $R_2$  et le CPE ( $\alpha$  et  $Q$ ) représentent respectivement la résistance de transfert de charge et la capacité de la double couche, du film passif de l'alliage et des cellules. La constante  $Q$  a été convertie en capacité effective  $C_{\text{eff}}$ , pour pouvoir associer un changement de capacité à des modifications possibles de l'interface. La capacité effective est directement liée à la constante diélectrique du film passif et des cellules et inversement liée à l'épaisseur globale par la relation présentée au chapitre précédent.

En présence des cellules, la résistance d'électrolyte  $R_e$  augmente (15 ou 87  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  selon les cellules) contrairement au test réalisé en l'absence de cellules, où elle diminue (9,2 à 7,7  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). García-Alonso et al. [201] ont également relevé que la  $R_e$  augmente après 7 jours de culture en présence d'ostéoblastes sur le titane alors qu'elle diminuait en absence de cellules. Etant donné que la résistance de l'électrolyte est majoritairement régie par la nature et la quantité d'ions présents dans la solution, des variations dans la concentration ionique ont vraisemblablement lieu au cours du temps. Les cellules échangent avec le milieu des ions par des pompes dont la principale est  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Elle expulse activement trois ions  $\text{Na}^+$  vers le milieu extracellulaire et importe deux ions  $\text{K}^+$  vers l'intérieur avec une vitesse de transport d'environ  $10^2$ - $10^3$  ions/seconde. Du fait de la multitude de flux ioniques existants, il reste difficile de déterminer avec exactitude les variations de concentrations ioniques à l'origine de la diminution de la conductivité de la solution. Toutefois, ces résultats montrent une nette distinction d'évolution de  $R_e$  en présence ou en absence de cellules.

Le processus de prolifération qui se produit sur le CoCrMo implique également que les cellules soient continuellement reliées les unes aux autres par des protéines adhésives couvrant la surface. Il est possible que l'aire de surface couverte par les cellules puisse limiter la diffusion des ions et des molécules entre le milieu proche de la surface du matériau et le milieu. D'autres travaux sont nécessaires pour élucider de quelle manière la résistance de l'électrolyte est affecté par les cellules.

La réponse électrochimique du CoCrMo en présence d'ostéoblastes et de macrophages a révélé une légère augmentation de l'angle de phase (de  $78^\circ$  à  $85^\circ$  ou de  $65^\circ$  à  $80^\circ$ ) dans le diagramme de Bode à la fréquence la plus basse. La hausse est plus significative en absence de cellules (de  $52^\circ$  à  $80^\circ$ ). Cette réponse est liée à l'adhésion des cellules sur la surface, qui forment une matrice extracellulaire dense.

L'augmentation de la résistance de transfert de charge  $R_2$  avec le temps d'exposition suggère, dans le cas du CoCrMo sans cellules, la formation d'un film passif de plus en plus protecteur. En présence des deux types de cellules, la résistance de transfert de charge augmente significativement : elle est de l'ordre de 7,8 et 11,2  $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  respectivement avec les ostéoblastes et les macrophages, par rapport à 3,4  $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$  sans cellules. Ceci suggère que la couche de cellules agit comme une barrière entre l'électrolyte et la surface CoCrMo. L'augmentation de la résistance peut être attribuée à la présence des cellules et, surtout, à la matrice extracellulaire sécrétée par les cellules. De plus, le taux de recouvrement des cellules peut également être associé à une diminution de la capacité. Etant donné que les macrophages ont une croissance plus rapide que les ostéoblastes (section III. 3.3), ceci peut expliquer qu'ils confèrent un caractère plus protecteur de l'interface.

Les résultats d'impédance sont en accord avec les études qui se sont focalisées sur les mesures d'impédance au potentiel à circuit ouvert d'une surface métallique avec des cellules osseuses. Huang et al. ont montré que l'impédance électrochimique d'un substrat de titane avec une couche de  $\text{TiO}_2$  à l'OCP augmentait avec le degré de propagation de cellules ostéoblastes (U-2OS) durant 24 heures [365]. Ils ont

montré que l'augmentation de la résistance de polarisation à 2, 24 et 72 heures était successivement liée aux processus cellulaires d'adhésion, de propagation et de prolifération [366]. Hiromoto a rapporté les propriétés électrochimiques du titane à l'OCP pendant sept jours d'incubation dans différents milieux (milieu essentiel minimum (MEM) avec et sans FBS, et avec les cellules fibroblastes L929) [367,368]. Pour chaque solution, des changements ont été notés sur le potentiel libre de corrosion, les courbes de polarisation et l'impédance électrochimique. Mustafa [369] et Pan [308,370] ont étudié l'impédance électrochimique des surfaces de titane prétraitées maintenues à l'OCP et cultivées avec des ostéoblastes pendant 28 jours. Après ce délai, les cellules ont été retirées pour conserver uniquement leurs nodules minéralisés à la

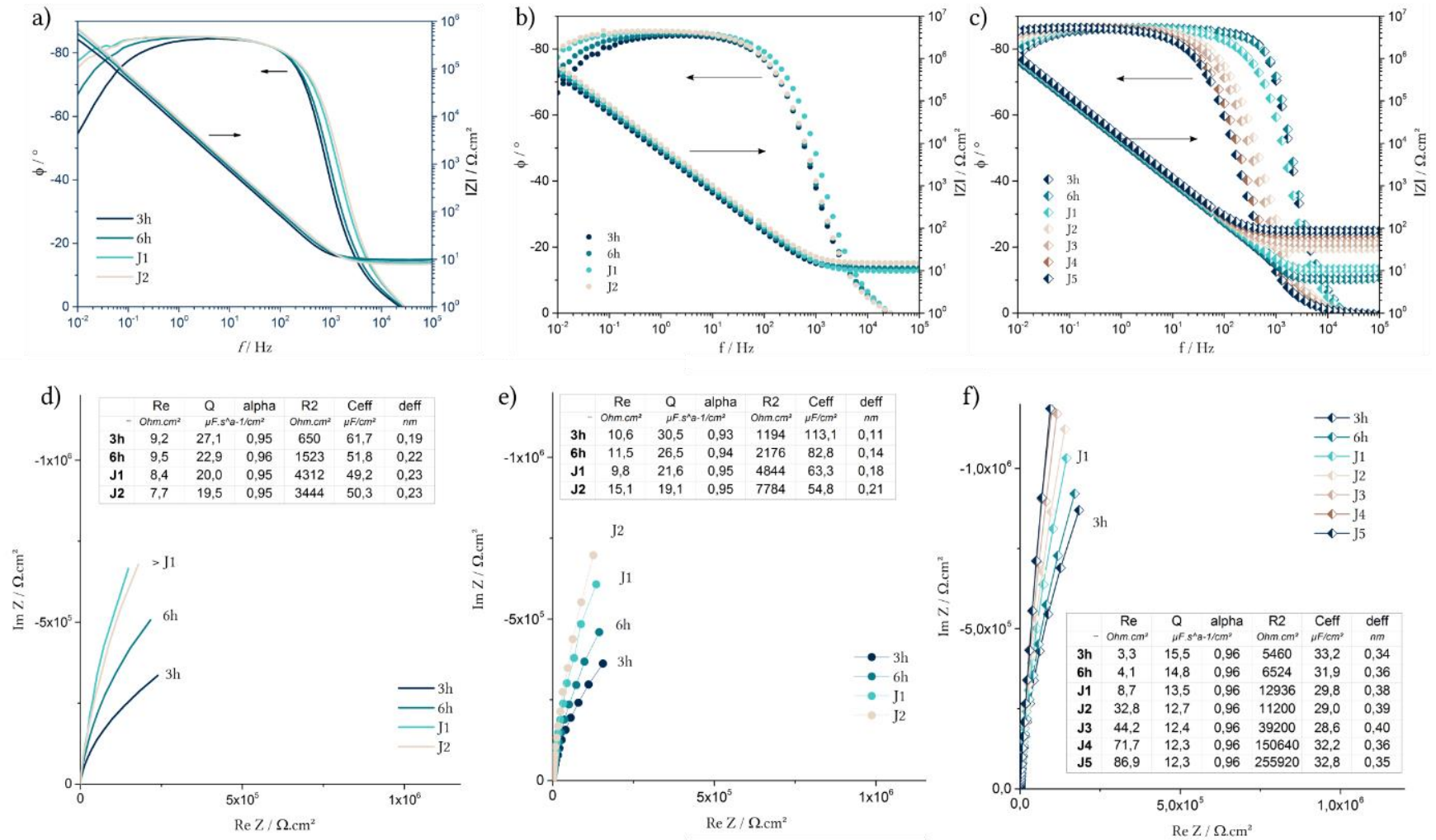


Figure V. 6 Spectres d'impédance du CoCrMo immergé dans le RPMI-1640 supplémenté réalisé pendant le suivi du potentiel  $E_{OCP}$  à 3, 6, 24, 48, 72, 96 et 120 heures en absence (a,d) et en présence de cellules ostéoblastiques Saos 2 (b,e) et macrophagiques RAW 264.7 (c,f) (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

surface de l'oxyde de titane. Les produits de la minéralisation étaient incorporés à l'oxyde et augmentaient l'impédance électrochimique de l'interface. Par ailleurs, un CEE a également été choisi en prenant compte de l'adsorption des acides aminés et des protéines sériques et de l'adhésion cellulaire. Ce modèle est similaire à celui proposé par Huang [365] en termes de placement des éléments de circuit, mais Hiromoto [367,368] a inclus un coefficient de Warburg pour tenir compte de la diffusion limitée des biomolécules en présence des cellules.

En résumé, l'adsorption des protéines du milieu de culture, suivie de l'adhésion et de la croissance des ostéoblastes et macrophages sur l'alliage CoCrMo, conduit à des surfaces avec différents degrés de couverture, et donc avec différentes réponses dans les diagrammes d'impédance avec le temps d'exposition. Dans cette étude, la couche cellulaire semble agir comme une barrière entre l'électrolyte et la surface du CoCrMo, par le biais de la matrice extracellulaire sécrétée. Les macrophages confèrent un caractère plus protecteur que les ostéoblastes. Ces variations entre les cellules peuvent provenir de leur vitesse de croissance intrinsèque et/ou de leur mécanisme d'adhésion.

### V. 3.2 Analyses de biocompatibilité des ostéoblastes et macrophages

#### V. 3.2.a Effet de l'exposition du CoCrMo sur la viabilité et la prolifération des ostéoblastes et des macrophages

Afin d'étudier les effets des ions relargués par le CoCrMo sur les cellules ostéoblastes Saos2 et macrophages RAW264.7, une analyse de cytotoxicité et de prolifération a été menée pendant 3 jours. Pour cela, les cellules sont cultivées sur des disques de CoCrMo, disposés au milieu d'une boîte de pétri, et placés dans un incubateur durant la durée de l'essai. Les milieux de culture, où se développent les cellules, ont été prélevés toutes les 24 heures et analysés par le test MTT et LDH afin de vérifier la viabilité, la prolifération, et la cytotoxicité cellulaire. Les valeurs d'absorbance sont converties sur l'histogramme comme indiqué à la Figure V. 7. Chaque donnée est comparée à la viabilité cellulaire dans le milieu de culture sans CoCrMo (contrôle).

Les graphiques indiquent une diminution de la viabilité des cellules ostéoblastes Saos2 et macrophages RAW264.7 en trois jours (Figure V. 7a). Cette réduction de la survie cellulaire peut être due à la dissolution des couches d'oxyde de surface (Cf Chapitre IV) et à la libération d'ions dans le milieu de culture pendant l'immersion [371]. La dissolution des ions cobalt, chrome et molybdène [372,373] dans le milieu, affecte les organites cellulaires et leur fonction. Il a été démontré que les ions cobalt entraînent une diminution proportionnelle au temps de la viabilité et de la prolifération des macrophages [52,374]. Notons cependant que les taux de viabilité des ostéoblastes sont supérieurs à 100%. Ceci suggère que le CoCrMo stimule d'abord la viabilité/prolifération cellulaire avant que la dissolution des ions métalliques intervienne sur le métabolisme cellulaire (diminution des taux de viabilité). D'autres travaux seraient nécessaires pour expliquer quels types de mécanismes sont impliqués dans la « stimulation » (rugosité, charges électriques, ...).

Il est envisageable qu'au-delà de 3 jours, le taux de viabilité se stabilise comme cela a été remarqué dans le cas d'ostéoblastes au contact d'un alliage de titane [363]. Ceci pourrait être dû à l'accumulation de sels provenant du milieu de culture sur la surface des échantillons, ce qui entraînerait une réduction d'ions relargués dans le milieu.

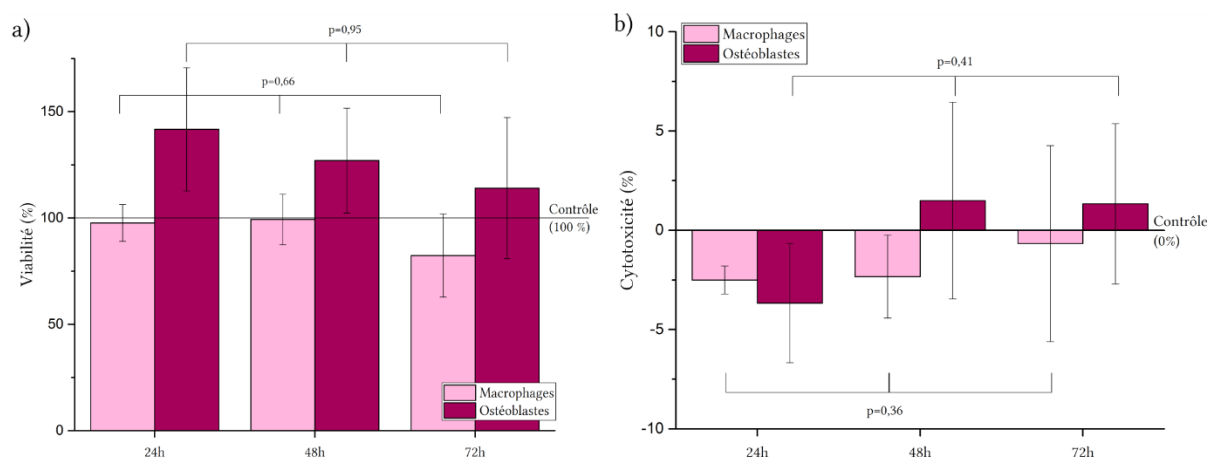


Figure V. 7 Viabilité cellulaire par dosage MTT (a) et LDH (b) des macrophages RAW 264.7 et des ostéoblastes hFOB 1.19 sur l'alliage CoCrMo en milieu RPMI-1640 pendant 24, 48 et 72 heures. Le contrôle correspond à des cellules ensemencées dans des boîtes de pétri. Les données ont été analysées par ANOVA :  $p = 0,66$  et  $0,95$  pour la viabilité des macrophages et des ostéoblastes respectivement par comparaison des trois temps ;  $p = 0,36$  et  $0,41$  pour la cytotoxicité des macrophages et des ostéoblastes respectivement par comparaison des trois temps.

La cytotoxicité induite par le CoCrMo augmente jusqu'à 72 heures mais avec des taux inférieurs à 5%. Les pourcentages négatifs de la cytotoxicité proviennent de valeurs d'absorbances inférieures à celle de l'échantillon contrôle. Ainsi, la dissolution de CoCrMo sous forme d'ions (oxydes de cobalt) dans le milieu n'induit pas de quantités élevées de LDH, c'est à dire de toxicité sur les macrophages et les ostéoblastes après 48 h d'exposition. Comme pour le test de viabilité, on confirme l'absence de toxicité de l'alliage dans ces conditions biologiques.

En général, la quantité de LDH induite par le CoCrMo pour les macrophages était inférieure à celle des ostéoblastes. Cette sensibilité entre cellules a également été mentionnée par Dalal et al. dans le cas d'exposition aux particules de CoCrMo [375]. Etant donné que la quantité de LDH libérée pour les deux types de cellules était proche de la limite de détection, il est probable que les différences observées ne soient pas significatives. La libération de LDH en tant que mesure de la cytotoxicité basée sur la stabilité de la membrane n'est pas une mesure aussi sensible des interactions entre les cellules et les particules que les essais de viabilité et de prolifération.

### V. 3.2.b Effet de l'exposition du CoCrMo sur les fonctions de minéralisation des ostéoblastes

Il est bien établi que les cellules de la lignée ostéoblastique jouent un rôle important dans le contrôle du remodelage osseux autour des implants orthopédiques. Dans certains cas, la matrice osseuse peut se dégrader considérablement ce qui entraîne une perte de contact et une indisponibilité à garder la prothèse articulaire. La minéralisation de la matrice osseuse est un processus biologique directement affecté par les biomatériaux métalliques, qui nécessite d'être étudié.

Par conséquent, l'effet des ions métalliques issus de la dissolution du CoCrMo a été évalué sur les fonctions de minéralisation des ostéoblastes hFOB 1.19 durant 14 jours. Pour ce faire, les ostéoblastes hFOB 1.19 ont été stimulés par un agent différenciateur hormonal pour devenir des ostéoblastes matures capables de synthétiser la matrice extracellulaire : ils deviennent ostéogéniques *in vitro* [3]. La différenciation ostéoblastique se caractérise par une succession de phases au cours desquelles, des gènes associés à la production de matrice extracellulaire (MEC) (phosphatase alcaline, collagène de type 1,



fibronectine, ostéopontine) sont produits. Ainsi, la mesure de la fonction de minéralisation des ostéoblastes peut être évaluée en mesurant le taux de phosphatase alcaline et en colorant les dépôts calciques de la MEC.

#### Coloration des dépôts calciques au rouge d'alizarine

La capacité de minéralisation de la matrice osseuse des ostéoblastes hFOB1.19 au contact de disques d'alliage de CoCrMo a été étudiée en stimulant les cellules par de l'acide ascorbique et du  $\beta$ -glycérophosphate. Les ostéoblastes représentant le contrôle n'ont pas été stimulés et sont donc à l'état de pré-ostéoblastes. La Figure V. 8a présente les valeurs d'absorbance lorsque les cellules sont stimulées en présence ou en absence du CoCrMo : c'est-à-dire ensemencement sur les boîtes de pétri classique ou sur les disques de CoCrMo placés au centre des boîtes de pétri.

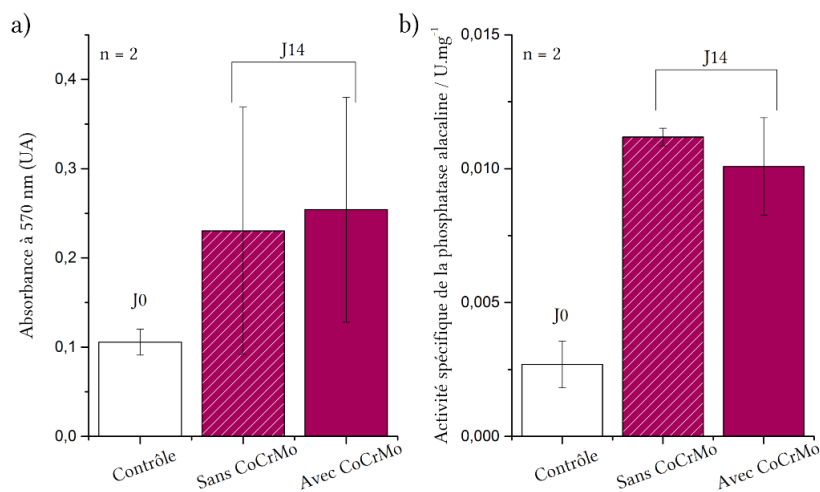


Figure V. 8 Capacité de minéralisation des ostéoblastes hFOB 1.19 en présence de l'alliage CoCrMo après 14 jours de stimulation par : a) coloration des dépôts calciques de la matrice extracellulaire au rouge d'alizarine et b) mesure de l'activité enzymatique spécifique de la TNAP. Le contrôle correspond à des pré-ostéoblastes, non stimulés.

L'absorbance augmente après 14 jours de traitement, ce qui indique que les ostéoblastes hFOB1.19 produisent de la matrice extracellulaire minéralisée. L'activité semble indépendante de la nature du support : l'absorbance est quasi identique avec ou sans l'alliage de CoCrMo (0,37 et 0,38). Notons tout de même que ces résultats n'ont été réalisés que deux fois et qu'ils méritent d'être poursuivis pour établir un lien direct entre les capacités de minéralisation des ostéoblastes hFOB1.19 et les ions relargués par le CoCrMo.

#### Activité de la phosphatase alcaline (ALP)

L'activité de l'ALP a également été mesurée durant les 14 jours de stimulation des ostéoblastes hFOB 1.19. Elle a été normalisée en fonction de la teneur en protéines et le rapport ALP/protéines a ensuite été exprimé en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  ou  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Le contrôle représente des pré-ostéoblastes, c'est-à-dire non stimulés.

La Figure V. 8b montre que l'activité spécifique de l'ALP était supérieure après 14 jours de culture ce qui confirme une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'orientation vers le linéage

ostéoblastique et par conséquent, les ostéoblastes matures hFOB 1.19 minéralisent la matrice extracellulaire. Généralement, les ostéoblastes entrent dans une phase active de synthèse de la matrice organique à partir de 7 jours, confirmant les taux élevés de phosphatase alcaline [316]. Runa et al. ont observé une évolution similaire sur le CoCrMo [376]. Les valeurs similaires en présence et en absence de CoCrMo ( $0,010 \text{ U.mg}^{-1}$  et  $0,011 \text{ U.mg}^{-1}$ ) suggèrent que les ions dissous en solution n'affectent pas la capacité de minéralisation des ostéoblastes hFOB 1.19.

### V. 3.3 Discussion

Les résultats ont montré que les cellules ont modifié les propriétés de corrosion du CoCrMo (augmentation de l' $E_{\text{OCP}}$  et de la résistance de transfert de charge  $R_2$ ). L'alliage métallique a tendance à former des oxydes stables aux propriétés protectrices. Pourtant, dès le contact avec le milieu de culture, le CoCrMo est également sujet à une dissolution des oxydes de cobalt de surface (chapitre précédent), ce qui entraîne une libération d'ions métalliques dans le milieu. Toutefois, les résultats de viabilité et de toxicité montrent que les cellules n'ont pas été significativement affectées par l'alliage ou les produits de corrosion libérés en 3 jours. La libération d'ions métalliques de l'alliage CoCrMo est relativement faible et non cytotoxique.

Plus important encore, les résultats suggèrent que le type cellulaire influence le comportement du film passif. La résistance de l'interface  $R_2$  était significativement supérieure avec les macrophages par rapport aux ostéoblastes (Figure V. 6), ce qui signifie que le film passif et/ou la couche cellulaire ont un caractère plus protecteur. L'augmentation de la résistance peut être attribuée à la présence de la matrice extracellulaire sécrétée par les cellules et au taux de prolifération cellulaire. Le fait que les macrophages aient tendance à proliférer plus rapidement que les ostéoblastes implique une plus grande surface couverte par les macrophages que les ostéoblastes.

De précédents travaux prouvent également que les cellules jouent un rôle important dans la corrosion des alliages *in vivo* en libérant des composés chimiques, en déposant des protéines, en modifiant le pH local et en limitant la diffusion d'oxygène [296,377–380]. Par exemple, il a été montré que sur une période de 9 jours, en présence d'ostéoblastes, que le taux de biodégradation des alliages avait augmenté et que des éléments tels que le Ti, V, Cr et Co étaient absorbés par les cellules.

Par ailleurs, des études *in vitro* [377,378,381] ont suggéré que les macrophages ont le potentiel d'améliorer les oxydes métalliques de surface, ce qui peut réduire la corrosion des alliages et la libération d'ions métalliques. Ces cellules libèrent notamment de l'oxyde nitrique (NO) et d'autres espèces chimiques réactives pour aider à diriger les événements de cicatrisation de la plaie pendant les 2 premiers jours suivant l'intervention. Ces espèces peuvent oxyder davantage les surfaces des alliages métalliques [377,378,381]. L'amélioration des oxydes de surface par les macrophages est concordante avec les données de cette étude. Par conséquent, les changements dans les oxydes de surface des alliages par les cellules macrophages et leurs composés chimiques libérés influencent la corrosion des alliages, ce qui peut finalement être important dans le développement des réponses *in vivo* des hôtes. Différents types de cellules peuvent moduler les profils de libération des ions métalliques et les réponses tissulaires de l'hôte, étant donné que même des niveaux sous-cytotoxiques d'ions métalliques peuvent affecter les fonctions cellulaires [55,180]. De futurs travaux d'immersions longues sont à prévoir pour discerner si les cellules modifient leur métabolisme en fonction de la dose d'ions métalliques présente dans le milieu.

La phosphatase alcaline, en tant que marqueur phénotypique de différenciation des ostéoblastes, est non seulement un paramètre sensible, mais aussi très variable dans les cultures sur différents biomatériaux [382–384]. Bien qu'une certaine variabilité dans les résultats ait été constatée, la coloration de la MEC au rouge alizarine au jour 14 de la culture cellulaire d'ostéoblastes matures était positive dans tous les supports (CoCrMo et plastique) (Figure V. 8). Les résultats de coloration indiquent une minéralisation plus élevée sur le CoCrMo que sur le plastique, or l'activité d'ALP révèle la tendance inverse mais sans aucune différence significative. Des précédents travaux [379,385] ont mis en évidence que l'alliage à base de CoCr n'avait pas affecté la viabilité et la croissance des cellules, mais avait inhibé en partie l'activité de la phosphatase alcaline, ce qui pourrait être lié à la présence d'ions chrome, tant dans le milieu de culture que dans la cellule. Par conséquent, dans notre étude, les ostéoblastes matures hFOB 1.19 minéralisent la MEC indépendamment du support de culture (CoCrMo, plastique) mais de futurs travaux sont à prévoir pour vérifier que les différents substrats n'inhibent pas l'ALP ostéoblastique.

Les résultats de cette étude sont en accord avec le consensus général selon lequel le CoCrMo est un alliage biocompatible bien toléré. Par conséquent, de faibles niveaux d'ions métalliques ne semblent pas activer davantage les ostéoblastes ou les macrophages sur une période de trois jours.

#### V. 4 CARACTERISATION POTENTIODYNAMIQUE DE L'INTERFACE COCRMO/CELLULES

Tout comme le milieu biologique, les cellules peuvent avoir des effets importants sur l'électrochimie globale de l'interface métallique et sur sa sensibilité à la corrosion. Grâce au tracé de courbes de polarisation, la passivation métallique du CoCrMo en présence de cellules ostéoblastiques et macrophagiques a été examinée. L'objectif est de comprendre comment les cellules affectent les réactions redox et les domaines de potentiels.

##### V. 4.1 Courbes de polarisation du CoCrMo en présence de cellules

Pour les essais présentés dans cette section, le temps d'incubation des cellules sur le CoCrMo a été établi à 24 heures. Après ce délai, la courbe de polarisation du CoCrMo ensemencé de cellules a été tracée dans l'incubateur (Chapitre II. 4). La Figure V. 9 montre la courbe de polarisation du CoCrMo après ce délai, en absence et en présence d'ostéoblastes (Saos2 et hFOB1.19) ou de macrophages (RAW264.7). La polarisation débute cathodiquement à partir de  $-50 \text{ mV}/E_{\text{OCP}}$  à une vitesse de  $1 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bien que ce potentiel de départ ne mette pas en évidence la transition active/passive (Cf Chapitre III), il a été choisi pour ne pas perturber le métabolisme des cellules par des réactions de réductions excessives.

Après 24 h d'immersion en RPMI-1640 supplémenté, le potentiel  $E_{\text{OCP}}$  du CoCrMo atteint  $-273 \text{ mV}/\text{ECS}$  au lieu de  $-533 \text{ mV}/\text{ECS}$  après 1h d'immersion (Figure V. 9a). Le potentiel augmente avec le temps d'immersion en RPMI-1640, traduisant une amélioration des propriétés de surface. Le film passif a un caractère plus protecteur, causé par un enrichissement en oxydes de chrome. Quel que soit le temps d'immersion, le comportement électrochimique général de l'alliage de CoCrMo se caractérise par un domaine passif et un domaine transpassif, à  $500 \text{ mV}/\text{ECS}$ . Pour autant, la densité de courant diminue approximativement de trois ordres de grandeur après 24 h d'immersion : par exemple à  $250 \text{ mV}/\text{ECS}$ , la densité de courant est réduite de  $3\cdot 10^{-2}$  à  $6\cdot 10^{-5} \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Cela signifie une baisse du transfert de charges, qui résulte vraisemblablement de la densification du film passif et de l'adsorption de molécules et/ou de composés organiques du milieu RPMI-1640. La résistance à la corrosion du film passif est améliorée et la dissolution de l'alliage métallique est réduite. L'immersion de 24 h favorise également les phénomènes

de diffusion comme celle de l'oxygène dissous et qui, par conséquent, interagit à la surface pour former des oxydes protecteurs. Ceci expliquerait également un décalage de la branche cathodique vers des valeurs plus élevées et par conséquent une augmentation du potentiel  $E_{OCP}$  après 24h.

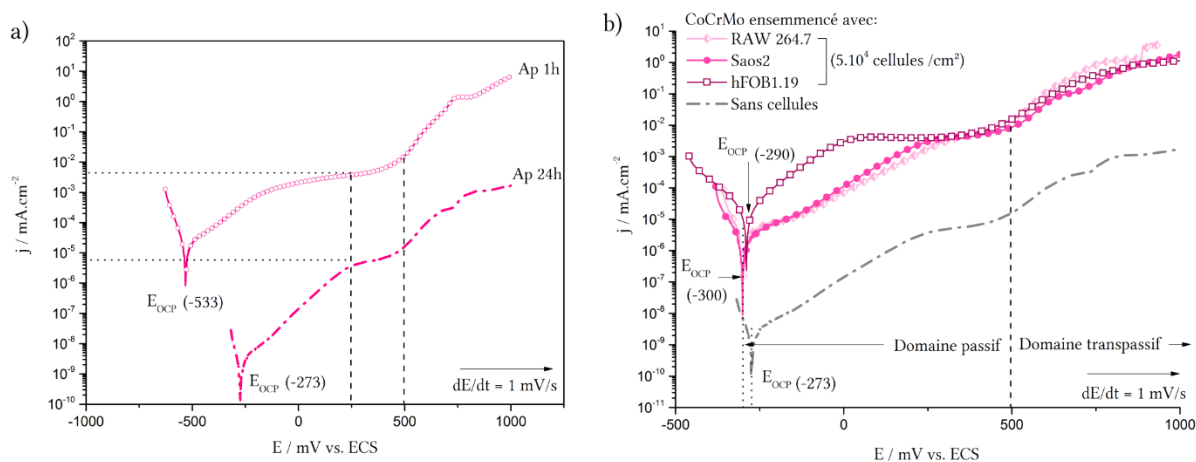


Figure V. 9 Courbes de polarisation du CoCrMo en milieu RPMI-1640 après 1 et 24 heures d'immersion (a) et en présence d'ostéoblastes (Saos2 et hFOB1.19) et de macrophages (RAW264.7) (b).

Les essais de polarisation anodique en présence de cellules montrent que tous les échantillons sont passivés avec l'augmentation du potentiel (Figure V. 9b). Contrairement à ce qui a été observé précédemment lors des mesures d'impédance, la densité de courant passive augmente quel que soit le type de cellules. Il est intéressant de signaler que la variation de courant du CoCrMo après 1 h d'immersion est relativement similaire à celle mesurée lorsque les cellules sont cultivées sur le matériau. Les cellules ont une influence sur la cinétique des réactions du CoCrMo en RPMI-1640 : soit elles agissent comme espèces oxydantes, soit comme un inhibiteur cathodique, soit en réduisant l'apport de l'oxygène dissous à la surface. La faible diminution de l' $E_{OCP}$  après 24h en présence de cellules (-273 à -300 mV/ECS) peut justement résulter de la diminution de réactions cathodiques.

Le domaine transpassif reste inchangé en présence de cellules. Les réactions majeures dans ce domaine sont l'oxydation du  $\text{Cr}^{3+}$  du film passif en  $\text{Cr}^{6+}$  soluble ainsi que l'oxydation par l'eau. Du fait des densités de courant élevées ( $> 10^{-2} \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), la réactivité de l'interface est reflétée par la réaction du CoCrMo avec le milieu RPMI-1640 et écrante les réactions provenant des cellules.

La similitude électrochimique entre les ostéoblastes Saos2 et les macrophages suppose que la fonction même des cellules affecte peu la réactivité de l'interface CoCrMo/cellules. On relève une légère modification dans le cas des ostéoblastes hFOB1.19, où le domaine passif du CoCrMo débute à des potentiels plus cathodiques (0 mV/ECS). Il est possible que le métabolisme des cellules intervienne dans les réactions redox. En effet, les cellules sont des systèmes électrochimiques dynamiques, où il se produit la génération et le transfert d'électrons à travers la membrane cellulaire. Ainsi, les surfaces polarisées peuvent perturber l'homéostasie d'oxydoréduction cellulaire, qui est régulée par des voies de signalisation intracellulaire et intercellulaire déterminant l'état redox d'une cellule et peut provoquer la mort cellulaire [351,386]. De même, les cellules peuvent contribuer à la production ou à la consommation de cations et d'anions et de ce fait inhiber les réactions de réductions ou catalyser les réactions d'oxydation [310]. Des essais supplémentaires de polarisation des cellules sur le CoCrMo seraient nécessaires pour déterminer de quelle manière les hFOB1.19 participent à l'équilibre oxydoréduction et la cinétique des réactions électrochimiques.

### Effet de la prolifération des cellules

Afin de discerner comment le processus de prolifération qui se produit sur l'implant métallique affecte la réactivité du métal, des courbes de polarisation ont été effectuées après 1, 3 et 5 jours d'ensemencement (Figure V. 10). Elles concernent les ostéoblastes Saos2 cultivés sur le CoCrMo en RPMI-1640 supplémenté. Dans ces conditions, on constate que les domaines électrochimiques restent inchangés en termes de limite de potentiel ou de densité de courant. Bien que les cellules prolifèrent et leur nombre augmente, il n'y a aucune modification électrochimique significative de l'interface métal/cellules. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la prolifération des cellules sur le CoCrMo conditions statiques. Une plus grande couverture cellulaire pourrait empêcher la diffusion des ions et des molécules entre le milieu proche de la surface du matériau et la solution.

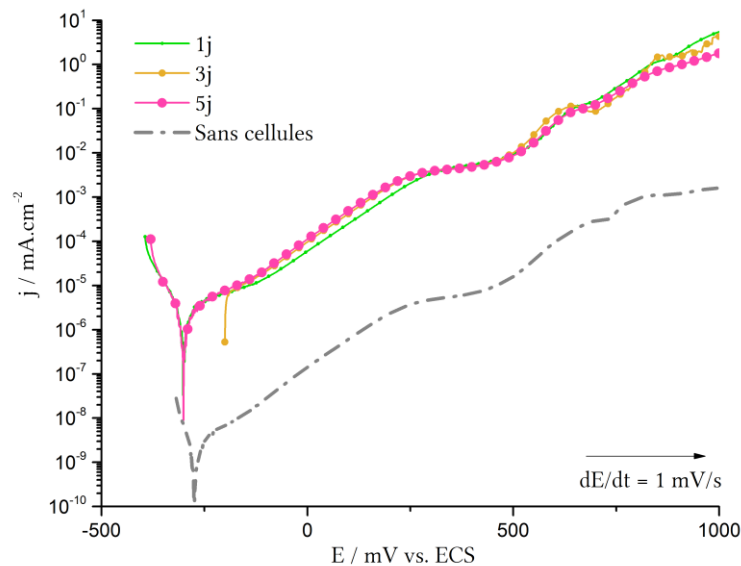


Figure V. 10 Courbe de polarisation du CoCrMo en présence d'ostéoblastes Saos2 cultivés pendant 1, 3 et 5 jours.

#### V. 4.2 Influence de la polarisation dynamique du CoCrMo sur la morphologie des cellules

Pour compléter la réactivité électrochimique du CoCrMo en présence de cellules, un suivi de la morphologie des cellules a été effectué pendant le tracé des courbes grâce à la microscopie à fluorescence et après polarisation par microscopie optique et électronique. L'observation morphologique a porté sur les ostéoblastes Saos2 et les macrophages RAW264.7.

##### V. 4.2.a Suivi par microscopie optique

La Figure V. 11 donne un premier aperçu de la morphologie des ostéoblastes avant et après l'essai de polarisation dynamique du CoCrMo. Elles sont à confluence après 3 jours de culture et elles ne semblent pas avoir de préférence d'alignement avec le substrat (Figure V. 11a). Après polarisation, les ostéoblastes ne se touchent plus, ont rétréci et ont un contour irrégulier avec de nombreuses extensions cellulaires (Figure V. 11b-d). L'analyse de la morphologie cellulaire au microscope optique est qualitative et nécessite l'utilisation du MEB pour discerner d'autres particularités morphologiques.



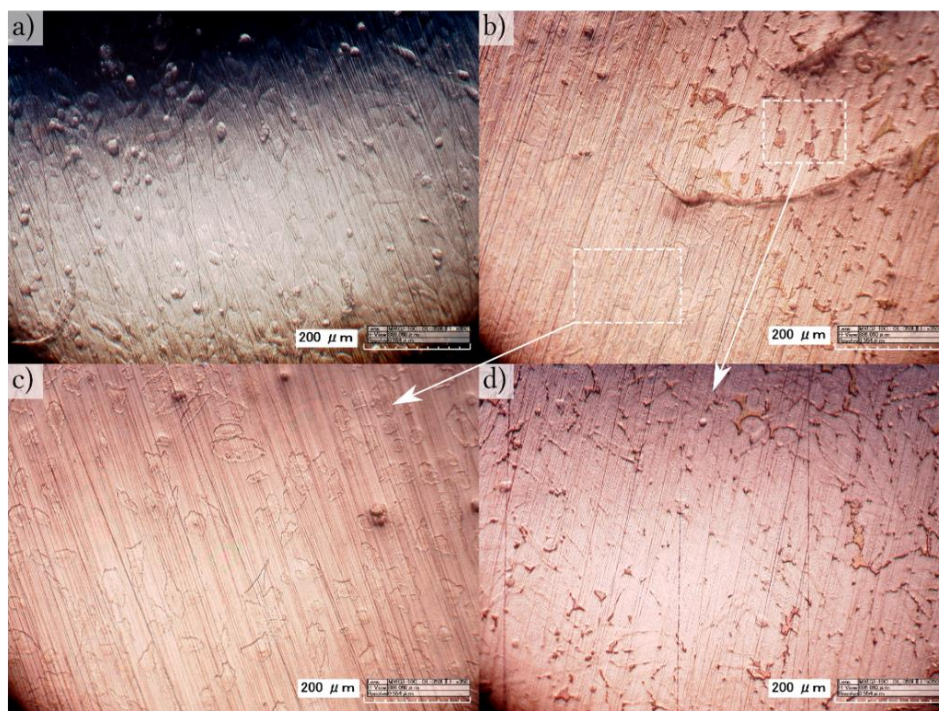


Figure V. 11 Vue générale des cellules ostéoblastiques Saos2 sur le CoCrMo après trois jours de culture sans polarisation (a) et après polarisation dynamique du CoCrMo (courbe de polarisation allant de  $-200 \text{ mV}/E_{OCP}$  à  $1000 \text{ mV}/ECS$ ) (b-d). Deux zones se distinguent selon la morphologie des cellules : (c) au centre et (d) au bord du métal.

La Figure V. 12 montre que les macrophages avant polarisation sont ronds, nombreuses, à confluence et se superposent les unes sur les autres. Après polarisation, elles présentent une modification interne, qui se traduit par un aspect non lisse (Figure V. 12c, d). Certaines cellules ont une aire de surface élevée indiquant peut être la présence de cellules multinucléées (Figure V. 12e).

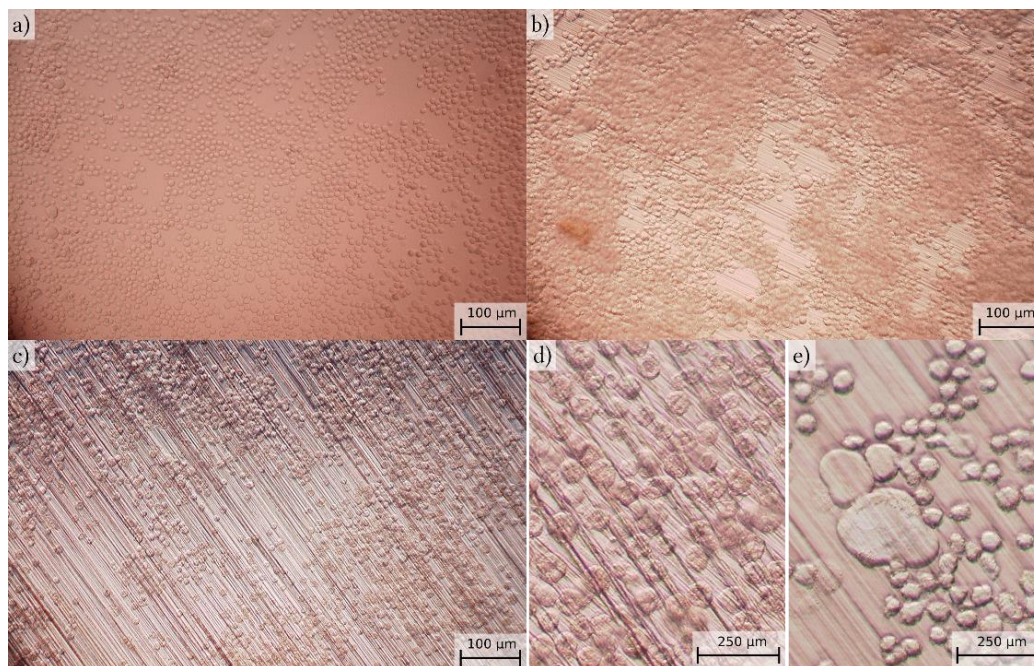


Figure V. 12 Vue générale des macrophages RAW264.7 ensemencés sur une boîte de pétri (a) et sur le CoCrMo (b) après 3 jours (pas de polarisation) et (c-e) après polarisation dynamique du CoCrMo (courbe de polarisation allant de  $-200 \text{ mV}/E_{OCP}$  à  $1000 \text{ mV}/ECS$ ). Les images d) et e) sont des agrandissements.

V. 4.2.b Observations par microscopie électronique à balayage MEB

Après polarisation du système CoCrMo/cellules jusqu'à 1000 mV/ECS, les ostéoblastes Saos2 ont été fixées et observées au MEB. La Figure V. 13a montre des cellules avant polarisation, qui sont presque à confluence après 3 jours de culture et qui semblent alignées avec la direction principale des traces d'usinage de polissage. Elles présentent un contour lisse avec peu d'extensions cellulaires. Quelques cellules rondes, de forme globulaire et sans orientation préférentielle sont également présentes. Après polarisation, la morphologie des ostéoblastes Saos2 change significativement selon leur disposition sur le disque de CoCrMo (Figure V. 13b) :

- Dans la zone centrale du disque, les cellules sont plus grandes et aplaties et n'ont aucune orientation préférentielle (Figure V. 13c). Elles ont une forme plus irrégulière avec de nombreuses extensions cellulaires particulières (de type filopodes<sup>6</sup> indiqués par les flèches). Malgré l'apparition d'un étalement, les cellules montrent des signes d'endommagement de la membrane (trous). Elles présentent une structure interne parsemée de pores. Cet état particulier a également été observé par Haerihosseini et al. lors de la polarisation de cellules à 500 mV/ECS [387]. Cet effet est attribué à l'impact du champ électrique sur la membrane cellulaire, connu sous le nom d'électroporation [313]. Quelques centaines de millivolts sont nécessaires pour obtenir le champ électrique nécessaire à l'électroporation [388] et à partir de quelques kV/cm, la rupture diélectrique de la membrane intervient [341,389]. L'application dans notre cas d'un potentiel de 1000 mV/ECS entraîne ainsi la rupture de la membrane cellulaire se traduisant par de nombreux pores. De plus, l'utilisation d'un échantillon métallique cylindrique induit des lignes de champ hétérogène sur la surface.
- Au bord de l'échantillon de CoCrMo, les cellules étaient moins à confluence par rapport au centre ; elles semblaient plus allongées et minces sous forme rétrécies et filamenteuses (Figure V. 13d). Leur structure interne est très dégradée (zones bleues).

Cette morphologie particulière des ostéoblastes Saos2 obtenue à des potentiels aussi élevés suggère un profond changement du métabolisme des cellules. Kalbacova et al. ont également observé des changements morphologiques significatifs des cellules Saos2 selon leur emplacement sur le métal (Titane) et ayant subies une polarisation en courant [353]. Les cellules étaient rétrécies lorsque les densités de courant sont élevées (-2,5 et -5 mA/cm<sup>2</sup>). Les auteurs ont suggéré que la polarisation cathodique du titane représente un système électrochimique à faible résistance ohmique, entraînant une distribution de densité de courant non homogène et, par conséquent, des quantités différentes de produits de réaction cathodique sur la zone d'échantillonnage ou, plus précisément, sur le rayon de l'échantillon. De la même manière, il est envisageable que la polarisation dynamique du CoCrMo entraîne une distribution de densité de courant non homogène à la surface. Au bord de l'échantillon, la densité de courant semble plus élevée ce qui engendre des quantités plus élevées d'ions métalliques. En conclusion, les ostéoblastes en bordure peuvent être affectés par une densité de courant localement plus élevée.

---

<sup>6</sup> Lors de la migration, l'avant de la cellule présente deux types d'extensions en fonction de leur morphologie et de l'organisation de l'actine : les lamellipodes et les filopodes. Contrairement aux lamellipodes qui sont des structures larges, les filopodes sont fins et cylindriques.



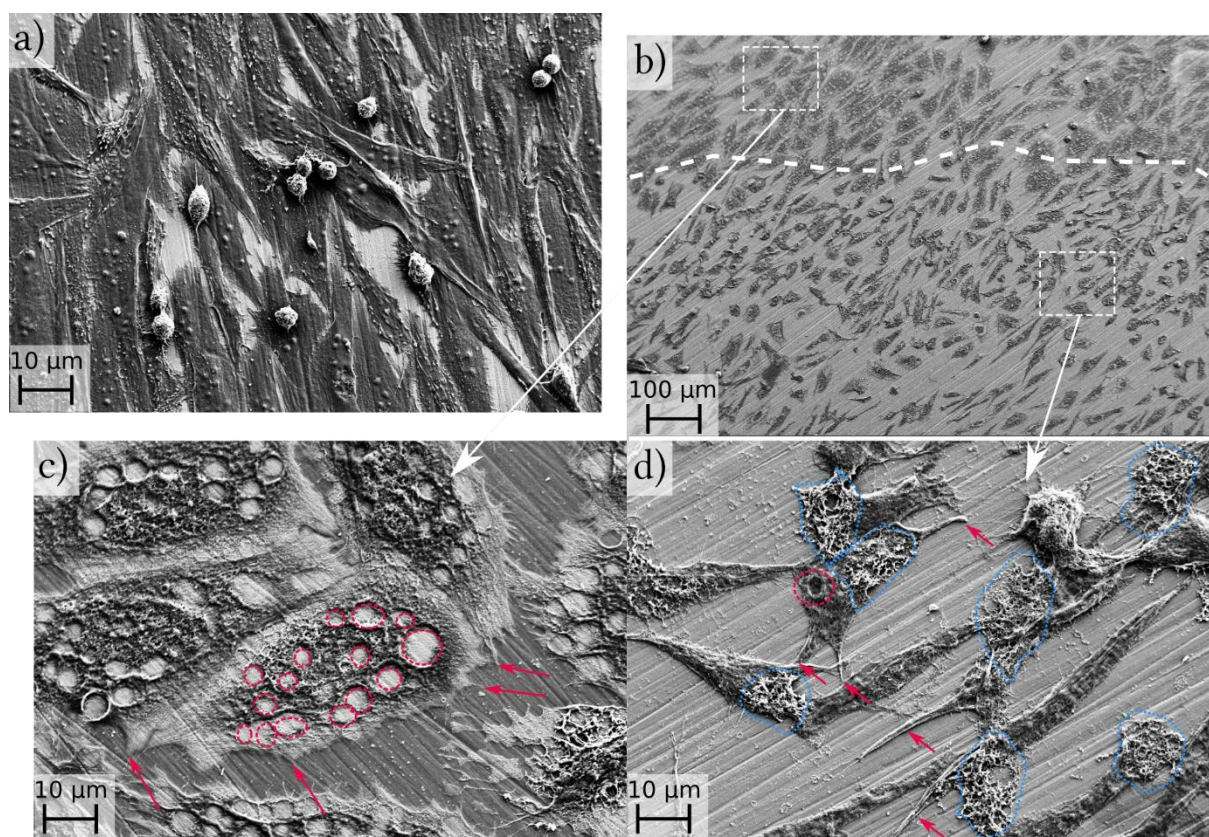


Figure V. 13 a) Vue générale des cellules ostéoblastiques Saos2 fixées sur le CoCrMo après trois jours de culture sans polarisation montrant un étalement dans le sens des rayures d'usinage (a) et après polarisation dynamique du CoCrMo (courbe de polarisation allant de  $-200 \text{ mV}/E_{OCP}$  à  $1000 \text{ mV}/ECS$ ) (b-d). Détails des Saos2 situées (c) au centre du disque métallique présentant une morphologie polygonale allongée avec de nombreuses extensions cellulaires et des pores internes et (d) sur le bord du disque, où les cellules sont longues et minces ou de forme globulaire et sans orientation préférentielle.

#### V. 4.2.c Evaluation du pH intracellulaire par microscopie à fluorescence

L'imagerie microscopique à fluorescence à intervalles réguliers est un outil puissant pour l'étude du comportement cellulaire tel que la mobilité, la migration et la morphologie. Cette dernière a été évaluée sur les macrophages RAW264.7 cultivés sur le CoCrMo soumis à la polarisation dynamique (courbe de polarisation). Le marqueur fluorescent de pH intracellulaire a été choisi pour mettre en évidence l'activité métabolique des cellules résultant de la phagocytose ou de la pinocytose<sup>7</sup> de corps étrangers. Du fait de leurs fonctions d'élimination, seuls les macrophages ont donc été testés. Bien que la durée de l'essai soit courte, les facteurs environnementaux comme la température et le taux de  $\text{CO}_2$  ont été maintenus constants grâce à une enceinte thermostatée placée sous un microscope à fluorescence (dispositif présenté en détail au Chapitre VI).

<sup>7</sup>Intégration par une cellule, de gouttelettes de liquide provenant du milieu extracellulaire.



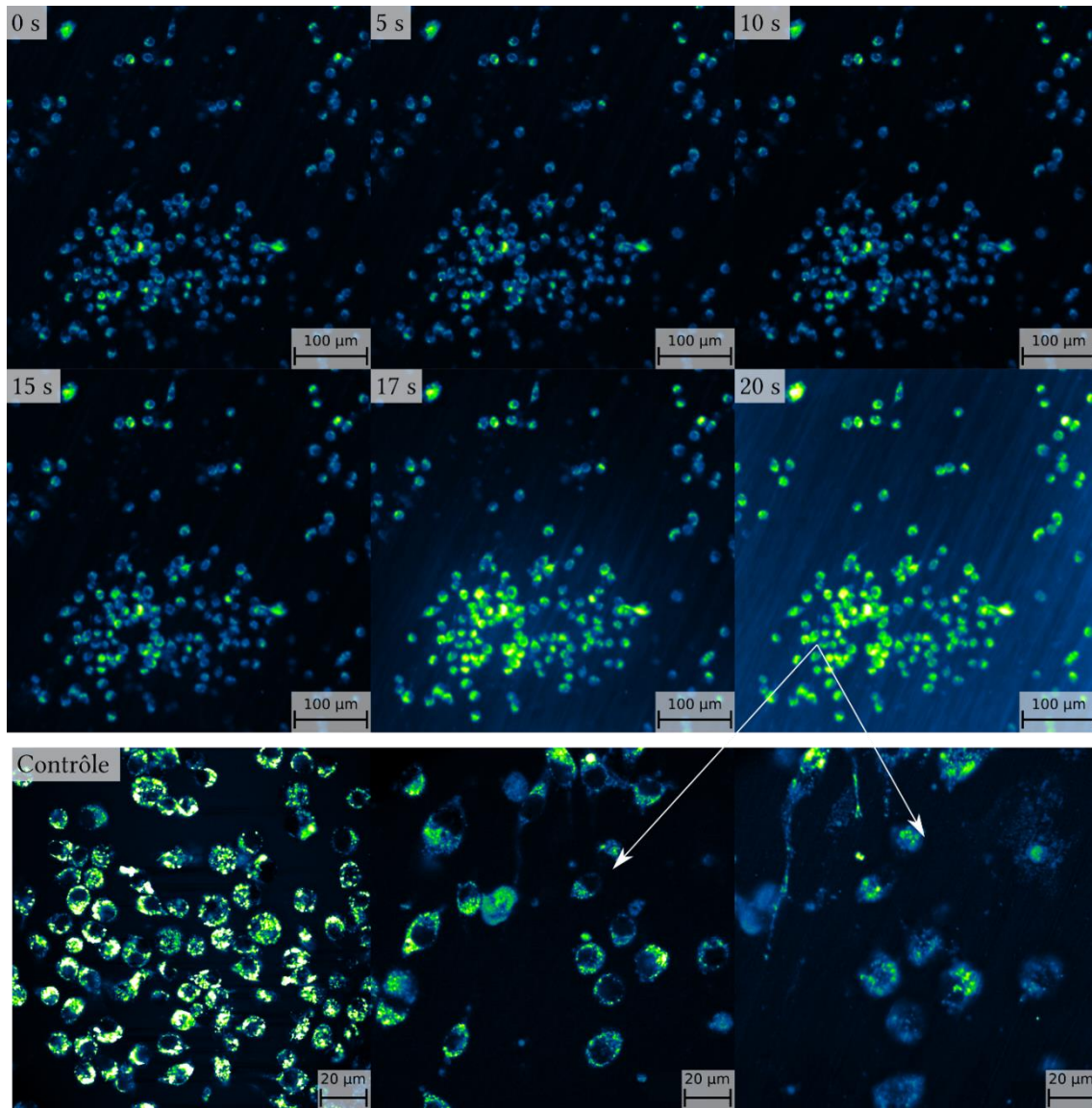


Figure V. 14 Images au microscope à fluorescence de macrophages marqués avec pHRodo™ et cultivés sur un disque de CoCrMo polarisé en potentiel (de  $-50 \text{ mV}/E_{\text{OCP}}$  à  $1000 \text{ mV}/\text{ECS}$ ). Le marqueur de pH intracellulaire devient vert-jaune en milieu acide. Le contrôle correspond à un échantillon de CoCrMo non polarisé.

Les images de fluorescence ont été réalisées toutes les secondes mais seulement quelques-unes sont présentées en Figure V. 14. Aucune différence significative de la taille moyenne (surface projetée) n'a été observée entre les cellules ensemencées sur les échantillons de CoCrMo avec ou sans polarisation. Toutefois, le signal devient plus intense à mesure que le potentiel augmente, signifiant un pH intracellulaire plus acide. Au fort grossissement, le noyau des cellules est facilement discernable, entouré de nombreuses vésicules acides. La polarisation anodique entraîne une activité métabolique typique de l'élimination de corps étrangers, tels que les ions métalliques.

#### V. 4.3 Discussion

Les résultats de cette étude montrent que les cellules ont un pouvoir oxydant sur la formation du film passif du CoCrMo (augmentation de la densité de courant passive), signifiant qu'un transfert de charge plus élevé a lieu à l'interface CoCrMo (oxyde)/électrolyte. Cette modification pourrait résulter des produits intermédiaires réactifs, produits par les cellules, qui accélèrent la réduction d'oxygène ou d'une

réduction de l'apport d'oxygène dissous à la surface métallique. Aucune différence significative n'a été notifiée dans le domaine transpassif en présence ou en absence de cellules : l'oxydation du chrome et la réaction anodique de la solution prédominent.

La polarisation dynamique du système CoCrMo/cellules engendre des changements irréversibles dans la morphologie cellulaire : elles rétrécissent et présentent un contour irrégulier et des ruptures dans la membrane cellulaire (pores). L'observation des cellules a été réalisée au potentiel anodique final (1000 mV/ECS), ce qui correspond à une différence de potentiel très élevée et non représentative de l'état des prothèses *in vivo*. Pour autant, il est intéressant de noter que la morphologie cellulaire est fonction de la disposition des cellules sur l'échantillon de CoCrMo ou, autrement dit, de la distribution hétérogène de la densité de courant.

Le dispositif expérimental peut être une limite de cette étude, puisqu'il consiste àensemencer des cellules au contact direct de l'échantillon métallique polarisé. A cet égard, il est concevable que le métabolisme cellulaire puisse être influencé par des processus non faradiques, qui peuvent engendrer des gradients électrostatiques modifiant la polarité et la distribution de molécules intracellulaires chargées. Ainsi, l'interaction entre le champ électrique résultant de la polarisation et les propriétés bioélectriques des membranes cellulaires est à prendre en compte pour de futurs travaux.

Dans cette étude, l'activité métabolique des macrophages a été mise en évidence grâce à un marqueur fluorescent de pH intracellulaire durant la polarisation dynamique du CoCrMo. Les résultats ont mis en évidence une corrélation entre le pH et le potentiel, suggérant que la phagocytose ou la pinocytose des ions métalliques a lieu lors des réactions d'oxydation. Cet outil de suivi biologique *in situ* durant les tests électrochimiques promet un large panel d'études concernant l'internalisation des corps étrangers par les macrophages, la migration cellulaire, les phases d'adhésion et d'apoptose de différents types de cellules.

## V. 5 CONTROLE ELECTROCHIMIQUE DE L'INTERFACE COCRMOC/CELLULES : CYTOTOXICITE INDUITE PAR L'OXYDATION METALLIQUE

Le potentiel de surface des implants métalliques, qui est déterminé par les réactions d'oxydo-réduction en surface, peut s'écarter du potentiel  $E_{OCP}$  en raison de l'abrasion des surfaces articulaires des implants [390,391], de la réponse cellulaire inflammatoire [352] ou de la contrainte mécanique transmise à l'os [304,306]. Le rôle de ces variations de potentiel sur la viabilité cellulaire a rarement été étudié [247,296,353]. Pourtant, les processus et mécanismes cellulaires qui peuvent être affectés par la proximité d'une surface métallique polarisée inclut de nombreux changements [344,345,347,348], qui affectent le comportement cellulaire et la biocompatibilité [239,342,380,392,393]. Par conséquent, il est essentiel de mieux comprendre comment le potentiel de surface des implants biomédicaux métalliques et les réactions électrochimiques associées pourraient influencer le comportement cellulaire.

Dans cette section, l'effet de potentiels anodiques sur la réponse des cellules cultivées à la surface d'un alliage de CoCrMo est étudié. La réponse cellulaire est évaluée par observation de la morphologie cellulaire et par des analyses de viabilité. Les courants électrochimiques et les concentrations d'ions métalliques ont été mesurés et reliés à la réponse observée.

### V. 5.1 Dissolution ionique contrôlée du CoCrMo

Des mesures potentiostatiques ont été effectuées afin d'évaluer l'effet du potentiel sur la cinétique de corrosion et sur la libération d'ions métalliques. Le courant généré à un potentiel fixe a été mesuré en fonction du temps, comme le montre la Figure V. 15.

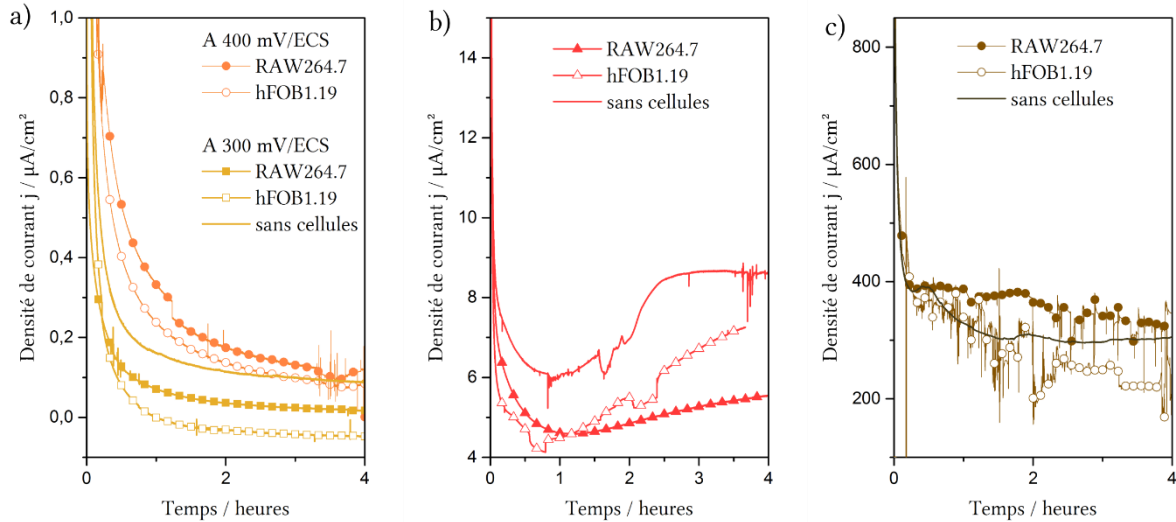


Figure V. 15 Evolution de la densité de courant  $j$  durant les essais de polarisation potentiostatique du CoCrMo en RPMI-1640 à 300 et 400mV/ECS (a), 500mV/ECS (b) et 700 mV/ECS (c) en présence d'ostéoblastes hFOB1.19 ou de macrophages RAW264.7.

Au potentiel passif appliqué entre 300 et 500 mV/ECS, la cinétique électrochimique est déterminée par la passivation (Figure V. 15a, b). Le transitoire de courant est typique d'un processus de passivation dans des conditions potentiostatiques, c'est-à-dire qu'il augmente brusquement jusqu'à une valeur maximale, puis diminue jusqu'à atteindre une valeur constante. Une fois l'alliage passivé, la valeur de la densité de courant reste constante et stable. La densité tend vers une asymptote dont la valeur augmente avec le potentiel : vers 0,1 mA/cm<sup>2</sup> en dessous de 400 mV/ECS et entre 5 et 9 mA/cm<sup>2</sup> à 500 mV/ECS. Le comportement de l'alliage CoCrMo est similaire en présence ou en absence de cellules. Une cinétique légèrement inférieure est observée dans le cas des ostéoblastes hFOB1.19 excepté à 500 mV/ECS. A ce potentiel, la densité de courant n'est pas stable et augmente après une heure de polarisation. Le transitoire de courant est typique d'une intensification des réactions anodiques. Ceci peut également traduire l'adsorption continue de composés organiques à l'interface métal/cellules, comme déjà mentionné dans les chapitres précédents.

Dans le domaine transpassif, à 700 mV/ECS, la densité de courant atteint des valeurs positives très élevées de l'ordre de la centaine de µA/cm<sup>2</sup> (Figure V. 15c). Ceci est dû au courant non faradique (pic de courant initial), à la réaction anodique des espèces de chrome (Cr<sup>6+</sup>), et l'oxydation de l'eau (H<sub>2</sub>O en O<sub>2</sub> gazeux). Le transitoire de courant en présence de cellules est bruité, ce qui suggère que les réactions d'oxydation s'effectuent selon une cinétique discontinue ou que l'O<sub>2</sub> produit perturbe les réactions à la surface de l'électrode.

### V. 5.2 Taux de libération d'ions

A la fin des 4 heures de polarisation, le taux d'ions métalliques cobalt, chrome et molybdène dans la solution RPMI-1640 a été mesuré par analyse ICP-MS (Figure V. 16a). Les rapports de concentration de

chaque élément ont été calculés pour évaluer les différents mécanismes de libération des ions métalliques (Figure V. 16b).

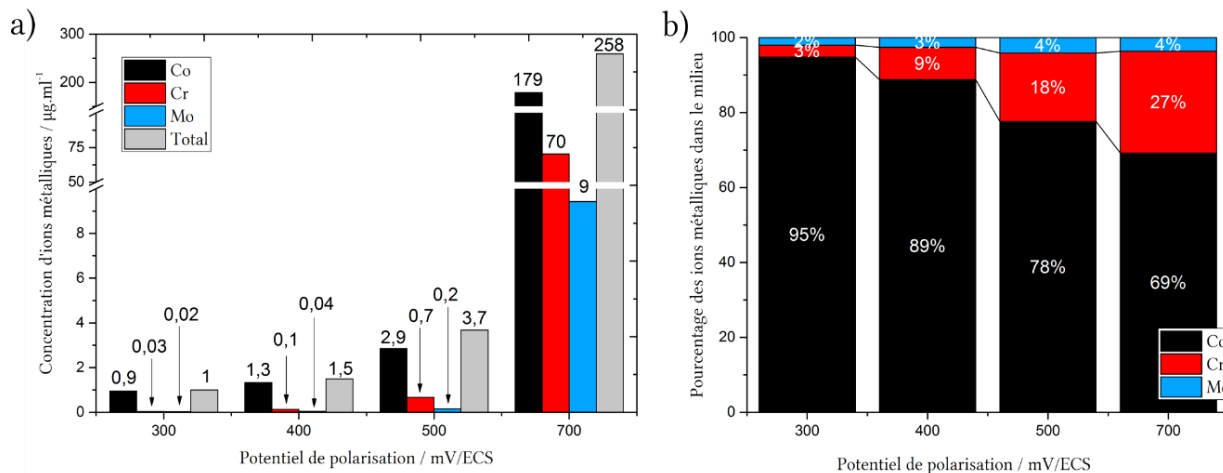


Figure V. 16 Concentration d'ions métalliques de cobalt, chrome, molybdène relevés dans le milieu de culture RPMI-1640 après polarisation potentiostatique du système CoCrMo/RAW264.7 à 300, 400, 500 et 700 mV/ECS. La concentration des ions pour un échantillon contrôle immergé durant le même temps mais non polarisé est de 0,3 de Co, 0,01 de Cr et 0,007  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Mo.

Tous les éléments métalliques cobalt, chrome et molybdène montrent une augmentation de leur concentration avec le potentiel. Elle est maximale à 700 mV/ECS (Figure V. 16a). Environ 0,9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cobalt et 0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de chrome ont été libérés à 300 mV/ECS, par rapport à 179  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivement dans le domaine transpassif (700 mV/ECS). La présence d'éléments métalliques est due aux réactions de dissolution du film passif et d'oxydation du matériau.

Le cobalt représente plus de 70 % de la libération totale d'ions métalliques quel que soit le potentiel appliqué (Figure V. 16b). Sa concentration diminue avec le potentiel au dépend de celle du chrome, qui augmente de 3 à 27%. La libération d'ions molybdène est très faible et se situe entre 2 et 4%. Le pourcentage de cobalt est dans la plupart des cas plus élevé que celui attendu, c'est-à-dire indiqué par la composition chimique de l'alliage CoCrMo (Chapitre II). Cela laisse supposer que le cobalt forme des ions sous forme soluble, et que le chrome précipite plutôt sous forme d'oxyde solide. En effet, la vitesse de dissolution du cobalt de la matrice métallique est supérieure à celle du chrome ; il est possible que le cobalt soit plus facilement dissous en présence de protéines [258,394]. Le chrome est plus affecté par la dégradation mécanique superficielle que les réactions électrochimiques : il provient du détachement du film de passivation. Par exemple, dans un cas de tribocorrosion, Wang et al. ont quantifié que les débris d'usure contenaient 43 % de cobalt et 99 % de chrome de l'alliage de CoCrMo après 24 h d'essais et que le reste est présent sous forme d'ions en solution. Ainsi, même si à mesure que le potentiel augmente, le film passif s'enrichit en oxydes de Cr(III), le cobalt sous forme soluble est majoritaire.

Au potentiel transpassif de 700 mV/ECS, le RPMI-1640 n'a aucune influence sur la dissolution des ions cobalt, chrome et molybdène. En effet, les concentrations ioniques sont très proches de la stœchiométrie du CoCrMo.

V. 5.3 Effet de la dissolution ionique du CoCrMo sur la viabilité et morphologie cellulaire

V. 5.3.a Quantification de la viabilité cellulaire

La viabilité des ostéoblastes et des macrophages sur l'alliage CoCrMo polarisé a été quantitativement déterminée par dosage spectrophotométrique MTT. Les analyses ont été réalisées directement après polarisation ou après un délai d'incubation de 24 h. Les données spectrophotométriques obtenues ont été converties en pourcentage de viabilité et sont représentées graphiquement sur la Figure V. 17.

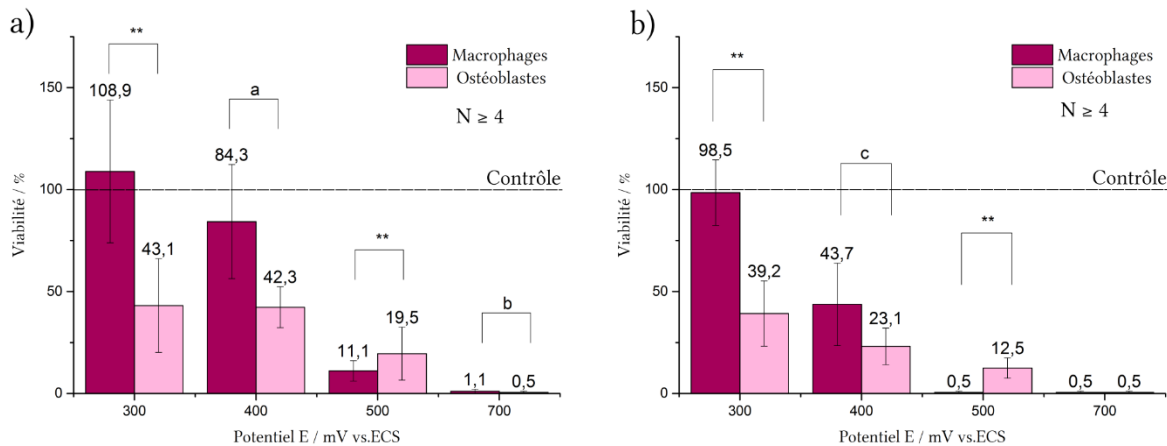


Figure V. 17 Viabilité par analyse MTT des cellules ensemencées sur l'alliage CoCrMo soumis à une polarisation potentiostatique entre 300 et 700 mV/ECS. Le contrôle correspond à un échantillon de CoCrMo non polarisé. Le test MTT est réalisé soit directement (a) soit 24 h (b) après la polarisation électrochimique. Les données ont été analysées par ANOVA : \*\* signifie que  $p < 0,05$ , a, b et c correspondent à  $p = 0,18$  ;  $0,35$  et  $0,13$ . La probabilité  $p$  entre les différents potentiels pour les macrophages à 0h et 24h est respectivement de  $0,0002$  et  $0,003$ . Pour les ostéoblastes  $p = 0,21$  et  $0,008$  à 0h et 24h respectivement.

La viabilité des deux types cellulaires est maximale au potentiel passif le plus bas, et diminue à mesure que le potentiel augmente (entre 0,5 et 1,1 %). Ceci est en corrélation avec les analyses de concentration d'ions métalliques rejetés dans le milieu (Figure V. 16) où elles sont les plus faibles à 300 mV/ECS.

Le pourcentage de viabilité des macrophages est supérieur à celui des ostéoblastes et ce d'autant plus quand le potentiel de polarisation est faible. A 300 et 400 mV/ECS, le pourcentage de viabilité des macrophages est respectivement 65 et 42% supérieurs par rapport aux ostéoblastes mais significativement et statistiquement différent à seulement 300 mV/ECS ( $p < 0,05$ ) (Figure V. 17a). Ceci laisse supposer que les ostéoblastes sont plus sensibles que les macrophages aux faibles taux d'ions métalliques en solution. A 500 mV/ECS, il est étonnant de constater que le taux de viabilité des macrophages est significativement plus faible que celui des ostéoblastes ( $p < 0,05$ ). Comme les macrophages ont pour fonction principale d'éliminer les corps étrangers, y compris les ions par pinocytose, il est supposé qu'entre 400 et 500 mV/ECS, un seuil d'acceptation est atteint, au-delà duquel les macrophages ne sont plus capables d'éliminer efficacement les ions métalliques, ce qui entraînerait une soudaine déficience métabolique (de 84,3 à 11,1%). L'hypothèse est que les macrophages, en raison de leurs échanges plus fréquents avec le milieu extracellulaire, semblent plus sensibles à la quantité d'ions métalliques en solution, tandis que les ostéoblastes sont sensibles aux ions métalliques, indifféremment de leur concentration totale.

L'application d'un potentiel peut également fortement affecter le métabolisme et la membrane des cellules [344,345,347,348]. Ainsi, la production d'ions métalliques par le biais de l'oxydation du métal sous-jacent diminue fortement la viabilité des cellules. Les ostéoblastes sont plus réceptifs aux perturbations de potentiel que les macrophages aux potentiels du domaine passif.



Les analyses MTT révèlent également que le temps d'exposition est un facteur influençant la viabilité cellulaire. Ce paramètre a été évalué en effectuant des analyses MTT, directement ou 24h après les essais de polarisation électrochimiques (Figure V. 17b). Les données montrent que la viabilité diminue avec le temps d'incubation, indépendamment des cellules ou des conditions de polarisation. La viabilité diminue d'un facteur approximatif de 1,1 à 2 pour les potentiels allant de 300 à 700 mV/ECS. Ceci suggère que le temps d'exposition et la concentration en ions métalliques agissent en synergie. De plus, le taux de viabilité des macrophages est significativement différent entre les potentiels après polarisation et après 24 h ( $p < 0,003$ ), alors que celui des ostéoblastes est statistiquement différent après 24 h ( $p = 0,008$ ) mais pas directement après la polarisation ( $p = 0,21$ ). Le temps d'incubation semble donc être un facteur essentiel pour mesurer la viabilité cellulaire. *In vivo*, les macrophages ont généralement tendance à s'activer avant les ostéoblastes, ce qui peut expliquer pourquoi le temps d'incubation après les tests influence davantage les ostéoblastes que les macrophages.

### V. 5.3.b Morphologie des cellules

Afin d'examiner la survie des ostéoblastes et des macrophages sur le CoCrMo polarisé, la morphologie a été évaluée avant et après les essais de polarisation statique par microscopie à fluorescence par coloration du pH intracellulaire des cellules vivantes (Figure V. 18 et Figure V. 19). L'étude a porté sur les deux conditions les plus défavorables pour les cellules, c'est-à-dire à 500 et 700 mV/ECS.

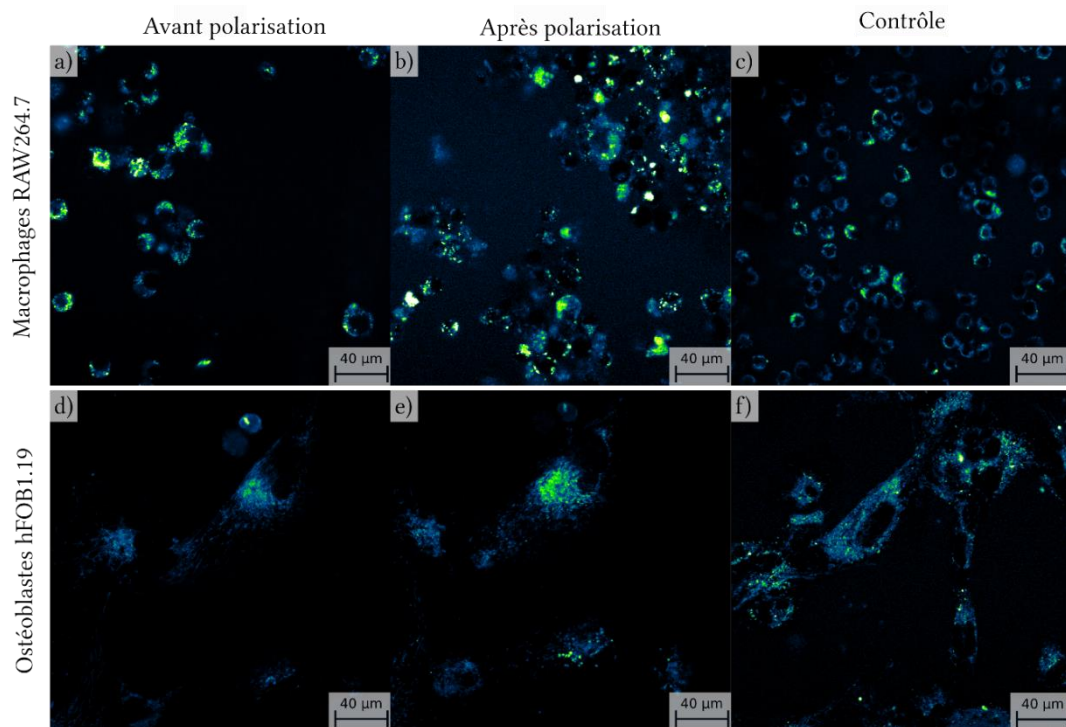


Figure V. 18 Images de microscopie par fluorescence des macrophages et des ostéoblastes vivants cultivés sur le CoCrMo polarisé à 500 mV/ECS. Le signal vert-jaune correspond à un pH intracellulaire acide (4,7-5).

Comme le montre la Figure V. 18a, avant la polarisation, les macrophages présentaient une morphologie globale petite et ronde. Après polarisation, on identifie une nette augmentation du nombre des zones à pH acide, disposées autour des noyaux (Figure V. 18b). Les ostéoblastes adoptent une forme caractéristique en forme de fuseau avec de longs filaments d'actine distinctifs entourant les noyaux (Figure V. 18f). Une différence a été observée avant et après polarisation : le pH intracellulaire diminue

nettement dans le cytoplasme cellulaire. Ainsi, la polarisation à 500 mV/ECS se traduit par une diminution locale du pH intracellulaire présent sous forme de petites vésicules ou dans le cytoplasme pour les macrophages et les ostéoblastes respectivement.

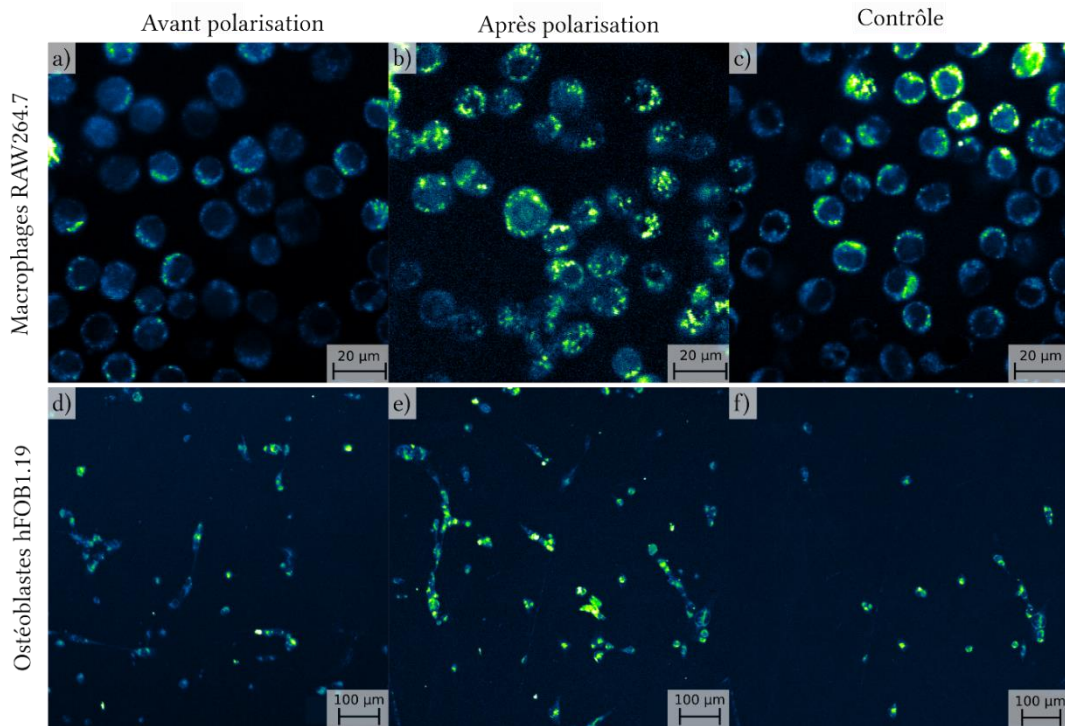


Figure V. 19 Images de microscopie par fluorescence des macrophages et des ostéoblastes vivants cultivés sur le CoCrMo polarisé à 700 mV/ECS. Le signal vert-jaune correspond à un pH intracellulaire acide (4,7-5).

A 700 mV/ECS, les macrophages montrent une évolution identique de la morphologie et du pH intracellulaire par rapport au potentiel inférieur (Figure V. 19a, b, c). L'observation des ostéoblastes après la polarisation de 4 heures à 700 mV/ECS a été difficile en raison d'un faible nombre de cellules en surface. Elles sont allongées et regroupées par îlots de quelques cellules (Figure V. 19d). Le signal fluorescent augmente après polarisation, ce qui suggère que la production d'ions métalliques dissous diminue le pH intracellulaire (Figure V. 19e). En résumé, le suivi morphologique des cellules par fluorescence permet d'identifier les zones localement actives dans l'élimination des ions métalliques générés sous polarisation électrochimique.

## V. 5.4 Discussion

### V. 5.4.a Effet de la libération d'ions métalliques CoCrMo

Les essais potentiostatiques visent à quantifier le rejet d'ions métalliques provenant de l'oxydation imposée au matériau. Le taux global de corrosion est déterminé par la charge totale  $Q_t$  calculée en intégrant l'évolution de la densité de courant aux potentiels anodiques appliqués. La Figure V. 20 présente la charge totale  $Q_t$  aux quatre potentiels de polarisation en présence ou en absence de cellules, établis sur la base de la moyenne d'au moins cinq essais potentiostatiques.

Dans le domaine passif (300 et 400 mV/ECS), les données montrent que la charge impliquée dans les processus interfaciaux est faible, inférieure à 12 mC. L'augmentation de la charge par un facteur 20 illustre que le potentiel de 500 mV/ECS correspond déjà au domaine transpassif. La dissolution du film

est majoritaire par rapport à sa formation. A 700 mV/ECS, la charge totale est de trois ordres de grandeurs supérieurs à celle du domaine passif.

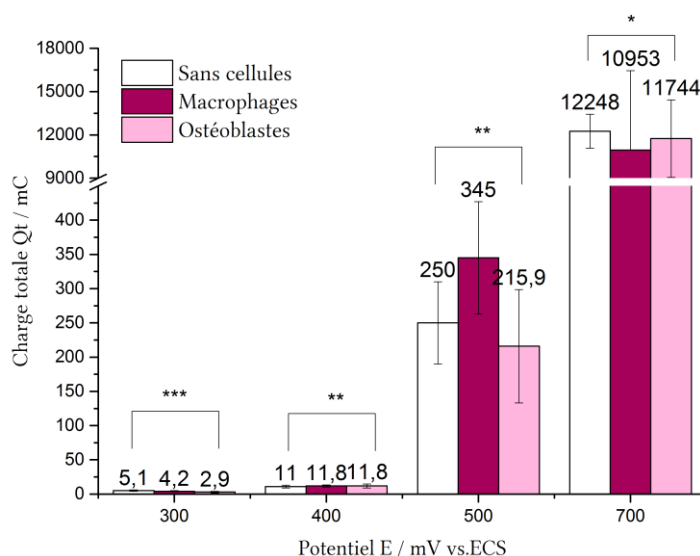


Figure V. 20 Charge totale  $Q_t$  du CoCrMo durant les essais de polarisation potentiostatique entre 300 et 700 mV/ECS en présence d'ostéoblastes Saos2 ou de macrophages RAW264.7. Les données ont été analysé par la variance à un facteur : \*\*\* signifie que  $p = 0,004$  ; \*\* signifie que  $p < 0,13$  et \* signifie que  $p = 0,25$ .

Les données montrent également que la présence de cellules modifie la charge totale impliquée dans la formation et la dissolution du film passif :

- A 300 mV/ECS, la charge totale  $Q_t$  du CoCrMo est plus faible en présence d'ostéoblastes que de macrophages ou sans cellules ( $p = 0,004$ ); les ostéoblastes tendent à limiter la formation du film passif,
- Inversement, à 500 mV/ECS, les macrophages augmentent la dissolution du film passif : la charge totale  $Q_t$  est de 345 mC au lieu de 215-250 mC pour les deux autres conditions. Les macrophages peuvent effectivement intervenir dans les réactions cathodiques en produisant notamment des espèces oxydantes comme  $H^+$  et  $H_2O_2$ , impliqués généralement dans la destruction des corps étrangers et dans la réaction inflammatoire.

#### V. 5.4.b Influence des ions métalliques

L'évaluation des niveaux d'ions métalliques après l'implantation d'un biomatériau est d'une grande importance car il sert d'indicateur de performance et de sécurité du dispositif. Dans le cas de personnes saines sans implants, les taux de cobalt et de chrome sont respectivement de 0,05 à 0,6 et de 0,06 à 0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  [328,395]. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles obtenues à 300 mV/ECS (0,9 et 0,03  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour le cobalt et le chrome) où justement la viabilité des cellules était élevée (Figure V. 16). Médicalement, il est établi que les concentrations de cobalt et de chrome dans le sang ou le sérum inférieures à 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  n'induit pas d'effets négatifs [396]. D'autres études confirment que les macrophages exposés au cobalt, au chrome et au molybdène à des taux faibles (inférieurs à 100 ppb) n'ont pas de réduction de leur viabilité [51]. Ces résultats sont similaires à ceux de notre étude et sont en accord avec le consensus général selon lequel le CoCrMo est un alliage biocompatible bien toléré. Par conséquent, de faibles niveaux d'ions métalliques ne semblent pas activer les cellules.

Dans le cas de patients ayant reçu un implant orthopédique métallique, les concentrations moyennes d'ions métalliques varient dans une large gamme qui est fonction de la durée d'implantation, du



liquide/tissu analysé et de nombreux autres facteurs. Il est donc très difficile d'établir un lien direct entre le seuil d'ions métalliques et les complications des implants orthopédiques métalliques. Par exemple, dans le cas de patients ayant subi une arthroplastie totale de la hanche en alliage CoCrMo, les taux moyens de chrome et de cobalt varient en fonction de la durée d'implantation : entre 0,75 et 1,8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  après 2 ans [390] et entre 0,72 et 1,63  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  après 7-15 ans [395]. Bien que ces taux soient très variables d'une étude à l'autre, ils sont du même ordre de grandeur que ceux de notre étude obtenus au potentiel de 400 mV/ECS (0,04  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Cr et 1,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Co). La polarisation du système CoCrMo/cellules à ce potentiel se rapproche de conditions accélérées *in vivo* des implants métalliques.

Au-delà de 500 mV/ECS (domaine transpassif), le taux de dissolution des ions augmente et est estimé entre 225 et 44750 ppb/h pour le cobalt et entre 7 et 2250 ppb/h pour le chrome. Généralement, on estime que le taux de dissolution est de l'ordre de 5 ppb/h pour le cobalt et 0,6 ppb/h pour le chrome [394]. Cela signifie que cette condition expérimentale amplifie considérablement la libération des ions métalliques par rapport aux conditions *in vivo*. Comme une prothèse orthopédique métallique est conçue pour une durée de vie de plus de 20 ans, la quantité d'ions provenant des ions métalliques peut être importante mais elle s'effectue à des vitesses nettement plus faibles. De plus, à partir de 500 mV/ECS, on remarque que la quantité d'ions cobalt est 4 fois plus élevée que les ions chrome au lieu de 30 fois aux potentiels de 300 et 400 mV/ECS. Cette différence significative de la quantité d'ions dans le milieu et du rapport [Co]/[Cr] se traduit par une nette diminution de viabilité des cellules (Figure V. 17). En effet, il est connu que les ions cobalt et chrome jouent un rôle important dans l'apoptose et la nécrose des macrophages et des ostéoblastes [235,337]. Bien qu'il a été montré que les ions  $\text{Co}^{2+}$  ont un effet nocif sur la viabilité des ostéoblastes [52,307,362], la dissolution transpassive du Cr (III) et la formation de Cr (VI) sont davantage susceptibles de produire des effets toxiques et sont les principaux responsables de la cytotoxicité des biomatériaux métalliques [50,55,362,397-399]. Ces ions sont, entre autres, responsables de la sécrétion de cytokines tels que IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  qui possèdent de multiples fonctions au sein de la réponse immunitaire et qui sont connues pour activer l'activité ostéoclastique responsable de la résorption osseuse.

Le chrome libéré par les échantillons CoCrMo polarisés à 500 et 700 mV/ECS existe dans deux états de valence physiologique :  $\text{Cr}^{3+}$  et  $\text{Cr}^{6+}$ . Les composés de chrome hexavalent, très solubles dans l'eau, pénètrent facilement dans les membranes cellulaires par les canaux physiologiques de transport des anions des cellules [400], tandis que la membrane plasmique est presque imperméable au  $\text{Cr}^{3+}$ . Une fois à l'intérieur de la cellule, le Cr (VI) est rapidement réduit par des enzymes réductrices en intermédiaires instables, tels que Cr (V) et Cr (IV) [401,402] et finalement en Cr (III). Au cours de sa réduction, des espèces réactives de l'oxygène produites sont considérées comme responsables des lésions de l'ADN et des dommages oxydatifs [14,403]. Les complexes formés subissent des réactions cycliques d'oxydation et de réduction et contribuent ainsi aux réactions redox qui engendrent la toxicité du métal libre. L'effet cytotoxique du Cr est attribué à l'action du  $\text{Cr}^{6+}$  qui agit au niveau de la membrane plasmique et du  $\text{Cr}^{3+}$  au niveau intracellulaire. Gunaratnam et al. ont rapporté en 2004 que le Cr (VI) induit la mort cellulaire par apoptose à de faibles concentrations (0,26  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), et par nécrose à des concentrations plus élevées (1,3 et 2,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [404]. Les ostéoblastes perdent leur viabilité après exposition au Cr (VI) à une concentration de 0,026  $\mu\text{g}/\text{L}$  pendant 48 heures. Ces résultats sont cohérents avec notre étude où la viabilité est extrêmement réduite à 700 mV/ECS, c'est-à-dire en présence de Cr(VI). Apparemment, le Cr (VI) inhibe l'activité de la collagénase et inhibe la synthèse des fibres de collagène ostéoblastique [405]. Le Cr (VI) interfère donc avec le renouvellement normal de l'os et sa libération à partir d'alliages CoCrMo favoriserait le descellement aseptique de l'implant, à la fois en détruisant les ostéoblastes et en réduisant leur capacité de synthèse de matrice osseuse. Il a également été démontré que le Cr(VI) cause une toxicité directe sur les cellules du système immunitaire *in vitro*. Il induit un stress oxydatif et l'apoptose des lymphocytes et des macrophages de souris [406,407]. Wang et ses collaborateurs [394] ont constaté que

les macrophages activés sécrétaient de 1,2 à 1,3 fois plus d'IL-1 $\beta$  en présence de chrome que les macrophages des cellules témoin. Une fois qu'une réponse inflammatoire est déclenchée, sa sévérité peut être augmentée en raison des niveaux d'ions métalliques, ce qui est en accord avec les taux élevés d'ions métalliques obtenus dans cette étude. La réactivité des macrophages est importante puisque *in vivo*, le site de lésion est dominé pendant les 2 premiers jours suivant l'intervention par les neutrophiles et les macrophages, qui libèrent des espèces réactives pour aider la cicatrisation de la plaie.

Il est extrêmement important dans la pratique clinique de connaître les niveaux supérieurs acceptables pour les ions métalliques : à partir de 7  $\mu\text{g/mL}$  il s'agit d'un motif d'inquiétude et au-delà de 30-50  $\mu\text{g/mL}$  l'intervention est envisagée [396]. Les limites supérieures sont définies pour le cobalt à 5  $\mu\text{g/L}$  dans le sang total et pour le chrome à 17  $\mu\text{g/L}$  dans les cellules (26). Ainsi, les concentrations d'ions de notre étude sont bien en deçà de cette limite, exceptée au potentiel le plus anodique. Toutefois, la viabilité des cellules est réduite à partir de 0,7 et 2,9  $\mu\text{g/mL}$ , ce qui suggère que d'autres mécanismes, comme par exemple la stimulation électrique, sont impliqués dans la réponse métabolique des cellules.

#### V. 5.4.c Limites

La comparaison entre la cytotoxicité des ions métalliques *in vitro* et les analyses des taux d'ions métalliques *in vivo* présente plusieurs limites. Tout d'abord, le site de prélèvement est d'une importance capitale : le ratio Co/Cr est dépendant de la distance par rapport à l'implant [331]. Dans cette étude, les taux d'ions métalliques d'un tissu prélevé du côté métallique ou polymère de la prothèse varient de 12-64 vs 0,21-1,34 ppm pour le Co et de 62-327 vs 0,34-8,32 ppm pour le Cr. Le rapport montre que l'emplacement des tissus *in vivo* doit être minutieusement renseigné pour faciliter la comparaison avec des résultats *in vitro*. Les ions Co et Cr tous deux absorbés par les tissus à une distance considérable de l'implant comme les ganglions lymphatiques abdominaux, le foie et la rate [408-410]. Les résultats suggèrent également que le cobalt est plus mobile que le chrome. Il n'est donc pas judicieux de considérer que seul le chrome demeure à la périphérie de l'implant [408].

Par ailleurs, certaines études ont constaté que la concentration de chrome est parfois plus élevée que celle du cobalt. Savarino et al. ont constaté que 41 % des patients présentaient des valeurs élevées de chrome (> 0,69 ng/mL) alors que seulement 22 % des cas présentaient une concentration élevée de cobalt (> 0,86 ng/mL) [294]. La prévalence de niveaux élevés de chrome pourrait être justifiée par le fait que le cobalt est transporté à l'écart du site implantaire et éliminé dans l'urine alors que le chrome est absorbé par les cellules, stocké et éliminé plus lentement. Cette présente étude *in vitro* ne permet pas de simuler la circulation des ions métalliques dans le fluide ce qui surestime très certainement les effets toxiques des ions métalliques sur les cellules.

Harmand et al. ont également noté une absorption significative des ions cobalt et chrome par les cellules ostéoblastes [379]. Etant donné l'absorption rapide de chrome par les cellules en général, on peut supposer qu'une quantité importante de chrome peut être retenue dans les cellules macrophages. De futurs travaux sont à prévoir pour discerner le taux d'absorption de produits de corrosion par les cellules macrophages.

Pour finir, il est reconnu que des augmentations significatives des quantités de chrome et de cobalt libérées dans les liquides organiques (plasma, sang, sérum et urine) sont exacerbées par l'usure des prothèses. *In vivo*, le nombre de débris d'usure de chrome provenant des films passifs augmente continuellement suite à l'endommagement par le contact tribologique. Il faut souligner que les débris d'usure solides peuvent être corrodés et libérer des ions métalliques au fil du temps. Ainsi, les ions métalliques ne doivent pas être interprétés comme le seul paramètre pour déterminer la stratégie

d'intervention médicale, mais également rendre en compte les données cliniques, radiographiques et implantaires.

## V. 6 CONCLUSION

Dans cette étude, les lignées cellulaires de macrophages ou d'ostéoblastes ont été utilisées pour simuler l'interaction tissu/biomatériau métallique. Nous avons choisi une méthodologie d'étude où les cellules sontensemencées sur un alliage CoCrMo et dans un milieu adapté à la culture cellulaire et aux techniques électrochimiques. Trois techniques sont envisageables :

- La production d'ions métalliques à partir de l'oxydation contrôlée du CoCrMo en contact direct des cellules cultivées sur la surface métallique.
- La complémentarité de la microscopie optique, électronique et à fluorescence, en fournissant des informations sur les mécanismes morphologiques de la réponse cellulaire.
- La combinaison de techniques analytiques telles que l'ICP-MS avec des outils d'essais électrochimiques pour mieux comprendre le principal mécanisme de corrosion en analysant la teneur en ions métalliques.

L'effet des ions métalliques et des potentiels anodiques sur la réponse des cellules cultivées à la surface d'un alliage de CoCrMo a été évalué par des analyses biologiques, des mesures électrochimiques et microscopiques. L'hypothèse évoquée en introduction sur l'existence d'une plage de potentiel de viabilité de l'alliage CoCrMo a été confirmée et a conduit aux conclusions suivantes :

1. Durant la colonisation à court terme, les ostéoblastes et les macrophages cultivés sur le CoCrMo améliorent les propriétés protectrices du film passif. Sa très faible dissolution dans le milieu de culture cellulaire n'affecte pas la viabilité/toxicité des cellules durant les trois premiers jours.
2. Les cellules utilisées dans cette étude semblent moduler les profils de libération des ions métalliques : les macrophages confèrent de meilleures propriétés au film passif du CoCrMo que les ostéoblastes, du fait de leur croissance rapide et de leurs fonctions intrinsèques (matrice extracellulaire réduite et libération d'espèces chimiques réactives).
3. Les macrophages semblent plus impliqués dans les réactions d'oxydoréduction que les ostéoblastes en raison de leur pouvoir oxydant et des transferts électroniques et ioniques à travers la membrane cellulaire.
4. Sous l'influence d'une différence de potentiel élevée, la membrane cellulaire se rompt et entraîne la formation de pores ou la fusion des membranes cellulaires, ce qui traduit un profond changement du métabolisme des cellules.
5. La dissolution du film passif, qui a lieu dès la fin du domaine passif (500 mV/ECS), libère un taux plus élevé de chrome que de cobalt, ce qui engendre une réduction significative de la viabilité des cellules.
6. Les ions métalliques mesurés *in vitro* réduisent la viabilité des cellules à des taux inférieurs que les seuils mentionnés toxiques *in vivo* du fait de l'environnement clos.

Ces travaux de recherche mettent en évidence l'effet des ions métalliques sur le métabolisme des macrophages et des ostéoblastes. Il a été démontré que les cellules influencent également les cinétiques des réactions électrochimiques et de ce fait, la formation et la dissolution du film passif du CoCrMo. Ces conclusions démontrent que l'interface cellules/biomatériau influence la biocompatibilité dès la phase d'adhérence et de colonisation.



---

# CHAPITRE VI

## PROPOSITION D'UN DISPOSITIF POUR L'ETUDE DE LA BIOTRIBOCORROSION

---

La caractérisation électrochimique du CoCrMo, établie dans les chapitres précédents, a été parachevée par l'ajout de contraintes mécaniques qui surviennent dans le contact articulaire de la prothèse de cheville. Ce dernier chapitre présente le développement d'un appareil de biotribocorrosion à des fins de validation. Les premiers résultats sont introduits en tant que perspectives à concrétiser.

### Sommaire

---

<b>VI. 1 Introduction</b> .....	<b>156</b>
<b>VI. 2 Notions bibliographiques sur la tribocorrosion des prothèses articulaires</b> .....	<b>156</b>
VI. 2.1 La tribologie.....	156
VI. 2.1.a Le frottement.....	156
VI. 2.1.b L'usure .....	156
VI. 2.2 La tribocorrosion des métaux passivables.....	158
VI. 2.3 Les systèmes expérimentaux pour l'étude de la tribocorrosion.....	159
VI. 2.4 Limites et défis pratiques des dispositifs de biotribocorrosion.....	160
VI. 2.5 Synthèse .....	162
<b>VI. 3 Développement d'un dispositif pour l'étude de la biotribocorrosion</b> .....	<b>163</b>
VI. 3.1 Origine et motivation .....	163
VI. 3.2 Cahier des charges de l'appareil de biotribocorrosion.....	163
VI. 3.3 Le dispositif expérimental .....	163
VI. 3.3.a Le système mécanique : le tribomètre .....	164
VI. 3.3.b La mesure électrochimique : le montage à trois électrodes .....	165
VI. 3.3.c Observation <i>in situ</i> des cellules vivantes .....	166
VI. 3.4 Les conditions environnementales.....	166
VI. 3.5 Utilisation du microscope à fluorescence dans l'analyse des particules d'usure.....	166
VI. 3.6 Synthèse des fonctionnalités du dispositif de biotribocorrosion.....	167
<b>VI. 4 Conclusion</b> .....	<b>167</b>

---

## VI. 1 INTRODUCTION

Les prothèses totales de cheville mettent en contact un composant en polyéthylène de très haut poids moléculaire (UHMWPE) associé à des équivalents métalliques. L'usure mécanique entre ces surfaces génère des produits de dégradation (nanoparticules, microparticules, ions métalliques et particules de polyéthylène) responsables de la défaillance de la prothèse. Libérés dans les tissus péri-prothétiques et dans le corps, ces produits de dégradation induisent une réponse inflammatoire. Les différents types de produits de dégradation résultent de l'action combinée de l'usure mécanique et des réactions électrochimiques, c'est-à-dire de la tribocorrosion.

Ce chapitre présente la dernière partie de ce travail de thèse, qui consistait au développement d'un dispositif de biotribocorrosion. L'objectif principal de cet appareil est de prendre en compte la contribution mécanique, simulant le contact articulaire, dans l'étude du comportement électrochimique du CoCrMo au contact des cellules. Ce dispositif permet de visualiser en temps réel des cellules vivantes fluorescentes sous charges et mouvements dynamiques d'un couple de frottement sélectionné.

## VI. 2 NOTIONS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LA TRIBOCORROSION DES PROTHESES ARTICULAIRES

La mécanique des contacts et la chimie structurale de la surface biomédicale métallique sont autant de facteurs à bien connaître pour améliorer la longévité et la durabilité, et réduire le descellement des implants [411]. Cette section traite brièvement de la friction, de l'usure et plus particulièrement de la tribocorrosion. Le développement et la présentation des dispositifs de tribocorrosion appliqués à l'étude des biomatériaux métalliques sont par la suite présentés, ainsi que leurs limites de conception.

### VI. 2.1 La tribologie

La tribologie est définie comme la science et la technique qui étudient le mouvement entre des surfaces qui interagissent. La tribologie est l'étude du frottement, de l'usure et de la lubrification [412,413].

#### VI. 2.1.a Le frottement

Le frottement est une force résistive qui se produit lorsque deux corps en contact sont déplacés l'un par rapport à l'autre [414]. La réponse de frottement de tout matériau est influencée par la structure du matériau, l'état de surface du matériau et le fait que le contact est lubrifié, sec ou corrosif [414]. Il est important de mesurer le frottement entre les surfaces de contact de deux corps. Il est défini par le coefficient de frottement (COF ou  $\mu$ ) (Eq VI. 1) où  $F_t$  est la force tangentielle et  $F_n$  la force normale entre deux corps en contact. Le coefficient de frottement peut être affecté par des changements chimiques, topologiques et structurels lors du contact glissant [414].

$$\text{COF} = \frac{F_t}{F_n} \quad \text{Eq VI. 1}$$

#### VI. 2.1.b L'usure

Dans la plupart des cas, l'usure entraîne une perte de matériau progressive qui peut entraîner une défaillance. Le taux de dégradation du matériau est principalement lié à l'état de surface des matériaux

de contact et aux conditions environnementales [414–416]. Le volume d'usure du matériau le plus mou peut être exprimé mathématiquement par la loi d'Archard selon l'équation suivante :

$$\frac{V}{L} = K \frac{F_n}{H} \quad \text{Eq VI. 2}$$

Où V est la perte de volume pendant le processus d'usure, L est la distance totale de glissement,  $F_n$  est la charge normale appliquée, H est la dureté des matériaux et K est le coefficient d'usure.

Il est courant de classer l'usure par les mécanismes qui la constitue. Quatre principaux mécanismes d'usure sont recensés, à savoir l'usure adhésive, l'usure par abrasion, l'usure par fatigue et l'usure par corrosion [416]. Les trois premiers sont les mécanismes les plus courants qui induisent les dommages de surface et la dégénérescence du polyéthylène dans les prothèses totales articulaires [417].

### 1. L'usure adhésive

L'usure adhésive se réfère au transfert d'un matériau d'une surface à une autre, causée par le soudage entre les aspérités opposées des surfaces de frottement durant un mouvement de glissement (Figure VI. 1).

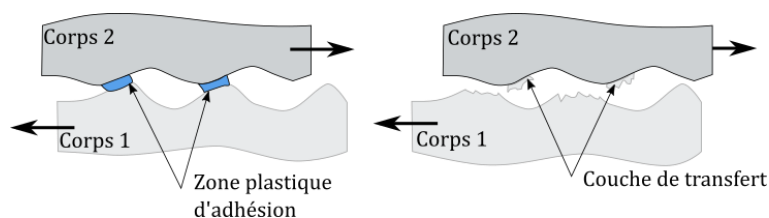


Figure VI. 1 Schéma de l'usure adhésive.

Dans le cas d'un contact métal/polyéthylène de prothèses articulaires, la liaison adhésive combinée à un mouvement relatif peut détruire les liaisons moléculaires cohésives du polyéthylène et par conséquent, libérer des débris dans les tissus environnants. En raison de la forte affinité des métaux pour le carbone et l'hydrogène, une forte adhérence entraîne le transfert du polymère à la surface du métal [417,418] Le comportement adhésif du polyéthylène varie considérablement en fonction des propriétés de surface des matériaux [419].

### 2. L'usure par abrasion

L'usure abrasive est due à des particules ou à des protubérances dures qui sont en contact et se déplacent le long d'une surface solide. Selon le type de contact, il peut se produire une abrasion à deux ou trois corps comme le montre la Figure VI. 2 [420].

Dans le cas des prothèses totales articulaire, l'usure abrasive du polyéthylène est presque indépendante du matériau de la contre-pièce (métallique ou céramique), et elle est principalement fonction de la rugosité des pièces [417]. Elle conduit à un micro usinage du polyéthylène à l'origine de débris d'usure.

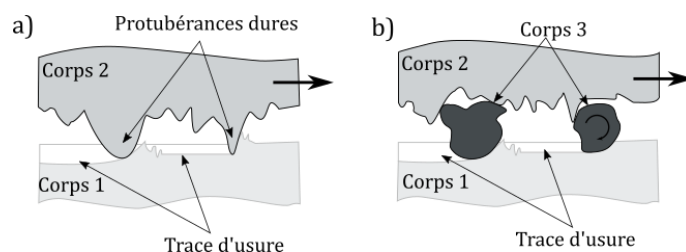


Figure VI. 2 Schéma de l'usure abrasive entre a) deux corps (protubérances dures) et b) trois corps (particules).

### 3. L'usure par fatigue

L'usure par fatigue se produit lorsqu'il y a une charge cyclique alternée et répétée pendant l'usure. Ce type d'usure se caractérise par la formation de microfissures dues aux contraintes superficielles. L'évolution de la structure du matériau conduit à la formation de fissures superficielles [26, 28].

### 4. L'usure par corrosion ou tribocorrosion

La tribocorrosion désigne le processus conduisant à l'endommagement de la surface d'un matériau sous les effets conjugués d'une sollicitation mécanique de contact (frottement, impact) et de la corrosion par un milieu corrosif [421,422]. L'étude de la tribocorrosion consiste à déterminer l'effet de synergie résultant du couplage entre sollicitations mécaniques et corrosion. En effet, la dégradation mesurée est généralement plus élevée que la somme de l'endommagement mécanique en l'absence de corrosion ou de l'usure corrosive sans sollicitation en frottement.

#### VI. 2.2 La tribocorrosion des métaux passivables

La tribocorrosion des métaux passivables implique l'existence de deux contributions, dont l'une est majoritaire selon les cas : la corrosion induite par l'usure et l'usure induite par la corrosion [151,423–426]. Si un métal passivable est soumis à un contact glissant dans un environnement corrosif, trois phénomènes peuvent avoir lieu :

- i) La formation d'un film lubrifiant dans la zone de contact, qui peut inhiber à la fois la corrosion et l'usure.
- ii) L'établissement d'un film mince d'oxyde, qui est ensuite éliminé et reformé continuellement, ce qui entraîne une augmentation du taux d'usure. Le film est éliminé chaque fois qu'il atteint une épaisseur critique [420]. La corrosion est induite par l'usure et se produit de préférence aux aspérités microscopiques.
- iii) La formation de piqûres à la surface de la zone usée, induites par le pouvoir oxydant de la solution comme la concentration en chlorures [427–429]. Ceci entraîne un couplage galvanique au sein même de l'alliage métallique (fond de piqûre et zone non corrodée), et par conséquent, une accélération de la corrosion [430]. L'usure est induite par la corrosion.

L'élimination du film passif varie en fonction des paramètres de frottement comme la fréquence de glissement et la charge appliquée [426]. Lorsque cette dernière est élevée, l'action mécanique domine et le film passif se rompt ce qui diminue la résistance à la corrosion. Une fréquence de contact rapide conduit à une dépassivation plus fréquente de la surface métallique. Pour les métaux passivables ayant des capacités rapides de repassivation, la dégradation totale provient majoritairement de l'usure accélérée par la corrosion. Ceci est d'autant plus prononcé lorsque la charge appliquée est élevée et la fréquence de glissement de contact lente. Ainsi, la dégradation causée par l'usure mécanique entre les pièces des prothèses articulaires dépend certes des conditions de charge et de lubrification, mais également des processus de corrosion.

Plusieurs approches quantitatives et modèles ont été établis pour décrire et comprendre la synergie entre usure et corrosion [431]. Pour autant, ils ne seront pas abordés ici au vue de l'état d'avancement précoce des résultats de biotribocorrosion obtenus.



## VI. 2.3 Les systèmes expérimentaux pour l'étude de la tribocorrosion

Pour étudier le comportement de la tribocorrosion d'un tribosystème, il faut recueillir les réponses mécanique et électrochimique. Le dispositif de base comprend : **i**) un tribomètre, qui permet de mesurer l'évolution du coefficient de frottement et de surveiller la réponse tribologique et **ii**) un potentiostat relié à un montage à trois électrodes qui mesure la réponse électrochimique (courant ou potentiel) (Figure VI. 3). Les tribomètres ont habituellement une configuration pion/bille-sur-plan [432,433] composée d'un échantillon métallique plat au contact d'un pion de friction inerte (céramique [196], zircone [434], oxyde d'aluminium [258,435–438], nitrure de silicium [118] ou carbure de tungstène [439]). Les fluides physiologiques simulés sont d'une grande variété : solution de chlorure de sodium, solution tampon de phosphate (PBS), solution de Hank, sérum bovin [110,130,132,134,153,175,440,441]. Ainsi, les dispositifs de tribocorrosion permettent de simuler les conditions *in vivo* des prothèses articulaires, c'est-à-dire les interactions synergiques d'usure et de corrosion en produisant des produits de dégradation [119,164,272,376,390,442].

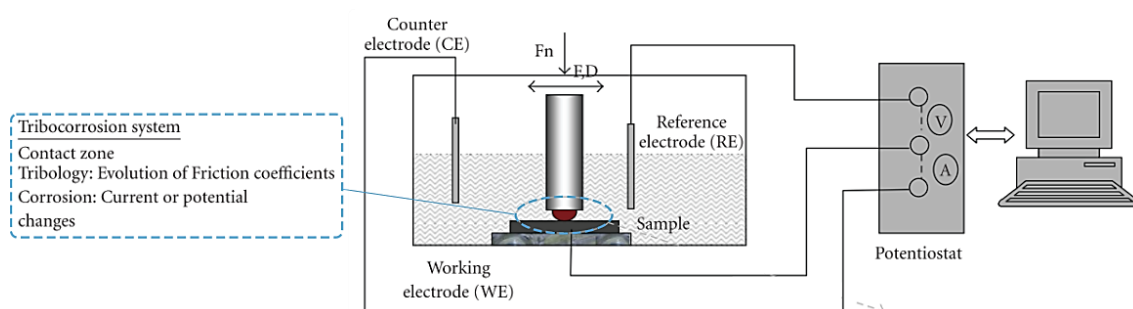


Figure VI. 3 Dispositif classique pour l'étude de la tribocorrosion. Il inclut un tribomètre pion/plan et un montage électrochimique [443].

## Techniques électrochimiques pour l'étude de la tribocorrosion

La mesure du potentiel de circuit ouvert ( $E_{OCP}$ ) d'un échantillon métallique, utilisée au cours de frottement continu ou alternatif, évalue son état de dissolution réel. La valeur du potentiel  $E_{OCP}$  correspond à une valeur globale qui dépend [444] : **i**) De la force électromotrice induite par l'hétérogénéité de surface résultant de la coexistence de zones frottées et non frottées dans des états électrochimiques différents, **ii**) Des aires respectives des zones frottées et non frottées, car le potentiel global résulte d'un couplage galvanique et **iii**) De la répartition spatiale de ces zones. Il en résulte une distribution non uniforme du potentiel sur l'ensemble de la surface. Le potentiel  $E_{OCP}$  sous frottement est une valeur moyenne dépendant de cette distribution [444]. Les fluctuations du potentiel  $E_{OCP}$  renseignent de l'évolution des phénomènes à la surface de l'échantillon (dissolution/repassivation).

A une échelle dilatée, l'évolution du potentiel ou du courant révèle des transitoires induits par le mouvement alternatif du pion sur la surface du matériau [131,444,445]. Ces transitoires informent sur la capacité des alliages à se repassiver et donc sur le taux de libération d'ions en solution induit durant les cycles de dissolution/repassivation. La Figure VI. 4 illustre les évolutions des transitoires pendant un essai de tribocorrosion au potentiel de circuit ouvert. Ils peuvent être séparés en deux parties :

- Pendant le frottement, le potentiel chute rapidement et le courant augmente traduisant une destruction du film passif sous le déplacement du pion ; il s'agit d'une dépasseivation ou une activation de la zone frottée.

- Pendant le temps de latence, le potentiel s'anoblit, caractérisant un phénomène de repassivation de la trace d'usure. Il est possible de rendre compte de la vitesse de destruction du film passif par l'évolution de la valeur absolue de la pente de chute de potentiel [131]. Durant le temps de latence, le courant chute puisque le film passif reformé protège à nouveau la surface précédemment mise à nu. L'aire sous la courbe  $I(t)$  pendant le temps de latence correspond à la quantité de charges nécessaire à la reconstruction des couches endommagées (oxydes, film passif) (Figure VI. 4).

A chaque chute de potentiel, la structure du film passif est altérée. La modification du champ électrique superficiel peut donc affecter les processus biologiques dans le tissu adjacent.

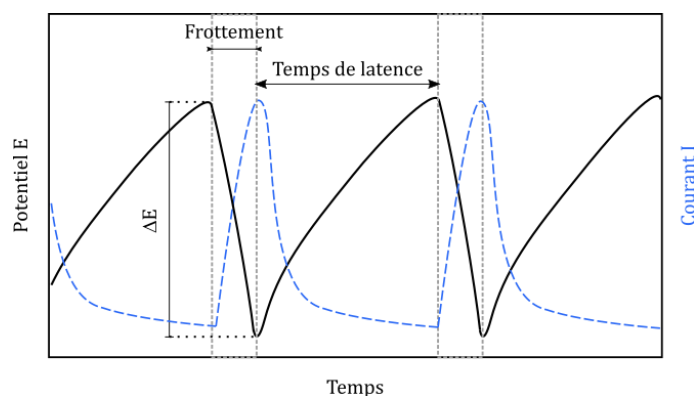


Figure VI. 4 Exemple d'évolution simultanée du potentiel et du courant pendant un essai de tribocorrosion.

Il faut toutefois noter qu'il est très peu probable que le potentiel des biomatériaux métalliques atteigne les niveaux nécessaires pour induire un comportement transpassif *in vivo*. Les surfaces sont plus susceptibles d'avoir un potentiel négatif à l' $E_{OCP}$  suite à l'abrasion mécanique [239].

Les essais de tribocorrosion peuvent également être effectués sous potentiel constant (cathodique ou anodique), où la variation de la densité de courant due à l'usure est mesurée. Pour comprendre et caractériser les films passifs formés à la surface de contact sous frottement lors d'essais de tribocorrosion, la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) peut être appliquée avant et après frottement.

#### VI. 2.4 Limites et défis pratiques des dispositifs de biotribocorrosion

Actuellement, les différentes conceptions de tribomètres conduisent à la production bien contrôlée de débris d'usure dans une grande variété de solutions salines diluées. Malgré cela, les débris d'usure retirés des simulateurs sont géométriquement plus gros (taille et forme) que les particules extraites des tissus péri-prothétiques [446,447]. De plus, la concentration de débris et d'ions produits artificiellement est difficile à maintenir analogue à celle relevée dans les tissus péri-articulaires, ce qui réduit la fiabilité des tests de cytotoxicité de ces produits de dégradation associés à l'ostéolyse. Il est important de considérer que la toxicité des produits de dégradation *in vivo* peut être le résultat cumulatif des différentes formes de débris d'usure et d'ions métalliques. L'écart entre les produits de dégradation simulés et réels pourrait être lié à la méthodologie de production des produits de dégradation, ce qui soulève la question de la validité des tribomètres actuels. La disparité des résultats peut s'expliquer par le manque de représentativité des conditions expérimentales.

Premièrement, la prothèse de cheville induit un mouvement entre des composants métalliques et un insert en polyéthylène. Seules quelques études ont examiné les processus de « tribocorrosion » à l'interface entre un métal et un polymère [448–450]. L'utilisation d'un pion inerte au lieu du polymère induit de

profonds changements dans la nature et la forme des particules d'usure et le mécanisme d'usure simulé pour ces prothèses articulaires.

Deuxièmement, les protocoles d'isolement des particules provenant des tissus périprothétiques (*in vivo*) ou des liquides organiques simulés (*in vitro*) peuvent être sujets de controverse [451,452]. Habituellement, ils incluent une étape de digestion (acide, basique ou enzymatique) [452], qui peut alors modifier considérablement la surface chimique des débris [453]. Les réactifs utilisés digèrent les protéines entourant les particules et éliminent ainsi l'effet protecteur contre l'action oxydante des solutions [454]. Les particules d'alliage de cobalt sont notamment sensibles à l'ionisation et à l'oxydation par les solutions alcalines [454]. Le procédé d'isolement des particules comprend également une étape de filtration avec des papiers filtrants de différentes tailles de pores, du nanomètre au micromètre. L'utilisation de tailles différentes induit une perte des particules d'usure solides mais surtout l'exclusion des ions métalliques résultant de la dissolution des métaux [452]. Il faut donc éviter d'utiliser des particules d'usure obtenues suite à un procédé d'isolement pour tester leur biocompatibilité.

Troisièmement, les fluides physiologiques simulés sont simplifiés malgré l'addition de sérum bovin ou d'espèces organiques comme les protéines [118]. Le fluide a un rôle notable puisqu'il conditionne la réactivité de surface des biomatériaux métalliques en modifiant la composition, la structure et l'épaisseur du film passif et par conséquent il régit leur biocompatibilité (Chapitres III et IV). Le milieu environnant, qui sert de réceptacle aux produits de dégradation par tribocorrosion, influence également la réactivité de surface des débris d'usure [328] et la complexation des ions métalliques [173,455]. Enfin, l'environnement physiologique contribue à la prolifération cellulaire en apportant des nutriments essentiels (vitamines et facteurs de croissance) au métabolisme des cellules. Il est source de carbonates et d'oxygène, ce qui maintient le pH et l'osmolarité dans des limites acceptables. Les protéines adsorbées du fluide physiologique peuvent contrôler l'adhésion des cellules aux biomatériaux [169] et ainsi modifier la biocompatibilité des alliages métalliques. Le milieu *in vitro* a de nombreuses fonctions et ne doit donc pas être trop simplifié pour comprendre son implication dans les études de tribocorrosion.

Quatrièmement, les dispositifs de tribocorrosion sont limités pour évaluer simultanément la dégradation des biomatériaux soumis à la tribocorrosion et la réponse inflammatoire des cellules. Le manque de développement de ces dispositifs biomédicaux spécifiques s'explique certainement par des difficultés de conception (connaissances pluridisciplinaires, couplage des mesures, stérilité). Pourtant, les produits de dégradation de la tribocorrosion (débris et ions) entraînent une réponse cellulaire négative impliquant des ostéoblastes, des fibroblastes et des cellules immunitaires dans le mécanisme périprothétique de l'ostéolyse. La cible cellulaire la plus importante pour les débris d'usure est le macrophage, qui contribue à augmenter la résorption osseuse. Les débris d'usure de taille micrométrique inférieure à 1 µm peuvent être phagocytés par ces cellules. Les particules de polyéthylène ou de métal activent la signalisation pro-inflammatoire, ce qui entraîne une augmentation du recrutement et de l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes dans l'espace articulaire (enzymes protéolytiques, médiateurs inflammatoires et ostéolytiques) [456–459]. Bien que de plus en plus d'études évaluent l'influence des débris d'usure et des ions métalliques sur les macrophages [460], il est très difficile de recueillir et d'analyser ces produits de dégradation lorsqu'ils sont produits dans un contenant séparé de celui dans lequel se déroule la culture cellulaire. La biocompatibilité des prothèses articulaires est généralement évaluée par des techniques biologiques de suivi dans le temps (viabilité, prolifération et minéralisation) ou d'analyse des cytokines inflammatoires dans le surnageant [53,337]. L'observation directe de cellules vivantes pendant les tests permet de compléter les analyses biologiques postérieures aux tests. Cependant, il s'agit d'une tâche difficile car elle nécessite des appareils de microscopie puissants pour l'acquisition, la régularité des mesures et le traitement avancé des images. Par ailleurs, les techniques biologiques sont applicables à un seul échantillon, telle qu'une boîte de Pétri ou un puits, pour lequel il est difficile de combiner plusieurs

mesures successives. Il serait intéressant d'obtenir plusieurs échantillons de cellules d'un même puits de fonctionnement, c'est-à-dire de cellules ayant subi exactement les mêmes conditions expérimentales, pour les soumettre à différents tests biologiques.

Enfin, la plupart des tribomètres fonctionnent généralement dans un environnement aéré et ne contrôlent donc pas le niveau de CO<sub>2</sub> qui maintient le pH de la solution dans une plage viable pour les cellules. Ceci confirme que les tribomètres actuels ne sont pas adaptés aux conditions cellulaires. Certaines études récentes proposent des dispositifs de tribocorrosion, qui peuvent être insérés dans un incubateur ou enfermés dans des chambres thermostatiquement contrôlées [461]. Ce sont des exemples prometteurs à suivre pour évaluer encore plus précisément la biocompatibilité des biomatériaux métalliques en contact direct des cellules. Le principal avantage d'un tel dispositif est la régulation globale des facteurs environnementaux en les maintenant fixes et adaptés aux conditions cellulaires.

### VI. 2.5 Synthèse

Un contact donne lieu à différents types d'usure qui dépendent de la nature des composants et des paramètres mécaniques (charge, vitesse de frottement, rugosité). L'étude de la tribologie dans le domaine biomédical est d'une grande importance puisque les effets induits par la charge mécanique sont couplés aux réactions (électro)chimiques à l'interface entre le biomatériau et le liquide physiologique. Ceci conduit généralement à une synergie, entraînant une accélération des dommages, une usure et une perte de fonctionnalité des implants médicaux. Le frottement modifie le comportement électrochimique et la résistance à la corrosion des surfaces métalliques, tandis que les réactions de corrosion affectent la composition en surface des matériaux (espèces adsorbées, couches de produits de corrosion). D'autres aspects mécaniques comme la déformation élastique, la déformation plastique peuvent affecter les surfaces couvertes de film d'oxydes.

La recherche sur la tribocorrosion comporte de nombreux défis, comme l'élaboration d'appareil d'essai normalisé. Plusieurs méthodes intéressantes pour l'évaluation systématique de la tribocorrosion des alliages métalliques dans des solutions physiologiques ont été récemment développées. Il est important de préciser que dans le corps humain, il y a des facteurs supplémentaires liés aux processus biologiques.

### VI. 3 DEVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF POUR L'ETUDE DE LA BIOTRIBOCORROSION

Cette partie présente les caractéristiques d'un dispositif de biotribocorrosion développé au cours des derniers mois de la thèse. Ses fonctionnalités sont présentées par champs disciplinaires.

#### VI. 3.1 Origine et motivation

Le développement du dispositif de biotribocorrosion a été mené en améliorant un dispositif biotribométrique (ou bioréacteur) déjà existant [462]. La littérature a permis de mettre en évidence les limites des appareils actuels quant à la représentativité du contact articulaire. C'est sur la base de ces appareils que le dispositif de biotribocorrosion a été conçu. Les adaptations ont concerné les domaines de l'électrochimie, de la tribologie et de la biologie dans le but de simuler le contact articulaire en incluant les conditions physiologiques cellulaires représentatives du contact prothétique articulaire.

Ce dispositif a été développé conjointement entre les laboratoires MATEIS et LaMCoS dans le cadre d'un projet Bonus Qualité Recherche octroyé par le conseil scientifique de l'INSA de Lyon.

#### VI. 3.2 Cahier des charges de l'appareil de biotribocorrosion

Les trois caractéristiques retenues pour le développement du dispositif de biotribocorrosion sont :

1. L'exigence des conditions de culture cellulaire (milieu de culture cellulaire, température, tampon de pH, stérilité), permettant l'ajout de macrophages vivants près du contact articulaire simulé. Ces cellules sont notamment plus impliquées dans les premières étapes de la réaction inflammatoire.
2. L'utilisation de la microscopie à fluorescence pour évaluer *in situ* la prolifération des cellules vivantes (densité, morphologie) et pour visualiser les débris d'usure polymères fluorescents présents dans l'environnement ou sur les surfaces de friction.
3. L'élimination des étapes intermédiaires (digestion et/ou filtration) dans l'analyse des produits de dégradation (débris d'usure et ions métalliques) qui peuvent modifier leur réactivité et leur nature cytotoxique.

#### VI. 3.3 Le dispositif expérimental

L'un des avantages du système de biotribocorrosion est la complémentarité des mesures entre les différents domaines disciplinaires. En effet, il est possible de visualiser les cellules vivantes *in situ*, en mesurant simultanément la corrosion et les indicateurs mécaniques lors des essais de tribocorrosion. Pour ce faire, plusieurs instruments de mesure ont été intégrés tels qu'un potentiostat, un microscope à fluorescence et un enceinte thermostatée (Figure VI. 5a).

Le dispositif de biotribocorrosion est présenté selon trois sous-sections relevant de trois champs disciplinaires (mécanique, électrochimie, biologie).

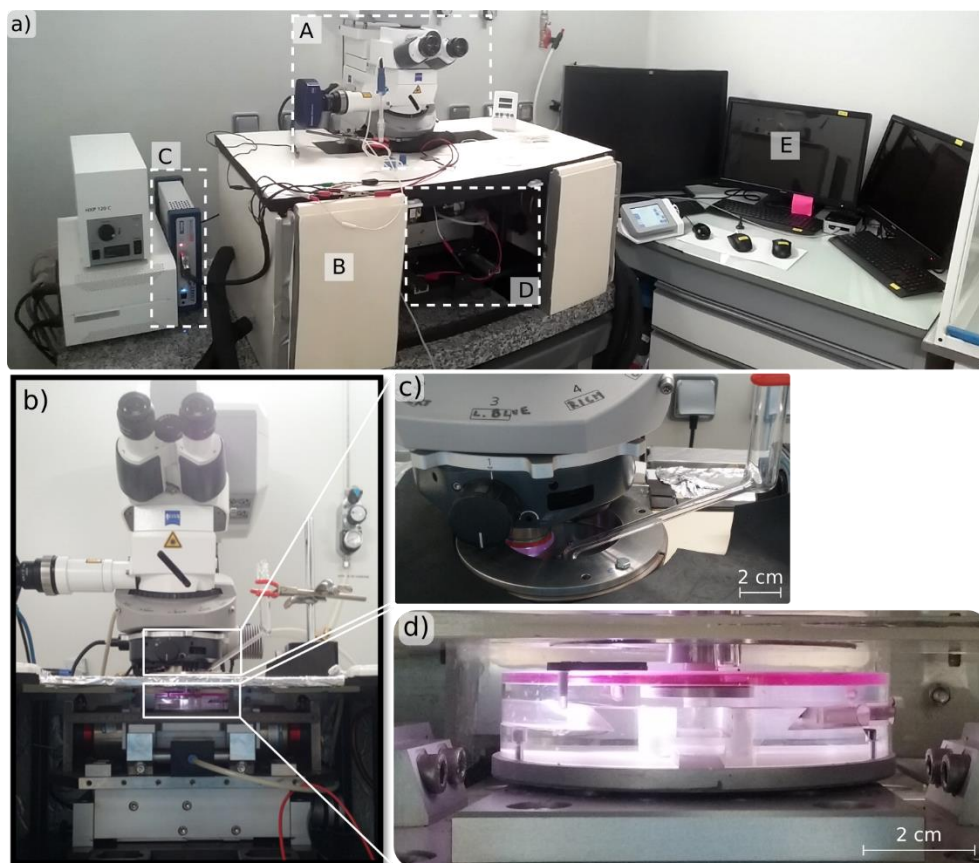


Figure VI. 5 a) Appareil de biotribocorrosion comprenant : A) Le microscope à fluorescence, B) l'enceinte thermostatique sur mesure, C) le potentiostat, D) les appareils de tribocorrosion et E) les calculateurs d'acquisition de données. Agrandissements b) de la colonne microscopique et tribologique, c) de l'insertion de l'objectif dans la porte échantillon et d) de la cellule électrochimique.

### VI. 3.3.a Le système mécanique : le tribomètre

Le tribomètre a été monté selon une configuration pion-sur-plan avec mouvement alternatif, ce qui permet de prendre en compte un nombre intéressant de cycles et des temps de latence nécessaires à la simulation des cycles de charge comme celui de la marche.

Le tribomètre se caractérise par un bâti fixe qui maintient le porte pion tandis que le porte échantillon plat est mobile (Figure VI. 6). Les mouvements de translation et la charge sont appliqués par la partie inférieure du système. Le porte échantillon est fixé à une table élévatrice (NORELEM, France), qui permet la mise en contact des éléments et d'appliquer la charge souhaitée. Celle-ci est mesurée par un capteur de force à 3 axes ( $K3D60 \pm 100$  N, Testwell, France) et est maintenue constante par une boucle d'asservissement. La force tangentielle est mesurée par un capteur piézoélectrique (PZ 100 SG, TRIOPTICS, France). Le coefficient de frottement (COF) est défini comme le rapport entre la force tangentielle et la force normale. Le déplacement horizontal du porte-échantillon est piloté par un moteur linéaire à courant continu (H2W Technologies, USA), qui impose des mouvements alternatifs de translation.

L'ensemble du tribomètre est piloté par une version modifiée du logiciel Galil (A2V Mecatronique, France), rebaptisé Biolub. Il permet de visualiser en temps réel la force normale  $F_z$ , la force tangentielle  $F_y$ , le déplacement vertical  $D_z$  et le déplacement horizontal  $D_x$ .

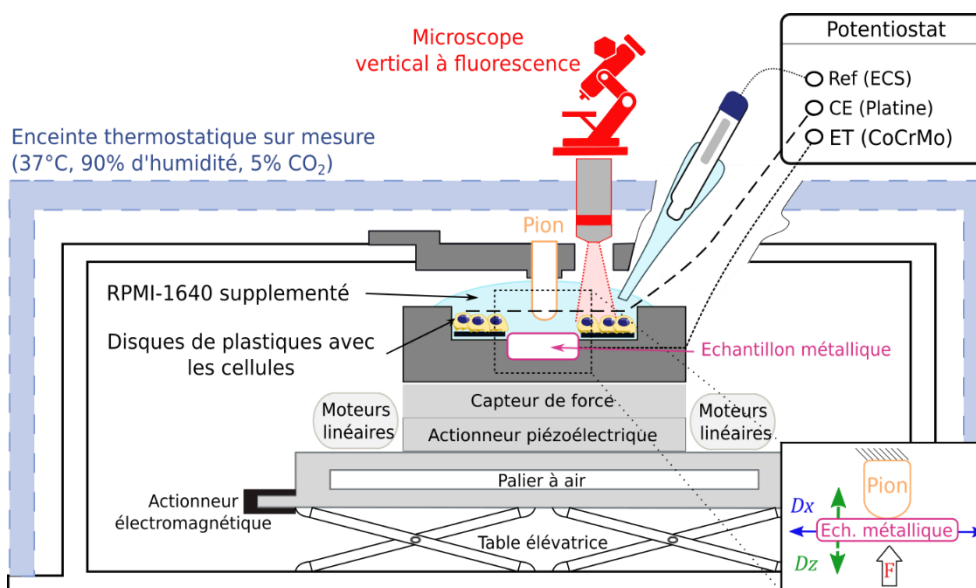


Figure VI. 6 Vue schématique de l'appareil expérimental de biotribocorrosion adapté aux conditions cellulaires. Il se compose d'une configuration conventionnelle à trois électrodes, d'un système tribologique pignon sur plan et d'un microscope à fluorescence verticale dans une enceinte thermostatique personnalisée.

### VI. 3.3.b La mesure électrochimique : le montage à trois électrodes

L'ajout d'un montage à trois électrodes permet de compléter la mesure mécanique. Il s'agit du même montage que celui des Chapitres IV et V. L'électrode de travail est un alliage métallique conducteur, comme le CoCrMo, connecté par un adhésif de cuivre. L'isolation électrique a été vérifiée par mesure du potentiel. L'électrode de référence (ECS) a été décentrée par un capillaire de Luggin (Figure VI. 7). La contre électrode est un fil de platine placé autour de l'électrode de travail. La réponse électrochimique du disque métallique est évaluée en mesurant le potentiel en circuit ouvert ( $E_{OCP}$ ) avant, pendant et après le test de friction.

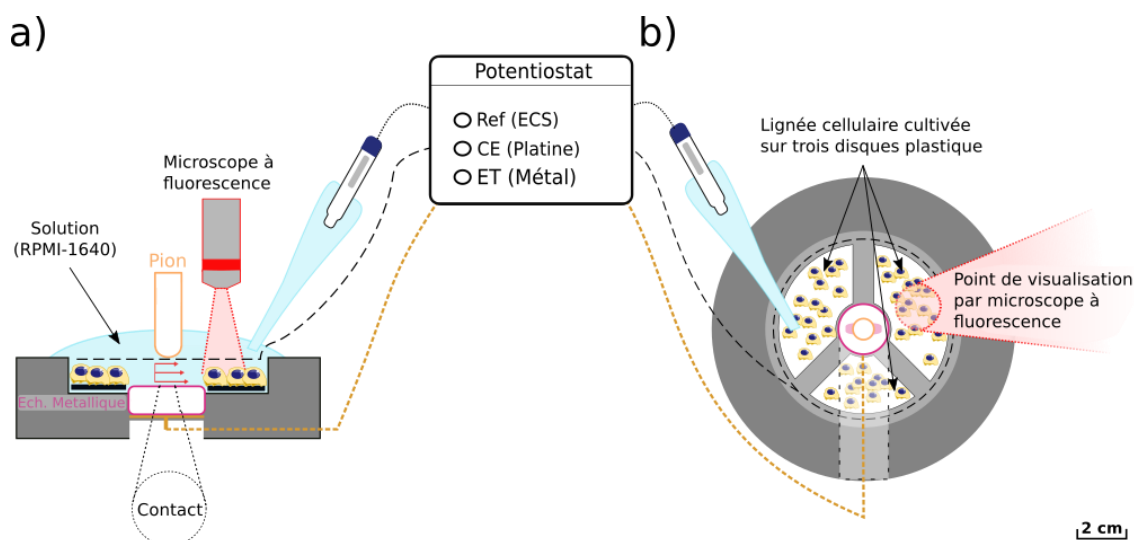


Figure VI. 7 Vue latérale (a) et vue de dessus (b) du support de l'échantillon métallique. Il comprend le montage électrochimique : un disque métallique comme électrode de travail (ET), un fil de platine comme contre-électrode (CE) et une électrode au calomel saturé (ECS) comme électrode de référence et trois disques usinés dans une boîte de Pétri avec les cellules.



### VI. 3.3.c Observation *in situ* des cellules vivantes

L'utilisation de la microscopie à fluorescence appliquée à la biologie permet l'acquisition d'images de cellules vivantes. En effet, l'ajout de fluorochromes permet de cibler un élément subcellulaire spécifique et de mesurer ainsi les modifications métaboliques ou physiologiques rapides dans les cellules vivantes (principe de la microscopie confocale à fluorescence en Annexe 6). Les analyses tribologiques et électrochimiques sont complétées par une visualisation *in situ* des lignées cellulaires autour du contact à l'aide d'un microscope optique à lumière et à fluorescence verticale (Zeiss Axio Examiner Z1, Leica DMLM). Le microscope est équipé d'une caméra CCD (Leica DC350F) avec deux objectifs : le "Fluar" 5x/0,25 M27 (distance focale = 12,5 mm) et N-Achroplan 63x/0,9 M27 (distance focale = 2,4 mm) et de deux lignes laser (488 et 555 nm) reliées à une caméra de fluorescence (caméra Axio 60 N-C).

### VI. 3.4 Les conditions environnementales

- L'enceinte thermostatée sur-mesure

Pour obtenir la température et la concentration appropriées des gaz dissous (oxygène et dioxyde de carbone) présents dans l'environnement corporel, les essais ont été effectués dans une enceinte thermostatée adaptée au dispositif de biotribocorrosion (Figure VI. 6). Elle permet de maintenir une température (37°C), un taux d'humidité (90%) et une atmosphère (5% de CO<sub>2</sub>) stables nécessaires au développement des cellules. La conception répond également à d'autres exigences : **i)** l'enceinte couvre le montage mécanique du tribomètre, **ii)** elle ne doit interférer ni avec l'observation des cellules au microscope à fluorescence ni avec le déroulement des essais de tribocorrosion, **iii)** elle est isolée thermiquement et étanche aux gaz.

La température est maintenue constante à 37°C par un bain thermostaté (Polystat 37, Fisherbrand, Fisher Scientific) à travers des tubes de cuivre de part et d'autre à l'intérieur de l'enceinte. La température est contrôlée par un thermomètre numérique. La teneur en CO<sub>2</sub> (N48, Air Liquide, France) est contrôlée par un capteur sans fil (PASCO, PS-3208) piloté par le logiciel PASCO Capstone. L'humidité est maintenue par deux béciers remplis d'eau distillée installés dans l'enceinte.

- Salle blanche ISO Classe 5

Les essais de biotribocorrosion ont été réalisés dans une salle blanche (ISO Cleanliness Class 5) située au LaMCoS (INSA Lyon, UMR5259 CNRS). L'environnement maintient un niveau de propreté équivalent à la classe de propreté ISO 5. Les principaux paramètres qui contrôlent la performance environnementale de la salle blanche sont : la mesure des débits d'air, et la différence de pression. En ajustant les débits d'air, une pression différentielle positive peut être créée pour empêcher l'introduction de contaminants potentiels provenant de la salle blanche environnante.

### VI. 3.5 Utilisation du microscope à fluorescence dans l'analyse des particules d'usure

Le dispositif de biotribocorrosion développé intègre un microscope à fluorescence qui peut servir à l'analyse des débris d'usure de polyéthylène grâce à leurs propriétés fluorescentes. Il est envisageable d'obtenir la dispersion et le nombre de particules de polyéthylène présent dans la trace d'usure du contre matériau. De plus, après gélicification du milieu de culture cellulaire, il serait possible de recenser la taille et la morphologie de chaque particule de polymère, en suivant les indications décrites dans la norme



ASTM F1877 [66]. La gélification a l'avantage principal de conserver la forme originelle des débris d'usure.

### VI. 3.6 Synthèse des fonctionnalités du dispositif de biotribocorrosion

Le dispositif de biotribocorrosion a été développé pour simuler les conditions physiologiques du contact prothétique articulaire. Sa spécificité principale réside dans la capacité à accéder simultanément à des mesures de corrosion et à la visualisation *in situ* de cellules vivantes par fluorescence sous charges et mouvements dynamiques d'un tribosystème. Cela signifie qu'il est possible de produire des produits de dégradation dans l'environnement même où les cellules sont cultivées.

Les variables d'entrée sont multiples et reliées à trois domaines disciplinaires : l'électrochimie, la biologie et la tribologie (Figure VI. 8). L'éventail des conditions expérimentales couvre le vaste champ de la biotribocorrosion, fournissant une mine d'informations sur la synergie des mécanismes. Appliqué au contact articulaire, le dispositif de biotribocorrosion fournit des informations sur la dégradation des composants de la prothèse (dissolution ionique du biomatériau métallique et usure mécanique d'un insert polyéthylène) et leur toxicité pour les cellules périprothétiques.

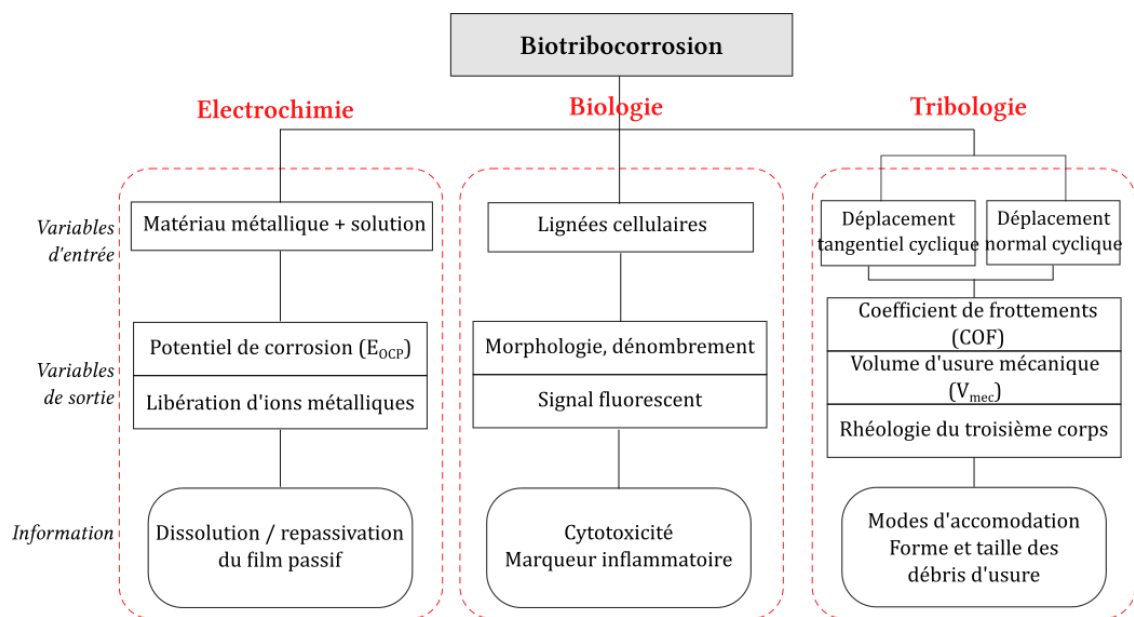


Figure VI. 8 Diagramme synthétique d'expériences de biotribocorrosion avec des variables d'entrée et de sortie complétées par des techniques de caractérisation.

## VI. 4 CONCLUSION

Le dispositif de biotribocorrosion développé au cours de cette thèse combine des techniques mécaniques, biologiques et électrochimiques. Une attention particulière a été accordée aux exigences relatives à la culture cellulaire et à la visualisation *in situ* des cellules autour d'un contact frottant. Le développement de ce dispositif a été le travail de plusieurs mois et la validation de ses fonctionnalités n'a pu être achevée complètement. La section suivante présente les premiers résultats sous forme de perspectives et vise à illustrer le potentiel du dispositif expérimental.

## PREMIERS ESSAIS SUR LE DISPOSITIF DE BIOTRIBOCORROSION : ILLUSTRATION D'UN CONTACT CoCrMo/POLYETHYLENE

---

Pour valider la bonne fonctionnalité du dispositif expérimental de biotribocorrosion, il aurait fallu réaliser des tests aux multiples conditions expérimentales. Pour autant, seuls deux tests ont pu être entrepris. La compréhension des résultats obtenus n'est donc pas achevée, toutefois leur présentation permet de percevoir le potentiel d'un tel dispositif et de définir de futures perspectives de travail. Les hypothèses formulées ici doivent être vérifiées par des travaux complémentaires.

Le terme de « biotribocorrosion » s'applique aux fonctionnalités du dispositif puisqu'il permet une approche multidisciplinaire. L'étude illustrative choisie pour valider l'appareil expérimental fait référence au contact articulaire réel de la prothèse de cheville, c'est à dire au couple polyéthylène/CoCrMo.

### I. Conditions expérimentales

Les matériaux et couple de frottement : Le tribosystème met en jeu un disque de CoCrMo et un pion arrondi de UHMWPE. La valeur de la charge a été fixée en fonction de celle de compression moyenne réelle appliquée aux prothèses de chevilles, qui varie entre 3 et 5,2 fois le poids corporel [21,463]. Elle correspond à une pression de contact de 5,7 à 25 MPa [23,34,38]. Etant donné le rayon de courbure du pion de UHMWPE de 48 mm, la force appliquée était de 35 N pour obtenir une pression de contact de 10 MPa (contact hertzien détaillé en Annexe 7).

Le liquide physiologique simulé : Le milieu de culture cellulaire RPMI-1640 supplémenté à 10% en sérum de veau fœtal et 1% en antibiotiques a été utilisé (12 mL). Il sert à la fois de support vital à la croissance cellulaire et de réceptacle aux produits de dégradation générés.

Les cellules : Les macrophages murins RAW 264.7 ont été sélectionnés car ce sont les principales cellules associées à la phagocytose particulaire dans la réaction inflammatoire à l'interface os-implant. La densité d'ensemencement est comprise entre 3 et  $5 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> et a été contrôlée par un compteur cellulaire (Millipore™ Scepter, Dutscher). La viabilité et la morphologie cellulaire ont été évaluées à l'aide d'un marqueur de membrane lipophile (colorant dialkyle aminostyryle : Dil, Thermofisher,  $\lambda_{ex/em} = 549/565$  nm) ou de pH intracellulaire (pHrodo™ Red AM, Thermofisher,  $\lambda_{ex/em} = 560/585$  nm). Les cellules ont été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), incubées avec 5  $\mu$ l de Dil dilués dans 6 mL de RPMI-1640 ou avec 60  $\mu$ l de pHrodo™ pendant 30 minutes puis lavées avec du PBS. Des images de microscopie par fluorescence ont été réalisées *in situ* lors des essais. Les caractéristiques morphologiques des cellules ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, USA) par traitement de binarisation, analyse de la surface des particules et calcul de distribution.

Séquence expérimentale : Le temps d'essai de friction a été fixé entre 3h30 et 5h30 en vue de reproduire la durée maximale qu'une prothèse de cheville peut subir en une journée de travail. Les essais sont ordonnés selon la procédure suivante durant 5 à 8 heures. (Figure VI. 9) :

0. Mesure de la stationnarité initiale (Init) du potentiel de corrosion  $E_{OCP}$  du CoCrMo durant 30 min. Elle s'effectue sans contact mécanique. L'imagerie par fluorescence renseigne sur la morphologie des cellules en début du test.

Ensuite, l'essai est divisé en trois séquences répétées plusieurs fois : friction, relaxation des contraintes de compression et rhéologie, notées respectivement 1, 2 et 3 (Figure VI. 9) :

1. Lors de l'essai de frottement (Frot), des déplacements horizontaux d'amplitude 10 mm ( $D_x$ ) sont appliqués avec une vitesse de frottement de 0,6 ou 2 mm/s. La charge est à nouveau portée à 35 N. Le frottement entre l'UHMWPE et le CoCrMo dure 1h30.

2. La relaxation des contraintes de compression (RCC) consiste à appliquer une charge normale (35 N) sur le CoCrMo contre le pion UHMWPE. La force est maintenue pendant 15 minutes pour s'adapter aux effets de relaxation de la machine. Cette étape fournit également des informations sur la viscoélasticité du troisième corps sur la Transformation Tribologique de Surface (TTS) de l'UHMWPE.

3. La troisième phase, le test rhéologique (Rh), consiste à décharger complètement (Figure VI. 9b-2') ou partiellement (Figure VI. 9b-3'') le contact. La charge est ensuite maintenue à 5 N et des mouvements sinusoïdaux verticaux d'amplitude 40  $\mu\text{m}$  ( $D_z$ ) sont effectués à des fréquences de 0,5 à 2 Hz. Il est possible de caractériser la rhéologie du troisième corps en déterminant sa force élastique  $F_e$ , sa force visqueuse  $F_v$  et son module d'élasticité  $E$ . Quand elle intervient après l'étape 2, le test rhéologique conduit également à des mouvements de convection, favorisant la dissipation des ions métalliques en solution et l'évacuation des débris d'usure UHMWPE hors du contact.

Le cycle de tribocorrosion, comprenant les phases RCC, Rh et Frot, est répété trois fois. Les valeurs du potentiel de corrosion ( $E_{OCP}$ ), des forces normales et tangentielles et du déplacement horizontal sont enregistrées. L'imagerie par fluorescence a été réalisée après chaque séquence glissante, c'est-à-dire pendant les séquences RCC+Rh.

4. La stabilisation finale (Final) clôtur le test de biotribocorrosion en éliminant la charge de contact normale et en contrôlant la morphologie cellulaire par fluorescence.

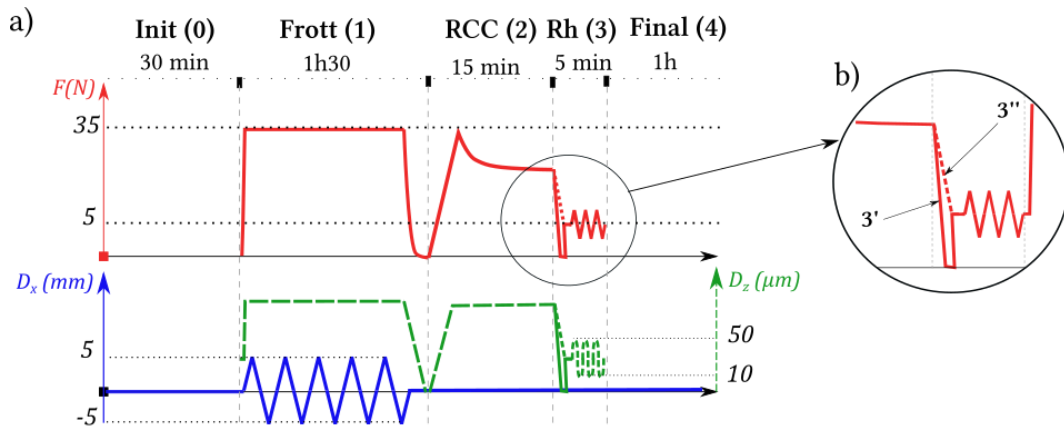


Figure VI. 9 a) Représentation synoptique du protocole des essais de biotribocorrosion comprenant les phases majeures suivantes : une stabilisation initiale (Init), une relaxation des contraintes de compression (RCC), une séquence rhéologique (Rh), un frottement (Frott) et une stabilisation finale (Final). b) Variantes de la séquence rhéologique avec décharge complète (3') ou partielle (3'') de charge.

**Variables d'entrées :** Deux conditions expérimentales ont été fixées pour simuler deux types de conditions agressives du contact articulaire. La première favorise la production de particules d'usure de polyéthylène (Test N° 1) tandis que la seconde génère davantage d'ions métalliques (Test N° 2). Pour cela, deux paramètres expérimentaux ont été modifiés : l'état de surface du CoCrMo et la vitesse de frottement (Tableau VI. 1). Les essais n'ont pu être réalisés qu'une seule fois ( $N=1$ ).

Tableau VI. 1 Paramètres expérimentaux des essais de biotribocorrosion (N° 1 et N° 2).

Nature des paramètres expérimentaux		Test N°. 1	Test N°. 2
<i>Matériaux et solution</i>	Alliage métallique	Disque de CoCrMo (ASTM-F75)	
	- Finition de surface	SiC 1200, $R_a = 0,20 \mu\text{m}$	Polissage miroir, $R_a = 0,04 \mu\text{m}$
<i>Biologique</i>	Contrepion	Pion UHMWPE	
	Fluide	RPMI-1640 supplémenté	
<i>Mécanique</i>	Lignée cellulaire	RAW 264.7 (macrophages)	
	- Densité [ $\times 10^4$ cellules/cm <sup>2</sup> ]	5	3
<i>Mécanique</i>	Marqueur fluorescent	Membrane lipophile	pH intracellulaire
	Pression moyenne de Hertz calculée [MPa]	10	
	Amplitude de déplacement [mm]	10	
	$V_{\text{Gliss}}$ [mm/s]	0,6	2
	Charge Durant la séquence de rhéologie (Rh)	Décharge totale (Figure VI. 9b-2')	Décharge partielle (Figure VI. 9b-2'')
Durée [heures]	5-7		

Mesure du taux d'usure : Les mesures ont été établies avec un profilomètre optique sans contact (Altisurf© 500, Altimet) à une vitesse d'acquisition de 40 mm/s et avec une résolution de 10 nm. Il s'agit d'une technique de mesure de topographie de surface à haute résolution verticale permettant d'établir des profils de surface en termes de rugosité ( $R_a$  et  $R_q$ ) (Principe détaillé en Annexe 8). L'appareil de mesure a été l'objet d'un étalonnage précis sur l'UHMWPE lors de précédents travaux [84]. Les profils obtenus par profilométrie optique étaient significativement similaires à ceux obtenus par microscopie à force atomique. La précision d'acquisition de l'appareil est confirmée.

Les pions de polyéthylène ont été placés sur une base rotative permettant une mesure de profil tous les 10° le long d'une ligne de référence (Figure VI. 10). Cette méthode permet de balayer l'ensemble de la surface du pion et d'établir la zone de contact après frottement. La Figure VI. 10 schématise la trace d'usure obtenue en utilisant le profilomètre optique. Le logiciel MountainsMap effectue automatiquement des calculs usuels comme l'estimation du rayon de courbure du profil mesuré, l'extraction de la surface du profil et le traitement du signal (nivellement, variations de réflectivité). Les profilées de la piste d'usure selon trois angles ont été utilisés pour estimer la valeur du volume d'usure.

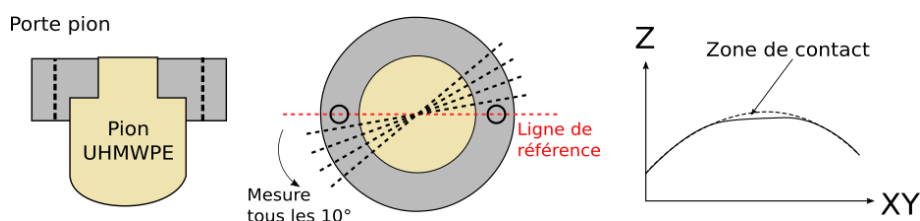


Figure VI. 10 Méthodologie et schématisation de l'acquisition des lignes de profils du pion UHMWPE par interférométrie optique.

Concentration des ions métalliques : Les surnageants du RPMI-1640 ont été recueillis avant et après les essais et examinés par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) pour quantifier les ions métalliques libérés. Il s'agit d'une méthode d'analyse qui permet de séparer, d'identifier et de quantifier les ions inorganiques d'un composé en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) (Principe détaillé en Annexe 9). Les solutions ont été analysées à l'aide d'un iCAPTM TQs ICP-MS (ThermoFisher Scientific, Brème) doté d'une technologie Triple Quadrupôle. Les éléments Cr, Co et Mo de masse molaire 52, 59 et 95 g.mol<sup>-1</sup> respectivement ont été quantifiés avec une limite de détection de 0,05 µg/l. Les

analyses ICP-MS ont été réalisées par le laboratoire de géochimie de l'ENS Lyon, France (Philippe Telouk).

Analyse d'une cytokine pro-inflammatoire : La concentration de la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) dans les produites par les macrophages et rejetée dans le milieu surnageants a été quantifiée par la méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Le kit disponible sur le marché (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) a été utilisé conformément à la méthodologie recommandée par le fabricant. L'absorbance a été mesurée avec des plaques de lecture à 405 nm. Les concentrations de cytokines (pg/mL) ont été calculées à partir d'une courbe standard de cytokines recombinantes et normalisées par la quantité totale de protéines rejetées par les cellules.

## II. Résultats

### II.1. La réactivité électrochimique du CoCrMo

La Figure VI. 11 présente les mesures du potentiel en circuit ouvert ( $E_{OCP}$ ) de trois échantillons de CoCrMo immergés dans du RPMI-1640 supplémenté soumis aux conditions tribologiques (Test N° 1 et N° 2) et non soumis à une sollicitation mécanique (Contrôle).

Sans frottement, le potentiel du CoCrMo passe de -160 à -50 mV/ECS après 8 heures d'immersion. L'étude préliminaire, relative au Chapitre IV, a caractérisée ces valeurs de potentiel comme faisant partie du domaine de passivation du CoCrMo. Même si le potentiel n'a pas atteint son état stationnaire, le film passif semble avoir été formé durant le temps imparti.

Pendant l'essai tribologique N° 1, le potentiel  $E_{OCP}$  augmente progressivement de -260 à -150 mV/ECS. Cette évolution globale est similaire à celle enregistrée pour l'échantillon contrôle, ce qui signifie que l'application d'une charge et le mouvement de glissement du pion de UHMWPE affecte peu la dépassivation du CoCrMo. Le potentiel initial, proche de -260 mV/ECS, correspond au potentiel de corrosion du CoCrMo dans le RPMI-1640 en incubateur (Chapitre IV). Le potentiel initial du Test N°2 est toutefois supérieur au test précédent, passant de -150 à 0 mV/ECS.

Lorsque la force a été appliquée et que le frottement a commencé (0,3 et 0,35 h pour les tests N°1 et N°2 respectivement), le potentiel varie de manière différente selon les deux conditions : le potentiel du CoCrMo N°1 diminue légèrement (30 mV) pouvant correspondre à l'action de la contrainte mécanique sur la croissance du film passif, tandis que le potentiel du CoCrMo N°2 montre un régime transitoire brusque où le potentiel augmente puis diminue d'une différence de 250 mV.

Durant les séquences de frottement, et à une échelle dilatée, l'évolution du potentiel du Test N°1 semble révéler des transitoires non induits par le mouvement alternatif du pion sur la surface du CoCrMo (résultats non montrés). Inversement, le Test N°2 montre une perturbation du signal répétitif toutes les 5 secondes, identique à la vitesse de frottement du pion. Etant donné que l'étude du bruit électrochimique n'a pas été entrepris en détail, la compréhension des transitoires reste limitée et ne peut être expliquée à partir de deux tests uniquement. Une étude à part entière devra être poursuivie pour discerner l'implication des phénomènes électrochimiques sur la variation du potentiel et la qualité de la mesure électrochimique de ce système.

Pendant la relaxation des contraintes de compression et la rhéologie (1,8 et 3,5 h), le potentiel du CoCrMo N°1 augmente soudainement dans la plage de 200-300 mV/ECS. Cette séquence expérimentale consistait mécaniquement en la relaxation de la charge et la génération de mouvements verticaux d'une amplitude

de 40  $\mu\text{m}$ . Cette étape a été effectuée deux fois et le potentiel  $E_{\text{OCP}}$  a suivi la même évolution entre chacune d'elles comme si cette séquence ne perturbait pas les mesures. Par comparaison, aucune augmentation de potentiel n'est enregistrée lors de la séquence rhéologique du Test N°2 où la charge est maintenue à 5 N. Ce potentiel est caractérisé par de nombreux régimes transitoires autour d'une valeur médiane de 5 mV/ECS.

Les différences de protocole et de surface peuvent être une piste d'explication dans les variations de potentiel des deux essais. Pour autant, les essais doivent être répétés plusieurs fois pour évaluer si les valeurs de potentiel mesurées reflètent des artefacts de mesure ou un comportement électrochimique spécifique.

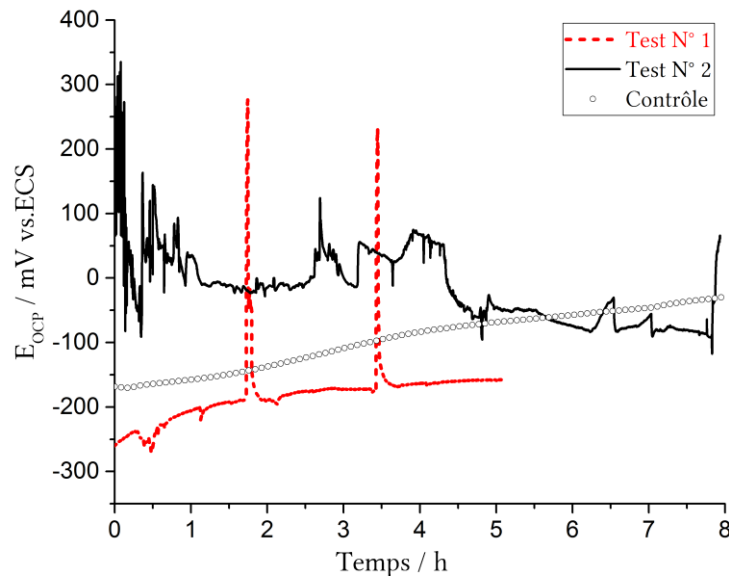


Figure VI. 11 Variation du potentiel  $E_{\text{OCP}}$  des échantillons de CoCrMo pendant les essais tribologiques (Test n°1 et N°2) et seulement immergé dans le RPMI-1640 supplémenté (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ).

## II.2. Libération d'ions métalliques

À la fin des expériences, les surnageants ont été analysés par ICP-MS pour quantifier les ions métalliques provenant du CoCrMo. La Figure VI. 12 indique la teneur en cobalt, chrome et molybdène de la solution après les deux tests tribologiques et après un test d'immersion de CoCrMo dans du RPMI-1640 supplémenté pendant 6h en incubateur (Contrôle). Le cobalt est le plus concentré des trois éléments détectables, suivi du chrome et du molybdène. Cela était attendu en raison de la composition chimique de l'alliage, qui contient 64,4 % en poids de cobalt.

La libération totale d'ions cobalt est similaire ou plus faible lors des essais tribologiques par rapport à l'essai d'immersion (de 116 à 70,7 ppb). Inversement, le niveau d'ions  $\text{Mo}^{4+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  et  $\text{Cr}^{6+}$  est supérieur pour les échantillons soumis aux conditions de frottement : 12 et 22,9 ppb d'ions chrome pour les essais N° 1 et 2 respectivement par rapport à 8,8 ppb pour le contrôle et 6 et 8 ppb d'ions molybdène pour les essais N° 1 et 2 respectivement par rapport à 5,7 ppb pour le contrôle.

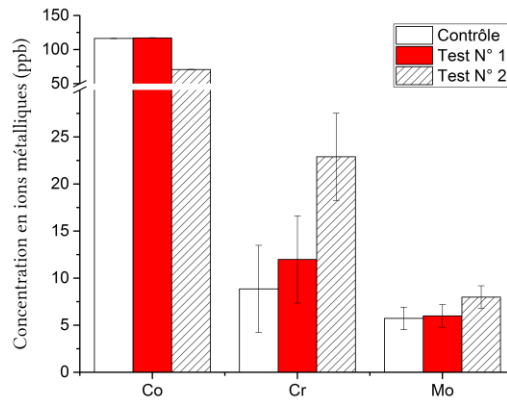


Figure VI. 12 Libération d'ions métalliques après les deux essais de biotribocorrosion comparée à l'essai d'immersion du CoCrMo dans le RPMI-1640 supplémenté de 6 h (Contrôle). La barre d'erreur correspond à la limite de détection de l'appareil pour chaque ions (N=1).

### II.3. Les mécanismes d'usure

La Figure VI. 13 montre le coefficient de frottement moyen calculé pour chacune des trois séquences de frottement. Le coefficient de frottement est plus élevé pour l'essai N° 2 que pour l'essai N° 1 lors des deux premières sessions de frottement et s'inverse lors de la 3<sup>ème</sup> séquence de frottement. Le coefficient de frottement diminue légèrement pour l'essai N° 1 (de 0,13 à 0,09) alors qu'une forte baisse est enregistrée pour l'essai N° 2 (de 0,14 à 0,03 au dernier frottement). Les valeurs de COF sont faibles, ce qui signifie que plus de la moitié de l'énergie de la force normale exercée est utilisée pour retarder le mouvement latéral entre les deux surfaces, c'est-à-dire un faible frottement.

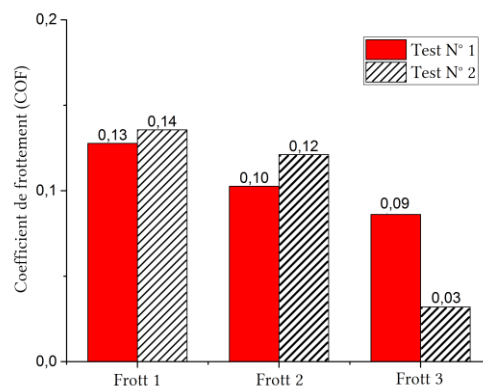


Figure VI. 13 Coefficient de frottement moyen du contact UHMWPE/CoCrMo dans le RPMI-1640 supplémenté après les trois séquences de frottement des essais de biotribocorrosion.

### II.4. Le taux d'usure du pion UHMWPE

Le taux d'usure moyen des pions UHMWPE a été obtenu à partir de mesures de profilométrie optique par différence des profils de surface avant et après les essais. La perte de volume a été calculée à partir de mesures de surface obtenues sous trois angles différents. Le taux d'usure de l'UHMWPE des essais N° 1 et N° 2 était de  $0,167 \pm 0,038 \text{ mm}^3$  après 5 heures et de  $0,017 \pm 0,010 \text{ mm}^3$  après 7 heures respectivement, soit  $11,173 \pm 2,569 \text{ mm}^3/\text{MC}$  et  $0,945 \pm 0,557 \text{ mm}^3/\text{MC}$ . La perte de volume était cinq fois plus faible pour



l'essai N° 2 que pour l'essai N° 1, ce qui donne à penser que le taux d'usure est lié aux conditions de surface.

## II.5. Analyses de surface

La taille, la forme, la nature et le nombre de particules d'usure ont été analysées par imagerie des surfaces des échantillons de UHMWPE et de CoCrMo. Les images MEB des pions de UHMWPE usés sont présentées sur la Figure VI. 14. Les zones de contact, délimitées par des cercles pointillés, sont caractérisées par des rainures de frottement perpendiculaires aux lignes d'usinage pour l'essai N° 2 ou orientées à 45° pour l'essai N° 1. Les particules polymères sont rondes, ovales ou en forme de rouleau (indiquées par les flèches de la Figure VI. 14). Elles sont le plus souvent rondes dans le cas de l'essai N° 1, alors qu'elles sont en forme de rouleaux écrasés dans l'essai N° 2. Une couche de UHMWPE adhérente est également présente dans ce dernier cas.

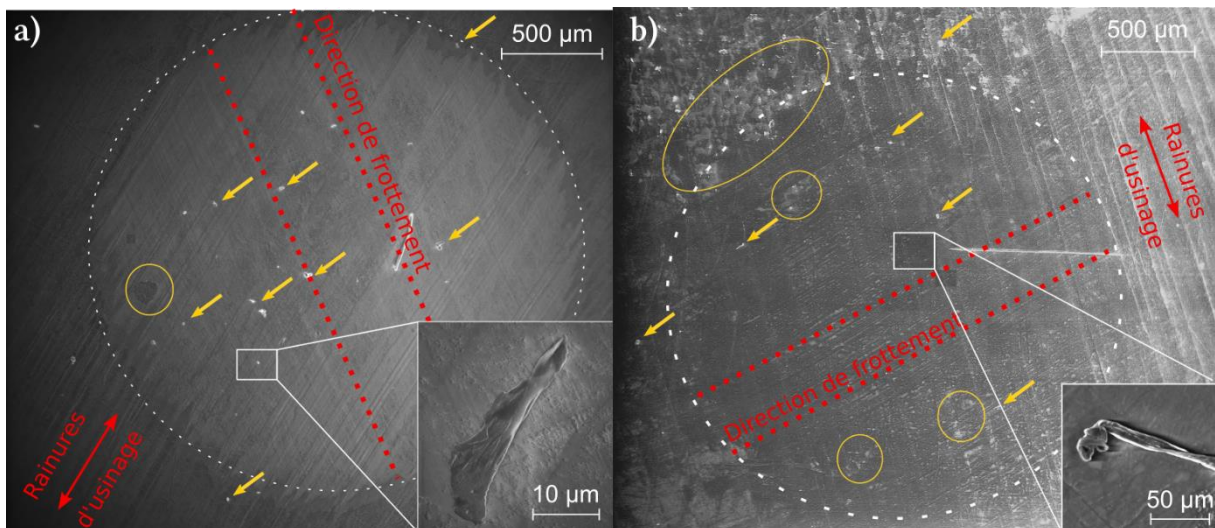


Figure VI. 14 Images MEB montrant la surface des pions UHMWPE après les essais de biotribocorrosion N° 1 (a) et N° 2 (b). Les flèches et les cercles jaunes indiquent les particules d'usure et le troisième corps épais respectivement.

Les traces d'usure du CoCrMo produites lors des essais de biotribocorrosion ont été observées en microscopie à fluorescence afin de révéler les particules d'usure de polyéthylène fluorescentes, colorées ici en rouge (Figure VI. 15). La distribution et le nombre de particules de UHMWPE varient considérablement dans la trace d'usure selon les deux tests. Pour l'essai N° 1, de nombreuses petites particules rondes sont présentes alors qu'elles sont beaucoup moins nombreuses et plus allongées dans l'essai N° 2. Comme le montrent les images MEB du pion (Figure VI. 14), les particules sont présentes sous forme de rouleaux pour l'essai N° 2. Des débris d'usure sont aussi présents en dehors de la trace d'usure, jusqu'à la périphérie du disque de cobalt. Ils sont généralement de plus grande taille.



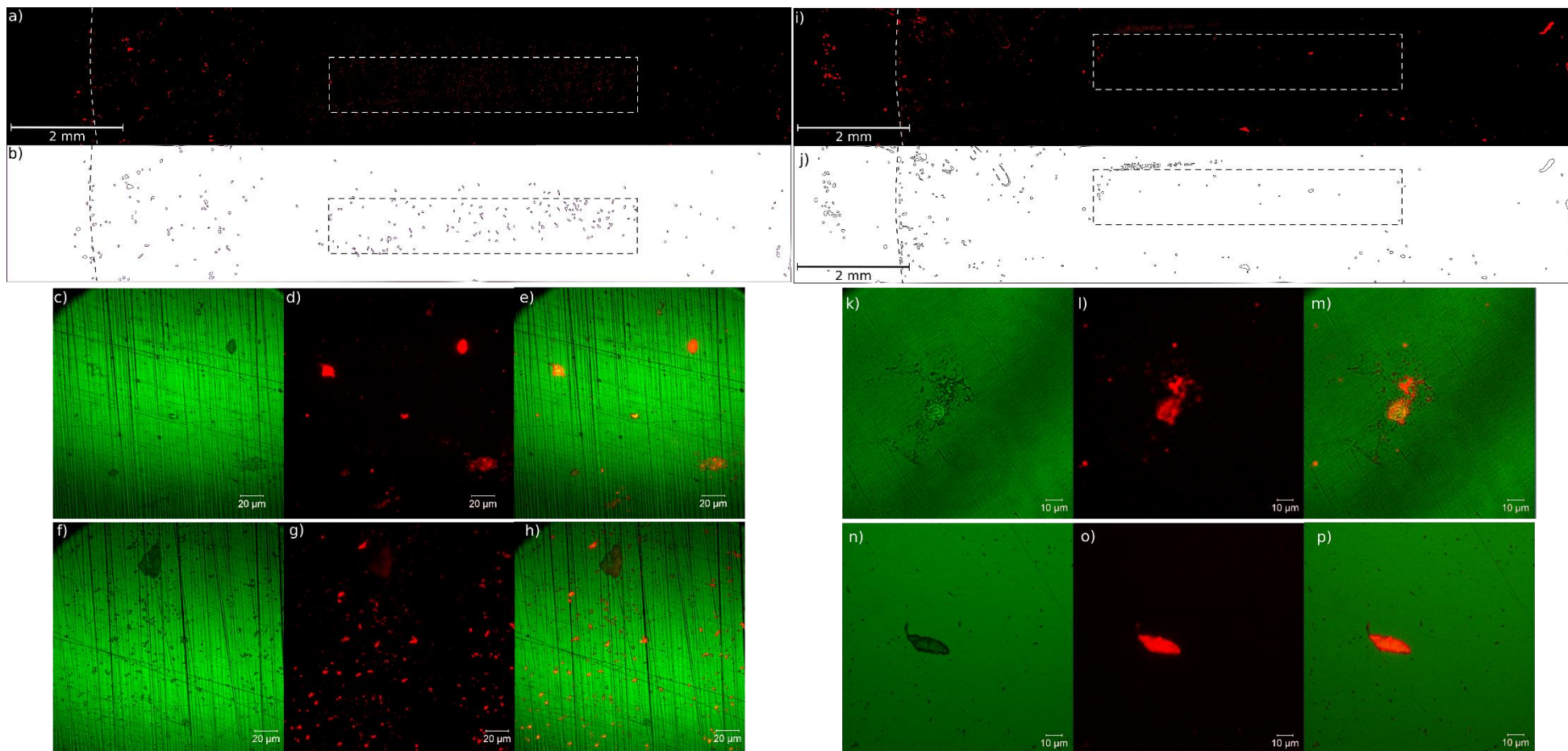


Figure VI. 15 Images au microscope à fluorescence de la surface du cobalt (noir ou vert) avec présence de débris d'usure de polyéthylène fluorescent (rouge) de l'essai de biotribocorrosion N° 1 (a-h) et N° 2 (i-p) comprenant : une image panoramique originale de la surface avec délimitation de la trace d'usure (zone en pointillés) (a, i) et traitement numérique (b, j). Les images c à h et k à p sont des exemples de décorrélation des images prise en microscopie à fluorescence. Elles témoignent de la quantité et de la taille des débris de polyéthylène.

Une analyse des images de micrographies à fluorescence a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, USA) afin de déterminer la surface et le périmètre de chaque particule, et ainsi d'avoir accès à la concentration, la taille (*Equivalent Circular Diameter ECD*) et la forme des particules (*Equivalent Shape Ratio ESR*) (Figure VI. 16).

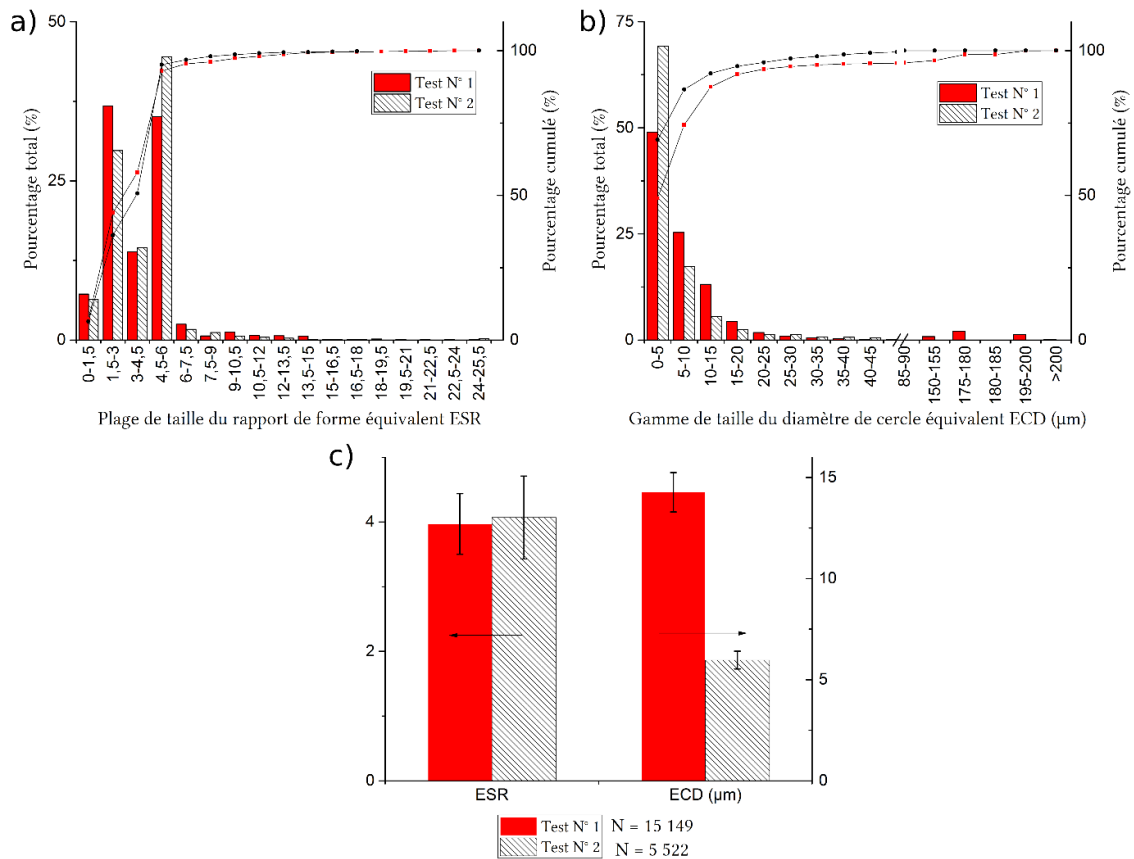


Figure VI. 16 Distribution des rapports a) de forme (ESR) et b) de taille (ECD) des particules d'usure de UHMWPE observée sur la surface du CoCrMo après les essais de biotribocorrosion à partir de 10 images en fluorescence. c) Moyennes pondérées et incertitude (écart type) des rapports de taille et de forme pour les deux tests de biotribocorrosion.

Le facteur ESR donne des informations sur la forme des particules : entre 0 et 1,5, les particules sont qualifiées de rondes, entre 1,5 et 3, elles sont allongées et au-delà 3, elles sont fibrillaires. Pour les deux tests, les particules sont en majorité qualifiées par un facteur ESR de 1,5-3 (30 à 37%) et 4,5-6 (35 à 44%) (Figure VI. 16a). La quantification morphologique des particules de polyéthylène à la surface du CoCrMo montre qu'elles sont plus allongées pour l'essai N° 1 (37%) et plus fibrillaires pour l'essai N° 2 (44%). Compte tenu de toutes les particules détectées, la différence de forme n'est pas significative entre les deux tests. Le facteur ESR moyen est d'environ 4, c'est-à-dire que les particules sont en forme de fibrille (Figure VI. 16c).

Le facteur ECD est utilisé pour qualifier les particules en fonction de leur taille. La distribution des particules de polyéthylène est assez similaire pour les deux tests : la fréquence diminue avec la taille. Les particules les plus petites, entre 0 et 5 µm, sont majoritaires, représentant 69% des particules pour l'essai N° 2 et 49% pour l'essai N° 1 (Figure VI. 16b). Au-dessus de 5 µm, le nombre de particules diminue avec la taille. Les particules UHMWPE avec un ECD supérieur à 5 µm sont toujours plus nombreuses dans l'essai N° 1 que dans l'essai N° 2. La répartition des tailles est significativement différente entre les deux essais : les débris d'usure sont trois fois moins nombreux (5549) et 2,3 fois plus petits (ECD : 6 µm) pour

l'essai N° 2 que ceux analysés pour l'essai N° 1 (15149 particules ayant un diamètre moyen de 14  $\mu\text{m}$ ) (Figure VI. 16c).

Pour finaliser l'analyse morphologique des débris d'usure, le surnageant gélifié a également été analysé au microscope à fluorescence. Cette étude fournit des données plus quantitatives que qualitatives sur les particules. Les résultats de l'analyse sont présentés à la Figure VI. 17. Le nombre de particules générées est nettement plus élevé dans le cas de l'essai N° 1 (8122 particules/mL) que dans celui de l'essai N° 2 (100 particules/mL). Dans les deux cas, ces concentrations sont supérieures à celles obtenues à partir d'un échantillon de solution de RPMI-1640, qui sert de témoin (32 particules/mL). Cette faible concentration correspond probablement à des particules de pollution piégées lors de la gélification du surnageant. La surface moyenne calculée des particules générées après l'essai N° 1 est similaire à celle du témoin (16,6 et 19,3  $\mu\text{m}^2$ ) alors qu'elle est presque 10 fois supérieure pour l'essai N° 2 (152,9  $\mu\text{m}^2$ ).

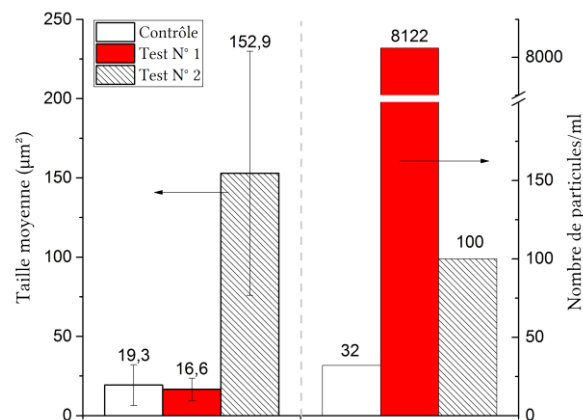


Figure VI. 17 Nombre et taille moyenne des particules d'usure de polyéthylène extraites du RPMI-1640 après les essais de biotribocorrosion. Les valeurs de contrôle se réfèrent aux particules de pollution piégées lors de la gélification du RPMI-1640 supplémenté.

## II.6. Analyse biologique des macrophages

### Densité des cellules

La Figure VI. 18 montre des images fluorescentes de la lignée cellulaire de macrophages murins révélées par un marqueur lipophile (essai N° 1) et un marqueur de pH intracellulaire (essai N° 2) après les trois séquences de frottement. Le marqueur lipophile met en évidence la membrane des macrophages (Figure VI. 18a, b, c). Le marqueur de pH intracellulaire, utilisé lors de l'essai N° 2, révèle une majorité de cellules faiblement bleues (pH = 7) dont certaines sont jaunâtres, ce qui indique un pH intracellulaire de 4,5-5 (Figure VI. 18d, e, f). L'intensité de la couleur verte représente l'acidification des endosomes, lysosomes et phagosomes acides à un pH de 4-5.

En tenant compte de la différence de grossissement des images entre les deux tests, la densité cellulaire a été calculée. Le traitement des images a été effectué par ImageJ (procédé de binarisation, analyse de la surface des particules et distribution) pour compter le nombre de cellules par surface d'image. La densité cellulaire au cours des essais de biotribocorrosion est indiquée au bas de chaque image. Le nombre de cellules diminue avec le temps, passant de 50 000 à 29 200 cellules/ $\text{cm}^2$  et de 30 000 à 14 600 pour les essais N° 1 et 2, respectivement. Pour les deux tests, la densité cellulaire diminue avec le temps. A la fin de la séquence de frottement (5 à 7 heures), seulement la moitié des cellules initialement cultivées sont dénombrées.

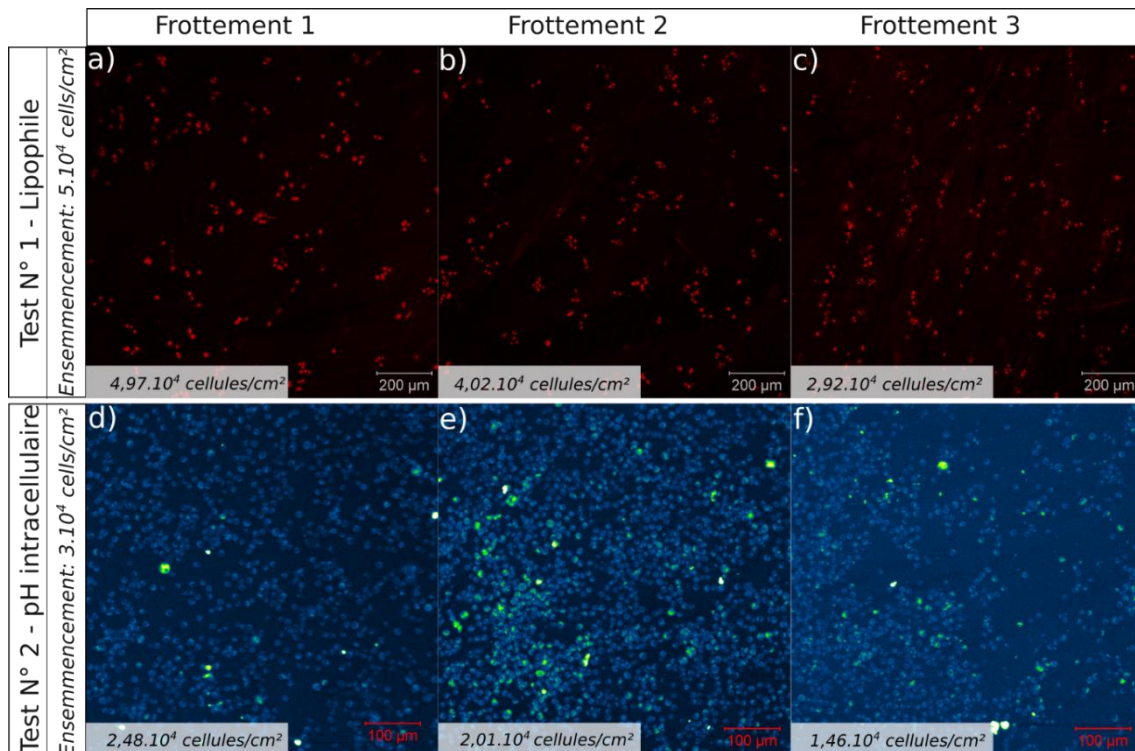


Figure VI. 18 Images de microscopie par fluorescence des macrophages vivants cultivés autour du CoCrMo après les trois séquences de frottement des essais de biotribocorrosion. Les cellules sont colorées pour révéler la membrane lipidique pour l'essai N° 1 (a, b, c) et le pH intracellulaire, pour l'essai N° 2 (d, e, f). Le signal vert jaune indique un pH acide (4,7-5). La densité des cellules calculée est indiquée en bas de chaque image en italique.

### Morphologie cellulaire

Une analyse morphologique a été réalisée à partir des images fluorescentes (Tableau VI. 2). La surface moyenne des cellules pour l'essai N° 1 passe de 109 à 165  $\mu\text{m}^2$  avec le temps, contrairement à l'essai N° 2, où elle passe de 126 à 88  $\mu\text{m}^2$ . La variation de taille n'est pas statistiquement différente pour l'essai N° 1 ( $p=0,13$ ) contrairement à l'essai N° 2 ( $p=0,002$ ). La distribution de taille des macrophages pour le test N°1 était similaire (de 0 à 400  $\mu\text{m}^2$ ) et la gamme de tailles de cellules pour les trois séquences de frottement était équivalente. Comparativement, les cellules après la troisième séquence de frottement étaient plus grandes (190-310  $\mu\text{m}^2$ ) que celles des frottements 1 et 2, et recouvrent une plus grande distribution. Notons que les petites cellules (< 10  $\mu\text{m}^2$ ) sont plus présentes après le frottement 1 (28 %) qu'après le frottement 2 (8 %). La taille des macrophages après le premier frottement de l'essai N° 2 n'étaient pas statistiquement différentes les unes des autres ( $p=0,10$ ), mais étaient différentes de celles après le deuxième et le troisième frottement ( $p < 0,05$ ). Les petites cellules, d'une surface inférieure à 110  $\mu\text{m}^2$ , étaient plus nombreuses à la fin de l'essai, soit 88 %.

Tableau VI. 2 Surface moyenne des lignées cellulaires de macrophages après les trois séquences de frottement des essais de biotribocorrosion. Les données ont été traitées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un essai de comparaison multiple :  $p = 0,13$  en comparant les trois séquences de frottements pour l'essai N° 1 et  $p = 0,002$  pour l'essai N° 2, et <sup>a</sup> correspond à  $p < 0,1$  et <sup>b</sup> à  $p < 0,05$  par comparaison entre les essais.

	Test	Frot. 1	Frot. 2	Frot. 3	p
Aire moyenne des cellules ( $\mu\text{m}^2$ )	N° 1	109,2 ± 2,2	143,1 ± 2,6	165,7 ± 3,2	0,13
	N° 2	126,7 ± 1,9	112,1 ± 1,7	88,5 ± 1,3	0,002



## Libération de cytokine pro-inflammatoire

Pour compléter la réponse inflammatoire de la lignée cellulaire des macrophages murins aux débris d'usure et aux ions métalliques, la production de prostaglandine E<sub>2</sub> a été mesurée par analyse ELISA. Le Tableau VI. 3 montre que les conditions expérimentales différentes des essais N° 1 et N° 2 ont toutes deux entraîné une augmentation significative de la production de PGE<sub>2</sub> par rapport au témoin (55,18 pg/mL), mais pas statistiquement significatif ( $p > 0,1$ ). Les macrophages murins soumis à l'essai de biotribocorrosion N° 2 produisent le plus de prostaglandine E<sub>2</sub> qu'initialement, soit 2,5 fois plus concentré (140,89 pg/mL). Les deux tests ne sont pourtant pas significativement différents statistiquement ( $p = 0,3$ )

Tableau VI. 3 Analyse de la PGE<sub>2</sub> dans les surnageants après les deux essais de biotribocorrosion en utilisant la technique ELISA. Le contrôle correspond aux cellules immergées dans le milieu RPMI-1640 supplémenté sans sollicitations chimiques et/ou mécaniques. Les données ont été traitées par ANOVA suivie d'un essai de comparaison multiple : <sup>a</sup> correspond à  $p = 0,10$  comparé au contrôle, <sup>b</sup> à  $p = 0,18$  comparé au contrôle et  $p = 0,30$  entre les deux tests.

Prostaglandin E <sub>2</sub> (pg/mL)	Contrôle	Test N° 1	Test N° 2
	55,18	100,65 <sup>b</sup>	140,89 <sup>a</sup>

### III. Proposition d'interprétation et discussion

La fonctionnalité du dispositif de biotribocorrosion a été testée sur le tribosystème CoCrMo/UHMWPE au contact de macrophages. L'étude se concentre sur l'évaluation des produits de dégradation générés et de leur impact sur la réponse cellulaire des macrophages. L'hypothèse formulée est que la cytotoxicité est influencée par la nature des produits de dégradation générés par le contact (débris ou ions). La discussion est basée sur des résultats préliminaires. D'autres analyses sont nécessaires pour confirmer les tendances décrites ci-dessous.

#### III.1. Génération d'ions métalliques

Pour les deux essais réalisés sur le dispositif de biotribocorrosion, le potentiel moyen E<sub>OCP</sub> du CoCrMo dans le milieu RPMI-1640 supplémenté varie dans le domaine passif (Figures VI. 13). Ceci signifie que la dépassivation du CoCrMo est très faible et que l'UHMWPE n'agit pas comme un pion abrasif.

La lente augmentation de l'E<sub>OCP</sub> du Test N°1 (de -250 à -150 mV/ECS) montre que la capacité protectrice du film passif augmente avec le temps ; il n'y a aucune chute de potentiel et de transitoires prouvant l'enlèvement mécanique du film passif. A contrario, le potentiel E<sub>OCP</sub> du Test N°2 présente de nombreux transitoires tout au long de l'essai. Les taux d'ions métalliques (Co, Cr, Mo) mesurée en fin d'essais sont également plus élevés que le contrôle et le Test N°1.

D'un point de vue électrochimique, il est tendancieux de proposer des hypothèses claires sur les différences entre deux conditions basées sur un seul essai. Plusieurs questionnements émergent de ces résultats ; ils sont mentionnés ici à des fins de validation en tant que perspectives futures :

- Les transitoires du potentiel E<sub>OCP</sub> combinés aux mesures de concentrations d'ions métalliques peuvent-ils indiquer une dissolution ou une dépassivation du CoCrMo ?
- Est-ce que la rugosité de surface du CoCrMo ( $R_a = 0,04$  versus  $0,20 \mu\text{m}$ ) peut être un facteur significatif d'usure lorsque la contrepartie frottant est un pion de polyéthylène ?
- Qu'induit la séquence de rhéologie (aucun frottement et application de mouvements verticaux du pion) à l'interface CoCrMo/RPMI-1640 ? est-ce qu'il s'agit d'un réajustement des charges de la

double couche et/ou de l'afflux de nouvelles espèces chimiques (protéines, oxygène dissous) avec un pouvoir oxydant élevé qui accélère soudainement la réactivité de surface?

Le tribosystème UHMWPE/CoCrMo ne peut être qualifié d'un cas de tribocorrosion au sens où le pion n'induit pas l'accélération de la corrosion par usure. Il se produit davantage une dissolution métallique, qui ne représente que 10 % de la dégradation du CoCrMo dans le liquide physiologique [231]. La phase rhéologique peut être une étape intéressante pour évaluer les réactions non faradiques lors d'une faible vitesse de déplacement de frottement (0,6 mm/s).

### III.2. Production de débris d'usure de polyéthylène

Le mécanisme d'usure du polyéthylène est évalué par la variation du coefficient de frottement (COF), par le volume d'usure et par l'analyse des particules d'usure (forme, nature et répartition). Pour les deux essais, un faible coefficient de frottement a été mesuré ( $< 0,12$ ), ce qui suggère que le couple UHMWPE/CoCrMo fonctionne sous lubrification limite (Figure VI. 13). Le COF dépend des caractéristiques du lubrifiant et surtout des protéines qui lubrifient la surface des matériaux en formant un film complexe et réduisent ainsi significativement le COF [103,376,464]. Les valeurs obtenues sont cohérentes puisque le RPMI-1640 est un milieu biologique riche en composés organiques (6,18 g/L de protéines). Il se forme une couche nanométrique de protéines à la surface métallique qui pilote les propriétés physico-chimiques du CoCrMo [167]. Par ailleurs, les grosses molécules (acide hyaluronique et albumine) peuvent augmenter le coefficient de friction par formation de rouleaux contenant des lipides, remplissant l'espace entre les premiers corps [465]. Cet effet a été supposé négligeable en raison de l'adsorption compétitive (effet Vroman [466]) entre molécules organiques en termes de dynamique et de conformation : les petites molécules s'adsorbent de préférence avant les grosses molécules moins mobiles.

Bien que l'amplitude et la distribution de la pression de contact influent le taux d'usure du polyéthylène, les volumes d'usure obtenus (1,2 à 17,8 mm<sup>3</sup>/MC) concordent avec ceux de travaux précédents [467-470]. Dans un contact polymère/métal, l'usure affecte majoritairement le polymère, composant moins dur que l'alliage métallique. La différence entre les deux tests pourrait provenir de la rugosité de surface du CoCrM : l'échantillon de CoCrMo N° 1 possède une surface plus rugueuse qui favorise l'usure adhésive [417] et l'accumulation de particules d'usure de polyéthylène dans la trace d'usure (Figure VI. 15). Au contraire, la surface lisse du CoCrMo (Test N° 2) favorise l'usure abrasive. Les débris d'usure agissent en tant que troisième corps.

L'observation par fluorescence des débris d'usure de UHMWPE sur le CoCrMo et dans la solution révèle un grand nombre de particules rondes pour l'essai N° 1 et un faible nombre de petites particules de forme fibrillaire pour l'essai N° 2. La forme ronde correspond davantage aux particules d'usure récupérées dans le liquide synovial à la suite d'arthroplasties totales de la cheville qui fonctionnent bien [471]. Pourtant, des travaux antérieurs ont montré que le nombre de particules en forme de fibrilles augmentait avec le temps lors des essais d'usure [470,472]. Ceci pourrait expliquer la différence de forme des particules entre les deux tests, qui durent 5 et 7 heures. Dans cette étude, les particules d'usure ont été collectées sans processus de digestion (enzymatique, acide ou basique), pour ne pas modifier leurs caractéristiques physico-chimiques et leur caractère cytotoxique [453].

### III.3. Cytotoxicité des produits de dégradation

Les tests préliminaires de viabilité/cytotoxicité (MTT et LDH) des macrophages sur CoCrMo pendant 72 heures, présentés au Chapitre V, n'ont pas montrés de changements significatifs. Cependant, au cours des essais de biotribocorrosion, la densité cellulaire des macrophages a été réduite de près de moitié après 5 à 7 heures de frottement, ce qui reflète la cytotoxicité des produits de dégradation générés (Figure VI. 18).

La surface moyenne des macrophages est supérieure dans les conditions du Test N° 1 que le N°2, signifiant que les cellules s'étalent sur la surface d'appui et favorisent leurs points d'attache. En général, les monocytes adhèrent dès le début de la mise en contact avec une surface [473]. Cependant, une perturbation des signaux d'adhésion peut provoquer le détachement cellulaire et l'apoptose [474]. Dans cette étude, seuls des débris d'usure et les ions métalliques sont les facteurs pouvant engendrer une diminution de l'adhésion des macrophages en interférant les signaux d'adhérence. Les caractéristiques morphologiques des cellules reflètent également leur capacité phagocytaire : des macrophages pulmonaires après phagocytose de particule présentent une membrane cellulaire irrégulière [475]. Il est supposé que les macrophages sont dans un état d'avancement de phagocytose plus avancé durant l'essai N° 2 que pendant l'essai N° 1, ce qui reflèterait un état inflammatoire et une détérioration cellulaire.

Les taux supérieurs de prostaglandine E2 normalisés au nombre de cellules dans les surnageants des essais (Tableau VI. 3) indiquent que les deux types de conditions simulés sur le dispositif de biotribocorrosion génèrent des conditions inflammatoires. Ceci va de pair avec de précédentes études montrant que les macrophages exposés à des particules de polyéthylène submicroniques [476,477] et à des ions Co et Cr [50] libèrent plusieurs médiateurs inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>) qui ont le potentiel de stimuler la résorption osseuse. En raison d'un manque de reproductibilité des essais, les analyses de PGE<sub>2</sub> ne sont pas statistiquement significatives comparés au contrôle et entre les deux tests ( $p > 0,1$ ). De futurs tests sont à prévoir pour discerner si l'internalisation des produits de dégradation dans les cellules modifie leurs caractères cytotoxiques de par leur état solide ou ionique.

### III.4. Impact biologique des ions et des débris d'usure

Les facteurs critiques régissant la cytotoxicité des produits de dégradation diffèrent selon le type des produits de dégradation ; la réactivité biologique des débris d'usure sur les macrophages dépend de la forme et de la taille plus que de la concentration, alors que le caractère cytotoxique des ions métalliques dépend de la nature des ions et surtout de leur concentration [241].

Des études ont évalué que la quantité des débris d'usure n'est pas l'un des facteurs critiques, mais que la taille et la forme ont plus d'impact biologique sur les cellules de type monocyte :

- Les macrophages réagissent aux particules de polyéthylène qui sont suffisamment petites pour subir une phagocytose (0,3 à 10 microns) [478,479], parmi lesquelles celles de 0,1 à 1 micron sont les plus réactives [451,456]. Les particules plus grosses provoquent peu de réactions inflammatoires et sont donc peu susceptibles de stimuler l'ostéolyse [480]. Les deux tests réalisés sur le dispositif de biotribocorrosion confirment que les plus petites particules (16  $\mu\text{m}$ ) affectent davantage la viabilité des macrophages (Figure VI. 17). Il est intéressant de noter que même si le nombre de particules dans l'essai N° 2 (5541) est trois fois plus faible que dans l'essai N° 1 (14 394), il entraîne une cytotoxicité plus élevée des macrophages (Figure VI. 16 et Tableau VI. 2).

- La forme des particules est considérée comme un facteur critique de la réaction tissulaire et de l'ostéolyse [66,481,482]. Pourtant, les particules caractérisées à partir des tissus péri-prothétiques des prothèses articulaires présentent une grande variété de formes géométriques [336,483], pouvant résulter de l'existence de multiples méthodes d'isolement des particules d'usure [453,454]. La gélification du milieu contenant les débris d'usure permet d'outrepasser leur emploi. Généralement, des débris d'usure sous forme rugueuse et fibulaire semble provoquer une augmentation de la production de cytokines par rapport ceux possédant une surface lisse et une forme globulaire [484,485]. Ceci concorde avec les résultats obtenus, puisque les particules en forme de rouleau et les particules fibulaires sont plus présents à la fin du Test N°2 où la viabilité cellulaire est plus faible (Figure VI. 14,15, 16).

L'analyse ICP-MS des milieux après essais montre que les ions cobalt sont majoritairement présents par rapport aux ions chrome et molybdène. Pourtant, à concentration égale, le chrome est connu pour produire la plus grande réponse inflammatoire, suivi du cobalt, du nickel et du molybdène [235,246]. Il est difficile de comparer la concentration des ions métalliques obtenus durant les essais à celle relevée cliniquement. Toutefois, il a été relevé dans les tissus périprothétiques, un taux d'ions cobalt de 2 à 67 ppm et un taux d'ions chrome de 12 à 260 ppm [486,487]. Ces concentrations sont supérieures par rapport aux conditions simulées de cette étude (0,12 ppm d'ions cobalt et 0,025 ppm d'ions chrome), ce qui pourraient expliquer les faibles variations du comportement cellulaire. L'écart est principalement attribuable au temps d'exposition, qui est bien plus faible dans notre étude par rapport aux tissus analysés.

Les ions métalliques induisent des effets sur les macrophages et sur les cellules osseuses ; ils stimulent une réponse d'hypersensibilité, induisent l'oxydation de protéines cytoplasmiques [399], créent un stress oxydatif et/ou activent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui génèrent l'ostéolyse des implants métalliques [235,330,394]. Par conséquent, la diminution de l'activité des ostéoblastes peut causer *in vivo* l'échec de l'ostéointégration primaire. Des essais de co-culture cellulaire pourraient être envisagés pour élucider les effets synergiques des ions et des cytokines pro-inflammatoires sur les cellules osseuses.

Comme les ions métalliques sont beaucoup plus concentrés dans le cas de l'essai N° 2, il est possible qu'ils aient agi en symbiose avec les particules. En effet, les ions métalliques qui encapsulent la surface des particules de polyéthylène [488] pourraient agir comme catalyseurs, augmentant les taux d'oxydation et modifiant la chimie de surface des particules. Les particules oxydées pourraient avoir la capacité de provoquer une activation cellulaire accrue par rapport aux particules non oxydées.

#### IV. Limites de l'étude

Plusieurs limites importantes sont inhérentes à cette étude. Elles incluent la reproductibilité des résultats, la représentativité du milieu cellulaire, la sélection des paramètres mécaniques et de l'analyse des résultats :

- La principale limite de cette étude est le manque de répétition des essais effectués sur le dispositif de biotribocorrosion. Comme mentionné précédemment, cette étude présente les premiers résultats qui permettent de valider la fonctionnalité du dispositif développé. D'autres essais doivent être réalisés dans les mêmes conditions pour vérifier les hypothèses proposées.
- Les conditions physiologiques simulées *in vitro* ne prennent pas en compte l'ensemble des protéines présentes dans le liquide synovial. Or, certaines d'entre elles peuvent augmenter les effets inflammatoires, comme les protéines inflammatoires des macrophages (MIP)-1 ou agir comme des lubrifiants qui réduisent la friction et donc l'usure. De même, certaines protéines



forment avec les ions et les sels une couche carbonée [397,464,489] à caractère protecteur [461,489] à la surface du métal qui pourrait : **i)** modifier la croissance stable d'un film d'oxydes protecteur, **ii)** limiter la diffusion d'oxygène pour la repassivation [240] et/ou **iii)** réduire la contrainte mécanique par lubrification. Toutes ces raisons insistent à utiliser un milieu simulé proche du fluide synovial tel que le fluide biomimétique développé par Sava et al. [462] où les cellules peuvent proliférer [490].

- Les lignées cellulaires sont plus résilientes que les cellules primaires (extraites de tissus). En effet, des études montrent qu'elles peuvent être deux à trois fois plus tolérantes à l'exposition aux particules d'alliage CoCrMo que les cellules primaires [375].
- Les essais réalisés sont de courte durée (< 7 h) ce qui signifie que les réactions de toxicité cumulative à long terme sont sous-estimées et que les seuils tolérables *in vivo* sont surestimés. Le tribosystème ne prend pas en compte les périodes actives et passives de contraintes pour simuler les activités quotidiennes d'une personne. Dans le cas d'une prothèse de cheville, les forces mécaniques exercées varient selon le cycle de marche et le modèle de la prothèse (10,3 à 36 MPa) [23]. Les essais ne reflètent pas également la cinématique tibiale-talus *in vivo* de l'articulation de la cheville. Ainsi, les futurs travaux doivent tenir compte de l'application d'une charge/décharge en même temps que le mouvement de frottement et d'une pression de contact initiale plus élevée.
- Les mécanismes d'usure mis en jeu peuvent être complétés par une caractérisation mécanique des surfaces usées. La nanoindentation permet notamment de déterminer la présence d'une couche tribologique de type abrasif ou d'un film de transfert de polymère. L'uniformité des mesures de dureté sur la surface métallique recouverte du film polymère peut donner des indications intéressantes sur la distribution des particules, l'étirement du film et son rôle dans l'adhésion et la friction. Il faudra faire attention à la faible épaisseur du film de transfert, qui peut fausser les résultats de nanoindentation à cause de la contribution du substrat [491,492].
- L'acquisition d'images en fluorescence peut être perturbée de composés chimiques, produits du processus de photo-blanchiment (également appelé décoloration), qui interfèrent avec les processus cellulaires. Il est donc important de minimiser l'exposition à la lumière pour préserver à la fois le signal de fluorescence et l'activité cellulaire normale [493].

## V. Conclusion

Les premiers tests réalisés sur le dispositif de biotribocorrosion mettent en jeu le contact polyéthylène/CoCrMo. Au vu des résultats obtenus, les conditions expérimentales sélectionnées ne permettent pas de simuler un cas de biotribocorrosion à proprement parler, au sens où le pion de polyéthylène n'engendre pas une corrosion accélérée par l'usure du CoCrMo. Les hypothèses proposées sont les suivantes :

- L'essai N° 1 serait similaire à une usure adhésive du UHMWPE, caractérisée par la présence de nombreuses petites particules d'usure de polyéthylène, accumulées dans la trace d'usure. Aucun changement structurel dans le film passif du CoCrMo n'a été induit par le pion. Les principaux produits de dégradation sont des particules rondes de UHMWPE de taille micrométrique.
- L'essai N° 2 est caractérisé par la présence d'une couche de troisième corps dans la zone de contact, qui servirait de lubrifiant. La dissolution ionique du métal est plus importante que dans l'essai précédent. Les ions métalliques sont les principaux produits de dégradation générés.

L'ensemble des fonctionnalités de l'appareil est opérationnel. Un tel dispositif permet donc d'évaluer les produits de dégradation générés par un tribosystème (ions métalliques et/ou débris d'usure) et d'examiner leur toxicité sur des cellules avoisinantes vivantes. Cet appareil permet de s'affranchir des biais induits par la dissociation des essais expérimentaux qui génèrent d'un côté les produits de dégradation et qui de l'autre testent leurs biocompatibilité vis à vis des cellules. La poursuite directe de ce travail est de sélectionner un couple de friction entre un métal et un pion inerte qui met en jeu un cas de tribocorrosion et qui permettent de valider le terme choisi pour dénommer le dispositif.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

La finalité de cette thèse résidait dans l'identification des interactions entre le milieu cellulaire et l'alliage de CoCrMo, utilisé en tant que biomatériau dans les prothèses articulaires de cheville. Les objectifs fixés pour cette thèse étaient d'établir une caractérisation complète de la résistance à la corrosion du CoCrMo dans l'environnement cellulaire et de permettre l'étude des couplages synergiques avec l'activité cellulaire. Cette étude était également destinée à développer un dispositif de biotribocorrosion dans le but de générer des produits de dégradation (particules d'usure et ions métalliques). A cet égard, une approche itérative pluridisciplinaire a été adoptée, s'appuyant sur des analyses électrochimiques et physico-chimiques de la réactivité de surface, des études biologiques et mécaniques. La méthodologie expérimentale a été développée autour du même milieu physiologique simulé et successivement complétée par l'addition d'éléments (alliage métallique, cellules) ou de conditions plus agressives (électrochimiques).

Afin de présenter le contexte de l'étude et de décrire le développement de la méthodologie expérimentale permettant de répondre à ces objectifs, le manuscrit est divisé en six chapitres.

Les deux premiers explorent les bases théoriques des biomatériaux métalliques, destinés à des applications orthopédiques, et les bases techniques des diverses analyses utilisées en complément des essais expérimentaux.

L'étude bibliographique révèle les limites relatives aux essais de corrosion et de biocompatibilité des biomatériaux métalliques. L'absence de similitudes expérimentales, et l'inadaptation des différents types d'essais entre le domaine de l'électrochimie et celui de la biologie ont été mis en exergue. Ainsi, le troisième chapitre vise à améliorer l'étude *in vitro* des biomatériaux métalliques en abordant les prérequis du biologiste et du corrosionniste. Une attention particulière a été accordée à la représentativité du milieu physiologique simulé. A cet égard, le RPMI-1640 a été utilisé comme milieu simulé, car il prend en compte à la fois la représentativité et l'adaptabilité des conditions extérieures. Les réactions d'oxydoréduction régissant la réactivité intrinsèque du milieu de culture ont été établies, ce qui a permis d'identifier celles relatives aux composés organiques électrochimiquement réactifs (acides aminés, vitamines).

Le quatrième chapitre de cette étude est consacré à la caractérisation de l'alliage métallique CoCrMo en termes de résistance vis-à-vis de la corrosion dans le milieu RPMI-1640. Le rôle du milieu physiologique (protéines, pH) sur les matériaux implantaires a été exploré. Il a été évalué que le CoCrMo a un comportement typique d'un alliage passivable. Les bonnes propriétés protectrices inhérentes au film passif ont été attribuées aux oxydes et hydroxydes de Cr(III), et/ou aux complexes organométalliques de cobalt, et à l'adsorption d'espèces organiques telles que les protéines aux diverses conformations. Le développement d'un système expérimental permettant de combiner un système électrochimique et la culture cellulaire a été abouti. L'obtention des résultats issus de ce dispositif a permis d'identifier le rôle évident des composés organiques du RPMI-1640 sur la réactivité du CoCrMo. Plus encore, il permet d'introduire du dioxyde de carbone dans l'atmosphère, stabilisant le pH du milieu et par conséquent reproduisant fidèlement le pH corporel. Les mécanismes d'adsorption et de complexation des dérivés

carbonés ont été obtenus. Ainsi, la réactivité du CoCrMo a pu être étudiée précisément en dissociant les composés réactifs liés au milieu cellulaire.

Par suite, les processus continus de dissolution partielle et de re-précipitation du CoCrMo ont été abordés du point de vue de la biocompatibilité. A cet effet, le cinquième chapitre est consacré à la réactivité biologique des cellules (osseuses et immunitaires) exposées aux ions métalliques du CoCrMo. La complémentarité des techniques d'observation microscopique et d'analyse quantitative de teneur d'ions métalliques a permis d'évaluer l'effet des ions métalliques et des tensions anodiques sur le métabolisme des macrophages et des ostéoblastes. Une explication a été recherchée quant au seuil de toxicité des ions sur le comportement cellulaire. La colonisation cellulaire à court terme du biomatériau n'a démontré aucune corrélation entre la faible dissolution du CoCrMo et la viabilité cellulaire. A contrario, des taux plus élevés de chrome et de cobalt, produits par oxydation forcée de l'alliage métallique, ont conduit à une réduction significative de la viabilité des cellules. L'effet des cellules sur la réactivité du CoCrMo a également été abordé. Leur fonction métabolique a été identifiée comme un facteur pouvant moduler les profils de libération des ions métalliques et les cinétiques des réactions électrochimiques, ce qui implique la formation et la dissolution du film passif. Les macrophages semblaient être plus impliqués dans les réactions d'oxydoréduction que les ostéoblastes, en raison de leur pouvoir oxydant et de leurs transferts électroniques et ioniques à travers la membrane cellulaire.

Les produits de dégradation issus des essais de tribocorrosion et de biocompatibilité *in vitro* présentent d'importantes disparités par rapport aux conditions réelles *in vivo*. L'un des objectifs de la thèse était donc de développer un dispositif qui permet simultanément de produire des produits de dégradation et d'évaluer leur biocompatibilité face aux cellules. Une attention particulière a été accordée aux exigences relatives à la culture cellulaire, à la visualisation *in situ* du contact de frottement et à l'analyse des produits de dégradation. La collaboration avec le LaMCoS a abouti à un dispositif de biotribocorrosion qui conjugue des techniques mécaniques, biologiques, et électrochimiques et qui permet de générer des produits de dégradation (particules d'usure et ions métalliques). Ce dispositif multidisciplinaire ouvre la voie du suivi *in situ* des cellules exposées à des produits de dégradation générés à leurs contacts. Le dispositif est opérationnel et l'ensemble de ses fonctionnalités a pu être illustrés au travers des premiers tests mettant en jeu un contact CoCrMo/polyéthylène, représentatif du contact articulaire des prothèses de cheville. La reproductibilité des essais sera nécessaire pour faire de ce dispositif un exemple de référence. Il en résulte une méthodologie et une conception expérimentale prometteuse ouvrant sur l'étude des divers contacts articulaires des prothèses.

Cette thèse fournit des solutions aux problématiques abordées au laboratoire MATEIS : Comment évaluer la dégradation des biomatériaux métalliques *in vitro* en conjuguant une approche pluridisciplinaire ? Au-delà du développement des dispositifs expérimentaux, ce sont les interactions entre l'alliage CoCrMo et le milieu cellulaire qui furent le réel objet de cette thèse. Une base expérimentale a été construite, sur laquelle les projets futurs pourront s'appuyer. Les essais entrepris ont été centrés sur un milieu de culture, le RPMI-1640, mais sont valables pour d'autres milieux de culture cellulaire utilisés en biologie. Les propositions sont nombreuses et ouvrent la voie à un grand nombre d'applications. Le dispositif d'électrochimie adapté à la culture cellulaire permet d'entrevoir des pistes de réflexion sur l'effet de l'adhésion, la colonisation et la migration des cellules sur la résistance à la corrosion d'un biomatériau métallique. Le microscope à fluorescence permet de réaliser un suivi *in situ*, apportant des informations complémentaires à celles issues des séquences électrochimiques et des analyses biologiques.

L'étude peut se généraliser à la dégradation d'autres prothèses articulaires métalliques. Elle passera par : **i)** une amélioration du milieu physiologique simulé, **ii)** une caractérisation de l'interface biomatériau/milieu cellulaire combinant les techniques de l'électrochimie, la biologie et la mécanique, et

**iii)** l'incorporation d'un système d'étude *in vitro* prenant en compte la complexité du contact articulaire, et par conséquent les effets synergiques.



## Annexe 1 Caractéristiques mécaniques des matériaux

---

Cette annexe détaille les caractéristiques mécaniques du CoCrMo et du UHMWPE, nécessaire à la compréhension des mécanismes d'usure.

Tableau II. 6 Caractéristiques mécaniques de l'alliage de cobalt Biodur® CCM® (sources fabricant).

Densité (g/cm <sup>3</sup> )	8,3
Module d'Young E (GPa)	240
Coefficient de Poisson $\nu$	0,3
Limite élastique $R_e$ (MPa)	958 ± 139
Résistance maximale à la traction $R_m$ (MPa)	1393 ± 202
Allongement à la rupture A%	39 - 35
1% - 1.25%	
Coefficient de striction Z%	29
Dureté Rockwell (HRC)	43

Tableau II. 7 Caractéristiques mécaniques du polyéthylène à très haute masse moléculaire Chirulen® 1050, données fabricant MediTECH®.

Densité (g/cm <sup>3</sup> )	0,932 ± 0,001
Module d'Young E (GPa) (à 37°C)	0,67 ± 0,04
Module de compressibilité K (MPa) (à 37°C)	660 ± 37
Coefficient de Poisson $\nu$	0,46
Limite élastique $R_e$ (MPa)	21,5 ± 0,8
Résistance maximale à la traction $R_m$ (MPa)	53,5 ± 4
Allongement à la rupture 1% - 1.25% (A%)	380 ± 15
Dureté Shore (Echelle D)	67 ± 1

## Annexe 2 Composition chimique détaillée du RPMI-1640

Formule chimique	Nom	mg/L	mmol/L
<b>Acides aminés</b>			
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	L-Arginine	200	1,15
C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	L-Asparagine anhydre	50	0,33
C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	L-Acide aspartique	20	0,15
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> 2HCl	L-Cystine 2HCl	65,2	0,21
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	L-Glutamine	30	0,45
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	L-Acide glutamique	20	0,14
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Glycine	10	0,13
C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	L-Histidine	15	0,10
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	L-Proline	20	0,15
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	L-Isoleucine	50	0,38
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	L-Leucine	50	0,38
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl	L-Lysine HCl	40	0,22
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	L-Méthionine	15	0,10
C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	L-Phénylalanine	15	0,09
C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	L-Proline	20	0,17
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	L-Sérine	30	0,29
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	L-Thréonine	20	0,17
C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	L-Tryptophane	5	0,02
C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	L-Tyrosine 2Na 2H <sub>2</sub> O	29	0,11
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	L-Valine	20	0,17
C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	L Gluthanione réduit	1	0,00
<b>Total</b>		<b>769,4</b>	<b>4,91</b>
<b>Vitamines</b>			
B8	D-biotine	0,2	0,0008
B5	Pantothénate de calcium	0,25	0,0010
B9	Acide folique	1	0,0023
	Myo-inositol	35	0,1943
B3	Niacinamide	35	0,2866
B3	Nicotinamide	1	0,0082
PABA B10	Acide para-amino-benzoïque	1	0,0073
B6	Pyridoxine HCl	1	0,0049
B2	Riboflavine	0,2	0,0005
B1	Thiamine HCl	1	0,0030
B12	Vitamine B12	0,005	3,7.10 <sup>-6</sup>
	Chlorure de choline	3	0,0215
<b>Total</b>		<b>78,7</b>	<b>0,53</b>
<b>Sels inorganiques</b>			
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium	2000	23,81
NaCl	Chlorure de sodium	6000	102,67
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Hydrogénophosphate de sodium	800	5,64
KCl	Chlorure de potassium	400	5,37
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Nitrate de calcium tétrahydraté	100	0,42
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium	48,84	0,41
<b>Autres</b>			
H <sub>2</sub> O	Eau	987,6	54 836
C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NaO <sub>5</sub> S	Sel de rouge de phénol	5,3	0,01
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	D-Glucose anhydre	2000	11,10



## Annexe 3 Protocole de sous-passage des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires doivent être entretenues tous les 2 à 3 jours pour être maintenues en vie. Un passage est effectué selon les étapes suivantes (Figure II. 16) :

1. Retirer le milieu de culture et rincer délicatement les cellules avec 4 mL de tampon phosphate.
2. Retirer le tampon phosphate.
  - 2.1 Pour les ostéoblastes hFOB1.19, ajouter 3 mL de solution de trypsine/EDTA dans la flasque de manière à décoller les cellules du substrat par action enzymatique. Incuber la flasque à 37°C.
  - 2.2 Pour les macrophages RAW.264.7, décoller les cellules mécaniquement à l'aide d'un grattoir.
3. Lorsque les cellules commencent à se détacher du substrat, la dissociation peut être accélérée en donnant au bord de la fiole un coup sec avec la main dans le cas des ostéoblastes.
4. Utiliser du milieu de culture cellulaire pour rincer les cellules, en dirigeant l'écoulement de la pipette de manière à ce qu'elle se déloue les cellules adhérentes. Transférer les cellules dans un tube et disperser doucement la suspension (en pipétant à plusieurs reprises vers le haut et vers le bas) pour briser les amas de cellules.
5. Centrifuger le tube contenant les cellules (1400 rpm, 10 min), jeter le milieu surnageant et remettre les cellules en suspension dans un faible volume de milieu de culture.
6. Prélever un aliquot de 0,5 mL pour un comptage cellulaire. Cette méthode est utilisée pour déterminer la densité d'ensemencement ou la cinétique de croissance de la culture
7. Transférer le volume souhaité (par exemple,  $1,0 \cdot 10^6$  cellules) dans une flasque de 25 cm<sup>2</sup> contenant 7 mL de milieu complet.

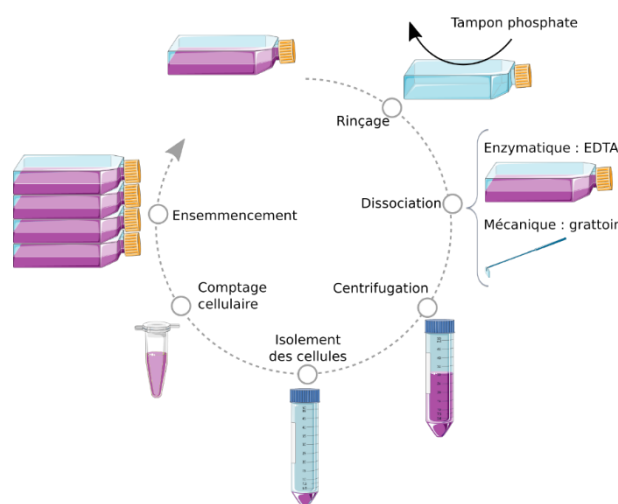


Figure II. 16 Cycle d'un passage de cellules : procédé de sous-culture de cellules animales.

## Annexe 4 Principe de la spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La surface de l'échantillon est bombardée par un faisceau de rayons X monochromatiques (photons Al K $\alpha$  ou Mg K $\alpha$ ) (Figure II. 17). Les photons sont absorbés par les atomes du solide, ce qui conduit à l'ionisation et à l'émission des électrons de cœur et de valence. Les électrons sont alors collectés par un analyseur qui mesure l'énergie cinétique  $E_c$ . En fixant l'énergie du photon incident  $h\nu$  et en mesurant l'énergie cinétique de l'électron éjecté  $E_c$ , il est possible de déduire l'énergie de liaison  $E_l$  par la relation :

$$h\nu = E_i + E_c \quad \text{Eq. A.II.4.1}$$

Les électrons sont classés et comptés en fonction de leur énergie de liaison  $E_i$ , caractéristique de l'atome d'origine et de leur environnement chimique. Le spectre XPS décrit une succession de pics correspondant à une énergie de liaison donnée permettant de réaliser une analyse élémentaire.

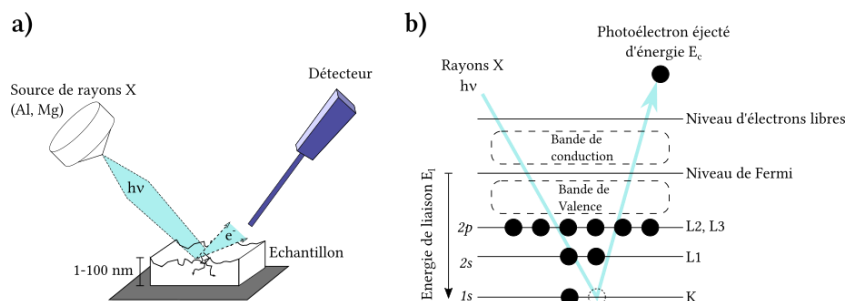


Figure II. 17 a) Schéma de la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) et b) des niveaux d'énergie des électrons soumis à des rayons X.

## Annexe 5

Cette annexe présente les résultats détaillés des paramètres électrochimiques obtenus suite aux essais de SIE de l'électrode platine immergée en RPMI-1640 supplémenté (10 % vol de SVF) et en absence de SVF.

Tableau III. 7 Résultats des paramètres électrochimiques d'une électrode de platine polarisée dans le RPMI-1640 avec ou sans SVF. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins deux échantillons. Les paramètres du CPE ( $Q$  et  $\alpha$ ) ont été obtenus à l'aide des méthodes graphiques présentées par Orazem et al. [98].

E / mV vs. ECS	SVF	$R_e / \Omega \text{ cm}^2$	$R_2 / k\Omega \text{ cm}^2$	$\alpha$	$Q / \mu\text{F s}^{\alpha-1} \text{ cm}^{-2}$	$W / \Omega \text{ s}^{-0.5} \text{ cm}^2$	Distribution de surface (Brug)	
							$C_{\text{eff}} / \mu\text{F cm}^{-2}$	$d_{\text{eff}} / \text{nm}$
700	10% vol	$53,5 \pm 11,9$	$126,7 \pm 38,0$	$0,918 \pm 0,015$	$55,9 \pm 1,8$		$115,0 \pm 9,8$	$0,09^* \pm 0,01$
	sans	$51,2 \pm 6,9$	$94,2 \pm 39,2$	$0,926 \pm 0,007$	$54,1 \pm 1,0$		$102,0 \pm 4,1$	$0,10^* \pm 0,01$
300	10% vol	$45,5 \pm 6,8$	$778,8 \pm 326,8$	$0,907 \pm 0,002$	$42,6 \pm 5,7$		$93,2 \pm 17,5$	$0,12^* \pm 0,02$
	sans	$84,4 \pm 16,9$	$790,9 \pm 142,8$	$0,920 \pm 0,010$	$39,2 \pm 3,9$		$75,4 \pm 3,8$	$0,14^* \pm 0,01$
-150	10% vol	$35,0 \pm 3,0$	$108,7 \pm 61,4$	$0,936 \pm 0,024$	$25,1 \pm 2,7$		$36,5 \pm 8,8$	$1,87 \pm 0,42$
	sans	$70,0 \pm 16,7$	$70,4 \pm 17,5$	$0,964 \pm 0,008$	$26,1 \pm 2,9$		$34,9 \pm 5,9$	$1,91 \pm 0,32$
-450	10% vol	$31,6 \pm 17,3$	$20,5 \pm 4,4$	$0,935 \pm 0,008$	$30,4 \pm 2,6$		$50,3 \pm 6,2$	$1,32 \pm 0,16$
	sans	$31,9 \pm 8,5$	$17,9 \pm 0,2$	$0,928 \pm 0,001$	$32,1 \pm 2,2$		$55,1 \pm 2,6$	$1,19 \pm 0,21$
-600	10% vol	$56,8 \pm 11,3$	$15,4 \pm 1,8$	$0,796 \pm 0,069$	$88,1 \pm 35,7$	$355,7 \pm 54,6$	$782,6 \pm 130,8$	$0,17 \pm 0,12$
	sans	$67,2 \pm 22,8$	$13,7 \pm 7,1$	$0,873 \pm 0,016$	$43,8 \pm 3,0$		$141,6 \pm 34,3$	$0,48 \pm 0,12$

## Annexe 6 Principe de la microscopie confocale à fluorescence

Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchiée et/ou en fluorescente. Généralement un laser est utilisé comme source de lumière. Son faisceau est concentré par une lentille et assure le balayage de la surface de l'échantillon, préalablement marquée par des fluorochromes (Figure VI. 19). Les molécules fluorescentes du produit de marquage reçoivent des photons provenant du laser et réémettent en retour une lumière qui est collectée par l'objectif puis par le détecteur. Sur le trajet des rayons, un diaphragme variable (*pinhole*) est situé sur l'avant du détecteur dans le plan conjugué avec celui de l'échantillon (confocal). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal, qui est confocal avec le plan du *pinhole*, parviennent au diaphragme variable et participent à la formation de l'image. La lumière provenant des plans adjacents (floue) est arrêtée par les bords du trou. Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal. Le microscope confocal à balayage laser MCBL (soit CLSM pour "*confocal laser scanning microscope*") est ainsi défini.

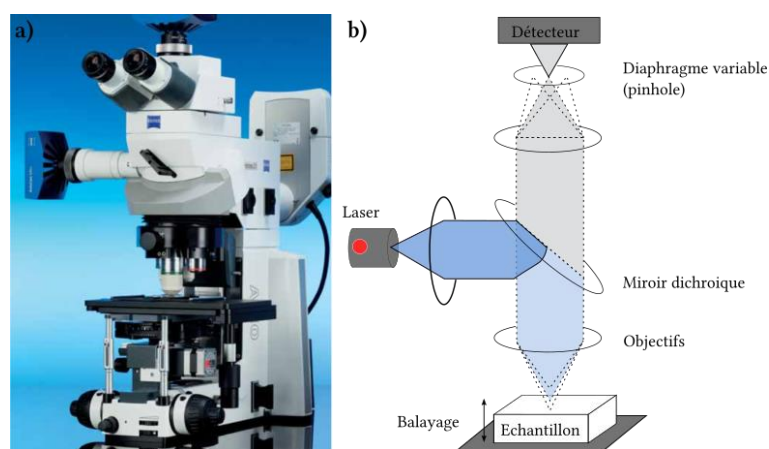


Figure VI. 19 a) Microscope confocal à balayage laser (Zeiss Axio Examiner Z1), b) Schéma du trajet optique du laser sur un microscope confocal à balayage laser (MCBL).

Dans la pratique, l'énergie du laser est partiellement absorbée par des molécules réceptrices hors du point focal, notamment sur le chemin optique du laser. Il y a alors diminution ou disparition de la fluorescence dans une région définie au cours des illuminations successives. Ceci provoque un effet de saturation lumineuse appelé photoblanchiment (ou *Fluorescence Loss Induced by Photobleaching*), qui impacte la qualité des images de microscopie. Le temps d'acquisition est donc lié à un compromis entre la volonté d'obtenir une image de qualité à partir d'un balayage plus lent, et la nécessité de conserver intacts les fluorochromes en pratiquant un balayage plus rapide.

## Annexe 7 Contact et pression du point initial hertzien

La théorie de Hertz décrit la géométrie d'un contact élastique entre deux sphères de rayons quelconques, ou une sphère et une surface plane (rayon de courbure infini). Les hypothèses sont les suivantes :

- les solides sont isotropes et homogènes et soumis à des contraintes faibles, dans les limites de leur réponse élastique,
- les surfaces sont parfaites, lisses et homogènes
- la force s'applique perpendiculairement au plan de contact. Il n'y a ni adhésion, ni frottement ou force tangentielle au plan défini par le contact.
- les dimensions de l'aire de contact, par exemple le rayon ( $a$ ) dans le cas du contact sphère-plan, sont petites par rapport au rayon de courbure des surfaces ( $a \gg R$ ).

Considérons le cas d'une sphère en contact avec un plan sous une charge normale  $F_n$ , un contact se produit entre les deux sur une surface circulaire de rayon  $a$  (Figure VI. 20). La taille de la surface de contact est déterminée par la charge normale appliquée et les propriétés déformatrices des deux matériaux en contact. Le rayon,  $a$ , d'une surface de contact peut être calculé à l'aide d'une équation donnée par Hertz (Eq.A.VI.5.1) [494].

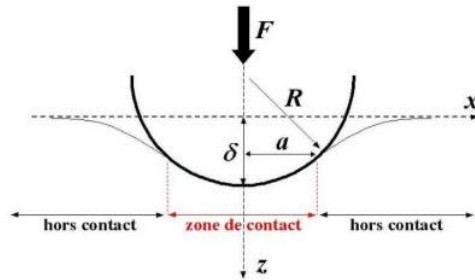


Figure VI. 20 Géométrie du contact pointe-cellule selon un modèle de Hertz sphère-plan.

$$a = \left( \frac{3F_n R}{4E^*} \right)^{1/3} \quad \text{Eq.A.VI.5.1}$$

où  $R$  est le rayon de la sphère et  $E^*$  est le module d'Young effectif. Il dépend des modules d'Young des deux matériaux en contact,  $E_1$  et  $E_2$ , et de leurs coefficients de Poisson,  $\nu_1$  et  $\nu_2$  :

$$\frac{1}{E^*} = \left( \frac{1-\nu_1^2}{E_1} \right) + \left( \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right) \quad \text{Eq.A.VI.5.2}$$

La profondeur d'indentation  $\delta$  de la sphère par rapport au plan de la surface est obtenue par la relation suivante :

$$\delta = \pi \frac{a^2}{R} \quad \text{Eq.A.VI.5.3}$$

L'aire de la zone de contact  $A$  est, dans le cas considéré, l'aire d'un disque de rayon  $a$  :

$$A = \pi a^2 \quad \text{Eq.A.VI.5.4}$$

La pression moyenne de Hertz  $P_m$  s'exerçant sur la surface de contact s'obtient par la relation Eq.A.VI.5.5.

$$P_m = \frac{F_n}{A} \quad \text{Eq.A.VI.5.5}$$

Le système tribologique utilisé dans cette thèse de doctorat était composé d'un pion de UHMWPE à face bombée (rayon de 48 mm) et d'un disque de CoCrMo, dont les modules de Young et les rapports de Poisson sont donnés à l'Annexe II.1, respectivement. En utilisant les équations Eq.A.VI.5.1 et Eq.A.VI.5.2, le rayon d'une surface de contact a été calculé à  $24 \cdot 10^{-3}$  m. La pression de contact hertzienne moyenne de 10 MPa a été obtenue en divisant la force normale de 35 N utilisée dans les expériences de tribocorrosion par la surface de contact.

## Annexe 8 Principe de la profilométrie optique

La profilométrie optique a été développée pour la mesure du relief d'une surface à l'aide d'un interférogramme, basée sur l'interférométrie (Figure VI. 21). Un faisceau de lumière blanche est dirigé sur une lame séparatrice créant deux faisceaux : l'un est réfléchi par l'échantillon à analyser et l'autre est réfléchi par le miroir de référence. Les deux faisceaux de lumière sont collectés sur le capteur avec une différence de trajet optique, ce qui produit des franges d'interférences, et indique le relief de l'objet. Pendant la mesure, la lentille interférométrique se déplace verticalement, balayant la surface à différentes hauteurs. Le contraste interférentiel se traduit en termes de hauteur selon Z et est périodique avec la différence de marche en lumière monochromatique. La hauteur relative en chaque point est un multiple de  $\lambda/2$  du à la périodicité des franges d'interférences. On obtient ainsi la topographie de la surface, par tranches d'épaisseur  $\lambda/2$ , puis un traitement logiciel est utilisé pour assembler les découpes ensemble et établir un profil topographique. La résolution des profilomètres optiques peut atteindre 2 mm en Z.

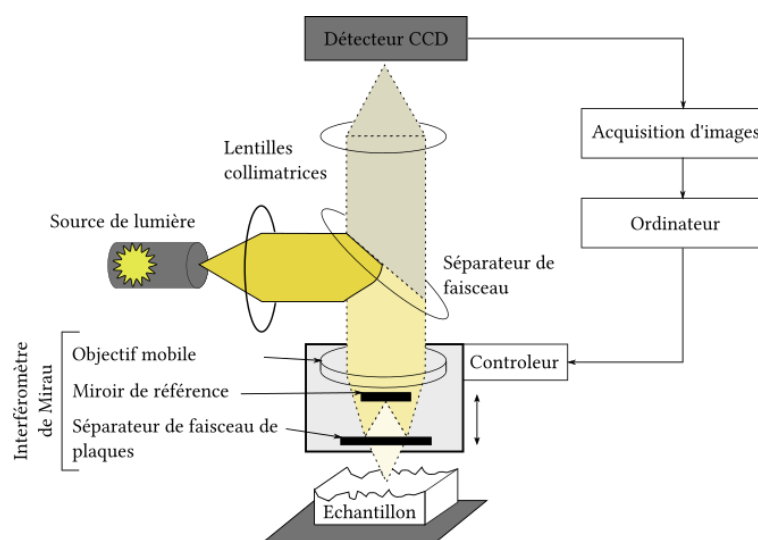


Figure VI. 21 Schéma de principe du profilomètre optique sans contact.

## Annexe 9 Principe de la Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Les échantillons liquides sont nébulisés et introduits dans le flux d'un plasma gazeux d'argon composé d'électrons et d'ions argon chargés positivement (Figure VI. 22). Dans le plasma, la matière se divise en atomes individuels qui perdent des électrons et deviennent des ions chargés positivement (les anions ne sont pas détectés par ICP-MS). Le faisceau d'ions positifs entre dans un analyseur où les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge. La longueur d'onde de la lumière émise est caractéristique des éléments et est alors convertie en un signal électrique qui est mesuré quantitativement.

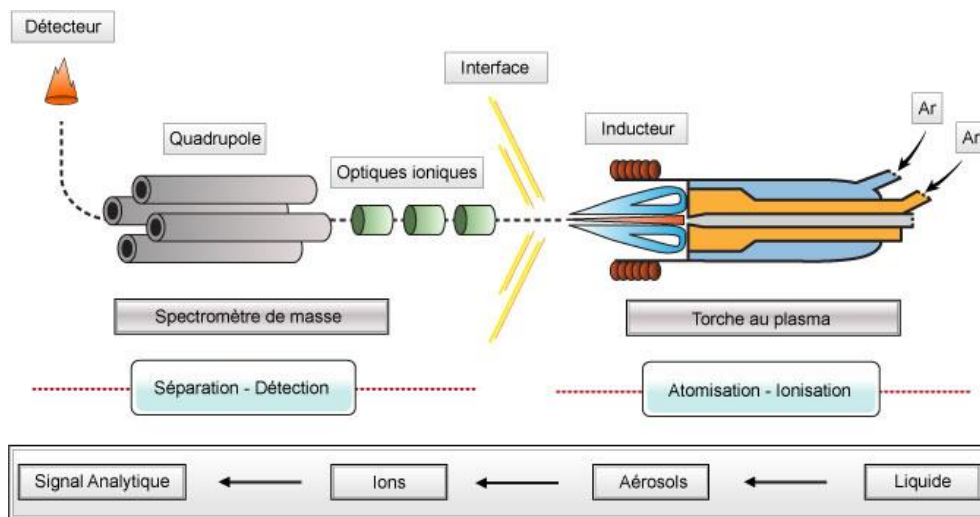


Figure VI. 22 Principaux éléments de la Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS).

# Références bibliographiques

- [1] N.E. Gougoulias, A. Khanna, N. Maffulli, History and evolution in total ankle arthroplasty, *Br. Med. Bull.*, 2009 vol. **89**, n° 1, pp. 111–151.
- [2] S. Kurtz, K. Ong, E. Lau, F. Mowat, M. Halpern, Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.*, 2007 vol. **89**, n° 4, pp. 280–285.
- [3] S.M. Kurtz, E. Lau, K. Ong, K. Zhao, M. Kelly, K.J. Bozic, Future young patient demand for primary and revision joint replacement: National projections from 2010 to 2030, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2009 vol. **467**, n° 10, pp. 2606–2612.
- [4] G. Labek, M. Thaler, W. Janda, M. Agreiter, B. Stöckl, Revision rates after total joint replacement: cumulative results from worldwide joint register datasets., *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2011 vol. **93**, n° 7, pp. 998.
- [5] E. Jämsen, H. Huhtala, T. Puolakka, T. Moilanen, Risk factors for infection after knee arthroplasty a register-based analysis of 43,149 cases, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.*, 2009 vol. **91**, n° 1, pp. 38–47.
- [6] M. Khatod, G. Cafri, R.S. Namba, M.C.S. Inacio, E.W. Paxton, Risk factors for total hip arthroplasty aseptic revision, *J. Arthroplasty.*, 2014 vol. **29**, n° 7, pp. 1412–1417.
- [7] K.L. Ong, F.S. Mowat, N. Chan, E. Lau, M.T. Halpern, S.M. Kurtz, Economic burden of revision hip and knee arthroplasty in medicare enrollees, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2006 vol. **446**, pp. 22–28.
- [8] J. Crowe, T. Sculco, B. Kahn, O.N.C. RN, Revision Total Hip Arthroplasty: Hospital Cost and Reimbursement Analysis., *Clin Orthop.*, 2003 vol. **413**, pp. 175–182.
- [9] N. Eliaz, *Degradation of implant materials*, Springer S, New York, 2012.,
- [10] Z. Chiri, A. Guerci, Prothèses moléculaires - L'homme en pièces détachées. **In: Corps, prothèses, hybridation: Essai médical**, A. Fergombe (Ed.), EME éditio, 2015.,
- [11] S. Ramakrishna, M. Ramalingam, T.S.S. Kumar, W.O. Soboyejo, Metallic Biomaterials, **In: Biomaterials a nano approach**, CRC Press, 2010.,
- [12] G. Rohman, Materials Used in Biomaterial Applications, **In: Biomaterials**, V. Migonney (Ed.), ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc, 2014.,
- [13] Y.K. Kim, J. B.Park, Metallic biomaterials, **In: Biomaterials**, B. Raton (Ed.), CRC Press, 2007.; pp. 1–22.
- [14] M. Valko, H. Morris, M. Cronin, Metals, Toxicity and Oxidative Stress, *Curr. Med. Chem.*, 2005 vol. **12**, n° 10, pp. 1161–1208.
- [15] P.J. Andersen, A.M. Llc, Metals for Use in Medicine, **In: Comprehensive Biomaterials**, Elsevier Ltd., 2011.; pp. 5–20.
- [16] D.F. Williams, *The Williams dictionary of biomaterials*, Liverpool University Press, 1999.,
- [17] V. Migonney, Biocompatibility and Norms, **In: Biomaterials**, V. Migonney (Ed.), ISTE Ltd and John Wiley & Sons, Inc, 2014.,
- [18] S. Ramakrishna, M. Ramalingam, T.S.S. Kumar, W.O. Soboyejo, Degradation and Corrosion of Biomaterials, **In: Biomaterials a nano approach**, CRC Press, 2010.; pp. 57–80.
- [19] M. Maestro, B. Ferre, Anatomie fonctionnelle du pied et de la cheville de l'adulte, *Rev. Du Rhum. Monogr.*, 2014 vol. **81**, n° 2, pp. 61–70.
- [20] N. Fusco, Analyse, modélisation et simulation de la marche pathologique, 2008.
- [21] R.N. Stauffer, E.Y.S. Chao, R.C. Brewster, Force and Motion Analysis of the Normal, Diseased, and Prosthetic Ankle Joint, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1977 vol. **127**, n° September, pp. 189–196.
- [22] A. Lundberg, Kinematics of the Normal Ankle Joint, **In: Current status of ankle arthroplasty**, Springer, 1998.,
- [23] B. Reggiani, A. Leardini, F. Corazza, M. Taylor, Finite element analysis of a total ankle replacement during the stance phase of gait, *J. Biomech.*, 2006 vol. **39**, n° 8, pp. 1435–1443.
- [24] T.D. Brown, R.C. Johnston, C.L. Saltzman, J.L. Marsh, J.A. Buckwalter, Posttraumatic osteoarthritis: A first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease, **In: Journal of Orthopaedic Trauma**, 2006.,
- [25] J.A. Buckwalter, C. Saltzman, T. Brown, The impact of osteoarthritis: Implications for research, **In: Clinical Orthopaedics and Related Research**, 2004.,
- [26] M. Glazebrook, T. Daniels, A. Younger, C.J. Foote, M. Penner, K. Wing, J. Lau, R. Leighton, M. Dunbar, Comparison of health-related quality of life between patients with end-stage ankle and hip arthrosis, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.*, 2008.
- [27] X.F. Courville, P.J. Hecht, A.N.A. Tosteson, Is total ankle arthroplasty a cost-effective alternative to ankle fusion?, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2011 vol. **469**, n° 6, pp. 1721–1727.
- [28] R. Thomas, T.R. Daniels, K. Parker, Gait analysis and functional outcomes following ankle arthrodesis for isolated ankle arthritis, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.*, 2006.
- [29] N.F. SooHoo, G. Kominski, Cost-effectiveness analysis of total ankle arthroplasty, **In: Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, 2004.,
- [30] G. Lord, J. Marotte, Total ankle prosthesis. Technic and 1st results. Apropos of 12 cases, *Rev. Chir. Orthopédique Réparatrice l Appar. Mot.*, 1973 vol. **59**, pp. 139–151.
- [31] M. Freeman, M. Kempson, M. Tuke, Total replacement of the ankle with the ICLH prosthesis, *Int. Orthop.*, 1979 vol. **2**, n° 4, pp. 237–331.
- [32] A. Wynn, A. Wilde, Long-term follow up of the Conaxial (Beck-Steffee) total ankle arthroplasty, *Foot Ankle.*, 1992 vol. **13**, n° 6, pp. 303–36.
- [33] B. Zerahn, H. Kofoed, Bone mineral density, gait analysis, and patient satisfaction, before and after ankle arthroplasty, *Foot Ankle Int.*, 2004 vol. **25**, pp. 208–214.
- [34] B. Hintermann, *Total ankle arthroplasty. Historical overview, current concepts and future perspectives*, SpringerWi, 2005.,
- [35] T.S. Roukis, G.C. Berlet, C. Bibbo, C.F. Hyer, M.J. Penner, M. Wünschel, *Primary and Revision Total Ankle Replacement*, Springer, 2015.,
- [36] T.S. Roukis, A.F.P. Bartel, Survivorship of First-, Second-, and Third-Generation Total Ankle Replacement Systems, **In: Primary and Revision Total Ankle Replacement**, T.S. Roukis, G.C. Berlet, C. Bibbo, C.F. Hyer, M.J. Penner, M. Wünschel (Eds.), 2015.,
- [37] J.A. Vickerstaff, A.W. Miles, J.L. Cunningham, A brief history of total ankle replacement and a review of the current status., *Med. Eng. Phys.*, 2007 vol. **29**, n° 10, pp. 1056–64.
- [38] A.P.B.M. Saad, A. Syahrom, M.N. Harun, M.R.A. Kadir, *Wear Prediction on Total Ankle Replacement Effect of Design Parameters*, Springer, 2016.,
- [39] A. Saxena, ed., *International advances in foot and ankle surgery*, Springer, 2012.,
- [40] J. Deorio, M. Easley, Total ankle arthroplasty, *Instr. Course Lect.*, 2008 vol. **57**, pp. 383–413.
- [41] M.H. Feldman, J. Rockwood, Total ankle arthroplasty: A review of 11 current ankle implants, *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, 2004 vol. **21**, n° 3, pp. 393–406.
- [42] S.G. Urwin, D.F. Kader, N. Caplan, A. St Clair Gibson,

- S. Stewart, Gait analysis of fixed bearing and mobile bearing total knee prostheses during walking: Do mobile bearings offer functional advantages?, *Knee*, 2014 vol. **21**, pp. 391–395.
- [43] V. Valderrabano, G.I. Pagenstert, A.M. Müller, J. Paul, H.B. Henninger, A. Barg, Mobile- and fixed-bearing total ankle prostheses, *Foot Ankle Clin.*, 2012 vol. **17**, n° 4, pp. 565–585.
- [44] N.J. Hallab, J.J. Jacobs, Biologic effects of implant debris, *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.*, 2009 vol. **67**, n° 2, pp. 182–188.
- [45] Y. Takakubo, A. Berce, R. Trebše, Y. Tamaki, I. Milošev, A. Al-Samadi, V.-M. Tiainen, Orton, Y.T. Konttinen, Wear and corrosion in the loosening of total joint replacements (TJR), In: Bio-Tribocorrosion in Biomaterials and Medical Implants, Woodhead Publishing Limited, 2013; pp. 74–110.
- [46] D. Bitar, J. Parvizi, Biological response to prosthetic debris, *World J. Orthop.*, 2015 vol. **6**, n° 2, pp. 172–189.
- [47] B. Ollivere, J.A. Wimbhurst, I. M. Clark, S.T. Donell, Current concepts in osteolysis, *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2012 vol. **94**, pp. 10–15.
- [48] A. Sargeant, T. Goswami, Hip implants - Paper VI - Ion concentrations, *Mater. Des.*, 2007 vol. **28**, n° 1, pp. 155–171.
- [49] H.S. Dobbs, M.J. Minski, Metal ion release after total hip replacement, *Biomaterials.*, 1980 vol. **1**, n° 4, pp. 193–198.
- [50] R. Shrivastava, R.K. Upreti, P.K. Seth, U.C. Chaturvedi, Effects of chromium on the immune system, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2002 vol. **34**, pp. 1–7.
- [51] J.Y. Wang, B.H. Wicklund, R.B. Gustilo, D.T. Tsukayama, Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in vitro, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1997 vol. **339**, pp. 216–226.
- [52] L. Anissian, A. Stark, H. Dahlstrand, B. Granberg, V. Good, E. Bucht, Cobalt ions influence proliferation and function of human osteoblast-like cells, *Acta Orthop. Scand.*, 2002 vol. **73**, n° 3, pp. 369–374.
- [53] K.M. Shah, J.M. Wilkinson, A. Gartland, Cobalt and chromium exposure affects osteoblast function and impairs the mineralization of prosthesis surfaces in vitro, *J. Orthop. Res.*, 2015 vol. **33**, n° 11, pp. 1663–1670.
- [54] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.*, 2008 vol. **20**, n° 2, pp. 86–100.
- [55] N. Hallab, K. Merritt, J.J. Jacobs, Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.*, 2001 vol. **83A**, n° 3, pp. 428–436.
- [56] N. Martinelli, S. Baretta, J. Pagano, A. Bianchi, T. Villa, G. Casaroli, F. Galbusera, Contact stresses, pressure and area in a fixed-bearing total ankle replacement: A finite element analysis, *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2017 vol. **18**, n° 1, pp. 1–9.
- [57] T. McIff, C. Saltzman, T. Brown, Contact pressure and internal stresses in a mobile bearing total ankle replacement, In: 47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 2001,.
- [58] K. Iwakiri, Y. Minoda, A. Kobayashi, R. Sugama, H. Iwaki, F. Inori, Y. Hashimoto, H. Ohashi, Y. Ohta, K. Fukunaga, K. Takaoka, In Vivo Comparison of Wear Particles Between Highly Crosslinked Polyethylene and Conventional Polyethylene in the Same Design of Total Knee Arthroplasties, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, 2009 n° 91B, pp. 799–804.
- [59] G. McCollum, M.S. Myerson, Failure of the Agility Total Ankle Replacement System and the Salvage Options, *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, 2013 vol. **30**, n° 2, pp. 207–223.
- [60] J.L. Besse, Osteolytic cysts with total ankle replacement: Frequency and causes?, *Foot Ankle Surg.*, 2015 vol. **21**, n° 2, pp. 75–76.
- [61] J.L. Besse, C. Lienhart, M.H. Fessy, Outcomes Following Cyst Curettage and Bone Grafting for the Management of Periprosthetic Cystic Evolution After AES Total Ankle Replacement, *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, 2013 vol. **30**, n° 2, pp. 157–170.
- [62] F. Dalat, R. Barnoud, M.H. Fessy, J.L. Besse, Histologic study of periprosthetic osteolytic lesions after AES total ankle replacement. A 22 case series, *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, 2013 vol. **99**, n° 6 SUPPL, pp. S285–S295.
- [63] M. Bonnin, F. Gaudot, J.-R. Laurent, S. Ellis, J.-A. Colombier, T. Judet, The Salto Total Ankle Arthroplasty, *Clin Orthop Relat Res.*, 2011 n° 469, pp. 225–236.
- [64] Y. Kadoya, A. Kobayashi, H. Ohashi, Wear and osteolysis in total joint replacements, *Acta Orthop. Scand. ISSN.*, 1998 vol. **69**, n° 278, pp. 1–16.
- [65] J.K. Steck, J.B. Anderson, Total Ankle Arthroplasty: Indications and Avoiding Complications, *Clin Pod. Med Surg.*, 2009 vol. **26**, pp. 303–324.
- [66] S. Gupta, J.K. Ellington, M.S. Myerson, Management of specific complications after revision total ankle replacement, *Semin. Arthroplast.*, 2010 vol. **21**, n° 4, pp. 310–319.
- [67] F.G. Krause, M. Windolf, B. Bora, M.J. Penner, K.J. Wing, A.S.E. Younger, Impact of complications in total ankle replacement and ankle arthrodesis analyzed with a validated outcome measurement, *J. Bone Jt. Surg.*, 2011 vol. **93**, n° 9, pp. 830–839.
- [68] C.L. Saltzman, A. Amendola, R. Anderson, C. Coetzee, R.J. Gall, S.L. Haddad, S. Herbst, G. Lian, R.W. Sanders, M. Scioli, A.S. Younger, Surgeon Training and Complications in Total Ankle Arthroplasty, *Foot Ankle Int.*, 2003 vol. **24**, n° 6, pp. 514–518.
- [69] A. Haskell, R.A. Mann, Perioperative Complication Rate of Total Ankle Replacement Is Reduced by Surgeon Experience, *Foot Ankle Int.*, 2004 vol. **25**, n° 5, pp. 283–289.
- [70] ASTM Standard F-1537-11, Standard Specification for Wrought Cobalt–28 Chromium–6 Molybdenum Alloys for Surgical Implants, *ASTM Int. West Conshohocken.*, 2007.
- [71] ISO Standard 5832-12 Implants for Surgery – Metallic Materials, Part 12: Wrought Cobalt–Chromium–Molybdenum Alloy., *Int. Organ. Stand.*, 2007 vol. **Geneva, Sw.**
- [72] A. Kocijan, I. Milošev, B. Pihlar, Cobalt-based alloys for orthopaedic applications studied by electrochemical and XPS analysis, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2004 vol. **15**, n° 6, pp. 643–650.
- [73] M. Metikos-Hukovic, S. Omanovic, R. Babic, I. Milosev, An electrochemical study of the passive film formed on Ni-Cr (80/20) coating, *Berichte Der Bunsengesellschaft Phys. Chem.*, 1994 vol. **98**, n° 10, pp. 1243–1249.
- [74] R.M. Berlin, L.J. Gustavson, A.K. Wang., Influence of Post Processing on the Mechanical Properties of Investment Cast and Wrought CoCrMo Alloys, In: Cobalt-base Alloys for Biomedical Applications STP 1481, R. Disegi, J. A. Kennedy, R. L., Pilliar (Ed.), *ASTM Inter.*, West Conshohocken, PA, 1999; p. 62.
- [75] A.J.T. Clemow, B.L. Daniell, Solution treatment behavior of Co-Cr-Mo alloy, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1979 vol. **13**, pp. 265–279.
- [76] F. Onderka, J. Kadlec, Chemical Composition and Hardness of As-Cast Biocompatible CoCrMo Alloy, *Littera Scr.*, 2013 vol. **6**, pp. 184–194.
- [77] W.D. Callister, ed., Materials Science and Engineering, An Introduction, John Wiley, New York, 2007,.
- [78] L.A. Pruitt, Deformation, yielding, fracture and fatigue behavior of conventional and highly cross-linked ultra high molecular weight polyethylene, *Biomaterials.*, 2005 vol. **26**, pp. 905–915.
- [79] J. Zhou, A. Chakravartula, L. Pruitt, K. Komvopoulos, Tribological and Nanomechanical Properties of Unmodified and Crosslinked Ultra-High Molecular Weight Polyethylene for Total Joint Replacements, *J.*



- Tribol.*, 2004 vol. **126**, n° 2, pp. 386.
- [80] K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, *Biomaterials*, In: John Wiley, 2002,.
- [81] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons, eds., Biomaterials science. An introduction to materials in medicine, Academic P, San Diego, 1996,.
- [82] ASTM-F648. Standard Specification for Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylene Powder and Fabricated Form for Surgical Implants, , 2014.
- [83] ISO 5834. Implants chirurgicaux. Polyéthylène à très haute masse moléculaire. Partie 1: Produits sous forme de poudre, , 2019.
- [84] N. Wang, Greffage de polymères biomimétiques sur implants articulaires en polyéthylène: contrôle du comportement tribologique, Université Claude Bernard Lyon 1, 2013.
- [85] E.M. Czeakańska, In vitro cell and culture models for osteoblasts and their progenitors By Supervised by, 2014.
- [86] Gibco™ Education ThermoFisher Scientific, Cell Culture Basics Handbook, , 2016.
- [87] S.B. Rodan, Y. Imai, M.A. Thiede, G. Wesolowski, D. Thompson, Z. Bar-Shavit, S. Shull, K. Mann, G.A. Rodan, Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties, *Cancer Res.*, 1987 vol. **47**, n° 18, pp. 4961–4966.
- [88] R. Richards, E. Czekanska, J. Hayes, M. Stoddart, In search of an osteoblast cell model for in vitro research, *Eur. Cells Mater.*, 2016 vol. **24**, pp. 1–17.
- [89] M. Keddad, R. Oltra, C. Duret-Thual, Contrôle et suivi de la corrosion: Tests et méthodes, In: Prévention et lutte contre la corrosion, B. Normand, N. Pébère, C. Richard, M. Wery (Eds.), Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, 2004,; pp. 445–482.
- [90] M. Keddad, J.P. Millet, Caractérisation électrochimique de la corrosion, In: Corrosion des métaux et alliages- Mécanismes et phénomènes, G. Beranger, H. Mazille (Eds.), Hermès Science Publication Lavoisier, Paris, 2002,; pp. 139–160.
- [91] P. Bommersbach, C. Alemany-Dumont, J.P. Millet, B. Normand, Formation and behaviour study of an environment-friendly corrosion inhibitor by electrochemical methods, *Electrochim. Acta.*, 2005 vol. **51**, n° 6, pp. 1076–1084.
- [92] R.G. Kelly, J.R. Scully, D.W. Shoesmith, R.G. Buchheit, Electrochemical Techniques in Corrosion Science and Engineering, Marcel Dek, New York, 2003,.
- [93] E. Ghali, V.S. Sastri, M. Elboudjaini, Corrosion Prevention and Protection: Practical Solutions, Wiley, Chichester, 2007,.
- [94] E. Bardal, Corrosion and Protection, Springer, London, 2003,.
- [95] P. Marcus, T. Magnin, Corrosion Mechanisms in Theory and Practice. Third Edition, CRC Press, New York, 2012,.
- [96] J. Wang, Analytical Electrochemistry, Second Edition, Wiley-VCH, New York, 2000,.
- [97] C. Gabrielli, Identification of electrochemical processes by frequency response analysis, 1998,.
- [98] M.E. Orazem, N. Pébère, B. Tribollet, Enhanced graphical representation of electrochemical impedance data, *J. Electrochem. Soc.*, 2006 vol. **153**, n° 4, pp. 129–136.
- [99] P. Córdoba-Torres, M. Keddad, R.P. Nogueira, On the intrinsic electrochemical nature of the inductance in EIS, *Electrochim. Acta.*, 2008 vol. **54**, n° 2, pp. 518–523.
- [100] S. Zanna, C. Compere, P. Marcus, XPS characterisation of BSA adsorption on stainless steel, In: Passivation of Metals and Semiconductors, and Properties of Thin Oxide Layers, P. Marcus, V. Maurice (Eds.), Elsevier, Paris, 2006,; pp. 365–370.
- [101] I. Frateur, L. Lartundo-Rojas, C. Méthivier, A. Galtayries, P. Marcus, Influence of bovine serum albumin in sulphuric acid aqueous solution on the corrosion and the passivation of an iron-chromium alloy, *Electrochim. Acta.*, 2006 vol. **51**, n° 8–9, pp. 1550–1557.
- [102] C. Tkaczyk, O.L. Huk, F. Mwale, J. Antoniou, D.J. Zukor, A. Petit, M. Tabrizian, The molecular structure of complexes formed by chromium or cobalt ions in simulated physiological fluids, *Biomaterials.*, 2009 vol. **30**, n° 4, pp. 460–467.
- [103] T. Hanawa, S. Hiromoto, K. Asami, Characterization of the surface oxide film of a Co-Cr-Mo alloy after being located in quasi-biological environments using XPS, *Appl. Surf. Sci.*, 2001 vol. **183**, n° 1–2, pp. 68–75.
- [104] M. Ben Salah, R. Sabot, P. Refait, I. Liascukiene, C. Méthivier, J. Landoulsi, L. Dhouibi, M. Jeannin, Passivation behaviour of stainless steel (UNS N-08028) in industrial or simplified phosphoric acid solutions at different temperatures, *Corros. Sci.*, 2015 vol. **99**, pp. 320–332.
- [105] I. Milošev, H.H. Strehblow, The composition of the surface passive film formed on CoCrMo alloy in simulated physiological solution, *Electrochim. Acta.*, 2003 vol. **48**, n° 19, pp. 2767–2774.
- [106] M. Schmidt, X-ray photoelectron spectroscopy studies on adsorption of amino acids from aqueous solutions onto oxidised titanium surfaces, *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 2001 vol. **121**, pp. 403–410.
- [107] A. Foelske, H.H. Strehblow, Passivity of cobalt in borate buffer at pH 9.3 studied by X-ray photoelectron spectroscopy, *Surf. Interface Anal.*, 2000 vol. **29**, n° 8, pp. 548–555.
- [108] F. Grellner, B. Klingenberg, D. Borgmann, G. Wedler, Electron spectroscopic study of the interaction of oxygen with Co(1120) and of coadsorption with water, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.*, 1995 vol. **71**, n° 2, pp. 107–115.
- [109] M. Peuckert, XPS investigation of surface oxidation layers on a platinum electrode in alkaline solution, *Electrochim. Acta.*, 1984 vol. **29**, n° 10, pp. 1315–1320.
- [110] A. Ouerd, C. Alemany-Dumont, B. Normand, S. Szunerits, Reactivity of CoCrMo alloy in physiological medium: Electrochemical characterization of the metal/protein interface, *Electrochim. Acta.*, 2008 vol. **53**, n° 13, pp. 4461–4469.
- [111] A.I. Muñoz, S. Mischler, Interactive Effects of Albumin and Phosphate Ions on the Corrosion of CoCrMo Implant Alloy, *J. Electrochem. Soc.*, 2007 vol. **154**, n° 10, pp. C562–C570.
- [112] T. Hanawa, Characterization of surface films formed on titanium in electrolyte using XPS, *Appl. Surf. Sci.*, 1992 vol. **55**, pp. 269–276.
- [113] B. Demri, D. Muster, XPS study of some calcium compounds, *J. Mater. Process. Technol.*, 1995 vol. **55**, n° 3–4, pp. 311–314.
- [114] T. Moffat, R. Latanision, An Electrochemical and X-Ray Photoelectron Spectroscopy Study of the Passive State of Chromium, *J. Electrochem. Soc.*, 1992 vol. **139**, n° 7, pp. 1869–1879.
- [115] I. Grohmann, E. Kemnitz, Curve fitting of Cr 2p photoelectron spectra of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CrF<sub>3</sub>, *Surf. Interface Anal.*, 1995 vol. **23**, pp. 887–891.
- [116] T. Chuang, C. Brundle, D. Rice, Interpretation of the X-ray photoemission spectra of cobalt oxides and cobalt oxide surfaces, *Surf. Sci.*, 1976 vol. **59**, pp. 413–429.
- [117] J. Haber, L. Ungier, On chemical shifts of ESCA and auger lines in cobalt oxides, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.*, 1977 vol. **12**, pp. 305–312.
- [118] Y. Yan, A. Neville, D. Dowson, Tribo-corrosion properties of cobalt-based medical implant alloys in simulated biological environments, *Wear.*, 2007 vol. **263**, n° 7-12 SPEC. ISS., pp. 1105–1111.

- [119] A.W.E. Hodgson, S. Kurz, S. Virtanen, V. Fervel, C.O. a Olsson, S. Mischler, Passive and transpassive behaviour of CoCrMo in simulated biological solutions, *Electrochim. Acta.*, 2004 vol. **49**, n° 13, pp. 2167–2178.
- [120] C.O.A. Olsson, H.J. Mathieu, D. Landolt, Angle-resolved XPS analysis of molybdenum and tungsten in passive films on stainless steel PVD alloys, *Surf. Interface Anal.*, 2002 vol. **34**, n° 1, pp. 130–134.
- [121] B. Brox, I. Olefjord, ESCA Studies of MoO<sub>2</sub> and MoO<sub>3</sub>, *Surf. Interface Anal.*, 1988 vol. **13**, n° 1, pp. 3–6.
- [122] M. Xu, D.J. McCanna, J.G. Sivak, Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, 2015 vol. **71**, pp. 1–7.
- [123] D.M.L. Morgan, Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity, *Polyam. Protoc.*, 2003 vol. **79**, n° 4, pp. 179–184.
- [124] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay Johan, *Methods Mol Biol.*, 2011 vol. **31**, pp. 237–45.
- [125] A.J. Racher, D. Looby, J.B. Griffiths, Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability, *Cytotechnology.*, 1990 vol. **3**, pp. 301–307.
- [126] D. Koley, A.J. Bard, Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010 vol. **107**, n° 39, pp. 16793–16787.
- [127] Y. H.An, K. L.Martin, eds., Handbook of histology methods for bone and cartilage, Springer Science & Business Media, 2003,.
- [128] S.C. Marks, S.N. Popoff, Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton, *Am. J. Anat.*, 1988 vol. **183**, pp. 1–44.
- [129] D.C. Morris, K. Masuhara, K. Takaoka, K. Ono, H.C. Anderson, Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone, *Bone Miner.*, 1992 vol. **19**, pp. 287–292.
- [130] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass ceramic A-W3, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990 vol. **24**, n° 6, pp. 721–734.
- [131] A. Ouerd, *Comportement électrochimique et tribo-électrochimique de l'alliage CoCrMo en milieu physiologique simulé: Influence des protéines*, INSA de Lyon, 2009.
- [132] M. Haeri, S. Goldberg, J.L. Gilbert, The voltage-dependent electrochemical impedance spectroscopy of CoCrMo medical alloy using time-domain techniques: Generalized Cauchy-Lorentz, and KWW-Randles functions describing non-ideal interfacial behaviour, *Corros. Sci.*, 2011 vol. **53**, n° 2, pp. 582–588.
- [133] J.J. Ryu, P. Shrotriya, Mechanical load assisted dissolution response of biomedical cobalt–chromium and titanium metallic alloys: Influence of in-plane stress and chemical environment, *Wear.*, 2015 vol. **332–333**, pp. 662–668.
- [134] L.N. Wang, X.Q. Huang, A. Shinbine, J.L. Luo, Influence of albumin on the electrochemical behaviour of Zr in phosphate buffered saline solutions, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2013 vol. **24**, n° 2, pp. 295–305.
- [135] K. Khan, M. Elia, Factors affecting the stability of L-glutamine solution, *Clin. Nutr.*, 1991 vol. **10**, pp. 186–192.
- [136] M.J. Davies, R.J.W. Truscott, Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2001 vol. **63**, n° 63, pp. 114–125.
- [137] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003 vol. **305**, n° 3, pp. 761–770.
- [138] B. Sjöberg, *Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène: l'importance de l'environnement protéique*, Université de Franche-Comé, 2013.
- [139] J. Combes, E. De, *Etude de l'adhésion d'ostéoblastes sur substituts apatitiques par microscopie à force atomique*, 2009.
- [140] R.K. Sinha, R.S. Tuan, Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials., *Bone.*, 1996 vol. **18**, n° 5, pp. 451–7.
- [141] J.M. Davis, Basic Techniques and Media, the Maintenance of Cell Lines, and Safety, **In: Animal Cell Culture: Essential Methods**, J.M. Davis. (Ed.), John Wiley, 2011,; pp. 91–151.
- [142] R.G. Ham, W.L. McKeehan, Media and growth requirements, *Cell Cult.*, 1979 vol. **58**, pp. 44–93.
- [143] P. Gillery, Stress oxydant et glycation des protéines au cours du diabète sucré, *Ann Biol Clin.*, 2006 vol. **64**, n° 4, pp. 309–314.
- [144] R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, Advanced glycation end- products: a review, *Diabetologia.*, 2001 vol. **44**, pp. 129–46.
- [145] P. Gillery, J. Monboisse, F. Maquart, J. Borel, Glycation of proteins as a source of superoxide, *Diabetes Metab.*, 1988 vol. **14**, pp. 25–30.
- [146] Z. Jian, A. Woollard, S. Wolff, Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation, *FEBS Lett.*, 1990 vol. **268**, pp. 69–71.
- [147] I. Slavin, J.P. Schell, Contamination, **In: Human Stem Cell Manual (Second Edition)**, Second Edi, Elsevier Inc., 2012,; pp. 41–51.
- [148] R. Festen, Understanding Animal Sera: Considerations for Use in the Production of Biological Therapeutics, **In: Medicines from Animal Cell Culture**, G. Stacey, J. Davis (Eds.), John Wiley, New York, 2007,; pp. 45–58.
- [149] W. Bal, M. Sokółowska, E. Kurowska, P. Faller, Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2013 vol. **1830**, n° 12, pp. 5444–5455.
- [150] R. G.Narins, M. Emmett, Simple and mixed acid-base disorders a practical approach.pdf, *Medicine (Baltimore)*, 1980 vol. **59**, n° 3,.
- [151] M. Hong, S. Pyun, Corrosive wear behaviour of 304-L stainless steel in 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution Part 1. Effect of applied potential, *Wear.*, 1991 vol. **147**, pp. 59–67.
- [152] C. Valero Vidal, A. Igual Munoz, Study of the adsorption process of bovine serum albumin on passivated surfaces of CoCrMo biomedical alloy, *Electrochim. Acta.*, 2010 vol. **55**, n° 28, pp. 8445–8452.
- [153] X. Cheng, S.G. Roscoe, Corrosion behavior of titanium in the presence of calcium phosphate and serum proteins, *Biomaterials.*, 2005 vol. **26**, n° 35, pp. 7350–7356.
- [154] T. Kokubo, Surface chemistry of bioactive glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids.*, 1990 vol. **120**, n° 1–3, pp. 138–151.
- [155] K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, Protein-Surface Interactions, **In: An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions**, John Wiley, New York, 2002,; pp. 37–52.
- [156] P. Tengvall, Protein Interactions with Biomaterials, **In: Comprehensive Biomaterials**, P. Ducheyne, K. Healy, D.W. Huttmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick (Eds.), Elsevier, Elsevier Ltd., New York, 2011,; pp. 63–73.
- [157] K.B. Sagomonyants, G. Gronowicz, Integrin-Activated Reactions to Metallic Implant Surfaces, **In: Comprehensive Biomaterials**, P. Ducheyne, K. Healy, D.W. Huttmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick (Eds.), Elsevier, Elsevier Ltd., New York, 2011,; pp. 101–113.
- [158] M. Wahlgren, Protein adsorption to solid surfaces, *Trends Biotechnol.*, 1991 vol. **9**, n° 1, pp. 201–208.
- [159] S. Hiromoto, E. Onodera, A. Chiba, K. Asami, T. Hanawa, Microstructure and corrosion behaviour in biological environments of the new forged low-Ni Co-

- Cr-Mo alloys, *Biomaterials.* , 2005 vol. **26**, n° 24, pp. 4912–4923.
- [160] G.C.F. Clark, D.F. Williams, The effects of proteins on metallic corrosion, *J. Biomed. Mater. Res.* , 1982 vol. **16**, n° 2, pp. 125–134.
- [161] S. Omanovic, S.G. Roscoe, Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin on Stainless Steel, *Langmuir.* , 1999 n° 15, pp. 8315–8321.
- [162] C.W. Svare, C. Dentistry, I. Iowa, I. City, The Role of Organics in Metallic Passivation, *J. Biomed Mater. Res.* , 1970 vol. **4**, pp. 457–467.
- [163] J. Woodman, J. Black, S. Jimenez, Isolation of serum protein organometallic corrosion products from 316LSS and HS-21 in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res.* , 1984 vol. **18**, pp. 99–114.
- [164] B. Alemón, M. Flores, W. Ramírez, J.C. Huegel, E. Broitman, Tribocorrosion behavior and ions release of CoCrMo alloy coated with a TiAlVCN/CNx multilayer in simulated body fluid plus bovine serum albumin, *Tribol. Int.* , 2015 vol. **81**, n° 2015, pp. 159–168.
- [165] Y. Yan, A. Neville, D. Dowson, Biotribocorrosion of CoCrMo orthopaedic implant materials – Assessing the formation and effect of the biofilm, *Tribol. Int.* , 2007 vol. **40**, pp. 1492–1499.
- [166] F. Contu, B. Elsener, H. Böhni, Characterization of implant materials in fetal bovine serum and sodium sulfate by electrochemical impedance spectroscopy. I. Mechanically polished samples, *J. Biomed. Mater. Res. A.* , 2002 vol. **67**, n° 1, pp. 246–54.
- [167] D. Sun, J.A. Wharton, R.J.K. Wood, Effects of proteins and pH on tribocorrosion performance of cast CoCrMo – a combined electrochemical and tribological study, *Tribol. - Mater. Surfaces Interfaces.* , 2008 vol. **2**, n° 3, pp. 150–160.
- [168] V. Hlady, J. Buijs, Protein adsorption on solid surfaces, *Curr. Opin. Biotechnol.* , 1996 vol. **7**, n° 1, pp. 72–77.
- [169] T. Groth, K. Klosz, C. E.J. R. New, H. B. G. H, Protein adsorption, lymphocyte adhesion and platelet adhesion/activation on polyurethane ureas is related to hard segment content and composition, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* , 1994 vol. **6**, n° 6, pp. 497–510.
- [170] C. Valero Vidal, A. Igual Muñoz, Electrochemical characterisation of biomedical alloys for surgical implants in simulated body fluids, *Corros. Sci.* , 2008 vol. **50**, n° 7, pp. 1954–1961.
- [171] C. Valero Vidal, A. Olmo Juan, A. Igual Munoz, Adsorption of bovine serum albumin on CoCrMo surface: Effect of temperature and protein concentration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* , 2010 vol. **80**, n° 1, pp. 1–11.
- [172] L. Lartundo-Rojas, I. Frateur, A. Galtayries, P. Marcus, BSA adsorption on Fe-17Cr in acid solution: electrochemical behaviour and surface composition, **In: Passivation of Metals and Semiconductors, and Properties of Thin Oxide Layers**, P. Marcus, V. Maurice (Eds.), Elsevier B.V., Paris, 2006, pp. 357–363.
- [173] Y. Hedberg, X. Wang, J. Hedberg, M. Lundin, E. Blomberg, I. Odnevall Wallinder, Surface-protein interactions on different stainless steel grades: Effects of protein adsorption, surface changes and metal release, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* , 2013 vol. **24**, n° 4, pp. 1015–1033.
- [174] J.T.Y. Lee, Y. Leng, K.L. Chow, F. Ren, X. Ge, K. Wang, X. Lu, Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid, *Acta Biomater.* , 2011 vol. **7**, n° 6, pp. 2615–2622.
- [175] P.A.A.P. Marques, M.C. Magalhaes, R.N. Correia, Inorganic plasma with physiological CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub>-buffer, *Biomaterials.* , 2003 vol. **24**, pp. 1541–1548.
- [176] M. Bohner, J. Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?, *Biomaterials.* , 2009 vol. **30**, n° 12, pp. 2175–2179.
- [177] J.A. Calderón, O.R. Mattos, O.E. Barcia, S.I. Córdoba de Torresi, J.E. Pereira da Silva, Electrodeposition of cobalt in carbonate/bicarbonate media, *Electrochim. Acta.* , 2002 vol. **47**, n° 28, pp. 4531–4541.
- [178] A. Yamamoto, S. Hiromoto, Effect of inorganic salts, amino acids and proteins on the degradation of pure magnesium in vitro, *Mater. Sci. Eng. C.* , 2009 vol. **29**, n° 5, pp. 1559–1568.
- [179] S.G. Real, S.B. Ribotta, A.J. Arvia, The electrochemical dissolution of cobalt in carbonate-bicarbonate solutions from EIS and steady polarization data, *Corros. Sci.* , 2008 vol. **50**, n° 2, pp. 463–472.
- [180] N.J. Hallab, C. Vermes, C. Messina, K.A. Roebuck, T.T. Glant, J.J. Jacobs, Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts, *J. Biomed. Mater. Res.* , 2002 vol. **60**, n° 3, pp. 420–433.
- [181] E.M. Hudak, J.T. Mortimer, H.B. Martin, Platinum for neural stimulation: voltammetry considerations, *J. Neural Eng.* , 2010 vol. **7**, n° 2, pp. 026005.
- [182] L.D. Burke, M.B.C. Roche, Hydrous oxide formation on platinum-A useful route to controlled platinization, *J. Electroanal. Chem.* , 1984 vol. **164**, n° 2, pp. 315–334.
- [183] L.D. Burke, M.M. Murphy, Effect of solution pH on hydrous oxide growth and reduction on polycrystalline platinum, *J. Electroanal. Chem.* , 1991 vol. **305**, n° 2, pp. 301–312.
- [184] L.D. Burke, Premonolayer oxidation and its role in electrocatalysis, *Electrochim. Acta.* , 1994 vol. **39**, n° 11–12, pp. 1841–1848.
- [185] L.D. Burke, D.T. Buckley, Formation and reduction of hydrous oxide films on platinum in aqueous solution at 273 K, *J. Appl. Electrochem.* , 1995 vol. **25**, n° 10, pp. 913–922.
- [186] V.I. Birss, M. Chang, J. Segal, Platinum oxide film formation-reduction: measurement study an in-situ mass measurement study, *J. Electroanal. Chem.* , 1993 vol. **355**, pp. 181.
- [187] M. Pourbaix, Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions, Pergamon P, Oxford, 1966,.
- [188] M. Pourbaix, J. Van Muylder, N. Zoubov, Electrochemical properties of the platinum metals, *Platin. Met. Rev.* , 1959 vol. **3**, n° 2, pp. 47–53.
- [189] D.A. Puleo, R. Bizios, eds., Biological interactions on materials surfaces. Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses, Springer, New York, 2009,.
- [190] P. Daubinger, J. Kieninger, T. Unmüssig, G. a Urban, Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes - a cyclic voltammetry study., *Phys. Chem. Chem. Phys.* , 2014 vol. **16**, n° 18, pp. 8392–9.
- [191] P. Bernabeu, L. Tamisier, A.D.E. Cesare, A. Caprani, Study of the adsorption of albumin on a platinum rotating disk electrode using impedance measurements, *Electrochim. Acta.* , 1988 vol. **33**, n° 8, pp. 1129–1136.
- [192] P. Bernabeu, A. Caprani, Influence of surface charge on adsorption of fibrinogen and/or albumin on a rotating disc electrode of platinum and carbon, *Biomaterials.* , 1990 vol. **11**, n° 4, pp. 258–264.
- [193] M. Farcas, N.P. Cosman, D.K. Ting, S.G. Roscoe, S. Omanovic, A comparative study of electrochemical techniques in investigating the adsorption behaviour of fibrinogen on platinum, *J. Electroanal. Chem.* , 2010 vol. **649**, n° 1–2, pp. 206–218.
- [194] B. Hirschorn, M.E. Orazem, B. Tribollet, V. Vivier, I. Frateur, M. Musiani, Determination of effective capacitance and film thickness from constant-phase-element parameters, *Electrochim. Acta.* , 2010 vol. **55**, n° 21, pp. 6218–6227.
- [195] B. Le Gorrec, C. Montella, B.-Y. Chang, S. Park, E.I.S.D. Analysis, M.E. Orazem, B. Tribollet, R.L. Sacci, D. Harrington, G.A. Ragoisha, A.S. Bondarenko,

- Electrochemical Impedance Spectroscopy, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)*, 2009 vol. **3**, pp. 207–229.
- [196] F. Contu, B. Elsener, H. Böhni, Corrosion behaviour of CoCrMo implant alloy during fretting in bovine serum, *Corros. Sci.*, 2005 vol. **47**, n° 8, pp. 1863–1875.
- [197] M. Stenberg, H. Arwin, A. Nilsson, Silicon-silicon dioxide as an electrode for electrical and ellipsometric measurements of adsorbed organic molecules, *J. Colloid Interface Sci.*, 1979 vol. **72**, n° 2, pp. 255–264.
- [198] J. Helsen, H. Breme, Metals as biomaterials, John Wiley, New York, 1998,.
- [199] C.G. Malmberg, A. a. Maryott, Dielectric constant of water from 0 to 100 C, *J. Res. Natl. Bur. Stand. (1934)*, 1956 vol. **56**, n° 1, pp. 1.
- [200] G.J. Brug, A.L.G. van den Eeden, M. Sluyters-Rehbach, J.H. Sluyters, The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element, *J. Electroanal. Chem.*, 1984 vol. **176**, n° 1–2, pp. 275–295.
- [201] M.C. Garcia-Alonso, L. Saldaña, C. Alonso, V. Barranco, M.A. Muñoz-Morris, M.L. Escudero, In situ cell culture monitoring on a Ti-6Al-4V surface by electrochemical techniques, *Acta Biomater.*, 2009 vol. **5**, n° 4, pp. 1374–1384.
- [202] T.S. Light, E.A. Kingman, A.C. Bevilacqua, T. Associates, The conductivity of low concentrations of CO<sub>2</sub> dissolved in ultrapure water from 0-100°C, **In: 209th American Chemical Society National Meeting**, 1995,; pp. 0–17.
- [203] A. Bard, L. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, United States of America, 2001,.
- [204] M.T. Ehrensberger, J.L. Gilbert, The effect of static applied potential on the 24-hour impedance behavior of commercially pure titanium in simulated biological conditions, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2010 vol. **93**, n° 1, pp. 106–112.
- [205] P. Huetz, V. Ball, J. Voegel, P. Schaaf, Exchange kinetics for a heterogeneous protein system on a solid surface, *Langmuir*, 1995 vol. **11**, n° 1995, pp. 3145–3152.
- [206] C.A. Haynes, W. Norde, Globular proteins at solid-liquid interfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 1994 vol. **2**, pp. 517–566.
- [207] W. Norde, Driving forces for protein adsorption at solid surfaces, **In: Biopolymers at Interfaces**, M. Dekker (Ed.), Malmsten M, Dublin, 2003,.
- [208] G. Stoner, S. Srinivasan, Adsorption of blood proteins on metals using capacitance techniques., *J. Phys. Chem.*, 1970 vol. **74**, pp. 1088–1094.
- [209] B. Ivarsson, I. Lundstrom, Physical characterization of protein adsorption on metal and metaloxide surfaces., *Crit. Rev. Biocompat.*, 1986 vol. **2**, pp. 1–96.
- [210] B.G. Pound, Passive films on metallic biomaterials under simulated physiological conditions, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2014 vol. **102**, n° 5, pp. 1595–1604.
- [211] M. Metikoš-Huković, Z. Pilić, R. Babić, D. Omanović, Influence of alloying elements on the corrosion stability of CoCrMo implant alloy in Hank's solution, *Acta Biomater.*, 2006 vol. **2**, n° 6, pp. 693–700.
- [212] R. Singhvi, A. Kumar, G. Lopez, G. Stephanopoulos, D. Wang, G. Whitesides, D. Ingber, Engineering cell shape and function, *Science (80- )*, 1994 vol. **264**, n° 5159, pp. 696–698.
- [213] S.S. Ozturk, B.Ø. Palsson, Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: Effect of media type, and serum concentration, *Biotechnol. Prog.*, 1990 vol. **6**, pp. 121–128.
- [214] L. Frauchiger, M. Taborrelli, B.O. Aronsson, P. Descouts, Ion adsorption on titanium surfaces exposed to a physiological solution, *Appl. Surf. Sci.*, 1999 vol. **143**, n° 1, pp. 67–77.
- [215] Y. Yang, K.-H. Kim, C.M. Agrawal, J. L.Ongad, Interaction of hydroxyapatite–titanium at elevated temperature in vacuum environment, *Biomaterials*, 2004 vol. **25**, n° 15, pp. 2927–2932.
- [216] C. Tkaczyk, O.L. Huk, F. Mwale, J. Antoniou, D.J. Zukor, A. Petit, M. Tabrizian, Investigation of the binding of Cr(III) complexes to bovine and human serum proteins: a proteomic approach., *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2010 vol. **94**, n° 1, pp. 214–22.
- [217] J. Lima, S.R. Sousa, A. Ferreira, M.A. Barbosa, Interactions between calcium, phosphate, and albumin on the surface of titanium, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001 vol. **55**, n° 1, pp. 45–53.
- [218] A. Klinger, D. Steinberg, D. Kohavi, M.N. Sela, Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997 vol. **36**, pp. 387–392.
- [219] X. Cheng, M. Filiaggi, S.G. Roscoe, Electrochemically assisted co-precipitation of protein with calcium phosphate coatings on titanium alloy, *Biomaterials*, 2004 vol. **25**, n° 23, pp. 5395–5403.
- [220] J. Baggott, Gas transport and pH regulation, **In: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**, T. Devlin (Ed.), John Wiley, New York, 1982,; pp. 1025–1036.
- [221] S. Chatterjee, S. Rayalu, S.D. Kolev, R.J. Krupadam, Adsorption of carbon dioxide on naturally occurring solid amino acids, *J. Environ. Chem. Eng.*, 2016 vol. **4**, n° 3, pp. 3170–3176.
- [222] D.H. Davies, P. Street, The Electrochemical Behaviour of Cobalt in bicarbonate and borate electrolytes, *Corros. Sci.*, 1980 vol. **20**, n° 1980, pp. 973–987.
- [223] C. Valero Vidal, A. Igual Muñoz, Effect of physico-chemical properties of simulated body fluids on the electrochemical behaviour of CoCrMo alloy, *Electrochim. Acta*, 2011 vol. **56**, n° 24, pp. 8239–8248.
- [224] A. Ornberg, J. Pan, M. Herstedt, C. Leygraf, Corrosion Resistance, Chemical Passivation, and Metal Release of 35N LT and MP35N for Biomedical Material Application, *J. Electrochem. Soc.*, 2007 vol. **154**, n° 9, pp. C546–C551.
- [225] M. Spector, V.A. Boston, H. System, The Concept of Biocompatibility, **In: Comprehensive Biomaterials**, Elsevier Ltd., 2011,; pp. 1–6.
- [226] K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, Biocompatibility, **In: John Wiley**, 2002,.
- [227] S.C. Methods, Biomaterial Surfaces and the Physiological Environment, **In: 2002**,; pp. 149–172.
- [228] J.D. Andrade, Interfacial phenomena and biomaterials, *Med. Instrum.*, 1973 vol. **7**, pp. 110–9.
- [229] S. Ramakrishna, M. Ramalingam, T.S.S. Kumar, W.O. Soboyejo, Overview of Biomaterials, **In: Biomaterials a nano approach**, CRC Press, 2010,.
- [230] D.R. Jackson, S. Omanovic, S.G. Roscoe, Electrochemical studies of the adsorption behavior of serum proteins on titanium, *Langmuir*, 2000 vol. **16**, n° 12, pp. 5449–5457.
- [231] J.R. Goldberg, J.L. Gilbert, Electrochemical response of CoCrMo to high speed fracture of its metal oxide using an electrochemical scratch, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997 vol. **37**, pp. 421–431.
- [232] A.C. Lewis, M.R. Kilburn, P.J. Heard, T.B. Scott, K.R. Hallam, G.C. Allen, I.D. Learmonth, The Entrapment of Corrosion Products from CoCr Implant Alloys in the Deposits of Calcium Phosphate: A Comparison of Serum, Synovial Fluid, Albumin, EDTA, and Water, *J. Orthop. Res.*, 2006 n° 24, pp. 1587–1596.
- [233] A.C. Lewis, P.J. Heard, The effects of calcium phosphate deposition upon corrosion of CoCr alloys and the potential for implant failure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2005 vol. **75**, n° 2, pp. 365–373.
- [234] A. Petit, F. Mwale, D.J. Zukor, I. Catelas, J. Antoniou, O.L. Huk, Effect of cobalt and chromium ions on bcl-2, bax, caspase-3, and caspase-8 expression in human U937

- macrophages, *Biomaterials*, 2004 vol. **25**, n° 11, pp. 2013–2018.
- [235] K. Magone, D. Luckenbill, T. Goswami, Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis, *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, 2015 vol. **135**, n° 5, pp. 683–95.
- [236] D. Landolt, *Corrosion and surface chemistry of metals*, EPFL Press, Switzerland, 2007.
- [237] K. Kim, Y.M. Biomaterials, E.J.D. Bronzino, Park, J. B., Kon Kim, Y. "Metallic Biomaterials," *In*: 2000.
- [238] Y. Yan, Growth of passive tribofilms in medical implants, *In*: *Bio-tribocorrosion in biomaterials and medical implants*, Y. Yan (Ed.), Woodhead P, New York, 2013, pp. 147–168.
- [239] J.L. Gilbert, Electrochemical Behavior of Metals in the Biological Milieu, *In*: *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier Ltd., 2011, pp. 21–48.
- [240] J.J. Ryu, P.S. Hrotriya, Synergistic mechanisms of bio-tribocorrosion in medical implants, *In*: *Bio-tribocorrosion in biomaterials and medical implants*, Woodhead Publishing Limited, 2013, pp. 25–44.
- [241] O.L. Huk, I. Catelas, F. Mwale, J. Antoniou, D.J. Zukor, A. Petit, Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro, *J. Arthroplasty*, 2004 vol. **19**, n° 8, pp. 84–87.
- [242] Y.S. Li, R. Wang, P. He, B.X. Huang, P. Kovacs, Surface-enhanced Raman spectroelectrochemical studies of corrosion films on implant Co-Cr-Mo alloy in biosimulating solutions, *J. Raman Spectrosc.*, 1999 vol. **30**, n° 2, pp. 97–103.
- [243] A. Kocijan, I. Milošev, D.K. Merl, B. Pihlar, Electrochemical study of Co-based alloys in simulated physiological solution, *J. Appl. Electrochem.*, 2004 vol. **34**, n° 5, pp. 517–524.
- [244] Y. Yan, *Corrosion and Tribo-Corrosion Behaviour of Metallic Orthopaedic Implant Materials*, The University of Leeds, 2006.
- [245] B.G. Pound, Electrochemical behavior of cobalt - Chromium alloys in a simulated physiological solution, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2010 vol. **94**, n° 1, pp. 93–102.
- [246] M.S. Caicedo, R. Desai, K. McAllister, A. Reddy, J.J. Jacobs, N.J. Hallab, Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: A novel mechanism for implant debris reactivity, *J. Orthop. Res.*, 2009 vol. **27**, n° 7, pp. 847–854.
- [247] M.T. Ehrensberger, J.L. Gilbert, The effect of scanning electrochemical potential on the short-term impedance of commercially pure titanium in simulated biological conditions, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2010 vol. **94**, n° 3, pp. 781–789.
- [248] K. Merritt, S.A. Brown, Effect of proteins and pH on fretting corrosion and metal ion release, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1988 vol. **22**, n° 2, pp. 111–120.
- [249] S. Petrn, Determination of transferrin isoproteins in human cerebrospinal fluid using isoelectric focusing and zone immunoelectrophoresis assay, *Electrophoresis*, 1987 vol. **8**, pp. 515–517.
- [250] M. Salim, B. O'Sullivan, S.L. McArthur, P.C. Wright, Characterization of fibrinogen adsorption onto glass microcapillary surfaces by ELISA, *R. Soc. Chem.*, 2007 vol. **7**, n° 1, pp. 64–70.
- [251] D.T.H. Wassell, Graham Embery, Adsorption of bovine serum albumin on to titanium powder, *Biomaterials*, 1996 vol. **17**, n° 9, pp. 859–864.
- [252] Joshua J. Jacobs, N.J. Hallab, A.K. Skipor, R.M. Urban, Metal degradation products: a cause for concern in metal-metal bearings?, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2003 n° 417, pp. 139–147.
- [253] P. Ying, A.S. Viana, L.M. Abrantes, G. Jin, Adsorption of human serum albumin onto gold: A combined electrochemical and ellipsometric study, *J. Colloid Interface Sci.*, 2004 vol. **279**, n° 1, pp. 95–99.
- [254] S. Virtanen, I. Milošev, E. Gomez-Barrena, R. Trebše, J. Salo, Y.T. Konttinen, Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions, *Acta Biomater.*, 2008 vol. **4**, n° 3, pp. 468–476.
- [255] J.P. Laussac, B. Sarkar, Characterization of the Copper(II)- and Nickel(II)-Transport Site of Human Serum Albumin. Studies of Copper(II) and Nickel(II) Binding to Peptide 1-24 of Human Serum Albumin by <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy, *Biochemistry*, 1984 vol. **23**, n° 12, pp. 2832–2838.
- [256] W. Bal, J. Christodoulou, P. Sadler, A. Tucker, Read at DeepDyve »Multi-metal binding site of serum albumin, *J. Inorg.*, 1998 vol. **70**, pp. 33–39.
- [257] S. Karimi, T. Nickchi, A.M. Alfantazi, Long-term corrosion investigation of AISI 316L, Co-28Cr-6Mo, and Ti-6Al-4V alloys in simulated body solutions, *Appl. Surf. Sci.*, 2012 vol. **258**, n° 16, pp. 6087–6096.
- [258] N. Espallargas, C. Torres, A.I. Muñoz, A metal ion release study of CoCrMo exposed to corrosion and tribocorrosion conditions in simulated body fluids, *Wear*, 2015 vol. **332–333**, pp. 669–678.
- [259] C.O. De, Equilibres calco-carboniques, n.d. pp. 1–17.
- [260] D.C. Mears, The use of dissimilar metals in surgery, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1975 vol. **9**, n° 4, pp. 133–148.
- [261] I. Milosev, H.H. Strehblow, The behavior of stainless steels in physiological solution containing complexing agent studied by x-ray photoelectron spectroscopy, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000 vol. **52**, n° 2, pp. 404–412.
- [262] G.T. Burstein, D.H. Davies, The analysis of anodic films formed on cobalt in bicarbonate and borate electrolytes, *Corros. Sci.*, 1980 vol. **20**, n° 8–9, pp. 989–995.
- [263] C.A. Gervasi, P.E. Alvarez, Anodic oxide films on tin in carbonate-bicarbonate buffer solution, *Corros. Sci.*, 2005 vol. **47**, n° 1, pp. 69–78.
- [264] S. Virtanen, Corrosion in Biomedical Applications, *Ref. Modul. Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*, 2017 pp. 128–133.
- [265] N. Ramasubramanian, N. Precanin, R.D. Davidson, Analysis of passive films on stainless steel by cyclic voltammetry and Auger spectroscopy, *J. Electrochem. Soc.*, 1985 vol. **132**, pp. 793–798.
- [266] M. Bojinov, I. Betova, G. Fabricius, T. Laitinen, R. Raicheff, T. Saario, The stability of the passive state of iron-chromium alloys in sulphuric acid solution, *Corros. Sci.*, 1999 vol. **41**, pp. 1557–1584.
- [267] C.H. Hsu, F. Mansfeld, Concerning the conversion of the constant phase element parameter Y0 into a capacitance, *Corrosion*, 2001 vol. **57**, pp. 747.
- [268] G. V. Samsonov, ed., *The oxide handbook*, IFI/Plenum, New York, 1982.
- [269] P.H. Fang, W.S. Brower, Dielectric Constant of Cr2O3 Crystals, *Phys. Rev.*, 1963 vol. **129**, n° 4, pp. 1561–1561.
- [270] K. V. Rao, A. Smakula, Dielectric properties of cobalt oxide, nickel oxide, and their mixed crystals, *J. Appl. Phys.*, 1965 vol. **36**, n° 6, pp. 2031–2038.
- [271] F. Contu, B. Elsener, H. Böhni, Electrochemical Behavior of CoCrMo Alloy in the Active State in Acidic and Alkaline Buffered Solutions, *J. Electrochem. Soc.*, 2003 vol. **150**, n° 9, pp. B419.
- [272] Y. Yan, D. Dowson, A. Neville, In-situ electrochemical study of interaction of tribology and corrosion in artificial hip prosthesis simulators, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2013 vol. **18**, pp. 191–199.
- [273] I. Milošev, The effect of biomolecules on the behaviour of CoCrMo alloy in various simulated physiological solutions, *Electrochim. Acta*, 2012 vol. **78**, n° 2012, pp. 259–273.
- [274] S. Storp, R. Holm, ESCA investigation of the oxide layers on some Cr containing alloys, *Surf. Sci.*, 1977 vol. **68**, pp. 10–19.

- [275] M. Metikos-Hukovic, p-Type and n-Type Behavior of Chromium Oxide as a Function of the Applied Potential, *J. Electrochem. Soc.*, 1987 vol. **134**, n° 9, pp. 2193–2197.
- [276] S. Haupt, H.-H. Strehblow, The formation of the passive layer on Cr in 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A combined electrochemical and surface analytical study, *J. Electroanal. Chem.*, 1987 vol. **228**, pp. 365–392.
- [277] A.I. Muñoz, J. Schwiesau, B.M. Jolles, S. Mischler, In vivo electrochemical corrosion study of a CoCrMo biomedical alloy in human synovial fluids, *Acta Biomater.*, 2015 vol. **21**, pp. 228–236.
- [278] H.R. Nordlund, V.P. Hytönen, O.H. Laitinen, S.T.H. Uotila, E.A. Niskanen, J. Savolainen, E. Porkka, M.S. Kulomaa, Introduction of histidine residues into avidin subunit interfaces allows pH-dependent regulation of quaternary structure and biotin binding, *FEBS Lett.*, 2003 vol. **555**, n° 3, pp. 449–454.
- [279] S. Fukuzaki, H. Urano, K. Nagata, Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces, *J. Ferment. Bioeng.*, 1996 vol. **81**, n° 2, pp. 163–167.
- [280] C.M. Pradier, F. Kármán, J. Telegdi, E. Kálmán, P. Marcus, Adsorption of Bovine Serum Albumin on Chromium and Molybdenum Surfaces Investigated by Fourier-Transform Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy (FT-IRRAS) and X-ray Photoelectron Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B.*, 2003 vol. **107**, n° 28, pp. 6766–6773.
- [281] Q. Huai, Y.L. He, F.L. Sheng, Z.Y. Tao, Effects of pH and metal ions on the conformation of bovine serum albumin in aqueous solution - An Attenuated Total Reflection (ATR) FTIR spectroscopic study, *Spectrochim. Acta Part A.*, 1996 vol. **52**, n° 13, pp. 1795–1800.
- [282] D.L. Kirchman, D.L. Henry, S.C. Dexter, Adsorption of proteins to surfaces in seawater, *Mar. Chem.*, 1989 vol. **27**, pp. 201–217.
- [283] A. Klinger, D. Steinberg, D. Kohavi, M.N.N. Sela, Mechanism of adsorption of human albumin to titanium in vitro., *J. Biomed Mater. Res.*, 1997 vol. **36**, pp. 387–392.
- [284] P.R. Roberge, R. Pierre, Handbook of Corrosion Engineering Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1999.
- [285] P. Schmuki, S. Virtanen, A.J. Davenport, C.M. Vitus, Transpassive Dissolution of Cr and Sputter-Deposited Cr Oxides Studied by In Situ X-Ray Near-Edge Spectroscopy, *J. Electrochem. Soc.*, 1996 vol. **143**, n° 12, pp. 3997-.
- [286] A. Foelske, H.H. Strehblow, Structure and composition of electrochemically prepared oxide layers on Co in alkaline solutions studied by XPS, *Surf. Interface Anal.*, 2002 vol. **34**, n° 1, pp. 125–129.
- [287] D. Gallant, S. Simard, A study on the localized corrosion of cobalt in bicarbonate solutions containing halide ions, *Corros. Sci.*, 2005 vol. **47**, n° 7, pp. 1810–1838.
- [288] M. Kalbacova, S. Roessler, U. Hempel, R. Tsaryk, K. Peters, D. Scharnweber, J.C. Kirkpatrick, P. Dieter, The effect of electrochemically simulated titanium cathodic corrosion products on ROS production and metabolic activity of osteoblasts and monocytes/macrophages, *Biomaterials.*, 2007 vol. **28**, n° 22, pp. 3263–3272.
- [289] S.S. Jakobsen, G. Danscher, M. Stoltenberg, A. Larsen, J.M. Bruun, T. Mygind, K. Kemp, K. Soballe, Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2007 vol. **101**, n° 6, pp. 441–446.
- [290] J.Y. Wang, B.H. Wicklund, R.B. Gustilo, D.T. Tsukayama, Prosthetic metals impair murine immune response and cytokine release in vivo and in vitro, *J. Orthop. Res.*, 1997 vol. **15**, n° 5, pp. 688–699.
- [291] M. Khan, J.H. Kuiper, J.B. Richardson, Can cobalt levels estimate in-vivo wear of metal-on-metal bearings used in hip arthroplasty?, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, 2007 vol. **221**, n° 8, pp. 929–942.
- [292] L.S. de Morais, G.G. Serra, E.F. Albuquerque Palermo, L.R. Andrade, C.A. Müller, M.A. Meyers, C.N. Elias, Systemic levels of metallic ions released from orthodontic mini-implants, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 2009 vol. **135**, n° 4, pp. 522–529.
- [293] G. Mabilieu, Y.M. Kwon, H. Pandit, D.W. Murray, A. Sabokbar, Metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: A review of periprosthetic biological reactions, *Acta Orthop.*, 2008 vol. **79**, n° 6, pp. 734–747.
- [294] L. Savarino, D. Granchi, G. Ciapetti, S. Stea, M.E. Donati, G. Zinghi, G. Fontanesi, R. Rotini, L. Montanaro, Effects of metal ions on white blood cells of patients with failed total joint arthroplasties., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999 vol. **47**, n° 4, pp. 543–550.
- [295] S. Kawanishi, Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa, The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002 vol. **32**, n° 9, pp. 822–832.
- [296] J.L. Gilbert, L. Zarka, E. Chang, C.H. Thomas, The reduction half cell in biomaterials corrosion: Oxygen diffusion profiles near and cell response to polarized titanium surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998 vol. **42**, n° 2, pp. 321–330.
- [297] M. Haeri, T. Wöllert, G.M. Langford, J.L. Gilbert, Electrochemical control of cell death by reduction-induced intrinsic apoptosis and oxidation-induced necrosis on CoCrMo alloy in vitro, *Biomaterials.*, 2012 vol. **33**, n° 27, pp. 6295–6304.
- [298] J. Jacobs, J. Gilbert, R. Urban, Current concepts review. Corrosion of metal orthopaedic implants., *J. Bone Joint Surg. Am.*, 1998 vol. **80**, pp. 268–282.
- [299] J. Black, T.J. Baranowski, Electrochemical aspects of d.c stimulation of osteogenesis, *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, 1984 vol. **12**, pp. 323–327.
- [300] S.M. Dymecki, J. Black, D.S. Nord, S.B. Jones, T.J. Baranowski, C.T. Brighton, Medullary osteogenesis with platinum cathodes, *J. Orthop. Res.*, 1985 vol. **3**, n° 2, pp. 125–136.
- [301] C.E. Campbell, D. V. Higginbotham, T.J. Baranowski, A constant cathodic potential device for faradic stimulation of osteogenesis, *Med. Eng. Phys.*, 1995 vol. **17**, n° 5, pp. 337–346.
- [302] Q. Wang, S.Z. Zhong, O.Y. Jun, L.X. Jiang, Z.K. Zhang, Y. Xie, S.Q. Luo, Osteogenesis of electrically stimulated bone cells mediated in part by calcium ions, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1998.
- [303] J.A. Spadaro, Electrically enhanced osteogenesis at various metal cathodes, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1982 vol. **16**, pp. 861–873.
- [304] C.A.L. Bassett, R.O. Becker, Generation of Electric Potentials by Bone in Response to Mechanical Stress obtained in a highly purified state . For the detector response used , the sensitivity was of the order of 0 . 02 fig . Infrared spectra obtained by means not dependent upon cell, *Science (80- )*, 1962 vol. **137**, pp. 1063–1064.
- [305] C.A.L. Bassett, R.J. Pawluk, Effects of electric currents on bone in vivo, *Nature.*, 1964 vol. **204**, pp. 652–654.
- [306] E. Fukada, I. Yasuda, On the piezoelectric effect of bone, *J. Phys. Soc. Japan.*, 1957 vol. **12**, n° 10, pp. 1158–1162.
- [307] K. Chamaon, P. Schönfeld, F. Awiszus, J. Bertrand, C.H. Lohmann, Ionic cobalt but not metal particles induces ROS generation in immune cells in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2018 pp. 1–8.
- [308] J. Pan, D. Thierry, C. Leygraf, Electrochemical and XPS studies of titanium for biomaterial applications with respect to the effect of hydrogen peroxide, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994 vol. **28**, pp. 113–122.
- [309] L. Luo, A. Petit, J. Antoniou, D.J. Zukor, O.L. Huk, R.C.W. Liu, F.M. Winnik, F. Mwale, Effect of cobalt and chromium ions on MMP-1, TIMP-1, and TNF- $\alpha$  gene expression in human U937 macrophages: A role for tyrosine kinases, *Biomaterials.*, 2005 vol. **26**, n° 28, pp. 5587–5593.

- [310] R. Plonsey, Bioelectric phenomena, **In**: 1969,; pp. 338–357.
- [311] U. Zimmermann, G. Pilwat, F. Riemann, Dielectric Breakdown of Cell Membranes, *Biophys. J.*, 1974 vol. **14**, n° 11, pp. 881–899.
- [312] M. Sencia, J. Takeda, S. Abe, T. Nakamura, Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation, *Plant Cell Physiol.*, 1979 vol. **20**, n° 7, pp. 1441–1443.
- [313] I.P. Sugar, W. Förster, E. Neumann, Model of cell electrofusion. Membrane electroporation, pore coalescence and percolation, *Biophys. Chem.*, 1987 vol. **26**, n° 2–3, pp. 321–335.
- [314] T.Y. Tsong, On electroporation of cell membranes and some related phenomena, *Bioelectrochemistry.*, 1990 vol. **24**, pp. 271–295.
- [315] A.L. Kierszenbaum, Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique, De Boeck Supérieur, 2006,.
- [316] M.-C. de Vernejoul, P. Marie, Cellules osseuses et remodelage osseux, *Médecine/Sciences.*, 1993 vol. **9**, pp. 192–203.
- [317] H.K. Väänänen, T. Laitala-Leinonen, Osteoclast lineage and function, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008 vol. **473**, n° 2, pp. 132–138.
- [318] R. Lüllmann-Rauch, Histologie, De Boeck Supérieur, 2008,.
- [319] J. D.Currey, Bones: structure and mechanics, Princeton University Press, 2002,.
- [320] B. Corradetti, ed., The Immune Response to Implanted Materials and Devices, Springer, Switzerland, 2017,.
- [321] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.*, 2004 vol. **25**, n° 12, pp. 677–686.
- [322] B.N. Brown, R. Londono, S. Tottey, L. Zhang, K.A. Kukla, M.T. Wolf, K.A. Daly, J.E. Reing, S.F. Badylak, Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials, *Acta Biomater.*, 2012 vol. **8**, pp. 978–987.
- [323] B.D. Ratner, A History of Biomaterials, *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Third Ed.*, 2013.
- [324] J. Anderson, Soft tissue response, **In**: Handbook of biomaterial properties, Chapman &, New York, 1998,.
- [325] L. Tang, J. Eaton, Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions, *Mol Med.*, 1999 vol. **5**, n° 6, pp. 351–358.
- [326] L. Tang, Fibrinogen mediates acute inflammatory responses to biomaterials, *J. Exp. Med.*, 1993 vol. **178**, n° 6, pp. 2147–2156.
- [327] R.F. Padera, C.K. Colton, Time course of membrane microarchitecture-driven neovascularization, *Biomaterials.*, 1996 vol. **17**, n° 3, pp. 277–284.
- [328] Y. Okazaki, E. Gotoh, Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials.*, 2005 vol. **26**, n° 1, pp. 11–21.
- [329] T. Hanawa, Y. Kohayama, S. Hiromoto, A. Yamamoto, Effects of Biological Factors on the Repassivation Current of Titanium, 2004 vol. **45**, n° 5, pp. 1635–1639.
- [330] R.E. Andrews, K.M. Shah, J.M. Wilkinson, A. Gartland, Effects of cobalt and chromium ions at clinically equivalent concentrations after metal-on-metal hip replacement on human osteoblasts and osteoclasts: Implications for skeletal health, *Bone.*, 2011 vol. **49**, n° 4, pp. 717–723.
- [331] J.M.H. Smolders, P. Bisseling, A. Hol, C. Van Der Straeten, B.W. Schreurs, J.L.C. van Susante, Metal ion interpretation in resurfacing versus conventional hip arthroplasty and in whole blood versus serum. How should we interpret metal ion data?, *HIP Int.*, 2011 vol. **21**, n° 5, pp. 587–595.
- [332] Y. Mu, T. Kobayashi, M. Sumita, A. Yamamoto, T. Hanawa, Metal ion release from titanium with active oxygen species generated by rat macrophages in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000 vol. **49**, n° 2, pp. 238–243.
- [333] L. Savarino, M. Greco, E. Cenni, L. Cavasinni, R. Rotini, N. Baldini, A. Giunti, Differences in ion release after ceramic-on-ceramic and metal-on-metal total hip replacement, *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2006 vol. **88-B**, n° 4, pp. 472–476.
- [334] C. Jantzen, H.L. Jørgensen, B.R. Duus, S.L. Sparring, J.B. Lauritzen, Chromium and cobalt ion concentrations in blood and serum following various types of metal-on-metal hip arthroplasties: A literature overview, *Acta Orthop.*, 2013 vol. **84**, n° 3, pp. 229–236.
- [335] H.C. Amstutz, P. Campbell, H. McKellop, T.P. Schmalzried, W.J. Gillespie, D. Howie, J. Jacobs, J. Medley, K. Merritt, Metal on metal total hip replacement workshop consensus document, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1996 n° 329 SUPPL., pp. 297–303.
- [336] P.F. Doorn, P.A. Campbell, J. Worrall, P.D. Benya, H.A. Mckellop, H.C. Amstutz, Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: Transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles, 1998.
- [337] I. Catelas, A. Petit, H. Vali, C. Fragiskatos, R. Meilleur, D.J. Zukor, J. Antoniou, O.L. Huk, Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro, *Biomaterials.*, 2005 vol. **26**, n° 15, pp. 2441–2453.
- [338] D.A. Puleo, L.A. Holleran, R.H. Doremus, R. Bizios, Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991 vol. **25**, n° 6, pp. 711–723.
- [339] S. Koyama, T. Haruyama, E. Kobatake, M. Aizawa, Electrically induced NGF production by astroglial cells, *Nat. Biotechnol.*, 1997 vol. **15**, pp. 164–166.
- [340] K. Kinoshita, T. Tsong, Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane, *Nature.*, 1977 vol. **268**, pp. 438–441.
- [341] S. Kar, L. Mohan, K. Dey, P. Shinde, H.-Y. Chang, M. Nagai, T.S. Santra, Single-Cell Electroporation: Current Trends, Applications and Future Prospects, 2007.
- [342] M. Yaoita, H. Shinohara, M. Aizawa, Y. Hayakawa, T. Yamashita, Y. Ikariyama, Potential-controlled morphological change and lysis of HeLa cells cultured on an electrode surface, *J. Electroanal. Chem.*, 1988 vol. **254**, n° 1–3, pp. 169–177.
- [343] J. Kojima, H. Shinohara, Y. Ikariyama, M. Aizawa, K. Nagaike, S. Morioka, Electrically controlled proliferation of human carcinoma cells cultured on the surface of an electrode, *J. Biotechnol.*, 1991 vol. **18**, n° 1–2, pp. 129–139.
- [344] P. Chiarugi, G. Pani, E. Giannoni, L. Taddei, R. Colavitti, G. Raugei, M. Symons, S. Borrello, T. Galeotti, G. Ramponi, Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: The oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion, *J. Cell Biol.*, 2003 vol. **161**, n° 5, pp. 933–944.
- [345] H.T. Tien, Redox reactions in lipid bilayers and membrane bioenergetics, *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, 1986 vol. **15**, n° 1, pp. 19–38.
- [346] T. Zhou, S.J. Braunhut, D. Medeiros, K.A. Marx, Potential dependent endothelial cell adhesion, growth and cytoskeletal rearrangements, *Mater Res Soc Symp Proc.*, 1998 vol. **489**, pp. 211–216.
- [347] I. Lassing, F. Schmitzberger, M. Björnstedt, A. Holmgren, P. Nordlund, C.E. Schutt, U. Lindberg, Molecular and Structural Basis for Redox Regulation of  $\beta$ -Actin, *J. Mol. Biol.*, 2007 vol. **370**, n° 2, pp. 331–348.
- [348] M. Szibor, C. Richter, P. Ghafourifar, Redox Control of Mitochondrial Functions, *Antioxid. Redox Signal.*, 2001 vol. **3**, n° 3, pp. 515–523.
- [349] R.T.T. Gettens, J.L. Gilbert, Fibrinogen adsorption onto

- 316L stainless steel under polarized conditions, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.*, 2008 vol. **85**, n° 1, pp. 176–187.
- [350] M.T. Stankovich, A.J. Bard, The electrochemistry of proteins and related substances Part III. Bovine serum albumin, *J. Electroanal. Chem.*, 1978 vol. **86**, n° 1, pp. 189–199.
- [351] M. Haeri, T. Wöllert, G.M. Langford, J.L. Gilbert, Voltage-controlled cellular viability of preosteoblasts on polarized cpTi with varying surface oxide thickness, *Bioelectrochemistry.*, 2013 vol. **94**, pp. 53–60.
- [352] C. Fonseca, M.A. Barbosa, Corrosion behaviour of titanium in biofluids containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> studied by electrochemical impedance spectroscopy, *Corros. Sci.*, 2001 vol. **43**, n° 3, pp. 547–559.
- [353] M. Kalbacova, S. Roessler, U. Hempel, R. Tsaryk, K. Peters, D. Scharnweber, J.C. Kirkpatrick, P. Dieter, The effect of electrochemically simulated titanium cathodic corrosion products on ROS production and metabolic activity of osteoblasts and monocytes/macrophages, *Biomaterials.*, 2007 vol. **28**, n° 22, pp. 3263–3272.
- [354] C.T. Brighton, S. Adler, J. Black, N. Itada, Z.B. Friedenberg, Cathodic oxygen consumption and electrically induced osteogenesis., *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1975.
- [355] O.C. Tuncay, D. Ho, M.K. Barker, Oxygen tension regulates osteoblast function, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 1994 vol. **105**, n° 5, pp. 457–463.
- [356] K.K. Kaysinger, W.K. Ramp, N. Carolina, Extracellular pH Modulates the Activity of Cultured Human Osteoblasts, 1998 vol. **89**, pp. 83–89.
- [357] J. Thomas J. Baranowski, J. Black, *Electrochemically controlled faradic stimulation of osteogenesis*, US005458627A, 1995.
- [358] S. Bierbaum, T. Douglas, T. Hanke, D. Scharnweber, S. Tippelt, T.K. Monsees, R.H.W. Funk, H. Worch, Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: Characterization and influence on osteoblastic cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.*, 2006 vol. **77**, pp. 551–562.
- [359] C.J. Kirkpatrick, C. Mittermayer, Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1990 vol. **1**, n° 1, pp. 9–13.
- [360] S. Yang, K. Zhang, F. Li, J. Jiang, T. Jia, S. Yang, Biological responses of preosteoblasts to particulate and ion forms of Co-Cr alloy, *J Biomed Mater Res Part A.*, 2015 vol. **103A**, pp. 3564–3571.
- [361] I. Catelas, *Characterization and biological effects of wear particles from metal-metal hip implants*, McGill University, 2001.
- [362] C. Fleury, A. Petit, F. Mwale, J. Antoniou, D.J. Zukor, M. Tabrizian, O.L. Huk, Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress, *Biomaterials.*, 2006 vol. **27**, n° 18, pp. 3351–3360.
- [363] Z.U. Rahman, W. Haider, L. Pompa, K.M. Deen, Electrochemical & osteoblast adhesion study of engineered TiO<sub>2</sub> nanotubular surfaces on titanium alloys, *Mater. Sci. Eng. C.*, 2016 vol. **58**, pp. 160–168.
- [364] A.H. Kyle, C.T.O. Chan, A.I. Minchinton, Characterization of three-dimensional tissue cultures using electrical impedance spectroscopy, *Biophys. J.*, 1999 vol. **76**, n° 5, pp. 2640–2648.
- [365] H.H. Huang, S.J. Pan, F.H. Lu, Surface electrochemical impedance in situ monitoring of cell-cultured titanium with a nano-network surface layer, *Scr. Mater.*, 2005 vol. **53**, n° 9, pp. 1037–1042.
- [366] H.H. Huang, In situ surface electrochemical characterizations of Ti and Ti-6Al-4V alloy cultured with osteoblast-like cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004 vol. **314**, n° 3, pp. 787–792.
- [367] S. Hiromoto, K. Noda, T. Hanawa, Development of electrolytic cell with cell-culture for metallic biomaterials, *Corros. Sci.*, 2002 vol. **44**, n° 5, pp. 955–965.
- [368] S. Hiromoto, K. Noda, T. Hanawa, Electrochemical properties of an interface between titanium and fibroblasts L929, *Electrochim. Acta.*, 2002 vol. **48**, n° 4, pp. 387–396.
- [369] J. Wroblewski, K. Mustafa, C. Leygraf, J. Pan, K. Arvidson, Electrochemical impedance spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy analysis of titanium surfaces cultured with osteoblast-like cells derived from human mandibular bone, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002.
- [370] J. Pan, H. Liao, C. Leygraf, D. Thierry, J. Li, Variation of oxide films on titanium induced by osteoblast-like cell culture and the influence of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998.
- [371] C. Pulletikurthi, N. Munroe, D. Stewart, W. Haider, S. Amruthaluri, R. Rokicki, M. Dugrot, S. Ramaswamy, Utility of magneto-electropolished ternary nitinol alloys for blood contacting applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2015 vol. **103**, n° 7, pp. 1366–1374.
- [372] M.S. Caicedo, P.H. Pennekamp, K. McAllister, J.J. Jacobs, N.J. Hallab, Soluble ions more than particulate cobalt-alloy implant debris induce monocyte costimulatory molecule expression and release of proinflammatory cytokines critical to metal-induced lymphocyte reactivity, *J Biomed Mater Res A.*, 2010 vol. **93**, pp. 1312–1321.
- [373] M.S. Caicedo, R. Desai, K. Mcallister, A. Reddy, J.J. Jacobs, N.J. Hallab, Soluble and Particulate Co-Cr-Mo Alloy Implant Metals Activate the Inflammasome Danger Signaling Pathway in Human Macrophages: A Novel Mechanism for Implant Debris Reactivity, *J Orthop Res.*, 2008 vol. **27**, pp. 847–854.
- [374] I. Catelas, A. Petit, D.J. Zukor, J. Antoniou, O.L. Huk, TNF- $\alpha$  secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro - Qualitative analysis of apoptosis, *Biomaterials.*, 2003 vol. **24**, n° 3, pp. 383–391.
- [375] A. Dalal, V. Pawar, K. Mcallister, C. Weaver, N.J. Hallab, Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages, *J Biomed Mater Res Part A.*, 2012 vol. **100A**, pp. 2147–2158.
- [376] M.J. Runa, M.T. Mathew, M.H. Fernandes, L.A. Rocha, First insight on the impact of an osteoblastic layer on the bio-tribocorrosion performance of Ti6Al4V hip implants, *Acta Biomater.*, 2015 vol. **12**, n° 2015, pp. 341–351.
- [377] H.Y. Lin, J.D. Bumgardner, In vitro biocorrosion of Co-Cr-Mo implant alloy by macrophage cells, *J. Orthop. Res.*, 2004 vol. **22**, n° 6, pp. 1231–1236.
- [378] H.Y. Lin, J.D. Bumgardner, Changes in the surface oxide composition of Co-Cr-Mo implant alloy by macrophage cells and their released reactive chemical species, *Biomaterials.*, 2004 vol. **25**, n° 7–8, pp. 1233–1238.
- [379] M. Harmand, A. Najj, P. Gonfrier, In vitro study of biomaterials biodegradation using human cell cultures, *Clin. Mater.*, 1994 vol. **15**, pp. 281–285.
- [380] M. Gabi, T. Sannomiya, A. Larmagnac, M. Puttaswamy, J. Vörös, Influence of applied currents on the viability of cells close to microelectrodes, *Integr. Biol.*, 2009 vol. **1**, n° 1, pp. 108–115.
- [381] C.C. Shih, S.J. Lin, K.H. Chung, Y.L. Chen, Y.Y. Su, Increased corrosion resistance of stent materials by converting current surface film of polycrystalline oxide into amorphous oxide, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000 vol. **52**, n° 2, pp. 323–332.
- [382] J. Lincks, B.D. Boyan, C.R. Blanchard, C.H. Lohmann, Y.



- Liu, D.L. Cochran, D.D. Dean, Z. Schwartz, Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition, **In: The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium**, 2006.
- [383] B.A.A. Scheven, D. Marshall, R.M. Aspden, In Vitro Behaviour of Human Osteoblasts on Dentin and Bone, *Cell Biol. Int.*, 2002 vol. **26**, n° 4, pp. 337–346.
- [384] D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength, *Biomaterials.*, 2001.
- [385] C.H. Lohmann, L.F. Bonewald, M.A. Sisk, V.L. Sylvia, D.L. Cochran, D.D. Dean, B.D. Boyan, Z. Schwartz, Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-dihydroxyvitamin D3, *J. Bone Miner. Res.*, 2000.
- [386] M. Haeri, J.L. Gilbert, Study of cellular dynamics on polarized CoCrMo alloy using time-lapse live-cell imaging, *Acta Biomater.*, 2013 vol. **9**, n° 11, pp. 9220–9228.
- [387] S.M. Haerihosseini, *Voltage Effects on Cells Cultured On Metallic Biomedical Implants*, Syracuse University, 2012.
- [388] H. He, D.C. Chang, Y.K. Lee, Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of biomolecules in HeLa cells, *Bioelectrochemistry.*, 2007 vol. **70**, n° 2, pp. 363–368.
- [389] J.A. Stolwijk, C. Hartmann, P. Balani, S. Albermann, C.R. Keese, I. Giaever, J. Wegener, Impedance analysis of adherent cells after in situ electroporation: Non-invasive monitoring during intracellular manipulations, *Biosens. Bioelectron.*, 2011 vol. **26**, n° 12, pp. 4720–4727.
- [390] M.A. Wimmer, M.P. Laurent, M.T. Mathew, C. Nagelli, Y. Liao, L.D. Marks, J.J. Jacobs, A. Fischer, The effect of contact load on CoCrMo wear and the formation and retention of tribofilms, *Wear.*, 2015 vol. **332–333**, pp. 643–649.
- [391] D. Sun, *Abrasion-corrosion of Cast CoCrMo in Simulated Hip Joint Environments*, University of Southampton, 2009.
- [392] M. Tominaga, E. Kumagai, S. Harada, Effect of electrical stimulation on HIV-1-infected HeLa cells cultured on an electrode surface, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003 vol. **61**, n° 5–6, pp. 447–450.
- [393] Q. Wang, S. Zhong, Y. Xie, Z. Zhang, G. Yang, Electrochemical reactions during constant DC Current stimulation: An in vitro experiment with cultured rat calvarial cells, *Electromagn. Biol. Med.*, 1995 vol. **14**, n° 1, pp. 31–40.
- [394] Y. Wang, Y. Yan, Y. Su, L. Qiao, Release of metal ions from nano CoCrMo wear debris generated from tribo-corrosion processes in artificial hip implants, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2017 vol. **68**, n° December 2016, pp. 124–133.
- [395] T. Visuri, M. Koskenvuo, Cancer risk after McKee-Farrar total hip replacement, *Orthopedics.*, 1991 vol. **14**, pp. 137–142.
- [396] M.M. Morlock, J. Kunze, M.A. Wimmer, C.H. Lohmann, Metal-on-Metal: Ion Levels as an Intervention Strategy, *Semin. Arthroplasty.*, 2012 vol. **23**, n° 4, pp. 283–285.
- [397] J. Hesketh, M. Ward, D. Dowson, A. Neville, The composition of tribofilms produced on metal-on-metal hip bearings, *Biomaterials.*, 2014 vol. **35**, n° 7, pp. 2113–2119.
- [398] Y. Yan, A. Neville, J. Hesketh, D. Dowson, S. Williams, J. Fisher, M-16 A New Tool to Assess Corrosion and Metal Ion Release in Artificial Hip Joints, *J. Biomaterials.*, 2010 vol. **43**, pp. S58.
- [399] A. Petit, F. Mwale, C. Tkaczyk, J. Antoniou, D.J. Zukor, O.L. Huk, Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages, *Biomaterials.*, 2005 vol. **26**, n° 21, pp. 4416–4422.
- [400] H.J. Wiegand, H. Ottenwälder, H.M. Bolt, Recent advances in biological monitoring of hexavalent chromium compounds, *Sci. Total Environ.*, 1988 vol. **71**, n° 3, pp. 309–15.
- [401] J. Ning, M.H. Grant, The role of reduced glutathione and glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium (VI) in osteoblasts, *Toxicol. Vitro.*, 2000 vol. **14**, n° 4, pp. 329–335.
- [402] M. Sugiyama, Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury, *Free Radic. Biol. Med.*, 1992 vol. **134**, n° 2, pp. 191–202.
- [403] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, 2006 vol. **160**, n° 1, pp. 1–40.
- [404] M. Gunaratnam, M.H. Grant, Damage to F-actin and cell death induced by chromium VI and nickel in primary monolayer cultures of rat hepatocytes, *Toxicol. Vitro.*, 2004 vol. **18**, n° 3, pp. 245–253.
- [405] J. Ning, C. Henderson, M.H. Grant, The cytotoxicity of chromium in osteoblasts: Effects on macromolecular synthesis, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2002 vol. **13**, n° 1, pp. 47–52.
- [406] J.Y. Wang, B.H. Wicklund, R.B. Gustilo, D.T. Tsukayama, Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro, *Biomaterials.*, 1996 vol. **17**, n° 23, pp. 2233–2240.
- [407] A. Lalaoui, C. Henderson, C. Kupper, M.H. Grant, The interaction of chromium (VI) with macrophages: Depletion of glutathione and inhibition of glutathione reductase, *Toxicology.*, 2007 vol. **236**, n° 1–2, pp. 76–81.
- [408] R.M. Urban, J.J. Jacobs, M.J. Tomlinson, J. Gavrilovic, J. Black, M. Peoc'h, Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. A.*, 2000 vol. **82**, pp. 457–463.
- [409] V.G. Langkamer, C.P. Case, P. Heap, A. Taylor, C. Collins, M. Pearse, L. Solomon, Systemic distribution of wear debris after hip replacement. A cause for concern?, *J. Bone Joint Surg. Br.*, 1992 vol. **74**, pp. 831–839.
- [410] K.G. Shea, G.A. Lundeen, R.D. Bloebaum, K.N. Bachus, L. Zou, Lymphoreticular dissemination of metal particles after primary joint replacements, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1997 vol. **338**, pp. 219–226.
- [411] J. Takadoum, *Materials for Tribology*, **In: Materials and Surface Engineering in Tribology**, Wiley-ISTE, 2008, pp. 109–204.
- [412] S. Mischler, Wear-Accelerated Corrosion of Passive Metals in Tribocorrosion Systems, *J. Electrochem. Soc.*, 1998 vol. **145**, pp. 750–758.
- [413] J.P. Celis, P. Ponthiaux, F. Wenger, Tribo-corrosion of materials: Interplay between chemical, electrochemical, and mechanical reactivity of surfaces, *Wear.*, 2006 vol. **261**, pp. 939–946.
- [414] J. Williams, *Engineering tribology*, Cambridge, 2005.
- [415] J.R. Davis, *Surface engineering for corrosion and wear resistance*, ASM intern, 2001.
- [416] I.M. Hutchings., ed., *Tribology: friction and wear of engineering materials*, CRC Press, 1992.
- [417] M.C. Galetz, S.H. Seiferth, B. Theile, U. Glatzel, Potential for adhesive wear in friction couples of UHMWPE running against oxidized zirconium, titanium nitride coatings, and cobalt-chromium alloys, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2010 vol. **93**, n° 2, pp. 468–475.
- [418] L. V. Wilches, J.A. Uribe, A. Toro, Wear of materials used for artificial joints in total hip replacements, *Wear.*, 2008 n° 88, pp. 9–16.
- [419] K. Marcus, C. Allen, The sliding wear of ultrahigh molecular weight polyethylene in an aqueous

- environment, *Wear.*, 1994 vol. **178**, n° 1–2, pp. 17–28.
- [420] P.J. Blau, ASM Handbook: Friction, Lubrication, and Wear Technology, Vol. 18, In: G.E. Totten (Ed.), *ASM Intern.*, 1992.
- [421] V. Vignal, N. Mary, P. Ponthiaux, F. Wenger, Influence of friction on the local mechanical and electrochemical behaviour of duplex stainless steels, *Wear.*, 2006 vol. **261**, pp. 947–953.
- [422] A. Igual Munoz, N. Espallargas, Tribocorrosion mechanisms in sliding contacts, In: *Tribocorrosion of passive metals and coatings*, D. Landolt, S. Mischler (Eds.), 2011, pp. 118–147.
- [423] H. ABD-EL-KADER, S.M. EL-RAGHY, Wear-corrosion mechanism of stainless steel in chloride media, *Corros. Sci.*, 1986 vol. **26**, n° 8, pp. 647–653.
- [424] I. Garcia, D. Drees, J. Celis, Corrosion-wear of passivating materials in sliding contacts based on a concept of active wear track area, *Wear.*, 2001 vol. **249**, pp. 452–460.
- [425] M. Hong, S. Pyun, Corrosive wear behaviour of 304-L stainless H2SO4 solution Part 2. Effect of chloride ion concentration steel in 1 N, *Wear.*, 1991 vol. **147**, pp. 69–78.
- [426] S. Tao, D.Y. Li, Investigation of corrosion – wear synergistic attack on nanocrystalline Cu deposits, *Wear.*, 2007 vol. **263**, pp. 363–370.
- [427] X. Jiang, S. Li, D. Tao, J. Yang, Accelerative effect of wear on corrosion of high-alloy stainless steel, *Corrosion.*, 1993 vol. **49**, n° 10.
- [428] T. Zhang, X. Jiang, S. Li, X. Lu, A quantitative estimation of the synergy between corrosion and abrasion, *Corros. Sci.*, 1994 vol. **36**, n° 12, pp. 1953–1962.
- [429] J. Jiang, M.M. Stack, A. Neville, Modelling the tribocorrosion interaction in aqueous sliding conditions, *Tribology Int.*, 2002 vol. **35**, pp. 669–679.
- [430] R. Bailey, *Surface Engineered Titanium for Improved Tribological, Electrochemical and Tribo-electrochemical Performance*, Montfort University, 2015.
- [431] S. Mischler, Triboelectrochemical techniques and interpretation methods in tribocorrosion: A comparative evaluation, *Tribol. Int.*, 2008 vol. **41**, pp. 573–583.
- [432] M.T. Mathew, M.A. Wimmer, Tribocorrosion in artificial joints: In vitro testing and clinical implications, In: *Tribocorrosion of Passive Metals and Coatings*, Woodhead Publishing Limited, 2011, pp. 368–400.
- [433] S. Mischler, A.I. Muñoz, Wear of CoCrMo alloys used in metal-on-metal hip joints: A tribocorrosion appraisal, *Wear.*, 2013 vol. **297**, n° 1–2, pp. 1081–1094.
- [434] D. Sun, J.A. Wharton, R.J.K. Wood, L. Ma, W.M. Rainforth, Microabrasion – corrosion of cast CoCrMo alloy in simulated body fluids, *Tribol. Int.*, 2009 vol. **42**, pp. 99–110.
- [435] A.C. Vieira, A.R. Ribeiro, L.A. Rocha, J.P. Celis, Influence of pH and corrosion inhibitors on the tribocorrosion of titanium in artificial saliva, *Wear.*, 2006 vol. **261**, n° 9, pp. 994–1001.
- [436] J. Qu, P.J. Blau, T.R. Watkins, O.B. Cavin, N.S. Kulkarni, Friction and wear of titanium alloys sliding against metal, polymer, and ceramic counterfaces, *Wear.*, 2005 vol. **258**, n° 9, pp. 1348–1356.
- [437] A. Berradja, F. Bratu, L. Benea, G. Willems, J.P. Celis, Effect of sliding wear on tribocorrosion behaviour of stainless steels in a Ringer's solution, *Wear.*, 2006 vol. **261**, n° 9, pp. 987–993.
- [438] Y. Sun, R. Bailey, Improvement in tribocorrosion behavior of 304 stainless steel by surface mechanical attrition treatment, *Surf. Coatings Technol.*, 2014 vol. **253**, pp. 284–291.
- [439] G. Prieto, W.R. Tuckart, Influence of Cryogenic Treatments on the Wear Behavior of AISI 420 Martensitic Stainless Steel, *J. Mater. Eng. Perform.*, 2017 vol. **26**, n° 11, pp. 5262–5271.
- [440] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.*, 2006 vol. **27**, n° 15, pp. 2907–2915.
- [441] J.J. Ryu, P. Shrotriya, Mechanical load assisted dissolution response of biomedical cobalt–chromium and titanium metallic alloys: Influence of in-plane stress and chemical environment, *Wear.*, 2015 vol. **332–333**, pp. 662–668.
- [442] Y. Yan, A. Neville, J. Hesketh, D. Dowson, Real-time corrosion measurements to assess biotribocorrosion mechanisms with a hip simulator, *Tribol. Int.*, 2013 vol. **63**, pp. 115–122.
- [443] M.T. Mathew, P. Srinivasa Pai, R. Pourzal, a. Fischer, M. a. Wimmer, Significance of tribocorrosion in biomedical applications: Overview and current status, *Adv. Tribol.*, 2009 vol. **2009**, pp. 1–12.
- [444] B. Normand, N. Pèbère, C. Richard, M. Wery, *Prévention et lutte contre la corrosion. Une approche scientifique et technique*, 2004.
- [445] V. Dalbert, *Etude du comportement en tribocorrosion d'aciers inoxydables en milieu aqueux: évaluation de la synergie entre sollicitations mécaniques superficielles et réactions électrochimiques de surface, effet de la microstructure.*, INSA de Lyon, 2014.
- [446] L. Hongtao, G. Shirong, C. Shoufan, W. Shibo, Comparison of wear debris generated from ultra high molecular weight polyethylene in vivo and in artificial joint simulator, *Wear.*, 2011 vol. **271**, n° 5–6, pp. 647–652.
- [447] R. Büscher, G. Täger, W. Dudzinski, B. Gleising, M.A. Wimmer, A. Fischer, Subsurface microstructure of metal-on-metal hip joints and its relationship to wear particle generation, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, 2005 vol. **72**, n° 1, pp. 206–214.
- [448] M.M. Stack, J. Rodling, M.T. Mathew, H. Jawan, W. Huang, G. Park, C. Hodge, Micro-abrasion–corrosion of a Co–Cr/UHMWPE couple in Ringer's solution: An approach to construction of mechanism and synergism maps for application to bio-implants, *Wear.*, 2010 vol. **269**, pp. 376–382.
- [449] C.G. Figueiredo-Pina, A. Matos Neves, B.M. Bandarra das Neves, Corrosion-wear evaluation of a UHMWPE/Co-Cr couple in sliding contact under relatively low contact stress in physiological saline solution, *Wear.*, 2011 vol. **271**, n° 5–6, pp. 665–670.
- [450] D. Tetreault, F. Kennedy, Friction and wear behavior of ultrahigh molecular weight polyethylene on Co-Cr and titanium alloys in dry and lubricated environments, *Wear.*, 1989 vol. **133**, pp. 295–307.
- [451] D.W. Van Citters, 14 – Failure analysis of orthopaedic implants, *Wear Orthop. Implant. Artif. Joints.*, n.d.
- [452] M.J. Nine, D. Choudhury, A.C. Hee, R. Mootanah, N.A.A. Osman, Wear debris characterization and corresponding biological response: Artificial hip and knee joints, *Materials (Basel).*, 2014 vol. **7**, n° 2, pp. 980–1016.
- [453] H.O. Catelas I, Bobynd JD, Zukor DJ, Petit A, The effect of digestion protocols on the isolation and characterization of metal– metal wear particles. II. Analysis of ion concentrations and particle composition, *J Biomed Mater Res.*, 2001 vol. **55**, n° 330–337.
- [454] I. Catelas, J. Dennis Bobynd, J.J. Medley, D.J. Zukor, A. Petit, O.L. Huk, Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal–metal wear particles. I. Analysis of particle size and shape, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001 vol. **55**, n° 3, pp. 320–329.
- [455] A. Kocijan, I. Milošev, B. Pihlar, The influence of complexing agent and proteins on the corrosion of stainless steels and their metal components, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2003 vol. **14**, n° 1, pp. 69–77.
- [456] E. Ingham, J. Fisher, The role of macrophages in

- osteolysis of total joint replacement, *Biomaterials*, 2005 vol. **26**, n° 11, pp. 1271–86.
- [457] I. Catelas, R. Vanos, L.L. Lildhar, E.A. Lehoux, P.E. Beaul, In vitro macrophage response to nanometer-size chromium oxide particles, 2013 pp. 149–159.
- [458] S.D. Neale, D.R. Haynes, D.W. Howie, D.W. Murray, N.A. Athanasou, The effect of particle phagocytosis and metallic wear particles on osteoclast formation and bone resorption in vitro, *J. Arthroplasty*, 2000 vol. **15**, n° 5, pp. 654–662.
- [459] M.S. Caicedo, L. Samelko, K. McAllister, J.J. Jacobs, N.J. Hallab, Increasing both CoCrMo-alloy particle size and surface irregularity induces increased macrophage inflammasome activation in vitro potentially through lysosomal destabilization mechanisms, *J Orthop Res*, 2013 vol. **31**, n° 10, pp. 1633–1642.
- [460] B.T. Perez-Maceda, M.E. López-Fernández, I. Díaz, A. Kavanaugh, F. Billi, M.L. Escudero, M.C. García-Alonso, R.M. Lozano, Macrophage biocompatibility of CoCr wear particles produced under polarization in hyaluronic acid aqueous solution, *Materials (Basel)*, 2018 vol. **11**, n° 5.
- [461] A. Butt, N.B. Lucchiari, D. Royhman, M.J. Runa, M.T. Mathew, C. Sukotjo, C.G. Takoudis, Design, Development, and Testing of a Compact Tribocorrosion Apparatus for Biomedical Applications, *J. Bio-and Tribo-Corrosion*, 2014 vol. **1**, n° 1, pp. 4.
- [462] M.M. Sava, B. Munteanu, E. Renault, Y. Berthier, A.M. Trunfio-Sfarghiu, Tribological analysis of UHMWPE tibial implants in unicompartmental knee replacements: From retrieved to in vitro studies, *Biotribology*, 2018 vol. **13**, n° October 2017, pp. 1–15.
- [463] A. Seireg, R.J. Arvikar, The Prediction of Muscular Load Sharing and Joint Forces in Lower Extremities during Walking, *J. Biomech.*, 1975 vol. **8**, pp. 89–102.
- [464] M. Lyvers, D. Bijukumar, A. Moore, P. Saborio, D. Royhman, M. Wimmer, K. Shull, M.T. Mathew, Electrochemically induced tribolayer with molybdenum for hip implants: Tribocorrosion and biocompatibility study, *Thin Solid Films*, 2017 vol. **644**, n° May, pp. 82–91.
- [465] A.M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, M.H. Meurisse, J.P. Rieu, Multiscale analysis of the tribological role of the molecular assemblies of synovial fluid. Case of a healthy joint and implants, *Tribol. Int.*, 2007 vol. **40**, n° 10-12 SPEC. ISS., pp. 1500–1515.
- [466] L. Vroman, A.L. Adams, M. Klings, Interactions among human blood proteins at interfaces, *Fed. Proc.*, 1971 vol. **30**, pp. 1494–1502.
- [467] A. Smyth, J. Fisher, S. Suñer, C. Brockett, Influence of kinematics on the wear of a total ankle replacement, *J. Biomech.*, 2017 vol. **53**, pp. 105–110.
- [468] B. Kincaid, F. Gillard, D. Wentorf, O. Popoola, J. Bischoff, Gravimetric Wear Testing of a Fixed-Bearing Bicondylar Total Ankle Replacement, **In:** 2013.
- [469] C.J. Bell, J. Fisher, Simulation of Polyethylene Wear in Ankle Joint Prostheses, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 2007 vol. **81B**, pp. 162–167.
- [470] O.N. Schipper, S.L. Haddad, S. Fullam, R. Pourzal, M.A. Wimmer, Wear Characteristics of Conventional Ultrahigh-Molecular-Weight Polyethylene Versus Highly Cross-Linked Polyethylene in Total Ankle Arthroplasty, *Foot Ankle Int.*, 2018 pp. 1–10.
- [471] A. Kobayashi, Y. Minoda, Y. Kadoya, H. Ohashi, K. Takaoka, C.L. Saltzman, Ankle arthroplasties generate wear particles similar to knee arthroplasties, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2004 n° 424, pp. 69–72.
- [472] B. Hintermann, V. Valderrabano, Total ankle replacement, *Foot Ankle Clin.*, 2003 vol. **8**, n° 2, pp. 375–405.
- [473] W.A. Soskolne, L. Sennerby, A. Wennerberg, The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF- $\alpha$  and PGE 2, *Clin Oral Implant. Res.*, 2002 vol. **13**, pp. 86–93.
- [474] W.G. Brodbeck, M.S. Shive, E. Colton, Y. Nakayama, T. Matsuda, J.M. Anderson, Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells, *J Biomed Mater Res A*, 2001 vol. **55**, n° 4, pp. 661–668.
- [475] D.B. Warheit, L.H. Hill, A.R. Brody, Surface morphology and correlated phagocytic capacity of pulmonary macrophages lavaged from the lungs of rats, *Exp. Lung Res.*, 1984 vol. **6**, n° 1, pp. 71–82.
- [476] A.S. Shanbhag, J.J. Jacobs, J. Black, J.O. Galante, T.T. Glant, Macrophage/particle interactions: Effect of size, composition and surface area, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994 vol. **28**, n° 1, pp. 81–90.
- [477] I. Voronov, J.P. Santerre, A. Hinek, J.W. Callahan, J. Sandhu, E.L. Boynton, Macrophage phagocytosis of polyethylene particulate in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997 vol. **39**, n° 1, pp. 40–51.
- [478] T.R. Green, J. Fisher, M. Stone, B.M. Wroblewski, E. Ingham, Polyethylene particles of a “critical size” are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro, *Biomaterials*, 1998 vol. **19**, n° 24, pp. 2297–2302.
- [479] J.B. Matthews, A.A. Besong, T.R. Green, M.H. Stone, B.M. Wroblewski, J. Fisher, E. Ingham, Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000 vol. **52**, n° 2, pp. 296–307.
- [480] M. Endo, J.L. Tipper, D.C. Barton, M.H. Stone, E. Ingham, J. Fisher, Comparison of wear, wear debris and functional biological activity of moderately crosslinked and non-crosslinked polyethylenes in hip prostheses, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, 2002 vol. **216**, n° 2, pp. 111–122.
- [481] N. Ishiguro, T. Kojima, T. Ito, S. Saga, H. Anma, K. Kurokouchi, Y. Iwahori, T. Iwase, H. Iwata, Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997 vol. **35**, n° 3, pp. 399–406.
- [482] E. Ingham, J. Fisher, Biological reactions to wear debris in total joint replacement, **In: Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, 2000, pp. 21–37.
- [483] F. Billi, P. Benya, E. Ebramzadeh, P. Campbell, F. Chan, H.A. McKellop, Metal wear particles: What we know, what we do not know, and why, *SAS J.*, 2009 vol. **3**, n° 4, pp. 133–142.
- [484] S. Yang, W. Ren, Y. Park, A. Sieving, S. Hsu, S. Nasser, P.H. Wooley, Diverse cellular and apoptotic responses to variant shapes of UHMWPE particles in a murine model of inflammation, *Biomaterials*, 2002 vol. **23**, pp. 3535–3543.
- [485] A. Sieving, B. Wu, L. Mayton, S. Nasser, P.H. Wooley, Morphological characteristics of total joint arthroplasty-derived ultra-high molecular weight polyethylene ( UHMWPE ) wear debris that provoke, *J Biomed Mater Res A*, 2003 vol. **64**, n° 3, pp. 457–64.
- [486] L.D. Dorr, R. Bloebaum, J. Emmanuel, R. Meldrum, Histologic, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1990 vol. **261**, pp. 82–95.
- [487] M. Böhler, F. Kanz, B. Schwarz, I. Steffan, A. Walter, H. Plenck Jr, K. Knahr, Adverse tissue reactions to wear particles from Co-alloy articulations, increased by alumina-blasting particle contamination from cementless Ti-based total hip implants, *J. Bone Jt. Surg.*, 2002 vol. **84**, n° 1, pp. 128–136.
- [488] R. Meldrum, B. Roy, D. Lawrence, Metal ion concentrations in retrieved polyethylene total hip inserts and implications for artifactually high readings in tissue, *J Biomed Mater Res*, 1993 vol. **27**, pp. 1349–1355.
- [489] M.T. Mathew, C. Nagelli, R. Pourzal, A. Fischer, M.P.

- Laurent, J.J. Jacobs, M.A. Wimmer, Tribolayer formation in a metal-on-metal (MoM) hip joint: An electrochemical investigation, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* , 2014 vol. **29**, pp. 199–212.
- [490] T. Veselack, G. Aldebert, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, T. Schmid, M. Laurent, M. Wimmer, Phospholipid Vesicles in Media for Tribological Studies against Live Cartilage, *Lubricants.* , 2018 vol. **6**, n° 1, pp. 19.
- [491] K. Friedrich, J. Flöck, K. Váradi, Z. Néder, Experimental and numerical evaluation of the mechanical properties of compacted wear debris layers formed between composite and steel surfaces in sliding contact, *Wear.* , 2001 vol. **250–251**, pp. 1202–1212.
- [492] L. Chang, Z. Zhang, L. Ye, K. Friedrich, Tribological properties of epoxy nanocomposites. III. Characteristics of transfer films, *Wear.* , 2007 vol. **262**, n° 5–6, pp. 699–706.
- [493] C. Gray, D. Zicha, Microscopy of living cells, **In: Animal Cell Culture: Essential Methods**, John M. Davis (Ed.), 2011.; pp. 61–90.
- [494] K. L. Johnson, Contact mechanics. Cambridge, Cambridge, n.d.,.

## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : IMPERGRE	DATE de SOUTENANCE : 30 Juillet 2019
Prénoms : Amandine	
TITRE : Interactions entre CoCrMo et milieu cellulaire : de la corrosion à la tribocorrosion	
NATURE : Doctorat	Numéro d'ordre : 2019LYSEI060
Ecole doctorale : ED 34 – Matériaux de Lyon	
Spécialité : Matériaux	
RESUME :	
<p>La durabilité à long terme des prothèses articulaires repose sur leur résistance à la corrosion et leur comportement à l'usure. Quels que soient les matériaux utilisés, des produits de dégradation (ions métalliques et débris d'usure) se forment, du fait de la corrosivité des fluides corporels et de la biomécanique des articulations. Généralement, ces produits sont associés aux complications post-opératoires et en conséquence, leurs effets constituent des préoccupations cliniques critiques. A cet égard, la tribocorrosion est une considération sérieuse dans la performance des prothèses articulaires.</p> <p>Ce travail vise à contribuer à l'amélioration de la compréhension des mécanismes de dégradation d'un alliage de CoCrMo, utilisé en tant que prothèse articulaire, en appréhendant le couplage de charges mécaniques et l'activité cellulaire. Cette thèse a été entreprise selon une approche itérative, qui débute par l'étude du comportement électrochimique du milieu physiologique simulé, propice à la culture cellulaire (le RPMI-1640). L'alliage métallique et les cellules ont successivement été ajoutés au système d'étude. Les essais ont révélé que l'oxydation du CoCrMo est accélérée en présence d'espèces carbonées et de composés organiques, et que les cellules interviennent sur la libération d'ions métalliques. Un dispositif de biotribocorrosion a été développé dans le but d'évaluer l'influence des produits de dégradation sur le métabolisme cellulaire. Cette étude multidisciplinaire exhaustive a combiné des techniques expérimentales d'électrochimie, de biologie et de tribologie, afin de souligner l'importance de la chimie de surface du biomatériau sur sa résistance à la tribocorrosion et son caractère cytotoxique.</p> <p>Finalement, une méthodologie expérimentale a été proposée dans ce travail, en vue de mieux comprendre l'interaction entre les fluides physiologiques simulés et les biomatériaux.</p>	
MOTS-CLÉS : Corrosion, Biomatériaux, CoCrMo, Tribocorrosion	
Laboratoire (s) de recherche : MATEIS -UMR CNRS 5510, INSA de Lyon	
Directeur de thèse : Bernard Normand	
Président de jury : Pierre Ponthiaux	
Composition du jury : René Sabot, Jean Geringer, Laurent Gremillard, Bernard Normand, Christelle Der-Loughian	