

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés
Laboratoire de Génie de l'Environnement

Mémoire

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE Master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés
Spécialité : Génie Pharmaceutique

Présenté par

SOUAGUI Radia

Thème

**Préparation et évaluation microbiologique des poudres de
biocéramique pour applications en biomédical.**

Soutenu le 07/07/2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
KHIREDDINE Hafit	Professeur	Université de Béjaia	Président
RAMDANI Nacer	MCB	Université de Béjaia	Examineur
SIDANE Djahida	MCB	Université de Béjaia	Encadrant
BOUREBABA Yasmina	MCB	Université de Béjaia	Co-Encadrant

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Les matériaux élaborés durant ce projet de mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Génie de l'Environnement (LGE) de l'université de BEJAIA, ainsi, je tiens à remercier les membres de ce laboratoire. Pour commencer, je tiens à exprimer ma sincère gratitude à mon encadrant Mme SIDANE Djahida qui m'a aidée dans la réalisation de ce mémoire et pour la qualité de son encadrement exceptionnel et je voudrais la remercier aussi pour sa gentillesse. Je tiens également à remercier Mr KHIREDDINE Hafit de m'avoir accueillie au sein de son équipe tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme BOUREBABA Yasmina, mon co-encadrant pour son aide dans la réalisation des tests microbiologiques.

Mes remerciements vont également aux membres de jury, Mr KHIREDDINE Hafit et Mr RAMDANI Nacer pour avoir accepté d'examiner ce travail et je profite aussi pour remercier énormément Mr RAMDANI Nacer pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire « Laboratoire de Biologie des Sols, Pédologie ».

Je remercie enfin tous mes proches pour leurs conseils et soutien moral.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mon support dans ma vie, celui qui m'a appris, m'a orienté et m'a dirigé vers la gloire ...

À mon père décédé, trop tôt, que Dieu l'accueille en son vaste paradis.

J'espère pouvoir, à travers ce mémoire, lui faire preuve de ma reconnaissance.

De la part de sa fille qui a toujours prié pour le salut de son âme.

À ma chère mère qui m'a béni par ces prières, qui m'a soutenue durant toutes mes années d'études.

À ma chère sœur Siham, mon cher frère Mokran et ma belle-sœur Wazna.

À tous les membres de ma famille.

À mes meilleures amies Yamira et Amira.

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures et tableaux

Introduction..... 01

Chapitre I : Biomatériaux et tissu osseux

I.1. Notion d'un biomatériau..... 02

I.2. Propriétés des biomatériaux..... 02

I.3. Classification des biomatériaux 03

I.4. Tissu osseux..... 05

I.4.1. Cellules osseuses et mécanisme de remodelage osseux..... 05

I.4.2. Collagène/gélatine : Composante organique principale du tissu osseux 07

I.4.3. Hydroxyapatite : Constituant minéral principal du tissu osseux..... 10

I.4.3.1. Apatite de l'os..... 10

I.4.3.2. Hydroxyapatite stoechiométrique..... 10

I.4.3.3. Application de HAP dans le domaine de la médecine et de la pharmacie..... 11

I.5. Application du biomatériau : Substitut osseux en hydroxyapatite..... 11

Chapitre II : Infection des implants et stratégie de prévention

II.1. Types et origines des infections bactériennes 12

II.2. Infections dues aux implants médicaux..... 12

II.3. Résistance des bactéries..... 13

II.4. Effet antimicrobien d'ions métalliques sur les microorganismes..... 14

II.5. Intérêt biologique de l'hydroxyapatite substituée..... 15

II.6. Mécanisme d'action antibactérien..... 16

Chapitre III : Matériel et méthodes

III.1. Elaboration des poudres de biocéramique.....	18
III.1.1. Synthèse des composites HAP-gélatine(HG).....	18
III.1.2. Synthèse des composites HAP-gélatine-silice (HG-silice).....	19
III.1.3. Synthèse de HAP dopée (HAP-métal)	21
III.2. Test microbiologique	22
III.2.1. Résistance et sensibilité de souches testées aux biomatériaux	22
III.2.2. Préparation et ensemencement de la suspension bactérienne.....	22
III.2.3. Mise en contact des poudres de biomatériaux.....	22
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des poudres.....	22
III.4. Analyses chimique et structurale des poudres.....	23
III.4.1. Analyse par spectrophotométrie Infra-rouge (FTIR).....	23
III.4.2. Analyse par diffractions des Rayons X (DRX).....	23

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Analyse des poudres par spectrophotométrie IR.....	24
IV.2. Analyse des poudres par diffraction des rayons X.....	28
IV.3. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne des poudres de biocéramique.....	32
IV.3.1. Composite HAP-gélatine.....	32
IV.3.2. Composite HAP-gélatine-silice.....	33
IV.3.3. HAP substituée (HAP-Ag, HAP-Zn, HAP-(Ag+Zn) et HAP-Ce).....	34
Conclusion	37
Références bibliographiques	38

Annexes

Liste des abréviations

Abréviation/symbole	Signification
B-TCP	Phosphate tri-calcique ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CaO	Oxyde de calcium (chaux)
DRX	Diffraction des Rayons X
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformer de Fourier
HAP	Hydroxyapatite
HAP-Ag	Hydroxyapatite dopée par l'argent
HAP-(Ag+Zn)	Hydroxyapatite co-dopée par l'argent et le zinc
HAP-Ce	Hydroxyapatite dopée par le cerium
HAP-Zn	Hydroxyapatite dopée par le zinc
HG	Composite : hydroxyapatite -gélatine
HG-Si	Composite : hydroxyapatite -gélatine-silice (voie humide)
HG/Si	Composite : hydroxyapatite-gélatine- silice (voie solide)
ICDD	International Center for Diffraction Data
KBr	Bromure de potassium
MEC	Matrice extracellulaire
nM	Nano molaire
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TEOS	Orthosilicate de tétraéthyle
(1)	Concentration N°1 ($x = 0,05$ mol)
(2)	Concentration N°2 ($x = 0,1$ mol)
(3)	Concentration N°3 (100 ppm)
(4)	Concentration N°4 (10000 ppm)

Liste des figures et tableaux

N°	Titre de la figure	Page
01	Etapes de remodelage osseux.	05
02	Organisation structurale d'os.	06
03	Os compact et spongieux ou trabéculaire.	06
04	Fibre de collagène et cristaux d'apatite.	07
05	Schéma de la structure d'une molécule de collagène comprise au sein d'une fibrille.	08
06	Formules chimiques de la gélatine et des acides aminés les plus abondants dans la molécule de collagène de type I.	09
07	Projection de la maille de HAP sur le plan (001).	10
08	Schéma de formation d'un biofilm bactérien de <i>S. aureus</i> sur un implant.	13
09	Schéma du mécanisme d'action antibactérienne de Ag,Si-HAP.	16
10	Schéma correspondant au mode opératoire de préparation des poudres de HAP pure et HAP-gélatine (HG).	18
11	Schéma correspondant au mode opératoire de préparation des poudres HAP-gélatine-silice (HG-Si) par voie humide.	19
12	Schéma correspondant au mode opératoire de préparation des poudres HAP-gélatine-silice (HG/Si) par voie solide.	20
13	Spectres FTIR de HG0 et HG10.	24
14	Spectres FTIR : (a) HG0-Si, HG10-Si et HG30-Si synthétisés par voie humide. (b) HG0/Si, HG10/Si et HG30/Si synthétisés par voie solide.	25
15	Spectres FTIR : (a) HAP-Ag (1) et HAP-Zn (1). (b) HAP-Ag (4) et HAP-Zn (4).	27
16	Diagrammes DRX de HG0 et HG10.	28
17	Diagrammes DRX : (a) HG0-Si et HG30-Si synthétisés par voie humide. (b) HG0/Si et HG30/Si synthétisés par voie solide.	29

18	Diagrammes DRX : (a) HAP-Ag (1), HAP-Zn (1), HAP-(Ag+Zn) (1) et HAP-Ce (1). (b) HAP-Ag (4), HAP-Zn (4) et HAP-(Ag+Zn) (4).	30
19	Antibiogrammes de (a) HG0 (contrôle), (b) HG10, (c) HG20, (d) HG30. HG50 au milieu de la boîte (pour m2 = 0,05g).	32
20	Antibiogrammes de (f) HG0-Si, (g) HG10-Si, (h) HG20-Si, (i) HG30-Si, (j) HG0/Si, (k) HG10/Si, (l) HG20/Si, (m) HG30/Si. (e) HG0 (contrôle au milieu de la boîte).	33
21	Antibiogrammes de (A) HAP-Zn (1), (B) HAP-Ag (1), (C) HAP-(Ag+Zn) (1), (D) HAP-Ce (1), (F) HAP-Zn (2), (G) HAP-Ag (2), (H) HAP-(Ag+Zn) (2), (i) HAP-Ce (2), (E) HAP (contrôle).	34
22	Antibiogrammes de (J) HAP (contrôle), (K) HAP-Zn (3), (L) HAP-Ag (3), (M) HAP-(Ag+Zn) (3), (N) HAP (contrôle), (O) HAP-ZN (4), (P) HAP-Ag (4), (Q) HAP-(Ag+Zn) (4).	35

N°	Titre du tableau	Page
I	Classification des biomatériaux.	03
II	Composition minérale de l'os.	10
III	Exemples de substitutions dans la structure apatitique.	15
IV	Paramètres de synthèse des poudres composites	20
V	Paramètres de synthèse des poudres dopées	21

Introduction

Introduction

L'hydroxyapatite est l'une des principales biocéramiques utilisées en chirurgie. Les cas des hydroxyapatites composites (hydroxyapatite-gélatine) et (hydroxyapatite-gélatine-silice) et substituées ou dopées (hydroxyapatite-métal) sont le centre d'intérêt de ce travail.

En fait, la poudre d'hydroxyapatite est dopée par des éléments métalliques qu'on peut retrouver dans la phase minérale de l'os et qui possèdent également des propriétés antimicrobiennes tels que Ag, Zn et Ce, donc ils sont considérés comme étant des agents antibactériens. L'incorporation de ces éléments dans la structure apatitique peut engendrer des substitutions au niveau de son réseau cristallin. Le silicium qui à son tour rentre dans la composition et la formation de l'os est inséré dans le composite hydroxyapatite-gélatine, sous forme de silice (SiO_2) par voies solide et humide.

Ainsi, l'objectif de ce travail est de vérifier l'activité antibactérienne de l'hydroxyapatite pure et composite. Pour l'étude de l'effet antibactérien des poudres élaborées, nous avons porté notre choix sur une souche représentative des bactéries à Gram négatif, *Escherichia coli* et une souche représentative des bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus* ainsi qu'une levure, *Candida albicans*.

L'hydroxyapatite, le collagène et la gélatine font l'objet du premier chapitre après avoir donné quelques rappels sur la notion d'un biomatériau et du tissu osseux.

Le deuxième chapitre portera quant à lui sur le problème majeur rencontré lors d'implantation osseuse à savoir les infections bactériennes ou fongiques des implants et la stratégie à adopter afin de réduire leur effet. Une attention particulière a été accordée aux agents antibactériens et aux souches qui ont fait l'objet de notre travail.

Au cours du troisième et quatrième chapitre, il y sera décrit la méthodologie expérimentale de travail adoptée ainsi que l'interprétation et la discussion des résultats obtenus. Enfin, nous terminons par une conclusion qui rassemble les points essentiels de ce mémoire et proposerons quelques perspectives pouvant apporter une plus-value à ce travail.

Chapitre I

Biomatériaux et tissu osseux

I.1. Notion d'un biomatériau

Un biomatériau est défini comme étant un matériau inerte, non vivant, destiné à être en contact temporaire ou permanent avec des systèmes biologiques (tissus, organes ou fluides d'un être vivant) pour évaluer, traiter, augmenter ou remplacer un tissu, un organe ou une fonction quelconque du corps humain. C'est la définition qui a été retenue au cours de la Conférence de Chester de la Société Européenne des Biomateriaux (1986) [1].

Vaisseaux artificiels, valves cardiaques, stents, implants dentaires, prothèses de la hanche, os ou cartilage synthétique, cœur artificiel, broches, matériaux de suture, greffes de cellules ou de tissus, etc. qu'ils soient synthétiques, vivants ou hybrides, tous ces éléments utilisables à des fins médicales pour remplacer une partie ou une fonction d'un organe ou d'un tissu constituent des *biomatériaux* [2].

Ces biomatériaux sont souvent associés pour former des biomatériaux composites, par exemple une prothèse articulaire peut contenir du titane, être scellée avec un ciment méthacrylique, avoir des surfaces partiellement recouvertes de céramique (hydroxyapatite) et comporter des surfaces de glissement en polyéthylène. Plus récemment, s'est développé l'utilisation de biomatériaux vivants et hybrides, recouverts de molécules biologiques ou pré cultivés avec des cellules du patient pour accélérer l'intégration tissulaire [1].

I.2. Propriétés des biomatériaux

L'enjeu global est d'introduire dans le corps humain, pour une longue durée, un matériau étranger en s'assurant qu'il puisse poursuivre sa nouvelle fonction sans entraîner une quelconque complication. Les biomatériaux doivent pouvoir être mis en forme, être implantables ou injectables, dégradables ou non suivant le cas, éventuellement poreux s'ils doivent être colonisés une fois implantés [3].

Un biomatériau doit être bien toléré par le receveur (biocompatible), c'est à dire ne pas provoquer d'infection, d'inflammation, d'allergie, voire de réaction de rejet et doit répondre à des contraintes mécaniques pour s'adapter aux pressions exercées par l'environnement telles que le poids du corps pour des prothèses de hanche ou de genou [3].

I.3. Classification des biomatériaux

Les biomatériaux ont été classés en se basant sur le type de réaction entre le biomatériau et le tissu vivant [4]. D'après le **tableau I**, les différents types de biomatériaux classés selon les quatre types de réaction peuvent être biotoxiques, bioinertes, bioactifs ou biorésorbables à des degrés variables [4, 5].

Tableau I : Classification des biomatériaux.

Type de biomatériau	Réaction de l'organisme	Matériau
Biotoxique	Rejet du tissu vivant à la proximité du matériau suite à un procédé chimique ou galvanique.	- Alliages contenant du cadmium, vanadium,... - Aciers et carbures.
Bioinerte	Matériau lié au tissu vivant par une capsule fibreuse d'épaisseur variante.	- Oxydes de zirconium, aluminium, titane et tantale.
Bioactif	Formation d'un lien biochimique direct avec la surface du matériau.	- Hydroxyapatite dense. - Phosphate tricalcique. - Bioverres.
Biorésorbable	Dissolution graduelle du matériau par le biosystème de l'organisme et son remplacement sans toxicité ou rejection.	- Hydroxyapatite poreuse. - Phosphate tricalcique. - Certain bioverres. - Polyuréthane

✚ Les biomatériaux peuvent être *entièrement synthétiques* et interagissent peu avec l'environnement du site d'implantation [6]. Il existe trois types de matériaux de ce type:

- **Métaux** (acier inoxydable, titane etc.), utilisés dans la fabrication des prothèses de hanche par exemple, ou celle des broches.
- **Céramiques** qui sont des matériaux inorganiques, tels que l'alumine, zircone, hydroxyapatite, phosphate tricalcique, la silice etc.
- **Polymères**, tels que des plastiques, colles, résines ou encore des hydrogels servant par exemple à la conception de lentilles de contact [6].

✚ Les chercheurs développent également des biomatériaux à partir de *matériaux d'origine naturelle* comme du corail ou d'autres constituants extraits d'organismes végétaux ou animaux comme la chitine, l'alginate, l'héparine, le fucoïdane, la cellulose, le collagène ou la fibrine [6]. Il existe aussi des biomatériaux combinant plusieurs matières : on parle de *biomatériaux composites* [6].

✚ Les **biomatériaux équipés de molécules actives** à savoir les facteurs de croissance, peptides ou encore analogues, etc. L'idée consiste à utiliser des molécules actives pour contrôler le devenir des cellules de l'organisme amenées à interagir ou à coloniser le biomatériau. Par exemple un biomatériau de réparation du cartilage. Il comprend une membrane nanofibreuse à base de collagène et de polycaprolactone ressemblant à la matrice extracellulaire qui entoure le cartilage et contient des nanoréservoirs qui renferment des facteurs de croissance de l'os [6].

✚ Des tissus ou des organes vivants, manipulés afin de changer leurs propriétés, sont considérés comme des **biomatériaux vivants**. C'est par exemple le cas de tissus vivants obtenus à partir de cellules en culture, comme des fragments de peau issus de cellules du patient ou de cellules souches. La qualité des tissus produits s'est améliorée dans les années 90, grâce à l'utilisation de polymères synthétiques servant d'échafaudages pour les cellules. Devenue omniprésente, cette stratégie permet la conception de matériaux 3D implantables pouvant être colonisés par des cellules [6].

✚ Les **biomatériaux hybrides** correspondent à l'association de matériel synthétique et de matériel vivant [6]. Ils contiennent des cellules dont les fonctions sont variables et peuvent être destinées :

- à produire des facteurs nécessaires à la réparation du tissu ;
- à produire une matrice extracellulaire servant d'échafaudage pour d'autres cellules ou encore à se différencier en cellules spécifiques et fonctionnelles du tissu à réparer ;

Ces biomatériaux sont très prometteurs, mais chaque indication nécessite d'identifier et de tester des cellules particulières, répondant à des besoins spécifiques [6].

Les chercheurs tentent en outre d'évaluer précisément le devenir des cellules après leur implantation, ainsi que leur contribution exacte dans la reconstruction du tissu par rapport aux cellules du tissu hôte. Ils utilisent pour cela des techniques d'imagerie (microscopie, IRM, etc.). L'analyse histologique du tissu nouvellement formé permet en outre d'identifier la présence des cellules implantées dans le biomatériau, grâce à des marquages spécifiques. D'autres stratégies de reconstruction des tissus sont apparues récemment. Elles visent à équiper les matériaux de moyens leur permettant de mieux s'intégrer au sein des tissus receveurs. Elles s'appuient sur l'utilisation de composants biologiques comme des protéines ou des cellules et donnent une dimension biologique au terme « biomatériau » et impliquent l'ingénierie tissulaire [6].

I.4. Tissu osseux

I.4.1. Cellules osseuses et mécanisme de remodelage osseux

Le tissu osseux est fait de cellules osseuses noyées dans une matrice osseuse. Les tissus biologiques d'une façon générale sont composés de cellules, d'une trame organique et d'une phase minérale, ces deux dernières formant la matrice extracellulaire (MEC) [7]. La MEC donne une structure à l'organe et joue un rôle de support pour l'attachement et la migration des cellules. Les tissus osseux se renouvellent constamment en décomposant les tissus plus vieux et en les remplaçant par de nouveaux tissus. On appelle ce processus le « remodelage ». Les cellules à la base de ce cycle de renouvellement comprennent :

- Les **ostéocytes**, qui forment le tissu vivant des os.
- Les **ostéoclastes** (cellules de dissolution des tissus osseux), qui solubilisent la matière minérale des os.
- Les **ostéoblastes** (cellules de formation des tissus osseux), qui participent à la formation de la substance fondamentale et se transforment en ostéocytes [7].

Selon la **figure 01**, l'os se renouvelle en cinq étapes [7-9] :

Phase de quiescence au cours de laquelle l'os est en repos, sa surface est recouverte de cellules allongées et très fines « cellules bordantes ».

Phase d'activation où les cellules mononuclées coupent les cellules bordantes et se regroupent sur la surface minéralisée de tissu.

Phase de résorption du tissu osseux où les ostéoclastes se répartissent le long du tissu osseux en résorbant un petit volume de l'os et formant une cavité de dimensions bien déterminées. Ensuite, les ostéoclastes sont remplacés par des cellules mononuclées d'origine macrophagique et/ ou précurseurs d'ostéoblastes.

Phase intermédiaire, les cellules mononuclées aplanissent la surface de la cavité et engendrent la formation d'un nouveau tissu jeune minéralisé.

Phase de production de l'os (3 mois), le processus se poursuit jusqu'à ce que la lacune soit comblée par l'os jeune et les ostéoblastes synthétisent les fibres de collagène et les protéines nécessaires à la minéralisation. L'os retourne à l'état inactif jusqu'au cycle suivant.

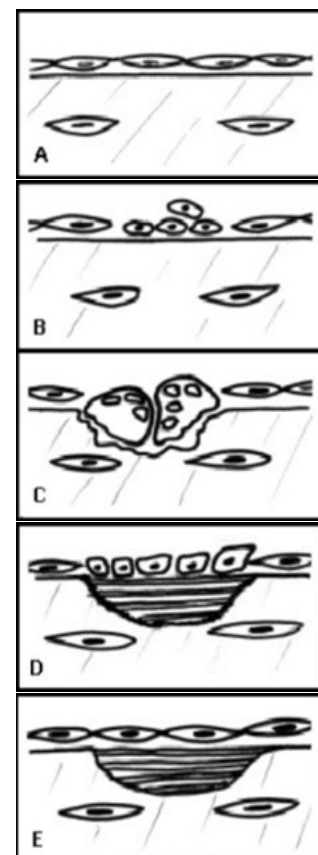


Figure 01 : Etapes de remodelage osseux [7-9].

L'os est un tissu vivant composé de protéines, de calcium et d'autres minéraux, ainsi que d'eau. L'os naturel est approximativement composé de 67% de phase minérale, 21% de phase organique et 12% d'eau [10].

Les différentes formes des os sont présentées sur la **figure 02** où on peut distinguer les os longs, tel que le fémur, les os courts, tels que les phalanges de la main et du pied ainsi que le calcanéum et les os plats, tels que les os du crâne et les os irréguliers, tel que la vertèbre, les os du crâne et les os sésamoïdes (os de la main) [11].

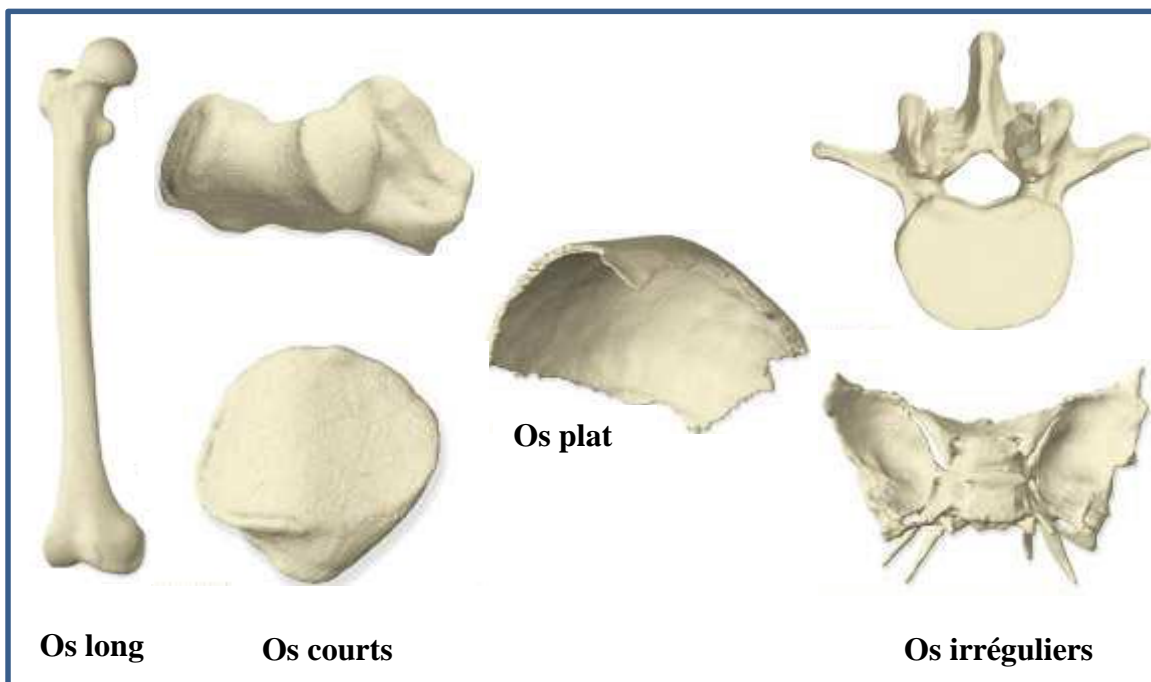


Figure 02 : Organisation structurale d'os [11].

Il existe deux types de tissu osseux (voir **Figure 03**) : une partie dense et rigide, c'est l'os cortical, et une partie moins résistante que l'os cortical et poreuse, c'est l'os spongieux ou trabéculaire [12].

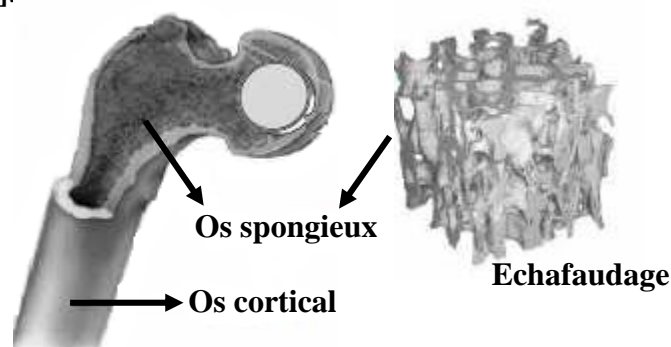


Figure 03 : Os compact et spongieux ou trabéculaire.

<http://www.medix.free.rf/cours/histologie-cytologie-os.php>

L'os spongieux constitue la partie centrale de l'os. Il est riche en cellules conjonctives adipeuses et en éléments sanguins mais sa résistance est faible car il est peu dense. L'os spongieux se trouve essentiellement dans les os courts et plats et dans l'épiphyse des os longs tel le fémur. La partie périphérique de l'os est composée d'os cortical (ou compact) : c'est une partie osseuse dense, dure et très résistante formant un manchon plus ou moins épais. L'os cortical constitue la diaphyse des os longs et l'enveloppe des os courts et plats [12]. Au niveau microstructural, l'os est considéré comme étant un matériau composite qui associe une phase organique (principalement des fibres de collagène) représentant 35% du poids osseux et une phase minérale constituée de cristaux de calcium (voir **Figure 04**) [13, 14].

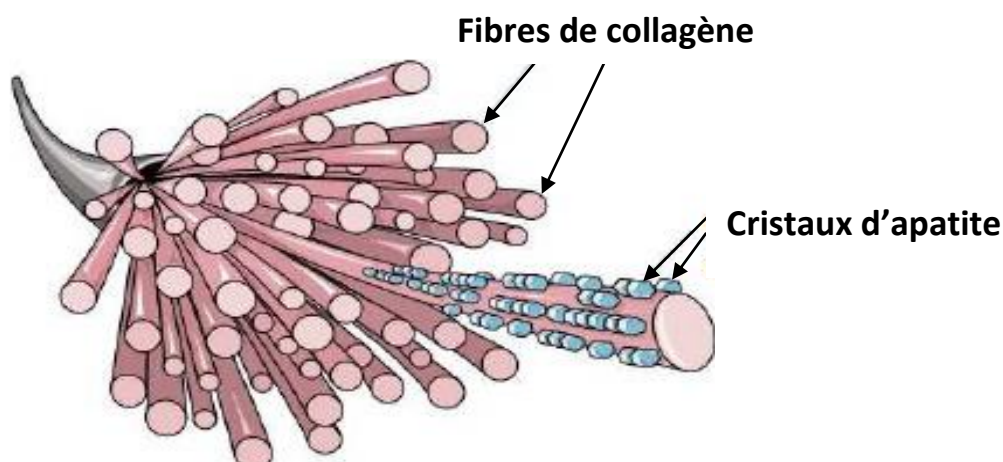


Figure 04 : Fibres de collagène et cristaux d'apatite [13, 14].

La phase minérale contient des phosphates de calcium principalement, sous forme de cristaux d'apatite carbonatée [7] [15].

I.4.2. Collagène/gélatine : composante organique principale du tissu osseux

La phase organique constituante du tissu osseux est composée de fibres de collagène et d'une substance fondamentale constituée de lipides et de protéines non collagéniques, qui interviennent dans le processus de minéralisation osseuse en se liant au calcium et en le fixant sur les cristaux d'hydroxyapatite [10]. Le collagène représente presque la totalité de la matière organique de l'os. Les molécules de collagène s'ordonnent parallèlement entre elles selon une organisation précise. La nucléation des cristaux d'apatite débiterait au niveau des espaces entre ces molécules. La formation des fibrilles de collagène, en se groupant en faisceaux épais, donne naissance aux fibres de collagène [16, 17].

En effet, le collagène est la protéine la plus abondante chez les animaux, elle représente 25 à 30% de toutes les protéines de l'organisme humain. Il existe une vingtaine de types de collagène, chacun possédant une structure propre et se retrouvant dans des organes particuliers. Le collagène de type I intervient majoritairement dans la structure de la peau, des tendons, des os et de la cornée où l'arrangement spatial des fibrilles de collagène y est spécifique. Le type II est présent essentiellement dans les cartilages, tandis que le type III se retrouve principalement au niveau du système cardiovasculaire [18, 19].

La molécule de collagène, représentée sur la **figure 05** est une triple hélice de chaînes polypeptidiques. Chaque chaîne peptidique est composée d'un millier d'acides aminés. Dans une chaîne polypeptidique les séquences d'acides aminés Glycine-Proline-X et Glycine-X-Hydroxyproline y sont répétées, X pouvant être divers autres acides aminés. Les chaînes polypeptidiques sont séparées de 0,45 nm. Le pas d'une triple hélice est d'environ 30 acides aminés, soit 8,5 nm. La longueur d'une molécule de collagène est de 300 nm et le diamètre de 1,2 nm [20, 21].

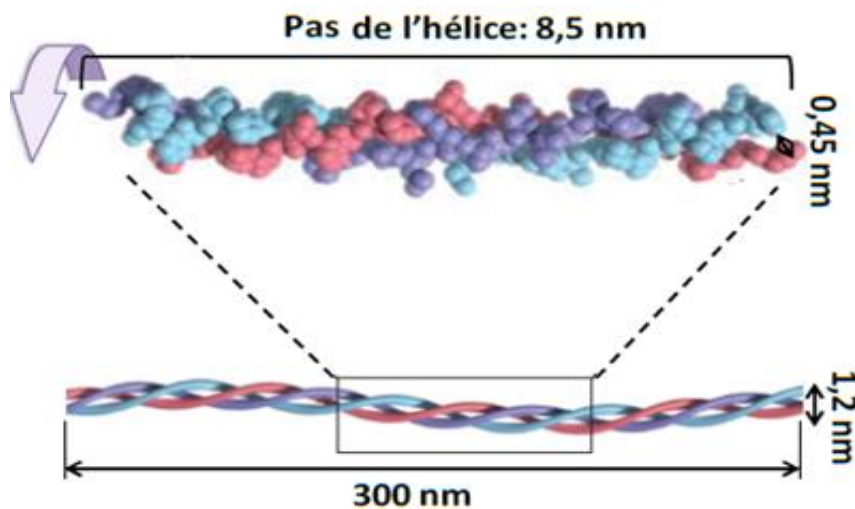


Figure 05 : Schéma de la structure d'une molécule de collagène comprise au sein d'une fibrille [20, 21].

❖ Du collagène à la gélatine

Les molécules de collagène se dénaturent irréversiblement en gélatine au-delà de 37°C donc la gélatine est une forme dénaturée du collagène. La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Pour que la gélatine soit solubilisée il est nécessaire de la chauffer à des températures supérieures à 40°C pour lesquelles elle présente une structure dite désordonnée [22].

Si l'on refroidit la solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place. Les propriétés gélifiantes de la gélatine (formation du gel, l'effet épaississant, la texturation, etc.) sont dépendantes de la viscosité, de la structure, de la masse moléculaire et de la température du système. Les propriétés de surface de la gélatine sont basées sur le fait que les chaînes latérales ont des groupements hydrophiles ou hydrophobes qui ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse [22].

La gélatine est composée d'acides aminés hydrophobes et hydrophiles, qui lui confèrent un caractère amphiphile. Elle est composée de groupes chargés positivement (13% de lysine et d'arginine), des groupes chargés négativement (~ 12% d'acide glutamique et aspartique) et des groupes hydrophobes (~ 11% de la chaîne comprenant la leucine, isoleucine, méthionine et valine). L'autre partie de la chaîne contient de la glycine, de la proline et de l'hydroxyproline (voir **Figure 06**) [23, 24].

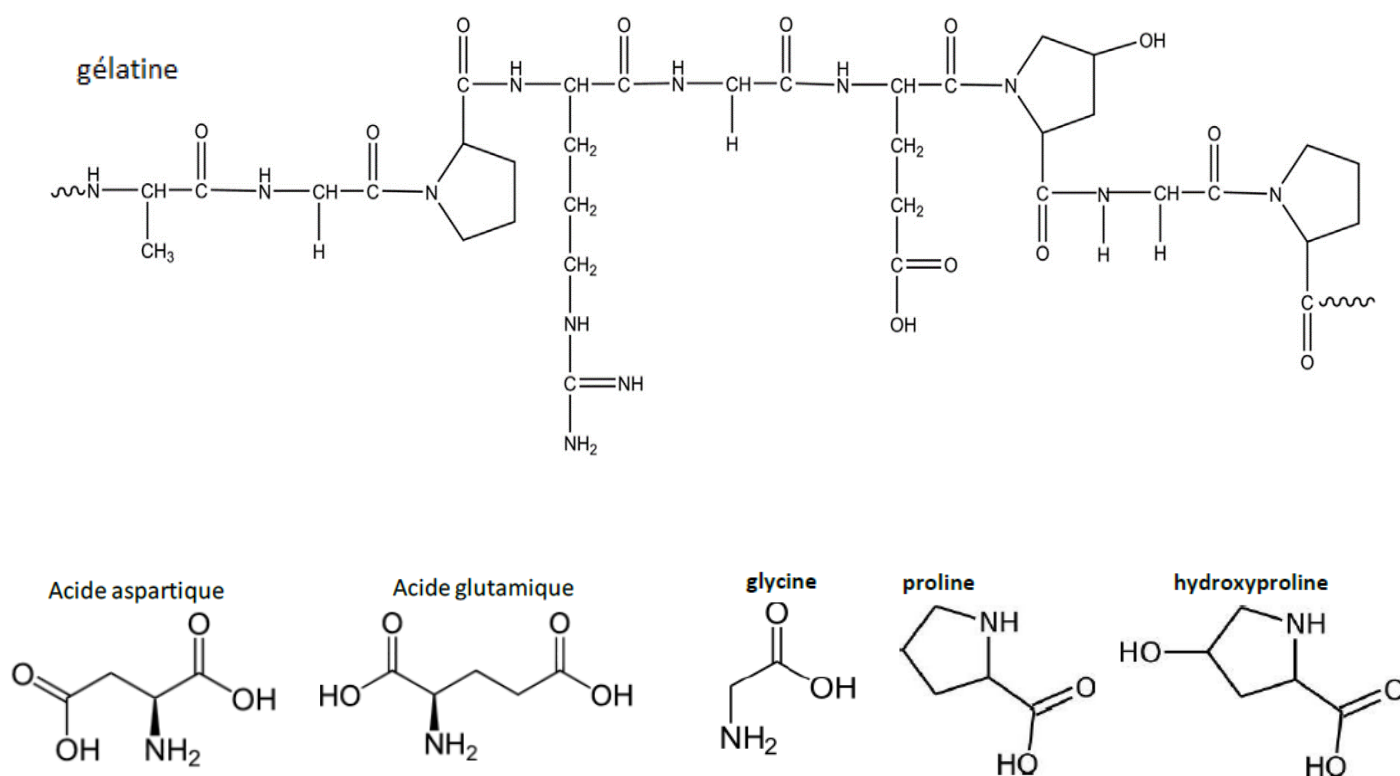


Figure 06 : Structure et formules chimiques de la gélatine et des acides aminés les plus abondants dans la molécule de collagène de type I [23, 24].

I.4.3. Hydroxyapatite : constituant minéral principal du tissu osseux

I.4.3.1. Apatite de l'os

La phase inorganique dans l'os s'apparente à l'hydroxyapatite, notée HAP, de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. L'hydroxyapatite appartient à la famille cristallographique des apatites phosphocalciques, de formule $\text{Me}_x(\text{XO}_4)_y\text{Y}_z$, où Me représente un cation divalent, XO_4 un groupement anionique trivalent et Y un anion monovalent. Cependant, l'apatite de l'os est un phosphate de calcium déficient dont le rapport molaire (Ca/P) varie de 1,37 à 1,87 [25-27]. En plus, elle est caractérisée par un désordre intérieur du cristal et la présence de différents ions dans sa structure (Na, Mg, F, et d'autres éléments dont la présence est à l'état de traces) comme le montre le **Tableau II**. En fait, l'os n'est pas vraiment analogue à l'hydroxyapatite stœchiométrique (HAP sans substitution ou lacune) mais plutôt à une apatite carbonatée [30, 31].

Tableau II : Composition minérale de l'os (en % massique) [26].

Ca	P	Na	Mg	K	Sr, Zn, Cu, Si	CO ₃	F	Cl	Ca/P
26,7	12,5	0,73	0,44	0,06	0,04 (Sr)	3,48	0,07	0,08	1,66
36,7	16,0	0,77	0,46	–	–	8,00	0,04	–	1,77
34,0	15,0	0,80	0,50	0,20	–	1,60	0,08	0,2	1,75
24,5	11,5	0,70	0,55	0,03	Traces	5,80	0,02	0,10	1,65

I.4.3.2. Hydroxyapatite stœchiométrique

L'hydroxyapatite stœchiométrique se cristallise en symétrie hexagonale ($P6_3/m$) avec les paramètres de maille : $a = b = 9,4180 \text{ \AA}$, et $c = 6,8840 \text{ \AA}$.

Le volume de la maille est égal à $528,80 \text{ \AA}^3$ [32]. La **figure 07** ci-dessous montre la structure cristallographique de la maille de HAP.

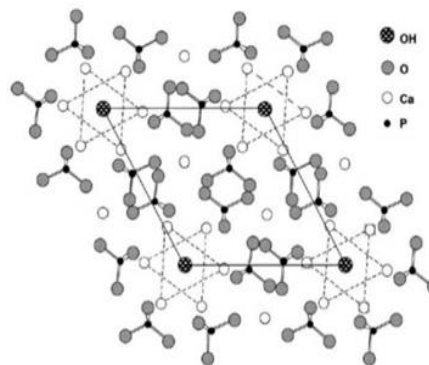


Figure 07 : Projection de la maille de HAP sur le plan (001) [32].

I.4.3.3. Application de l'hydroxyapatite dans le domaine de la médecine et de la pharmacie

L'hydroxyapatite est utilisée dans le domaine de la médecine et de la pharmacie comme matériaux de substitution pour le remplacement ou la régénération de tissus malades ou endommagés. Elle est également utilisée comme « enduit » sur des prothèses en titane pour faciliter l'ostéointégration ou encore pour empêcher l'usure due à des micromouvements oscillatoires à l'interface entre l'implant et l'os conduisant même parfois à une rupture de la prothèse et en tant que ciment employé dans la chirurgie faciale afin de remplacer les greffes osseuses autogènes. De plus, on la trouve dans un nombre croissant d'applications en tant que vecteur de médicaments grâce à une structure présentant des micropores interconnectés [33, 34].

I.5. Application du biomatériau : substitut osseux en hydroxyapatite

Les substituts osseux sont des matériaux biocompatibles destinés à être implantés afin de combler ou remplacer une perte osseuse. Le but est de restaurer la fonction de l'os et de renforcer sa structure. Parmi les matériaux qui peuvent être utilisés comme substituts osseux, les métaux, les bioverres, les polymères et les céramiques [7-9]. Les biocéramiques (céramiques actives) à base de phosphates de calcium présentent un intérêt majeur pour les applications de comblement osseux [32]. Elles sont connues pour leur bioactivité et s'intègrent au tissu vivant conduisant à une liaison physico-chimique intime avec l'os, appelée ostéointégration. De plus, lorsque les biocéramiques phosphocalciques sont macroporeuses, elles guident la repousse osseuse à leur surface permettant la pénétration d'os néoformé au cœur de la structure poreuse favorisant ainsi la régénération osseuse *in vivo* [35-36].

Chapitre 2

Infection des implants et stratégie de prévention

II.1. Types et origines des infections bactériennes

Les infections bactériennes constituent un problème très important dans le domaine médical. Les infections nosocomiales constituent un véritable problème clinique. Une infection nosocomiale est une infection contractée à l'hôpital, absente lors de l'admission du patient et qui se développe après l'admission [37]. Ces infections peuvent survenir après les incisions chirurgicales, ce qui donne un accès aux pathogènes dans le corps ou encore après implantation des prothèses articulaires ou les valves cardiaques, etc. qui agissent comme une niche pour la croissance bactérienne. D'autres facteurs contribuent à l'apparition des infections comme les facteurs reliés aux instruments médicaux et seringues contaminés lors d'interventions médico-chirurgicales [37-39].

Les microorganismes causant les infections sont généralement retrouvés sur le corps du patient lui-même (la flore intérieure). Mais ils peuvent aussi venir de l'équipe médicale après contact avec le patient, contamination des instruments médicaux et seringues ainsi que de l'environnement (flore extérieure) [40]. Les microorganismes responsables des infections se retrouvent autant chez les Gram positifs (*Staphylococcus* et *Entérocoques*) que les Gram négatifs (*Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*) mais aussi les levures (*Candida*) [39] [41].

II.2. Infections dues aux implants médicaux

Les implants médicaux seraient la cause d'un nombre important d'infections. Les infections associées aux implants contribuent à l'échec, à l'augmentation de la morbidité et sans parler des coûts. Malgré les mesures de préventions prises pour réduire l'effet de ces infections dues aux implants médicaux, les infections persistent [42]. Leur développement est dû à des interactions entre les facteurs du dispositif à implanter, de l'hôte et de la bactérie. Initialement, les bactéries sont adhérentes passivement à la surface des implants.

Plusieurs espèces bactériennes possèdent des protéines, les adhésines, qui permettent l'attachement à la surface des implants. *Staphylococcus aureus*, afin de s'attacher à l'implant, a besoin des ligands de l'hôte (fibronectine, fibrogène, collagène) [43-45].

II.3. Résistance des bactéries

Les bactéries sont des cellules procaryotes, naturellement présentes dans notre environnement, en suspension dans des fluides plus ou moins complexes (air ou liquide), à l'état planctonique « libres » ou bien « fixées » sur une surface, ce qui constitue un biofilm. Les bactéries sont présentes sur le sol, les aliments et au niveau de l'organisme humain. Le secteur médical fait face à un véritable problème qui est l'émergence de bactéries pathogènes de plus en plus résistantes aux antibiotiques probablement due à un usage excessif de ces derniers. Cette résistance peut être en fonction des bactéries naturelle ou acquise [46].

Lorsque les bactéries se retrouvent sur un dispositif médical, elles peuvent produire une matrice extracellulaire polymérique [45, 47]. La **figure 08** montre un schéma de formation d'un biofilm de *S. aureus* à la surface d'un implant. Ce film ainsi formé protège les bactéries contre le système immunitaire et les agents antimicrobiens. Ainsi, la dispersion des bactéries du biofilm peut entraîner la propagation de l'infection à d'autres tissus ou organes, propageant ainsi l'infection dans tout le corps [48-50].

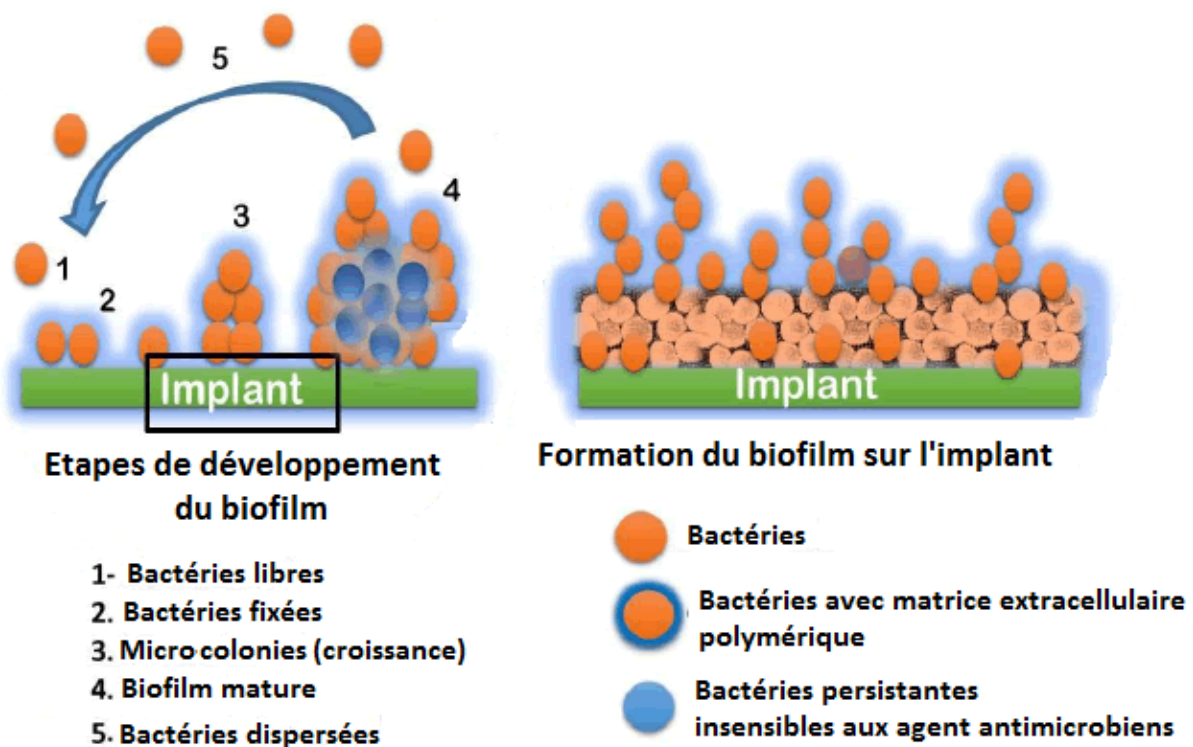


Figure 08 : Schéma de formation d'un biofilm bactérien de *S. aureus* sur un implant [48].

II.4. Effet antimicrobien d'ions métalliques sur les microorganismes

Les ions métalliques sont connus pour accélérer et améliorer l'action des médicaments et leur efficacité contre les pathogènes résistants [51, 52]. Les ions d'argent ont été les premiers à être utilisés comme agent antimicrobien. Kalishwaralal et al. [53] ont étudié l'effet des nanoparticules d'argent sur des bactéries de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermis* car ces deux souches causent des biofilms sur les lentilles oculaires. Ils ont montré que la croissance des bactéries est réduite à des concentrations en argent de 100 nM.

Une autre étude a été menée sur l'effet des nanoparticules de cuivre et de zinc sur la formation de biofilms [54]. Les auteurs ont remarqué une inhibition de la croissance des bactéries planctoniques de 30% pour le zinc et 66% pour le cuivre ainsi qu'une inhibition de la formation de biofilm, mais à des concentrations plus élevées que celles utilisées pour les bactéries planctoniques (10 fois plus élevée) [54].

D'autres métaux ont également des effets antimicrobiens tels que les ions Ce^{3+} [55]. Ces ions sont utilisés comme agents antibactériens en médecine depuis longtemps car le cérium est moins toxique pour les cellules du corps que l'argent par exemple. De plus, les modifications chimiques de l'oxyde de cérium se régénèrent avec le temps, de sorte que l'effet des nanoparticules sur les bactéries peut recommencer. Ainsi, les particules de cérium pourraient avoir un effet durable. HAP pur avec des nanoparticules de cérium a fait l'objet de plusieurs recherches. Les résultats de ces études ont montré une augmentation de la solubilité de HAP, ce qui peut développer la biodégradabilité et les propriétés antibactériennes de celle-ci [55].

Le silicium fait partie de la structure de la trame de l'os, de ce fait, le silicium est un minéral indispensable à la synthèse des fibres de collagène de tous les tissus de soutien de notre corps [56]. Un manque de silicium fait perdre de la souplesse et de la structure à l'os, la peau, les ligaments, la paroi des vaisseaux sanguins, etc. Hetrick et al. [56] ont testé l'effet des nanoparticules de silice sur des biofilms et ont remarqué que les particules de silice ont permis de tuer les bactéries à un pourcentage supérieur à 99 %.

II.5. Intérêt biologique de l'hydroxyapatite substituée

La capacité de la structure apatitique à accueillir un grand nombre d'ions différents dans chaque site de son réseau permet d'envisager des matériaux pour de nombreuses applications. Des exemples de substitutions sont représentés dans le **tableau III** [12].

Tableau III : Exemples de substitutions dans la structure apatitique.

Site	Substitutions	Formules chimiques	Notations
Ca²⁺	Ag ⁺	Ca _{10-x} Ag _x (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x}	Ag-HAP
	Sr ²⁺	Ca _{10-x} Sr _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Sr-HAP
	Zn ²⁺	Ca _{10-x} Zn _x (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Zn-HAP
B/ PO₄³⁻	CO ₃ ²⁻	Ca _{10-x} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-2x}	C _B -HAP
	SiO ₄ ⁴⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) _{6-x} (SiO ₄) _x (OH) _{2-2x}	Si-HAP
A/ OH⁻	Cl ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} Cl _{2x}	Cl-HAP
	CO ₃ ²⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} (CO ₃) _x	C _A -HAP
	F ⁻	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) _{2-2x} F _{2x}	F-HAP
A et B	CO ₃ ²⁻	Ca _{10-x+u} (PO ₄) _{6-x} (CO ₃) _x (OH) _{2-x+2u-2y} (CO ₃) _y	C _{A/B} -HAP

Les éléments présentés dans le **tableau III** sont en rapport avec les espèces naturellement présentes dans l'os. Donc 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 (PO₄³⁻) sont appelés respectivement site A et site B [12].

D'une manière générale, les substitutions ioniques modifient les paramètres de maille de la structure apatitique. D'un point de vue biologique, l'argent a montré des caractéristiques prometteuses en tant qu'agent antibactérien. Le strontium a été retrouvé dans les tissus calcifiés de l'os et semble être un acteur important dans leur minéralisation. Tout comme le strontium, le zinc a montré un effet inhibiteur sur l'activité ostéoclastique *in vitro* [57]. Pour ce qui est des substitutions anioniques, la présence d'ions fluorures F⁻ est déterminante dans la croissance de l'os [57]. L'intérêt des ions Cl⁻ réside en 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 [58].

II.6. Mécanisme d'action antibactérien

Le mécanisme d'action antibactérien de l'hydroxyapatite-silicium (Si-HA) (ou Si-HAP) élaborés sous forme de disques contenant l'argent (Ag,Si-HA) sur la souche *S. aureus* a été proposé par P. N. Lim et *al.* [59]. Ces auteurs ont pu démontrer que ce sont les ions d'argent (Ag^+) se trouvant à la surface des disques qui sont responsables de l'action antibactérienne par rapport aux ions de structure. Ces résultats suggèrent que les ions d'argent dans la structure cristalline diffusent vers la surface des disques de (Ag,Si-HA) après leur immersion dans une solution et interagissent avec *S. aureus* endommageant ainsi la paroi cellulaire et induisant les fuites des ions de potassium (K^+) [59].

Les étapes qui décrivent ce mécanisme sont présentées sur la **figure 09** ci-dessous.

Adhésion des bactéries à la surface de (Ag, Si-HA)

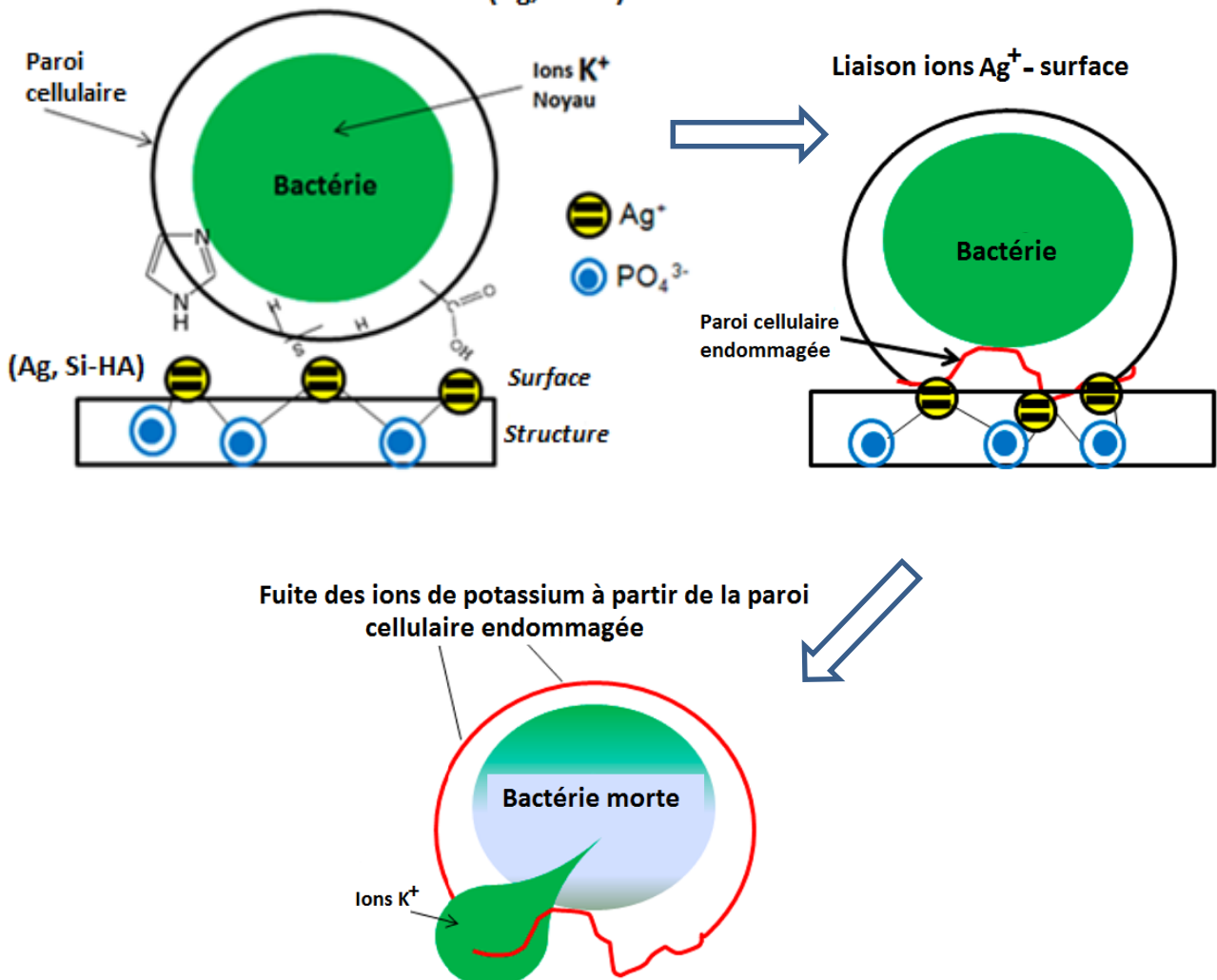


Figure 09 : Schéma du mécanisme d'action antibactérienne de (Ag,Si-HA) [59].

Étape 1 : Les ions d'argent sont diffusés vers la surface cristalline de (Ag, Si-HA) une fois immergé dans la solution. Il y a alors présence de l'ion argent (Ag^+) et de l'argent métallique (Ag) en surface de (Ag, Si-HA) mais l'effet antibactérien est apporté principalement par les ions argent (Ag^+). Les bactéries s'adhèrent alors sur (Ag, Si-HA). La protéine de la paroi cellulaire et les enzymes des bactéries contiennent des groupes imidazole, amino, carboxyle et thiol. Ces groupes fonctionnels sont attirés par les ions d'argent liés à la surface de (Ag, Si-HA) pour subir l'échange ionique [59].

Étape 2 : Par échange d'ions entre les groupes fonctionnels de la paroi cellulaire et l'argent lié à la surface de (Ag, Si-HA), la paroi cellulaire de la bactérie subit un endommagement. L'intégrité de la membrane est alors altérée et la perméabilité membranaire est modifiée. Généralement, ces événements conduisent rapidement à la mort du microorganisme [59].

Étape 3 : En examinant les modifications de la morphologie de la paroi cellulaire, les auteurs ont remarqué une séparation au niveau de la membrane cellulaire de la paroi, ce qui a pu induire la fuite des ions potassium provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire. Avec l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire, le système de défense de la bactérie serait affaibli, rendant la bactérie sensible à l'attaque des agents antibactériens et entraînant sa mort. Il est possible aussi que les ions d'argent liés à la surface aient envahi le noyau de la bactérie après avoir endommagé la paroi cellulaire [59].

Chapitre 3

Matériel et méthodes

III.1. Elaboration des poudres de biocéramique

III.1.1. Synthèse des composites HAP-gélatine (HG)

La synthèse des poudres de HAP pure et composite HAP-gélatine (HG) a été réalisée par procédé sol-gel selon les protocoles établis précédemment [60, 61].

Les précurseurs utilisés lors de ces synthèses sont le nitrate de calcium tétrahydraté, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (100%, Sigma Aldrich) et le pentoxyde phosphorique, P_2O_5 , (97%, Sigma Aldrich). Chaque précurseur a été dissous dans de l'éthanol, puis les deux solutions ont été mélangées sous agitation de manière à avoir une solution sol de HAP de concentration égale à 1,67 M. Après dissolution de 5 g de gélatine (Microbiologie, Fluka Analytical) dans 100 mL de H_2O à 40°C , des volumes de HAP et gélatine ont été mélangés à 10%, 20%, 30% et 50%. Les mélanges ont été agités puis laissés au repos (vieillessement) pour prise de masse à température ambiante pendant 24h. Les solutions ainsi vieillessement sont alors séchées dans une étuve à 80°C pendant 24h. Les gels séchés ainsi obtenus ont alors été calcinés à une température de 500°C sous air atmosphérique pendant 1 heure à un pas de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ (Figure 10).

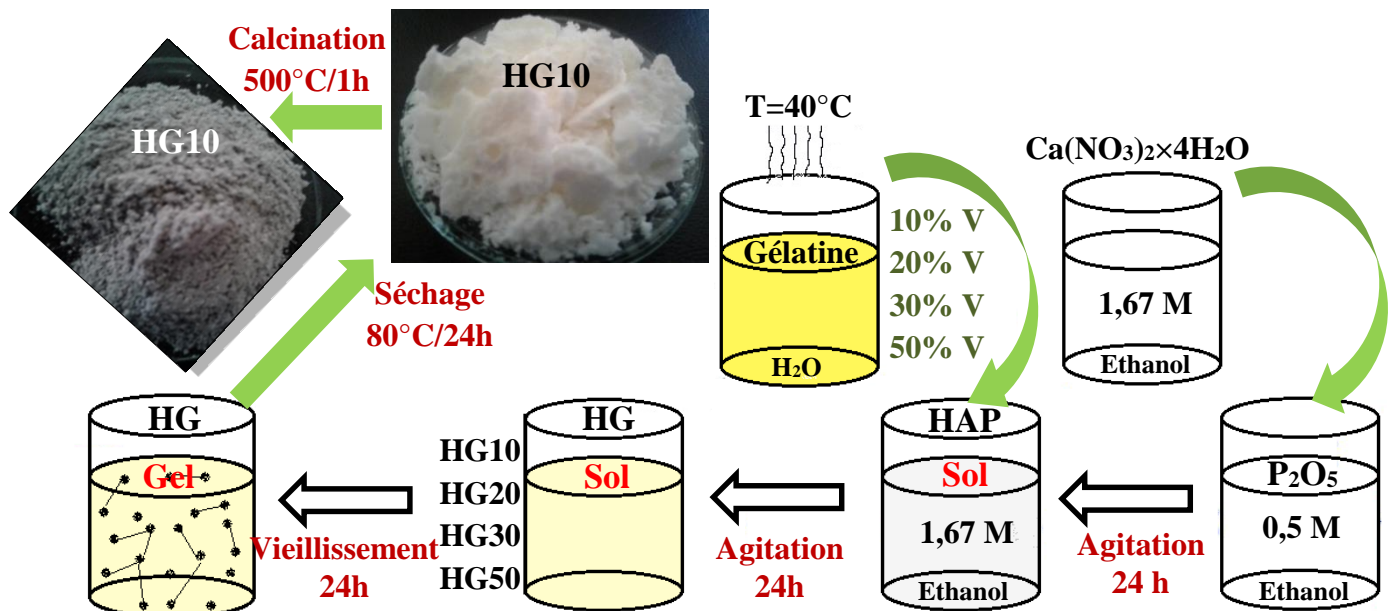


Figure 10 : Schéma correspondant au mode opératoire de préparation des poudres HAP et HAP-gélatine (HG).

III.1.2. Synthèse des composites HAP-gélatine-silice (HG-silice)

Pour la synthèse de HAP composite avec la silice, deux modes opératoires sont réalisés : Synthèse par voie humide et synthèse par voie solide.

➤ Synthèse de HG-Si par voie humide

Le précurseur utilisé pour la synthèse des poudres HG-Si est l'orthosilicate de tétraéthyle, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, (99%, Sigma-Aldrich.) Le volume de TEOS ajouté dans la solution de gélatine est équivalent à 2% du volume de la gélatine [62]. Pour préparer les composites, des volumes du sol de HAP et de la solution de gélatine contenant le TEOS ont été mélangés à 10%, 20%, 30% et 50%. Les mélanges ont été portés sous agitation puis laissés au repos (vieillessement) pour prise de masse à température ambiante pendant 24h (transition sol-gel). Les solutions ainsi vieilleses ont alors été séchées dans une étuve à 80°C pendant 24h. Les gels séchés obtenus ont été calcinés à une température de 500°C sous air atmosphérique pendant 1h à un pas 2°C/min (Figure 11).

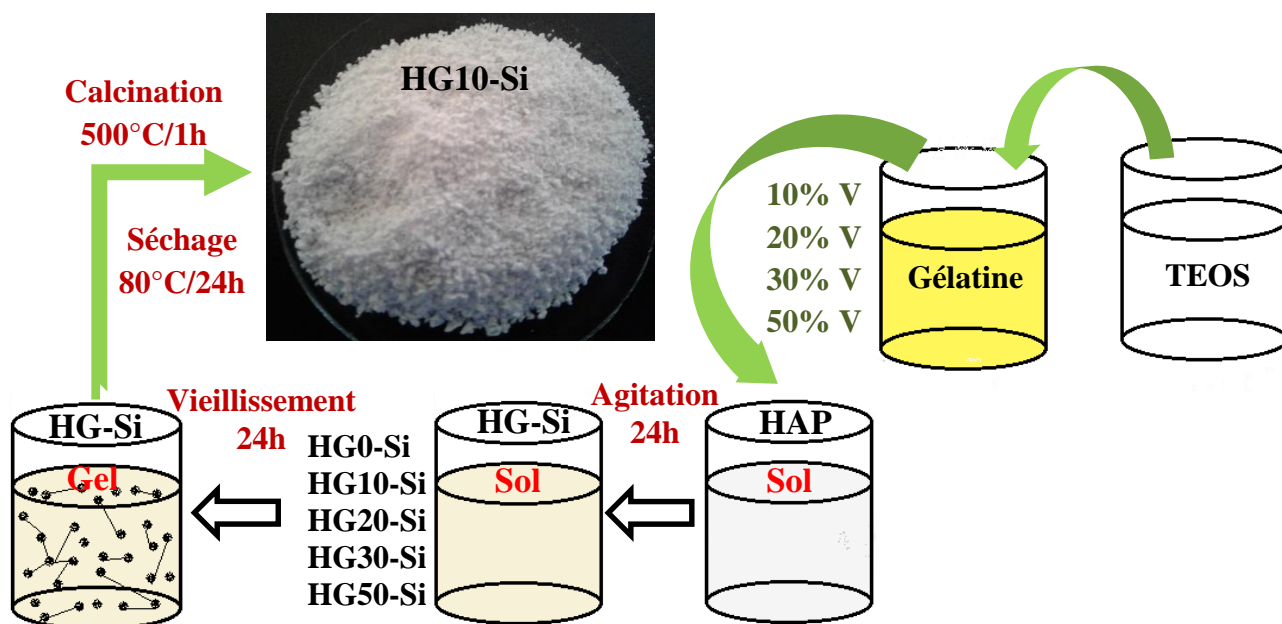


Figure 11 : Schéma correspondant au mode opératoire de préparation des poudres HAP-gélatine-silice (HG-Si) par voie humide.

➤ Synthèse de HG/Si par voie solide

Les poudres HG/Si ont été préparées par voie solide par mélange des poudres HG et SiO_2 puis calcination des mélanges solides à 1100°C durant 2 heures [63] (Figure 12). La masse de SiO_2 introduite dans chaque poudre du composite représente 5% en masses de HG (0-50%).

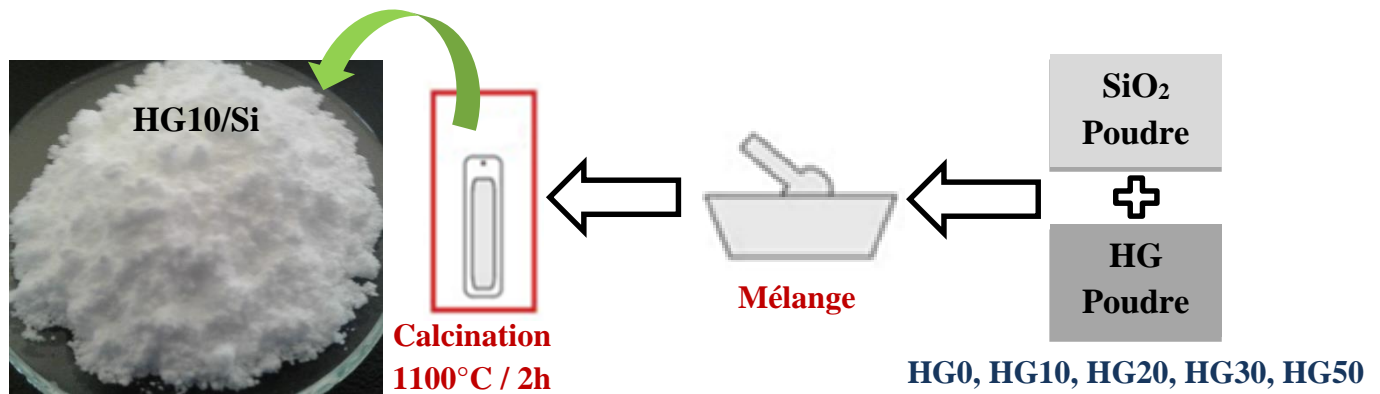


Figure 12 : Schéma correspondant au mode opératoire de préparation des poudres HAP-gélatine-silice (HG/Si) par voie solide.

Les volumes des solutions, les rapports molaires, les compositions possibles ainsi que les notations utilisés pour les 3 types de synthèses sont regroupés dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Paramètres de synthèse des poudres composites.

Ordre de synthèse	Poudre	Composition
		$(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, Ca/P=1,67
		$Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x}$, Ca/P≠1,67
HG	HG0	100% de HAP ($V_{Total}=50$ mL)
	HG10	90% de HAP, 10% de gélatine ($V_{Total}=50$ mL)
	HG20	80% de HAP, 20% de gélatine ($V_{Total}=50$ mL)
	HG30	70% de HAP, 30% de gélatine ($V_{Total}=50$ mL)
	HG50	50% de HAP, 50% de gélatine ($V_{Total}=50$ mL)
		$Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$, Ca/(P+Si)=1,67
HG-Si	HG0-Si	50 mL de HAP et 1 mL de TEOS
	HG10-Si	90% de HAP, 10% de (gélatine + TEOS) ($V_{TEOS}=0,1$ mL)
	HG20-Si	80% de HAP, 20% de (gélatine + TEOS) ($V_{TEOS}=0,2$ mL)
	HG30-Si	70% de HAP, 30% de (gélatine + TEOS) ($V_{TEOS}=0,3$ mL)
	HG50-Si	50% de HAP, 50% de (gélatine + TEOS) ($V_{TEOS}=0,5$ mL)
HG/Si	HG0/Si	5 g de HAP et 0,25 g de SiO ₂
	HG10/Si	90% de HAP, 10% de (gélatine + SiO ₂) (m (SiO ₂) = 0,25 g)
	HG20/Si	80% de HAP, 20% de (gélatine + SiO ₂) (m (SiO ₂) = 0,25 g)
	HG30/Si	70% de HAP, 30% de (gélatine + SiO ₂) (m (SiO ₂) = 0,25 g)
	HG50/Si	50% de HAP, 50% de (gélatine + SiO ₂) (m (SiO ₂) = 0,25 g)

III.1.3. Synthèse de HAP dopée (HAP-Métal)

Des solutions de nitrate de calcium (1,67 M) sont préparées avec des quantités différentes de :

- Nitrate d'argent, AgNO₃ (99,9%, BIOCHEM Chemopharma) ;
- Nitrate de zinc, Zn(NO₃)₂×6H₂O (98%, BIOCHEM Chemopharma) ;
- Nitrates de cérium, Ce(NO₃)₂×6H₂O (99,9%, BIOCHEM Chemopharma) ;

De manière à garder le rapport molaire « (Ca+M)/P » constant et égal à 1,67. Après avoir introduit ces solutions dans celles du phosphore (0,5 M), les mélanges ont été agités pendant 24h, à température ambiante puis séchées à 80°C pendant 24h puis calcinées à 600°C sous air atmosphérique pendant 1h à un pas de 3°C/min.

Les concentrations molaires, les compositions et les notations utilisées pour les différents modes de synthèses sont regroupées dans le **tableau V**.

Tableau V : Paramètres de synthèse des poudres dopées.

Ordre de synthèse	Poudre	Composition
Ca_{10-x}M_x(PO₄)₆(OH)₂ avec M : Ag, Zn, (Ag+Zn), Ce. (Ca+Ag)/P = 1,67		
HAP-Ag	HAP-Ag (1)	$x = 0,05$ mol
	HAP-Ag (2)	$x = 0,1$ mol
	HAP-Ag (3)	100 ppm
	HAP-Ag (4)	10000 ppm
HAP-Zn	HAP-Zn (1)	$x = 0,05$ mol
	HAP-Zn (2)	$x = 0,1$ mol
	HAP-Zn (3)	100 ppm
	HAP-Zn (4)	10000 ppm
HAP (Ag+Zn)	HAP-(Ag +Zn) (1)	$x = 0,05$ mol
	HAP-(Ag +Zn) (2)	$x = 0,1$ mol
	HAP-(Ag +Zn) (3)	100 ppm
	HAP-(Ag +Zn) (4)	10000 ppm
HAP-Ce	HAP-Ce (1)	$x = 0,05$ mol
	HAP-Ce (2)	$x = 0,1$ mol

III.2. Test microbiologique

Afin d'étudier le potentiel antibactérien du biomatériau synthétisé, trois souches bactériennes de références ont été sélectionnées et utilisées dans notre travail. Il s'agit de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Candida albicans* (ATCC 1024).

III.2.1. Résistance et sensibilité de souches testées aux biomatériaux

La résistance ou la sensibilité aux biomatériaux élaborés des souches de référence sélectionnées a été évaluée selon la méthode de l'antibiogramme standard sur milieu Mueller-Hinton (Annexe I).

III.2.2. Préparation et ensemencement de la suspension bactérienne

Les pré-cultures des souches bactériennes préalablement sélectionnées pour ce test ont été préparées à partir de cultures fraîches de moins de 24h. Des colonies bactériennes sur gélose nutritive ont été prélevés aseptiquement et placés dans des tubes contenant 5 ml d'eau physiologique stérile afin d'avoir une densité optique correspondant à 0,5 McFarland soit 0,08 à 0,1 à 625 nm (soit 10^8 cellules/mL). Après homogénéisation des suspensions bactériennes au vortex, celles-ci ont été ensemencées par écouvillonnage sur boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton stérile.

III.2.3. Mise en contact des poudres de biomatériaux

Une fois les bactéries ont été préalablement ensemencées sur le milieu de culture, une même quantité, à savoir, 0,025 et 0,05 g de chacune des poudres préalablement stérilisées ont été déposées en formant des disques séparés à distance régulière les uns des autres. Les boîtes ont par la suite été incubées à 37°C pendant 24h. Pour chaque souche, trois répétitions ont été réalisées.

III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des poudres

L'effet antibactérien des différentes poudres à base de HAP contenant les agents antibactériens a pu être déterminé par l'observation de zones claires résultantes de l'inhibition formée autour des matériaux. La mesure des diamètres de ces zones permet de

déterminer la sensibilité ou la résistance de ces souches vis-à-vis des biomatériaux testés. Si l'agent antibactérien (Ag, Zn, Ce, Si) est inefficace ou sa concentration dans la poudre est trop faible pour avoir un effet antibactérien potentiel alors il y'aura croissance de bactéries tout autour du matériau.

III.4. Analyses chimique et structurale des poudres

III.4.1. Analyse par spectrophotométrie Infra-rouge (FTIR)

L'analyse des groupements fonctionnels des poudres a été réalisée par la technique de pastille KBr. Les poudres ont été mélangées avec le KBr (80% en poids) puis pressés sous forme de pastilles de 14 mm de diamètre. L'analyse a été effectuée dans un intervalle de nombre d'ondes allant de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} , en utilisant un spectrophotomètre IRAffinity-1, SHIMADZU.

III.4.2. Analyse par diffractions des Rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une méthode d'identification de phases cristallines. Elle donne des informations sur la pureté, la cristallinité et la valeur des paramètres cristallographiques. L'analyse a été réalisée en utilisant un diffractomètre à rayons X (Panalytical type MPD/système vertical θ/θ), avec une radiation $\text{CuK}\alpha$ de longueur d'onde $\lambda=0,15406\text{ nm}$. Le diagramme DRX a été obtenu dans l'intervalle 2θ allant de 20° à 80° à un pas de $0,026^\circ$. Les phases ont été identifiées par comparaison avec les références des fiches ICDD (Annexe II).

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Analyse des poudres par spectrophotométrie IR

❖ Composites : HAP-gélatine et HAP-gélatine-silice

La **figure 13** montre les spectres IR des poudres de HAP pure et composite.

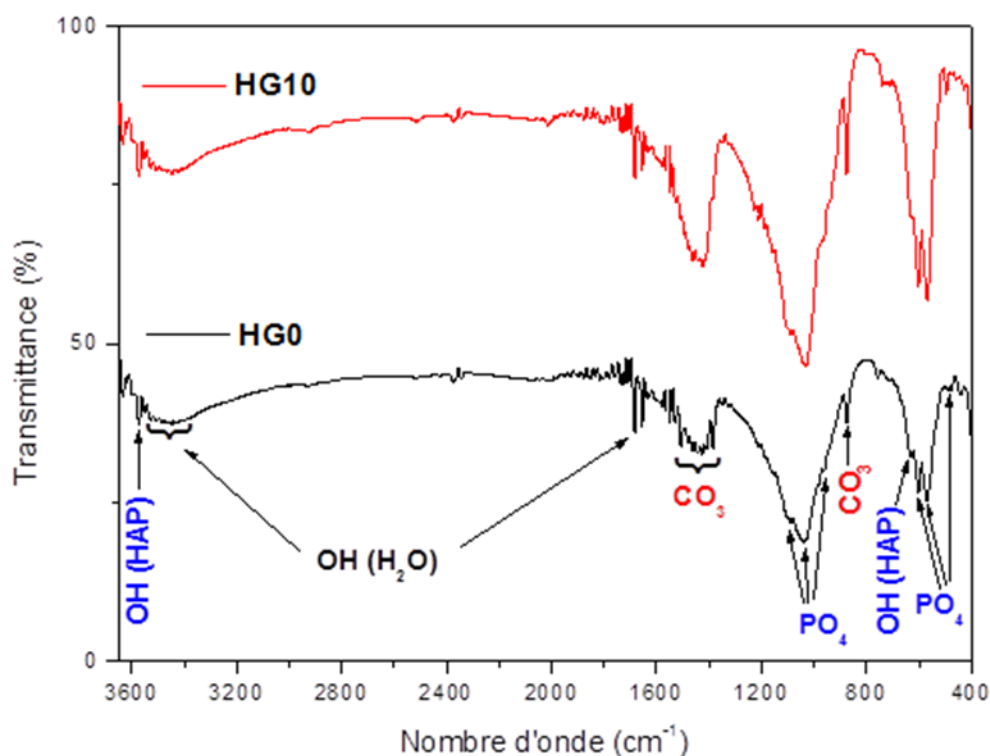


Figure 13 : Spectres FTIR de HAP pure (HG0) et composite (HAP-gélatine (HG10)).

Le spectre IR de HG0 montre des bandes à 473, 563, 600, 1049 et 1089 cm^{-1} qui sont attribuées aux liaisons PO_4 . La bande d'absorption à 3572 cm^{-1} et le pic développé à 630 cm^{-1} proviennent des liaisons des groupes OH. Ces bandes d'absorption qui caractérisent la structure de l'apatite [64] sont identifiées dans les deux spectres, ce qui indique la formation de la phase d'hydroxyapatite dans les deux poudres. Les spectres montrent également des bandes d'absorption relatives aux carbonates CO_3 situées à 873 cm^{-1} et entre 1400 et 1540 cm^{-1} . Leur présence dans la structure apatitique est due à la substitution partielle des groupes PO_4 par ceux de CO_3 donnant lieu à une apatite carbonatée non stœchiométrique [65-67]. On remarque que les bandes de carbonates sont plus intenses dans le cas de HG10. La bande large allant de 3200 cm^{-1} à 3500 cm^{-1} ainsi que les pics se trouvant aux environs de 1632 cm^{-1} sont attribués aux liaisons O-H dans la molécule de H_2O .

Les spectres FTIR des poudres composites avec silice (HAP-gélatine-silice) synthétisés à l'état humide (HG0-Si, HG10-Si, HG30-Si) et à l'état solide (HG0/Si, HG10/Si, HG30/Si) sont présentés dans les **figures 14a** et **b**, respectivement

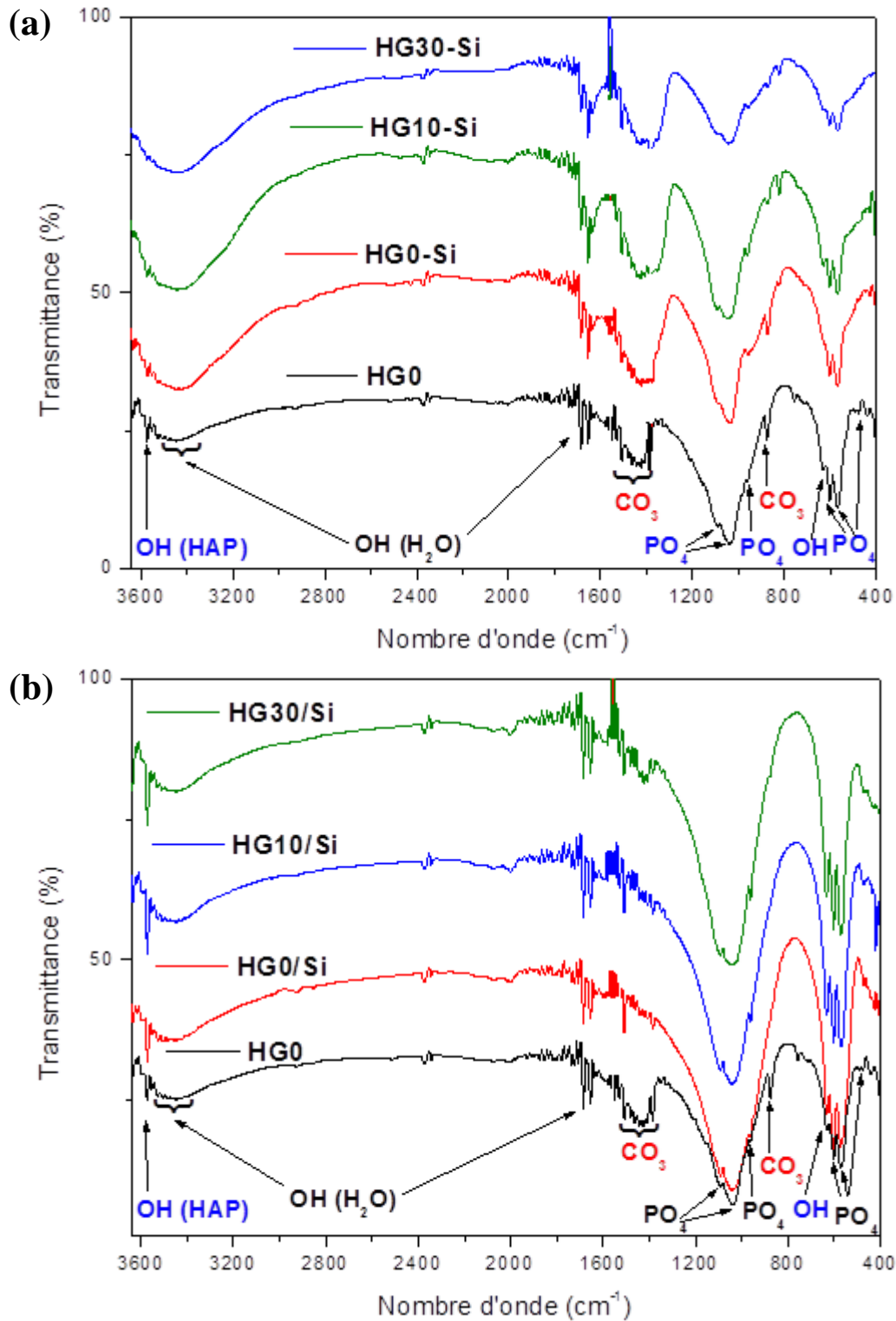


Figure 14 : Spectres FTIR (a) HG0-Si, HG10-Si et HG30-Si synthétisés par voie humide. (b) HG0/Si, HG10/Si et HG30/Si synthétisés par voie solide.

Les spectres enregistrés pour les poudres composites dopées avec la silice montrent des bandes d'absorption similaires qui caractérisent la phase de HAP (HG0). Cependant, on remarque que les bandes d'absorption correspondantes aux poudres composites synthétisées à l'état solide (**Figure 14b**) sont plus intenses et plus larges. Ce résultat indique que ces poudres sont plus denses à cause de l'amélioration de leur cristallinité après calcination à une température de 1100°C.

❖ HAP dopée (HAP-Ag, HAP-Zn)

Les spectres FTIR des poudres de HAP pure et dopée par les ions métalliques (Ag^+ et Zn^{2+}) sont présentés dans la **figure 15a** (concentration faible (1) : $x = 0,05$ mol), et dans la **figure 15b** (concentration élevée (4) : 10000 ppm).

Les spectres des poudres HAP-Ag (1) et HAP-Zn (1), dopées à une faible concentration indiquent des bandes bien définies associées à la phase de HAP (**figure 15a**). Ils montrent une même évolution des bandes spectrales pour les deux éléments, Ag et Zn. Les principaux pics présents dans le spectre sont attribués aux groupements phosphate (PO_4), carbonate (CO_3) et hydroxyle (OH/HAP).

Dans le cas des poudres HAP-Ag (4) et HAP-Zn (4), dopées à une concentration plus élevée (10000 ppm), la **figure 15b** montre un décalage au niveau de leur bandes d'absorption. La résolution des bandes caractéristiques de la structure de HAP diminuent, spécialement dans le cas de HAP-Zn (4).

Ainsi, contrairement aux deux poudres HAP-Ag (1) et HAP-Zn (1) et aux poudres composites HG-Si et HG/Si, l'analyse par IR a montré l'effet de la substitution des ions Ag^+ et Zn^{2+} dans le réseau de HAP à une concentration élevée (HAP-Ag (4) et HAP-Zn (4)). Donc l'effet de la substitution varie en fonction de la quantité d'élément dopant insérée. Cette substitution peut être expliquée par le fait que le rayon ionique de Zn^{2+} (0,074 nm) est inférieur à celui de Ca^{2+} (0,099 nm), le remplacement des ions Ca^{2+} par les ions Zn^{2+} entraîne alors des défauts dans les paramètres du réseau [68]. La substitution de Ag^+ (0,128 nm) par l'ion Ca^{2+} (0,099 nm) se fait préférentiellement dans le site Ca (1) de HAP, ce qui conduit à une augmentation des paramètres de maille [69].

Le mécanisme d'adsorption des métaux sur l'hydroxyapatite se fait par échange ionique. Dans la première étape, des charges négatives se forment à la surface de l'hydroxyapatite qui se dissocie en Ca^{2+} et H_2PO_4^- . Dans la deuxième étape, les ions Ca^{2+} situés à la surface sont échangés avec les nanoparticules d'agent présentes dans le milieu [69].

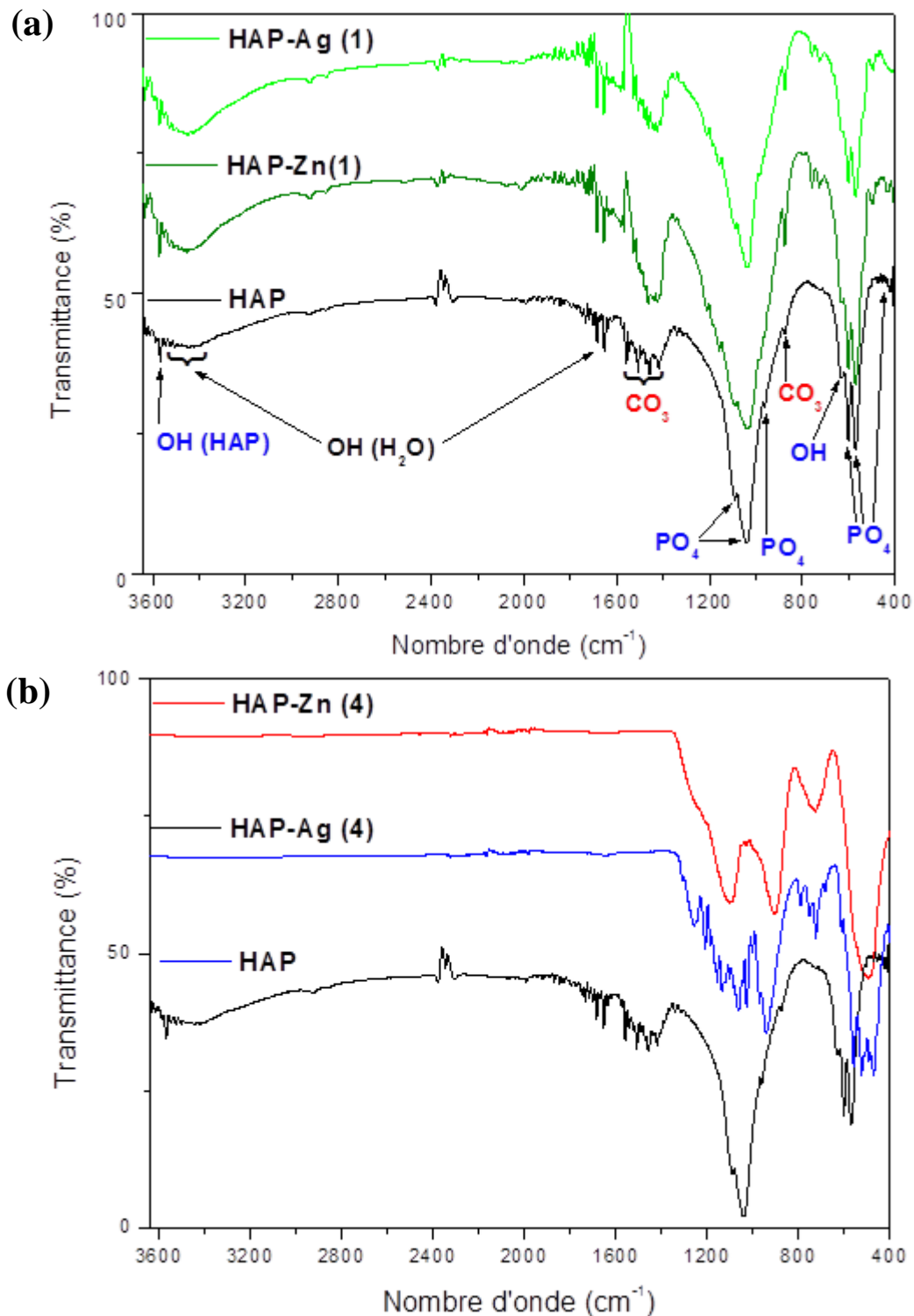


Figure 15 : Spectres FTIR (a) HAP-Ag (1) et HAP-Zn (1). (b) HAP-Ag (4) et HAP-Zn (4).

IV.2. Analyse des poudres par diffraction des rayons X

❖ Composites HAP-gélatine et HAP-gélatine-silice

La **figure 16** montre les diffractogrammes des rayons X des poudres de HAP pure (HG0) et HAP composite (HAP-gélatine (HG10)).

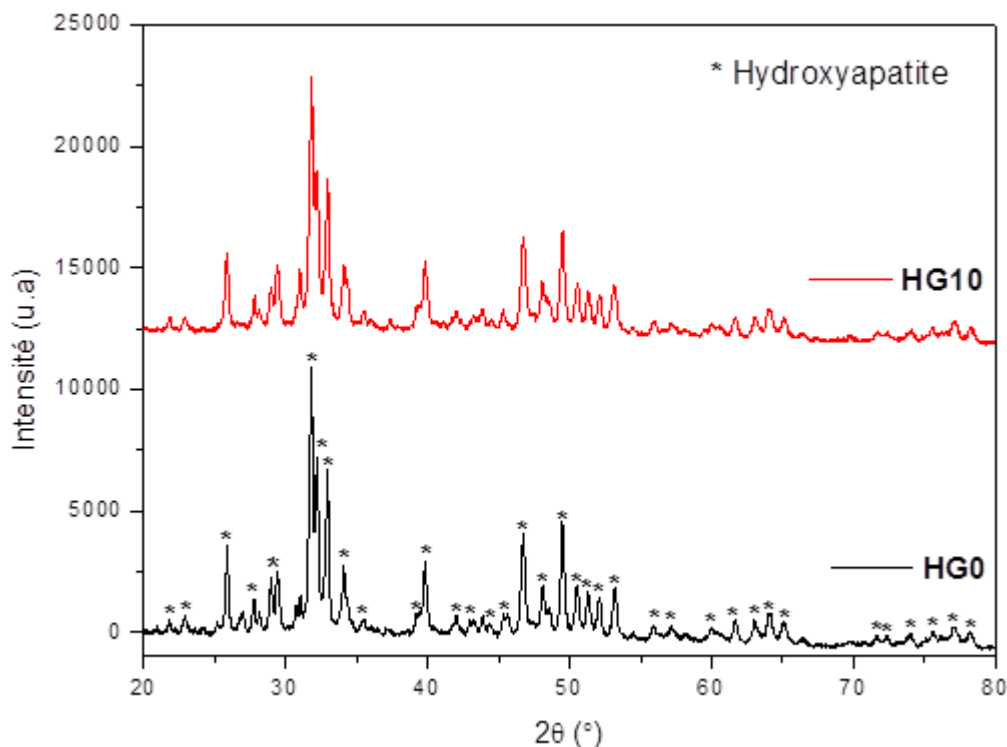


Figure 16 : Diagrammes DRX de HG0 et HG10.

On remarque que le diffractogramme de la poudre composite HG10 est identique à celui de HAP pure (HG0). Les pics caractéristiques de la phase cristalline de HAP sont identifiés par rapport à leur position (2θ) et intensité (%) comparées à ceux inscrits dans la fiche numéro 09-0432 (voir Annexe II). Les principaux pics sont situés à $2\theta = 25,88^\circ$, lié au plan (002) et à 2θ variant entre 31° et 33° , correspondant aux plans réticulaires (211), (112) et (300).

Les diagrammes DRX des poudres composites dopées avec la silice synthétisées par voies humide et solide sont présentés sur la **figure 17a** et **b**, respectivement. Par comparaison avec les principaux pics de la phase de HAP pure (2θ compris entre 31° et 35°), on remarque que la résolution des pics dans le cas des poudres HG0-Si et HG30-Si diminue. Alors que dans le cas des poudres HG0/Si et HG30/Si, les pics deviennent très intenses et aigus, ce qui indique que la phase de HAP est bien cristallisée.

Sur la **figure 17b**, on note également l'apparition de faibles pics originares des phases secondaires de la dégradation thermique de l'hydroxyapatite, CaO et B-TCP (voir les fiches correspondantes dans la partie Annexe II).

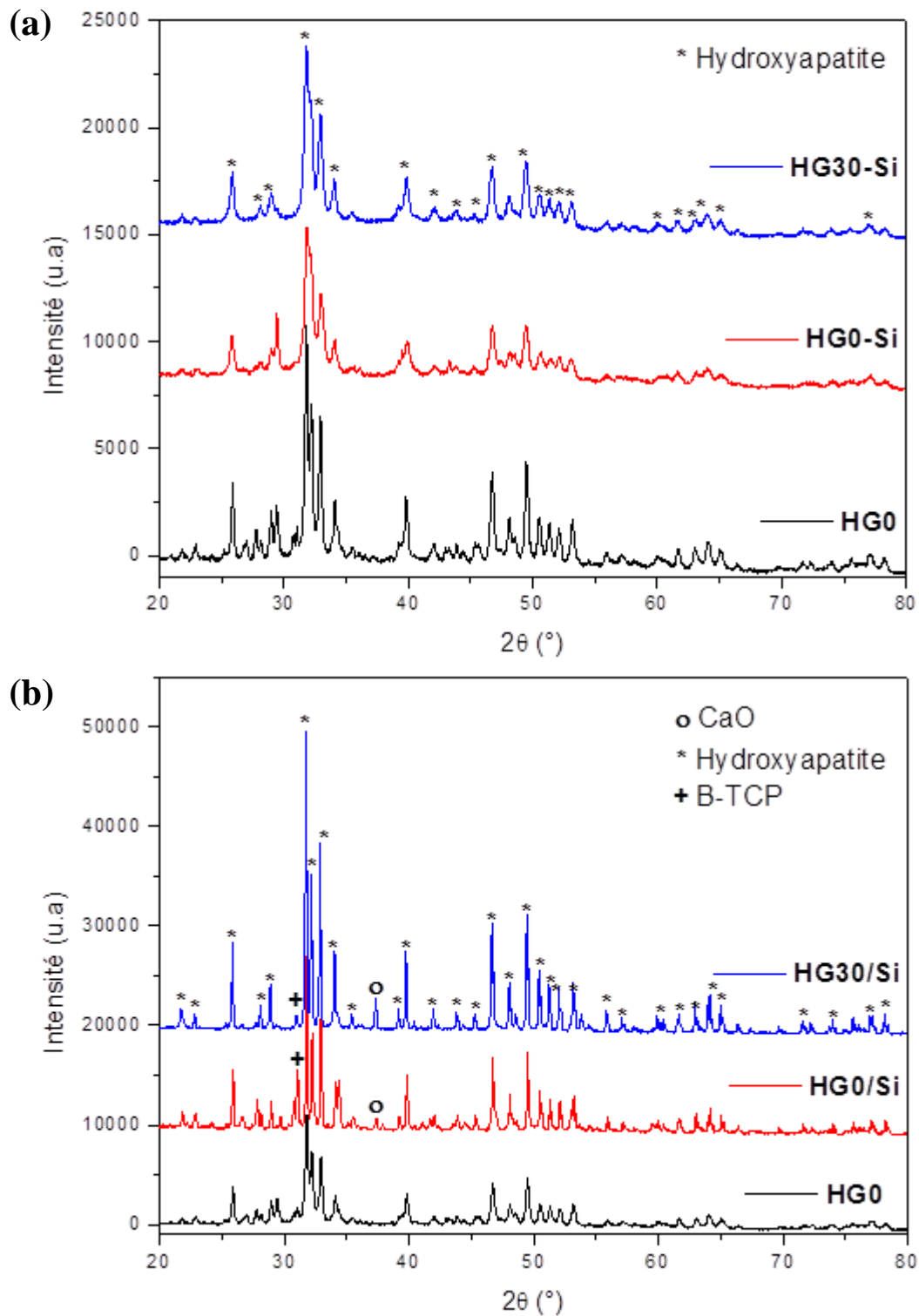


Figure 17 : Diagrammes DRX (a) HG0-Si et HG30-Si synthétisés par voie humide.
(b) HG0/Si et HG30/Si synthétisés par voie solide.

❖ HAP sdopée (HAP-Ag, HAP-Zn, HAP-(Ag+Zn) et HAP-Ce)

Les diagrammes DRX des poudres de HAP dopées aux ions métalliques (Ag^+ , Zn^{2+} et Ce^{3+}) sont présentés dans la **figure 18a** ($x = 0,05$ mol) et la **figure 18b** (10000 ppm).

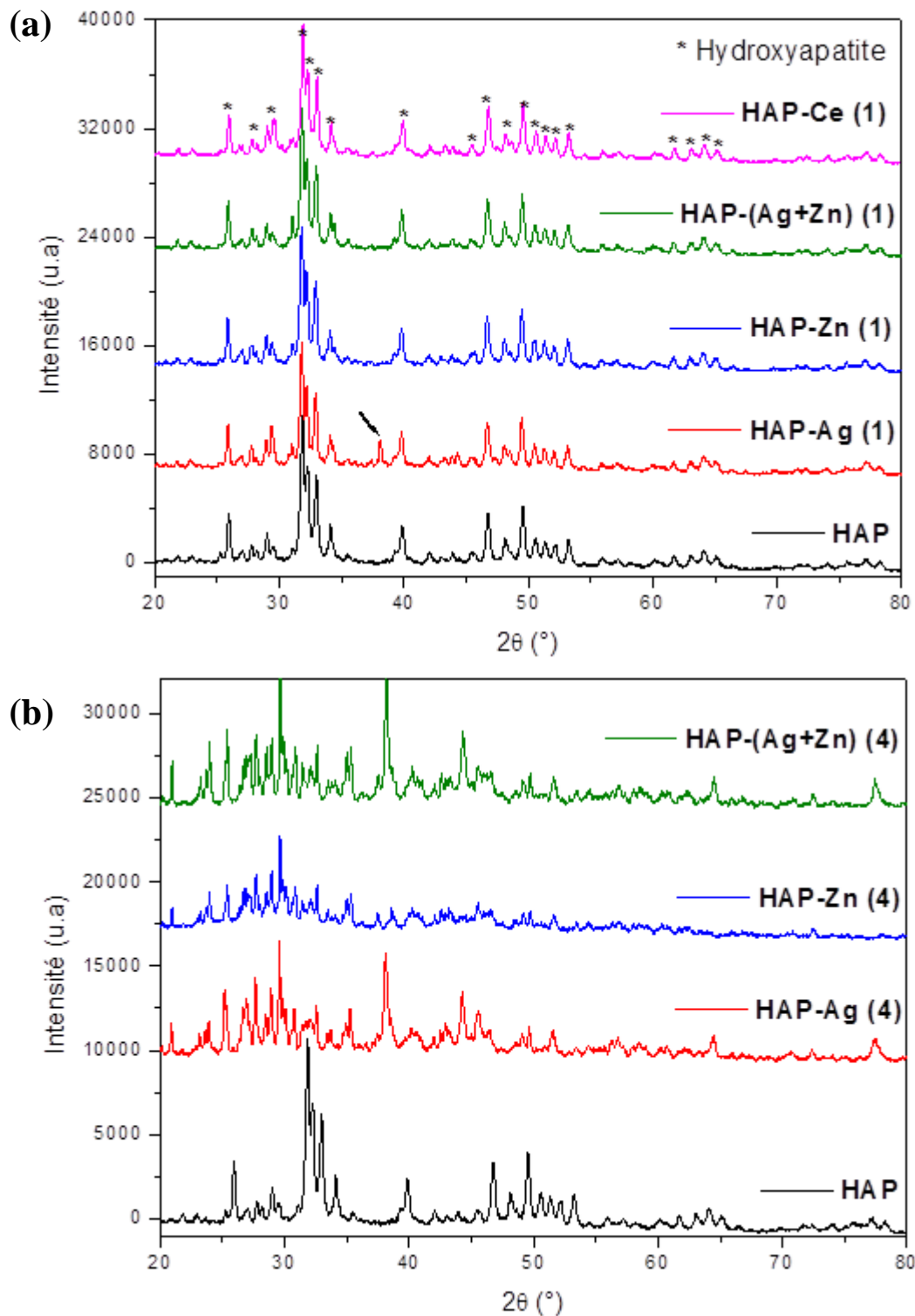


Figure 18 : Diagrammes DRX (a) HAP-Ag (1), HAP-Zn (1), HAP-(Ag+Zn) (1) et HAP-Ce (1).
(b) HAP-Ag (4), HAP-Zn (4) et HAP-(Ag+Zn) (4).

Les diagrammes DRX des poudres HAP-Ag (1), HAP-Zn (1), HAP-(Ag+Zn) (1) et HAP-Ce (1) dopées à une faible concentration indiquent des pics représentatifs de la phase de HAP qui évoluent de la même manière pour les 4 poudres (**figure 18a**). A une concentration plus élevée (10000 ppm) les pics des diffractogrammes des poudres HAp-Ag (4), HAP-Zn (4) et HAP-(Ag+Zn) (4) changent de position et d'intensité, cela suggère que HAP a subi une modification au niveau de sa maille (réseau cristallin). Les résultats de cette analyse sont en accord avec ceux obtenus par analyse IR.

Ces deux méthodes d'analyses, FTIR et DRX nous ont permis de caractériser les différentes poudres synthétisées et d'identifier les phases présentes dans chacune. Nous avons constaté que l'ajout de 10% de gélatine dans HAP n'a pas modifié sa microstructure tandis que l'insertion de la silice dans HAP-gélatine par voie solide a entraîné une augmentation de sa cristallinité et l'apparition des phases de CaO et β -TCP.

Nous avons déduit aussi que la substitution dans le réseau de HAP par les agents métalliques a eu lieu à une concentration de 10000 ppm. Nous n'avons pas observé une modification dans la structure de HAP pour une faible concentration ($x = 0,05$ mol).

IV.3. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne des poudres de biocéramique

IV.3.1. Composite HAP-gélatine

Pour savoir si les souches bactériennes sélectionnées (*S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans*) sont sensibles ou résistantes aux poudres de biocéramique à base d'hydroxyapatite élaborées dans ce travail, on doit observer les zones d'inhibition formées autour de chaque poudre après 24 heures d'incubation. Cela va nous renseigner sur la croissance ou non des bactéries mises au contact des biomatériaux. Ainsi, on peut déduire si la bactérie est résistante ou non à un agent antibactérien donné et à une concentration donnée.

Dans cette partie on a essayé de vérifier l'influence de la gélatine présente dans la poudre de HAP à différentes teneurs sur la croissance des bactéries. Le test est réalisé pour deux masses de poudre ($m_1 = 0,025$ g et $m_2 = 0,05$ g). Les poudres à tester sont : HG10, HG20, HG30, HG50 et HG0 (contrôle) (**Figure 19**).

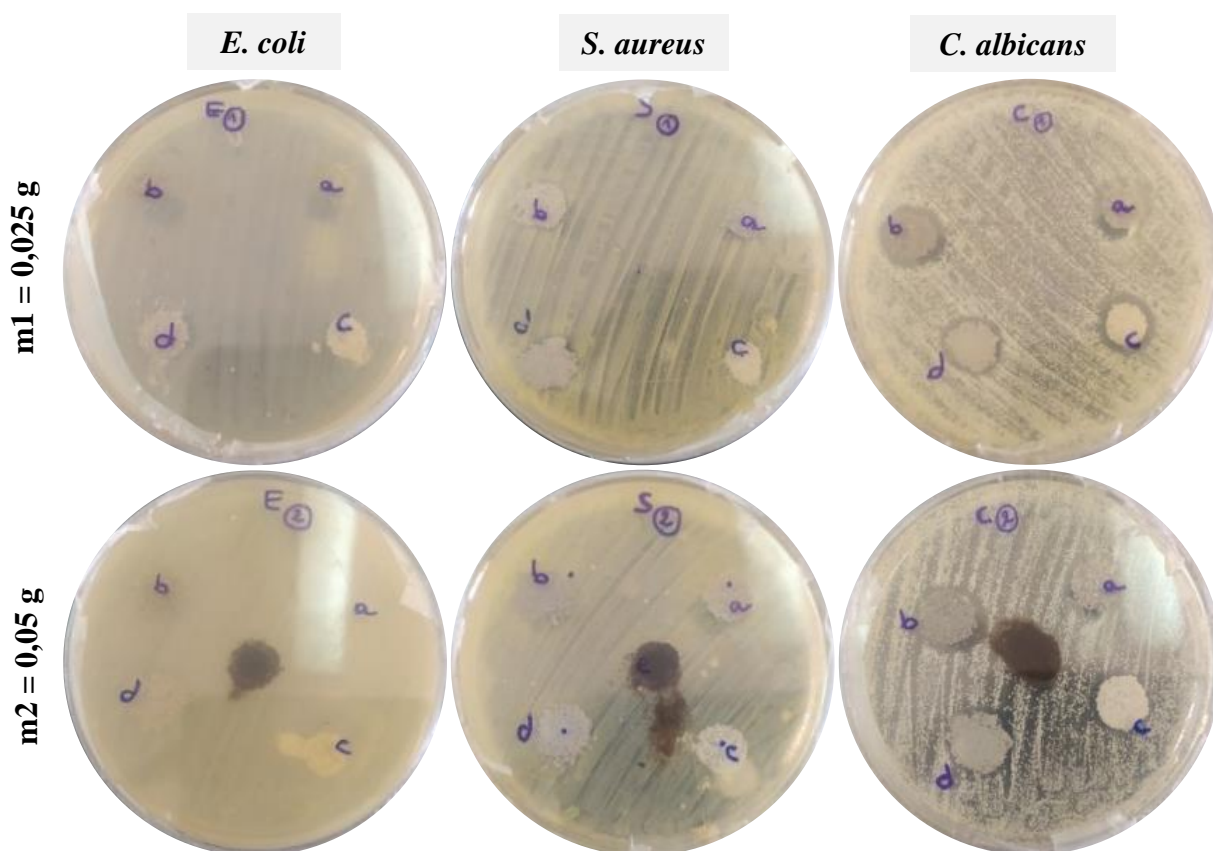


Figure 19 : AntibioGrammes de (a) HG0 (contrôle), (b) HG10, (c) HG20, (d) HG30, HG50 au milieu de la boîte (pour $m_2 = 0,05$ g).

D'après la **figure 19** quelle que soit la masse des poudres fixée (0,025 g ou 0,05 g) celles-ci n'ont aucun effet sur *E. coli* et *S. aureus*, donc ces deux bactéries sont résistantes aux poudres de HAP-gélatine. Par contre, on voit apparaître des zones d'inhibition dans le cas de *C. albicans* pour toutes les poudres et pour les deux masses sauf dans le cas de la poudre HG50 qui contient 50% de gélatine. Aucune zone d'inhibition n'est détectée pour HG50. Donc une quantité importante en gélatine peut annuler complètement l'effet de l'hydroxyapatite vis-à-vis de *C. albicans*.

Les résultats de ce test nous ont permis de fixer la masse des poudres à 0,025 g et de considérer uniquement les poudres à 10, 20 et 30% en gélatine.

IV.3.2. Composite HAP-gélatine-silice

Les échantillons évalués sont des poudres composites d'hydroxyapatite-gélatine et silice synthétisées par voie humide (HG0-Si, HG10-Si, HG20-Si et HG30-Si) et par voie solide (HG0/Si, HG10/Si, HG20/Si et HG30/Si) (**Figure 20**).

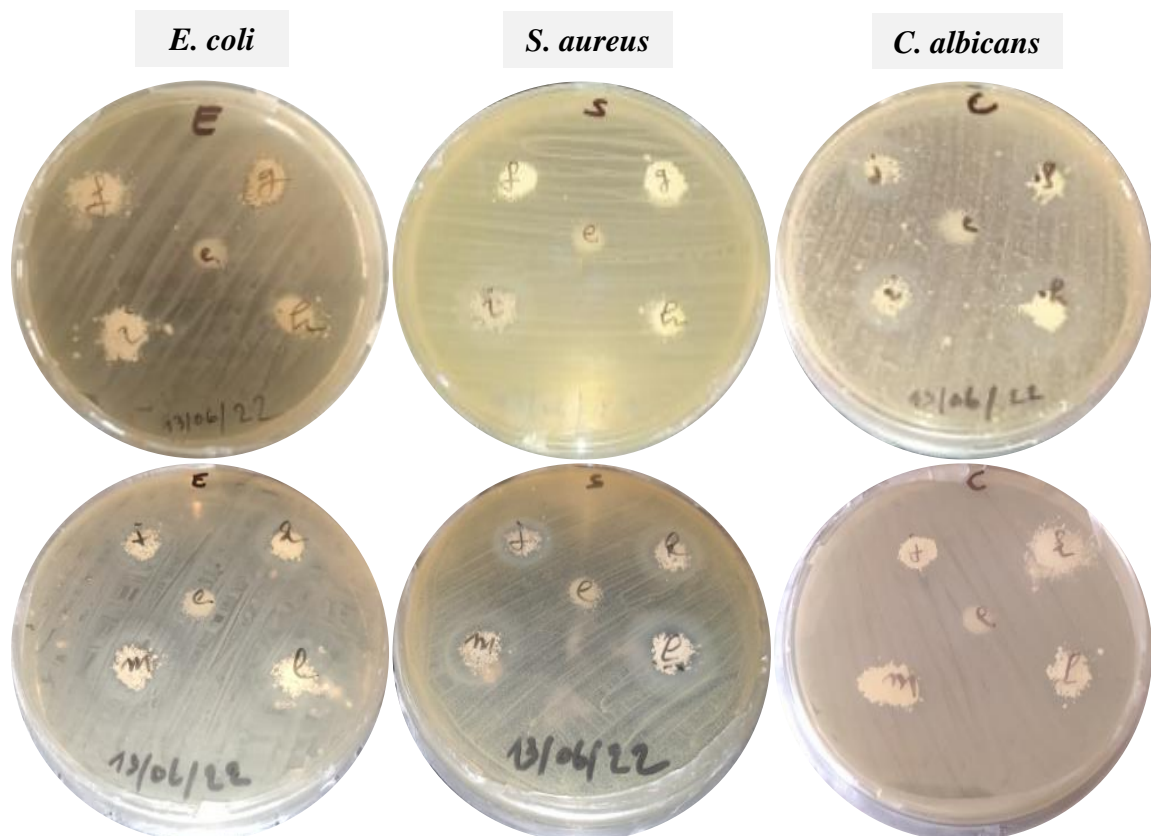


Figure 20 : Antibiogrammes de (f) HG0-Si, (g) HG10-Si, (h) HG20-Si, (i) HG30-Si, (j) HG0/Si, (k) HG10/Si, (l) HG20/Si, (m) HG30/Si, (e) HG0 (contrôle au milieu de la boîte).

Sur la **figure 20** on remarque pour les deux souches *E. coli* et *S. aureus*, l'apparition de zones d'inhibition autour de toutes les poudres synthétisées par voie solide. C'est la même observation pour *C. albicans* mais dans le cas des poudres synthétisées par voie humide. On constate que l'ajout de la silice dans les composites HAP-gélatine a permis à ces poudres d'avoir une certaine activité contre les bactéries. En plus, *E. coli* et *S. aureus* semblent être sensibles aux poudres denses et cristallisées HG/Si (préparées par voie solide) contrairement à *C. albicans* qui n'a montré aucun effet vis à vis de ces poudres.

IV.3.3. HAP sdopée (HAP-Ag, HAP-Zn, HAP-(Ag+Zn) et HAP-Ce)

HAP est dopée avec des agents métalliques tels que Ag, Zn et Ce. L'effet antibactérien de ces agents dans les poudres de HAP est vérifié en variant la teneur de chaque élément. La **figure 21** présente des poudres préparées à de faibles concentrations ($x = 0,05$ mol et $x = 0,1$ mol).

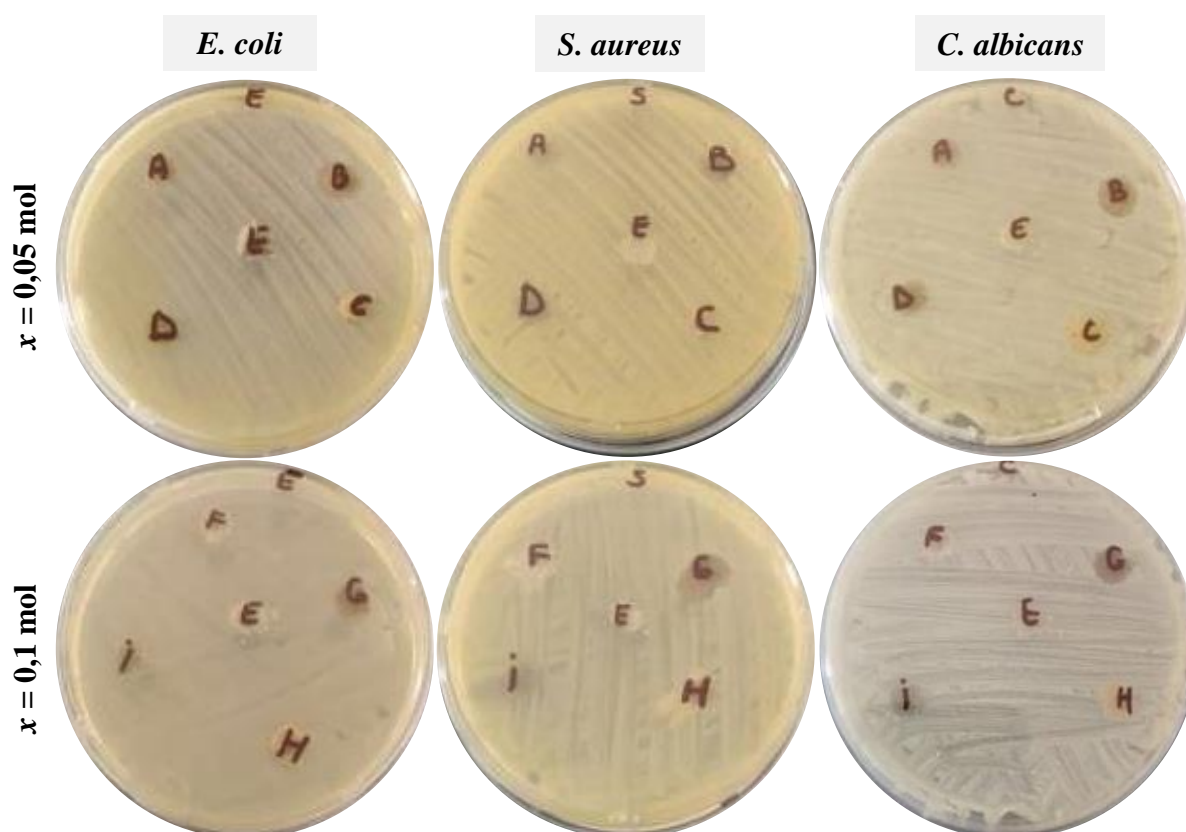


Figure 21: AntibioGrammes de (A) HAP-Zn (1), (B) HAP-Ag (1), (C) HAP-(Ag+Zn) (1), (D) HAP-Ce (1), (F) HAP-Zn (2), (G) HAP-Ag (2), (H) HAP-(Ag+Zn) (2), (i) HAP-Ce (2), (E) HAP (contrôle).

D'après la **figure 21** il n'existe pas de zones d'inhibition significatives pour les poudres préparées à de faibles concentrations, à l'exception de HAP-Ag (1) et HAP-Ag (2) pour lesquelles on note le développement d'une zone d'inhibition légère dans le cas des trois souches. Ainsi, l'argent peut empêcher la croissance bactérienne même lorsqu'il est présent en quantités réduites alors que le zinc et le cérium n'ont aucun effet inhibiteur.

En augmentant la teneur de HAP en éléments Ag et Zn (100 ppm), la **figure 22** indique l'apparition de zones d'inhibition plus importantes pour la poudre HAP-Ag (3) dans le cas des trois souches bactériennes. On remarque également la formation de zones d'inhibition autour de HAP co-dopée (HAP-(Ag+Zn) (3)). Ainsi, pour une concentration de 100 ppm, le co-dopage de HAP par Zn et Ag a entraîné la formation de faibles zones d'inhibition contrairement à HAP contenant Zn seul (HAP-Zn (3)).

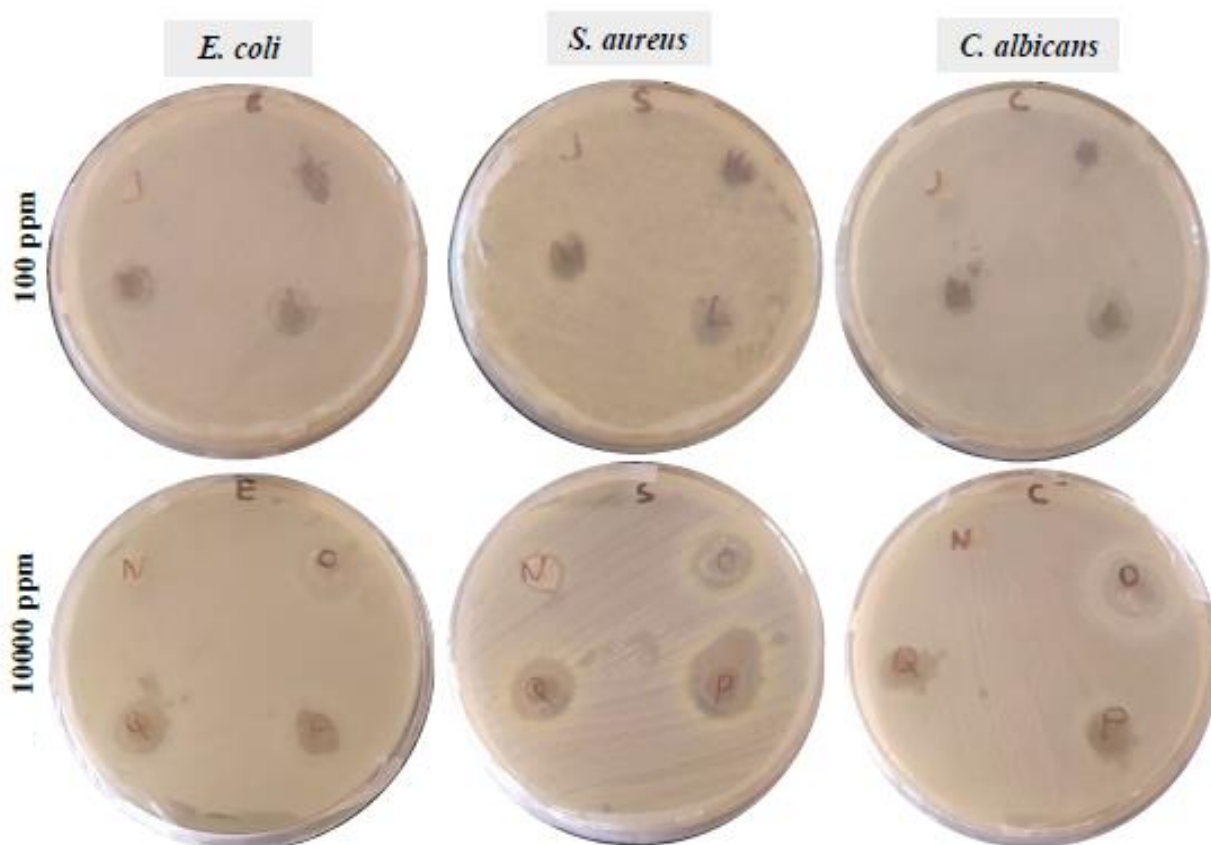


Figure 22 : AntibioGrammes de (J) HAP (contrôle), (K) HAP-Zn (3), (L) HAP-Ag (3), (M) HAP-(Ag+Zn) (3), (N) HAP (contrôle), (O) HAP-ZN (4), (P) HAP-Ag (4), (Q) HAP-(Ag+Zn) (4).

Pour une concentration de HAP en Ag, Zn et Ag+Zn plus élevée (10000 ppm), les trois bactéries deviennent moins résistantes à toutes les poudres (HAP-Ag (4), HAP-Zn (4) et HAP-(Ag+Zn) (4). En effet, on observe des zones d'inhibition avec différents diamètres tel que c'est montré dans la **figure 22**.

De cette étude, en considérant les trois souches bactériennes *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* testées, on peut déduire que la zone d'inhibition varie en fonction de la teneur de la poudre de HAP en gélatine, de la microstructure des poudre et enfin de leurs teneurs en éléments métalliques.

Pour de faibles concentrations, le cérium et le zinc n'ont montré aucun effet antibactérien à l'inverse de l'argent qui a provoqué la formation de zones d'inhibition avec toutes les souches et pour toutes les concentrations considérées.

On peut conclure que les bactéries ont montré une résistance vis-à-vis des poudres substituées donc la substitution de HAP a provoqué une activité antibactérienne dans le cas des poudres dopées en Ag et Zn à 10000 ppm.

Conclusion

Conclusion

Notre travail a été consacré à l'étude des céramiques ayant des propriétés spécifiques pour des applications médicales telles que des poudres d'hydroxyapatite pure (HAP) et composites (HAP-gélatine / HAP-gélatine-silice). Dans nos travaux précédents nous avons montré que l'ajout de la gélatine dans la phase de HAP permet d'augmenter la porosité et d'améliorer la bioactivité de l'hydroxyapatite. Dans ce travail nous avons procédé à l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'hydroxyapatite avec et sans gélatine en la dopant avec la silice (HAP-gélatine-silice) et des agents métalliques (HAP-Ag, HAP-Zn, HAP-(Ag+Zn) et HAP-Ce).

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des poudres par spectrophotométrie (FTIR) et par diffractions des rayons X (DRX) ont montré que l'hydroxyapatite synthétisée est carbonatée. Les carbonates disparaissent dans le cas des composites HG/Si préparés par voie solide. Nous avons également constaté qu'il est possible d'avoir une HAP substituée lorsque la concentration en élément substituant (Ag, Zn et Ce) est élevée (10000 ppm).

Les résultats des tests de l'effet antibactérien réalisés avec les trois souches bactériennes *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* ont montré que ces souches possèdent une sensibilité vis-à-vis des poudres dopées par les ions métalliques (Ag et Zn). La résistance des bactéries varie selon la teneur de HAP en gélatine (vis-à-vis de *C. albicans* uniquement), la microstructure de HAP (composite HAP/Si) et la concentration en argent et en zinc. Pour de faibles concentrations le cérium et le zinc n'ont montré aucun effet antibactérien contrairement à l'argent qui a provoqué la formation d'une zone d'inhibition avec toutes les souches et pour toutes les concentrations considérées.

En perspective, il est nécessaire de caractériser les poudres de biocéramique élaborées par microscopie électronique à balayage couplée à l'analyse élémentaire (MEB/EDS) et par microscopie électronique en transmission (MET). La taille et la forme des particules sont des paramètres essentiels pour favoriser l'action des agents antibactériens (nanoparticules). L'évaluation de l'activité antibactérienne par observation et estimation des zones d'inhibition est insuffisante, d'autres méthodes de quantification des colonies bactériennes autour des biomatériaux doivent être réalisées afin de compléter cette étude.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] D. F. Williams. Definitions in biomaterials: Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, 1986.
- [2] B. D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. Biomaterial science: A multidisciplinary endeavor. In: B.D. Ratner et al., 2nd ed Biomaterial Science. Elsevier (2004) 1-9.
- [3] J. A. Vilamitjana et J. C. Fricain. Unité Inserm 1026, Bioingénierie Tissulaire, Bordeaux.
- [4] L. L. Hench. Bioceramics. Amer. Ceram. Soc. 81 (1998) 1705-1727.
- [5] S. F. Hulbert, J. C. Bokros, L. L. Hench. Ceramics in clinical applications: past, present and future, High Tech Ceramics, Ed: P. Vincenzini, Amsterdam, 1987.
- [6] D. Letourneur, L. Bordenave. Ingénierie tissulaire : Une approche multidisciplinaire. Med Sci. 33 (2017) 4651.
- [7] L. Teot, J. Vidal, Eds., Le tissu osseux. Biologie de l'appareil locomoteur, Edition : Vigot, Montpellier, 1989.
- [8] M .C. De Vernejoul, P. Marie. Cellules osseuses et remodelage osseux. Med Sci. 9 (1993) 1192-1203.
- [9] P. Marie, L. Miravet. Ency. Med. Chir., appareil locomoteur, Editions : Techniques, Paris, 1986.
- [10] G. Chomette, M. Auriol, Ency. Med. Chir., Stomatologie et odontologie, Editions : Techniques, Paris, 1992.
- [11] A. G. Cornuelle, D.H. Gronefeld. Radiographic anatomy and positioning : an integrated approach. Mc Graw-Hill Medical Publishing, New York, 1997.
- [12] M. Palard, Synthèse et frittage d'hydroxyapatites phosphocalciques silicatées. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, France, 2007.
- [13] A. Shavandi, A. Bekhit, S. Zhifa, A. Azam. A review of synthesis methods, properties and use of hydroxyapatite as a substitute of bone Journal of Biomimetics J. Biomim. Biomater. Biomed. 25 (2015) 98-117.
- [14] D. Driss. Identification des pathologies du tissu osseux par traitement d'image. Mémoire de Magister en Electronique de l'Université de Tizi-Ouzou, Algérie, 2010.
- [15] M. Peroglio. Composites organiques-inorganiques poreux pour la substitution osseuse ». Thèse de Doctorat de l'Université de Lyon, France, 2008.

- [16] P. Dadoune et P. Hadjiiski. Histologie, Edition : flammarion, Paris, 1990.
- [17] D. Kuntz, P. Marie, L. Miravet. Ency. Med. Chir., Appareil locomoteur, Paris, 1981.
- [18] A.J. Bailey, R.G. Paul, L. Knott. Mechanisms of maturation and ageing of collagen
ech Ageing Dev.106 (1998) 1-56.
- [19] D.A. Hanson, D.R. Eyre. Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole
cross-links in type I collagen of human bone. Biol. Chem. 271 (1996) 26508-26516.
- [20] J. Woodhead-Galloway, The anatomy of a protein. Edward Arnold, London, 1982.
- [21] D.J. Prockop, K.I. Kivirikko. Heritable diseases of collagen. Engl. J. Med. 311
(1984) 376–96
- [22] M. H. Hong, D. S. Oh, Y. K. Lee. Bone 48 (2011) S186.
- [23] P. Choudhury, D.C. Agrawal. Surf. Coating Tech. 206 (2011) 360.
- [24] D.W. Lee, J.Y. Kim, D.H. Lew. J. Craniofac. Surg. 21 (2010) 1084.
- [25] W. F. De Jong. Rec. Trav. Chim. 45 (1926) 445-448.
- [26] D. Mc Connell. Apatite- Its Crystal Chemistry, Mineralogy, Utilization, and
Geologic and Biologic Occurrences, Edition: Springer Verlag, Vienna-Heidelberg-
New York, 1973.
- [27] A. S. Posner. Physiol. Rev. 49 (1969) 760-792
- [28] F. C. M. Driessens. Bull. Soc. Chim. Belg. 89 (1980) 663-689.
- [29] H. Aoki. Science and medical applications of hydroxyapatite, Edition: Takayama
Press System Centre, Tokyo, 1991.
- [30] R. Z. Le Geros, J. P.Le Geros. Dense hydroxyapatite. In An introduction to
bioceramics, Edition: L. L. Hench & J. Wilson, World Scientific, 1993.
- [31] J. Elliot. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates,
Edition: Elsevier, 1994.
- [32] G. Montel, G. Bonel, J.C. Trombe, J.C. Heughebaert, C. Rey. Pure & Appl. Chem.
52 (1980) 973-987.
- [33] M. Wang. Biomaterials 24 (2003) 2133.
- [34] J.H. Cho, J.P. Garino, S.-K. Choo, K.-Y. Han, J.-H. Kim and H.-K. Oh, Clin.
Orthop. Surg. 2 (2010) 214.
- [35] T. J. White, D. Zhi Li. Acta Crystallographica B 59 (2003) 1-16.

- [36] J. P. Lafon. Synthèse, stabilité thermique et frittage d'hydroxyapatites carbonatées
Thèse de l'Université de Limoges, 2004.
- [37] A. S. Breathnach. *Medicine* 41 (2013) 649-653.
- [38] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro and J. W. Costerton.
Biomaterials 33 (2012) 5967-5982.
- [39] D. M. Livermore. *Clin Infect Dis.* 36 (2003) :S11-23
- [40] R. J. Gordon, F. D. Lowy. *Clin Infect Dis.* 46 (2008) : S350–S359
- [41] N. J. Ronald, M. A. Pfaller. *Diagn. Microbiol Infect Dis.*31 (1998) 379-88.
- [42] B. J. Nablo, A. R. Rothrock, M. H. Schoenfisch. *Biomaterials* 26 (2005) 917-924.
- [43] R. O. Darouiche. *Clin Infect Dis.* 33 (2001) 1567-72.
- [44] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola. *Biomaterials* 27 (2006) 2331-2339.
- [45] L. G. Harris, R. G. Richards. *Injury* 37 (2006) S3-S14.
- [46] M. Talantikit. Effets antibactériens des nanoparticules de cuivre, oxyde de cuivre et oxyde de fer. Thèse de l'Institut de génie biomédical, Ecole polytechnique de montréal, Canada, 2014.
- [47] M. Bouskraoui, S. Zouhair, A. Benaouda, Z. Khalid, N. Soraa, M. Mahmoud. Guide pratique des bactéries pathogènes, SOMIPAV, Maroc, Edition 2017.
- [48] S. K. Shukla, T. S. Rao. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 43 (2014), 2107-2116
- [49] R. Singh, P. Ray, A. Das, M. Sharma. *J. Antimicrob Chemother.* 65 (2010)1955-8.
- [50] T. Subba Rao. *Arch Orthop.* 1 (2020) 98-105
- [51] A. M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P. T. Kalaichevan, R. Venketesan. *Nanomedicine*, 6 (2010) 103-109.
- [52] J. R. Morones-Ramirez, J. A. Winkler, C. S. Spina, *J. Sci Transl Med.* 5 (2013): 190ra81.
- [53] K. Kalishwaralal, S. Barath-Mani-Kanth, S. R.Pandian, V. Deepak, S. Gurunathan. *Colloids Surf.* 79 (2010) 340-344.
- [54] S. Tabrez Khan, M. Ahamed, A. Al-Khedhairy, and J. Musarratc. *Mater. Lett.* 97 (2013) 67-70.
- [55] D. Gopia, S. Ramyaa, D. Rajeswaria, P. Karthikeyana, L. Kavithad. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 451 (2014) 172–180.
-

-
- [56] E. M. Hetrick, J. H. Shin, H. S. Paul, M. H. Schoenfisch. *Biomaterials* 30 (2009) 2782-2789.
- [57] J. H. Shepherd, D. V. Shepherd, S. M. Best. *J Mater Sci Mater Med.* 23 (2012) 2335-2347.
- [58] S. Kannan, A. Rebelo, J. M. F. Ferreira. *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1692-1697.
- [59] P. N. Lim, L. Chang, B. Y. Tay, V. Guneta, C. Choong, B. Ho, and E. S. Thian. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 17082-17092.
- [60] M. Bouskraoui, S. Zouhair, A. Benaouda, Z. Khalid, N. Soraa, M. Mahmoud. *Guide pratique des bactéries pathogènes, SOMIPAV, Maroc, Edition 2017.*
- [61] S. K. Shukla, T. S. Rao. *Indian J. Geo-Mar. Sci.* 43 (2014), 2107-2116.
- [62] V. Uskoković, S. Ghosh, V.M. Wu. *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 6065-6080.
- [63] M. Virginia A. D. Laksono, W.P. Kusuma Asih., D.T. Agustiningtyas. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1726 (2021) 012007.
- [64] D.M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, *Biomaterials* 23 (2002) 691-698.
- [65] Z.H. Cheng, A. Yasukawa, K. Kandori, T. Ishikawa, FTIR study on incorporation of CO₂ into calcium hydroxyapatite, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94 (1998) 1501–1505.
- [66] D.W. Holcomb, R.A. Young, Thermal decomposition of human tooth enamel, *Calcif. Tissue Int.* 31 (1980) 189–201.
- [67] J.C. Elliott, The crystallographic structure of dental enamel and related apatites PhD. Thesis University of London, 1974.
- [68] A. Adeogun, M. Idowu, S. Kareem. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies, *Heliyon* 5 (2019) e01716.
- [69] N. Rameshbabu, T.S. Sampath Kumar, T.G. Prabhakar, V.S. Sastry, K.V.G.K. Murty, K. Prasad Rao, Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2006.
-

Annexe I

Composition des milieux de culture

(Pour 1L d'eau distillée) (Vincent, 1970)

- **Gélose nutritive**

Tryptone	5,0g
Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar bactériologique	12,0 g
Eau distillée	qsp 1 L

pH = 7.0 +/- 0.2, autoclaver à 120°C pendant 20min.

- **Gélose Mueller-Hinton (MH)**

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17,5 g
Extrait de viande	2,0g
Amidon	1,5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12,5 mg
Agar bactériologique	15,0 g
Eau distillée	qsp 1 L

pH = 7.4 +/- 0.2, autoclaver à 120°C pendant 20min.

- **Eau physiologique**

NaCl	9,0 g
Eau distillée	qsp 1 L

pH 7.0 +/- 0.2, autoclaver à 120°C pendant 20min.

Annexe II

Fiche de référence DRX

(HAP, TCP, CaO)

Fiche HAP

Name and formula

Reference code: 00-009-0432

Mineral name: Hydroxylapatite, syn
PDF index name: Calcium Phosphate Hydroxide

Empirical formula: $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$
Chemical formula: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$

Crystallographic parameters

Crystal system: Hexagonal
Space group: P63/m
Space group number: 176

a (Å): 9,4180
b (Å): 9,4180
c (Å): 6,8840
Alpha (°): 90,0000
Beta (°): 90,0000
Gamma (°): 120,0000

Calculated density (g/cm³): 3,16
Measured density (g/cm³): 3,08
Volume of cell (10⁶ pm³): 528,80
Z: 2,00

RIR: -

Subfiles and Quality

Subfiles: Inorganic
Mineral
Common Phase
Pharmaceutical

Quality: Indexed (I)

Comments

Color: Green, bluish green, yellow-green, grayish green, violet, violet-blue, violet, colorless, light greenish white, gray, brown, pinkish red, pinkish-red, blue

General comments: I/I₁ are peak values from a pattern which shows slight broadening of prism reflections.
Validated by calculated data 24-33.

Sample source: Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et

Optical data:
Additional pattern:

al., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **10** 156 (1938).

B=1.651, Q=1.644, Sign=-

To replace 34-10.

See ICSD 22059, 22060, 24240, 26204, 26205 and 34457 (PDF 73-293, 73-294, 73-1731, 74-565, 74-566 and 76-694).

References

Primary reference:

de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands., *ICDD Grant-in-Aid*

Optical data:

Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., **II**, 879

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	0	0	8,17000	10,820	12,0
2	1	0	1	5,26000	16,842	6,0
3	1	1	0	4,72000	18,785	4,0
4	2	0	0	4,07000	21,820	10,0
5	1	1	1	3,88000	22,902	10,0
6	2	0	1	3,51000	25,354	2,0
7	0	0	2	3,44000	25,879	40,0
8	1	0	2	3,17000	28,127	12,0
9	2	1	0	3,08000	28,967	18,0
10	2	1	1	2,81400	31,774	100,0
11	1	1	2	2,77800	32,197	60,0
12	3	0	0	2,72000	32,902	60,0
13	2	0	2	2,63100	34,049	25,0
14	3	0	1	2,52800	35,481	6,0
15	2	1	2	2,29600	39,205	8,0
16	3	1	0	2,26200	39,819	20,0
17	2	2	1	2,22800	40,453	2,0
18	3	1	1	2,14800	42,030	10,0
19	3	0	2	2,13400	42,319	4,0
20	1	1	3	2,06500	43,805	8,0
21	4	0	0	2,04000	44,370	2,0
22	2	0	3	2,00000	45,306	6,0
23	2	2	2	1,94300	46,713	30,0
24	3	1	2	1,89000	48,104	16,0
25	3	2	0	1,87100	48,624	6,0
26	2	1	3	1,84100	49,469	40,0
27	3	2	1	1,80600	50,494	20,0
28	4	1	0	1,78000	51,285	12,0
29	4	0	2	1,75400	52,102	16,0
30	0	0	4	1,72200	53,145	20,0
31	1	0	4	1,68400	54,442	4,0
32	3	2	2	1,64400	55,881	10,0
33	3	1	3	1,61100	57,129	8,0
34	5	0	1	1,58700	58,075	4,0
35	4	2	0	1,54200	59,940	6,0
36	3	3	1	1,53000	60,459	6,0
37	2	1	4	1,50300	61,662	10,0
38	5	0	2	1,47400	63,013	12,0
39	5	1	0	1,46500	63,445	4,0
40	3	0	4	1,45200	64,080	13,0
41	5	1	1	1,43300	65,033	9,0
42	4	2	2	1,40700	66,388	4,0
43	5	1	2	1,34800	69,701	3,0
44	4	3	1	1,31600	71,653	5,0
45	5	2	0	1,30600	72,288	4,0

Fiche TCP

Name and formula

Reference code:	00-009-0169
Mineral name:	Whitlockite, syn
PDF index name:	Calcium Phosphate
Empirical formula:	$\text{Ca}_3\text{O}_8\text{P}_2$
Chemical formula:	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Crystallographic parameters

Crystal system:	Rhombohedral
Space group:	R-3c
Space group number:	167
a (Å):	10.4290
b (Å):	10.4290
c (Å):	37.3800
Alpha (°):	90.0000
Beta (°):	90.0000
Gamma (°):	120.0000
Calculated density (g/cm ³):	3.07
Measured density (g/cm ³):	3.12
Volume of cell (10 ⁶ pm ³):	3520.91
Z:	21.00

RIR: -

Status, subfiles and quality

Status:	Marked as deleted by ICDD
Subfiles:	Inorganic Mineral Corrosion Common Phase Educational pattern Forensic
Quality:	Indexed (I)

Comments

Deleted by:	Deleted by 00-055-0898, higher FN, QM and more complete, LRB 6/04.
Color:	Colorless, white, gray, yellow.
Sample source:	Sample obtained by heating a commercial sample.
Structure:	Nearly isostructural with cerite.
Additional pattern:	See PDF 01-070-2065. Validated by calculated pattern 00-042-0577.
Unit cell data source:	Powder Diffraction.

References

Primary reference: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands., *ICDD Grant-in-Aid*, (1957)
Structure: Calvo, C., Gopal, R., *Am. Mineral.*, **60**, 120, (1975)
Optical data: *Dana's System of Mineralogy, 7th Ed.*, **II**, 684, (1951)

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	0	1	2	8.15000	10.847	12.0
2	1	0	4	6.49000	13.633	16.0
3	0	0	6	6.22000	14.228	6.0
4	1	1	0	5.21000	17.005	20.0
5	1	1	3	4.80000	18.469	2.0
6	2	0	2	4.39000	20.212	8.0
7	0	1	8	4.15000	21.394	4.0
8	0	2	4	4.06000	21.874	16.0
9	1	1	6	4.00000	22.206	4.0
10	1	0	10	3.45000	25.803	25.0
11	2	1	1	3.40000	26.189	4.0
12	1	2	2	3.36000	26.507	10.0
13	1	1	9	3.25000	27.421	8.0
14	2	1	4	3.21000	27.769	55.0
15	1	2	5	3.11000	28.681	2.0
16	3	0	0	3.01000	29.655	16.0
17	0	2	10	2.88000	31.027	100.0
18	1	2	8	2.75700	32.449	20.0
19	3	0	6	2.71000	33.027	10.0
20	1	1	12	2.67400	33.485	8.0
21	2	2	0	2.60700	34.372	65.0
22	0	1	14	2.56200	34.995	6.0
23	2	2	3	2.55300	35.122	8.0
24	2	1	10	2.52000	35.598	12.0
25	1	3	1	2.49900	35.907	6.0
26	1	2	11	2.40700	37.329	10.0
27	3	1	5	2.37500	37.851	6.0
28	1	0	16	2.26300	39.801	10.0
29	1	1	15	2.24900	40.059	4.0
30	0	4	2	2.24100	40.209	2.0
31	4	0	4	2.19500	41.089	14.0
32	3	0	12	2.16500	41.685	12.0
33	1	2	14	2.10300	42.974	4.0
34	0	0	18	2.07600	43.561	8.0
35	3	2	1	2.06800	43.738	4.0
36	2	3	2	2.06100	43.894	6.0
37	0	4	8	2.03300	44.531	10.0
38	3	2	4	2.02300	44.763	6.0
39	3	1	11	2.01700	44.903	4.0
40	2	2	12	2.00000	45.306	8.0
41	4	1	0	1.97000	46.035	2.0
42	4	1	3	1.94600	46.636	4.0
43	4	0	10	1.93300	46.969	20.0
44	2	3	8	1.89500	47.969	16.0

Fiche CaO

Name and formula

Reference code: 00-037-1497

Mineral name: Lime, syn
Common name: burnt lime, calcia, quicklime
PDF index name: Calcium Oxide

Empirical formula: CaO
Chemical formula: CaO

Crystallographic parameters

Crystal system: Cubic
Space group: Fm-3m
Space group number: 225

a (Å): 4.8106
b (Å): 4.8106
c (Å): 4.8106
Alpha (°): 90.0000
Beta (°): 90.0000
Gamma (°): 90.0000

Volume of cell (10⁶ pm³): 111.33
Z: 4.00

RIR: -

Subfiles and Quality

Subfiles: Inorganic
Mineral
Alloy, metal or intermetallic
Cement and Hydration Product
Common Phase
Educational pattern
Forensic
NBS pattern
Pharmaceutical
Superconducting Material
Excipient

Quality: Star (S)

Comments

Color: Colorless.

General comments: References to earlier patterns will be found in reference 4. Pattern reviewed by K. Martin and G. McCarthy, North Dakota State Univ., Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid (1990). Excepted for the (220) reflection, there is good agreement with experimental and calculated patterns. The experimental pattern had I(220)=245; the calculated value is I(220)=49.

Sample preparation: The sample was prepared from calcium hydroxide obtained from Fisher Scientific Co., Fair Lawn, New Jersey, USA, by heating it to 925° overnight.

Structure: The structure was determined by Oftedal (1).
Additional pattern: See PDF 01-082-1690. To replace 00-004-0777 (2).
Unit cell data source: Powder Diffraction.
Temperature: The mean temperature of data collection was 25.3°.

References

Primary reference: McMurdie, H., Morris, M., Evans, E., Paretzkin, B., Wong-Ng, W.,
Hubbard, C., *Powder Diffraction*, **1**, 266, (1986)
Structure: 1. Oftedal, I., *Z. Phys. Chem. (Leipzig)*, **128**, 154, (1927)

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta [deg]	I [%]
1	1	1	1	2.77737	32.204	36.0
2	2	0	0	2.40587	37.347	100.0
3	2	2	0	1.70093	53.856	54.0
4	3	1	1	1.45050	64.154	16.0
5	2	2	2	1.38877	67.375	16.0
6	4	0	0	1.20257	79.665	6.0
7	3	3	1	1.10367	88.525	6.0
8	4	2	0	1.07576	91.459	16.0
9	4	2	2	0.98194	103.343	12.0
10	5	1	1	0.92572	112.631	6.0
11	4	4	0	0.85035	129.879	6.0
12	5	3	1	0.81313	142.643	10.0
13	6	0	0	0.80179	147.776	16.0

Résumé : Les biocéramiques en phosphates de calcium sont utilisées comme substituts osseux en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale, du fait de leur composition qui est très proche de la phase minérale de l'os. L'hydroxyapatite (HAP) est chimiquement le phosphate de calcium le plus proche des cristaux des apatites biologiques. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne des poudres d'hydroxyapatite pure et composite (hydroxyapatite - biopolymère (gélatine)) après insertion d'agents antibactériens tels que l'argent, le zinc, le cérium et la silice à des concentrations différentes. L'effet de ces agents au contact de souches bactériennes telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* est évalué par observation des zones d'inhibition.

Mots clés : Biomatérial, hydroxyapatite, composite, agent antibactérien, substitution.

Abstract : Calcium phosphate bioceramics are used as bone substitutes in orthopedic and maxillofacial surgery, due to their composition which is very close to the mineral phase of bone. Hydroxyapatite (HAP) is chemically the calcium phosphate closest to the crystals of biological apatite. Thus, the objective of this work is to evaluate the antibacterial activity of pure and composite (hydroxyapatite - biopolymer (gelatin)) hydroxyapatite powders after insertion of antibacterial agents such as silver, zinc, cerium and silica with different concentrations. The effect of these agents in contact with bacterial strains such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* is investigated by observing the inhibition zone.

Key-words: Biomaterial, hydroxyapatite, composite, antibacterial agent, substitution.

نبذة مختصرة : يستخدم الخزف الحيوي لفوسفات الكالسيوم كبديل للعظام في جراحة العظام والوجه والفكين ، نظراً لتكوينها القريب جداً من الجزء المعدني للعظام. هيدروكسيباتيت (HAP) هو كيميائياً فوسفات الكالسيوم الأقرب إلى بلورات الأباتيت البيولوجية. وبالتالي ، فإن الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمساحيق هيدروكسيباتيت النقية والمركبة (هيدروكسيباتيت - البوليمر الحيوي (الجيلاتين)) بعد إدخال عوامل مضادة للجراثيم مثل الفضة والزنك والسيريوم والسيليكا بتركيزات مختلفة. تم التحقق من تأثير هذه العوامل عند ملامستها للسلاسل البكتيرية مثل "*Staphylococcus aureus*" و "*Escherichia coli*" و "*Candida albicans*" من خلال مراقبة منطقة التثبيط.

الكلمات الدالة : مادة حيوية ، هيدروكسيباتيت ، مركب ، عامل مضاد للجراثيم ، بديل.