

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des sciences
Département de chimie**MEMOIRE DE MASTER**Option : Chimie Moléculaire des complexes métalliques
Promotion 2008-2009**SYNTHESE ET CARACTERISATION DES
HYDROXYDAPATITES DOPEES EN ZINC ET LEUR EFFET
ANTIBACTERIEN**

Par

KACI BELKACEM

Devant le jury composé de :

R. BELAL	Professeur, U. de Blida	Président
A. BOULHAOUUCHE	Chargé de cours, U. de Blida	Examineur
K. BAL	Professeur, U. de Blida	Rapporteur

Blida, Juillet 2009

RESUME

Les poudres d'hydroxyapatites (HA) dopées de zinc (Zn) sont préparées par la méthode de précipitation, en utilisant $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ comme précurseur de calcium (Ca) et de phosphore (P) respectivement et ZnCl_2 comme sel dopant en zinc.

Les HA synthétisés sont caractérisés par deux méthodes d'analyse (diffraction de rayon X (DRX); infrarouge de transformé de Fourier FTIR), afin de pouvoir déterminer la phase cristalline, la composition chimique et la stabilité thermique de Zn-HA.

La variation de la fraction du Zn (0mole% à 70 moles%) a permis de mettre en évidence deux phases: une phase apatite et une phase parascholzite

L'étude de l'activité antibactérienne des complexes HA/Zn a montré des zones d'inhibitions envers des bactéries pathogènes telles les *E. coli* où un diamètre d'inhibition de l'ordre de 18 mm est enregistré.

Abstract

Zinc-doped hydroxyapatite (Zn-HA) powders are prepared by precipitation method by using CaCl_2 , Na_2HPO_4 as precursor of calcium (Ca) and phosphorus (P) and ZnCl_2 as reagents doping.

X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) are used to characterize the crystalline phase, chemical composition, and thermal stability of Zn-HA.

The variation of the Zn concentration (from 0 mole% to 70 mole %) permits to indicate two phases: an apatite phase and a parascholzite phase.

The study of antibacterial activity of the HA/Zn complexes shows the inhibitions zone to pathogenic bacteria such as *E. coli* with an inhibition diameter about 18 mm.

TABLE DES MATIERES



TABLE DES MATIERES

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....1

CHARITRE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....3

I.1 Introduction.....	3
I. 2 L 'hydroxyapatite.....	3
I .2. 1 Les propriétés physico chimiques.....	6
I.2.2 Différentes méthodes de synthèse de phosphate.....	9
I. 3 Le Zinc.....	11
I.4 Toxicité.....	12

CHARITRE 2 PARTIE EXPERIMENTALE.....13

2.1 Introduction.....	13
2.2 Synthèse de l'hydroxyapatite par la voie du mélange CaCl_2 et Na_2HPO_4 :.....	13
2.3 caractérisation des hydroxyapatite	16:
2.3.1 Diffraction des rayons X.....	17
2.3.2 Analyse d'infrarouge de tranformé de fourier (FTIR).....	21
2.3.3Influence de la calcination sur l'hydroxyapatite.....	24
2.4 <i>Activité antibactérienne in vitro</i>	28
2.4.1 Étude qualitative de l'effet antimicrobien d'HA dopée par la méthode de diffusion sur milieu solide	28

CONCLUSION.....31

REFERENCES

SYMBOLES ET ABREVIATIONS

HA : hydroxyapatite

Zn-HA : hydroxyapatite dopée en zinc

TCP : phosphate tricalcique

LISTE DES ILLUSTRATION

Figure 1.1 : Projection sur le plan de base (001) de la maille de l'HA	4
Figure 1.2 : structure optimisé de HA dopé par Zn	5
Figure 1.3 : a, b Dimension de la macroporosité.	6
Figure 1.4 : a, b: structure microporeuse des parois de céramiques	7
Figure 1.5 : a, b structures des porosités	7
Figure 1.6 : a, b Porosité d'interconnexion.	8
Figure 2.1 : Le montage de la synthèse des HA.	14
Figure 2.2 : Protocole de préparation de HA-Zn	15
Figure 2.3 : spectre de DRX de HA	18
Figure 2.4 : spectre de DRX de (Zn-HA 5%).	18
Figure 2.5 : spectre de DRX de (Zn-HA 10%).	19
Figure 2.6 : spectre de DRX de (Zn-HA 15%).	19
Figure 2.7 :spectre d'absorption FTIR de Zn-HA avec défèrent fraction en Zn.	23
Figure 2.8 : spectre de DRX de HA calciné à 900°C.	25
Figure 2.9 : spectre de DRX de 5% mole Zn- HA calciné à 900°C.	25
Figure 2.10 : spectre de DRX de 10% mole Zn- HA calciné à 900°C.	26
Figure 2.11 : spectre de DRX de 15% mole Zn- HA calciné à 900°C.	26
Figure 2.12 : spectre d'absorption FTIR de Zn-HA calciné à 900°C	27
Figure 2.13 : Activité bactérien formé à : a) 0 mole% , b) 5 mole% , c) 10 mole% ,d) 15 mole% ,e) 20 mole% et f) 25 mole% Zn-HA non calciné. Disk sur G.N plate cultivé par staphylococcus aureus	30
Figure 2.14 : la zone d'inhibition bactérien formé à : a) 0 mole% , b) 5 mole% , c) 10 mole% ,d) 15 mole% ,e) 20 mole% et f) 25 mole% Zn-HA calciné. Disk sur G.N plate cultivé par staphylococcus aureus.	30
Tableau 2.1 : les quantité des réactive et la formule calculer de Zn-HA	16
Tableau 2.2 : La taille des cristaux des produit avec différent fraction de Zn	20
Tableau 2.3 : les paramètres de la maille avec différent fraction de Zn	20
Tableau 2.4 : les positions des bandes des groupements fonctionnels du spectre FTIR.	22
Tableau 2.5 : Différentes souches microbiennes utilisées	28
Tableau 2.6 : Le résultat de test de la zone d'inhibition.	29

INTRODUCTION

Pour des besoins croissant dans le domaine de la chirurgie orthopédique et dentaire et avec les limites d'usage (pas d'effets pharmaceutiques) des biomatériaux approuvés tels : hydroxyapatite (HA), tricalcium phosphate (β -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) et les vitrocéramiques [1], de nombreux chercheurs se sont penchés sur la recherche de nouveaux matériaux susceptibles de reproduire les mêmes effets et sensations, en évitant tout risque de transmission infectieuse.

Parmi les matériaux les plus recherchés, les céramiques telles que l'hydroxyapatite (HA) sont les plus étudiés. Ces biomatériaux sont, soit actifs - création d'une liaison entre le matériau et les tissus vivants (céramiques polycristallines en hydroxyapatite HA, bêta-TCP, vitrocéramiques, composites polyéthylène/HA...) [2], soit résorbables c'est-à-dire que le matériau réagit avec le milieu et disparaît complètement à long terme, (bêta-TCP, bioverres...) [3].

Les propriétés des hydroxyapatites peuvent être améliorées en les dopant avec des ions naturellement présents dans l'os tels que le zinc, le strontium ou encore le magnésium.

La substitution de Zn dans HA a été le centre d'intérêt particulier en raison de sa présence dans tous les tissus biologiques et son rôle dans des fonctions biologiques, telles que l'activité enzymatique, de métabolisme d'acide nucléique, d'entretien de structure de membrane et de fonction, activité hormonale, aussi bien que la bio minéralisation [4] et la calcification potentiellement pathologique [5,6]. La prise et la libération du Zn dans le corps est fortement liée par le réservoir d'os, quoiqu'il contienne seulement une petite partie de tout le Zn présent dans le corps [7]. Des dents se sont également avérées pour contenir une quantité significative de Zn, qui a été employé comme indicateur de l'exposition environnementale [8]. On a récemment démontré que l'incorporation de Zn dans l'implant peut favoriser la formation d'os autour du matériel [9.10].

L'incorporation ou "le dopage" en zinc, également apporte des propriétés intéressantes au matériau, il modifie les processus de dissolution/ précipitation et accélère la dégradation de l'hydroxyapatite [11].

Au niveau cellulaire, il modifie l'expression de certaines cytokines [12] et inhibe les fonctions ostéoclastiques en favorisant la formation osseuse [13]. L'hydroxyapatite dopée

semble donc apporter des bénéfices comparés à l'utilisation d'une hydroxyapatite non-dopée. Cependant, une forte concentration en zinc peut entraîner une diminution de la solubilité de l'apatite [14]. Ainsi, le zinc doit être libéré lentement parce que le zinc à un niveau élevé induit des réactions défavorables.

Pour la préparation des hydroxyapatiques dopées, nous avons adopté une technique qui semble être prometteuse : il s'agit d'un procédé qui utilise des précurseurs moléculaires (sels) en solution qui vont, par un processus de neutralisation, conduire à la formation d'un gel amorphe qui après traitement thermique adéquat permettra d'obtenir le matériau composite.

L'utilisation de tels précurseurs permet d'assurer une excellente pureté au produit final mais aussi de modifier facilement la composition du matériau. La céramique est obtenue à des températures modérées et le contrôle des paramètres de synthèse (solvant, catalyse, rapport,...) ainsi que des conditions de traitement thermique résultent le contrôle de la texture du matériau (porosité, taille des pores, surface spécifique,...)

Le travail proposé s'inscrit dans ce ordre d'idées, qui a pour objectif principal la synthèse et la caractérisation d'une HA dopées de zinc a des propriétés bio-fonctionnelles susceptible de répondre à des besoins cosmétiques par exemple (usage cutané).

Notre mémoire se scinde en deux parties essentielles :

- Etude succincte bibliographique sur les hydroxyapatiques.
- Partie expérimentale qui comporte trois parties :
 - La synthèse des HA dopés en Zn à différentes fractions.
 - La caractérisation des HA par différentes analyses à savoir : la diffraction de RX ; FTIR (infrarouge à transformé de Fourier).
 - Etude de l'activité antibactérienne des Zn-HA.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Introduction :

Les phosphates de calcium jouent un rôle considérable dans les processus biologiques notamment au sein du tissu osseux. Il est admis aujourd'hui que sa partie minérale est assimilable à une apatite phosphocalcique mal cristallisée et lacunaire. Pour permettre un meilleur remodelage d'un tissu endommagé, la chirurgie moderne fait fréquemment appel à des substituts osseux synthétiques. Parmi ces matériaux certains possèdent des propriétés de compatibilité biologique vis-à-vis des tissus environnants qui les rendent particulièrement attractifs. L'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) et le phosphate tricalcique de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP) sont largement utilisés pour ces propriétés, le premier pour son activité biologique de surface et le second pour son caractère résorbable.

I.2 L'hydroxyapatite :

Une des formes les plus répandues du phosphate de calcium est l'hydroxyapatite (HA). De formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, qui appartient à une grande famille de composés isomorphes. L'hydroxyapatite phosphocalcique cristallise dans le système hexagonal (groupe spatial P63/m) avec les paramètres cristallographiques suivants [15] :

$$a = 9,418 \text{ \AA}, \quad c = 6,881 \text{ \AA}, \quad \beta = 120^\circ \text{C};$$

La structure cristallographique : le l'HA (figure1.1) consiste en un empilement de groupements phosphate qui forment deux types de tunnels parallèles à l'axe c. Le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par des ions calcium notés Ca(I). Le second type de tunnel, dont l'axe coïncide avec l'axe sénaire hélicoïdal du réseau, est bordé par des atomes d'oxygène et les autres ions calcium, notés Ca(II), et occupé

par les ions OH⁻. La taille de ce type de tunnel (3 Å pour l'HA) confère aux apatites des propriétés d'échangeurs d'ions et d'accepteur de petites molécules (O₂, H₂O, glycine) [16, 17,18].

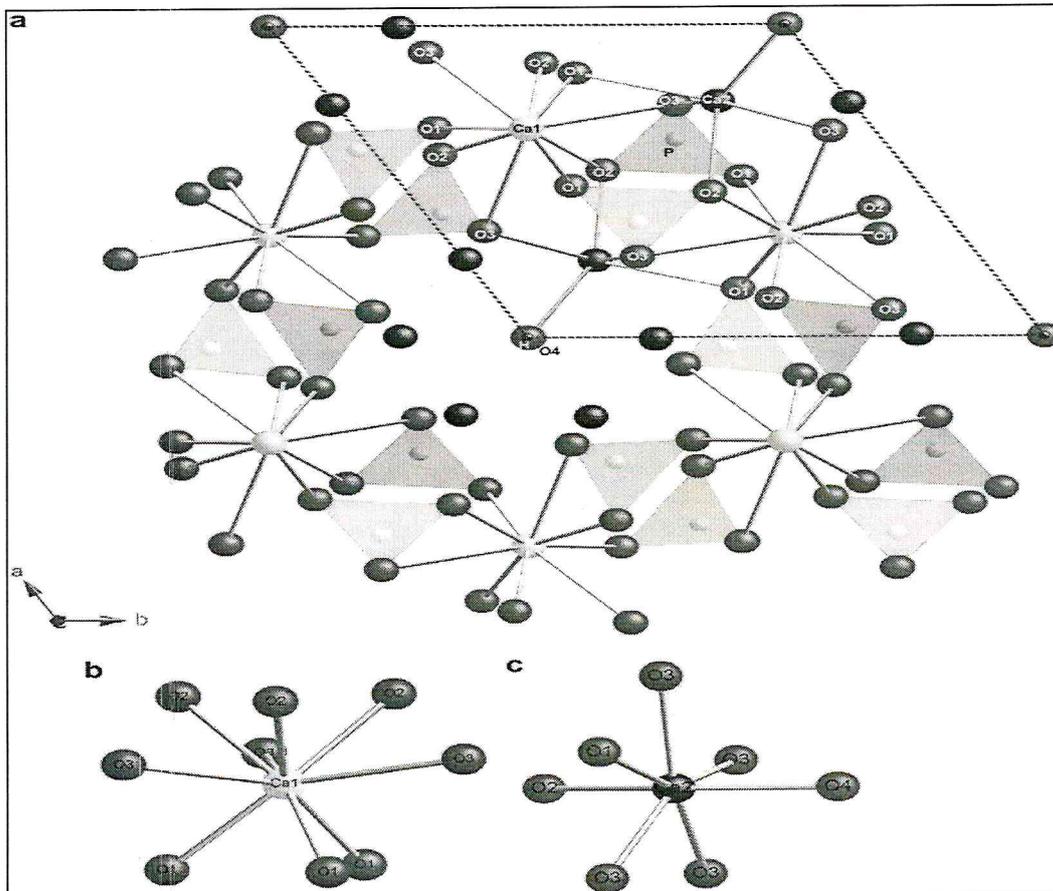


Figure 1.1 : Projection sur le plan de base (001) de la maille de l'HA [19].

La structure des apatites admet un grand nombre de substitutions qui peuvent être partielles ou totales. En considérant la formule chimique générale suivante :



Ainsi les cations divalents (Me^{2+}) peuvent être remplacés par des cations monovalents Na^+ , K^+ , Li^+ , cations bivalents Ca^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} .

Le groupement anionique trivalent (XO_4^{3-}) peut être remplacé par des PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , mais aussi par des bivalents HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , ou même par des monovalents et des tétravalents MnO_4 , SiO_4^{4-} .

Les anions monovalents des tunnels (Y) peuvent céder leurs places aux ions OH⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻ ou même aux ions bivalents O²⁻, CO₃²⁻, S²⁻.

Une autre propriété remarquable des apatites est d'admettre des lacunes, qui n'existent jamais en site (XO₄³⁻), mais peuvent se localiser en site cationique (Me²⁺) ou anionique (Y).

La présence de lacune et de substitutions variées conduit à des modifications importantes des équilibres de charges locales, des symétries locales et des distorsions sensibles du réseau.

Les apatites naturelles les plus courantes sont les phosphates de calcium : Ca₁₀(PO₄)₆(OH, F, Cl)₂, la forme apatitique la plus connue est la fluoroapatite de formule idéale Ca₁₀(PO₄)₆F₂. Lorsque les ions fluor sont échangés par les ions OH⁻, on obtient l'hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂.

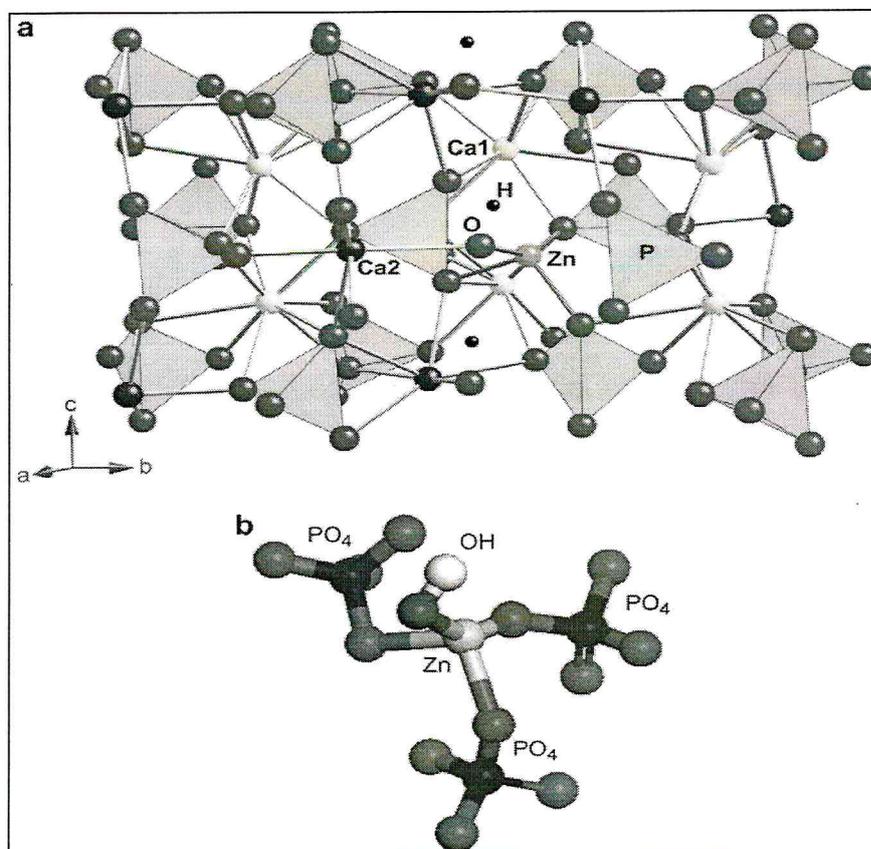


Figure 1.2 : structure optimisé de HA dopé par Zn [19] .

1.2. 1 Les propriétés physico chimiques:

- Porosité :

Selon les conditions de préparation, deux types de porosité coexistent au sein des céramiques de phosphate de calcium, la macroporosité et la microporosité.

La macroporosité : se traduit par l'existence de pores calibrés, créés par l'ajout d'un agent porogène lors du frittage. Contrairement aux micropores, les macropores présentent un diamètre compris entre 100 et 600 μm , qui permet leur colonisation par des cellules. (fig.1.3 a,b)

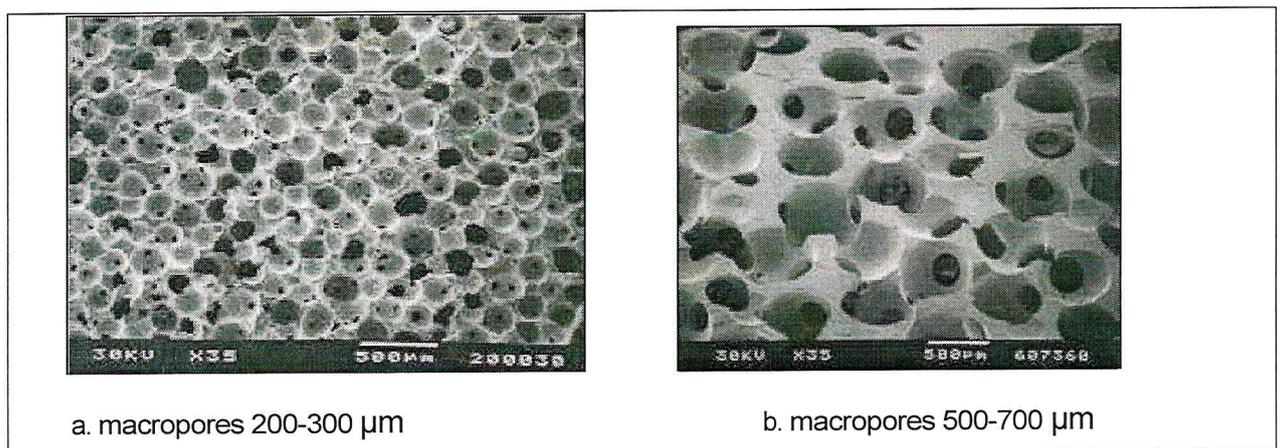


Figure 1.3 : a, b Dimension de la macroporosité.

La microporosité : correspond aux espaces qui existent entre les cristaux de la céramique D'une taille réduite (1 à 10 μm de diamètre), ces espaces ne peuvent être colonisés par les cellules ; seuls les fluides biologiques y diffusent. (fig.11.4a, b)

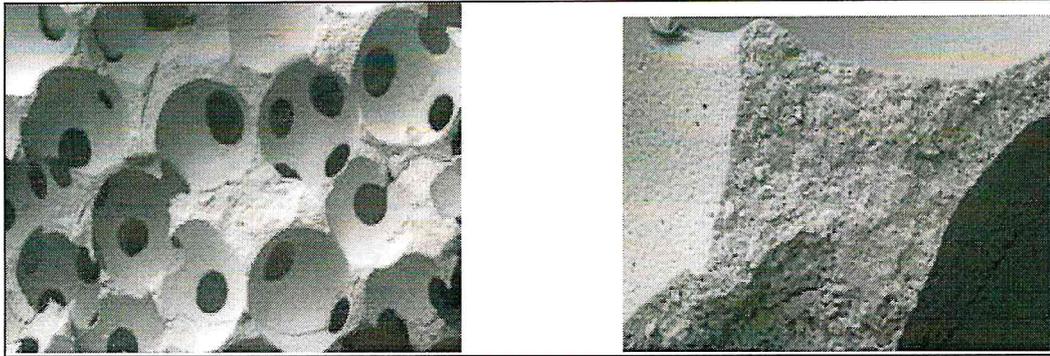
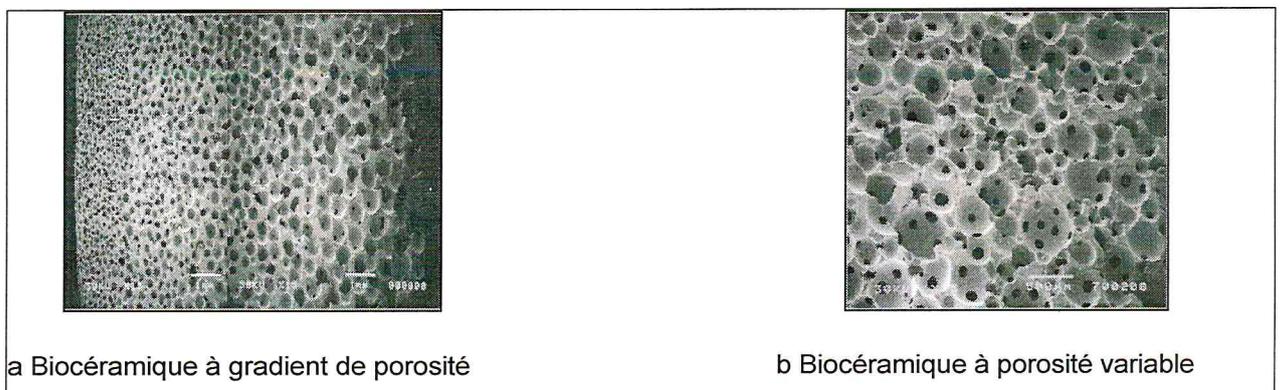


Figure 1.4 : a, b: structure microporeuse des parois de céramiques.

Il existe aux sein des céramiques de phosphate de calcium un gradient de porosité variable (Fig.1.5a,b). En augmentant la surface d'échange entre la céramique et le milieu biologique, une porosité globale élevée améliore la solubilité ainsi que l'activité biologique. Toutefois, une macroporosité élevée altère les propriétés mécaniques de la céramique, et limite son utilisation à des sites hors contrainte ou en association avec un montage orthopédique parfaitement stable. L'idéal est de trouver la porosité optimale, afin de conserver une continuité cellulaire et tissulaire suffisant et donc une bonne colonisation osseuse, tout en maintenant une résistance mécanique compatible pour une utilisation en chirurgie parodontale. Une étude récente a montré qu'une macroporosité de 40 %, avec des macropores de 565 μm constitue un bon compromis.



a Biocéramique à gradient de porosité

b Biocéramique à porosité variable

Figure1.5 : a, b structures des porosités.

- Porosité d'interconnexion

Son importance théorique repose sur la nécessité de la présence de passages entre les macropores de surface et ceux en profondeur pour permettre une colonisation abondante et profonde de la céramique. (Fig.1.6 a,b).

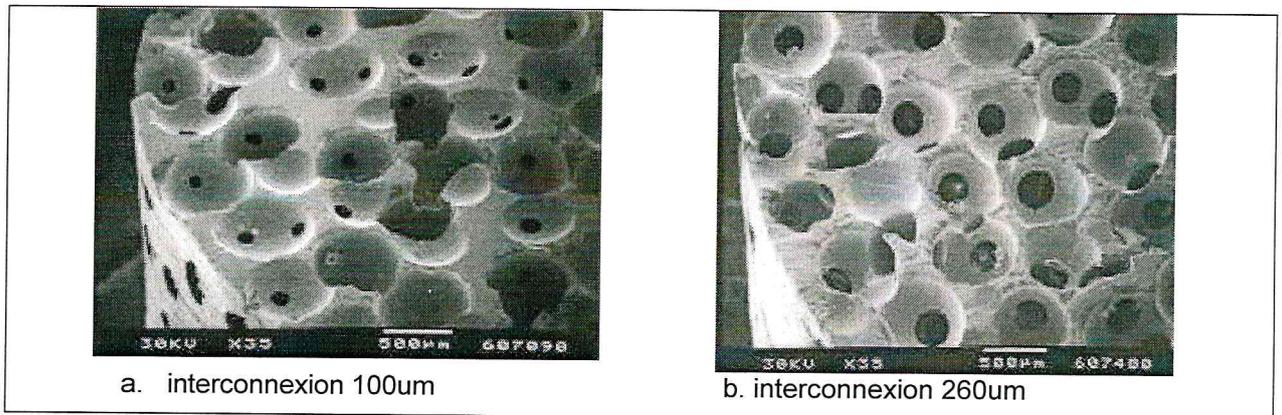


Figure 1.6: a,b Porosité d'interconnexion.

- Propriétés biologiques :

Les phosphates de calcium présentent deux propriétés biologiques principales : (1) biocompatibilité et (2) bio activité.

- La biocompatibilité :

La biocompatibilité se définit comme la propriété d'un matériau qui joue un rôle dans une application spécifique, avec une réponse appropriée de l'hôte, en dehors de tout effet néfaste indésirable. En raison de leur mode d'élaboration par synthèse chimique, les céramiques de phosphates de calcium présentent une parfaite innocuité à la fois biologique et toxicologique

A l'inverse des matériaux d'origine biologique, tout risque est exclu dans la transmission d'éléments pathogènes ou de contaminations par des éléments toxiques. D'autre part, en raison de leur composition proche de celle de l'os, les céramiques phosphocalciques sont biocompatibles comme cela a pu être démontré, in vivo, en site osseux ou extra osseux.

En fait, seule une instabilité de l'implant peut entraîner une réaction inflammatoire aboutissant à son encapsulation dans un tissu fibreux, son isolement ou son rejet.

- La bio activité:

La bioactivité se définit comme la possibilité d'interactions et d'échanges avec les cellules et les tissus vivants et celle d'induire des modifications biologiques des biomatériaux. Elle dépend des :

- Interactions et échanges avec les cellules et les tissus.
- Modifications biologiques du biomatériau.
- Facteurs de bioactivité.

1.2.2 Différentes méthodes de synthèse de phosphate apatitique :

La reproductibilité, la biocompatibilité et l'absence de toxicité constituent les principaux points du cahier des charges que doit remplir un substitut osseux de synthèse.

Plusieurs grandes voies de synthèse sont utilisées pour la préparation des apatites : la précipitation par voie aqueuse, la réaction solide - solide (voie sèche), la réaction en sels fondus, le procédé sol – gel et la voie des ciments. Les phosphates de calcium peuvent apparaître sous différentes formes : hydrates, hydroxydes ou anhydres. Ils sont habituellement décrits par leur rapport molaire Ca/P.

- Réactions en phase aqueuse :

Les synthèses en phase aqueuse se font selon deux procédés différents : la méthode par double décomposition et la méthode par neutralisation. Ces procédés sont actuellement utilisés pour la production industrielle d'apatite [20].

La méthode par double décomposition [21,22,23] consiste à ajouter une solution du sel de cation Me dans une solution du sel de l'anion contrôlée XO₄. Le précipité est ensuite lavé et séché. Cette technique permet également d'obtenir des apatites mixtes (contenant deux cations différents) avec une maîtrise du rapport Me₁/Me₂.

Les cations sont introduits simultanément dans le réacteur avec le rapport

Me1/Me2 désiré, cela permet d'éviter une ségrégation lors de la précipitation. Les principaux inconvénients de cette méthode viennent de sa mise en œuvre qui nécessite beaucoup de matériel et la vitesse de synthèse est plutôt lente.

La méthode par neutralisation consiste à neutraliser une solution de lait de chaux en y ajoutant une solution d'acide phosphorique. Cette réaction permet d'obtenir rapidement de grandes quantités d'hydroxyapatite phosphocalcique avec peu de matériel [24]. Il est également possible de synthétiser des fluorapatites.

- Réactions en phase solide :

La synthèse par réaction solide - solide consiste à chauffer un mélange réactionnel, constitué des divers sels des cations et des anions, dans un rapport Me/XO₄ égal à 1,67. Ce mélange doit être parfaitement homogène pour permettre une réaction totale. La synthèse d'une fluorapatite phosphocalcique peut être effectuée, par exemple, à partir de phosphate tricalcique et de fluorure de calcium selon la réaction suivante [25] :



Cette réaction s'effectue à 900 °C pendant plusieurs heures.

Dans le cas d'une réaction solide/gaz, le gaz provient soit de la sublimation d'un sel solide contenu dans le mélange réactionnel (la synthèse peut alors s'effectuer dans une enceinte fermée), soit par un apport extérieur sous forme d'un balayage du gaz réactif par exemple.

- Réactions en sels fondus :

Cette méthode permet de se rapprocher des conditions de synthèse de certaines apatites naturelles. Des phosphates métalliques à structure apatitique ont ainsi été préparés. On a pu ainsi obtenir des cristaux qui sont le plus souvent mélangés à l'excès de réactifs de départ [26,27].

- Réactions sol - gel :

Le procédé sol - gel est basé sur la polymérisation de précurseurs organométalliques de type alcoxydes M(OR)_n.

Après une hydrolyse contrôlée de cet alcoxyde en solution, la

condensation des monomères conduit à des ponts oxo puis à un oxyde organique. La polymérisation progressive de ces précurseurs forme des oligomères puis des polymères en augmentant ainsi la viscosité. Ces solutions polymériques conduisent à des gels qui permettent une mise en forme aisée des matériaux (films denses et transparents, poudres ultra - fines, céramiques, ...) avec de nombreuses applications technologiques [14-15].

- Réaction liquide / solide (la voie des ciments) :

Les ciments phosphocalciques sont des ciments hydrauliques minéraux qui font prise grâce à des réactions acido-basiques entre des phosphates de calcium à caractère acide et des phosphates de calcium à caractère basique pour donner une hydroxyapatite phosphocalcique en phase unique [28,29] .

I. 3 Le Zinc :

Le zinc est un élément abondant qui constitue à peu près 0,004 pour cent de la croûte terrestre [30].

Le zinc est un élément nutritif essentiel pour l'homme. Les besoins quotidiens varient de 4 à 10 mg selon l'âge et le sexe; toutefois, les femmes enceintes et celles qui viennent d'accoucher peuvent avoir besoin d'une dose de 16 mg/jour. Les aliments constituent la source la plus importante de zinc.

L'ingestion de longue durée de quantités dépassant considérablement celles mentionnées n'a entraîné aucun effet nocif. Qui plus est, à cause de la présence de mécanismes d'homéostasie efficaces, il est très peu probable que le zinc puisse engendrer une toxicité chronique..

Le zinc est un élément essentiel pour tous les renfermant du zinc participent à tous les aspects du métabolisme, entre autres à la réplication et à la traduction du matériel génétique.[31] organismes vivants, y compris l'homme. Des protéines et des enzymes .On a identifié près de 200 enzymes renfermant du zinc chez toutes les espèces.[20]. Parmi les enzymes renfermant du zinc qui sont bien caractérisées, on peut citer l'anhydrase carbonique, l'aspartase, la

transcarbamylyase et l'alcooldéshydrogénase.

I.6.1 Toxicité :

Le zinc est un oligo-élément essentiel à toutes les espèces vivantes. Il entre dans la composition de métalloprotéines impliquées dans de multiples réactions physiologiques [32].

Chez l'homme une carence en zinc entraîne des lésions de la peau, et un affaiblissement du système immunitaire.

La consommation quotidienne de zinc recommandée se situe entre 5 et 40 mg, les doses toxiques et létales étant respectivement de 150-600 mg et de 6 g [33].

Le zinc est suspecté carcinogène à forte dose.

CHAPITRE 2

PARTIE EXPERIMENTALE

2.1 Introduction :

Dans ce chapitre, les parties suivantes seront considérées:

La première partie est consacrée à la synthèse de l'hydroxyapatite et au complexe HA-Zn. Les poudres d'hydroxyapatite obtenues seront calcinées en vue d'optimiser la composition de l'hydroxyapatite.

La deuxième partie traitera l'étude de la caractérisation des HA par l'analyse de diffraction des rayons X (XRD) et par la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Ces deux analyses indiqueront l'état cristallographique et les différentes phases présentes dans les hydroxyapatite synthétiques.

Et en fin, la dernière partie de ce travail investit l'activité antibactérienne des biomatériaux obtenus (HA et HA/Zn) par l'étude de la variation du diamètre des zones d'inhibitions en fonction des différentes fractions préparées.

2.2 Synthèse de l'hydroxyapatite par la voie du mélange CaCl_2 et Na_2HPO_4 :

Les poudres HA et HA dopée ont été préparées par voie aqueuse à partir de solutions de chlorure de calcium $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de phosphate de sodium $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et de chlorure de zinc ZnCl_2 . Les différentes quantités de réactifs sont inscrites dans le tableau 2.1. On calcule les fractions de zinc dans la composition par $[\text{Zn}]/[\text{Ca}+\text{Zn}] \times 100$ (mole%). Le rapport molaire $(\text{Ca}+\text{Zn})/\text{P}$ en réactifs est fixé à 1,670 pour toutes les synthèses.

La solution de chlorure de calcium est introduite dans le réacteur et chauffée à la température souhaitée sous agitation. Le pH et la température sont contrôlés grâce à deux régulateurs indépendants qui sont le pH mètre et thermomètre. La solution de phosphate sodium, chauffée elle aussi, est introduite à débit contrôlé dans le réacteur. L'ensemble est ensuite maintenu sous agitation à la température de synthèse. L'étape ultime est de filtrer sous vide le produit de la précipitation, avec opération de lavage.

Le gâteau obtenu est ensuite séché dans une étuve à 105°C pendant 24 heures (voir figure 2.1).

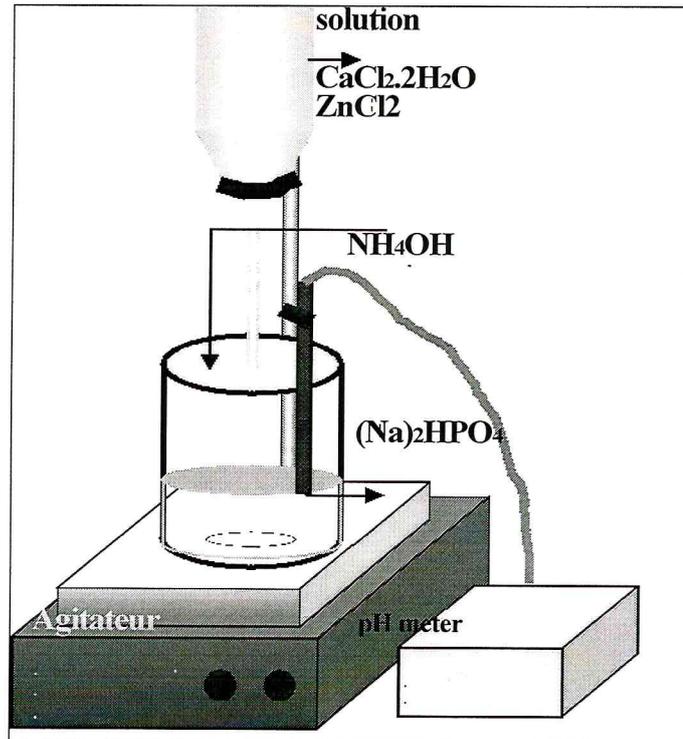


Figure 2.1 : Le montage de la synthèse des HA.

Les conditions opératoires suivantes sont à respecter :

- les solutions de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont fraîchement préparées.
- un volume de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est introduit dans un bécher.
- la solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ est introduite dans une burette pour maintenir le débit d'écoulement qui est de 5 ml \ min.
- le réacteur est chauffé à la température souhaitée sous agitation.
- Un pH mètre est utilisé pour contrôler le pH qui sera ajusté par une solution d'hydroxyde d'ammonium NH_4OH .
- le précipité obtenu est séché à 105°C.

Le protocole d'expérience est représenté par l'organigramme de la figure (2.2) suivante.

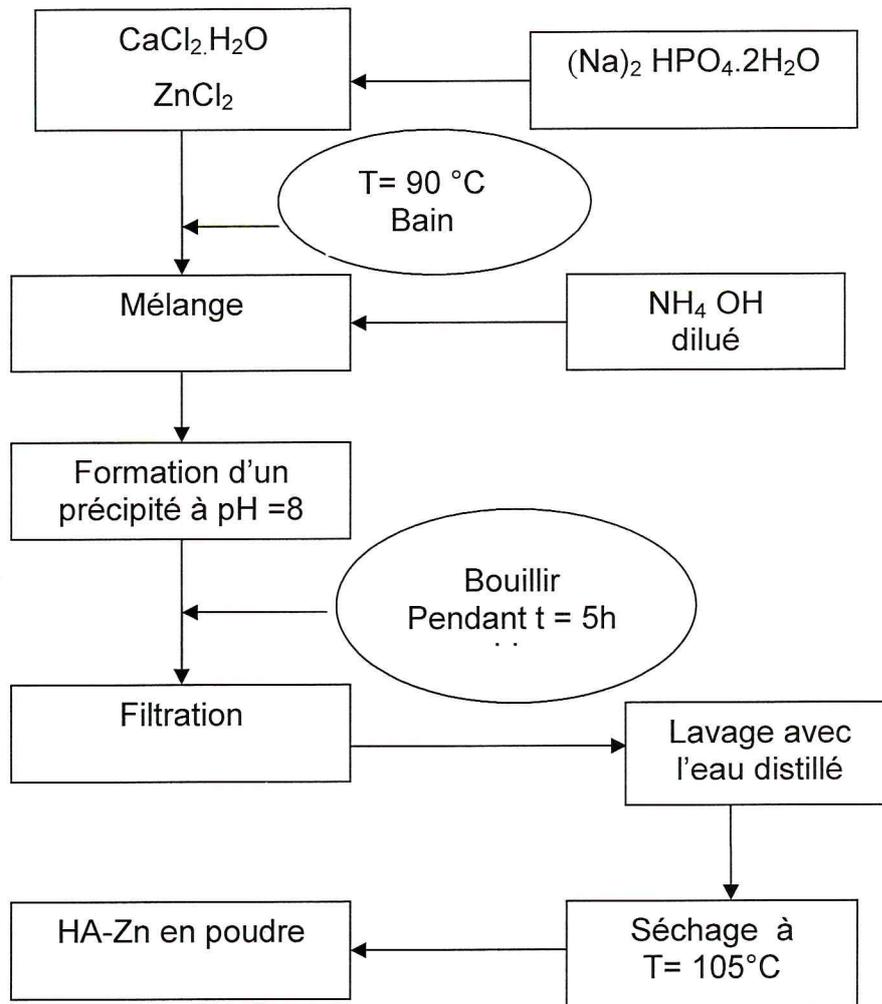


Figure 2.2 : Protocole de préparation de HA-Zn.

La synthèse a donné après séchage une poudre bien blanche d'hydroxyapatite qui sera identifiée par la suite (partie II) par diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge de Fourier.

La composition des solutions est choisie à partir des coefficients stœchiométriques correspondant à l'équilibre de l'équation de la réaction : (rapport atomique Ca/P = 10/6).



Tableau 2.1 : Classification des quantités des réactifs et les différentes formules de Zn-Ha.

	$n_{(\text{Na})_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}$	$n_{\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}/\text{mol}$	$n_{\text{ZnCl}_2}/\text{mol}$	La formule chimique calculée de Zn-HA
00mol % Zn-HA	0.060	0.100	0.000	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$
05 mol % Zn-HA	0.060	0.095	0.005	$\text{Ca}_{9.5}\text{Zn}_{0.5}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$
10mol % Zn-HA	0.060	0.090	0.010	$\text{Ca}_9\text{Zn}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$
15mol % Zn-HA	0.060	0.085	0.015	$\text{Ca}_{8.5}\text{Zn}_{1.5}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$
20mol % Zn-HA	0.060	0.080	0.020	$\text{Ca}_8\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$
25mol % Zn-HA	0.060	0.075	0.025	$\text{Ca}_{7.5}\text{Zn}_{2.5}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$

Cette voie de synthèse a permis la production de 9.5 g d'HA brute, alors que la deuxième quantité d'HA dopée par le Zinc dans les mêmes conditions a donné 11.36 g à 15 g.

2.3 Caractérisation des hydroxyapatites :

Dans cette partie, on décrit les expériences que nous avons effectuées pour déterminer la structure cristallographique des différents hydroxyapatite synthétisées. Tout d'abord, l'analyse par diffraction des rayons x (XRD) permettra de déterminer si nous sommes en présence d'une structure apatite et nous montrera si nous n'avons pas la présence d'autres composés. Ensuite, une analyse par spectrométrie d'absorption infrarouge à transformé de Fourier (FTIR) confirmera la nature des liaisons entre les différents groupements présents que nous n'aurons pas pu mettre en évidence au préalable par les autres méthodes.

2.3.1 Diffraction des rayons X [34] :

- Principe:

Les corps cristallins peuvent être considérés comme des assemblages de plans réticulaires plus ou moins denses Certains contiennent plus d'atomes que d'autres selon la formule chimique du minéral. Ces plans sont séparés par des distances réticulaires caractéristiques (d) selon la nature du cristal ou du minéral considéré.

Trois ou quatre distances réticulaires ainsi que la connaissance du groupe d'espace déterminant la symétrie dans la maille permettent une reconstitution du réseau cristallin du minéral considéré, avec un rayonnement de longueur d'onde suffisamment petit (quelque Angströms, Domaine des rayons X), on peut obtenir des diffractions par les plans réticulaires. Cette diffraction est d'autant plus intense que le plan est <<dense>> c'est-à-dire riche en électrons.

La diffraction X permet de caractériser de façon univoque la cristallographie d'un composé. En effet, un échantillon bombardé par un faisceau monochromatique de rayons X produit des faisceaux diffractés selon la loi de Bragg (2) :

$$2 d \sin (\theta)= n \lambda \quad (2)$$

avec :

d : distance entre les plans de diffraction

θ angle de diffraction.

λ : longueur d'onde des rayons X.

Les diagrammes des poudres ont été effectués à l'aide d'un diffractomètre X TERT.

- Résultats et discussions :

L'étude du diagramme de diffraction des rayons X du produit préparé(HA) (Figure 2.3) montre la présence de toutes les raies de diffraction de la phase apatitique bien cristallisée. En effet, les distances interarticulaires et les intensités des raies de diffraction observées sont identiques aux valeurs des

données cristallographiques de l'hydroxyapatite phosphocalcique fiche (JCPDS 09-0432), lorsque la fraction de Zn est inférieure à 15 mol %.

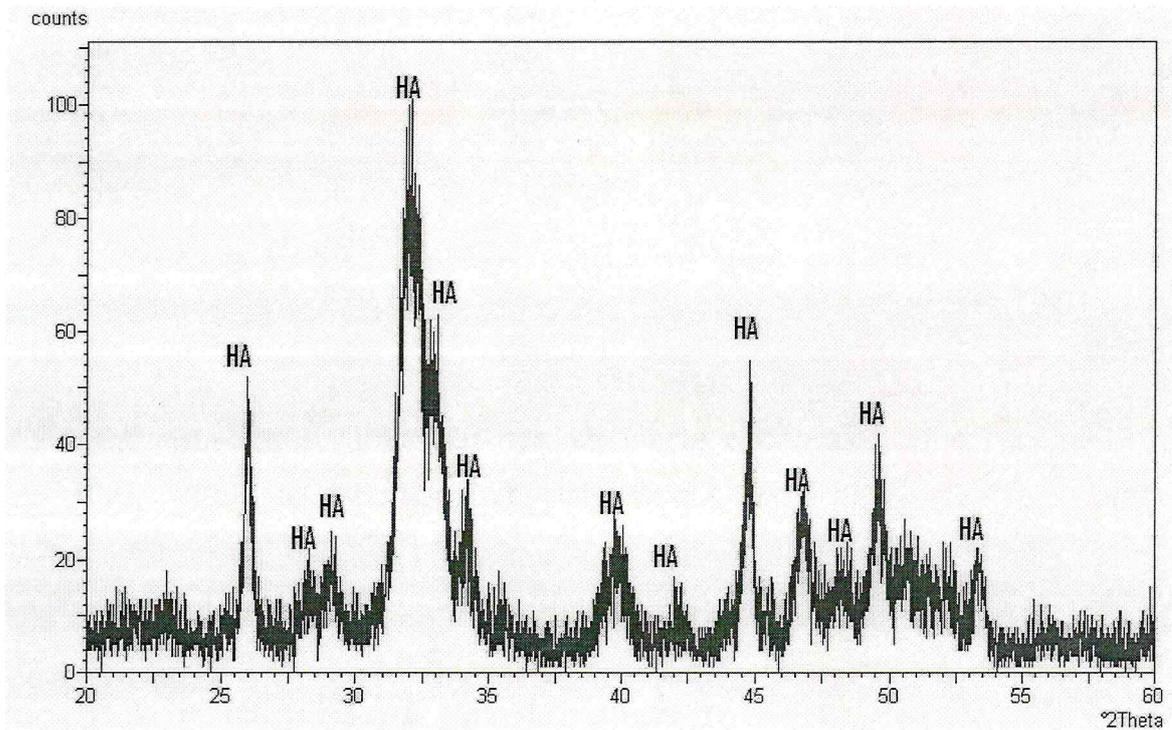


Figure2.3 : spectre de DRX de HA.

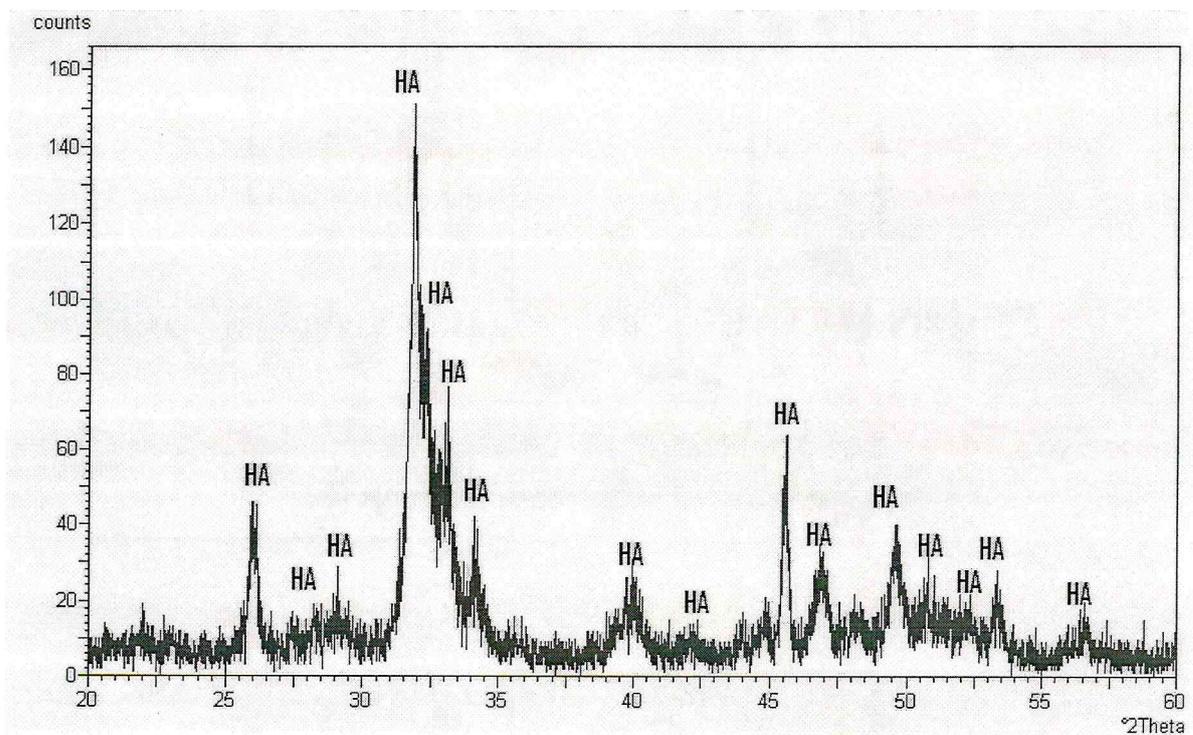
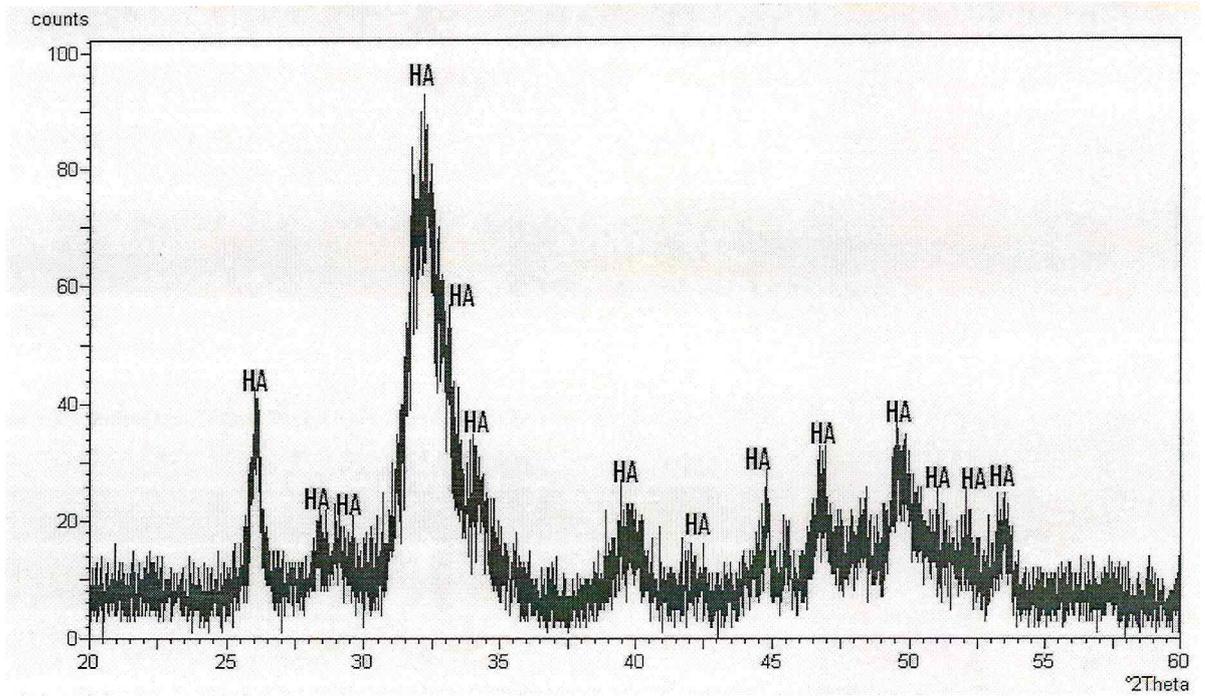


Figure2.4 : spectre de DRX de (Zn-HA 5%).



HA10

Figure2.5 : spectre de DRX de (Zn-HA 10%).

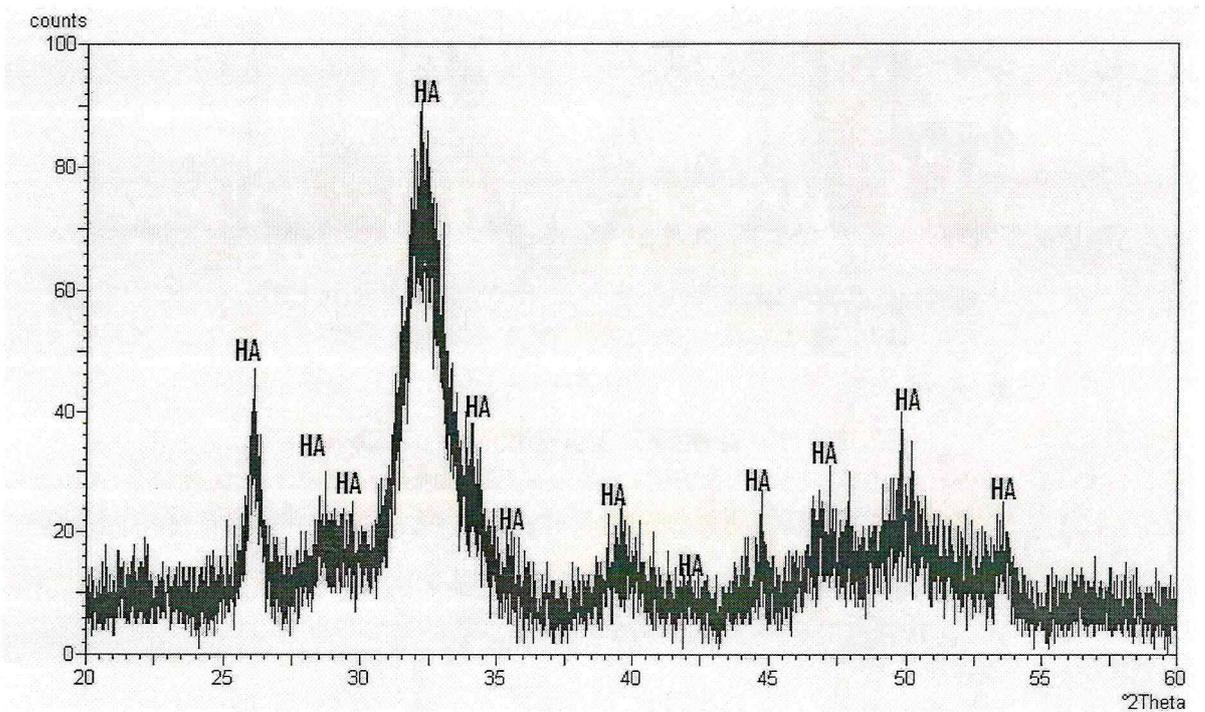


Figure2.6 : spectre de DRX de (Zn-HA 15%).

Toutefois, ces pics deviennent plus ou moins large et moins intenses lorsque la teneur en Zn augmente pour les raisons probables suivantes :

- Le rayon ionique dans Zn^{2+} (0.074 nm) est que celui de Ca^{2+} (0.099 nm) .
- L'effet de la taille des cristaux, calculée par la formule de Scherrer [35] :

$$D_{(hkl)} = 0.9 \lambda / \beta \cos \theta$$

Tableau2.2 : La taille des cristaux des produit avec différent fraction de Zn .

échantillon	La taille des cristaux de HA et Zn-HA / nm	
	axe-a	axe -c
HA	30.9	42.2
5 mole % Zn-HA	22.0	71.1
10 mole % Zn-HA	21.9	60.7

d'où $D_{(hkl)}$ la taille des cristallite (nm) ; $\lambda=0.15405$ (nm) ; θ angle de diffraction (°);
 β la valeur FWHM (la largeur à mi-hauteur du pic) de l'échantillon.

- montre que leur taille diminue lorsque la teneur en zinc augmente.

Le tableau 2.3 montre que le paramètre de la maille décroît lorsque la fraction en Zn augmente. la paramètre de la maille c décroît de façon monotone avec l'augmentation de la fraction de Zn.

Les paramètre de la maille (a et c) des échantillons sont calculé par l'utilisation de l'équation du système hexagonale :

$$1/d = [4(h^2+hk+k^2)/3a^2 + l^2/c^2]$$

Tableau 2.3 : les paramètres de la maille avec différent fraction de Zn.

échantillon	a/nm	c/nm
HA	0.9422	0.6848
5 mole % Zn-HA	0.9394	0.6822
10 mole % Zn-HA	0.9367	0.6809
15 mole % Zn-HA	0.9339	0.6796

2.3.2 Analyse d'infrarouge de transformé de fourier (FTIR) [36] :

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructives fondées sur l'étude de l'absorption (ou la réflexion), par l'échantillon des radiations électromagnétique comprises entre 1 et 1 000 μm . cette bande spectrale est elle-même divisée en infrarouge proche (de 100 000 à 4 000 cm^{-1}), en moyen infrarouge (4000-400 cm^{-1}) et en infrarouge lointain (au-delà de 400 cm^{-1}), la partie la plus riche en Informations et la plus accessible d'un point de vue expérimental est celle du moyen Infrarouge.

Les absorptions dans ce domaine, qui constituent une sorte d'empreinte digitale des composés examinés, permettent de déduire la nature des liaisons et la présence des différents groupements fonctionnels.

•Principe :

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

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

•Résultats et discussions :

Nous avons regroupé les différentes bandes des principaux groupements fonctionnels qui peuvent être attribués à la nature chimique des hydroxyapatite HA, HA-Zn dans le tableau (2.4) et montré par la figure (2.7).

En général, on observe deux bandes caractéristiques pour tous les spectres à 3446.61 cm^{-1} et 1995.96 cm^{-1} qui correspondent respectivement aux vibrations des groupements OH^- et aux harmoniques des groupements phosphates.

Les bandes entre 1035.59-1086.69 cm^{-1} correspondent aux vibrations symétriques des liaisons P-O, et celle à environ 952.66 cm^{-1} aux vibrations antisymétriques. Les bandes entre 562.14-566.96 cm^{-1} représentent les vibrations de déformation des groupements O-P-O. les bandes à 811.88, 1408.75 et 1414.53 cm^{-1} sont assignés au groupement CO_3^{2-} , tandis qu'à 1643.05 cm^{-1} nous avons l'eau. Ces quatre dernières bandes disparaissent après calcination.

Tableau2.4 : les positions des bandes de groupements fonctionnels du spectre FTIR.

échantillons	Nombre d'onde (cm^{-1})				
	PO_4^{3-}	H_2O	CO_3^{2-}	CO_2	OH^-
Zn-HA 0%	562 ; 1035	1640	1409	2330	3446
Zn-HA 5%	567 ; 1037	1638	1411	-	3447
Zn-HA 10%	568 ; 1039	1636	1413	2361	3444
Zn-HA 15%	566 ; 1035	1635	1414	2358	3448
Zn-HA 20%	565 ; 1036	1638	1403	2360	3445
Zn-HA 25%	565 ; 1034	1644	-	-	3442
Zn-HA 40%	567 ; 1041	1643	1402	-	3440

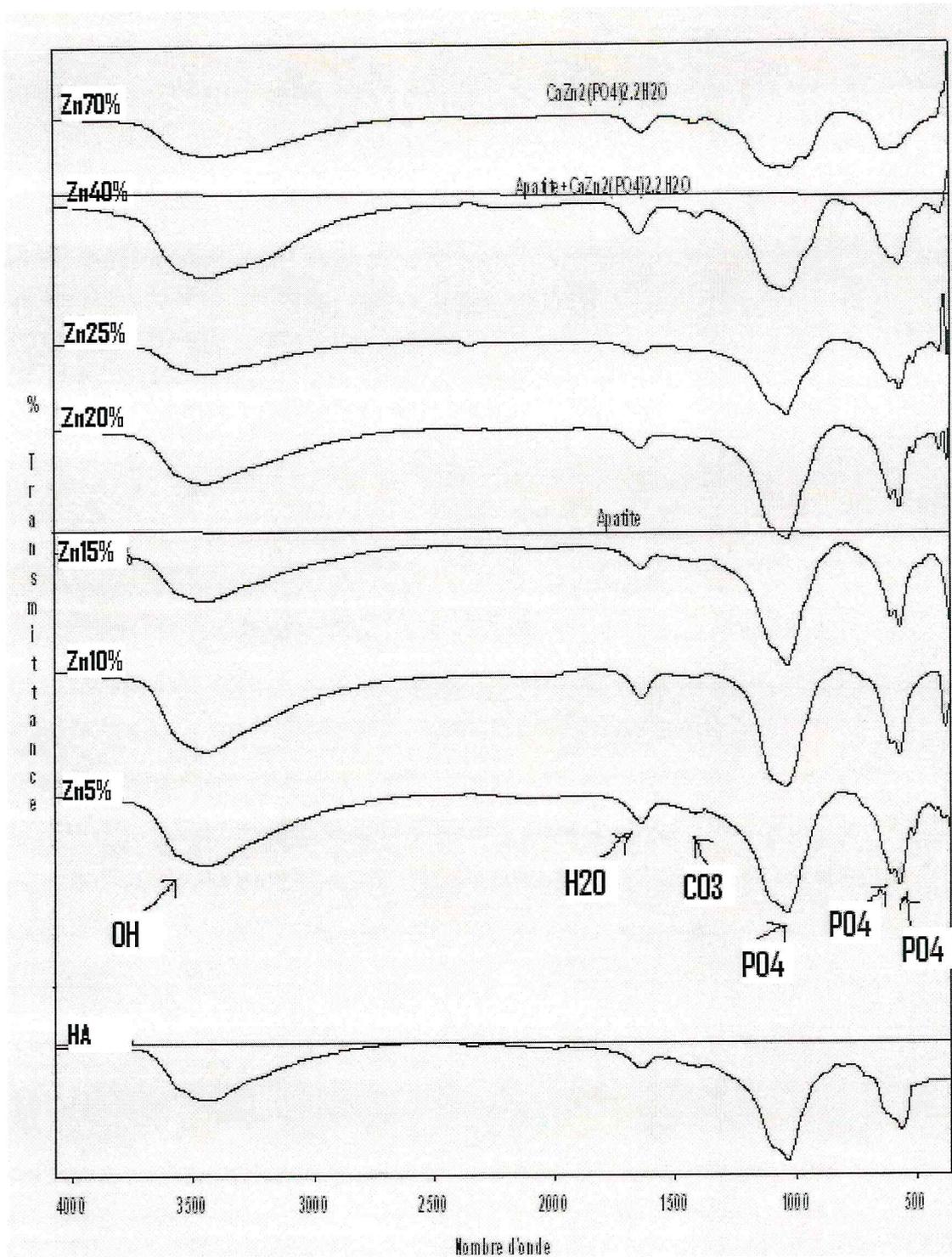


Figure 2.7 : spectre d'absorption FTIR de Zn-HA avec différent fraction en Zn.

2.3. 3 Influence de la calcination sur l'hydroxyapatite :

Les particules d' HA habituellement calcinées à température élevée pour améliorer les propriétés mécaniques, cristallinité et activité mécanique de ce matériau. ce traitement peut influencer la structure et les propriétés de l'HA. Ainsi, l'étude de ce traitement est non seulement importante dans la production de matériaux de l'industrie (catalyse), mais également dans le domaine médical. Il a été établi par Ishikawa et al [37], que la surface d'HA possède plusieurs sites de groupes P-OH agissant en tant qu'emplacement d'adsorption pour différentes molécules comme H₂O et CO₃, et c'est le nombre de groupes de P-OH à la surface qui détermine les diverses propriétés par exemple l'acidité, l'affinité et réactivité et l'activité catalytique.

Le but de cette partie est d'élucider l'influence du traitement thermique (la calcination) sur la structure des HA dopée par différent fraction du Zinc.

• Protocole expérimental :

Les poudres d'HA préparées par la voie aqueuse, ont été soumises à un traitement thermique élevé à 900 °C pendant 1 heure sous air dans un four à moufle (Nabertherm).

La structure des poudres calcinées est déterminée par diffraction des rayons X (DRX, X.TERT).est par FTIR (FTIR-4100, Jasco)

• Résultats et discussions :

La calcination des poudres d'Zn-HA, a causé une perte totale en poids d'environ 34.57% due à l'élimination d'H₂O et de CO₃²⁻.

Les figures (2.8, 2.9., 2.10, 2.11) présentent les diffractogrammes de HA, 5 % Zn-HA, 10 %Zn-HA et 15 %Zn-HA calcinées. En ce référant aux fiches (JCPDS 09-0432).On remarque une deuxième phase (β TCP) qui apparaît lorsque la fraction de Zinc atteint 10 mole%. Cela indique que le Zn-HA est transformé en Zn-TCP après un traitement thermique à température de 900 °C. la figure (2.10) montre la présence de la phase β TCP quand la fraction de Zn atteint la valeur de 10 mole%, les pics de la phase β TCP augmente avec l'augmentation de la

fraction de zinc. En effet, il a été rapporté que l'incorporation de zinc dans la maille de HA influe sur la stabilité thermique de HA.

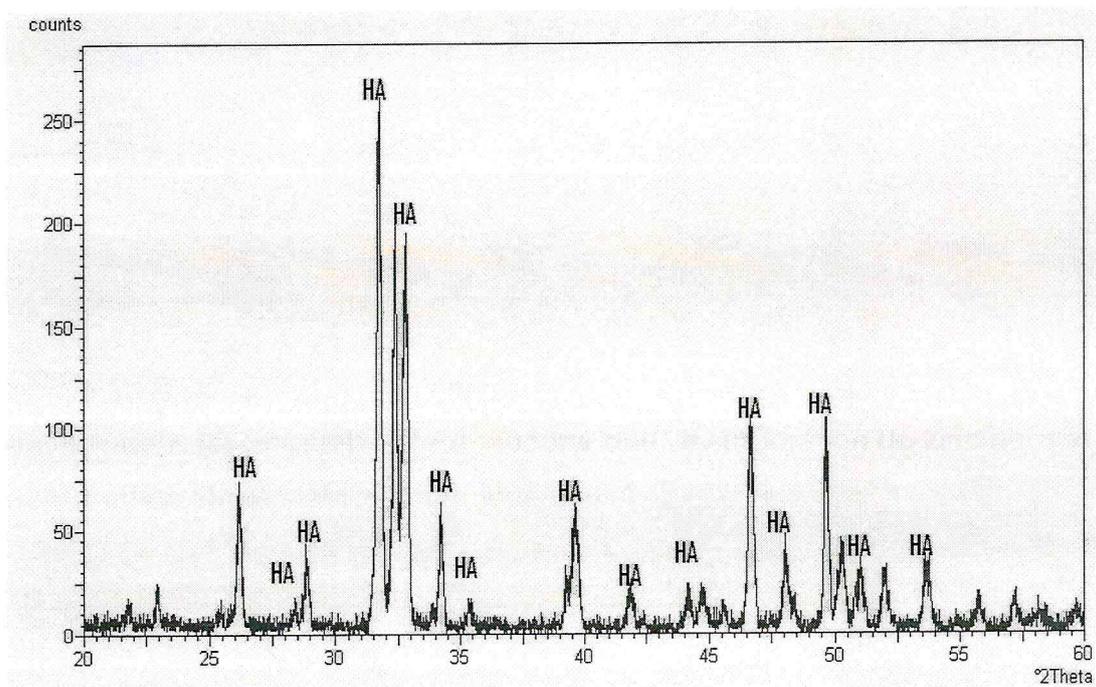


Figure 2.8 : spectre de DRX de HA calciné a 900°C.

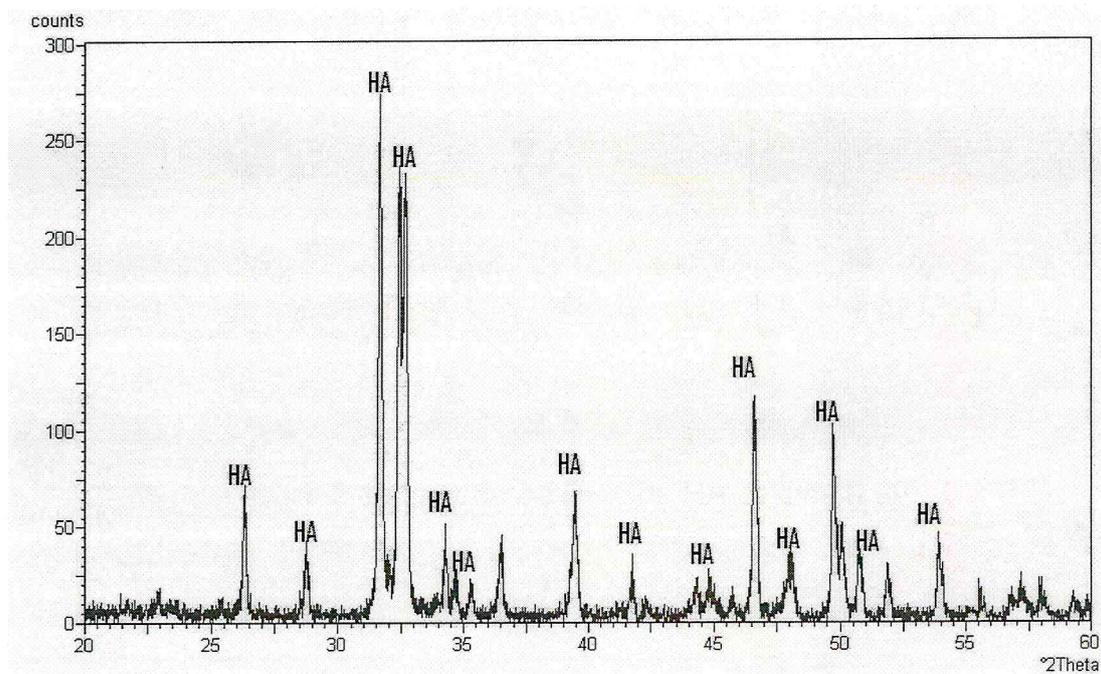


Figure 2.9 : spectre de DRX de 5 mole% Zn- HA calciné a 900°C.

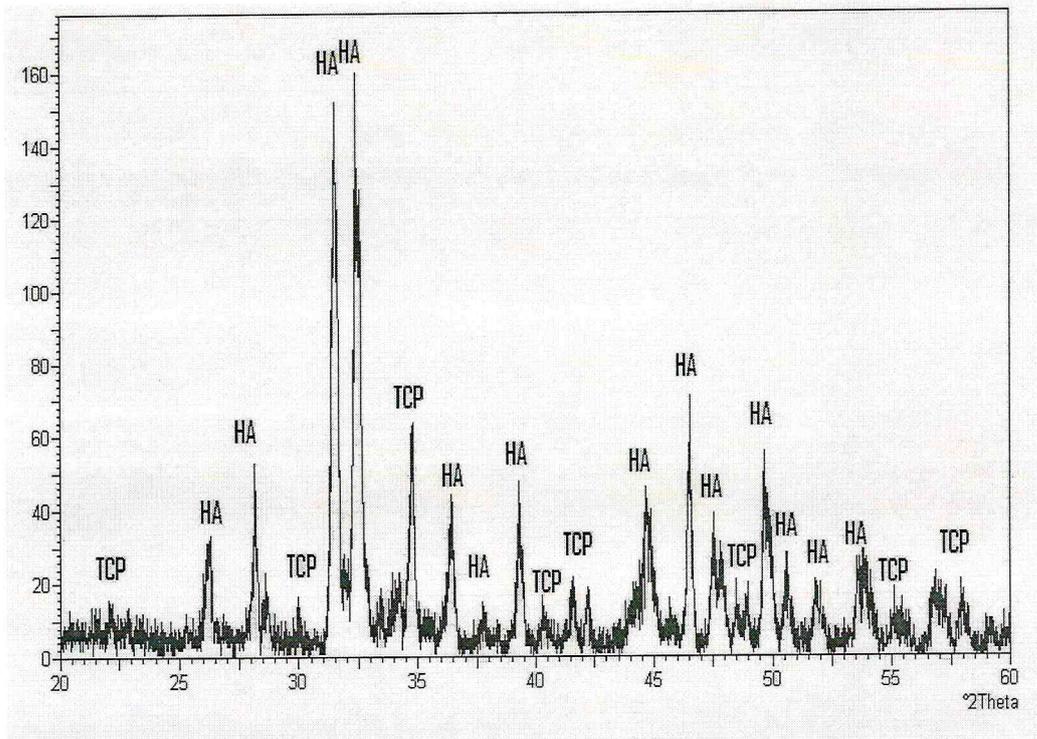


Figure 2.10 : spectre de DRX de 10mole% Zn- HA calciné a 900°C.

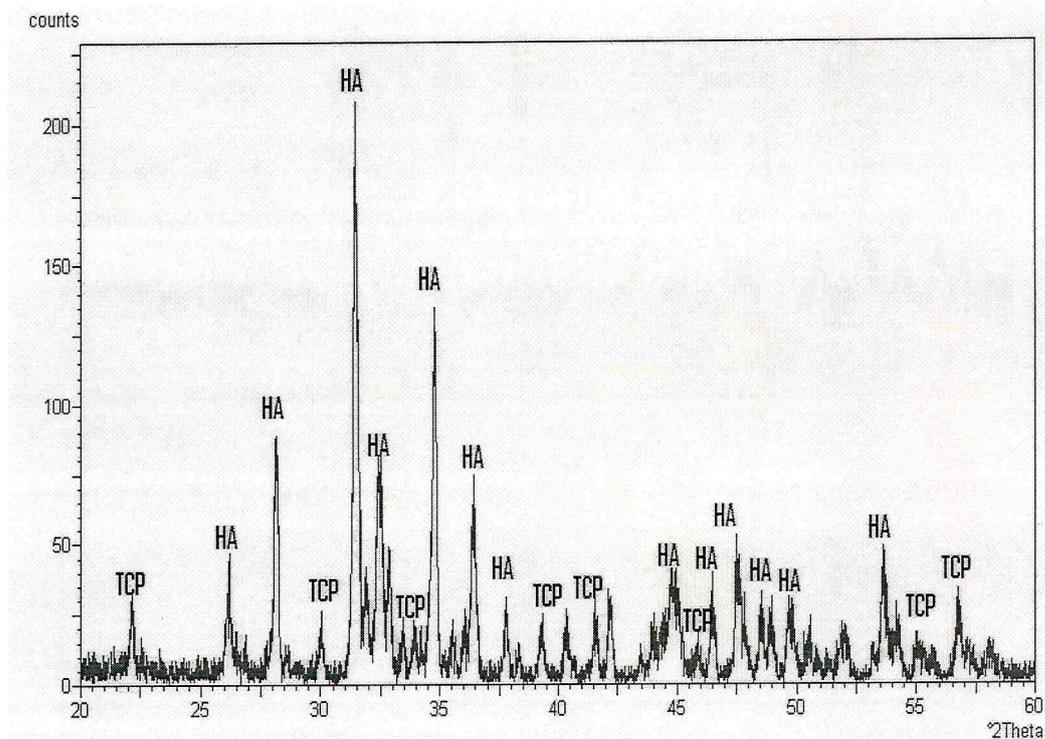


Figure 2.11 : spectre de DRX de 15mole %Zn- HA calciné a 900°C.

Les spectres FTIR des poudres HA et Zn-HA traitées à température élevée sont illustrés dans la figure, et qui ne montrent aucun changement structurel. les bandes autour de 3444 cm^{-1} deviennent plus étroites après le traitement thermique à 900°C . Il en résulte une diminution de la quantité H_2O adsorbée. La disparition du pic à 1414 cm^{-1} est due à la décarbonations sous air à 900°C .

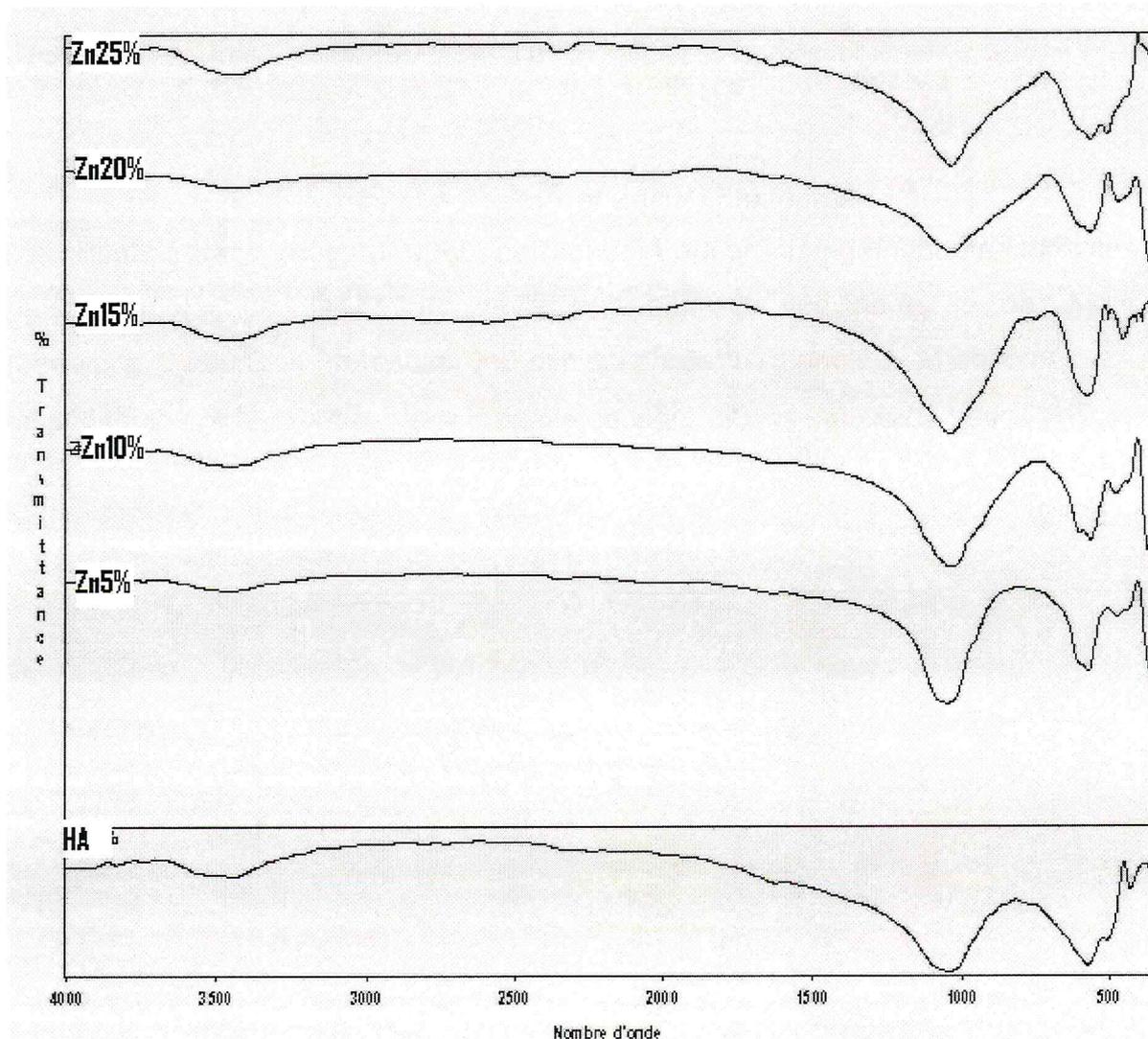


Figure 2.12: Spectre d'absorption FTIR de Zn-HA calciné à 900°C avec différentes fraction en Zn.

2.4 Activité antibactérienne in vitro :

Cette partie décrit le protocole choisi pour mettre en évidence l'activité d'hydroxyapatite dopée par diffusion dans le milieu de culture. Les résultats qualitatifs permettent de sélectionner la souche la plus sensible est pour la détermination de la fraction de Zn dans HA.

2.4.1 Étude qualitative de l'effet antimicrobien d'HA dopée par la méthode de diffusion sur milieu solide :

Cette méthode est la technique choisie pour déterminer l'activité antimicrobienne d'HA dopée . Elle repose sur le pouvoir migratoire d'HA dopée à l'intérieur d'une boîte de pétri, dans un milieu nutritif solide.

- Matériels et méthodes :

a) Les Disques : Sont préparé a partir d'HA sous forme de pastilles. Leurs diamètre est de 9 mm.

b) Les souches : sont choisies pour leur résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens. Les souches bactériennes qui ont été retenues pour ce travail sont celles, provenant de la collection du laboratoire de microbiologie d'Antibiotique-SAIDAL.

La liste des souches utilisées est regroupée dans le tableau suivant :

Tableau 2.5 : Différentes souches microbiennes utilisées.

Nom de la souche	N°ATCC
Escherichia coli	4157
Staphylococcus aureus	29737

c) La concentration bactérienne : des différentes solutions et inoculums est évaluée par la méthode des dilutions et est exprimée par la mesure de la densité

optique (D.O à 620 nm) sur un spectrophotomètre UV Visible (UV mini 1240 Shimadzu).

- Protocole:

Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de pétri. Les disques d'HA dopée stériles de 0.05 mg sont déposés sur gélose inoculée avec les souches. La concentration de la suspension bactérienne est ajustée à 10^7 - 10^8 germes /ml.

Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve 18 heures à 35°C. L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm, à l'aide d'un lecteur spécifique de type Sherly LYLI.

La boîte de contrôle, est une boîte dont le disque déposé au centre de la gélose. Le témoin est une boîte de pétri préparée dans les conditions de l'expérience, sans disques.

- Résultats et discussions :

Les résultats des tests antibactériens sont présentés dans le tableau 2.6. Nous pouvons constater qu'une zone d'inhibition ne dépasse les 9 mm est enregistrée pour l'hydroxyapatite brute pour les deux espèces. Alors que lorsque le zinc est dopé, cette valeur augmente sensiblement.

Le tableau 2.6 : Le résultat du test de la zone d'inhibition.

Bactéries	La zone d'inhibition /mm					
	HA	ZnHA5%	ZnHA10%	ZnHA15%	ZnHA20%	ZnHA25%
E. Coli	9.0	13.9	18.6	18.1	14.2	12.1
S.Aureus	9.0	11.2	11.0	12.0	10.4	10.0

Les zones inhibition correspondant aux fractions de 10 mole% à 15 mole% en Zn semble être meilleur en activité in vitro. Pour tous les cas de figures, les St. Présentent une résistance élevée, voir figure 2.14.

Peut être ceci est expliqué du faite qu' à partir d'une fraction en zinc qui dépasse les 15 mole%, on a une deuxième phase, présente la β TCP.

Aucun effet n'était remarqué pour les échantillons non calciné.

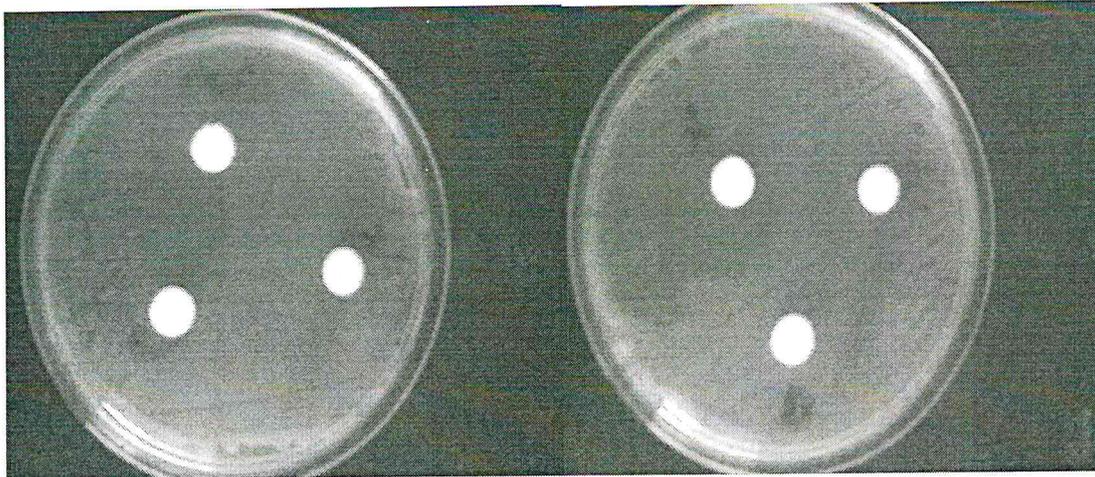


Figure 2.13 : activité bactérien formé à : a) 0 mole% , b) 5 mole% , c) 10 mole% ,d) 15 mole% ,e) 20 mole% et f) 25 mole% Zn-HA non calciné. disk sur G.N plate cultivé par staphy lococcus aureus

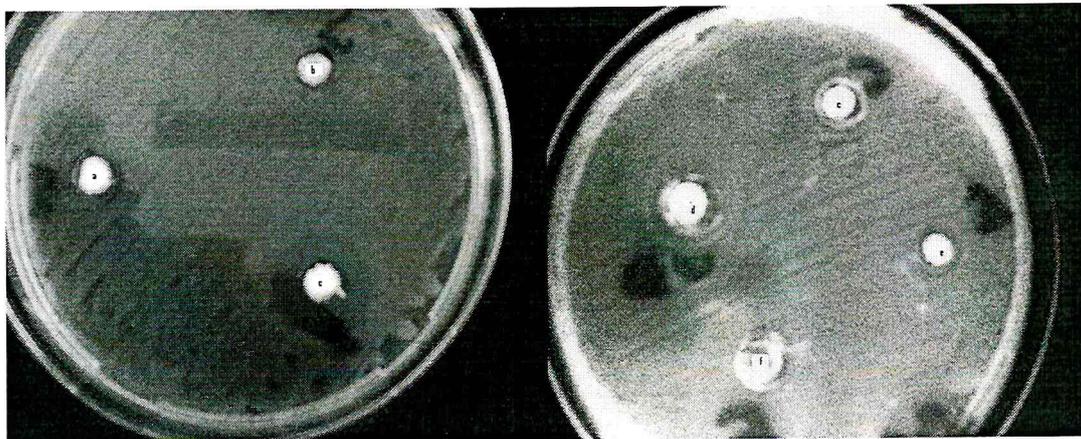


Figure 2.14: la zone d'inhibition bactérien formé à : a) 0 mole% , b) 5 mole% , c) 10 mole% ,d) 15 mole% ,e) 20 mole% et f) 25 mole% Zn-HA calciné. disk sur G.N plate cultivé par staphy lococcus aureus.

CONCLUSION

A l'issue de ce mémoire nous pouvons arrêter les principaux points que nous jugeons concluants:

Nous avons préparé des poudres par la méthode de précipitation sous les conditions spécifiques (pH 8,90 °C) avec succès, en utilisant le $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et ZnCl_2 comme réactifs. Les résultats d'analyse par FTIR et par RDX ont confirmé la formation de deux phases bien distinguées : phase d'apatite et la phase parascholzite.

En effet, lorsque la fraction de Zinc augmente dépassant la concentration de 20 moles%, une nouvelle phase apparaît, dite : la parascholzite ($\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Ainsi, pour garder une phase apatite nécessaire pour un éventuel usage bio-médical recherché, la limite de la substitution de zinc dans l'hydroxyapatite ne doit pas dépasser la valeur de 15 mole%.

Le paramètre de la maille (a, b) diminue à partir de 5 mole% de Zn. La stabilité thermique de l'apatite décroît sensiblement avec le croisement en teneur de Zinc.

En plus, la différence dans le rayon ionique entre Zn^{2+} et Ca^{2+} est décisive de changée le paramètre de la maille.

En fin, l'étude de l'activité antibactérienne sur deux souches pathogène a montré meilleure efficacité contre *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition le plus élevé est 18.6 mm.

En perspective et à titre comparatif, il serait souhaitable de doper l'hydroxyapatite avec d'autres éléments de traces divalent dans l'os tels, Sr^{+2} , Mg^{+2} ou bien le Mn^{+2} . Etudier la cinétique de la biodégradation du produit synthétisé est également intéressant et permettra certainement de déterminer les profils de libération du Zn^{2+} .

REFERENCES

- [1] Atsuo Ito, Haruo Kawamura, Makoto Otsuka, Masako Ikeuchi, Hajime Ohgushi, Kunio Ishikawa, Kazuo Onuma, Noriko Kanzaki, Yu Sogo, Noboru Ichinose. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation *Materials Science and Engineering C* 22 (2002) 21–25),
- [2] Mangele, C. Apeçu des principales technique en vue d'obtention des liaisons céramiques /métal
.Sciences et Médecine (document interne), Janvier 1991.
- [3] Peronneau, Nakache. les biomatériaux ERA/CNRS n°785 et hôpital Broussais.
- [4] Murray EJ, Messer HH. Turnover of bone zinc during normal and accelerated bone loss in rats. *J Nutr* 1981;111:1641–7.
- [5] Bazin D, Chevallier P, Matzen G, Jungers P, Daudon M. Heavy elements in urinary stones. *Urol Res* 2007;35:179–84.
- [6] Bazin D, Carpentier X, Traxer O, Thiaudiere D, Somogyi A, Reguer S, et al. Very first tests on SOLEIL regarding the Zn environment in pathological calcifications made of apatite determined by X-ray absorption spectroscopy.
J Synchrotron Radiat 2008;15:506–9.
- [7] Windisch W. Homeostatic reactions of quantitative Zn metabolism on deficiency and subsequent repletion with Zn in Zn-65-labeled adult rats. *Trace Elem Electrolytes* 2001;18:122–8.
- [8] Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Fosse G, Wesenberg GR. Zinc in primary teeth from children in Norway. *Sci Total Environ* 1999;226:201–12.
- [9] Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, et al. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mater Sci Eng* 2002;C22:21–5.

- [10] Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;50:178–83.
- [11] Jallot E, Irigaray JL, Oudadesse H, Brun V, Weber G, Frayssinet P. Resorption kinetics of four hydroxyapatite-based ceramics by PIXE and neutron activation analysis. *Eur Phys JAP* 1999;6:205–15.
- [12] Bao B, Prasad A, Beck F, Godmer M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 ;285:1095–102.
- [13] Kawamura H, Ito A, Miyakawa S, Layrolle P, Ojima K, Ichinose N, et al. Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora. *J Biomed Mater Res* 2000;50(2): 184–90.
- [14] Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;50(2):178–83.
15. Kay, M.I., Young, R.A., Posner, A.S., « Cristal structure of hydroxyapatite » ; *Nature* 204, pp. 1050-1052, (1964).
16. Montrejaud, M., Rey, C., Trombe, J.C., Montel, G., « Sur l'aptitude du réseau apatitique à fixer des molécules d'oxygène ; Colloques internationaux C.N.R.S., Physico-Chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique », pp. 48 1-486, (1973).
17. Rey, C., Trombe J.C., Montel, G., « Sur la fixation de la glycine dans le réseau des phosphates à structure apatitique » ; *J. Chem. Research*, pp. 2401-2416, (1978).
18. Rey, C., « Etude des relations entre apatites et composés moléculaires » ; Thèse d'Etat I.N.P : Toulouse (1984).
19. Chair, H., « Optimisation de la synthèse en continu des phosphates de calcium », Thèse INP, Toulouse, 1993.
20. Trombe, J.C., « Contribution à l'étude de la décomposition et de la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses », Thèse, Université Paul - Sabatier Toulouse, 1972.
21. Gomez-Morales, J., Torrent-Burgues, J., Boix, T., « Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method », *Crys. Res. Technol.*, 2001, Vol. 36, p. 15-26.

22. Sallek, B., « Les phosphates de calcium, support potentiels de médicaments implantables : Etude de leur mécanisme de dissolution et d'absorption », Thèse, INP, Toulouse 1993.
23. Osaka, A., Miura, Y., Takeuchi, K., Asada, M., Takahashi, K. , « Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid » , J. Mater. Sci. Mater.Med., 1991, vol. 2 p. 5 1-55.
24. Wallaey, R., « Contribution à l'étude des apatites phosphocalciques », Ann. Chim., 1952, vol. 7, p. 808-848.
25. Britel, O., « Possibilités de substitution dans les apatites et défluoration en fonction de la pression par voie thermique de la fluorapatite synthétique et naturelle », thèse de 3ème cycle, Rabat, 1990.
26. Lacout, J.L., « Contribution à l'étude de l'extraction par vapoméallurgie du manganèse et du vanadium des apatites », Thèse INP, Toulouse, 1983.
27. Livage, S., journal of non-crystalline solides, 1992, vol. 145, p.11-19.
28. Santos, M.L. , Florentino, A.O., Saeki, M.J., « Synthesis of hydroxyapatite by sol-gel method using alternative precursors: calcium nitrate and phosphoric acid ». Eclat. Quím., 2005, July/Sept. 2005, vol. 30, n° 3, p. 29-35.
29. Mejdoubi, E., « Elaboration et étude physico- chimique d'un ciment à base de phosphate de calcium », Thèse, INP Toulouse, 1993.
30. Schmitt, M., « Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphates de calcium », Thèse de Doctorat : Université de Nantes, 2000.
31. Browing, E., « Toxicity of industrial metals ». 2^e édition. Butterworths, Londres. p. 348, 1969.
32. Galdes, A. et Vallée, B.L. Categories of zinc metalloenzymes. Metal Ions Biol. Syst., 15: 2, 1983.
33. O'Dell, B.L., « History and status of zinc in nutrition », Fed. Proc., 43: 2821, 1984.
34. Papp, J.P. ,Metal fume fever. Postgrad. Med., 43: 160 , 1968.
35. Prasad, A.S., Brewer, G.J., Schoomaker, E.B. et Rabbani, P. Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. J. Am. Med. Assoc., 240: 2166, 1978.

36. E. BOUYER, F. GITZHOFER, I. BOULOS, J. Mater. Sci., Mater. Med.11 (2000) 523.

37. Hidekazu, T., Masatoshi, C., Kazuhiko, K., Tastsuo, I., « Influence of thermal on the structure of calcium hydroxyapatite », School of chemistry, Osaka University of Education, 4-698-1 Asahigaoka, Kashiwara-Osaka, 582-8582, Japan.

REFERENCES

- [1] Atsuo Ito, Haruo Kawamura, Makoto Otsuka, Masako Ikeuchi, Hajime Ohgushi, Kunio Ishikawa, Kazuo Onuma, Noriko Kanzaki, Yu Sogo, Noboru Ichinose. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation *Materials Science and Engineering C* 22 (2002) 21–25),
- [2] Mangele, C. Aperçu des principales techniques en vue d'obtention des liaisons céramiques / métal
.Sciences et Médecine (document interne), Janvier 1991.
- [3] Peronneau, Nakache. les biomatériaux ERA/CNRS n°785 et hôpital Broussais.
- [4] Murray EJ, Messer HH. Turnover of bone zinc during normal and accelerated bone loss in rats. *J Nutr* 1981;111:1641–7.
- [5] Bazin D, Chevallier P, Matzen G, Jungers P, Daudon M. Heavy elements in urinary stones. *Urol Res* 2007;35:179–84.
- [6] Bazin D, Carpentier X, Traxer O, Thiaudiere D, Somogyi A, Reguer S, et al. Very first tests on SOLEIL regarding the Zn environment in pathological calcifications made of apatite determined by X-ray absorption spectroscopy.
J Synchrotron Radiat 2008;15:506–9.
- [7] Windisch W. Homeostatic reactions of quantitative Zn metabolism on deficiency and subsequent repletion with Zn in Zn-65-labeled adult rats. *Trace Elem Electrolytes* 2001;18:122–8.
- [8] Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Fosse G, Wesenberg GR. Zinc in primary teeth from children in Norway. *Sci Total Environ* 1999;226:201–12.
- [9] Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, et al. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mater Sci Eng* 2002;C22:21–5.

- [10] Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;50:178–83.
- [11] Jallot E, Irigaray JL, Oudadesse H, Brun V, Weber G, Frayssinet P. Resorption kinetics of four hydroxyapatite-based ceramics by PIXE and neutron activation analysis. *Eur Phys JAP* 1999;6:205–15.
- [12] Bao B, Prasad A, Beck F, Godmer M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 ;285:1095–102.
- [13] Kawamura H, Ito A, Miyakawa S, Layrolle P, Ojima K, Ichinose N, et al. Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora. *J Biomed Mater Res* 2000;50(2): 184–90.
- [14] Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;50(2):178–83.
15. Kay, M.I., Young, R.A., Posner, A.S., « Cristal structure of hydroxyapatite » ; *Nature* 204, pp. 1050-1052, (1964).
16. Montrejeaud, M., Rey, C., Trombe, J.C., Montel, G., « Sur l'aptitude du réseau apatitique à fixer des molécules d'oxygène ; Colloques internationaux C.N.R.S., Physico-Chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique », pp. 48 1-486, (1973).
17. Rey, C., Trombe J.C., Montel, G., « Sur la fixation de la glycine dans le réseau des phosphates à structure apatitique » ; *J. Chem. Research*, pp. 2401-2416, (1978).
18. Rey, C., « Etude des relations entre apatites et composés moléculaires » ; Thèse d'Etat I.N.P : Toulouse (1984).
19. Chaair, H., « Optimisation de la synthèse en continu des phosphates de calcium », Thèse INP, Toulouse, 1993.
20. Trombe, J.C., « Contribution à l'étude de la décomposition et de la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses », Thèse, Université Paul - Sabatier Toulouse, 1972.
21. Gomez-Morales, J., Torrent-Burgues, J., Boix, T., « Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method », *Crys. Res. Technol.*, 2001, Vol. 36, p. 15-26.

22. Sallek, B., « Les phosphates de calcium, support potentiels de médicaments implantables : Etude de leur mécanisme de dissolution et d'absorption », Thèse, INP, Toulouse 1993.
23. Osaka, A., Miura, Y., Takeuchi, K., Asada, M., Takahashi, K. , « Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid », J. Mater. Sci. Mater.Med., 1991, vol. 2 p. 5 1-55.
24. Wallaey, R., « Contribution à l'étude des apatites phosphocalciques », Ann. Chim., 1952, vol. 7, p. 808-848.
25. Britel, O., « Possibilités de substitution dans les apatites et défluoration en fonction de la pression par voie thermique de la fluorapatite synthétique et naturelle », thèse de 3ème cycle, Rabat, 1990.
26. Lacout, J.L., « Contribution à l'étude de l'extraction par vapoméallurgie du manganèse et du vanadium des apatites », Thèse INP, Toulouse, 1983.
27. Livage, S., journal of non-crystalline solides, 1992, vol. 145, p.11-19.
- 28.Santos, M.L. , Florentino, A.O., Saeki, M.J., « Synthesis of hydroxyapatite by sol-gel method using alternative precursors: calcium nitrate and phosphoric acid ». Eclet. Quím., 2005, July/Sept. 2005, vol. 30, n° 3, p. 29-35.
29. Mejdoubi, E., « Elaboration et étude physico- chimique d'un ciment à base de phosphate de calcium », Thèse, INP Toulouse, 1993.
30. Schmitt, M., « Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphates de calcium », Thèse de Doctorat : Université de Nantes, 2000.
31. Browing, E., « Toxicity of industrial metals ». 2^e édition. Butterworths, Londres. p. 348, 1969.
32. Galdes, A. et Vallée, B.L. Categories of zinc metalloenzymes. Metal Ions Biol. Syst., 15: 2, 1983.
33. O'Dell, B.L., « History and status of zinc in nutrition », Fed. Proc., 43: 2821, 1984.
34. Papp, J.P. ,Metal fume fever. Postgrad. Med., 43: 160 , 1968.
35. Prasad, A.S., Brewer, G.J., Schoomaker, E.B. et Rabbani, P. Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. J. Am. Med. Assoc., 240: 2166, 1978.