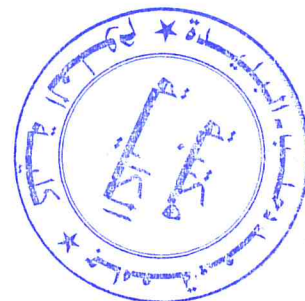


UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Option : *Chimie organique*

Présenté Par : *Benbouteldja Selma*

Thème

*Préparation et caractérisation d'un matériau
micro/nanoparticulaire à base de phosphates de calcium
pour la vectorisation d'un agent
thérapeutique porphyrinique, la m-THPP*

Soutenu le 8/10/2013, devant le jury composé de :

<i>Mr R. BELAL</i>	<i>Professeur</i>	<i>président</i>
<i>Mme N. SALHI</i>	<i>professeur</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mr. Y. BAL</i>	<i>professeur</i>	<i>Directeur de thèse</i>

Laboratoire de Chimie –Physique moléculaire et macromoléculaire

2013

Remerciement



En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant qui me fait chaque jour des merveilles.

Je remercie très respectivement le responsable du master chimie moléculaire monsieur le professeur R. Belal pour sa disponibilité, son aide, et ses conseils avisés.

Je remercie mon promoteur Mr Bal pour les conseils prodigués, le soutien moral et l'effort fourni.

Je remercie également les membres de jury d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements à ma Co-promotrice Ben Mihoub Amina pour l'effort fourni et pour sa persévérance dans le suivi.

Je remercie également tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué dans la réalisation de ce mémoire en particulier le recteur de l'université de Laghouat, le chef du département de chimie de l'université de Laghouat et monsieur Saidat (université de Laghouat) je remercie aussi le chef du département de la faculté de pharmacie, à Mr Abbes Samir et Mr Kars et sans oublier les gens du centre de développement des technologies avancées CDTA.

Je remercie l'ingénieur du laboratoire Melle El Acheache qui m'a toujours soutenu, aidé et encouragé pendant toute la période de recherche.

Dédicace

*Celui qu'Allah a envoyé, clémence pour l'univers, Ultime prophète et émissaire
soigneur des aïeux et des descendants, Le sincère, le vertueux, MOHAMMED
l'émissaire (envoyé) d'Allah*

صلى الله عليه و سلم

*Tout d'abord je rend grâce à ALLAH créateur de l'univers et mètre des destinées pour
avoir permis à la mienne de suivre la bonne voie, celle de la fois, de savoir et pour m'avoir
guider et soutenue.*

Je Dédie ce modeste travail

À ma très chère mère.

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour
tous les sacrifices et l'amour qu'ils m'ont prodigué a fin de me permettre d'avoir à ce stade.*

À mon père.

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, et le respect que j'ai toujours eue pour
vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma
formation.*

*Et à ma très chère sœur : ZINEBE, MES FRÈRES: ROBERT,
MOHAMMED ALHADJ et MAFFOUDE.*

*À mon très cher fiancé Chakib pour ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton
profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*À toute ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousins en particulier à Nabil et son
épouse Hadjira et ces enfants Nourhane, Hanane et Mohamed.*

*À tous mes amis en particulier à ma très chère copine Wassila et à Djazia, Sarah Abed,
Kenza, Wissem, Hania, Khadija, Horia, zaycha, Sarah.*

Résumé

Des micro/nanoparticules des phosphates de calcium (hydroxyapatite et Brushite) ont été préparées dans ce travail selon deux voies différentes, la voie hydrothermique et la voie biomimétique. Ces particules devant être utilisées comme vecteurs pour la m-THPP (méso-5, 10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrine), un anti-cancéreux pour la thérapie photodynamique PDT. Les résultats expérimentaux obtenus montrent bien, effectivement, la possibilité d'inclure l'agent actif dans des matrices aussi variées que l'HAP seule ou des systèmes composites tels que l'HAP- β -cyclodextrine. Cependant, il semble d'après des résultats spectroscopiques (FTIR et notamment DRX) que la présence de la β -CD conduit à des modifications structurales du support principal phosphaté en augmentant sa pureté. En effet, la cristallinité de la matrice minérale devient meilleure et la taille des particules plus petite.

Mots clés :

Vecteur thérapeutique, micro/nanoparticules, méso-5,10,20,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrine, hydroxyapatite, Brushite, β -cyclodextrine.

Abstract

Calcium phosphate micro/nanoparticles (Hydroxyapatite, Brushite) were prepared in this work using two different routes, hydrothermal and biomimetic route respectively. These particles could be used as vectors for (méso-5,10,15,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrine) m-THPP which is a photosensitizer used in treatment of cancer by PDT. The experimental results demonstrate that effectively, it's possible to encapsulate the active agent into HAP in its simple or composite form. However, according to the spectroscopic results (FTIR and XRD), that the presence of β -CD lead to a structural modification of the calcium phosphate carrier increasing its purity, indeed, the crystallinity of the mineral matrix becomes better and the size of the particles becomes smallest.

Key words:

Vector therapeutic, micro / nanoparticles, méso-5, 10, 20, 20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrine, hydroxyapatite, brushite, β -cyclodextrin

المخلص

جسيمات مجهرية و نانومترية من فوسفات الكالسيوم (هيدروكسيباتيت و براشيت) قد أعدت في هذا العمل بطريقتين مختلفتين : طريقة حرارية و طريقة بيوميبتيكية . ليتم إستخدامها كنواقل طبية لي ميزو 10،5 15،20 نيتراكيس (4- هيدروكسي- فنيل) بورفرين m-THPP ضد السرطان بواسطة الدينامكية الضوئية PDT، نتائج تجريبية محصلة تبين فيها فعلا أن إمكانية إدراج العامل الناشط على مصفوفات مختلفة من HAP او نظم مركب مثل HAP- β -CD . فإنه يبدو من نتائج التحليل الطيفي (FTIR و DRX) أن وجود B-CD أدى إلى تغيرات هيكلية لدعم الرئيسي من الفوسفات و ذلك بزيادة نقاوته و بالفعل فإن تبلور المصفوفة المعدنية يصبح أفضل حجم و أصغر الجسيمات .

كلمات مفتاح :

أشعة علاجية ، جسيمات مجهرية و نانومترية، ميزو 10،5 15،20 نيتراكيس (4- هيدروكسي فنيل) بورفرين . هيدروكسيباتيت، براشيت، بيتا سيكلوديسترين .

SOMMAIRE

Introduction général	P.01
Chapitre I : Etude bibliographique	P.03
I-1 La vectorisation.....	P.03
I-1.1 Définition.....	P.03
I-1.2 Les différents types de vecteurs.....	P.03
I-1.3 Les différentes générations de vecteurs.....	P.04
I-2 Les phosphates de calcium.....	P.05
I-2.1 Généralités.....	P.05
I-2.2 L'hydroxyapatite.....	P.07
i. Voies de synthèse.....	P.08
ii. Structure et propriété.....	P.08
iii. Les différentes applications de l'HA.....	P.12
Bibliographie	P.17
Chapitre II : partie expérimentale	P.20
II. 1 Introduction.....	P.20
II.2 Synthèse des micro/nanoparticules des phosphates de calcium vides.....	P.21
II.2-1 Synthèse des Np/ μ p.HA par voie hydrothermique.....	P.21
a. Microparticules d'hydroxyapatite (μ .HA).....	P.21
b. Microparticules d'hydroxyapatite fonctionnalisées (μ p.HAf).....	P.21

SOMMAIRE

II.2-2 Synthèse des microparticules de l'hydroxyapatite par voie Biomimétique.....	P.22
a. Préparation du liquide physiologique stimulé (SBF).....	P.22
b. Microparticules d'hydroxyapatite par voie biomimétique (μ p.HA /SBF).....	P.23
II.2-3 Caractérisation des phosphates de calcium synthétisés.....	P.23
a) Aspect physique.....	P.23
b) Caractérisation spectroscopique par FTIR.....	P.24
c) Caractérisation par diffraction des rayons X.....	P.28
d) Caractérisation morphologique et calcul de taille des particules par MEB.....	P.33
II.2-4 Etude de la bioactivité des phosphates de calcium synthétisés.....	P.34
II.3 Synthèse des micro/nanoparticules des phosphates de calcium chargé en principe actif.....	P.35
a. Chargement directe.....	P.36
b. Chargement indirecte.....	P.36
1. Préparation du système supramoléculaire.....	P.36
2. La formation du système supramoléculaire.....	P.36
II.3-2 Caractérisation de HA chargée en principe actif.....	P.40
a) Aspect morphologique.....	P.40
b) Spectroscopie FTIR.....	P.40
Bibliographie.....	P.42
Conclusion générale.....	P.45

Liste des illustrations

Listes des figures

Fig.I-1 : (a) : liposome, (b) : micro/nanosphere et (c) : micro/nanocapsule.....	P.04
Fig.I-2 : Les trois générations des vecteurs des médicaments.....	P.05
Fig.I-3 : Projection dans le plan de base (001) de la cellule élémentaire de l'hydroxyapatite.....	P.09
Fig.I-4 : Spectre FTIR de l'HA.....	P.10
Fig.I-5 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'HA.....	P.11
Fig.II-1 : Synthèse d'HA par voie hydrothermique.....	P.22
Fig.II-2 : Synthèse de la Brushite par voie biomimétique.....	P.23
Fig.II-3 : Vue macroscopique des différents phosphates de calcium synthétisés.....	P.24
Fig.II-4 : Spectre FTIR de l'hydroxyapatite par voie hydrothermique.....	P.25
Fig.II-5 : Spectre FTIR d'HA- β -CD par voie hydrothermique.....	P.25
Fig.II-6 : Spectre FTIR d'HA-PEG par voie hydrothermique.....	P.26
Fig.II-7 : Spectre FTIR d'HA- β -CD-PEG par voie hydrothermique.....	P.27
Fig.II-8 : Spectre FTIR du Brushite par voie biomimétique.....	P.28
Fig.II-9 : Diffractogramme RX d'HA par voie hydrothermique.....	P.29
Fig.II-10 : Diffractogramme RX d'HA- β -CD synthétisé par voie hydrothermique.....	P.29
Fig.II-11 : Diffractogramme RX d'HA-PEG synthétisé par voie hydrothermique.....	P.30
Fig.II-12 : Diffractogramme RX d'HA- β -CD -PEG synthétisé par voie hydrothermique .	P.31
Fig.II-13 : Diffractogramme RX de la Brushite synthétisée par voie biomimétique.....	P.32
Fig.II-14 : Microphotographies des différents phosphates de calcium synthétisés.....	P.34

Liste des illustrations

- Fig.II-15** : Changement des valeurs du pH en fonction de la période du stockage des différents systèmes synthétisés dans le SBF.....**P.35**
- Fig.II-16** :Spectre UV-Vis du complexe d'inclusion m-THPP : β -CD à différentes concentration de β -CD, pH=3.....**P.37**
- Fig.II-17** :Spectre UV-Vis du complexe d'inclusion m-THPP : β -CD à différentes concentration de β -CD, pH=7.....**P.37**
- Fig.II-18** :Spectre UV-Vis du complexe d'inclusion m-THPP : β -CD à différentes concentration de β -CD, pH=10.....**P.38**
- Fig.II-19** :Double réciproque du m-THPP à différentes concentrations de la β -CD en milieu neutre.....**P.39**
- Fig.II-20** : Vue macroscopique de l'hydroxyapatite chargé en principe actif (a) : HA+PS et (b) : HA+complexe d'inclusion C.....**P.40**
- Fig.II-21** : Spectre FTIR de HA chargée par (a) : PS seul et (b) : complexe d'inclusion...**P.41**

Liste des tableaux

- Tab.I-1** : Orthophosphates de calcium et caractéristiques : rapport atomique (Ca/P) et solubilité.....**P.07**
- Tab.I-2** : Position et intensités des bandes FTIR de l'HA.....**P.10**
- Tab.I-3** : Distances interréticulaires et intensités des principales raies de diffraction de l'HA.....**P.11**
- Tab.I-4** : Paramètres thermo physiques et mécaniques de l'HA.....**P.12**

Liste des abréviations

MCPA :phosphate monocalcique anhydre.

MCPM :phosphate monocalcique monohydraté.

DCPA :phosphate dicalcique anhydre (monitite).

DCPD :phosphate dicalcique dihydraté (brushite).

OCP :phosphate octacalcique.

PTCa :phosphate tricalcique apatitique.

NCA :Les phosphates de calcium apatitiquesnanocristallins.

BSA :l'albumine de sérum bovin.

HA/TCP : hydroxyapatite sur le phosphate tricalcique.

HA : hydroxyapatite.

μ.HA: microparticule d' hydroxyapatite.

Np/μp.HA : micro/nanoparticule d'hydroxyapatite.

μp.HAf : Microparticules d'hydroxyapatite fonctionnalisées.

μp.HA-PEG : microparticule d' hydroxyapatite avec le poly éthylène glycol.

μp.HA-β-CD : microparticule d' hydroxyapatite avec la bêta-cyclodextrine.

Np.HA-PEG-β-CD : nanoparticule d'hydroxyapatite avec le poly éthylène glycol.

SBF:simulated body fluid.

μp.HA/SBF : Microparticules de l'hydroxyapatite dans lesimulated body fluid.

β-CD : beta-cyclodextrine.

PEG:poly ethylene glycol.

m-THPP:méso 5, 10, 15, 20 –tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrine.

Liste des abréviations

m-THPP : B-CD : complexe d'inclusion B-CD avec la THPP a base libre.

DMSO : diméthyle sulfoxyde.

FT-IR : spectrophotométrie infrarouge à transformée de fourrier.

DRX : diffraction rayons X.

K : constante d'inclusion.

MEB : microscopie à balayage électronique.

α -TCP :Phosphate de calcium tricalcique de type α .

β -TCP :Phosphate de calcium tricalcique de type β .

m-THPP/DMSO : méso 5, 10, 15,20 –tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrine dans diméthyle sulfoxyde.

UV-Vis : spectrophotométrie ultraviolet visible.

μm : micromètre

nm : nanomètre

Introduction générale

Introduction générale

Des progrès spectaculaires ont été observés au cours de ces dernières décades pour le traitement de plusieurs pathologies. Néanmoins, certains traitements, notamment dans le cas des maladies cancéreuses, présentent une efficacité thérapeutique encore limitée et accompagnée d'effets secondaires considérables. Ces effets secondaires résultent d'une part de l'accumulation indésirable du principe actif dans des tissus sains qui provoque une certaine toxicité, d'autre part de la nature des excipients de la formulation galénique.

L'adressage ciblé de molécules thérapeutiques vers un site d'action spécifique (un tissu ou une cellule malade) constitue actuellement un défi majeur pour le traitement des maladies cancéreuses et infectieuses. Ce concept s'approche de plus en plus de la réalité avec le développement des nanotechnologies qui offrent des opportunités intéressantes pour la vectorisation ciblée de principes actifs. Plusieurs types de nanoparticules ont été développés telles que les liposomes, les micelles, les micro/nanocapsules, les micro/nanosphères, ...ect. Avec tous ces agents de vectorisation on vise souvent la protection de l'agent actif, l'augmentation de sa sélectivité thérapeutique et l'élimination ou la réduction des effets secondaires associés.

En outre, du fait de l'hydrophobie prononcée de certains principes actifs importants, notamment des photosensibilisateurs utilisés en thérapie photodynamique pour le traitement du cancer, le contrôle de cette propriété (qui limite en fait l'efficacité) est considérée actuellement comme une thématique de recherche primordiale. En effet, on peut modifier la propriété d'hydrophobie du PS par son inclusion, par exemple, dans des molécules cages hydrophiles telles que la β -cyclodextrine. Cette possibilité constitue notre intérêt majeur dans cette étude.

Des matériaux phosphocalciques apatitiques comme l'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) sont utilisés ici comme support de base dans des systèmes biologiques simulés. Ces matériaux, similaires aux tissus osseux, sont généralement bioactifs, biocompatibles et non toxiques.

Dans notre travail, des microparticules à base d'hydroxyapatite ont été préparées et utilisées comme vecteurs pour le (m-THHP), agent actif.

Ce modeste travail est partagé en deux parties :

La première partie est consacrée à une revue bibliographique sur la vectorisation, la génération des vecteurs du principe actif, les phosphates de calcium et l'hydroxyapatite.

Dans la seconde partie, on s'est intéressé au développement de méthodes expérimentales pour la préparation et la caractérisation des microparticules d'hydroxyapatite par voies hydrothermique et biomimétique ainsi que des complexes d'inclusion de type «Host-Guest» de l'agent actif (m-THPP) dans une molécule cage (β -cyclodextrine).

La spectrophotométrie infrarouge (FT-IR), la spectrophotométrie UV-Vis, la diffraction à rayons X (DRX) ainsi que la microscopie électronique à balayage (MEB) sont les principales techniques analytiques utilisées dans cette étude.

Chapitre I : Etude bibliographique

L'adressage des molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment dans le cas des maladies cancéreuses, présentent une efficacité thérapeutique et limitée d'accompagnée d'effets secondaires. Ce concept est devenu près de la réalité grâce à la nanotechnologie avec le concept de la vectorisation ciblée des agents actifs [1].

I-1 La vectorisation

I-1.1 Définition

Vectoriser un médicament, c'est utiliser un support nommé "vecteur" pour l'acheminer sur le site malade dans un but thérapeutique. La vectorisation des médicaments fait l'objet de nombreuses recherches impliquant différentes approches car elle concerne pratiquement toutes les maladies et plus particulièrement celles qui tourmentent l'Humanité, comme le cancer.

On peut dire que les nano/microparticules sont des vecteurs efficaces car leur index thérapeutique (capacité à traiter une maladie) est élevé par rapport aux techniques conventionnelles. Cela est dû au fait que l'utilisation des nano/microparticules va permettre dans un premier temps de cibler les cellules malades, donc de n'incorporer que la dose qu'il faut, et dans un deuxième temps, leur grande surface par rapport à leur volume va permettre d'administrer plus de principe actif, il n'y aura donc pas besoin d'injecter une grande quantité de ces vecteurs dans le sang ce qui implique une baisse des risques liés à la toxicité.

I-1.2 Les différents types de vecteurs

On distingue trois types de vecteurs :

1. **Le liposome** : vésicule biodégradable composée de deux couches de lipides et d'un compartiment aqueux au centre de la nanoparticule. Lorsque le principe actif du médicament à stocker dans le liposome est hydrophile, il est placé dans le compartiment aqueux, mais lorsqu'il est lipophile, il est placé dans la bicouche de lipides. Le liposome mesure environ 100nm ce qui fait de lui un agent 70 fois plus petit qu'un globule rouge.

- 2. La nano/microsphère :** polymère (molécules enchevêtrés) biodégradable de forme sphérique. Le principe actif du médicament est dispersé dans la matrice de polymère. Ce principe actif sera libéré lors de la dégradation de la nanosphère.
- 3. La nano/microcapsule :** paroi fine de polymère biodégradable qui entoure le principe actif. On parle alors de "réservoir" du principe actif.

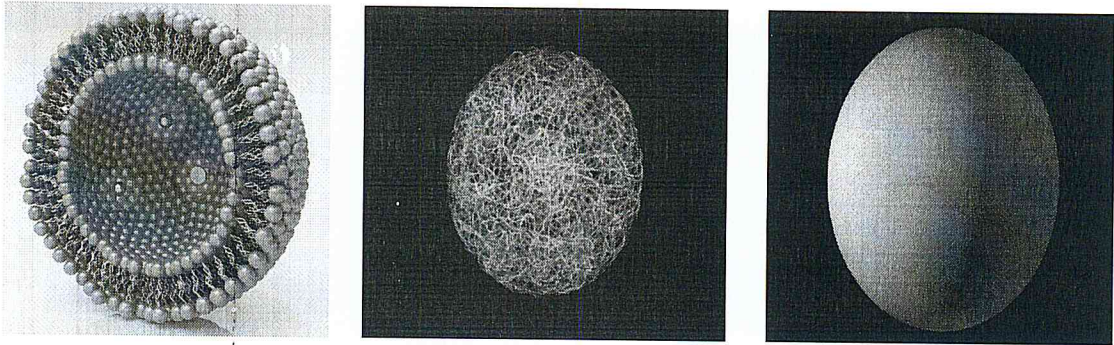


Fig.I-1 : (a) : liposome, (b) : micro/nanosphere et (c) : micro/nanocapsule

I-1.3 Les différentes générations de vecteurs

a) Les vecteurs de la première génération

Ce sont des microparticules administrées par voie vasculaire à proximité de l'organe à traiter pour libérer le principe actif. Ces microparticules ont été utilisées pour l'encapsulation des agents anticancéreux et le ciblage des tumeurs selon un mécanisme de chimio-embolisation qui conjugue une oblitération des artères nourricières de la tumeur à une libération de l'agent anti-tumoral. Cependant, depuis une vingtaine d'années, l'intérêt s'est porté sur l'obtention de vecteurs de taille submicronique permettant de nouvelles voies d'administration [2].

b) Les vecteurs de deuxième génération

Ce sont des liposomes, des nanosphères ou des nanocapsules de taille inférieure au micromètre. La vectorisation est dite passive quand la distribution du principe actif est imposée par les caractéristiques physico-chimiques et la taille du vecteur. Des résultats intéressants ont été obtenus lors de l'administration de vecteurs colloïdaux par voie orale ou intramusculaire. Par voie intraveineuse, le problème principal réside dans la capture de ces particules principalement par le système phagocytaire mononucléé. Il est tout à fait remarquable que ce verrou technologique ait été contourné grâce à l'application du concept

physico-chimique de la « répulsion stérique » développé par l'équipe de Gennes dès le début des années 1990. Le recouvrement des vecteurs par des polymères hydrophiles et flexible, comme les polyéthylènes glycols (PEG), les polysaccharides, les poloxamers et les poloxamines, empêche les protéines, en particulier les opsonines, de s'adsorber à leur surface [2].

c) Les vecteurs de troisième génération

Lorsque les vecteurs de deuxième génération sont décorés de ligands, ils sont alors capables de reconnaître de manière sélective des antigènes ou des récepteurs qui sont hyper-exprimés à la surface des cellules cibles (exp : cellules cancéreuses) [2]. La conception de ces vecteurs de 3^{ème} génération nécessite la construction d'édifices supramoléculaires composés :

- D'une particule type liposome ou nanoparticule.
- D'une couche de polymères hydrophiles et flexibles (exp : PEG) pour éviter la reconnaissance hépatospléniques.
- D'un ligand de reconnaissance membranaire à l'extrémité de certaines chaînes de PEG.

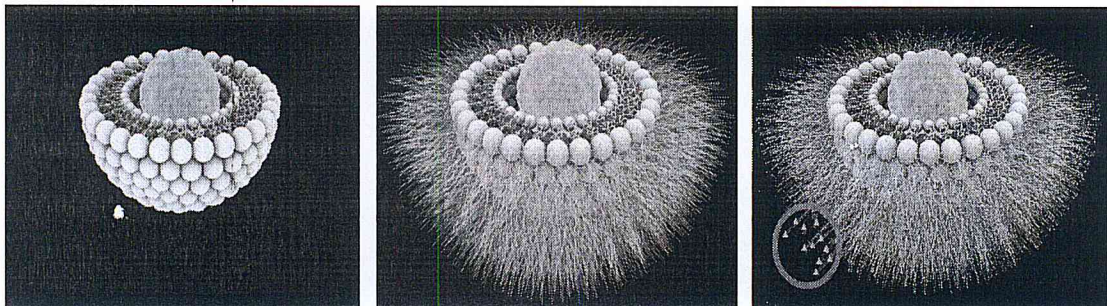


Fig.I-2 : Les trois générations des vecteurs des médicaments

I-2 Les phosphates de calcium

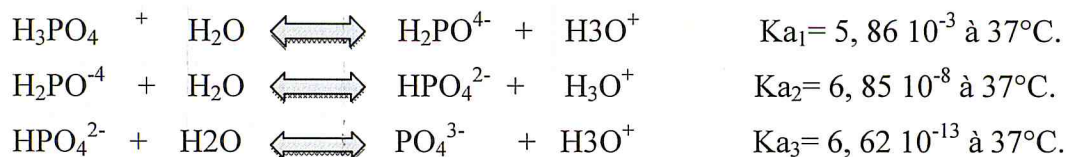
I-2.1 Généralités

Les phosphates de calcium jouent un rôle important dans divers domaines. Dans l'industrie, ces minerais sont la source principale des engrais phosphatés et servent à préparer l'acide phosphorique et différents dérivés phosphatés [3]. De plus, leurs propriétés électroniques sont largement mises à profit dans la conception des lampes fluorescentes [4]

et des matériaux pour Laser [5]. Ils sont également utilisés en chromatographie pour la séparation et la purification des molécules organiques [6; 7].

Outre leur importance industrielle, les phosphates de calcium apatitiques ont connu un grand essor dans le domaine des biomatériaux. En effet, grâce à leur composition chimique proche de la phase minérale des tissus osseux, leurs propriétés de biocompatibilité et de bioactivité les rendent utilisables sous diverses formes : substituts osseux, système de libération de principes actifs, céramiques et ciments etc... [8; 9].

Les sels de calcium de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4) constituent une grande famille de composés solides: les orthophosphates de calcium. Ces composés dérivent en général de la neutralisation de la première acidité (sels monobasiques : MCPA et MCPM), de la deuxième acidité (sels dibasiques : DCPA et DCPD) et / ou de la troisième acidité de H_3PO_4 (sels tribasiques : OCP, PTCa). Les équations des réactions acido-basiques suivantes représentent les neutralisations successives des différentes acidités de l'acide orthophosphorique.



Les propriétés de dissolution de ces phosphates de calcium dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques, en particulier le rapport molaire Ca/P, la structure cristallographique et la surface spécifique [10]. Ainsi, en fonction du rapport molaire Ca/P qui varie de 1,33 à 1,67, nous pouvons définir plusieurs familles d'orthophosphates de calcium répertoriées dans le tableau I-3.

Parmi ces phosphates de calcium, notre choix a porté sur ces types d'apatites connues par leurs applications dans le domaine des biomatériaux :

- Hydroxyapatite (HA).
- Apatites nanocristallines carbonatées.

Tab.I-1 : Orthophosphates de calcium et caractéristiques : rapport atomique (Ca/P) et solubilité[11].

Phosphate de Calcium	Nom abrégé	Formule Chimique	Ca/P	Solubilité (pK _s)*
Phosphate monocalcique				
anhydre	MCPA	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0,50	
monohydraté	MPCM	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ · H ₂ O	0,50	
Phosphate dicalcique				
anhydre (monétite)	DCPA	CaHPO ₄	1,00	6,04
dihydraté (brushite)	DCPD	CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1,00	6,73
Phosphate octocalcique				
triclinique	OCP ₁	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ · 5H ₂ O	1,33	98,6
apatitique	OCP ₂	Ca ₈ (HPO ₄) _{2,5} (PO ₄) _{3,5} (OH) _{0,5}	1,33	
amorphe	OCP _{am}	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ · nH ₂ O	1,33	
Phosphate tricalcique				
α ou β	TCP _(α,β)	Ca ₃ (PO ₄) ₂		28,5- 29,6
apatitique	TCP ₂	Ca ₉ (PO ₄) ₅ (HPO ₄)(OH)		
amorphe	ACP	Ca ₉ (PO ₄) ₆ · nH ₂ O		
Hydroxyapatite phosphocalcique*				
stoechiométrique	HA	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	117,2
non-stoechiométrique	PCA	Ca _{10-x} ((PO ₄) _{6-x} (HPO ₄) _x)(OH) _{2-x}	1,33-1,67	

* Produit de solubilité (pK_s) à 37°C [12].

I-2.2 L'hydroxyapatite

Les tissus durs, l'os et les dents, sont des composites organo-céramiques qui ont une microstructure très complexe. Le principal constituant minéral de l'os est l'hydroxyapatite phosphocalcique (HA) pour une part de ~50% en masse et ~70% en volume.

Elle semble être le matériau céramique le plus adéquat pour la construction du tissu osseux artificiel grâce à ses excellentes propriétés de biocompatibilité [13]. Malheureusement, les caractéristiques mécaniques des céramiques pures d'HA sont mauvaises. Les applications médicales sont limitées aux petits implants non chargés mécaniquement, aux poudres, aux

revêtements et aux implants poreux peu chargés [14]. Sous forme de couches minces (films) ou de revêtements, l'HA garde l'intégrité mécanique du dispositif métallique de la prothèse ou de l'implant. Compte tenu de son excellente bioactivité, l'HA favorise le développement du tissu naturel osseux sur le dispositif prothétique et contribue à l'adhésion et à la prolifération des cellules osseuses.

i. Voies de synthèse

On connaît deux voies principales d'élaboration des poudres d'HA, à savoir: les synthèses par voie humide et les réactions à l'état solide [14].

Les méthodes par voie humide peuvent être divisées en trois groupes: la précipitation, la technique hydrothermale et l'hydrolyse des autres phosphates de calcium. En fonction de la méthode on obtient des matériaux de morphologies, stœchiométries et degrés de cristallinité variés.

Les réactions à l'état solide donnent usuellement des produits stœchiométriques, bien cristallisés, mais exigent des températures relativement importantes. De plus, le frittage de ces poudres est simple.

Il existe aussi des techniques alternatives pour l'élaboration des poudres d'HA pure. Nous énumérons ici la méthode sol-gel [15], la pyrolyse-spray [16], l'irradiation sous micro-ondes [17] et la méthode de l'émulsion [18].

ii. Structure et propriétés

L'hydroxyapatite fait partie de la famille des orthophosphates de calcium. Elle cristallise dans une structure hexagonale du groupe spatial P63/m [19]. Les paramètres du réseau cristallin sont $a_0=b_0=9,418 (\pm 0,003) \text{ \AA}$, $c=6,883 (\pm 0,003) \text{ \AA}$. La forme hexagonale est connue depuis longtemps. Ultérieurement une forme monoclinique a été décrite [20].

Le squelette de l'apatite (Figure I.9) est formé par deux couches horizontales de tétraèdres PO₄, situés à $z=1/4$ et $z=3/4$, ayant 2 atomes d'oxygène dans le plan horizontal et

les 2 autres situés sur une parallèle à l'axe c . Perpendiculairement à ces 2 couches, deux types de tunnels apparaissent:

- le premier type correspond à l'axe ternaire de la structure; ce type de tunnels existe sur chaque cellule élémentaire et chaque tunnel contient deux atomes de calcium.
- le deuxième type correspond à l'axe de symétrie hélicoïdal d'ordre 6 situé aux sommets de la maille élémentaire; les parois de ce tunnel sont constituées d'atomes d'oxygène ou de calcium et contiennent aussi les groupes OH^- .

Les atomes de calcium forment des triangles équilatéraux. Les plans de ces triangles sont parallèles l'un à l'autre en formant ainsi le tunnel. La distance entre deux plans consécutifs est environ $6,5 \text{ \AA}$. Les ions hydroxyles sont situés au centre des triangles et orientés avec l'atome d'hydrogène vers la direction de l'axe c . Ce type de tunnel a un diamètre beaucoup plus important que celui du premier type et confère à l'apatite des propriétés d'échange ionique, spécialement des ions OH^- et F^- , et permet aussi d'abriter de petites molécules, comme, par exemple, O_2 et H_2O . [21]

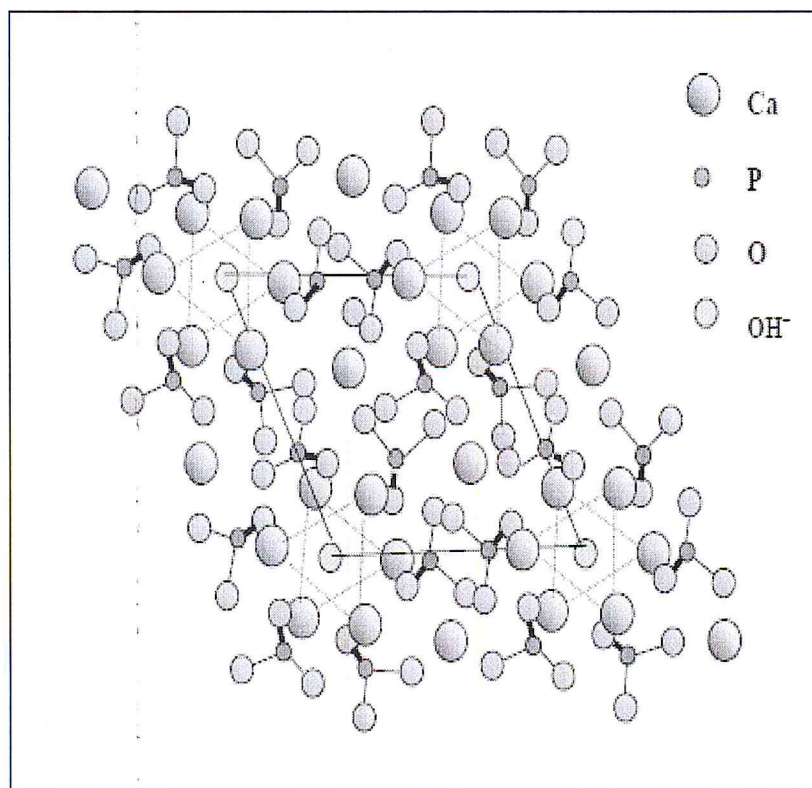


Fig.I-3 : Projection dans le plan de base (001) de la cellule élémentaire de l'hydroxyapatite

Le spectre IR de l'HA est reporté sur la Figure I.10. Les positions des bandes et les intensités sont indiquées dans le Tableau I.10 [22].

Tab.I-2 : Position et intensités des bandes FTIR de l'HA

Nombre d'onde (cm-1)	intensité	Attribution
3572	moyenne	(v1) OH ⁻
1093	forte	(v3) PO ₄ ³⁻
1050	Très forte	(v3) PO ₄ ³⁻
963	forte	(v1) PO ₄ ³⁻
630	moyenn	OH
602	forte	(v4) PO ₄ ³⁻
573	forte	(v4) PO ₄ ³⁻
474	moyenne	(v2) PO ₄ ³⁻

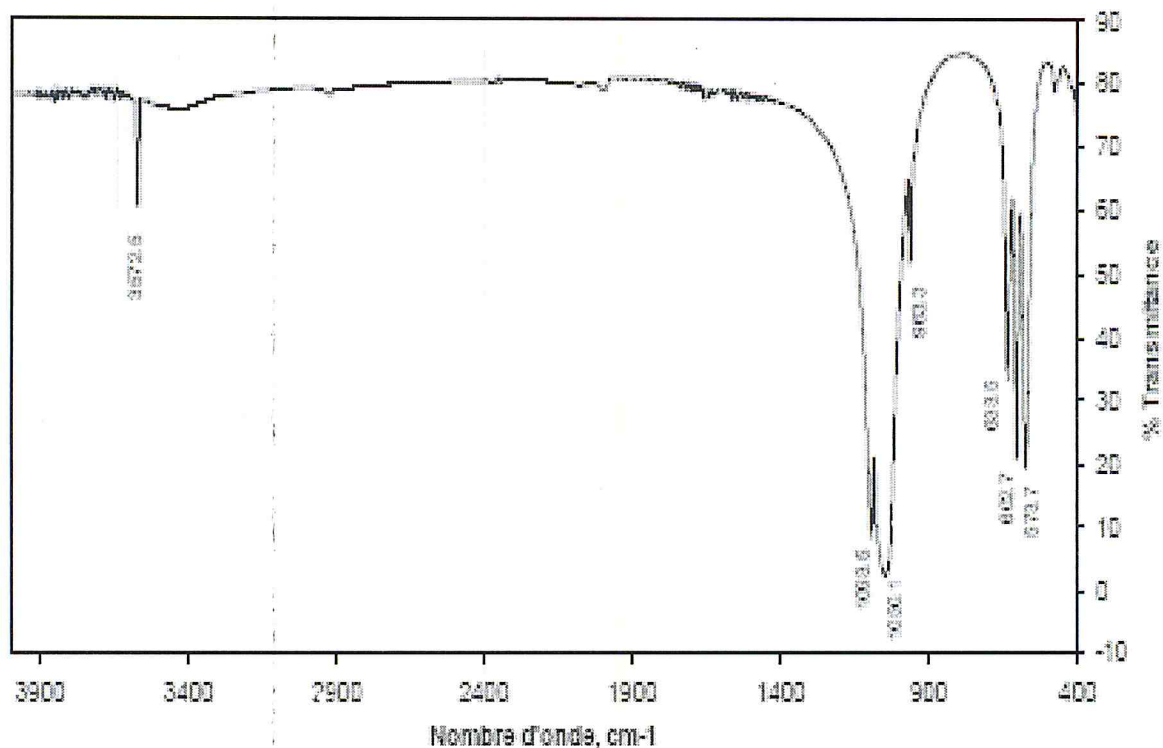


Fig.I-4 : Spectre FTIR de l'HA [22]

Le diagramme de diffraction des rayons X de l'HA est reporté sur la Figure I.11. Les distances interréticulaires et intensités des principales raies de diffraction des rayons X sont indiquées dans le Tableau I.2.

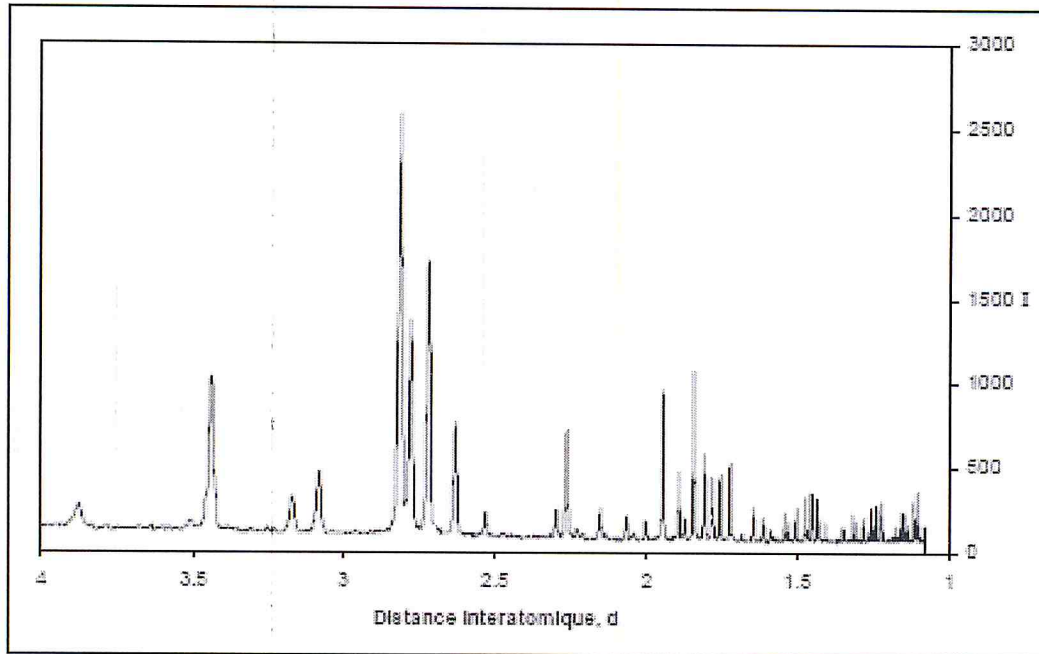


Fig.I-5 : Diagramme de diffraction des rayons X de l'HA [22].

Tab.I-3 : Distances interréticulaires et intensités des principales raies de diffraction de l'HA [JCPDS-90432][22]

D théorique (Å)	I/I ₀	h k l
3,44	40	002
2,81	100	211
2,78	60	112
2,72	60	300
2,63	25	302
2,26	20	310
1,94	30	222
1,84	40	213

L'hydroxyapatite phosphocalcique présente le produit de solubilité le plus faible du système $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4$. Pour $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $K_s = 3,05 \cdot 10^{-59} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^9$ à 25 °C et $K_s = 4,7 \cdot 10^{-59} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^9$ à 37 °C [22].

Le Tab.I-4 présente quelques paramètres thermophysiques et mécaniques de l'hydroxyapatite.

Tab.I-4 : Paramètres thermo physiques et mécaniques de l'HA [22].

Paramètre	Température (K)	Valeur
Conductivité thermique ($\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$)	283	0,72
	1352	2,16
Chaleur spécifique ($\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$) ($\text{cal g}^{-1} \text{K}^{-1}$)	293-1300	766
		0,15
Chaleur latente de vaporisation (KJ kg^{-1})		15,4
Point de fusion (k)		19,23
Température des gouttelettes (K)		19,23
Densité théorique (g cm^{-3})		3,15
Expansivité thermique ($\times 10^{-6} \text{K}$)	293	13,3
	1093	13,3
Module d'Young (GPa)		90
Dureté Knoop (MPa)		3450
Coefficient de poisson		0,3
Limite élastique (MPa)		50
Contrainte résiduelle (MPa)		20-30

iii. Les différents application de l'HA

a. Applications biologiques et médicales.

Comme évoqué précédemment, les HAp en tant que constituant minéral principal des os et de l'email dentaire, possèdent de très bonnes propriétés de biocompatibilité et notamment des propriétés d'adsorption spécifique des cellules ou des protéines.

Elles sont donc utilisées fréquemment dans le domaine de la médecine et de la pharmacie. Les HAp servent par exemple de matériaux de substitution pour le remplacement ou la régénération de tissus malades ou endommagés. Par couplage d'une HAp à un polymère il est possible de créer des implants composites céramique-polymère bioactifs et mieux tolérés par l'organisme.

Les HAp sont également fréquemment utilisées comme « enduit » sur des prothèses en titane pour faciliter l'ostéointégration ou encore pour empêcher l'usure due à des micromouvements oscillatoires à l'interface entre l'implant et l'os conduisant même parfois à une rupture de la prothèse.

On trouve quelques exemples d'utilisation en tant que ciment employé dans la chirurgie faciale afin de remplacer les greffes osseuses autogènes et un nombre croissant d'applications en tant que vecteur de médicaments grâce à une structure présentant des micropores interconnectés. Néanmoins, sous certaines conditions, ce même matériau peut présenter un caractère pathogène pour l'organisme: suite à des dysfonctionnements, le corps peut produire des HAp de morphologies particulières qui peuvent être cause de la formation de calculs rénaux ou de la calcification de cartilages qui s'avère dangereux pour l'organisme.

Dans toutes ces applications, c'est finalement la réactivité de surface de la HAp avec le milieu biologique qui est le point clé. C'est la raison pour laquelle nombre d'études fondamentales traitent de l'interaction de molécules biologiques (souvent des acides aminés) avec la HAp, l'objectif étant de rationaliser les propriétés d'adhésion des protéines sur ce support (à l'origine de sa biocompatibilité). Sans entrer dans le détail de ces études, on peut souligner le lien qui est fait entre la capacité d'adsorption ou de désorption des protéines selon le pH du milieu, ce qui joue non seulement sur la spéciation de la molécule biologique, mais aussi sur la charge de surface de la HAp. Pour autant, alors que ces interactions traduisent au niveau moléculaire des interactions acide base (tout comme on le verra pour les applications catalytiques), peu d'études posent le problème en ces termes [23].

b. Autres applications chimiques

D'autres spécificités que la biocompatibilité de la HAp peuvent également être mises à profit telle son aptitude à la substitution qui lui permet de dépolluer des eaux contaminées par des cations métalliques en jouant le rôle d'échangeur inorganique de cation.

Elles sont aussi employées très fréquemment en chromatographie pour séparer les protéines et autres biomolécules. Les HAp sont efficaces grâce aux effets combinés des groupes calcium et phosphates exposés à la surface du cristal qui donnent au matériau une sélectivité pointue permettant la séparation de mélanges complexes [23].

c. Applications en catalyse

Depuis une période relativement récente, les HAp sont des matériaux très prisés dans le domaine de la catalyse hétérogène.

Elles sont par exemple utilisées dans l'oxydation sélective d'alcools ou du méthane, mais en co-action avec un métal de type ruthénium ou Nickel. Dans ce type de réactions les espèces actives sont les espèces métallique ($\text{Ru}(\text{OH})_2$ ou Nickel sous forme partiellement métallique et oxydée et la HAp sert simplement de support qui se révèle d'une grande stabilité à la fois texturale et aussi en terme d'interaction entre ces métaux et la structure apatite, et ce même dans les conditions de la catalyse. De même, dans la réaction de water gas shift, la HAp est utilisée comme support de particules d'or (la HAp n'ayant aucune activité en elle-même dans cette réaction même pour des températures supérieures à 400°C), et cette combinaison Au/HAp permet une bonne activité dans cette réaction pour des températures aussi basses que 110°C .

En catalyse acide, la HAp peut être utilisée en substitution d' AlCl_3 dans les réactions Friedel-Crafts afin de rendre le procédé moins polluant. Bien que la meilleure activité soit atteinte pour ZnCl_2 supporté sur HAp (97% de conversion du toluène en 2 minutes), la HAp seule est également active (95% de conversion du toluène en 120min). Ici les propriétés acides intrinsèques de la HAp sont utilisées en plus de sa fonction de simple support.

En catalyse basique les propriétés acido-basiques intrinsèques de la HAp sont mises à profit. Dans certains cas ces propriétés peuvent être dopées, comme dans la réaction de Knoevenagel, où l'adjonction de fluor de potassium va permettre d'augmenter la basicité qui pré-existe avant dopage. Les auteurs attribuent cette recrudescence d'activité à un changement de morphologie induit par le dopage par KF, ce qui n'est pas surprenant puisque le fluor se substitue facilement aux groupements hydroxyles et que des substitutions par des ions de charge différentes (comme le K^+) ont déjà été rapportées et qu'elles se traduisent souvent par une réorganisation du matériau pour compenser la charge.

De même, sans aucun dopage, la HAp se révèle être un très bon catalyseur basique dans certaines réactions de chimie fine : dans l'addition de Michael par exemple elle permet d'obtenir de hauts rendements tout en évitant les réactions indésirables et ce, dans des conditions relativement douces. Zahouily et al font l'hypothèse que la réaction a lieu à la surface de la HAp et non au sein des canaux présents dans la structure et que l'excellente activité de ces matériaux est due à la nature acide et basique de cette surface : le caractère acide induit une polarisation de la liaison C=O du réactif alors que les sites basiques vont augmenter la nucléophilie du thiol, accélérant ainsi la formation du lien S-C du produit final.

La réaction de Guerbet est un autre exemple probant de l'activité basique particulière des HAp : contrairement aux autres oxydes basiques type CaO ou MgO, la HAp a la particularité de former sélectivement du n-butanol à partir de l'éthanol. Les auteurs mettent en lumière l'importance de la stoechiométrie: la sélectivité des différents produits va varier en fonction du rapport Ca/P de la HAp utilisée. Bien que la stoechiométrie soit une propriété de cœur, on voit qu'elle a un impact sur les propriétés de surface et donc sur l'activité basique de la HAp. Pour comprendre le comportement atypique de la HAp dans cette réaction de Guerbet, mais aussi plus largement ses bonnes performances dans plusieurs réactions notamment basiques, et rationaliser l'impact de la stoechiométrie, propriété massique, sur la réactivité basique, il faut se poser la question de la nature des sites basiques actifs en surface de ce matériau et de leur mode de fonctionnement.

Jusqu'ici peu d'études ont été menées pour identifier les sites basiques et acides qui sont impliqués dans la réactivité des HAp. Au vu de la structure de la HAp il est possible d'imaginer deux espèces pouvant potentiellement jouer le rôle de sites basiques : d'une part, les groupements hydroxyles qui comme évoqué plus haut, sont des bases faibles susceptibles de présenter une réactivité intéressante et, d'autre part, les groupements PO₄, sont également de potentielles bases faibles. Pour ce qui est de sites acides susceptibles d'intervenir, deux types peuvent a priori être considérés des sites de type acide de Lewis que sont les ions calcium et des sites de type acide de Bronsted représentés par les P-OH [23].

iv. Application de l'HA micro/nanostructurée

Les phosphates de calcium apatitiques nanocristallins (NCA) possèdent une plus grande capacité d'adsorption attribuée à leur grande réactivité de surface. En effet, la faible cristallinité, la taille et la morphologie des cristallites ainsi que la présence d'ions et de

molécules relativement mobiles dans la couche hydratée de surface créent de nombreux sites « actifs » favorables à la « fixation » de diverses molécules [24;25]. De plus, les caractéristiques de cette couche labile évoluent avec la maturation et les ions présents permettant ainsi de moduler les paramètres d'adsorption en fonction des besoins et rendant ainsi ce modèle du minéral osseux « dynamique » contrairement à l'hydroxyapatite.

Aussi, l'adsorption d'acides aminés, de protéines, de facteurs de croissance ou encore de molécules actives sur NCA ont fait l'objet de quelques récentes études. Barroug et al ont notamment participé à l'étude et la compréhension des interactions entre ses molécules « d'origine biologiques » et NCA. Ils ont étudié l'adsorption d'acides aminés tels que la O-phospho-L-serine sur NCA et ont mis en évidence une adsorption de type Langmuir ainsi que la grande capacité d'adsorption et la grande affinité de ces acides aminés pour la surface des cristaux de NCA [26]. De plus, ils ont montré que la présence d'un groupement phosphate dans l'adsorbat favorisait l'adsorption sur NCA. Ils ont observé des interactions similaires de ces apatites avec l'héparine, l'albumine de sérum bovin (BSA) et les molécules actives de cisplatine [27;28].

D'autres études ont aussi été réalisées en vue d'optimiser l'adsorption de facteurs de croissance sur des céramiques phosphocalciques. Autefage et al ont souligné l'impact d'un dépôt de NCA sur une céramique industrielle biphasée HA/TCP sur l'adsorption de rhBMP-2.

Notons cependant que les études menées sur l'adsorption via des supports apatitiques nanocristallins restent moins abondantes que celle sur l'hydroxyapatite notamment pour des raisons de stabilité, de solubilité et de complexité du système.

Les implants réalisés à partir de ce phosphate de calcium subissent une importante attaque par l'organisme. Ils sont dits biorésorbables. Les lacunes induites par la dissolution du matériau et la phagocytose des grains par les cellules multinucléées permettent une pénétration croissante des fluides au sein du matériau. Les pores ainsi créés permettent à la matrice extracellulaire calcifiante de s'insérer dans la microstructure. En raison de cette dissolution rapide, ils ne sont pas considérés comme des implants durables. Ils sont donc utilisés comme supports pour l'élaboration de structures implantables biodégradables ou la libération contrôlée de principes actifs [29]. Le système de délivrance d'une molécule active est également connu sous le nom de « Drug Delivery System » ou « DDS ».

Bibliographie

- [1] Karine Andrieux, Didier Desmaele, Jean D'Angélo et Patrick Couverture, «nanotechnologies et nouveaux médicaments », actualité chimique novembre-décembre (2003).
- [2] Fessi H, « l'encapsulation de médicaments version micro et nano » article de magazine « club 6 » de l'université claudebarnard Lyon 1 n° 6. (2004).
- [3] Amjad Z., "Calcium phosphates in biological and industrial systems", Kluwer Academic Publishers, USA (1997).
- [4] Budin J.P., Michel J.C., Auzel F., "Oscillator strengths and laser effect in $\text{Na}_2\text{Nd}_2\text{Pb}_6(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ (chloroapatite), a new high-Nd-concentration laser material", J. Appl. Phys., 50(2), 641 (1979).
- [5] Wright A.O., Seltzer M.D., Gruber J.B., Chai B.H.T., "Site selective spectroscopy and determination of energy levels in Eu^{3+} doped strontium fluorophosphate", J. Appl. Phys., 78(4), 2456-2467 (2009).
- [6] Gorbunoff M.J., "The interaction of proteins with hydroxyapatite: Role of protein charge and structure", Anal. Biochem., 136(2), 425-432 (1984).
- [7] Shibusawa Y., Miwa N., Hirashima T., Matsumoto U., "Separation of Low Density and Very Low Density Lipoproteins from Human Serum by Hydroxyapatite Chromatography", J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 17(6), 1203-1217 (1994).
- [8] LeGeros R.Z., "Calcium phosphates in oral biology and medicine", in " Monographs in oral Science" Ed. Myers H.M., Karger, London, 15 (1991).
- [9] Aoki H., "Medical applications of hydroxyapatite", IshiyakuEuroAmerica, Inc., Tokyo (1994).
- [10] Hina A., "Etude de la réactivité, en milieu aqueux, d'apatites phosphocalciques d'intérêt biologique", Thèse de Doctorat, INP, Toulouse (1996).
- [11] Ramona-Nicoleta BORȘA, thèse de doctorat de l'université de toulouse, France « Elaboration de poudres et de dépôts de phosphates de calcium silicatés à usage de Biomatériaux », Novembre (2008).

Bibliographie

- [12] Wang L., Nancollas G.H., "Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution", *Chemi. Rev.*, 108(11), 4628-4669 (2008).
- [13] Daculsi G., LeGeros R.Z., Mitre D., Crystal dissolution of biological and ceramic apatites, *Calcified Tissue International* 45, 2, 95-103, (1989).
- [14] Aoki H., Hisashi K., Masaru A., Tissue reactions to calcined graft, *Biomaterials*, 7,2, 132-136 (1986)
- [15] Deptula A., Olczak T., Lada W. et al., Preparation of calcium phosphate powders by water extraction variant of sol gel process, *Hydroxyapatite and Related Compounds* 263-271 (1994)
- [16] Luo P., Nieh T.G., Synthesis of ultrafine hydroxyapatite particles by a spray dry method *Materials Science and Engineering: C*, 3, 2, 75-78 (1995)
- [17] Lerner E., Sarig S., Azoury R., Enhanced maturation of hydroxyapatite from aqueous solutions using microwave irradiation, *Journal Material Science, Materials in Medicine* 2, 138 (1991)
- [18] Murray M. G. S., Wang J., Ponton C. B., Marquis P. M., An improvement in processing of hydroxyapatite ceramics, *Journal of Material Science* 30, 3061 (1995)
- [19] Elliott JC, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, *Studies in Inorganic Chemistry* 18, Elsevier, (1994)
- [20] Elliot JC., Mackie P. E., Young R. A., Monoclinic hydroxyapatite, *Science* 180, 1055(1973)
- [21] Montrejaud M., Rey C, Trombe J.C, Montel G, Sur l'aptitude du réseau apatitique à fixer des molécules d'oxygène, *Colloque International CNRS, Physico-Chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique*, 481-486 (1973)
- [22] Ahmed AL-KATTAN, these de doctorat université de toulouse ,France
« Développement de nano-systèmes hybrides à base d'apatites biomimétiques en vue d'applications biomédicales en cancérologie », Novembre (2010).

Bibliographie

[23] Sarah DIALLO-GARCIA. These de doctorat université pierre et marie curie. France
« Hydroxyapatites, un système basique atypique modulable par la synthèse : vers
l'identification des sites actifs », Octobre (2012).

[24]Barroug, A. Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro
controlled adsorption and release, J Orthop Res., 22 (4): 703-708 (2004).

[25]Barroug, A. Exchange reactions at calcium phosphates surface and applications to
biomaterials, Key Engineering Materials., 361: 79-82.ication des sites actifs »,
Octobre 2012.

[26]Benaziz, L. (Adsorption of O-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline
Apatite, J Colloid Interface Sci., 238 (1): 48-53. (2001).

[27]Ouizat, S. Adsorption of bovine serum albumin on poorly crystalline apatite: influence
of maturation, Mater Res Bull., 34 (14-15): 2279-2289 (1999).

[28]Menbaoui, A. Interaction de l'héparine avec des phosphates de calcium biologiques,
Covaphos I, Marrocco, Marrakech (2004).

[29]Vallet-RegíM. Revisiting ceramics for medical applications.Dalton Transactions;
5211-20 (2006).

Chapitre II : Partie expérimentale

II.1 Introduction

Dans l'objectif d'améliorer la stabilité et l'efficacité de la porphyrine en tant qu'agent actif dans la thérapie photodynamique du cancer, on s'est intéressé dans cette étude à la préparation et la caractérisation de micro/nanovecteurs à base de phosphate de calcium.

Il est bien connu que l'utilisation des matériaux à base d'os substitué dans les sciences des biomatériaux est un des objectifs importants à cause de leurs bioactivité et biocompatibilité [1, 2].

L'hydroxyapatite (HA) est largement appliquée dans les biomatériaux pour l'implantation des tissus osseux, à cause de sa bonne biocompatibilité, sa bioactivité et bien aussi grâce à sa similarité au composé inorganique des tissus rigides présents dans l'os naturel [3]. Dans la littérature, plusieurs méthodes ont été décrites pour sa synthèse, incluant les méthodes sol-gel [4, 5], les microémulsions inversées [6,7], l'hydrothermique classique et sous micro-ondes [8, 9], ainsi que par voie biomimétique [10]. Dans la plupart des cas, les particules obtenues se trouvent être de taille micro et nanométrique.

Le présent travail décrit la préparation des micro/nanoparticulaires à base de l'hydroxyapatite (HA) destinés pour l'encapsulation et le transport d'agent actif thérapeutique (anti-cancéreux). Deux méthodes différentes ont été suivies pour cet objectif : la première est une voie hydrothermique alors que la seconde est biomimétique dans du plasma sanguin simulé SBF. Ces particules sont caractérisées par infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), Diffraction des Rayon X (DRX) et la Microscopie Electronique à Balayage (MEB).

Tous les produits utilisés dans cette partie expérimentale sont de qualité analytique des firmes Aldrich et Fluka.

II.2 Synthèse des micro/nanoparticules des phosphates de calcium

II.2-1 Synthèse des Np/ μ p.HA par voie hydrothermique

a. Microparticules d'hydroxyapatite (μ .HA)

Les nano/microparticules (Np/ μ p.HA) sont préparées par la méthode hydrothermique selon la méthode suivante: Une solution aqueuse du phosphate de sodium est ajoutée goutte à goutte et sous agitation à une solution aqueuse de chlorure de calcium, à une température fixée pendant 5h. Le précipité blanc des Np/ μ p.HA est ensuite récupéré par filtration sous vide puis séché à 50°C.

b. Microparticules d'hydroxyapatite fonctionnalisées (μ p.HA_f)

Nous avons préparé trois systèmes différents: (1) l'hydroxyapatite avec le polyéthylène glycol (PEG), (2) l'hydroxyapatite avec la bêta-cyclodextrine (β -CD) et (3) l'hydroxyapatite avec le PEG et la β -CD à la fois. L'abréviation des différents systèmes obtenus est comme suit (μ p.HA-PEG, μ p.HA- β -CD et Np.HA-PEG- β -CD), respectivement. Les trois systèmes sont préparés par la même méthode citée ci-dessus avec quelques modifications.

➤ Système un : μ p.HA-PEG

Une quantité appropriée de la poudre obtenue dans le système un (Np/ μ p.HA) a été mélangée avec une solution aqueuse du PEG sous agitation douce pendant un temps précis et le précipité (Np/ μ p.HA-PEG) est séparé par filtration sous vide et laissé sécher à l'étuve à 50°C.

➤ Système deux : μ p.HA- β -CD

Une quantité d'une solution de la β -CD est ajoutée à la solution du phosphate de sodium, puis le mélange obtenu est égoutté sous agitation à une température fixe pendant un temps précis dans la solution du chlorure de calcium. Le précipité du deuxième système Np/ μ p.HA- β -CD est récupéré par filtration sous vide puis séché dans l'étuve à 50 °C.

➤ Système trois : Np.HA-PEG- β -CD

Le système trois obtenu dans l'étape précédente est ajouté à une solution aqueuse du PEG sous agitation pendant un temps précis. Le précipité du système quatre Np/ μ p.HA-PEG- β -CD est récupéré par filtration sous vide puis séché à l'étuve à 50°C.

Le schéma de la méthode utilisée dans la préparation des quatre systèmes est donné dans la figure ci-dessous

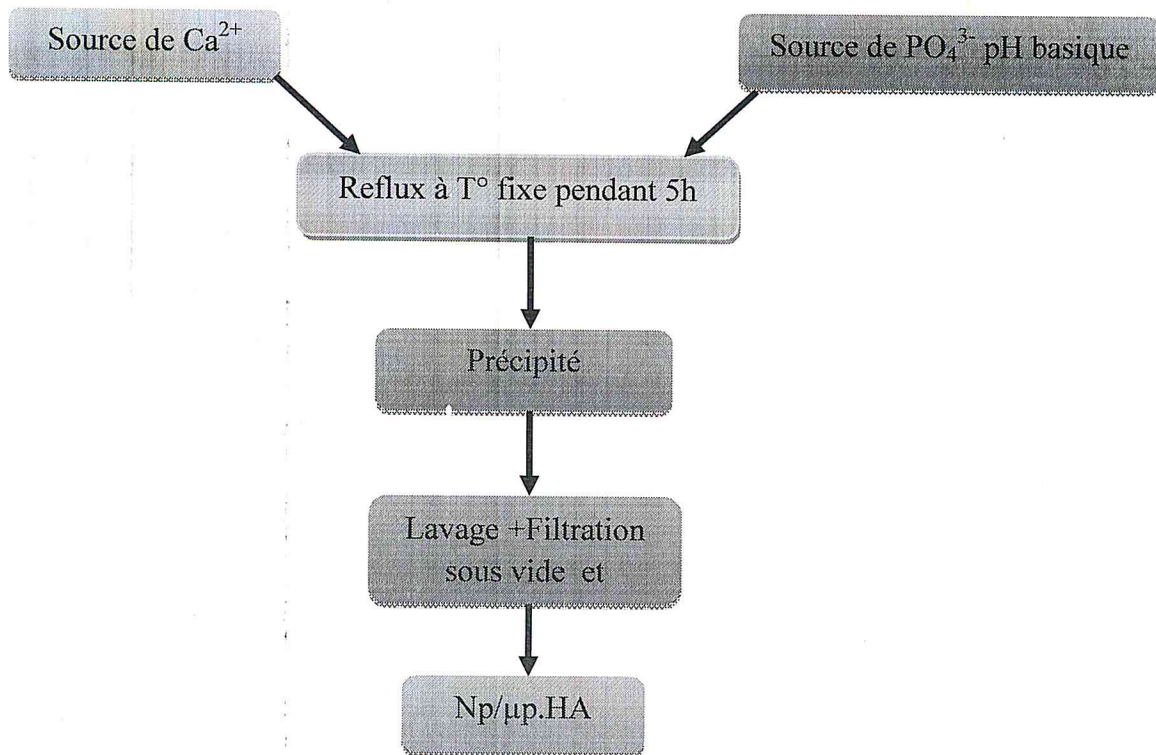


Fig.II-1 : Préparation de l'HA par voie hydrothermique.

II.2-2 Synthèse des microparticules de l'hydroxyapatite par voie biomimétique

a. Préparation du plasma sanguin simulé(SBF)

Le SBF est une solution saline, possédant un pH neutre et libre d'enzymes, sa préparation se fait selon le protocole expérimental suivant :

On met une quantité d'eau distillée dans un bécher. On y dissout ensuite des quantités définies des réactifs cités ci-dessous afin d'avoir des concentrations ioniques similaires à celles du plasma sanguin. [11]

NaCl, NaHCO₃, KCl, Na₂HPO₄, MgCl₂, Na₂SO₄, (C₂H₅OH)₃CNH₂.

b. Microparticules d'hydroxyapatite par voie biomimétique ($\mu\text{p.HA/SBF}$)

Les microparticules ($\mu\text{p.HA/SBF}$) sont préparées par voie biomimétique dans le SBF. Une solution du SBF contenant du phosphate de sodium à un pH basique à concentration connue est ajoutée goutte à goutte et sous agitation à une solution du SBF à une concentration connue du chlorure de calcium, à une température fixe pendant 1 h. En fin, le précipité blanc des $\mu\text{p.HA/SBF}$ est récupéré par filtration sous vide puis séché à 50°C .

Le schéma de la préparation des $\mu\text{p.HA/SBF}$ est donné dans le schéma ci-dessous.

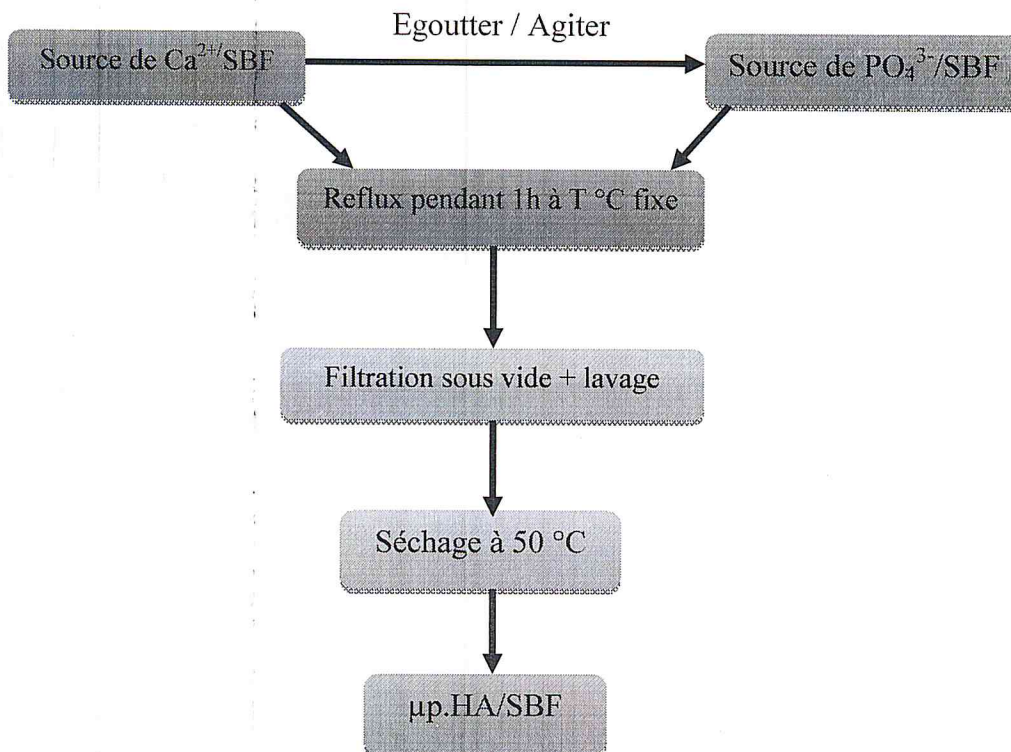


Fig.II-2 : Préparation de l'hydroxyapatite par voie biomimétique

II.2-3 Caractérisation des phosphates de calcium préparés**a) Aspect morphologique**

Les systèmes préparés sont obtenus sous forme d'une poudre fine blanche sans odeur caractéristique dans le cas des $\mu\text{p.HA}$, $\mu\text{p.HA-PEG}$, $\mu\text{p.HA-}\beta\text{-CD}$, $\text{Np}/\mu\text{p.HA-PEG-}\beta\text{-CD}$, et $\mu\text{p.HA/SBF}$. (Fig.II-3-a, Fig.II-3-b, Fig.II-3-c, Fig.II-3-d et Fig.II-3-e) respectivement.

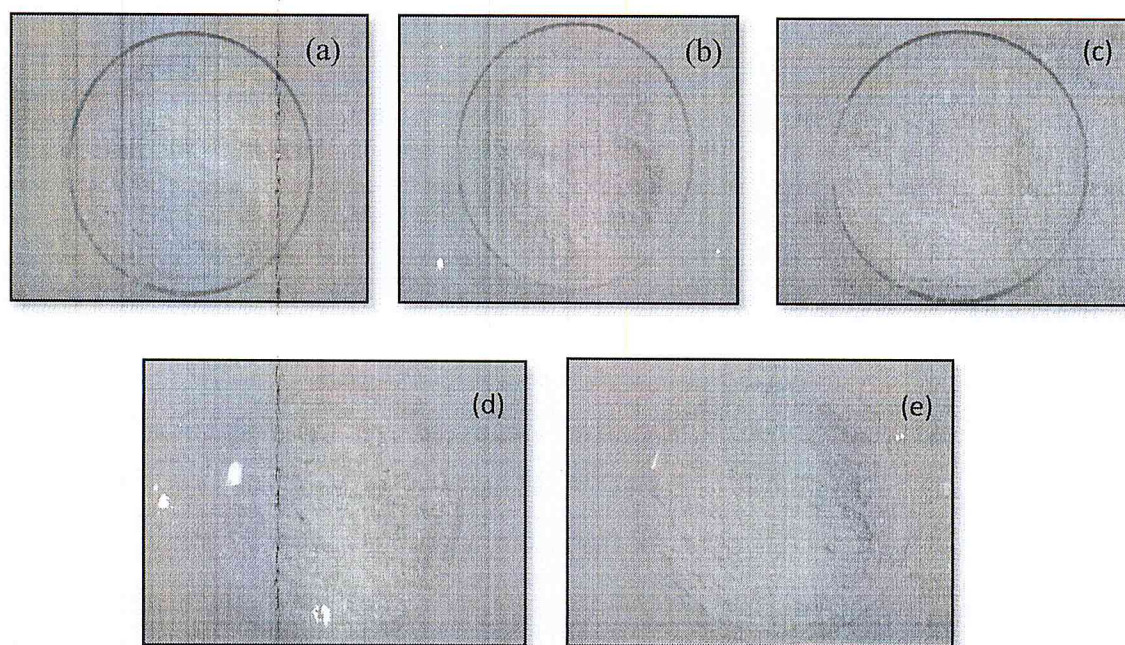


Fig.II-3 : Vue macroscopique des différents phosphates de calcium préparés

b) Caractérisation spectroscopique par FTIR

Les spectres FTIR des différents produits sont enregistrés d'après la méthode du disque KBr sur une gamme de 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} . Un instrument de type SHIMADZU 8900 a été utilisé.

➤ Spectre FTIR d'HA par voie hydrothermique

La première indication de la formation de l'hydroxyapatite est sous forme d'une large bande dans le spectre FTIR d'HA (Fig.II-4) vers $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ [12]. La bande vers 961 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation symétrique de la liaison P-O du groupement PO_4^{3-} [13, 14].

Comme pic majeur du groupement phosphate, on peut identifier dans la région entre 1092 cm^{-1} et 1032 cm^{-1} le pic le plus intense dans tous les modes de vibration du groupement phosphates. Les bandes entre $602\text{-}558\text{ cm}^{-1}$ et 474 cm^{-1} est attribuée aux vibrations de déformation du groupement PO_4^{3-} .

Les bandes assignées aux vibrations d'élongation des groupements hydroxyles (OH) dans l'hydroxyapatite (3571 cm^{-1} et 632 cm^{-1}) [12, 13] peuvent être observées clairement dans

le spectre. Et enfin, le faible pic vers 1639 cm^{-1} est attribué à l'eau associée à l'hydroxyapatite.

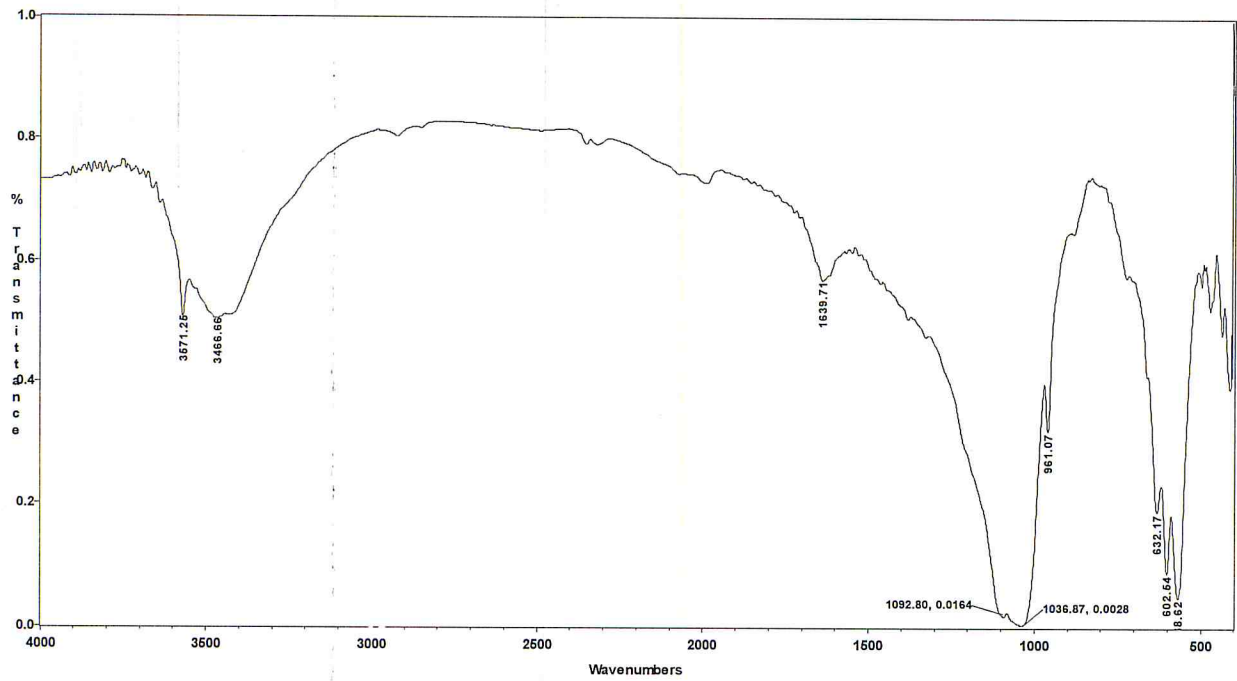


Fig.II-4 : Spectre FTIR de l'hydroxyapatite obtenue par voie hydrothermique

➤ Spectre FTIR du système HA- β -CD.

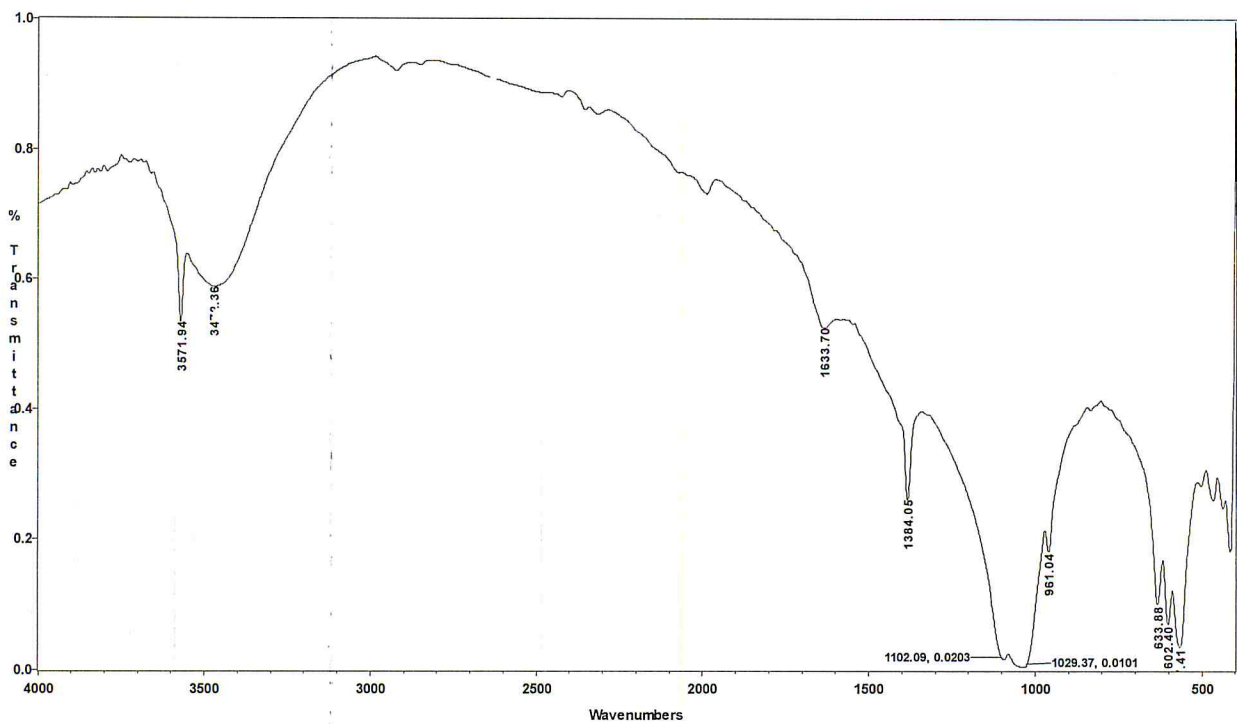


Fig.II-5 : Spectre FTIR du système HA- β -CD obtenu par voie hydrothermique.

L'échantillon d'hydroxyapatite préparée en présence de la β -CD garde les mêmes pics caractéristiques pour les différents modes de vibration du groupement PO_4^{3-} qui apparaissent autour de 1102, 1029, 961 et 557 cm^{-1} tandis que les bandes à 3340 cm^{-1} et 1640 cm^{-1} sont attribuées au groupement OH associé à la β -CD avec l'eau absorbée [15].

➤ Spectre FTIR d'HA-PEG

Comme il est clairement observé dans la Fig.II-6, le spectre FTIR d'HA-PEG ne diffère pas de celui d'HA seul. Les pics caractéristiques à 1032, 1099 et 965 cm^{-1} sont attribués à l'élongation du groupement PO_4^{3-} tandis que ceux vers 604, 565 et 456 cm^{-1} sont attribués à la déformation du PO_4^{3-} [16]. Les bandes d'absorption à 3446 et 1644 cm^{-1} sont attribuées à l'eau adsorbée tandis que le pic vers 3575 cm^{-1} est attribué au -OH de l'hydroxyapatite. Le pic vers 867 cm^{-1} est attribué au groupement CO_3^{2-} dans l'HA. De plus le faible pic vers 2928 cm^{-1} est attribué à l'élongation de $-\text{CH}_2-$ du PEG, donc c'est une indication de formation des liaisons intramoléculaire entre le PEG et HA.

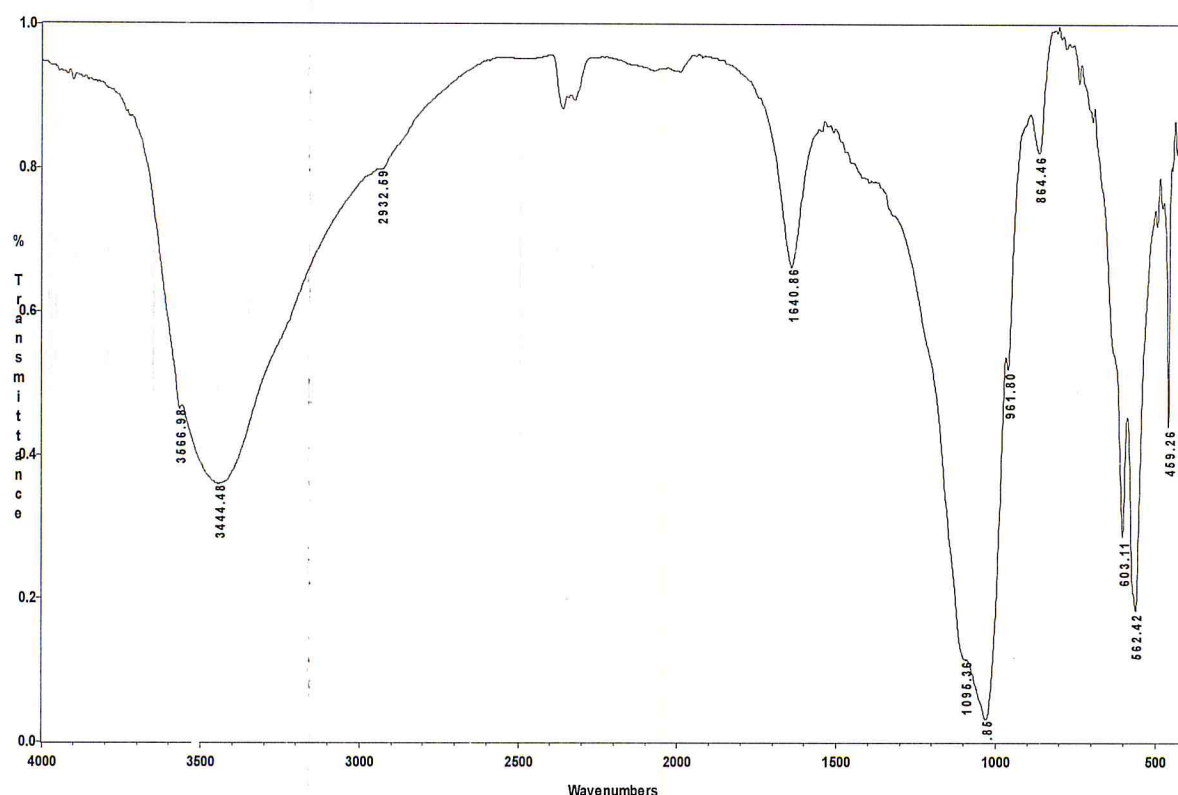


Fig.II-6 : Spectre FTIR du système HA-PEG préparé par voie hydrothermique.

➤ Spectre FTIR d'HA-β-CD-PEG

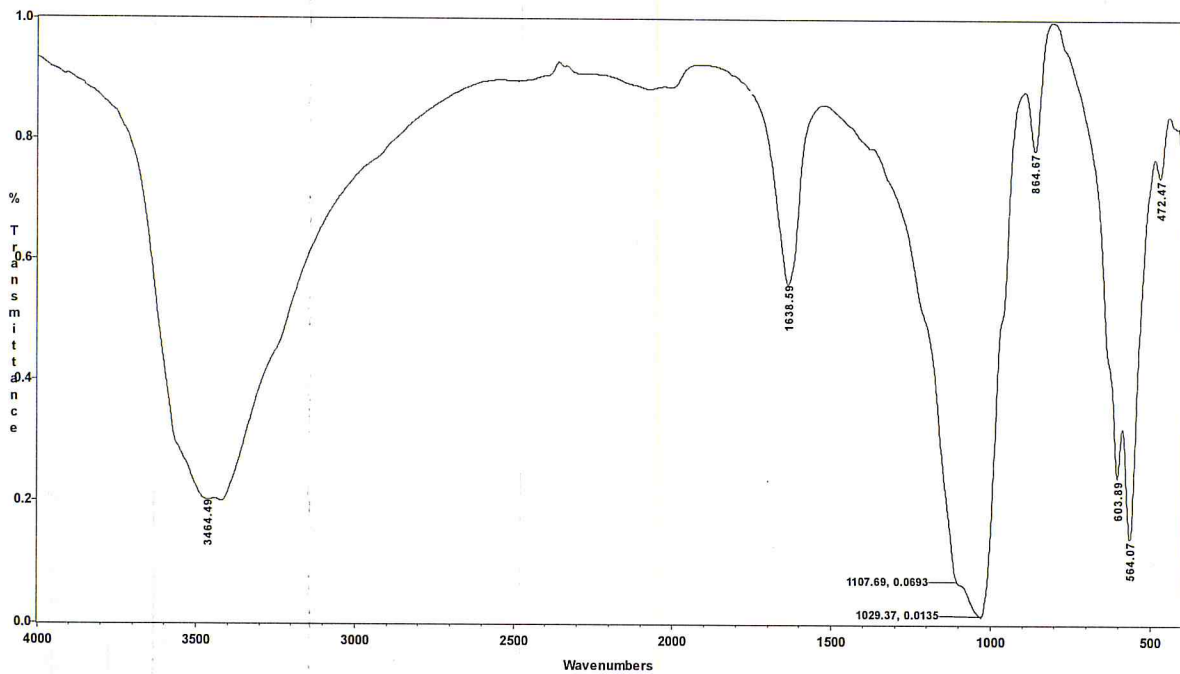


Fig.II-7 : Spectre FTIR du système HA-β-CD-PEG préparé par voie hydrothermique.

A son tour, Le spectre FTIR du biocomposite d'HA-β-CD-PEG garde les mêmes pics caractéristiques observés dans les systèmes cités ci-dessus avec des petits déplacements observés. i.e. les deux pics vers 1032 et 1099 cm^{-1} (HA-PEG) attribués à l'élongation du groupement PO_4^{3-} sont déplacés vers 1102 et 1029 cm^{-1} (HA-β-CD-PEG) qui est du à l'interaction de la β-CD avec l'HA sachant que la β-CD a un pic caractéristique à 1029 cm^{-1} attribué à l'élongation C-O-C [17].

➤ Spectre FTIR d'HA/SβF (Brushite)

Le spectre FTIR de la Fig.II-8 montre que le produit obtenu n'est pas l'hydroxyapatite mais son dérivé le Brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [18]. La large bande entre 3168-3542 cm^{-1} est attribuée au groupement H-O-H. Le pic vers 1648 cm^{-1} est attribué à la présence de l'eau H_2O . Le pic vers 1220 cm^{-1} est attribué à la déformation de la liaison PO-H venant du groupement HPO_4 . Les pics vers 1131, 1059, 987, 788, 658, 574 et 427 cm^{-1} sont dus à la présence de la liaison P-O provenant du groupement HPO_4 ou PO_4 . Les pics vers 987 et 872 cm^{-1} sont attribués à l'élongation de la liaison P-OH du groupement HPO_4 , et enfin, le pic vers 525 cm^{-1} est attribué à la déformation de la liaison HO- PO_3 provenant du groupement HPO_4 .

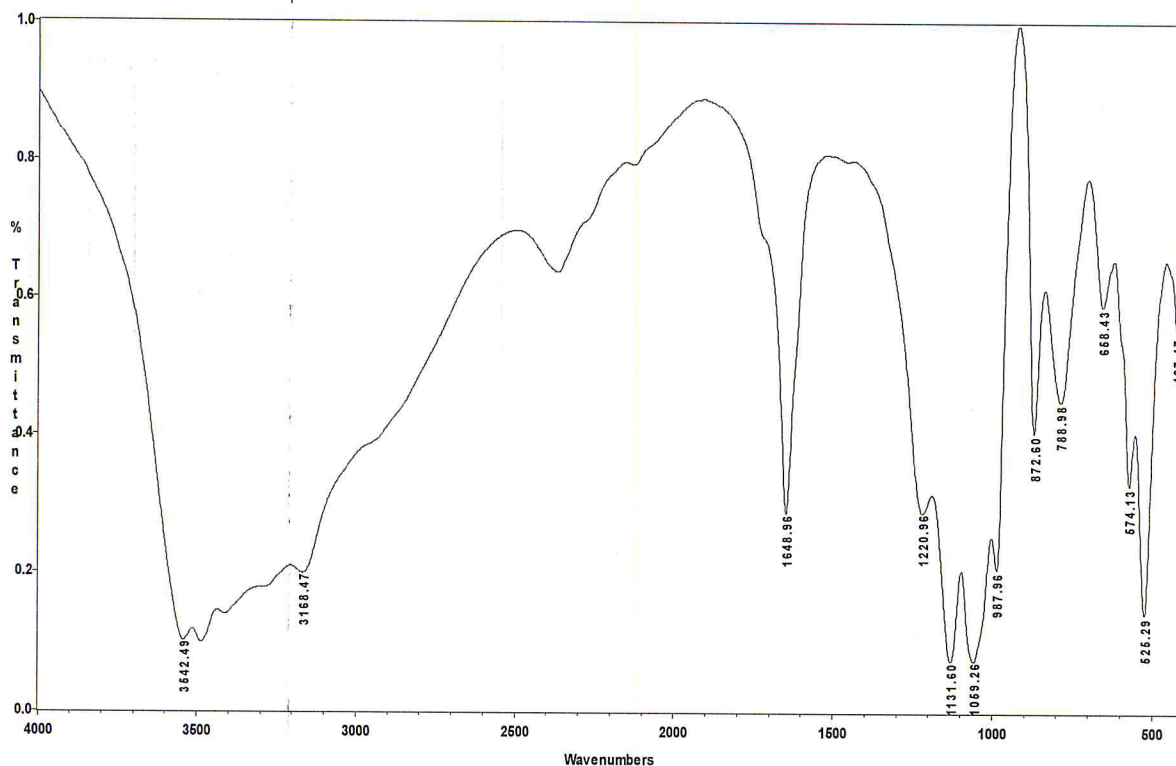


Fig.II-8 : Spectre FTIR de la Brushite préparée par voie biomimétique.

c) Caractérisation par diffraction des rayons X

La pureté et les niveaux de cristallinité des différentes poudres de HA ont été mesurés par diffraction X (DRX) au sein de la salle d'analyse du pavillon 13 (Département de chimie) sur un diffractomètre à rayon X de type (BRUKER, PHASER D2) dans l'intervalle d'angle $20 \leq 2\theta \leq 60$.

➤ Diffractogramme RX d'HA préparée par voie hydrothermique

Le diffractogramme RX obtenu de l'échantillon d'hydroxyapatite synthétisé par voie hydrothermique semble être similaire aux données bibliographiques relatives à ce composé. De plus, les signaux correspondants aux phases intermédiaires comme la α -TCP et la β -TCP n'ont pas été observés dans le diffractogramme reporté par Saezen[19], ce qui indique que le matériau obtenu est d'un rapport stœchiométrique Ca/P proche de la valeur 1.67 comme il est suggéré [20].

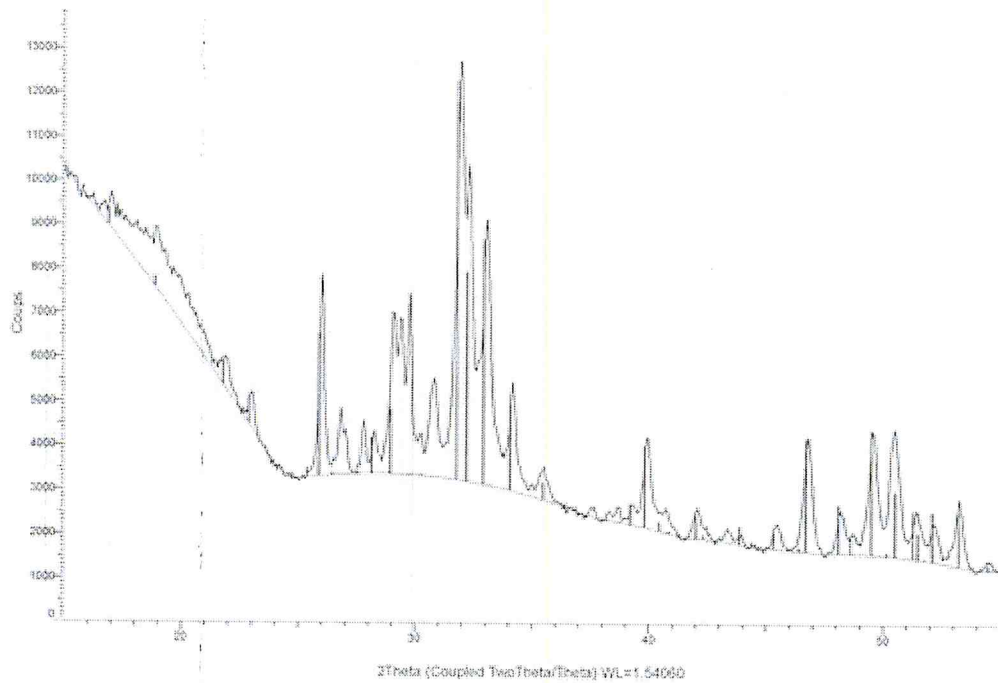


Fig.II-9 : Diffractogramme RX d'HA préparée par voie hydrothermique

➤ Diffractogramme RX d'HA- β -CD synthétisé par voie hydrothermique

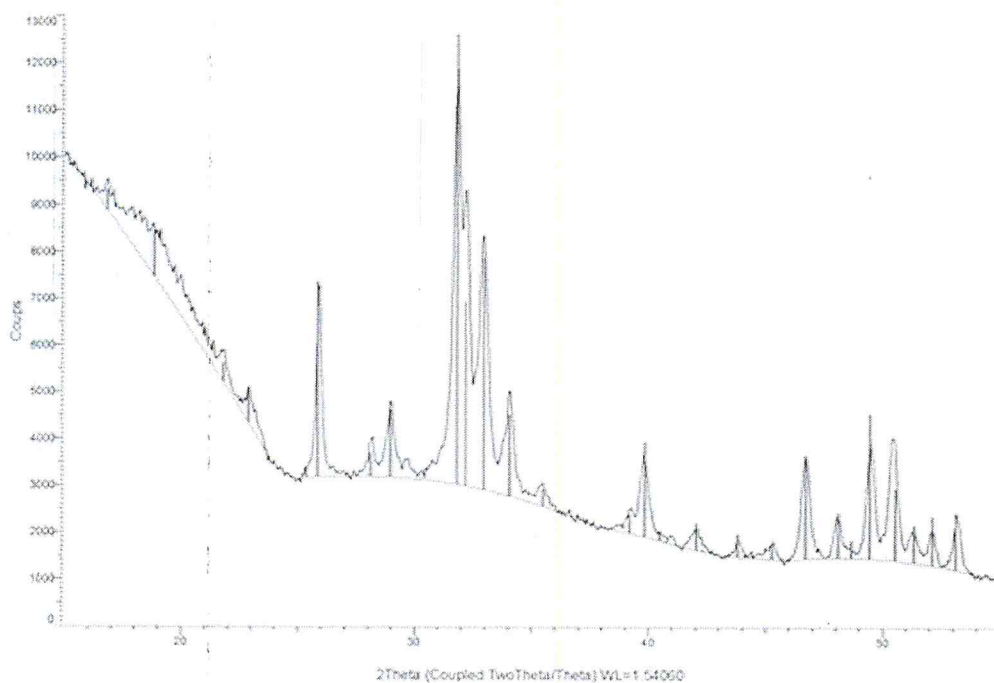


Fig.II-10 : Diffractogramme RX du système HA- β -CD préparé par voie hydrothermique

Le diffractogramme de l'hydroxyapatite synthétisé en présence d'une concentration définie de la β -CD est donné dans la figure ci-dessus (Fig.II-10). Les pics caractéristiques sont attribués à la présence d'une phase hexagonale de l'hydroxyapatite dans l'échantillon synthétisé [21]. Les pics caractéristiques d'HA dans les plans (002) et (211) sont détectés vers $2\theta = 26^\circ$ et 32° , respectivement [22], tous les autres pics du diffractogramme RX sont identique à ceux du HA standard (JCPDS 09-432). Lorsqu'on ajoute la β -CD, aucun pic correspondant à d'autres phases comme β -TCP et CaO n'a été détecté, de plus les petites impuretés de $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ observées dans le spectre de HA seule ont disparus par l'ajout de la β -CD ce qui indique que la β -CD a une influence sur le contrôle de la pureté de l'HA dans les conditions expérimentales appliquées.

Diffractogramme RX du système HA-PEG préparé par voie hydrothermique

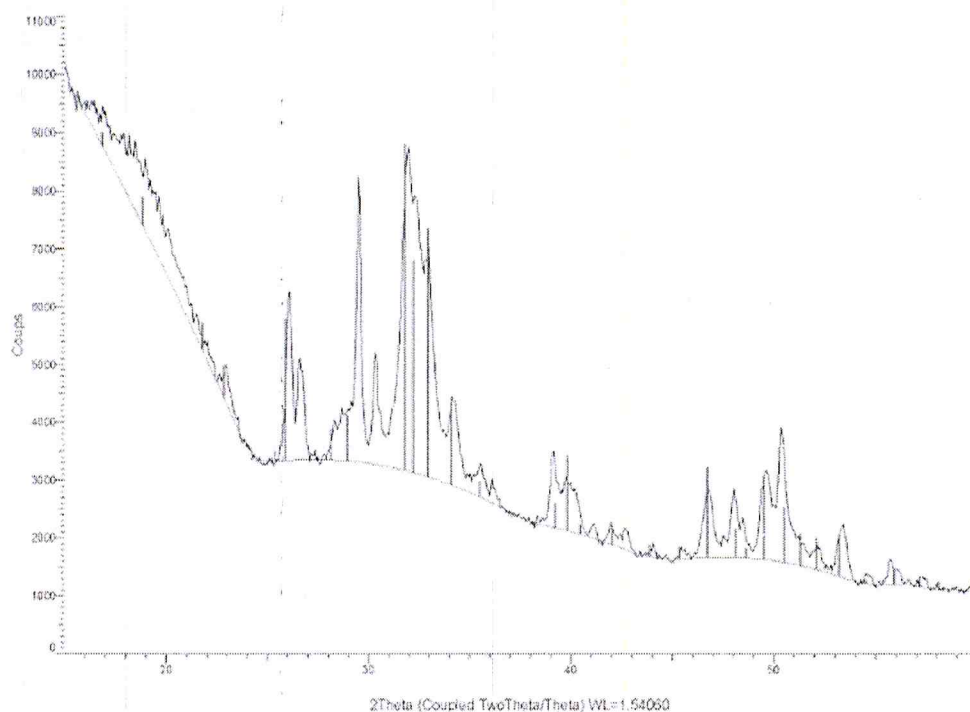


Fig.II-11 : Diffractogramme RX du système HA-PEG préparé par voie hydrothermique

D'après le diffractogramme ci-dessus il apparaît que l'hydroxyapatite est la seule phase cristalline observée dans l'échantillon de l'HA immergé dans la solution du polymère utilisé. De plus, les pics sont devenus plus intenses par rapport à ceux de l'HA seul ce qui indique que la cristallinité est meilleure dans l'HA-PEG que dans l'HA seul [23], par contre les pics sont moins intenses et plus larges dans l'HA-PEG que dans l'HA- β -CD ce qui signifie que les



particules de l'HA-PEG ont un aspect cristallin moins significatif que celles de l'HA- β -CD et une taille plus grande que celles de l'HA- β -CD.

➤ Diffractogramme RX d'HA- β -CD-PEG synthétisé par voie hydrothermique

Comme il est clairement observé, le diffractogramme d'HA- β -CD-PEG confirme les deux résultats obtenus dans le DRX d'HA- β -CD et d'HA-PEG, i.e. l'ajout de la β -CD augmente la cristallinité d'HA et diminue la taille de ses particules. On juge que ce dernier système pourrait être un vecteur thérapeutique vérifiant des propriétés intéressantes dans le domaine de livraison médicale contrôlée (taille, surface et stabilité).

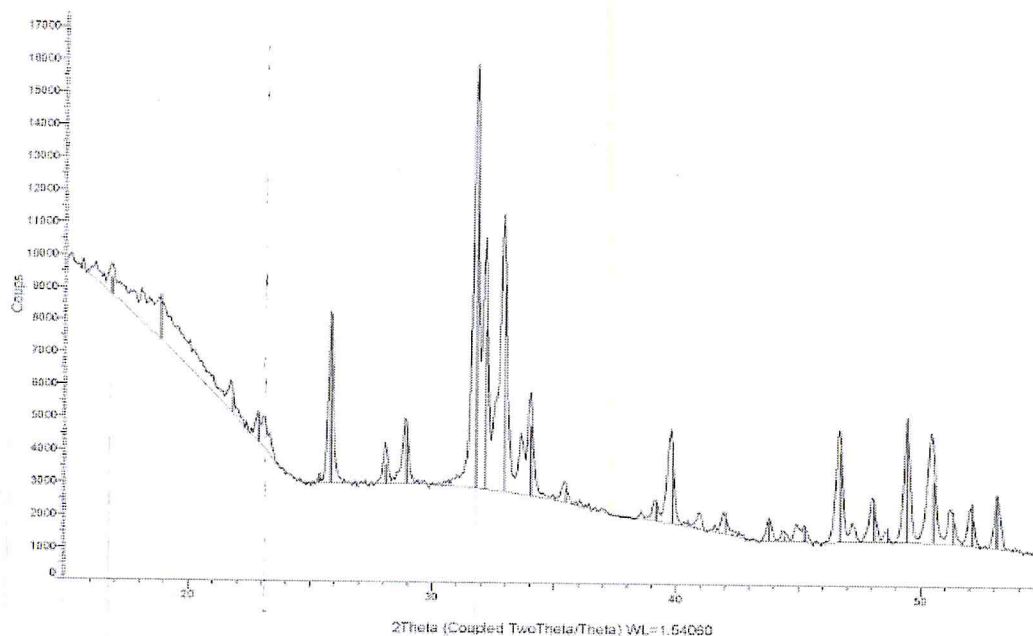


Figure.II-12 : Diffractogramme RX du système HA- β -CD-PEG préparé par voie hydrothermique

➤ Diffractogramme RX du Brushite synthétisé par voie biomimétique

La figure ci-dessous (Fig.II-13) représente le diffractogramme de la brushite synthétisée par voie biomimétique. Les pics de la diffraction RX des cristaux à $2\theta = 20.9^\circ$, 23.6° , 29.3° , 35.5° , et 48° sont attribués à la structure cristalline de la brushite standard (JCPDS file no.2-0085). Aucun pic des autres phases des phosphates de calcium ou impureté ont été détectés comme il est signalé dans la référence [24]. L'intensité des diffractions des pics indique que l'échantillon est bien cristallisé.

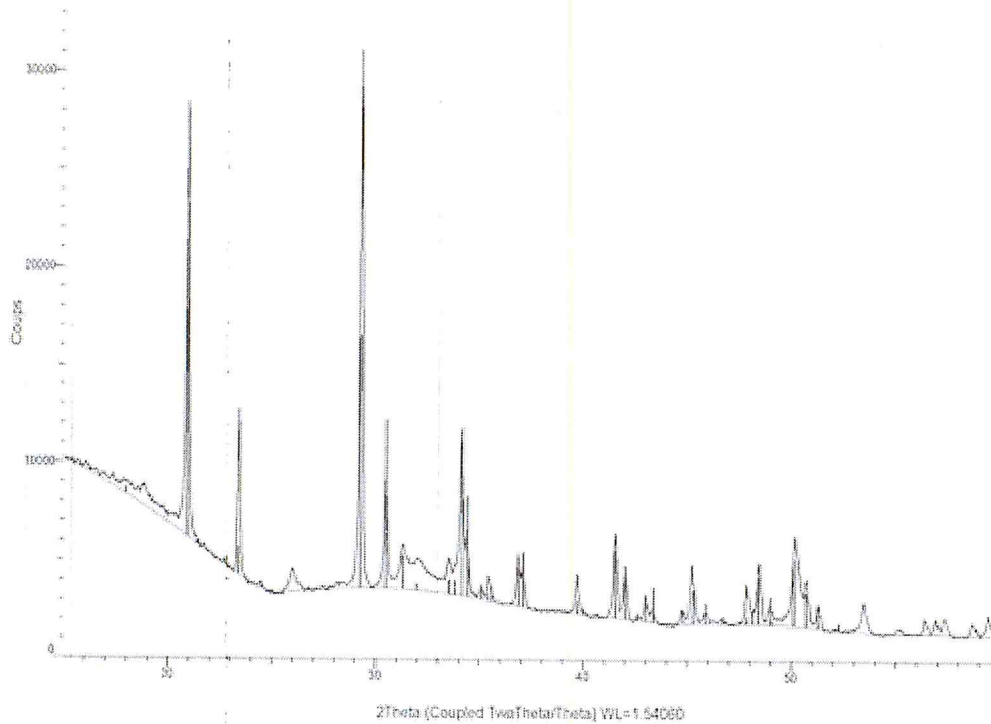


Fig.II-13 : Diffractogramme RX obtenu de la Brushite préparée par voie biomimétique

➤ **Principe de la formation des deux phosphates de calcium**

a) Principe de la synthèse de l'hydroxyapatite par voie hydrothermique

La synthèse de l'hydroxyapatite dans les systèmes ne contenant pas la β -CD citées ci-dessus peut être décrite par la réaction suivante :



Par contre sa synthèse dans les systèmes contenant la β -CD, se fait par deux étapes qui peuvent être décrites par les deux réactions suivantes :

➤ Etape une :



➤ Etape deux:

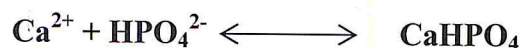


b) Principe de la synthèse de la Brushite par voie biomimétique

➤ Etape une :



➤ Etape deux :



➤ Equation globale



d) Caractérisation morphologique et calcul de taille des particules par MEB

Les analyses par microscopie électronique (MEB) ont été réalisées à l'aide d'un instrument du type JEOL JSM-6360L. Tous les échantillons étudiés ont subi une métallisation avec une fine couche d'or. Les résultats sont donnés dans les figures ci-dessous.

Comme il est indiqué sur les microphotographies obtenues, les quatre systèmes de l'hydroxyapatite synthétisés par voie hydrothermique ont une morphologie de bâtonnets de différentes surfaces et tailles, i.e. dans le cas de HA (Fig.II-14-a) (bâtonnets de longueur : 16 μm et largeur 2 μm avec des sphères fortement agglomérées et une surface spongieuse), dans le cas de HA-PEG (Fig.II-14-b) (bâtonnets de longueur : 7 μm et largeur :2 μm et d'une surface poreuse), dans le cas de HA- β -CD (Fig.II-14-c) (bâtonnets de longueur : 7 μm et largeur :1.5 μm plus des sphères de diamètre 1.5 μm d'une surface plus lisse), dans le cas de HA- β -CD-PEG (Fig.II-14-d) (des bâtonnets de très petites tailles arrivant à 400 nm) tandis que dans le cas de la brushite (Fig.II-14-e) les particules ont plutôt la morphologie d'une rose de sable dont la taille varie selon le nombre des feuillets qui l'a constituent une dizaine de μm (10-15 μm). Les résultats obtenus renforcent les résultats obtenus par FTIR et DRX.

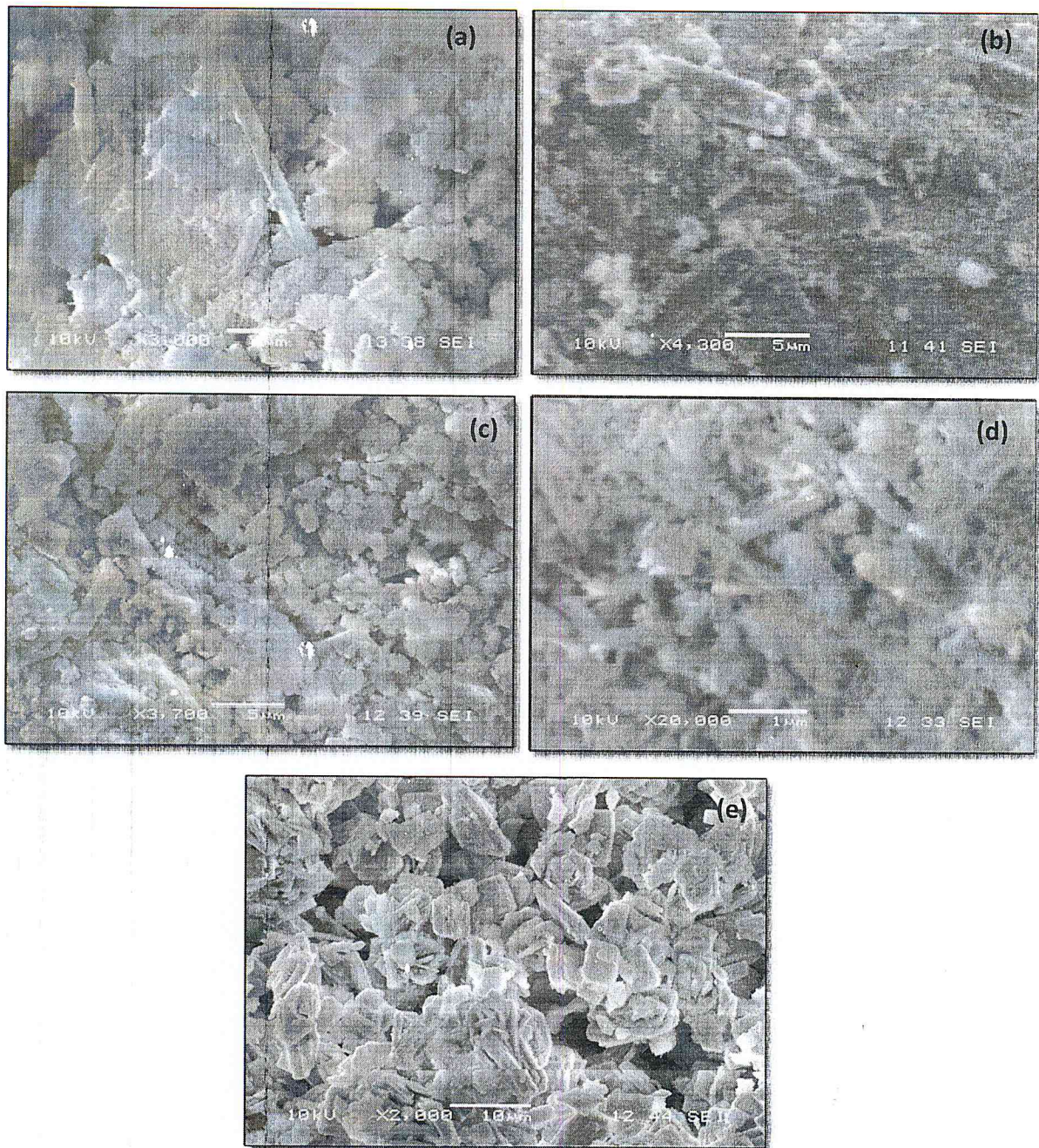


Fig.II-14 : Microphotographies des différents phosphates de calcium préparés

II.2-4 Etude de la bioactivité des phosphates de calcium synthétisés

Afin d'étudier la bioactivité des phosphates de calcium, des quantités appropriées des différents systèmes synthétisés ont été immergés dans une solution de SBF à 37 °C pendant 10 jours, puis on mesure le changement de la valeur du pH dans chaque milieu de stockage à différents intervalles de temps. Les résultats sont donnés dans la figure ci-dessous.

Comme il est clairement observé dans la figure ci-dessus, l'ajout des phosphates de calcium que ce soit l'hydroxyapatite ou la brushite contribue à augmenter le pH du SBF. Le changement du pH dans le cas du biocomposite des μ .HA- β -CD-PEG est trop faible par rapport à celui des autres systèmes ce qui indique que ce système est le plus stable physiologiquement durant la période d'étude, par contre, le changement du pH est plus remarquable dans le cas du système μ .HA- β -CD ce qui indique qu'il se dissout plus rapidement que les autres systèmes. Ces résultats suggèrent que le système μ .HA- β -CD a une bioresorption supérieure par rapport aux autres systèmes [25].

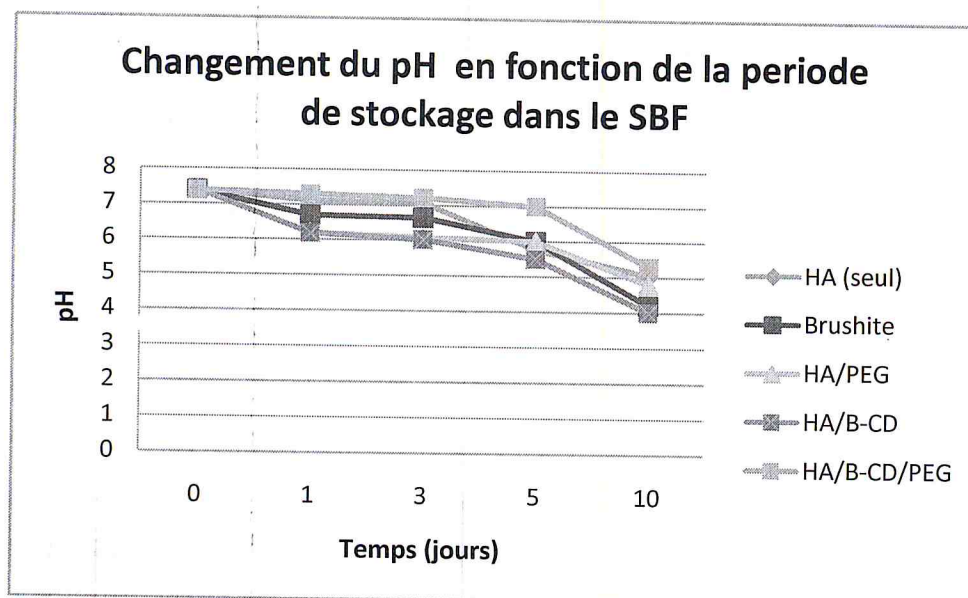


Fig.II-15 : Changement des valeurs du pH en fonction de la période du stockage des différents systèmes synthétisés dans le SBF.

II.3 Synthèse des micro/nanoparticules des phosphates de calcium chargé en principe actif

On a fait le test de chargement des microparticules des phosphates de calcium par le principe actif que sur un seul système seulement (microparticule d'hydroxyapatite synthétisé par voie hydrothermique).

Le chargement est fait selon deux voies :

- Chargement directe : le principe actif est encapsulé directement dans les μ .HA
- Chargement indirecte : le principe actif est encapsulé d'abord dans la bêta-cyclodextrine formant un système supramoléculaire, ce dernier est par la suite lui-même piégé dans les μ .HA.

II.3-1- a) Chargement directe

On a refait les mêmes étapes décrites dans la partie de synthèse des μ .HA par voie hydrothermique sauf que la porphyrine est ajoutée sous sa forme diluée dans la solution du calcium. A la fin, le produit récupéré est protégé dans un milieu opaque.

II.3-1-b) Chargement indirecte

1. Préparation du système supramoléculaire

Une solution aqueuse de la β -CD à une concentration connue est mélangée avec une solution organique de m-THPP à une concentration donnée dans le DMSO. On porte le mélange sous agitation pendant 30 min à température ambiante.

2. La formation du système supramoléculaire

Une quantité de la solution de m-THPP/DMSO à une faible concentration est ajoutée à un excès de la solution de la β -CD à différentes concentrations, on porte le mélange à une douce agitation pendant 30 min [26], puis on fait l'étude par UV-Vis.

➤ Spectroscopie UV-Vis

Les spectres UV-Vis des différents complexes d'inclusion m-THPP : β -CD à différentes concentrations de la β -CD et en présence de trois solutions tampon pH = 3, 7 et 10 sont donnés dans les figures ci-dessous.

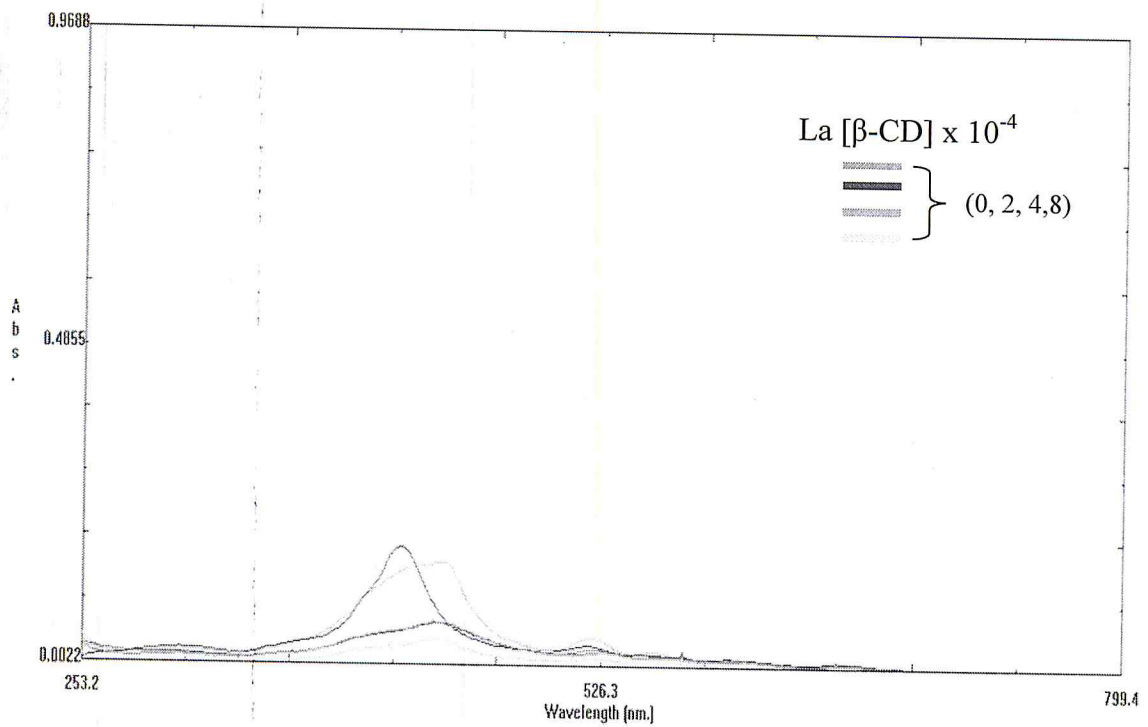


Fig.II-16 : Spectre UV-Vis du complexe d'inclusion m-THPP : β-CD à différentes concentration de β-CD, pH=3.

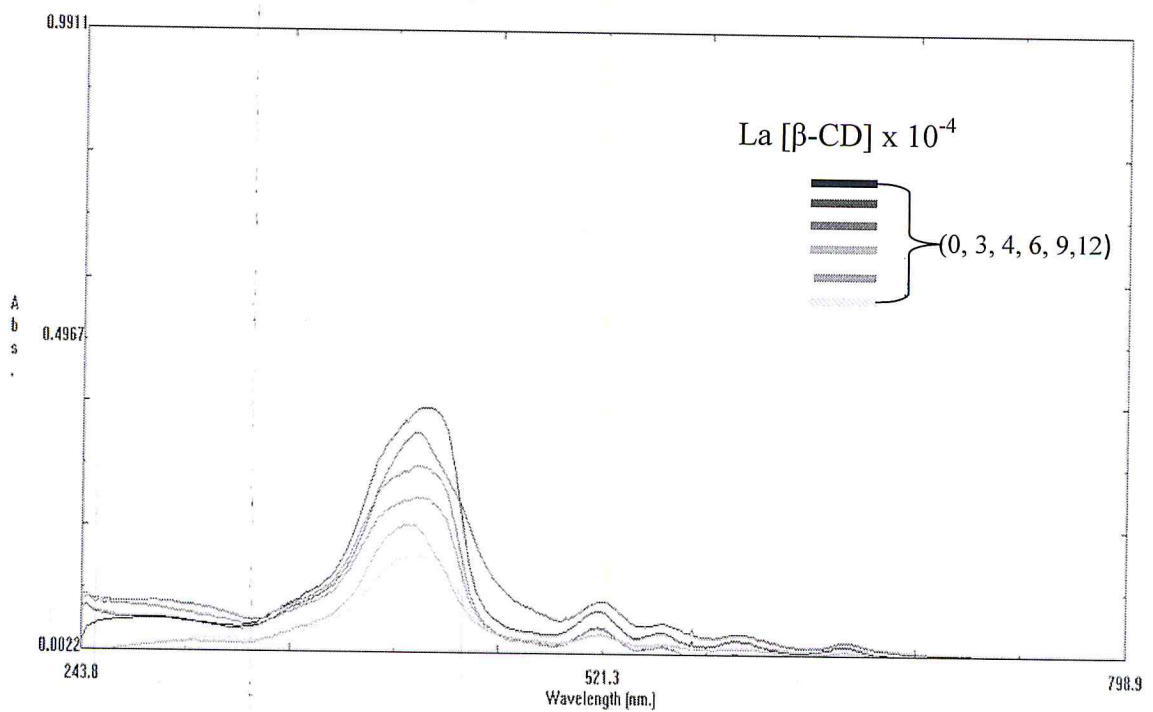


Fig.II-17 : Spectre UV-Vis du complexe d'inclusion m-THPP : β-CD à différentes concentration de β-CD, pH=7.

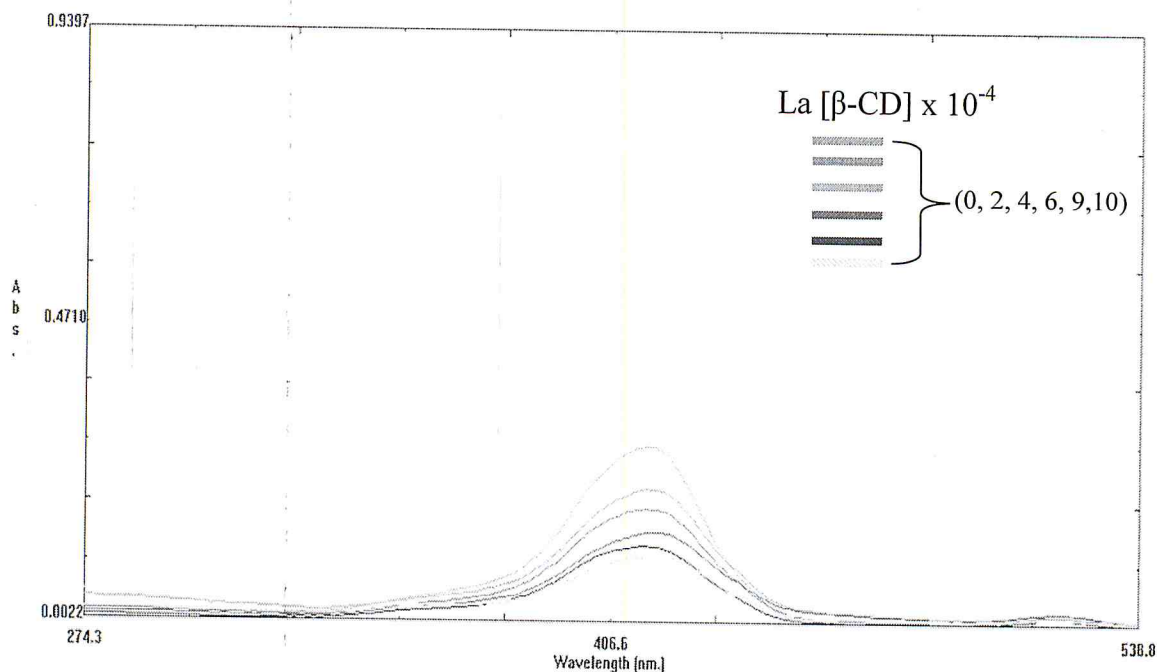


Fig.II-18 : Spectre UV-Vis du complexe d'inclusion m-THPP : β -CD à différentes concentration de β -CD, pH=10.

➤ **Vérification de la formation du complexe d'inclusion.**

L'ajout d'un excès d'une solution de β -CD à la solution de m-THPP, provoque des changements dans les propriétés photo-physiques de la m-THPP, en outre un léger déplacement accompagné par une diminution dans les intensités d'absorbances en fonction de l'augmentation de la concentration de β -CD dans le milieu, celles-ci sont accompagnées par l'apparence du point isobestique vers 421 nm dans le cas du milieu neutre, ce qui suggère la formation d'un système supramoléculaire ou complexe d'inclusion d'une stoechiométrie et une constante de complexation précises [27] tandis que dans le cas du milieu acide et basique on a remarqué la diminution dans l'absorbance en fonction de l'augmentation de β -CD mais sans apparition du point isobestique ces résultats conformes aux résultats de la littérature [28].

➤ **Détermination de la constante et l'ordre d'inclusion**

Afin de déterminer la constante et l'ordre de complexation caractéristique du m-THPP : β -CD, on trace une courbe $1/\Delta A f(C_{\beta-CD}^n)$ [27], on se basant sur les résultats de la Fig. II.5

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{K \cdot C_X \cdot \alpha} \cdot \frac{1}{C_{\beta-CD}^n} + \frac{1}{\alpha \cdot C_X} \quad [27]$$

Tel que ΔA est la différence d'absorbance de la m-THPP en présence et en absence de la β -CD, C_x est la concentration initiale de la m-THPP, α est le coefficient d'absorption du système supramoléculaire THPP : β -CD et K c'est la constante d'inclusion.

La courbe $1/\Delta A$ f($C_{\beta\text{-CD}}^1$) Fig. II.19 est une droite d'équation mathématique de la forme :

- Par superposition avec l'équation donnée ci-dessus, on a :

$$0.0769 = 1/K \cdot C_x \cdot \alpha$$

$$1/\alpha \cdot C_x = 0.9815$$

$$K = 12.76 \text{ mol/l}$$

- Le ratio d'inclusion est donc 1 : 1 une THPP incluse dans une β -CD avec une constante d'inclusion $K=12.76 \text{ mol/l}$.

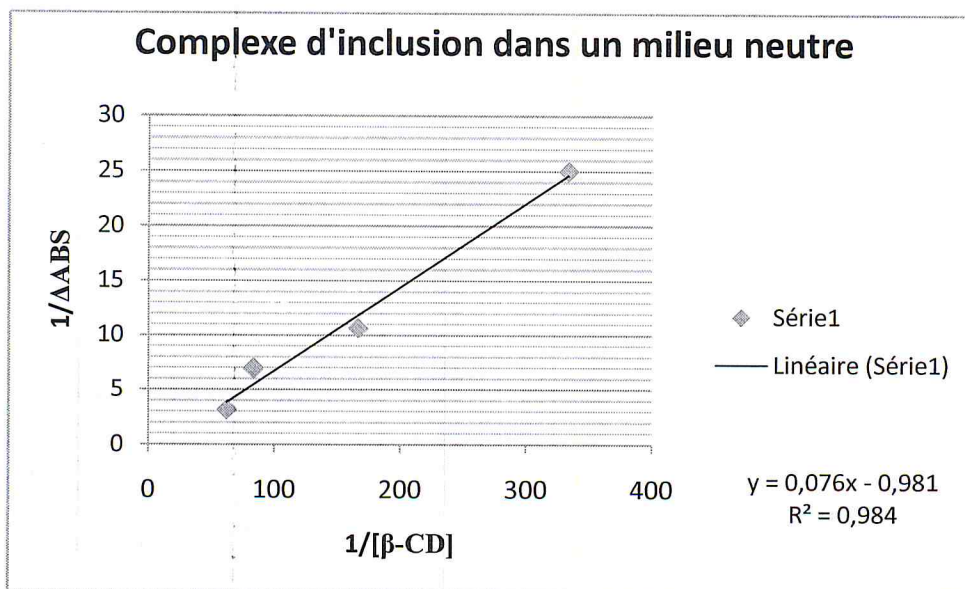


Fig.II-19 : Double réciproque du m-THPP à différentes concentrations de la β -CD en milieu neutre.

➤ Encapsulation du système supramoléculaire dans l'hydroxyapatite

Une fois que le système supramoléculaire est formé, on procède à son encapsulation dans l'hydroxyapatite par la même méthode faite par la voie directe sauf que la porphyrine est remplacée par le système supramoléculaire.

II.3-2 Caractérisation de HA chargée en principe actif.

a) Aspect morphologique :

L'hydroxyapatite dopé a un aspect d'une poudre de couleur violet foncé et sans odeur caractéristique dans le cas des $\mu\text{p.HA-m-THPP}$ (Fig.II-20-a) et d'une poudre fine de couleur violet clair dans le cas des $\text{Np}/\mu\text{p.HA-C}$ (Fig.II-20-b). Une vue macroscopique des systèmes préparés est donnée dans la figure ci-dessous (Fig.II-20)

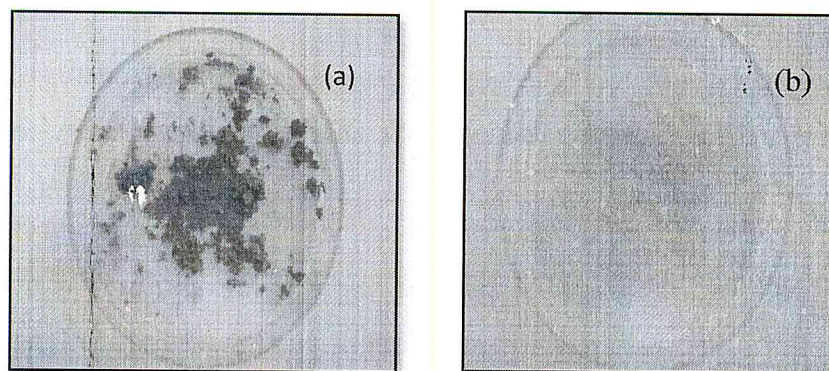


Fig.II-20 : Vue macroscopique de l'hydroxyapatite chargée en principe actif (a) : HA+PS et (b) : HA+complexe d'inclusion C.

Discussion :

Comme il est clairement observé sur la Fig.II-20, les couleurs des deux HA chargées par le PS sont différentes, i.e : violet foncé dans le cas du HA chargée directement par le PS tandis qu'une couleur plus claire « mauve claire » dans le cas de HA chargée par le complexe d'inclusion et cela est dû la double encapsulation du PS dans le cas (b) .

b) Spectroscopie FTIR :

Les spectres FTIR du PS seul, HA-PS et HA-C sont donnés dans les figures ci-dessous :

On observe deux petits pics qui apparaissent vers 2997 et 2914 cm^{-1} attribués aux $-\text{CH}$ de la porphyrine. Un léger déplacement du pic 1639 cm^{-1} attribué à l'eau associée dans le cas du HA seul vers 1647 cm^{-1} dans le cas de HA chargée par le complexe d'inclusion et cela est dû à l'interaction de coordination entre le Ca^{2+} et THPP : $\beta\text{-CD}$ plus précisément entre Ca^{2+} et $\beta\text{-CD}$, ce résultat montre que le groupement OH de la $\beta\text{-CD}$ est le site d'interaction major entre la $\beta\text{-CD}$ et Ca^{2+} (cas du HA avec le complexe) tandis que dans le cas de HA avec le PS seul le

déplacement pourrait être dû à la déformation de la liaison C=C du cycle aromatique (vers 1600 cm^{-1}) provenant éventuellement de la formation de la liaison hydrogène du OH de HA avec le OH du cycle aromatique du PS. De plus il apparait un pic vers 1387 cm^{-1} qui pourrait être attribué au groupement CO_3 dû à l'interaction du CO_2 de l'air avec les groupements OH du HA. En outre, les HA chargée par le PS ou le complexe d'inclusion sont caractérisées par les deux pics vers 1029 et 566 cm^{-1} attribués au PO_4^{3-} du HA.

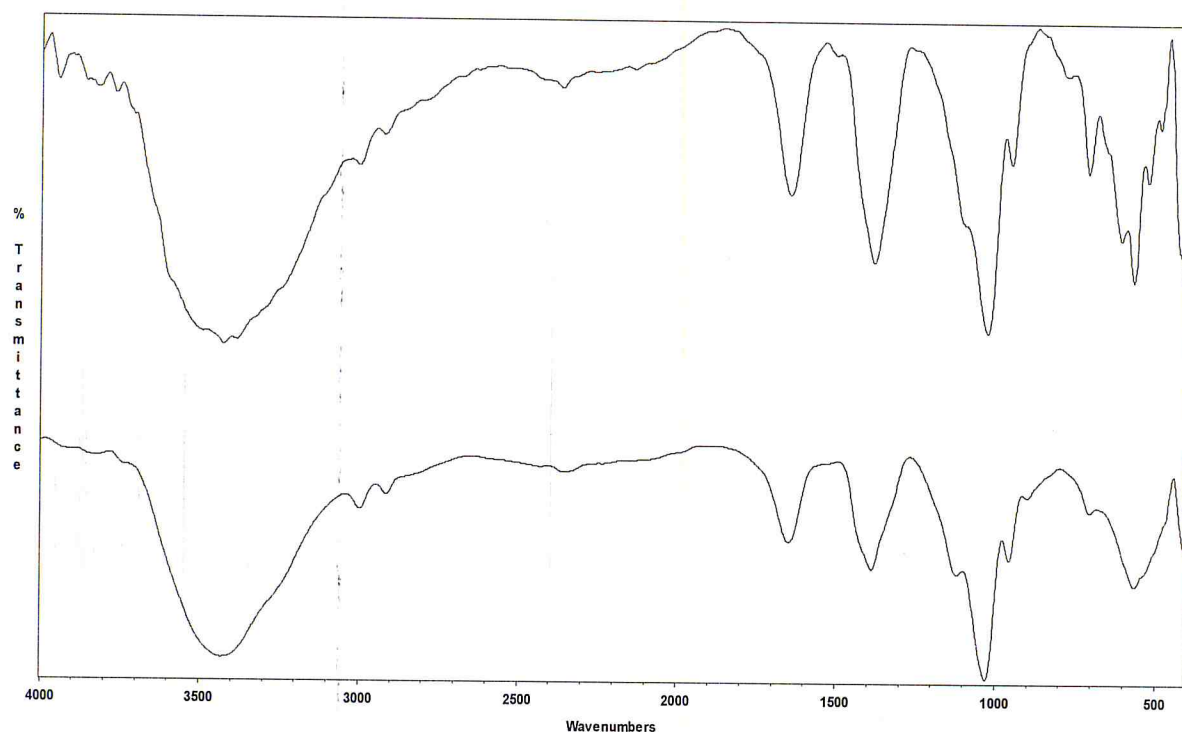


Fig.II-21 : Spectre FTIR de HA chargée par (a) : PS seul et (b) : complexe d'inclusion.

Bibliographie

- [1] P. Parhi, A. Ramanan, A.R. Ray, A convenient route for the synthesis of hydroxyapatite through a novel microwave-mediated metathesis reaction, *Mater. Lett.* 58 (2004) 3610–3612.
- [2] J. Marchi, A.C.S. Dantas, P. Greil, Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium-phosphate powders, *Mater. Res. Bull.* 42 (2007) 1040–1050.
- [3] R. Murugan, S. Ramakrishna, Development of nanocomposites for bone grafting, *Compos. Sci. Technol.* 65 (2005) 2385–2406.
- [4] F. Wang, M. Li, Y. Lü, Y. Qi, A simple sol–gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders, *Mater. Lett.* 59 (2005) 916–919.
- [5] I. Kim, P.N. Kumta, Sol–gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder, *Mater. Sci. Eng. B* 111 (2004) 232–236.
- [6] Y. Sun, G. Guo, Z. Wang, H. Guo, Synthesis of single-crystal HAP nanorods, *Ceram. Int.* 32 (2006) 951–954.
- [7] G.C. Koumoulidis, A.P. Katsoulidis, A.K. Ladavos, P.J. Pomonis, C.C. Trapalis, A.T. Sdoukos, T.C. Vaimakis, Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route, *J. Colloid Interface Sci.* 259 (2003) 254–260.
- [8] G.C. Koumoulidis, A.P. Katsoulidis, A.K. Ladavos, P.J. Pomonis, C.C. Trapalis, A.T. Sdoukos, T.C. Vaimakis, Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route, *J. Colloid Interface Sci.* 259 (2003) 254–260.
- [9] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, X. Wang, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template, *Mater. Lett.* 60 (2006) 1484–1487.
- [10] Feng Wang, Mu-Sen Li, Yu-Peng Lu, Yong-Xin Qi, Yu-Xian Liu, Synthesis and microstructure of hydroxyapatite nanofibers synthesized at 37 °C. *Materials Chemistry and Physics* 95 (2006) 145–149.

Bibliographie

- [11] Tas A C, Biomimetic synthesis of carbonated calcium hydroxyapatite powders at 37°C with Urea- or EnzymUreas-containing synthetic Body Fluids, Patent pending, No: 99/00037, Turkish Patent, Ankara, Turkey, January 11 ,(1999).
- [12] Varma, H.K., Babu, S.S., Synthesis of calcium phosphate bio ceramics by citrate gel pyrolysis method. *Ceram. Int.* 31, (2005) 109–114.
- [13] Kawata, M., Uchida, H., Itatani, K., Okada, I., Koda, S., Aizawa, M. Development of porous ceramics with well-controlled porosities and pore sizes from apatite fibers and their evaluations. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15, 817–823. (2004)
- [14] Miyaji, F., Kono, Y., Suyama, Y, Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite. *Mater. Res. Bull.* 40, 209–213.(2005)
- [15] X.F. Xiao, P.F. Liu, C.F. Qiu, D.C. Zhu, F. Liu. *Mater. Sci. Eng. C*, 29 (2009), pp. 785–790.
- [16] C.C. Li, L.P. Zhao, J.J. Han et al. Synthesis of citrate-stabilized hydrocolloids of hydroxyapatite through a novel two-stage method: a possible aggregates-breakdown mechanism of colloid formation .*J. Colloid Interface Sci.*, 360 (2011), pp. 341–349
- [17] Jie Chen, Liang Rong, Han Lin, Ruijia Xiao, Huifeng Wu. Radiation synthesis of Ph sensitive hydrogels from β -cyclodextrin-grafted PEG and acrylic acid for drug delivery. *Materials Chemistry and Physics* , Volume 116, Issue 1, 15 July (2009), Pages 148–152.
- [18] BurcuCengiz, YavuzGokce, NurayYildiz*, ZekiAktas, AylaCalimli. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 322 (2008) 29–33
- [19] Saenz, A., Rivera-Munoz, E., Brostow, W., Castano, V.M. Ceramic biomaterials: an introductory overview. *J. Mater. Edu.* 21, 297–306. (1999)
- [20] M. Motskin , D.M. Wright , K. Muller , N. Kyle , T.G. Gard , A.E. Porter , J.N. Skepper. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 30 (2009) 3307–3317.

Bibliographie

- [21] R. Rukmani, Willi Paul, C.P. Sharma, J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater. 88 (2009) 41.
- [22] Carlos A. Martínez-Pérez, Jorge García-Montelongo, Perla E. Garcia Casillas, José R. Farias-Mancilla, Humberto Monreal Romero. Preparation of hydroxyapatite nanoparticles facilitated by the presence of β -cyclodextrin. Journal of Alloys and Compounds Volume 536, Supplement 1, 25 September (2012), Pages S432–S436.
- [23] C. P. Dhanalakshmi, L. Vijayalakshmi and V. Narayanan. Synthesis and preliminary characterization of polyethylene glycol (PEG)/hydroxyapatite (HAp) nanocomposite for biomedical applications. International Journal of Physical Sciences Vol. 7(13), pp. 2093 - 2101, 23 March, (2012).
- [24] HongNgee Lim, AnuarKassim, NayMing Huang, RauzahHashim, ShahidanRadiman, PoiSimKhiew, WeeSiong Chiu. Fabrication and characterization of 1D brushite nanomaterials via sucrose ester reverse microemulsion. Ceramics International, Volume 35, Issue 7, September (2009), Pages 2891–2897
- [25] M.H. Fathi, A. Hanifi, V. Mortazavi . Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatitenanopowder . Journal of Materials Processing Technology, Volume 202, Issues 1–3, 20 June (2008), Pages 536–542
- [26] X.Guo et al. / journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry 173, (2005), pp.258-263.
- [27] S. Hamai, T. Ohshida, J. Incl. Phenom.Macro.50, (2004), pp.209.
- [28] XiliangGuo, Wenting An, ShaominShuang ,Fangqin Cheng, Chuan Dong. Study on spectroscopic characterization of meso-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin (THPP) in cyclodextrin and its derivatives. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 173 (2005) 258–263.

Conclusion générale

Conclusion générale



Dans cette étude, des microparticules à base de phosphate de calcium ont été préparées afin de supporter et vectoriser un principe actif anti-cancéreux (mésoporphyrine IX) dans le but d'augmenter sa sélectivité dans l'organisme.

Par voie hydrothermique, des micro-bâtonnets d'hydroxyapatite vide et fonctionnalisés ont été obtenus en milieu alcalin. Dans le cas du système l'HAP / β -CD/PEG, des bâtonnets de très petites tailles arrivant à 400 nm ont été observés.

Les résultats analytiques obtenus nous permettent de dire que l'ajout de la bêta-cyclodextrine dans HAP contribue à augmenter la cristallinité de la matrice minérale ce qui indique que la β -CD possède une influence sur le contrôle de la pureté d'HA. Aussi, la taille et l'agglomération des particules d'hydroxyapatite semblent diminuer en présence de la β -CD. Par conséquent, on peut signaler ici que le système l'HAP / β -CD/PEG peut répondre aux exigences de la vectorisation microparticulaire (taille, surface et stabilité).

Par voie biomimétique, un dérivé de l'hydroxyapatite, la Brushite, a été obtenu. Ce dérivé bien cristallisé et de taille micrométrique possède la morphologie d'une rose de sable dans le SBF.

Dans la préparation de l'hydroxyapatite chargée en principe actif par voie directe et indirecte, des complexes supramoléculaires m-THPP : β -CD ont été reconnus avec un excès d'une solution de β -CD en milieu neutre. Le complexe supramoléculaire obtenu est de stoechiométrie m-THPP : β -CD 1 :1.