

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

THESE DE DOCTORAT

En Chimie Industrielle

Spécialité : Génie des Procédés

**DOPAGE METALLIQUE DE L'HYDROXYAPATITE : SYNTHÈSE,
CARACTERISATION ET APPLICATION A L'ELIMINATION DES BACTERIES
PATHOGENES**

Par

Houria ALIOUI

Devant le jury composé de :

D.E. HADJ-BOUSSAAD	Professeur, USDB, Blida 1	Président
S. KOUADRI MOUSTEFAI	Professeur, UHB, Chelf	Examinatrice
Y. BOUCHEFFA	Professeur, U.S.T.H.B., Alger	Examineur
O. BENKORTBI	Professeur, U. Médéa	Examineur
A. BADIS	Professeur, USDB, Blida 1	Examineur
O. BOURAS	Professeur, USDB, Blida 1	Rapporteur

Blida, Février 2020

RESUME

Une série d'hydroxyapatites (HAp) dopée et co-dopée avec les cations de zinc et du magnésium a été préparée par précipitation à partir des solutions aqueuses de CaCl_2 , Na_2HPO_4 , ZnCl_2 et MgCl_2 .

Les résultats ont révélé que l'incorporation des cations Zn^{2+} et/ou Mg^{2+} , au moyen d'une substitution isomorphique dans les structures HAp, a été couronnée de succès. L'analyse IRTF a confirmé la présence des bandes caractéristiques attribuées aux modes vibratoires des groupes phosphate et hydroxyle. Les analyses DRX et MEB ont montré que les différents solides préparés à base de plus de 5 % en moles d'ions Zn et/ou de Mg ont été identifiés comme étant des HAp. Cependant, la présence de ces cations métalliques a entraîné une augmentation significative de la taille de leurs cristallites (30 à 50 nm) ainsi que l'apparition d'une seconde phase (scholzite, whitlockite). Les nanoparticules se présentent sous diverses morphologies qui sont semblables à des aiguilles (HAp-Zn, HAp-Mg et HAp-cod Zn/Mg) et à des sphères (HAp non substituée).

Les résultats de l'analyse FRX ont clairement indiqué la présence des éléments Zn, Mg, Ca et P dans les supports HAp-Zn, HAp-Mg et HAp co-dopées (HAp-Zn/Mg) avec un rapport (Ca+M/P) qui varie entre 1.7 et 2.

L'activité antimicrobienne de ces nanopoudres a été testée in vitro contre cinq bactéries (*Escherichia Coli*; *Klebsiella Pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et deux souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus niger*).

Des zones d'inhibitions de tailles 11.33 ± 0.01 mm, 16.33 ± 0.04 mm et de 20.00 ± 0.01 mm contre respectivement les bactéries (Gram négatif, Gram positif) et les champignons ont été obtenues avec (HAp-Zn dopée à 15% en moles de zinc et HAp co-dopées à 10 ou 15% en moles de (Zn+Mg), ce qui démontre l'intérêt thérapeutique de cette nouvelle génération de nanomatériaux.

Mots clés: Hydroxyapatite, dopage métallique, co-dopage, méthode de précipitation par voie aqueuse, activité antimicrobienne.

ABSTRACT

In this study, a series of hydroxyapatites HApS doped and co-doped with two metal cations (zinc and magnesium) has been synthesized by means of the precipitation method using CaCl_2 , Na_2HPO_4 , ZnCl_2 and MgCl_2 aqueous solutions as reagents. The results revealed that the incorporation of Zn^{2+} and/or Mg^{2+} cations by isomorphic substitution into HAp structure was successful. The FTIR analysis showed the presence of the characteristic bands attributed to the vibratory modes of phosphate and hydroxyl groups. The SEM and XRD analyzes showed that the different solids prepared based on more than 10 mol% of Zn and Mg ions were identified as HApS. However, the presence of metal cations caused a significant increase in their crystallite sizes (30–50 nm) along with the appearance of a second phase (scholzite, whitlockite). The nanoparticles come in various morphologies that are needle-like (HApS-Zn, HApS-Mg and HApS-cod Zn / Mg) and spheres like (HAp) and were highly agglomerated.

The XRF spectra indicated the presence of Ca, P, Zn and Mg in the powders prepared with a high Metal/P ratio (1.7–2).

The antimicrobial activity of these nanopowders has been tested in vitro against five bacterias (*Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) and two fungal strains (*Candida albicans* and *Aspergillus niger*). The comparative study of the various in vitro antimicrobial activity tests on pathogenic and fungal bacteria confirms the great affinities of this new generation of nanomaterials (HApS-Zn doped at 15 mol% and HApS co-doped at 10 or 15 % by moles of (Zn+Mg)). The antimicrobial study showed inhibition zones of 11.33 ± 0.01 mm, 16.33 ± 0.04 mm and 20.00 ± 0.01 mm against Gram (-), Gram (+) and fungal, respectively. This demonstrates the therapeutic value of this new generation of nanomaterials.

Keywords: Hydroxyapatite; metal doping; co-doped hydroxyapatite; precipitation method in aqueous; antimicrobial activity.

ملخص

كشفت النتائج أن دمج أيونات الزنك والمغنيزيوم عن طريق الاستبدال المتماثل في هياكل HApس باستعمال طريقة الترسيب في وسط مائي، باستخدام المحاليل المائية $CaCl_2$ و Na_2HPO_4 و $ZnCl_2$ و $MgCl_2$ ككواشف كان ناجحاً في هذه الدراسة.

أكدت التحاليل بالأشعة تحت الحمراء IR عن وجود مجالات خاصة تابعة لمجموعات الفوسفات والهيدروكسيل. أما فيما يخص تحاليل الأشعة السينية DRX ، فقد أظهرت أن المواد الصلبة المحضرة على أكثر من 5 مول٪ من أيونات الزنك و المغنيسيوم او الاثنين معا أنها تحظى بكل مميزات وخصائص HApس. ومع ذلك ، أدى وجود هذه الكاتيونات المعدنية إلى ظهور التزايد في حجم البلورات (من 30 إلى 50 نانومتر) وظهور طور ثانوي و هو (scholzite, whitlockite).

أظهرت صورة المجهر الإلكتروني (MEB) على تنوع أشكال الجسيمات النانومترية فمنها على شكل إبر (HApس-Zn, HApس-Mg) و المشتركة الادماج (HApس-Zn / Mg). ومنها دائرية الشكل (HAp) غير متبادلة.

أشارت نتائج تحليل XRF بوضوح إلى وجود عناصر Zn و Mg و Ca و P في دعامات HApس- و HApس-Zn و Mg و HApس المشتركة الادماج (HApس-Zn / Mg)، مع الحصول على نسبة (Ca+M/P) تتراوح ما بين 1.7 و 2.

تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات لهذه المساحيق النانومترية في المختبر ضد خمسة من البكتيريا (الإشريكية القولونية ، الكلبسيلا الرئوية ، الزائفة الزنجارية ، المكورات العنقودية الذهبية والعصيات الرقيقة) واثنين من السلالات الفطرية (المبيضات البيض والرشاشيات النيجر).

وقد اكدت الدراسة على وجود نشاط ضد ميكروبي ملحوظ وان المستحضرات الجديدة من المواد متناهية الصغر (HApس-Zn) و المشتركة الادماج (HApس-Zn / Mg) بتركيزمولي 15 ٪ ، أن لديها قدرة قوية مضادة بمناطق تثبيط بأحجام تتراوح ما بين 0.01 ± 11.33 مم ، 0.04 ± 16.33 ملم و 0.01 ± 20.00 ملم ضد البكتيريا على التوالي (سلبية الجرام ، ايجابية الجرام) والفطريات، مما يعطيها القيمة العلاجية.

الكلمات المفتاحية : هيدروكسيباتيت HApس، الاستبدال المعدني ، الاستبدال المعدني المتماثل، طريقة الترسيب في وسط مائي، ضد ميكروبي.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout le monde pour m'avoir soutenu afin de réaliser ce travail.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, Monsieur **Omar BOURAS**, Professeur à l'Université de Blida1 pour son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie en plus de son appui scientifique. Il m'a tout le temps soutenu et conseillé au cours de l'élaboration de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Monsieur **Jean-Claude BOLLINGER** de l'Université de Limoges pour m'avoir aidé, pour son soutien permanent, ses aides précieuses et sa disponibilité permanente lors de la rédaction de mon article.

Je tiens à remercier avec la plus grande gratitude Monsieur **Djamel Eddine HADJ-BOUSSAAD**, Professeur à l'Université de Blida1 qui m'a fait un grand honneur de présider le jury de cette thèse et de la juger.

Je suis très honoré de la présence à ce jury de M^{me} **Soumia KOUADRI**, Professeur à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef. Je lui adresse mes remerciements pour sa participation scientifique ainsi que le temps qu'elle a consacré à examiner mon travail.

Que Monsieur **Yucef BOUCHEFFA**, Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie de Houari Boumediène d'Alger, trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de faire partie de ce jury et de juger cette thèse

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **Othmane BENKORTBI**, Professeur à l'Université de Médéa pour l'honneur qu'il m'a fait d'être dans mon jury de thèse.

Je tiens à remercier avec la plus grande gratitude Monsieur **Abdel Malek BADIS**, Professeur à l'Université de Blida1, pour avoir bien voulu participer au jury de cette thèse en qualité d'examineur.

Je n'oublie pas de remercier Monsieur **Yacine BOUTOUMI**, Professeur à l'Université de Blida 1 pour son aide précieuse, ses conseils et son esprit scientifique.

Je remercie mes collègues avec qui j'ai partagé mes études notamment durant toutes ces années de la préparation de ma thèse.

A ma petite famille qui m'a soutenue durant tous ces instants difficiles, pour leurs encouragements et la patience dont ils ont fait preuve et surtout à mes chers parents en témoignage de reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	12
1. BIOMATÉRIAUX	16
1.1. Généralités	16
1.2. Biocéramiques	17
1.3. Phosphates de calcium	18
1.4. Méthodes de synthèse des phosphates apatitiques	29
2. HYDOXYAPATITES SUBSTITUÉES	32
2.1. Hydroxyapatites phosphocalciques substituées d'intérêt biologique	32
2.2. Substitutions isomorphiques des HAp	34
2.3. HAp substituées au Zn (HAp-Zn)	36
2.4. HAp substitués au Mg (HAp-Mg)	43
2.5. HAp co-substituées aux différents ions dopants	46
3. AGENTS ANTIMICROBIENNES ET INFECTIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES	52
3.1. Généralités	52
3.2. Infections bactériennes	52
3.3. Antibiotiques	55

3.4. Bactéries	58
3.5. Infections fongiques	62
3.6. Antifongiques	63
3.7. Antibiogramme	66
4. MATERIEL ET METHODES	71
4.1. Introduction	71
4.2. Synthèse des nanopoudres (HApS)	72
4.3. Diffraction des rayons X (DRX)	75
4.4 Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (IR-TF)	78
4.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)	79
4.6. Fluorescence (FRX)	79
4.7. Souches microbiennes	80
5. RESULTATS ET DISCUSSIONS	86
5.3. Analyse par diffraction de rayons X (DRX)	86
5.2. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de fourier(IR-TF)	93
5.3. Analyse par MEB	98
5.4. Analyse par FRX	101
5.5. Etude de l'activité antimicrobienne	104
CONCLUSION	117
APPENDICES	120
A. LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS	120
B. GLOSSAIRE	122
C. SPECTRES D'IDENTIFICATION (DRX)	123
D. SPECTRES D'IDENTIFICATION (FRX)	127
REFERENCES	137

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 :	Représentation de la structure HAp	24
Figure 1.2 :	Projection sur le plan de base (001) de la maille de l'HAp	25
Figure 1.3 :	Dimension de la macroporosité des biocéramiques (a, b)	26
Figure 1.4 :	Structure microporeuse des parois des biocéramiques (a, b)	26
Figure 1.5 :	Différentes structures de porosité des biocéramiques (a, b)	27
Figure 1.6 :	Porosité d'interconnexion des biocéramiques (a, b)	28
Figure 2.1 :	Structure optimisée de HAp dopée par Zn	41
Figure 3.1 :	Structure d'une bactérie	53
Figure 3.2 :	Composition de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif	54
Figure 3.3 :	Photographies de la souche d'Escherichia coli	59
Figure 3.4 :	Photographies de la souche Klebsiella	59
Figure 3.5 :	Photographies de la souche de P. aeruginosa	60
Figure 3.6 :	Photographie de S. aureus, observé au MP après coloration de Gram	61
Figure 3.7 :	Photographie de Bacillus observé au MP après coloration de Gram.	62
Figure 3.8 :	Mode d'action des antifongiques	64
Figure 3.9 :	Photographies de la souche Candida albicans	65
Figure 3.10 :	Photographie de l'Aspergillus au MP après coloration de Gram	66

Figure 3.11 :	Schéma en coupe d'une gélose Muller-Hinton utilisée pour un AntibioGramme standard	69
Figure 3.12 :	Droite de concordance entre logarithme de la concentration en antibiotique et diamètre de diffusion de l'antibiotique	70
Figure 4.1 :	Schéma représentatif de la synthèse des hydroxyapatites	75
Figure 4.2 :	Schéma représentatif montrant la FWHM	77
Figure 4.3 :	Standards McFarland de turbidité pour la préparation des suspensions de microorganismes	82
Figure 5.1 :	Diagramme DRX de HAp non dopée.	86
Figure 5.2 :	Diagrammes DRX des différents échantillons: HAp non dopés, Zn et Mg-dopés	87
Figure 5.3 :	Diagrammes DRX des différents échantillons: (a) HAp non dopées, Zn et Mg co-dopées HAp ((1): Zn 25% + Mg 75%; (2): Zn 50% + Mg 50%; (3): Zn 75% + Mg 25%)	89
Figure 5.4 :	Spectres IR-TF des différents échantillons à différentes concentrations de HAp dopées : (A) : HAp non dopée et HAp-Zn ; (B) : HAp non dopée et HAp-Mg	94
Figure 5.5 :	Spectres IR-TF des différents échantillons de HAp co-dopées	95
Figure 5.6 :	Images MEB des HAp: (a) non dopé; (b) Zn-HAp 15 mol%; (c) Mg-HAp 15 mol%; (d) HAp co-dopée 15 mol%; (2): Zn 50% + Mg 50%	100
Figure 5.7:	Tests antimicrobiens des contrôles positifs	104
Figure 5.8 :	Activités antimicrobiennes des nanopoudres de HAp	105
Figure 5.9 :	Tests antifongiques des matrices (HAp, HAp-n15% ; HAp-cod 15%)	106
Figure 5.10 :	Photographies de l'activité antimicrobienne des nanopoudres de HAp utilisées (cod 15%, 10% (50% Zn; 50% Mg): contre les bactéries Gram (-) <i>E. coli</i> , (a); bactéries Gram (+) comme <i>Bacillus subtilis</i> (b) et contre les souches fongiques <i>Candida albicans</i> (c) et <i>Aspergillus niger</i> (d)	107
Figure 5.11 :	Mécanisme antibactérien des nanoparticules et de leurs ions métalliques	110

Figure 5.12 :	Effet de différentes concentrations d'ions dopés et co-dopés sur l'activité antibactérienne	113
Figure 5.13 :	Modèle de comparaison Fisher des HAps simples et des HAps dopées en Zn	114
Figure 5.14 :	Modèle de comparaison Fisher des HAps dopées en Mg	115
Figure 5.15 :	Modèle de comparaison Fisher des HAps co-dopées	116
Tableau 1.1 :	Principales orthophosphates de calcium existants et leurs propriétés	19
Tableau 2.2 :	Exemples de substitutions dans la structure apatitique	34
Tableau 3.1 :	Facteurs favorisant l'apparition des résistances bactériennes	58
Tableau 3.2 :	Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme	63
Tableau 3.3 :	Classe des antifongiques	64
Tableau 4.1 :	Différentes quantités de réactifs utilisées dans la préparation d'HAps dopées et co-dopées avec Zn et / ou Mg	74
Tableau 5.1 :	Taille des cristallites et cristallinité des poudres synthétisées	92
Tableau 5.2 :	Position et attribution des bandes d'absorption infrarouge de l'hydroxyapatite	93
Tableau 5.3 :	Résultats des mesures de fluorescence X(FRX) des différentes nano-poudres utilisées.	103

Introduction

Les céramiques d'hydroxyapatites (HAps) sont actuellement considérées comme l'une des classes de matériaux les plus utilisées notamment en biologie et en médecine.

Elles sont utilisées aussi dans les colonnes chromatographiques [1], en tant que catalyseurs nanostructures hétérogènes dans plusieurs réactions d'oxydation dans la protection de l'environnement en éliminant diverses substances polluantes des eaux et/ou des sols pollués [2], ou comme photocatalyseurs dans la destruction des polluants organiques [3].

Ces matériaux constituent également la phase inorganique majeure des tissus humains durs tels que les os et les dents [4,5].

Les HAps synthétiques sont apparus au XIX^{ème} siècle comme matériaux biomédicaux potentiels pour une utilisation dans de nombreux domaines, notamment dans les implants dentaires, les systèmes d'administration de médicaments, la chirurgie maxillo-faciale et orthopédique [6].

Les HAps sont définis en tant que biocéramiques au phosphate de calcium de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dont le rapport molaire Ca/P est égal à 1,67. Ils constituent également les principaux composés d'os naturels, qui contiennent respectivement 50% et 70% d'HAps en volume et en masse [7].

Les ions Ca^{2+} dans les HAps peuvent être remplacés dans certains cas par des ions métalliques divalents de type Zn^{2+} , Mg^{2+} et/ou Pb^{2+} . Cette substitution isomorphe dépend de la charge et en particulier de la taille de l'ion d'impureté [8].

Les HAps sous forme de poudre, à l'échelle nanométrique, sont plus denses et présentent de meilleures propriétés physicochimiques et mécaniques en termes de surface spécifique, de bioactivité et de frittabilité [9].

La présence souhaitable ou préjudiciable d'impuretés dans les HAps peut généralement affecter leurs propriétés physiques. Les ions disponibles et incorporés dans le réseau cristallin ou adsorbés à la surface reflètent la nature complexe du milieu dans lequel les tissus durs se minéralisent ; ils présentent également la souplesse de la structure de l'apatite.

Il a été démontré précédemment que la présence de ces ions dans les os agissait comme un tampon dans le sang et pouvait influencer l'activité de prolifération des ostéoblastes et des ostéoclastes [10-12].

Selon la littérature scientifique, de nombreuses substitutions ioniques ont été effectuées.

Les HAps substituées au Mg ont fait l'objet de nombreuses recherches compte tenu de l'importance du développement des os artificiels et d'autres applications médicales.

Ainsi donc, plusieurs études ont été menées sur la synthèse des HAps seuls et ceux substitués par les cations métalliques de Zn^{2+} ou Mg^{2+} [13]. Malgré sa faible concentration (généralement entre 0,5 et 1,5% en poids), l'ion Mg^{2+} joue un rôle clé dans le métabolisme osseux, en particulier au début de l'ostéogenèse en stimulant la prolifération des ostéoblastes [14].

L'appauvrissement en magnésium affecte tous les stades du métabolisme squelettique en entraînant un arrêt de la croissance osseuse, une diminution de l'activité des ostéoblastes, de l'ostéopénie et de la fragilité des os.

Par ailleurs, les HAps dopées au zinc se sont révélées efficaces dans la l'adsorption des protéines [15]. La co-substitution d'ions dans les HAps offre, toutefois, le potentiel de combiner plusieurs caractéristiques souhaitables des HAps monosubstituées.

Une co-substitution réussie doit être effectuée avec précaution en sélectionnant des ions modèles. C'est pourquoi, dans toute opération de co-substitution on doit tenir compte de l'équilibre de charge ionique, la nature des sites de substitution atomique et la stabilité de phase et l'impact biologique potentiel [16].

Les données de la littérature ont confirmé que le co-dopage de nanopoudres HAps en présence de cations tels que ceux de Zn^{2+} et/ou Mg^{2+} joue un rôle important dans la performance biologique de l'os [17].

Les matériaux HAps substitués par le Mg devraient présenter une biocompatibilité et des propriétés biologiques excellentes. En effet, les céramiques HAps-Mg ont été proposées pour une utilisation dans des applications orthopédiques et dentaires [18].

Selon Gopi et al. [19], le zinc est également essentiel au maintien d'une bonne santé du système immunitaire qui est indispensable à la protection du corps contre les bactéries et les infections.

Ainsi donc, l'introduction d'ions métalliques dans la structure de l'hydroxyapatite est étudiée depuis longtemps dans le but d'examiner le changement de la structure et de la cristallinité de ces matériaux ainsi que les interactions avec la culture microbologique. A ce jour, il n'y a pas eu d'études complètes sur ce sujet et c'est pourquoi nous nous proposons ce travail de recherche.

Aussi, l'objectif principal de ce travail de thèse est de préparer et caractériser une nouvelle génération d'hydroxyapatites dopées et co-dopées avec des ions Zn^{2+} et/ou Mg^{2+} . L'un des objectifs clé de cette étude est d'établir également la quantité de cations à substituer (Zn^{2+} et/ou Mg^{2+}) dans l'hydroxyapatite afin d'étudier l'efficacité des poudres synthétisées comme agents antimicrobiens.

En suivant cette approche, le présent travail est structuré de la manière suivante :

- ❖ La première partie sous forme d'un chapitre est relative aux généralités sur les biomatériaux en termes de définitions et de procédés de synthèse.
- ❖ La deuxième partie regroupe deux chapitres : l'un consacré à une étude bibliographique sur les hydroxyapatites substituées et un second chapitre résume les généralités sur les infections bactériennes, fongiques et d'agents antimicrobiens.
- ❖ La troisième et la dernière partie traite en deux chapitres le volet expérimental et portera essentiellement sur:
 - La méthode de synthèse et la caractérisation des matrices dopées (HAps-Zn, HAps-Mg) et co-dopées (HAps-Zn/Mg).
 - Les tests in vitro (antibiogrammes) de tous les échantillons préparés ainsi que l'étude de leurs effets possibles sur l'activité antimicrobienne.et le chapitre discussion et interprétation des résultats expérimentaux obtenus.

CHAPITRE 1

LES BIOMATÉRIAUX

1.1. Généralités

La science des matériaux biomédicaux ou la science de la compréhension et du développement des «biomatériaux» a fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques passionnantes et enrichissantes dans le domaine de la science des matériaux.

Actuellement, on définit un biomatériau comme étant une substance qui a été conçue pour prendre une forme seule ou dans le cadre d'un système complexe lequel est utilisé pour diriger le contrôle des interactions avec les composants des systèmes vivants [20].

Compte tenu du vieillissement croissant de la population, il y a eu, ces dernières années de nombreuses maladies dûes à la fragilité des os et dont le traitement consiste à l'incorporation des implants biocompatibles.

Pour garantir qu'un implant puisse fournir la fonction souhaitée, sa longévité et son efficacité avec succès, il est essentiel de choisir un biomatériau adapté à l'application proposée. Les biomatériaux solides sont classés en tant que biométaux, biopolymères, biocéramiques ou biocomposites.

A noter que l'hydroxyapatite est un phosphate de calcium utilisé principalement pour ses excellentes propriétés ostéo-conductrices [21].

1.2 Les biocéramiques

Grâce à leurs caractéristiques spécifiques, les céramiques se sont rapidement imposées comme matériaux de comblement osseux. Historiquement, ce sont les alumines, en tant que céramiques de première génération les plus inertes qui furent utilisées [22].

Au-delà de leur biocompatibilité avérée, ils se sont confrontés à l'apparition d'une enveloppe fibreuse juste à l'interface de l'implant et de l'os (encapsulation) empêchant ainsi une fixation adéquate (interruption des propriétés biologiques et mécaniques). C'est pourquoi, de nombreuses recherches se sont alors orientées vers d'autres types de matériaux capables de consolider cette liaison biologique entre le tissu osseux et l'implant afin de favoriser le métabolisme tissulaire, ce fut l'avènement des matériaux dits bioactifs.

Le mécanisme de fixation du tissu est directement lié au type de réponse tissulaire à l'interface de l'implant où aucun matériau implanté dans les tissus vivants n'est inerte ; tous les matériaux provoquent une réponse des tissus vivants.

Dans ce contexte, quatre types de réponses à l'attachement des prothèses au système musculo-squelettique sont identifiées [23] :

- Si le matériau est toxique, le tissu environnant meurt ;
- Si le matériau est non toxique mais biologiquement inactif (presque inerte), il se forme un tissu fibreux de forme et d'épaisseur variable ;
- Si le matériau est non toxique mais biologiquement actif (bioactif), il se forme une liaison à l'interface ;
- Si le matériau est non toxique, il se dissout et le tissu entourant le remplace (biorésorbable).

1.3. Phosphates de calcium

1.3.1. Généralités

Les phosphates de calcium (CaP) constituent un groupe de minéraux contenant des ions calcium (Ca^{2+}) ainsi que des ortho phosphates (PO_4^{3-}), méta phosphates ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) et occasionnellement des ions hydrogène ou hydroxyde.

Selon leurs compositions, la grande majorité des phosphates de calcium synthétiques sont classés comme

- Phosphates tricalciques α et β (TCP) : $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.
- Phosphates de calcium biphasiques (BCP), qui sont un mélange de α -TCP ou de β -TCP avec HAp.
- HAp : $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$.
- Phosphates de calcium amorphes [24, 25].

La première tentative d'utilisation des phosphates de calcium pour des applications cliniques consistait à utiliser un matériau artificiel pour réparer chirurgicalement des défauts osseux chez le lapin en 1920. Néanmoins, leurs utilisations et leurs applications orthopédiques chez l'homme ne se sont manifestées qu'au début des années 1970 [25].

En essayant de remplacer les matériaux métalliques dominants à l'époque, l'attention principale était de les remplacer par d'autres matériaux à base de céramiques se caractérisant par des propriétés favorables en termes d'intégration osseuse, de fonctionnalité, de résistance mécanique et/ou chimique.

Le tableau 1.1 présente une liste des ortho-phosphates de calcium connus ainsi que leurs principales propriétés en termes de formule chimique, de solubilité et de stabilité chimique.

Tableau 1. 1 : Principales propriétés des ortho-phosphates de calcium [25].

Rapport molaire $r = (Ca/P)$	Composé	Formule	pH de stabilité chimique (dans les solutions aqueuses à 25 °C)	Solubilité à 25 °C (g/L)
0.5	Phosphate monocalcique monohydrate	$Ca_2(H_2PO_4).H_2O$	0.0 - 2.0	~18
0.5	Phosphate monocalcique anhydre	$Ca_2(H_2PO_4)$	Stable à des températures supérieures à 100 ° C	~17
1.0	Phosphate dicalcique dihydraté, bursite minérale	$CaHPO_4.2H_2O$	2.5 - 6.0	~0.088
1.0	Phosphate di-calcique anhydre, monétite minérale	$CaHPO_4$	Stable à des températures supérieures à 100 ° C	~0.048
1.33	Phosphate d'octacalcium (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4).5H_2O$	5.5 - 7.0	~0.0081
1.5	Phosphate tricalcique β (β -TCP)	$\beta-Ca_3(PO_4)_2$	Pas de précipités à partir de solutions aqueuses	~0.0025
1.5-1.67	Hydroxyapatite carencée en calcium (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x.(PO_4)_{6-x}(OH)_2$	6.5 - 9.5	~0.0094
1.67	Hydroxyapatite	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$		~0.0003

Les phosphates de calcium se forment selon le processus de frittage (1100-1250 °C) [26], au cours duquel des structures amorphes ou cristallines se forment. Les conditions de frittage et de stœchiométrie de la réaction peuvent dicter le type, la structure et la composition du CaP final.

Ainsi donc, le rapport Ca/P de 1.5 favorise la formation de la phase TCP alors que le matériau HAP est obtenu à un rapport de 1,67 [27].

Par ailleurs, un rapport ($1.5 < Ca/P < 1.67$) entraîne la formation du composé CaP à partir d'un mélange biphasique des deux phases TCP et HAP.

La solubilité de ce CaP peut également déterminer le type d'application pour lequel il peut être utilisé. Il dépend, à la fois, de la nécessité d'une phase résorbable et d'une phase non soluble [27].

1.3.2. Phosphates tricalciques (TCP)

Comparé à l'hydroxyapatite HAp, le phosphate tricalcique (TCP) de formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ se caractérise par un rapport Ca/P inférieur à 1.67, d'une faible stabilité chimique et d'une plus grande solubilité.

Cette phase est thermodynamiquement stable mais uniquement à très hautes températures (1000-1500 °C).

Les phases α - et β -TCP ont des propriétés légèrement différentes. En effet, elles ont toutes les deux une composition chimique identique mais des propriétés cristallographiques différentes.

La phase α -TCP qui est la moins stable se caractérise par des taux de solubilité et de dégradation qui restent supérieurs à ceux de la phase β -TCP [22].

1.3.3. Hydroxyapatites (HAp)

1.3.3.1. Généralités

Le mot «Apatite» désigne tout composé minéral de formule générale **$\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$** où Me représente un cation bivalent (Ca^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}), XO_4 est un anion trivalent (PO_4^{3-} , VO_4^{3-} , AsO_4^{3-}) et Y est un anion monovalent (OH^- , F^- , Cl^-).

Néanmoins, les propriétés physico-chimiques de l'apatite phosphatée dépendent de la prédominance du fluor, du chlore ou des espèces hydroxylées dans la structure cristalline.

Ainsi, en fonction du type de l'anion Y, on distingue trois minéraux: l'hydroxyapatite (HAp), la fluorapatite (FAp) et la chlorapatite (ClAp) de formules chimiques respectives $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ et $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$.

En plus de leur forme minéralogique, les apatites phosphatées peuvent exister sous forme de céramiques biologiques.

La formation des HAp solides à partir de solutions aqueuses a été largement étudiée par de nombreux chercheurs au cours des années 90 afin de répondre au triple objectif suivant:

- Compréhension des phénomènes naturels dans les étangs,
- Traitement des eaux usées, [28]
- Obtention de matériaux de substitution destinés à la réparation des dents ou des os [29, 30].

La préparation de sels inorganiques par la méthode de précipitation est bien connue depuis le XIX^{ème} siècle. La formation de tels composés légèrement solubles à partir de solutions sursaturées semble théoriquement simple, même lorsque plusieurs solides isomorphes se forment simultanément : c'est le cas des systèmes binaires (Ca/PO₄) ou (Ca/CO₃) [31].

La thermodynamique suggère une règle empirique stipulant qu'une solution sursaturée en un constituant entraîne la formation d'un composé se caractérisant par la solubilité la plus élevée (règle dite "Ostwald-Gay Lussac").

Le processus réel est plus compliqué du fait que les divers solides isomorphes peuvent subir une série de réactions d'échange solide/liquide [31,32].

On parle de "maturation d'Ostwald" lorsque la cinétique est régulée par la tension interfaciale solide/liquide [33] et après une période de vieillissement suffisante de l'espèce précurseur, il y aura la formation de la phase solide la plus stable [34].

L'effet de l'introduction d'autres cations divalents (alcalino-terreux ou éléments de transition) pour remplacer une partie des ions Ca²⁺ dans les structures des HAps [35] a été quelque peu controversé à cause de l'inhibition de la formation des HAps et/ou de l'amélioration de leurs propriétés mécaniques. C'est pourquoi, plusieurs autres articles se sont intéressés à la synthèse et à la caractérisation structurale des HAps dopées au Mg ou au Zn [36,37].

Matsunaga [38], a effectué des calculs théoriques afin d'expliquer le comportement des substitutions ioniques isomorphiques par les ions Mg²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Sr²⁺, Cd²⁺, Ba²⁺ et Pb²⁺. Par la suite, ils se sont concentrés sur les HAps substituées aux cations de Mg et Zn.

Oukerroum et ces collaborateurs [39] ont synthétisé des matériaux de composition $\text{Ca}_{10-2x}\text{Ag}_x\text{Al}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ par précipitation en milieu basique. Les phases apatitiques pures ne sont obtenues que dans le domaine de composition $0 \leq x \leq 0,4$. Il a été montré que les paramètres cristallins diminuent avec l'augmentation de la teneur en aluminium et en argent, où les ions se localisent préférentiellement dans les sites Ca(I) du réseau apatitique.

Laquerriere et al. [40] ont préparé des particules de natures différentes en termes de taille, de forme, de température de traitement et de composition chimique. Ces auteurs ont constaté que la réponse cellulaire est due principalement aux monocytes/macrophages comme étant les premières cellules à coloniser le site inflammatoire. En effet, les particules sous forme d'aiguilles induisent une plus grande production de médiateurs de l'inflammation qui sont plus toxiques pour les cellules. Toutefois, la température de traitement semble être moins importante même si elle joue un rôle important dans les processus de dissolution/précipitation.

A ce jour, seules de très rares études élaborés par Gopi et Kaygili ont été publiées sur le dopage des nanoparticules d'HAps par les ions de Mg et Zn [41, 42].

1.3.3.2. Structure stœchiométrique des HAps :

L'hydroxyapatite phosphocalcique stœchiométrique de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ a une composition théorique massique de 39.68 % de Ca, 18.45 % de P, et un rapport molaire r ($r = \text{Ca}/\text{P}$) égale à 1.67.

Comme le montre la figure 1.1, la matrice HAp cristallise selon un système hexagonal avec un groupement spatial ($P6_{3/m}$) de symétrie notés « I » et « II », perpendiculaires au plan (001)). Le tunnel de type « I » de diamètre égal à environ 2,5 Å est occupé par des cations Me (I).

Dans le cas de la structure HAp, les sites des cations Ca(I), qui sont au nombre de quatre par maille sont placés sur les axes ternaires et sont entourés de neuf atomes d'oxygène dans un système hexagonal (de groupe spatial $P6_{3/m}$).

Pour l'hydroxyapatite stœchiométrique (sans substitution ou lacune), ces paramètres cristallographiques de maille a , c et β sont respectivement égaux à 9.418 Å, 6.884 Å et 120°. Le volume de la maille est égal à 528.80 Å³ (données extraites de la fiche ICDD-PDF 9-432).

La structure apatitique accepte un grand nombre de substituant. Ainsi donc, les cations bivalents (Me^{2+}) peuvent non seulement être remplacés par des cations bivalents (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+}), mais également par des cations monovalents (Na^+ , K^+) ou trivalents (La^{3+} , Ga^{3+} , Eu^{3+}). De même, les anions XO_4^{3-} trivalents peuvent être remplacés par des groupements bivalents (CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}) [43], trivalents (AsO_4^{3-} , VO_4^{3-}) ou tétravalents (SiO_4^{4-}) [44]. Enfin, les groupements Y^- peuvent également être substitués par des ions monovalent (F^- , Cl^-) ou bivalents (CO_3^{2-} , O^{2-} , S^{2-}).

Toutefois, des mécanismes de compensations de charges apparaissent lors des substitutions ioniques afin de conserver l'électroneutralité impliquant des modifications structurales et la création de lacunes dans la maille.

A noter que contrairement aux sites Me et Y, aucune apatite renfermant des lacunes sur les sites XO_4 n'a été décrite. Les tétraèdres XO_4 définissent le squelette de la structure apatitique [45].

La structure cristallographique de la maille d'hydroxyapatite est exposée dans la (figure 1.1).

La maille cristalline présente deux types de tunnels tous le long de l'axe C, la ligne noire connecte les colonnes Ca(I) dans des réseaux hexagonaux et les triangles cylindrique et magenta relie des atomes de Ca (II) décalés situés dans le même plan, mais à une hauteur différente par rapport à l'axe C [46]).

L'hydroxyapatite (HAp) de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ est l'une des formes les plus répandues du phosphate de calcium. Elle appartient à une grande famille de composés isomorphes.

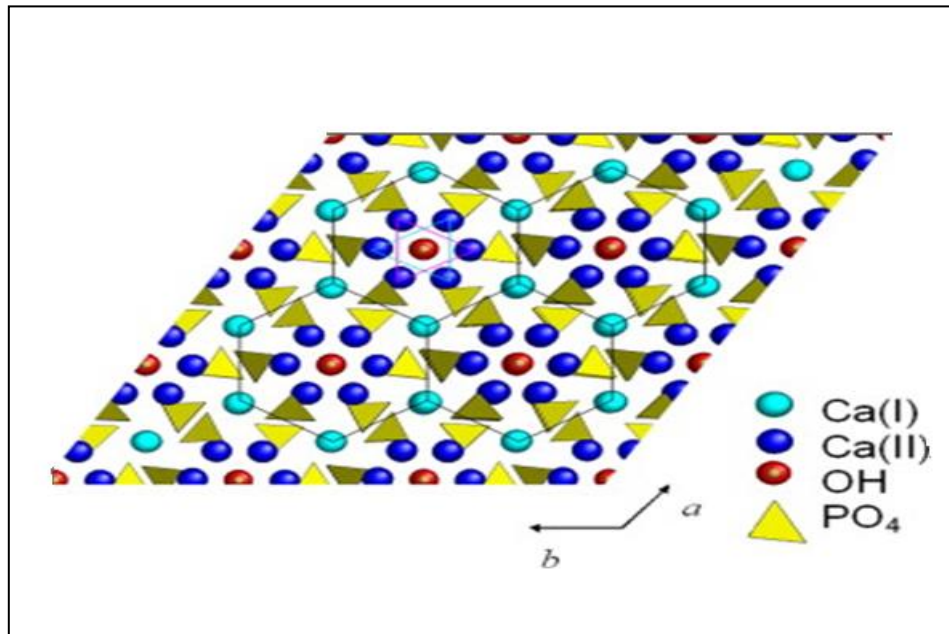


Figure 1.1: Représentation de la structure de la matrice HAp [46].

La structure cristallographique de l'hydroxyapatite (figure 1.2) consiste en un empilement de groupements phosphate qui forment deux types de tunnels parallèles à l'axe c :

- Tunnel 1 dont l'axe coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Les tunnels correspondants sont occupés par des ions calcium notés Ca(I).
- Tunnel 2 dont l'axe coïncide avec celui du sénéaire hélicoïdal du réseau. Il 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 les HAp) confère aux apatites des propriétés d'échangeurs d'ions et d'accepteur de petites molécules (O_2 , H_2O , glycine) [47,48].

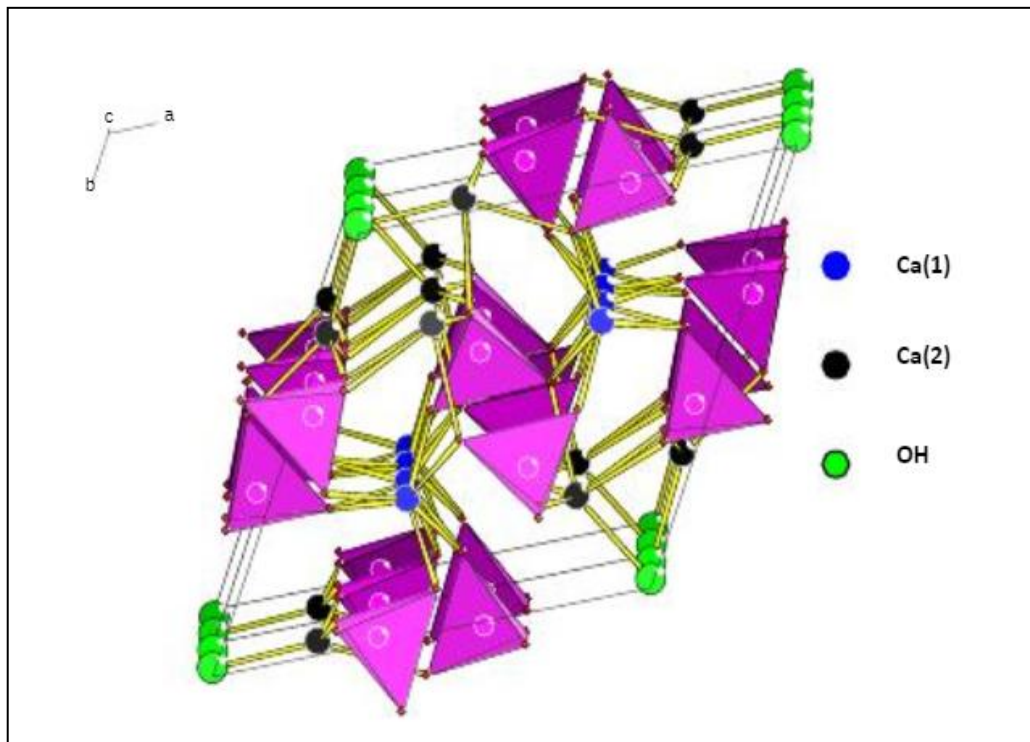


Figure 1.2 : Projection sur le plan de base (001) de la maille de l'hydroxyapatite [49].

1.3.3.3. Propriétés physico-chimiques

➤ Porosité

Selon les conditions de préparation, deux types de porosité coexistent au sein des biocéramiques 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 (figure.1.3 a, b).

➤ Microporosité

Elle correspond aux espaces existant entre les cristaux de la céramique de taille réduite (1 à 10 μm de diamètre). Ces espaces ne peuvent être colonisés par les cellules et seuls les fluides biologiques y diffusent. (figure1.4 a, b).

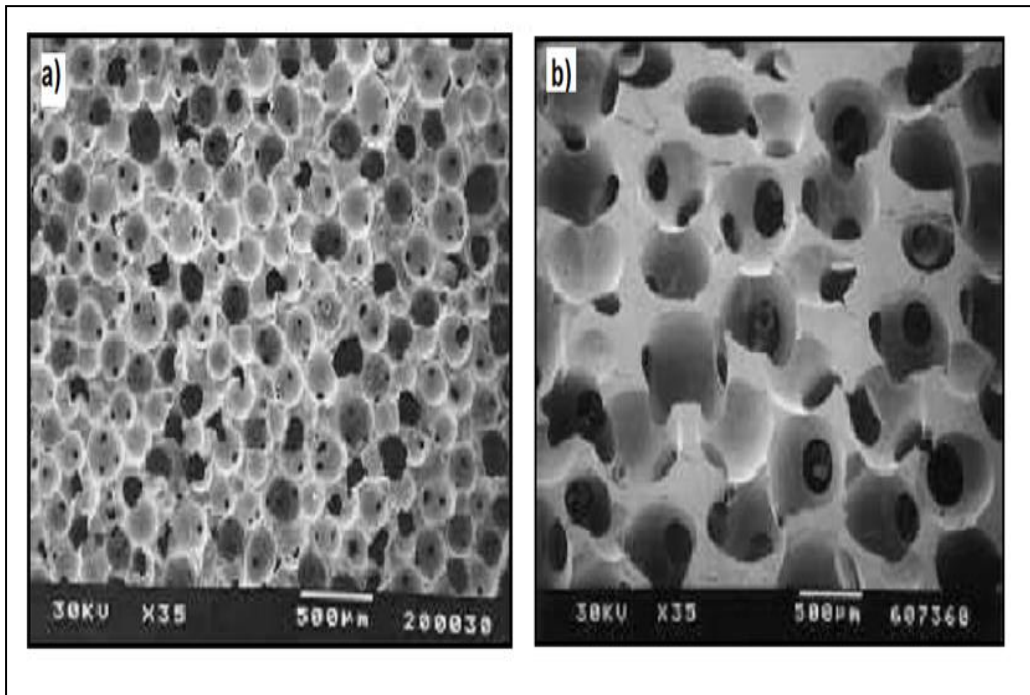


Figure 1.3 : Dimension de la macroporosité des biocéramiques de phosphate de calcium :

(a) 200-300 μm , (b) 500-700 μm).

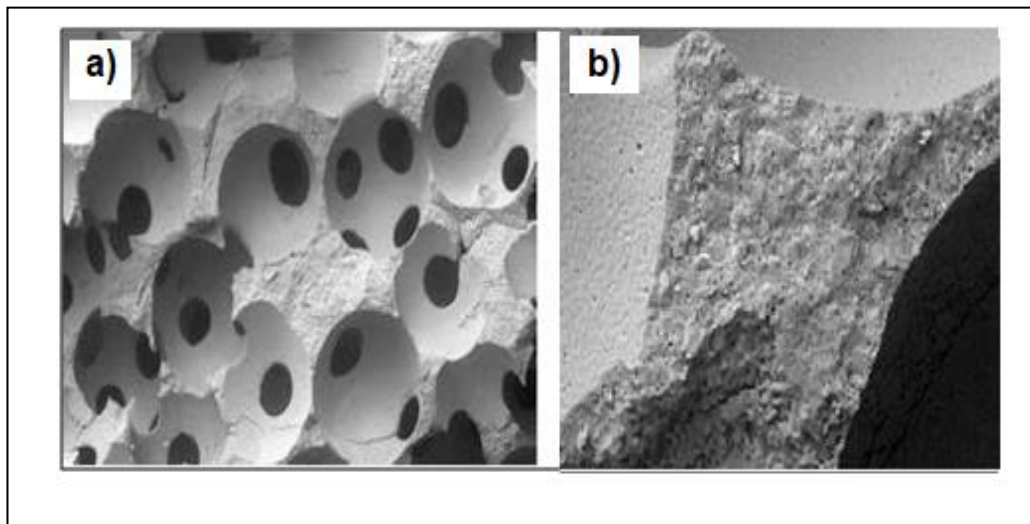


Figure 1.4 : Structure microporeuse des parois des biocéramiques de phosphate de calcium (a): 10 μm , (b) : 1 μm) [50].

Il existe au sein des biocéramiques de phosphate de calcium un gradient de porosité variable (figure. 1.5. a, b).

En effet, une augmentation de la surface d'échange entre la biocéramique et le milieu biologique entraîne une augmentation de la porosité, solubilité ainsi que l'activité biologique.

Toutefois, une macroporosité élevée peut altérer les propriétés mécaniques de la biocéramique et limiterait donc son utilisation uniquement 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 suffisante et donc une bonne colonisation osseuse, tout en maintenant une résistance mécanique compatible pour une utilisation en chirurgie parodontale. Une étude récente a montré, en effet, une macroporosité de 40 % avec des macropores de l'ordre de 565 μm constitue un bon compromis.

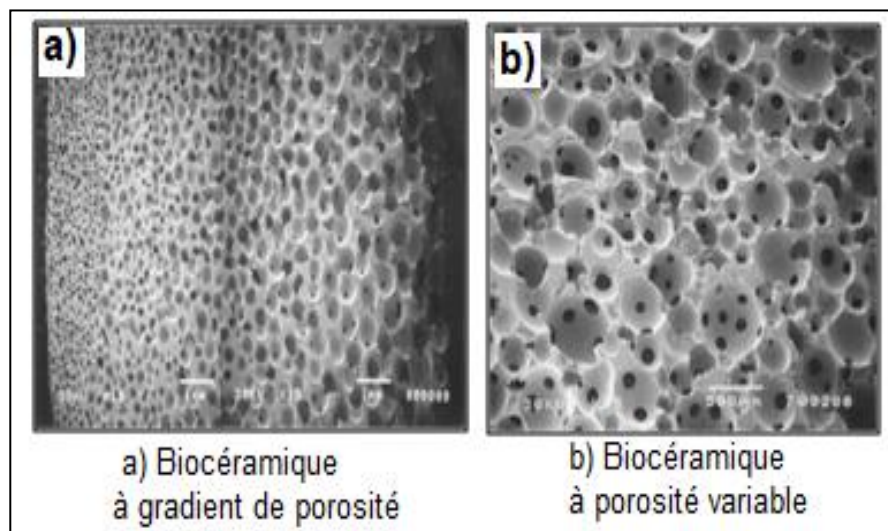


Figure 1.5 : Différentes structures de biocéramiques à porosités différentes.

➤ 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 biocéramique. (figure 1.6 a, b).

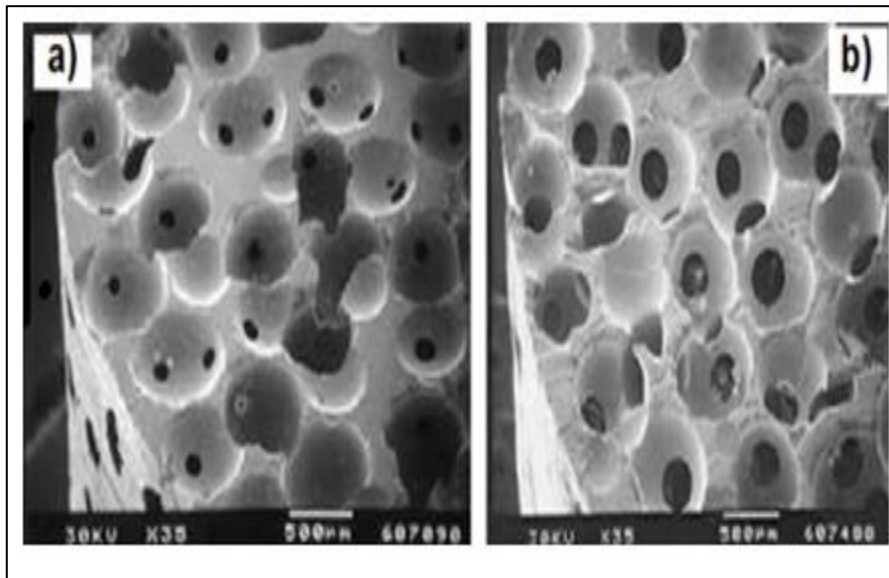


Figure 1.6: Porosité d'interconnexion de biocéramique
(a : interconnexion 100 μ m, b : interconnexion 260 μ m) [50].

Les phosphates de calcium présentent deux propriétés biologiques principales :

- (1) Biocompatibilité
- (2) Bioactivité

➤ Biocompatibilité

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

À l'inverse des matériaux d'origine biologique, tout risque est exclu dans la transmission d'éléments pathogènes ou de contamination par des éléments toxiques.

D'autre part et en raison de leur composition très proche de celle de l'os, les céramiques phosphocalciques sont biocompatibles comme cela a pu être démontré antérieurement (in vivo), en site osseux ou extra osseux [50].

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 bioactif.

➤ Bioactivité

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 vivants,
- Modifications biologique du matériau,
- Facteurs de bioactivité

1.4. Méthodes de synthèse des phosphates apatitiques

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,
- la méthode hydrothermale.

Les phosphates de calcium qui sont habituellement décrits par leurs rapports molaires Ca/P peuvent apparaître sous différentes formes : hydrates, hydroxydes ou anhydres.

➤ Réactions en phase aqueuse

La synthèse en phase aqueuse se fait 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 [50].

La méthode par double décomposition [51-53] consiste à effectuer les opérations suivantes :

- Mélange d'une solution de sel de cation Me avec une solution de sel de l'anion contrôlée XO_4 .
- Lavages successifs du précipité
- Séchage et conservation

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 afin d'éviter une ségrégation lors de la précipitation.

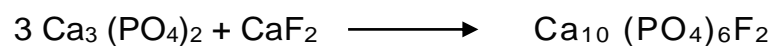
La réaction permet d'obtenir rapidement de grandes quantités d'hydroxyapatite phosphocalcique [54]. Cette méthode permet également de synthétiser des fluorapatites.

Les principaux inconvénients de cette méthode sont liés à sa mise en œuvre qui nécessite beaucoup de matériel et la lenteur de la vitesse de synthèse.

➤ Réactions en phase solide

La synthèse par réaction solide-solide consiste à chauffer un mélange réactionnel, constitué de divers sels de cations et d'anions, dans un rapport Me/ XO_4 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 [55].



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 [56,57].

➤ 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 d'abord des oligomères puis des polymères tout en augmentant leurs viscosités.

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 [58,59].

➤ Réactions 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 des hydroxyapatites phosphocalciques en phase unique [46,60].

CHAPITRE 2 LES HYDROXYAPATITES SUBSTITUÉES

2.1. Hydroxyapatites phosphocalciques substituées d'intérêt biologique

Comme il a été signalé précédemment, la phase minérale des tissus osseux s'apparente à une apatite phosphocalcique poly-substituée.

En fonction de leur nature, les ions de substitution se répartissent sur les trois sites qu'offre la structure apatitique. Les sites accueillant les ions hydroxydes (OH^-) et ceux accueillant les ions phosphates (PO_4^{3-}) sont appelés respectivement sites A et sites B.

Tin-Oo et al.[61] ont utilisé une hydroxyapatite synthétique dans des applications biomédicales. L'étude de l'activité antibactérienne de ce matériau à différentes concentrations (allant de 50 à 800 mg/mL) vis-à-vis des bactéries pathogènes telles que « *Streptococcus* » a montré une inhibition complète à des concentrations qui dépassent 200 mg HAp/mL de solvant avec 10 à 25 nombres de colonies (méthode de Miles et Misra). Ces auteurs suggèrent l'utilisation de cette hydroxyapatite comme matériau bioactif dans des applications dentaires et maxillo-faciales.

Shepherd et Best [62, 63] ont montré que la substitution des ions Ca^{2+} par ceux de Sr^{2+} ou Mg^{2+} augmente la solubilité de l'hydroxyapatite et facilite la libération de calcium et de phosphore en milieu physiologique. Par contre, l'ajout des cations Cr^{3+} augmente la taille des grains de hydroxyapatite et réduit la solubilité du matériau.

De façon générale, il a été montré que les substitutions cationiques affectent souvent la stabilité thermique du matériau en engendrant des complications lors de l'élaboration des céramiques de type hydroxyapatite carbonatée (substituée en carbonate notée HAp-C) ou hydroxyapatite substituée en Mg (HAp-Mg). Celles-ci peuvent, en effet, se décomposer dès 800 °C contre 1200 °C pour HAp) [43, 62].

D'un point de vue biologique, il a été montré que le magnésium joue un rôle important dans le remodelage osseux au moment de la calcification. L'argent a montré des caractéristiques prometteuses en tant qu'agent antibactérien. Pour leur part, les hydroxyapatites carbonatées (HAp-C) et les hydroxyapatites silicatées (HAp-Si) modifient les paramètres de maille et la structure apatitique. Le strontium a été retrouvé dans les tissus calcifiés de l'os et semble être un acteur important dans leur minéralisation [63].

Tout comme le strontium, le zinc a manifesté un effet inhibiteur sur l'activité ostéoclastique in vitro. Pour ce qui est des substitutions anioniques, la présence d'ions fluorures F^- est déterminante dans la croissance de l'os. En effet, l'absence des anions F^- limite la densification de l'os. Inversement, sa trop forte concentration génère des ostéoscléroses [63].

Enfin, l'intérêt des ions chlorures Cl^- réside dans leur capacité à développer un environnement acide à la surface de l'os qui active les ostéoclastes dans le processus de résorption afin de solubiliser les sels alcalins du minéral osseux [51].

Ainsi, l'incorporation de tel ou tel ion dans la structure apatitique est, non seulement, susceptible de changer sa structure, mais aussi, d'améliorer potentiellement sa bioactivité.

Le Tableau 2.1 présente quelques exemples de substitutions ioniques dans les structures des matrices HAp.

Les éléments présentés sont en rapport avec les espèces naturellement présentes dans l'os.

Tableau 2.1 : Exemples de substitutions dans la structure apatitique [63].

Substitutions	Formules chimiques théoriques	Notations
<u>Site Ca²⁺</u>		
Ag ⁺	Ca _{10-x} Ag _x (PO ₄) ₆ (OH) _{2-x}	HAp- Ag
Sr ²⁺	Ca _{10-x} Sr _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂	HAp- Sr
Zn ²⁺	Ca _{10-x} Zn _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂	HAp- Zn
Mg ²⁺	Ca _{10-x} Mg _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂	HAp- Mg
<u>Site B (PO₄³⁻)</u>		
CO ₃ ²⁻	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x}	HAp- C (site B)
SiO ₄ ⁴⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) _{6-x} (SiO ₄) _x (OH) _{2-x}	HAp- Si
<u>Site A (OH⁻)</u>		
Cl ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} Cl _{2x}	HAp- Cl
CO ₃ ²⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} (CO ₃) _x	HAp- C (site A)
F ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} F _{2x}	HAp- F
<u>Sites mixtes A/B</u>		
CO ₃ ²⁻	Ca _{10-x+u} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x+2u-2y} (CO ₃) _y	HAp-C (site A/B)

2.2. Substitutions isomorphiques des HAp

La composition chimique et la structure finale des matrices HAp peuvent être adaptées en ajustant la formulation et les précurseurs utilisés dans la réaction de précipitation de ces biomatériaux. La possibilité d'incorporer les ions étrangers dans la structure chimique de l'hydroxyapatite peut expliquer le fonctionnement des os comme zone de stockage des ions hautement efficaces.

Dans le tissu osseux, les matériaux se présentent sous forme des hydroxyapatites HAp déficientes en calcium et incorporent donc, dans leurs structures à travers des substitutions ioniques, différents ions.

Ces ions sont de type K^+ (0.03-0.07 % en poids), Mg^{2+} (0.2-1.2% en poids), Sr^{2+} (0.03-0.05% en poids), Cl^- (0.1-0.4% en poids) et F^- (0.01-0.07% en poids) avec de faibles contributions supplémentaires, d'ordre ppm, d'ions métalliques Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cr^{3+} , Co^{3+} et Mn^{2+} [65, 66].

Les ions disponibles, soient incorporés dans le réseau cristallin, soient adsorbés à la surface, représentent la nature complexe du milieu dans lequel le tissu dur se minéralisait. Il dénote également la flexibilité de la structure de l'apatite.

La présence de ces ions a été démontrée comme action tampon dans la circulation sanguine [67], en agissant sur l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes ainsi que la prolifération cellulaire [68, 69].

Au cours des dernières années, de nombreux ions biologiquement actifs ont été incorporés à des implants en céramique dans le but d'améliorer la régénération des tissus autour de l'implant, et de favoriser l'ostéo-intégration, le degré d'ordre structurel (c'est-à-dire de cristallinité) et la vitesse de dissolution [67-68, 70].

Cette section examinera l'utilisation de la substitution de deux ions (Zn et Mg) qui ont fait l'objet de quelques études antérieures et qui sont étudiés dans le cadre de ce projet. Les mécanismes de leur incorporation dans les HAp sont examinés et modifiés en fonction des réponses in vitro.

La substitution ionique dans l'hydroxyapatite des ions et en particulier ceux du Zn et du Mg peut s'effectuer par incorporation dans la structure HAp par l'une des méthodes suivantes:

- Échange d'ions entre l'hydroxyapatite pur précédemment préparé et l'ajout d'une solution de sel métallique [71].
- Pyrolyse par pulvérisation ultrasonique [72], qui est une méthode de synthèse en aérosol avec dépôt des métaux sur des nanoparticules.

- Méthode par précipitation humide, où tous les précurseurs sont solubilisés dans l'eau et précipitent à la même heure [73].
- Méthode aux micro-ondes [74].

Le matériau obtenu soumis à un traitement thermique par frittage ou séchage peut, non seulement, affecter sa structure finale, mais aussi, la taille de ces cristaux [75].

2.3. HAps substituées au Zn (HAps-Zn)

Tripathy et al. [76] ont montré qu'il est possible de produire la matrice de type HAp-Zn de formule chimique $Zn_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ par co-précipitation en milieu aqueux.

Le zinc (Zn) qui existe sous forme de traces dans les minéraux osseux est le plus abondant avec des quantités allant de 0.0126 à 0.0217 % en poids. Ce métal joue un rôle clé dans diverses fonctions de l'organisme telles que la régulation des acides nucléiques, le métabolisme, le maintien la structure membranaire, l'activité hormonale.

Ainsi donc, Il joue plusieurs rôles suivants :

- Un cofacteur enzymatique dans plus de 300 enzymes impliquées dans le métabolisme osseux [77].
- Les ions Zn^{2+} stimulent, à la fois, la formation osseuse et la minéralisation en inhibant la différenciation des ostéoclastes et l'activité des ostéoblastes [78].
- Il entraîne une réduction des paramètres de réseau du cristal d'apatite à cause de son rayon ionique plus petit (0.075 nm) comparé à celui de Ca (0.099 nm) [79].
- Le zinc 'est bien connu pour son effet inhibiteur sur la croissance cristalline de l'hydroxyapatite, mais il a été démontré qu'il peut être substitué quantitativement dans le réseau de la matrice HAp à des concentrations allant jusqu'à 20 % de poids [80].

Pour leur part, Bigi et al. [77] se sont intéressés à préparer des matrices HAps-Zn en utilisant différentes concentrations de Zn en solution allant de 0 à 100% en poids).

L'analyse DRX a montré la présence d'une phase amorphe à côté d'une autre phase cristalline unique. Celle-ci n'a été obtenue qu'avec les concentrations de Zn inférieures à 25% en poids [77].

En raison de l'effet inhibiteur du Zn sur la cristallisation, plusieurs autres auteurs, ont conclu qu'il est très difficile de synthétiser les matériaux HAps-Zn [77,81- 82].

La substitution ionique par précipitation humide a été utilisée pendant longtemps comme technique de préparation de plusieurs classes de supports HAps-Zn substitués (HAps-Zn) avec différents rapports de substitutions Zn/HAp [81,83].

Dans un autre laboratoire, Miyaji et al. [81] ont constaté que la taille des cristaux obtenus (phase amorphe et phase parascholzite ($\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ainsi que le degré de cristallinité diminuaient avec l'augmentation de la substitution isomorphique des ions Zn^{2+} en parfait accord avec les résultats rapportés par Li et al. [82].

Pour leur part, Laquerriere et al.[84] ont étudié le comportement et la réponse cellulaire des monocytes /macrophages qui sont parmi les premières cellules à coloniser le site inflammatoire. En effet, les nanoparticules synthétisées sous formes d'aiguilles induisent une production importante de médiateurs de l'inflammation.

A noter que la température de traitement semble être moins importante même si elle joue un rôle important dans les processus de dissolution/précipitation. Les premières données sur le dopage des HAps montrent qu'il est bénéfique pour les cellules. Malheureusement, il n'y'a que très peu d'informations sur l'effet d'ions dopants notamment par le zinc et le strontium sur la réponse cellulaire.

De leur côté, Miyaji et al. [81] ont dopé, par la méthode de précipitation, une hydroxyapatite par le zinc (HAp-Zn) avec un pourcentage de substitution de l'ordre de 15% en moles. Les résultats d'analyse ont montré que les paramètres de maille a et c de cette hydroxyapatite substituée (HAp-Zn) diminuent avec l'augmentation de la température du traitement thermique (à $T=400$ °C) et avec l'augmentation de la fraction en Zinc introduite. En outre, la différence de rayon ionique entre l'ion Zn^{2+} (0.074 nm) et celui de Ca^{2+} (0.099 nm) a été déterminante.

Dans ce même domaine, Lima et al. [85] ont montré que l'hydroxyapatite est capable d'accepter les ions métalliques de substitutions comme ceux du zinc au sein de son réseau cristallin. Le zinc joue, en effet, un rôle important dans l'activité enzymatique à base de phosphate alcalin.

Il a été montré notamment qu'un mélange de granules en Zinc (concentration de 5% en moles) avec un agent pyrogène comme l'hydroxyapatite conduit à la réduction de la cristallinité des HAp en formant une structure de deux phases après une calcination à 1200 °C.

A ce stade, il apparaît clairement que la présence du zinc dans les biomatériaux peut avoir des applications cliniques notamment comme greffe osseuse.

En effet, Grandjean-Laquerrière et al. [86] ont rapporté que la présence du support HAp-Zn en tant que matériau de prothèse diminue la réaction inflammatoire et augmente la production de cytokines.

Cuneyt Tas et al. [87] ont préparé des biocéramiques de type β -tricalcium phosphate (β -TCP) dopées en zinc (rapport molaire Ca/P variant de 1.49 à 1.51) en utilisant une technique de synthèse chimique de co-précipitation par voie humide suivie d'une calcination à 1000 °C. Les poudres synthétisées déficientes en Ca existaient sous formes de nanopoudres avec des particules agglomérées d'aiguilles de 30 nm d'épaisseur.

Li et al. [88] ont préparé les poudres d'hydroxyapatites dopées en zinc par la méthode hydrothermale en utilisant les réactifs $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ et $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.

Il a été montré que la fraction molaire du Zinc introduite par substitution dans l'hydroxyapatite influe d'une façon remarquable sur la stabilité thermique, la microstructure et la morphologie de cette dernière [88]. En effet, le remplacement des ions Zn^{2+} par ceux à base de Ca^{2+} provoque les phénomènes suivants :

- Bonne cristallinité
- Modification des paramètres de maille, étant donné que le rayon ionique de Zn^{2+} (0.074nm) est plus petit que celui de l'ion Ca^{2+} (0.099nm).
- Ralentissement de la croissance de cristaux.
- Diminution de la stabilité thermique.

Dans un autre laboratoire, des tests de culture in vitro réalisés sur des cellules de type ostéoblastes des souris en présence des HAp-Zn ont montré les phénomènes suivants [87] :

- Les échantillons dopés avec de 2900 à 4100 ppm de Zn produisent une grande viabilité cellulaire (taux cellules vivantes / cellules mortes).
- Une augmentation de la teneur en zinc de 1% en poids entraîne une augmentation de la mortalité des cellules.
- L'activité de phosphatase alcaline est observée pour l'échantillon β - TCP dopé en Zn à une concentration de 4100 ppm.
- La rugosité de surface de l'échantillon, mesurée par profilométrie sans contact, a un effet sur le taux (cellules vivantes / cellules mortes) et les chiffres (vivants/morts).
- La viabilité de la cellule la plus élevée correspond à la surface la moins rugueuse

Wang et al. [89] ont remarqué que les ions Zn^{2+} , en proportion supérieure à 1% en poids, acquièrent une forte affinité pour s'adsorber sur des cristaux HAp. En effet, les isothermes d'adsorption correspondantes des cations Zn^{2+} sur HAp sont de type Langmuir et montrent que la rétention de ces cations se fait sur les sites actifs des cristaux HAp.

Ce phénomène a été expliqué de la manière suivante :

- Formation d'un complexe à partir des ions de zinc et de phosphates à la surface et la possibilité pour les espèces de Zn liées à la surface de subir l'hydrolyse
- Blocage de multiples sites d'activité croissante.

De leur côté, Li et al. [82] ont utilisé une méthode hydrothermale pour synthétiser des matrices HAp-Zn (20% en moles) en utilisant les produits $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$ et $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.

Les résultats correspondants ont montré qu'une augmentation de la concentration de Zn entraînerait une diminution du degré de cristallinité et de la taille des cristaux HAp-Zn et une augmentation du nombre des cristaux de HAp-Zn

Ces mêmes auteurs ont utilisé d'autres réactifs de remplacement à base de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ afin d'éviter l'incorporation des ions NO_3^{2-} ou Cl^- dans la structure de l'apatite. Il a été montré que les supports HAp-Zn obtenus sont plus difficiles à préparer par précipitation plutôt que par la méthode hydrothermale et qu'une augmentation de la teneur de Zn entraînerait une diminution des rapports (Ca/P) et $(\text{Ca}+\text{Zn})/\text{P}$ et donc une modification de la stœchiométrie des matériaux HAp-Zn à travers une perte de cristallinité.

Dans un autre contexte, Tang et al. [90] ont montré que les ions Zn^{2+} pourraient être piégés et agir comme un site de défaut à cause de la rapidité cinétique de cristallisation des précipitations.

Leur étude théorique a confirmé que la substitution isomorphe d'ions n'est pas toujours favorisée sur le plan énergétique et que l'incorporation des cations Zn^{2+} à la place de ceux de Ca^{2+} (en particulier sur le site Ca (II)) peut entraîner des distorsions structurelles locales importantes (figure 2.1).

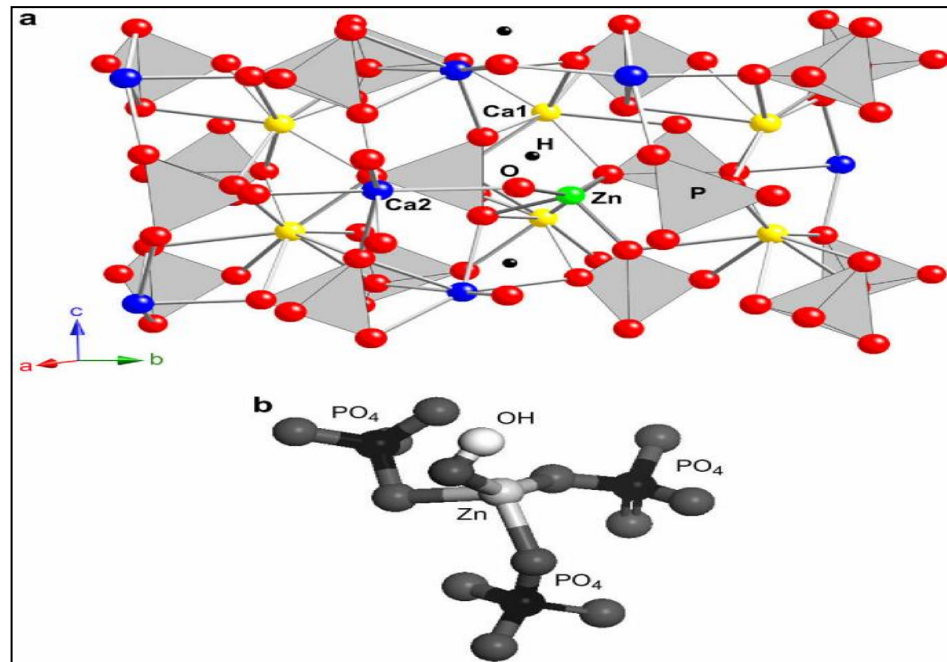


Figure 2.1 : Structure optimisée des hydroxyapatites dopées par le zinc HAp-Zn [90].

Dans un autre laboratoire, Yang et al. [91] ont constaté que la présence des ions Zn^{2+} dans les HAp peut endommager l'activité enzymatique ainsi que l'ADN et l'ARN des bactéries.

Les travaux de recherches réalisés par Stanic et Wolschendorf [92,93] ont discuté le mécanisme de l'activité antibactérienne des supports solides HAp-Zn. En effet, les ions Zn forment d'abord des liaisons fortes avec les acides thioniques, imidazole, amine et groupes carboxyliques de protéines. Ils, provoquent, par la suite, des changements structurels et affecte la membrane perméable et entraîne donc la mort cellulaire.

D'après Gomes et al [94], la caractérisation par diffraction de rayons X (DRX) des échantillons d'hydroxyapatite (HAp-Zn) contenant différentes quantités de zinc (0, 1.6, 3.2 et 6.1 % en poids), traités à différentes températures (entre 500 et 1100 °C) a confirmé l'insertion du Zn dans la structure cristalline de l'hydroxyapatite dans le canal hexagonal (occupation partielle du site 2b Wyckoff avec la formation d'entités linéaires (O-Zn-O)).

La formation de HAp dopée en Zn a été atteinte au-dessus de 900 °C seulement, sa composition chimique est de $(Ca_{10}Zn_x (PO_4)_6 (OH)_2 \cdot 2xO_{2x})$ ($0 < x < 0.256$) avec un rapport constant Ca/P de 1.67.

Les échantillons traités thermiquement à 500 °C ont montré une faible incorporation des cations Zn^{2+} . La formation réversible de la phase B-TCP de l'hydroxyapatite dopée en Zn (HAp-Zn) apparaît à partir de 600 °C pour atteindre son maximum à 900 °C et disparaît à 1100 °C. Ces résultats renforcent la proposition récente de certains auteurs [94] relative au mécanisme d'insertion du Zn dans la position de (2b Wyckoff interstitielle) dans le réseau cristallin des matrices HAp.

Qiao et al. [95] ont discuté plutôt le rôle important du zinc dans la régulation et la formation osseuse, essentiellement dans la fabrication de biomatériaux dans l'ingénierie tissulaire. C'est ainsi qu'une enquête systématique a été effectuée sur deux modes différents de mise en place du Zn.

Le revêtement de Zn-implanté (qui possède la plus petite concentration de zinc a montré de meilleures caractéristiques d'ostéogéniques et une bonne régénération osseuse.

Predoi et al. [96] ont évalué l'influence de la stabilité des solides HAp-Zn sur les propriétés antimicrobiennes. Les résultats de la méthode de raffinage de Rietveld par l'analyse DRX ont révélé la présence d'une phase unique correspondant à l'hydroxyapatite hexagonale. Les paramètres de réseau calculés des échantillons HAp, HAp-Zn- (7% en moles) et HAp-Zn-(20% en moles) étaient également en bon accord avec les données standards de l'hydroxyapatite hexagonale.

Pour la première fois, une attention particulière a été portée aux études colloïdales sur les dispersions de HAp-Zn en utilisant des ultrasons comme technique de caractérisation de la stabilité et de la dispersion [96]. Ces études ont montré que la stabilité des suspensions de HAp-Zn est fortement influencée par la teneur en zinc. Les résultats ont révélé que la souche de *S. aureus* était plus sensible que celle d'*E.Coli* aux hydroxyapatites dopées au zinc par rapport au témoin.

2.4. HAps substituées au Mg (HAps-Mg)

Chiranjeevirao et ses collaborateurs [97] ont élaboré des matériaux solides de HAps-Mg en utilisant du nitrate de calcium et/ou du nitrate de magnésium en milieu aqueux à pH légèrement basique (pH = 9,0).

Un autre travail similaire a été effectué par Patel [98] qui a préparé des solides similaires de type HAps-Mg en utilisant les mêmes réactifs mais en milieu plus alcalins (pH > 11).

Bigi et al. [99], ont montré que la phase apatite cristalline unique n'a été obtenue qu'avec des concentrations de Mg comprises entre 0 et 30% en poids. Ces auteurs rapportent que :

- ❖ Les ions Mg présentent un effet similaire à ceux des ions Zn et inhibent la cristallisation des HAps.
- ❖ À des concentrations de Mg allant de 35 à 50% en poids, la structure est complètement amorphe avec apparition d'autres phases de type $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ et $NH_4MgPO_4H_2O$.
- ❖ La taille des cristaux, le degré de cristallinité et le rapport $(Ca+Mg)/P$ diminue lorsque la concentration en Mg augmente.

D'après Legeros [100], le magnésium reste l'un des métaux essentiels de l'apatite biologique avec des concentrations de 0.44, 1.23 et 0.72% en poids dans l'émail, la dentine et les os, respectivement. Il a été montré que la présence des ions Mg^{2+} joue un rôle clé dans la croissance et le métabolisme osseux en modulant les ostéoblastes et l'activité des ostéoclastes dans l'apatite biologique.

Le magnésium peut également inhiber la nucléation et la croissance des cristaux des HAps en entraînant la réduction de celle-ci [101] et en stabilisant les phases intermédiaires acides du phosphate de calcium pendant la synthèse [102]. A noter que les HAps-Mg ont été utilisées dans de nombreux exemples de prothèses orthopédiques et dentaires [103].

Les effets des ions magnésium libres sur la formation osseuse précoce ont été exploités par le biais de production de HAps-Mg en tant que remplisseurs de défauts osseux.

Bien qu'il n'y ait pas d'études spécifiques qui isolent le rôle des ions Mg dans l'ajustement des propriétés de dissolution du matériau, il existe des preuves d'association des ions Mg avec les phosphates de calcium qui peuvent influencer la structure de la surface de manière à impliquer une augmentation de solubilité [104].

Le magnésium a un rayon ionique (0.065 nm) inférieur à celui du calcium (0.099 nm). Il lui permet donc de substituer des cations Ca avec une préférence pour la position Ca (II) à cause de sa plus grande flexibilité due à la géométrie des ions à cette position [105].

Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'état solide ont également confirmé la substitution des ions Ca^{2+} par ceux de Mg^{2+} pour un rapport molaire allant jusqu'à 10% de Mg [106].

Belluci et al. [107] ont démontré que la carence en Mg a un effet négatif sur le métabolisme osseux et la formation de tissu autour des sites d'implants.

Les matrices HAp-Mg ont été utilisées dans de nombreux exemples de prothèses orthopédiques et dentaires. Bien que la recherche sur le rôle du Mg sur la santé des os soit toujours en cours, la plupart des études rapportent un effet positif sur tous les stades de squelette du métabolisme et la santé des os, en particulier dans le processus de l'ostéoporose [108].

Zhao et al. [109] rapportent que les surfaces des HAp substituées par les cations Mg^{2+} (HAp-Mg) favorisent la différenciation ostéogénique des ostéoblastes et pourrait améliorer l'ostéointégration de l'implant pendant les premières stades de l'implantation.

Arrivés à ce stade, nous jugeons utile de préciser que beaucoup de progrès ont été accomplis, au cours des dernières années, dans l'élaboration d'alliages de magnésium biodégradables comme des «implants intelligents» dans les applications cardiovasculaires et orthopédiques.

Cependant, les applications étendues d'alliages à base de Mg sont toujours inhibées principalement par leur taux élevé de dégradation et la perte de l'intégrité mécanique.

Dans ce contexte, des études approfondies ont été menées par Chen et al. [110], pour développer des alliages à base de Mg avec des performances mécaniques et à la corrosion supérieure. Cette étude se concentre sur les critères de conception de matériaux biodégradables avec une stratégie de développement d'alliage à base de Mg utilisés en particulier dans le cadre des essais cliniques (d'implants in vivo).

De leur côté, Farzadi et al. [111] ont synthétisé une hydroxyapatite substitué en magnésium par la méthode de précipitation chimique humide dans laquelle le changement de taille n'était pas significatif dans le support HAp-Mg par rapport à HAp. L'étude comparative des échantillons HAp et HAp-Mg, avant et après le traitement thermique, a montré que la structure de l'apatite reste stable thermiquement en'a subi aucune transformation de phase à haute température. A noter que la phase de $Mg(OH)_2$ observée dans la phase de phosphate de calcium demeurait sous forme d'hydroxyapatite de calcium hexagonale avant et après le traitement thermique.

El Saied Hanafi et al. [112] ont synthétisé une autre hydroxyapatite dopée en différentes concentrations en ion Mg^{2+} . Les résultats obtenus révèlent que tous les échantillons sont de même structure cristalline. Il a été montré qu'une augmentation de la concentration en ions Mg^{2+} entraîne une diminution de la cristallinité des échantillons HAp-Mg.

Dans leur étude, Gayathri et al. [113] ont incorporé du magnésium dans l'hydroxyapatite synthétisée préalablement par la méthode d'irradiation par micro-ondes. Les résultats observés suggèrent que les ions Mg^{2+} incorporés dans les nanoparticules d'hydroxyapatites ont le potentiel nécessaire pour y être utilisées comme agents efficaces de lutte contre les larves de moustiques.

2.5. Autres HAp co-substituées aux différents ions dopants

Gibson et Bonfield [114] ont préparé, par procédé de précipitation, une céramique à base d'HAp avec la co-incorporation des ions Mg^{2+} et CO_3^{2-} à des teneurs allant respectivement jusqu'à 0,5 et 1% en poids. Les matériaux résultants ont été proposés pour y être commercialisés et utilisés dans la fabrication d'implants osseux puisqu'ils ont manifesté une meilleure bioactivité que le matériau HAp pur.

Gomes et al. [115], ont présenté une étude de comportement des quatre ions dopants : Mg^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} et SiO_4^{4-} dans les hydroxyapatites. Les résultats correspondants mettent clairement en évidence les comportements spécifiques de chacun des ions dopants, et indiquent que la structure de l'hydroxyapatite n'accepte pas facilement n'importe quel élément de substitution (contrairement aux idées généralement admises).

De leur part, Ramli et al. [116] ont proposé une approche simple et économique pour produire des HAp nanoporeuses pures en utilisant le mélange hydroxyapatite-chitosane (HAp-CS) comme modèle. L'étude a montré globalement que l'élimination du chitosane par calcination conduit à la formation des HAp se caractérisant par des pores nanométriques désordonnés mais interconnectés.

Elmsellem et al. [117] se sont intéressés à optimiser les conditions de synthèse du phosphate tricalcique (TCP) par la double décomposition qui apparaît très utile vu la simplicité et la rapidité de cette méthode.

Dans cette étude, la technique de synthèse utilisée, basée sur les réactions dans un milieu eau-éthanol à pH=7 en variant la température, a permis d'optimiser la température de préparation du phosphate tricalcique apatitique (Ca/P=1.5) à une température de $T = 50\text{ °C}$.

Le traitement thermique a permis de tirer les conclusions suivantes :

- La calcination du TCP à 900 °C entraîne la formation du phosphate tricalcique β -TCP pure qui persiste même à 1150 °C .

- Le frittage entre 1050 et 1150 °C consolide la matrice β -TCP sans transformation de la phase β du phosphate tricalcique en phase α .
- Le compactage permet d'obtenir des meilleures résistances mécaniques (75 MPa à 1150 °C) et que la résistance mécanique augmente dans le même sens que la température.

Les travaux de Gopi et al. [118] relatifs à la synthèse des nanotiges d'hydroxyapatites à base de trois extraits de sources naturelles contenant différents ions dopants a permis d'avancer les informations suivantes :

- L'hydroxyapatite, en tant que matériau inorganique, reste le composant principal et le plus utilisé dans diverses applications biomédicales en raison de son excellente biocompatibilité et bioactivité.
- L'activité antibactérienne de ces HAps, à différentes concentrations, contre deux souches de bactéries pathogènes *E. coli* et *Klebsiella*, a été testée par la méthode de diffusion.
- Tous les échantillons obtenus sont purs et de tailles nanométriques
- La cristallinité diminue en fonction des extraits d'acide naturels à savoir (extrait d'acide tartrique, l'extrait d'acide de banane et d'extrait de tamarin).
- La formation de nanotiges de tailles uniformes n'est obtenue qu'à l'aide de l'extrait de tamarin contenant les ions dopants Zn^{2+} , Mg^{2+} .
- Les nanotiges HAps co-substituées présentent une forte activité antibactérienne contre *E. coli* et *Klebsiella*.
- Les nanotubes d'HAps synthétisés peuvent agir comme de bons biomatériaux pour diverses applications biomédicales.

Salhi et al. [119] se sont intéressés plutôt à la dégradation du colorant (A07) par photocatalyse hétérogène en utilisant une hydroxyapatite dopée au titane HAp-Ti. Le catalyseur développé a été caractérisé par la diffraction des rayons X, la spectroscopie IR-TF et l'analyse thermique (ATG-ATD).

Les résultats obtenus montrent les phénomènes suivants [119] :

- Bonne activité photo-catalytique du catalyseur HAp-Ti avec une décoloration complète de la solution après 16 heures d'irradiation.

- La décoloration dépend de la masse du catalyseur, du pH du milieu, la teneur en titane, la concentration initiale en colorant et la présence d'oxygène dans le milieu.

Pour leur part, Shanmugam et al. [120] ont préparé par co-précipitation une hydroxyapatite substituée au cuivre ($\text{Ca}_{10}\text{XCu}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) et une fluoro-apatite $\text{Ca}_{10}\text{XCu}_x(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$.

Les résultats trouvés confirment :

- la présence d'une phase pure et d'une autre phase secondaire (B-phosphate tricalcique) lorsque la teneur en cuivre passe de 0.5 à 2.0 % en moles dans $(\text{Ca}_{10}\text{XCu}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH}/\text{F})_2$.
- Les tests d'activité antimicrobienne contre les bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (bactéries à germes positifs) et *Candida albicans* (levure) ont montré une réduction de 100% du nombre de colonies par la matrice $\text{xCu}_x\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$ contre *E. coli*. Ce matériau peut être donc considéré comme un bon agent antibactérien pour l'implantation d'os.

L'étude effectuée par Gopi et al. [121] a pour but de synthétiser des poudres d'hydroxyapatites co-substituées (HAp-Ag/Mg) par la technique de l'irradiation ultrasonore en vue de les utiliser comme agents antibactériens et bioactifs.

Les résultats ont apporté la preuve des effets cytotoxiques de la présence de l'argent dans les matrices HAp-Ag. La co-substitution des ions Mg^{2+} par ceux d' Ag^+ compensent efficacement les effets négatifs causés par l'argent et améliorent donc les performances du support (HAp-Ag/Mg) par rapport aux HAp pures.

Ainsi donc, les supports de type (HAp-Ag/Mg) se caractérisant par des propriétés antibactériennes intéressantes et de bonnes capacités de liaisons osseuses peuvent être utilisés en tant que biomatériaux dans les différentes applications biomédicales.

Dans un autre laboratoire, Uysal et al. [122] ont co-dopé par précipitation une hydroxyapatite par les ions Zn^{2+} et F^- .

Il a été montré que :

- l'incorporation des ions Zn^{2+} dans la structure de HAp entraîne, à la fois, une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'activité des phosphatases alcalines (PAL) des cellules.
- L'incorporation supplémentaire de 1% (mol) de F^- entraîne une augmentation dans les propriétés mécaniques et une bonne réponse biologique des matrices (HAp-Zn/F) qui sont supérieures à celles obtenues par HAp-Zn.
- HAp-Zn/F est un bon candidat pour une application biomédicale.

De leur côté, Aryal et al. [123] ont fait une simulation des propriétés élastiques et mécaniques des HAp dopées aux concentrations plus élevées en zinc et en magnésium.

Il a été constaté que :

- les propriétés mécaniques des HAp-Zn et HAp-Mg dépendent également de manière significative de la distribution des impuretés entre les sites Ca(I) et Ca(II).
- Les ions Zn^{2+} préfèrent le site Ca(II) pour la substitution, alors que ceux de Mg^{2+} n'ont pas cette préférence. Pour des applications biomédicales spécifiques, un contrôle approprié de la concentration en dopants et de leurs préférences de site doit être soigneusement pris en compte lors de l'utilisation de ces HAp dopées.

Dans un autre laboratoire, Sodagar et al. [124] ont évalué l'activité antibactérienne d'un composite orthodontique conventionnel contenant des nanoparticules d'hydroxyapatites dopées en argent. Les disques composites (Transbond XT) contenant des nanoparticules HAp-Ag (5 et 10% Ag) produisent des zones d'inhibitions importantes et présentent donc des propriétés antibactériennes contre les biofilms.

Chiu et al. [125] ont synthétisé un composite d'alliage de type HAp-Zn-Y-Mg qu'ils ont soumis à un traitement thermique. L'étude a montré une bonne

résistance à la corrosion due, à la fois, à la formation d'une couche superficielle compacte de CaP et à une diminution de la fraction volumique dans la matrice HAp.

Dans ce même contexte, Helen et al. [126] ont synthétisé une hydroxyapatite substituée en ions Zn/Mg par la méthode de précipitation et ont montré que :

- l'incorporation des ions Zn^{2+} et Mg^{2+} conduit à une diminution de la cristallinité notamment pour une concentration en zinc élevée.
- Une augmentation de la concentration en zinc entraîne une diminution de la taille des particules
- L'effet cytotoxique de l'HAp sur les cellules procaryotes et eucaryotes a montré que les propriétés antimicrobiennes de cette HAp dépendent du type de souche microbienne et indiquent leur éventuelle utilisation dans le domaine biomédical.

Dans une autre étude, Rajendran et al. [127] ont élaboré une série d'hydroxyapatites (HAp) à base de magnésium, zinc et cobalt avec différentes compositions stœchiométriques. L'étude a été abordée en évaluant leurs caractéristiques morphologiques et structurelles, leurs degrés de cristallinité, leurs bioactivités, leur cytotoxicités et leurs activités antibactériennes.

Ces auteurs ont constaté que :

- Certaines caractéristiques morphologiques restent inchangées suite à la substitution des ions Mg^{2+} , Zn^{2+} et Co^{2+} dans le réseau cristallin de ces HAp.
- Les ions Zn^{2+} et Co^{2+} ont causé un dérèglement de la structure cristalline des HAp et la formation d'une autre phase supplémentaire β -TCP à côté de la phase apatitique,
- Le support HAp-Mg/Zn/Co présente de nouvelles caractéristiques en termes de bioactivité, de viabilité cellulaire et d'activité antibactérienne.

Dans l'étude effectuée par Laskus et ces collaborateurs [128], une série d'hydroxyapatites HAp dopées par les ions Zn^{2+} et SeO_3^{2-} a été préparée avec succès par la méthode de précipitation aqueuse. Les différents résultats d'analyse

(RMN solide, IRTF,...) ont indiqué que les ions Zn^{2+} stimulent la formation de la couche de surface hydratée amorphe entourant le cœur des cristaux d'HAp

Le travail élaboré par Ates et al. [129] décrit les effets des ions dopants de Mn^{2+} et/ou Ni^{2+} sur les performances structurales, magnétiques des biocéramiques de phosphate tricalcique β (β -TCP) synthétisées par la méthode de sol-gel et testées *in vivo* et *in vitro* afin de déterminer leur activité antimicrobienne.

L'étude a montré que :

- Les deux types d'ions dopants influent considérablement sur les dimensions des cristallites et les paramètres de réseau cristallin de la phase β -TCP.
- Les propriétés magnétiques de ces échantillons sont affectées par le type et la quantité du ou des ions dopants.
- Les activités antimicrobiennes *in vitro* de β -TCP dopés contre des souches bactériennes et fongiques ont montré seul le TCP-Ni présentait une activité antimicrobienne efficace contre les bactéries à Gram positif (de concentration d'inhibition minimale (CMI) de 50 μ g/mL), alors que les autres types de β -TCP dopés ne possédaient pas cet effet.
- Les tests *in vivo* ont montré que chaque formulation pouvait constituer un bon candidat pour la cicatrisation et le traitement des os.

CHAPITRE 3

AGENTS ANTIMICROBIENS - INFECTIONS BACTERIENNES ET FONGIQUES

3.1. Généralités

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier et causent donc de lourdes pertes économiques.

De nombreux programmes ont été proposés pour développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique afin de lutter contre les maladies infectieuses.

Dans ce contexte, de nombreux laboratoires et chercheurs conjuguent leurs efforts pour mettre au point de nouveaux biomatériaux idéaux, non couteux et sans effets secondaires destinés essentiellement pour de large spectre d'activités et notamment dans des applications médicales [130].

3.2. Infections bactériennes

Comme la montre la figure 3.1, les bactéries se caractérisent par des formes spécifiques, des structures facultatives et par certains groupes bactériens [131].

Du point de vue structure, on trouve le cytoplasme, généralement constitué d'un hyaloplasme où baignent essentiellement des ribosomes et parfois des éléments supplémentaires comme les substances de réserve.

Le cytoplasme est constitué par un appareil nucléaire diffusé entouré par la membrane cytoplasmique, elle-même, constituée par deux feuillets phospholipidiques contenant des protéines.

La membrane cytoplasmique est enveloppée par une paroi rigide (sauf chez les mycoplasmes).

Les structures facultatives, quant à elles, peuvent être des polymères de surface comme la capsule, des appendices comme les flagelles ou des structures génétiques comme les plasmides (molécules d'ADN extrachromosomiques).

Les endospores caractérisent quelques genres bactériens (*Bacillus* et *Clostridium*); elles ne sont élaborées que lorsque les conditions de vie deviennent défavorables.

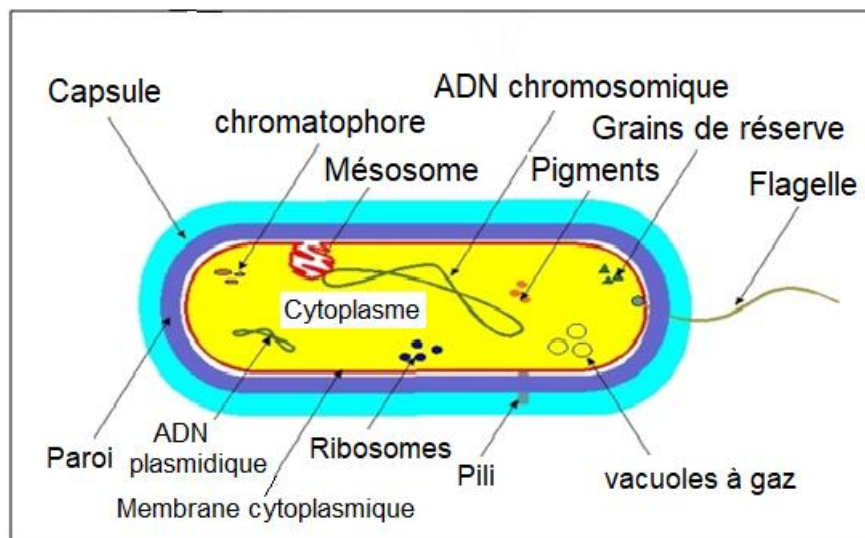


Figure 3.1 : Structure d'une cellule bactérienne [131].

Chez les bactéries à gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la couche peptidoglycane à laquelle sont associés des polymères d'acide téichoïque.

Les bactéries à gram négatif ont une paroi plus complexe : la couche de peptidoglycane est plus fine que celle du gram positif et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines.

La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérien (figure.3.2).

Les bactéries sont des microorganismes très adaptables. Elles sont à l'origine de maladies épidémiques graves comme le choléra, la peste ou bénignes comme une simple colonisation de la peau.

Elles sont capables de survivre et se multiplier rapidement dans leurs environnements. Certaines, d'entre elles, forment des spores résistantes qui survivent pendant des décennies.

En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmique qui est capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes.

Cette adaptabilité génétique peut accroître, à la fois, leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques [131].

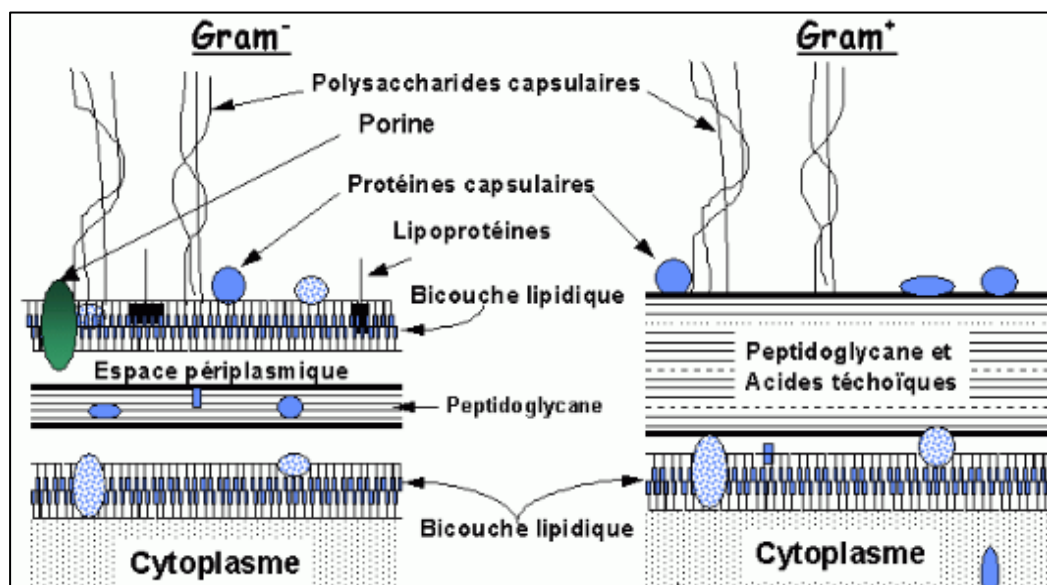


Figure 3.2 : Composition de la paroi des bactéries à Grams négatif et positif [131].

3.3. Les Antibiotiques

3.3.1. Introduction

La chimiothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de substances chimiques en thérapeutique, a vu le jour en 1909 par Paul Ehrlich (1854 - 1915). Son principe de base est une substance chimio-thérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses. Elle doit être nuisible pour le micro-organisme pathogène mais inoffensive pour les cellules de l'organisme hôte.

Les recherches de Ehrlich ont abouti à soigner la syphilis, ce qui lui a valu le prix Nobel en 1908.

L'action bactériostatique de certains micro-organismes envers d'autres avait été observée en 1877 par Louis Pasteur (1822 - 1895) et M. Joubert (à propos du bacille charbonneux). Mais, ce n'est qu'en 1929 que Sir Alexander Fleming (1881 - 1955) a constaté que la culture en boîte de Pétri de staphylocoques est inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium* [132].

Fleming conclu alors que le champignon secrète une substance chimique bactériostatique qui peut être utilisée en thérapeutique humaine. Un peu plus tard, la culture en masse a permis de disposer de grandes quantités de cette substance, c'est l'avènement de la pénicilline.

En dehors des micro-organismes du genre *Penicillium*, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent de nombreux antibiotiques. Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses à coloration Gram positive, strictement aérobiques.

Les *Streptomyces* ont pour habitat naturel le sol où ils jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques, grâce à la synthèse de nombreuses enzymes (amylases, chitinases, cellulases, protéases). Ils produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. L'abondance et la diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouvent dans aucun autre genre bactérien.

Depuis les années 60 [132], de nombreux antibiotiques sont obtenus par synthèse totale ou semi-synthèse où des champignons (agents antifongiques), ayant un site d'action bien défini et un mécanisme précis permettant leur utilisation dans le traitement de la majorité des infections [133].

Les modes de production des antibiotiques sont :

- Les organismes vivants tels que : les champignons, les bactéries, les végétaux supérieures
- La synthèse chimique à partir des molécules naturelles ; par exemple : la pénicilline est produite par un champignon "penicillium notatum " et l'érythromycine est produit par la bactérie " streptemyses erythreus, par contre le chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique [134-135].

Les antibiotiques sont des substances, d'origine biologique ou synthétique agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (agents antibactériens).

Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes qui possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement des bactéries dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier, mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales.

Ils sont définis par leur :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité),
- Toxicité sélective (mode d'action),
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

3.3.2. Modes d'action des antibiotiques

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) essentiellement tétracyclines, phénicolés, macrolides; soit bactéricide (qui détruit les germes), comme les bêtalactamines, les aminosides, les polypeptides [136].

Chaque antibiotique possède un spectre d'action qui est la flore microbienne sur laquelle il exerce son activité. Il est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand.

Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre. Ainsi donc, les antibiotiques ont été classés selon leur mode d'action en [137] :

- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses du peptidoglycane.
- Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires.
- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques.
- Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques.

3.3.3. Résistance bactérienne

La résistance bactérienne aux agents antibactériens est un problème lié à la croissance en pratique médicale.

L'utilisation intense et abusive des antibiotiques a rapidement conduit à l'apparition de deux phénomènes importants: les effets secondaires dus aux médicaments et à l'acquisition d'une certaine résistance aux antibiotiques par certaines populations microbiennes.

A l'heure actuelle, le phénomène de la résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques. En effet, l'activité des extraits de plantes sur les bactéries et les champignons a été exploitée antérieurement par plusieurs chercheurs [138].

Les principaux facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne sont présentés dans le tableau 3.1 [130].

Tableau 3.1 : Facteurs favorisant l'apparition des résistances bactériennes

Facteurs	Exemples
Émergence de la résistance	<ul style="list-style-type: none"> - Usage abusif et inadéquat d'antibiotiques - Hospitalisation prolongée - Durée de traitement courte et doses sous thérapeutiques - Diagnostic non confirmé d'infection bactérienne
Propagation de souches résistantes	<ul style="list-style-type: none"> - Non-respect aux mesures d'hygiène dans les hôpitaux et les directives de lutte contre les infections - Transmission des souches bactériennes entre les patients (entre le milieu hospitalisé et le milieu communautaire) - Voyages
Utilisation dans le secteur agro-alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> - Animaux destinés à la consommation - Agriculture et aquaculture
Utilisation des antiseptiques et des désinfectants	<ul style="list-style-type: none"> - Présence des agents antibactériens dans les produits d'entretien ménager

3.4. Les bactéries

- *Escherichia coli*

Ce Bacille à Gram négatif possède à leur surface des pili, qui jouent un rôle dans l'adhérence des bactéries à certaines cellules. Certaines souches peuvent produire des hémolysines et des entérotoxines qui sont des facteurs de virulence.

La bactérie *E. coli* est responsable d'infections diverses comme les infections urinaires, intestinales ainsi que celles des méninges. L'*Escherichia. Coli* se développe sur gélose nutritive. Elle produit habituellement de l'indole, fermente le lactose, mais ne produit pas de l'acétoïne [139] (figure 3.3).



Figure 3.3 : Photographies montrant la souche d'Escherichia coli

(a) : observée sous MEB Gx 15000 ; (b) : au MP G x 40 après coloration de Gram

- *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont de gros bacilles à Gram négatif, immobiles, entourés d'une capsule, appartenant à la famille des enterobacteriaceae. Sur un milieu gélosé, leurs colonies sont volumineuses, bombées, brillantes et très visqueuses à cause de leurs capsules, fermentent de nombreux sucres avec production de gaz mais elles ne sont pas protéolytiques. On distingue sept espèces dont Les *Klebsiella* (*pneumoniæ*, *oxytoca*, *ozeanae*, *rhinoscleromatis*, *planticola*, *terrigena*, *ornitholytica*) [69] (figure 3.4).

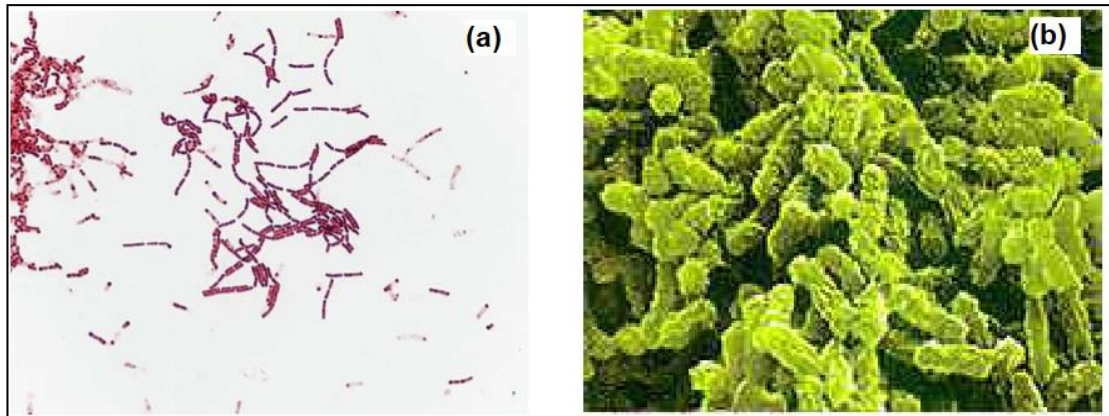


Figure 3.4 : Photographies montrant la souche Klebsiella
 (a): observée au MP au G x 40 après coloration de Gram ; (b) : sous MEB

- *Pseudoonas aeruginosa*

P. aeruginosa a les caractères généraux des Pseudomonaceae. C'est une bactérie Gram négatif (figure 3.5), aérobie strict, oxydase positive, mobile par un flagelle polaire. La température optimale de croissance est de 30°C. L'une des caractéristiques de cette espèce est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine. Les souches typiques produisent aussi des pigments verts fluorescents qui est la pyoverdine, laquelle contrairement à la pyocyanine, peut être produite par d'autres espèces qui appartiennent au genre *Pseudomonas*. Certaines souches sont a-pigmentaires et certains rares sont dites erythroènes ou mélanogènes.

Les souches isolées d'expectorations des malades atteints de pneumopathies ou de mucoviscidose ont le plus souvent des colonies avec aspect très muqueux. Ce dernier est dû à une volumineuse et abondante substance pericellulaires « le slime ».

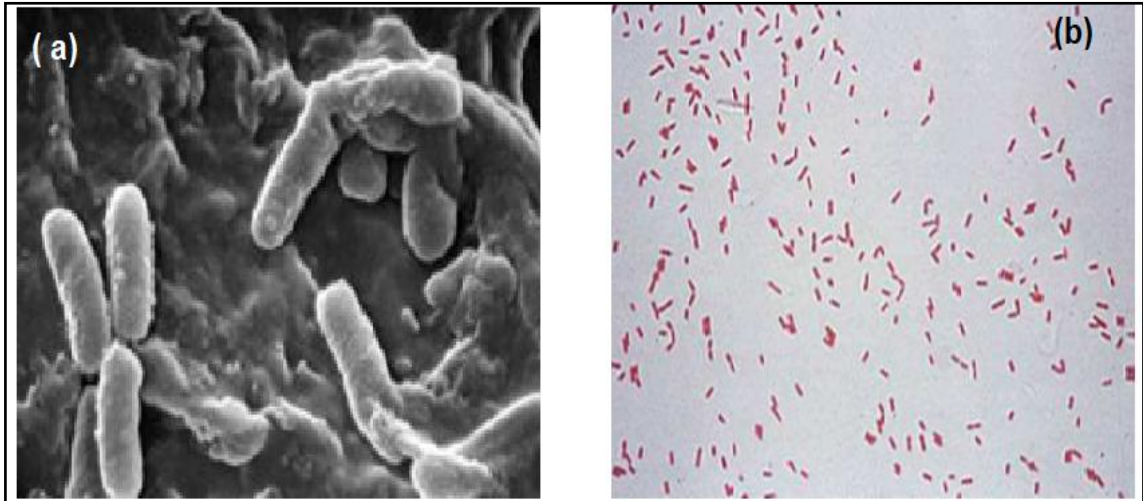


Figure 3.5 : Photographies montrant la souche de *Pseudomonas aeruginosa*
 (a) : sous MEB ; (b) : observée au MP (G x 40) après coloration de Gram.

- *Staphylococcus aureus*

Cette espèce est l'une des bactéries la plus souvent isolée au laboratoire de bactériologie médicale. Les Staphylocoques sont des coques Gram positif, arrondis, d'environ 1 μm de diamètre, immobiles, dépourvus de spores et de capsules. (Figure 3.6). Ils apparaissent le plus souvent en amas dit « grappes de raisin ». Cependant ils peuvent également être isolés, par paires ou en très courtes chaînes.

Après 24 heures de culture sur gélose nutritive, *S. aureus* donne des colonies produisant en général un pigment doré. Il pousse et fermente le mannitol sur milieu Chapman, faisant virer le rouge phénol au jaune, ce qui caractérise le mieux l'espèce aureus. Ce genre est facile à mettre en évidence en laboratoire [69].

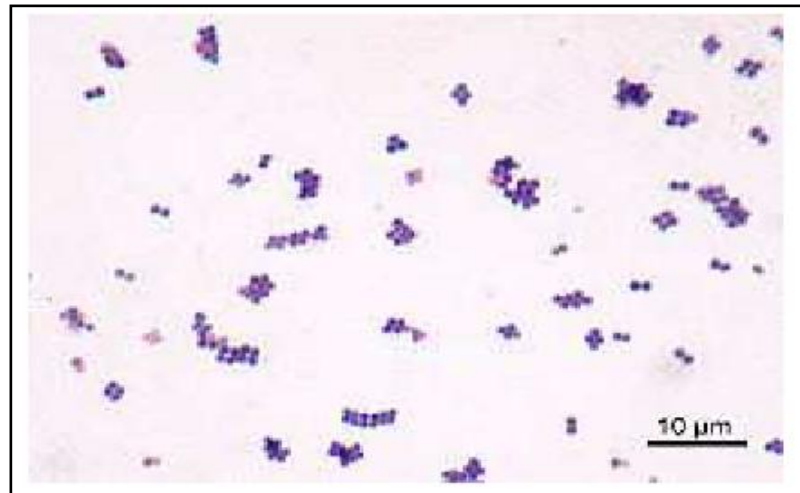


Figure 3.6 : Photographie de *Staphylococcus aureus*, observé au MP après coloration de Gram.

- *Bacillus subtilis*

Ce sont des bacilles à Gram positif et des germes de l'environnement que l'on trouve partout sur le sol et dans la poussière. La thermorésistance de leurs spores explique que l'on puisse les trouver comme contaminants dans les produits supposés stériles. Ils sont aéro-anaérobies, mobiles par une ciliature péritriche, à l'exception de *B. anthracis* qui est toujours immobile. Ces bactéries se développent sur gélose ordinaire à 37 °C (figure 3.7) [140].

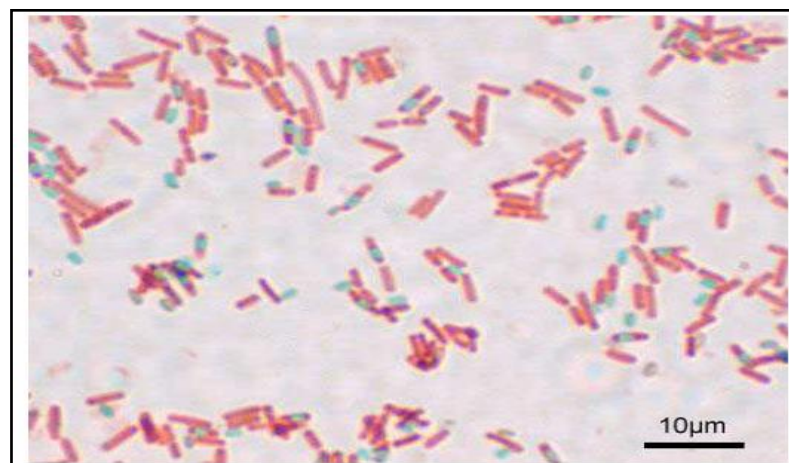


Figure 3.7 : Photographie de *Bacillus* observé au MP après coloration de Gram.

3.5. Les infections fongiques

La plupart des mycètes sont saprophytes, excepté les champignons parasites responsables de certaines maladies et qui peuvent infecter les êtres humains.

Toutefois, les agents des teignes ainsi que des dermatophytes sont pour leur grande majorité des champignons strictement parasites.

Le développement d'une pathologie fongique chez l'être humain dépend souvent des facteurs prédisposant comme l'augmentation accrue des patients immunodéprimés (pathologies concomitantes (SIDA), d'événements associés (intervention chirurgicale invasive, traitement antibiotique...) ou de facteurs environnementaux (conditions d'élevage favorisant les contacts rapprochés).

Comme le montre le tableau 3.2, il existe trois types de mycoses humaines fréquentes et universelles dans la pathologie fongique ou mycosique. Ce sont les dermatophytes, le Pityriasis versicolore et les candidoses cutanéomuqueuses. D'autres sont plus rares mais profondes et sévères [141].

Tableau 3.2 : Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme [141].

Type d'infection	Agent responsable	Site d'infection
Cryptococcoses	<i>Cryptococcus neoformans</i> .	Poumons, cerveau (méninges et liquide céphalorachidien).
Candidoses	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> .	Peau et muqueuses, tractus gastro-intestinal et sang.
Dermatophytoses	<i>Trichophyton</i> , <i>Microsporum</i> , et <i>Epidermophyton</i> .	Cuir chevelu ; peau et ongles.
Blastomycoses	<i>Blastomyces dermatitidis</i> .	Visage, mains et pied.
Sporotrichoses	<i>Sporothrix schenckii</i> .	Peau.

3.6. Les antifongiques

L'utilisation des antifongiques en pathologie buccale devient de plus en plus fréquente en raison de certains facteurs favorisants :

- troubles endocriniens (diabète, hypothyroïdie),
- prises de certains médicaments modifiant la sécrétion salivaire (psychotropes, antimétabolites),
- facteurs locaux (sécheresse buccale, diminution du pH salivaire, prothèse adjointe mal nettoyée).

On distingue habituellement deux entités d'infections fongiques : les mycoses superficielles survenant chez des sujets sains et les mycoses opportunistes observées chez les patients atteints de déficits immunitaires sévères (leucémies, chimiothérapies anticancéreuses, greffes d'organes, Sida).

La plupart des mycoses rencontrées au sein de la cavité buccale sont des candidoses buccales considérées comme étant des infections opportunistes et son traitement comporte les mesures d'hygiène bucco-dentaire, la prescription d'un traitement antifongique et l'élimination, sous peine de récurrences, du ou des facteurs ayant favorisé son développement (figure 3.8) [142].

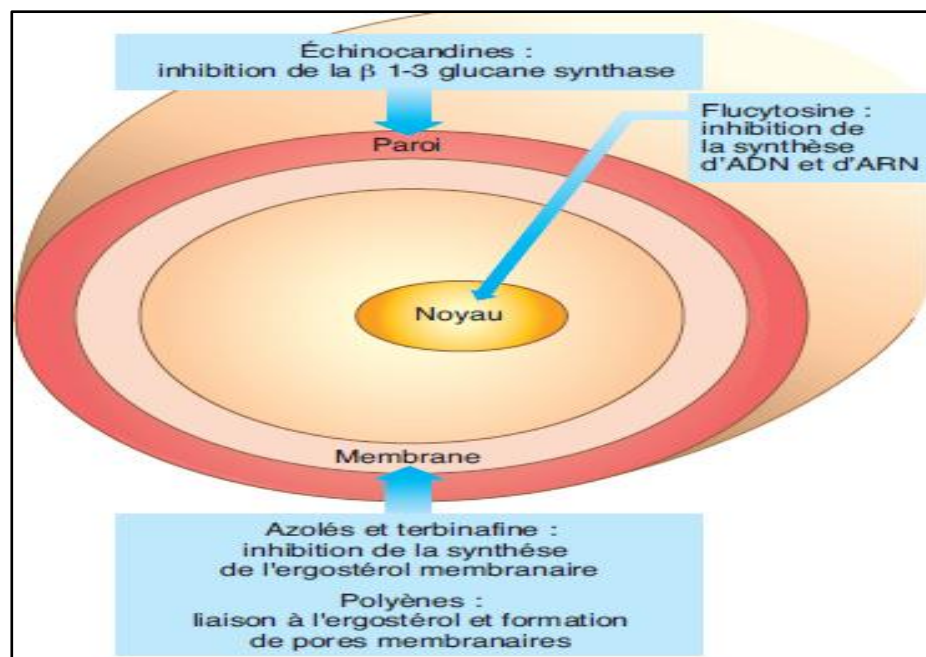


Figure 3.8 : Mode d'action des antifongiques [142].

Tableau 3.3 : Classe des antifongiques [142].

Antifongiques	Cible	Toxicité
Polyènes Amphotéricine B	Membrane fongique.	Fongicide.
Échinocandines Caspofungine	Paroi fongique.	Fongicide sur <i>Candida</i> . Fongistatique sur <i>Aspergillus</i> .
Azolés Voriconazole Itraconazole	Inhibition de la 14 α déméthylase (Ergostérol membranaire).	Fongistatique sur <i>Candida</i> Fongicide sur <i>C. krusei</i> , et <i>A. fumigatus</i>).
Fluorocytosine.	Acide nucléique.	Fongistatique.

3.6.1. Résistance aux agents antifongiques

Le développement de certains phénomènes de résistance fongique a été observé, ces dernières années, en parallèle avec l'utilisation croissante des antifongiques en prophylaxie et pour des traitements longs dans le cas de patients immunodéprimés.

La résistance peut se définir soit comme un phénomène *in vitro* lié à une augmentation de la CMI (concentration inhibitrice minimale) soit comme un phénomène clinique défini comme la persistance ou la progression d'une infection en dépit d'une thérapie antimicrobienne appropriée [143].

3.6.2. Les souches fongiques

➤ *Candida albicans*

C'est un champignon levuriforme unicellulaire qui mesure entre 4 à 6 μm de long. Contrairement aux autres mycètes pathogènes, *C. albicans* est un membre de la flore normale.

Si l'équilibre de la flore normale est troublé :

- Il se multiplie rapidement et peut provoquer des candidoses.
- Il se reproduit par bourgeonnement ou par des spores sur gélose de

Sabouraud.

Les colonies sont plates, assez denses, de couleur blanchâtre à beige et d'aspect laiteux. Sur bouillon nutritif, on obtient un trouble uniforme avec une tendance à donner un dépôt blanc [144] (figure 3.9).

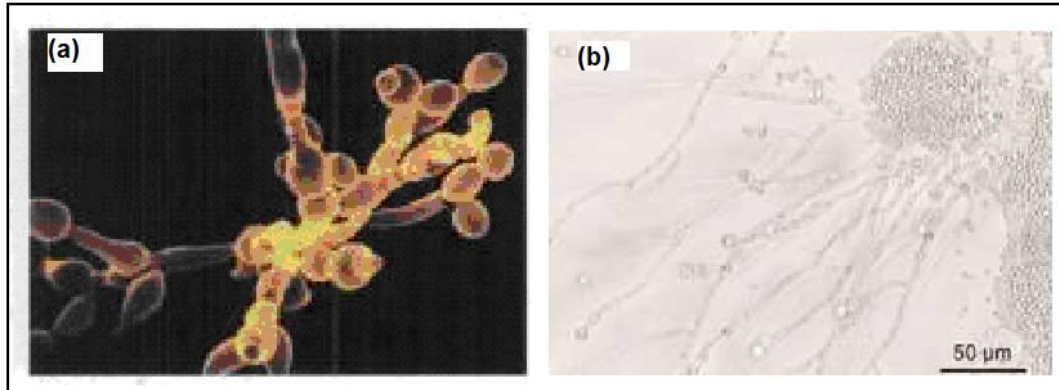


Figure 3.9 : Photographies montrant la souche de *Candida albicans*

(a) : MEB (G x 10.000) ;(b) : MP

➤ *Aspergillus*

La plupart des *Aspergillus* sont saprophytes et colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons.

Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent évoluer et devenir des parasites.

Les champignons appartenant à ce genre sont responsables de maladies chez l'homme et les animaux (aspergillose pulmonaire, allergies ou mycotoxicoses). Les espèces fongiques de types (*A. niger* et *A. flavus*) sont les principaux responsables des aspergilloses bronchiques allergiques (figure 3.10) [145].

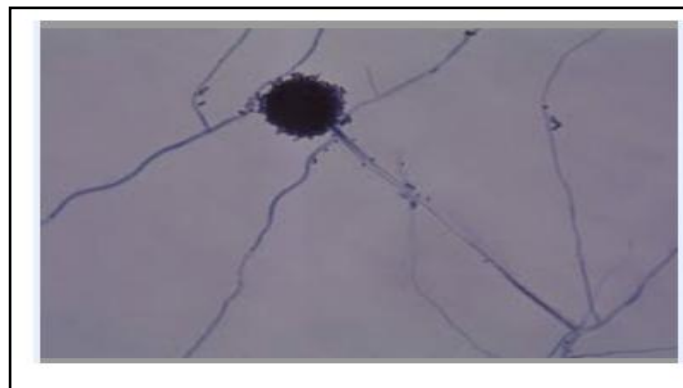


Figure 3.10 : Photographie de l'*Aspergillus* au MP après coloration de Gram.

3.7. Antibiogramme (ATB)

3.7.1 Introduction

L'antibiogramme standard est un test in vitro de sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques qu'on effectue par la technique de diffusion sur un milieu gélosé.

Il a pour but de guider le clinicien dans le choix d'un antibiotique pour :

- Traiter une infection bactérienne,
- Exploiter les données pour la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques (échange de données par le logiciel WHONET),
- Identifier le germe par la mise en évidence de résistances naturelles.

Le Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques applique les techniques de standardisation de l'antibiogramme préconisées par le CLSI (ClinicalLaboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et agréés par de nombreux pays.

La standardisation de la technique permet d'échanger des données grâce à un logiciel de saisie et d'exploitation fourni par l'OMS : le WHONET. Le CLSI et l'EUCAST (EuropeanCommittee on AntimicrobialSusceptibilityTesting) sont en concertation pour tenter d'unifier les techniques, les milieux, les charges des disques et les valeurs critiques.

➤ En Algérie, il existe un réseau de laboratoires chargé de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques [146].

➤ **But de la standardisation**

- Dépister rapidement et correctement les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.

- Surveiller l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans un pays.

- Echanger des données sur la résistance des bactéries aux antibiotiques entre laboratoires d'un même pays, d'un même continent puis avec les autres continents.

- Réduire le coût de l'antibiogramme.

- Orienter la prescription d'antibiotique.

- Contrôler la qualité de l'antibiogramme pour éviter les erreurs de lecture et d'interprétation.

➤ **Technique standardisée**

Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien doivent être déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé préalablement ensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester.

Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés. Le but étant de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition doit être proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

➤ **Paramètres importants**

La fiabilité des résultats d'un antibiogramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

- Le milieu de culture doit permettre la croissance de nombreuses bactéries et il ne doit pas contenir d'inhibiteurs de croissance d'antibiotiques. La teneur en calcium et en magnésium doit être contrôlée, car excès de cations bivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) inhibent l'action des polymyxines.
- Un pH trop acide augmente l'activité des β -lactamines alors qu'un milieu alcalin favorise les aminosides et les macrolides. Le pH neutre 7 permettant une bonne croissance bactérienne
- Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Mueller-Hinton. Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et les géloses doivent être refroidi avant l'emploi.

- La standardisation de l'épaisseur de la gélose détermine l'établissement du gradient et la valeur de la concentration en antibiotique à une distance donnée du disque. En effet, l'antibiotique contenu dans le disque se solubilise dans l'eau de la gélose.

La diffusion de l'antibiotique peut se faire en deux étapes comme le montre la figure 3.11 :

- Une diffusion verticale (en profondeur) dans le milieu contenu dans le cylindre délimité par le disque pré-imprégné,
 - Une diffusion horizontale (latéralement) qui répartit l'antibiotique selon un gradient de concentrations dont le maximum est située au niveau du disque, chaque disque est pré-imprégné d'une masse connue d'antibiotique appelée charge du disque [146].

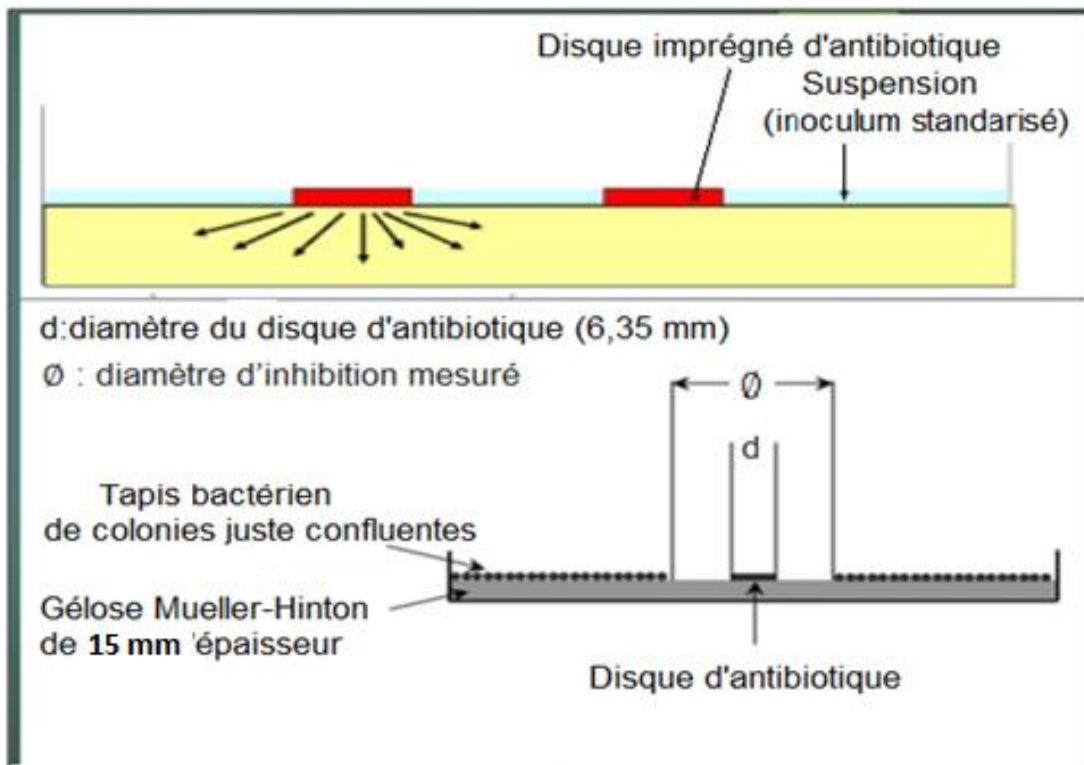


Figure 3.11: Schéma en coupe d'une gélose Mueller-Hinton utilisée pour un antibiogramme standard [146].

Il existe pour chaque antibiotique une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre du cercle concentrique au disque d'antibiotique appelée droite de concordance (figure 3.12).

On peut placer sur cette droite de concordance les concentrations critiques en antibiotique et en déduire les diamètres de diffusion correspondants. Plus on s'éloigne du disque d'antibiotique, plus la concentration en antibiotique diminue.

Ainsi donc, la concentration critique inférieure en antibiotique (CC_{inf}) est plus petite que la concentration critique supérieure en antibiotique (CC_{sup}). D'après la droite de concordance entre logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre de diffusion de l'antibiotique, on constate que le diamètre de diffusion de l'antibiotique de la concentration critique inférieure d (CC_{inf}) est plus grand que celui du $d(CC_{sup})$.

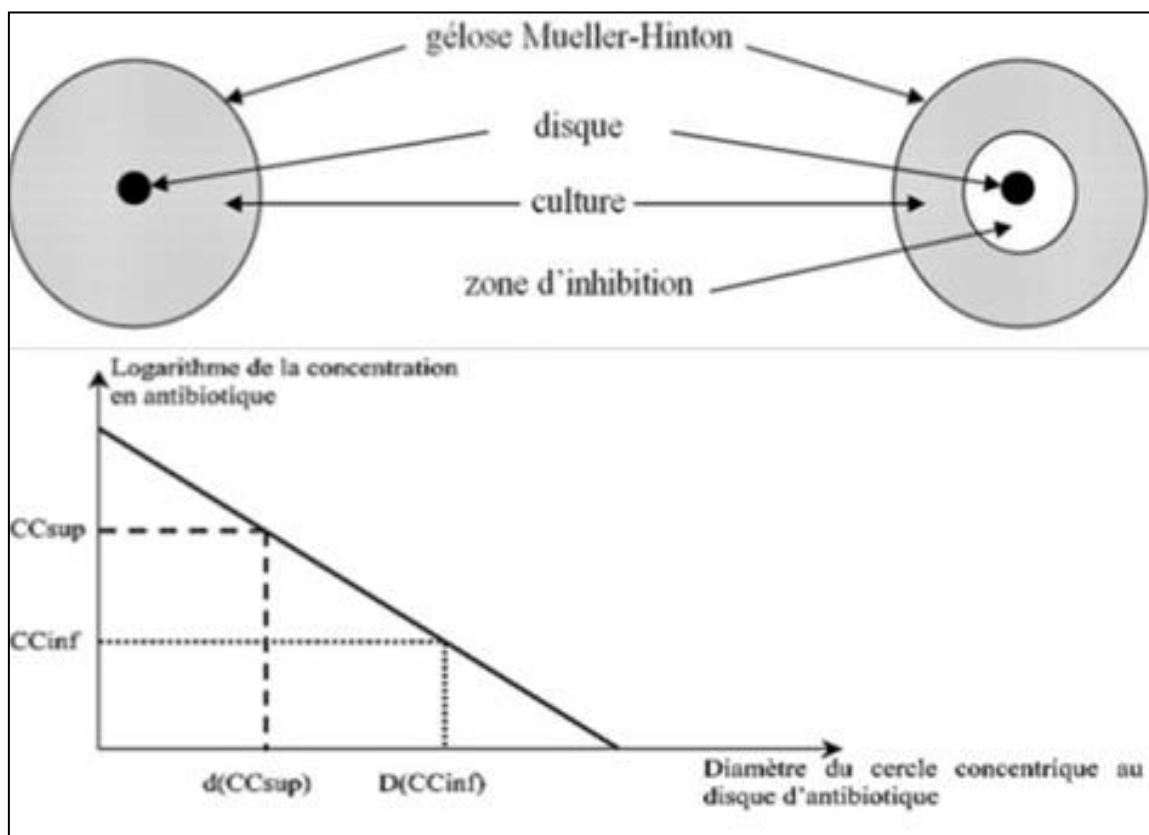


Figure 3.12 : Droite de concordance entre le logarithme de la concentration en antibiotique et le diamètre de diffusion de l'antibiotique [146].

CHAPITRE 4

MATERIEL ET MÉTHODES

4.1. Introduction

Ce chapitre décrit les procédures expérimentales détaillées utilisées dans :

- La synthèse d'hydroxyapatites substituées : dopées HAps-Zn et HAps-Mg) et co-dopées HAps-Zn/Mg.
- Les différentes techniques d'analyse utilisées dans la caractérisation des matrices HAps dopées et co-dopées.
- Les tests in vitro par emploi des différentes matrices élaborées (HAps dopées et HAps co-dopées) afin de comprendre et de modéliser leurs effets possibles sur l'activité antimicrobienne.

Les techniques suivantes ont été utilisées pour les analyses chimiques et structurelles:

- 1) La diffraction des rayons X (DRX) a été utilisée pour déterminer la pureté de la phase, le degré de cristallinité et la taille des cristaux des échantillons synthétisés.
- 2) La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) nous a permis d'identifier les différentes bandes d'absorption caractéristiques des hydroxyapatites.
- 3) La microscopie électronique à balayage (MEB) nous a révélé la morphologie interne des matrices préparées.
- 4) La technique de fluorescence des rayons X (XRF) a été adoptée pour identifier la composition chimique de ces matériaux.

4.2. Synthèse des nanopoudres HAps

Les poudres HAps dopées et co-dopées au Zn/Mg ont été préparées selon le procédé de précipitation en utilisant les produits $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99% de pureté ; $M_m=111$ g/mol) et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99% de pureté ; $M_m=141.96$ g/mol) comme sources de calcium et de phosphore respectivement.

Les réactifs ZnCl_2 (98%, $M_m = 136.28$ g/mol) et $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99% de pureté, $M_m=203,30$ g/mol), dissous dans l'eau, ont été utilisés comme des sels dopants.

Les différentes concentrations des réactifs introduits pour préparer les HAps sont énumérées dans le tableau 4.1.

Pour chaque composition, les fractions d'oligo-éléments Zn ou Mg sont représentées par le rapport molaire suivant: $r = 100 [\text{Zn ou Mg}] / [\text{Ca} + (\text{Zn ou Mg})]$ (% molaire).

Toutes les suspensions finales contiennent le même rapport molaire $[\text{M}^{2+}]/[\text{PO}_4^{3-}] = 1.667$ [43], où $M = \text{Ca} + \text{Zn} + \text{Mg}$.

Pour chaque matrice HAp à des mélanges de solutions de sel (CaCl_2) avec les sels de dopage sont préparés.

Comme indiqué dans le tableau 4.1., la précipitation consiste à mélanger dans un bécher, un volume de 100 mL de la solution de CaCl_2 avec 100 mL d'une solution de Na_2HPO_4 contenant du ZnCl_2 et/ou du MgCl_2 (sels de dopage) avec des quantités différentes.

Les conditions suivantes ont été utilisées pour obtenir les HAps substituées :

- La solution a été ajustée jusqu'à $\text{pH} = 9$ par additions progressives d'une solution aqueuse d'ammoniac à l'aide d'une pipette de 5 mL.
- Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation à 250 trs/min et chauffage à 90 °C pendant 5 heures. La température du mélange est contrôlée grâce à un thermomètre.
- A la fin de la réaction, les suspensions obtenues sont refroidies à l'air libre à température ambiante.

- Les suspensions ont été centrifugées pendant quelques minutes à 10000 trs/min dans une centrifugeuse (Modèle Beckman Coulter Centrifugeuse J6-MI).
- Mesures et vérification des pH des différents surnageants recueillis (figure 4.1).
- Les précipités obtenus sont lavés plusieurs fois (jusqu'à 5 fois) avec de l'eau désionisée jusqu'à ce que le pH du surnageant atteigne la neutralité (pH=7.0).
- Les produits solides obtenus (HAps) sont séchés à 105 °C pendant 24 heures, puis calcinés dans un four à moufle (Naberthem) à 900 °C pendant 1 heure [23,43]. Le rendement final de la réaction de synthèse des HAps est de l'ordre de 68 à 70%.
- Les précipités (HAps) obtenus sont broyés sous forme de poudres fines uniformes et pesés (à raison de 6 à 7g par échantillon), ensuite conservés dans des flacons sombres pour l'identification et l'application.

La réaction de formation des hydroxyapatites substituées aux Zn et/ou au Mg est exprimée comme suit:

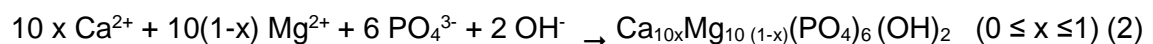
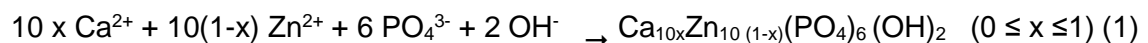


Tableau 4.1: Différentes quantités de réactifs utilisées dans la préparation des HAp dopées et co-dopées au Zn et/ou au Mg

Echantillon	n(Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O) mmol	n(CaCl ₂ ·2H ₂ O) mmol	n(ZnCl ₂) mmol	n(MgCl ₂) mmol	Formule chimique globale
HAp (non dopé)	60	100	0	0	Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂
HApZn 5	60	95	5	0	Ca_{9.5}Zn_{0.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApZn 10	60	90	10	0	Ca₉Zn₁(PO₄)₆(OH)₂
HApZn 15	60	85	15	0	Ca_{8.5}Zn_{1.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApMg 5	60	95	0	5	Ca_{9.5}Mg_{0.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApMg 10	60	90	0	10	Ca₉Mg₁(PO₄)₆(OH)₂
HApMg 15	60	85	0	15	Ca_{8.5}Mg_{1.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (1) 5	60	95	1.25	3.75	Ca_{9.5}(Zn+Mg)_{0.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (2) 5	60	95	2.50	2.50	Ca_{9.5}(Zn+Mg)_{0.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (3) 5	60	95	3.70	1.25	Ca_{9.5}(Zn+Mg)_{0.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (1) 10	60	90	2.50	7.50	Ca₉(Zn+Mg)₁(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (2) 10	60	90	5.00	5.00	Ca₉(Zn+Mg)₁(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (3) 10	60	90	7.50	2.50	Ca₉(Zn+Mg)₁(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (1) 15	60	85	3.75	11.50	Ca₉(Zn+Mg)_{1.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (2) 15	60	85	7.50	7.50	Ca₉(Zn+Mg)_{1.5}(PO₄)₆(OH)₂
HApcod (3) 15	60	85	11.50	3.75	Ca₉(Zn+Mg)_{1.5}(PO₄)₆(OH)₂

HApcod (1) :Zn25% ; Mg75% ; HApcod (2) :Zn50% ;Mg50% ; HApcod(3) : Zn75% ;Mg25%

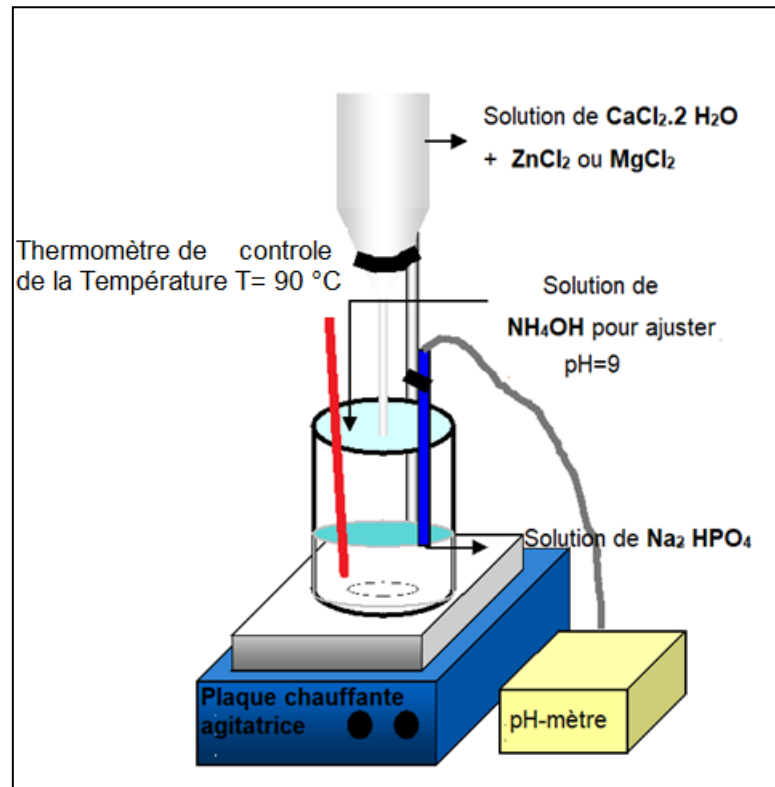


Figure 4.1 : Schéma représentatif montrant le dispositif de synthèse des hydroxyapatites

4.3. Diffraction des rayons X(DRX)

Pour la caractérisation DRX, 200 mg de la poudre d'échantillon ont été broyées dans un mortier et pilon de marbre.

Les différentes poudres d'HAp synthétisées ainsi préparées ont été analysées par un diffractomètre de type D8 Advance Eco (Bruker), avec un rayonnement $\text{Cu.K}\alpha$ ($= 1.5418 \text{ \AA}$) généré à 40 kV et 25 mA (au laboratoire de Chimie Physique Moléculaire et Macromoléculaire (LCPMM) Blida 1).

Les données ont été recueillies sur une plage de l'angle de Bragg 2θ allant de 20 à 60° (pas de 0.010° ; temps de comptage 0.2 s) et les tailles des cristallites ont été calculées à l'aide de l'équation de Debye-Scherrer.

Les données d'analyse de DRX ont été utilisées pour identifier les phases, la cristallinité, la pureté des poudres HAp ainsi que les détails de leur propriétés cristallographiques (telle que la taille des cristaux).

Pour l'étape d'identification de phase, les diagrammes de diffraction des rayons X ont été comparés directement aux données du comité de normes de diffraction des poudres (JCPDS, Carte n° 09432) telles que fournis par le Centre International de Données sur la Diffraction (ICDD).

Les phases, ci-dessous, les plus comparables pour Mg et Zn ont été identifiées et rapportées dans la section résultats et discussion:

- β -TCP-Mg (JCPDS 01-70-1787),
- brucite $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$ (JCPDS 07-0239),
- oxyde de magnésium (JCPDS 00-04683),

La cristallinité des échantillons HAp a été évaluée en comparant les rapports des pics des échantillons étudiés à ceux d'un échantillon de référence totalement cristallin [147].

Le pourcentage de cristallinité est basé sur les diagrammes de diffraction de rayons X obtenus entre 10° et 60° (2θ). Il a été calculé en utilisant l'équation suivante [147] :

$$X_C = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \quad \text{Eq 4.1}$$

Où

I_{300} représente l'intensité de la réflexion (300)

$V_{112/300}$ représente l'intensité du vide entre les réflexions (112) et (300).

La taille des cristaux des précipités a été estimée à partir de l'équation de Debye-Scherrer.

Selon cette équation, la seule dimension cristalline perpendiculaire au plan (h k l) (nm) peut être estimée à partir de l'élargissement du pic de la manière suivante:

$$D = \frac{K \alpha}{F W H M \cdot \cos \theta} \quad \text{Eq 4.2}$$

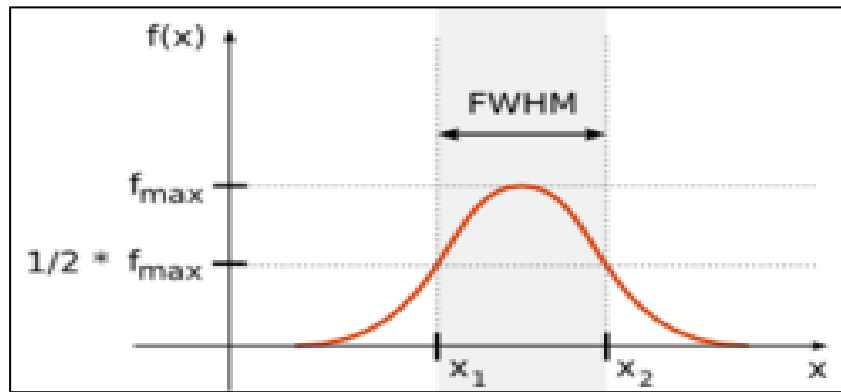


Figure 4.2 : Schéma représentatif montrant la FWHM.

où les paramètres suivants représentent :

D : la taille du cristal en nm; K : la constante de Scherrer (0,9) pour le solide HAp hexagonal) ; α : la longueur d'onde du faisceau de rayons X monochromatique (0,15418 nm); FWHM : est la largeur à mi-hauteur de pic de diffraction / largeur totale entre deux valeurs ; θ : l'angle de diffraction ($^{\circ}$).

Dans les échantillons à structures apatitiques et pour la ligne d'élargissement du plan (002), la réflexion a été utilisée pour évaluer la taille moyenne des cristaux qui correspond à l'axe cristallographique « c » . .

Dans le cas de la structure cristalline hexagonale des HAp, les paramètres de réseau notés par (a = b), et c ont été déterminés à partir de la relation entre la distance (d) de deux plans adjacents et les indices (h k l), en utilisant l'équation ci-dessous [147] :

$$\frac{1}{d^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad \text{Eq 4.3}$$

où d est déterminé par la loi de Bragg en connaissant la longueur d'onde (λ) et l'angle de diffraction de Bragg (2θ).

Dans cette méthode, pour chaque raie (hkl), l'espacement des réseaux des plans (hkl) peut être calculé par l'équation suivante:

$$d_{hkl} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad \text{Eq 4.4}$$

Où θ est obtenu à partir du modèle DRX.

Le paramètre d'axe c peut être calculé à partir des pics (00l). A noter qu'un paramètre d'axe peut être calculé en prenant en compte tous les pics (hkl).

Cependant et étant donné que toute erreur dans la mesure de la valeur exacte de θ produit des erreurs dans $\sin\theta$ et par la suite dans le paramètre de réseau calculé, il est important de choisir les pics qui minimisent cette erreur.

Ainsi donc, l'erreur dans la fonction $\sin\theta$ serait minimale si θ est proche de 90° .

Par conséquent, il est plus précis d'utiliser des pics proches de $\theta = 90^\circ$ pour minimiser les erreurs dans $\sin\theta$. S'il y a plus de pics dont l'angle θ est proche de 90° ($\theta = 90^\circ$), tous les pics seront pris en compte pour évaluer la valeur moyenne des paramètres de réseau.

Dans notre cas, les données suivantes ont été utilisées pour l'évaluation des paramètres :

$$a = b; \alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ; \text{groupement spacial : } P6_{3/m}$$

4.4. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) est une technique d'analyse chimique qui génère une empreinte moléculaire des échantillons.

Elle est basée sur les vibrations des atomes qui sont soumis à un rayonnement infrarouge passant et mesure le rapport du rayonnement incident est absorbé à une énergie particulière [148].

Comme l'échantillon est exposé à différentes longueurs d'onde des radiations infrarouges, les transitions entre les niveaux d'énergie de vibration de diverses liaisons chimiques sont détectées. Elles permettent d'identifier les groupes fonctionnels au sein des molécules de l'échantillon.

Les spectres obtenus, caractéristiques de l'absorption/émission infrarouge à différents niveaux de longueur d'onde peuvent être utilisés pour définir la composition chimique de l'échantillon.

Dans cette étude, l'IR-TF a été utilisé pour confirmer davantage la composition chimique des échantillons.

Les conditions suivantes ont été utilisées dans l'analyse IRTF (au laboratoire de Chimie Physique Moléculaire et Macromoléculaire (LCPMM) Blida 1). :

- Spectrophotomètre Shimadzu (Japon) FTIR-4100.
- La préparation de l'échantillon consistait à mélanger (plage de 400 à 4000 cm^{-1} nombre de balayages 32; résolution de 4 cm^{-1}).
- Des mélanges de poudres séchées (1 mg de HAp dopée ou pure et 250 mg de KBr) ont été convertis en pastilles transparentes à une pression de 8 tonnes, Une lecture de fond a été effectuée avant de collecter les spectres des échantillons.

4.5. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) ou Scanning Electron Microscopy (SEM en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière.

La morphologie et la microstructure des échantillons HAp ont été observées à l'aide d'un MEB Thermo-Fisher Quanta 250 (tension d'accélération de 15 à 20 kV; avec une distance de 10 à 10.2 mm) au centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC de Bousmail).

4.6. Fluorescence X (FRX)

La fluorescence X (FRX) est une technique d'analyse élémentaire permettant de comprendre la composition chimique.

La composition des échantillons est basée sur la mesure de la forme spécifique des faisceaux de rayons X émis après qu'un faisceau de rayons X est dirigé depuis une source externe à l'intérieur de la machine à rayons X [149].

Les échantillons ont été séchés et réduits en poudre comme décrit pour l'analyse DRX. L'opération consiste à disperser uniformément 1 g d'échantillon de poudre sur un film de Mylar de 2 μm d'épaisseur, tendu sur un porte-échantillon.

Les concentrations atomiques de Ca, P, Zn et Mg dans les précipités ont été déterminées par l'appareil de type (PANalytical Epsilon 3-XL apparatus) au laboratoire de Physique Fondamentale et Appliquée (FUNDAPL) Blida 1. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque échantillon et la valeur moyenne a été calculée.

Des échantillons de référence de chaque ion ont été préparés en mélangeant une quantité connue du sel de nitrate solide dans la poudre de HAp pure puis analysés par fluorescence X.

Les courbes standards ont été créées en mesurant la réponse XRF pour 3 concentrations différentes de chaque cation (5%, 10% et 15% en moles de Zn^{2+} et Mg^{2+} dans la matrice HAp pure). Les résultats correspondants ont été utilisés, par la suite, pour calculer la précision et la concentration de chaque composant dans les échantillons des différentes HAp substituées.

4.7. Souches microbiennes

Le support bactérien est constitué de cinq souches bactériennes de références sous forme de lots "American Type Culture Collection ATCC" et "Collection de l'institut de pasteur Paris". Ce sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Le support fongique est constitué de deux souches fongiques de références sous forme de lots "American Type Culture Collection ATCC" : *Candida albicans* ATCC 24433, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Toutes les souches microbiennes référenciées sont fournies aimablement par :

- Le Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé-Département de Biologie-Université de Blida,
- Le Laboratoire de Contrôle Microbiologique du groupe SAIDAL-MEDEA,

- Le Laboratoire d'Hygiène de la Wilaya de Blida,

Ces souches ont été choisies à cause de leurs fréquences élevées de résistance et surtout de leurs pathogénicités dominantes.

Les disques sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations précises. Ils sont clairement identifiés par un sigle, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque.

- Les disques se présentent sous forme de cartouches (Série de 50 disques conditionnés en containers étanches contenant un dessicant.

- La date de péremption et le numéro de lot figurent sur chaque conditionnement (cartouche et container).

- Les cartouches de disques doivent être conservées dans leur container entre +2 et + 8 °C à sec.

- Le laboratoire a pour responsabilité de stocker les disques dans des conditions optimales et de ne pas utiliser des disques périmés.

- Avant utilisation, les disques doivent être amenés à température ambiante.

- Toute cartouche ouverte doit être utilisée dans les cinq jours.

➤ **Taille de l'inoculum**

La densité de l'inoculum de la culture jeune est un élément primordial. La suspension cellulaire doit être préparée dans de l'eau physiologique stérile à partir d'une culture jeune et pure sur un milieu d'isolement approprié.

Elle doit être ajustée à l'aide d'un photomètre ou par comparaison avec un étalon d'opacité (échelle de McFarland) (figure 4.3).

L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

En Algérie, l'antibiogramme par diffusion est réalisé avec une suspension calibrée à 0.5 McFarland. La lecture des absorbances de 0.08 à 0.10 est effectuée à la longueur d'onde appropriée de 625 nm et à environ 108 bactéries par mL.

Ce dernier nombre est porté à 109 pour l'espèce *Helicobacter pylori* qui est équivalent au standard McFarland 3.

Les normes McFarland originelles ont été établies en mélangeant des quantités spécifiées de chlorure de baryum et d'acide sulfurique. Le mélange des deux

composés forme un précipité de sulfate de baryum, ce qui rend la solution trouble. Un étalon de standard 0.5 McFarland est préparé en mélangeant 0.05 ml de chlorure de baryum à 1.175% dihydraté ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), avec 9.95 ml d'acide sulfurique à 1% (H_2SO_4). La norme peut être comparée visuellement à une suspension de bactéries dans une solution saline ou un bouillon nutritif stérile (Figure 4.3) .



Figure 4.3 : Standards McFarland de turbidité utilisés pour la préparation des suspensions de microorganismes [146].

4.7.3 Technique d'ensemencement

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

Il est réalisé par écouvillonnage ou par inondation de telle façon à avoir, après incubation un tapis de colonies.

Dans ces opérations, Il faut respecter les mesures de sécurité nécessaires suivantes :

- La précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité,
- La performance des réactifs utilisés dans les tests,
- La performance du personnel qui effectue les tests et la lecture,
- La procédure de contrôle selon les recommandations du Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques. Le contrôle de qualité doit se faire à chaque arrivée de lots de Mueller-Hinton et/ou d'antibiotiques.
- Le laboratoire devrait vérifier la validité de sa technique en testant, au moins une fois par mois, la sensibilité des souches de référence et vérifier

que les diamètres des zones d'inhibition obtenues vis-à-vis des divers antibiotiques sont conformes aux valeurs publiées par le comité de l'antibiogramme.

Les souches de référence testées sont : *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 25923; *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; *S. pneumoniae* ATCC 43152 et *Bacillus subtilis* ATCC 9372,

Les souches fongiques : *Candida albicans* ATCC 24433, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Si les résultats ne sont pas satisfaisants, il faudra contrôler chacun des paramètres suivants :

- La lecture et l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition,
- Le milieu de culture,
- L'inoculum,
- Les disques d'antibiotiques et les souches de référence.

➤ **Lecture des résultats**

Après incubation à la température et sous atmosphère recommandées, les diamètres des zones d'inhibitions seront mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse. Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée.

Les diamètres des zones d'inhibitions mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par (CLSI) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories : Résistant, Intermédiaire ou Sensible. Ces critères de catégorisation clinique, établis selon les diamètres critiques, sont remis à jour périodiquement par le CLSI.

➤ **Rédaction des résultats :**

Le compte-rendu des résultats d'un antibiogramme standard sera réalisé en reportant les diamètres d'inhibition mesurés \emptyset pour chaque antibiotique et les diamètres critiques dans un tableau.

➤ **Milieux de culture**

Les géloses utilisées sont : la gélose nutritive le saboureaud (IP d'Alger), la MULLER- HINTON (IP d'Alger).

➤ **Enrichissement et préparation des cultures jeunes**

Les souches conservées sont enrichies dans des milieux liquides d'enrichissement, incubés à l'étuve à 37° pendant 24 – 48h.

Après l'incubation, les tubes sont retirés, repiqués sur gélose et ré-incubés encore une fois à l'étuve. Les cultures obtenues (dites cultures jeunes) seront utilisées pour les préparations d'inoculum microbien.

Les conditions de l'incubation et les milieux utilisés sont appropriées pour chaque souche microbienne.

➤ **Test antimicrobien par la méthode de diffusion de disque sur gélose**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des échantillons synthétisés par l'aromatogramme a été réalisée par la méthode de diffusion sur un milieu gélosé.

Les tests ont été effectués au niveau du Laboratoire d'Hygiène de la Wilaya de Blida-Algérie.

➤ **Préparation de l'inoculum**

Cette préparation de l'inoculum consiste à effectuer les opérations suivantes :

- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 2 à 3 colonies bien isolés et identiques sont raclées à partir d'une culture pure et jeune sur le milieu d'isolement,
- Diluer le contenu de la pipette dans 10 mL d'eau physiologique stérile à 0.9 %,
- Mesurer la densité optique de l'inoculum par un densitomètre DEN-1 (Grant-Bio), à 620nm.
- L'inoculum bactérie peut être ajusté à 0,5 McFarland en l'ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort, et il doit êtreensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

➤ **Ensemencement**

Dans l'ensemencement, il faut effectuer les opérations suivantes:

- Tremper un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée (inoculum).

- Essorer en le passant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même,
- Passer l'écouvillon sur périphérique de la boîte de Pétri à la fin de l'ensemencement.
- Recharger l'écouvillon à chaque fois, dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes.

➤ Doses et application des disques

La technique repose principalement sur le dépôt, à l'aide d'une micropipette d'un volume de 10 µL, différentes suspensions d'hydroxyapatites (500 mg/mL) dans le DMSO (Diméthylsulfoxyde) sur les disques de 06 mm (Biorad-France). Les dépôts sont effectués sur les géloses appropriées.

Les essais sont répétés trois fois avec des témoins positifs de disques d'antibiotiques : Gentamycin (15 µg) ; Ciproflaxacin (5 µg) de référence (Bio-maximas S.A Poland) par rapport aux bactéries étudiées et de disque antifongique : Nystatin (50 µg) de référence (Himedia India) par rapport aux champignons testés, le dimethyl sulfoxyde (DMSO de purté 99% ; Mm=78,13 g/mol) de référence (Sigma-Aldrich Germany) comme témoin négatif.

➤ Lecture et interprétation

Les zones d'inhibition autour des disques sont mesurées avec un pied à coulisse (en mm) après une incubation de 24 heures à 37 °C pour les bactéries testées, 48 heures à 25 °C pour les levures (*C.albicans*) et 120 heures à 30 °C pour les moisissures (*A. niger*).

L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HAp sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées sensibles ou très sensibles, ou résistantes [150] :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 6 mm.
- Peu sensible (+) : diamètre compris entre 6 à 10 mm.
- Sensible (++) ou intermédiaire : diamètre compris entre 11 à 15 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 15 mm.

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

5.1.1 Hydroxyapatites non dopées, dopées et co-dopées

Afin d'étudier les conséquences de la substitution d'ions sur la structure de l'hydroxyapatite et les caractéristiques chimiques et physiques, un échantillon d'hydroxyapatite non substituée a été préparé (en utilisant la même méthode de préparation) et utilisé comme échantillon de référence tout au long de cette étude. Nous le notons par HAp.

La figure 5.1 illustre que les valeurs de l'angle de Bragg 2θ (en degrés) attribuées à la phase hydroxyapatite donnent les principaux pics de l'hydroxyapatite stœchiométrique qui apparaissent à : 29 ; 32 ; 34 ; 40 ; 47 ; 48 et 50 et correspondent aux différents plans (hkl) (210), (112), (202), (310), (222), (312) et (321), respectivement répertoriés par la base de données de fichiers de diffraction standards JCPDS (PDF N° 70-0794). Les deux diffractogrammes se superposent parfaitement.

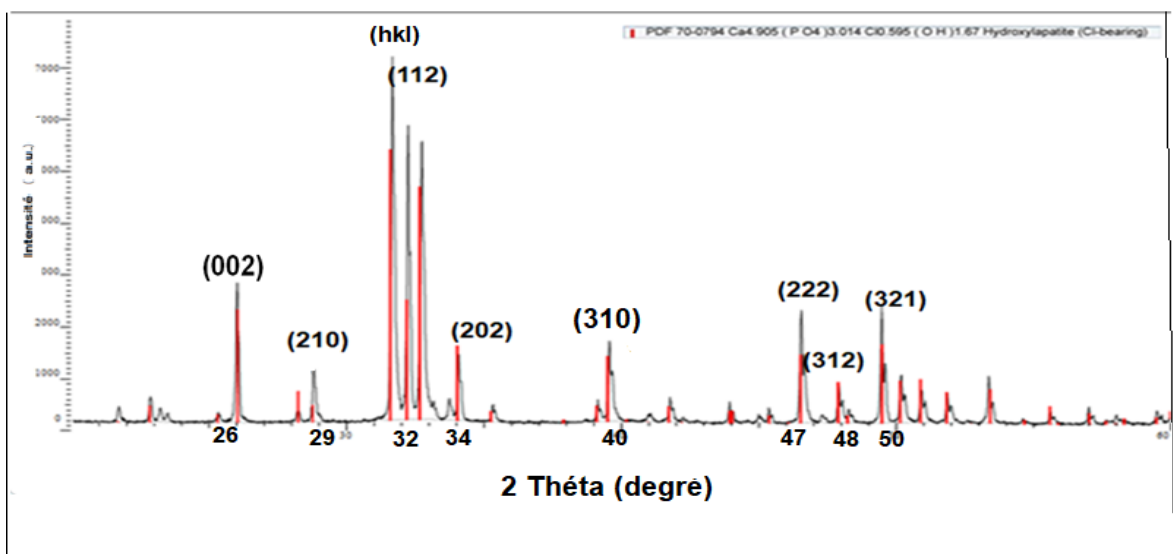


Figure 5.1: Diagramme DRX de HAp non dopée.

Cet échantillon d'hydroxyapatite non substitué a été comparé aux deux hydroxyapatites dopées par les deux ions Zn^{2+} (HAp-Zn) et Mg^{2+} (HAp-Mg) à différentes concentrations de Zn et de Mg.

Comme indiqué précédemment dans la section « matériel et méthodes » (Chapitre 4), l'analyse DRX a été utilisée, non seulement, pour identifier les phases cristallines, mais aussi, pour déterminer le degré de cristallinité et la taille du cristal.

Les diffractogrammes des échantillons HAp simples et HAp dopées sont illustrés à la figure 5.2.

L'examen de ces courbes DRX fait apparaître les principaux pics caractéristiques de l'hydroxyapatite HAp répertoriés par le comité mixte sur les normes de diffraction des poudres (JCPDS), PDF no° 70-0794 pour HAp stœchiométrique [151].

Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus antérieurement par certains auteurs [151-152].

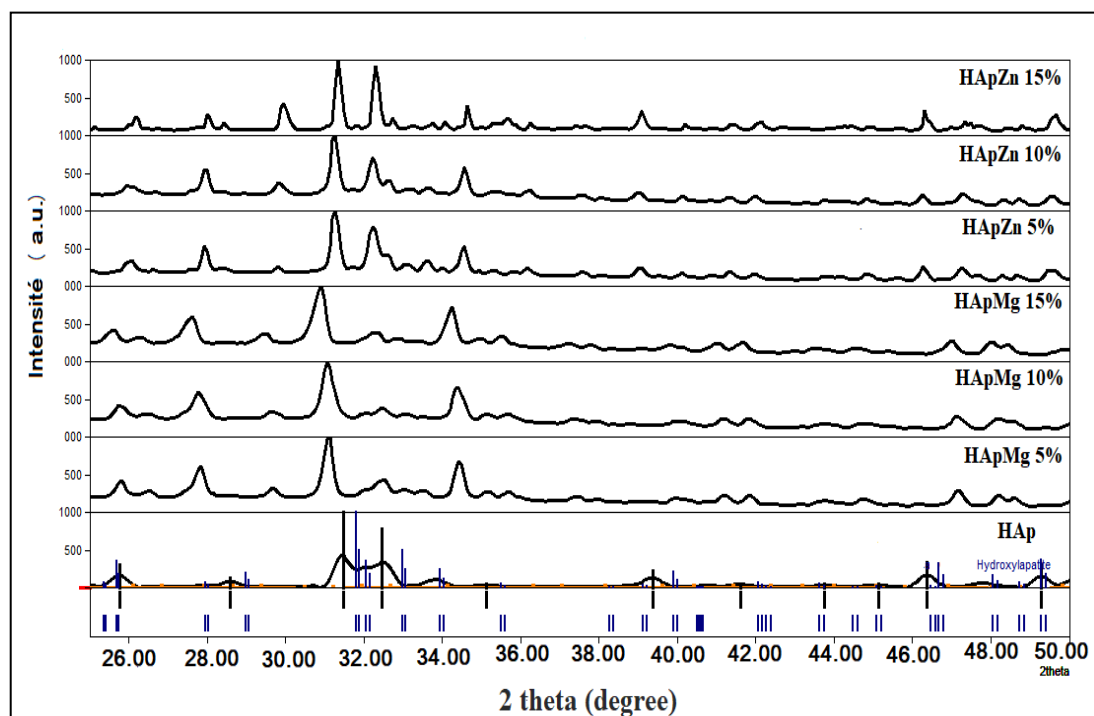


Figure 5.2: Diagrammes DRX des différents échantillons étudiés (HAp non dopée et HAp-Zn/Mg dopées).

Les paramètres en termes de cristallinité, taille de cristal et degré de cristallinité des HAp non substituées et substituées ont été calculés en utilisant l'équation de Debye-Scherrer (citer dans la section 4.1. « Matériel et méthodes »).

➤ Identification de la phase HAp -Zn

Les diagrammes DRX de tous les échantillons d'hydroxyapatites substituées en zinc sont illustrés dans la figure 5.2.

L'examen de ces diffractogrammes montre des élargissements des raies situées à $2\theta = 32^\circ$ et suggèrent donc la formation de petits cristaux d'apatite.

Les pics caractéristiques des supports HAp sont détectés aussi dans tous les diagrammes des HAp dopées de type HAp-Zn (5%, 10% et 15%), montrant par-là, la conservation de leurs structures apatitiques après les opérations de substitutions isomorphiques.

Cependant, comme le montre la figure 5.2, une nouvelle phase plus prononcée a été identifiée dans le diffractogramme de la matrice HAp-Zn (15%) attribuée à la présence de phosphate de zinc et de calcium hydraté ou de Parascholzite ($\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; voir Appendice B.3).

➤ Identification de la phase HAp-Mg:

Les spectres de diffraction des rayons X de toutes les hydroxyapatites substituées au magnésium HAp-Mg (5%, 10% et 15%) sont illustrés dans la figure 5.2.

Ces diffractogrammes font apparaître les phénomènes suivants :

- Un décalge de la plupart des raies d'environ 1° vers les faibles valeurs de l'angle de Bragg ($2\theta = 31^\circ$ pour les HAp-Mg) en comparaison avec ceux du support précurseur non dopé (HAp simple).
- Un élargissement de tous les pics au fur et à mesure que le taux de substitution du Mg augmente.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons proposer les conclusions suivantes :

- L'absence de l'oxyde MgO (JCPDS n° 00-04683) et de la brucite ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) (JCDs n° 07-0239) dans tous les diffractogrammes des HAp-Mg

confirment clairement la substitution des cations Ca^{2+} par ceux de Mg^{2+} dans le réseau cristallin des HAp. Néanmoins, l'emplacement de la substitution reste très difficile à identifier à partir de ces données.

- les ions Mg^{2+} de substitution engagés dans les structures des différentes HAp provoquent des déformations dans leurs réseaux cristallins et entraîne la formation de HAp déficientes en calcium. Les résultats de DRX et de IRTF confirment ces conclusions qui est sont en parfait accord avec celles avancées antérieurement par Adzila et al. [153].
- Il apparait clairement qu'une augmentation de la concentration de Mg de 5% à 15% en moles entraîne l'apparition d'une nouvelle phase unique de type Whitlockite-Mg [$\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6(\text{PO}_3)\text{OH}$] appelée aussi Mg- β -TCP (JCPDS n°01-70-1787) qui apparait avec des pics localisés à $2\theta = 31,30^\circ$ [154].

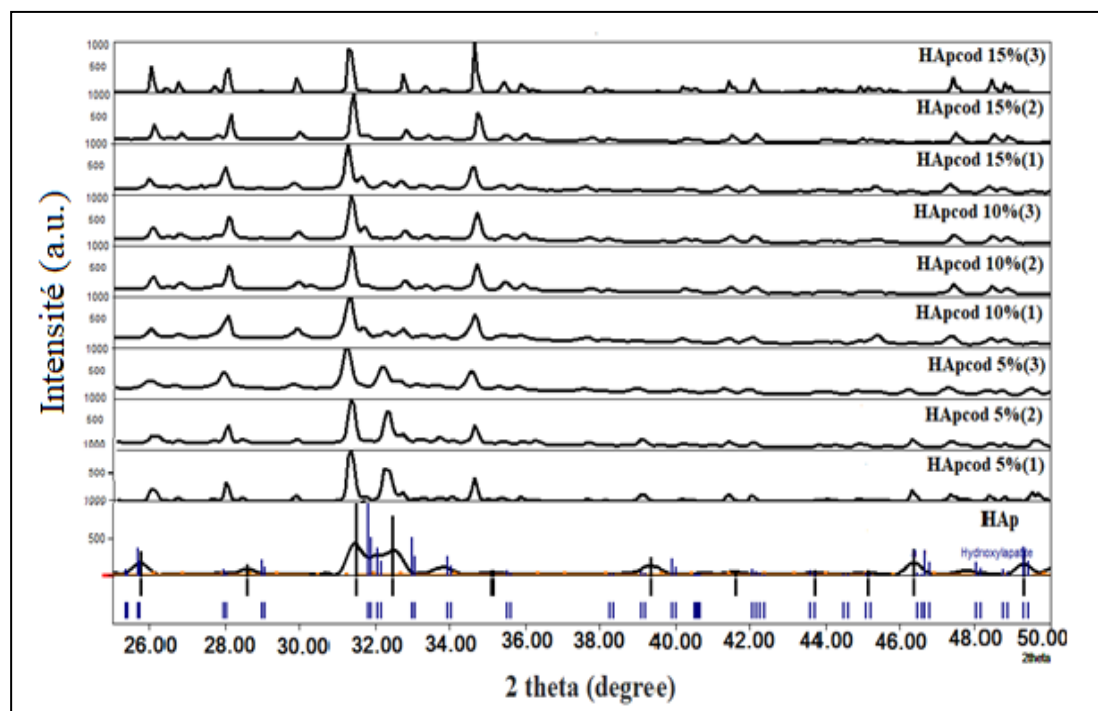


Figure 5.3: Diagrammes DRX des différents échantillons: (a) HAp non dopée, HAp co-dopées (1): Zn 25% + Mg 75%; (2): Zn 50% + Mg 50%; (3): Zn 75% + Mg 25%).

La figure 5.3 présente les diagrammes de diffraction des rayons X des poudres de nanocristaux HAp co-dopées contenant différentes fractions de Zn et de Mg.

De façon globale et sur la base de ces diffractogrammes, nous enregistrons les résultats suivants :

- Toutes les phases minérales solides ont été identifiées, grâce à la base de données de fichiers de diffraction standard JCPDS.
- Les raies attribuées à la phase hydroxyapatite sont similaires et apparaissent de façon claire dans les spectres des différents échantillons HAp co-dopés (5-15% en mol) (par rapport au PDF n° 70-0794 ; Figure 5.1).
- Toutes ces raies sont comparables à celles rapportées antérieurement par d'autres auteurs ayant travaillé sur les HAp substitués par le zinc et/ou le magnésium [155].
- Ces pics correspondent au modèle HAp standard (PDF # no° 70-0794 ; Figure 5.1). Ils révèlent clairement que l'incorporation des ions Mg et/ou Zn ne modifie pas la cristallinité des nanocristaux de HAp.
- Comme la montre la figure 5.3, une augmentation de la proportion de dopage entraîne l'apparition de nouvelles phases indésirables de types parascolzite $\text{Ca}_{19}\text{Zn}_2(\text{PO}_4)_{14}$ (PDF # 48-1196) ou de la phase whitlockite $\text{Ca}_{2.81}\text{Mg}_{0.19}(\text{PO}_4)_2$ (PDF # 70-0682) ; (voir Appendice C.6).
- Les tailles de particules ont été calculées à l'aide de l'équation de Debye-Scherrer (tableau 5.1), le plan de diffraction (002) étant pris en compte pour le calcul de la taille des cristallites avant leur mise en forme et leur isolation.
- Lorsque la concentration de Zn dans les cristaux de HAp-Zn substitués atteint une concentration de 10% en moles, la phase scolzite $\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_{2,2}\text{H}_2\text{O}$ (PDF n° 27-0095 ; Appendice C.4) est détectée.
- La difficulté significative pour les cations divalents tels que Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} et Cu^{2+} de se substituer au Ca^{2+} dans la structure d'hydroxyapatite a été déjà rapportée par certains auteurs [155].

Arrivés à ce stade de notre étude, nous jugeons utile de rappeler que :

- la substitution des ions Ca^{2+} par ceux de Zn^{2+} ou Mg^{2+} dans l'hydroxyapatite a pu apparaître grâce à la méthode de précipitation synthétique.
- Cette substitution isomorphe semble provoquer des déformations au niveau du réseau cristallin des HAp.
- La cristallinité des HAp diminue lorsque la concentration en ions magnésium et/ou zinc augmente (tableau 5.1), comme l'ont montré précédemment Adzila et al. [153].
- Ce pourcentage de cristallinité est évalué à partir de l'équation 3 présentée dans la section 4.2 "Matériel et méthodes (chapitre 4)".

Les données expérimentales de la cristallinité et de celles de la taille des HAp-Mg, obtenues par l'analyse DRX, indiquent que l'incorporation des ions Mg^{2+} affectent, à la fois, la cristallinité et la taille des cristaux de HAp tel qu'indiqué sur la figure 5.1. Aussi, elle provoque des élargissements des raies et des réductions de leurs intensités dans les structures biphasiques cristallisées (β -TCP + HAp) des échantillons HAp.

Certains auteurs [100] constatent, en effet, que la substitution isomorphe par le magnésium affecte le degré de cristallinité et la taille des cristaux des dopées HAp-Mg.

Ceci suggère une contraction plus prononcée dans le cas de la phase β -TCP pour les concentrations les plus élevées de Mg^{2+} due à la substitution des cations plus gros de Ca^{2+} (rayon ionique $R_I = 0.099$ nm) par des cations plus petits de Mg^{2+} ($R_I = 0.072$ nm).

La phase de Whitlockite n'est détectable que lorsque le taux de substitution en ions Mg^{2+} est compris entre 10 et 15 % en moles. Le seuil minimal étant de 5% en moles.

Tableau 5.1: Taille des cristallites et cristallinité des poudres HAp synthétisées

Echantillon	Plan (hkl)	FWHM β (radians)	Taille des cristaux (nm)	Cristallinité (%)
HAp	002	0.337	25.1	44
HApZn 5	002	0.181	50.5	82
HApZn10	002	0.239	32.2	57
HApZn15	002	0.239	32.2	57
HApMg5	002	0.288	29.2	60
HApMg10	002	0.288	28.5	50
HApMg15	002	0.288	28.2	48
HApcod(1)5	002	0.191	44.3	77
HApcod(2)5	002	0.191	44.2	75
HApcod(2)5	002	0.191	44.1	74
HApcod(1)10	002	0.191	44.4	78
HApcod(2)10	002	0.191	44.2	75
HApcod(3)10	002	0.191	44.1	74
HApcod(1)15	002	0.191	44.1	74
HApcod(2)15	002	0.227	36.8	65
HApcod(3)15	002	0.227	36.7	64

FWHM β est la différence de moitié largeur du pic intense / largeur totale entre deux valeurs (en radians).

5.2. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

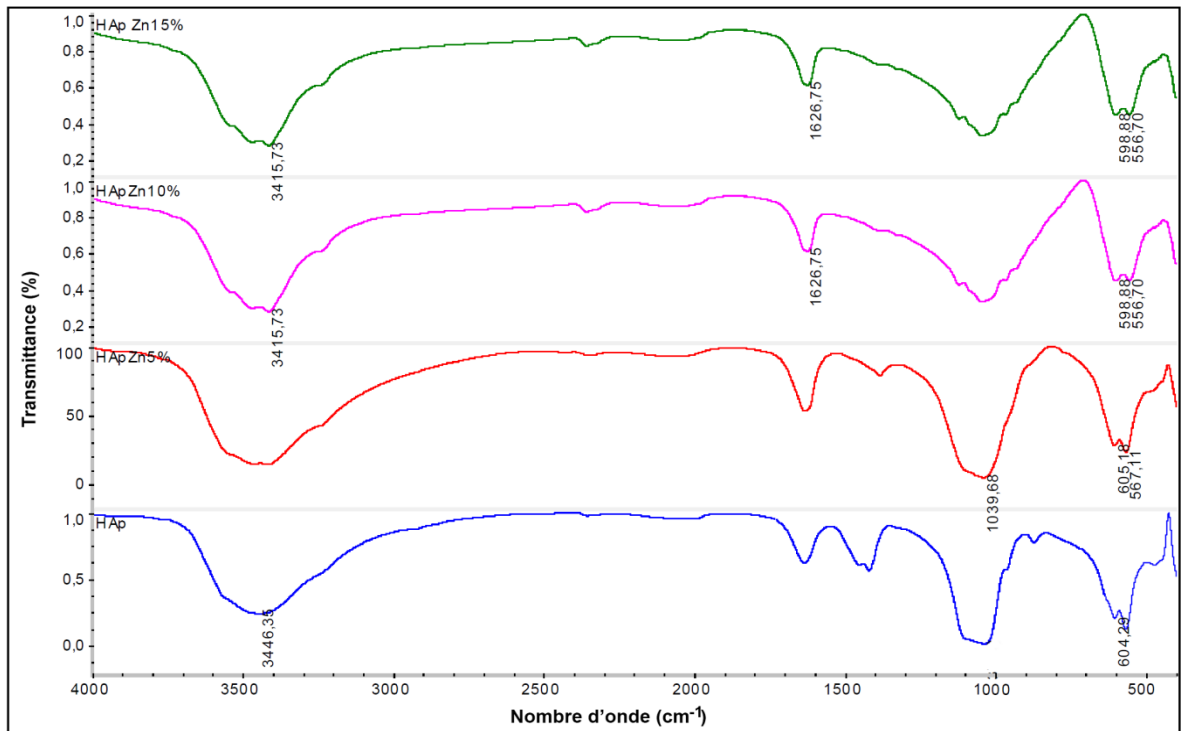
Les spectres IRTF des différents échantillons étudiés (HAp, HAp-Zn, HAp-Mg et HAp-Zn/Mg) sont illustrés dans les figures 5.4 à 5.5.

Les bandes d'absorption correspondantes ainsi que leurs affectations sont résumées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 : Position et attribution des bandes d'absorption infrarouge de l'hydroxyapatite.

Position des bandes (cm⁻¹)	Attribution des bandes
474	PO ₄ ³⁻ (Déformation symétrique)
530	HPO ₄ ²⁻ (Déformation HO-PO ₃)
571-601	PO ₄ ³⁻ (Déformation asymétrique)
630	OH ⁻ (Bande de vibration)
875	HPO ₄ ²⁻ (Elongation P-OH)
962	PO ₄ ³⁻ (Elongation symétrique)
1046-1087	PO ₄ ³⁻ (Elongation asymétrique)
1180-1200	HPO ₄ ²⁻ (Déformation dans le plan des groupements OH ⁻)
1630	H ₂ O (Déformation des molécules d'eau liées par des ponts H)
3000-3400	H ₂ O (Elongation symétrique des molécules d'eau liées par des ponts H)
3560	OH ⁻ (Elongation symétrique)

(A)



(B)

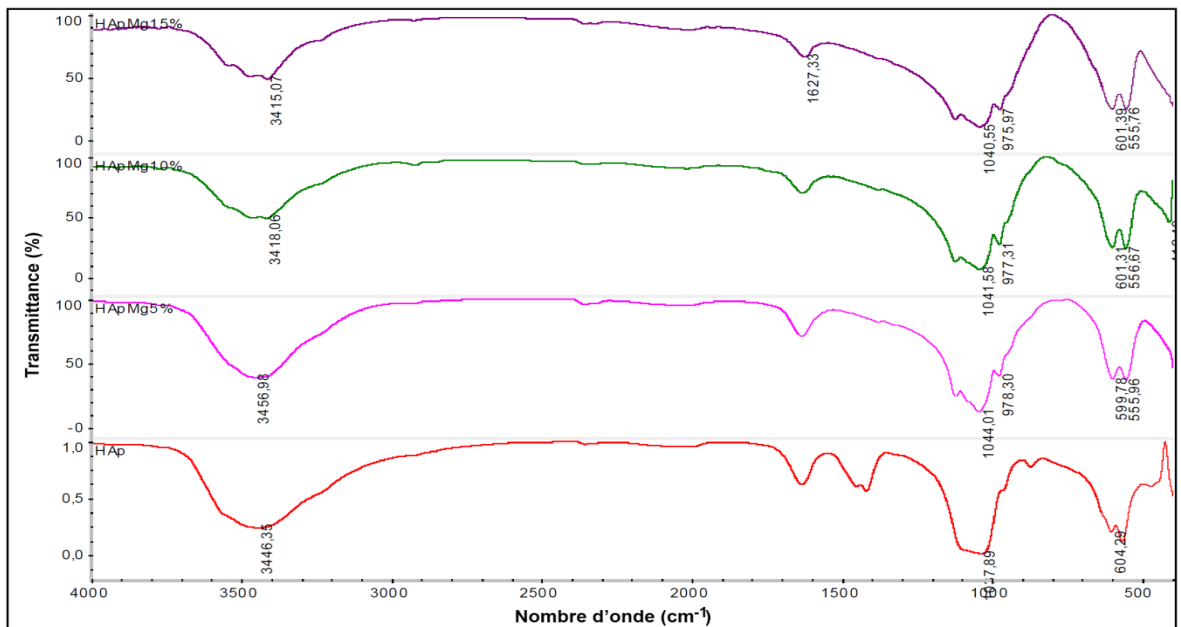


Figure 5.4: Spectres IR-TF des différents échantillons de HAp

(A) : HAp non dopée et HAp-Zn (dopées à différentes concentrations).

(B) : HAp non dopée et HAp-Mg (dopées à différentes concentrations).

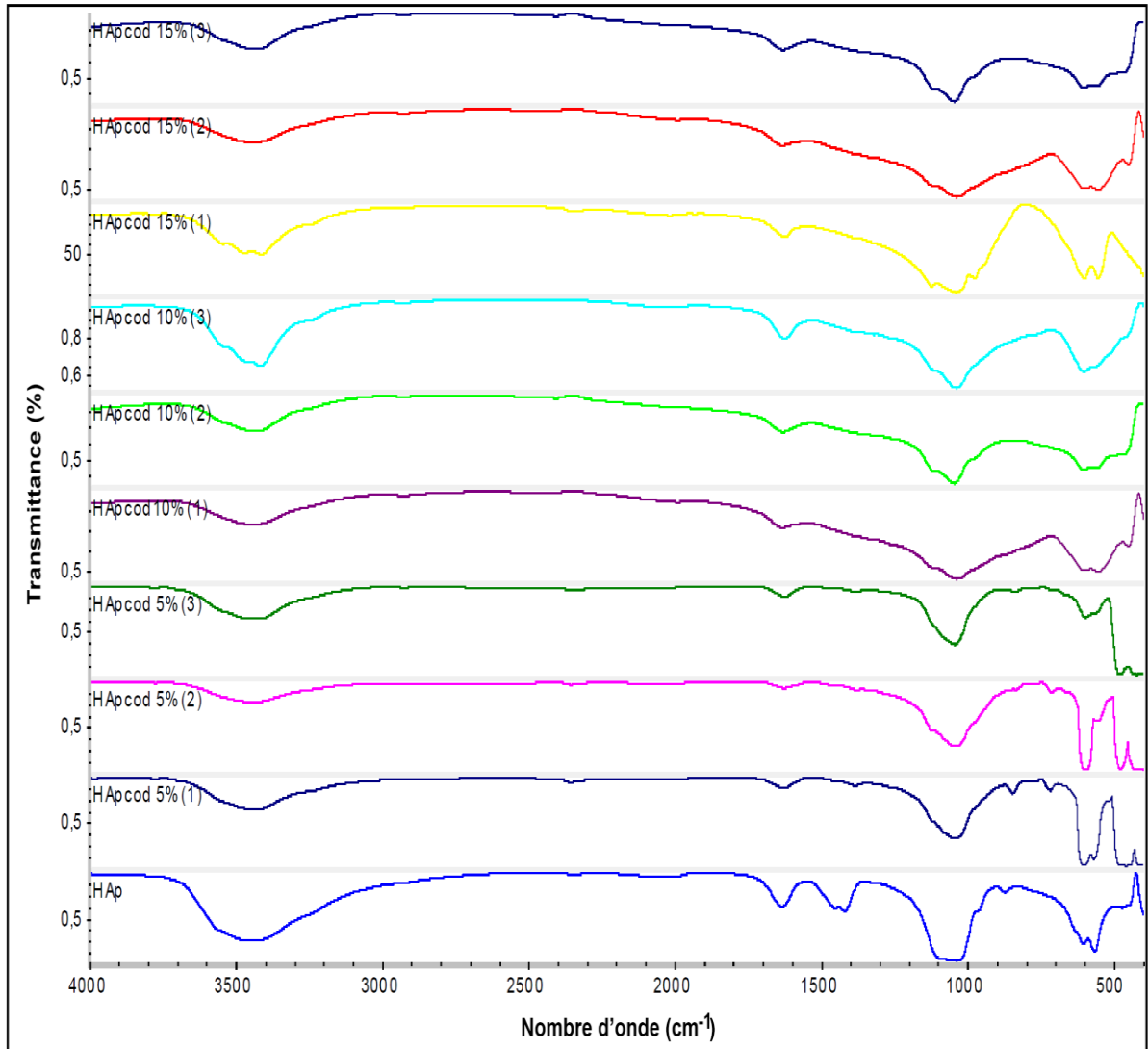


Figure 5.5: Spectres IR-TF des différents échantillons de HAp Co- dopées (5,10, et 15% mol)

((1) : Zn 25% + Mg 75%; (2): Zn 50% + Mg 50%; (3): Zn 75% + Mg 25%).

L'examen de ces spectres fait apparaître les bandes d'absorption suivantes :

Modes de vibration fondamentale (PO_4^{3-}) :

Les bandes relatives aux phosphates (PO_4^{3-}) apparaissent à 598, 605, 977 et (1020-1120) cm^{-1} confirment donc la présence de la phase apatite dans l'ensemble des poudres étudiées HAp, HAp-Zn et HAp-Mg.

En augmentant la concentration de Zn de 5 à 15%, les bandes attribuées au groupement PO_4^{3-} sont apparues à 562 et 600 cm^{-1} tandis que les bandes d'étirement PO_4^{3-} étaient centrées à 1039 cm^{-1} et à 1089 cm^{-1} lorsque la concentration de Zn atteint 15% comme le montre la figure 5.4 (A).

Les mêmes bandes de groupes PO_4^{3-} (598, 605, 975 et 1020-1120 cm^{-1}) de la phase apatite sont toujours présentes dans tous les échantillons de HAp-Mg. De plus, les pics PO_4^{3-} , qui sont présents aux alentours de 1044 cm^{-1} , ont été progressivement fusionnés en un large pic centré autour de 1162 cm^{-1} comme la montre la figure 5.4(B), ces changements impliquaient l'apparition d'une nouvelle phase (Whitlockite) lorsque l'apatite est substituée au Mg lorsque la teneur en Mg atteignait les 10% mol. Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'analyse DRX.

Pour les HAp co-dopées, la figure 5.5 présente les bandes de déformation symétrique du groupement PO_4^{3-} qui se déplacent vers les 600 cm^{-1} et s'élargissent à 1100 cm^{-1} et leurs intensités diminuent au fur et à mesure que la concentration en ions dopants augmente et dépasse les 10%. Cela pourrait être lié à l'incorporation de ces ions dans la structure de l'apatite.

Groupe HPO_4^{2-}

La bande de vibration fondamentale de groupe HPO_4^{2-} qui est localisée dans la région 910 cm^{-1} et dans la gamme 1190-1200 cm^{-1} apparaît moins intense quand la concentration en Zn augmente dans la série de HAp-Zn. Elle est due probablement à la formation d'une nouvelle phase dite scholzite identifiée dans l'analyse DRX. D'autre part, cette même bande s'intensifie lorsque la concentration de l'ion dopant Mg^{2+} augmente dans la série HAp-Mg (figure 5.4 (B)).

À une concentration de 10% de HAp co-dopée, le spectre IR-TF présente un motif similaire à celui de 5% et une large bande de HPO_4^{2-} située à 1100 cm^{-1} et affiche une résolution plus faible.

En outre, l'élargissement du pic devient plus important lorsque la concentration des ions dopants augmente, suggérant probablement une déformation de la structure de l'apatite [156].

Groupes OH⁻

Les bandes situées à 630 et à 3470 cm⁻¹ sont représentatives des groupes OH⁻ de la phase apatite et de l'eau adsorbée, qui apparaissent pratiquement dans tous les spectres IR-TF des différentes séries de HAps étudiées.

Cependant, la réduction de la résolution aux environ de 634 cm⁻¹ peut être attribué au mode de libération des ions OH⁻ [70, 157-158].

Les bandes associées à OH⁻ apparaissant aux alentours de 3570 cm⁻¹ sont plus larges et indiquent que l'incorporation des ions de Zn ou de Mg par substitution dans la structure apatite a induit des changements significatifs.

Pour le spectre de la série co-dopée, une large bande entre 3300 et 3700 cm⁻¹ est attribuée à la présence de molécules d'eau. Un chevauchement est possible dans cette région, en particulier à 3571 cm⁻¹, associé à la présence des groupes OH⁻.

Eau d'hydratation

Les bandes liées à l'eau d'hydratation (molécules adsorbées sur les cristaux) sont bien visibles dans les spectres IRTF dans les intervalles 3446-3600 cm⁻¹ (HAp), 3415 et 3500 cm⁻¹ (HAps-Zn) ; 3456–3500 cm⁻¹ (HAps-Mg) et à 3400- 3600 cm⁻¹(HAps-cod Zn/Mg).

Une large bande située à 3500 cm⁻¹ est attribuée aux molécules d'eau adsorbées sur les cristaux HAps-Zn. L'introduction d'ions Mg²⁺ dans les matrices HAps via un échange de cations de surface avec des cations Ca²⁺ en solution semble entraîner une augmentation de l'intensité globale dans la bande asymétrique H₂O (figure.5.5).

La bande attribuée à la déformation des molécules d'eau liées par des ponts Hydrogène (H) est située à 1626 cm⁻¹ pour (HAps-Zn) et 1627 cm⁻¹

pour (HAp-Mg). Pour les matrices (HAp-cod Zn/Mg), cette bande se déplace vers 1650 cm^{-1} (HAp-cod Zn/Mg)

Carbonates CO_2^{3-}

Le petit pic situé à 1430 cm^{-1} est lié à la présence des carbonates dans le réseau cristallin des HAp. Ces carbonates incorporés proviennent de la solubilisation du CO_2 de l'air dans l'eau.

Pour la matrice HAp-Mg, la bande attribuée aux carbonates (CO_2^{3-}) est plus prononcée à environ 1660 cm^{-1} [159].

Ammonium NH_4^+ :

Une bande caractéristique des nitrates (groupes ammonium NH_4^+) est bien observée à 1423 cm^{-1} dans les spectres. Elle est due aux résidus d'ammonium encore présents dans les échantillons synthétisés [160-161].

D'après les spectres d'absorption infrarouge, nous pouvons confirmer la pureté de toutes les phases obtenues dans les séries d'HAp synthétisées.

5.3 Analyse de microscopie électronique à balayage MEB

L'analyse microscopique MEB est utilisée, non seulement pour vérifier l'homogénéité des échantillons, mais aussi, pour examiner l'effet du substituant sur la structure d'apatite.

Sur la base des images de la microscopie électronique à balayage MEB, la morphologie des poudres de l'apatite est fortement affectée par la présence de zinc et/ou de magnésium.

Les images du MEB des différents échantillons de HAp décrits à la figure 5.6, fournissent des informations utiles, à la fois, en termes de forme et de taille de ces nanoparticules solides.

De façon globale, la morphologie de surface de ces nanocristaux HAp non dopées (figure 5.6.a) révèle de nombreuses agglomérations donnant naissance à de petites particules sphériques de tailles nanométriques allant de 280 à 430 nm comme le confirment Ferraz et al. [162].

La matrice HAp-Zn se présente comme étant une nanoparticule sous forme d'aiguilles ressemblant à une rose de sable. Cette forme est due à la substitution isomorphe des ions Ca^{2+} (rayon ionique cristallin $R = 0.099 \text{ nm}$) par des ions Zn^{2+} ($R = 0.074 \text{ nm}$) et / ou Mg^{2+} ($R = 0.064 \text{ nm}$) au sein des différentes matrices de HAp-Mg. Ces constatations sont en accord avec les recherches menées par Abidi et Murtaza [163].

Comme le montre la figure (5.6.c), les nanoparticules d'hydroxyapatites (HAp-Mg) semblent fortement agglomérées à cause de la maturation d'Ostwald. De plus, la distribution des nanoparticules reste presque uniforme avec une taille moyenne de l'ordre de 545 nm à 560 nm.

Pour les HAp co-dopées (HAp-cod 15%mol), la figure (5.6.d) montre que la morphologie des poudres est fortement affectée par la présence des cations Mg^{2+} et/ou de Zn^{2+} et confirme donc l'augmentation du degré d'agglomération avec l'augmentation de la teneur en substituant.

De ce fait, nous pouvons conclure que les nanoparticules (HAp non substituée, HAp-Zn, HAp-Mg, HAp-cod Zn/Mg) se présentent sous diverses morphologies qui sont semblables à des aiguilles (HAp-Zn, HAp-Mg et HAp-cod Zn/Mg) et à des sphères (HAp non substituée). Ces deux types de forme conviennent à de nombreuses applications technologiques.

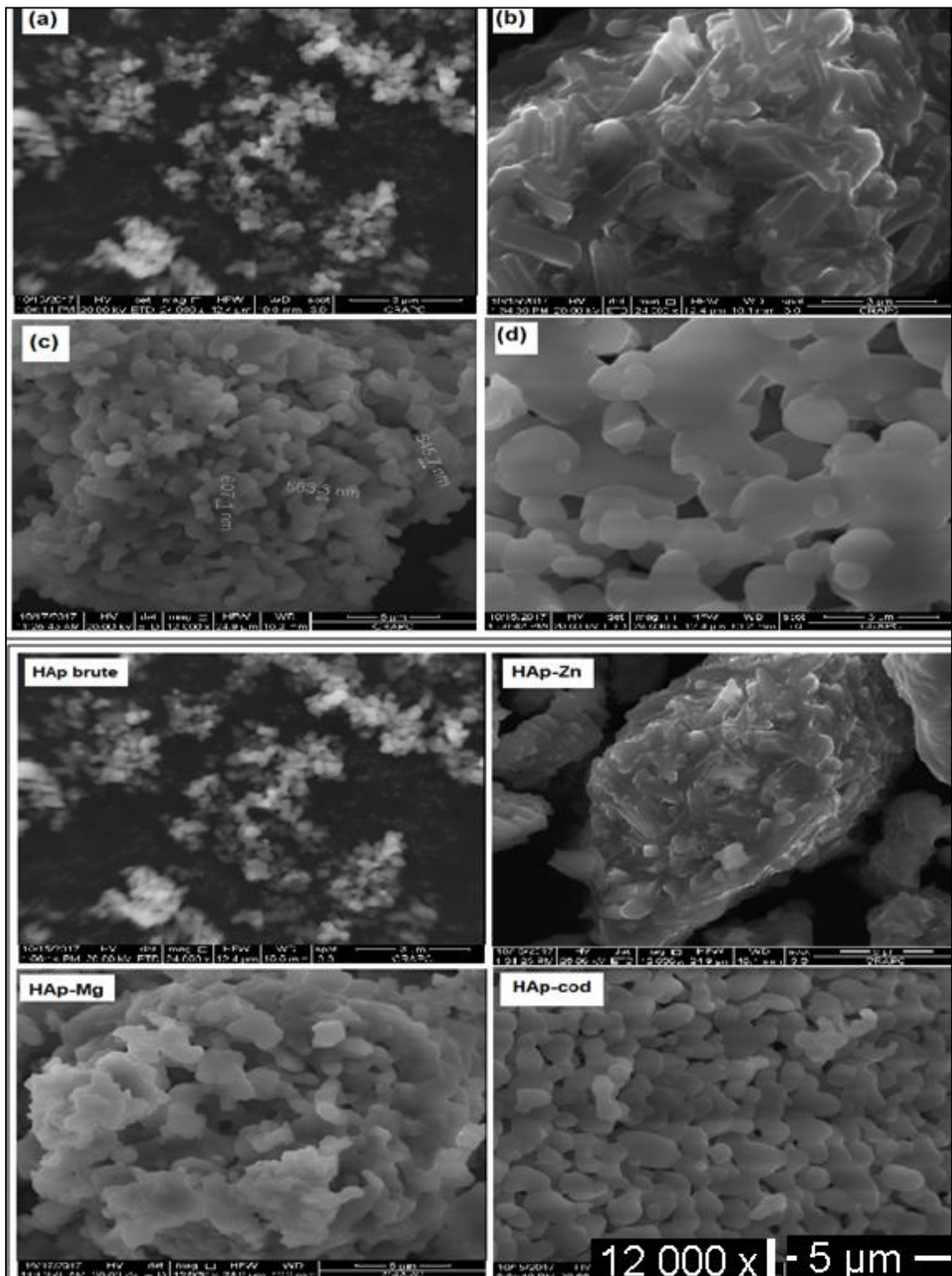


Figure 5.6: Images MEB de produits HAPs utilisées:
 (a) HAP (non dopée); (b) HAP- Zn 15 mol%; (c) HAP-Mg 15 mol%; (d) HAP co-
 dopée 15 mol%; (2): Zn 50% + Mg 50%.

5.4. Analyse FRX

Les résultats de l'analyse par diffraction des rayons X sont complétés par ceux de la chimie semi-quantitative par fluorescence des rayons X (FRX).

Le tableau 5.3 détaille les mesures FRX liées à la teneur en Zn ou en Mg dans les différentes HAp et HAps (co) dopées.

Ce tableau répertorie également les valeurs du rapport molaire $\{[Ca^{2+}] + [M^{2+}]\} / [PO_4^{3-}]$.

Les rapports Ca/P dans la matrice HAp non substituée et (Ca+X)/P (où X est le cation substituant de Ca^{2+}) dans HAp substituée ont été fixé à 1.67 au départ et dans les conditions normales, comme indiqué au chapitre 4 (section 4.1),

Dans le précurseur (HAp non substituée), le rapport Ca/P est égal à 1.7 qui est proche à celui fixé au départ dans la synthèse des HAps (1.67). Selon certains auteurs [164], cette légère augmentation pourrait être due au remplacement des ions phosphates par des ions carbonates CO_3^{2-} résultant de la solubilisation du CO_2 atmosphérique dans le milieu réactionnel aqueux.

5.4.1. FRX de l'hydroxyapatite substitué au Zn (HAps-Zn)

Le tableau 5.3 montre les résultats obtenus par FRX relatifs à la teneur en Zn dans les échantillons solides HAps-Zn (5, 10 et 15% en Zn), ainsi que les valeurs correspondantes de rapport (Ca+Zn)/P calculées à partir des résultats obtenus par l'analyse FRX

Ces résultats montrent, de façon claire, que les concentrations totales finales de Zn sont respectivement de l'ordre de 5,95 ; 10,4 et 16% en poids) qui correspondent aux proportions de Zn introduites dans les trois mélanges (5, 10 et 15% en moles) et ceci après leur substitution. Toutefois, le rapport (Ca+Zn)/P \approx 2) a légèrement augmenté par rapport à celui introduit lors de la synthèse qui était de 1,67 [24].

5.4.2. FRX de l'hydroxyapatite substituée au Mg (HAps-Mg)

Le tableau 5.3 montre les résultats obtenus par FRX relatifs à la teneur en Mg dans les nanopoudres HAps-Mg ainsi que les valeurs du rapport $(Ca+Mg)/P$.

Ces résultats montrent que la substitution de Mg dans les structures HAps des trois mélanges est traduite par les quantités de Mg introduites finalement (tableau 5.3). Cette substitution est traduite par une légère baisse du rapport $(Ca+Mg)/P$ allant de 2,16 à 2,04 pour la matrice (HAps-Mg).

5.4.3. FRX de l'hydroxyapatite co-substituée au Zn et au Mg (HAps-Zn/Mg)

Pour tous les échantillons de HAps (co) dopés, ces résultats mettent en évidence la présence régulière de Ca et de P en tant qu'éléments essentiels des hydroxyapatites, à environ 36 et 15% en poids, respectivement, ainsi que la présence d'éléments Zn et Mg dans les HAps co-dopées.

Comme le montre le tableau 5.3, l'augmentation de la concentration en Zn ou en Mg dans les mélanges initiaux du co-dopage des HAps induit l'incorporation du zinc ou de magnésium avec des quantités de l'ordre de ppm et un rapport $(Ca+M)/P$ variant entre 2.1 et 1.9. Cela peut être expliqué par l'adsorption de l'ion dopant à la surface de la matrice HAp.

Le rapport molaire $(Ca+M)/P$, quant à lui, est supérieur à la valeur théorique 1.67 en raison de la substitution des ions dopants (incorporation de Zn et/ou Mg) dans le réseau cristallin des poudres HAps (co) dopées et de la présence d'autres phases solides telles que la scholzite et la whitlockite.

Tableau 5.3: Résultats des mesures de fluorescence X(FRX) des différentes nanopoudres.

Echantillon (mol%)	Element (poids %)				Rapport molaire (Ca+M)/P	Rapport molaire Théorique (Ca/P)
	Ca	P	Zn	Mg		
HAp	36.30	16.52	–	–	1.70	1.67
HApZn 5	37.06	14.18	5.95	–	2.27	1.67
HApZn 10	32.65	14.56	10.46	–	2.07	1.67
HApZn 15	30.68	14.94	16.15	–	2.01	1.67
HApMg 5	39.10	14.64	–	1.05	2.16	1.67
HApMg 10	39.73	15.91	–	2.40	2.12	1.67
HApMg 15	35.81	15.46	–	3.04	2.04	1.67
HApcod(1)5	38.64	14.72	3.88	0.35	2.15	1.67
HApcod(2)5	36.98	15.02	2.02	0.37	1.97	1.67
HApcod(3)5	41.50	15.30	0.92	0.99	2.08	1.67
HApcod(1)10	36.23	16.48	5.14	1.76	1.97	1.67
HApcod(2)10	36.44	15.73	0.57	0.75	1.79	1.67
HApcod(3)10	32.15	14.96	7.91	0.66	1.90	1.67
HApcod(1)15	33.46	15.40	1.28	2.56	1.93	1.67
HApcod(2)15	38.94	15.23	0.08	1.83	2.13	1.67
HApcod(3)15	36.86	14.69	2.14	0.96	1.90	1.67

5.5. Étude de l'activité antimicrobienne

5.5.1. Antibiogramme de différentes poudres d'HAPs dopées et Co-dopées

L'activité antimicrobienne des différentes poudres HAPs dopées et co-dopées, synthétisées dans la présente étude par la méthode de précipitation, a été testée in vitro contre cinq bactéries (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*) et deux souches de champignons (*C. albicans* et *A. niger*).

La figure 5.7 illustre la zone d'inhibition des tests antimicrobiens suivants [132] :

- Gentamycine et ciprofloxacine en tant qu'antibiotiques contre les différentes bactéries.
- Nystatine en tant que contrôle antifongique positif avec des souches fongiques, en plus du contrôle négatif avec du DMSO en tant que solvant de dilution.

Les résultats et les photographies correspondantes sont présentés respectivement dans les figures 5.7, 5.8 ,5.9 et 5.10.

Le modèle Fischer (Individual 95% CIS) présente des groupes similaires (a, b, c) bien visibles sur les histogrammes. Il indique aussi le même pouvoir inhibiteur de ces nanoparticules sur les différentes souches étudiées. A noter que les tests soient significatifs que si est seulement si $*p \leq 0.05$.

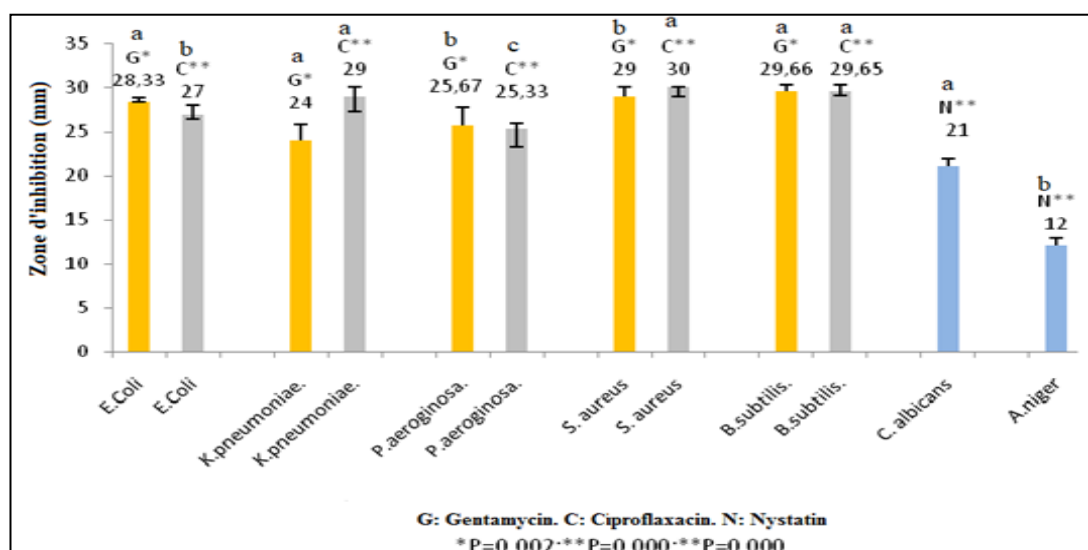


Figure 5.7: Tests antimicrobiens des contrôles positifs.

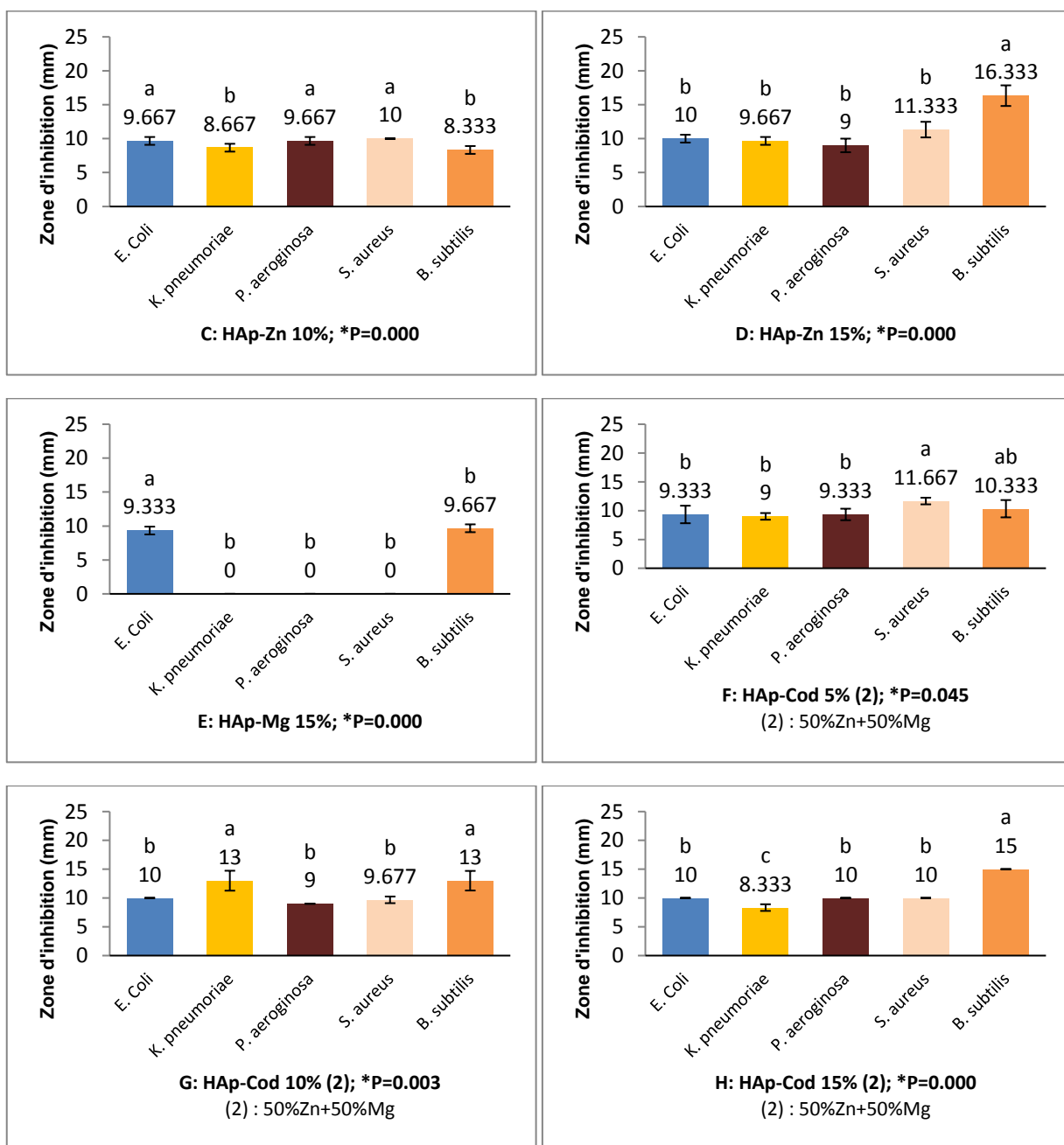


Figure 5.8: Activités Antimicrobiennes des nanopoudres HAp (non dopées, dopées au Zn et /ou au Mg et co-dopées).

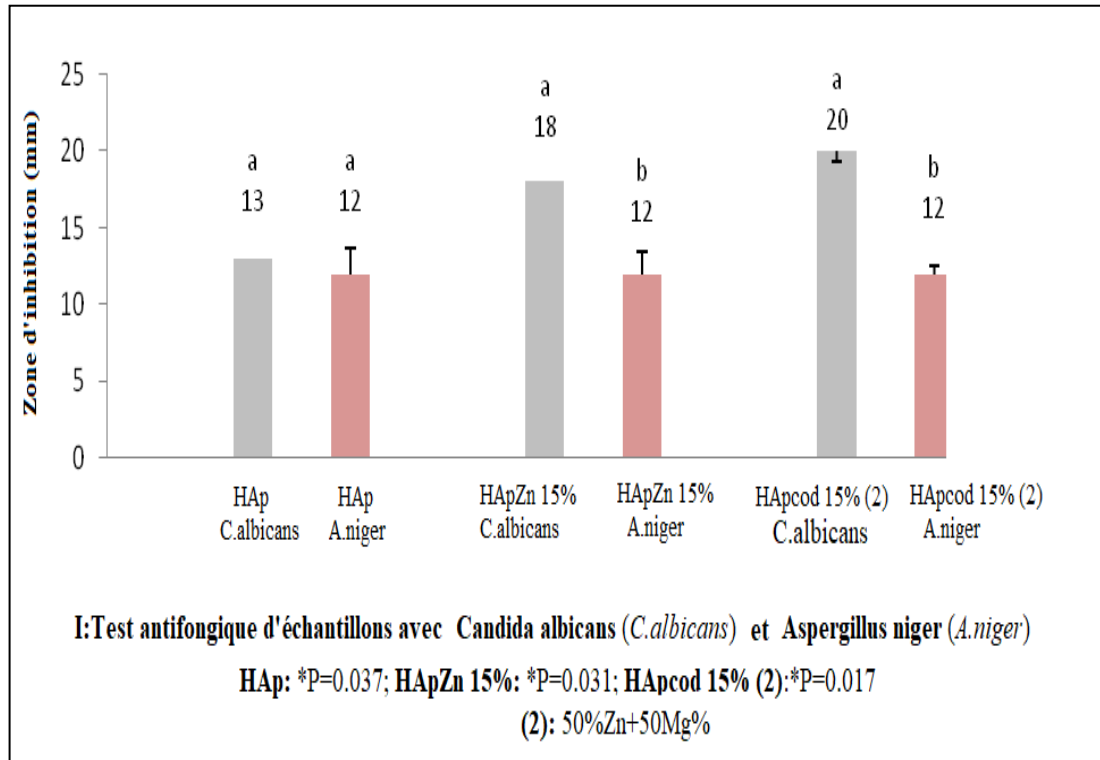


Figure 5.9: Tests antifongiques des matrices (HAp, HApZn15% ; HApCod 15%)

Comme le montre l'histogramme sur la figure (5.8. A) et selon le modèle de comparaison Fischer (Individual 95% CIS), l'échantillon HAp non substitué fait apparaître clairement des zones d'inhibitions allant de 9 à 10 mm pour les bactéries Gram (-) et de 11 à 15 mm pour les bactéries à Gram (+).

La souche *B. subtilis*, quant à elle, semble être la souche la plus sensible vis-à-vis de la plupart des échantillons HAp en montrant des zones d'inhibition plus larges dont les tailles varient de 13 à 15 mm.

Comme indiqué sur la figure 5.8 (A, B, C, D et E), le modèle Fischer (Individual 95% CIS) présente des groupes similaires (a, b, c) bien visible sur les histogrammes, qui explique le même pouvoir inhibiteur de ces nanoparticules sur les bactéries Gram (-) et sur celles de Gram (+).

La figure. 5.8 (D) montre clairement qu'une augmentation de la concentration en Zn de 5 à 15% (en moles) dans les nanoparticules HAp dopées entraîne une activité inhibitrice considérable de 10 à 11 mm pour la bactérie Gram (-) et une zone d'inhibition de l'ordre de 16 mm pour la souche *B. subtilis*.

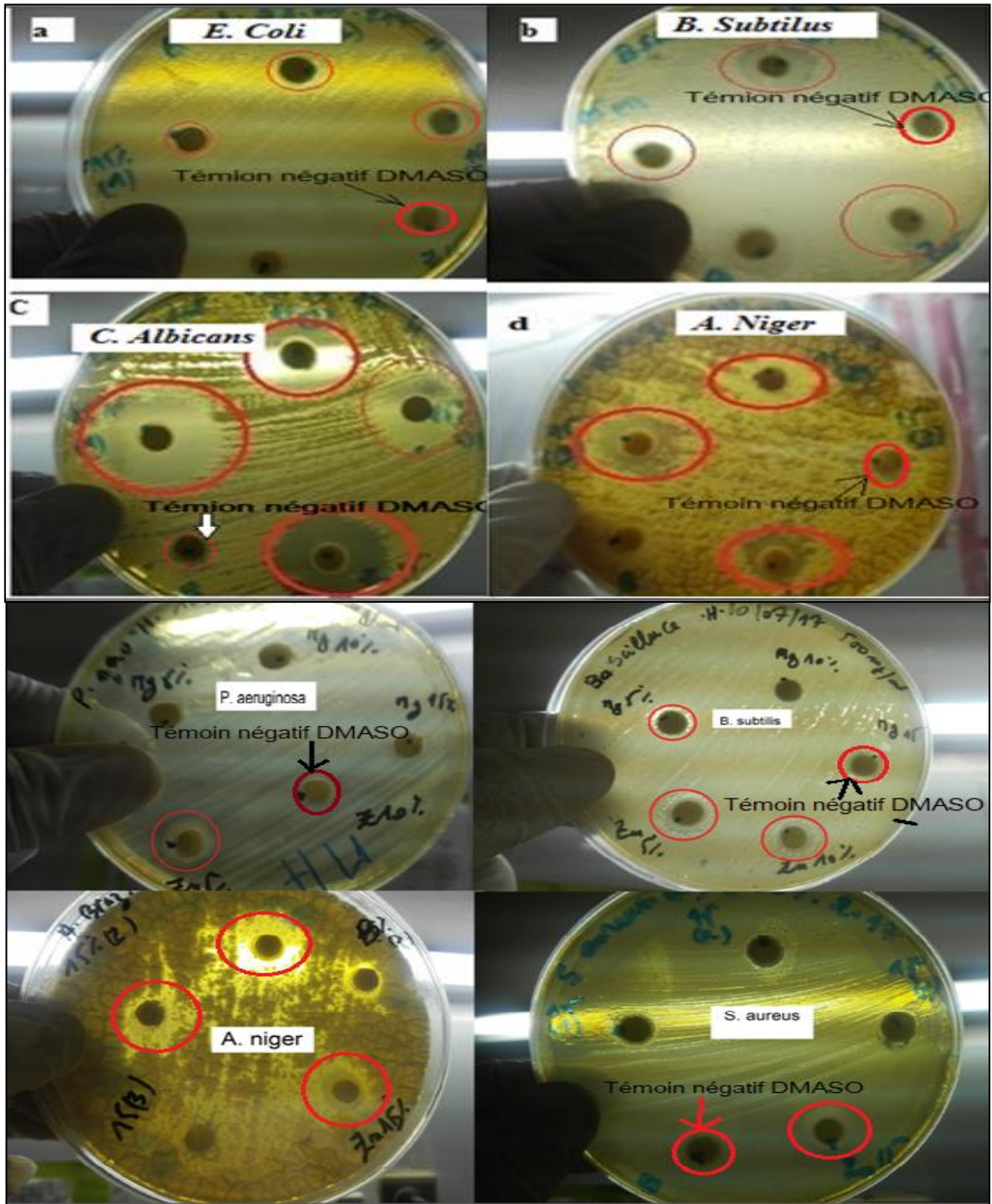


Figure 5.9: Photographies de l'activité antimicrobienne des différentes nanopoudres HAp utilisées :

(HAp-cod 15%, 10% (50% Zn+50% Mg): contre les bactéries Gram (-) comme *E. coli*, (a); les bactéries Gram (+) comme *Bacillus subtilis* (b) et contre les souches fongiques *Candida albicans* (c) et *Aspergillus niger* (d)).

Par ailleurs, le test antibactérien effectué sur l'hydroxyapatite dopée en magnésium (HAp-Mg (15 mol%), (figure 5.8.E) révèle deux zones d'inhibition :

- La première de l'ordre de 9 mm pour *E.coli*, la souche est considérée peu sensible
- La deuxième \leq 10 mm pour *B. subtilis*)

Néanmoins, aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée pour les faibles concentrations molaires en Mg (5 et 10 % mol).

De même, les tests antibactériens effectués sur les deux types de produits HAp co-dopées par les cations Zn^{2+} et Mg^{2+} « HAp-Zn/Mg 5 à 15 % mol en (50% Zn+ 50% Mg) » montrent que les faibles concentrations de co-dopage en Zn (0.57%) et Mg (~ 0.75%), détectées par analyse par fluorescence X (tableau 5.3) confirment ces activités antibactériennes.

En effet, des zones d'inhibitions de l'ordre de 9 mm pour *E. coli*, de 10 à 11 mm pour *S. aureus* et *P. aeruginosa* et de 12 à 16 mm pour *B. subtilis* ont été observées.

La figure 5.9(I) indique que les HAp non dopées, HAp dopées par Zn (15%) et co-dopées HAp-Zn/Mg (15% mol) semblent avoir des effets importants sur des souches pathogènes fongiques telles que *C. albicans* et *A. niger* (figure. 5.10. photographies C et D). Ces résultats sont comparables à ceux trouvés dans les tests positifs de Nystatin avec *C. albicans* et *A. niger*,

Comme le montre la figure 5.9 (I), la zone d'inhibition de l'échantillon co-dopé à 15% mol s'avère la valeur la plus élevée et atteint des valeurs maximales de l'ordre de 20 mm pour *C. albicans* et de 12 mm pour *A. niger*.

Ces résultats peuvent être interprétés de la manière suivante :

La paroi cellulaire de la bactérie Gram (-) qui contient, à la fois, des couches de peptidoglycane et de lipopolysaccharide, influe sur la perméabilité des molécules. Celles-ci peuvent, en effet, altérer les fonctions respiratoires et donc l'effet bactéricide .

L'étude effectuée par Gayathri et al.[165] soutient fortement nos conclusions. En effet, ces auteurs montrent, de façon claire, que l'activité antimicrobienne des nanoparticules de type HAps-Mg a le potentiel de contrôler les microbes. Dans leur étude, des zones d'inhibition de l'ordre de 16.38 ± 1.22 mm et de 8.91 ± 0.07 mm ont été observées respectivement contre les bactéries Gram (+) et Gram (-).

Dans ce même contexte, des études récentes effectuées par Guzman et al. [166] montrent que la présence de cations métalliques bivalents dans les nanoparticules peut réagir avec les groupes de protéines S-S et participe ainsi à l'inactivation bactérienne

Arrivés à ce stade de notre étude, nous pouvons donc avancer les conclusions suivantes :

- Les HAps co-dopées couvrent un large spectre d'action, agissant aussi bien sur les souches des bactéries à Gram (+) que sur les bactéries à Gram (-).
- La zone d'inhibition la plus élevée a été observée chez les bactéries Gram (+) sous forme de *B. subtilis* (~ 16 mm), avec les HAps dopées (HAps-Zn à 15%) et HAps co-dopées (HAp-Zn/Mg à 15% mol).
- Il n'existe pas d'activité antibactérienne pour une faible concentration de HAp-Mg, mais plutôt un pouvoir inhibiteur sélectif avec une activité plus élevée contre les bactéries Gram (-) telles que *E. coli* et les bactéries Gram (+) telles que *B. subtilis* (figure. 5.7. E).

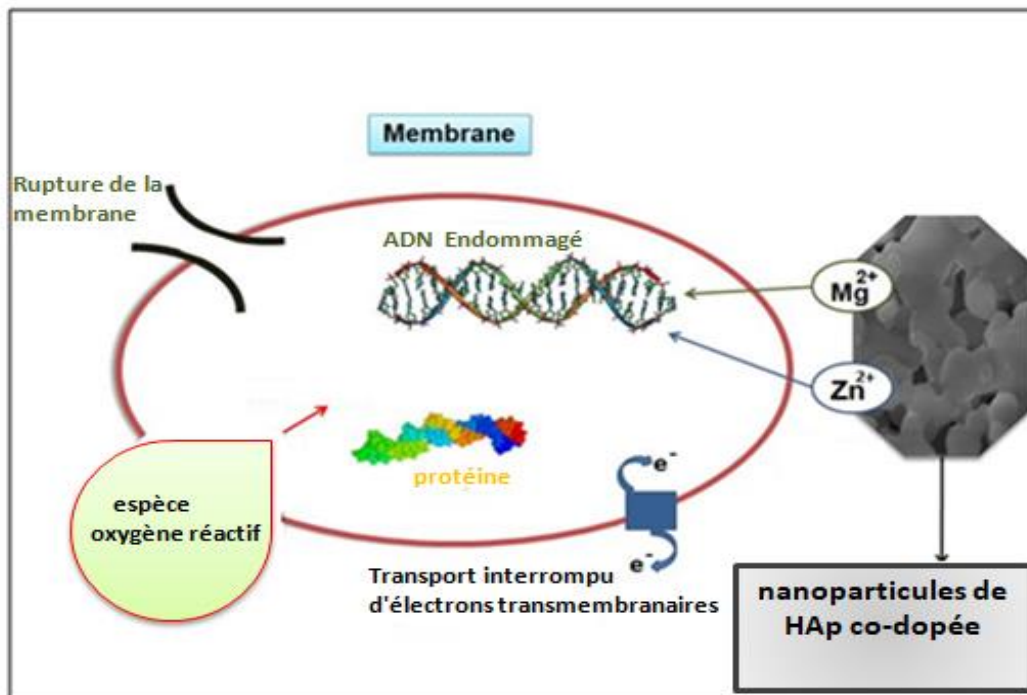


Figure 5.11: Mécanisme antibactérien des nanoparticules et de leurs ions métalliques [167].

La figure 5.11, montre l'hypothèse des trois mécanismes possibles d'activité ionique antibactérienne sont considérés pour expliquer l'effet des ions sur la croissance des microorganismes [167] :

- i) Pénétration d'ions à travers la membrane cellulaire, combinée à une modification de la régulation de la production d'ATP et de la réplication de l'ADN.
- ii) Fixation d'ions sur les membranes cellulaires avec des forces électrostatiques. Ces forces interfèrent avec l'intégrité de la cellule et affectent le transport libre de protons et d'autres molécules à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.
- iii) Induction du stress oxygène par la formation de radicaux libres (également appelés espèces réactives de l'oxygène: ROS). Ces derniers interfèrent avec le fonctionnement normal et peuvent endommager de manière irréversible les cellules bactériennes (leurs membranes, leurs ADN et leurs

mitochondries (centrales énergétiques de la production d'ATP) et entraînent donc leurs mort.

Le mécanisme d'activité antibactérienne des matrices HAps-Zn n'est pas encore complètement compris. Néanmoins, certains auteurs [168] suggèrent la présence de fortes liaisons entre les cations Zn^{2+} et les groupes thiol, imidazole, amine et carboxylique. Ces liaisons peuvent, en effet :

- provoquer des modifications structurelles en t affectant la perméabilité et le transport de la membrane, qui entraînent la mort cellulaire.
- entraver l'activité enzymatique ainsi que l'ADN et l'ARN des bactéries avec des résultats similaires

En plus de leur rôle en tant qu'agents antimicrobiens, les céramiques de types HAps-Zn sont utilisées pour réguler d'autres fonctions biologiques. En effet, l'ajout de HAps-Zn diminue la réaction inflammatoire et augmente la production de cytokines à la suite de l'implantation d'une prothèse à base d'HAps-Zn [168].

5.5.2. Effet de la concentration des ions dopants sur l'activité antibactérienne

L'étude de l'effet de la concentration en ions dopés sur l'activité antibactérienne a montré que le pouvoir inhibiteur augmente de manière remarquable à mesure que la concentration de cet ion augmente dans les HAps dopées et co-dopées.

En effet, plusieurs zones d'inhibition ont été détectées:

- Zones d'inhibition contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) de 15 mm et 9 mm avec les nanoparticules de HAp non substitué respectivement (figure 5. 12).
- Zones d'inhibition contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) de 16.00 ± 0.02 mm et de 10.00 ± 0.045 mm respectivement dans des nanoparticules dopées HAps-Zn (15% mol) et co-dopees HAps-Zn/Mg (15% mol), (figure. 5.12. a et c).
- Les bactéries à Gram (-) tels que (*E. coli* ; *P. aeruginosa*) sont classées peu sensibles aux nanoparticules HAps à cause de leur paroi bactérienne comparé aux souches à Gram (+) tel que (*B. subtilis*) ou elles sont considérées plus sensibles.

- Les fongiques quant à eux sont qualifiées comme des souches extrêmement sensibles.

Dans ce domaine, plusieurs autres études récentes relatives à l'emploi d'autres types de HAps co-dopées par des cations de métaux divalents tels que Cu, [167-170] Co, [171] et HAps-Mg/Zn/Co [172] ont démontré un comportement antibactérien efficace contre les bactéries de type *E. coli* et *S. aureus*. Pour tous les échantillons dopés HAps-Zn et ceux co-dopés HAps-Zn/Mg.

Les résultats obtenus montrent, de façon claire, que les zones d'inhibition de toutes les bactéries ont été considérablement élargies. Ils reflètent donc la forte activité antibactérienne vis-à-vis des champignons pathogènes de type (*candida* et l'*aspergillus*).

Il convient de noter qu'il n'existe pas d'activité antibactérienne à une faible concentration de HAps-Mg, mais un pouvoir inhibiteur sélectif à une activité plus élevée contre les bactéries Gram (-) telles que les espèces *E. coli* et les bactéries Gram (+) telles que *B. subtilis* (figure. 5.11. c).

Gayathri et al. [165] soutiennent fortement nos conclusions. Ces auteurs rapportent, en effet, que l'activité antimicrobienne des nanoparticules de HAps-Mg possède le potentiel de contrôler les microbes. Des zones d'inhibition de l'ordre de 16.38 ± 1.22 mm et de 9.91 ± 0.07 mm ont été observées respectivement contre les bactéries Gram (+) et Gram (-).

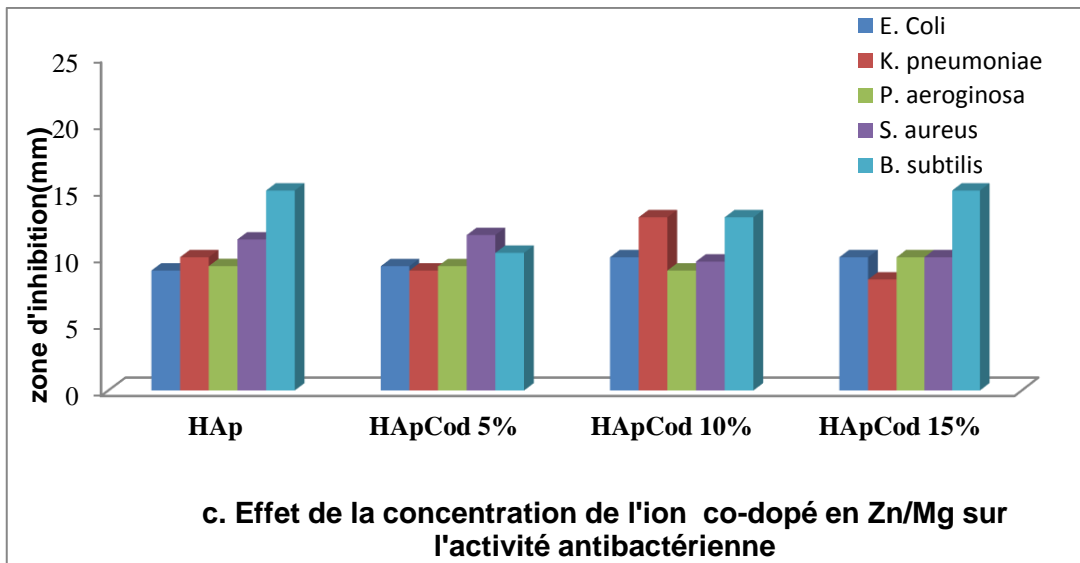
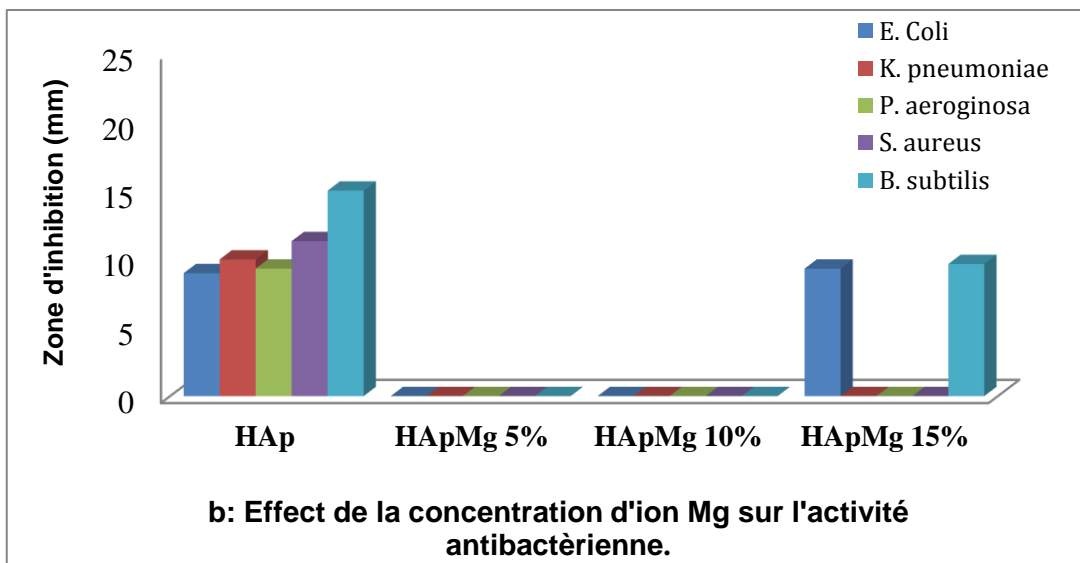
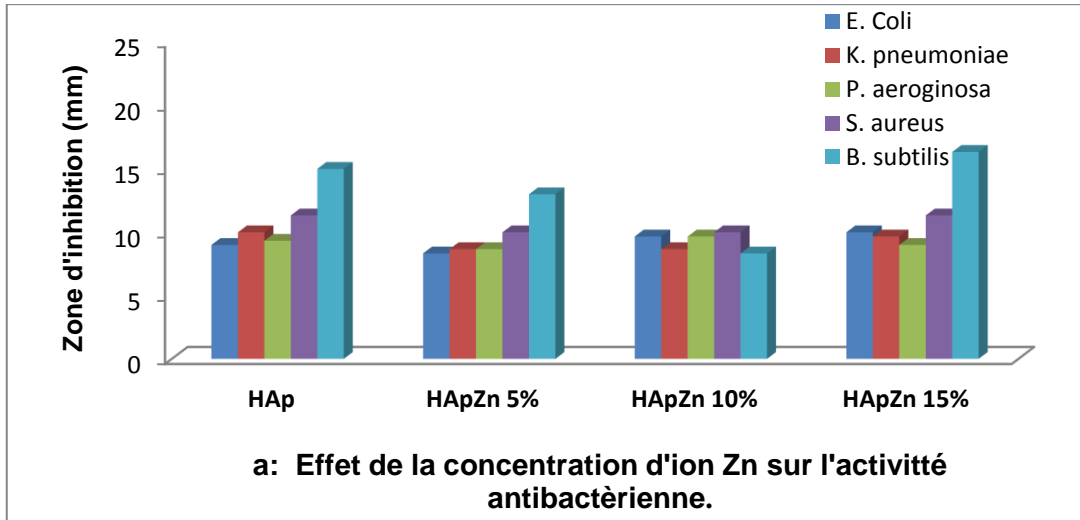


Figure 5.12 : Effet de la concentration de l'ion dopant et co-dopant sur l'activité antibactérienne.

5.5.3. Étude comparative

L'étude comparative de l'effet des nanopoudres HAp sur les différentes couches bactériennes est effectuée en utilisant le logiciel Minitab 17 (Individuel Fischer comparaison 95% Cis). :

- Le matériau non substituée (HAp) réagit de la même manière vis-à-vis de l'ensemble des bactéries à Gram (-) (figure 5.13 (a)).
- Comme la montre la figure 5.13 (b, c, d)), les pouvoirs inhibiteurs des HAp dopées en Zn (HAp-Zn) à différentes concentrations (5 ; 10 ; 15 mol%) envers les bactéries à Gram (-) sont similaires du moment que la moyenne des zones d'inhibitions est toujours au voisinage de zéro.

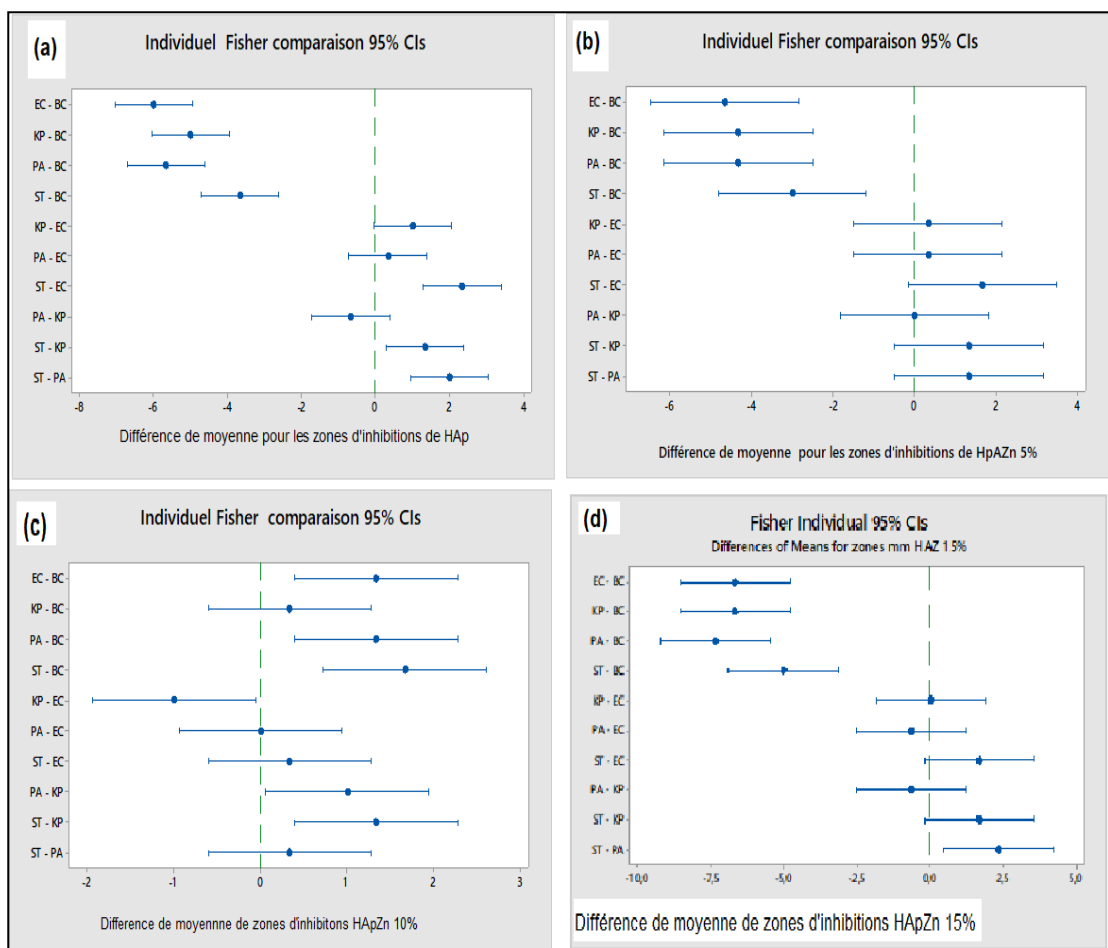


Figure 5.13 : Modèle de comparaison Fisher des HAp et HAp dopées au Zn.

- La figure 5.14 montre que la matrice HAp-Mg (15% mol en Mg) inhibe préférentiellement les bactéries à Gram (-) dont la moyenne des zones d'inhibitions reste proche de zéro.
- La figure 5.14 (f) montre que le matériau plus riche en magnésium (HAp-Mg 15% mol) manifeste une affinité envers plutôt les bactéries à Gram (+) (*P. aeruginosa* et *B. subtilis*) que celles à Gram (-).

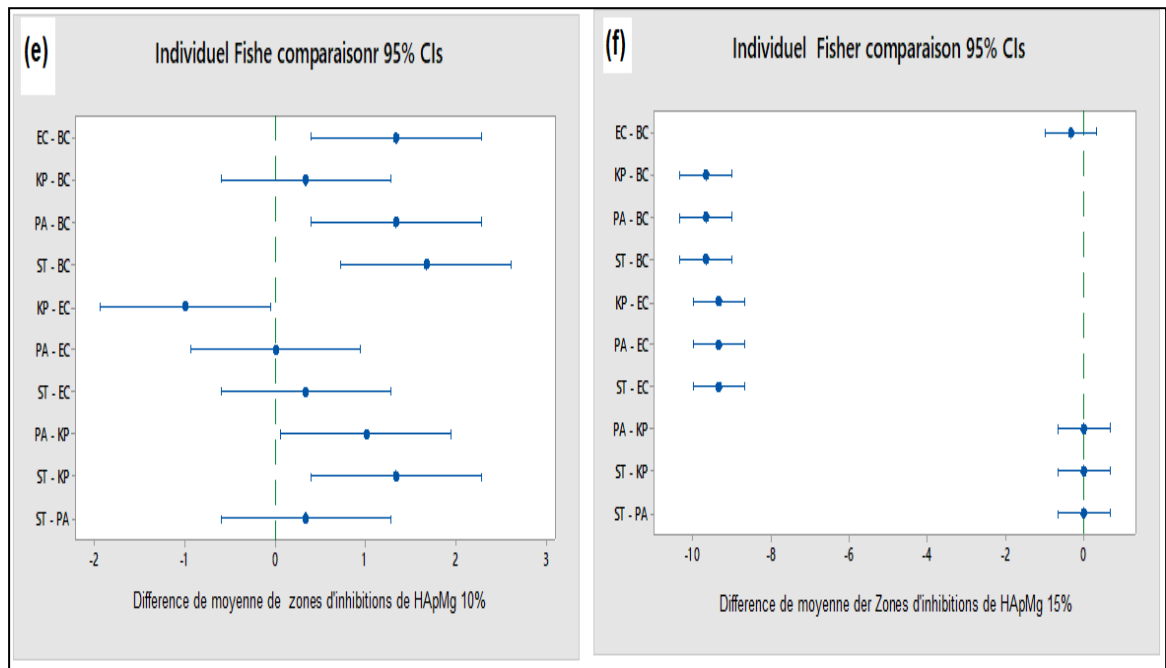
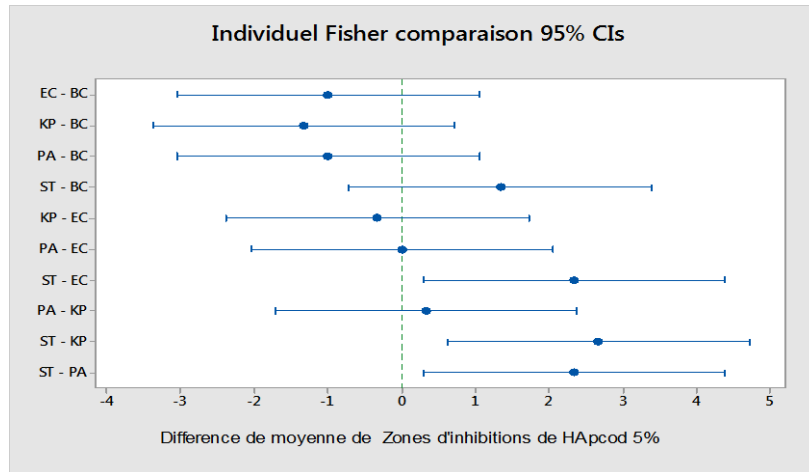


Figure 5.14 : Modèle de comparaison Fisher des (HAp-Mg).

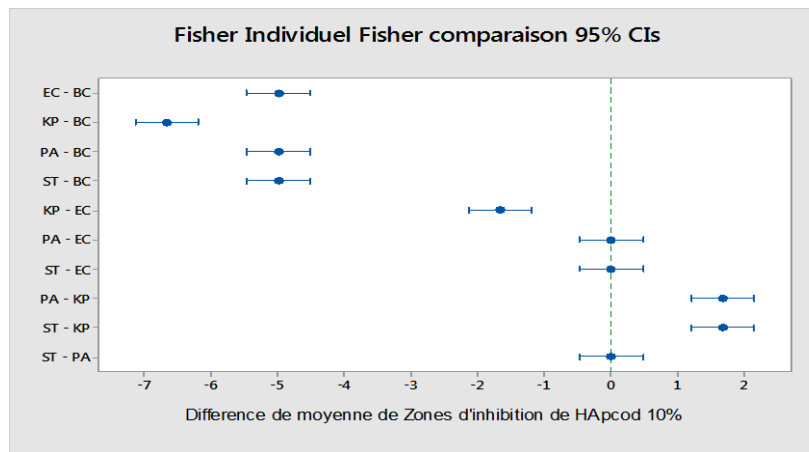
- La figure 5.15 (g, h, i) donne une interprétation supplémentaire sur l'effet antibactérien des HAp co-dopées (HAp-Zn/Mg) envers les bactéries étudiées. En effet, la moyenne des zones d'inhibitions est proche de zéro pour le support co-dopé HAp-Zn/Mg (5% mol en Zn+Mg) montrant par là un même pouvoir inhibiteur.

Par ailleurs, les matrices co-dopées HAp-Zn/Mg 15% et 10%, quant à elles, révèlent une moyenne des zones d'inhibitions légèrement différente de zéro. Ces matrices se comportent donc de manière différente vis-à-vis des souches étudiées.

(g)



(h)



(i)

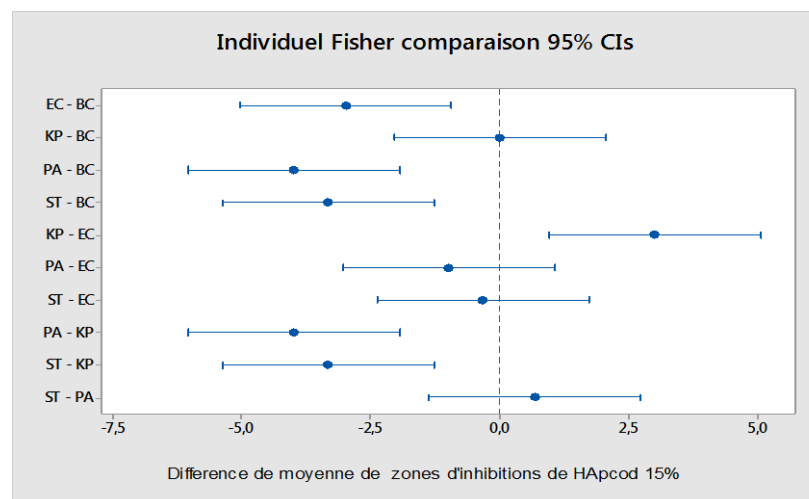


Figure 5.15 : Modèle de comparaison Fisher des matériaux HAp cod-Zn/Mg
 (g) : HApod 5% ; (h) : HApod 10% ; (i) : HApod 15%

CONCLUSION

Le but principal de cette étude est de préparer plusieurs hydroxyapatites (HAp), dopées et/ou co-dopées avec des cations de zinc (Zn) et/ou de magnésium (Mg) à des concentrations allant de 5 à 15% en moles et d'en examiner, à la fois, la structure et les propriétés biologiques ainsi que l'activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons pathogènes.

Au terme de cette étude, nous pouvons donc avancer les conclusions suivantes :

- Les nanopoudres HAp dopées et/ou co-dopées ont été synthétisés par la méthode de précipitation en utilisant différents sels dopants.
- L'incorporation des cations Zn^{2+} et/ou Mg^{2+} au moyen d'une substitution isomorphe dans les structures d'hydroxyapatites a été couronnée de succès.
- La caractérisation par DRX a révélé les phénomènes suivants :
 - la présence de nouvelles phases de whitlockite et scholzite à une concentration de 15% mol de l'ion substituant
 - La diminution de la taille des cristallites des échantillons pour des concentrations élevées en ions Zn ou Mg à cause de l'incorporation des cations Zn et/ou Mg dans la structure d'hydroxyapatite
- Les analyses IR-TF ont confirmé la présence des bandes caractéristiques attribuées aux modes vibratoires des groupes phosphate et hydroxyle des hydroxyapatites.

- La caractérisation par MEB a permis de déterminer la morphologie des cristallites qui sont devenus sous forme d'aiguilles, irrégulières et plus agglomérés dans les HAp dopées et/ou co-dopées.
- Les résultats de l'analyse FRX ont clairement indiqué la présence des éléments Zn, Mg, Ca et P dans les structures des HAp en particulier pour les solides dopés (HAp-Zn, HAp-Mg) et les HAp co-dopés (HAp-Zn/Mg).
- Également les valeurs du rapport molaire $\{[Ca^{2+}] + [M^{2+}]\} / [PO_4^{3-}]$ sont légèrement élevées par rapport au rapport initialement introduit lors de la synthèse qui est de 1,67.
- L'étude de l'activité antimicrobienne confirme, en effet, une inhibition significative de la croissance des bactéries testés et montre les grandes affinités de cette nouvelle génération de nanomatériaux HAp-Zn (dopées à 15% en moles de zinc) et HAp co-dopés (HAp-Zn/Mg avec Zn+Mg allant de 10 et 15%).
- L'activité antimicrobienne est influencée par l'effet de l'ion dopant et donc par des changements au niveau des propriétés cristallines des différentes poudres d'hydroxyapatites.
- L'étude comparative des résultats des différents tests d'activité antimicrobienne in vitro sur des bactéries pathogènes et fongiques suggère la possibilité de l'utilisation de ces nanoparticules dans le domaine biomédical.

En guise de perspective et pour valider l'utilisation de ces nanoparticules comme biomatériaux d'intérêt biomédical, il est souhaitable de poursuivre cette étude en effectuant les travaux suivants :

- Élaboration de nouvelles séries d'hydroxyapatites ou des céramiques phosphocalciques destinées essentiellement à l'ingénierie tissulaire osseuse.
- Etude de l'influence des propriétés physicochimiques des biomatériaux sur le comportement biologique in vitro et in vivo.
- Utilisation de techniques analytiques pointues supplémentaires comme la (RMN MAS) des solides dans la caractérisation de ces nouveaux matériaux.
- La substitution et/ou la co-substitution par d'autres ions tels que ceux des silicates et carbonates pourraient être envisagées et comparées à celles proposées dans cette thèse.
- Etude plus approfondie notamment sur l'effet des ions sur la réponse biologique et proposition d'un mécanisme adéquat à cette réponse.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

ATB	:	Antibiotique.
A. Niger	:	Aspergillus Niger
ATTC	:	American Type Culture Collection
B. Substillis	:	Bacillus subtilis
C. albicans	:	Candida albicans
C	:	Ciproflaxacin
CAP	:	Phosphates de calcium
CC _{inf}	:	Concentration critique inférieure
CC _{sup}	:	Concentration critique supérieure
CLST	:	Clinical laboratory standards Institute
CMI	:	Concentration d'inhibition minimale
Cu.K α	:	Longueur d'onde anticathode de cuivre
DRX	:	Diffraction des rayons X
DMSO	:	Diméthyl sulfoxyde
EUCAST	:	European committee on antimicrobial susceptibility testing.
E. coli	:	Escherichia coli
FWHMB	:	La largeur à la mi-hauteur de pic de diffraction .
FRX	:	Fluorescence des rayons X.
G	:	Gentamycin
Gram (+)	:	Gram positif

Gram (-)	:	Gram négatif
HAp	:	Hydroxyapatite non dopée
HAp-Zn	:	Hydroxyapatite dopée au Zinc
HAp-Mg	:	Hydroxyapatite dopée au Magnésium
HAp-cod	:	Hydroxyapatite dopée
HAp-cod Zn/Mg	:	Hydroxyapatite dopée au Zinc et au Magnésium
IR-TF	:	Infrarouge à transformée de Fourier.
<i>K. pneumoniae</i>	:	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
M	:	Métal
MEB	:	Microscopie électronique à Balayage
MP	:	Microscopie photonique
N	:	Nystatin
OMS	:	Organisation mondiale de santé
<i>P. aeruginosa</i>	:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RMN (MAS)	:	Résonance magnétique nucléaire des solides
<i>S. aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
TCP	:	Phosphate tricalciques de type β
β -TCP	:	Phosphates tricalciques de type β .
Λ	:	Longueur d'onde
Θ	:	Angle de diffraction

APPENDICE B

GLOSSAIRE

Biocompatible	: Capacité d'un matériau à ne pas interférer, ne pas dégrader, le milieu biologique dans lequel il est utilisé.
Biodégradable	: Capacité d'être décomposé par des micro-organismes biologiques.
Biorésorbable	: Matériau qui peut être implanté dans le corps humain pour remodeler.
Cytokines	: Hormones du système immunitaire (molécules polypeptidiques).
Ostéoblastes	: Cellules qui synthétisent la partie non-minérale de l'os.
Ostéoclastes	: Cellules multinucléées d'origine hématopoïétique qui produisent des cellules sanguines.
Ostéo-conduction	: Propriété passive d'un matériau à recevoir la réponse osseuse.
Ostéogénèse	: Fragilité osseuse excessive due à un défaut congénital.
Ostéo-intégration	: Connexion structurelle et fonctionnelle directe entre l'os vivant et la surface d'un implant artificiel.
Ostéopénie	: Baisse de la densité de l'os (démminéralisation et décalcification osseuse modérée).
Ostéosclérose	: Augmentation localisée ou diffuse de la densité osseuse.

APPENDICE C

SPECTRES D'IDENTIFICATION (DRX)

Diffraction des rayons X (DRX) :

La diffraction des rayons X (DRX) est une méthode instrumentale polyvalente et non destructive utilisée pour la détermination de disposition atomique dans un matériau, donnant les phases cristallines de l'espace atomique et symétrie.

Dans cette technique, les rayons X d'une longueur d'onde connue sont irradiés à travers un échantillon pour étudier pleinement sa structure cristalline. La nature ondulatoire des rayons X signifie que le réseau du cristal donne une diffraction unique, ce qui entraîne un motif de pics de 'Réflexions' sous différents angles et avec différentes intensités. Les faisceaux diffractés des atomes dans les plans successifs s'annulent sauf si elles sont en phase, et la condition pour cela est donnée par le Loi de Bragg.

$$\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

Eq.1

Où; λ est la longueur d'onde des rayons X, d est la distance entre différents plans d'atomes dans le réseau cristallin et θ est l'angle de diffraction.

La figure C.1 montre le détecteur de rayons X qui se déplace autour de l'échantillon et mesure l'intensité de ces pics et la position de ces pics (angle de diffraction 2θ). Le plus haut sommet est défini par le pic de 100% et l'intensité de tous les autres pics sont exprimés en pourcentage.

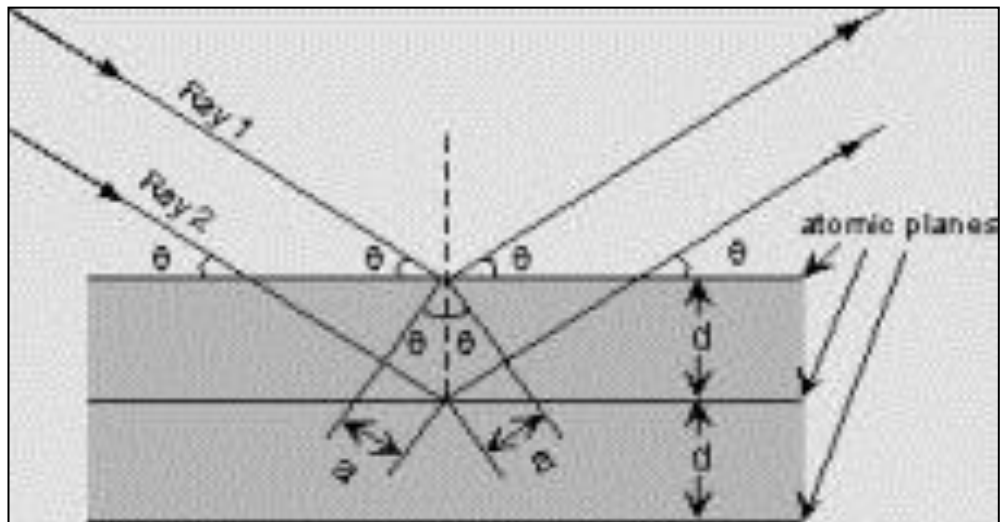


Figure C.1: Les rayons X incidents et diffractés en phase.

Les différentes poudres d'HAp synthétisées ont été identifiées grâce à un diffractomètre D8 Advance Eco (Bruker), avec un rayonnement $\text{Cu.K}\alpha$ ($= 1.5418 \text{ \AA}$) généré à 40 kV et 25 mA comme le montre la figure ci-dessous.

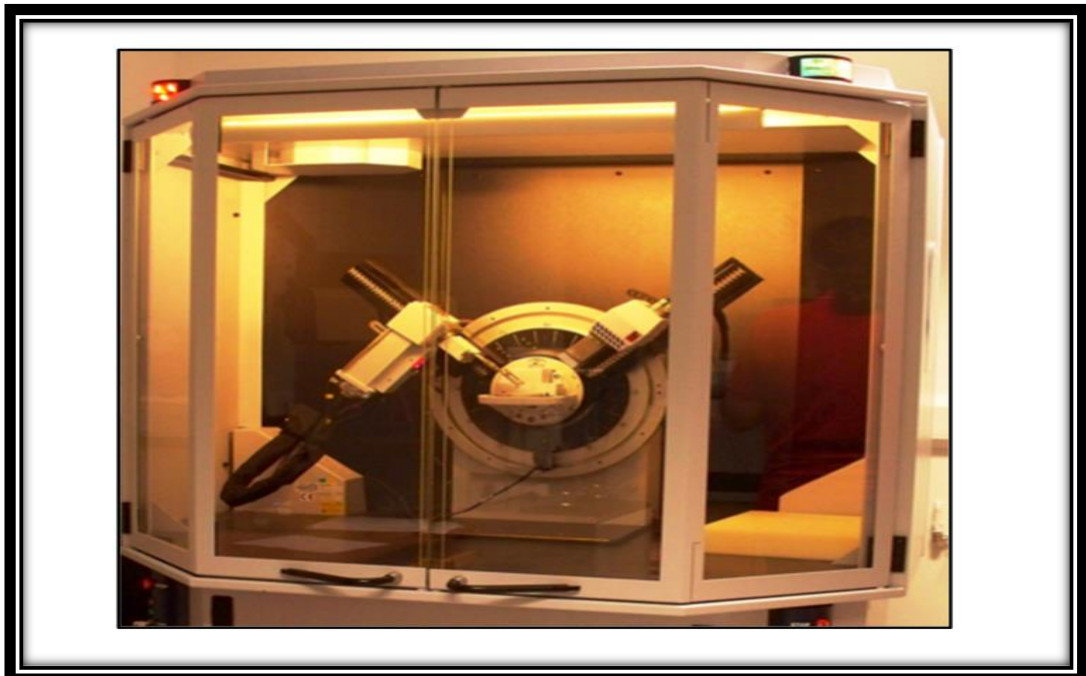


Figure C.2 : Diffracteur de rayons X sur poudre (Diffractomètre Bruker D8).

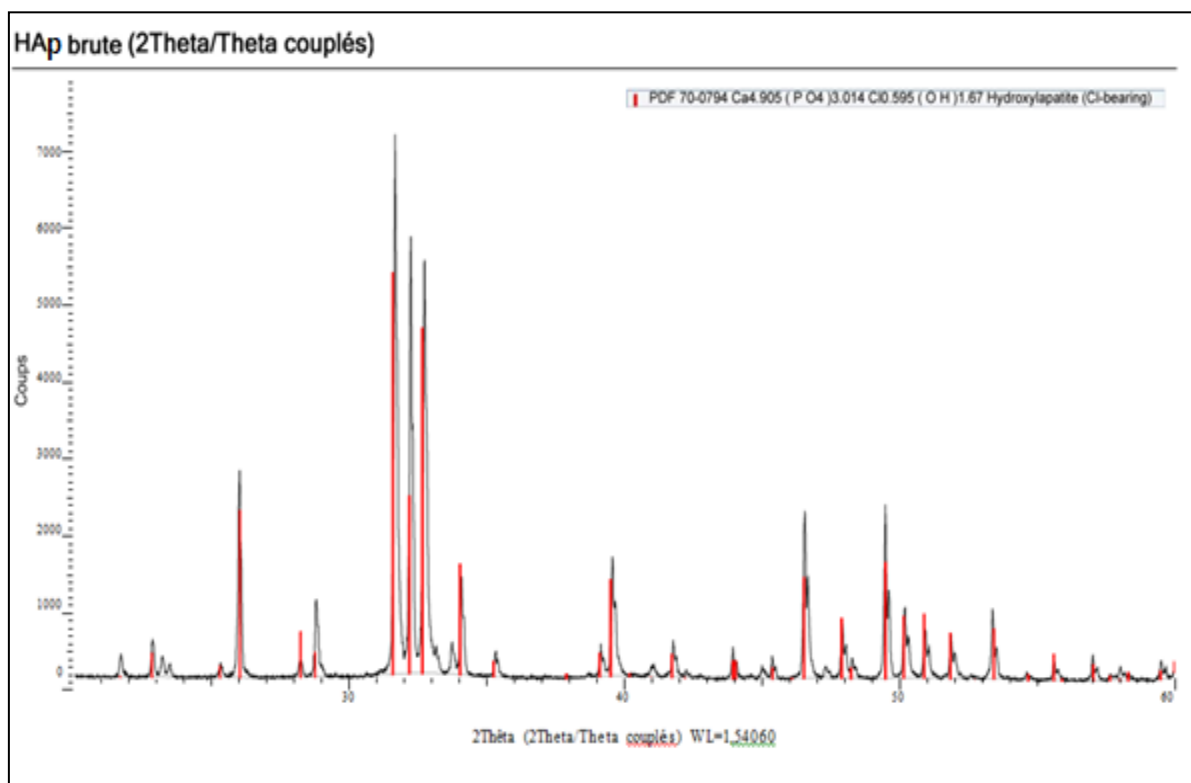


Figure C.3 : Spectre d'identification de HAp non substituée

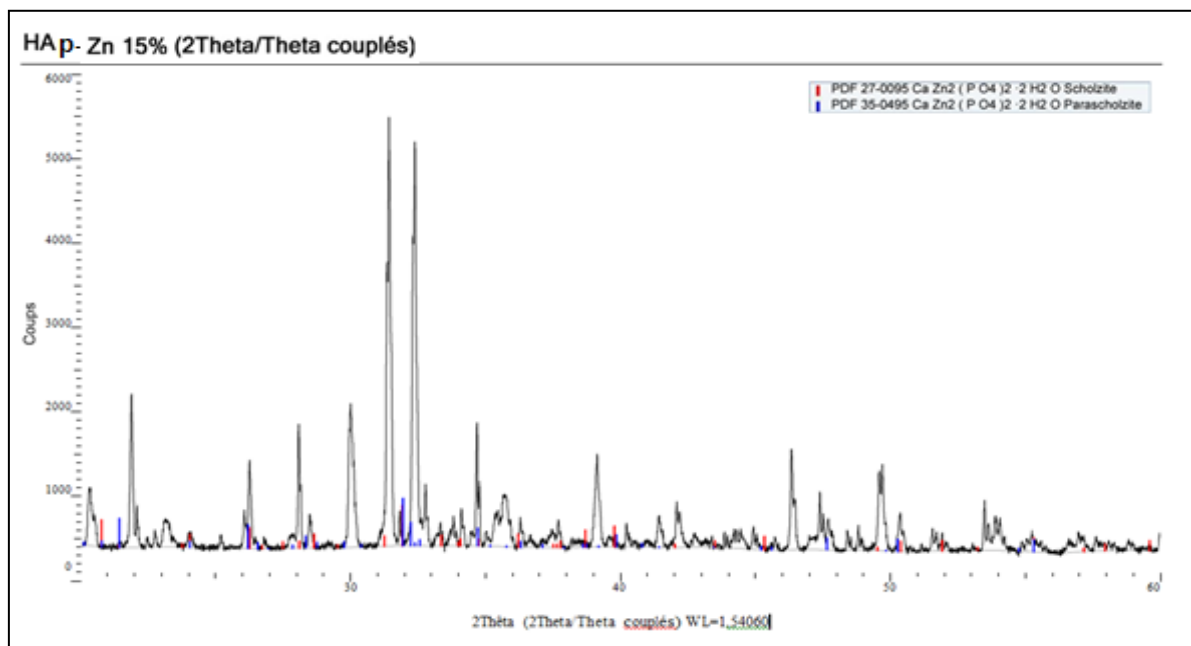


Figure C.4 : Spectre d'identification de HAp-Zn 15%

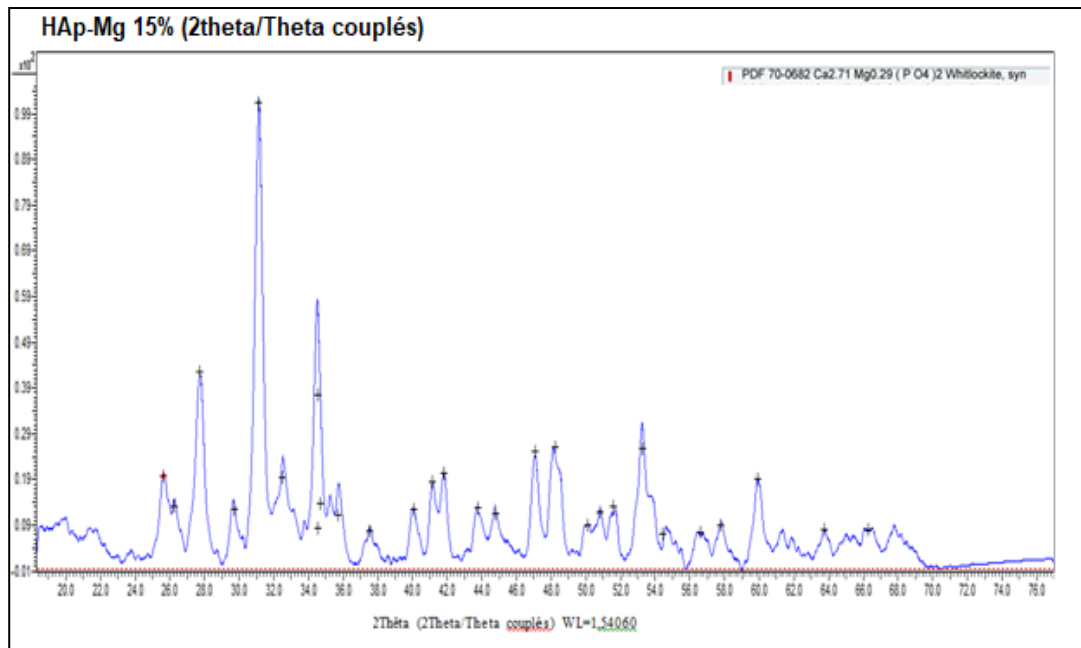


Figure C.5 : Spectre d'identification de HAp-Mg 15%

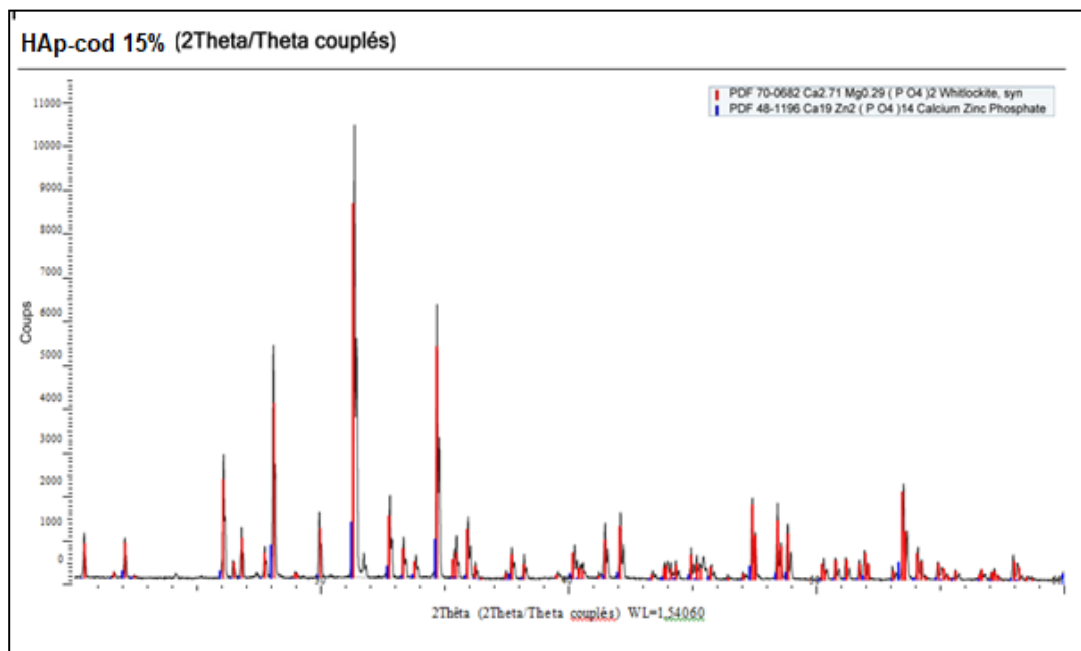


Figure C.6 : Spectre d'identification de HAp-cod 15% (50% Zn+ 50% Mg).

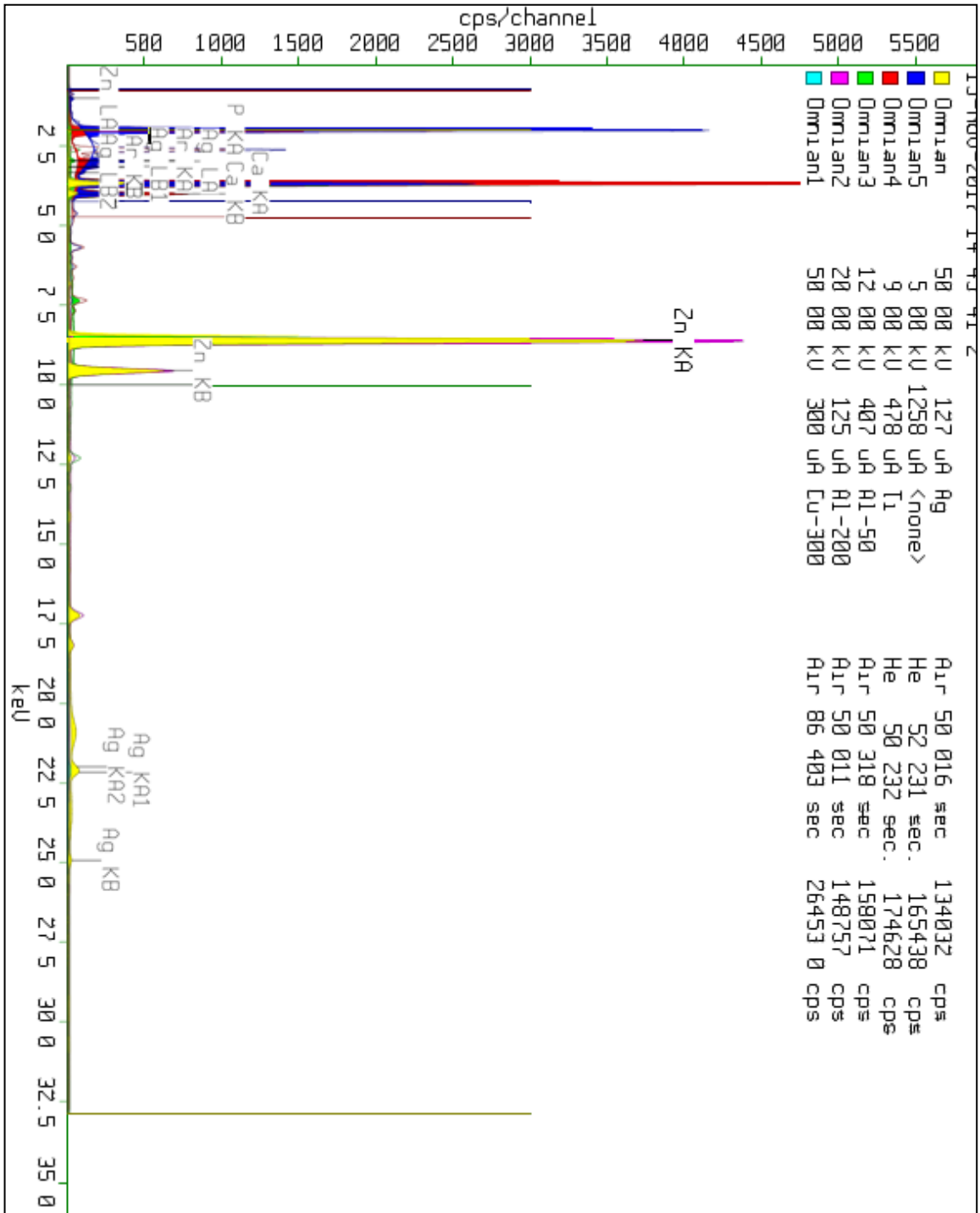


Figure D.2 : Spectre d'identification FRX HAp-Zn 15%

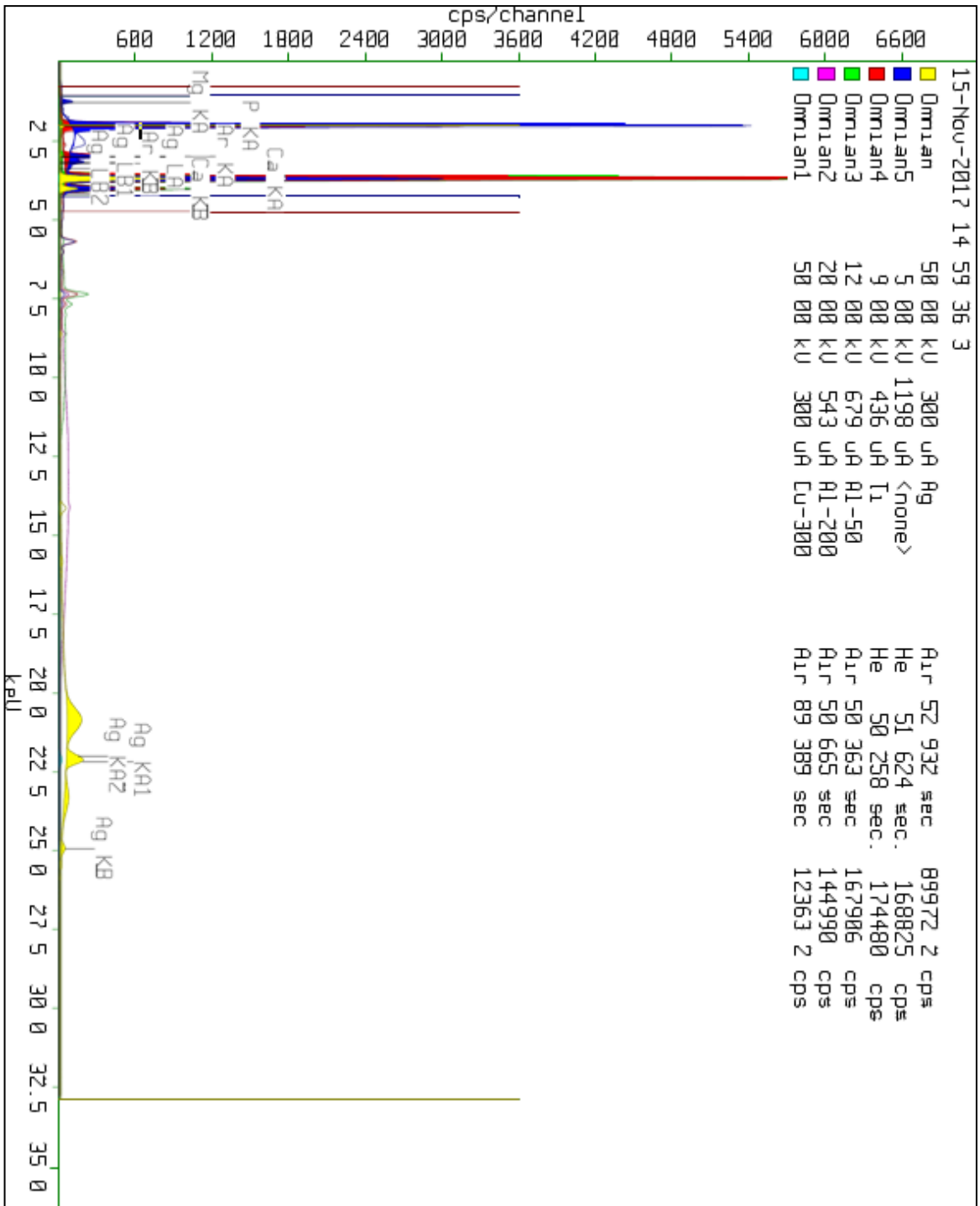


Figure D.5 : Spectre d'identification FRX HAp-Mg 15%

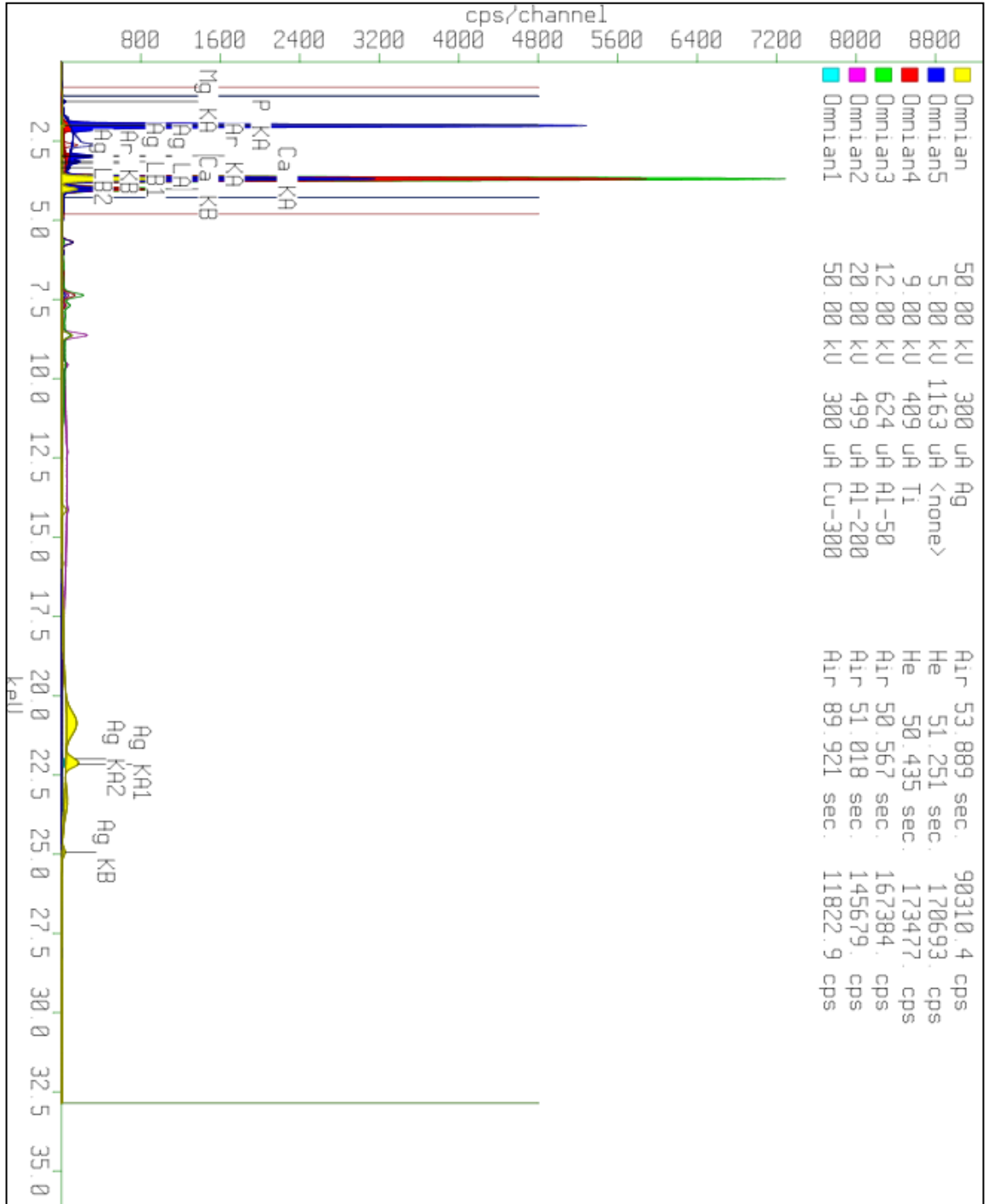


Figure D.6 : Spectre d'identification FRX HAp-Mg 10%

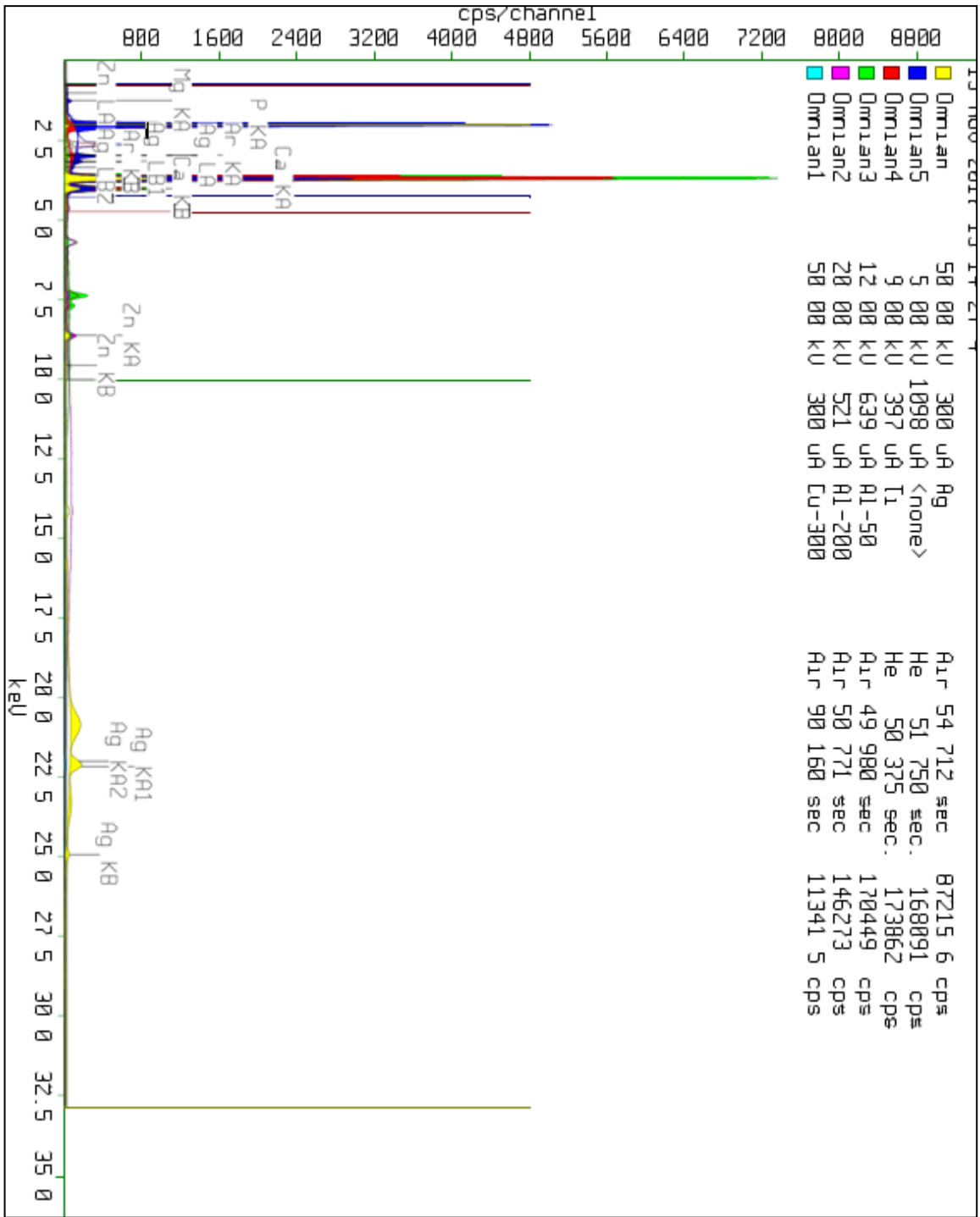


Figure D.7 : Spectre d'identification FRX HAp-cod (2) 5%.

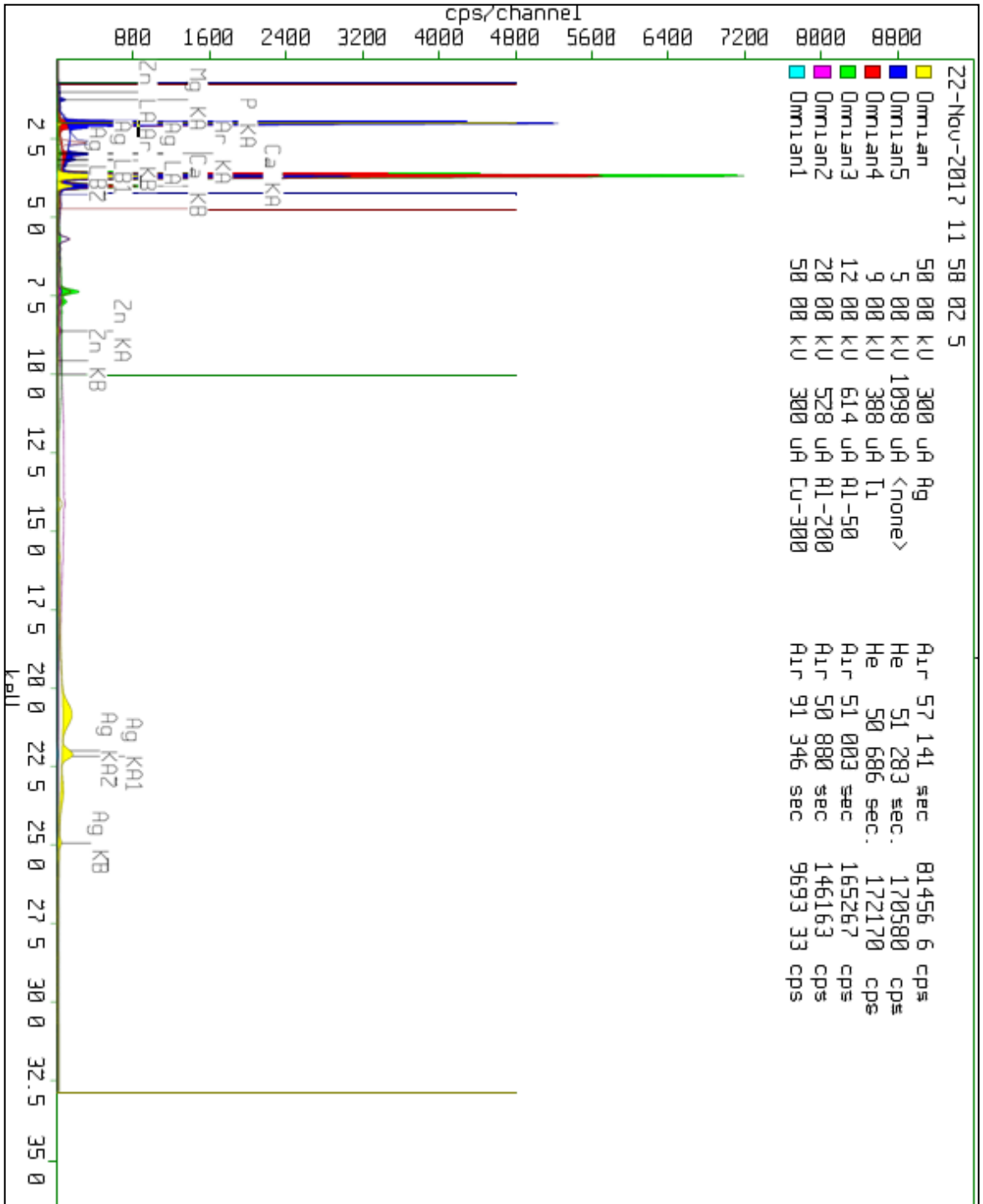


Figure D.8 : Spectre d'identification FRX HAp-cod (2) 10% (50% Zn+50% Mg).

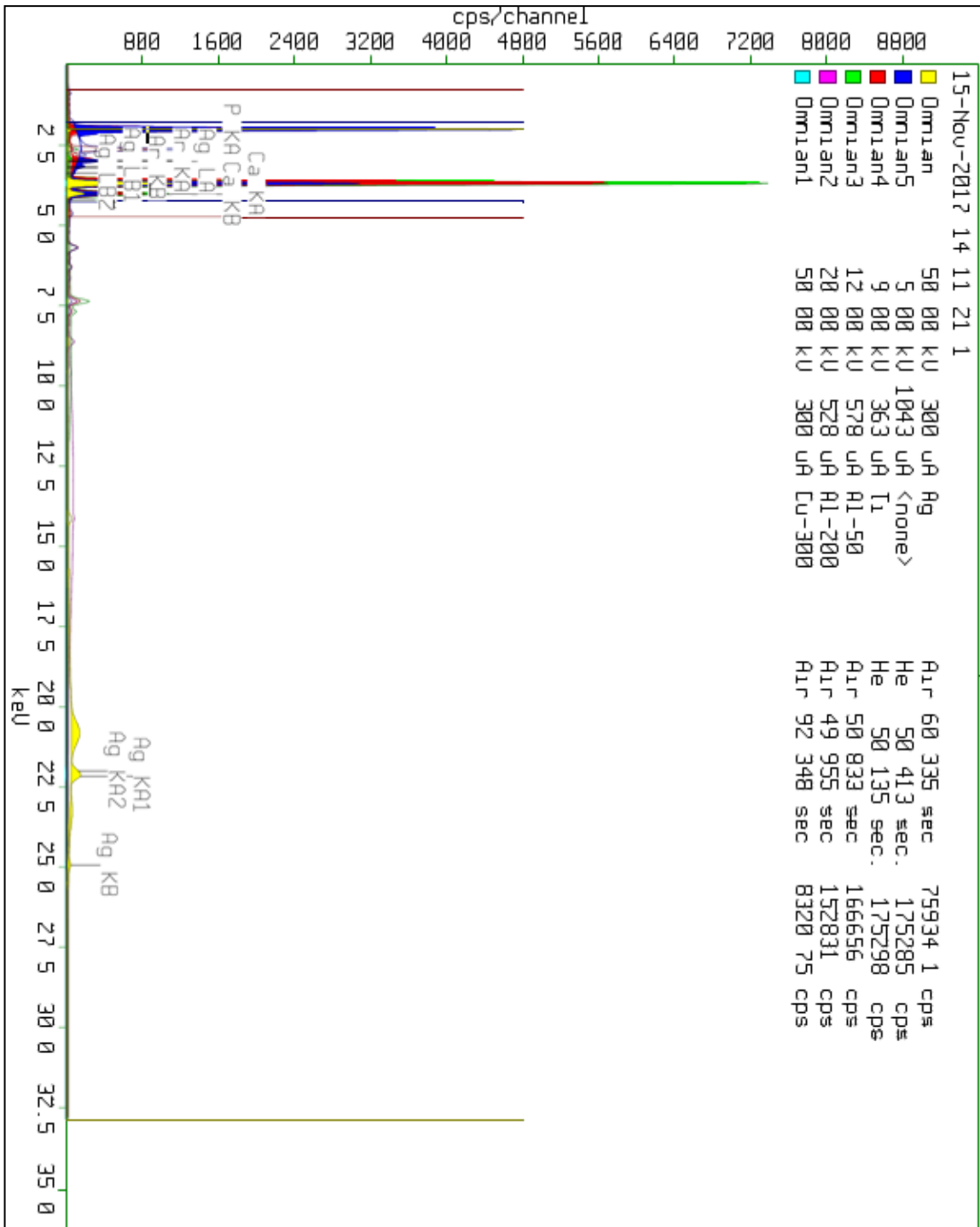
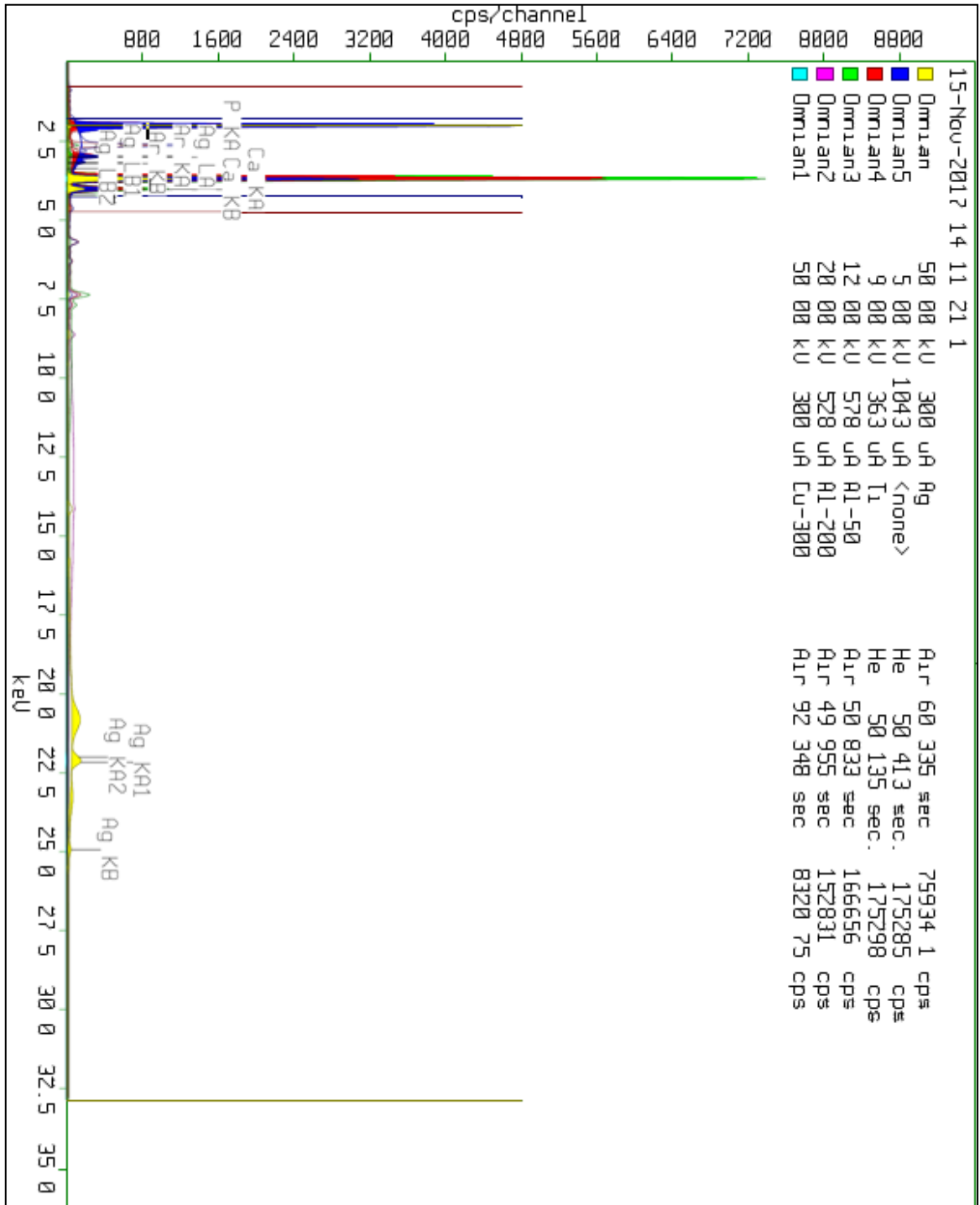


Figure D.9 : Spectre d'identification FRX HAp-cod (2) 10%.



REFERENCES

1. Nzihou, A., Sharrock, P., "Role of phosphate in the remediation and reuse of heavy metal polluted wastes and sites", *Waste. Biomass. Valor*, V.1 (2010), 163-174.
2. Park, J.H., Akita, D., Iwate, C., "Application of phosphates for metal immobilization. In *Phosphates: Sources, Properties and Applications*", Eds. Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, (2012), 231-241.
3. Piccirillo, C., Castro, P.M.L., "Calcium hydroxyapatite-based photocatalysts for environment remediation: Characteristics, performances and future perspectives", *Journal Environ Manager*, v .193, (2017), 79-91.
4. Šupová, M., "Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review", *Ceramic Inttenational*, V.41, (2015), 9203-92391.
5. Szcześ, A., Hołysz, L., Chibowski, E., "Historical perspective - Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications", *Adv. Colloid Interface Science*, V. 249, (2017), 321-330.
6. Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O., Planell, J.A., "Review - Biomaterials in orthopaedics", *J. Royal Soc. Interface*, V.5, (2008), 1137-1158.
7. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.T., Dinpanah-Khoshdarg, E., Jamshidi, A., "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures", *Acta Biomaterial.*, V.9, (2013), 7591-7621.
8. Matsunaga, K., Inamori H., Murata, H., "Theoretical trend of ion exchange ability with divalent cations in hydroxyapatite", *Physical. Review. B*, V.78, n°9,(2008), 1-9.
9. Wang, Y., Zhang, S., Wei, K., Zhao, N., Chen, J., Wang, X., "Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template". *Mater. Lett*, V. 60, (2006), 1484-1487.
10. Cacciotti I., Bianco, A., Lombardi, M., Montanaro, L., "Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour". *Journal European Ceramic Society*, V.29, (2009), 2969-2978.
11. Dvorak, M.M., Siddiqua, A., Ward, D.T., Carter, D.H., Dallas, S.L., Nemeth, E.F., Riccard,i D., "Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones", *Procceng National Acadimic. Siciety. USA*, V. 101,(2004), 5140-5145.
12. Habibovic, P., Barrale, J.E., "Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. *Acta Biomaterial.*", V.7, (2011), 3013-3026.

13. Kanzaki, N., Onuma K., Treboux, G., Tsutsumi, S., Ito A., "Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (001) face", *Journal Physical Chemistry B*, V.104, (2000), 4189-4194.
14. Landi, E., Tampieri, A., Mattioli-Belmont, M., Celotti, G., Sandri, M., Gigante, A., Fava, P., Biagini, G., "Biomimetic Mg- and Mg,CO₃-substituted hydroxyapatites: Synthesis, characterization and in vitro behaviour", *Journal European Ceramic Society*, V.26, (2006), 2593-2601.
15. Hayakawa, S., Ando, K., Tsuru K., Osaka, A., Fujii, E., Kawabata, K., Bonhomme, C., Babonneau, F., "Structural characterization and protein adsorption property of hydroxyapatite particles modified with zinc ions", *Journal American Ceramic Society*, V.90, (2007), 565-569.
16. Hu, W., Ma, J., Wang, J., Zhang, S., "Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticle", *Material. Science Engineering. C*, V.32, (2012), 2404-2410.
17. Gaines, R.V., Skinner, H.C.W., Foord, E.E., Mason, B., Rosenzweig, A., "Dana's New Mineralogy", 8th Ed.; Wiley: New York, (1997), 1813-1895.
18. Suchanek, W.L, Byrappa, K., Shuk, P., Riman, R.E., Janas, V.F., TenHuisen, K.S., "Preparation magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method", *Biomaterials*, V. 25, (2004), 4647-4657.
19. Gopi D., Nithiya S., Shinyjoy E., Kavitha L., "Spectroscopic investigation on formation and growth of mineralized nanohydroxyapatite for bone tissue engineering applications", *Spectrochim. Acta A*,92, (2012), 194-200.
20. Williams, D., "On the nature of biomaterials", *Biomaterials*. V. 30 (30) 2009, 5897-5909.
21. Pilliar R., Deporter D., Watson P., Pharoah M., Chipman M., V. N., "The effect of partial coating with hydroxyapatite on bone remodeling in relation to porouscoated titanium-alloy dental implants in the dog", *Journal entalen Resereach*. (1991),70(10):1338-1345.
22. De Groot, K., "Clinical applications of calcium phosphate biomaterials" *Ceramics International* ,V. 19, n°5, (1993),363-366.
23. Cao, W., Hench, L.L., "Bioactive Material *Ceramics International*", V. 22, (1996), 493-507.
24. Verron, E., Khairoun, I., Guicheux, J., Bouler, J.M, "Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems": a review. *Drug. Discovery .Today*, V.15, n°13-14, (2010), 547-552.
25. Dorozhkin, S.V., "Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art", *Journal of Functional Biomaterials*, V.1, n°1 (2010), 22-107.

26. Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Lebugle, A., Sfihi, H., Barroug, A., "Nanocrystalline apatites in biological systems: characterization, structure and properties, *Material wissenschaft und Werkstofftechnik*", V.38, (2008), 996-1002.
27. Dorozhkin, S., "Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates", *Acta Biomaterial.*, V. 8, n°3, (2012), 963-977.
28. Valsami-Jones, E., "Mineralogical controls on phosphorus recovery from waste waters", *Mineralogical. Magazine*, V. 65, n°5 (2001), 611-620.
29. Legeros, R.Z., LeGeros, J.P., "Phosphate minerals in human tissues", in: J.O. Nriagu, P.B. Moore, Eds., *Phosphate Minerals*, Springer, Berlin – Heidelberg, (1984),351-385.
30. Hench, L.L., "Bioceramics: From concept to clinic", *Journal of the American Ceramic Society*, V.74, n° 7 (1991), 1487–1510.
31. Gal, J.Y., Bollinger, J.C., Tolosa, H., Gache, N., "Calcium carbonate solubility: A reappraisal of scale formation and inhibition", *Talanta*, V.43, (1996), 1497-1509.
32. Bollinger, J.C., Deluchat, V., Gal, J.Y., Gache, N., Fovet, Y., "Repartition of various soluble and insoluble species in supersaturated solutions", *Pure Applied Chemistry*, V.70, n°10,(1998) 1921-1924.
33. Wu, W., Nancollas, G.H., "The dissolution and growth of sparingly soluble inorganic salts: A kinetics and surface energy approach", *Pure Applied. Chemistry*, V.70, n°10, (1998), 1867-1872.
34. Pang, Y.X., Bao, X.X., "Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles", *Journal of European Ceramic Society*, V. 23, n° 10, (2003), 1697–1704.
35. Kanzaki, N., Onuma, K., Treboux, G., Tsutsumi, S., Ito, A., "Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (0001) face", *the Journal of Physical Chemistry*, V.B 104, n°17 (2000), 4189-4194.
36. Jallot, E., Nedelec, J.M., Grimault, A.S., Chassot, E., Grandjean-Laquerriere, A., Laquerriere, P., Laurent-Maquin, D., "STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids", *Colloids. Surfaces*, V.B 42, (2005), 205-210.
37. Hayakawa, S., Ando, K., Tsuru, K., Osaka, A., Fujj, E., Kawabata, K., Bonhomme, C., Babonneau, F., "Structural characterization and protein adsorption property of hydroxyapatite particles modified with zinc ions", *Journal of American Ceramic Society*, V. 90, (2007), 565–569.
38. Matsunaga, K., "First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate", *the Journal of Chemical Physics*, V.128, n° 24 (2008), 101p.

39. Oukerroum, J.L., Badrou, L., El Hajbi, A., Siniti, M., Bouamrane, A., Sadel, A., Zalim, M., « synthèse et étude physico-chimique des hydroxyapatites mixtes Calcium-Aluminium-Argent », journal Physique et Chimique, V.2, (2001), 129-133.
40. Laquerriere, P., Grandjean-Laquerriere, A., Jallot E., Nardin, M., Frayssinet, P., Nedelec, J-M., Laurent-maquin, D., « influence des propriétés physicochimiques d'hydroxyapatites sur le comportement cellulaire », ITBM-RBM, V. 26,(2005), 200-205.
41. Gopi, D., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., Kanimozhi, K., Kavitha, L., "A novel green template assisted synthesis of hydroxyapatite nanorods and their spectral characterization", Molecular and biomolecular Spectroscopy, V.107, (2013), 196-202.
42. Kaygili, O., Keser, S., "Sol-gel synthesis and characterization of Sr/Mg, Mg/Zn and Sr/Zn co-doped hydroxyapatites", Materials Letters, V.141, (2015), 161-164.
43. Lafon, J., « synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées ». Thèse doctorat, Limoges, (2004), 206p
44. Palard, M., « synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées » thèse doctorat, Limoges, (2007).189p.
45. Elliott, J.C., "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates", Studies in organic chemistry, 1^{er} edition, V. 18, (1994), 404p.
46. Ito, A., Ojima, K., Naito, H., Ichinose, N., Tateishi, T., "Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics". Journal Biomedical Material Research, V. 50, n°2, (2000), 78-183.
47. Montrejaud, M., Rey C., Trombe, J.C., Montel, G., « 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 », (1973), 481-486,
48. Rey, C., « Etude des relations entre apatites et composés moléculaires », thèse doctorat d'état I.N.P, Toulouse, (1993).
49. Chaair, H., « Optimisation de la synthèse en continu des phosphates de calcium », Thèse doctorat d'état I.N.P, Toulouse, (1993).
50. Trombe, C., « Contribution à l'étude de la décomposition et de la réactivité de certaines apatites hydroxylées carbonatées ou fluorées alcalino-terreuses », Thèse doctorat, Université Paul - Sabatier Toulouse, (1972).
51. Osaka, A., Miura, Y., Takeuchi, K., Asada, M., Takahashi, K., « Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid », Journal of Material Society, V. 2, (1991) ,51-55.

52. Sallek, B., « Les phosphates de calcium, support potentiels de médicaments implantables : Etude de leur mécanisme de dissolution et d'absorption », Thèse de doctorat, I.N.P, Toulouse, (1993).
53. Gomez-Morales, J., Orrent-Burgue, J., Boix, T., « Precipitation of stoichiometric hydroxyapatite by a continuous method », *Crystal Growth and Characterization of Materials*, V.36, (2001), 15-26.
54. Wallaey, R., « Contribution à l'étude des apatites phosphocalciques », *Annal Chimie*, V .7, (1952) 808-848.
55. 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 doctorat, Rebat, (1990).
56. Lacout, J.L., « Contribution à l'étude de l'extraction par apoméallurgie du manganèse et du vanadium des apatites », Thèse de doctorat I.N.P, Toulouse, (1983),218p
57. Livage, J., Sanchez C., « Sol-gel chemistry » *journal of non-crystalline solides*, V. 145, (1992) ,11-19.
58. Schmitt, M., « Contribution à l'élaboration de nouveaux matériaux biphasés en phosphates de calcium », Thèse de Doctorat, Nantes, (2000).
59. Santos, M. L., Florentino, A. O., Saeki, M. J., « Synthesis of hydroxyapatite by sol-gel method using alternative precursors: calcium nitrate and phosphoric acid ». *Electric chemistry*, V. 30, n°3 (2005), 29-35.
60. Kay, M.I., Young, R.A., Posner, A.S., "Cristal structure of hydroxyapatite" *Science and Nature*, V. 204, (1964), 1050-1052.
61. Tin-Oo, M.M., Gopalakrishnan, V., Samsuddin, A.R., Salihi, K.A., Shamsuria, O., "Antibacterial property of locally produced hydroxyapatite", *archives of neurofacial sciences*, V. 2, (2007), 41-44.
62. Shepherd, J.H., "Best S.M., Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Repair". *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, V.63, n° 4, (2011), 83-92.
63. Shepherd, J.H., Shepherd, D.V., Best, S.M., « Sustituted hydroxyapatite for bone repair », *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, V. 23, n° 10, (2012), 2335–2347.
64. Kannan, S., Rebelo, A., Lemos, A.F., Barba, A., Ferreira, J.M.F., "Synthesis and mechanical behaviour of chlorapatite and chlorapatite/ β -TCP composites", *Journal of the European Ceramic Society*, V. 27, n° 5, (2007), 2287–2294.

65. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A., « Ionic substitutions in calcium phosphates synthe sized at low temperature », *Acta Biomaterial*, V. 6, n° 6, (2010), 1882-1894.
66. Uskokovic, V., Uskokovic, D., « Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents », *Journal of Biomedical Material. Research. B. Application Biomaterial*, V. 96, n° 1, (2011), 152-191.
67. Cacciotti, I., Bianco, A., Lombard,i M., Montanaro, L., « Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: synthesis, thermal stability and sintering behavior », *Journal of European Ceramic Society*, V. 29, n° 14, (2009), 2969-2978.
68. Dvorak, M.M., Siddiqua, A., Ward, T., Carter, D., Dallas, S., Nemeth E., « Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones », *Proceedings of the National. Academy of Sciences of USA*, V.101, n°14, (2004), 5140-5145.
69. Habibovic, P., Barralet, J., « Bioinorganics and biomaterials: bone repair », *Acta Biomaterial*, V. 7, n° 8, (2011), 3013-3026.
70. Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Gazzano, M., « Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals », *Organical chemical Acta*, V.60, n°3,(2007),1009-1016.
71. Fenga, Q.L., Kim, T.N., Wua, J., Parkb, E., Kimb, J.,Limb, D., « Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates », *Thin Solid Films*, V. 335,n°1-2,(1998), 214-219.
72. Oh, K., Kim, K., Jeong, Y., Park, E., Kim, S., Kwon, J., et al. « Cytotoxicity and antimicrobial effect of Ag doped hydroxyapatite », *European Ceramic Society*, V.264-268, (2004), 2107-2110.
73. Samani, S., Hossainlipour, S., Tamizifar, M., Rezaie, H., « In-vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn + Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methycillin-resistant *S. aureus* », *Journal of Biomedical Material. Research. A*, V. 101, n°1, (2013), 222-230.
74. Costescu, A., Ciobanu, C., Iconaru, S., Ghita, R., Chifiriuc, C., Marutescu, L., « Fabrication, Characterization, and Antimicrobial Activity, Evaluation of Low Silver Concentrations in Silver-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles » *Journal of Nanomaterials*, V. 5, (2013).1-9.
75. Joanna, K., Groszyk, E., Różycka, D., « Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties », *BioMed. Research International*, V.7, (2014).1-15.
76. Tripathy, N., Patel, P., Panda, A., « reparation, IR, and lattice constant measurements of mixed (Ca+Cu+Zn) hydroxyl apatites » *journal of Solid State Chemistry*, V. 80, n° 1, (1989), 1-5.

77. Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M., Roveri, N., « Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization », *Journal of Inorganique Biochemistry*, V. 58, (1995), 49-58.
78. Moonga, B., Dempster, D., « Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro », *Journal of the American Bone and Mineral Research*, V.10, n°3, (1995), 453-457.
79. Ergun, C., Webster, T., Bizios, R., Doremus, R., « Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium structure and microstructure », *Journal of Biomedical Material and Research*, V. 59, n°2, (2002), 305-311.
80. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi A., « Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature », *Acta Biomaterial*, V.6, n°6, (2010), 1882-1894.
81. Miyaji, F., Kono, Y., Suyama, Y., « Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite », *Materials Research Bulletin*, V. 40, n° 2, (2005), 209-220.
82. Li, M., Xiao, X., Chen, C., Huag, L., « Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method », *Journal of Materials and Sciences Materials Medical*, V. 19, n°2, (2008), 797-803.
83. Ren, F., Xin, R., Ge, X., Leng, Y., « Characterization and structural analysis of zinc substituted hydroxyapatites ». *Acta Biomaterials*, V.5, n°8, (2009), 3141-3149.
84. Laquerriere, P., Grandjean-Laquerriere, A., Jallot, E., Nardin, M., Frayssinet, P., Nedelec, J-M., Laurent-maquin, D., «influence des propriétés physicochimiques d'hydroxyapatites sur le comportement cellulaire », *ITBM-RBM*, V. 26, (2005), 200-205.
85. Lima, I., R., Costa, A., M., Bastos, I., N., Granjeiro, J., M., Soares, G., A., "Development and characterization of 5% mol Zn bioceramic in granular form", *Materials Research*, v. 9, n°4, (2006),399-403.
86. Grandjean-Laquerriere, A.,Laquerriere, P.,Jallot, E., Nedelec, J., Guenounou M., Laurent-Maquin, D., « Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro". *Biomaerials*, V.27, n° 6, (2006), 195-200.
87. Guney Tas, A., Bhaduri, S. B., Jalota, S., "Preparation of Zn-doped β -tricalcium phosphate (β -Ca₃ (PO₄)₂) bioceramics", *Materials sciences and engineering*, V. C 27, (2007), 394-401.
88. Li, M., O., Xiao, X., liu, R., "Structural characterization of Zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method", *Journal of Materials Sciences & Materials Medical*, V. 19, (2008), 797-803.
89. Wang, L., Nancollas, G., "Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution", *Chemical. Reviews*, V.108, n° 11, (2008), 4628-4669.

90. Tang, Y., Chappell, H., Dove, M., Reeder, R., Lee, Y., "Zinc incorporation into hydroxylapatite", *Biomaterials*, V.30, n° 15, (2009), 2864-2872.
91. Yang, Y., Zhang, L., Xu, K., "Effect of storing on the microstructure of Ag/Cu/HA powder", *Ceramics International*, V. 35, n° 4, (2009), 1595-1601.
92. Stanic, V., Dimitrijevic, S., Antic-Stankovic, J., Mitric, M., Jokic, B., Plecas, L., "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders". *Applied Surface Science*. V.256, n° 20, (2010), 6083-6089.
93. Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T., Dove, L., Nolan, S., Laminchane, G., "Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*", *Processing National Academic. Science. U S A*, V.108, n° 4, (2011), 1621-1627.
94. Gomes, S., Nedelec, J-M., Renaudin, G., "On the effect of temperature in the insertion of Zinc into Hydroxyapatite", *Acta Biomaterial*, V.8, (2012), 1180–1189.
95. Qiao, Y., Zhang, W., Tian, P., Meng, F., Zhu, H., Jiang, X., Liu, X., Chu P-K., "Stimulation of bone growth following Zinc incorporation into biomaterials", *Biomaterials*, V.35, (2014), 6882-6897.
96. Predoi, D., Iconaru, S.L., Predoi, M.V., Motelica-Heino, M., Guegan, R., Button, N., "Evaluation of antibacterial activity of Zinc-Doped hydroxyapatite", *colloids and Dispersion Stability Nanomaterials*, V.9, (2019), 515-535.
97. Chiranjeevirao, S., Hemmerle, J., Voegel, J., Frank, R., "A method of preparation and characterization of magnesium-apatites", *Inorganica chemical Acta*, V.67, (1982), 183-187.
98. Patel, P., "Magnesium calcium hydroxylapatite solid solutions", *Journal of organic and Nuclear Chemistry*, (1980), 1129-1132.
99. Bigi, A., Falini, G., Foresti, E., Gazzano, M., Ripamonti, A., Roveri, N., "Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization", *Journal of Inorganique Biochemistry*, V.49, (1993), 69-78.
100. Legeros, R. "Calcium phosphates in oral biology and medicine". *Monogr. Oral Science*, V.15, n° 1(1991), 201p.
101. Fuierer, T., Lore, M., Puckett, S., Nancollas, G., "A mineralization adsorption and mobility study of hydroxyapatite surfaces in the presence of zinc and magnesium ions". *Langmuir*, V.10, n° 12, (1994), 4721-4725.
102. Kannan, S., Lemos, I., Rocha, J., Ferreira, J., "Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/B-tricalcium phosphate ratios". *Journal of Solid State Chemistry*, V.178, n° 10, (2005), 6106-6112.
103. Suchanek, W., Byrappa, K., Shuk, P., Riman, R., Janas, V., TenHuisen, K., "Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the

- mechanochemical-method biomaterials”, *Journal Biomaterials*, V.25, n°19,(2004),4647-4657.
104. Ren, F., Xin, R., Ge, X., Leng, Y., “Characterization and structural analysis of zinc substituted hydroxyapatites”. *Acta Biomaterial*, V.5, n° 8, (2009), 3141-3149.
 105. Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M, Roveri, N., “Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization” *Journal inorganic Biochemistry*, V.58, (1995), 49-58.
 106. Laurencin, D., Almora-Barrios, N., Leeuw, N ., Gervais, C., Bonhomme, C., Mauri, F., « Magnesium incorporation in to hydroxyapatite », *Biomaterials*, V.32,n° 7, (2011),1826-1837.
 107. Belluci, M., Giro, G., Barrio, R., Pereira, R., Marcantonio, E., Orrico, S., “Effects of magnesium intake deficiency on bone metabolism and bone tissue around osseointegrated implants”. *Clinical Oral Implants Research*, V. 22, n° 7, (2011), 16-21.
 108. Castiglioni, S., Cazzaniga, A., Albisetti, W., Maier, J., “Magnesium and Osteoporosis: Current State of Knowledge and Future Research Directions”, *Nutrients*, V.5, n° 8, (2013), 3022-3033.
 109. Zhao, S., Jiang, Q., Peel, S., Wang, X., He, F., “Effects of magnesium-substituted nanohydroxyapatite coating on implant osseointegration”, *Clinical Oral Implants Research*, (2013), 34-41.
 110. Chen, Y., Xu, Z., Smith, C., Sankar, J., “Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants”, *Acta biomaterials*, V. 10, (2014), 4561- 4773.
 111. Farzadi, A., Bakhshi, F., Soltani-Hasshjin, M., Asadi-Eydivand, M., Azuan abu osman. N., “Magnesium incorporated hydroxyapatite: synthesis and structural properties characterization” *ceramics international*, V.40, (2014) 6021-6029.
 112. El Saied Hanafi, M., Mohamed Sallam, S., Adel Mohamed, F., “Characterization of hydroxyapatite doped with different concentrations of magnesium ions”, *International Journal of Research Studies in Science, Engineering and Technology*, V. 3, n° 8, (2016), 17-23.
 113. Gayathri, B., Muthukumarasamy N., Velauthapillai D., Santhosh S.B., Sokaan, V., “Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity”, *Arabic. Journal. Chemistry*. V. 11, (2017), 645-654.
 114. Gibson, B.W., “Preparation and characterization of magnesium and carbonate co-substituted hydroxyapatites”, *Journal Materials Science And Materials Medical.*, V.13, n° 7, (2002), 685-693.
 115. Gomes, S., Nedelec, J-M., Jallot, E., Bouhome, C., Babonneau, F., Filinchk, Y., Sheptyakov, D., Renaudin, G., « Etude structural des

- substitutions ioniques dans les BCP Phosphates Calciques Bi-phasiques », *Matériaux*, (2010), 18-22.
116. Rozita, A.R., Rohana, A., Abu Bakar, M., Sam'an, M.M., “ Synthesis and Characterisation of Pure Nanoporous Hydroxyapatite”, *Journal of Physical Science*, V. 22, n° 1, (2011),25-37.
 117. Elmsellem, H., Elgadi, M., Kolli, M.,“Synthèse du phosphate tricalcique apatitique et sa céramisation en β -TCP», *Nature & Technologie : A-Sciences fondamentales et Engineering*, V. 8, (2012) ,2-6.
 118. Gopi, D., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., Kanimozhi K., Kavitha L., « A novel green template assisted synthesis of hydroxyapatite nanorods and their spectral characterization», *Molecular and biomolecular Spectroscopy*, V. 107, (2013), 196-202.
 119. Salhi, A., Arfane, A., Tahiri, S., Khamliche, L., Bensitel, M., Rafqah, S., Benzidia, N., El Krati, M., « Préparation et évaluation de l'efficacité photocatalytique de l'hydroxyapatite Titane vis-à-vis du colorant Acide Orange 7 en milieu aqueux », *Journal Material Environnement. Science*, V. 5, (2014), 1573-1582.
 120. Shanmugam, S., Gopal, B., « Copper substituted hydroxyapatite and fluorapatite: synthesis characterization and antimicrobial properties », *Ceramics International*, V.40, (2014), 15655–15662.
 121. Gopi, D., Shinyjoy, E., Kavitha, L., “Synthesis and spectral characterization of Silver/magnesium co-substituted hydroxyapatite for biomedical applications”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, V. 127, (2014), 286–291.
 122. Uysal, I., Severcan, F, Tezcaner, A., Evis, Z., «Co-doping of hydroxyapatite with zinc and fluoride improves mechanical and biological properties of hydroxyapatite », *Progress in Natural Science : Materials International*, V. 24, (2014), 340-349.
 123. Aryal, S., Matsunaga, K., Ching, W-Y., « Ab initio simulation of elastic and mechanical properties of Zn-and Mg-doped hydroxyapatite (HAP) »*Journal of the Mechanical behavior of Biomedical Materials*, V. 47, (2015), 135-146.
 124. Sodagar, A., Akhavan, A., Hashemi, E., Arab, S., Pourhajibagher, M., Sodagar, K., Javad Kharrazifard, M., Bahador, A., « Evaluation of the antibacterial activity of a conventional orthodontic composite containing silver/hydroxyapatite nanoparticles » *Progress in orthodontics*, V. 17, n° 40, (2016,) 20-23.
 125. Chih, C., Lu, C-T., Chen, S-H., Ou, K-L., «Effect of hydroxyapatite on the Mechanical Properties and Corrosion Behavior of Mg-Zn-Y Alloy », *Materials*, V .10, n° 8 (2018), 855-860.

126. Helen, S., Kumar, R., « Co-dopands on Hydroxyapatite in Structural, Morphology and in Antibacterial Activity », *Mechanics Materials Science & Engineerin*, V. 14, (2018) ,2412-5954.
127. Rajendran, A., Balakrishnan, S., Kulandaivelu, R., Nellaiappan, S., Narayanan, T.S., « Multi-element substituted hydroxyapatites: synthesis, structural characteristics and evaluation of their bioactivity, cell viability, and antibacterial activity”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, V. 86, (2018), 441-458.
128. Laskus, A., Zgadzaj, A., Kolmas, J., « Zn²⁺ and SeO₃²⁻ co-substituted hydroxyapatite: Physicochemical properties and biological usefulness », *Ceramics International*, V.45, (2019), 14474-14478.
129. Ates, T., Dorozhkim, S.V., Kaygili, O., Kom, M., Ercan, I., « The effects of Mn and/or Ni dopants on the in vitro/in vivo performance, structural and magnetic properties of β-tricalcium phosphate bioceramics », *Ceramics International*, V. 39, (2019) ,1-115.
130. Rybak, M.J., “Resistance to antimicrobial agents: an update”. *Pharmacotherapy*, V. 24, n°12, (2004), 203-215.
131. Hart, T., Shears, P., « Atlas de poche de microbiologie Médecine Sciences-Flammarion », Casinir-Delarigne, Paris, (1997), 423 p.
132. Bauer, A.W., Kirby W.M.M., Scherris J.C., Turck M., “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method”, *The American Journal of Clinical Pathology*. 45, (1966), 493-496.
133. Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring J., Reed M., et al. (2004). “Degradation of human antimicrobial peptide LL37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* », V. 48, (2004), 4673-4679.
134. Labayle D., « Guide Pharmaco », Edition Lamare, Paris, 568, (2001).
135. Kiouba, J., « Usage des antibiotiques en milieu hospitalier »,Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bamako, (2003).
136. Gherib, A., “Chimie Thérapeutique”, Office de Publication Universitaire, Alger, V.1, (1883).
137. Dupon, B., Drouhet, E., « Antifongiques. *Encycl. Méd. Chir* », Paris, V.14, (1987).
138. Vaubourdolle, M., “Infectiologie”, 3ème Edition. Paris, Wolters Kluwer, (2007).
139. Joly, B., Reynaud, A., “Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic”, Tec & Doc, (2003), 356 p.
140. Ferron, A., “Bactériologie médicale à l’usage des étudiants en médecine”, 12 ème édition, éditions C. et R., (1983), 376 p.

141. Alcamo, E., « Fundamentals of microbiology », 5ème Edition : The Fungi-Adison Wilsey Longman Inc, (1997), 429-461.
142. Association pharmaceutique canadienne (APC), « Compendium of nonprescription products: summer », Canadian Pharmacists Association, 8th edition, Ottawa, (2001).
143. White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A., "Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance", *Clinical Microbiology Reviews*, V. 11, (1998), 382-402.
144. Ouraini, D., Agoumi, A., Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Belabbas, M., "Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha Pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques- Phytothérapie" ; Vol.1, (2007) ,6-14.
145. Mohammedi, Z., "Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie". Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Tlemcen, (2013) ,169p.
146. Cullity, B, Stock, S., "Elements of X-Ray Diffraction. 3", Illustrated Ed: Prentice Hall, (2001).
147. Ferraro, J., Krishnan, K., "Practical Fourier transform infrared spectroscopy: Industrial and laboratory chemical analysis", San Diego: Elsevier, (2012).
148. Hoffmann, P., "Atomic and nuclear analytical methods. XRF, Massbauer, XPS, NAA and ion-beam spectroscopic techniques". *Analysis Bioanal Chemistry*. V. 391, n° 6, (2008), 2103-2104.
149. Pibiri, M.C., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles ». Thèse de doctorat, Ecole poly-technique fédérale, EPFL. Lausanne, (2005).157p
150. Ponce, A.G., Fritz, R., Delvalle, C., Roura, S.I., « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », V.36, (2003), 679-684.
151. Koutsopoulos, S., "Synthesis and Characterisation of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on the Analytical Methods", *Journal Biomedical Material. Resereach*. V.62, n° 4, (2002), 600-612.
152. Smiciklas, I., Onjia, A., Raicevic, S., "Experimental Design Approach in the Synthesis of Hydroxyapatite by Neutralization Method", *Separation and Purification Technology*, V. 44 (2), (2005), 97-102.
153. Adzila, S., Ramesh, S., Sopyan I., Tan, C.Y., Hamdi, M., Teng, W.D., "Mechanochemical synthesis of magnesium doped hydroxyapatite: Powder characterization", *Appl. Mech. Mater.*, V. 372, (2013), 62-65.
154. Gopal, R., Calvo, C., Ito, J., Sabine, W.K., "Crystal structure of synthetic Mg-Whitlockite, $\text{Ca}_{18}\text{Mg}_2\text{OH}_2(\text{PO}_4)_{14}$ ", *Canadian Journal Chemistry*, V. 52, (1974), 1155-1164.

155. Matsunaga, K., "First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate", *Journal Chemistry. Physical.* V.128, (2008).
156. Kang, S., "Sintering: "Densification, Grain Growth and Microstructure: Butter worth Heinemann", (2004), 280 p.
157. Gibson, I., Bonfield, W., "Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite", *Journal Biomedical. Material Research*, V.59 n° 4, (2002), 697-708.
158. Siddharthan, A., Seshadri, S., Sampath, Kumar, T., "Rapid synthesis of calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles by microwave irradiation. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*", V.18, n° 2, (2005), 110-113.
159. Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Thomas, P., "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio Synthesis, characterisation and thermal stability of powders", *Biomaterials*, V. 23 n° 4, (2002) ,1065-1072.
160. Prakash, K., Ooi, C., Kumar, R., Khor, K., Cheang, P., "Effect of super saturation level on the size and morphology of hydroxyapatite precipitate", *Emerging Technologies, Nanoelectronics*, Singapore: IEEE, (2006), 345-349.
161. Furuzono, T., Walsh, D., Sato, K., Sonoda, K., Tanaka, J., "Effect of reaction temperature on the morphology and size of hydroxyapatite nanoparticles in an emulsion system", *Journal of Materials Science Letters*, V. 20, n° 2, (2001), 111-114.
162. Ferraz, M.P., Monteiro, F.J., "Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies", *Journal of Applications Biomaterials Biomechistry*, V. 2, (2004), 74-80.
163. Abidi, S. S. A., Murtaza, Q., "Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction". *Journal of Materials Science & Technology*, V. 30, n° 4, (2014), 307 –310.
164. Askari louyeh, M., "Silver, Magnesium and Zinc Substituted Hydroxyapatite for Orthopaedic Applications", thèse doctorat, Université de Birmingham, (2016), 269p.
165. Gayathri, B., Muthukumarasamy, N., Velauthapillai, D., Santhosh, S.B., Asokan, V., "Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity", *Arabic Journal Chemistry.*, V. 11, (2018), 645-654.
166. Guzman, M., Dille, J., Godet, S., "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria", *Nanomed Nanotechnol Biological Medical.*, V.8,(2012),37-75.

167. Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Aberasturi, D.J., Larramendi, I.R., Rojo T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M., "Antibacterial properties of nanoparticles", *Trend. Biotechnol.*, V. 30, (2012), 499-511.
168. Stanić, V., Dimitrijević, S., Antić-Stanković, J., Mitrić, M., Jokić, B., Plećaš, I.B., Raičević, S., "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders", *Appl. Surf. Sci.*, V. 256, (2010), 6083-6089.
169. Grandjean-Laquerriere, A., Laquerriere, P., Jallot E., Nedelec, J.M., Guenounou, M., Laurent-Maquin, D., Phillips, T.M., "Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro", *Biomaterials*, V. 27, (2007), 3195-3200.
170. Shanmugam, S., Gopal, B., "Copper substituted hydroxyapatite and fluorapatite: Synthesis, characterization and antimicrobial properties", *Ceramic International*, V. 40, (2014), 15655-15662.
171. Ajduković, Z.R., Mihajilov-Krstev, T.M., Ignjatović, N.L., Stojanović, Z., Mladenović-Antić, S.B., Kocić, B.D., Najman S., Petrović, N.D., Uskoković D.P., « In vitro evaluation of nanoscale hydroxyapatite-based bone reconstructive materials with antimicrobial Reconstructive properties", *Journal of Nanoscience And Nanotechnology*, V.16, (2016), 1420-1428.
172. Rajendran, A., Balakrishnan, S., Kulandaivelu, R., Nellaiappan, S.K.T.S., "Multi-element substituted hydroxyapatites: synthesis, structural characteristics and evaluation of their bioactivity, cell viability, and antibacterial activity", *Journal of Sol-Gel Science and Technologie*, V.86, (2018), 441-458.