



HAL
open science

Caractérisation physico-chimique et ultrasonore de matériaux céramiques pour applications biomédicales

Cristina Liana Popa

► **To cite this version:**

Cristina Liana Popa. Caractérisation physico-chimique et ultrasonore de matériaux céramiques pour applications biomédicales. Acoustique [physics.class-ph]. Université du Havre; Universitatea București, 2016. Français. NNT : 2016LEHA0022 . tel-01431610

HAL Id: tel-01431610

<https://theses.hal.science/tel-01431610>

Submitted on 17 Jan 2017

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

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



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Acoustique

Préparée au sein de l'Université du Havre et de l'Université de Bucarest

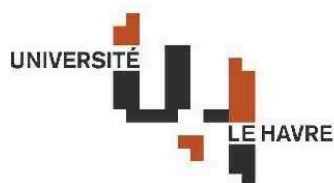
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET ULTRASONORE DE MATERIAUX CERAMIQUES POUR APPLICATIONS BIOMEDICALES

Présentée et soutenue par
Cristina Liana POPA

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Physique, université de Bucarest, le 27/09/2016
devant le jury composé de

M. Mounsi ECH CHERIF EL KETTANI	Maître de Conférences HDR, LOMC, Le Havre	Codirecteur de thèse
M. Stefan ANTOHE	Professeur, Université de Bucarest	Codirecteur de thèse
M. Damien LEDUC	Maître de Conférences, LOMC, Le Havre	Examineur
M. Mikael MOTELICA-HEINO	Professeur, Université d'Orléans	Rapporteur
M. Mihai Valentin PREDOI	Professeur, Université Polytechnique de Bucarest	Rapporteur
M. Lucian ION	Professeur, Université de Bucarest	Examineur

Thèse dirigée par Mounsi ECH CHERIF EL KETTANI, LOMC UMR CNRS 6294
et co-dirigée par Stefan ANTOHE, Université de Bucarest



LABORATOIRE ONDES
et MILIEUX COMPLEXES

Contenu

Introduction	3
1 ^{er} chapitre: Propriétés générales des biomatériaux céramiques ...	9
1.1 Présentation générale des biomatériaux	9
1.2 Biomatériaux céramiques	11
1.3 Biocéramiques sur base de phosphate de calcium	13
1.4 Hydroxyapatite.....	15
1.5 Applications de l'hydroxyapatite.....	18
2 ^{ème} chapitre: Méthodes de synthèse et techniques de caractérisation des biomatériaux céramiques	20
2.1. Synthèse et caractérisation structurelle et morphologique des biomatériaux céramiques	20
2.1.1 Synthèse par co-précipitation.....	20
2.1.2 Caractérisation	21
2.3. Caractérisation ultrasonore des biomatériaux céramiques.....	23
2.3.1 Caractérisation ultrasonore des solutions	23
2.4. Caractérisation biologique des biomatériaux céramiques	24
2.4.1 Viabilité des cellules endothéliales sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec différentes concentrations de zinc	24
2.4.2 Viabilité des cellules HepG2 sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc.....	25
2.4.3 Viabilité des cellules HeLa sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec Zn dans la matrice de collagène	25
2.4.4 Études antimicrobiennes sur Escherichia coli	26
2.4.5 Évaluation qualitative de la sensibilité des différentes souches microbiennes par rapport aux nanoparticules avec potentielle action antimicrobienne	26
3 ^{ème} Chapitre: Caractérisation physique-chimique et biologique de l'hydroxyapatite dopée avec zinc	27
3.1. Caractérisation physique – chimique des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc	28
3.1.1 Diffractométrie de rayons X (DRX)	28
3.1.2 Microscopie électronique de balayage (MEB)	33
3.1.3 Microscopie électronique en transmission (MET).....	36
3.1.4 Analyse thermique (TGA-DTA).....	39
3.1.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	40
3.1.6 Spectroscopie Raman.....	46
3.1.7 Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS)	48
3.1.8 Mesures de porosité par adsorption – désorption de gaz (méthode BET) 54	

3.2. Études biologiques des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc.....	61
3.2.1 Croissance et viabilité des cellules endothéliales sur supports d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc	61
3.2.2 Viabilité des cellules HepG2 sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc.....	65
3.2.3. Études antimicrobiennes sur Escherichia coli	67
3.3. Conclusions.....	68
4^{ème} chapitre: Synthèse et caractérisation des nano-composites sur base de l'hydroxyapatite.....	73
4.1. Synthèse et caractérisation des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène.....	74
4.2.1. Diffraction de rayons X (DRX)	74
4.2.2 Microscopie électronique de balayage (MEB)	76
4.2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	77
4.2.4 Spectroscopie Raman.....	78
4.2.5 Analyse thermique (TGA-DTA).....	80
4.2.6 Mesures de porosité par adsorption – désorption de gaz (méthode BET) 81	
4.3 Études biologiques des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène.....	84
4.3.1 Étude de la cyto-toxicité	84
4.3.2 Distribution du cycle cellulaire.....	84
4.3.3 Évaluation des propriétés antimicrobiennes	85
4.4 Conclusions.....	87
5^{ème} chapitre: Caractérisation ultrasonore des biomatériaux céramique sur base d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc	89
5.1 Caractérisation ultrasonore des dispersions d'hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec zinc (HApZn7 et HApZn20).....	89
5.2 Dispersion des ondes ultrasonores d'haute fréquence des nanoparticules dispersées dans l'eau bi-distillée.....	103
5.3 Conclusion.....	118
Conclusions Générales	120
Bibliographie	123
Liste des propres contributions.....	142
6.1 Travaux publiés dans les revues.....	142
6.1.1 Revues indexées ISI.....	142
6.2 Travaux présentés aux conférences.....	143
6.2.1 Conférences internationales.....	143

Introduction

Depuis les temps anciens jusqu'à nos jours, les gens se sont confrontés avec le risque des accidents, des maladies et des infections. Autrefois, l'entière activité des peuples, indifféremment s'il s'agissait de la chasse, de l'agriculture ou de constructions, s'est basée sur les membres de la communauté capables à soutenir le bon développement des locations d'où ils faisaient partie. Tous les individus qui, à cause de certains accidents ou certaines maladies ne pouvaient pas contribuer au bon état de la communauté, représentaient une charge pour les autres. Certaines des plus graves lésions étaient celles osseuses. Ces types de lésions représentaient un motif majeur de souci suite à la possibilité d'apparition de certaines séquelles permanentes. Ainsi, la fragilité de l'organisme humain a déterminé le fait de trouver et développer certaines méthodes de guérison des différentes affections. Les premiers essais de réparation des défauts osseux ont été mentionnés dans le papyrus d'Edgar Smith et ils datent environ de l'année 2000 Avant J.C. [1]. Les écritures mentionnent que le traitement d'un défaut osseux crânien d'environ 7 mm a été réalisé avec un morceau d'os issu d'un animal [2-3]. En plus, des études récentes réalisées par les professeurs anthropologues de l'Université de Florida ont découvert des preuves de certaines des plus anciennes interventions chirurgicales osseuses en Pérou [4-5]. Il semble que certaines des plus anciennes interventions chirurgicales orthopédiques ont été réalisées pendant la période 800 – 1335 par les chamans Chachapoya de Pérou. Les scientifiques qui ont étudié cette découverte sont arrivés à la conclusion que ces interventions chirurgicales ont été le plus probable effectuées afin de diminuer la pression accumulée dans le pied suite à une lésion ou à une infection [4-5]. Malgré le fait que les deux interventions ont fini avec le décès des patients, les fragments osseux ne présentant pas des traces de guérison, cette découverte présente les débuts de la chirurgie orthopédique. En temps, la médecine s'est développée de manière continue, dans un rythme alerte, en arrivant à l'utilisation des premières greffes osseuses avec plus de 350 années à l'avant [6]. À compter avec les années 1600, il a été accordé une attention spéciale à la compréhension et la connaissance de la physiologie humaine. Galileo Galilei finit la construction du premier microscope moderne en 1609, et en Grand Bretagne, Whiliam Harvey découvrait la circulation sanguine en 1615. De même, la curiosité pour la connaissance de l'organisme humain a été immortalisée dans des divers chefs d'œuvres de l'époque, l'un

des plus représentatifs étant «La leçon d'anatomie du Dr. Nicolaes Tulip », chef-d'œuvre réalisé par le peintre hollandais Rembrandt dans l'année 1631. Dans cet œuvre Rembrandt décrit une leçon d'anatomie, où Dr. Nicolaes Tulip présente aux disciples la musculature du bras. La médecine moderne a continué de se développer graduellement. Ainsi, dans l'année 1668, le médecin hollandais Jacob Van Meekren réalise la première intervention chirurgicale de greffe osseuse en utilisant la xéno greffe canine pour réparer un défaut osseux crânien d'un soldat russe suite à une lésion de guerre [1,6]. L'intervention chirurgicale a été un succès, la greffe osseuse étant complètement incorporée par le tissu d'accueil [1,6]. Ultérieurement, après plus de 150 ans, en 1821, Philips von Walter a effectué en Allemand la première intervention chirurgicale où il a été utilisé une autogreffe [7]. 60 ans plus tard, en 1879, Sir William MacEwen, médecin écossais a réalisé le premier transplant allogène par le remplacement de deux tiers de l'humérus proximal infecté d'un garçon de quatre ans avec le tibia d'un autre enfant qui souffrait de rachitisme [7]. Les progrès médicaux réalisés pendant la Première et la Seconde Guerre Mondiale ont conduit à une meilleure compréhension des modalités de traitement des défauts osseux. Ainsi, après la finalisation des deux guerres mondiales, ils ont été réalisés de nombreuses recherches axées sur le développement de certaines nouvelles méthodes de traitement des défauts osseux. Parmi les réalisations majeures du domaine de la chirurgie osseuse, on énumère la découverte de la matrice osseuse déminéralisée (DBM) autour des années 1960 et aussi de celle de la protéine morphogénique osseuse (BMP) dans l'année 1965 par le chirurgien orthopédiste américain Marshall Urist [6]. Suite aux études réalisées tout au long des années, il a réussi en 1996 d'être breveté le premier produit céramique synthétique [6,8-9].

Même si les plus utilisés types de greffes restent les autogreffes, dans le dernier siècle ils ont été réalisés de nombreuses études pour la création de certains matériaux synthétiques alternatifs au tissu naturel osseux. Parce que l'utilisation des autogreffes suppose des interventions chirurgicales supplémentaires, et la quantité de tissu osseux qui peut être utilisée est limitée, des scientifiques et des médecins du monde entier ont essayé à créer un matériel qui puisse substituer le tissu osseux naturel. Le premier matériel synthétique utilisé comme remplaçant du tissu osseux a été réalisé en 1892, par Dressmann qui a utilisé le sulfate de calcium (plâtrerie de Paris – matériel connu à ce jour sous le nom de gypse) afin de remplir des défauts osseux [2,10]. Ultérieurement, dans les années 1940, la résine acrylique connue sous le nom de méthacrylate de

méthyle a été utilisée comme remplaçant du tissu osseux, étant utilisée même à ce jour en combinaison avec des différentes masses métalliques. Les céramiques sur base d'hydroxyapatite et phosphate de calcium ont été utilisées en orthopédie et stomatologie, à compter de la seconde moitié du 20^{ème} siècle [2].

Une fois avec le développement du génie tissulaire, il a été essayé la création du remplaçant idéal du tissu humain osseux. Dans ce contexte, il est important de prendre en compte qu'un matériel créé pour remplacer le tissu humain doit avoir plusieurs propriétés spécifiques. Les plus importantes propriétés sont la biocompatibilité avec le tissu d'accueil et l'habilité de ne pas déclencher une réponse de rejette de la part de l'organisme [2]. L'os humain est une matrice extracellulaire composée d'une partie organique et d'une inorganique. La composante majeure de la partie organique est l'hydroxyapatite (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La partie organique est composée de collagènes fibrillaires [11-12] qui sont alignés parallèle avec l'axe des nanocristaux d'HAp [11,13]. Le tissu osseux humain contient entre 10 et 20% eau, et de sa masse sèche, environ 60-70% est représentée par la partie minérale formée d'hydroxyapatite. La différence jusqu'à 100% est représentée en grande partie par le collagène, protéines et sels inorganiques [14]. Ainsi, le matériel synthétique idéal capable à reproduire le plus fidèle la structure du tissu osseux humain doit être formée à la fois de l'hydroxyapatite et aussi de collagène. Les recherches réalisées tout au long du temps ont démontrées que l'hydroxyapatite possède des propriétés comme l'ostéo-conductivité et l'ostéo-inductance, ayant la capacité de stimulation de la régénération osseuse [15-16]. De même, une autre caractéristique importante d'HAp est la biodégradabilité. Des études récentes [15,17-22] ont montré que l'hydroxyapatite s'incorpore avec succès dans le tissu environnant, en se dégradant graduellement au fur et à mesure que le tissu d'accueil commence à se régénérer. Afin d'améliorer certaines propriétés d'HAp, comme la solubilité, la bio-activité ou l'ostéo-inductance, les scientifiques ont essayé d'introduire dans sa structure des divers ions métalliques par l'intermède du mécanisme de substitution ionique [11,20-21,23-27]. De ceux-ci, une attention spéciale a été accordée aux ions métalliques ayant des propriétés antimicrobiennes, tel que Ag^+ , Zn^{2+} , Eu^{3+} . Des études précédentes ont démontré que le dopage de l'hydroxyapatite avec des différents ions métalliques détermine la modification des paramètres du réseau cristalline, de la cristallinité et aussi d'autres propriétés physiques [28-34]. Dans ce contexte, une attention spéciale a été accordée au zinc (Zn). Le zinc est un métal de

transition qui comporte un rôle essentiel pour le bon fonctionnement de l'organisme humain, en spécial du tissu osseux et du plasma [28,35-37]. Il est un composant chimique non-protéique nécessaire pour l'activité biologique de plus de 300 enzymes et il contribue au métabolisme des protéines, des hydrates de carbone et des lipides [28,38-41]. En plus, el zinc a un important rôle catalytique, structurel et régulateur dans le cadre du système biologique [28,38]. Presque 30% de la quantité totale de zinc du corps humain se trouve dans le tissu osseux, étant nécessaire pour la maintenance de la densité minérale osseuse et du métabolisme osseux. La déficience de zinc détermine l'apparition de certains problèmes graves de santé tel que le retard d'agrandissement, l'hypogonadisme masculin, en pouvant produire de modifications neurosensorielles anormales [19,28,38,42]. De même, la déficience de zinc induit le retard des guérisons des lésions, la perte en poids, anorexie et une sensibilité élevée aux infections [19,28,38,42]. En plus, chaque étape du métabolisme du tissu osseux implique l'action du zinc, et une absence de celui-ci détermine l'installation de l'ostéoporose [28,38]. En conséquence, le dopage HAp avec ions de Zn^{2+} pourrait conduire à l'amélioration des propriétés de l'hydroxyapatite, en s'obtenant ainsi un bio-matériel avec des propriétés physique – chimiques supérieures. Vu que la matrice organique osseuse est représentée par collagène en proportion de 89% [11,43-44], il doit comprendre la préoccupation pour la création d'un nouveau bio-composite sur base de collagène et hydroxyapatite dopée avec zinc. Le collagène est un polymère naturel qui peut être trouvé dans des différents types de tissus, tels que peau et os (Type I), dans les cartilages (Type II) ou dans les parois des vaisseaux de sang (Type III) [11,45]. De même, le collagène a été utilisé au génie tissulaire et de réparation grâce à sa biocompatibilité et à la capacité d'être facilement résorbé par le corps humain e permettant en même temps une bonne fixation des cellules [11,22, 45-48]. Des études récentes ont démontré que les dispositifs sur base de collagène et hydroxyapatite inhibe le développement des agents pathogènes bactériens, en diminuant ainsi le risque de l'apparition des infections post-chirurgicales qui peuvent s'installer suite à l'implantation des prothèses [11,45,49].

L'objectif de cette thèse de doctorat a été de créer de nouveaux matériaux céramiques biocompatibles avec des propriétés spécifiques qui permettent le développement de nouvelles applications dans le domaine médical. Ainsi, l'obtention de l'hydroxyapatite dopée avec des ions de zinc et/ou son incorporation dans une matrice de collagène a représenté l'un des principaux objectifs de cette étude. Une attention

spéciale a été accordée à la caractérisation des propriétés physique – chimiques et biologiques de ces matériaux. En plus, dans le cadre de cette thèse, ils sont présentés pour la première fois des études non-destructives par spectroscopie ultrasonore sur les matériaux céramiques en solution et compactes.

La thèse est formée de cinq chapitres, les premiers ayant un caractère général, étant exposées des notions générales sur les biomatériaux et sur les techniques de synthèse et caractérisation utilisées. Dans les derniers quatre chapitres, ils sont présentés les résultats expérimentaux originaux. Le degré de nouveauté de cette thèse consiste dans la méthode de synthèse et la caractérisation des matériaux biocéramiques sur base d'hydroxyapatite pour les possibles applications biomédicales. De même, il est présenté une nouvelle technique non-destructive de caractérisation des matériaux sur base d'hydroxyapatite avec ultrasons. La thèse est structurée comme il suit :

Dans le **1^{er} Chapitre**, ils sont brièvement présentés les propriétés générales des biomatériaux, l'accent étant mis sur les biomatériaux céramiques, spécialement ceux sur base de phosphate de calcium, en particulier étant présentées les principales propriétés de l'hydroxyapatite. Il est mis en évidence de même la motivation pour laquelle il a été choisi le zinc comme matériel dopant de l'hydroxyapatite, comme le collagène come bio-polymère couvrant des nanoparticules d'hydroxyapatite dopée avec zinc. Dans le **2^{ème} chapitre**, il est décrit la méthode de synthèse des matériaux étudiés, et aussi les techniques de caractérisation physique-chimique et ultrasonore utilisées. Le **3^{ème} chapitre** inclut des résultats expérimentaux obtenus suite à la caractérisation physique – chimique et biologique des nanoparticules d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc. Dans le **4^{ème} chapitre**, ils sont présentés les données expérimentales obtenues suite à la caractérisation physique – chimique et biologique des nanoparticules d'hydroxyapatite dopée avec zinc en matrices de collagène. Pour ces études, il a été sélecté une concentration de dopant représentative, étant étudié l'effet du collagène sur les propriétés du matériel.

Le **5^{ème} chapitre** inclut les résultats expérimentaux obtenus suite à la caractérisation ultrasonore des nanoparticules d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc. Dans ce but, ils ont été caractérisés à l'aide des ultrasons des solutions où ils ont été dispersés trois preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc. Les concentrations de zinc des matériaux utilisés ont été choisies comme étant représentatives pour les études effectuées.

À la fin des cinq chapitres, ils sont présentés les **Conclusions générales** qui peuvent être mises en évidence suite aux résultats des études présentées dans le cadre de cette thèse de doctorat.

1^{er} chapitre: Propriétés générales des biomatériaux céramiques

Pendant les dernières décennies, ils ont été enregistrés de progrès importants en ce qui concerne le développement de nouveaux matériaux ou amélioration de la composition et de la microstructure des matériaux déjà existants, pour l'obtention de certains matériaux ayant des propriétés supérieures qui pourraient être utilisés dans des différentes applications biomédicales [50]. L'un des domaines de recherche de la science des matériaux, qui a attiré une attention spéciale, a été celui des matériaux créés pour les applications du domaine médical, spécialement pour les interventions chirurgicales reconstructives.

1.1 Présentation générale des biomatériaux

En grandes lignes, les biomatériaux peuvent être définis comme matériaux synthétiques créés pour accomplir une certaine activité biologique [50-51]. Un bio-matériau peut être décrit comme une combinaison de substances issues des matériaux naturels, inorganiques ou organiques, qui est biocompatible et il se trouve en contact partiel ou total avec l'organisme humain pendant la période de sa guérison. Les biomatériaux peuvent faire partie partiellement ou intégralement d'un dispositif médical créé pour l'effectuation, l'amélioration ou le remplacement d'une fonction naturelle de l'organisme humain [52-53]. Dans l'année 1987, D.F. Williams a défini les biomatériaux comme étant « des matériaux non-viables utilisés dans des dispositifs médicaux, destinés pour interagir avec les systèmes biologiques » [54]. Cette définition a été ultérieurement approuvée par les experts du domaine.

La science des biomatériaux s'adresse à la fois aux processus de diagnostic, et aussi aux méthodes thérapeutiques. En incluant à la fois des renseignements du domaine de la biologie, de la physique, de la chimie, et aussi du domaine de génie et celui médical, la science des biomatériaux doit parcourir certaines étapes pour la facilitation de l'utilisation clinique des biomatériaux. Les plus importantes étapes qui devraient être parcourues pour que les biomatériaux soient intégrés dans les dispositifs médicaux sont (1) conception et création des biomatériaux ; (2) test in vitro ; (3) test in vivo sur les

animaux et puis sur les gens ; (4) l'approbation pour l'utilisation clinique ; (5) la production, le développement et la commercialisation industrielle des biomatériaux [54].

Globalement, tous les biomatériaux sont conçus pour maintenir l'équilibre entre les propriétés mécaniques du tissu remplacé et les effets biochimiques du matériel implanté sur le tissu d'accueil. Dans ce but, il est nécessaire pour que les biomatériaux utilisés possèdent certaines propriétés, telles que la biocompatibilité, l'activité biologique, la résistance mécanique ou la durabilité chimique. En conséquence, pour pouvoir être utilisés cliniquement, les matériaux devraient présenter une combinaison complexe des plusieurs propriétés, les plus importants étant ci-dessus mentionnées.

La différence entre les biomatériaux et autres types de matériaux consiste dans leur habilité de rester au milieu biologique sans léser le tissu d'accueil et sans se détériorer pendant le processus d'implantation [50,55]. Ainsi, pour pouvoir accomplir une certaine fonction biologique, les biomatériaux doivent réunir à la fois les propriétés biologiques du tissu naturel qu'ils le remplacent, et aussi les propriétés spécifiques du matériel utilisé. Du point de vu médical, il est préférable pour qu'un matériel biocompatible perturbe le moins possible le fonctionnement normal de l'organisme humain. En conséquence, la plus importante caractéristique d'un biomatériau est le mode dont le dernier interagit avec le tissu naturel quand il est implanté dans l'organisme humain [50]. La capacité d'un biomatériau implanté de coexister avec le tissu d'accueil sans donner naissance à certaines réactions adverses est connue sous la dénomination de « biocompatibilité », celle-ci représentant « la capacité d'un matériau d'obtenir une réponse adéquate de la part du tissu d'accueil en accomplissant en même temps une application spécifique » [50,56]. Le biomatériau qui pourrait avoir des potentielles applicabilités dans le domaine médical devrait détenir de propriétés spécifiques telles que la compatibilité du point de vu biochimique, non-toxicité, il soit non-irritable, non-allergique et non-cancérigène. En plus, le biomatériau doit être compatible du point de vu biomécanique avec le tissu d'accueil et former un contact bio-adhésif avec le dernier [50].

En tenant compte des facteurs ci-dessus mentionnés, les biomatériaux peuvent être classifiés ainsi [50,57]:

1. Bio-inertes ou bio-tolérables – sont des matériaux biocompatibles, mais qui ne peuvent pas former de liaisons biocompatibles entre le tissu d'accueil et l'implant.
2. Bioactifs – sont des matériaux biocompatibles qui peuvent s'attacher directement des tissus vivants et ils peuvent former des liaisons chimiques et biochimiques pendant les étapes de début de la période immédiatement suivante à l'opération d'implantation.
3. Bio-résorbables – sont des matériaux biocompatibles qui résorbent graduellement, étant remplacés finalement avec de nouveaux tissus in vivo régénérés.

1.2 Biomatériaux céramiques

Les matériaux céramiques sont des sources importantes pour les biomatériaux utilisés dans des différentes applications du génie biomédical. Les matériaux céramiques destinés d'être en contact avec les tissus vivants s'appellent des matériaux biocéramiques. Les études réalisées pendant les 50 dernières années ont conduit à leur développement continu. Les nécessités médicales d'une population de plus en plus âgée ont déterminé la concentration de l'attention des scientifiques du monde entier sur la création de nouveaux matériaux destinés pour l'amélioration de la vie des patients [58]. Les principaux objectifs de l'utilisation des matériaux biocéramiques sont de diminuer la douleur et de ré-établir les fonctions des tissus osseux ou dentaires calcifiés, malades ou détériorés. Les os sont vulnérables aux fractures, en spécial dans le cas des personnes âgées grâce à la perte de la densité et de la résistance osseuse une fois avec l'avancement à l'âge. Cette chose représente un problème majeur spécialement dans le cas des femmes à cause des modifications hormonales survenues après l'installation de la ménopause. L'une des plus grandes provocations de l'orthopédie moderne est celle de remplacer le tissu osseux âgé et détérioré avec un matériel capable à accomplir les fonctions du tissu original et qui, de manière idéale, soit graduellement remplacé avec un nouveau tissu osseux naturel obtenu suite au processus de régénération initié par l'organisme humain [59-60]. En conséquence, l'une des caractéristiques communes de tous les biocéramiques est la réactivité des surfaces. Elle influence la capacité de la formation des liaisons avec le tissu osseux adjacent et contribue à la formation d'un

nouveau tissu osseux. Pendant l'implémentation, ils ont lieu des différentes interactions à l'interface matériel biocéramique / tissu qui détermine des modifications dépendantes de temps des caractéristiques des surfaces des matériaux biocéramiques implantés, et aussi des tissus biologiques adjacents [59,61]. Vu que la durée moyenne de vie des gens est à ce jour supérieure à 80 ans, et les interventions chirurgicales orthopédiques deviennent nécessaires autour de l'âge de 60 ans, il est essentiel pour que les matériaux biocéramiques non-résorbables aient une durée de vie de 20 ans au minimum. Ainsi, l'une des plus importantes réalisations des dernières décennies a été la création des matériaux biocéramiques implantables capables à résister aux plus difficiles conditions, telles que la corrosion, la température ou les charges mécaniques [59,62].

Regardant rétrospective, dans l'évolution des biomatériaux céramiques implantables, nous pouvons distinguer trois générations de matériaux biocéramiques qui ont été développées au cours des derniers 40-50 ans. Les premiers matériaux céramiques avec des propriétés biologiques ont été réalisés autour des années 1960. Parmi ceux-ci les plus représentatifs sont l'oxyde d'aluminium, connu sous le nom d'alumina (Al_2O_3) et l'oxyde de zirconium (ZrO_2). Une autre catégorie de matériaux biocéramiques débute à se développer dans les années 1980 par l'amélioration des propriétés des matériaux existants et le développement d'autres nouveaux qui présentent des interactions bénéfiques avec l'organisme humain. Suite à une demande de plus en plus grande de matériaux biocéramiques, les recherches ont été étendues, en rehausser ainsi la création de certains matériaux avec des propriétés complexes qui ont pu être utilisés pour la régénération des tissus naturels biologiques. Ces matériaux avec des propriétés complexes ont été réalisés par le développement et l'amélioration des propriétés des matériaux biocéramiques déjà existants. Ainsi, les biocéramiques modernes sont des matériaux céramiques complexes biocompatibles, avec des propriétés supérieures, obtenus par l'ajout de certains matériaux mésoporeux, des matériaux hybrides de type organique – inorganique ou substances biologiques actives [58]. Tel qu'on peut observer, dans une moitié de siècle, le domaine des matériaux biocéramique s'est développé dans un rythme alerte, et à ce jour les biocéramiques cliniquement utilisés sont spécialement créés, afin de réparer et régénérer le tissu humain adjacent à la zone affectée.

À ce jour, la médecine moderne utilise des dispositifs implantables qui contiennent des matériaux biocéramiques pour la régénération et la réparation des tissus

vivants affectés par des diverses maladies ou traumatismes. Pour les applications cliniques spécifiques, spécialement à l'orthopédie ou à la stomatologie, les matériaux biocéramiques ont un rôle essentiel [58]. Ils sont utilisés comme éléments composants du système musculaire – squelettique, pour les implants orthopédiques ou dentaires, pour les implants de l'oreille orbitale et médiane, pour les valves cardiaques, et aussi comme couches couvrantes conçues pour améliorer la biocompatibilité des implants métalliques.

Pour l'évaluation biologique des matériaux biocéramiques, il doit être établi leur cytotoxicité, l'irritabilité tissulaire, l'interaction biocéramique – tissu et l'adhésion cellulaire sur la surface du bio-matériel [53,63-65]. Parmi les propriétés caractéristiques des matériaux céramiques, on peut mentionner les suivantes : la température de fusion élevée, la conductivité électrique et thermique basse, ou la dureté relativement élevée. En ce qui concerne les propriétés mécaniques des matériaux céramiques, les dernières présentent à la fois la résistance à la compression élevée et aussi la résistance à l'étirement très diminuée. Plus que ça, on peut considérer que les biocéramiques sont des matériaux rigides, avec des valeurs élevées du module d'Young. Vu qu'ils ne se déforment pas plastique, ces matériaux sont fragiles, en pouvant être considérés même cassables [58]. Grâce au caractère cassable des matériaux biocéramiques, leur capacité d'être utilisés pour des différentes applications médicales a été drastiquement limitée.

1.3 Biocéramiques sur base de phosphate de calcium

Les études existantes jusqu'à ce jour ont montré que les matériaux biocéramiques sur base de phosphate de calcium sont les plus utilisés pour le traitement des défauts et des lésions des tissus biologiques durs. Ce sont les matériaux biocéramiques sur base de phosphate de calcium. Les phosphates de calcium représentent une famille de minéraux formée d'une combinaison d'ions de calcium (Ca^{2+}) et orthophosphates (PO_4^{3-}), métaphosphates ou pyrophosphates ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) [66]. Les phosphates de calcium sont rencontrés à la fois dans les systèmes biologiques et aussi dans la nature, dans l'environnement [50]. Grâce à la similarité chimique avec la composante minérale du tissu humain dure (os et dents), les phosphates de calcium ont été utilisés pour la reconstruction et la réparation des lésions ou des défauts osseux produits suite à certains accidents ou qui ont apparu suite à certaines maladies [67-69].

Le premier implant où il a été utilisé un matériel biocéramique sur base de phosphate de calcium synthétique a été réalisé au début du 20^{ème} siècle, dans l'année 1920, quand il a été testé l'effet stimulateur sur l'ostéogénèse. Le matériel biocéramique sur base de phosphate tricalcique (TCP) a été utilisé pour le traitement de certains défauts osseux créés en préalable à voie chirurgicale aux lapins. Plus tard, après encore une moitié de siècle, les matériaux sur base de phosphate de calcium ont été utilisés dans les diverses recherches réalisées dans le domaine de la chirurgie parodontale [67,70], étant rapportés les premiers résultats de l'implantation de certains cylindres d'hydroxyapatite comme remplaçants des racines des dents [67,71]. Ultérieurement, dans les années 1980, l'utilisation des phosphates de calcium dans les applications cliniques a connu un progrès spécial [67]. À ce jour, ils sont réalisés des études étendues pour l'amélioration des propriétés des matériaux utilisés dans les applications médicales des différents domaines.

Suite aux recherches, on a constaté que certains matériaux biocéramiques sur base de phosphate de calcium peuvent s'intégrer dans l'organisme vivant, étant soumis à un processus d'ostéo-intégration avec le tissu osseux adjacent, processus similaire à celui de ré-modélisation osseuse qui se produit naturellement [61,67]. Ces matériaux possèdent des surfaces adéquates au guidage de la ré-modélisation osseuse et ils dirigent la croissance osseuse par un processus nommé ostéo-conduction. On a pris en compte aussi la possibilité de la création de certains phosphates de calcium avec des propriétés ostéo-inductives, en réussissant ainsi la stimulation de la prolifération des cellules stem mésenchymateuses (CSM) tout au long des ostéoblastes et en facilitant la création d'un nouveau tissu osseux [67,72]. Cette nouvelle propriété des matériaux sur base de phosphates de calcium s'est obtenue par l'intermédiaire de certaines substitutions ioniques spécifiques. En conséquence, les matériaux biocéramiques sur base de phosphate de calcium ont pu être impliqués à la fois dans la médecine régénérative, et aussi au génie tissulaire. Suite à la résistance diminuée à l'usure [67,73], l'applicabilité de ces matériaux s'est limitée au remplissage de petits défauts osseux et à la couverture des prothèses métalliques ou des implants parodontaux [67]. Ainsi, parmi les produits commerciaux sur base de phosphate de calcium utilisés pour la réparation des tissus osseux, pour la croissance osseuse ou pour les reconstructions tissulaire, on peut énumérer les apatites (hydroxyapatite et β -TCP) [74-84].

1.4. Hydroxyapatite

La dénomination « apatite » provient du terme grec « apatit » qui signifie « tromper » et elle est attribuée aux apatites minérales grâce au fait que celles-ci sont souvent confondues avec des diverses pierres précieuses comme le topaze, l'aigue-marine ou l'améthyste [74,85]. Dans ce contexte, les apatites forment une famille de composés avec une structure chimique similaire, qui cristallisent dans le système hexagonal, groupe spatial $P6_3/m$. Des études structurales et des éléments ont montré que les étapes inorganiques des os et des dents sont majoritairement formées de l'hydroxyapatite [74,86]. Suite aux analyses structurales, il a été démontré que les diffractogrammes de l'émail dentaire, de la dentine et des os sont similaires avec celles des apatites minérales. D'autre part, des études des éléments ont démontré que le phosphate et le calcium sont les principaux éléments constituant du tissu [74,86]. La similitude entre le tissu minéral osseux et les apatites minérales à contenu de carbonate de calcium est mise en évidence par les liaisons du carbonate de calcium avec les apatites biologiques [74,87]. Des études complémentaires effectuées pour les apatites minérales, biologiques et synthétiques ont démontré que les apatites biologiques sont des apatites sur base de carbonate [74,88-90]. Du point de vue cristallographique, l'hydroxyapatite appartient au groupe spatial $P6_3/m$, ayant une cellule élémentaire hexagonale avec les paramètres de réseau $a=9.432 \text{ \AA}$ et $c=6.881 \text{ \AA}$ [75,101]. La cellule unité contient dix atomes de calcium (Ca), six groupements de phosphate (PO_4) et deux groupements d'hydroxyle (OH). La représentation schématique de la structure de l'hydroxyapatite est présentée dans la Figure 1.1 [67,91].

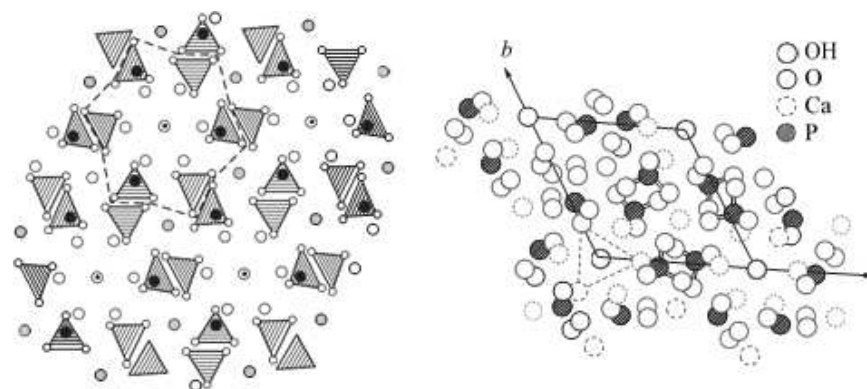


Figure 1.1: Structure de l'hydroxyapatite (gauche) et représentation tout au long de l'axe c (droite) [Images reprises de 103]

Pour que l'hydroxyapatite soit considérée stoechiométrique, le rapport molaire doit être $\text{Ca/P} = 1.67$. Toutes les autres apatites pour lesquelles le rapport molaire $\text{Ca/P} < 1.67$ est déficitaire en calcium [74]. Les apatites stoechiométriques, en particulier l'hydroxyapatite stoechiométrique, peuvent incorporer une grande variété d'ions. Ainsi, on peut incorporer de cations avec le même état d'oxydation comme Ca^{2+} , tels que Sr^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc [67,92-95], et anions avec le même état d'oxydation comme OH^- , tels que F^- ou Cl^- [67,96]. Ces types de substitutions peuvent déterminer de modifications structurelles, en influençant les paramètres de réseau et/ou morphologiques, en produisant ainsi des modifications des propriétés spectrales, de la couleur, et aussi de la solubilité et de la stabilité thermique [74]. Un rôle important dans les modifications produites suite aux substitutions est donné à la fois par la quantité des ions remplaçants, et aussi par leur dimension. En plus, les propriétés biologiques sont fortement influencées par les éléments remplaçants de la structure des apatites [74,97-100].

Une attention spéciale a été accordée au dopage de l'hydroxyapatite avec des différents ions métalliques. Parmi ceux-ci, le zinc a reçu l'intérêt des scientifiques du monde entier grâce aux propriétés eues, et aussi son rôle dans le bon fonctionnement de l'organisme humain. On sait que le zinc (Zn) est un métal de transition essentiel pour le système biologique humain, ayant un rôle catalytique, structurel et régulateur [38]. Le zinc se trouve de l'abondance dans chaque partie de l'organisme, étant surclassé uniquement par le fer en termes de concentration des métaux de transition. Bien qu'il fasse partie de chaque système biologique humain, le zinc est concentré avec prépondérance dans le tissu musculaire (60% de l'entière quantité de zinc) et le tissu osseux (30% de l'entière quantité de zinc). Une quantité significative de zinc est accumulée de même dans la peau (environ 5% de la quantité totale de corps) [38]. On a calculé que l'organisme d'un adulte contient en moyenne 2-3 grammes de zinc [38,101]. De même, le zinc est cofacteur dans plus de 300 enzymes de toutes les 6 classes d'enzymes [38]. Le zinc est de même impliqué dans le métabolisme des protéines, des hydrates de carbone et de lipides [38,102-107]. En plus, on a montré que le zinc est essentiel à l'entretien d'ADN et, respectivement de l'ARN [38]. Physiologiquement, le zinc est essentiel à la croissance et au développement normal de l'organisme humain [38,108-110]. En plus, on a montré que le zinc influence la capacité d'adaptation à

l'obscurité du sens visuel, les fonctions thyroïdiennes, la coagulation sanguine, l'acuité gustative et il contribue au bon-fonctionnement du système immunitaire [38,110]. La déficience de zinc détermine l'apparition et l'installation des plusieurs affections cliniques, parmi lesquelles on énumère le retard d'agrandissement, l'hypogonadisme masculin, la léthargie mentale, des modifications neurosensorielles anormales, la prolongation du processus de guérison des lésions, l'appétit diminué, l'oligospermie, l'anorexie, la perte en poids et une sensibilité augmentée aux infections [38,109,111]. Les études réalisées tout au long des années ont montré que l'absence d'une concentration optimale de zinc peut conduire au déclenchement de nombreuses maladies qu'affectent à la fois les jeunes, et aussi les personnes âgées [38,112-114]. En tenant compte que le zinc a un rôle régulateur local dans les cellules osseuses, ostéoporose et retard d'agrandissement sont certains des plus communes affections dues à la déficience de zinc [38,115]. Parce qu'il est impliqué dans chaque étape du métabolisme osseux, le zinc agit comme un cofacteur à l'activité des ostéoblastes pendant le processus de formation du tissu dur. C'est pourquoi, le zinc est nécessaire pour la maintenance de la densité osseuse optimale et il contribue à la diminution du risque d'apparition de l'ostéopénie et des et des fractures une fois avec l'avancement à l'âge [38]. Le zinc a de même un rôle important à la réglementation des activités cellulaires, en stimulant la synthèse des protéines nécessaires pour la formation de la matrice organique, un exemple étant la production de collagène [38,101,111,116-117]. Le collagène représente environ 90-95% de la matrice osseuse, en formant le cadre structurel autour duquel il a lieu le processus de minéralisation [38].

De la quantité totale de collagène de l'entier organisme humain, 90% représente le principal élément constituant de la partie organique du tissu osseux (collagène de type I). Le reste de 10% se retrouve dans la structure des yeux et des cartilages (collagène de type II), dans la composition de la peau, des muscles et des vaisseaux sanguins (collagène de type III), il forme la couche des épithéliums sécréteurs de la membrane basale (collagène de type IV) ou il se retrouve dans la composition des cheveux, des surfaces des cellules ou du placenta (collagène de type V) [118,119-120]. En conséquence, aux biomatériaux sur base de collagène, on a accordé une attention augmentée pour les différentes utilisations du génie tissulaire et de la médecine régénérative. Grâce à la biocompatibilité augmentée et de l'immunogénicité diminuée, le collagène est la protéine idéale pour l'amélioration des biomatériaux. Les grands

avantages de l'utilisation de collagène consistent dans le fait qu'il peut être extrait des différentes sources tissulaires et il peut former des composants variés par la combinaison avec d'autres molécules [118,120].

1.5. Applications de l'hydroxyapatite

Tel que je l'ai mentionné antérieurement, grâce à la similitude avec composante inorganique du tissu dur humain, l'hydroxyapatite est considérée un matériel adéquat pour différentes applications médicales qu'impliquent la réparation du tissu osseux et dentaire, étant déjà utilisée dans ce but depuis presque 40 ans [121-122]. En plus, les études récentes ont mis en évidence le potentiel de l'hydroxyapatite d'être utilisés comme système de livraison des médicaments, pour la direction des cellules, comme sonde biologique luminescente ou pour le diagnostic. Dans les applications cliniques, les biocéramiques sur base d'HAp peuvent être utilisées à la stomatologie ou orthopédie ou sous la forme d'implants de petites dimensions. De même, ces biocéramiques peuvent être utilisées comme sous-couche temporaire qui favorise la croissance cellulaire et la régénération du tissu osseux dans des régions qui ne sont pas soumis au stress mécanique ou comme matériau recouvrant biocompatible et bioactif des implants métalliques utilisés dans le domaine maxillo-facial et orthopédique [121-123].

On a démontré que les greffes synthétiques sur base d'hydroxyapatite s'intègrent dans l'organisme humain sans être rejetées par le tissu d'accueil et elles facilitent la formation d'un nouveau tissu osseux, en créant des liaisons avec le tissu nouvellement formé. Un tel comportement détermine une meilleure récupération du tissu osseux lésé [121,124]. D'autre part, les nanoparticules d'HAp ont été utilisées à large échelle comme des composants bioactifs dans la fabrication des greffes osseuses [121,125]. L'hydroxyapatite peut être utilisée comme matériel couvrant pour les implants métalliques en facilitant une meilleure adhésion de l'implant de tissu osseux adjacent. Les réponses biologiques d'HAp et aussi l'adhésion et la diffusion ou la prolifération et la différenciation cellulaire dépendent de la porosité et la dimension des micropores, de la forme et la dimension des cristallites, de la cristallinité et les substitutions ioniques [121,126-127]. Un intérêt spécial pour la médecine reconstructive est représenté par la régénération des cartilages. Des études récentes [121-126] ont démontré que les nanocristaux d'hydroxyapatite forment une composante bioactive importante, en facilitant la

régénération des cartilages. L'incorporation des nanoparticules d'HAp dans l'organisme humain stimule l'adhésion et la prolifération des chondrocytes, en augmentant ainsi la capacité de régénération des cartilages [121,128-129].

En conclusion, on peut dire que l'hydroxyapatite joue un rôle important dans le développement de nouveaux matériaux à large applicabilité dans des différents domaines, comme le génie tissulaire réparateur, systèmes de livraison des substances médicamenteuses, des gènes ou des protéines, en chromatographie, imagerie et diagnostic [121]. L'amélioration des propriétés de l'hydroxyapatite est un domaine d'intérêt majeur pour les scientifiques du monde entier. À ce jour, tout travail scientifique sur ce thème représente un bénéfice apporté aux communautés médicales et scientifiques internationales.

Suite aux propriétés majeures dans le cadre du tissu osseux humain et de la contribution essentielle au bon fonctionnement de l'entier organisme, le zinc et le collagène ont été choisis pour évaluer le mode dont ceux-ci peuvent contribuer à l'amélioration des propriétés spécifiques de l'hydroxyapatite. Dans le cadre de cette thèse, il a été étudié l'influence de la concentration de zinc de la structure de l'hydroxyapatite sur les propriétés physique-chimiques et biologiques. D'autre part, on a suivi la réalisation d'un nouveau composé par l'incorporation de l'hydroxyapatite dopée avec zinc dans une matrice polymérique de collagène. En plus, ils seront présentés les résultats obtenus suite à l'étude des propriétés physique – chimiques, ultrasonores et biologiques de l'hydroxyapatite et de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avant et après l'incorporation dans une matrice de collagène. Des études non-destructives par spectroscopie ultrasonore sur les matériaux céramiques dans la solution et compactes seront, de même, présentés.

2^{ème} chapitre: Méthodes de synthèse et techniques de caractérisation des biomatériaux céramiques

Parce que l'hydroxyapatite est un matériel d'importance majeure dans des différentes applications du domaine médical, une attention spéciale a été et est accordée au développement de certaines méthodes de synthèse versatiles et économiques [130].

De même, une importance spéciale est accordée à la caractérisation de l'hydroxyapatite du point de vue physique – chimique et aussi biologique. En plus, de nouvelles techniques d'investigation sont adaptées afin d'obtenir des renseignements supplémentaires qui peuvent contribuer au développement de certains nouveaux domaines d'applicabilité. Dans le cadre de cette étude, ils ont été utilisés de techniques de caractérisation structurale, morphologique, optique, d'éléments et de porosité. De même, dans le cadre de cette thèse de doctorat, il a été utilisé une méthode innovante de caractérisation non-destructive de l'hydroxyapatite par l'intermédiaire des ultrasons.

2.1. Synthèse et caractérisation structurale et morphologique des biomatériaux céramiques

2.1.1 Synthèse par co-précipitation

La méthode de co-précipitation a été choisie parce qu'elle est efficace du point de vue économique et elle permet un bon contrôle des paramètres pendant le processus de synthèse. Un autre avantage de cette méthode de synthèse est donné par la quantité substantielle de matériel qui peut être obtenue suite à une seule préparation à un coût raisonnable [130-131].

Dans le cadre de ce travail, à la fois les preuves d'hydroxyapatite simple (HAp) et aussi celles d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HApZn) ont été obtenues par une méthode adaptée de co-précipitation.

Pour l'hydroxyapatite non-dopée (HAp, $x_{Zn}=0$) ils ont été utilisés comme précurseurs l'ammonium hydrogène phosphate $[(NH_4)_2H_2PO_4]$ et le nitrate de calcium tétra-hydrate

[Ca(NO₃)₂·4H₂O], en conservant le rapport molaire entre le calcium et le phosphore Ca/P=1.67 [19]

Pour l'hydroxyapatite dopée avec zinc (HApZn, Ca_{10-x}Zn_x(PO₄)₆(OH)₂, unde $0.01 \leq x_{Zn} \leq 0.3$) ils ont été utilisés comme précurseurs l'ammonium hydrogène phosphate [(NH₄)₂HPO₄], le nitrate de calcium tétra-hydrate [Ca(NO₃)₂·4H₂O] et le nitrate de zinc hexa-hydrate [Zn(NO₃)₆ · 6H₂O]. Les solutions aqueuses dans le cadre des synthèses ont eu de rapports ioniques Zn:(Zn+Ca) différents, ainsi que le rapport, (Ca+Zn)/P a été conservé à une valeur constante de 1.67 [132].

Pour les preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc englobées dans la matrice de collagène, on a utilisé un gel formé des fibrilles de collagène de type I (Col) avec une concentration de 2.11% (w/w) de provenance bovine, extrait suite à certains traitements acides et alcalines [11,133].

En même temps, pour l'obtention des preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc englobées dans une matrice de collagène, les poudres de Zn:HAp ont été ajoutées sur le gel de collagène (HApZn10-CBc), en s'obtenant des preuves avec les rapports suivants : 0:1 (référence de collagène), 4:1 (HApZn10-CBc_4), 1:1 (HApZn10-CBc_1) et 1:0 (référence HApZn10) [11].

2.1.2 Caractérisation

Diffraction de rayonnements X

Les mesures de diffraction avec rayonnements X ont été effectuées à l'aide d'un diffractomètre Bruker D8 Advance. Pour une analyse complexe DRX des nano-poudres étudiées, les diffractogrammes ont été traités à l'aide du programme MAUD [21] en utilisant le raffinement Rietveld et « les règles POPA ». Suite à cette analyse détaillée, on a pu déterminer la structure, les paramètres de réseau et la dimension moyenne des cristallites.

Microscopie électronique de balayage (MEB)

La morphologie des preuves obtenues a été analysée par microscopie électronique de balayage (MEB). De même, l'analyse d'éléments a été réalisée par l'analyse EDAX. Dans le cadre de ce travail, les micrographies MEB ont été effectuées

à l'aide d'un microscope Quanta Inspect F doté avec un dispositif EDAX/2001 utilisé pour l'analyse d'éléments.

Microscopie électronique en transmission (MET)

La microscopie électronique en transmission a été utilisée afin de déterminer la distribution de dimensions des nanoparticules, et aussi afin de mettre en évidence leur forme. Dans ce travail, pour l'effectuation des études MET des preuves obtenues, il a été utilisé un microscope 120 keV de FEI. La diffraction d'électrons sur Surface Sélectionnée (SAED) a été utilisée pour la mise en évidence de la structure des preuves (ils ont pu être déterminés des paramètres cristallographiques)

Spectroscopie à photoélectrons de rayonnements X (XPS)

Dans le cadre de cette thèse de doctorat, les mesures de spectroscopie à photoélectrons de rayonnements X (XPS) ont été effectuées avec un Système d'analyse des surfaces Multimethod SPECS [132].

Analyse thermogravimétrique (TGA) et thermo-différentielle (DTA)

Les études d'analyse thermique différentielle (DTA) et celles d'analyse thermique gravimétrique (TGA) ont été effectuées pour l'évaluation du comportement thermique des preuves investiguées. Pour cette chose, il a été utilisé un analyseur Shimadzu DTG-TA-50 et DTA 50. L'intervalle de températures étudié a été 30°C-1200°C.

Spectroscopie en infrarouge avec transformée Fourier (FTIR)

Les groupements fonctionnels présents dans la structure des preuves investiguées ont été par l'intermédiaire des mesures spectroscopiques FTIR, en utilisant un spectromètre Spectrum BX de Perkin Elmer.

Spectroscopie Raman

Dans le cadre de cette thèse, les spectres Raman ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Raman dispersif type RenishawInVia (2012) [28].

Adsorption – Désorption de gaz (BET)

Des études d'adsorption / désorption de gaz ont été réalisées dans la présence N₂ à une température de 77K à l'aide d'un instrument ASAP 2020. Pour la détermination de la surface spécifique des preuves, on a utilisé les méthodes Bräuauer-Emmett-Teller

(BET), Langmuir et t-plot. Le volume des pores et leur diamètre ont été calculés par le modèle Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [21].

2.3. Caractérisation ultrasonore des biomatériaux céramiques

2.3.1 Caractérisation ultrasonore des solutions

Les équipements qui sont utilisés aux déterminations expérimentales sont groupés comme il suit :

- a. Le récipient thermo-contrôlé (réalisé à S.C. Nuclear NDT Research & Services) est formé des deux structures: (1) le récipient d'acier inoxydable à couvercle de plexiglas par lequel il passe le transducteur ultrasonique d'immersion, sonde de température, axe de l'hélice d'homogénéisation agi par le moteur fixé sur le couvercle et spirale de chauffage du liquide ; (2) Le bloc électronique de mesure et de contrôle de la température, qu'affiche la température avec erreur de 0,1 °C et commande après un programme adaptatif le chauffage en récipient, afin de maintenir une température constante du liquide du vaisseau d'acier inoxydable, ou la croissance après une fonction de temps donnée. Le même bloc de commande agi aussi l'hélice d'homogénéisation de la température.
- b. L'appareil puser-receiver (réalisé au laboratoire LAUM – Université du Havre - France). Il fonctionne dans ce travail, en régime de pulser-receiver sur un seul transducteur qu'accomplit les deux rôles. L'appareil émet un pouls bref (signal Dirac) d'haute tension (300 V). Le transducteur produit un signal de résonance et puis il réceptionne les échos du liquide mesuré. L'appareil amplifie ces signaux (amplification réglable jusqu'à 100 dB) et il les applique à la borne de sortie, qui est lié à l'entrée de l'oscilloscope. L'appareil a encore une sortie « trigger-out » qui est utilisée pour la synchronisation de l'oscilloscope par l'entrée « Aux » de celui –ci.
- c. Transducteur ultrasonore. Il a été choisi le modèle H5K (produit par General-Electric, Krautkramer), avec la fréquence centrale 5MHz et un très court pouls. Le transducteur est couplé à la borne 1 de l'appareil pulser – receiver.
- d. L'oscilloscope Tektronix DPO 4014B (produit par Tektronix) est utilisé pour l'affichage et le stockage des signaux de pulser – receiver. Le stockage se réalise sur stick de mémoire sous forme de fichiers de texte.

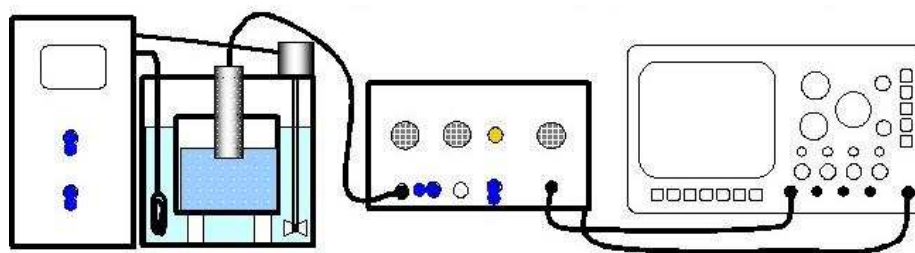


Figure 2.1: *Croquis d'interconnexion des appareils utilisés [134]*

2.4. Caractérisation biologique des biomatériaux céramiques

2.4.1 Viabilité des cellules endothéliales sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec différentes concentrations de zinc

Cultures de cellules

Le matériel biologique utilisé a été représenté par des cellules endothéliales humaines, la ligne EAhy 926 (Edgell C, 1983) augmentées dans le milieu de culture DMEM avec 4,5 % glucose où il a été ajouté 10% sérum fœtal bovin et 2% mélange antibiotique (pénicilline, néomycine et streptomycine). Les cellules endothéliales ($0,85 \times 10^5$ cellules/ml) ont été augmentées 72 heures à 37°C et 5% CO₂ sur supports d'hydroxyapatite (HAp) en contenant des différentes concentrations de Zn (1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 20%, 30%).

Viabilité cellulaire

Les cellules vivantes se distinguent par la présence de l'estérase intracellulaire, déterminée par la conversion enzymatique de la calcéine AM non fluorescente en calcéine intense fluorescente. Le colorant polyanionique – la calcéine est bien retenus dans les cellules vivantes, en produisant une fluorescence verte intense, uniforme dans les cellules vivantes (excitation / émission : 485nm/530nm). Les cellules mortes ont été mises en évidence par coloration avec ethidium homodimer (EthD-1).

2.4.2 Viabilité des cellules HepG2 sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc

Cultures cellulaires

Les tests de croissance cellulaire des cellules HepG2 ont été réalisés conformément à la méthode antérieurement décrite dans la littérature [135] avec les modifications suivantes : les cellules HepG2 ont été augmentées dans un Environnement Minimal Essential (Minimal Essential Medium - MEM) amélioré avec 10% v/v sérum bovin fœtal (FBS), 20 mM L-glutamine, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ stréptomycine et 100 U mL^{-1} pénicilline [132].

Viabilité cellulaire

Pour les tests de viabilité cellulaire, ils ont été semés 3.10^5 cellules HepG2 dans chaque godet d'une plaque avec 12 godets. La viabilité cellulaire a été déterminée par la numération des cellules colorées avec Bleu Trypan à l'aide d'un Compteur Cellulaire Automatique TC20 (BioRad) [132]. Les différents composants HApZn ont été solubilisés à l'eau jusqu'au moment quand ils sont arrivés à une concentration finale de 10 mg/ml.

2.4.3 Viabilité des cellules HeLa sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec Zn dans la matrice de collagène

Étude de la cyto-toxicité

Pour l'effectuation des expériences, ils ont été utilisés des cellules HeLa. Les cellules ont été développées en DMEM:F12 (Invitrogen, NY, USA) complété avec 10% sérum bovin thermiquement inactif et pénicilline/streptomycine à 37°C avec 5% CO_2 . La morphologie des cellules a été étudiée avec un microscope avec fluorescence. Brièvement, les cellules ont été fixées dans une solution avec 70% éthanol, colorées avec 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iodure de propidium et étudiées avec un microscope Leica DFC450 [11]. La cyto-toxicité a été établie en utilisant la couleur bleue Trypan suite au traitement avec 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ composant pendant 24 heures [11].

Distribution du cycle cellulaire

3×10^5 cellules ont été déposées dans chaque des 6 godets et elles ont été traitées pendant 72 heures avec une quantité de matériel de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Après la période de traitement, les cellules ont été récoltées d'une sous-couche et colorées avec iodure de

propidium, l'acquisition a été réalisée à l'aide d'un cytomètre de flux Epics Beckman Coulter. Les données ont été analysées à l'aide d'un programme Ploidy et elles ont été exprimées comme fractions de cellules dans des différentes étapes du cycle [11].

2.4.4 Études antimicrobiennes sur Escherichia coli

Le test quantitatif de la concentration inhibitrice minimale (MIC, $\mu\text{g/mL}$) s'est basé sur dilutions séries doubles effectuées en plaques avec 96 godets. Les plaques ont été incubées pendant 12 heures à une température de 30 °C sous agitation constante de 45 rpm dans un lecteur de plaques Tecan, l'absorbance à 600 nm étant mesurée à chaque 15 minutes [28,132].

2.4.5 Évaluation qualitative de la sensibilité des différentes souches microbiennes par rapport aux nanoparticules avec potentielle action antimicrobienne

Pour l'évaluation qualitative des propriétés antimicrobiennes des preuves Collagène, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1, on a utilisé une méthode diffusimétrique adaptée. L'effet bactéricide du composant (inhibition de la croissance bactérienne) a été quantifié par l'apparition d'une zone d'inhibition (zone claire) autour du spot [136].

3^{ème} Chapitre: Caractérisation physique-chimique et biologique de l'hydroxyapatite dopée avec zinc

Dans le cadre de ce chapitre, ils sont présentés les résultats obtenus suite à la caractérisation physique – chimique et biologique des nano-poudres sur base d'hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc. Dans le Tableau 3.1 ils sont présentés les dénominations des preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc selon la concentration de zinc présente dans chaque preuve.

Tableau 3.1: Dénominations des preuves étudiées

Preuve	Concentration de zinc De la preuve
HAp	$x_{Zn}=0$
HApZn1	$x_{Zn}=0.01$
HApZn3	$x_{Zn}=0.03$
HApZn5	$x_{Zn}=0.05$
HApZn7	$x_{Zn}=0.07$
HApZn10	$x_{Zn}=0.1$
HApZn20	$x_{Zn}=0.2$
HApZn30	$x_{Zn}=0.3$

L'influence du zinc sur la structure et la morphologie de l'hydroxyapatite a été étudiée selon les différentes concentrations de zinc.

Les propriétés structurales des matériaux obtenus ont été évalués par Diffraction de Rayonnements X (DRX), Microscopie Électronique de Balayage (MEB), Microscopie Électronique dans la Transmission (MET) et Analyse Thermique (TG-DTA). Des informations sur la morphologie des particules ont été obtenues suite aux investigations MEB et MET, En plus, les propriétés optiques des matériaux obtenus ont été étudiées par Spectroscopie en Infrarouge avec Transformé Fourier (FTIR), Spectroscopie Raman et Spectroscopie avec photoélectrons de Rayonnements X (XPS). L'analyse d'éléments a été réalisée par XPS et Spectroscopie d'Énergie Dispersive de Rayonnements X (EDAX). En plus, dans le cadre de cette thèse, ils ont été réalisés des études de porosité des matériaux obtenus. Les études de porosité ont été effectuées par la technique d'adsorption – désorption d'azote. Pour l'évaluation de la porosité, de la

dimension et du volume de pores, et aussi de la surface spécifique, ils ont été utilisés les méthodes BET (Brunauer–Emmett–Teller), Freundlich, t-Plot et BJH (Barrett-Joyner-Halenda). En plus, l'effet de la concentration de zinc sur l'hydroxyapatite a été évalué par des études biologiques, telles que la viabilité cellulaire et études antimicrobiennes.

3.1. Caractérisation physique – chimique des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc

3.1.1 Diffraction de rayons X (DRX)

Les diffractogrammes des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) sont présentés dans les Figures 3.1-3.3. Les résultats de la diffraction de rayonnements X obtenus pour toutes les 8 preuves (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) mettent en évidence la présence des maximales associées à l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) hexagonale qu'appartient au groupe spatial $P6_3/m$, en conformité avec la fiche ICDD-PDF No. 9-432. Les données expérimentales sont marquées en bleu, et les données calculées sont représentées par une ligne de couleur grise. Les lignes verticales représentent les positions des lignes de diffraction de l'hydroxyapatite hexagonale. La ligne grise d'en bas de la figure représente le profil de la différence entre les données expérimentales et celles calculées en utilisant la méthode Rietveld.

Les valeurs calculées des paramètres de réseau « a » et « c » ont baissées quand la concentration de Zn des preuves a augmenté. D'autre partie, une fois avec la croissance de la concentration de Zn, on a observé que la dimension moyenne des cristallites a baissé de 23.1879 nm (HAp) à 4.7546 nm (HApZn30). La diminution de la dimension des cristallites une fois avec la concentration de Zn des preuves justifie l'élargissement des maximales de diffraction observée. Les résultats présentés dans cette étude sont logiques et en accord avec ceux antérieurement présenté par E.S. Thain et al. [137], en tenant compte que le rayonnement ionique de Zn^{2+} (0,074 nm) est plus petit en dimension que celui de Ca^{2+} (0,099 nm).

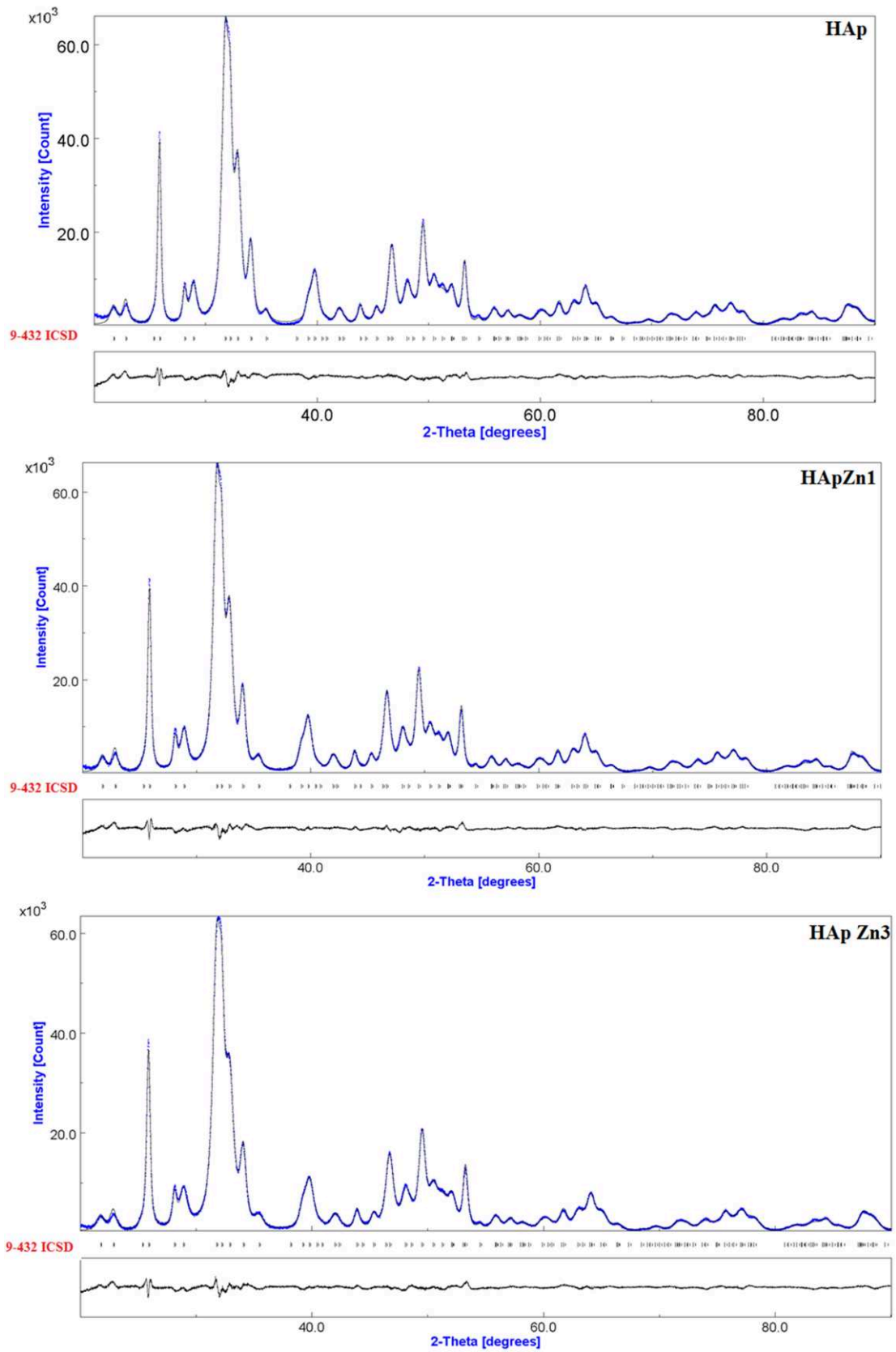


Figure 3.1: Traitement Rietveld des preuves HAp, HApZn1 et HApZn3.

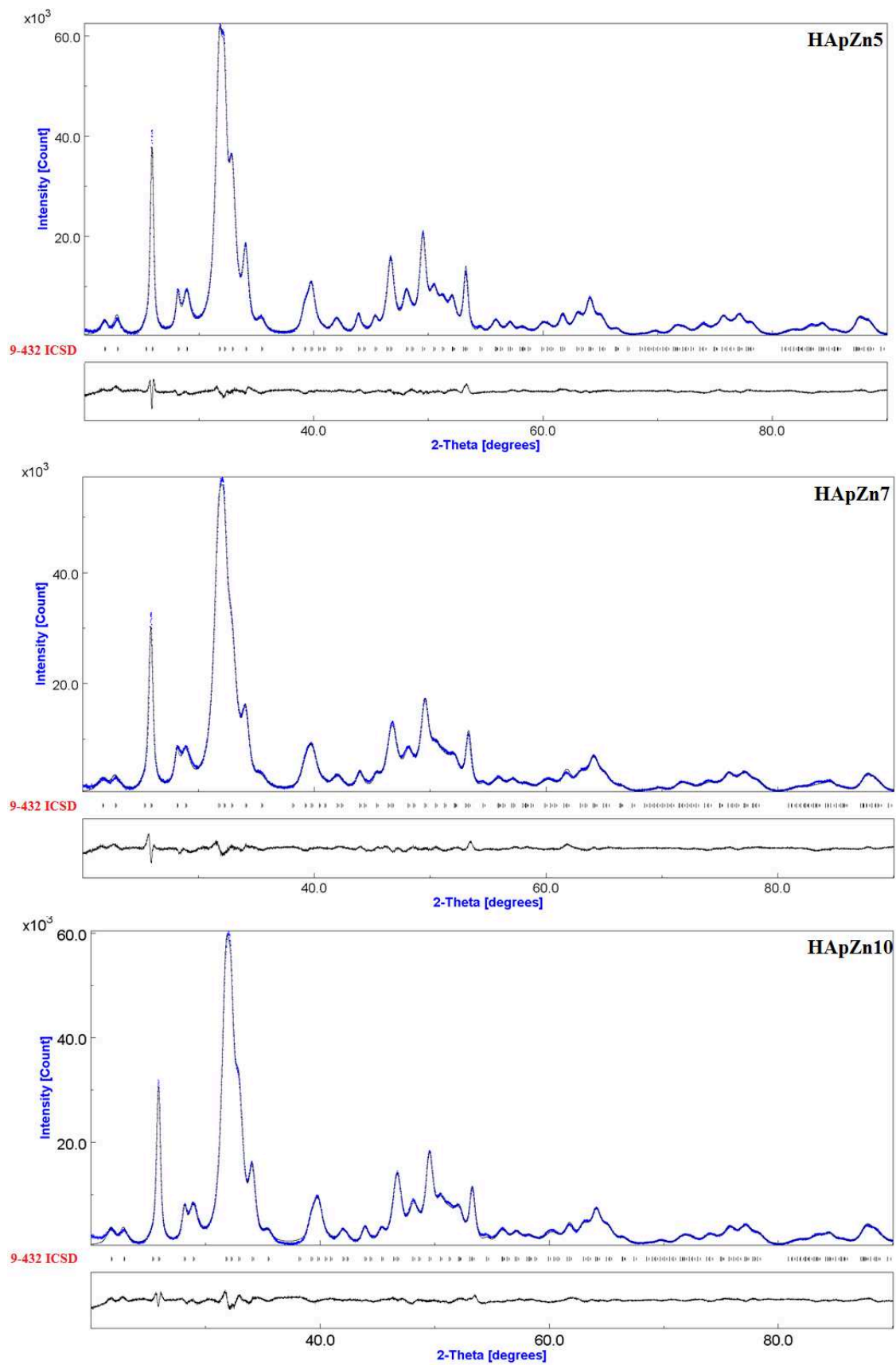


Figure 3.2: Traitement Rietveld des preuves HApZn5, HApZn7 et HApZn10.

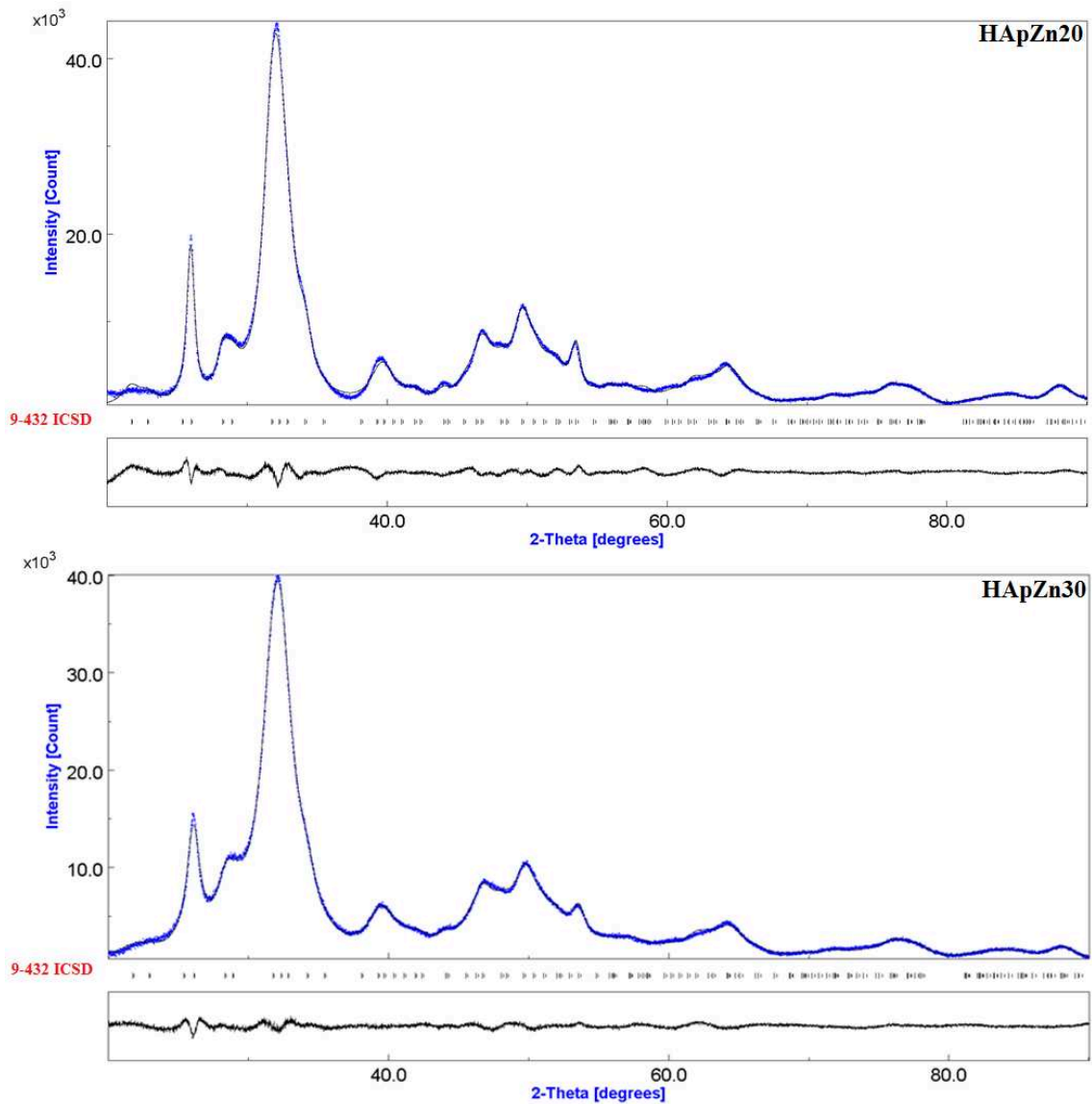


Figure 3.3: Traitement Rietveld des preuves HApZn20 et HApZn30.

Dans chaque diffractogramme obtenue pour les preuves d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc, il a été identifié uniquement la phase hexagonale avec les paramètres de réseau caractéristiques à l'hydroxyapatite (Tableau 3.2). La dimension moyenne des cristallites a baissé une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves (Tableau 3.2).

À la fois les paramètres de réseau des preuves d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) et aussi les facteurs R [138] ont été déterminés en utilisant la méthode Rietveld pour le traitement des données DRX collectées dans

l'intervalle 2 θ 20-80° et en utilisant le programme MAUD (Material Analysis Using Diffraction) [139] par l'application de la théorie Popa pour l'analyse de la microstructure anisotrope [140], implémentée dans le code du programme MAUD comme "règle Popa".

Tableau 3.2: Les constants de réseau calculées, les écarts survenus dans le cas des preuves Zn:HAp et les dimensions moyennes de cristallites mesurées parallèle et *perpendiculaire par rapport à l'axe c pour les différentes valeurs x_{Zn}*.

Preuve	Paramètres de réseau		Dimensions des cristallites (Å)	x _{Zn}
	a = b/écart (Å)	c/écart (Å)		
ICDD-PDF#9-432	9.418	6.8838/0.001		
HAp	9.4320/0.001	6.8828/0.001	231.879 ± 1.000	0
HApZn1	9.4325/0.001	6.8818/0.001	230.797 ± 1.000	0.01
HApZn3	9.4348/0.001	6.8808/0.002	224.182 ± 1.000	0.03
HApZn5	9.4365/0.001	6.8838/0.001	201.651 ± 1.000	0.05
HApZn7	9.4298	6.8806/0.001	193.858 ± 1.000	0.07
HApZn20	9.4287	6.8736/0.001	99.671 ± 1.000	0.2
HApZn30	9.4273	6.8718/0.001	47.546 ± 1.000	0.3

Il a résulté que chaque preuve est constituée des nano-cristallites allongées qui peuvent être approximées par un ellipsoïde circulaire, avec la dimension plus longue parallèle avec l'axe cristallographique « c » d'HAp. Les valeurs obtenues pour les facteurs R finaux (R_{wp} , R_{exp} et R_{Bragg}) [141] suite au traitement des preuves HApZn (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) en utilisant la méthode Rietveld sont présentées dans le Tableau 3.3.

Tableau 3.3: Valeurs obtenues pour les facteurs R finaux (R_{wp} , R_{exp} et R_{Bragg}).

Preuve	R_{wp} (%)	R_{exp} (%)	R_{Bragg} (%)
HAp	2.4120636	0.9340562	1.8473682
HApZn1	2.262112	0.9263251	1.8062721
HApZn3	2.2435231	0.92514825	1.7426357
HApZn5	2.2953548	0.9202162	1.731587
HApZn7	2.329898	0.9187892	1.7531348
HApZn10	2.1904957	0.9283141	1.7085351
HApZn20	2.22002	0.9004986	1.7693205
HApZn30	1.5515361	0.8810307	1.2327117

3.1.2 Microscopie électronique de balayage (MEB)

La morphologie et la composition des éléments des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc a été investiguée par l'intermédiaire de la microscopie électronique de balayage (MEB) et de la spectroscopie d'énergie dispersive de rayonnements X (EDAX).

Dans la Figure 3.4, ils sont présentés les micrographies MEB des poudres HAp, HApZn3, HApZn5, HApZn10, HApZn20 et HApZn30. Les preuves étudiées ont permis la mise en évidence de l'influence de la concentration de zinc sur la morphologie des nanoparticules. Dans les six images MEB présentées, on peut observer que les poudres sont formées des particules à l'échelle nanométrique allongées qui ont la tendance de former des agglomérations une fois avec la diminution de leur dimension. De même, on peut remarquer le fait que le dimensionnement des nanoparticules baisse une fois avec la croissance de la concentration de zinc, en empêchant ainsi l'observation claire des nanoparticules. Ainsi, pour la poudre avec la concentration la plus grande de zinc (HApZn30) (Figure 3.4 b), ils ont été observés des nanoparticules avec des dimensions extrêmement réduites qui ont la tendance de s'agglomérer.

L'analyse des éléments des preuves HAp, HApZn3, HApZn5, HApZn10, HApZn20 et HApZn30 est présentée dans la Figure 3.5. Dans le cas de la preuve HAp (hydroxyapatite pure, $x_{Zn}=0$), on peut observer que les principaux éléments constitutifs sont l'oxygène (O), le phosphore (P) et le calcium (Ca). La présence du zinc (Zn) a été observée dans le cas des preuves HApZn3, HApZn5, HApZn10, HApZn20 et HApZn30. De même, les spectres EDAX ont mis en évidence la croissance de la concentration de zinc, en se remarquant une croissance de l'intensité des maximales associées une fois avec sa croissance. En plus, les spectres EDAX relèvent le fait qu'aucune preuve ne contient d'autres éléments ou impuretés.

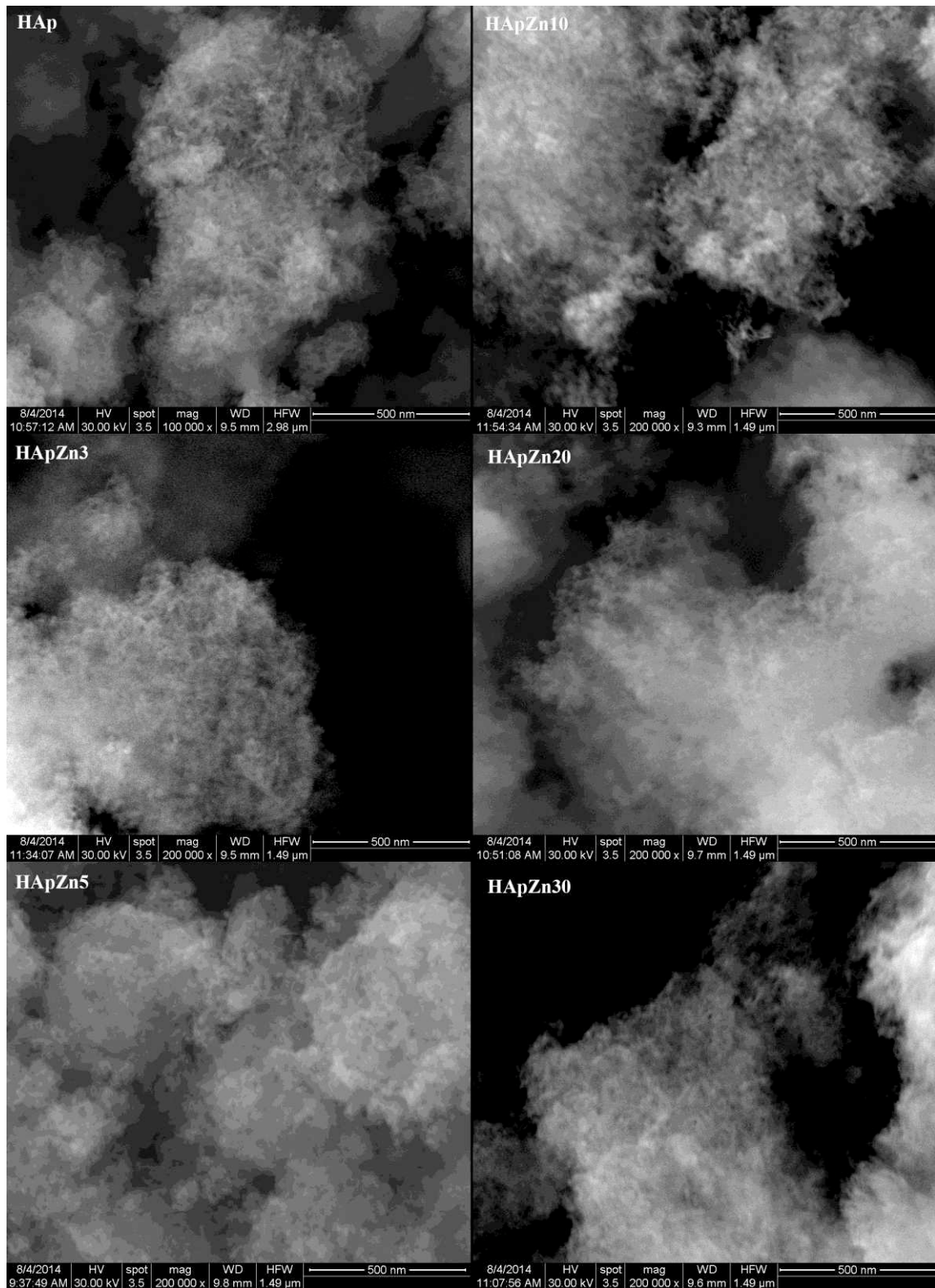


Figure 3.4: Micrographies MEB des poudres HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

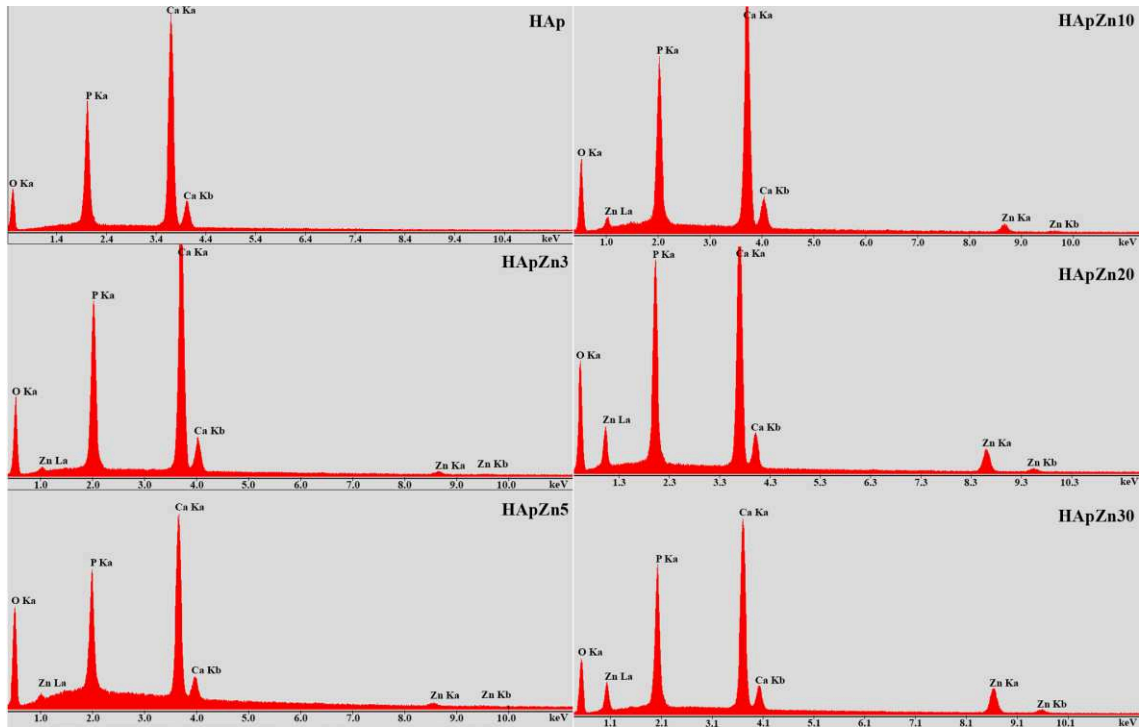


Figure 3.5: Spectres EDAX des poudres HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

Les cartographies des éléments réalisés sur les preuves qui font l'objet de cette étude ont permis l'observation de la distribution des éléments constituant. Dans la Figure 3.6, ils sont présentés les cartographies des deux preuves représentatives (HApZn5 et HApZn30). Ils ont été choisis ces preuves pour mettre en évidence la distribution des éléments constituant une fois avec la croissance de la concentration de zinc. On peut observer que les éléments constituant de chaque preuve analysée sont uniformément distribués. Une croissance de la quantité de zinc a été observée dans le cas des preuves HApZn5 et HApZn30. En plus, on peut remarquer une diminution de la quantité de calcium au fur et à mesure que la quantité de zinc a augmenté.

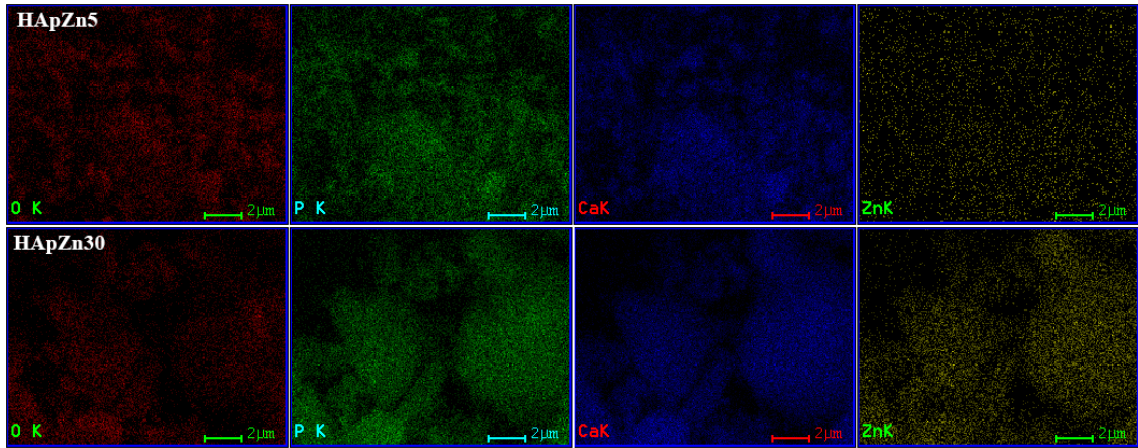


Figure 3.6: Cartographie des éléments de la poudre de HApZn5 et HApZn30

3.1.3 Microscopie électronique en transmission (MET)

Pour obtenir des informations sur la structure, la dimension et la forme des particules des preuves investiguées (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30), on a effectué des études de microscopie électronique en transmission (MET). Les micrographies MET obtenues pour les poudres analysées sont présentées dans la Figure 3.7. Elles ont montré que toutes les poudres analysées sont formées des particules à l'échelle nanométrique légèrement elliptiques. Suite à l'énumération de plus de 500 nanoparticules, pour chaque preuve, on a réalisé la distribution de dimensions (Figure 3.8). On a remarqué que la dimension des particules a baissé une fois avec la croissance de la concentration de zinc de 25 nm ($x_{Zn}=0$) à 16 nm ($x_{Zn}=30$). Suite aux dimensions très petites des nanoparticules, on a observé une tendance d'agglomération. Les résultats obtenus suite à ces investigations ont confirmé les résultats des études MEB. Les deux méthodes de caractérisation ont montré que la dimension des particules baisse quand la concentration de zinc augmente.

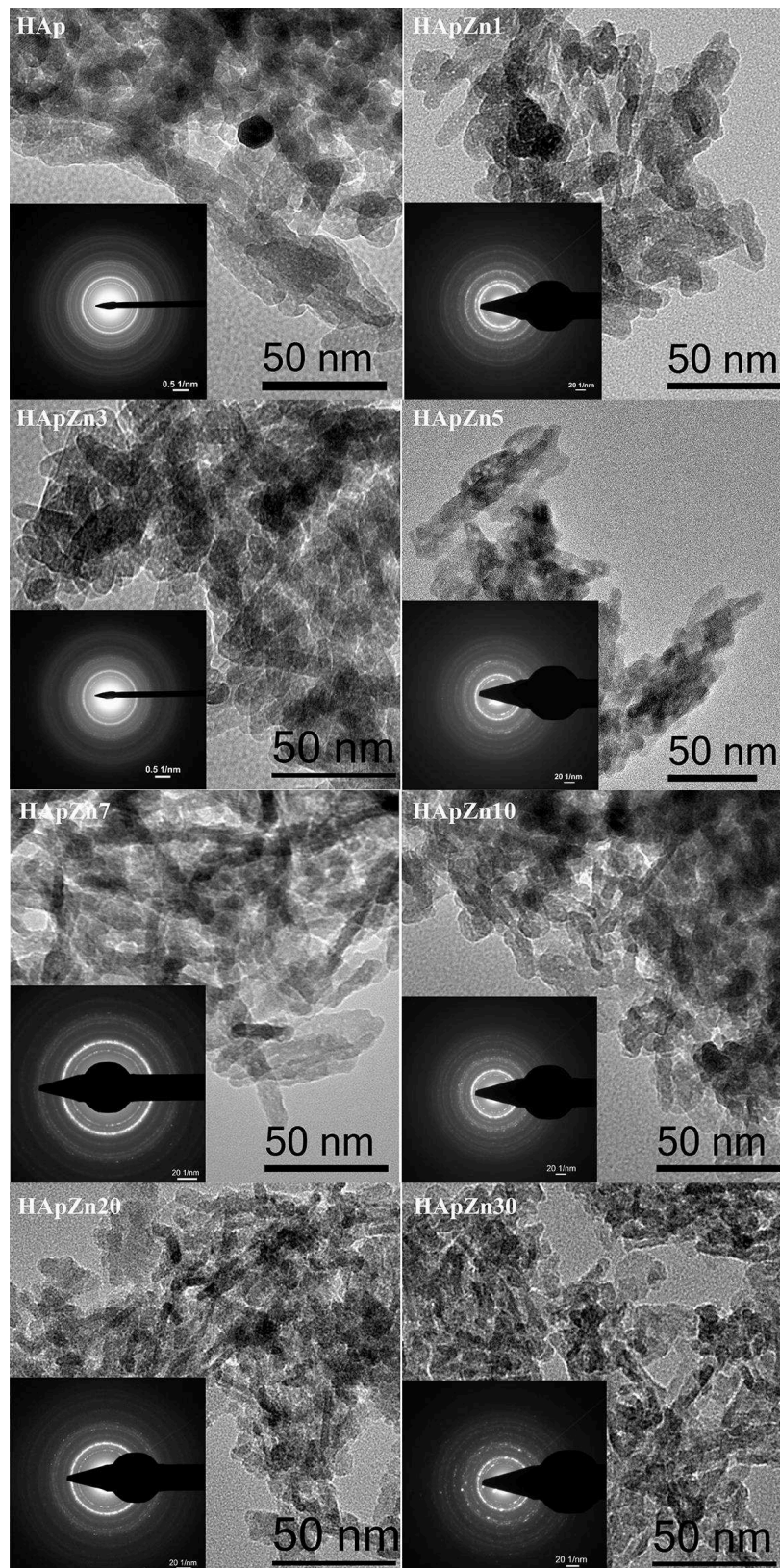


Figure 3.7: Micrographies MET obtenues pour les poudres HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30, une fois avec les images SAED insérées au coin inférieur gauche de chaque micrographie

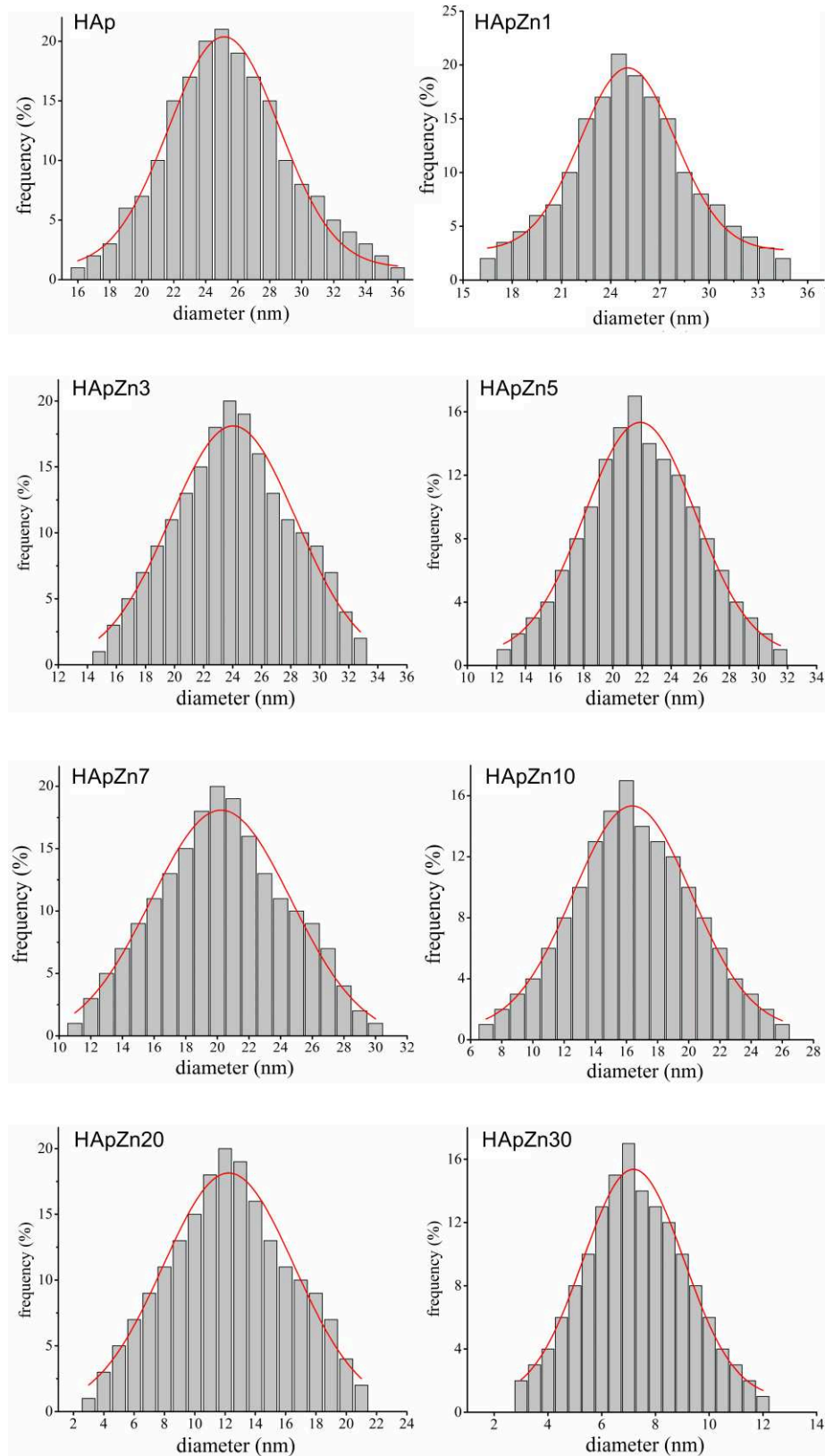


Figure 3.8: Distributions de dimensions des poudres HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

3.1.4 Analyse thermique (TGA-DTA)

Par l'intermédiaire de l'analyse thermique on a pu investiguer les modifications physique-chimiques qui ont lieu sous l'action imposée par la variation de la température. Ainsi, on a pu observer la stabilité des preuves d'hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7 et HApZn20) et étudier les effets qu'accompagnent les différentes transformations qui ont lieu pendant le traitement thermique.

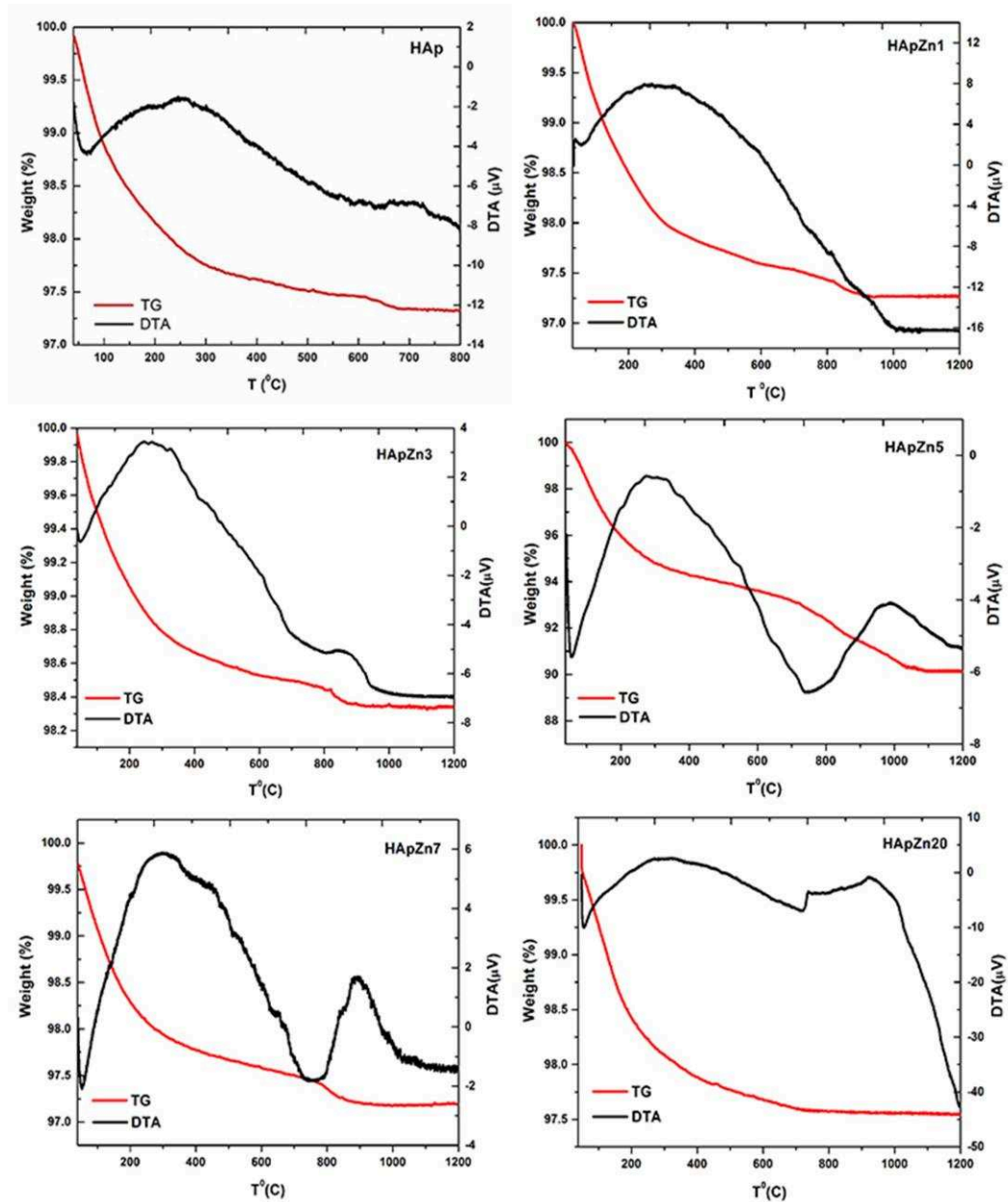


Figure 3.9: Les courbes TGA et DTA des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7 et HApZn20

La courbe d'analyse thermogravimétrique (TGA) a permis la mesure des changements de masse des preuves selon la température dans l'intervalle 30-1200°C (en air statique avec un taux linéaire de chauffage de 10°C/min). D'autre part, l'analyse thermique différentielle (DTA) nous a permis l'obtention de certains renseignements importants sur les processus exothermiques ou endothermiques des preuves analysées. Les courbes TGA et DTA caractéristiques aux preuves étudiées obtenues suite à l'analyse thermogravimétrique et à l'analyse thermique différentielle sont présentées dans la Figure 3.9. Les températures maximales du processus (maximales exothermiques) ont été déterminées suite à l'analyse de la courbe DTA.

Suite aux analyses thermiques effectuées pour les preuves d'hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7 et HApZn20), on a observé qu'une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves, la première perte de masse a lieu dans un intervalle de température de plus en plus augmentée. De même, la température maximale enregistrée sur les courbes DTA (maximales exothermiques) se déplace une fois avec la croissance de la concentration de zinc. Ainsi, on peut observer qu'il s'est déplacé de 241°C (HAp) à 384°C (HApZn20).

Dans le cas de toutes les preuves analysées, le premier maximal exothermique observé correspond à la déshydratation et la perte des molécules d'eau physiquement adsorbées par la poudre d'hydroxyapatite [142].

En plus, la mise en évidence d'une seule perte de masse jusqu'au tour de la valeur de 700-800 °C suggère la formation de l'hydroxyapatite bien cristallisée [143]. Les études d'analyse thermique confirment ainsi les résultats obtenus suite au traitement des données de diffraction de rayonnements X, qui ont mis en évidence une seule phase cristalline qu'appartient à l'hydroxyapatite hexagonale dans le cas de toutes les preuves analysées.

3.1.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La composition des preuves investiguées a été étudiée par l'intermédiaire des mesures FTIR. Une attention spéciale a été accordée aux régions spectrales 450-700 cm⁻¹ et 900-1200 cm⁻¹. Pour ces régions spectrales, ils ont été réalisés des dé-convolutions en

utilisant des courbes d'essai Voigt. Ces études ont été complétées par le calcul de la seconde dérivée des régions d'intérêt. Ainsi, pour chaque preuve, ils ont été comparés à la fois les maximales obtenues suite aux dé-convolutions, et aussi celles mises en évidence par le calcul de la seconde dérivée. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 3.10–3.13.

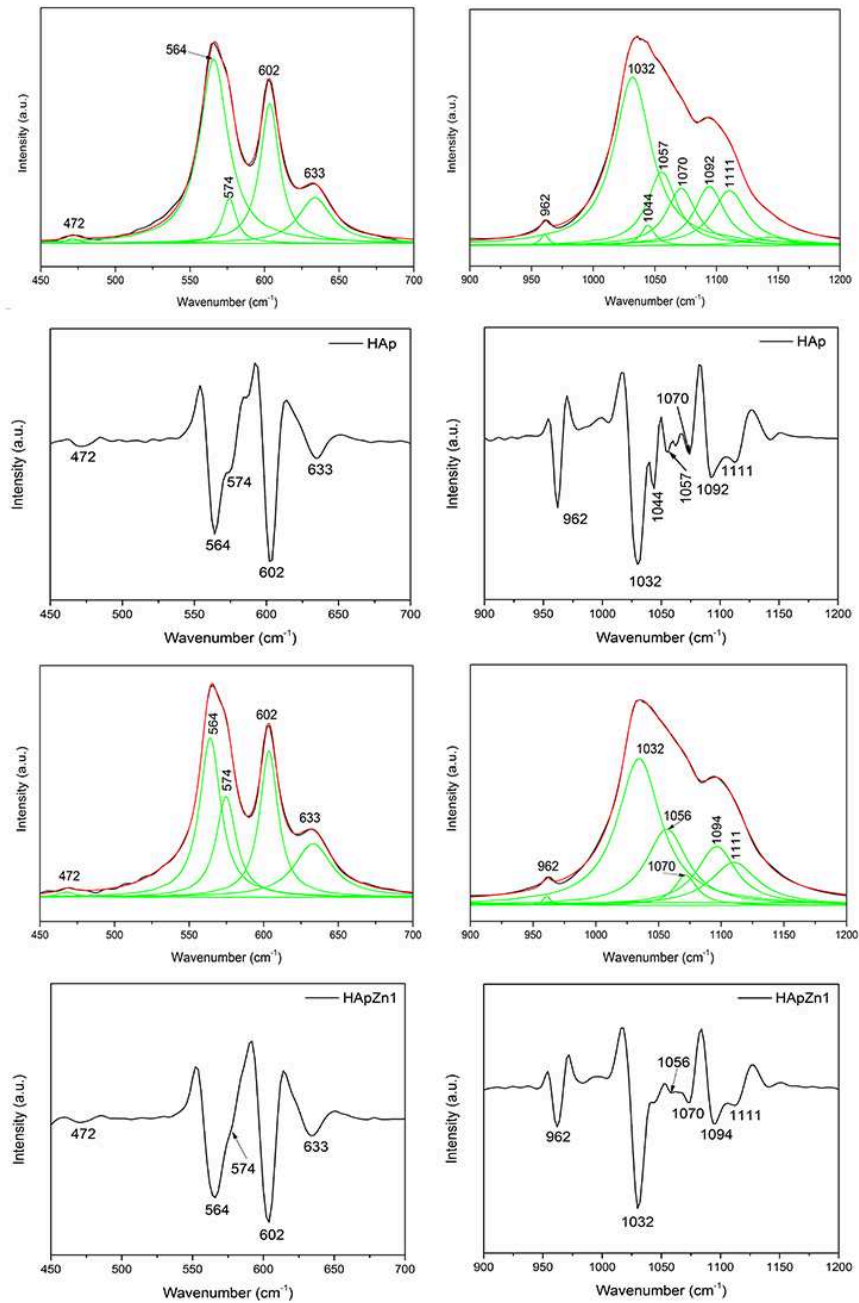


Figure 3.10: Dé-convolutions et calculs de la seconde dérivée pour les spectres FTIR des preuves HAp et HApZn1 dans les régions spectrales 450-700 cm⁻¹ et 900-1200 cm⁻¹

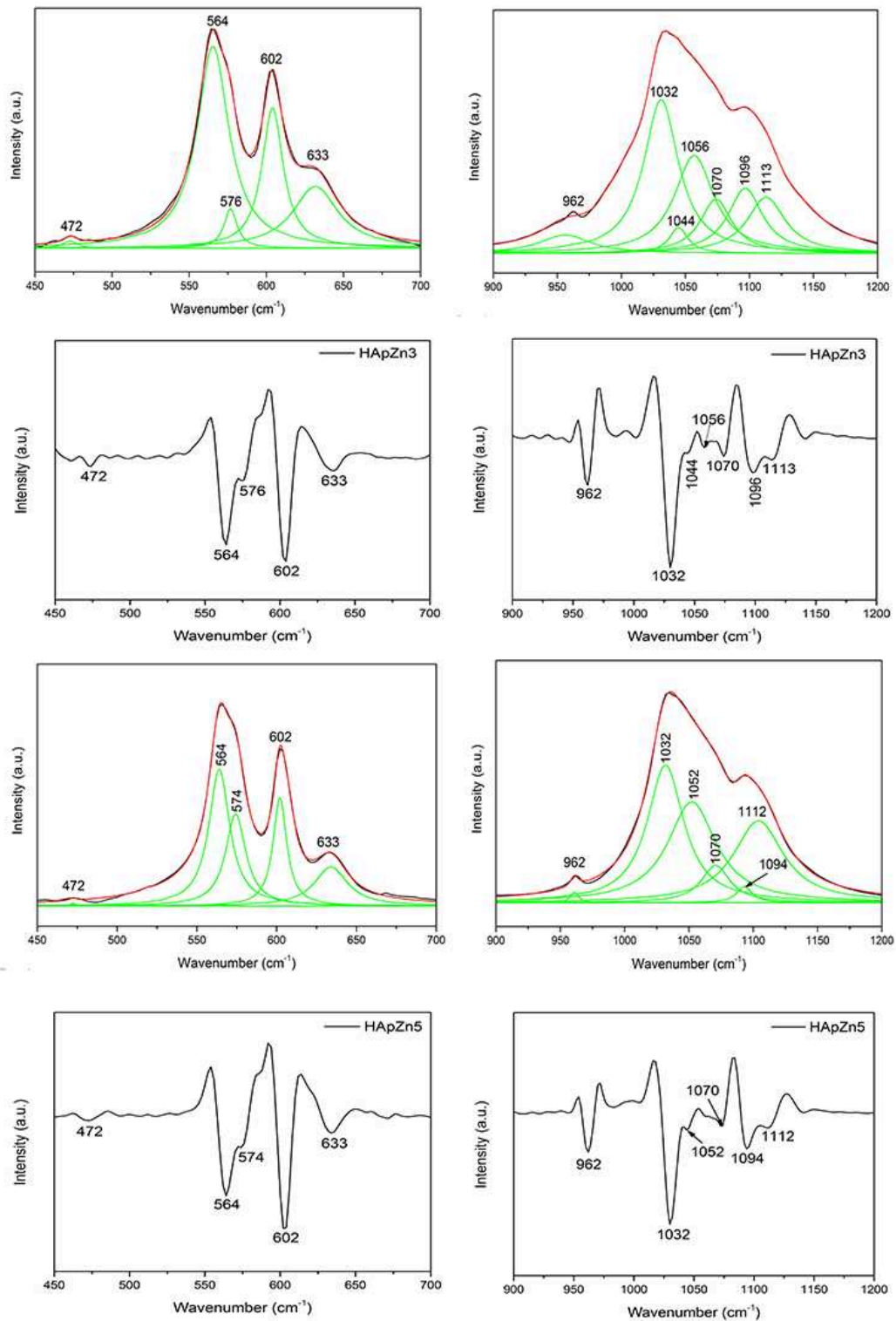


Figure 3.11: Dé-convolutions et calculs de la seconde dérivée pour les spectres FTIR des preuves HApZn3 et HApZn5 dans les régions spectrales 450-700 cm^{-1} et 900-1200 cm^{-1}

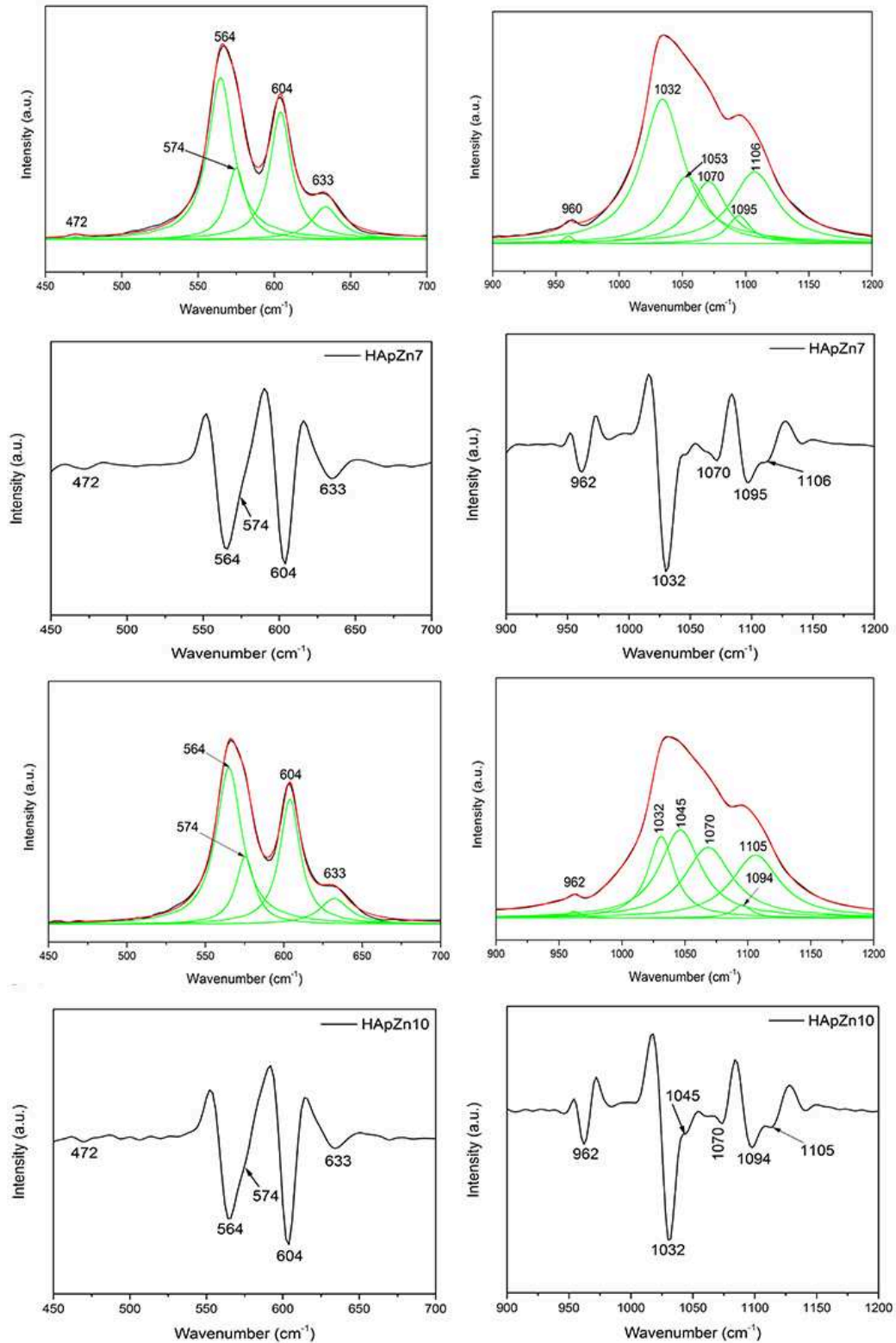


Figure 3.12: Dé-convolutions et calculs de la seconde dérivée pour les spectres FTIR des preuves HAp7 et HApZn10 dans les régions spectrales 450-700 cm⁻¹ et 900-1200 cm⁻¹

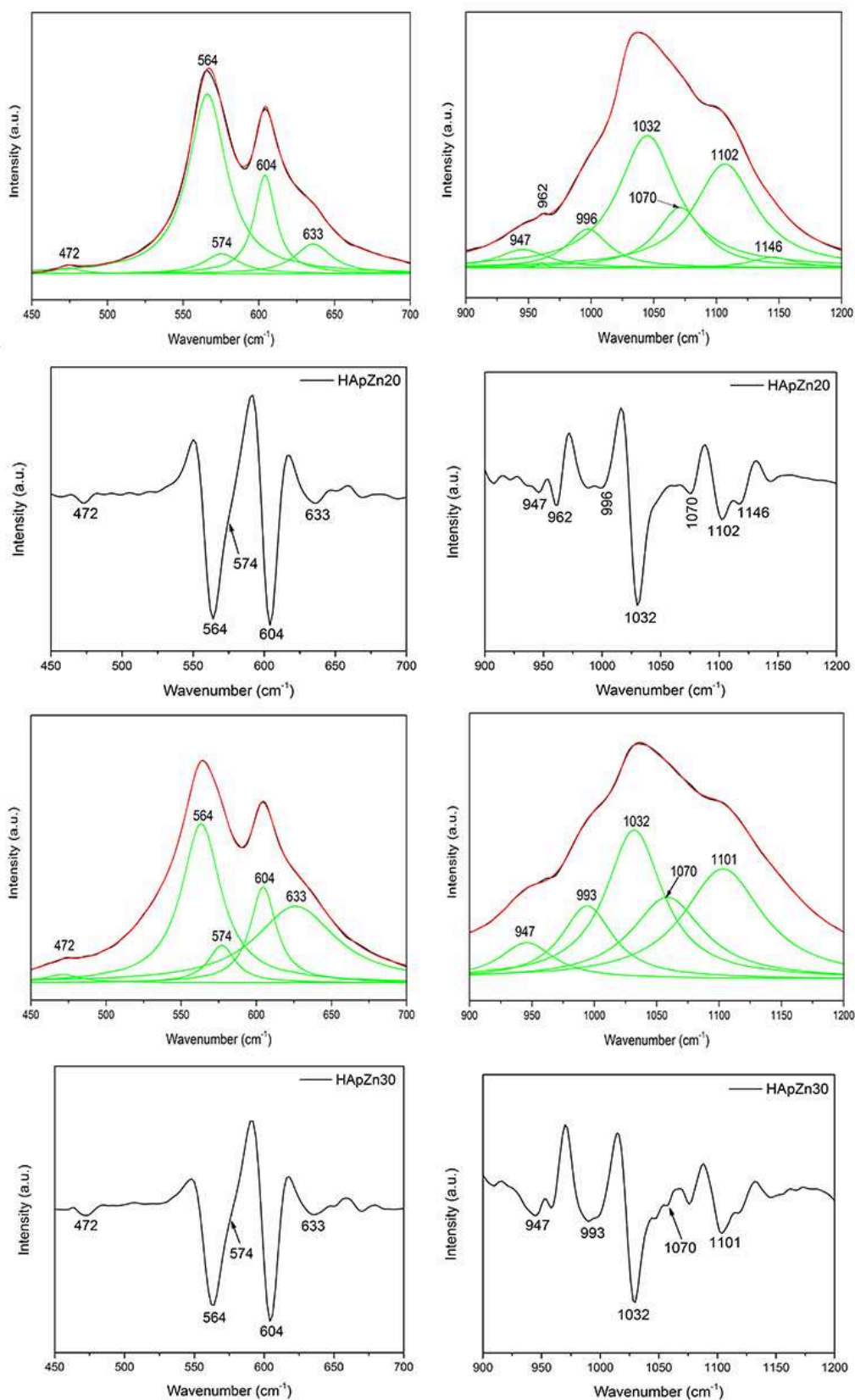


Figure 3.13: Dé-convolutions et calculs de la seconde dérivée pour les spectres FTIR des preuves HApZn20 et HApZn30 dans les régions spectrales 450-700 cm⁻¹ et 900-1200 cm⁻¹

La substitution des ions de Ca^{2+} avec des ions de Zn^{2+} dans la structure de l'hydroxyapatite détermine des modifications spectrales FTIR. Ainsi, on peut remarquer une diminution progressive de l'intensité des bandes vibrationnelles une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves, et aussi leur élargissement général. En plus, au fur et à mesure que la concentration de zinc des preuves augmente, on remarque une croissance de l'intensité des bandes vibrationnelles de 3452 cm^{-1} et 1631 cm^{-1} associées à l'eau [144].

Toutes les maximales d'adsorption caractéristiques aux preuves étudiées sont résumées dans le Tableau 3.4, étant présentés les modes de vibration associés à chaque maximale.

Tableau 3.4: Bandes FTIR des preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc

Position maximale (cm^{-1})									
HAp	HApZn1	HApZn3	HApZn5	HApZn7	HApZn10	HApZn20	HApZn30	Groupement fonctionnel	Référence
472	472	472	472	472	472	472	472	$\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$	26, 195-197
564	564	564	564	564	564	564	564	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$	26, 195-197
574	574	576	574	574	574	574	574	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$	26, 195-197
602	602	602	602	604	604	604	604	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$	26, 195-197
633	633	633	633	633	633	633	633	$\nu_L \text{OH}^-$	26, 193-194
-	-	-	-	-	-	947	947	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$	26, 195, 196, 198-200
962	962	962	962	962	962	962	-	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$	26, 195, 196, 198-200
-	-	-	-	-	-	996	993	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201
1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	1032	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201
1044	-	1044	1052	-	1045	-	-	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201
1057	1056	1056	-	-	-	-	-	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201

1070	1070	1070	1070	1070	1070	1070	1070	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201
1092	1094	1096	1094	1095	1094	-	-	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201
1111	1111	1113	1112	1106	1105	1102	1101	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	26, 104, 195, 197, 198, 200, 201
-	-	-	-	-	-	1146	-	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$	202

Les spectres FTIR de l'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc suggèrent le fait que toutes les preuves ont une composition caractéristique à l'hydroxyapatite hexagonale. Une fois avec la croissance de la concentration de zinc, les bandes de 960 et 1036 cm^{-1} sont de plus en plus difficile à observer, leur intensité baissant de manière significative. Ces modifications produites dans les spectres FTIR suggèrent une diminution de la cristallinité des apatites une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves. Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats XRD.

D'autres partie, on remarque une croissance du contenu d'eau dans les preuves une fois avec la croissance de la concentration de zinc. Les bandes vibrationnelles associées à la structure de l'eau tendent d'être plus intenses quand la concentration de zinc augmente de $x_{\text{Zn}}=0$ (HAp) à $x_{\text{Zn}}=0.3$ (HApZn30).

3.1.6 Spectroscopie Raman

Des études complémentaires de la spectroscopie FTIR ont été réalisées par l'intermédiaire de la spectroscopie Raman. Dans la Figure 3.14, ils sont présentés les spectres Raman des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (a) $x_{\text{Zn}}=0$ – HAp, b) $x_{\text{Zn}}=0.01$ - HApZn1, c) $x_{\text{Zn}}=0.03$ - HApZn3, d) $x_{\text{Zn}}=0.05$ - HApZn5, e) $x_{\text{Zn}}=0.07$ - HApZn7, f) $x_{\text{Zn}}=0.1$ - HApZn10, g) $x_{\text{Zn}}=0.2$ - HApZn20 et h) $x_{\text{Zn}}=0.3$ - HApZn30). Les bandes observées dans tous les 8 spectres des preuves analysées sont associées aux modes de vibration d'étirement et de courbure des groupements fonctionnels de phosphate.

Dans la partie gauche de chaque spectre, il se trouve la zone augmentée du maximal principal pour lequel on a fait la dé-convolution avec des fonctions Voigt. On peut

observer que, pour toutes les preuves étudiées le seul maximal observé est celui de 961 cm^{-1} . Il doit remarquer que dans les spectres Raman des preuves analysées, ils n'ont pas été mis en évidence d'autres maximales secondaires. La présence de ce seul maximal (961 cm^{-1}) suggère le fait que toutes les preuves, indifféremment de la concentration de zinc comportent une structure caractéristique de l'hydroxyapatite hexagonale [145].

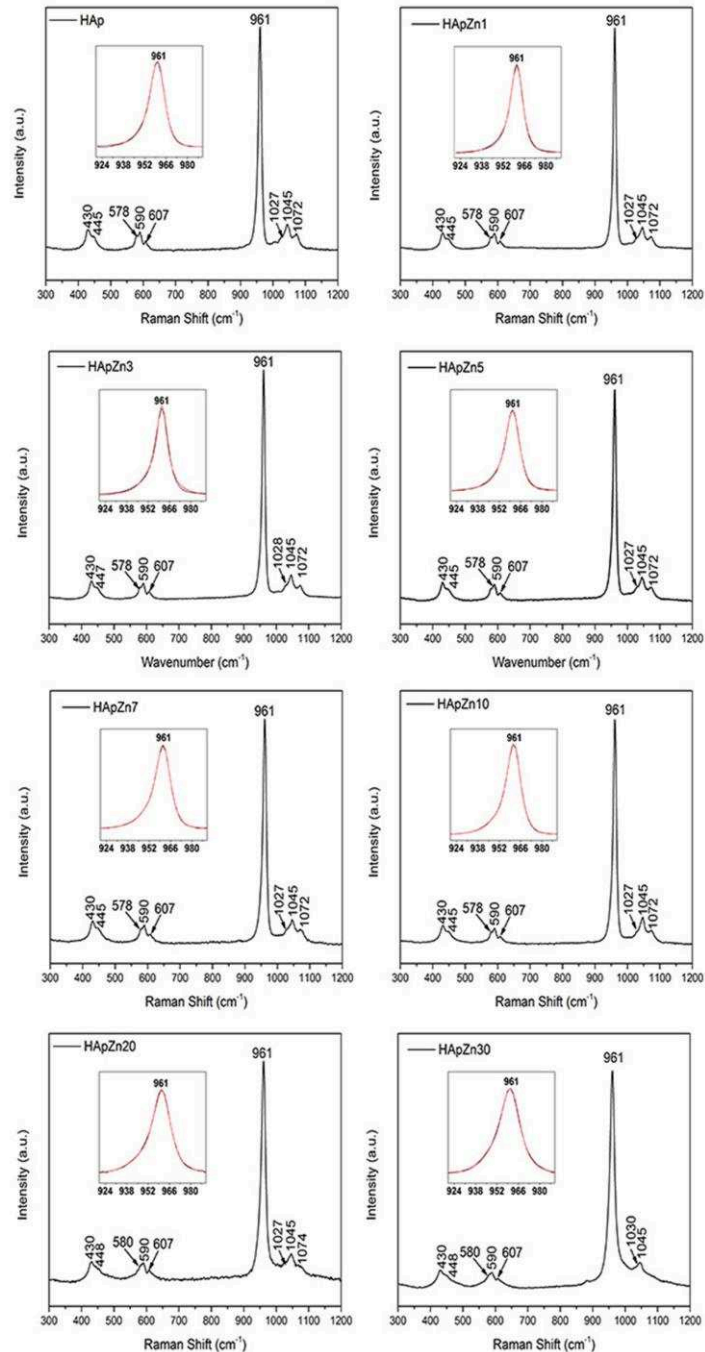


Figure 3.14: Spectres Raman des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

Les études de spectroscopie Raman mettent en évidence, comme dans le cas des résultats FTIR, que toutes les preuves comportent une structure caractéristique de l'hydroxyapatite. Les petits déplacements des maximales des bandes de vibration sont dus aux concentrations de zinc des preuves.

3.1.7 Spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS)

Des renseignements sur l'état chimique de l'hydroxyapatite dopée avec zinc $\text{Ca}_{10-x}\text{Zn}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ où $0 \leq x_{\text{Zn}} \leq 0.3$, ont été obtenus suite à l'analyse de ces preuves par la méthode XPS. Cette méthode nous a permis, de même, l'analyse chimique compositionnelle en pouvant, ainsi, identifier les éléments chimiques. Ils ont été réalisés des mesures sur les preuves HAp ($x_{\text{Zn}}=0$), HApZn1 ($x_{\text{Zn}}=0.01$), HApZn3 ($x_{\text{Zn}}=0.03$), HApZn5 ($x_{\text{Zn}}=0.05$), HApZn7 ($x_{\text{Zn}}=0.07$), HApZn10 ($x_{\text{Zn}}=0.1$), HApZn20 ($x_{\text{Zn}}=0.2$) et HApZn30 ($x_{\text{Zn}}=0.30$). Par l'intermédiaire de ces mesures, il a été mis en évidence l'influence de la substitution des ions de Ca^{2+} avec des ions de Zn^{2+} pendant le processus de synthèse.

Les sommets qui correspondent C1s, Ca 2p, P 2p, 1s O et Zn 2p ont été identifiés pour toutes les preuves avec $0.01 \leq x_{\text{Zn}} \leq 0.3$ investiguées. Comme on s'y attendait, dans le spectre de la preuve HAp ($x_{\text{Zn}}=0$), le sommet associé Zn 2p n'a pas été présent.

En plus, dans le cadre de cette étude, les spectres d'haute résolution obtenus pour C1s, Ca 2p, P 2p, 1s O et Zn 2p ont été analysés. Ainsi, dans le cas C1s, on a pu observer que la valeur de l'énergie de liaison pour les maximales C1s reste inchangée après la substitution des ions de Ca^{2+} avec ceux de Zn^{2+} . Plus que ça, il a été effectué la décomposition des maximales de l'intervalle énergétique correspondant C1s pour chaque preuve ($0 \leq x_{\text{Zn}} \leq 0.3$). On a pu observer que les maximales obtenues suite à la décomposition C1s ont été mises en évidence à la même valeur de l'énergie de liaison pour toutes les preuves indifféremment de la concentration de zinc. Un comportement différent a été observé dans le cas de la preuve HApZn30. D'autre partie, on a observé que, au fur et à mesure que la concentration de zinc de la preuve augmente de $x_{\text{Zn}}=0$ à $x_{\text{Zn}}=0.30$, les maximales associées aux énergies de liaison s'élargissent et baissent en intensité.

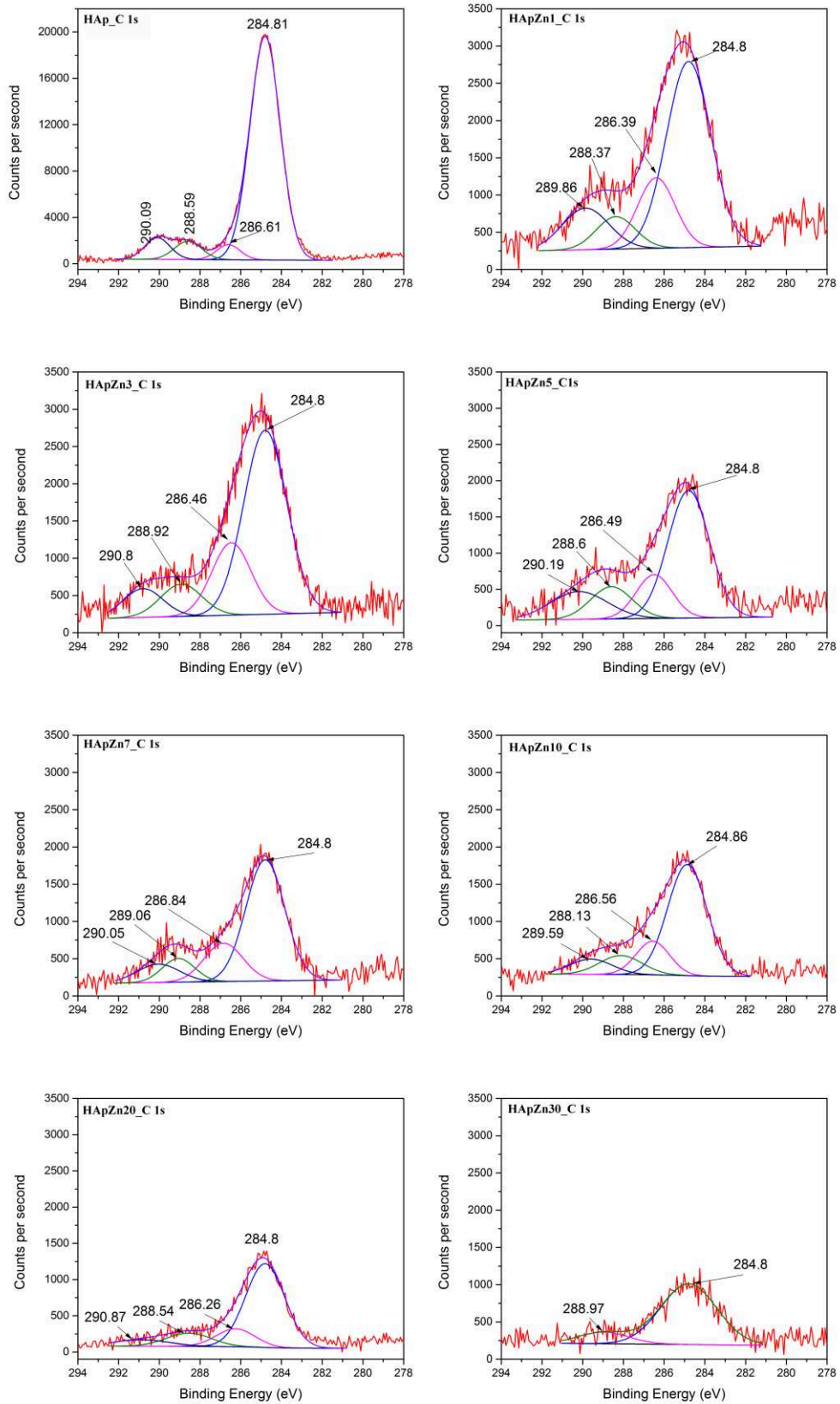


Figura 3.15: Spectres XPS d'haute résolution pour l'élément C 1s des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

Les spectres XPS d'haute résolution de O1s oxygène pour les preuves HApZn ont mis en évidence que le sommet associé O1s est situé autour de la valeur de 531.4 eV. Suite à la dé-convolution du sommet associé à l'énergie de liaison (E_B) égale avec 531.4 eV, la preuve HAp ($x_{Zn} = 0$) présente un seul sommet. Pour les preuves HApZn ($0.01 \leq x_{Zn} \leq 0.2$), le sommet associé O1s a été dé-convoluté dans deux sommets. Les énergies de liaison associées aux deux sommets obtenus suite à la dé-convolution sont légèrement influencées par la concentration de zinc des preuves, en marquant de déplacements de celles-ci quand la concentration de zinc de la preuve augmente.

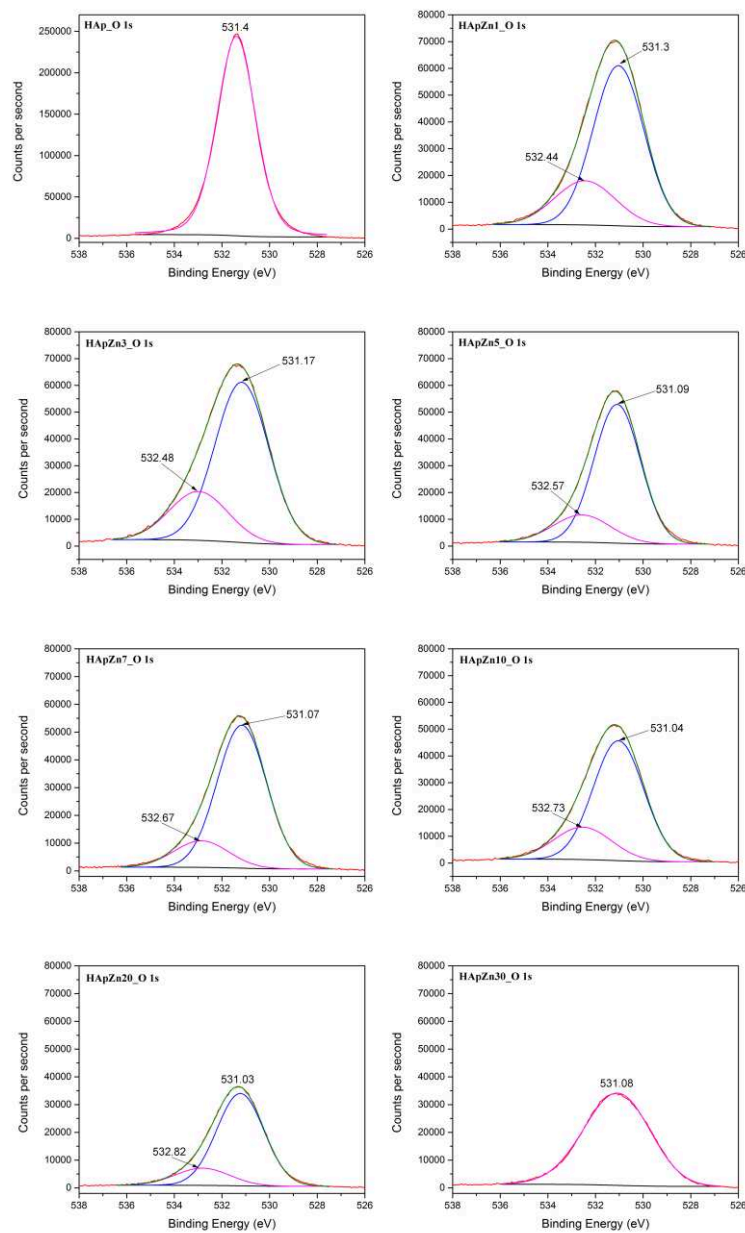


Figure 3.16: Spectres XPS d'haute résolution pour l'élément O 1s des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

Les spectres XPS d'haute résolution de Ca 2p pour les preuves avec $0 \leq x_{Zn} \leq 0.3$ présentent deux sommets associés aux valeurs de l'énergie de liaison caractéristiques Ca $2p_{1/2}$ et respectivement Ca $2p_{3/2}$. Quand la concentration de zinc des preuves augmente, on observe un déplacement des deux sommets associés aux énergies de liaison avec des valeurs plus petites. [146].

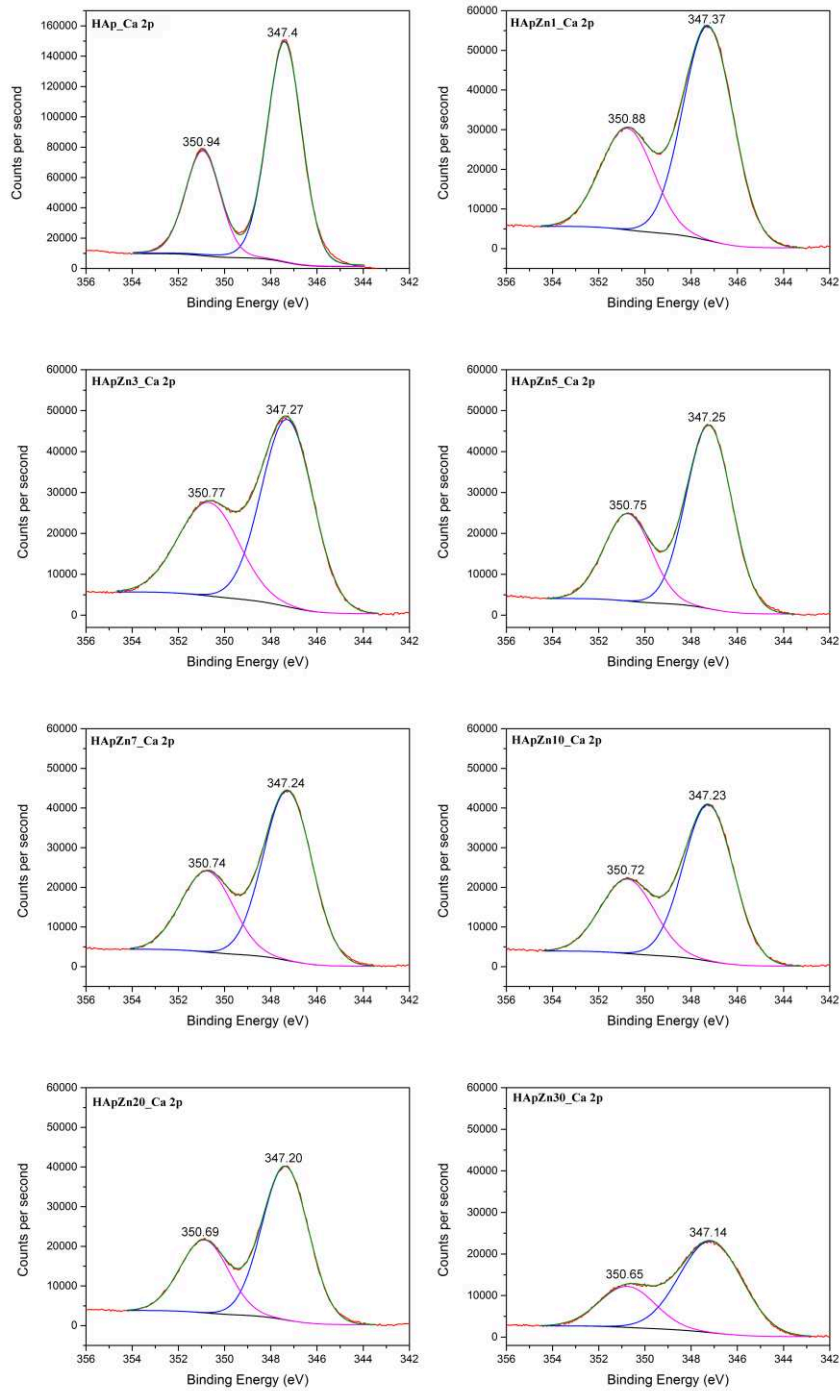


Figure 3.17: Spectres XPS d'haute résolution pour l'élément Ca 2p des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

La ligne du photoélectron P 2p consiste d'un seul maximal autour de l'énergie de liaison, E_B d'environ 133 eV [147]. En plus, on a pu observer que, au fur et à mesure que la concentration de zinc de la preuve augmente, l'intensité du maximal du photoélectron P 2p baisse. De même, il a été remarqué un élargissement du maximal du photoélectron P 2p une fois avec la croissance de la concentration de zinc.

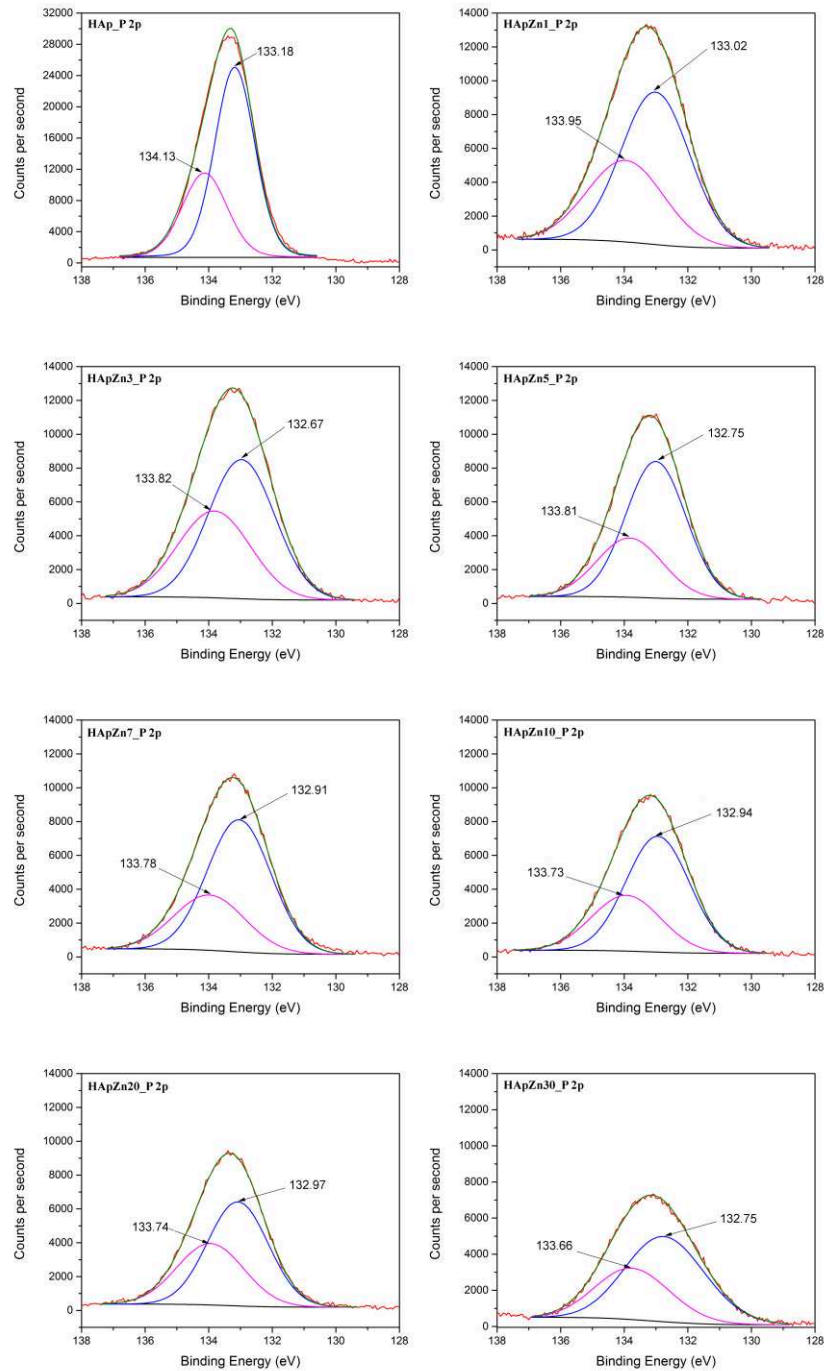


Figure 3.18: Spectres XPS d'haute résolution pour l'élément P 2p des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30

Les spectres du photoélectron Zn 2p pour des différentes preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc ont mis en évidence la présence du sommet associé Zn 2p autour de la valeur de l'énergie de liaison d'environ 1022.4 eV [148] en se modifiant légèrement une fois avec la croissance de la concentration de zinc de 1022.44 eV (HApZn1) à 1022.50 eV (HApZn20). Ainsi, l'énergie de liaison de Zn2p_{3/2} associée au sommet des spectres du photoélectron Zn 2p pour les preuves avec $0.01 \leq x_{Zn} \leq 0.2$ correspond à Zn²⁺, tel qu'il a été rapporté dans la littérature [149]. Cette chose suggère le fait que la valence du zinc n'a pas été modifiée pendant le processus de substitution des ions de Ca²⁺ avec Zn²⁺ [150].

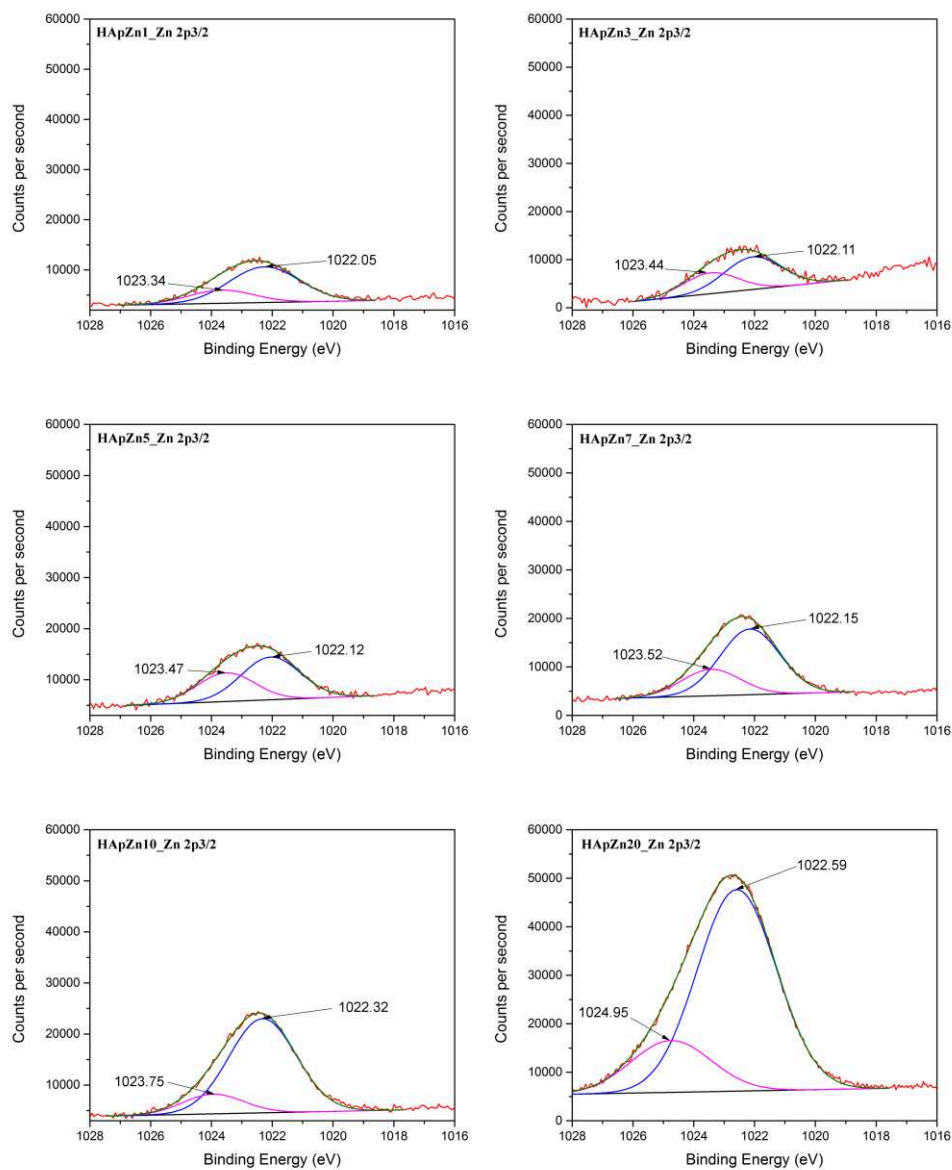


Figure 3.19: Spectres XPS d'haute résolution pour l'élément Zn 2p des preuves HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20

En conformité avec les résultats obtenus suite aux études DRX, FTIR, Raman et XPS, on peut tirer la conclusion que le matériel utilisé dans le cadre de cette étude est l'hydroxyapatite dopée avec zinc. L'analyse des spectres de diffraction a montré que nous n'avons pas de maximales supplémentaires, qui mettent en évidence la présence de certaines phases supplémentaires. Les études XPS ont confirmé les résultats DRX, en montrant que pendant le processus de synthèse de l'hydroxyapatite dopée avec zinc, la valence du zinc est restée inchangée (Zn^{2+}), même quand la concentration de zinc de la preuve a augmenté. La valeur calculée des rapports molaires Ca / P (1.67) et (Ca+Zn)/P (1.67) est égale avec la valeur stoechiométrique (1.67) obtenue suite à l'analyse ICP, en indiquant le fait que les ions de Ca^{2+} ont été substitués par les ions de Zn^{2+} au cours du processus de synthèse, en s'intégrant parfaitement dans la structure hexagonale de l'hydroxyapatite.

3.1.8 Mesures de porosité par adsorption – désorption de gaz (méthode BET)

La structure poreuse des preuves ($Ca_{10-x}Zn_x(PO_4)_6(OH)_2$ - HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20) a été déterminée par des diverses méthodes d'adsorption physique (BET, Freundlich, BJH). La surface spécifique représente la surface totale sur l'unité de masse de produit disponible, y compris la surface des pores ouverts. La surface spécifique peut être déterminée par la méthode Brunauer, Emmett et Teller (BET) [151]. Tel que nous allons démontrer ci-après, nombreux paramètres peuvent être déterminés des isothermes d'adsorption et désorption de gaz sur ces solides.

L'isotherme d'adsorption, avec l'équation $V_{ads} = f(p/p_0)$, s'obtient par la mesure des quantités volumiques du gaz adsorbé (V_{ads}) pour les valeurs croissantes de la pression relative, représentées par p/p_0 , où p représente la pression, et p_0 représente la pression des vapeurs de saturation du gaz à la température visée. Le phénomène d'adsorption résulte de la touche des molécules de gaz à la surface du solide (du matériel). Dans le cadre de notre étude, comme dans plusieurs cas, le gaz étudié est l'azote et la température est celle d'ébullition de l'azote liquide (77 K).

Après avoir touché la saturation ($p/p_0 = 1$), en déterminant les quantités de vapeurs restants adsorbés sur le solide (la surface de la preuve) pour des valeurs décroissantes de la pression relative (p/p_0), on peut obtenir l'isotherme de désorption.

La désorption correspond au déplacement des molécules de gaz à la surface en rapport avec la concentration totale de gaz. Souvent, l'isotherme de désorption ne correspond pas à l'isotherme d'adsorption. En conséquence, on observe l'apparition d'un phénomène d'hystérésis ; la quantité de vapeur restante adsorbée pendant la désorption pour une valeur donnée p/p_0 est supérieure à celle utilisée pendant l'adsorption à la même pression. Ce phénomène est toujours observé dans le cas des isothermes de type IV et V et, parfois, dans le cas des isothermes de type II et III. Les différents types d'hystérésis qui s'obtiennent classiquement ont été classifiés par DeBoer [152]. Ainsi, selon le type d'hystérésis obtenu, on peut déterminer la forme des pores du matériel solide analysé. L'absence de l'hystérésis indique soit que le matériel solide contient uniquement de micropores, soit que les pores présents sont tubulaires et fermés à une extrémité.

Les courbes d'adsorption – désorption de gaz (N_2 , à 77 K) nous permettent la détermination de la texture des preuves (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20). En plus, la texture d'un matériel solide peut être définie par la surface spécifique du matériel, le volume des pores et la forme des pores. La connaissance de ces caractéristiques des matériaux est très importante parce que les propriétés biologiques dépendent en principal de la surface disponible. La forme et la dimension des pores influencent les réactions qui ont lieu à la surface, la stabilité et les phénomènes de transfert.

Les isothermes d'adsorption obtenues permettent la détermination de la surface spécifique des preuves. Dans la Figure 3.20, ils sont présentés les isothermes d'adsorption – désorption de gaz des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20.

Tel qu'on peut observer, les isothermes d'adsorption obtenues sont de type II conformément à la classification [153]. Les isothermes de type II sont caractéristiques aux matériaux qui présentent un mélange de micro et méso-porosité. En plus, en accord avec la classification de DeBoer [152], le type d'hystérésis qui se forme montre que la forme des pores des preuves analysées est de type A. Les pores de type A sont des pores tubulaires. Une diminution de l'hystérésis des preuves analysées montre qu'une partie des pores tubulaires sont fermés à une extrémité.

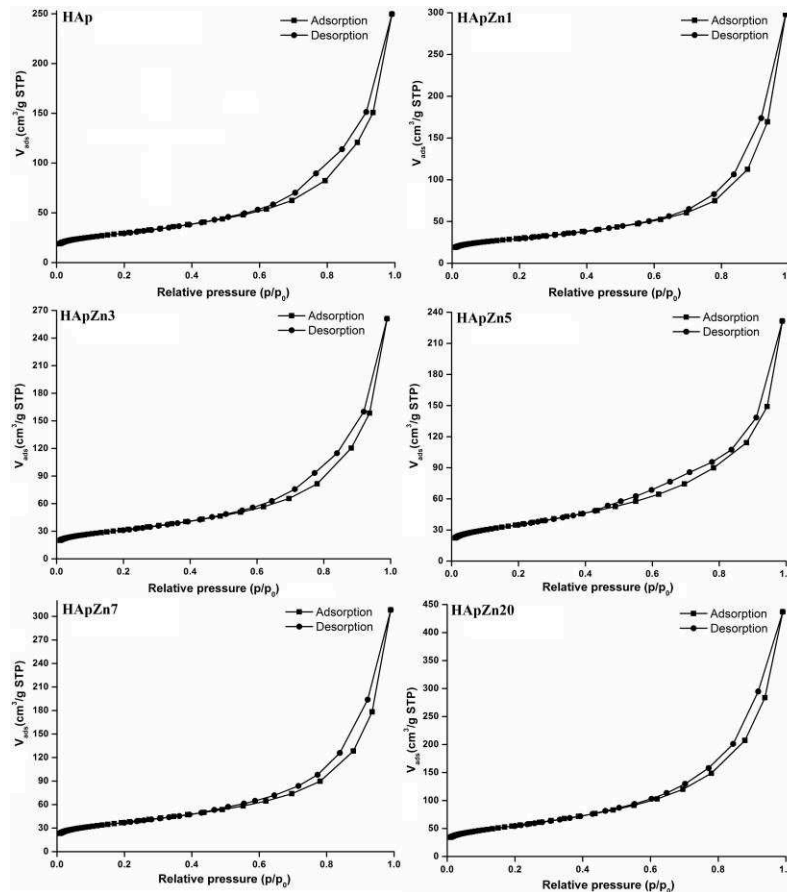


Figure 3.20: Isothermes d'adsorption – désorption de gaz des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20.

La détermination de la surface spécifique aux preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20 par la méthode BET peut être obtenue de manière expérimentale par l'adsorption physique d'un gaz à basse température. Cette méthode de détermination de la surface spécifique est fondée sur les études réalisées par Brunauer, Emmett et Teller en 1938 [251], qui ont proposé une théorie de l'adsorption physique qui suppose que la surface est homogène et l'adsorption se réalise dans plusieurs couches, les molécules de la première couche servent comme lieu d'adsorption pour la seconde couche. En plus, pendant ce processus, il est supposé qu'il y a un équilibre permanent entre le nombre de molécules qui s'adsorbent et celles qui sont désorbées.

L'équation BET pour l'adsorption d'un gaz (N_2 dans notre cas) par un solide (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 ou HApZn20) permet la détermination de la surface spécifique de la preuve analysée. Souvent, l'équation BET est applicable uniquement sur un certain domaine de pression relative (entre 0.05 et

0.1), domaine où les courbes théoriques et expérimentales coïncident, parce que la théorie BET ne tient pas compte de l'hétérogénéité du matériel solide. En partant de l'équation BET, nous pouvons représenter graphiquement la valeur $(p/(V_{ads}(p_0-p)))$ selon p/p_0 . La représentation graphique de $(p/(V_{ads}(p_0-p)))$ selon p/p_0 pour les preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20 est présentée dans la Figure 3.21.

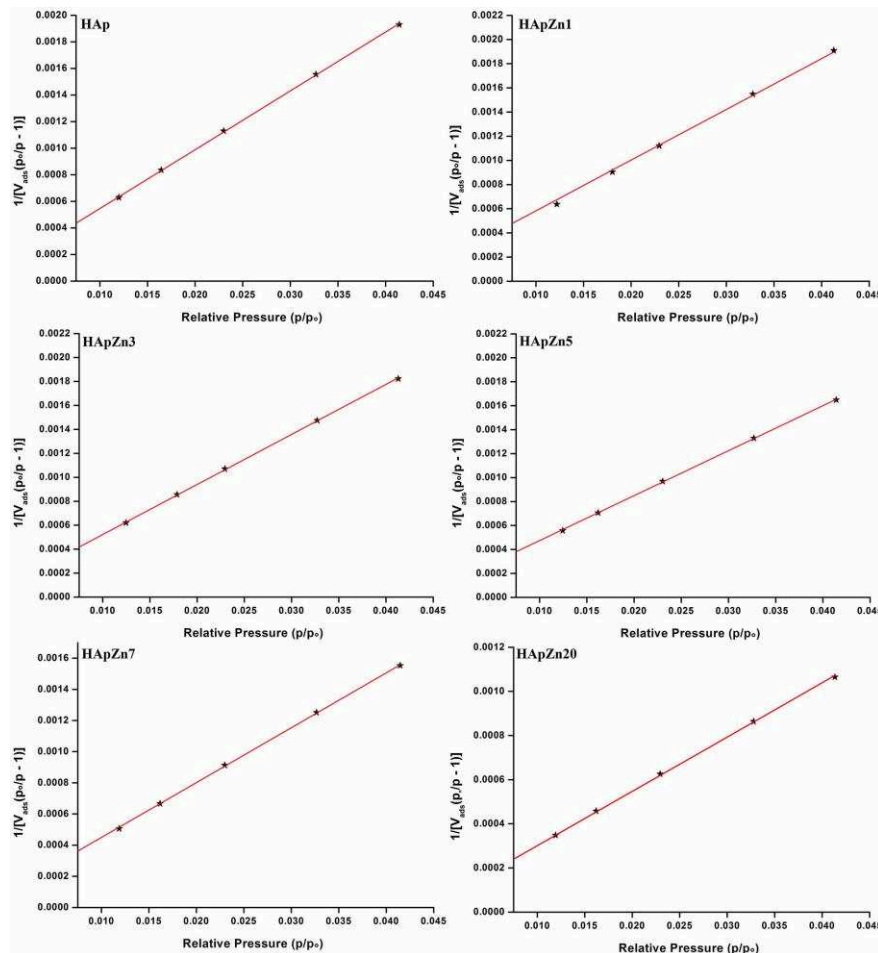


Figure 3.21: représentation graphique de $(1/(V_{ads}(p_0-p)))$ selon p/p_0 pour les preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20.

Dans le Tableau 3.5, ils sont représentés les valeurs obtenus pour V_m , C et S_{BET} . Le coefficient de corrélation a été égal avec 0.9999.

Tableau 3.5: Valeurs calculées pour C , V_m et S_{BET}

Preuve	C	$V_m(\text{cm}^3/\text{g STP})$	$S_{BET}(\text{m}^2/\text{g})$
HAp	409.126	22.616	98.449
HApZn1	386.660	22.852	99.481

HApZn3	383.430	23.956	104.285
HApZn5	393.876	26.514	115.421
HApZn7	379.539	28.222	122.854
HApZn20	391.044	40.962	178.313

Pour la détermination de la distribution de la grandeur des pores, on a utilisé le modèle Barret, Joyner, Hallend (BJH) [154]. Ce modèle est basé sur la condensation (capillaire) de l'azote dans les mésopores, qui a lieu à une pression inférieure que la pression des vapeurs saturés de l'absorbant (qui forme un ménisque hémisphérique liquide - vapeurs).

En tenant compte que par les mesures d'adsorption – désorption d'azote, nous obtenons le volume de l'azote adsorbé / désorbé selon la pression partielle, nous pouvons calculer le volume des pores selon la dimension des pores et, en conséquence, la distribution de la grandeur des pores du matériel. Le calcul du volume des pores selon la dimension des pores et la distribution de la grandeur des pores du matériel est effectué, en général, en utilisant la courbe de désorption. Les distributions du volume des pores déduites de l'isotherme de désorption correspondant aux preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20 sont représentées dans la Figure 3.22.

Les distributions du volume de pores déduites de l'isotherme de désorption correspondant aux preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20 (Figure 3.22) ont montré que l'intrusion de l'azote conduit à une distribution des pores inférieurs à 100 nm. Tel qu'on peut observer, toutes les preuves présentent une porosité de 2 nm à l'environ 40 nm.

Afin de déterminer quantitativement la superficie de la surface externe et la superficie des micropores externes des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20, on a utilisé la méthode t-plot (Figure 3.23) développée par De Boer [155] et Sing [156], qui ont montré que cette méthode offre un moyen pour la détermination de la microporosité des preuves.

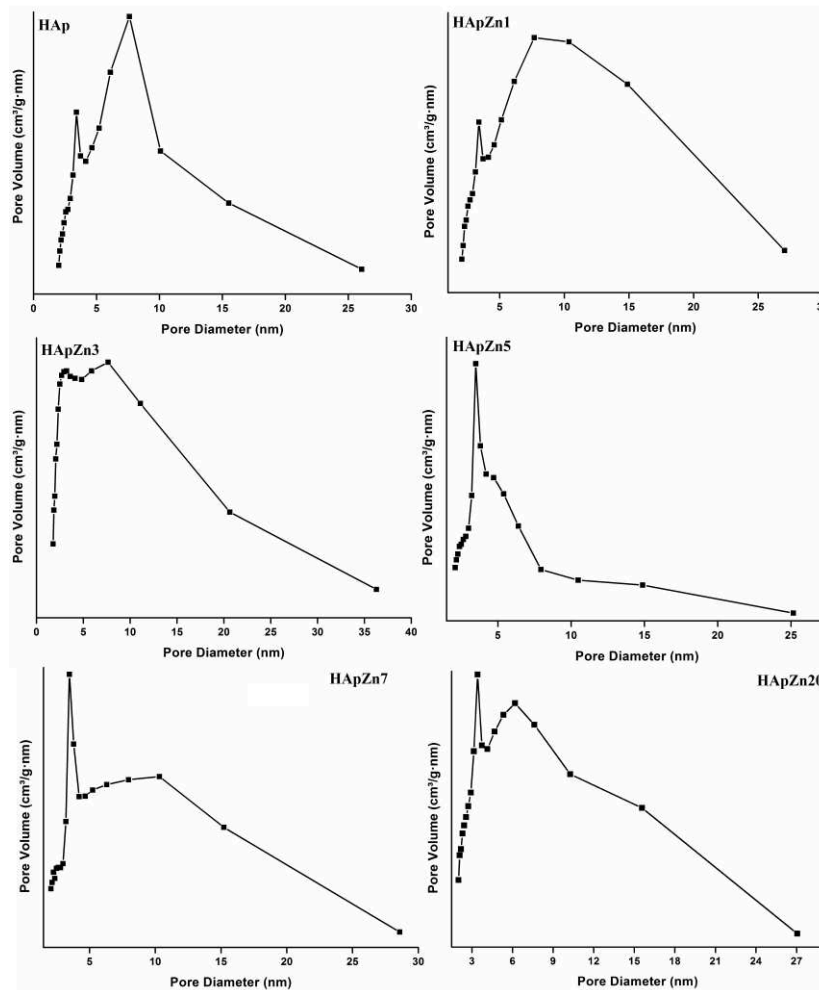


Figure 3.22: Distribution du volume des pores déduite de l'isotherme de désorption correspondante aux preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20.

Les graphiques des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20 présentées dans la Figure 3.22 ont mis en évidence des courbes caractéristiques aux matériaux qui présentent un mélange de micro- et mésopores. Parce qu'il a été difficile à obtenir des isothermes de référence de solides non-poreux, les isothermes BET ont été utilisées comme référence en accord avec la méthode proposée par Lecloux [157].

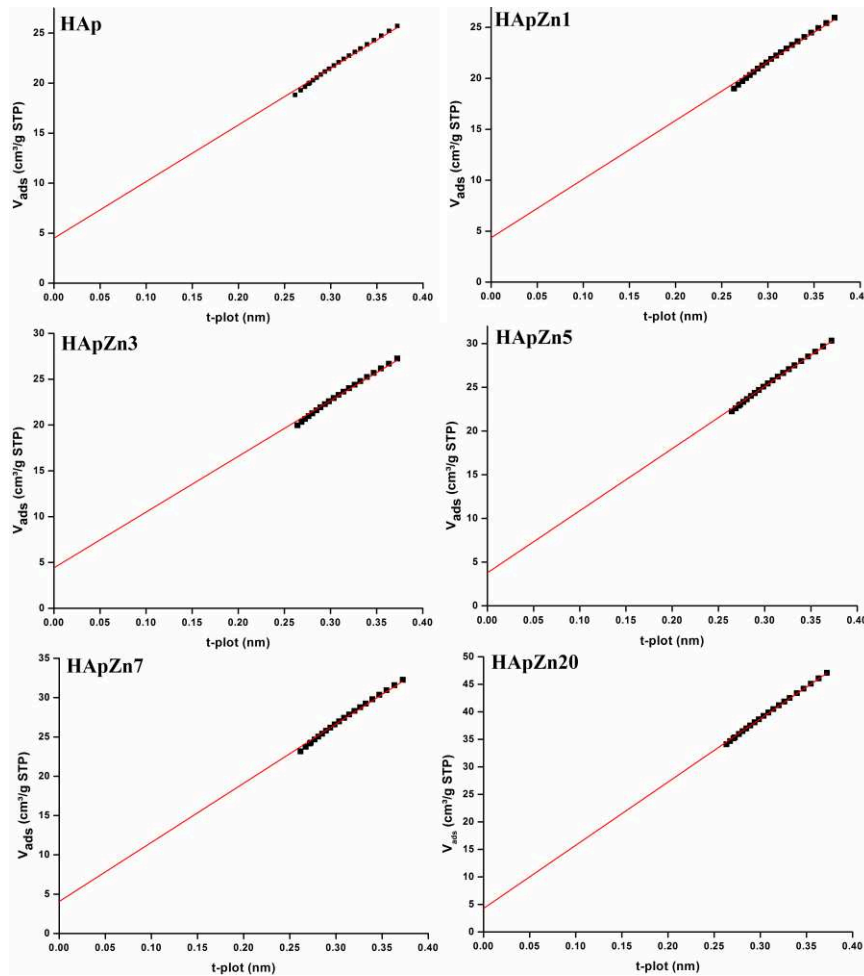


Figure 3.23: Valeurs t-plot des isothermes d'adsorption des preuves HAp et HApZn1.

En plus, les valeurs déterminées pour la superficie de la surface externe, la superficie des micropores externes, la dimension et le volume des pores des preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10 et HApZn20 sont présentées dans le Tableau 3.6.

Tableau 3.6: Les valeurs calculées pour la superficie de la surface externe, la superficie des micropores externes, la dimension et le volume des pores

Preuve	Superficie de la surface externe (m ² /g)	Superficie des micropores externes (m ² /g)	Volume des micropores (cm ³ /g STP)	Volume des pores (cm ³ /g STP)	Dimensions des pores (nm)
HAp	87.951	10.498	0.007023	0.386	15.533
HApZn1	88.849	10.361	0.007040	0.461	15.693
HApZn3	94.209	10.076	0.007059	0.404	15.845
HApZn5	109.976	6.445	0.005956	0.358	15.890

HApZn7	116.277	5.5776	0.006598	0.477	15.993
HApZn20	177.552	0.762	0.006750	0.676	16.598

3.2. Études biologiques des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc

3.2.1 Croissance et viabilité des cellules endothéliales sur supports d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc

Pour la première expérience (réalisée sur supports non-lavés en milieu de culture) après trois jours de culture, on a analysé la viabilité des cellules endothéliales agrandies sur les supports d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de Zn ($x_{Zn}=0$, $x_{Zn}=0.01$, $x_{Zn}=0.03$, $x_{Zn}=0.05$, $x_{Zn}=0.1$ și $x_{Zn}=0.3$). Au cours des 3 jours de culture, on a observé un effet cytotoxique élevé des supports sur la culture de cellules en comparaison avec les cellules agrandies sur support de verre. Les images de microscopie de fluorescence montre la croissance d'un nombre très réduit de cellules sur les supports d'HAp avec et sans Zn et mortalité absolue par la coloration avec EthD-1 (Figure 3.24). En plus, les supports d'hydroxyapatite présentent une auto-fluorescence puissante dans le domaine de la calcéine, en induisant des interférences à l'observation des cellules viables [134].

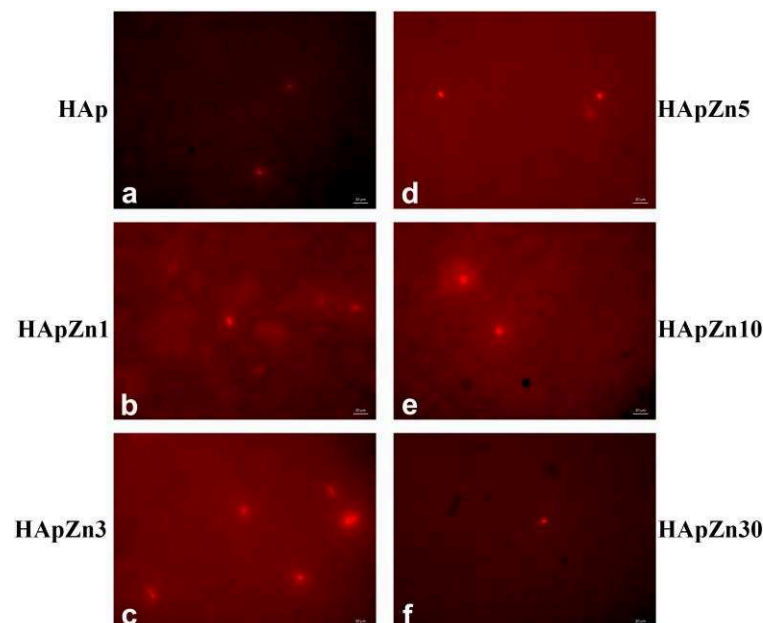


Figure 3.24: Image des cellules endothéliales agrandies sur supports d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de Zn ($x_{Xn}=0$, $x_{Xn}=0.01$, $x_{Xn}=0.03$, $x_{Xn}=0.05$, $x_{Xn}=0.1$ et $x_{Xn}=0.3$), colorées avec EthD-1 (cellules mortes) [134]

Par comparaison, les cellules endothéliales agrandies sur lamelle de verre sont au stade de confluence ayant viabilité élevée démontrée par la coloration avec calcéine AM (Figure 3.25a). La coloration avec EthD-1 des cellules traitées avec alcool éthylique 70% (pour la fixation et la perméabilité des membranes) met en évidence la mort de toutes les cellules (Figure 3.25b) [134].

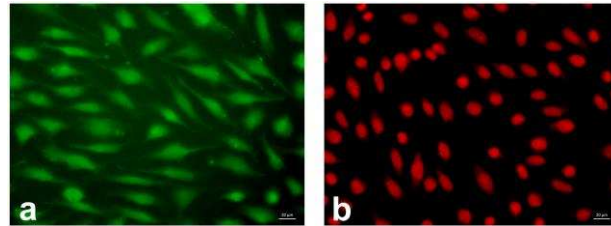


Figure 3.25: Image des cellules endothéliales agrandies sur supports de verre colorées avec calcéine AM pour les cellules vivantes (a) et EthD-1 pour les cellules mortes (a) [134]

Pour un second set de supports d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de Zn ($x_{Xn}=0$, $x_{Xn}=0.01$, $x_{Xn}=0.03$, $x_{Xn}=0.05$, $x_{Xn}=0.07$, $x_{Xn}=0.1$, $x_{Xn}=0.2$ et $x_{Xn}=0.3$), ils ont été réalisés des tests de détermination des valeurs de pH à 24h et 48h dans le milieu de culture DMEM avec 4.5% glucose sans sérum.

Les cellules ont été traitées pour la détermination de la viabilité cellulaire par le marquage des cellules vivantes (coloration avec calcéine AM) et des cellules mortes (coloration avec EthD-1). Après la coloration, les cellules ont été montées entre le support (lamelle) et lame, en utilisant un milieu de montage qui contient DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), colorant spécifique pour les acides nucléiques, qui a mis en évidence les noyaux des cellules endothéliales, noyaux appartenant à la fois aux cellules mortes et aussi aux cellules vivantes (flèches, Figure 3.26). On observe une petite croissance du nombre de cellules endothéliales qui peuplent les supports d'hydroxyapatite dopée avec zinc, directement proportionnelle avec la concentration de Zn contenue sur les supports (HAp, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) [134].

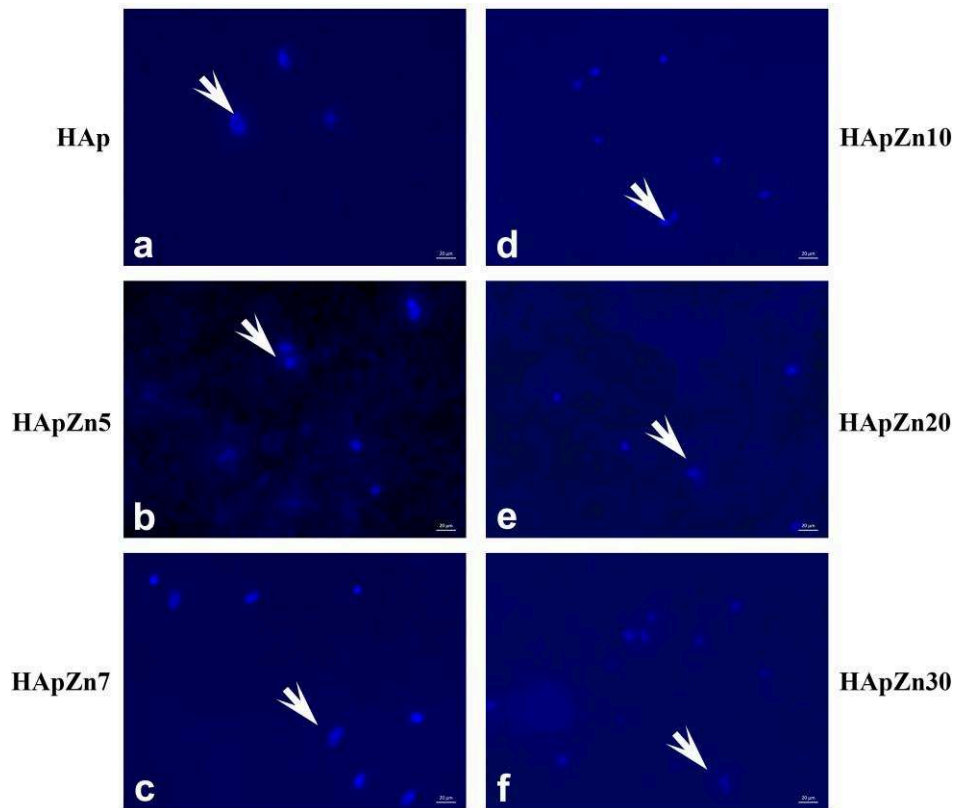


Figure 3.26: Mise en évidence par la coloration avec DAPI des noyaux des cellules endothéliales qui peuplent les supports d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc ($x_{Zn}=0$, $x_{Zn}=0.05$, $x_{Zn}=0.07$, $x_{Zn}=0.1$, $x_{Zn}=0.2$ et $x_{Zn}=0.3$) [134]

Les images de microscopie de fluorescence montrent la baisse légère du nombre de cellules mortes (flèches, Figure 3.27) une fois avec la croissance de la concentration de Zn ($x_{Zn}=0$, $x_{Zn}=0.01$, $x_{Zn}=0.03$, $x_{Zn}=0.05$, $x_{Zn}=0.07$, $x_{Zn}=0.1$, $x_{Zn}=0.2$ et $x_{Zn}=0.3$). Les cellules vivantes ne peuvent pas être observées à cause de l'auto-fluorescence puissante. La coloration avec DAPI a mis en évidence le nombre total de cellules (vivantes et mortes) détectées sur les supports semés avec cellules. Par la différence qualitative de la coloration avec DAPI (cellules totales) et avec EthD-1 (cellules mortes), il résulte une croissance relativement réduite du nombre de cellules viables présentes sur les supports d'hydroxyapatite dopée avec zinc directement proportionnelle avec la concentration de Zn contenue ($x_{Zn}=0$, $x_{Zn}=0.01$, $x_{Zn}=0.03$, $x_{Zn}=0.05$, $x_{Zn}=0.07$, $x_{Zn}=0.1$, $x_{Zn}=0.2$ et $x_{Zn}=0.3$) [134].

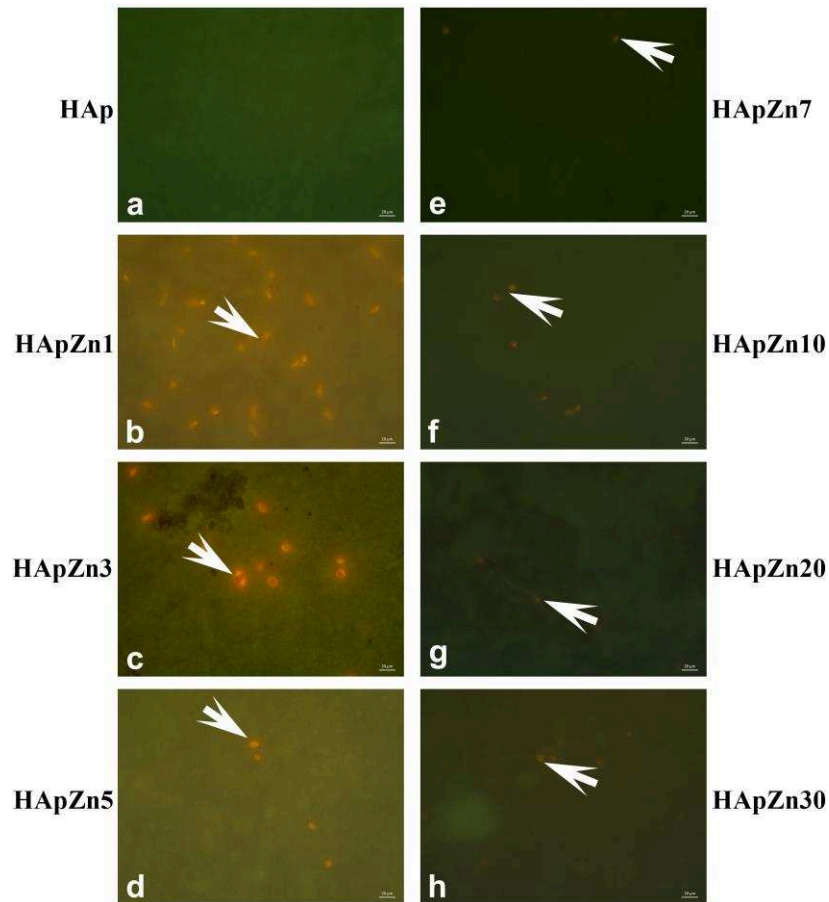


Figure 3.27: Mise en évidence des cellules endothéliales mortes sur les supports d'hydroxyapatite dopée avec zinc par coloration avec calcéine AM et EthD-1 [134]

Les résultats de viabilité obtenus sur les supports d'HAp ont été comparés avec ceux obtenus sur les cellules cultivées sur les lamelles de verre. Après 8 jours de culture, les cellules endothéliales se trouvent dans le stade de pré-confluence, par leur densité couvrant presque l'entière surface de la lamelle (Figure 3.28). Par la coloration avec calcéine AM et EthD-1, on observe des cellules vivantes (vertes) et des cellules mortes (rouges) (Figure 3.28a) et des cellules mortes (prétraitées avec alcool éthylique 70%), (Figure 3.28b). Ces résultats montrent la densité réduite des cellules des supports d'HAp avec et sans Zn en comparaison avec les cellules agrandies sur les lamelles de verre [134].

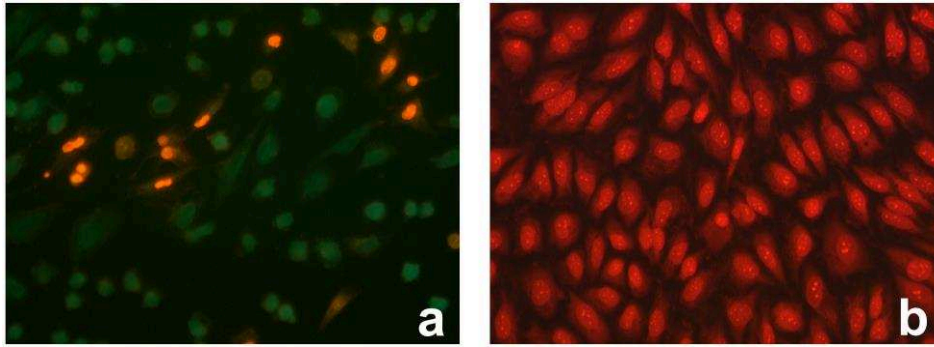


Figure 3.28: Cellules endothéliales cultivées sur les lamelles de verre (a) – cellules vivantes (vertes) et cellules mortes (rouges) colorées avec calcéine AM et EthD-1; (b) cellules mortes – cellules prétraitées avec alcool éthylique 70% et colorées avec calcéine AM et EthD-1 [134]

3.2.2 Viabilité des cellules HepG2 sur poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc

La ligne cellulaire HepG2 est formée des cellules de carcinome hépatique humain, issues du tissu hépatique. Au niveau mondial, le carcinome hépatocellulaire est le cinquième le plus souvent rencontré type de cancer [158]. Depuis le début des années '90, il a été étudié l'effet inhibiteur des nanoparticules d'hydroxyapatite sur la prolifération des cellules cancéreuses, ce sujet apportant un intérêt avide pour la science des matériaux et la médecine appliquée [158-165]. La ligne des cellules HepG2 est à ce jour utilisée à large échelle pour le développement de nouveaux médicaments pour le traitement du cancer [168-169]. Des études antérieures [159,166] ont montré que la dimension des nanoparticules d'hydroxyapatite comporte un rôle essentiel dans l'activité anti-tumorale, apoptose et pour l'activité des niveaux protéiques activés par la signalisation apoptotique [166]. Dans ce contexte, des études de l'effet des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc sur les cellules HepG2 sont utiles pour les possibles futures applications biomédicales.

Ainsi, dans le cas des cellules HepG2, on a testé la viabilité cellulaire dans la présence des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn} = 0$ (HAp), $x_{Zn} = 0.01$ (HApZn1), $x_{Zn} = 0.03$ (HApZn3), $x_{Zn} = 0.05$ (HApZn5), $x_{Zn} = 0.07$ (HApZn7) și $x_{Zn} = 0.1$ (HApZn10) aux différentes concentrations.

Pour les preuves HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7 et HApZn10, ils ont été étudiés quatre concentrations différentes : 62.5, 125, 250 et 500 µg/mL. Dans toutes les expériences effectuées, à l'exception de l'étalon, on a enregistré la morte d'environ 20% des cellules (Figure 3.29). La preuve HAp a induit un taux plus élevé de la mortalité cellulaire pour les concentrations de 62.5, 125 et 250 µg/mL, celle-ci en augmentant une fois avec la concentration, en arrivant à la fin pour 250 µg/mL à une mortalité d'environ 40%. Pour les concentrations plus élevées (500 and 1000 µg/mL), la toxicité a baissé, en arrivant à une mort cellulaire d'uniquement 20%. Ce niveau de mortalité est similaire avec celui enregistré pour les preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc. La toxicité observée pour les preuves HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7 et HApZn10 est due le plus probable à la sédimentation des particules pendant les expériences. Cependant, l'effet positif sur la survivance cellulaire observé pour HApZn5 pourrait être dû à une libération supérieure d'ions Zn^{2+} sur lesquels on sait que stimulent la prolifération cellulaire aux concentrations d'environ 100 µM [132,170].

Les résultats des études effectuées ont montré que l'activité des nanoparticules d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc sur les cellules HepG2 est fortement influencée par leur dimension. Des études antérieures [28,171-172] soutiennent cette hypothèse, en démontrant que la cyto-toxicité des nanoparticules HapZn est dépendante de leur dimension. Une fois avec la croissance de la concentration de zinc, on a remarqué une diminution de la dimension des particules, en observant un effet cytotoxique plus prononcé pour les poudres ayant des concentrations plus petites de zinc. En plus, Chithrani et al. [173] ont rapporté que la cinétique d'absorption cellulaire et les concentrations de saturation sont dépendantes des dimensions des nanoparticules. D'autre partie, Osaki et al. [174] ont établi que les nanoparticules semi-conductrices ayant un diamètre de 50 nm ont pénétré les cellules par l'endocytose par l'intermédiaire des récepteurs plus facilement que les nanoparticules ayant des dimensions plus petites [28].

Récemment, des études sur la corrélation entre les propriétés des particules et la cyto-toxicité et bio-stabilité [28,175] ont montré que, en ce qui concerne l'absorption cellulaire, les nanoparticules d'hydroxyapatite à forme allongée sont plus adéquates que celles à forme sphérique.

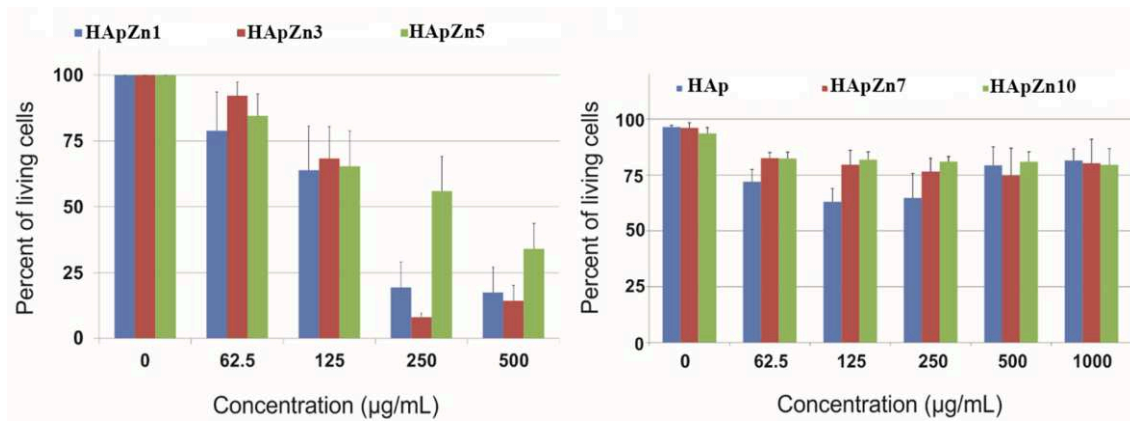


Figure 3.29: Viabilité des cellules HepG2, 24 heures après l'incubation avec hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn} = 0$, $x_{Zn} = 0.01$, $x_{Zn} = 0.03$, $x_{Zn} = 0.05$, $x_{Zn} = 0.07$ et $x_{Zn} = 0.1$ aux concentrations entre 62.5 et 500 µg/mL. Les barres d'erreur ont été calculées d'au moins 3 expériences indépendantes [28,132].

3.2.3. Études antimicrobiennes sur *Escherichia coli*

Il a été évalué l'effet de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0$ (HAp), $x_{Zn}=0.01$ (HApZn1), $x_{Zn}=0.03$ (HApZn3), $x_{Zn}=0.05$ (HApZn5), $x_{Zn}=0.07$ (HApZn7) et $x_{Zn}=0.1$ (HApZn10) sur la viabilité cellulaire procaryote et eucaryotes.

Les six preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc ont influencé la croissance cellulaire d' *Escherichia coli* uniquement aux concentrations très élevées (1000 et 500 µg/mL). Les preuves HApZn1 et HApZn3 inhibent la croissance *E. coli* avec 45% et respectivement 20% aux concentrations de 1000 µg/mL et respectivement 500 µg/mL (Figure 3.30 a).

Dans le cas des preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.07$ (HApZn7) et $x_{Zn}=0.1$ (HApZn10), on remarque une inhibition significative de la croissance de la souche bactérienne *Escherichia coli* uniquement pour les concentrations de 500 et 1000 µg/mL (Figure 3.30 b). La similitude de l'effet bactéricide de toutes les preuves investiguées suggère que leur toxicité diminuée sur la souche bactérienne est influencée par la dimension des particules présentes dans la solution. Cette hypothèse est soutenue par les résultats expérimentaux qu'indiquent une

toxicité plus basse dans le cas de la preuve HApZn10, la dernière ayant une quantité supérieure de zinc, mais des dimensions inférieures des particules [28].

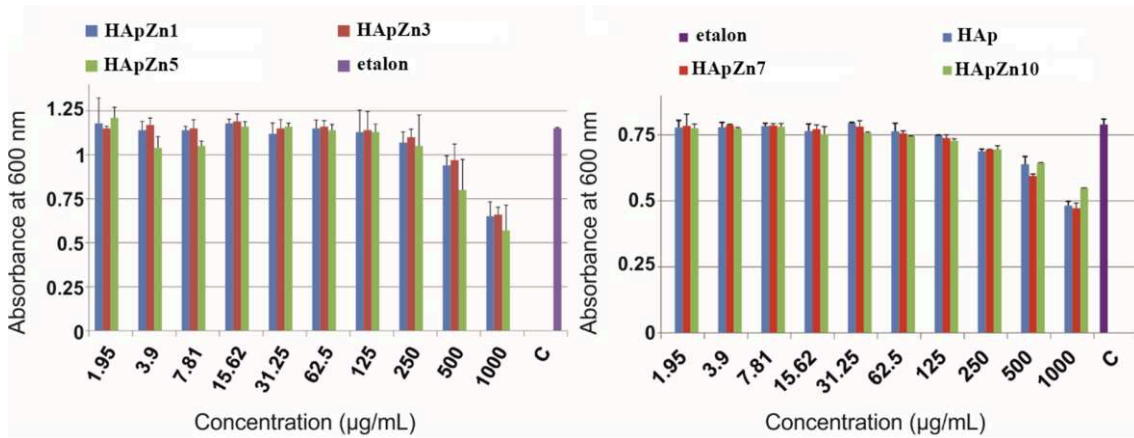


Figure 3.30: Croissance cellulaire de la bactérie *E. coli* en LB à 30 °C pendant 12 heures, dans la présence de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn} = 0$, $x_{Zn} = 0.01$, $x_{Zn} = 0.03$, $x_{Zn} = 0.05$, $x_{Zn} = 0.07$ et $x_{Zn} = 0.1$ aux concentrations entre 1.95 et 1000 µg/mL. Les barres d'erreur ont été calculées au moins dans 3 expériences indépendantes. [28,132]

Les investigations biologiques effectuées suggèrent que la cyto-toxicité des preuves sur la souche bactérienne *E. coli* et la ligne cellulaire HepG2 dépendent de la dimension des particules.

3.3. Conclusions

Dans le cadre de ce chapitre, ils ont été présentés les résultats obtenus suite à la caractérisation morphologique, structurale, biologique et de porosité des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc. Pour cette finalité, ils ont été synthétisés des poudres sur base d'hydroxyapatite avec des différentes concentrations de zinc (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30).

Les diffractogrammes de toutes les 8 poudres analysées ont mis en évidence la présence des maximales associées à l'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) hexagonale qu'appartient au group spatial $P6_3/m$, en conformité avec la fiche ICDD-PDF No. 9-432. D'autre partie, en étudiant les spectres DRX, on a pu observer que les maximales de diffraction d'élargissent progressivement, une fois avec la croissance de la

concentration de zinc des preuves. Ce comportement peut être déterminé par une diminution significative de la cristallinité des preuves et aussi une diminution de la dimension des particules une fois avec la croissance de la concentration de zinc. Des études supplémentaires ont montré le fait que les valeurs des paramètres « a » et « c », et aussi la dimension moyenne des cristallites ont baissé une fois avec la croissance de la concentration de zinc. Ainsi, la valeur de la dimension moyenne calculée baisse, de 23.1879 nm pour la preuve sans contenu de zinc (HAp) jusqu'à 4.7546 nm, pour la preuve avec la concentration la plus élevée de zinc (HApZn30). En plus, le traitement des données DRX collectées dans l'intervalle 2θ 20-80° en utilisant la méthode Rietveld a confirmé la formation de la structure de l'hydroxyapatite hexagonale monophasique en appartenant au groupe spatial $P6_3/m$ dans toutes les preuves d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) analysées.

Les micrographies MEB enregistrées pour les 8 preuves d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) ont permis l'étude de l'influence de la concentration de zinc des preuves sur la morphologie des nanoparticules. Ainsi, on a observé que les poudres sont formées des particules allongées dont la dimension baisse une fois avec la croissance de la concentration de zinc, ayant la tendance de former des agglomérations une fois avec la diminution de la dimension. En plus, l'analyse des éléments mise en évidence par les spectres EDAX ont mis en évidence le fait que toutes les poudres HApZn (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) contiennent les éléments constitutifs suivants : oxygène (O), phosphore (P) et calcium (Ca), caractéristiques à l'hydroxyapatite non-dopée. On a observé aussi une croissance de l'intensité du maximal associé au zinc (Zn) une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves analysées de HApZn3, à HApZn30. En plus, les cartographies des éléments ont mis en évidence la distribution uniforme des éléments constituant dans les preuves investiguées.

Les résultats MEB ont été confirmés aussi par les résultats des études de microscopie électronique en transmission. Les micrographies MET ont offert des renseignements sur la structure, la dimension et la forme des particules des preuves investiguées (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30). Ainsi, il a été confirmé la morphologie des poudres analysées, celles-ci

étant formées des particules nanométriques à forme elliptique. En plus, les résultats obtenus suite aux distributions de dimensions effectuées suite au comptage de plus 500 nanoparticules a mis en évidence la diminution de la dimension des particules une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves, de 25 nm (HAp) à 16 nm (HApZn30). De même, suite aux investigations SAED, il a été mis en évidence la structure hexagonale caractéristique à l'hydroxyapatite pure pour chaque preuve investiguée.

Les modifications physique-chimiques produites sur les preuves d'hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations (HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7 et HApZn20) déterminées par la variation de la température ont été investiguées par l'intermédiaire de l'analyse thermique (TGA et DTA). Les études d'analyse thermique ont confirmé les résultats obtenus suite au traitement des données de diffraction de rayonnements X, qui ont mis en évidence une seule phase cristalline, qu'appartient à l'hydroxyapatite hexagonale dans le cas de toutes les preuves analysées. En plus, il a été mis en évidence le fait que les preuves n'ont pas souffert des modifications structurales, indifféremment de la concentration de zinc des preuves.

La composition des preuves investiguées a été étudiée par l'intermédiaire des mesures de spectroscopie FTR et Raman. Les résultats de ces études ont mis en évidence le fait que les spectres de toutes les 8 preuves investiguées (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) présentent les maximales caractéristiques aux groupements fonctionnels phosphate, carbonate et hydroxyle, celles-ci étant définitoires à la structure de l'hydroxyapatite hexagonale. En plus, dans les spectres des preuves investiguées, on a observé des modifications produites une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves, ce que suggère une diminution de la cristallinité des apatites une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves. Ces résultats confirment les résultats obtenus par l'intermédiaire des études DRX.

De même, la composition des éléments des preuves d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc a été étudiée aussi par l'intermédiaire de la spectroscopie avec photoélectrons de rayonnements X. Ainsi, suite à l'analyse des spectres XPS, il a été mis en évidence la présence des principaux éléments constituants, Ca, P, O et Zn. En plus, on a pu observer une diminution des maximales associées au zinc une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves. Ce

comportement prouve le fait que les ions de zinc ont substitué les ions de calcium de la structure de l'hydroxyapatite. Cependant, on a observé que la preuve ayant la plus grande concentration de zinc (HApZn30) a été une exception de ce résultat, dans ce cas l'entière quantité de zinc ne pouvant pas être assimilée dans la structure de l'hydroxyapatite.

La structure poreuse des preuves a été déterminée par les méthodes d'adsorption physique BET, Freundlich et BJH. Suite à l'analyse des données expérimentales obtenues, on a pu tirer la conclusion que les isothermes d'adsorption obtenues pour les preuves investiguées ont été de type II conformément à la classification BDDT, celles-ci impliquant un mélange de micro- et méso-porosité, et les pores des poudres analysées ont été de type A (pores tubulaires). De même, les valeurs des surfaces spécifiques déterminées par l'intermède de la méthode BET ont présenté une croissance progressive, une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves. Ce comportement a été de même observé dans le cas de la dimension des pores, déterminée par la méthode BJH, celle-ci augmentant une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves. Ainsi, la surface spécifique a augmenté de 98.449 m²/g (HAp) à 178.313 m²/g (HApZn30), et la dimension des pores a augmenté de 15.533 nm (HAp) à 16.598 nm (HApZn30).

Dans le cadre des études sur la viabilité des cellules endothéliales (microscopie de fluorescence), il a été mis en évidence le fait que les supports d'hydroxyapatite ont effet cytotoxique sur la croissance des cellules endothéliales. La maintenance des supports semés avec des cellules endothéliales pour une période de trois jours dans la culture a déterminé un puissant effet cytotoxique, en résultant une population réduite avec des cellules et une mortalité élevée. On a observé une acidification puissante de l'environnement. Ultérieurement, par la maintenance des supports pour 48 heures en milieu de culture et puis leur population avec cellules a enregistré une croissance modérée des valeurs de pH, fait qui a déterminé une croissance légère des concentrations de zinc. Cependant, la densité des cellules détectées reste réduite en comparaison avec les cellules agrandies sur les lamelles de verre. On recommande de nouvelles méthodes de couverture d'HAp, ainsi que la surface de culture offre un pH neutre et une biocompatibilité améliorée par rapport aux conditions examinées. Suite aux études de viabilité cellulaire effectuées sur les cellules HepG2 et aux études antimicrobiennes sur la souche bactérienne Escherichia coli on a observé une cyto-

toxicité réduite sur la bactérie *E. coli* pour les six preuves d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc. Les effets cytotoxiques ont été plus prononcés dans le cas des cellules hépatiques. En-effet, une diminution de la viabilité commence à se remarquer nettement à la concentration de 125 µg/mL. Il est intéressant le fait que cette cytotoxicité est significativement plus réduite pour les concentrations supérieures de zinc. Ce comportement peut être dû à la libération des ions de zinc ou à une différence de la solubilité des preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc. La cytotoxicité observée pour toutes les preuves testées est due le plus probable à l'interaction entre les particules et les membranes cellulaires [28,132]. On peut tirer la conclusion que par le contrôle des propriétés physique-chimiques, les nanoparticules peuvent jouer un rôle important dans l'absorption cellulaire [28].

4^{ème} chapitre: Synthèse et caractérisation des nano-composites sur base de l'hydroxyapatite

Selon un rapport élaboré par l'Association Américaine des Chirurgiens Orthopèdes en 2002, le tissu osseux est le deuxième le plus fréquent transplanté tissu, étant dépassé uniquement par les transfusions de sang. Les greffes osseuses sont nécessaires pour le remède des lésions osseuses graves, causées en principal par des déformations congénitales, traumatismes, résections de certaines tumeurs ou différentes maladies dégénératives, comme l'ostéomyélite [11,45,176]. Dans ce contexte, la difficulté apparait quand il doit choisir le plus adéquat type des trois types de greffes. La première possibilité est l'utilisation d'une autogreffe. Cette option implique la récolte d'un morceau d'os du corps du patient afin d'être réimplanté dans la zone affectée. La quantité de tissu qui peut être utilisée est limitée, et l'intervention chirurgicale supplémentaire que le patient doit la supporter cause beaucoup de douleur et de souffrance, et le risque de la production des infections postopératoires est important [11,43]. Autre possibilité pour le greffage osseux est l'utilisation d'une autogreffe. Cette option implique la récolte du tissu osseux d'un donateur. Bien que cette méthode soit moins invasive que la première, il y ait un risque élevé de contacter une maladie infectieuse qui peut être transmise de donateur chez le patient [11,43]. Une conséquence, la médecine moderne s'est concentrée pour trouver une meilleure solution pour le problème des greffes osseux. Dans ce contexte, la troisième possibilité alternative aux deux méthodes de greffage ci-dessus mentionnées a apparu sous la forme de certaines greffes synthétiques. Ainsi, les chercheurs du monde entier se sont concentrés pour trouver un matériel capable à imiter le tissu osseux naturel [11].

Dans le cadre de ce chapitre, ils seront présentés les résultats obtenus suite à la caractérisation physique-chimiques et biologiques des biocéramiques sur base d'hydroxyapatite (HAp et HApZn10) en matrice de collagène. L'influence du collagène sur la structure et la morphologie HAp et HApZn10 a été mise en évidence suite aux analyses structurales, optiques, de surface et biologiques. Les propriétés structurales et morphologiques des nano-composites ont été investiguées par diffraction de rayonnements X (DRX) et microscopie électronique de balayage (MEB). Les transformations thermiques et les pertes de masse ont été mises en évidence par

l'analyse thermogravimétrique (TGA) et analyse thermique différentielle (DTA). En plus, les propriétés optiques de ces nano-composites ont été investiguées à la fois par la spectroscopie en infrarouge avec transformée Fourier (FTIR) et aussi par la spectroscopie Raman. L'effet cytotoxique des bio-composites sur la ligne cellulaire HeLa a été de même évaluée. En plus, l'influence sur le cycle cellulaire a été investiguée par l'intermédiaire de la cytométrie de flux. Des études antimicrobiennes sur des bactéries Gram-positives, Gram-négatives et champignons ont été de même réalisées.

4.1. Synthèse et caractérisation des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène

Pour l'obtention de la poudre d'hydroxyapatite en collagène (HAp6-CBc), 6g de poudre HAp synthétisée en préalable ont été mélangées avec 100 ml de solution avec contenu de collagène. Le mélange résulté a été continuellement mélangé pendant 90 heures. D'autre partie, pour l'obtention des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.1$ en collagène, la poudre d'hydroxyapatite dopée avec zinc a été ajoutée dans un gel de collagène, en s'obtenant ainsi des composants avec les rapports suivants : 0:1 (référence de collagène), 4:1 (HApZn10-CBc_4), 1:1 (HApZn10_1) et 1:0 (référence de HApZn10). Tous les composants de gel ont eu la même concentration de collagène, 1.2% (rapporté à la substance sèche), pH 7.4 et ils ont été réticulés avec 0.5% GA. Après le processus de réticulation, tous les composites de gel ont été lyophilisés en utilisant un lyophilisateur Christ Model Delta 2-24 LSC (Allemagne), en résultant en final des composites poreux 3D

4.2.1. Diffractométrie de rayons X (DRX)

Les spectres de diffraction ont été obtenus dans l'intervalle $2\theta = 10^\circ - 90^\circ$, avec un pas de 0.02° et un temps de mesure de 34s.

Dans la Figure 4.1, ils sont présentés les diffractogrammes obtenues pour les preuves d'hydroxyapatite (HAp) (Figure 4.1 (a)), hydroxyapatite en collagène (HAp6-CBc) (Figure 4.1 (b)), hydroxyapatite dopée avec zinc ($x_{Zn}=0.1$) en collagène ayant le rapport des concentrations HApZn10:Collagène 4:1 (HApZn10-CBc_4) (Figure 4.1 (c)) si 1:1 (HApZn10-CBc_1) (Figure 4.1 (d)) et aussi le standard correspondant à

l'hydroxyapatite hexagonale. Conformément à la fiche ICDD-PDF 9-0432 du Centre International pour les Bases de Données de Diffraction, les deux spectres sont formés des maximales caractéristiques à l'hydroxyapatite. Les diffractogrammes indiquent la présence d'une phase majoritaire qui correspond à la structure de l'hydroxyapatite hexagonale, en appartenant au groupe spatial $P6_3/m$ [11].

Sauf la phase associée à l'hydroxyapatite pure, il n'a été identifié aucune autre phase minoritaire. D'autre part, il a pu être observé une légère diminution de l'intensité des maximales dans le cadre de la preuve HAp6-CBc (Figura 4.1 (b)), et aussi un élargissement de celles-ci. Ce comportement pourrait déterminer une diminution du degré de cristallinité de la preuve [11]. De même, on peut remarquer un élargissement des maximales de diffraction et aussi une diminution de leur intensité une fois avec la baisse du rapport HApZn10:Collagène des preuves, ce qui suggère une diminution de la dimension des particules, et aussi une cristallinité réduite [11,15,177].

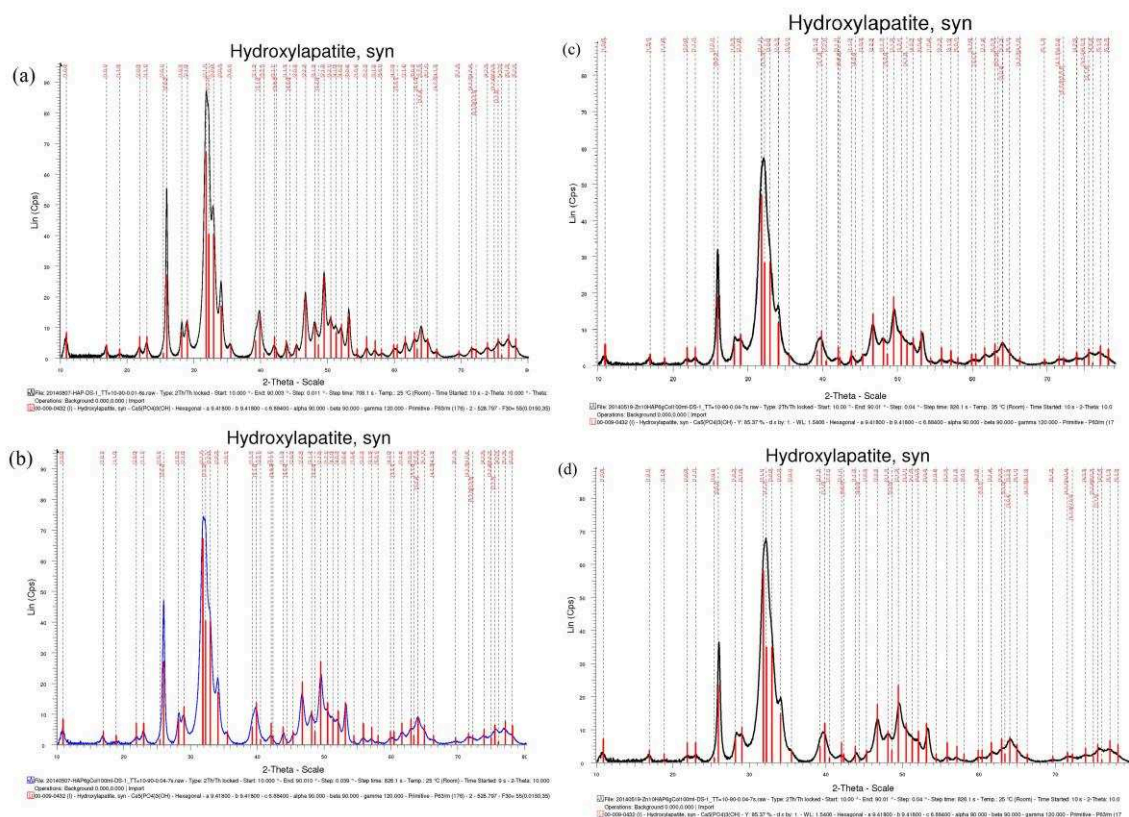


Figure 4.1: Diffractogrammes des preuves HAp (a), HAp6-CBc (b), Zn:HAp-CBc_4 (c) *et* Zn:HAp-CBc_1(d) [11,15]

4.2.2 Microscopie électronique de balayage (MEB)

Les morphologies des poudres d'hydroxyapatite (HAp), hydroxyapatite en collagène (HAp6-CBc), hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.1$ (HApZn10) et hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.1$ en collagène avec les rapports HApZn10:Collagène = 4:1 (HApZn10-CBc_4) et 1:1 (HApZn10-CBc_1) ont été étudiées par l'intermédiaire de la microscopie électronique de balayage.

Dans la Figure 4.2, il est présenté la micrographie MEB des preuves Collagène (a), HAp (b), HAp6-CBc (c), HApZn10 (d), HApZn10-CBc_4 (e) et HApZn10-CBc_1 (f). En observant les images de microscope électronique de balayage des preuves sur base d'hydroxyapatite. En observant les images de microscopie électronique de balayage des preuves sur base d'hydroxyapatite, on peut remarquer la forme ellipsoïdale des nanoparticules, et aussi la tendance de la formation d'agglomérations à cause de la dimension très petite des particules. De même, on peut remarquer une croissance de la porosité des poudres une fois avec la croissance de la concentration de collagène des preuves [11,15].

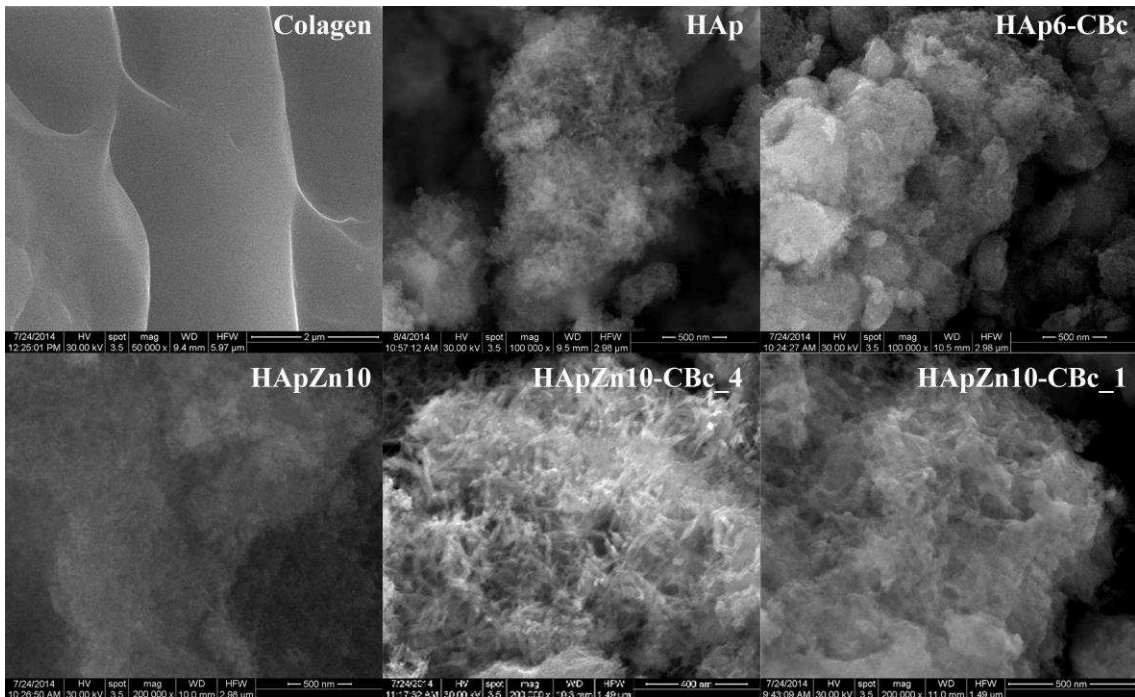


Figura 4.2: Image MEB des preuves collagène, HAp, HAp6-CBc, HApZn10 HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1 [11,15]

4.2.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les groupements fonctionnels présents dans la structure des preuves étudiées ont été identifiés par l'intermédiaire de la Spectroscopie FTIR. Dans la Figure 4.3, ils sont présentés les spectres de l'hydroxyapatite (HAp), de l'hydroxyapatite en collagène (HAp6-CBc), du collagène (Collagène), de l'hydroxyapatite dopée avec zinc (HApZn10) et de l'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène (HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1).

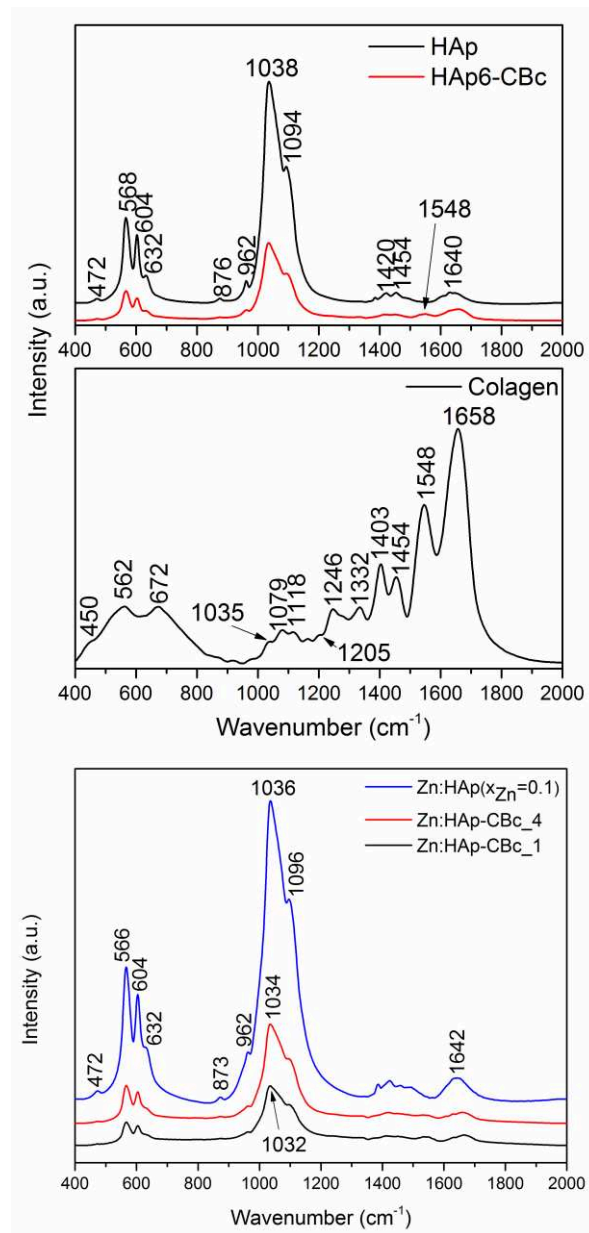


Figure 4.3 Spectres FTIR des preuves HAp, HAp6-CBc, Collagène, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1 [11]

Les spectres enregistrés pour l'hydroxyapatite, hydroxyapatite en matrice de collagène et hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène mettent en évidence la présence des bandes d'absorption caractéristiques aux apatites. Dans le cadre du spectre enregistré pour les preuves HAp6-CBc, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1, on peut observer légèrement que la bande de la région 1600-1700 cm^{-1} est plus large que dans le cadre du spectre obtenu pour la preuve HAp. Une explication de ce comportement est la superposition de la bande associée à la matrice d'eau avec celle associée au mode d'étirement C = O du groupe Amide I présente dans le spectre du collagène [178]. De même, on peut observer à 1548 cm^{-1} une bande vibrationnelle associée au groupement Amide II [36]. On peut remarquer le fait que l'influence du collagène détermine une diminution de l'intensité des maximales, et aussi une tendance générale d'élargissement de toutes les bandes d'absorption.

4.2.4 Spectroscopie Raman

Des études complémentaires à la spectroscopie FTIR ont été effectuées à l'aide de la spectroscopie Raman. Les spectres Raman de l'hydroxyapatite, de l'hydroxyapatite englobée en collagène, du collagène de l'hydroxyapatite dopée avec zinc HApZn10 et de celles de l'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène avec le rapport HApZn10:Collagène 4:1 (HApZn10-CBc_4) et 1:1 (HApZn10-CBc_1) sont présentées dans la Figure 4.4.

Les bandes vibrationnelles caractéristiques à la structure de l'hydroxyapatite ont été observées dans les spectres HAp, HAp6-CBc, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1.

En plus, dans les spectres obtenus pour les preuves avec collagène, HAp6-CBc HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1, on peut observer à la fois les bandes vibrationnelles du collagène, et aussi celles associées à la structure apatitique.

Comme dans le cas des spectres FTIR, l'influence du collagène détermine une diminution de l'intensité des maximales et aussi un élargissement et un lisage général de toutes les maximales, et aussi l'apparition de certaines maximales supplémentaires associées à la structure du collagène. L'Attribution des principales bandes vibrationnelles est résumée dans le Tableau 4.1

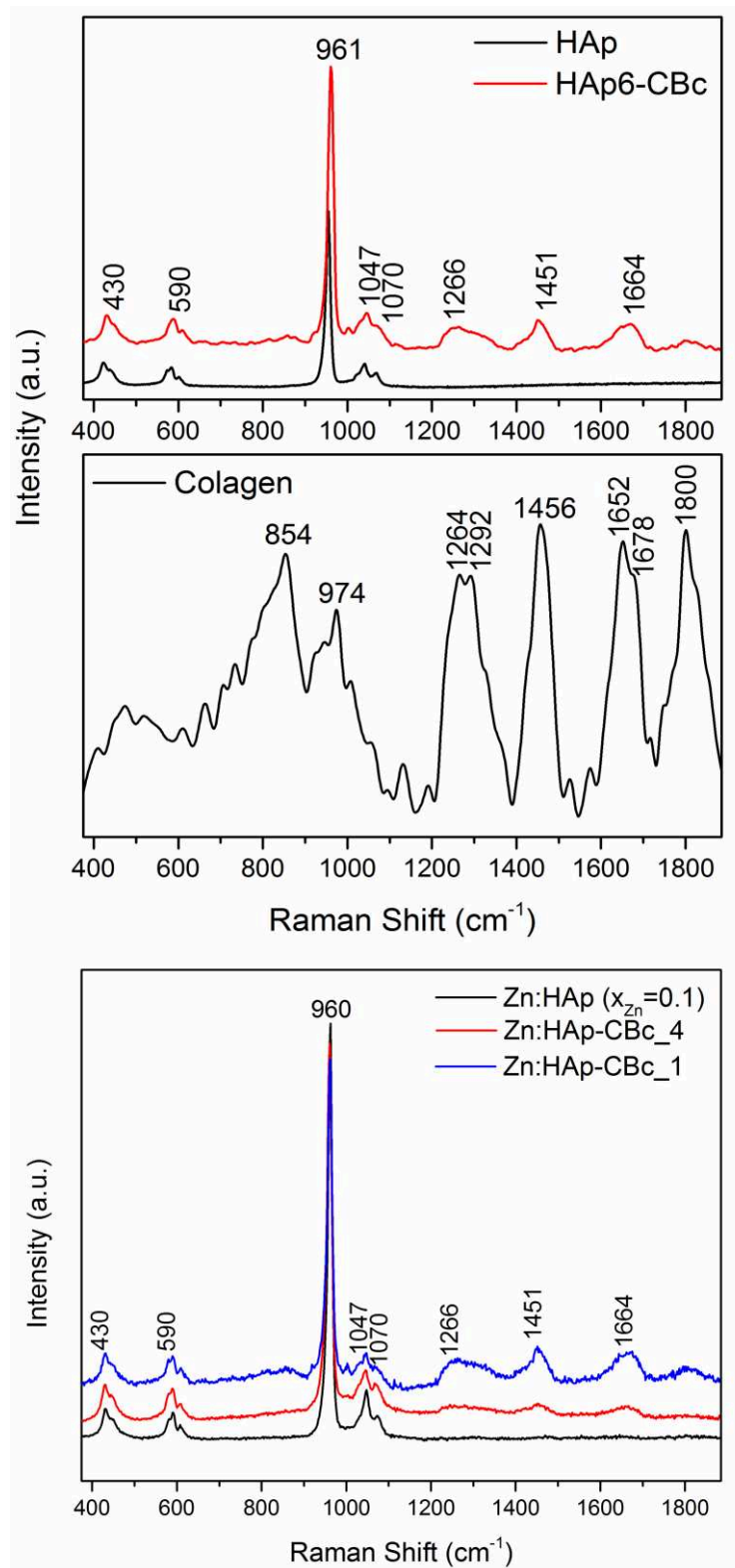


Figure 4.4: Spectres Raman des preuves HAp, C-HAp6, Collagène, HApZn10 , HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1 [11,15]

Tableau 4.1: Bandes Raman et modes vibrationnels correspondants [15]

Position maximale (cm ⁻¹)					
HAp	HAp6-CBc	HApZn10	HApZn10- CBc_4	HApZn10- CBc_1	Modes Vibrationnels
430	430	432	430	430	v2 PO_4^{3-}
-	-	445	444	447	v2 PO_4^{3-}
-	-	582	581	-	v4 PO_4^{3-}
590	590	591	590	590	v4 PO_4^{3-}
-	-	607	607	610	v4 PO_4^{3-}
961	960	962	960	960	v1 PO_4^{3-}
1047	1047	1047	1046	1047	v3 PO_4^{3-}
-	1070	-	1072	1070	v3 PO_4^{3-}
-	1266	-	1245	1266	v Amide III
-	1451	-	1451	1451	v C-H
-	1664	-	1664	1664	încovoiere v Amide I

4.2.5 Analyse thermique (TGA-DTA)

Les modifications chimiques des preuves Collagène, HAp, HAp6-CBc, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1 ont été investiguées à l'aide des études thermiques. Les courbes issues suite à l'analyse thermogravimétrique (TGA) et à l'analyse thermique différentielle (DTA) sont présentées dans la Figure 4.5. Les courbes TGA et DTA de ces preuves ont été obtenues dans l'air statique avec un taux linéaire de chauffage de 10°C/min, de 30°C à 800°C.

L'influence du collagène dans les preuves étudiées a été observée dans les courbes TGA des nanoparticules de HApZn10-CBc_1 (Figure 4.5 (d)) et HApZn10-CBc_4 (Figure 4.5 (b)). La perte totale de masse augmente quand la quantité de collagène de la preuve est supérieure (Zn:HAp-CBc_1). L'analyse thermogravimétrique (TGA) a montré une baisse de la masse perdue une fois avec la croissance de la quantité de nanoparticules de HApZn10 de la preuve (HApZn10-CBc_4).

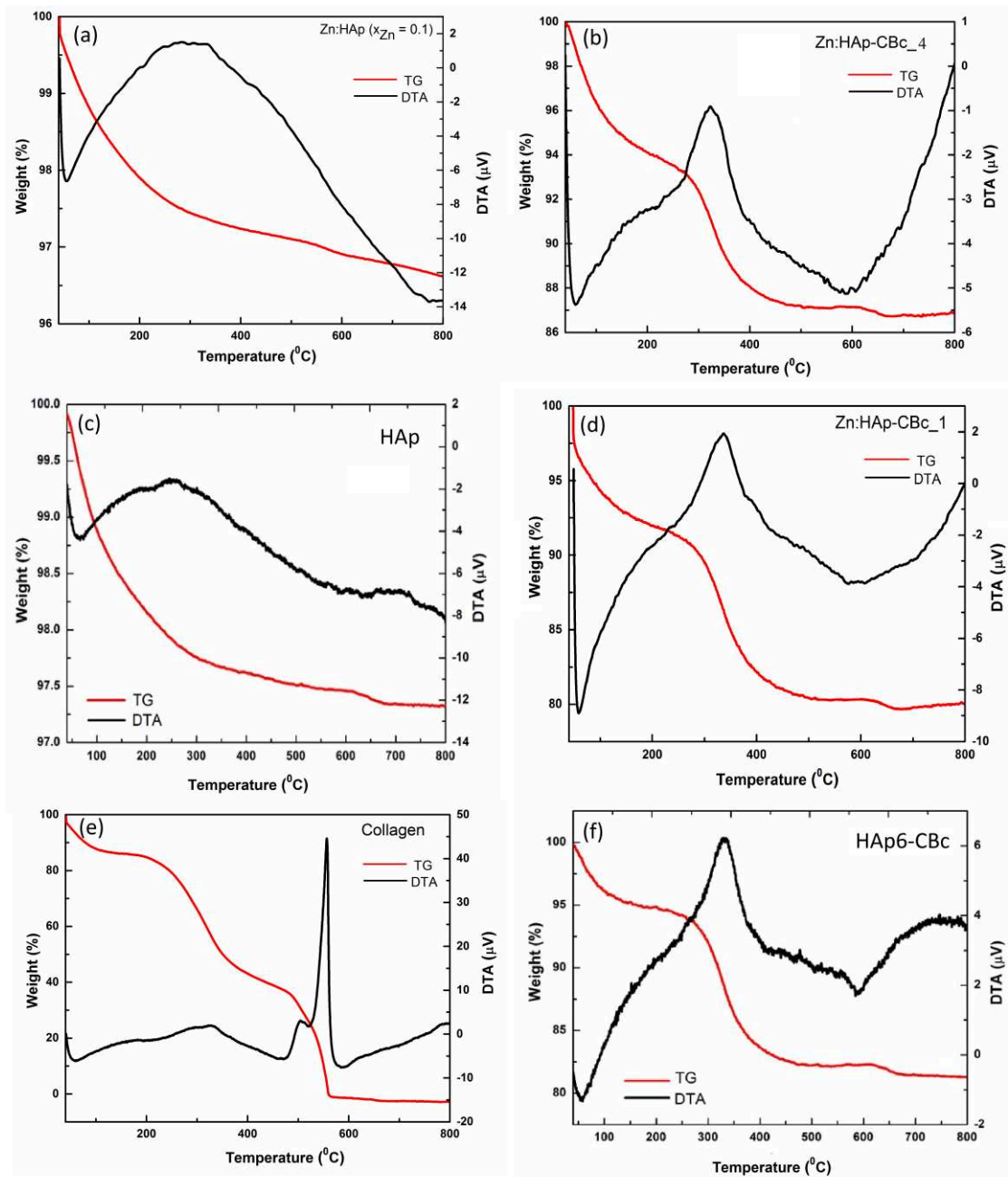


Figure 4.5: Courbes TGA et DTA des preuves HApZn10 (a), HApZn10-CBc_4 (b), HAp (c), HApZn10-CBc_1 (d), Collagène (e) et HAp6-CBc (f)

4.2.6 Mesures de porosité par adsorption – désorption de gaz (méthode BET)

Pour étudier la porosité des preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc (HApZn10) en matrice de collagène (HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1), ils ont été effectués des différentes méthodes d'adsorption physique comme BET, Freundlich et BJH. La surface spécifique (S_{BET}) des preuves a été déterminée de manière expérimentale par l'adsorption physique d'un gaz (azote) avec température basse (77K)

par la méthode BET. Des isothermes d'adsorption et désorption de gaz, ils ont pu être investigués par des différents paramètres spécifiques à l'hydroxyapatite dopée avec zinc en matrice de collagène. Ainsi, des courbes d'adsorption – désorption de gaz, ils ont pu être déterminés la texture et la surface spécifique des preuves et aussi le volume des pores et leur forme. La texture des preuves et du type de porosité présente dans la preuve analysée a été évaluée par l'intermédiaire de la classification BDDT [153].

Les surfaces spécifiques des preuves ont été déterminées des isothermes d'adsorption. Dans la Figure 4.6, ils sont présentés les isothermes d'adsorption – désorption de gaz des preuves.

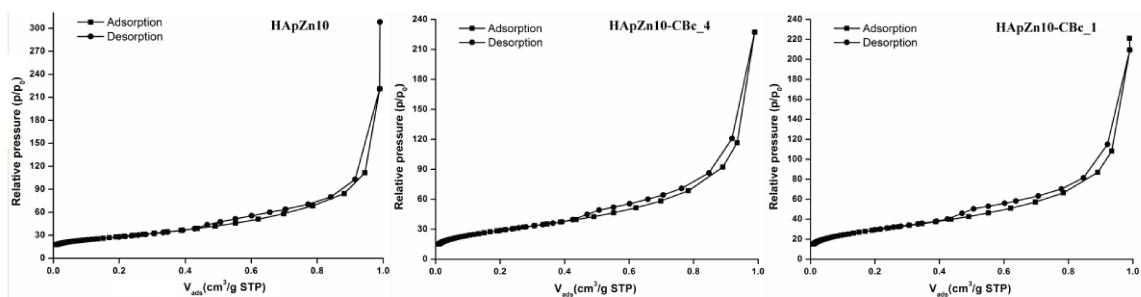


Figure 4.6: Isotherme d'adsorption – désorption de gaz des preuves HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1.

En tenant compte de la classification BDDT, les isothermes d'adsorption obtenues sont de type II [152]. Elles sont caractéristiques aux matériaux qui présentent un mélange de micro- et méso-porosité.

Figure 4.7: Distribution du volume des pores déduite de l'isotherme de désorption et Valeurs t-plot des isothermes d'adsorption correspondant aux preuves HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1.

Ils ont été calculés le volume de vapeurs nécessaires pour la couverture en totalité de la surface du solide avec une couche mono-moléculaire adsorbant (V_m), la constante caractéristique du système gaz-solide (C) et la surface spécifique BET (S_{BET}). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4.2, le coefficient de corrélation étant 0.9999.

Tableau 4.2: Valeurs calculées pour C, V_m et S_{BET}

Preuve	C	$V_m(\text{cm}^3/\text{g STP})$	$S_{BET}(\text{m}^2/\text{g})$
HApZn10	394.752	21.016	91.4856
HApZn10-CBc_4	111.222	23.818	103.685
HApZn10-CBc_1	105.535	23.554	102.537

D'autre partie, la distribution de la grandeur des pores a été déterminée par l'intermédiaire du modèle BJH [154], basé sur la condensation (capillaire) de l'azote en mésopores qui a lieu à une pression plus petite que la pression des vapeurs saturés de l'adsorbant. De la courbe de désorption, il a été déterminé le volume des pores selon la dimension des pores et la distribution de la grandeur des pores. Ainsi, dans la Figure 4.7 a-c, ils sont présentés les distributions du volume des pores correspondant aux preuves HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1. On a pu évaluer la porosité des preuves de 2 nm à l'environ 27 nm.

La méthode t-plot a été utilisée pour l'évaluation quantitative de la superficie de la surface externe et de la superficie des micropores externes, les résultats obtenus étant présentés dans la Figure 4.7 d-f.

Les courbes mises en évidence dans la Figure 4.7 d-f sont caractéristiques à un mélange de micro- et méso-pores, en montrant ainsi la nature des preuves HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1. Les valeurs déterminées pour la superficie de la surface externe, la superficie des micropores externes, la dimension et le volume des pores des trois preuves d'hydroxyapatite dopée avec zinc en matrice de collagène sont présentées dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.3: Valeurs calculées pour la superficie de la surface externe, la superficie des micropores externes, la dimension et le volume des pores

Preuve	Superficie de la surface externe (m^2/g)	Volume des micropores ($\text{cm}^3/\text{g STP}$)	Volume des pores ($\text{cm}^3/\text{g STP}$)	Dimension des pores (nm)
HApZn10	89.0519	0.004101	0.342	14.947
HApZn10-CBc_4	109.516	0.002853	0.324	12.494
HApZn10-CBc_1	112.099	0.004694	0.352	13.723

4.3 Études biologiques des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène

4.3.1 Étude de la cyto-toxicité

Dans la Figure 4.9, ils sont présentés des images des cellules HeLa suite à leur culture dans la présence des matériaux composites sur base d'hydroxyapatite pure et en matrice de collagène, et aussi dans la présence des composites sur base d'hydroxyapatite dopée avec zinc et hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène. On remarque le fait que les cellules HeLa cultivées dans la présence des matériaux composites étudiés ont une morphologie similaire avec celle de l'étalon. On peut observer des cellules polygonales, de manière homogène distribuées sur la surface.

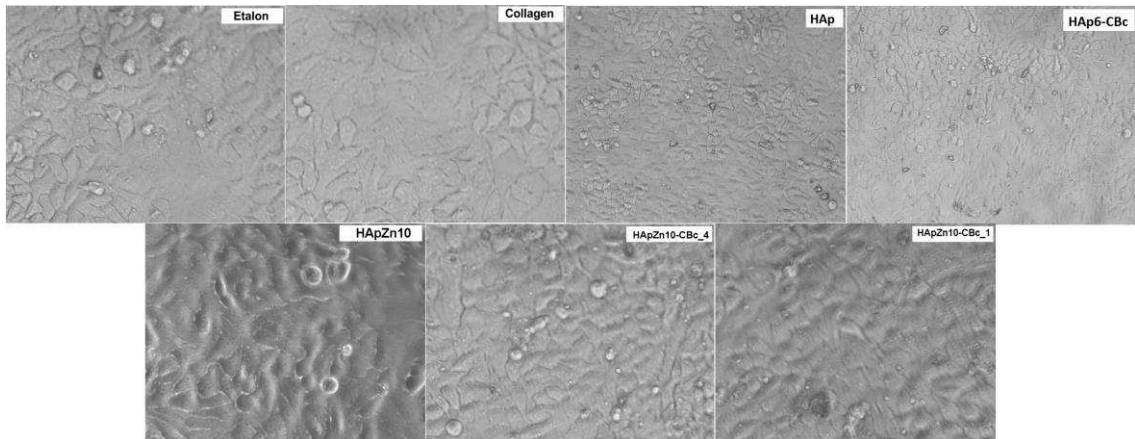


Figure 4.9: Études morphologiques des cellules HeLa avant et après l'exposition à Collagène, HApZn10, HAp, HAp6-CBc, HApZn10-CBc_1 et HApZn10-CBc_4 (10 mg/ml) pendant 72 h. Chaque expérience a été réalisée en triplicate [15]

4.3.2 Distribution du cycle cellulaire

L'influence des matériaux composites obtenus sur les cycles cellulaires des cellules HeLa a été étudiée par l'intermédiaire de la cytométrie de flux avec double – coloration des cellules avec Annexin V-FITC/ iodure de propidium. Quand les cellules HeLa ont été exposées au collagène, HApZn10-CBc_1, HApZn10-CBc_4 et HApZn10, ils n'ont pas été remarqués de modifications significatives. Sur la prolifération cellulaire et l'apoptose, les résultats des études suggèrent de n'avoir existé aucune différence entre les composites obtenus et les matériaux bruts utilisés (Figure 4.10 - étalon). Dans la

Figure 4.10, il est présenté la preuve de référence, l'analyse du cycle cellulaire des cellules HeLa cultivées avec 0.1% DMSO.

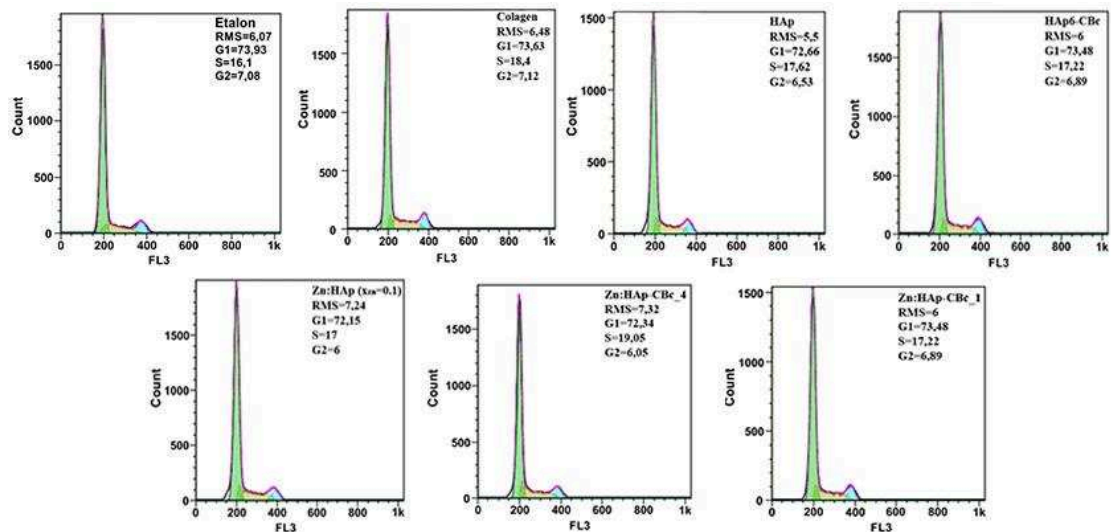


Figure 4.10: Analyse du cycle cellulaire des cellules HeLa cultivées avec 0.1% DMSO (étalon) et traitées avec collagène, HAp, HAp6-CBc, HApZn10, HApZn10-CBc_1 et HApZn10-CBc_4 [15]

Les études sur l'effet cytotoxique des nanoparticules d'hydroxyapatite dotée avec zinc en collagène sur la ligne cellulaire HeLa cancéreuse ont présentées une distribution homogène sur la surface des preuves, ayant une morphologie similaire avec celle de la preuve étalon. D'autre part, l'analyse du cycle cellulaire des cellules HeLa cultivées avec 0.1% DMSO (étalon) et traitées avec collagène, HAp, HAp6-CBc, HApZn10-CBc_1, HApZn10-CBc_4 et HApZn10 a montré de ne se remarquer aucune différence entre les composites obtenus suite au traitement et matériaux originaux en ce qui concerne la prolifération cellulaire et apoptose.

4.3.3 Évaluation des propriétés antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne des poudres de Collagène, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1 sur certaines des plus rencontrées souches Gram positives (*Staphylococcus aureus* 0364, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis*), Gram négative (*Pseudomonas aeruginosa* 1397, *Escherichia Coli* ATCC 25922) et sur

la souche de champignons *Candida albicans* ATCC 10231 a été qualitativement évaluée par une méthode adaptée à celle diffusimétrique.

Parmi les bactéries Gram négatives, la plus sensible souche à l'activité des composants testés sur base de zinc, hydroxyapatite et collagène a été *Pseudomonas aeruginosa* 1397. D'autre partie, les bactéries Gram positives *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Staphylococcus aureus* 0364 n'ont pas présentées la sensibilité devant les matériaux testés. Une sensibilité élevée par rapport aux composants testés a été observée dans le cas de la souche de champignons *Candida albicans* ATCC 10231. L'analyse qualitative de l'activité antimicrobienne des nanoparticules utilisées a montré que celles-ci présentent un spectre différent d'activité antimicrobienne. Ainsi, toutes les nanoparticules testées ont été actives par rapport à la souche de champignons testée.

La quantification de l'activité antimicrobienne des poudres de collagène HApZn10, HApZn10-CBc_4 și HApZn10-CBc_1, par l'observation de l'apparition d'une zone d'inhibition est présentée dans la Figure 4.11. Tel qu'on peut observer dans la Figure 4.11, la plus sensible souche microbienne a été *C. albicans* avec des zones d'inhibition clairement délimitées.

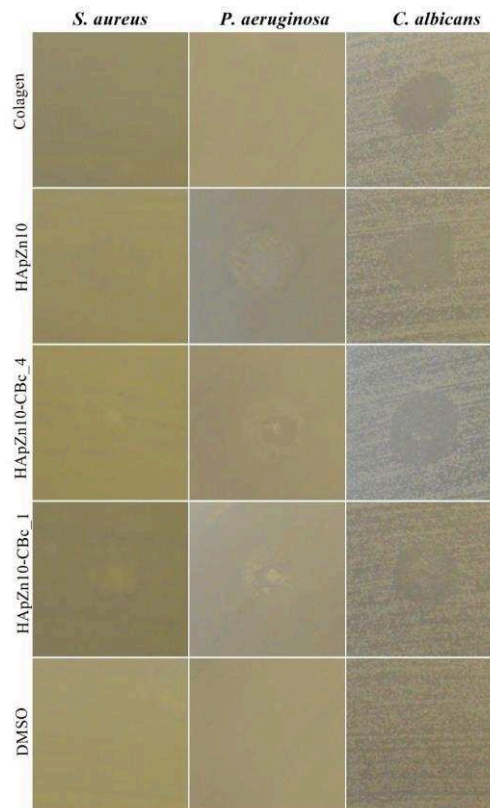


Figure 4.11: L'évaluation qualitative de l'activité inhibitrice des poudres de Collagène, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1, sur les bactéries Gram-positives

(*Staphylococcus aureus* 0364), Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* 1397) et de la souche de champignons *Candida albicans* ATCC 10231.

Suite à l'analyse qualitative des propriétés antimicrobiennes des poudres de Collagène, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1, on a observé que tous les matériaux qui contiennent zinc ont manifesté une action inhibitrice, bactériostatique / bactéricide sur les souches testées. Tel qu'on a pu observer dans la Figure 4.11, la plus sensible souche Gram-négative à l'activité des composants sur base de zinc est *Pseudomonas aeruginosa* 1397 avec des zones d'inhibition nettement délimitées. De même, dans le cas de la souche Gram-positif, *Staphylococcus aureus* 0364, on a pu observer des signes de l'activité inhibitrice des matériaux HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1, mais moins prononcés. Une activité inhibitrice intense de tous les matériaux testés a été observée par rapport à la souche de champignons *Candida albicans* ATCC 10231.

4.4 Conclusions

Les résultats de cette étude soulignent l'influence du processus d'incorporation de l'hydroxyapatite dans la matrice de collagène. Dans ce but, ils ont été étudiés la structure, la morphologie et les modifications chimiques des preuves préparées en préalable par la méthode de la co-précipitation à basse température. Les diffractogrammes obtenues suggèrent le fait que toutes les preuves présentent la structure caractéristique de l'hydroxyapatite, bien que le collagène semble à déterminer une diminution de la cristallinité. Cette diminution de la cristallinité des preuves analysées a été observée aussi dans les images MEB. De même, dans les micrographies MEB on a pu remarquer une diminution de la dimension moyenne des particules et aussi une croissance de la porosité une fois avec la croissance de la concentration de collagène. En ce qui concerne la présence des groupements fonctionnels dans les preuves étudiées, les spectres FTIR et Raman suggèrent la présence des bandes caractéristiques à l'hydroxyapatite associée en principal aux groupements phosphate, carbonate et hydroxyle, la présence du collagène en déterminant une diminution de l'intensité des maximales, un élargissement et un lisage de toutes les maximales observées dans les spectres obtenus dans les spectres obtenus, et aussi l'apparition de

certaines maximales supplémentaires caractéristiques à la structure du collagène. Les études thermiques ont été effectuées pour la détermination des modifications chimiques qui ont lieu dans la structure des preuves HAp, HAp6-CBc, HApZn10, HApZn10-CBc_4 et HApZn10-CBc_1. En analysant les courbes DTA, on a pu mettre en évidence les maximales exothermiques. La preuve HAp présente deux maximales à 161°C et 700°C, pendant que dans le cas de la preuve HAp6-CBc, on remarque la présence de trois maximales à 161°C, 330°C et respectivement 730°C. En plus, la perte majeure de masse se produit dans le cas des deux preuves pour des températures inférieures à 620°C, et pour des températures supérieures, la perte de masse reste constante [15].

En conclusion, cette étude a montré que l'intégration de l'hydroxyapatite synthétique dans la matrice de collagène détermine la formation d'un nouveau composant avec la structure caractéristique de l'hydroxyapatite pure, mais qui a une dimension moyenne des particules inférieure à celle observée pour HAp, un degré de porosité supérieur et une cristallinité plus basse [15].

Les propriétés antimicrobiennes des preuves investiguées (Collagène, HApZn10, HApZn10-CBc_4, et HApZn10-CBc_1) ont été évaluées pour les souches bactériennes Gram positives (*Staphylococcus aureus* 0364, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis*), Gram négatives (*Pseudomonas aeruginosa* 1397, *Escherichia Coli* ATCC 25922) et sur la souche de champignons *Candida albicans* ATCC 10231. Les résultats obtenus ont démontré que tous les matériaux qui contiennent zinc ont manifesté une action inhibitrice, bactériostatique / bactéricide sur les souches testées, le plus important effet pouvant être observé pour *C. albicans*.

D'autre partie, les études préliminaires in vitro ont montré que les matériaux composites sur base d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène présentent une excellente biocompatibilité, étant indiquées pour les futures études in vivo. De même, elles pourraient être adéquates aussi pour l'utilisation comme biomatériaux pour la régénération osseuse [11].

Vu les résultats prometteurs obtenus pour les matériaux composites sur base d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène, on peut dire que les nouveaux composites sont des biomatériaux qui pourraient être utilisés dans des différentes applications biologiques comme matériaux remplaçants pour le tissu osseux [11].

5^{ème} chapitre: Caractérisation ultrasonore des biomatériaux céramique sur base d`hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc

Dans ce chapitre, ils sont présentés les résultats expérimentaux des mesures d`ultrasons effectuées sur des solutions et d`hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc.

Pour l`interprétation des signaux ultrasonores, ils ont été utilisés des programmes spécialisés, capables à offrir des renseignements essentiels sur les paramètres caractéristiques de chaque matériel étudié.

5.1 Caractérisation ultrasonore des dispersions d`hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec zinc (HApZn7 et HApZn20)

La vitesse de propagation des ondes acoustiques dans des liquides homogènes peut être calculée avec la relation :

$$c = \sqrt{\frac{1}{\kappa\rho}} \quad (5.1)$$

où κ représente la compressibilité adiabatique, l`inverse du module élastique de compression K ($K = 1/\kappa$).

En utilisant les dépendances de température des grandeurs impliquées, on peut tracer la dépendance de la compressibilité adiabatique de l`eau pure (Figure 5.1).

La vitesse des ultrasons par des solutions et suspensions, dans l`approximation linéaire des petites perturbations, dépende de la densité moyenne et de la compressibilité moyenne. Ces valeurs sont calculées après les équations d`Urlick :

$$c = \frac{1}{\sqrt{\kappa\rho}}; \quad \kappa = \sum_i \Phi_i \kappa_i; \quad \rho = \sum_i \Phi_i \rho_i \quad (5.2)$$

où Φ_i représente la fraction (la participation) volumique de la compéente i . La fraction volumique peut être transformée en fraction massique, tel qu'il suit:

$$w = \frac{\Phi \rho_2}{\Phi \rho_2 + (1 - \Phi) \rho_1} \quad (5.3)$$

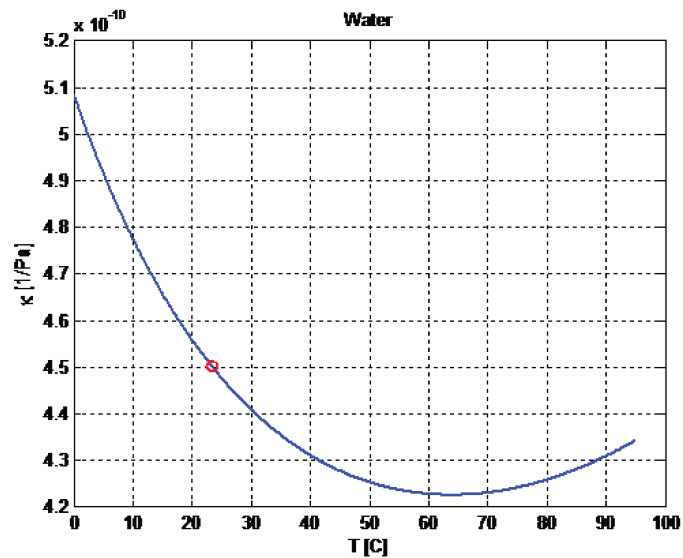


Figure 5.1: Coefficient de compressibilité adiabatique de l'eau pure comme fonction de température

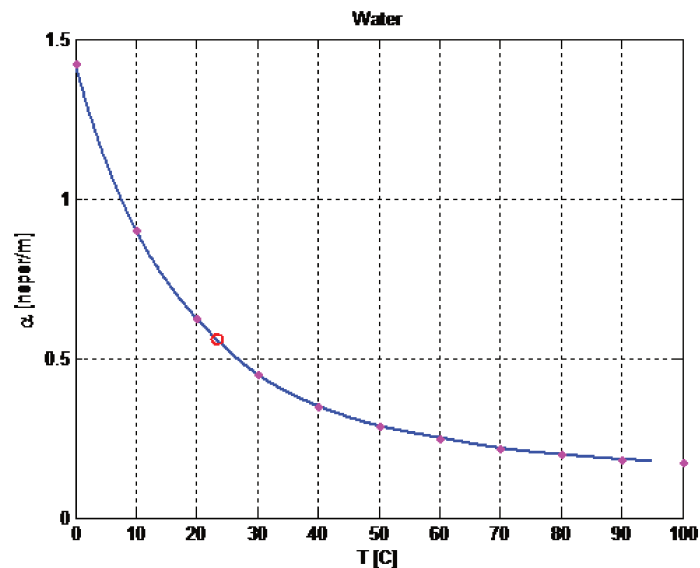


Figure 5.2: Coefficient d'atténuation des ondes acoustiques dans l'eau pure, fonction de température

Dans le cas d'une solution avec deux phases, notées avec l'indice 1 pour la phase 1 et 2 pour la phase dispersée [179-180]:

Pour l'effectuation de certaines études comparatives par l'intermède des ultrasons, ils ont été choisis trois matériaux avec trois concentrations de zinc différentes, sélectionnées de telle manière afin de mettre en évidence l'influence de la concentration de dopant sur les paramètres caractéristiques du matériel. Ainsi, les matériaux choisis ont été l'hydroxyapatite (HAp) et l'hydroxyapatite dopée avec zinc ayant $x_{Zn}=0.07$ (HApZn7) et $x_{Zn}=0.2$ (HApZn20).

Les solutions sur base d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc ($x_{Zn}=0.07$ et $x_{Zn}=0.2$) ont contenu 25 g de matériel de suspension en 500 ml eau bi-distillée. Pour une meilleure homogénéité des suspensions, les mélanges ont été continuellement agités par un agitateur magnétique. Les solutions finales ont été introduites dans le récipient contrôlé du point de vu thermique. La température des solutions a été maintenue constante à 21°C. Au cours des mesures, la suspension d'hydroxyapatite dans la solution a été stable, et à la fin de l'expérience, on n'a pas observé des nanoparticules précipitées. Les signaux obtenus ont été affichés et stockés à l'aide d'un oscilloscope.

Les instruments utilisés pour la caractérisation ultrasonore des dispersions d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc sont présentés dans les Figures 5.3-5.4.

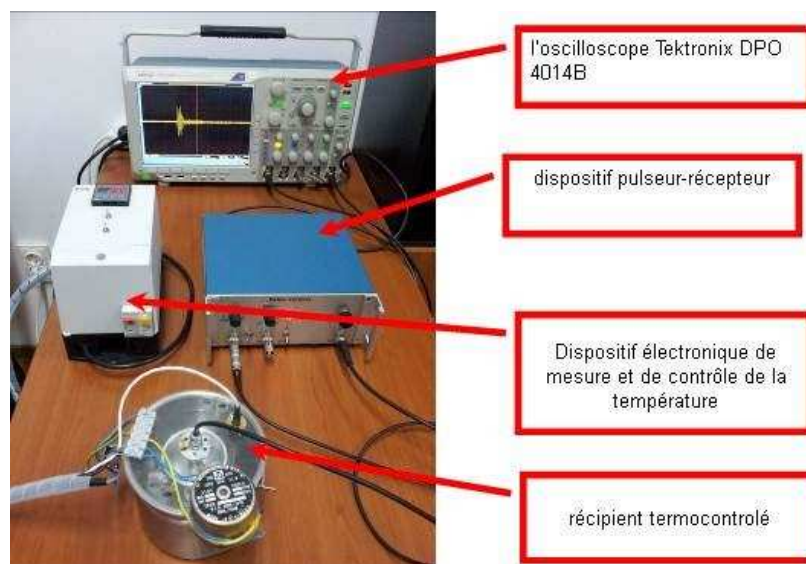


Figure 5.3: Vue d'ensemble de la chaîne de mesure



Figure 5.4: Récipient thermo-contrôlé (gauche) et bloc électronique de contrôle (droit)



Figure 5.5: Appareil pulser-receiver (en haut) et récipient à fond plat utilisé pour les volumes inférieurs de liquide (en bas)

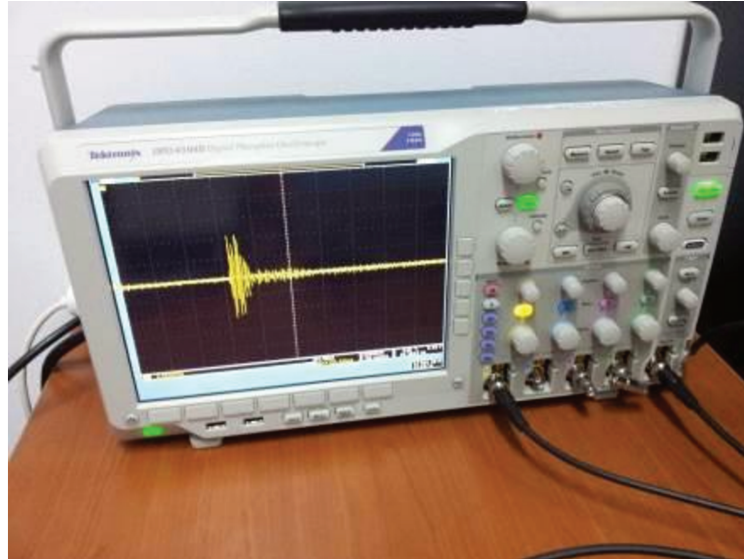


Figure 5.6: Oscilloscope utilisé pour l'affichage et stockage des signaux mesurés

L'eau est le fluide le plus utilisé pour la dissolution des différentes nanoparticules ou autres substances. La densité de l'eau pure dépend de la température conformément à la Figure 5.7.

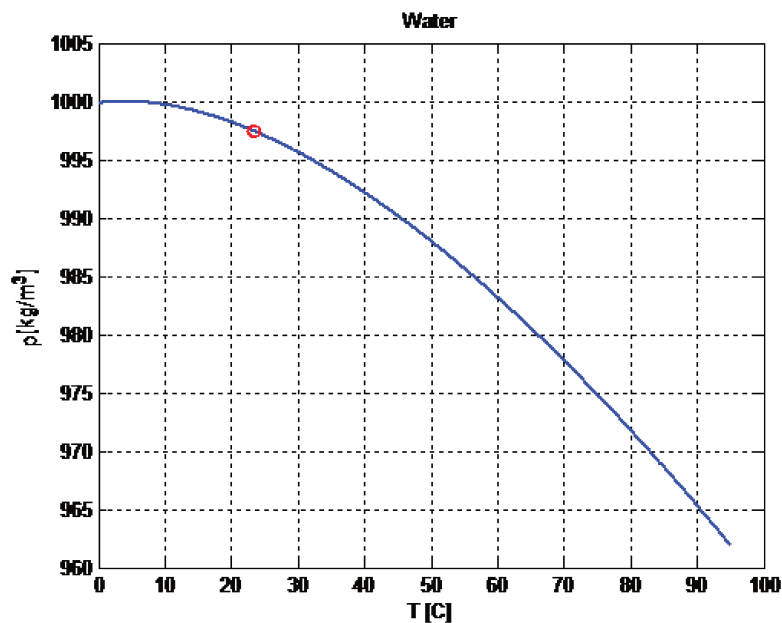


Figure 5.7: Dépendance de la densité de l'eau pure de température

Il doit remarquer que l'eau comporte un composant acoustique ultrasonore différent dans plusieurs aspects par rapport aux autres fluides. Par exemple, en-dessous de 74°C le gradient de la vitesse de propagation des ultrasons dans l'eau est positif,

pendant que pour la plupart des liquides il est négatif. Une autre propriété spéciale est le coefficient de dilatation négatif en-dessous de 4°C. Cependant, pour l'eau ils sont disponibles plusieurs résultats expérimentaux, ce qui facilite les études basées sur celle-ci.

La température est un facteur important, parce que la longueur de la voie acoustique se modifie grâce à la température, mais aussi la vitesse des ultrasons dans l'eau dépende en grande mesure de la température. On peut considérer avec bonne approximation que la vitesse des ondes élastiques varie dans l'eau avec environ 3 m/(s·K) à une température moyenne de 20°C, et nous pouvons avoir une erreur de 0,1 °C dans la mesure de la température et d'avoir une erreur de 0,3 m/s dans la détermination de la vitesse.

Pendant les recherches effectuées, nous avons vérifié plusieurs valeurs sur la courbe confirmée par plusieurs scientifiques [181-183]. La courbe tracée dans la Figure 5.8 est la courbe utilisée au cours des études effectuées.

L'étalonnage de la chaîne de mesure a été fait avec l'eau double distillée, à une température mesurée avec une précision de 0,1°C. Tous les autres paramètres ont été conservés constants à une modification du fluide testé.

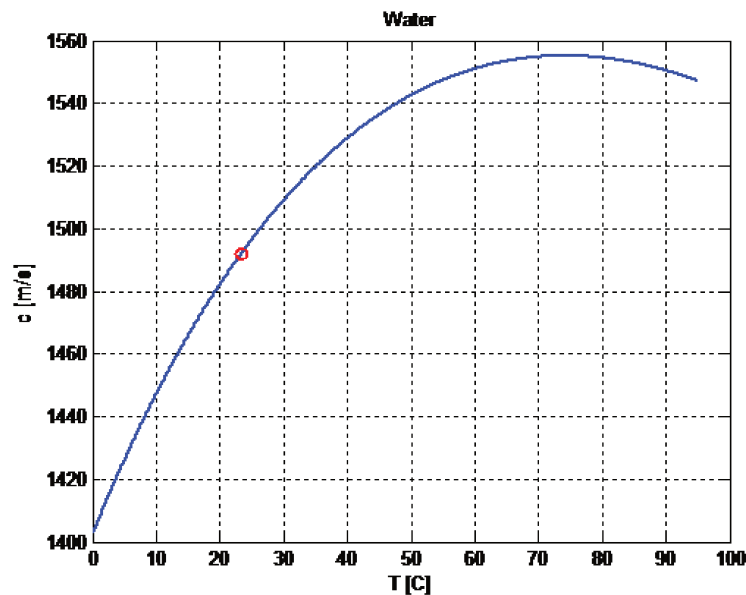


Figure 5.8: Courbe de la vitesse de propagation des ultrasons dans l'eau comme fonction de température

À la température déterminée (21°C) pour les fluides mesurés, les valeurs des grandeurs ci-dessus présentées pour l'eau pure sont : la vitesse des ondes acoustiques =

1492.07 m/s; densité de l'eau pure = 997.47 kg/m³; coefficient de compressibilité adiabatique = 4.5032e-010 1/Pa; coefficient d'atténuation = 0.558845 (Np/m) pour f=5 MHz.

Tableau 5.1: Densités des dispersions de HAp, HApZn7 et HApZn20

Preuve	Densité (g/cm ³)
H2O	0.9997
HAp	1.0129
HApZn7	1.0062
HApZn20	1.0057

On remarque une petite différence entre la densité standard de l'eau à 21°C (997,47 kg/m³) et celle mesurée (999,7 kg/m³). Cette différence peut s'expliquer par les possibles gaz dissous.

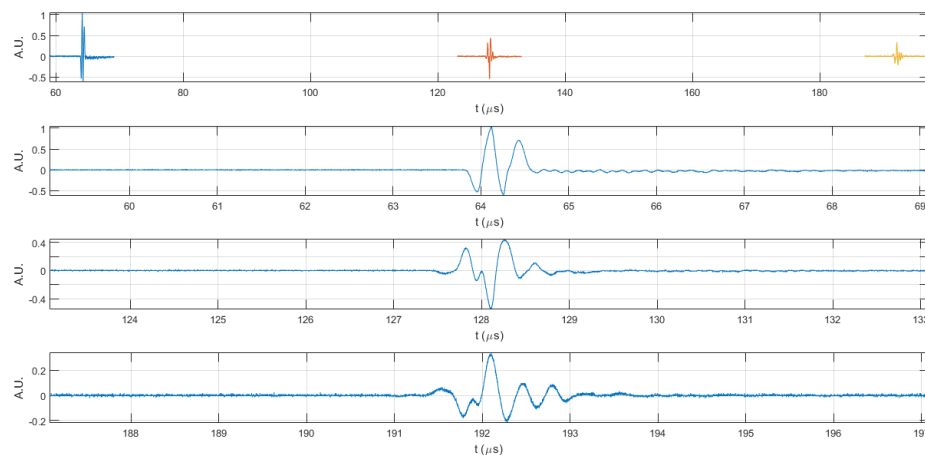


Figure 5.9: Signaux acquis pour l'eau double distillée, groupés (en haut) et les trois échos séparés (en bas) [134]

Les intervalles de temps entre les échos permettent la détermination avec précision de la distance entre la face du transducteur et la surface du fond de la glace d'aluminium utilisé. On utilise la vitesse des ondes ultrasonores dans l'eau double distillée, à la température mesurée, conformément à la Figure 5.8.

Les signaux obtenus ont été traités en utilisant un algorithme spécialisé implémenté dans le programme „Matlab”, et la modélisation de l'effet des ondes

ultrasonores sur les nanoparticules de HAp, HApZn7 et HApZn20 a été réalisée avec un modèle original implémenté dans le programme „Comsol”.

Le programme spécialisé pour l'analyse des signaux temporels permet la détermination des différences de temps entre les échos équivalents dans des fluides différents, avec précision de 1 ns. Pour tous les fluides testés, la référence est l'eau bi-distillée. Les petits signaux observés avant le deuxième et le troisième écho représentent les signaux des réflexions multiples sur le fond plan du récipient d'aluminium utilisé pour les fluides testés. Ces signaux n'affectent pas les résultats obtenus dans le programme d'interprétation des signaux.

L'algorithme est basé sur l'inter-corrélation des valeurs absolues des signaux comparés. Suite à l'analyse des signaux obtenus pour l'eau bi-distillée, il a été calculé la distance entre la face du transducteur et le fond plat du récipient d'aluminium, en résultant la distance de 47.91 mm. La température de l'eau pendant les mesures a été de 21°C, correspondant à la vitesse ultrasonore standard de 1492.07 m/s.

Dans la Figure 5.10, ils sont présentés les signaux des premiers trois échos acquis pour la dispersion sur base d'HAp.

Vu les paramètres HAp, ils ont été obtenus les différences temporelles entre chacun des trois échos obtenus pour l'eau bi-distillée, d'une part et la dispersion sur base d'hydroxyapatite, d'autre part. Ainsi, dans le cas du premier écho enregistré pour l'eau bi-distillée et la dispersion sur base d'hydroxyapatite, on a enregistré une différence temporelle de 1.67 μ s. Dans le cas du deuxième écho, la différence temporelle a été de 3.255 μ s, celle-ci étant correspondante à une différence entre les signaux équivalents de 1.628 μ s. Similairement, pour le troisième écho, la différence temporelle jusqu'à cet écho a été de 5.17 μ s, en s'obtenant ainsi une différence temporelle de 1.723 μ s [134].

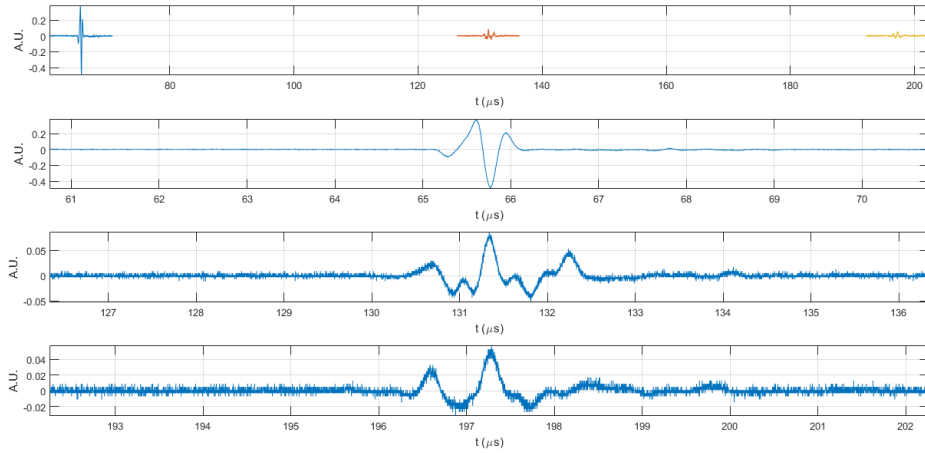


Figure 5.10: Signaux acquis pour HAp dispersée dans l'eau double distillée, groupés (en haut) et les trois échos séparés (en bas) [134]

En utilisant la moyenne de ces différences temporelles et la distance parcourue par les signaux (qui a été calculée du temps de parcours dans l'eau double distillée), on a obtenu la vitesse des ultrasons par la dispersion sur base d'hydroxyapatite (1454.17 ± 1.06 m/s) et une atténuation de 9.11055 Np/m (1.04889 dB/m) [134].

Dans la Figure 5.11, Figure 5.12 et Figure 5.13, ils sont présentés les superpositions des trois échos obtenus pour l'eau bi-distillée et la dispersion d'hydroxyapatite. On peut observer légèrement les petits signaux des réflexions multiples sur le fond plat du récipient d'aluminium dans le cas de l'eau bi-distillée (signaux bleus). La disparition de ces signaux de petite intensité dans le cas des dispersions sur base d'hydroxyapatite (signaux oranges) est déterminée par l'atténuation augmentée du signal ultrasonore pour ce milieu. Bien que la superposition des signaux semble imparfaite dans ces figures, il doit comprendre que le décalage de temps est optimisé dans le sens de la superposition optimale des modules des signaux, afin d'éviter le problème du saut de phase du signal à la réflexion sur la paroi d'aluminium. Dans les Figures 5.11 b) et 5.12 b), ils sont mis en évidence ces superpositions des signaux en valeur absolue, en pouvant observer une corrélation optimale entre les deux signaux.

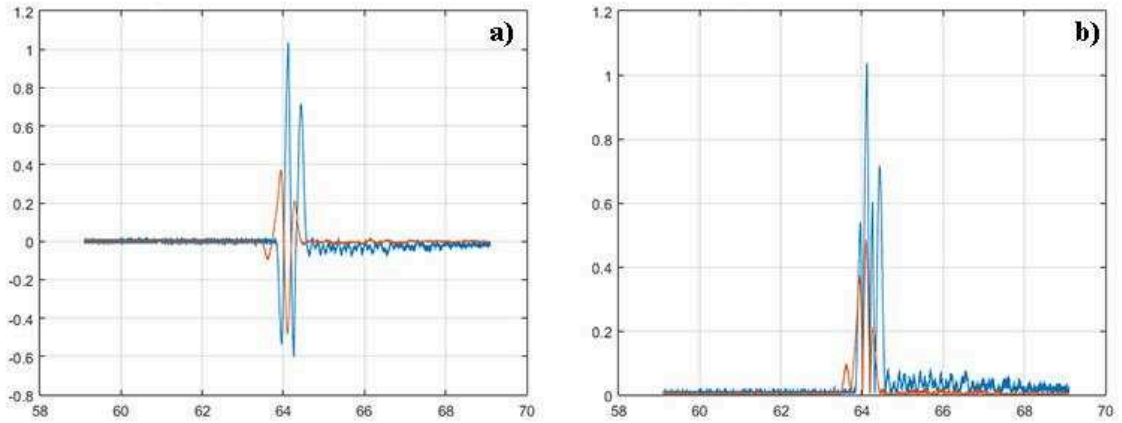


Figure 5.11: a) Superposition du premier écho du signal de l'eau (bleu) et celui de l'hydroxyapatite (HAp) dispersée (orange); b) mise en évidence d'une bonne superposition des signaux en valeur absolue

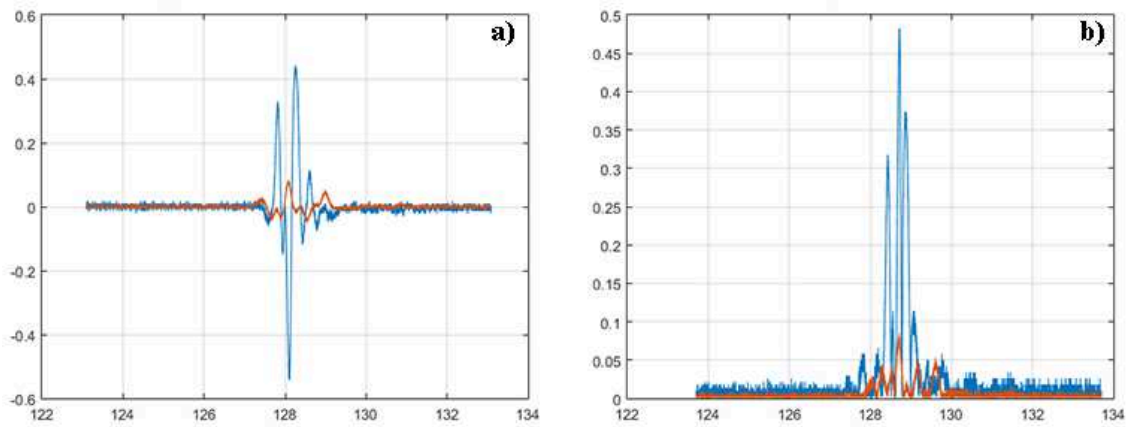


Figure 5.12: a) Superposition du deuxième écho du signal de l'eau (bleu) et celui de l'hydroxyapatite (HAp) dispersée (orange); b) mise en évidence d'une bonne superposition des signaux en valeur absolue

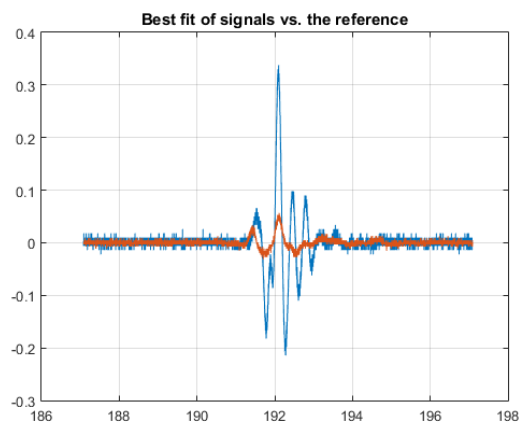


Figure 5.13: Superposition du troisième écho du signal de l'eau (bleu) et celui de l'hydroxyapatite (HAp) dispersée (orange)

Dans la Figure 5.14, ils sont présentés les signaux des premiers trois échos acquis pour la dispersion sur base d` HApZn7.

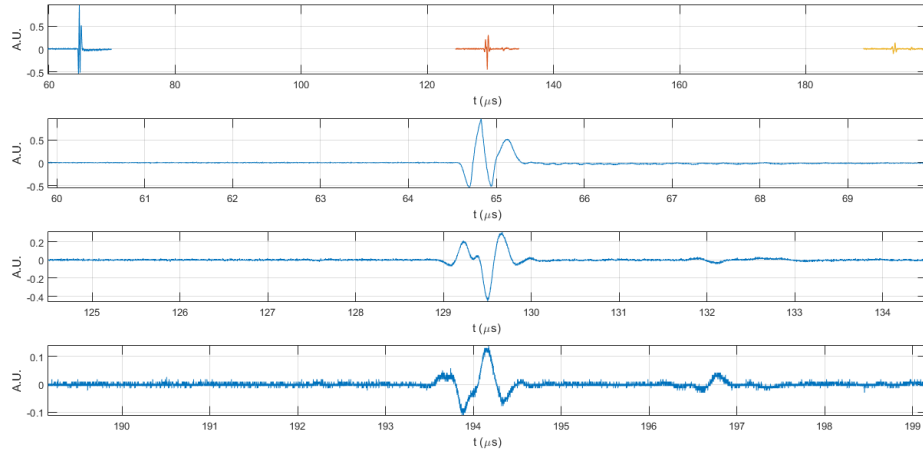


Figure 5.14: Signaux acquis pour HApZn7 dispersée dans l`eau double distillée, groupés (en haut) et les trois échos séparés (en bas)

Comme dans le cas de la dispersion d`HAp, ils ont été obtenus les différences temporelles entre chacun des trois échos obtenus pour l`eau bi-distillée, d`une partie et la dispersion sur base de HApZn7, d`autre partie. En comparaison le premier écho enregistré pour l`eau bi-distillée et la dispersion de HApZn7, on a obtenu une différence temporelle de 0.703 μs . Dans le cas du deuxième écho, la différence temporelle est 0.701 μs . Similairement, pour le troisième écho, la différence temporelle est de 0.691 μs .

Vu ces différences temporelles, on a obtenu la vitesse ultrasonore par la dispersion sur base de HApZn7, la dernière ayant une valeur 1476.02 +/- 0.15m/s et une atténuation de 3.87419 Np/m (0.446033 dB/m).

Les Figures 5.15-5.17 présentent en détail la superposition des premiers trois échos enregistrés pour l`eau bi-distillée (signal bleu) et, respectivement HApZn7 dispersée dans l`eau bi-distillée (signal orange).

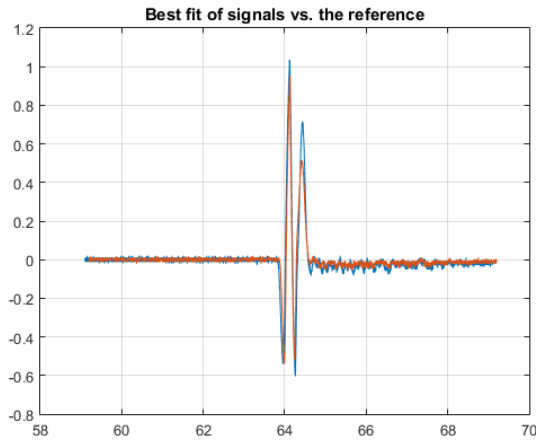


Figure 5.15: Superposition du premier écho du signal de l'eau (bleu) et celui de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.07$ (HApZn7) dispersée (orange)

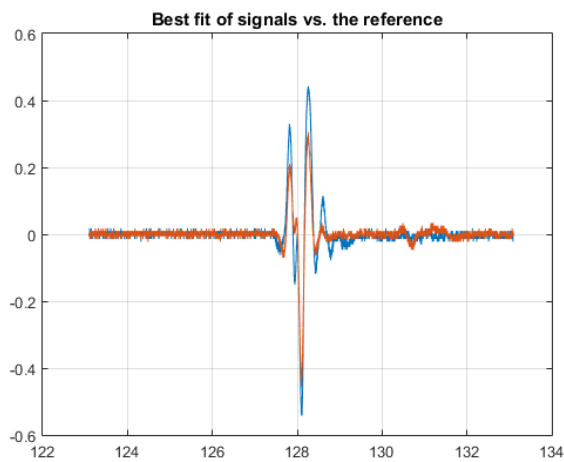


Figure 5.16: Superposition du deuxième écho du signal de l'eau (bleu) et celui de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.07$ (HApZn7) dispersée (orange)

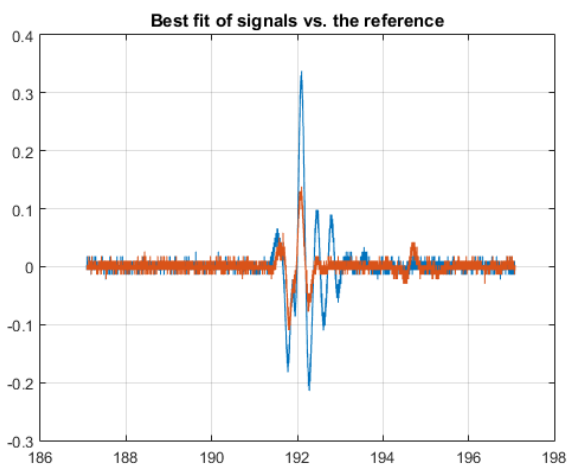


Figure 5.17: Superposition du troisième écho du signal de l'eau (bleu) et celui de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.07$ (HApZn7) dispersée (orange)

La Figure 5.18 présente les signaux acquis pour l'hydroxyapatite dopée avec une grande concentration de zinc (HApZn20) dispersée dans l'eau bi-distillée. Ils ont été calculés les différences temporelles entre les signaux des premiers trois échos obtenus pour l'eau bi-distillée et celles obtenues pour HApZn20. Ainsi, pour le premier écho, il a résulté une différence temporelle de 0.016 μs , dans le cas du deuxième écho, il a été calculé une différence temporelle de 0.0225 μs , et pour le troisième écho, la différence temporelle issue a été de 0.022 μs .

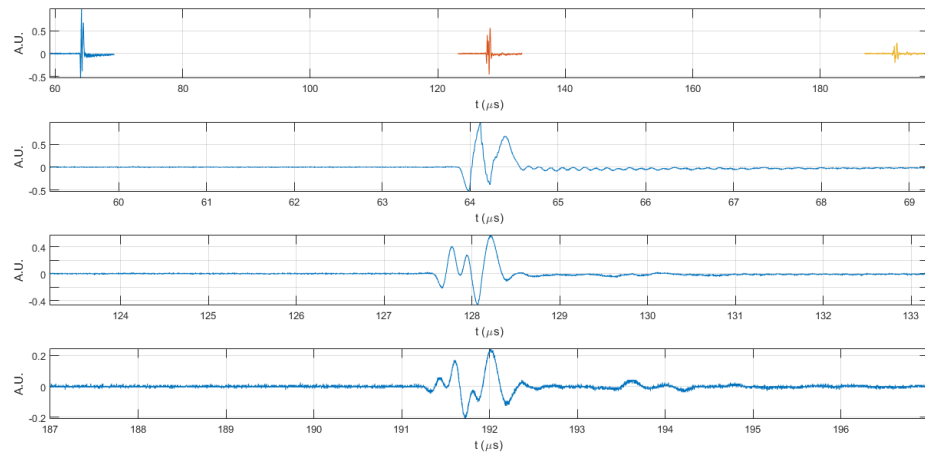


Figure 5.18: Signaux acquis pour HApZn20 dispersée dans l'eau double distillée, groupés (en haut) et les trois échos séparés (en bas)

Suite à la médiation des différences temporelles, on a obtenu la vitesse ultrasonore par la dispersion de HApZn20. Sa valeur a été de 1492.54 +/- 0.08 m/s, et pour l'atténuation on a obtenu la valeur de 2.823 Np/m (0.325 dB/m).

La superposition des premiers trois échos obtenus pour l'eau bi-distillée (signal bleu) et la dispersion de HApZn20 (signal orange) sont présentées séparément dans les Figures 5.19-5.21.

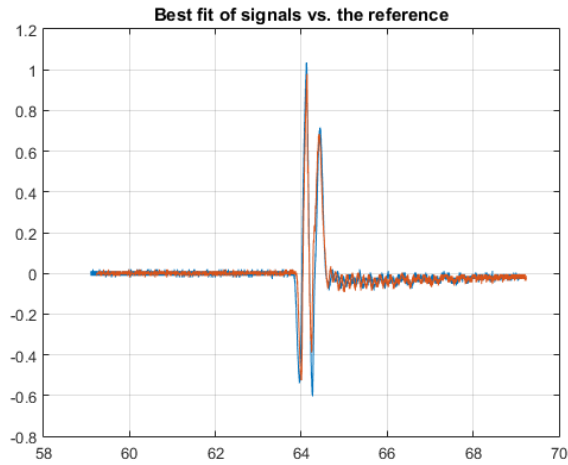


Figure 5.19: Superposition du premier écho du signal de l'eau (bleu) de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.2$ (HApZn20) dispersée (orange)

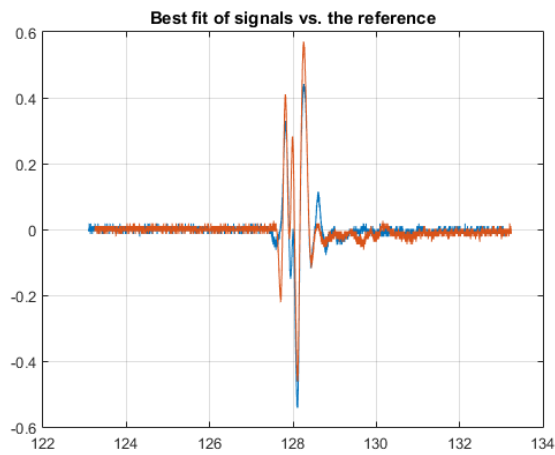


Figure 5.20: Superposition du deuxième écho du signal de l'eau (bleu) de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.2$ (HApZn20) dispersée (orange)

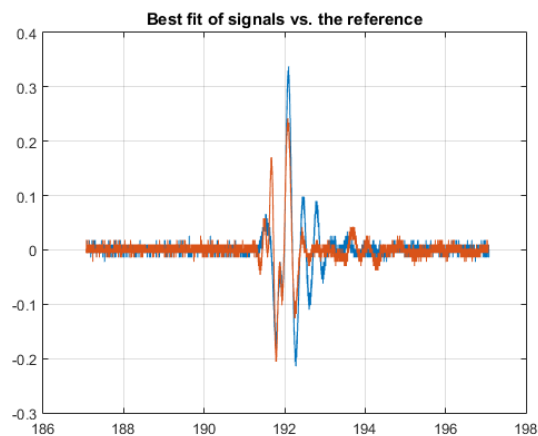


Figure 5.21: Superposition du troisième écho du signal de l'eau (bleu) de l'hydroxyapatite dopée avec zinc avec $x_{Zn}=0.2$ (HApZn20) dispersée (orange)

Pour toutes les trois dispersions étudiées (HAp, HApZn7 et HApZn20) on peut observer que les intensités des signaux associées aux dispersions sont plus diminuées comparativement avec celles associées à l'eau bi-distillée. Ce comportement est dû à l'atténuation augmentée par les dispersions investiguées.

Les résultats obtenus pour toutes les solutions investiguées ont été centralisés et ils sont présentés dans le Tableau 5.2. On peut observer qu'une fois avec la croissance de la concentration de zinc des composants d'hydroxyapatite dopée avec zinc, la densité des dispersions baisse et la vitesse ultrasonore augmente. Ainsi, on peut observer une dépendance entre la concentration de zinc et la vitesse de propagation des ondes ultrasonores par les milieux aqueux.

Tableau 5.2: Valeurs expérimentales

Preuve	Densité (g/cm ³)	Vitesse de propagation (m/s)	Atténuation (Np/m)
H2O	0.9997	1492.07	0.558845
HAp	1.0129	1454.17 +/- 1.06	9.11055
HApZn7	1.0062	1476.02 +/- 0.15	3.87419
HApZn20	1.0057	1492.54 +/- 0.08	2.8226

5.2 Dispersion des ondes ultrasonores d'haute fréquence des nanoparticules dispersées dans l'eau bi-distillée

La propagation des ondes planes dans un liquide est décrite par l'équation différentielle des ondes, qui pour la pression acoustique (p_a) peut être décrite avec la formule :

$$\frac{\partial^2 p_a}{\partial t^2} = c^2 \Delta p_a \quad (5.5)$$

La variation de la pression acoustique produit un mouvement local harmonique des particules de liquide. La relation entre la vitesse locale $\dot{\bar{U}}_a$ et la pression acoustique locale peut être décrite par la formule :

$$p_0 \frac{\partial \dot{\bar{U}}_a}{\partial t} = -\nabla p_a \quad (5.6)$$

Cette équation décrit en fait la relation entre l'accélération locale et le gradient de pression.

La propagation des ondes élastiques dans un milieu solide produit de petits déplacements $\bar{U} = u\bar{i} + v\bar{j} + w\bar{k}$, de composants u, v, w sur un système d'axes fixe. Ces ondes produisent des déformations du milieu, et conformément aux équations constitutives du matériel, ils génèrent des tensions mécaniques. L'équation de mouvement différentiel est

$$(\lambda + \mu)\nabla(\nabla \cdot \bar{U}) + \mu\Delta\bar{U} = \rho\ddot{\bar{U}} \quad (5.7)$$

où λ et μ sont les coefficients Lamé du matériel. La relation entre ces coefficients et les constants E (module d'Young) et ν (coefficient Poisson) est définie par les formules:

$$\lambda = \frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)}; \mu = \frac{E}{2(1+\nu)} \quad (5.8)$$

Modèle basé sur les éléments finis (MEF)

La Méthode des Éléments Finis (MEF) peut être appliquée pour la résolution des problèmes de l'interaction entre les ondes élastiques qui se propagent en fluide et les nanoparticules solides élastiques immergées dans le même liquide.

Le premier inconvénient majeur est représenté par la dimension réduite des nanoparticules (le rayonnement d'une nanoparticule est ~ 10 nm) en comparaison avec la longueur d'onde des ondes ultrasoniques qui se propagent par l'eau (~ 0.3 mm à 5 MHz). Dans un volume de $100 \times 100 \times 300\,000$ nm avec une concentration volumétrique de 5%, on retrouve environ 30 000 nanoparticules, cette chose étant évidemment un problème impossible à résoudre. Cependant, il n'est pas nécessaire la définition d'un domaine de dimension de la longueur d'onde pour obtenir de suffisantes valeurs de la pression tout au long de la direction de propagation. Un domaine de $100 \times 100 \times 2000$ nm prouve d'être adéquat pour les ressources de calcul actuelles, avec une précision suffisante des résultats, par l'assurance d'un espace suffisant (plus de 5 diamètres de nanoparticules sur la petite partie du domaine) pour une distribution aléatoire.

Un algorithme original a été implémenté dans le programme Matlab pour l'insertion « aléatoire » des nanoparticules sphériques avec un rapport volumétrique

donné dans une section parallélépipédique sélectionnée. Ainsi, ils ont été insérés 153 sphères indépendantes, qui ne se touchent pas entre elles. Il a été implémenté aussi une possible variation aléatoire (de 10% dans ce cas) du rayonnement des nanoparticules, en accord avec la dispersion réelle de leurs dimensions. Sauf la distribution présentée (Figure 5.22), ils ont été utilisés quatre distributions différentes, où les nanoparticules ont été aléatoirement générées. Il a été utilisé un nombre de 5 géométries de calcul différentes, afin de vérifier si les résultats obtenus ne sont pas dépendants d'une distribution particulière, bien qu'aléatoire, des nanoparticules. À la suite, ils sont présentés les résultats obtenus pour le domaine parallélépipédique.

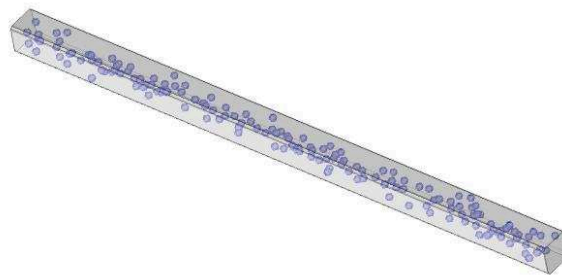


Figure 5.22: Distribution aléatoire des nanoparticules avec le rayonnement et le rapport volumétrique solide / fluide donné

La géométrie ainsi obtenue pour les solides élastiques (les 153 sphères) et l'eau qui l'entoure a été transférée vers le programme MEF „COMSOL” en utilisant le module dédié pour les interactions acoustiques fluide – solide. Le problème acoustique est résolu dans le domaine fréquentiel. Toutes les variations temporelles sont considérées harmoniques. Par exemple, une onde acoustique plane qui se propage tout au long de l'axe Oz produit une pression acoustique.

$$p_a = P \exp[i(kz - \omega t)] \quad (5.9)$$

où P est l'amplitude de la pression acoustique, $k = \omega/c$ est le numéro d'onde, et $\omega = 2\pi f$ est la vitesse angulaire, où f représente la fréquence. En conséquence, l'équation (5.5) peut être écrite comme il suit :

$$-\omega^2 p_a = c^2 \Delta p_a \quad (5.10)$$

et l'équation (5.7) devient

$$(\lambda + \mu) \nabla (\nabla \cdot \bar{U}) + \mu \Delta \bar{U} = -\omega^2 \rho \bar{U} \quad (5.11)$$

Les conditions de continuité entre les deux domaines sont établies par l'équation de continuité pour les déplacements (ou pour l'accélération) et la continuité de la pression dans le liquide transférée comme tension mécanique normale vers les particules solides.

À une extrémité de la section parallélépipédique, on applique une pression harmonique P avec une fréquence $f = 5\text{MHz}$. À l'autre extrémité opposée, il a été choisi « la condition de rayonnement libre » pour une onde plane. Cette condition pour le rayonnement permet à une onde plane de quitter le domaine de modélisation avec des réflexions nulles ou minimales, quand l'angle d'incidence est nul ou presque normal :

$$\bar{n}(\nabla p_a) + ikp_a = 0 \quad (5.12)$$

Le principal problème qui reste consiste dans les quatre extrémités latérales rectangulaires. La pression incidente du fluide agit sur chaque sphère solide, ces sphères solides étant perturbées par les multiples centres de diffraction formés du reste de sphères. De cette raison, par ces surfaces latérales, ils sortent des ondes de pression produites par chaque sphère, mais la pression totale inclut simultanément la pression qui provient des sphères situées en dehors du domaine FEM. Dans ce contexte, les conditions de frontière pour les parois rigides ordinaires ne sont pas adéquates. Les parois rigides produisent des réflexions irréalistes de la pression diffractée et elles produisent un effet de guide d'onde fluide avec des frontières rigides, pour lequel la vitesse d'onde peut souffrir des modifications. La plus réaliste option est d'imposer la périodicité des conditions de frontière entre les surfaces rectangulaires opposées du parallélépipède. Cette option, une fois avec la distribution aléatoire des sphères correspond le mieux au domaine théorique infini dans la direction latérale (perpendiculaire sur la direction de propagation). Malheureusement, le programme ne peut pas traiter cette double périodicité à cause de l'ambiguïté des points situés tout au long des quatre extrémités longues du parallélogramme. Cette inconvenance a été évitée par la section de certains petits chanfreins tout au long des quatre extrémités. Ainsi, la

section transversale normale devient un octogone. Grâce à la dimension très réduite des chanfreins, leur influence sur le domaine de calcul est négligeable, ainsi que pour ces quatre surfaces on a appliqué des conditions à la limite de parois rigides (déplacements / accélérations nulles).

Le réseau de 250 000 éléments en forme de tétraèdre finis couvre le domaine avec de nombreux détails suffisants pour décrire la forme des sphères (Figure 5.23).

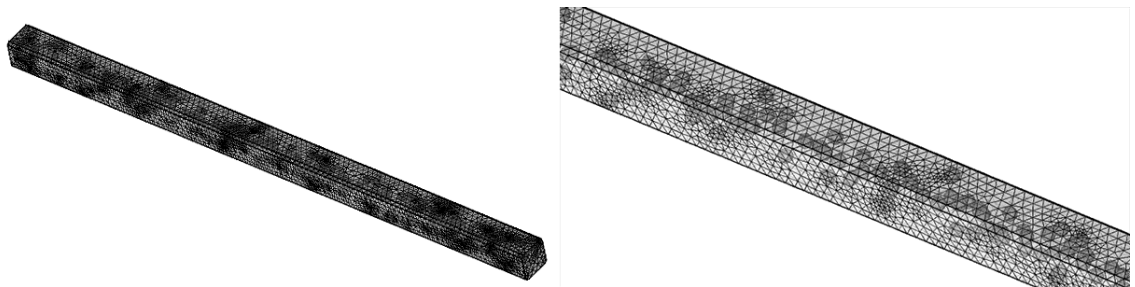


Figure 5.23: Treillis FEM utilisé pour le domaine bi-phasique (gauche). Présentation détaillée (droit)

La solution est obtenue pour cinq fréquences centrées autour de la valeur de 5 MHz (entre 3.75 MHz e 6.25 MHz) (Figure 5.24).

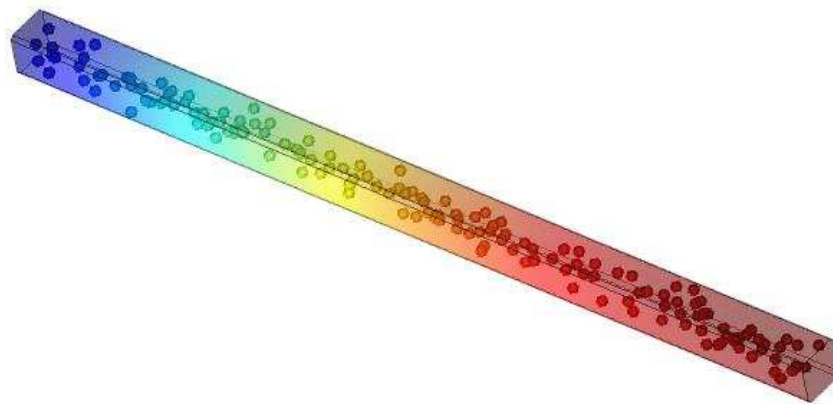


Figure 5.24: Champ de pression acoustique

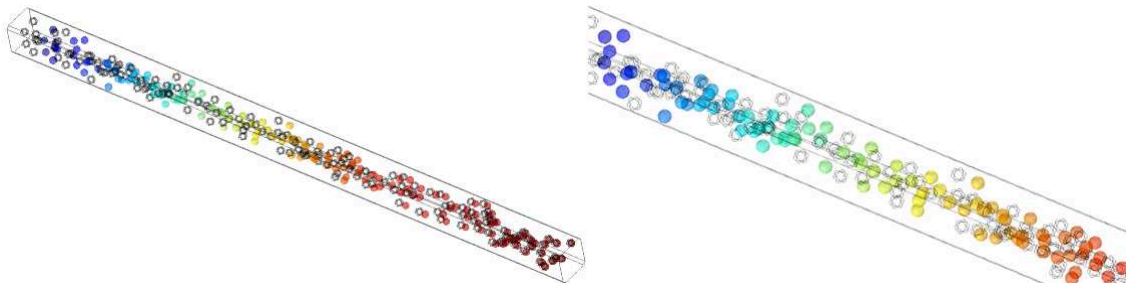


Figure 5.25: Pression acoustique (gauche). Présentation détaillée (droit)

Les résultats ci-dessus présentés sont obtenue pour la preuve HAp, avec $R=11.6$ nm, densité $\rho_s = 1.0129$ kg/m³ et une concentration volumétrique 5%.

Pour une valeur donnée de la température, l'onde plane dans l'eau pure se propage avec une vitesse c_0 présentée dans la Figure 5.8. En conséquence, la valeur de la pression à distance (la longueur du modèle FEM), conformément à l'équation (5.9) est

$$p_a = P \cos\left(\frac{\omega}{c_0} L\right) \quad (5.13)$$

La procédure inverse est appliquée pour les nanoparticules en suspension (milieu bi-phasique). La pression p_a est déterminée de la solution FEM calculée pour la paroi opposée ($z = L$), d'où il résulte la vitesse équivalente dans le milieu bi-phasique :

$$c = (\omega L) / \cos^{-1}(p_a / P) \quad (5.14)$$

Le rapport p_a/P tout au long de l'axe est graphiquement représenté avec rouge pour les cinq fréquences dans la Figure 5.26.

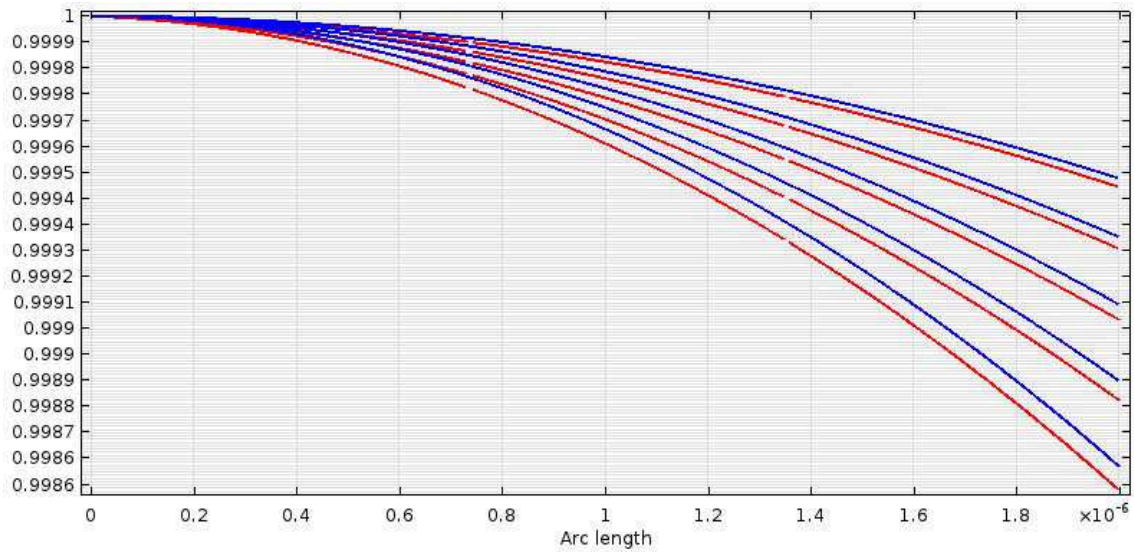


Figure 5.26: Pression acoustique en milieu bi-phasique dans le cas HAp (rouge) pour les cinq fréquences et dans l'eau (bleu)

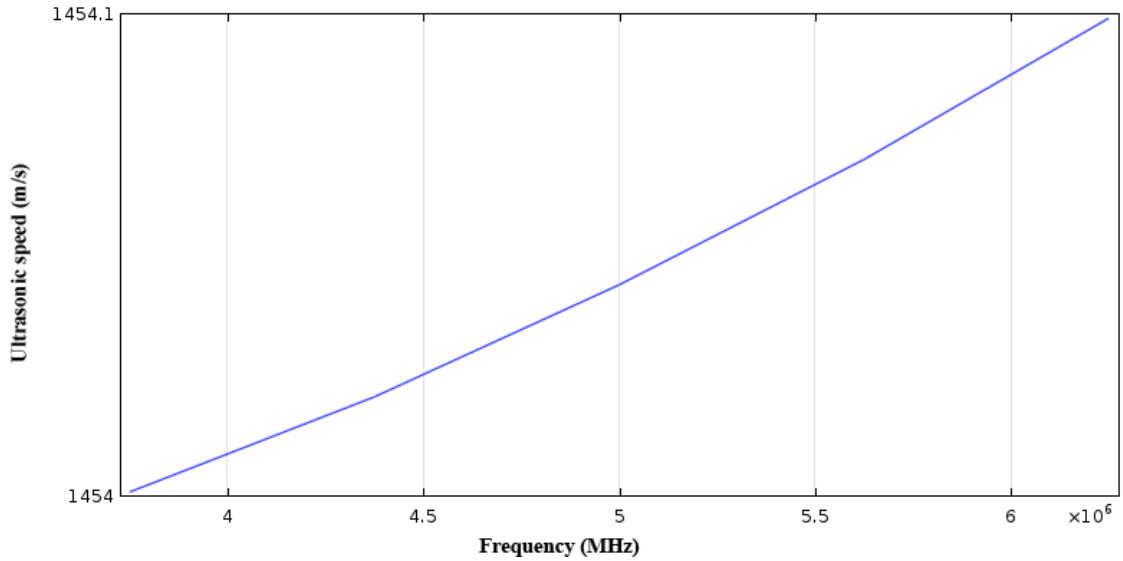


Figure 5.27: Vitesse dans le milieu bi-phasique dans le cas HAp pour l'intervalle de fréquences étudié

Tableau 5.3: Vitesses dans le milieu bi-phasique selon la fréquence pour la dispersion HAp (phase solide: $E=10\text{ Gpa}$, $\nu=0.3$, rapport volumétrique dans l'eau 5%, $R=11.6\text{ nm}$)

F (Hz)	Vitesse (m/s)
3.7500E6	1454.0
4.3750E6	1454.1
5.0000E6	1454.1
5.6250E6	1454.1
6.2500E6	1454.1

On peut observer légèrement que la vitesse ultrasonore obtenue pour les valeurs $E=10\text{ GPa}$ et $\nu=0.3$ comporte une valeur presque identique avec celle issue des données expérimentales obtenue pour la dispersion d'HAp, présentées dans le Tableau 5.2.

Une procédure itérative peut déterminer par l'interpolation la vitesse dans le milieu bi-phasique, en offrant des renseignements sur les propriétés élastiques du milieu solide avec une erreur minimale dans un domaine avec deux variables (E, ν).

Sur base des résultats obtenus suite aux modélisations pour une série de valeurs du module Young et du coefficient Poisson, on a réalisé un programme d'interpolation

$c(E, \nu)$. Les résultats obtenus pour la vitesse ultrasonore selon les paires de paramètres E et ν du Tableau 5.2 sont présentés dans les Figures 5.28 et 5.29.

Tableau 5.4: Vitesses dans le milieu bi-phasique selon les paramètres E et ν pour la dispersion HAp

E / ν	$\nu=0.2$	$\nu=0.25$	$\nu=0.3$
$E=10$	1458.6	1456.3	1454.1
$E=11$	1457.4	1455.3	1453.2
$E=12$	1456.3	1454.4	1452.6

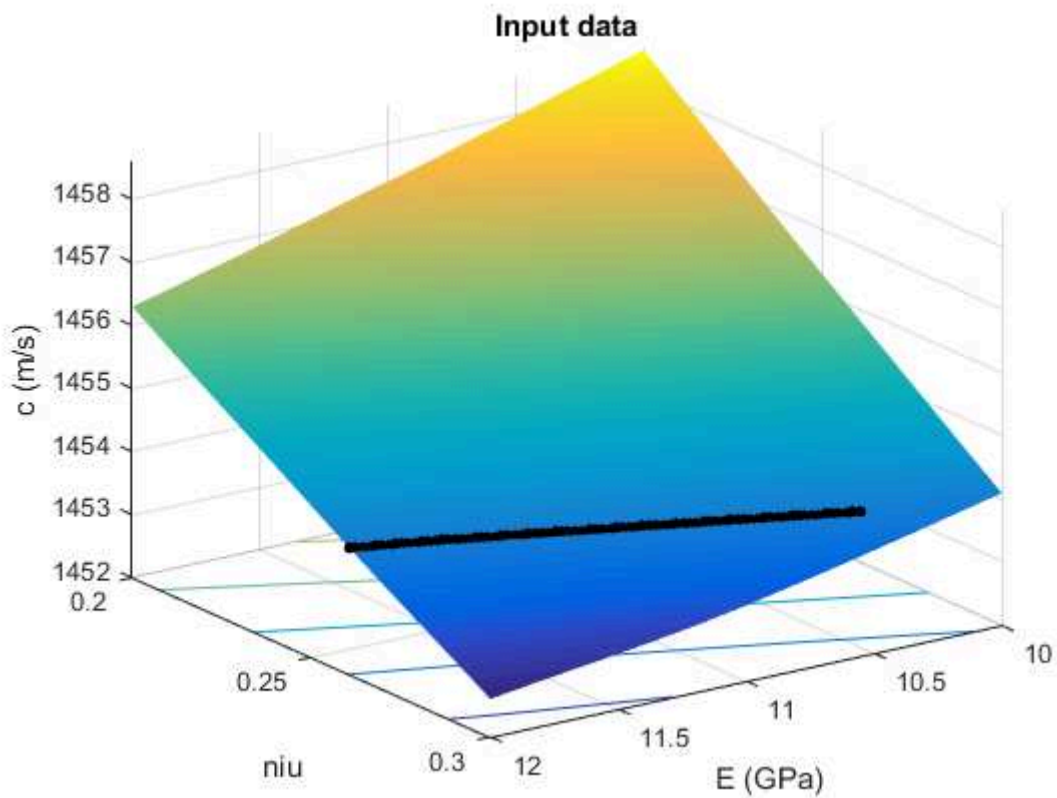


Figure 5.28: Vitesse ultrasonore par la dispersion HAp selon les valeurs du module d'Young (E). La ligne noire indique les valeurs interpolées.

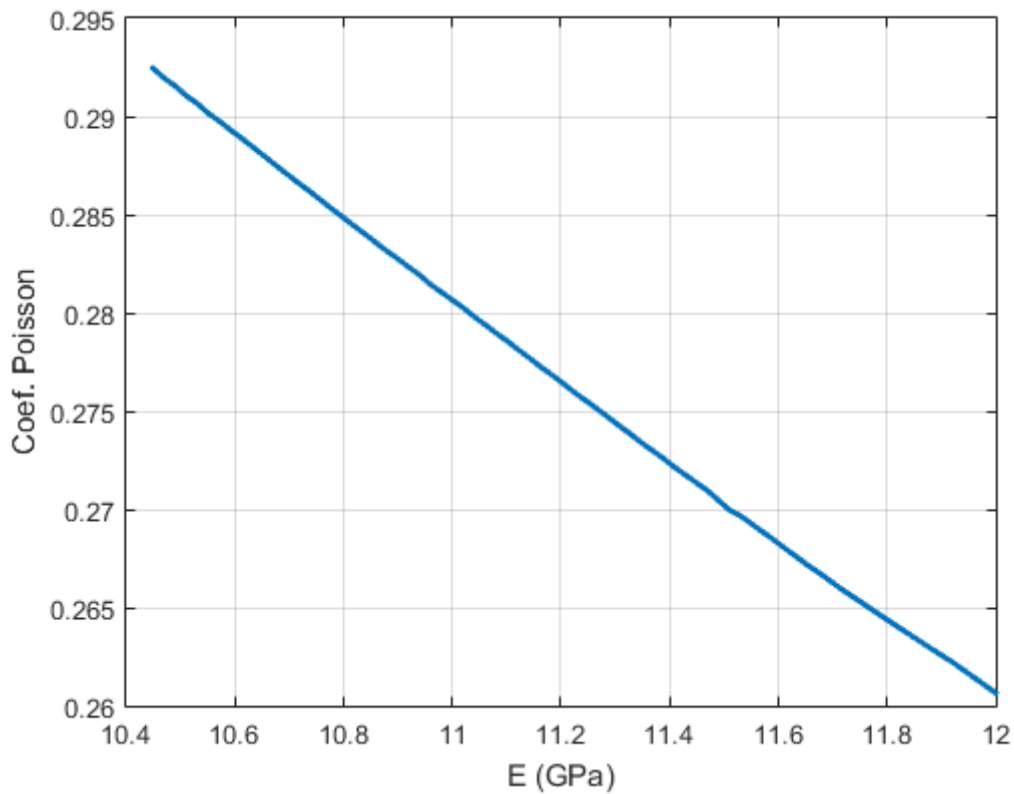


Figure 5.29: Dépendance des valeurs obtenues pour le coefficient *Poisson* (ν) et le module d'Young (E)

Ils ont été réalisés des études similaires avec celles effectuées pour la dispersion HAP pour les dispersions d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HApZn7 et HApZn20). Dans le cas de la preuve HApZn7, le rapport ρ_a/P tout au long de l'axe est graphiquement représenté avec rouge pour les cinq fréquences dans la Figure 5.30. Dans la Figure 5.31, il est présenté le graphique de la vitesse ultrasonore par la dispersion HApZn7 selon la fréquence

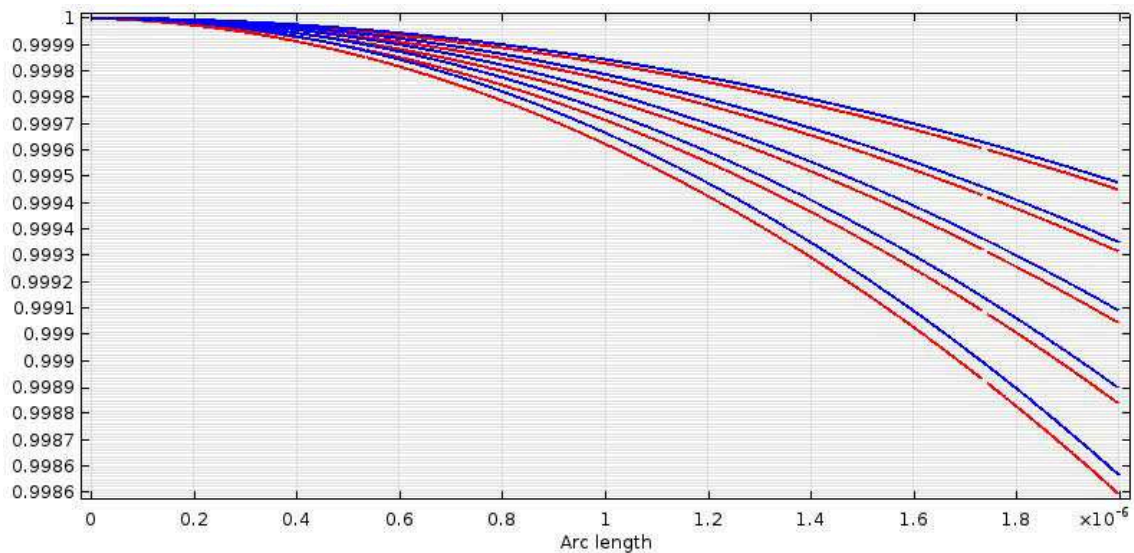


Figure 5.30: Pression acoustique dans le milieu bi-phasique dans le cas HApZn7 (rouge) pour les cinq fréquences et dans l'eau (bleu)

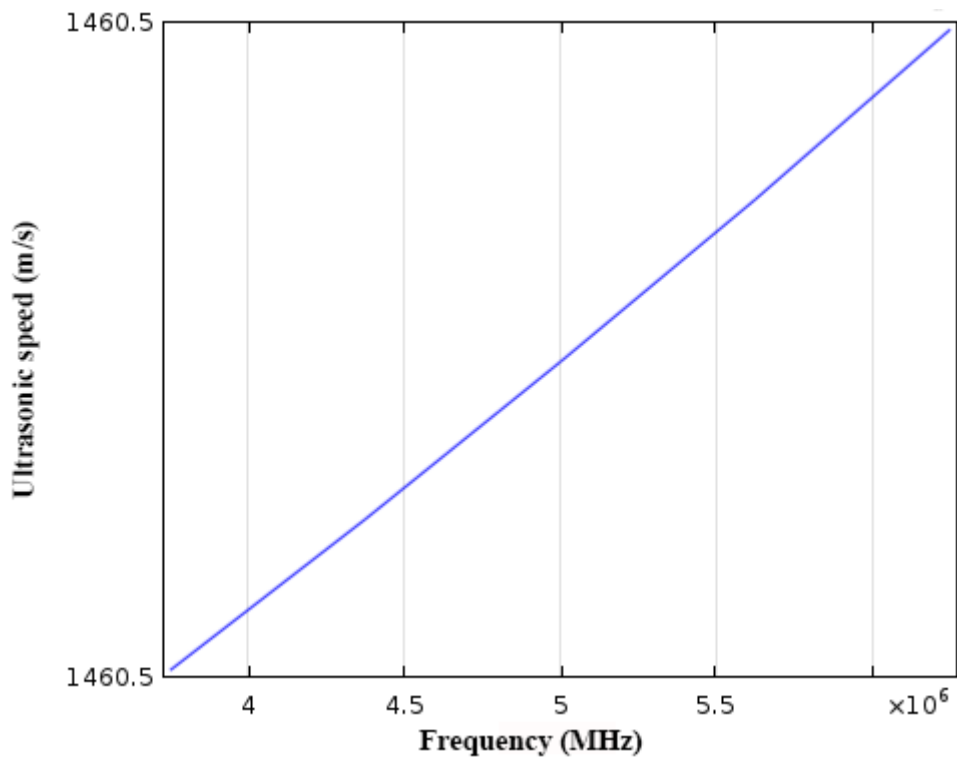


Figure 5.31: Vitesse dans le milieu bi-phasique dans le cas HApZn7 pour l'intervalle de fréquences étudié

Pour les valeurs préétablis du module d'Young ($E=6$ Gpa) et du coefficient Poisson ($\nu=0.3$), on a obtenu la même valeur de la vitesse ultrasonore par la dispersion HApZn7, dans l'intervalle de fréquences étudié (Tableau 5.5). On peut observer que

cette valeur de la vitesse est similaire avec celle déterminée de manière expérimentale (Tableau 5.2)

Tableau 5.5: Vitesses dans le milieu bi-phasique selon la fréquence pour la dispersion HApZn7 (phase solide: $E=6 \text{ Gpa}$, $\nu=0.3$, rapport volumétrique dans l'eau 5%, $R=9.7$

nm)	
F (Hz)	Vitesse (m/s)
3.7500E6	1460.5
4.3750E6	1460.5
5.0000E6	1460.5
5.6250E6	1460.5
6.2500E6	1460.5

Les valeurs de la vitesse ultrasonore par la dispersion HApZn7 ont été déterminées pour les valeurs différentes de la paire de paramètres (E , ν), les dernières étant présentées dans le Tableau 5.6. Dans ce cas aussi, il a été appliqué l'algorithme d'interpolation de la vitesse $c(E, \nu)$, les résultats obtenues étant présentées dans la Figure 5.32 et la Figure 5.33.

Tableau 5.6: Vitesses dans le milieu bi-phasique selon les paramètres E et ν pour la dispersion HApZn7

E / ν	$\nu=0.2$	$\nu=0.25$	$\nu=0.3$
E=3	1492.5	1484.3	1476.2
E=4	1480.2	1474.2	1468.3
E=6	1468.3	1464.4	1460.5

On peut observer que les valeurs de la vitesse ultrasonore présentées dans le Tableau 5.6 comportent une dispersion réduite, étant proches de la valeur de la vitesse dans la dispersion HApZn7 déterminée de manière expérimentale (1476.02 ± 0.15 m/s) dans le Tableau 5.2.

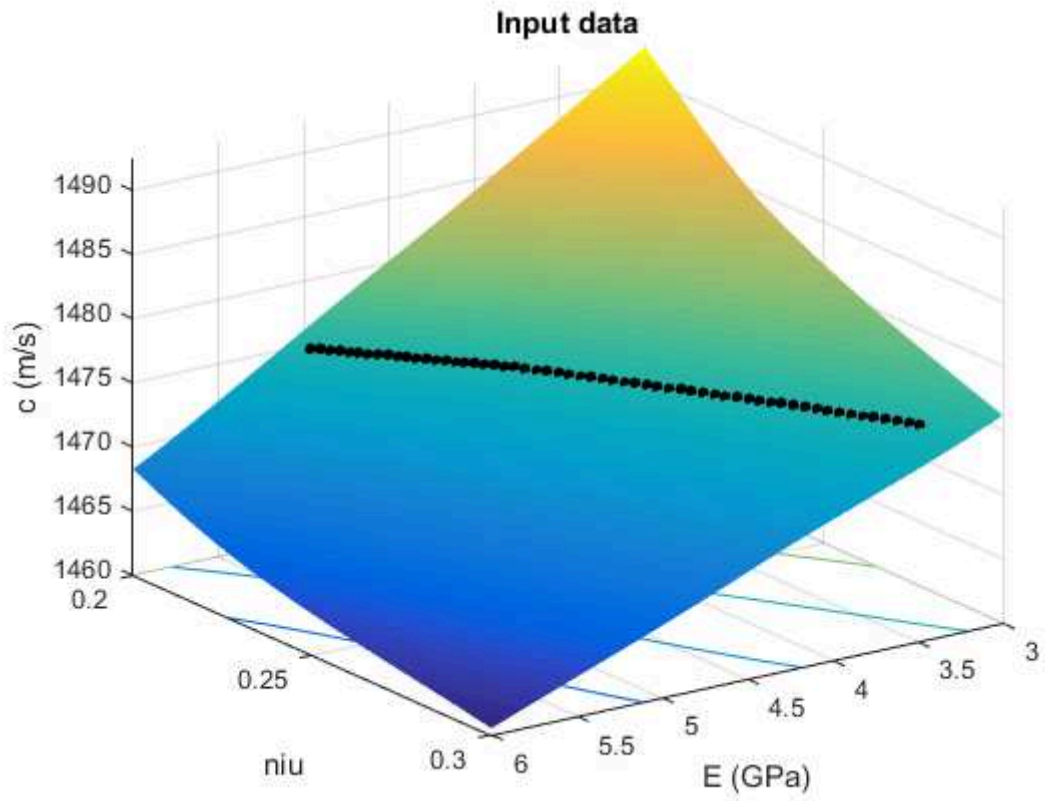


Figure 5.32: Vitesse ultrasonore par la dispersion HApZn7 selon les valeurs du module d'Young (E). La ligne noire indique les valeurs interpolées.

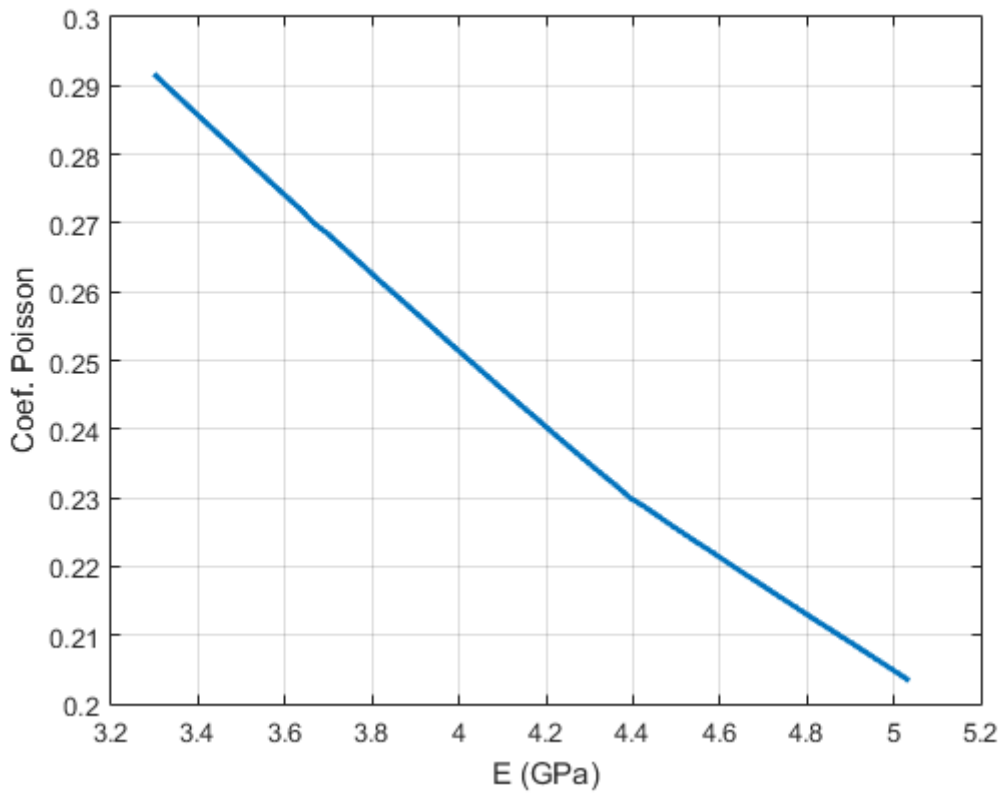


Figure 5.33: Dépendance des valeurs obtenues pour le coefficient *Poisson* (ν) et le module d'Young (E)

Dans le cas de la dispersion HApZn20, la pression acoustique enregistrée pour les cinq fréquences est présentée dans la Figure 5.34, et dans la Figure 5.35 on peut observer la vitesse par la dispersion selon la fréquence.

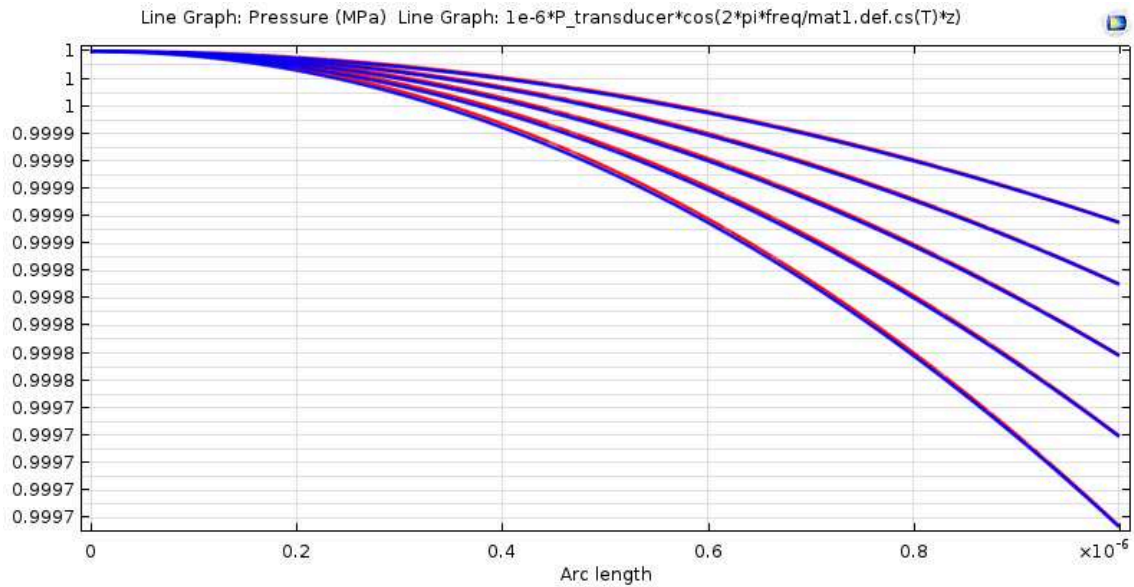


Figura 5.34: Pression acoustique dans le milieu bi-phasique dans le cas HApZn20 (rouge) pour les cinq fréquences et dans l'eau (bleu)

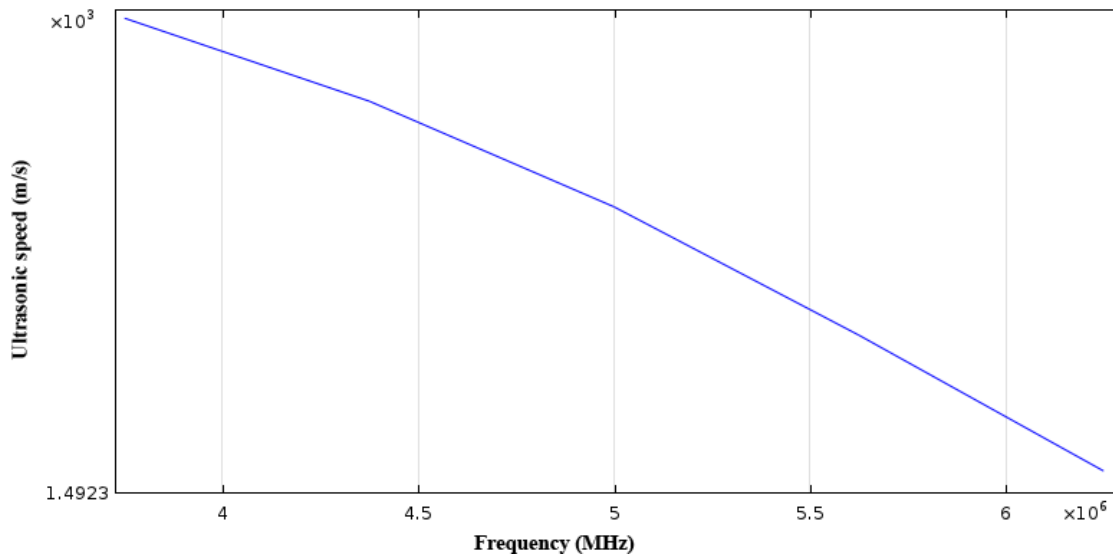


Figure 5.35: Vitesse dans le milieu bi-phasique dans le cas HApZn20 pour l'intervalle de fréquences étudié

Dans le Tableau 5.7, ils sont présentés les valeurs obtenues pour la vitesse ultrasonore dans le cas de la paire de paramètres (E, ν) préétablie. On peut observer que dans ce cas aussi, les valeurs obtenues sont proches de celles déterminées de manière expérimentale, présentée dans le Tableau 5.2.

Tableau 5.7: Vitesse dans le milieu bi-phasique selon la fréquence pour la dispersion HApZn20 (phase solide: $E=2 \text{ Gpa}$, $\nu =0.3$, rapport volumétrique dans l'eau 5%, $R=4.98 \text{ nm}$)

F (Hz)	Vitesse (m/s)
3.7500E6	1492.3
4.3750E6	1492.3
5.0000E6	1492.3
5.6250E6	1492.3
6.2500E6	1492.3

Comme dans le cas des dispersions HAp et HApZn7, il a été appliqué l'algorithme d'interpolation $c(E, \nu)$, et les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 5.36 et dans la Figure 5.37. Les paires de paramètres utilisées dans cet algorithme d'interpolation sont mises en évidence dans le Tableau 5.8.

Avec la méthode proposée, on peut déterminer des paires (E, ν) , étant nécessaire un développement de la méthode afin d'arriver à la détermination séparée des deux constantes élastiques des nanoparticules. Même dans ces conditions, les valeurs déterminées ont une dispersion réduite et elle donnent des renseignements importants sur le matériel étudié..

Tableau 5.8: Vitesses au milieu bi-phasique selon les paramètres E et ν pour la dispersion HApZn20

E / ν	$\nu=0.2$	$\nu=0.25$	$\nu=0.3$
E=2	1515.4	1504.7	1492.3
E=3	1492.3	1484.3	1476.3
E=4	1480.3	1474.3	1468.5

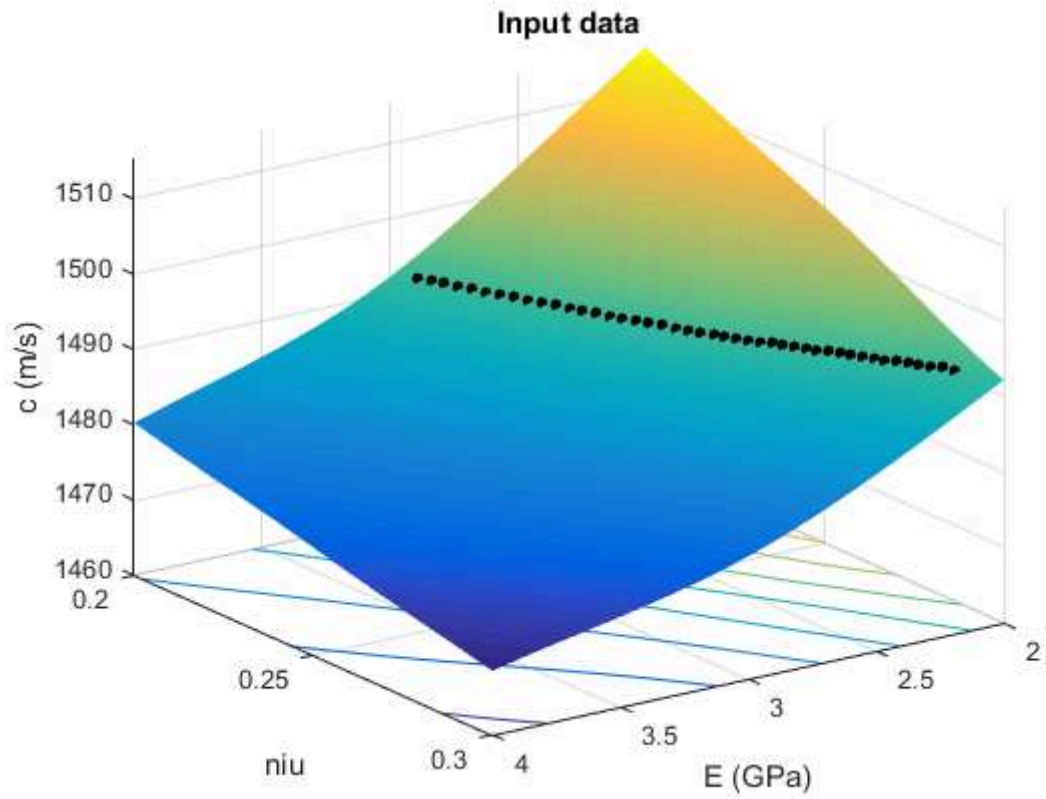


Figure 5.36: Vitesse ultrasonore par la dispersion HApZn20 selon les valeurs du *module d'Young* (E). La ligne noire indique les valeurs interpolées.

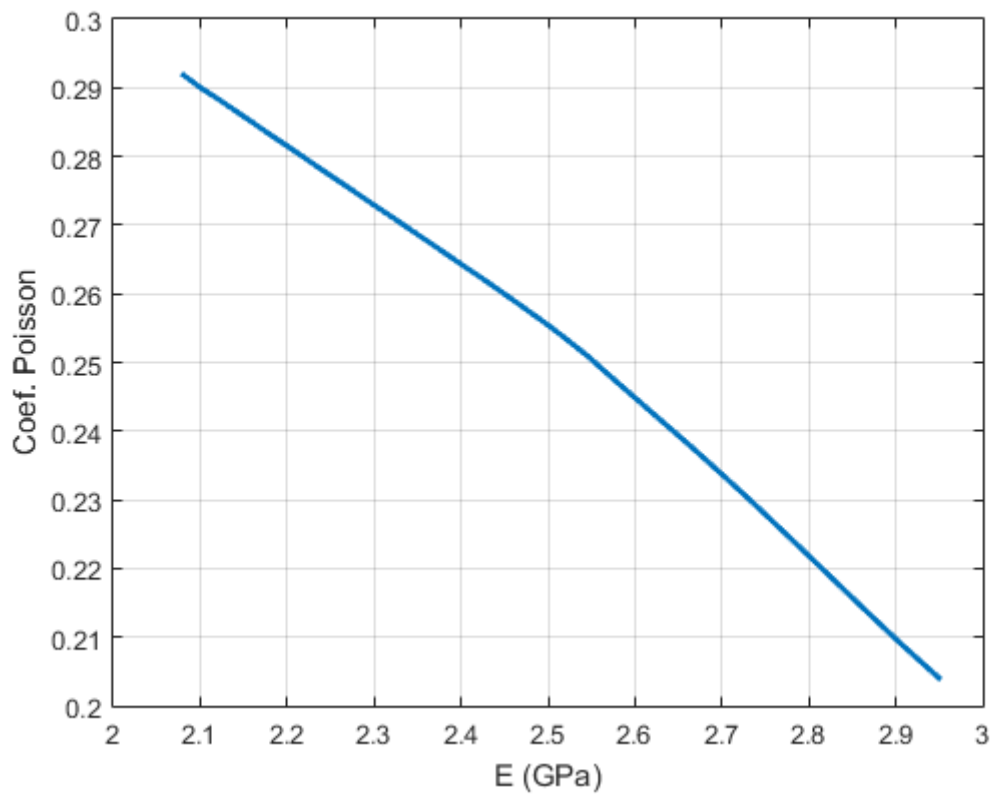


Figure 5.37: Dépendance des valeurs obtenues pour le coefficient Poisson (ν) et le module d'Young (E)

5.3 Conclusion

Dans le cadre de ce chapitre, ils ont été présentés les résultats obtenus suite à la caractérisation ultrasonore des dispersions d'hydroxyapatite (HAp) et hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc (HApZn7 et HApZn20). Pour l'étude de l'influence de la concentration de zinc sur les propriétés du matériel déduites suite aux mesures avec ultrasons, ils ont été choisis des concentrations de zinc significatives pour les études effectuées. Dans ce but, ils ont été étudiés de solutions sur base d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc ($x_{Zn}=0.07$ și $x_{Zn}=0.2$) avec contenu de 25 g de matériel en suspension de 500 ml eau bi-distillée.

Il a été accordé une attention spéciale à la maintenance de la température constante. Ainsi, pour toutes les dispersions étudiées, la température a été maintenue à la valeur de 21°C. Les mesures à ultrasons ont été effectuées à une fréquence centrale de 5 MHz. Suite à l'analyse des signaux obtenus, on a pu déterminer, par l'intermédiaire d'un algorithme spécialisé, implémenté dans le programme « Matlab », les différences de temps entre les échos équivalents en fluides différents, en utilisant comme référence l'eau bi-distillée. En utilisant la moyenne de ces différences temporelles et la distance parcourue par les signaux (qui a été calculée du temps de parcours dans l'eau double distillée), on a obtenu la vitesse des ultrasons par les dispersions investiguées (HAp, HApZn7 et HApZn20). On a observé qu'une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves, la densité des suspensions baisse de 1.0129 g/cm³ (HAp) à 1.0057 g/cm³ (HApZn20), en utilisant comme référence l'eau bi-distillée, dont la densité déterminée de manière expérimentale a été 0.9997 g/cm³. En plus, dans ces conditions, on a observé que la vitesse ultrasonore a augmenté progressivement, de 1454.17 m/s (HAp) à 1492.54 m/s (HApZn20).

D'autre partie, en utilisant le modèle basé sur des éléments finis et par l'intermédiaire de certains algorithmes spécialisés réalisés dans les programmes „Matlab” et „COMSOL”, on a réalisé une étude préliminaire sur l'influence des ondes ultrasonores sur les nanoparticules HAp, HApZn7 et, respectivement HApZn20

dispersées dans l'eau bi-distillée. On a déterminé de même la vitesse ultrasonore par des dispersions selon la fréquence et les paramètres de matériel E (module d' Young) et ν (coefficient Poisson). Les valeurs de la vitesse ultrasonore déterminée pour des différentes paires de paramètres (E , ν) ont été similaires avec celles déterminées de manière expérimentale. Ainsi, on peut tirer la conclusion que le modèle utilisé est adéquat pour la caractérisation des céramiques sur base d' hydroxyapatite. L'avantage de cette technique est la possibilité de la caractérisation des biocéramiques par une méthode non-destructive.

Conclusions Générales

Dans le cadre de cette thèse de doctorat, ils ont été étudiés les propriétés physique-chimiques et ultrasonores des poudres d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc, et aussi des composants d'hydroxyapatite et hydroxyapatite dopée avec zinc en matrice de collagène. Dans ce but, ils ont été synthétisés des poudres sur base d'hydroxyapatite avec des différentes concentrations de zinc (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30, hydroxyapatite en matrice de collagène (HAp6-CBc), et hydroxyapatite dopée avec zinc en matrice de collagène (HApZn10-CBc_4 și HApZn10-CBc_1) par une méthode de co-précipitation à température basse.

Les diffractogrammes des poudres d'hydroxyapatite dopée avec zinc analysées ont mis en évidence la présence des maximales associées à l'hydroxyapatite en conformité avec la Fiche ICDD-PDF No. 9-432, en se remarquant une diminution de la cristallinité des preuves, et aussi une diminution de la dimension des particules une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves. La formation de la structure de l'hydroxyapatite hexagonale dans le cas de chaque preuve investiguée a été mise en évidence par l'analyse Rietveld réalisée pour chaque diffractogramme des poudres HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30. De même, les résultats obtenus suite à l'analyse SAED a démontré le fait que la structure de chaque preuve est caractéristique à l'hydroxyapatite hexagonale.

La morphologie des preuves investiguées a été étudiée par MEB et MET. Les deux méthodes ont mis en évidence le fait que les poudres sont formées des particules allongées dont la dimension baisse une fois avec la croissance de la concentration de zinc, ayant la tendance de former des agglomérations une fois avec la diminution de la dimension.

La composition des éléments des preuves HApZn (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) a été investiguée par l'intermède des études EDAX et XPS. Ainsi, il a été démontré que les éléments constituants de chaque preuve sont caractéristiques à l'hydroxyapatite pure : oxygène (O), phosphore (P) et calcium (Ca). La croissance de la concentration de zinc des preuves a été mise en évidence par la croissance de l'intensité des maximales

correspondantes à cet élément, à la fois dans les spectres EDAX et aussi dans les spectres XPS.

Les modifications physique-chimiques déterminées par la variation de la température ont été étudiées par l'intermédiaire de l'analyse thermique (TGA et DTA). Ainsi, les résultats obtenus ont confirmé les résultats obtenus suite au traitement des données de diffraction de rayonnements X, qui ont mis en évidence une seule phase cristalline qu'appartient à l'hydroxyapatite hexagonale dans le cas de toutes les preuves analysées. En plus, il a été mis en évidence le fait que les preuves n'ont pas souffert de modifications structurelles, indifféremment de la concentration de zinc des preuves.

La composition des preuves investiguées a été étudiée par l'intermédiaire des mesures de spectroscopie FTIR et Raman. Les résultats de ces études ont mis en évidence le fait que les spectres de toutes les preuves investiguées (HAp, HApZn1, HApZn3, HApZn5, HApZn7, HApZn10, HApZn20 et HApZn30) présentent les maximales caractéristiques aux groupements fonctionnels phosphate, carbonate et hydroxyle, celles-ci étant définitoires à la structure de l'hydroxyapatite hexagonale, en se marquant la diminution de la cristallinité une fois avec la croissance de la concentration de zinc.

La structure poreuse des preuves a été déterminée par les méthodes d'adsorption physique BET, Freundlich et BJH. Suite à l'analyse des données expérimentales obtenues, on a pu tirer la conclusion que les poudres investiguées présentent des pores tubulaires fermés à une extrémité. De même, on a marqué la croissance progressive de la surface spécifique et de la dimension des pores une fois avec la croissance de la concentration de zinc des preuves.

En ce qui concerne, l'influence du collagène sur la structure et la morphologie des preuves HAp et HApZn10, les études ont démontré que toutes les preuves présentent la structure caractéristique de l'hydroxyapatite, bien que le collagène semble à déterminer une diminution de la cristallinité. Cette diminution de la cristallinité des preuves analysées a été observée aussi dans les images MEB. En plus, l'analyse des spectres FTIR et Raman a mis en évidence la présence des groupements fonctionnels caractéristiques à l'hydroxyapatite pure, le collagène déterminant l'apparition de certaines maximales supplémentaires associées aux groupements Amide, et aussi le lisage et la diminution des intensités des maximales caractéristiques HAp.

Les études biologiques effectuées sur les preuves d'hydroxyapatite dopée avec des différentes concentrations de zinc ont mis en évidence l'effet cytotoxique des preuves investiguées sur la croissance des cellules endothéliales et HepG2. En plus, les propriétés antimicrobiennes évaluées pour les souches bactériennes Gram positives (*Staphylococcus aureus* 0364, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis*), Gram négatives (*Pseudomonas aeruginosa* 1397, *Escherichia Coli* ATCC 25922) et sur la souche de champignons *Candida albicans* ATCC 10231. Les résultats obtenus ont démontré que tous les matériaux qui contiennent zinc ont manifesté une action inhibitrice, bactériostatique / bactéricide sur les souches testées, le plus important effet pouvant être observé pour *C. albicans*.

Les études ultrasonores réalisées sur des dispersions de HAp, HApZn7 et HApZn20 ont permis l'évaluation de certaines propriétés caractéristiques au matériel. Les résultats obtenus ont démontré le potentiel de cette méthode non-destructive d'être utilisée pour la caractérisation des matériaux céramiques de manière rapide et efficiente, en pouvant être obtenus des renseignements essentiels sur la propriété des matériaux investigués.

Vu les résultats prometteurs obtenus pour les matériaux sur base d'hydroxyapatite dopée avec zinc en collagène, on peut dire que les nouveaux bio-composites sont des biomatériaux qui pourraient être utilisés dans des différentes applications biologiques comme matériaux remplaçants pour le tissu osseux.

Bibliographie

- [1] A. J. Oppenheimer, L. Tong, S. R. Buchman (2008) Craniofacial Bone Grafting: Wolff's Law Revisited, *Craniofacial Trauma & Reconstruction* **1**, 49-61
- [2] L. S. Pryor, E. Gage, C.-J. Langevin, F. Herrera, A. D. Breithaupt, C. R. Gordon, A. M. Afifi, J. E. Zins, H. Meltzer, A. Gosman, S. R. Cohen, R. Holmes (2009) Review of Bone Substitutes, *Craniofacial Trauma & Reconstruction* **2**, 151-160
- [3] G. Flati, C. Di Stanislao (2004) Chirurgia nella preistoria. Parte I, *Provincia Med Aquila* **2**, 8–11
- [4] M.-A. Russon (2015) Peru: First evidence of ancient bone surgery discovered with procedure on lower legs, <http://www.ibtimes.co.uk/peru-first-evidence-ancient-bone-surgery-discovered-procedure-lower-legs-1484533>
- [5] L. Leafloor (2015) First Ever Evidence for Ancient Bone Surgery found in Peru – Holes Drilled in Legs, <http://www.ancient-origins.net/news-history-archaeology/first-ever-evidence-ancient-bone-surgery-peru-drilled-legs-020174?nopaging=1>
- [6] <http://www.infusebonegraft.com/healthcare-providers/bone-grafting-options/history-of-bone-grafting/index.htm>
- [7] D. J. Berry, J. Lieberman (2013) *Surgery of the Hip*, Elsevier Saunders
- [8] M. Borden (2003) The development of bone graft materials using various formulations of demineralized bone matrix. In: Laurencin CT, editor. *Bone graft substitutes*, West Conshohocken (PA): ASTM International. Chapter 5. p. 96.
- [9] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMN/pmn.cfm?ID=K9635>
62
- [10] H. Dressmann (1892) Ueber Knochenplombierung bei Hohlenformigen Defekten des Knochens, *Beitrage zur klinischen Chirurgie* **9**, 804–810

- [11] C. L. Popa, C. M. Bartha, M. Albu, R. Guegan, M. Motelica-Heino, M. C. Chifiriuc, C. Bleotu, M. L. Badea, S. Antohe (2015) Synthesis, Characterization And Cytotoxicity Evaluation On Zinc Doped Hydroxyapatite In Collagen Matrix, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures **10**, 681-691
- [12] K. Matsunaga, H. Murata, T. Mizoguch, A. Nakahira (2010) Mechanism of incorporation of zinc into hydroxyapatite, Acta Biomaterialia **6**, 2289-2293
- [13] M. C. Chang, T. Ikoma, M. Kikuchi, J. Tanaka (2002) The cross-linkage effect of hydroxyapatite/collagen nanocomposites on a self-organization phenomenon, Journal of Materials Science. Materials in Medicine **13**, 993-997
- [14] <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/bones/structure.php>
- [15] C. L. Popa, M. Albu, C. Bartha, A. Costescu, C. Luculescu, R. Trusca, S. Antohe (2015) Structural characterization and optical properties of hydroxyapatite/collagen matrix, Romanian Reports in Physics, in press
- [16] K. J. L. Burg, S. Porter, J. F. Kellam (2000) Biomaterial developments for bone tissue engineering, Biomaterials **21**, 2347–2359
- [17] G. Krishnamurithy, M. Raman Murali, M. Hamdi, A. A. Abbas, H. B. Raghavendran, T. Kamarul (2014) Characterization of bovine-derived porous hydroxyapatite scaffold and its potential to support osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells, Ceramics International **40**, 771–777
- [18] H. Yoshikawa, N. Tamai, T. Murase, A. Myoui (2009) Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering, Journal of The Royal Society Interface **6**, S341 – S348
- [19] C. S. Ciobanu, F. Massuyeau, L. V. Constantin, D. Predoi (2011) Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C, Nanoscale Research Letters **6**, 613-620
- [20] C. S. Ciobanu, C. L. Popa, D. Predoi (2014) Sm:HAp Nanopowders Present Antibacterial Activity against Enterococcus faecalis, Journal of Nanomaterials **2014**, 1–9

- [21] C. S. Ciobanu, E. Andronescu, D. Predoi (2011) Bet and XRD studies on the hydroxyapatite and europium doped hydroxyapatite, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **6**, 1239–1244
- [22] D. Predoi, R. A. Vatasescu-Balcan (2008) Osteoblast interaction with iron oxide nanoparticles coated with dextrin in cell culture, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **10**, 152–157
- [23] F. Ren, R. Xin, X. Ge, Y. Leng (2009) Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites, *Acta Biomaterialia* **5**, 3141-3149
- [24] J. C. Elliott (1994) Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. *Studies in inorganic chemistry*, vol. 18, Elsevier
- [25] R. Z. LeGeros (1991) *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*, Karger
- [26] S Koutsopoulos (2002) Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **62**, 600-612
- [27] C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, P. Le Coustumer, L. V. Constantin, D. Predoi (2012) Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanoscale Research Letters* **7**, 324-333
- [28] C. L. Popa, A. Deniaud, I. Michaud-Soret, R. Guégan, M. Motelica-Heino, D. Predoi (2016) Structural and biological assessment of zinc doped hydroxyapatite nanoparticles, *Journal of Nanomaterials* 2016, 1-10
- [29] E. Jallot, J. M. Nedelec, A. S. Grimault, E. Chassot, A. Grandjean-Laquerriere, P. Laquerriere, D. Laurent-Maquin (2005) STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol–gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **42**, 205–210

- [30] G. Daculsi, R. Z. Legeros, M. Heughebaert, I. Barbieux (1990) Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics, *Calcified Tissue International* **46**, 20-27
- [31] I. R. Gibson, K. A. Hing, P. A. Revell, J. D. Santos, S. M. Best, W. Bonfield (2002) Enhanced In Vivo Response to Silicate-Substituted Hydroxyapatite, *Key Engineering Materials* **218-220**, 203-206
- [32] M. Okazaki (1995) Crystallographic properties of heterogeneous Mg-containing fluoridated apatites synthesized with a two-step supply system, *Biomaterials* **16**, 703-707
- [33] I. R. Gibson, W. Bonfield (2002) Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite, *Journal of Biomedical Materials Research* **59**, 697-708
- [34] E. Bertoni, A. Bigi, G. Cojazzi, M. Gandolfi, S. Panzavolta, N. Roveri (1998) Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite, *Journal of Inorganic Biochemistry* **72**, 29-35
- [35] E. Fujii, M. Ohkubo, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, K. Kawabata, C. Bonhomme, F. Babonneau (2006) Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia* **2**, 69-74
- [36] L. S. Hutley, J. Gowan, G. Milhaud (1969) Calcium metabolism in manganese-deficient and zinc-deficient rats, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **130**, 856-860
- [37] G. Oner, B. Bhaumick, R. M. Bala (1984) Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats, *Endocrinology* **114**, 1860-1863
- [38] C. O. Molokwu, Y. V. Li (2006) Zinc Homeostasis and Bone Mineral Density, *Research Clinical Review*

- [39] Y. H. Koh, K. H. Choi, I. K. Park (1998) Effects of niacin deficiency on the levels of soluble proteins and enzyme activities in various tissues of Japanese quail, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **30**, 943–953
- [40] B. L. Vallee, K. H. Falchuk (1993) The biochemical basis of zinc physiology, *Physiological Reviews* **73**, 79–118
- [41] G. R. Sauer, D. M. Smith, M. Cahalane, L. N. Wu, R. E. Wuthier (2003) Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes, *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 954–969
- [42] C. P. Doherty, P. M. Crofton, M. A. Sarkar, M. S. Shakur, J. C. Wade, C. J. Kelnar, M. W. Elmlinger, M. B. Ranke, W. A. Cutting (2002) Malnutrition, zinc supplementation and catch-up growth: Changes in insulin-like growth factor I, its binding proteins, bone formation and collagen turnover, *Clinical Endocrinology* **57**, 391–399
- [43] A. A. Al-Munajjed, N. A. Plunkett, J. P. Gleeson, T. Weber, C. Jungreuthmayer, T. Levingstone, J. Hammer, F. J. O'Brien (2009) Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique, *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* **90**, 584-591
- [44] R. B. Martin, D. B. Burr, N. A. Sharkey (1998) *Skeletal Tissue Mechanics* Springer-Verlag
- [45] D. A. Wahl, J. T. Czernuszka (2006) Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair, *European Cells & Materials* **11**, 43-56
- [46] G. Voicu, S. I. Jinga, R. Trusca, F. Iordache (2014) Synthesis, characterization and bio-evaluation of bioactive composites scaffolds based on collagen and glass ceramic, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **9**, 99-108
- [47] L. C. Rusu, D. A. Kaya, M. V. Ghica, M. G. Albu, L. Popa, A. Butu, C. E. Dinu-Pirvu (2014) Eucalyptus-collagen composite gels for dentistry applications, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **9**, 317-323 (2014)

- [48] G. David, B. C. Simionescu, S. Maier, C. Balhui (2011) Micro-/nanostructured polymeric materials: Poly (ϵ -caprolactone) crosslinked collagen sponges, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **6**, 1575-1585
- [49] G. A. Carlson, J. L. Dragoo, B. Samimi, D. A. Bruckner, G. W. Bernard, M. Hedrick, P. Benhaim (2004) Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321**, 472-478
- [50] B. Basu, S. Nath (2009) Fundamentals of biomaterials and biocompatibility in B. Basu, D. Katti, A. Kumar (Eds.) *ADVANCED BIOMATERIALS. Fundamentals, Processing, and Applications*, The American Ceramic Society, A John Wiley & Sons, Inc., Publication
- [51] D. F. Williams (1988) Consensus and definitions in biomaterials: *Advances in Biomaterials*, Elsevier Publishers, Amsterdam
- [52] A. Binnaz Hazar Yoruç, B. Cem Şener (2012) Biomaterials in S. Kara (Ed.) *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, InTech Publishers
- [53] J. W. Boretos, M. Eden (1984) *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects*, Noyes Publications
- [54] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons (2013) *Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor* in B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons (Eds.) *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd Edition, Academic Press, Elsevier Inc.
- [55] M. S. Valiathan, V. K. Krishnan (1999) Biomaterial: An Overview, *National Medical Journal of India* **12**, 270–274
- [56] D. F. Williams (1987) *Definitions in Biomaterials*, Progress in Biomedical Engineering, Elsevier Publishers, Amsterdam
- [57] J. B. Park, J. D. Bronzino (2003) *Biomaterials: Principles and Applications*, CRC press

- [58] M. Vallet-Regi (2014) *Bioceramics with Clinical Applications*, John Wiley & Sons Ltd.
- [59] S. V. Dorozhkin (2011) Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics, *BIO* **2011**, 1-51, <http://ccaasmag.org/BIO>
- [60] M. Bohner (2010) Resorbable biomaterials as bone graft substitutes, *Materials Today* **13**, 24-30
- [61] P. Ducheyne, Q. Qiu (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function, *Biomaterials* **20**, 2287-2303
- [62] L. L. Hench (1998) Biomaterials, *Journal of the American Ceramic Society* **81**, 1705-1728
- [63] R. L. Messer, P. E. Lockwood, J. C. Wataha, J. B. Lewis, S. Norris, S. Bouillaguet (2003) In vitro cytotoxicity of traditional versus contemporary dental ceramics, *Journal of Prosthetic Dentistry* **90**, 452-458
- [64] A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, T. Hanawa (2004) Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **68**, 244-256
- [65] T. V. Thamaraiselvi, S. Rajeswari (2004) Biological Evaluation of Bioceramic Materials – A Review, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* **18**, 9-17
- [66] https://en.wikipedia.org/wiki/Calcium_phosphate
- [67] D. Acros (2014) Calcium Phosphate Bioceramics in M. Vallet-Regi (2014) *Bioceramics with Clinical Applications*, John Wiley & Sons Ltd.
- [68] H. A. Lowenstam, S. Weiner (1989) *Biomineralization*, Oxford University Press
- [69] S. V. Dorozhkin (2009) Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, *Materials* **2**, 399–498

- [70] E. B. Nery, K. L. Lynch, W. M. Hirthe, K. H. Mueller (1975) Bioceramic implants in surgically produced intrabony defects, *Journal of Periodontology* **46**, 328–347
- [71] H. W. Denissen, K. de Groot (1979) Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite, *The Journal of Prosthetic Dentistry* **42**, 551–556
- [72] L. L. Hench, J. M. Polack (2002) Third-generation biomedical materials, *Science* **295**, 1014–1017
- [73] L. L. Hench, S. Best (2004) *Ceramics, Glasses and Glass-Ceramics*, in *Biomaterials Science. An Introduction to Biomaterials in Medicine*, Elsevier Academic Press
- [74] R. Z. LeGros, A. Ito, K. Ishikawa, T. Sakae, J. P. LeGros (2009) Fundamentals of hydroxyapatite and related calcium phosphates in B. Basu, D. Katti, A. Kumar (Eds.) *ADVANCED BIOMATERIALS. Fundamentals, Processing, and Applications*, The American Ceramic Society, A John Wiley & Sons, Inc., Publication
- [75] H. Aoki (1994) *Medical Applications of Hydroxyapatite*, Ishiyaku EuroAmerica, Inc.
- [76] G. Daculsi, O. Laboux, O. Marad, P. Weiss (2003) Current state of the art of biphasic calcium phosphate ceramics, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **14**, 195–200
- [77] E. Damien, P. A. Revell (2004) Coralline hydroxyapatite bone graft substitute: A review of experimental studies and biomedical applications, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* **2**, 65–75
- [78] K. deGroot K (1983) *Ceramics of calcium phosphates: Preparation and properties* in K. deGroot (Ed.) *Bioceramics of Calcium Phosphate*, CRC Press : Boca Raton
- [79] H. Denissen, K. deGroot (1979) Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite, *The Journal of Prosthetic Dentistry* **42**, 551-556

- [80] M. Jarcho (1981) Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics .
Clinical Orthopaedics and related research **157**, 259–278
- [81] T. Kokubo T (1996) Formation of biologically active bone - like apatite on metals and polymers by a biomimetic process, Thermochemica Acta **280**, 479–490
- [82] R. Z. LeGeros (1988) Calcium phosphate materials in restorative dentistry: A review, Advances in Dental Research **2**, 164–183
- [83] R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros (1991) Hydroxyapatite in: Kokubo T (Ed). Handbook of Bioceramics and their Applications, Woodhead Publishing Ltd
- [84] R. Z. LeGeros RZ, G. Daculsi, J. P. LeGeros JP (2008) Bioactive bioceramics in: W. S. Pietrzak, B. L. Eppley (Eds.) Musculoskeletal Tissue Regeneration: Biological materials and Methods, Humana Press Inc.
- [85] W. A. Deer, R. A. Howie, J. Zussman (1985) An Introduction to Rock - forming Minerals, Longman
- [86] W. F. DeJong WF (1926) La substance minerale dans les os, Res. Trav. Chim. **45**, 445–448
- [87] D. McConnell D (1952) The crystal chemistry of carbonate apatites and their relationship to the composition of calcified tissue, Journal of Dental Research **31**, 53–63
- [88] R. Z. LeGeros RZ (1967) Crystallographic Studies of the Carbonate Substitution in the Apatite Structure, PhD Thesis, New York University
- [89] R. Z. LeGeros RZ (1981) Apatites in biological systems, Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials **4**, 1–45
- [90] C. Rey, V. Renugoplakrishan, B. Collins (1991) Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging, Calcified Tissue International **49**, 251–258
- [91] A. Barroug, L. T. Kuhn, L. C. Gerstenfeld, M. J. Glimcher (2004) Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release, Journal of Orthopaedic Research **22**, 703–708

- [92] A. Bigi, A. Ripamonti, S. Brückner, M. Gazzano, N. Roveri, S. A. Thomas (1989) Structure refinements of lead substituted calcium hydroxyapatite by X-ray powder fitting, *Acta Crystallographica Section B* **45**, 247–251
- [93] A. Bigi, E. Falini, M. Foresti, M. Gazzano, A. Ripamonti, N. Roveri (1996) Rietveld structure refinements of calcium hydroxyapatite containing magnesium, *Acta Crystallographica Section B* **52**, 87–92
- [94] C. Ergun, T. J. Webster, R. Bizios, R. H. Doremus (2002) Hydroxyapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. I. Structure and microstructure, *Journal of Biomedical Materials Research* **59**, 305–311
- [95] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. Bizios, R. (2002) Hydroxyapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research* **5**, 312–317
- [96] P. E. Mackie, J. C. Elliott, R. A. Young (1972) Monoclinic structure of synthetic $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, chloroapatite, *Acta Crystallographica Section B* **28**, 1840–1848
- [97] Y. Fujimori, H. Mishima, K. Sugaya, T. Sakae, R. Z. LeGeros, Y. Kozawa, H. Nagura (1998) In vitro interactions of osteoclast - like cells and hydroxyapatite ceramics, *Bioceramics* **11**, 335–338
- [98] M. Inoue, R. Z. LeGeros, M. Inoue, H. Tsujigiwa, H. Nagatsuka, T. Yamamoto, N. Nagai N (2004) In vitro response of osteoblast - like and odontoblast - like cells to unsubstituted and substituted apatites, *Journal of Biomedical Materials Research* **70A**, 585–593
- [99] T. J. Webster, C. Ergun, R. Doremus, R. Bizios (2002) Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research* **59**, 312–317
- [100] J. Winters, A. Kleckner, R. Z. LeGeros (1989) Fluoride inhibits osteoclastic bone resorption in vitro, *Journal of Dental Research* **68**, 353
- [121] R. Z. LeGeros (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, *Clinical orthopaedics and related research* **395**, 81-98

- [101] M. Yamaguchi, Y. H. Gao (1998) Potent effect of zinc acexamate on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of elderly female rats, *General Pharmacology* **30**, 423-427
- [102] I. A. Brand, J. Kleineke (1996) Intracellular zinc movement and its effect on the carbohydrate metabolism of isolated rat hepatocytes, *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1941-1949
- [103] H. Haase, W. Maret (2003) Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling, *Experimental Cell Research* **291**, 289-298
- [104] C. Jacob, W. Maret, B. L. Vallee (1998) Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 3489-3494
- [105] W. Maret (2005) Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**, 7-12
- [106] K. A. McCall, C. Huang, C. A. Fierke (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes, *Journal of Nutrition* **130**, 1437S-1446S
- [107] M. Yamaguchi, S. Kishi S (1996) Zinc compounds inhibit osteoclast-like cell formation at the earlier stage of rat marrow culture but not osteoclast function, *Molecular and Cellular Biochemistry* **158**, 171-177
- [108] D. L. Bougle, J. P. Sabatier, G. Guaydier-Souquieres, F. Guillon-Metz, D. Laroche, P. Jauzac, F. Bureau (2004) Zinc status and bone mineralisation in adolescent girls, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**, 17-21
- [109] R. Tudor, P. D. Zalewski, R. N. Ratnaike (2005) Zinc in health and chronic disease, *Journal of Nutrition Health & Aging* **9**, 45-51
- [110] C. T. Walsh, H. H. Sandstead, A. S. Prasad, P. M. Newberne, P. J. Fraker (1994) Zinc: health effects and research priorities for the 1990s, *Environmental Health Perspectives* **102**, 5-46

- [111] C. P. Doherty, P. M. Crofton, M. A. Sarkar, M. S. Shakur, J. C. Wade, C. J. Kelnar, M. W. Elmlinger, M. B. Ranke, W. A. Cutting (2002) Malnutrition, zinc supplementation and catch-up growth: Changes in insulin-like growth factor I, its binding proteins, bone formation and collagen turnover, *Clinical Endocrinology (Oxf)* **57**, 391-399
- [112] O. S. Atik (1983) Zinc and senile osteoporosis. *Journal of the American Geriatrics Society* **31**, 790-791
- [113] P. Relea, M. Revilla, E. Ripoll, I. Arribas, L. F. Villa, H. Rico (1995) Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis, *Age and Ageing* **24**, 303-307
- [114] T. H. Hyun, E. Barrett-Connor, D. B. Milne (2004) Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: The Rancho Bernardo Study, *American Journal of Clinical Nutrition* **80**, 715-721
- [115] H. H. Hsu, H. C. Anderson (1995) Effects of zinc and divalent cation chelators on ATP hydrolysis and Ca deposition by rachitic rat matrix vesicles, *Bone* **17**, 473-477
- [116] T. Kaji, M. Takata, T. Miyahara, H. Kozuka, F. Koizumi (1990) Interaction of zinc with cadmium and copper on ossification of embryonic chick bone in tissue culture, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **19**, 653-656
- [117] N. M. Lowe, N. M. Lowe, W. D. Fraser, M. J. Jackson (2002) Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *The Proceedings of the Nutrition Society* **61**, 181-185
- [118] K. S. Silvipriya, K. Krishna Kumar, A. R. Bhat, B. Dinesh Kumar, Anish John, P. lakshmanan (2015) Collagen: Animal Sources and Biomedical Application, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **5**, 123-127
- [119] E. J. Miller (1984) Biomedical and industrial application of collagen in K. A. Piez, A. H. Reddi (Eds.) *Extracellular Matrix Biochemistry*, Elsevier Publishing
- [120] K. S. E. Cheah (1985) Collagen genes and inherited connective tissue disease. *Biochemical Journal* **229**, 287-303

- [121] M. Mucalo (Ed.) (2015) Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Woodhead Publishing
- [122] L. L. Hench (1991) Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society* **74**, 1487-1510
- [123] M. Vallet-Regi, J. M. González-Calbet (2004) Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, **32**, 1-31
- [124] H. Zhou, J. Lee (2011) Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* **7**, 2769-2781
- [125] F.-Z. Cui, Y. Li, J. Ge (2007) Self-assembly of mineralized collagen composites, *Materials Science and Engineering: R: Reports* **57**, 1-27
- [126] C. Zhou, Y. Hong, X. Zhang (2013) Applications of nanostructured calcium phosphate in tissue engineering, *Biomaterials Science* **1**, 1012-1028
- [127] Q. Hu, Z. Tan, Y. Liu, J. Tao, Y. Cai, M. Zhang, H. Pan, X. Xua, R. Tang (2007) Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, *Journal of Materials Chemistry* **17**, 4690-4698
- [128] J. B. Lee, S. H. Lee, S. M Yu, J.-C. Park, J. B. Choi, J. K. Kim (2008) PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration, *Surface and Coatings Technology* **202**, 5757-5761
- [129] D. Xue, Q. Zheng, C. Zong, Q. Li, H. Li, S. Qian, B. Zhang, L. Yu, Z. Pan (2010) Osteochondral repair using porous poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite hybrid scaffolds with undifferentiated mesenchymal stem cells in a rat model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **94A**, 259-270
- [130] A. K. Nayak (2010) Hydroxyapatite Synthesis Methodologies: An Overview, *International Journal of ChemTech Research* **2**, 903-907

- [131] M. H. Santos, M. de Oliveira, P. de Freitas Souza, H. S. Mansur, W. L. Vasconcelos (2004) Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process, *Materials Research* **7**, 625-630
- [132] C. L. Popa, A. Deniaud, M. Chevallet, I. Michaud-Soret, D. Predoi (2016) Synthesis and characterization of hydroxyapatite doped with zinc at low concentrations, in *curs de evaluare la Ceramics International*
- [133] M. G. Albu (2011) *Collagen gels and matrices for biomedical applications*, Lambert Academic Publishing
- [134] C. L. Popa, S. Antohe, F. Safciuc, M. Ech Cherif El Kettani, D. Leduc, F. Antohe, M. V. Predoi (2016) Preliminary structural ultrasonic characterization of hydroxyapatite, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **under review**
- [135] A. Lungu , M. G. Albu , N. M. Florea , I. C. Stancu, E. Vasile, H. Iovu (2011) The influence of glycosaminoglycan type on the collagen-glycosaminoglycan porous scaffolds, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* **6**, 1867-1875
- [136] E. Goldman, L. H. Green (2009) *Practical handbook of microbiology*, 2nd edition, CRC Press LLC, Taylor & Francis Group.
- [137] E. S. Thain, T. Konishi, Y. Kawanobe, P. N. Lim, C. Choong, M. Aizawa (2013) Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomedical with enhanced bioactivity and antibacterial properties, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **24**, 437-445
- [138] F. Izumi, A. Yamamoto, N. R. Khasanova, S. Kumazawa, W.-Z. Hu, T. Kamiyama (2000) Novel techniques of neutron powder diffraction and their applications to superconducting oxides, *Physica C* **335**, 239–244
- [139] L. Lutterotti (2010) Total pattern fitting for the combined size-strain-stress texture determination in thin film diffraction, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **268**, 334-340

- [140] N. C. Popa (1998) The (hkl) dependence of diffraction-line broadening caused by strain and size for all laue groups in Rietveld refinement, *Journal of Applied Crystallography* **31**, 176–180
- [141] B. H. Toby (2006) R factors in Rietveld analysis: how good is good enough?, *Powder Diffraction* **21**, 67–70
- [142] M. G. S. Murray, J. Wang, C. B. Pontoon, P. M. Marquis (1995) An improvement in processing of hydroxyapatite ceramics, *Journal of Materials Science* **30**, 3061-3074
- [143] J. Klinkaewnarong, S. Maensiri (2010) Nanocrystalline Hydroxyapatite Powders by a Polymerized Complex Method, *Chiang Mai Journal of Science* **37**, 243-251
- [144] J. R. Guerra-López, G. A. Echeverría, J. A. Güida, R. Viña, G. Punte (2015) Synthetic hydroxyapatites doped with Zn (II) studied by X-ray diffraction, infrared, Raman and thermal analysis, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **81**, 57–65
- [145] R. B. Heimann, H. D. Lehman (Eds.) *Bioceramic coatings for medical implants – Trends and techniques* (2015) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany
- [146] S. Kaciulis, G. Mattogno, L. Pandolfi, M. Cavalli, G. Gnappi, A. Montenero (1999) XPS study of apatite-based coatings prepared by sol–gel technique, *Applied Surface Science* **151**, 1-5
- [147] A. Boyd, M. Akay, B. J. Meenan (2003) Influence of target surface degradation on the properties of r.f. magnetron-sputtered calcium phosphate coatings, *Surface and Interface Analysis* **35**, 188-198
- [148] L. Lou, A. E. Nelson, G. Heo, P. W. Major (2008) Surface chemical composition of human maxillary first premolar as assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), *Applied Surface Science* **254**, 6706–6709
- [149] J. Li, Y. Li, L. Zhang, Y. Zuo (2008) Composition of calcium deficient Na-containing carbonate hydroxyapatite modified with Cu(II) and Zn(II) ions, *Applied Surface Science* **254**, 2844–2850

- [150] S. Feliu Jr, V. Barranco (2003) XPS study of the surface chemistry of conventional hot-dip galvanised pure Zn, galvanneal and Zn–Al alloy coatings on steel, *Acta Materialia* **51**, 5413-5424
- [151] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers, *Journal of American Chemical Society* **60**, 309-319
- [152] J. H. DeBoer, B. C. Lippens (1964) Studies on pore systems in catalysis II. The shapes of pores in aluminium oxide systems, *Journal of Catalysis* **3**, 38-43
- [153] S. Brunauer, L. S. Deming, W. E. Deming, E. J. Teller (1940) On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases, *Journal of the American Chemical Society* **62**, 1723-1732
- [154] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda (1951) The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, *Journal of American Chemical Society* **73**, 373–380
- [155] J. H. de Boer, B. C. Lippens, B. G. Linsen, J. C. P. Broekhoff, A. van den Heuvel, Th.V. Osinga (1966) The t-curve of multimolecular N₂-adsorption, *Journal of Colloidal and Interface Science* **21**, 405-414
- [156] K. S. W. Sing (1967) Assessment of microporosity, *Chemistry and Industry (London)*, 829-830
- [157] A. Lecloux, J. P. Pirard (1979) The importance of standard isotherms in the analysis of adsorption isotherms for determining the porous texture of solids, *Journal of Colloid and Interface Science* **70** 265-281
- [158] <http://www.hepg2.com/>
- [159] Y. Han, S. Li, X. Cao, L. Yuan, Y. Wang, Y. Yin, T. Qiu, H. Dai, X. Wang (2015) Different Inhibitory Effect and Mechanism of Hydroxyapatite Nanoparticles on Normal Cells and Cancer Cells In Vitro and In Vivo, *Scientific Reports* **4**, 1-7
- [160] A. Hideki, O. Masataka, K. Seisuke (1992) Effects of HAP-Sol on Cell Growth, *Report of the institute for Medical and Dental Engineering* **26**, 15–21

- [161] S. Li, S. Zhang, W. Chen, O. Wen (1996) Effects of hydroxyapatite ultrafine powder on colony formation and cytoskeletons of MGC-803 cell, *Bioceramics* **9**, 225–227
- [162] Y. F. Wang, Y. H. Yan, X. Y. Cao, S. P. Li (2005) Preparation and Characterization of Strontium-Containing HAP Sol and Studies on Its Effects on Cancer and Normal cells, *Key Engineering Materials* **288–289**, 537–540
- [163] M. Z. Yin, Y. C. Han, I. W. Bauer, P. Chen, S. P. Li (2006) Effect of hydroxyapatite nanoparticles on the ultrastructure and function of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* **1**, 38–41
- [164] Y. Yuan, C. S. Liu, J. C. Qian, J. Wang, Y. Zhang (2010) Size-Mediated Cytotoxicity and Apoptosis of Hydroxyapatite Nanoparticles in Human Hepatoma HepG2 Cells, *Biomaterials* **31**, 730–740
- [165] R. Meena, K. K. Kesari, M. Rani, R. Paulraj (2012) Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Proliferation and Apoptosis of Human Breast Cancer Cells (MCF-7), *Journal of Nanoparticles Research* **14**, 712
- [166] Y. Yuan, C. Liu, J. Qian, J. Wang, Y. Zhang (2010) Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells, *Biomaterials* **31**, 730–740
- [167] T. J. Hsieh, T. Z. Liu, F. J. Lu, P. Y. Hsieh, C. H. Chen (2006) Actinodaphnine induces apoptosis through increased nitric oxide, reactive oxygen species and down-regulation of NF- κ B signaling in human hepatoma Mahlavu cells, *Food Chem Toxicol* **44**, 344–354
- [168] C. N. Chen, H. H. Huang, C. L. Wu, C. P. C. Lin, J. T. A Hsu, H. P. Hsieh, S. E. Chuang, G. M. Lai (2007) Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells, *Cancer Letters* **246**, 237–252
- [169] Y. Hu, Y. Yang, Q. D. You, W. Liu, H. Y. Gu, L. Zhao (2006) Oroxylin A induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was involved in

its antitumor activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **351**, 521–527

[170] E. Emri, E. Miko, P. Bai, G. Boros, G. Nagy, D. Rozsa, T. Juhasz, C. Hegedus, I. Horkay, E. Remenyik, G. Emri (2015) Effects of non-toxic zinc exposure on human epidermal keratinocytes, *Metallomics* **7**, 499-507

[171] G. Devanand Venkatasubbu, S. Ramasamy, G. S. Avadhani, L. Palanikumar, J. Kumar (2012) Size-mediated cytotoxicity of nanocrystalline titanium dioxide, pure and zinc-doped hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma cells, *Journal of Nanoparticle Research* **14**, 819-836

[172] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, W. C. W. Chan (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent, *Nature Nanotechnology* **3**, 145–150

[173] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C.W. Chan (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Letters* **6**, 662–668

[174] F. Osaki, T. Kanamori, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama (2004) A quantum dot conjugated sugar ball and its cellular uptake. On the size effects of endocytosis in the subviral region, *Journal of the American Chemical Society* **126**, 6520–6521

[175] M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter, J. N. Skepper (2009) Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability, *Biomaterials* **30**, 3307–3317

[176] M. Geiger, R. H. Li, W. Friess (2003) Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP, *Advanced Drug Delivery Review* **55**, 1613-1629

[177] S. Liao, F. Z. Cui, W. Zhang, Q. L. Feng (2004) Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite, *Journal of Biomedical Materials Research B* **69B**, 158-165

[178] M.C. Chang, J. Tanaka (2002) FTIR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked glutaraldehyde, *Biomaterials* **23**, 4811–4818

- [179] M. J. W. Povey (1997) Ultrasonic techniques for fluids characterization, Academic Press, San Diego, 1997
- [180] M. J. W. Povey (2006) Acoustic Methods for Particle Characterisation, *KONA* **24**, 126-133
- [181] V. A. Hackley, J. Texter, Conference Report (1998) International Workshop On Ultrasonic And Dielectric Characterization Techniques For Suspended Particulates – Conference Report, Gaithersburg, MD August 4-6, Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology **103**, 217-223
- [182] M. Motozawa, T. Sawada (2002) Ultrasonic Propagation in a Magnetic Fluid, Third International Symposium on Ultrasonic Doppler Methods for Fluid Mechanics and Fluid Engineering EPFL, Lausanne, Switzerland, September 9 - 11, 137-141
- [183] M. A. Bramantya, M. Motozawa, H. Takuma, M. Faiz, T. Sawada (2009) Experimental analysis of clustering structures in magnetic and MR fluids using ultrasound, Journal of Physics: Conference Series **149** 012040

Liste des propres contributions

6.1 Travaux publiés dans les revues

6.1.1 Revues indexées ISI

1. C. L. Popa, C. M. Bartha, M. Albu, R. Guegan, M. Motelica-Heino, M. C. Chifiriuc, C. Bleotu, M. L. Badea, S. Antohe (2015) Synthesis, characterization and cytotoxicity evaluation on zinc doped hydroxyapatite in collagen matrix, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures **10**, 681 – 691
2. R. V. Ghita, S. L. Iconaru, C. L. Popa, A. Costescu, P. Le Coustumer, M. Motelica-Heino, C. S. Ciobanu (2014) Tetraethyl Orthosilicate Coated Hydroxyapatite Powders for Lead Ions Removal from Aqueous Solutions, Journal of Nanomaterials **2014**, Article ID 176426, 7 pages
3. C. L. Popa, A. Groza, P. Chapon, C. S. Ciobanu, R. V. Ghita, R. Trusca, M. Ganciu, D. Predoi (2015) Physicochemical Analysis of the Polydimethylsiloxane Interlayer Influence on a Hydroxyapatite Doped with Silver Coating, Journal of Nanomaterials **2015**, Article ID 250617, 10 pages
4. C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, C. L. Popa, A. Costescu, M. Motelica-Heino, D. Predoi (2014) Porous Methyltrimethoxysilane Coated Nanoscale-Hydroxyapatite for Removing Lead Ions from Aqueous Solutions, Journal of Nanomaterials **2014**, Article ID 361061, 9 pages
5. C. S. Ciobanu, C. L. Popa, D. Predoi (2014) Sm:HAp Nanopowders Present Antibacterial Activity against Enterococcus faecalis, Journal of Nanomaterials **2014**, Article ID 780686, 9 pages
6. C. S. Ciobanu, A. Groza, S. L. Iconaru, C. L. Popa, P. Chapon, M. C. Chifiriuc, R. Hristu, G. A. Stanciu, C. C. Negriila, R. V. Ghita, M. Ganciu, D. Predoi (2015) Antimicrobial Activity Evaluation on Silver Doped Hydroxyapatite/Polydimethylsiloxane Composite Layer, BioMed Research International **2015**, Article ID 926513, 13 pages
7. C. L. Popa, M. Albu, C. Bartha, A. Costescu, C. Luculescu, R. Trusca, S. Antohe, Structural characterization and optical properties of hydroxyapatite/collagen matrix, Romanian Reports in Physics, in press
8. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, M. Stan, A. Dinischiotu, C. C. Negriila, M. Motelica-Heino, R. Guegan, D. Predoi (2014) Systematic investigation and in vitro biocompatibility studies on mesoporous europium doped hydroxyapatite, Central European Journal of Chemistry **12**, 1032-1046
9. C. S. Ciobanu, S. L. Iconaru, C. L. Popa, M. Motelica-Heino, D. Predoi (2015) Evaluation of Samarium Doped Hydroxyapatite, Ceramics for Medical

Application: Antimicrobial Activity, Journal of Nanomaterials **2015**, Article ID 849216, 11 pages

10. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, C. C. Petre, M. Motelica-Heino, S. L. Iconaru, G. Jiga, D. Predoi (2014) Hydroxyapatite with environmental applications, AIP Conference Proceedings **1599**, doi: 10.1063/1.4876842, 318
11. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, G. Voicu, E. Vasile, M. C. Chifiriuc, S. L. Iconaru and D. Predoi (2015) Influence of Thermal Treatment on the Antimicrobial Activity of Silver-Doped Biological Apatite, Nanoscale Research Letters **10**, 502-511
12. C. L. Popa, A. Deniaud, I. Michaud-Soret, R. Guégan, M. Motelica-Heino, D. Predoi (2016) Structural and Biological Assessment of Zinc Doped Hydroxyapatite Nanoparticles, Journal of Nanomaterials **2016**, Article ID 1062878, 10 pages
13. C. S. Ciobanu, C. L. Popa, D. Predoi (2016) Cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by the co-precipitation method, Journal of Serbian Chemical Society **81**, 433–446

6.2 Travaux présentés aux conférences

6.2.1 Conférences internationales

1. C. L. Popa, S. L. Iconaru, C. S. Ciobanu, Mikael Motelica-Heino, Régis Guegan, A.M. Prodan, D. Predoi, Physico-chemical and biological evaluation of zinc doped hydroxyapatite in collagen matrix (2016) European Chemistry Congress (Eurochemistry 2016), Roma, Italia, 16-18 Iunie 2016
2. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, A. M. Prodan, C. Turculet, M. L. Badea, D. Predoi, Antimicrobial activity of zinc doped hydroxyapatite prepared by co-precipitation method (2015) 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2015), Porto, Portugalia, 13-16 Septembrie 2015
3. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, M. Albu, M. Motelica-Heino, D. Predoi, Physico-chemical characterizations and cytotoxicity evaluation of novel zinc doped hydroxyapatite in a collagen matrix (2015) 15th European Conference On Solid State Chemistry (ECSSC15), Viena, Austria, 23-26 August 2015
4. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, M. L. Badea, P. Chapon, R. V. Ghita, S. Antohe, D. Predoi, Structural characterization and bacterial inhibiting effect of zinc doped hydroxyapatite layer (2015) The 8th International Conference On Advanced Materials, Rocam 2015, Bucuresti, Romania, 7-10 Iulie 2015
5. C. L. Popa, C. S. Ciobanu, C. C. Petre, M. Motelica-Heino, D. Predoi, Hydroxyapatite With Environmental Applications (2014) Times of Polymers (TOP) and Composites 2014, Ischia, Italia, 22-26 Iunie 2014