



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira - BEJAIA

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du Diplôme

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Option

GENIE PHARMACEUTIQUE

Thème

**ETUDE DES PROPRIETES D'UN BIOMATERIAU
COMPOSITE POUR SUBSTITUTION OSSEUSE**

Présenté par :

DEFLAOUI Nawal

SADOU Lynda

Encadré par :

Dr SIDANE Djahida

Soutenu devant le jury :

Pr KHIREDDINE Hafit

Professeur

Université de BEJAIA

Président

Dr ZIANI Salima

MCA

Université de BOUIRA

Examinatrice

Dr BOUREBABA Yasmina

MCB

Université de BEJAIA

Examinatrice

Année Universitaire 2020-2021

Remerciements

En premier lieu et avant tout, on remercie Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience et la force d'accomplir ce travail.

Les travaux de ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Génie de l'Environnement (LGE) de l'Université de BEJAIA.

Ainsi

Nous remercions Mme SIDANE Djahida de nous avoir encadrées et accueillies tout au long de ce travail.

Nous remercions aussi tous les membres de l'équipe du laboratoire pour leur bonne humeur, leur soutien, leur aide et gentillesse et pour tous les moments agréables passés au laboratoire.

Nous tenons aussi à remercier Mme BOUREBABA Yasmina pour son aide pour la réalisation des tests microbiologiques.

Nos remerciements vont également aux membres du jury :

Mr KHIREDDINE Hafit, Mme ZIANI Salima et Mme BOUREBABA Yasmina pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, nous exprimons nos vifs remerciements à toute personne qui nous a apporté son aide et conseils durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

**A mes très chers parents qui m'ont soutenue durant toutes mes années d'études.
Leur sacrifice est inégalable, incalculable, qu'ils trouvent à travers ce modeste travail
tout mon amour et ma reconnaissance.**

« Que Dieu me les préserve pour qu'ils partagent avec moi tous les plaisirs de la vie ».

A ceux que j'aime et je respecte :

A mes deux frères, Hacen et Azzedine et leurs petites familles.

A mes sœurs, Sonia, Anissa et Yasmine.

A mes adorables neveux que j'aime, Rayane, Iyas et Ilyane.

A mes chères amies Lila, Katia, Chadia, Wissam et Souhila.

A mon fiancé pour son soutien, comme disait marcel Proust :

**« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur, elles sont les
charmants jardiniers par qui nos âmes fleurissent ».**

C'est de tout mon cœur que je le remercie.

A ma « binôme » Lynda pour les moments inoubliables qu'on a passés ensemble.

Nawal

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail.

A mes chers parents pour leurs encouragements, leur soutien et surtout pour leur amour et sacrifice durant mon parcours scolaire et universitaire.

A mon cher mari.

A mes frères, Yacine, Tahar, Lahlou.

A mes adorables enfants, Abdlouahab et Ayla.

A ma belle-mère et tous les membres de ma belle-famille.

A tous mes ami(e)s, et en particulier :

A Nesrine.

Et à Nawal, ma chère amie et « binôme ».

Lynda

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Introduction..... 01

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités : Os - Biomatériaux - Hydroxyapatite..... 02

I.1.1. Définition de l'os (tissus osseux)..... 02

I.1.2. Organisation générale du tissu osseux..... 02

I.1.2.1. Matrice osseuse..... 02

I.1.2.2. Cellules osseuses..... 03

I.1.3. Pathologies osseuses..... 06

I.1.3.1. Maladie de Paget..... 06

I.1.3.2. Ostéoporose..... 06

I.1.3.3. Ostéomalacie..... 06

I.1.3.4. Fractures osseuses..... 06

I.1.4. Nécessité des biomatériaux..... 07

I.1.4.1. Définition d'un biomatériau..... 07

I.1.4.2. Propriétés des biomatériaux..... 08

I.1.4.3. Domaines d'application des biomatériaux..... 11

I.1.4.4. Cahier des charges d'un biomatériau..... 12

I.1.4.5. Classifications des biomatériaux..... 12

I.1.5. Hydroxyapatite..... 13

I.1.5.1. Structure de l'hydroxyapatite..... 14

I.1.5.2. Méthodes de synthèses de l'hydroxyapatite..... 15

I.2. Modification de HAP par un composé biologique, la gélatine : Effet sur la bioactivité..... 17

I.2.1. Généralités sur la gélatine..... 17

I.2.2. Procédés d'extraction industrielle de la gélatine..... 18

I.2.3. Structure et composition de la gélatine..... 19

I.2.4. Caractéristiques de la gélatine..... 20

I.3. Modification de HAP par des ions métalliques, Ag⁺ et Zn²⁺ : Effet sur l'activité bactérienne.....	21
I.3.1. Agents antimicrobiens métalliques	21
I.3.1.1. Zinc.....	21
I.3.1.2. Argent.....	22
I.3.2. Contact implant-microorganismes.....	22
I.3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> « <i>S. aureus</i> ».....	23
I.3.2.2. <i>Escherichia coli</i> « <i>E. coli</i> ».....	23
I.3.2.3. <i>Candida albicans</i> « <i>C. albicans</i> ».....	23

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.1. Procédure expérimentale.....	25
II.1.1. Elaboration des matériaux.....	25
I.1.1.1. Préparation de la solution sol-gel CaP (HAP)	25
II.1.1.2. Préparation des matériaux pour l'étude de la bioactivité.....	25
II.1.1.3. Préparation des poudres d'hydroxyapatite dopée avec différentes concentrations métalliques.....	28
II.1.2. Test de bioactivité	29
II.1.2.1. Préparation de la solution (SBF)	29
II.1.2.2. Incubation des pastilles dans la solution SBF.....	30
II.1.3. Test microbiologique	30
II.1.3.1. Préparation de la suspension bactérienne.....	30
II.1.3.2. Ensemencement des bactéries.....	31
II.1.3.3. Préparation de la microplaque (méthode de turbidimétrie).....	32
II.2. Analyse et caractérisation.....	33
II.2.1. Analyse de la bioactivité <i>in vitro</i>	33
II.2.1.1. Mesure des masses et pH	33
II.2.1.2. Analyse quantitative du milieu SBF par spectrométrie d'absorption atomique (SAA).....	34
II.2.1.3. Analyse qualitative par spectrophotométrie Infra-rouge (ATR-FTIR).....	35
II.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	36

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Evaluation de la bioactivité	37
III.1.1. Variation de la concentration de Ca après immersion des pastilles dans le SBF....	37
III.1.2. Analyse de la structure par ATR.....	42
III.1.2.1. Traitement des spectres ATR.....	42
III.1.3. Analyse de la morphologie de surface par microscopie IR.....	45
III.2. Activité antibactérienne des poudres dopées.....	48
III.2.1. Caractérisation des poudres de HAP dopées par infra-rouge.....	48
III.2.2. Zones d'inhibition.....	49
III.2.3. Densités optiques des milieux.....	51
Conclusion.....	53
Références bibliographiques.....	55
Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Signification
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ATR	Réflectance Total Atténué
DO	Densité Optique
DRX	Diffraction des Rayons X
EDS	Spectroscopie à dispersion d'énergie
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformer de Fourier
HAP	Hydroxyapatite
HAP-Ag	Hydroxyapatite dopée avec Ag
HAP-Zn	Hydroxyapatite dopée avec Zn
HAP-(Ag+Zn)	Hydroxyapatite co-dopée avec Ag et Zn
HG	Biocomposite : hydroxyapatite - gélatine
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pH	Potentiel Hydrogène
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
SBF	Simulated Body Fluid (Solution Physiologique Simulée)
UV	Rayonnement ultraviolet

LISTE DES FIGURES

N°	Titre de la figure	Page
I.1	Les différentes échelles d'organisation de l'os naturel.	04
I.2	Représentation schématique de : (a) Tissue osseux. (b) Unité de remodelage osseux.	05
I.3	Représentation schématique du processus se déroulant à l'interface : Implant « Revêtement (CaP) » - Os.	10
I.4	Projection dans le plan de base (001) de la cellule élémentaire de l'hydroxyapatite.	14
I.5	Procédé industriel d'extraction de la gélatine.	18
I.6	Structure en triple hélice du collagène. (A) Vue axiale de l'hélice. (B) Vue de côté du modèle compact de triple hélice droite de collagène.	19
I.7	Structure chimique de base de la gélatine.	20
II.1	Protocole de synthèse des poudres des biocomposites : HAP-gélatine.	26
II.2	Images des pastilles HAP-gélatine.	27
II.3	Images des poudres de HAP dopée et co-dopée avec Ag et Zn à 10000 ppm.	28
II.4	Agitateur-Incubateur.	30
II.5	Images du milieu gélosé et ensemencé avec les bactéries et les poudres de HAP. Images microscopiques des 3 bactéries : (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ; (B) <i>Candida albicans</i> ; (C) <i>Escherichia coli</i> .	31
II.6	Image représentant l'essai de microplaque (DO).	32
II.7	Schéma illustratif des techniques d'analyse et de caractérisation de l'hydroxyapatite.	33
III.1	Courbe d'étalonnage : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration des solutions standards en calcium.	37
III.2	Variation de la concentration des milieux SBF en fonction des temps d'immersion des pastilles de HAP obtenues à différents temps et température de calcination.	38
III.3	Variation de la concentration des milieux SBF en fonction des temps d'immersion des pastilles de HAP-gélatine (biocomposite).	41
III.4	Spectres IR des pastilles de HAP préparée à différents temps et températures de calcination avant et après immersion dans le SBF.	43
III.5	Spectres IR des pastilles de HAP composite avant et après immersion dans le SBF.	45
III.6	Imagerie IR de la surface des pastilles de HAP composite à 0 et 10% en gélatine.	46
III.7	Imagerie IR de la surface des pastilles de HAP composite à 30 et 50% en gélatine.	47
III.8	Spectres IR des poudres de HAP dopées.	48
III.9	Antibiogrammes des deux bactéries.	50
III.10	Antibiogrammes du champignon.	51

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre du tableau	Page
I.1	Domaine d'application des biomatériaux.	11
I.2	Quelques propriétés physiques de la gélatine en fonction de l'origine.	20
II.1	Pastilles formées à partir des poudres des biocomposites (HAP-gélatine).	26
II.2	Pastilles représentatives du scaffold.	27
II.3	Réactifs utilisés pour la préparation d'un litre de la solution SBF à 37°C.	29
III.1	Variation du pH et de la masse des pastilles avant et après immersion dans le SBF.	42
III.2	Densités optiques des suspensions bactériennes.	52

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans certaines pathologies, le processus naturel de restauration de l'os peut être mis en échec. Ainsi, pour mettre à l'organisme un meilleur remodelage des tissus osseux altérés, la médecine actuelle emploie de plus en plus des biomatériaux synthétiques tels que les substituts osseux.

Actuellement, les céramiques à base de phosphate de calcium sont communément employées en tant que substituts osseux de comblement. Parmi les principaux avantages des composés phosphocalciques est leur similarité en terme de composition chimique avec la partie minérale de l'os ainsi que leurs propriétés de bioactivité et d'ostéoconduction. Parmi eux, l'hydroxyapatite de formule chimique, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, notée HAP et le phosphate tricalcique de formule chimique, $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, noté βTCP sont les biomatériaux les plus utilisés. Ces biomatériaux acceptent la repousse osseuse mais présentent une capacité limitée à stimuler le développement de nouveaux tissus, c'est pourquoi on cherche à ce jour à améliorer leurs propriétés soit en leur ajoutant des substances ou des ions (élaboration des biocomposites et matériaux hybrides) ou bien en leur donnant simplement une forme bien spécifique (*Scaffold*).

Ainsi, l'objectif de ce travail est de préparer une hydroxyapatite à utiliser en tant que matériau de remplacement osseux (substitut) et de vérifier ses propriétés de bioactivité et antibactérienne. L'effet de l'ajout de la gélatine et de l'incorporation des ions antibactériens (Ag et Zn) au sein de la structure de HAP sur ses propriétés physico-chimiques est également étudié. Ce manuscrit est alors composé de trois chapitres :

- La synthèse bibliographique qui est décrite au premier chapitre renseigne sur la structure du tissu osseux, sa composition et ses propriétés et présente aussi des notions sur les biomatériaux en général et sur l'hydroxyapatite et la gélatine, plus particulièrement.
- Le deuxième chapitre présente les différents protocoles expérimentaux utilisés ainsi que les méthodes et techniques d'analyse et de caractérisation physico-chimiques et biologiques.
- Le troisième chapitre est consacré à la présentation et à l'interprétation de l'ensemble des résultats obtenus concernant la biofonctionnalisation de l'hydroxyapatite par la gélatine (biocomposite) ainsi que les tests de bioactivité et de l'activité antibactérienne.

Nous terminerons par une conclusion résumant les points essentiels de ce mémoire.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. GENERALITES : OS – BIOMATERIAUX – HYDROXYAPATITE

I.1.1. Définition de l'os (tissu osseux)

Le tissu osseux est un tissu squelettique, tissu conjonctif spécialisé, de consistance dure. Il est parcouru par un très riche réseau vasculaire et comporte :

- Une matrice extracellulaire (MEC) minéralisée qui confère au tissu osseux sa rigidité et sa solidité. Elle est constituée d'une partie minérale et une partie organique.
- Des cellules osseuses (cellules bordantes, ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) [1].

Le tissu osseux possède 3 fonctions :

Une fonction mécanique qui assure à l'os son rôle :

- De soutien du corps : il constitue la charpente du corps.
- De protection des organes vitaux (cerveau, cœur, poumons, etc.)
- Dans la locomotion [1].

Une fonction métabolique : elle permet la libération et le stockage des sels minéraux ainsi que le contrôle du métabolisme phosphocalcique (régulation de la calcémie) [1].

Une fonction hématopoïétique : les os renferment dans leur espace médullaire de la moelle hématopoïétique dite hématogène dont les cellules souches à l'origine des 3 lignées de globules du sang, ainsi que les cellules souches multipotentes susceptibles de se différencier dans de multiples lignées différentes (fibroblastes, ostéoblastes, adipocytes, etc.) [1].

I.1.2. Organisation générale du tissu osseux

Le tissu osseux est composé de cellules noyées dans une matrice osseuse.

I.1.2.1. Matrice osseuse

Elle est constituée d'une partie organique (25%) et d'une partie minérale (70%) et de l'eau qui représente 5% de la matrice osseuse [1].

a) Partie minérale

La matrice minérale est responsable de la rigidité de l'os, les minéraux se fixent sur la trame protéique de l'ostéoïde (tissu osseux jeune non encore minéralisé) [1].

Les minéraux les plus importants sont :

- Le calcium : le squelette contient 99% du calcium de l'organisme (1100 à 1200g).
- Le phosphore : le squelette contient 90% du phosphore total de l'organisme (~ 600g)
- Le sodium (18g pour un squelette d'adulte), le potassium (6g) et le magnésium (3g) [1].

b) Partie organique

Elle est structurée ainsi :

- Collagène (de type I) : protéine très abondante, il représente 90 à 95% de la fonction organique, sa structure est en triple hélice (trois chaînes de protéines se liant entre elles) [1].
- Autre protéine : protéine non collagène spécifique de l'os (10%), elle comprend :
 - L'ostéonectine qui est la plus abondante, elle est liée au collagène et aux sels minéraux (cristaux d'hydroxyapatite). Elle sert de colle entre les parties minérales et les parties organiques.
 - L'ostéocalcine : intervient dans la minéralisation osseuse.
 - L'ostéopontine : relie l'hydroxyapatite aux cellules osseuses [1].
- Eau et électrolytes [1].

La matrice organique se minéralise par des dépôts de phosphate et de calcium cristallisés formant des cristaux d'**hydroxyapatite (HAP)**.

I.1.2.2. Cellules osseuses

Le tissu osseux adulte apparaît formé de cellules osseuses qui sont des cellules conjonctives qui se différencient au cours de l'ossification. On distingue :

1- Les ostéoblastes : cellules formatrices du tissu osseux. Elles produisent du collagène, des mucoprotéines de la substance fondamentale et des phosphates alcalines [1].

2- Les ostéocytes : cellules de forme étoilée dont les prolongements longs et fins unissent les cellules osseuses entre elles. Ce sont des cellules du tissu osseux mature. Leur rôle est la nutrition du tissu osseux et la participation aux mécanismes de résorption et de remodelage osseux [1].

3- Les ostéoclastes : cellules énormes et mobiles qui détruisent l'os tandis que parallèlement les ostéoblastes le reconstruisent [1].

4- Les cellules bordantes : ce sont des cellules ostéoblastes au repos. Elles revêtent les surfaces osseuses à un moment donné, et ne sont soumises ni à formation ni à résorption [1].

La **figure I.1** montre les échelles ou encore les dimensions d'organisation dans l'os. Les triples hélices du collagène forment des faisceaux de protéines à l'échelle nanométrique, qui servent de « Template » pour la cristallisation de nanocristaux d'hydroxyapatite. La matrice de collagène est également reconnue par les cellules souches indifférenciées de la moelle osseuse qui deviennent des ostéoblastes, cellules formatrices d'os, après réception de signaux provenant de protéines spécifiques dans la matrice.

Pour reproduire la durabilité et la résistance de l'os naturel, les chercheurs doivent concevoir des matériaux synthétiques qui correspondent à ces niveaux structurels d'organisation à partir de l'échelle nanométrique [2].

Nous reviendrons sur la définition du collagène dans la deuxième partie de ce chapitre.

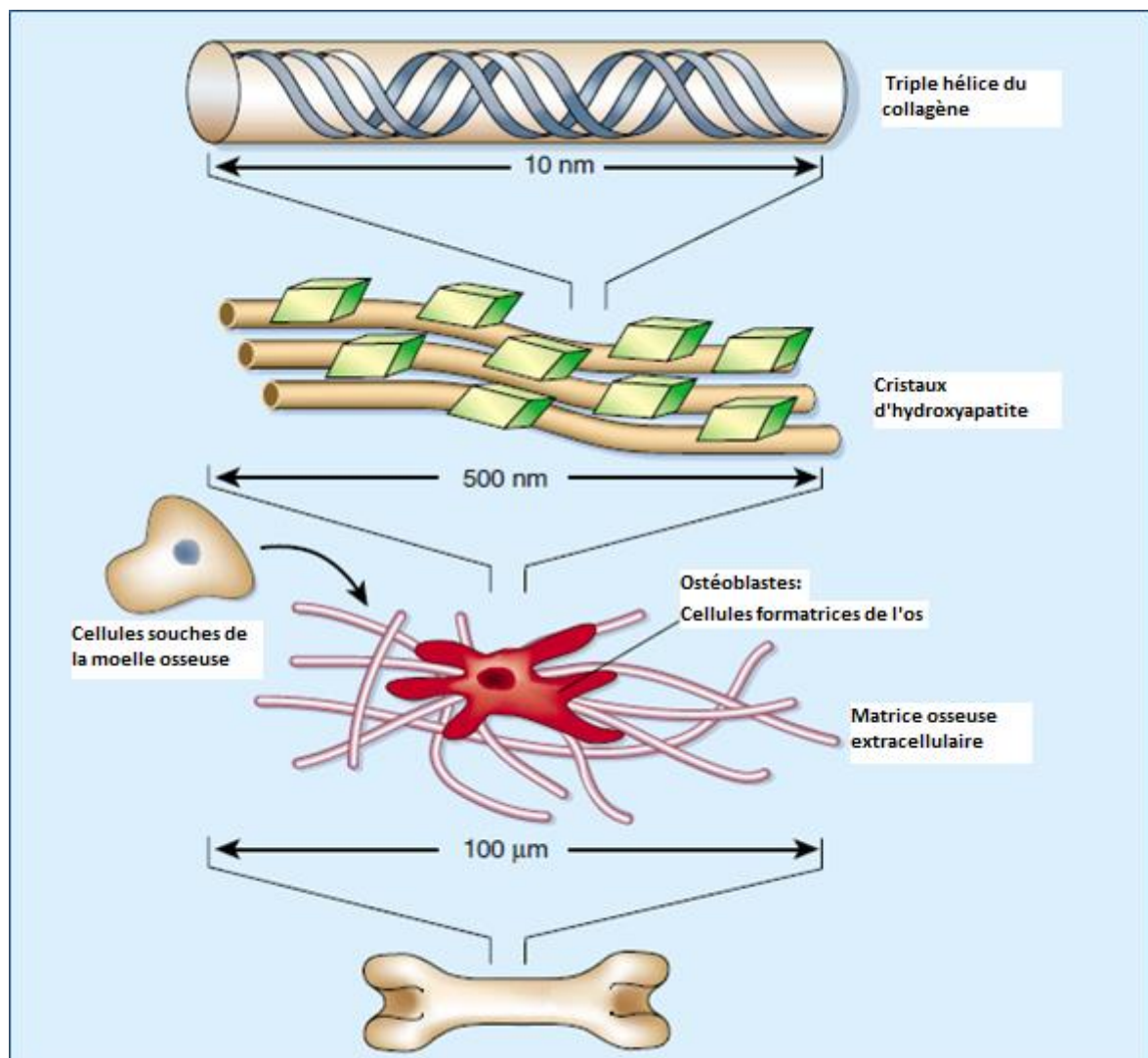
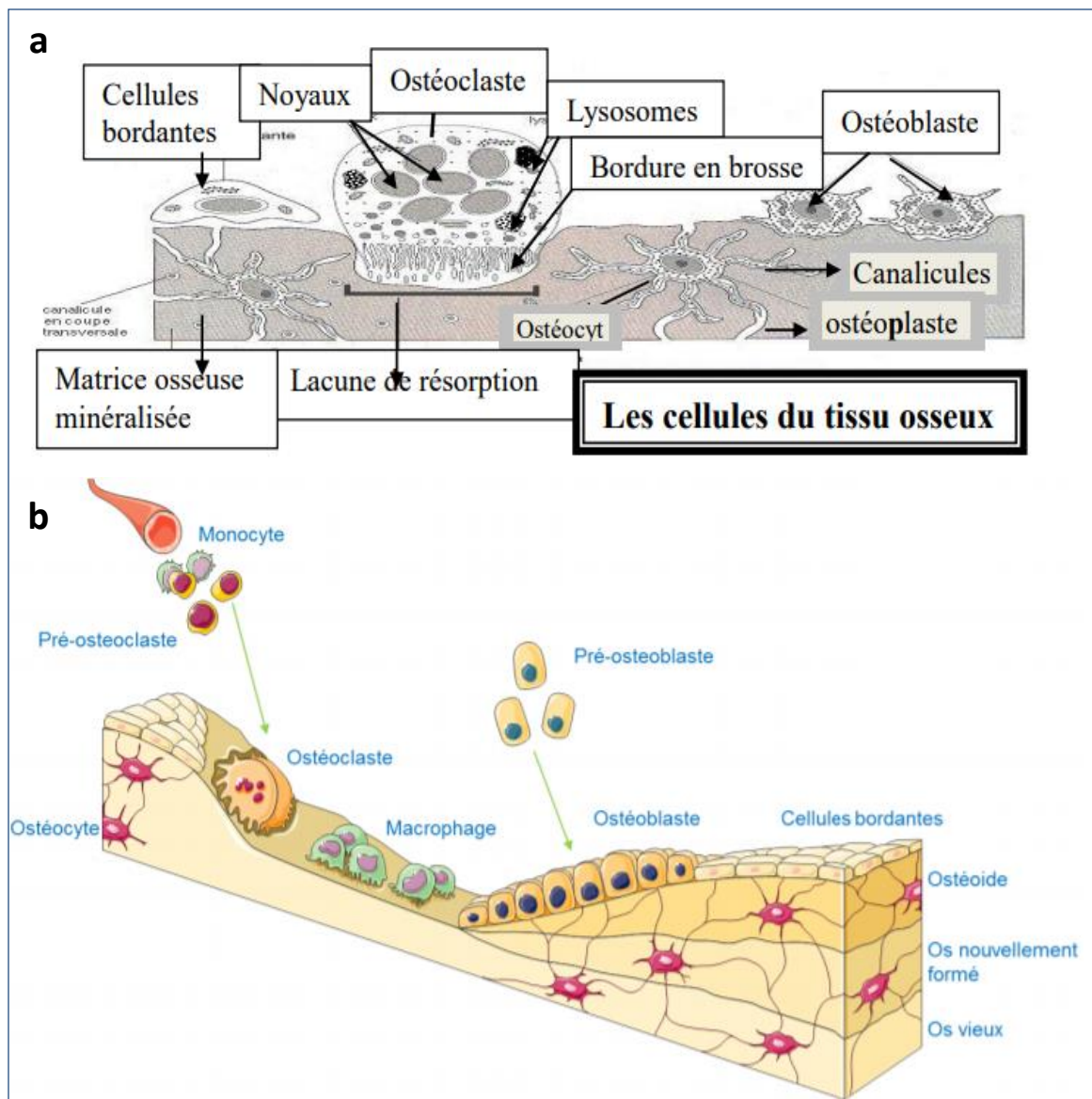


Figure I.1. Différentes échelles d'organisation de l'os naturel [2].

Le tissu osseux est en constant remodelage, et près de 5 à 10% de la masse osseuse est renouvelée annuellement chez l'adulte [3]. La **figure I.2** montre les cellules du tissu osseux ainsi que le principe du cycle de remodelage osseux et de formation d'un nouvel os.



**Figure I.2. Représentation schématique de : (a) Tissu osseux [4].
(b) Unité de remodelage osseux [5].**

Le remodelage osseux est nécessaire à la régulation de la calcémie (taux plasmatique de calcium), à la conservation des propriétés mécaniques de l'os et à la réparation d'éventuelles fractures. Cette réorganisation s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage qui associent ostéoclastes et ostéoblastes. L'os est formé de million de ces unités indépendantes d'environ 100 μm de diamètre qui se déplacent au fil du temps. La durée d'un cycle de remodelage est d'environ 4 mois chez l'adulte, la phase de formation de la matrice osseuse étant plus longue que celle de résorption [3].

I.1.3. Pathologies osseuses

I.1.3.1. Maladie de Paget

La maladie de Paget est un trouble osseux caractérisé par une augmentation récurrente de la résorption osseuse par des ostéoclastes anormaux qui dans le même temps stimulent une hyperactivité des ostéoblastes avec une formation osseuse excessive qui a perdu son ordonnance normale lamellaire entraînant l'affaiblissement et la déformation des os [6].

I.1.3.2. Ostéoporose

L'ostéoporose est une affection osseuse caractérisée par une déminéralisation qui se manifeste par la diminution de la masse et de la densité osseuse et qui se traduit par une fragilisation du squelette, augmentant le risque de fracture.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) considère qu'une personne est atteinte d'ostéoporose si sa densité minérale osseuse est au moins 2,5 écarts-types sous la densité osseuse moyenne des jeunes adultes du même sexe ou si elle présente des preuves radiographiques d'une fracture ostéoporotique et d'une réduction de la densité osseuse dans la région de la fracture [7].

I.1.3.3. Ostéomalacie

C'est une maladie caractérisée par un défaut de minéralisation du tissu pré-osseux et répond à des anomalies physiopathologies, principalement l'hypophosphorémie¹ [6].

I.1.3.4. Fractures osseuses

Les forces importantes appliquées sur les os sont l'origine principale des fractures osseuses qui se traduisent par une perte de masse osseuse. Elles ont dans la plupart des cas pour conséquence une perte de fonctionnement, de mobilité et éventuellement de position des os dans la partie concernée du corps. La possibilité de reconstruction osseuse chez l'homme étant limitée, une perte de masse osseuse nécessite une intervention chirurgicale et son comblement par un substitut osseux (greffon ou os synthétique). Le chirurgien doit donc avoir à sa disposition des matériaux de comblement fiables et efficaces [8].

¹ L'hypophosphorémie est définie par une concentration de phosphore sanguin inférieure à 0,8 mmol/L (soit 2,5 mg/dl de phosphate inorganique).

I.1.4. Nécessité des biomatériaux

Il est bien connu que chez l'homme, les capacités naturelles de réparation de l'os sont limitées surtout pour le traitement des tumeurs, des kystes ou d'infections, qui nécessitent l'utilisation de pièces osseuses de taille trop importante. Alors, le comblement de perte de substance ou la reconstruction osseuse a longtemps nécessité le recours aux autogreffes (prélèvement de tissu sur un individu de la même espèce vivant ou mort). Cependant, l'utilisation des autogreffes pose des problèmes de morbidité², de qualité et de quantité d'os disponible. Aussi, l'indisponibilité des greffons et les risques potentiels de transmission d'agents pathogènes, ont limité l'utilisation des allogreffes (greffes prélevées d'un autre individu) et des xéno-greffes (greffes de cellules ou d'organe animaux) [9]. Donc, les limitations que peuvent représenter ces greffes sont liées à la nécessité d'opérer un deuxième endroit du corps pour prélever le greffon, aux risques de transmission de maladie (SIDA, hépatites,...), d'infections et de rejet. D'où la nécessité d'utiliser des matériaux d'origine synthétique, appelés *biomatériaux* qui présentent comme avantages une disponibilité illimitée et l'absence de risque de transmission de maladies.

Les plus connus sont :

- ❖ Les céramiques au sens large.
- ❖ Les polymères.
- ❖ Les métaux et alliages métalliques.

I.1.4.1. Définition d'un biomatériau

En se référant à la conférence de consensus de Chester³ (1991), un biomatériau est défini ainsi : « un matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle ».

La notion de biocompatibilité (capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique) peut y être associée [10].

²**Morbidité** (sens en Médecine) : Caractéristique qui laisse apparaître des signes de maladie.

³**Conférence de Chester** : organisée par la Société Européenne pour les Biomateriaux, faisant suite à une première conférence de 1986, ayant permis d'arriver à un consensus sur la définition des biomateriaux.

I.1.4.2. 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.

Donc un biomatériau doit [9] [11-13] :

- ✓ **Etre biocompatible**, c'est-à-dire qu'il ne doit pas induire une réaction inflammatoire chronique, ni être immunogénique (induire une réaction immunitaire) ou cytotoxique.
- ✓ **Avoir des propriétés mécaniques adéquates** pour permettre la manipulation du matériau par le chirurgien et être capable, après implantation, de faire face à toutes les sollicitations (poids de la masse humaine, mouvements, etc.).
- ✓ **Avoir une porosité interconnectée** (afin de permettre la vascularisation de l'implant et sa colonisation par les cellules) et **des pores de taille convenable** pour activer la repousse osseuse.
- ✓ **Biorésorbable** : les matériaux implantés sont destinés à disparaître au fur et à mesure que l'os croît, car une résorption trop rapide entraînerait une perte du soutien mécanique et du contact avec le tissu tandis qu'une résorption trop lente aboutirait à une repousse osseuse altérée.

En matière de tissu osseux, un biomatériau peut posséder également les propriétés suivantes :

- **Ostéoconduction** : correspond à la propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire, à partir du tissu osseux receveur au contact du matériau. L'ostéoconduction est en partie dépendante de la taille des pores du biomatériau.
- **Ostéoinduction** : c'est la capacité d'induire la formation osseuse en site extra osseux.
- **Ostéoformation** : correspond à la construction de la matrice osseuse par des cellules ostéoformatrices.
- **Ostéointégration** : elle est liée à la qualité des liaisons que le tissu osseux crée avec le matériau. *In vivo*, l'ostéointégration se déroule en plusieurs étapes et implique l'adhésion des cellules osseuses, en particulier les ostéoblastes, à la surface du matériau implanté. Ainsi, il y a en premier lieu adsorption de molécules biologiques issues des fluides environnants et des sécrétions cellulaires à la surface du substitut. Ces molécules biologiques sont principalement des protéines que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire comme, entre autres, la fibronectine, la vitronectine, l'ostéopontine ou bien le collagène.

Les cellules interagissent et forment des liaisons avec ces protéines via des récepteurs (intégrines) situés sur leur membrane cellulaire.

Les biomatériaux à usage biomédical doivent également avoir des propriétés de bioactivité.

Bioactivité

○ La bioactivité peut être définie comme la propriété d'engendrer des réponses biologiques spécifiques à l'interface implant/tissu receveur, résultant de la formation de liaisons entre les tissus et le matériau. Dans le cas des substituts osseux, la bioactivité est généralement désignée en termes d'ostéointégration qui est régulièrement définie comme la capacité d'un matériau à adhérer à la surface de l'os hôte sans couche de tissu fibreux.

○ La bioactivité est liée à la modification de la surface du matériau avec formation d'une couche d'hydroxyapatite carbonatée suite à la dissolution et à la précipitation des ions et aux réactions d'échanges avec l'environnement physiologique. Le lien formé entre le matériau et le tissu vivant permet la fixation et la stabilisation de l'implant ou la prothèse. Différents degrés de bioactivité peuvent être rencontrés suivant les matériaux en fonction de la vitesse, des mécanismes et de la force de liaison avec les tissus et de l'épaisseur de la couche interfaciale implant/tissu [14-16].

○ La bioactivité est également définie comme la propriété de permettre des réactions chimiques spécifiques à l'interface implant-tissu receveur. Elle dépend directement des propriétés chimiques et physico-chimiques du matériau et s'oppose à la bioinertie (matériaux biocompatibles mais inertes). En matière de tissu osseux, elle représente l'établissement de liaisons chimiques entre l'implant et l'os environnant, mais elle n'implique pas forcément l'existence d'une ostéoconduction, ostéoinduction ou ostéogénèse (ostéoformation) [17].

Donc, après implantation d'un biomatériau dans le corps humain, la surface de l'implant est mise immédiatement en contact avec le fluide physiologique, qui contient de nombreux ions et protéines qui vont ensuite guider l'adhérence des cellules à sa surface.

Le processus se déroulant à l'interface du biomatériau après son implantation dans l'organisme vivant est représenté sur la **figure I.3**.

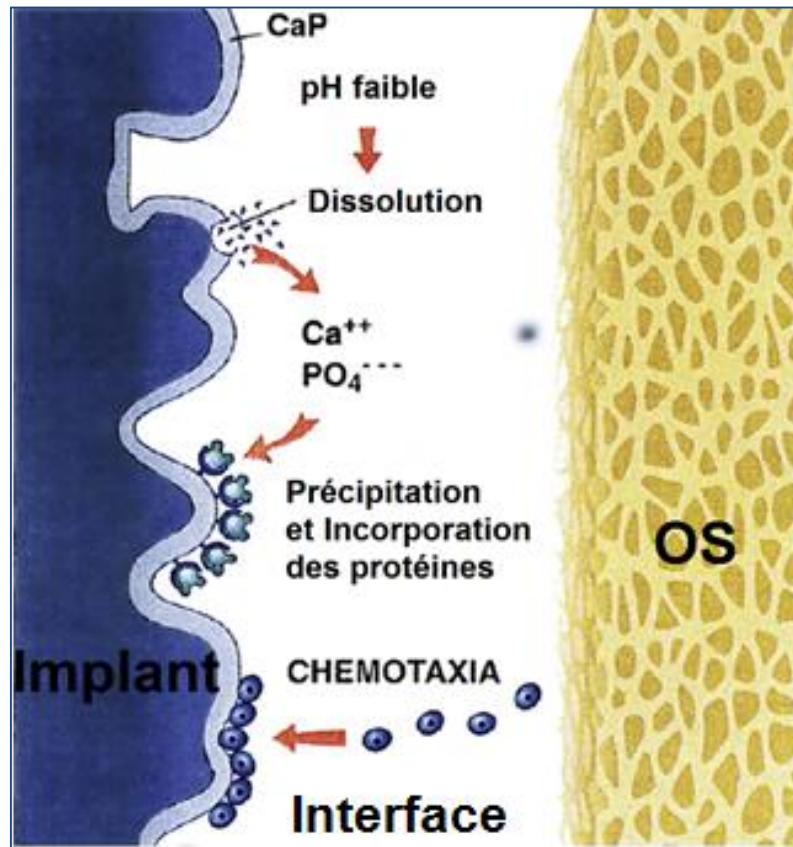


Figure I.3. Représentation schématique du processus se déroulant à l'interface : Implant « Revêtement (CaP) » - Os [18].

La diminution du pH du milieu entraîne la dissolution partielle du revêtement en phosphate de calcium (CaP) et par conséquent la libération des ions de calcium et de phosphate. Les ions sont alors précipités et incorporés sous forme de cristaux d'apatite via la matrice de collagène. L'augmentation des concentrations en ions de calcium et de phosphates incite la chimiotaxie ou chemotaxia (mouvement non orienté d'une cellule ou d'un organisme en réponse à un stimulus chimique) [18].

Si les liaisons implant/tissu ne sont pas fortes le matériau subira une encapsulation fibreuse (formation d'une couche de tissu collagénique par les fibroblastes en surface du matériau). Ainsi, il est important de prendre en compte certaines caractéristiques physico-chimiques de la surface du biomatériau puisqu'elles peuvent influencer l'adhésion cellulaire et l'ostéointégration. Parmi ces caractéristiques [19] :

- La chimie de surface (charge, caractère hydrophile/hydrophobe, énergie de surface).
- La structure (topographie, cristallinité).

I.1.4.3. Domaine d'application des biomatériaux

Le **tableau I.1** montre les différentes applications des biomatériaux dans le biomédical.

Tableau I.1. Domaine d'application des biomatériaux [10].

Domaine	Application
Chirurgie orthopédique	Prothèses articulaires (hanche, coude, genou, poignet), orthèses, ligaments et tendons artificiels, cartilage, matériel de remplacement ou comblement osseux, chirurgie du rachis, réparation de fractures (vis, plaques, clous, broches).
Cardiovasculaire	Valves cardiaques, matériel pour circulation extra-corporelle, coeur artificiel, assistance ventriculaire, stimulateurs cardiaques, prothèses et endoprothèses (<i>stents</i>) vasculaires, matériels pour angioplastie luminale, cathéters.
Chirurgie plastique et reconstructive	Matériaux et implants pour chirurgie esthétique, drains de chirurgie, colles tissulaires, peau artificielle, sutures résorbables.
Odontologie et Stomatologie	Matériaux de restauration, comblement dentaire et osseux, traitements prophylactiques, orthodontie, traitements du parodonte et de la pulpe, implants, reconstruction maxillo-faciale.
Ophthalmologie	Implants, lentilles, coussinets de récupération, produits visqueux de chambre postérieure.
Urologie et Néphrologie	Dialyseurs, poches, cathéters et tubulures pour dialyse, rein artificiel portable, prothèses, matériaux pour traitement de l'incontinence.
Radiologie et imagerie	Produits de contraste, produits pour embolisation, produits pour radiologie interventionnelle.
Applicables à plusieurs domaines	Systèmes de libération contrôlée de médicaments ou de gènes, biocapteurs, encapsulation cellulaire, néo-intestin

I.1.4.4. Cahier des charges d'un biomatériau

Le biomatériau élaboré doit vérifier les critères mentionnés ci-dessous, par *Pierre Mary*. *Collège Hospitalier et Universitaire de Chirurgie pédiatrique* » [20] :

- stérilisable ;
- absence de risque de transmission de maladies infectieuses ou parasitaires ;
- absence de réaction immunitaire ;
- pas de toxicité du produit d'origine et de ses produits de dégradation ;
- fabrication et stockage faciles ;
- moindre coût

I.1.4.5. Classifications des biomatériaux

a) Métaux et alliages métalliques

Ils sont les premiers à avoir été utilisés pour faire des implants. L'acier inoxydable est largement utilisé en chirurgie orthopédique, son intérêt réside dans ses propriétés mécaniques. Le titane est très utilisé en chirurgie orthopédique et pour réaliser des implants dentaires. L'un des avantages principaux du titane est sa bonne biocompatibilité : l'os adhère spontanément au titane. On utilise également des alliages à base de cobalt-chrome-molybdène, ou encore des métaux nobles (tantale, or, palladium, etc).

Les inconvénients limitant l'utilisation des métaux et alliages métalliques en tant que biomatériaux sont liés à la corrosion électrochimique et à l'adaptation des propriétés mécaniques [21] et principalement au manque des propriétés bioactives. Aussi, le coût élevé des métaux nobles rend leur utilisation de plus en plus rare.

b) Polymères

On peut distinguer les polymères fonctionnels susceptibles d'avoir une fonction chimique particulière à l'interface matériau-tissu vivant et les polymères résorbables tels que les copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique utilisables en chirurgie orthopédique et traumatologique. Cependant, ces matériaux souffrent de certaines limitations telles que : instabilité au rayonnement gamma, réactivité à certains types de médicaments, risques liés aux additifs aux composants de bas poids moléculaire, aux produits de dégradation *in vivo*, aux produits résiduels de stérilisation, manque de mesures de dégradation et de biorésorption, effets biologiques des produits de dégradation, etc. [21].

c) Céramiques

Grace à leurs caractéristiques spécifiques, les céramiques se sont rapidement imposées comme matériaux de comblement osseux. Les céramiques se caractérisent par une température de fusion élevée et un comportement fragile qui déterminent leurs domaines d'applications. Les plus connues sont les deux céramiques bioinertes : l'alumine et la zircone qui représentent des propriétés mécaniques intéressantes.

Il faut également signaler l'utilisation et le développement des céramiques à base de phosphates de calcium. La composition chimique des céramiques phospho-calciques (CaP) est très proche de celle de la matrice minérale de l'os. Ces matériaux bioactifs sont utilisés pour la répartition ou le remplacement des tissus osseux. Ils présentent une parfaite biocompatibilité avec la formation rapide d'un lien biologique entre la céramique et le tissu osseux. On peut citer particulièrement, les deux céramiques phosphocalciques : **L'hydroxyapatite (HAP)** et le **phosphate tricalcique TCP** qui ont l'avantage d'être ostéoconducteurs, ils favorisent la repousse osseuse au contact et la colonisation par l'os. La résistance à la fracture et la mesure et le contrôle de la biorésorption sont parmi les principaux problèmes que représentent les céramiques [21].

I.1.5. Hydroxyapatite

Parmi les biomatériaux les plus utilisés en médecine on trouve l'hydroxyapatite (HAP). Le choix de l'hydroxyapatite est basé sur la similarité de sa composition chimique à l'os. L'hydroxyapatite est le matériau céramique le plus adéquat pour la construction du tissu osseux grâce à ses excellentes propriétés de biocompatibilité, en plus d'être bioactif en surface. Cependant, les applications médicales de HAP sous forme de poudres ou à l'état massif sont limitées à cause de ses faibles propriétés mécaniques. HAP est alors utilisée comme revêtement (couches de l'ordre de quelques microns) à la surface d'implants métalliques (acier ou titane et leurs alliages) afin d'assurer l'apport mécanique du métal d'une part et d'autre part protéger le milieu vivant, une fois implanté, des risques de libération des ions métalliques.

Compte tenu de son excellente bioactivité, HAP favorise le développement du tissu naturel osseux sur le dispositif prothétique par la formation d'une fine couche d'os attachée à l'os pré-existant. Ceci a amené à qualifier ce matériau de « bioactif » ou en d'autres termes de « bone bonding », à la vue de ses propriétés de créer des ponts avec le tissu osseux [22].

Dans ce travail, l'hydroxyapatite élaborée est sous forme de poudres et disques.

I.1.5.1. Structure de l'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est une espèce minérale de la famille des phosphates de calcium, décrite par la formule chimique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ qui représente la maille élémentaire de l'hydroxyapatite. En général, HAP cristallise dans le système hexagonal, $P6_3/m$, ses paramètres de maille sont : $a = b = 9.432 \text{ \AA}$ et $c = 6.881 \text{ \AA}$. Elle peut aussi avoir une structure monoclinique.

La projection de la cellule élémentaire de l'hydroxyapatite dans le plan de base (001) est présentée sur la **figure I.4**.

La structure cristallographique de HAP consiste en un empilement de groupements phosphate qui forment deux types de tunnels parallèles à l'axe c .

Le premier coïncide avec l'axe ternaire de la structure. Ces tunnels sont occupés par des ions calcium notés Ca(I).

Le second type de tunnel, dont l'axe coïncide avec l'axe sénaire hélicoïdal du réseau, est bordé par des atomes d'oxygène et les autres ions calcium, notés Ca(II), et est occupé par les ions OH^- [23, 24].

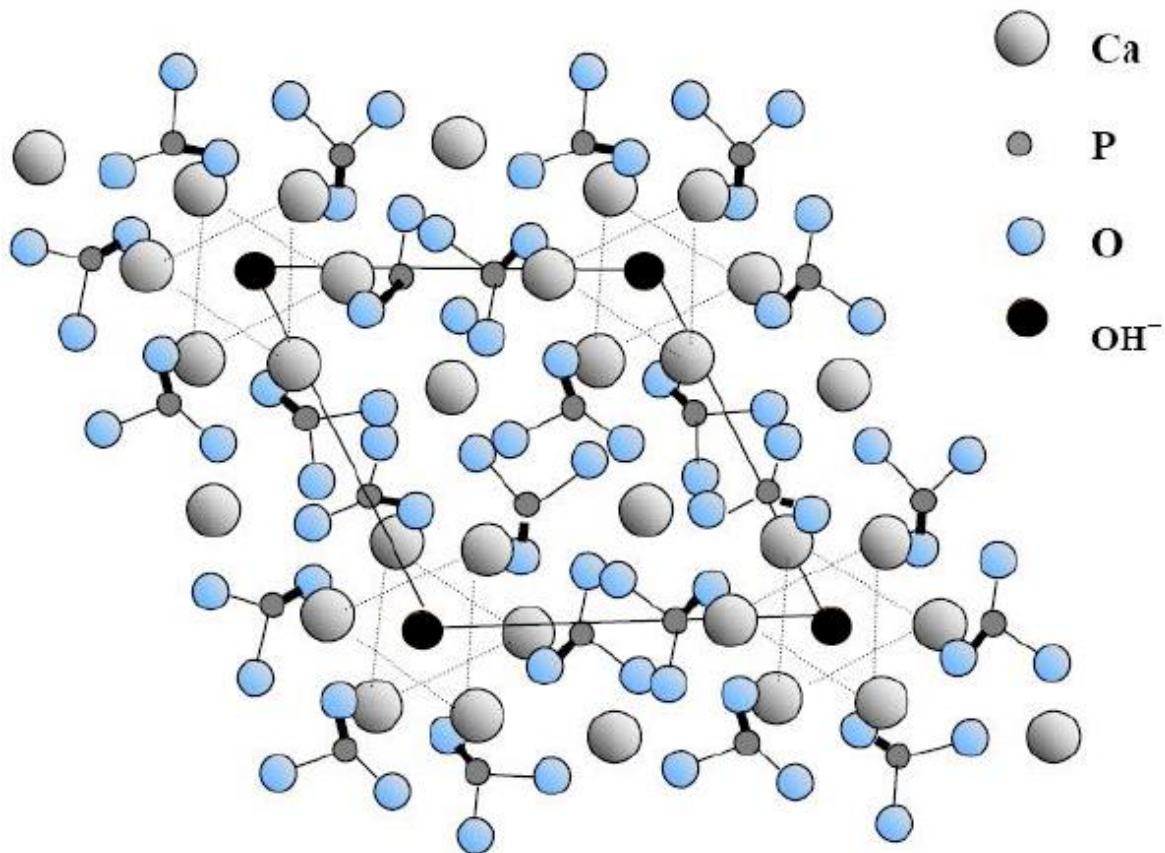


Figure I.4. Projection dans le plan de base (001) de la cellule élémentaire de l'hydroxyapatite [25].

I.1.5.2. Méthodes de synthèses de l'hydroxyapatite

En raison des nombreuses applications de l'hydroxyapatite, plusieurs méthodes de synthèse ont été mises en œuvre, elles s'opèrent soit par voie sèche où les précurseurs sont mélangés à l'état solide, soit en milieu humide en utilisant des réactifs en solution.

a) Synthèse par co-précipitation

Le principe général de cette méthode est d'ajouter goutte à goutte ou d'un seul coup un réactif en phase aqueuse à l'autre réactif en phase aqueuse avant de laisser le mélange, mis au pH voulu, sous agitation à une température comprise entre 25°C et 100°C généralement pendant un temps variant de 5h à 24h. Les réactifs communément utilisés peuvent être de deux types :

1- Dans le cas d'une neutralisation directe $Ca(OH)_2$ et H_3PO_4 sont les réactifs privilégiés et ce choix présente l'avantage de ne pas laisser de contre-ions résiduels [26]. En revanche, les HAP résultantes sont souvent assez carbonatées ce qui peut rendre complexe l'évaluation de leur réactivité basique.

2- Dans le cas d'une double décomposition par précipitation continue on utilisera plutôt $Ca(NO_3)_2$ [27] et $(NH_4)_2HPO_4$ [28] ou $(NH_4)H_2PO_4$ car bien qu'il soit possible de trouver des traces de nitrates d'ions ammonium dans les HAP finales, ces ions sont facilement éliminés par le chauffage [29].

L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans les risques d'irreproductibilité surtout en terme de stœchiométrie. En effet, le nombre de paramètre à contrôler avec précision est plus important pour cette méthode que pour les autres (pH, vitesse d'ajout, température de synthèse, réactifs de départ, vitesse d'agitation, etc.). Mais cette versatilité est aussi l'avantage principal de cette technique puisqu'il est possible de faire varier un à un ces paramètres pour étudier leur impact sur le matériau final en termes de morphologie, stœchiométrie ou d'activité catalytique et donc d'obtenir une variété d'échantillons [30].

b) Synthèse par voie hydrothermale

La méthode hydrothermale repose sur le mélange direct des réactifs qui sont mis sous pression dans un autoclave à une température donnée. La variété des précurseurs utilisés dans cette méthode est assez importante : pour le précurseur calcium, on retrouve ceux utilisés classiquement pour la méthode de co-précipitation, $Ca(NO_3)_2$ et $Ca(OH)_2$ [31-34] mais également des précurseurs moins usuels tels que $CaCO_3$ [35] ou un mélange de

précurseurs phosphate et calcium : $Ca(H_2PO_4)_2$ ou $CaHPO_4$ qui jouent le rôle de source de calcium et de phosphore [29].

Cette méthode a pour avantage d'être simple à mettre en place mais nécessite des temps de synthèse assez longs (plusieurs jours) pour obtenir des HAP purs. Néanmoins elle permet d'obtenir de manière assez reproductible des particules de formes relativement homogènes [31][36].

c) Synthèse par voie solide

Cette méthode se distingue des autres car elle ne fait pas partie des méthodes de synthèse par voie humide mais par voie sèche. Le principe repose sur la calcination, généralement entre 900°C et 1100°C de réactifs solides en quantités stœchiométriques [26]. Les précurseurs utilisés peuvent être un mélange des carbonates de calcium et de TCP ou de TCP et de $Ca(OH)_2$. Pour l'obtention d'une HAP pure, cette méthode n'est pas nécessairement idéale car elle demande beaucoup d'énergie (très haute température), mais elle permet en revanche d'obtenir assez facilement des composés biphasiques type TCP/HAP ou HAP/CaO avec des ratios Ca/P > 1.67 [37].

d) Synthèse par voie sol-gel

L'hydroxyapatite que nous avons utilisée aux cours de nos essais expérimentaux, est préparée par la méthode sol-gel.

Dans le cas de la synthèse de HAP par la méthode sol-gel, le vieillissement de la solution est un facteur très important. La préparation de HAP par cette méthode utilise des températures très proches de la température ambiante, elle est donc économe en énergie. Elle possède aussi l'avantage de permettre un mélange des précurseurs, calcium et phosphore, au niveau moléculaire engendrant ainsi une augmentation de l'homogénéité de HAP finale [38].

Le procédé sol-gel est basé sur la polymérisation de précurseurs organométalliques de type alcoxydes $M(OR)_n$. Après une hydrolyse contrôlée de ces alcoxydes en solution, la condensation des monomères conduit à des ponts oxo puis à un oxyde organique. La polymérisation progressive de ces précurseurs forme des oligomères puis des polymères en augmentant ainsi la viscosité. Ces solutions polymères conduisent à des gels qui permettent une mise en forme aisée des matériaux (films denses et transparents, poudres ultrafines, céramiques, etc.) avec de nombreuses applications technologiques [29].

I.2. Modification de HAP par un composé biologique, la gélatine : Effet sur la bioactivité.

Le collagène est présent dans toutes les matrices extracellulaires, c'est pourquoi des chercheurs tentent de reproduire sa structure en fabriquant des matériaux à base de gélatine car le collagène est très difficile à extraire à grande échelle, en plus, une fois stérilisé, il se dénature et se transforme en gélatine (forme dénaturée du collagène).

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'ajout de la gélatine sur la structure de l'hydroxyapatite et sa propriété de bioactivité.

I.2.1. Généralités sur la gélatine

La gélatine est un composé d'origine biologique, c'est une protéine qui est utilisée dans de nombreux domaines. Dans le domaine pharmaceutique, elle sert à confectionner l'enrobage de nombreux médicaments (capsules molles et dures, gélules, comprimés, etc.) ainsi que des éponges hémostatiques⁴. Elle est encore utilisée en photographie pour réaliser des films ultrasensibles (film radiographique) ou du papier photo brillant. La gélatine entre aussi dans la composition d'un grand nombre de produits alimentaires et dans la composition de nombreux produits cosmétiques, jouant à la fois le rôle de texturant et de principe actif. Cette utilisation de la gélatine dans des proportions importantes s'explique par son faible prix, sa facilité d'extraction à une échelle industrielle et sa forte abondance naturelle. En effet, la gélatine est le produit de dégradation thermique du collagène. C'est d'ailleurs sa ressemblance avec le collagène qui est à l'origine de sa forte popularité dans le domaine des biomatériaux [39]. Sachant que la gélatine est extraite à partir de tissus riches en collagène, le terme « gélatine » reste ambigu et peut désigner deux types d'objets :

- La forme dénaturée d'une triple hélice de collagène. Il s'agit alors uniquement d'une modification de la conformation du collagène sans altération de sa séquence.
- Le produit de la dégradation de tissus riche en collagène par des traitements chimiques et thermiques. Il s'agit ici de la gélatine commerciale, utilisée quotidiennement dans de nombreux foyers [40].

⁴ **Les éponges hémostatiques** sont divers types d'éponges synthétiques, stériles, résorbables par l'organisme. Elles sont composées de matériaux d'origine biologique : collagène d'origine bovine. Elles visent à stopper des saignements mineurs et favoriser la cicatrisation.

I.2.2. Procédé d'extraction industrielle de la gélatine

La gélatine est extraite à partir de tissus riches en collagène : l'os (bœuf) et la peau (porc, bœuf). Ces tissus sont, en majorité, des déchets provenant d'abattoirs. Les procédés d'extraction diffèrent en fonction du tissu et de l'âge de la bête abattue [41,42] (figure I.5).

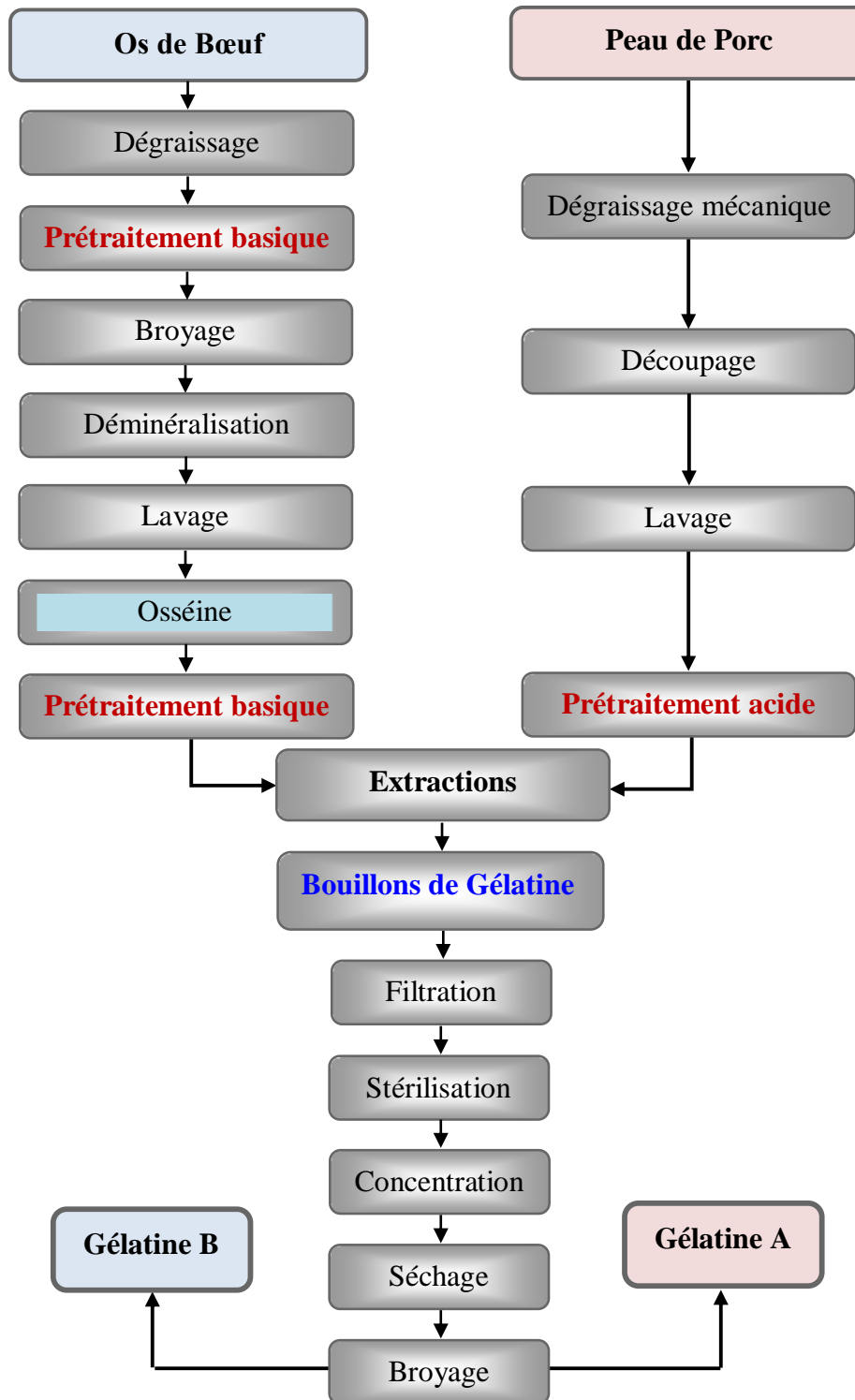


Figure I.5. Procédé industriel d'extraction de la gélatine [40].

I.2.3. Structure et composition de la gélatine

Comme nous l'avons déjà mentionné au début de ce chapitre, le collagène qui représente environ 95% de la partie organique du tissu osseux est constitué de protéines présentant une séquence peptidique caractéristique. Il s'agit de la répétition d'un triplé « Gly-X-Y » avec (Gly : glycine ; X et Y sont des acides aminés aléatoires) capable de s'associer avec deux autres chaînes pour former une triple hélice. D'après ce modèle, les résidus glycines sont enfouis au centre de la triple hélice (voir **figure I.6**) [43].

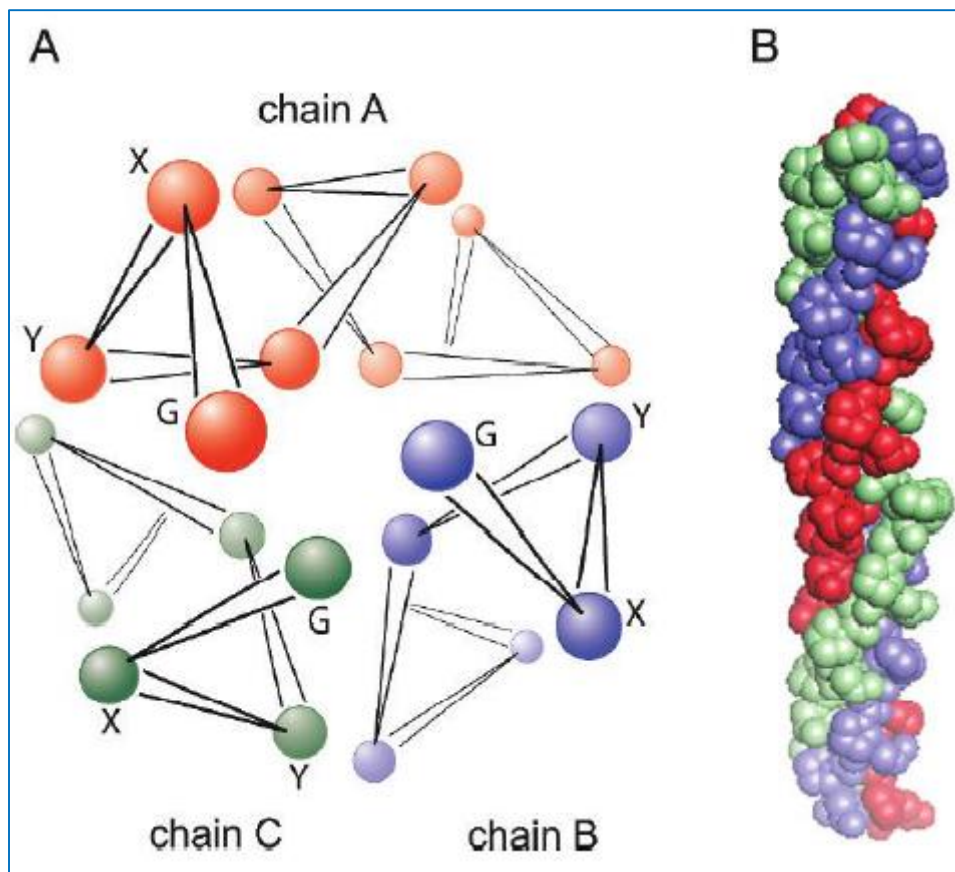


Figure I.6. Structure en triple hélice du collagène. (A) Vue axiale de l'hélice. (B) Vue de côté du modèle compact de la triple hélice droite de collagène [43].

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 (**figure I.7**) [44,45].

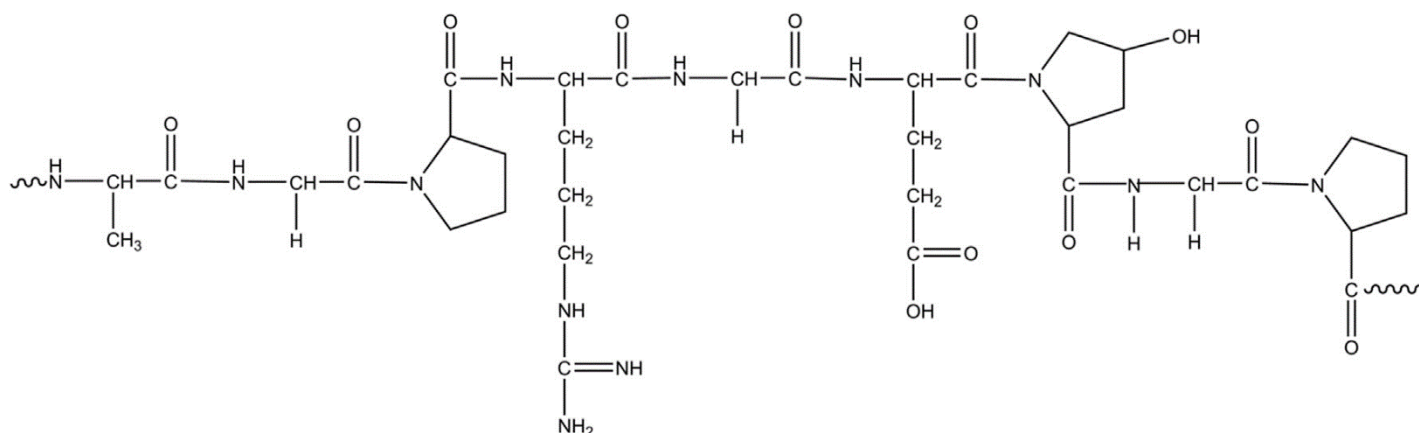


Figure I.7. Structure chimique de base de la gélatine [44].

I.2.4. Caractéristiques de la gélatine

La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Elle est soluble dans l'eau chaude que dans l'eau froide. 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. Le système ainsi obtenu est une solution de gélatine à l'état sol. Si l'on refroidit la solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place. Le comportement physicochimique de la gélatine est principalement déterminé par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, sa distribution en masses moléculaires, ainsi que par les conditions du milieu (pH, force ionique et réaction avec d'autres composés) [46].

Les propriétés de la gélatine sont divisées en 2 groupes [46] :

- 1- Le premier groupe associé aux 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.
- 2- Le second groupe est lié aux propriétés de surface de la gélatine, 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.

Tableau I.2. Quelques propriétés physiques de la gélatine [46].

Propriété	Gélatine (Bovin)	Gélatine (Porc)
Température de gélification (°C)	24 - 25	19 - 23.9
Point de fusion (°C)	29 - 33	31 - 36
Point isoélectrique (pH)	4 - 5	7 - 9
Force de gel (gramme)	210 - 239	216 - 295

I.3. Modification de HAP par des ions métalliques, Ag⁺ et Zn²⁺ : Effet sur l'activité bactérienne.

Le control et la prévention des risques d'infection lors de l'implantation d'un biomatériau sont primordiaux d'autant plus avec la propagation de l'antibiorésistance⁵ qui représente un problème majeur de santé publique. C'est pourquoi des matériaux biocéramiques de substitution en phosphates de calcium qui ont la particularité de pouvoir accepter des substitutions ioniques dans leur réseau structural, sont dopés avec différents agents antibactériens.

Dans ce contexte, nous avons testé dans ce travail la réponse microbiologique de l'hydroxyapatite sous forme de poudres dopées avec des ions métalliques de **zinc (Zn²⁺)** et d'**argent (Ag⁺)**. Ces éléments sont choisis pour leurs célèbres propriétés antimicrobiennes et pour leur disponibilité. Pour évaluer l'activité des poudres, celles-ci sont mises en contact de souches d'intérêt clinique : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*.

I.3.1. Agents antimicrobiens métalliques

Une attention spéciale a été accordée aux ions métalliques ayant des propriétés antibactériennes, tels que Cu²⁺, Ag⁺, Zn²⁺. Des études ont démontré que le dopage de l'hydroxyapatite avec différents ions métalliques entraîne la modification des paramètres du réseau cristallin, de la cristallinité et aussi d'autres propriétés physiques [47-53]. De plus, les ions métalliques sont connus pour accélérer et améliorer les actions de médicaments et leur efficacité contre les pathogènes résistants [54,55].

I.3.1.1. Zinc

Le zinc est un métal qui a un rôle essentiel pour le bon fonctionnement de l'organisme humain, plus spécialement du tissu osseux et du plasma. Il est un composant chimique non-protéique nécessaire pour l'activité biologique des enzymes et contribue au métabolisme des protéines et des lipides [47][56-62]. Presque 30% de la quantité totale de zinc du corps humain se trouve dans le tissu osseux, il est nécessaire pour la maintenance de la densité

⁵ L'**antibiorésistance** est le phénomène qui consiste, pour une bactérie, à devenir résistante aux antibiotiques.

minérale osseuse et du métabolisme osseux. Le manque du zinc cause une sensibilité élevée aux infections. En plus, chaque étape du métabolisme du tissu osseux implique l'action du zinc, et une absence de celui-ci provoque l'ostéoporose [47][59][63-64]. Par conséquent, le dopage de HAP avec des ions de Zn^{2+} pourrait donc conduire à l'amélioration des propriétés de l'hydroxyapatite.

I.3.1.2. Argent

On dit que « l'argent ne fait pas le bonheur des bactéries ». En effet, pour faire face à une importante résistance bactérienne contre les antibiotiques, l'argent et ses composés, historiquement bien connus pour leur effet antimicrobien, sont de nouveau au centre des nouvelles recherches et de développements pour combattre et prévenir les infections associées aux implants [65,66].

Le plus grand avantage de l'argent réside dans son mode d'action multidirectionnel contre les microbes. En effet, les ions d'argent (Ag^+) interfèrent en tant qu'agent antimicrobien en interagissant avec la membrane cellulaire bactérienne, en altérant le transport d'électrons et en se liant à l'ADN [66]. Contrairement aux antibiotiques à cible unique, le développement de la résistance est donc plus difficile et nécessite plusieurs mutations séquentielles dans la cellule bactérienne. Des études ont montré que les ions d'argent (Ag^+) à faibles concentrations sont toxiques contre les micro-organismes alors qu'ils ne le sont pour nos cellules qu'à de fortes concentrations [67].

I.3.2. Contact implant-microorganisme

Dès son insertion dans son environnement biologique, l'implant a pour première conséquence la destruction des tissus qui se soldent par la rupture de la barrière physique naturelle protectrice qui permet donc aux bactéries de proliférer.

Les agents étiologiques les plus fréquemment rencontrés sont le *staphylococcus epidermidis* et le *staphylococcus aureus*. Les staphylocoques sont responsables de nombreuses infections et sont les espèces prédominantes pour la formation de biofilm sur les implants représentant 50 à 70% des infections [68].

I.3.2.1. *Staphylococcus aureus* « *S. aureus* »

Staphylococcus aureus connu aussi sous le nom de *Staphylococcus doré* est une bactérie à la fois commensale et pathogène opportuniste. Cette espèce bactérienne peut coloniser l'humain aussi bien que plusieurs espèces animales. Chez l'homme, on peut les retrouver au niveau du nez, des aisselles ou encore dans le système gastro-intestinal. *Staphylococcus aureus* est le staphylocoque le plus virulent en raison de ses nombreux facteurs de virulence. Lorsque l'opportunité se présente, cette espèce de staphylocoque peut causer diverses infections telles des endocardites, ostéomyélites, infections de la peau, pneumonies, et intoxications alimentaires.

Staphylococcus aureus est un coque à Gram positif non sporulant de la famille des *Staphylococcaceae*. Il peut, en comparaison à d'autres staphylocoques d'intérêt clinique, produire une enzyme de type Dnase [69-75].

I.3.2.2. *Escherichia coli* « *E. coli* »

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* ou encore *Shigella* appartiennent également à cette famille. Ce sont des bacilles à gram négatif, aéroanaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates et qui ne possèdent pas d'oxyde. Le genre *Escherichia* regroupe cinq espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris* chaque espèce d'E possède des caractéristiques biochimiques particulières, permettant de les différencier.

Escherichia coli fait partie de la microflore commensale intestinale de l'homme et de nombreux animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Il représente ainsi près de 80% de la microflore aérobie [76-78].

I.3.2.3. *Candida albicans* « *C. albicans* »

Les levures du genre *Candida* sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez les patients immunodéprimées. Parmi le genre *Candida*, 54,3% des infections sont dues à l'espèce *albicans*. Le *Candida albicans* est un champignon présent dans l'organisme (au niveau des voies génitales et du tube digestif, dans la bouche et sur la peau). C'est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnement multilatéraux d'une cellule mère (le blastopore) formant ainsi des

colonies blanches crémeuses. Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 μm , et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in-vitro* et *in-vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* [79-84].

CHAPITRE II

MATERIEL & METHODES

Ce chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés durant notre travail qui consiste à étudier la bioactivité d'une biocéramique pure (HAP) et biocomposite (hydroxyapatite-gélatine (HG)) dans une solution physiologique simulée (SBF). Les poudres de HAP sont ensuite dopées avec des ions métalliques qui ont pour rôle d'agir comme agents antibactériens. Pour cela, nous avons opté pour les deux éléments métalliques Ag et Zn. L'hydroxyapatite étudiée dans ce travail est synthétisée par voie sol-gel.

II.1. PROCEDURE EXPERIMENTALE

II.1.1. Elaboration des matériaux

II.1.1.1. Préparation de la solution sol-gel CaP (HAP)

On fait dissoudre une quantité de nitrate de calcium tétra-hydraté $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ (Sigma Aldrich 99%) de concentration 1.67 mol/L dans 100 mL d'éthanol absolu.

De la même manière, on fait dissoudre une quantité de pentoxyde phosphorique P_2O_5 (Sigma Aldrich 97%) de concentration 0.5 mol/L dans le même volume d'éthanol absolu (100 mL). Le rapport molaire Ca/P doit être égal à 1.67. Les deux solutions sont portées sous agitation à température ambiante puis mélangées et la solution formée est laissée sous agitation pendant 24h. Une fois l'agitation est arrêtée, on laisse vieillir la solution « sol » obtenue pendant 24h à température ambiante pour prise en masse « processus de gélification ».

II.1.1.2. Préparation des matériaux pour l'étude de la bioactivité

a) Préparation des poudres de HAP pure

Après vieillissement, la solution sol-gel de HAP est séchée dans l'étuve à 80°C puis calcinée dans un four sous air à des températures de 500°C durant 1h, 600°C durant 1h et 6h et 900°C durant 3h à un pas de 2°C/min.

b) Préparation des poudres de HAP biocomposite : HAP- gélatine

On fait dissoudre 5g de gélatine en poudre issue de la peau du porc (Microbiologie, Fluka Analytical) dans un volume de 100 mL d'eau distillée chauffée à une température de 40°C sous agitation jusqu'à dissolution complète de la gélatine.

On mélange des quantités de la solution sol-gel de HAP avec différentes quantités de la solution de gélatine (10%, 30% et 50% en pourcentage volumique). Les mélanges sont agités puis laissés au repos à température ambiante pendant 24h.

Les solutions ainsi vieillies sont alors séchées dans l'étuve à 80°C pendant 24h. Les gels séchés obtenus sont ensuite calcinés à une température de 500°C sous air atmosphérique pendant 60 min à un pas 2°C/min. La **figure II.1** résume le principe d'élaboration des poudres des biocomposites (HAP-gélatine).

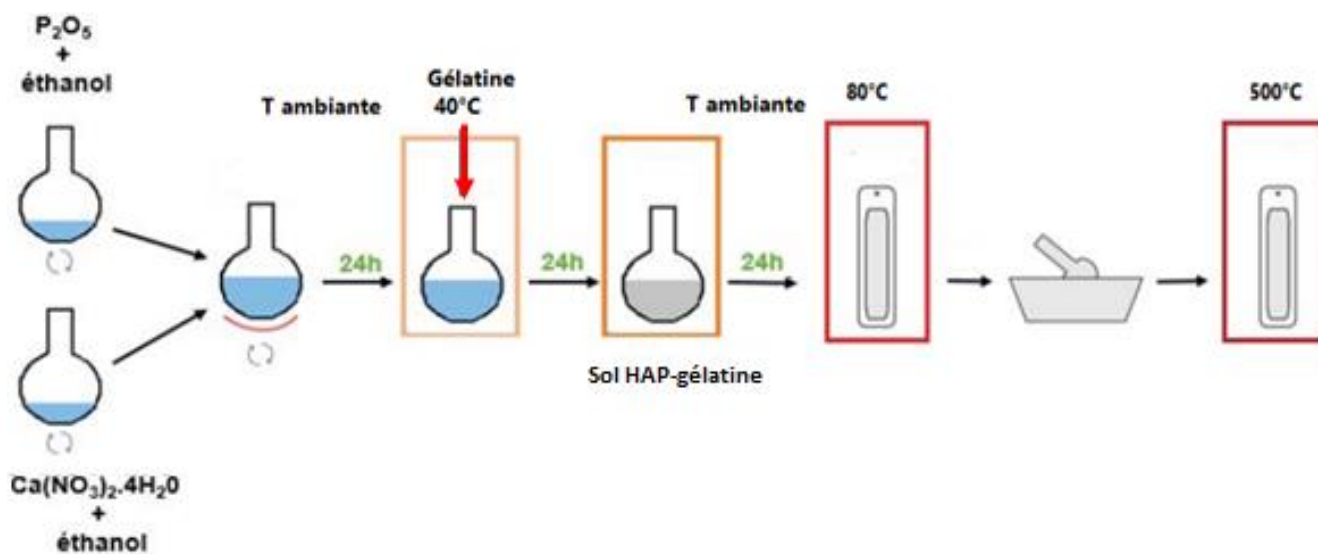


Figure II.1. Protocole de synthèse des poudres des biocomposites : HAP-gélatine.

c) Mise en forme des matériaux : préparation des pastilles

Pour la préparation des disques pour l'étude de la bioactivité, on dépose d'abord la poudre dans un moule à pastilles, soit une masse de 0.3 à 0.4g pour chaque échantillon (HAP pure calcinée à différentes températures et HAP-gélatine à différents pourcentages) puis la masse est mise sous pression sous vide pendant 2 à 4 minutes dans une presse hydraulique de laboratoire (Thermo Fisher). Les pastilles ainsi produites (**tableaux II.1**) sont d'un diamètre de 14 mm (3 pastilles pour chaque échantillon).

Tableau II.1. Pastilles formées à partir des poudres des biocomposites (HAP-gélatine).

Ordre	Pastille	Composition
1	HAP/G-0%	100% de HAP + 0% de gélatine
2	HAP/G-10%	90% de HAP + 10% de gélatine
3	HAP/G-30%	70% de HAP + 30% de gélatine
4	HAP/G-50%	50% de HAP + 50% de gélatine

Pour l'élaboration du scaffold, on mélange 50% en masse de gélatine poudre avec 50% en masse de chaque poudre composite de HAP/gélatine dans un broyeur à mortier automatique (RM 200) où elles sont broyées pendant 20 minutes afin de bien homogénéiser le mélange. Le scaffold est préparé sous forme de pastille de la même manière précédente puis les pastilles sont calcinées sous air atmosphérique à une température de 200°C à un pas de 2°C/min pendant 20 min (tableaux II.2).

Tableau II.2. Pastilles représentatives du scaffold.

Ordre	Pastilles	Composition
1	HG0/G-50%	50% de HAP pure + 50% de gélatine
2	HG10/G-50%	50% de HAP/G-10% + 50% de gélatine
3	HG30/G-50%	50% de HAP/G-30% + 50% de gélatine
4	HG50/G-50%	50% de HAP/G-50% + 50% de gélatine

La **figure II.2** montre des photographies des différentes pastilles obtenues à partir des poudres des biocomposite (HAP-gélatine).

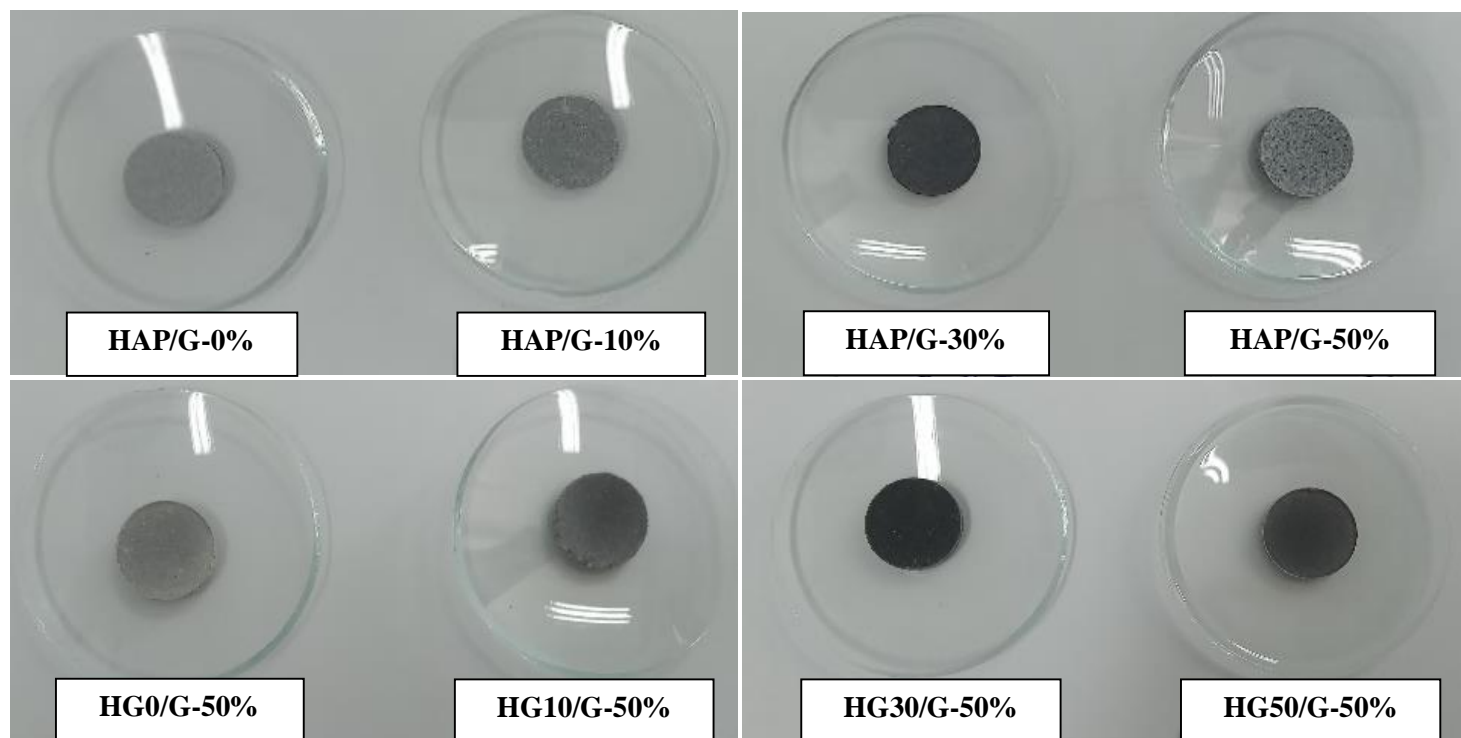


Figure II.2. Images des pastilles HAP-gélatine.

II.1.1.3. Préparation des poudres d'hydroxyapatite dopée avec différentes concentrations métalliques

On fait dissoudre une quantité de pentoxyde phosphorique dans six erlenmeyers de même volume d'éthanol et on les met sous agitation pendant 24h. La concentration de cette solution est 0.5 mol/L. On prépare 6 solutions de nitrate de calcium dans un même volume d'éthanol puis on rajoute dans chaque solution une quantité de nitrate d'argent ($AgNO_3$, BIOCHEM Chemopharma 99.92 %), une quantité de nitrate de zinc ($Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$, BIOCHEM Chemopharma 98%) et une quantité de nitrate d'argent et de nitrate de zinc de manière à garder le rapport molaire « (Ca+M)/P » constant et égal à 1.67 (M étant le métal : Ag, Zn ou (Ag+Zn)). Les concentrations des solutions en éléments dopants (Ag, Zn et (Ag+Zn)) sont fixées chacune à 100 et 10000 ppm (ces valeurs sont choisies en se basant sur les données de la littérature). Après avoir introduit ces solutions (Ca-Ag, Ca-Zn et Ca-(Ag+Zn)) dans celles du phosphore, les six mélanges sont portés sous agitation pendant un temps de 24h, à température ambiante. Les solutions obtenues sont ensuite séchées à 150°C pendant 24h puis calcinées à 600°C sous air atmosphérique pendant 1h à un pas de 3°C/min.

Les 6 poudres obtenues ((HAP-Ag (100 et 10000 ppm), (HAP-Zn (100 et 10000 ppm) et (HAP-(Ag+Zn) (100 et 10000 ppm)) sont broyées à l'aide du broyeur à mortier automatique jusqu'à obtention d'une poudre homogène avec une fine texture.

La **figure II.3** montre des photos prises sur la poudre de HAP pure, les poudres de HAP dopée avec les éléments métalliques à une concentration de 10000 ppm.



Figure II.3. Images des poudres de HAP dopée et co-dopée avec Ag et Zn à 10000 ppm.

II.1.2. Test de bioactivité

II.1.2.1. Préparation de la solution (SBF)

Le fluide physiologique simulé (*Simulated Body Fluid*, SBF) représente la partie minérale du plasma humain. La solution SBF contient les mêmes ions aux mêmes concentrations que le plasma réel. Bien qu'il existe d'autres milieux physiologiques (*phosphate buffered saline*, PBS, *Minimum Essential Medium-Eagle*, MEM, etc.) on a choisi ce milieu car c'est la solution d'immersion la plus utilisée pour l'étude de la bioactivité des biomatériaux. En effet, il contient les éléments nécessaires à la réactivité de nos échantillons à base d'hydroxyapatite et donc la possibilité de provoquer la formation d'une couche de phosphates de calcium à leur surface.

Le pH et la température du milieu sont égaux à ceux du plasma humain. La solution est préparée à une température d'environ 37°C et un pH qui varie de 7.38 à 7.45 en utilisant la formulation de Kokubo [85].

Les réactifs utilisés pour la préparation d'un litre de solution SBF sont listés par ordre de dissolution dans le **tableau II.3** ci-dessous. Les réactifs sont dissous un par un suivant l'ordre indiqué dans le tableau. La solution est tamponnée par le trishydroxyméthyl aminométhane. Le pH de la solution est ajusté avec du chlorure d'hydrogène (HCl) ajouté goutte à goutte jusqu'à atteindre une valeur variante de 7.38 à 7.44.

La solution préparée est bien scellée et stockée à une température de 4°C afin d'éviter la précipitation des sels.

Tableau II.3. Réactifs utilisés pour la préparation d'un litre de solution SBF à 37°C.

Ordre	Réactifs par ordre de dissolution	Quantité (g)
1	Chlorure de sodium NaCl	7.996
2	Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO ₃	0.350
3	Chlorure de potassium KCl	0.224
4	Hydrogénophosphate de potassium trihydraté K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.228
5	Chlorure de magnésium hydraté MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.305
6	Chlorure de calcium CaCl ₂	0.278
7	Sulfate de sodium Na ₂ SO ₄	0.071
8	Tris (Tris-hydroxyméthylamino-méthane) (CH ₂ OH) ₃ CNH	6.057
9	Acide chlorhydrique HCl pour ajuster le pH	pH = 7.44

II.1.2.2. Incubation des pastilles dans la solution SBF

On met les pastilles dans des flacons contenant un volume de la solution SBF (30 mL pour les pastilles de HAP composite et 40 mL pour les pastilles de HAP pure calcinée à différents temps et températures). Les flacons sont placés dans l'incubateur (MaxQ 4000 Thermo Scientific TM). La vitesse d'agitation est réglée à 60 tours/min et la température d'incubation est aux environs de 37°C. Les prélèvements sont réalisés après 3, 7, 14 et 21 jours.



Figure II.4. Agitateur-Incubateur

II.1.3. Test microbiologique

II.1.3.1. Préparation de la suspension bactérienne

Mettre de l'eau physiologique stérile dans un tube à essai, prélever les colonies pures avec une anse de platine stérile puis les transférer dans l'eau stérile. On utilise un vortex pour bien mélanger les tubes et homogénéiser la suspension. La densité de la suspension bactérienne est estimée à 10^6 cellules.

Les 3 souches testées sont : *Candida albicans* (ATCC 1024), *Escherichia coli* (ATCC 25922) à Gram négatif, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) à Gram positif.

II.1.3.2. Ensemencement des bactéries

On verse la gélose de Mueller-Hinton dont la composition est représentée dans le tableau A1 (Annexe) dans des boîtes de Pétri, l'épaisseur de la couche doit être de 4 mm. Une fois la solution est solidifiée, on prend un écouvillon, on l'imbibe avec la suspension bactérienne de chaque souche et on fait une série de stries sur toute la surface de la gélose. On tourne la boîte de Pétri d'un quart et on refait l'ensemencement dans les trois directions pour avoir un tapis bactérien sur toute la surface. On dépose alors une quantité (0,05g) de chaque poudre (HAP, HAP-Ag, HAP-Zn et HAP-(Ag+Zn) à 100 et à 10000 ppm) dans les 4 quarts de la boîte en formant des petits cercles (**figure II.5**).

Toutes les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24h dans l'étuve à une température de 37°C. Pour chaque souche le test est répété trois fois.

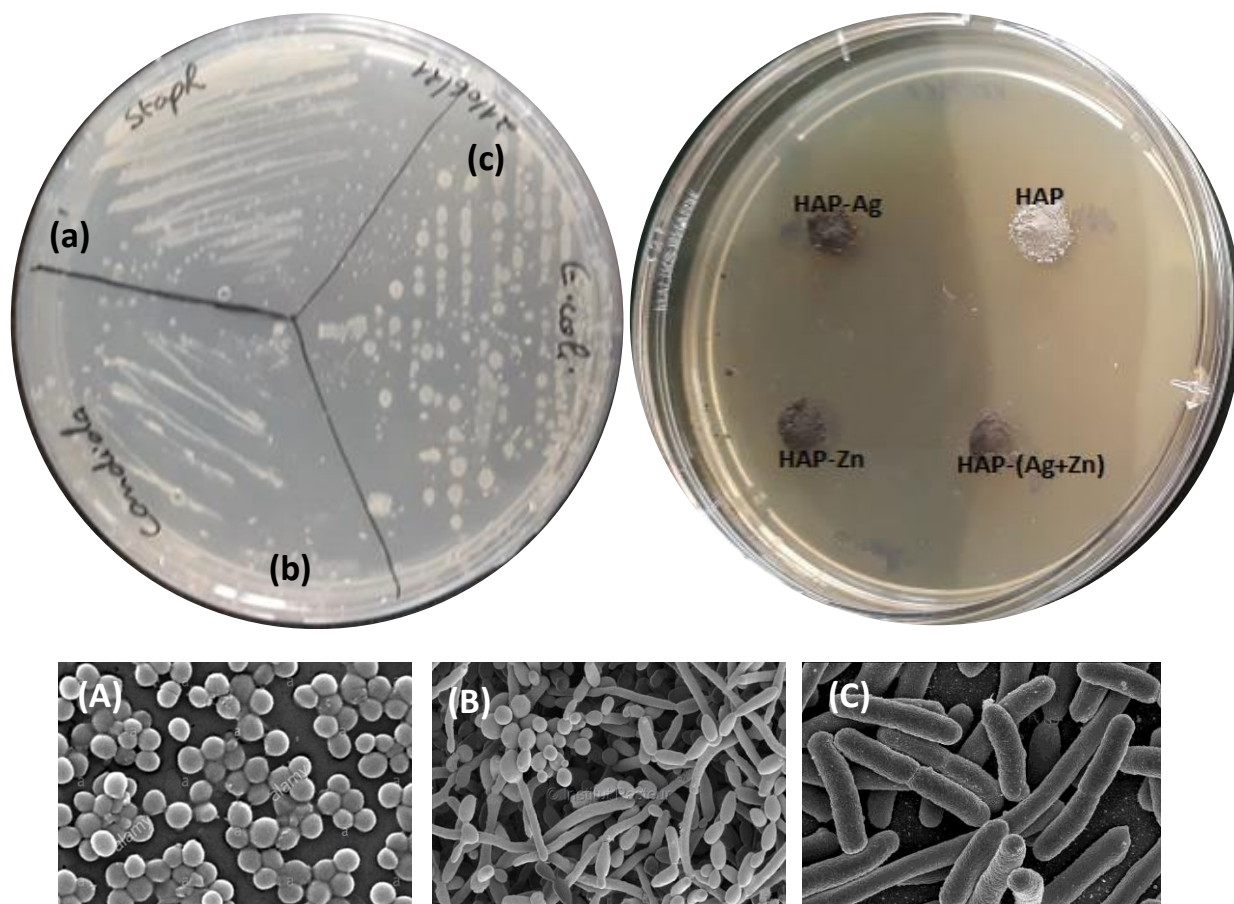


Figure II.5. Images du milieu gélosé et ensemencé avec les bactéries et les poudres de HAP. Images microscopiques des 3 bactéries :
 (A) *Staphylococcus aureus* ; (B) *Candida albicans* ; (C) *Escherichia coli*.

II.1.3.3. Préparation de la microplaque (méthode de turbidimétrie)

On introduit environ 200 μl d'un inoculum bactérien de chaque souche dans les puits d'une microplaque à 96 puits avec une petite quantité (0,005g) de poudres de HAP pure et dopée pour les deux concentrations (100 et 10000 ppm) comme suit (voir la **figure II.6**) :

- Dans le premier puits, on dépose uniquement l'inoculum bactérien.
- Dans le deuxième puits, on dépose l'inoculum bactérien plus l'échantillon : HAP pure.
- Dans le troisième puits, on dépose l'inoculum bactérien plus l'échantillon : HAP-Ag.
- Dans le quatrième puits on dépose l'inoculum bactérien plus l'échantillon : HAP-Zn.
- Dans le cinquième puits on dépose l'inoculum bactérien plus l'échantillon : HAP-(Ag+Zn). Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche.

La microplaque est incubée à 37°C pendant 24h sous agitation constante. Après un certain temps, on détermine la densité optique (DO). On fait passer la microplaque dans le lecteur de microplaques (multimode Synergy™ HTX BioTek.) pour la mesure d'absorbance à une longueur d'onde de 570 nm. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois essais.

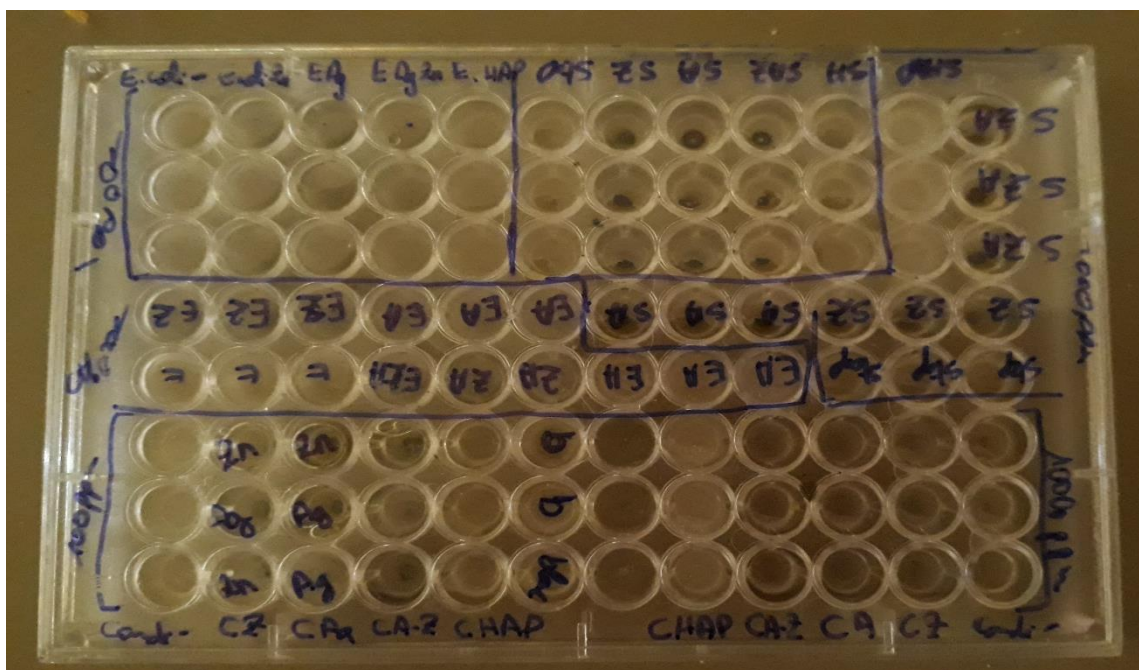


Figure II.6. Image représentant l'essai de microplaque (DO).

b : Blanc ; **C** : *Candida albicans* ; **E** : *Escherichia coli* ; **S** : *Staphylococcus aureus* ;

CHAP : *Candida albicans* /HAP ; **CA** : *Candida albicans* /HAP-Ag ; **CZ** : *Candida albicans* /HAP-Zn ;

CA.Z : *Candida albicans* /HAP-(Ag+Zn) ; **EH** : *Escherichia coli* /HAP ; **EA** : *Escherichia coli* /HAP-Ag ;

EZ : *Escherichia coli* /HAP-Zn ; **EA.Z** : *Escherichia coli* /HAP-(Ag+Zn) ; **SHAP** : *Staphylococcus aureus* /HAP ;

SA : *Staphylococcus aureus* /HAP-Ag ; **SZ** : *Staphylococcus aureus* /HAP-Zn ;

SA.Z : *Staphylococcus aureus* /HAP-(Ag+Zn).

II.2. ANALYSE ET CARACTERISATION

La **figure II.7** présente le principe d'analyse et de caractérisation de l'hydroxyapatite modifiée par la gélatine et les agents antibactériens. Ainsi, les propriétés de bioactivité et antibactériennes de HAP sont évaluées à travers les techniques représentées sur la figure ci-dessous.

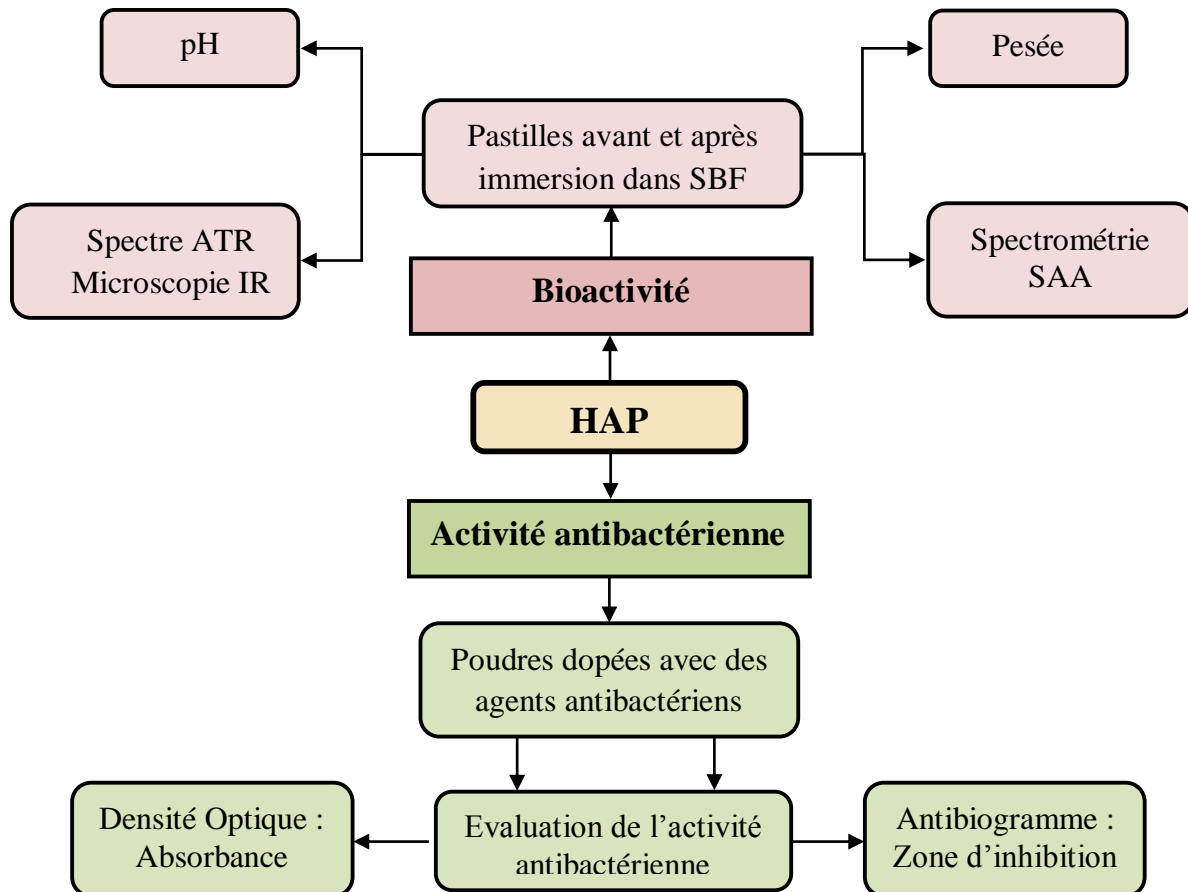


Figure II.7. Schéma illustratif des techniques d'analyse et de caractérisation de l'hydroxyapatite.

II.2.1. Analyse de la bioactivité *in vitro*

II.2.1.1. Mesure des masses et pH

Pour chaque échantillon, on mesure le pH de la solution SBF (pH JENWAY 3510 pH Meter) ainsi que la masse des pastilles (balance Sartorius BP221S) avant et après immersion dans la solution. Ces mesures sont répétées 3 fois.

II.2.1.2. Analyse quantitative du milieu SBF par spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

La spectrométrie d'absorption atomique est une technique d'analyse élémentaire très sensible et largement utilisée pour analyser plus de 70 éléments, parfois à l'état de trace. Elle repose sur l'absorption par les éléments à l'état atomique d'un rayonnement issu d'une lampe à cathode creuse ou à décharge. Compte tenu de la nature discrète des niveaux d'énergie des atomes, la source lumineuse doit contenir l'élément à analyser, ainsi son spectre d'émission correspond exactement au spectre d'absorption de l'élément à analyser. Autrement dit, les photons issus de la lampe remplissent les conditions de résonance pour les atomes « cible » donc induisent des transitions électroniques ce qui provoque l'absorption. L'appareillage utilisé est composé de :

Une lampe (source de lumière) qui délivre un rayonnement constitué des raies caractéristiques de l'élément qui la compose donc de l'élément à analyser.

Une flamme ou dans un four en graphite dans laquelle ou à travers laquelle l'échantillon est porté à une température de plusieurs milliers de degrés. On obtient ainsi un gaz d'atomes libres. Le faisceau lumineux tombe ensuite sur les atomes « cible ». Sous l'effet du rayonnement et puisque la condition de résonance est remplie, des atomes passent de l'état fondamental à un état excité. Une partie du rayonnement est ainsi absorbé.

Un monochromateur permet de sélectionner une bande de longueur d'onde ou d'énergie au centre de laquelle se trouve la raie avec laquelle on veut travailler. Sa présence est indispensable puisque l'on peut être amené à changer de raie caractéristique pour un même élément ou à analyser un autre élément, bien sûr, il faut, dans ce dernier cas, changer la source lumineuse.

Enfin un détecteur, le plus souvent un tube photomultiplicateur, mesure l'intensité transmise.

Le principe de l'analyse quantitative par absorption atomique est exactement le même que pour la spectrométrie UV/visible ou la spectrométrie infrarouge [86].

L'appareillage utilisé pour l'analyse SAA est un spectromètre d'absorption atomique de type iCE 3000 Séries. Nous avons procédé à la réalisation de la courbe d'étalonnage par dosage de solutions de concentrations connues préparées par dilution de la solution mère de CaCl_2 . Les milieux SBF récupérés sont filtrés à l'aide de filtres à seringues ($0.45 \mu\text{m}$) et conservés à froid.

D'après la littérature (chapitre I) on peut dire qu'un matériau est bioactif lorsqu'il induit la formation d'une couche d'apatite carbonatée « *Bone-like apatite* » à sa surface via des liaisons chimiques. Cette couche d'apatite peut être identifiée par microscopie électronique à balayage, MEB (analyse de la morphologie) couplée à la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie, EDS (analyse élémentaire) et par diffraction des rayons X, DRX, (phase, structure, cristallinité, etc.).

Lors de la formation de cette couche, il y a interaction entre les ions contenus dans le plasma et le matériau au contact. Les ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} sont principalement les éléments échangés entre le matériau et le milieu, c'est pourquoi on s'intéresse à l'évolution de la concentration de ces derniers. Ainsi, la bioactivité des pastilles de HAP pure calcinée à différents temps et températures et des pastilles de HAP renforcée par la gélatine (biocomposites) est évaluée dans le milieu physiologique SBF par le suivi de la variation de la concentration des ions Ca^{2+} . Ces ions sont présents dans la solution SBF et entrent également dans la composition de HAP (CaP). La quantification de ces ions est réalisée par spectrométrie SAA.

Pour le volume de SBF à prendre pour chaque échantillon, dans le cas des matériaux denses, on mesure les dimensions de l'échantillon (diamètre : 14 mm, épaisseur : 2 mm) et on calcule la surface de la pastille puis le volume de SBF en utilisant l'équation [87] suivante :

$$V_s = \frac{S_a}{10}$$

V_s : Volume du SBF (mL)

S_a : Surface apparente de l'échantillon (mm^2)

Pour les matériaux poreux, le volume de SBF doit être supérieur au volume V_s calculé.

II.2.1.3. Analyse qualitative par spectrophotométrie Infra-rouge (ATR-FTIR)

a) Technique de réflectance totale atténuée (ATR)

Le principe de la technique de réflectance totale atténuée repose sur la mesure des modifications survenant dans un faisceau infrarouge réfléchi en interne lorsque le faisceau entre en contact avec un échantillon. Le faisceau infrarouge est dirigé vers un cristal optiquement dense avec un indice de réfraction élevé à un certain angle. Cette réflectance interne crée une onde qui s'étend au-delà de la surface du cristal et à l'intérieur de l'échantillon qui est en contact avec le cristal. Dans les régions du spectre IR où l'échantillon absorbe de l'énergie, l'onde est atténuée. Le faisceau atténué revient au cristal, puis quitte l'extrémité opposée du cristal et est dirigé vers le détecteur dans le spectromètre IR.

Le détecteur enregistre le faisceau IR atténué sous forme d'un signal d'interférogramme, qui est utilisé pour générer un spectre IR. L'avantage de la spectroscopie ATR-FTIR est qu'elle permet d'étudier tant des films minces que des poudres, des polymères ou des liquides, avec une préparation d'échantillon minimale⁶. Pour identifier les groupements fonctionnels dans les poudres et pastilles, celles-ci sont déposées directement à la surface du cristal en utilisant un spectromètre (FT-IR Spectrometer Perkin-Elmer UATR Two). Les spectres sont enregistrés en mode de transmittance de 400 à 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} .

b) Imagerie par microscopie infrarouge (IR)

La microscopie infrarouge ou IR-TF (Nicolet™ iN™10 Infrared Microscope) est la combinaison de la microscopie conventionnelle et de l'identification chimique par spectroscopie IR-TF. Individuellement, les deux techniques sont très puissantes, mais ensemble, elles offrent la possibilité d'examiner chimiquement les plus petits objets, en associant l'information spectrale et la résolution spatiale⁷.

II.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'effet antibactérien peut être déterminé par l'observation de zones claires résultantes de l'inhibition formée autour des matériaux. La mesure des densités optiques permet également d'évaluer la croissance des souches bactériennes au contact des poudres de HAP contenant les agents antibactériens.

⁶ <https://www.thermofisher.com>

⁷ <https://www.bruker.com/fr>

CHAPITRE III

RESULTATS & DISCUSSION

Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus lors de notre travail. Ces résultats sont discutés et mis en valeur par rapport à ceux obtenus dans les différents travaux de recherche.

III.1. EVALUATION DE LA BIOACTIVITE

III.1.1. Variation de la concentration de Ca après immersion des pastilles dans le SBF

La courbe d'étalonnage réalisée nous a permis de déterminer la concentration en calcium de chaque milieu SBF recueilli grâce aux absorbances mesurées à partir de l'ensemble des échantillons standards (étalons) préparés à des concentrations connues. La réponse est linéaire (**figure III.1**) et les concentrations des différents milieux varient entre 10 et 70 mg/L. La concentration initiale du milieu SBF c'est à dire avant incubation des pastilles est de l'ordre de 22,4 mg/L.

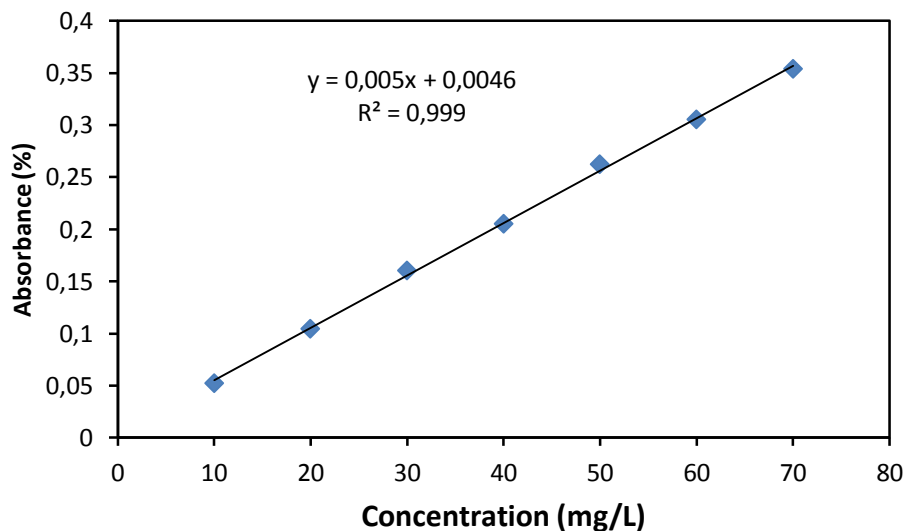


Figure III.1. Courbe d'étalonnage : variation de l'absorbance en fonction de la concentration des solutions standards en calcium.

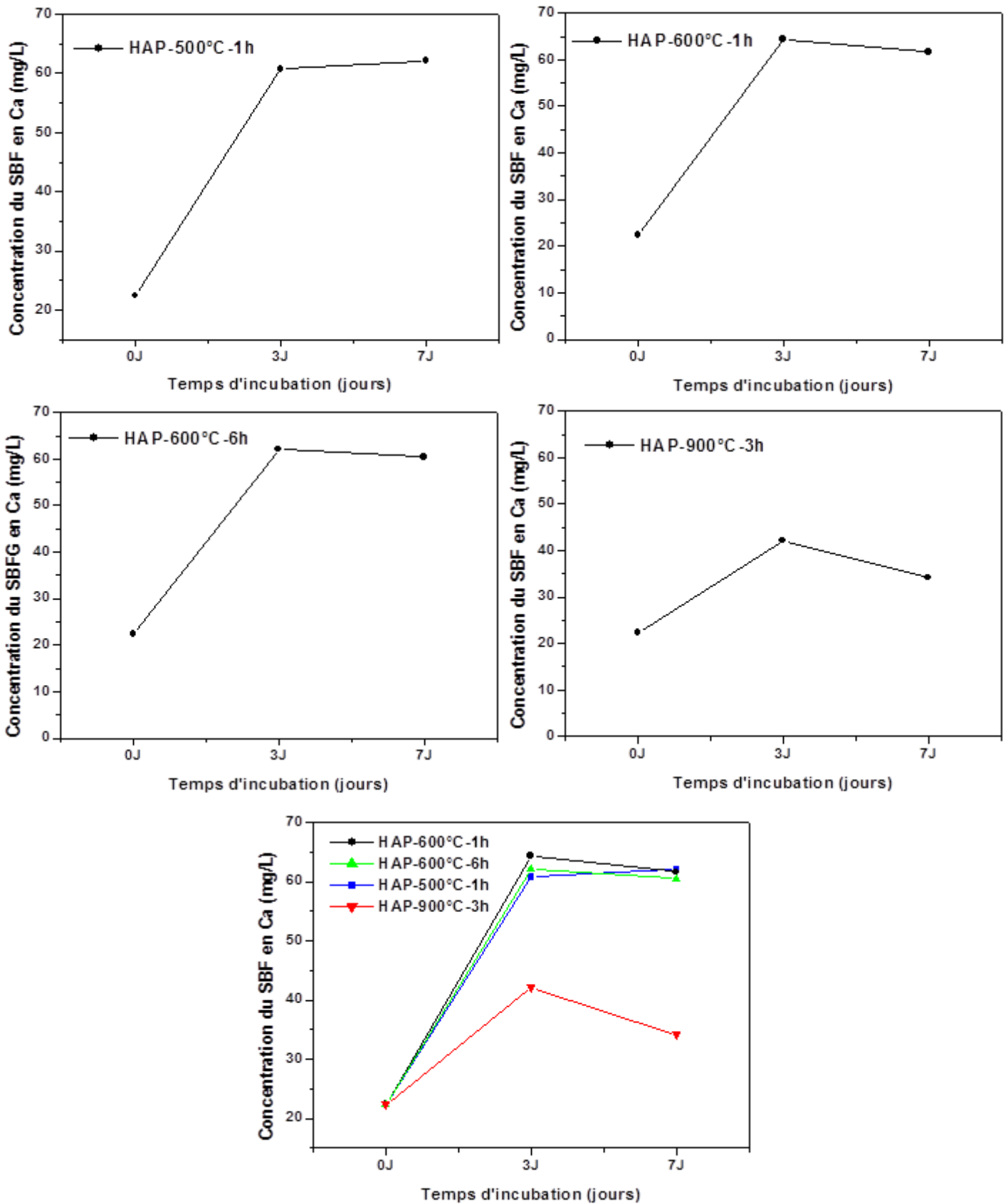


Figure III.2. Variation de la concentration des milieux SBF en fonction des temps d'immersion des pastilles de HAP préparée à différents temps et température de calcination.

Sur la **figure III.2** on observe qu'après 7 jours d'immersion de la pastille de HAP-500°C-1h dans la solution SBF, la concentration de Ca dans le SBF augmente avec le temps d'immersion et atteint une valeur de 62 mg/L. Tandis que pour les autres échantillons, HAP calcinée à 600°C et à 900°C, la concentration de Ca dans le SBF augmente après 3 jours d'immersion ensuite diminue jusqu'à une valeur moyenne de 60 mg/L pour HAP-600°C (1h et 3h) et 34 mg/L pour HAP-900°C-3h.

L'augmentation des ions de Ca dans le milieu SBF (concentrations supérieures à 22.4 mg/L) est due au processus de dissolution de HAP durant les trois premiers jours puis la concentration de Ca diminue à cause de la migration des ions de Ca de la solution SBF vers les pastilles de HAP, excepté pour HAP calcinée à 500°C, pour former l'apatite carbonatée. C'est le processus de précipitation.

En regroupant les 4 courbes dans un même graphe, on observe que la concentration du SBF en calcium atteint son maximum pour HAP calcinée à 600°C (≈ 63 mg/L). Pour une température de calcination de 900°C, la concentration du milieu SBF en ions calcium est moins importante.

Donc pour une température de calcination de 900°C, les processus de dissolution-précipitation sont moins importants du fait de l'augmentation de la température de calcination de HAP qui devient plus dense par rapport à celle calcinée à 500 et 600°C. On note aussi que l'augmentation du temps de calcination de HAP à 600°C de 1h à 6h n'a aucun effet sur la cinétique de variation de Ca après immersion dans le SBF. La cinétique de variation de Ca est presque la même pour ces deux pastilles (HAP-600°C-1h et 6h).

Pour les pastilles de HAP-gélatine, la variation de la concentration de Ca dans le SBF en fonction du temps d'immersion est illustrée dans la **figure III.3**.

Pour HAP pure sans gélatine (HAP/G-0%), le processus de précipitation a lieu à partir du 7^{ème} jour. On observe une forte diminution de la concentration en Ca dans le SBF.

Pour HAP/G-10% et HAP/G-30%, la concentration en Ca augmente avec le temps jusqu'au 7^{ème} jour d'immersion où elle se stabilise. On observe que la concentration de Ca dans le SBF pour ces deux échantillons évolue de la même manière. La concentration ionique reste stable, ce qui veut dire qu'il y'a un équilibre entre le processus de dissolution des pastilles et le processus de précipitation de l'apatite à partir de Ca présent dans la solution SBF à la surface des pastilles immergées.

Pour HAP/G-50%, la concentration des ions de calcium augmente avec le temps d'immersion. C'est le processus de dissolution qui prédomine le processus de précipitation de l'apatite. On observe une augmentation continue de Ca dans le SBF. Donc environ 35% des ions de Ca ont migré des pastilles vers la solution SBF après 21 jours d'immersion dans SBF. Donc l'équilibre entre le processus de dissolution des pastilles et le processus de précipitation de l'apatite à partir de Ca dans le SBF n'est pas encore atteint. Pour HAP/G-50%, le processus de dissolution de la pastille n'est pas encore achevé.

De manière générale, après que le processus de dissolution atteint le point maximum, on a une inversion du processus, soit une diminution de la concentration des ions de Ca, qui a eu lieu en suggérant une précipitation de « bone-like apatite » [88].

***NB** : Les pastilles élaborées pour une application comme **scaffold** se sont dissoutes dès leur immersion dans le SBF.*

Selon la théorie de Kimet al. [89], la surface négative de HAP attire les ions Ca présents dans le SBF pour former une couche phosphocalcique amorphe riche en Ca (Amorphous Calcium Phosphate : ACP). Après immersion dans le SBF, HAP expose ses groupes d'hydroxyle et de phosphate ce qui conduit à une surface négative.

Dans la deuxième étape, les ions phosphate dans le SBF interagissent avec les ions de Ca de la couche ACP pour former une couche phosphocalcique pauvre en calcium.

Enfin, cette couche se cristallise en « bone like apatite » ce qui permet la stabilisation de HAP dans le SBF [89].

Donc d'après cette théorie la dissolution de HAP dans le SBF engendre une évolution de pH vers des valeurs supérieures à celle du SBF préparé initialement en raison de la libération des ions Ca^{2+} dans la solution SBF. En outre, la diminution de la valeur de pH de la solution SBF lors de la précipitation est attribuée à la diminution des ions OH^- présents dans la solution SBF causée par la formation d'une fine couche d'apatite à la surface de HAP [90,91].

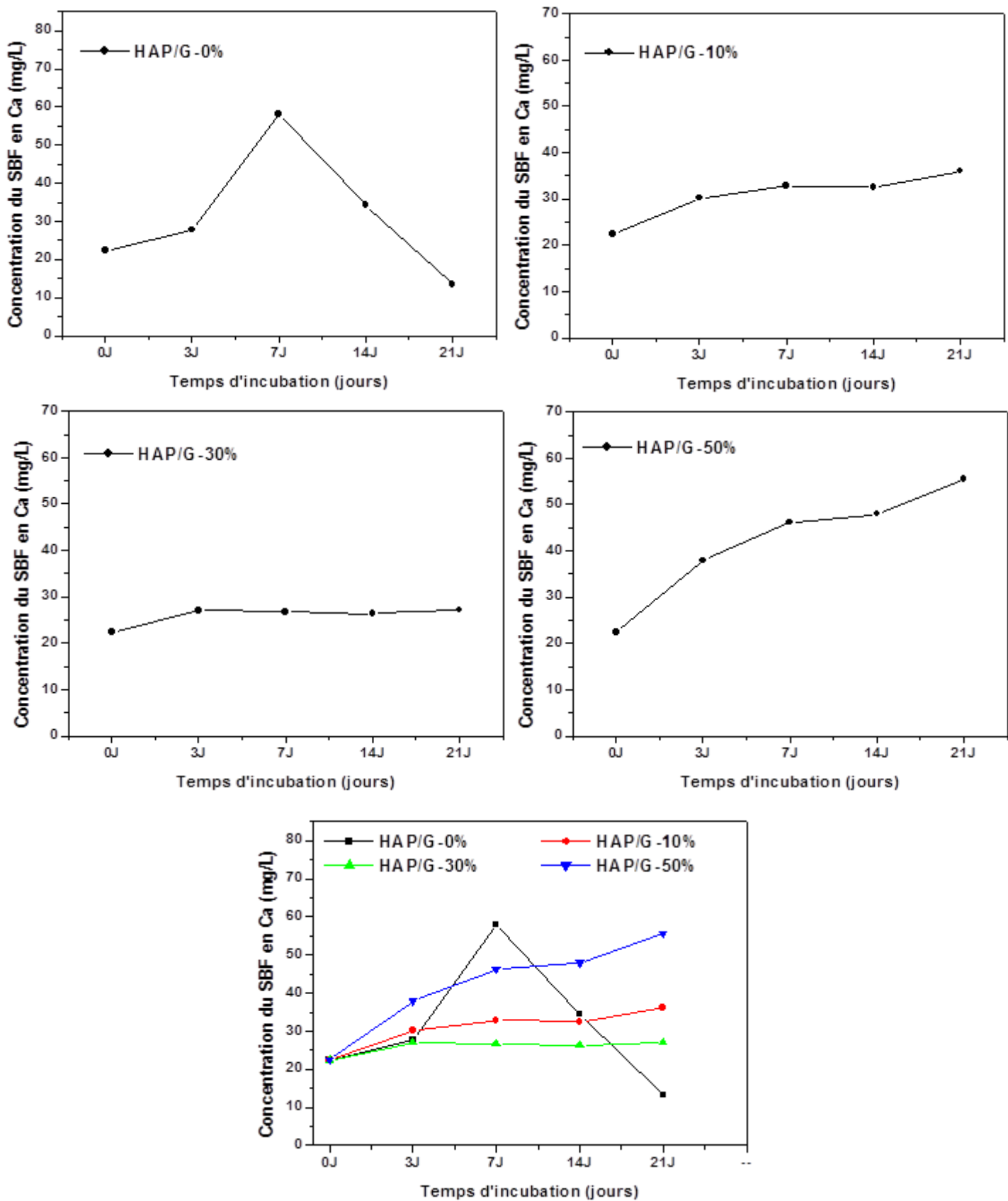


Figure III.3. Variation de la concentration des milieux SBF en fonction des temps d'immersion des pastilles de HAP-gélatine.

Le pH des solutions SBF mesuré après 7 et 21 jours d'immersion des pastilles (**tableau III.1**) varie selon l'hypothèse citée au-dessus. Après lavage et séchage, les masses des pastilles mesurées montrent une diminution par rapport aux masses initiales, ce qui indique que la couche d'apatite carbonatée susceptible de se former à la surface des pastilles est très fine. Il faut signaler également les pertes de masse lors de la pesée.

Tableau III.1. Variation du pH et de la masse des pastilles avant et après immersion dans le SBF.

Temps d'immersion dans le SBF	Pastille							
	HAP/G-0%	HAP/G-10%	HAP/G-30%	HAP/G-50%	HAP-500°C-1h	HAP-600°C-1h	HAP-600°C-6h	HAP-900°C-3h
	pH							
0jour	7.440							
7 jours	7.442	7.420	7.314	7.439	7.442	7.335	7.324	7.305
21jours	7.387	7.508	7.342	7.535	-	-	-	-
	Masse (g)							
0 jour	0.3000				0.4000			
7 jours	0.2806	0.2850	0.2872	0.2900	0.3507	0.3930	0.3940	0.3880
21jours	0.2772	0.2747	0.2952	0.2838	-	-	-	-

NB : Pour HAP/G-50% les valeurs de pH ne concordent pas avec le reste des valeurs.

III.1.2. Analyse de la structure par ATR

Afin de compléter l'étude de la bioactivité de nos échantillons, nous avons analysé les différentes pastilles par spectrométrie et spectroscopie ATR.

III.1.2.1. Traitement des spectres ATR

La **figure III.4** montre les spectres IR des pastilles de HAP calcinée à 500°C -1h, 600°C-1h, 600°C-6h et 900°C-3h.

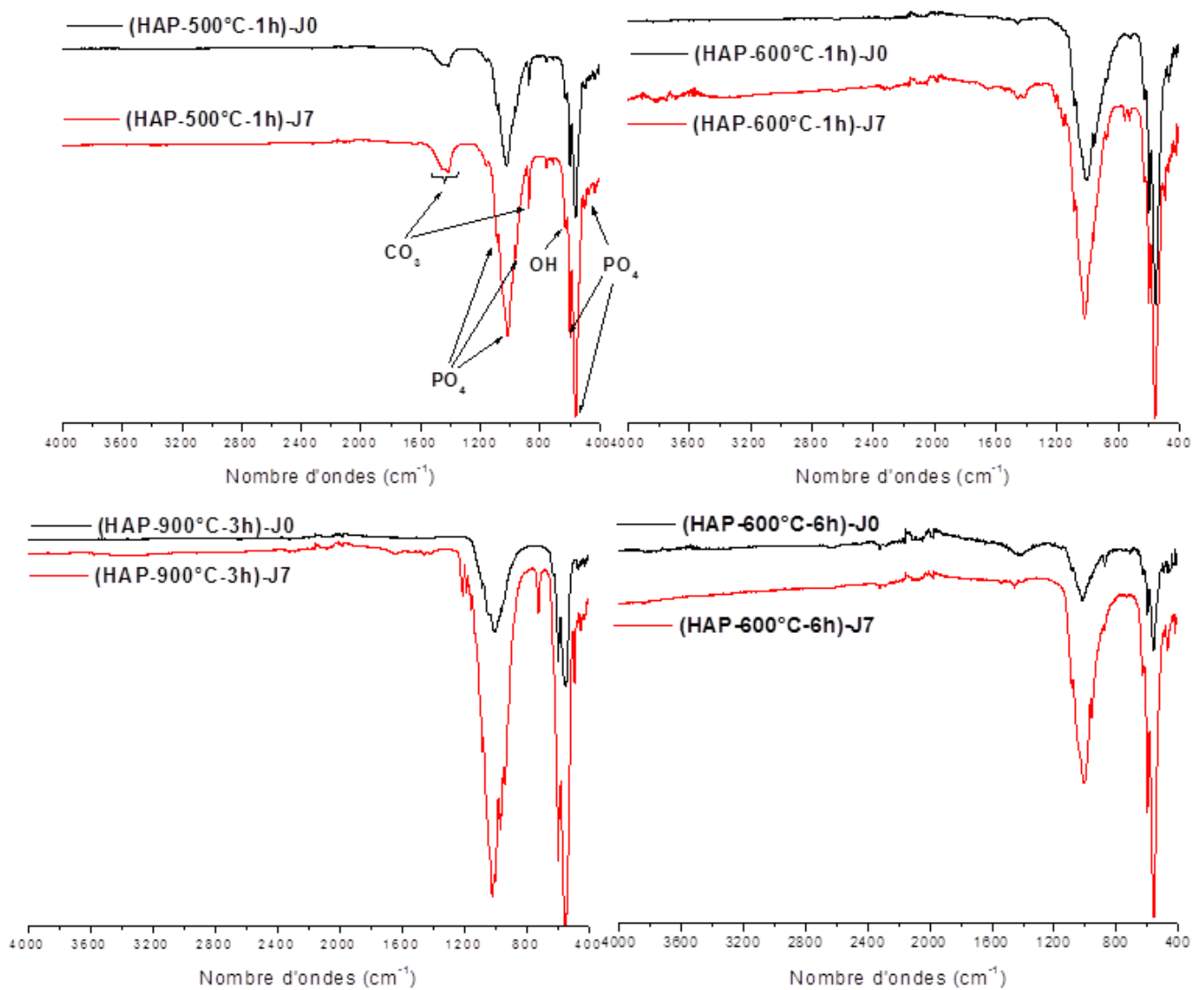


Figure III.4. Spectres IR des pastilles de HAP préparée à différents temps et températures de calcination avant et après immersion dans le SBF.

Le spectre IR de HAP calcinée à 500°C-1h montre un triplé de pics (473 cm^{-1} , 563 cm^{-1} et 600 cm^{-1}) qui sont attribués aux ions PO_4^{3-} avec développement d'un épaulement à 630 cm^{-1} qui provient des modes de vibration d'élongation des ions OH^- , ce qui caractérise la structure de l'apatite [92]. Les pics à 964 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} et 1089 cm^{-1} correspondent également aux ions PO_4^{3-} . Ces pics sont identifiés dans tous les spectres ce qui indique la formation de la phase de HAP dans tous les échantillons.

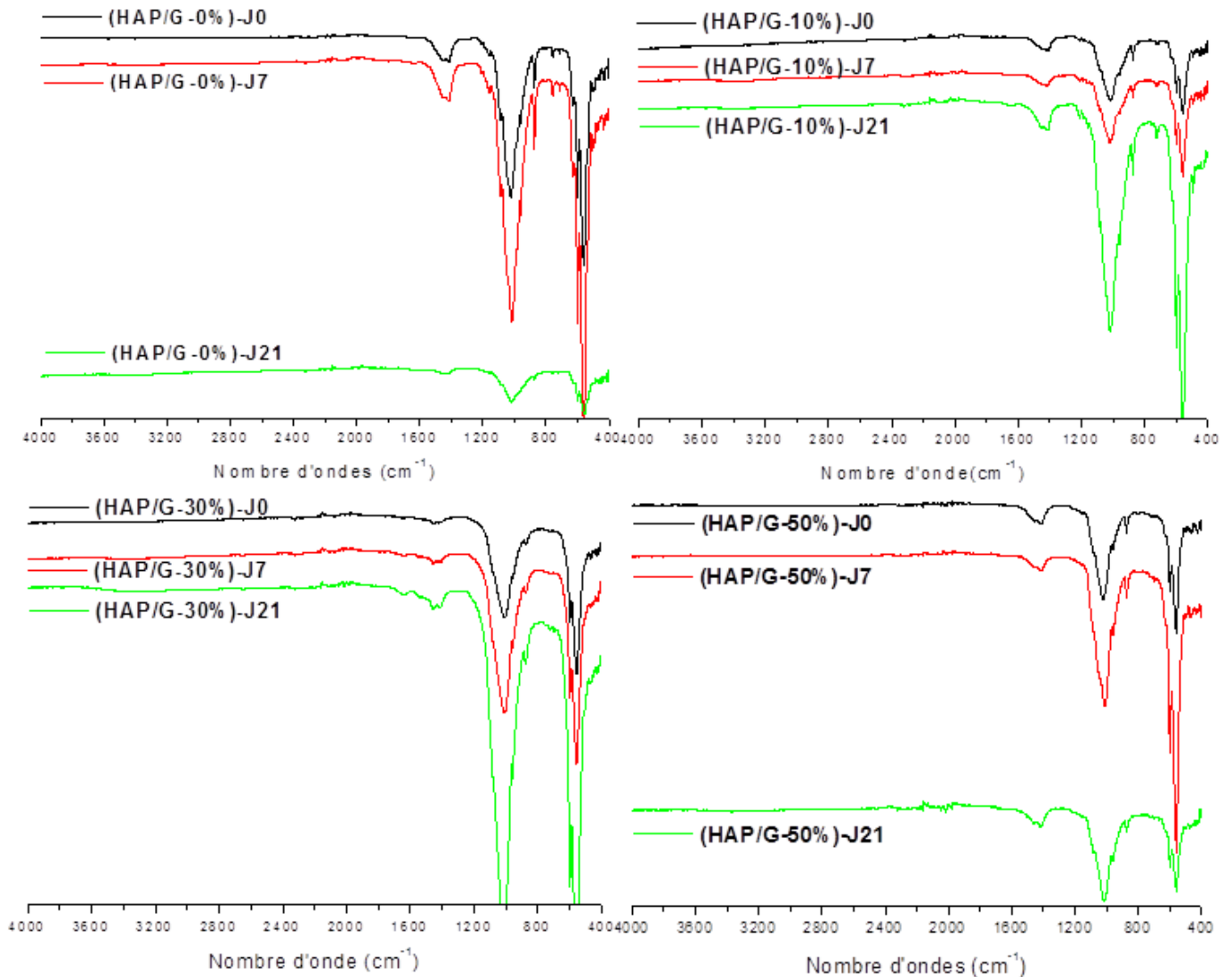
Nous observons, également, la présence de bandes originaires des vibrations d'élongation des ions CO_3^{2-} à 873 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} et 1501 cm^{-1} caractéristiques de l'apatite carbonatée [93]. Ces bandes de carbonates sont moins intenses pour HAP 600°C-1h et 6h. Pour HAP 900°C-3h aucun pic de carbonate n'est enregistré. Donc pour les températures élevées les ions CO_3^{2-} sont éliminés.

Nous remarquons que le pic correspondant aux groupements OH^- (dans HAP) situé à 3572 cm^{-1} n'est pas visible. Aussi, la bande à 3440 cm^{-1} relative à l'eau adsorbée n'apparaît pas dans les spectres, ce qui indique l'absence de l'eau (humidité) dans les pastilles préparées.

Après 7 jours d'immersion, on observe une augmentation de l'intensité de la bande de OH^- à 630 cm^{-1} et des bandes caractéristiques des groupements de phosphate PO_4 . On observe également une meilleure résolution des pics des carbonates dans les spectres de HAP calcinée à 500°C et 600°C durant 1h et apparition de nouveaux petits pics caractéristiques des carbonates dans le cas des pastilles de HAP calcinée à 600°C durant 6h et 900°C durant 3h. En combinant avec les résultats de SAA, cela suggère qu'il y a formation d'apatite carbonatée à la surface des pastilles après immersion dans le SBF pendant 7 jours.

La **figure III.5** présente les spectres IR des pastilles de HAP-gélatine calcinée à 500°C. Ces spectres montrent des bandes d'absorption caractéristiques de la structure de HAP carbonatée. Dans le cas de HAP sans gélatine la résolution des pics est meilleure après 7 jours d'immersion dans le SBF.

Après 21 jours d'immersion dans le SBF, l'intensité des pics des groupements de HAP sans gélatine diminue considérablement. Cela peut être expliqué par la dissolution et diminution de la couche de HAP carbonatée précédemment formée. Alors que pour HAP renforcée par la gélatine (HAP/G-10% et HAP/G-30%) les spectres IR enregistrés montrent une augmentation de l'intensité de la bande de phosphate et d'hydroxyle ainsi que celle des carbonates mais ces bandes sont moins résolues dans le cas de HAP/G-50% après 21 jours d'immersion. Ceci peut être dû au fait que la structure de la pastille de HAP contenant 50% de gélatine est poreuse par rapport à HAP/G-10% et HAP/G-30%. Donc la nature de la couche de HAP carbonatée formée dépend de la structure du matériau au contact du milieu SBF. D'après Kim et al. [89] la formation de l'apatite carbonatée à la surface de HAP dépend de plusieurs facteurs tels que : la densité, la surface spécifique, la composition et la structure.



D'après les résultats du test de bioactivité et de l'analyse IR, on constate que quelle que soit la température ou temps de calcination de HAP, celle-ci peut induire la formation d'une couche apatitique à sa surface après un temps d'immersion dans le SBF de 7 jours. Contrairement à HAP pure, les pastilles de HAP contenant la gélatine subissent une dissolution continue ou stable durant la période de leur immersion dans le SBF. Donc l'ajout de la gélatine dans HAP a pour effet de retarder le processus de dissolution des ions de Ca et de formation de la couche d'apatite carbonatée (au-delà du 7^{ème} jour).

III.1.3. Analyse de la morphologie de surface par microscopie IR

L'imagerie par microscopie IR (**figures III.6 et III.7**) montre la morphologie de la surface des pastilles avant et après immersions dans le SBF pendant 21 jours.

Sur les deux figures nous remarquons que la structure de HAP devient plus poreuse (présence de cavités et de pores de dimensions irrégulières) lorsque la teneur en gélatine augmente de 10 à 50%.

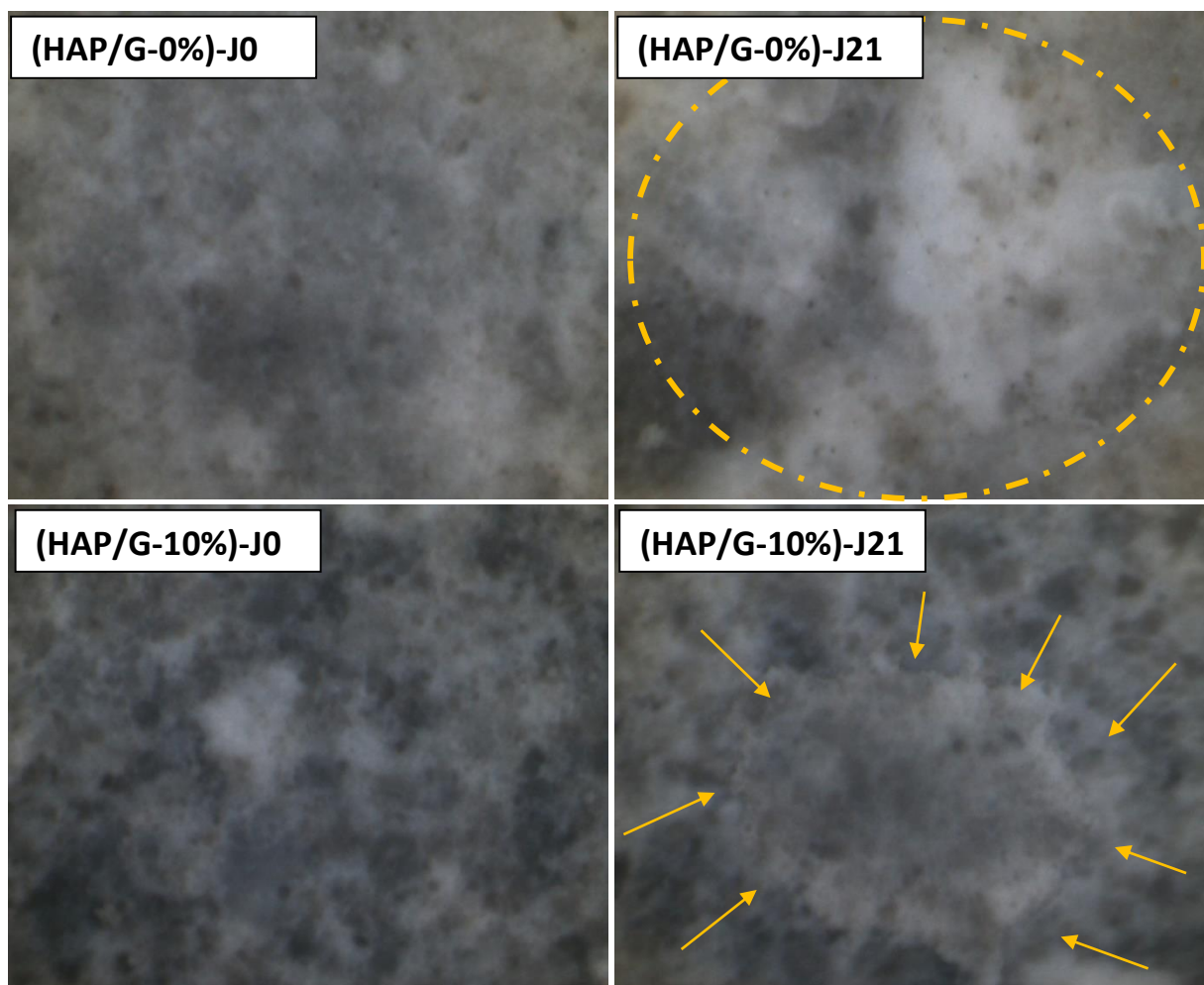


Figure III.6. Imagerie IR de la surface des pastilles de HAP composite à 0 et 10 % en gélatine.

Les surfaces des pastilles sont couvertes soit en totalité ou partiellement par une couche ou bien un ensemble de particules.

- Pour (HAP/G-0%)-J21, sa surface est couverte d'une couche de couleur blanche.
- pour (HAP/G-10%)-J21, on remarque à sa surface une agglomération de particules.
- De même pour (HAP/G-30%)-21, on observe une agrégation de particules à sa surface.
- La surface de (HAP/G-50%)-21J, devient plus uniforme après son immersion dans le SBF.

En comparant les résultats de ces observations microscopiques avec les résultats des méthodes d'analyse SAA et ATR, on peut suggérer que la couche d'apatite apparaît sur les deux échantillons HAP/G-10% et HAP/G-30%.

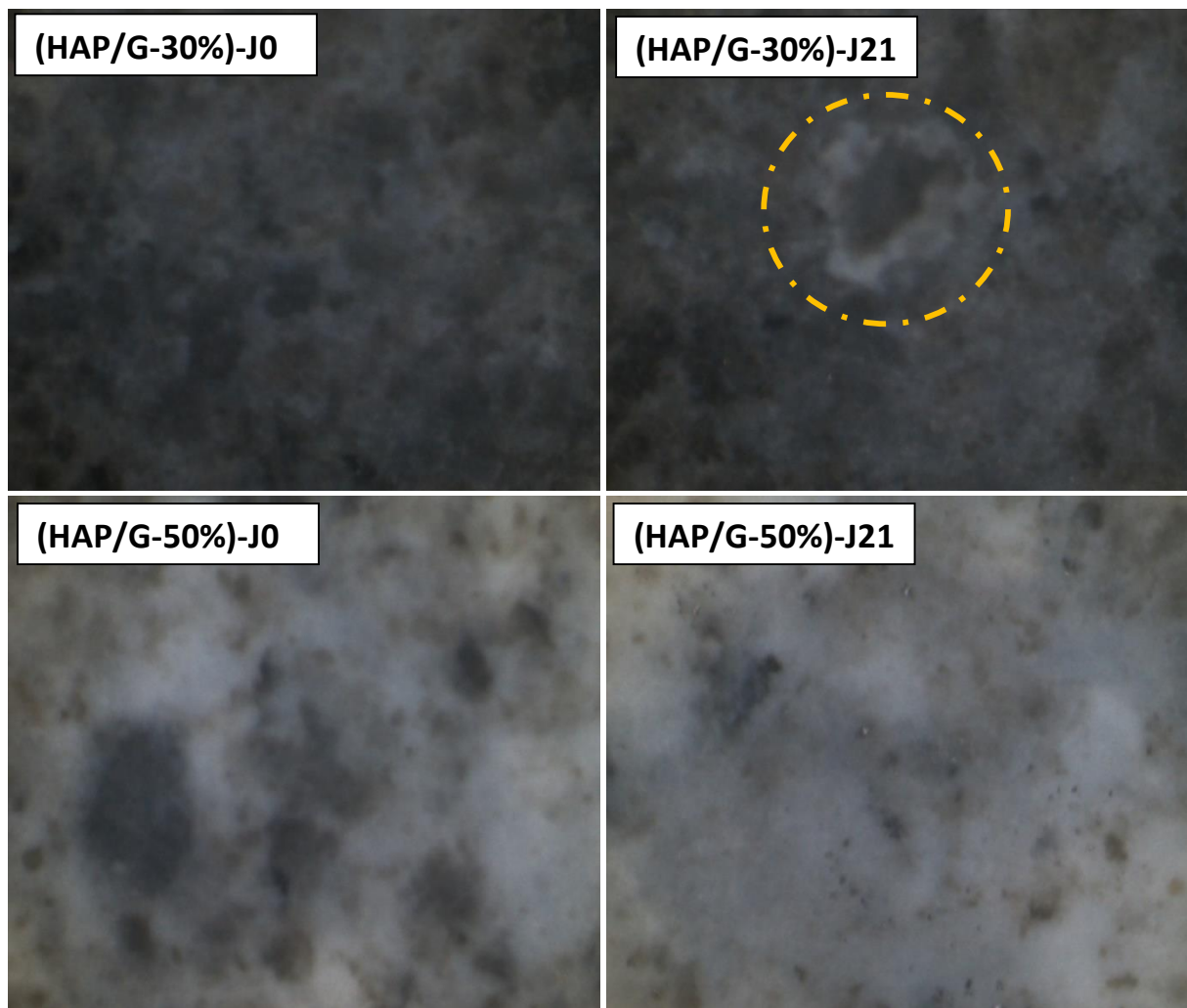


Figure III.7. Imagerie IR de la surface des pastilles de HAP composite à 30% et 50 % en gélatine.

Ainsi on peut conclure que l'hydroxyapatite et les biocomposites élaborés dans ce travail sont biactifs. Ces résultats semblent intéressants mais doivent être encore confirmés par d'autres techniques de caractérisation qui sont complémentaires telles que la diffraction des rayons X (DRX) et la microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB/EDS).

III.2. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES POUDRES DOPEES

Les infections dues aux implantations chirurgicales constituent un problème majeur et implique de refaire la chirurgie. L'activité antibactérienne de HAP élaborée dans ce travail par procédé sol-gel est testée au contact de micro-organismes qui sont responsables de la plupart des infections inter-hospitalières. Il s'agit de *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif) et *Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif) qui peuvent provoquer des infections graves. En plus de ces deux bactéries, on a également testé l'effet d'un champignon « *Candida albicans* » au contact de HAP.

III.2.1. Caractérisation des poudres de HAP dopées par infra-rouge

La figure III.8 présente les spectres IR de la poudre de HAP dopée avec Ag, Zn et Ag+Zn.

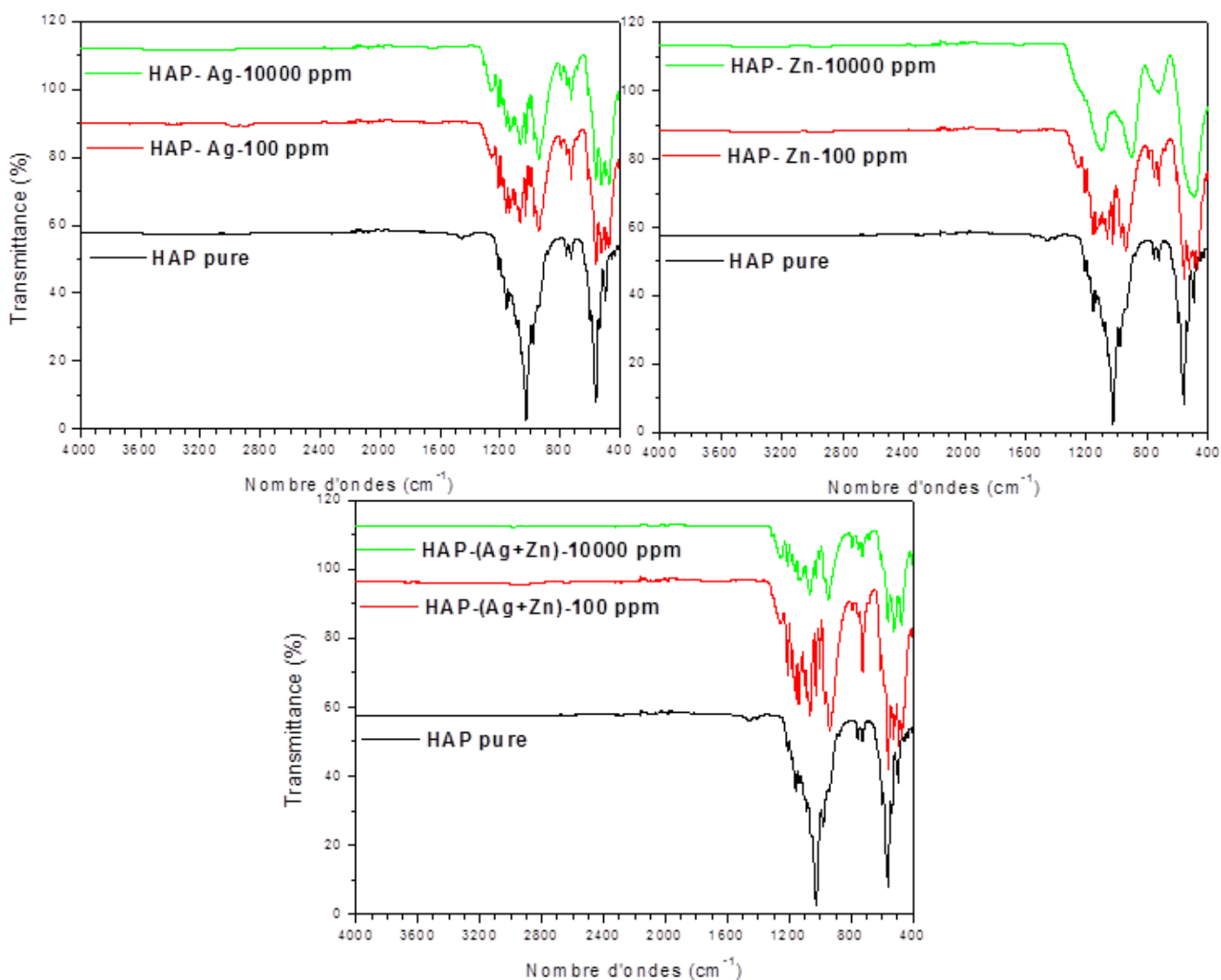


Figure III.8. Spectres IR des poudres de HAP dopées.

Les spectres des poudres dopées indiquent des bandes bien définies associées à la phase de HAP. Ils montrent une même évolution des bandes spectrales pour les deux éléments Ag et Zn mais leurs intensités diffèrent et varient en fonction de la concentration des agents dopants (100 ppm et 10000 ppm).

Les principaux pics présents dans HAP dopées sont attribués aux groupements phosphates [94]. Les bandes caractéristiques de HAP sont enregistrées dans tous les spectres : les groupements phosphates dans l'intervalle $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ et $400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ et un épaulement à 630 cm^{-1} correspondant à OH (HAP). Pour HAP-Zn-10000 ppm, ces bandes d'absorption deviennent plus larges et arrondies. En effet, le rayon ionique du Zn^{2+} (0.074 nm) est inférieur à celui de Ca^{2+} (0.099 nm), le remplacement des ions Ca par des ions Zn entraîne alors des défauts dans leurs paramètres du réseau [94]. 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 en fonction de la quantité d'argent insérée. 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'argent présentes dans le milieu [95].

III.2.2. Zones d'inhibition

La lecture de l'antibiogramme permet de déterminer si une souche bactérienne était sensible ou résistante à l'agent antibactérien. Pour cela, on mesure ou encore on estime le diamètre du disque ou de la zone translucide autour de l'échantillon contenant l'antibactérien à différentes compositions, puis on compare entre ces zones d'inhibition qui indiquent la croissance ou non des bactéries au contact des échantillons. Ainsi, on peut en déduire si une bactérie est résistante à un agent antibactérien donné et à une concentration donnée.

On observe sur la figure III.9 que pour les deux bactéries, la zone d'inhibition varie en fonction de la teneur de la poudre de HAP en argent et en zinc. Pour une concentration de HAP de 100 ppm en argent ou bien en zinc ou encore pour les deux éléments, il n'y a aucun effet sur les deux bactéries. Par contre à 10000 ppm, on voit apparaître des zones d'inhibition. Donc *staphylococcus aureus* et *escherichia coli* sont sensibles aux poudres de HAP-Ag-10000 ppm, HAP-Zn-10000 ppm et HAP-Zn-10000.

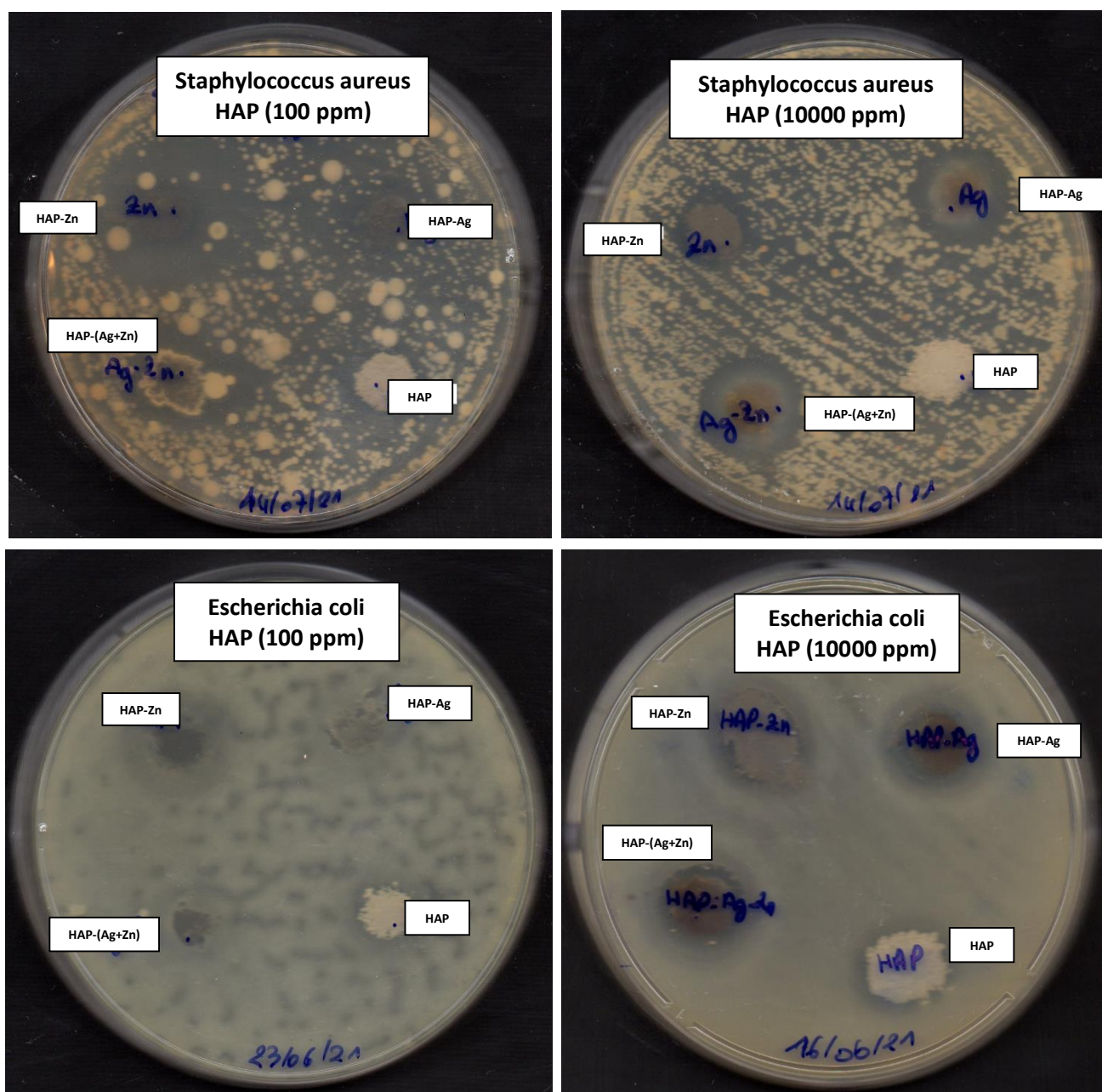


Figure III.9. Antibiogrammes des deux bactéries :

S. aureus-HAP ; *S. aureus*-HAP-Ag ; *S. aureus*-HAP-Zn ; *S. aureus*-HAP-(Ag+Zn)
E. coli-HAP ; *E. coli*-HAP-Ag ; *E. coli*-HAP-Zn ; *E. coli*-HAP-(Ag+Zn)

D'autre part, bien que les poudres de HAP-Ag-100 ppm, HAP-Zn-100 ppm et HAP-(Ag+Zn)-100 ppm ne présentent pas de zone d'inhibition appréciable, la croissance de colonies bactériennes n'est observée que pour *staphylococcus aureus*. Donc *escherichia coli* est plus sensible aux poudres de HAP que *staphylococcus aureus*. Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Silva-Holguin et al. [96].

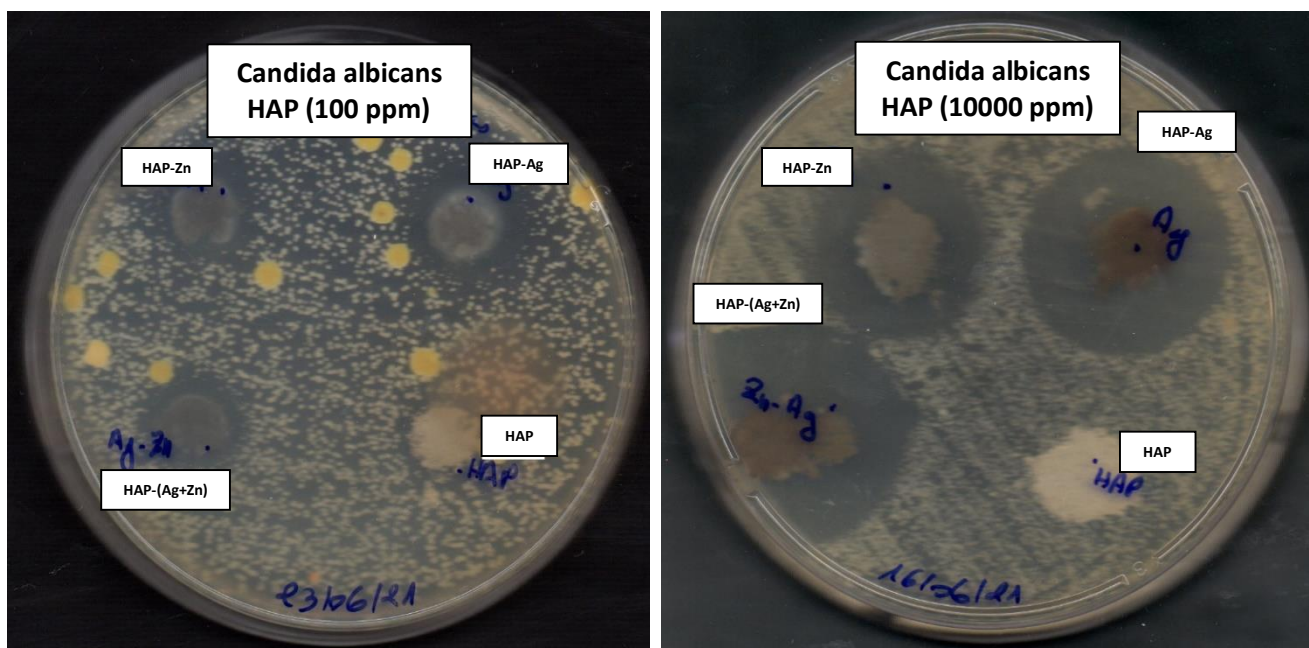


Figure III.10. Antibiogrammes du champignon :

C. albicans-HAP; *C. albicans* -HAP-Ag; *C. albicans*-HAP-Zn; *C. albicans*-HAP-(Ag+Zn)

Au contact de *Candida albicans*, les poudres de HAP-Ag-100 ppm, HAP-Zn-100 ppm et HAP-(Ag+Zn)-100 ppm montrent des zones d'inhibition, qui augmentent avec l'augmentation de la teneur en argent et en zinc dans l'échantillon comme le montre la **figure III.10**. Ainsi, la présence d'une faible quantité d'argent et de zinc dans HAP a un potentiel de minimiser le risque de contamination.

Pour une concentration de 10000 ppm, la comparaison entre les zones d'inhibition montre que celles formées autour de la poudre de HAP-(Ag+Zn) est la plus importante, par conséquent, cette poudre co-dopée possède un pouvoir inhibiteur le plus élevé par rapport aux deux autres poudres.

III.2.3. Densités optiques des milieux

L'estimation de la croissance bactérienne est basée sur deux critères, la masse cellulaire et le nombre de bactéries, qui augmentent dans des proportions variables au cours de la croissance. La masse cellulaire est mesurée selon la densité optique du milieu.

La mesure des densités optiques permet d'évaluer la croissance des souches bactériennes au contact des poudres de HAP contenant les agents antibactériens

Les résultats du test de turbidimétrie sont présentés dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2. Densités optiques des suspensions bactériennes.

100 ppm				10000 ppm			
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> HAP-Zn	<i>E. coli</i> HAP-Ag	<i>E. coli</i> HAP-(Ag+Zn)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> HAP-Zn	<i>E. coli</i> HAP-Ag	<i>E. coli</i> HAP-(Ag+Zn)
0.459	0.169	0.126	0.254	0.495	0.080	0.184	<u>0.090</u>
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> HAP-Zn	<i>S. aureus</i> HAP-Ag	<i>S. aureus</i> HAP-(Ag+Zn)	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> HAP-Zn	<i>S. aureus</i> HAP-Ag	<i>S. aureus</i> HAP-(Ag+Zn)
1.355	0.091	0.049	0.314	1.027	0.190	0.104	<u>0.010</u>
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> HAP-Zn	<i>C. albicans</i> HAP-Ag	<i>C. albicans</i> HAP-(Ag+Zn)	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> HAP-Zn	<i>C. albicans</i> HAP-Ag	<i>C. albicans</i> HAP-(Ag+Zn)
0.364	0.317	0.149	0.027	0.242	0.017	0.035	<u>0.016</u>

D'après le tableau en dessus :

Souche 1 : *Escherichia coli* (0.459-0.495)

On note une croissance, très faible, des bactéries mises en contact des particules la poudre HAP-(Ag+Zn)-10000 ppm (DO : 0.09).

Souche 2 : *Staphylococcus aureus* (1.027-1.355)

On remarque qu'il y a une forte diminution de la croissance des bactériesensemencées avec la poudre HAP-(Ag+Zn)-10000 ppm (DO : 0.01).

Souche 3 : *Candida albicans* (0.242-0.364)

La plus forte diminution de la croissance bactérienne est également notée pour l'échantillon HAP-(Ag+Zn)-10000 ppm (DO : 0.016).

Donc selon les résultats de ce test, on peut dire que les deux bactéries testées *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* et *candida albicans* sont toutes sensibles à l'échantillon HAP-(Ag+Zn)-10000 ppm. Ce résultat vient confirmer les observations faites sur l'antibiogramme de *candida albicans* qui a montré une zone d'inhibition plus importante autour de HAP-(Ag+Zn)-10000 ppm par rapport à HAP-Ag-10000 ppm et HAP-Zn-10000 ppm.

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans ce travail nous avons choisi d'utiliser le procédé sol-gel pour l'élaboration de nos biomatériaux. Ce procédé a permis d'obtenir une hydroxyapatite carbonatée à une température de calcination de 500°C durant 1 heure. Les propriétés de l'hydroxyapatite ainsi élaborée sont étudiées après l'avoir renforcée par de la gélatine (10%, 30% et 50% en volume) et pour différents temps et températures de calcination (HAP calcinée à 600°C-1h, HAP calcinée à 600°C-6h et HAP calcinée à 900°C-3h) afin de voir leur effet sur sa bioactivité.

Les analyses par spectrophotométrie Infra-rouge (ATR-FTIR) et par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ont permis d'identifier les groupements fonctionnels de HAP et des matériaux biocomposites (HAP-gélatine) et de suivre l'évolution de la concentration de Ca dans le milieu SBF. L'imagerie par microscopie IR nous a permis d'avoir une idée sur la morphologie de surface. Les résultats de ces analyses ont montré que l'hydroxyapatite et les matériaux biocomposites élaborés sont bioactifs. Ces résultats semblent intéressants mais doivent être confirmés par d'autres techniques de caractérisation telles que la diffraction des rayons X (DRX), la microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (MEB/EDS).

Concernant l'effet antibactérien des poudres de HAP dopée avec l'argent et le zinc, en comparant les zones d'inhibitions et les densités optiques mesurées, les résultats ont montré que les poudres dopées possèdent une activité antibactérienne contre ces micro-organismes : *escherichia coli*, *staphylococcus aureus* et *candida albicans*. L'incorporation de l'argent et du zinc dans HAP semble avoir des effets inhibiteurs à la croissance des bactéries à une concentration de 10000 ppm. Donc il s'agit des poudres suivantes : HAP-Ag-10000 ppm, HAP-Zn-10000 ppm et HAP-(Ag+Zn)-10000 ppm.

Ainsi, nous avons décrit un simple protocole pour obtenir de l'hydroxyapatite biocomposite (HAP-gélatine) avec des propriétés bioactives et de l'hydroxyapatite dopée (HAP-Ag-Zn) avec des propriétés antibactériennes testée au contact des souches bactériennes à Gram positif et Gram négatif les plus courantes et contre un champignon de la famille des saccharomycetaceae.

CONCLUSION

En conclusion, le biomatériau élaboré dans ce travail est considéré comme un biomatériau composite, bioactif et antimicrobien pouvant être utilisé pour le comblement osseux.

Comme perspective, il est d'abord recommandé de compléter l'étude de la bioactivité par l'analyse microstructurale par diffraction des rayons X et microscopie électronique à balayage couplée à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (MEB/EDS). Il serait aussi intéressant de prolonger le temps d'immersion et de suivre l'évolution de Ca et P par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) et de faire les tests de microbiologie avec insertion d'autres agents antibactériens tels que la silice, le strontium, etc. Il est également souhaitable de tester d'autres méthodes pour l'élaboration du *scaffold* en gardant l'hydroxyapatite comme matrice de base et la gélatine comme agent porogène.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. Seddiki-Bougrassa and N. Messala. (2020). Tissus osseux, support de cours. Faculté de Médecine, université d'Oran. 10p.
- [2] T. Andrew-Taton. (2001). Nanotechnology. Boning up on biology, *Nature*, 412: 2-491.
- [3] M.C. De Vernejoul and P. Marie. (2008). *Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Editions: Médecine Sciences Publications, France. 370p.
- [4] O. Bentayeb. (2020). Le tissu osseux, support de cours. Département de Médecine, Université d'Annaba.
- [5] Servier Medical Art. (2005). Représentation schématique du cycle du remodelage osseux. <https://www.researchgate.net/profile/Antoine-Boyer>.
- [6] C. Alexandre. (1989). *Physiopathologie des maladies osseuses, le tissu osseux*. Editeurs: L. Teot, J. Vidal, J. Dssa. Sauramps Médical, Montpellier. pp. 163-169.
- [7] S. Amin and D.T. Felson. (2001). Osteoporosis in Men, *Rheum Dis Clinics of North America*, 27: 19-47.
- [8] H. Elbriak. (2004). Mécano-synthèse à sec de phosphates de calcium et de calcium-strontium d'intérêt thérapeutique: optimisation des conditions et aptitude à préparer des biocéramiques. Thèse de doctorat en sciences de la vie et de la santé, université de Montpellier.
- [9] H. Petite. (2002). La bio-ingénierie de la régénération osseuse, *M/S: medicine sciences*, 18: 995-1002.
- [10] A. Meddahi-Pellé, I. Bataille, P. Subra and D. Letourneur. (2004). Biomatériaux vasculaires : du génie biologique et médical au génie tissulaire, *M/S: medicine sciences*, 20: 679-684.
- [11] D. F. Williams. (1991). *Definitions in Biomaterials*, Second Consensus Meeting, Eur. Soc. Biomat. Edition: Elsevier, Chester, UK.
- [12] L.L. Hench and J. Wilson. (1993). *An introduction to Bioceramics*. Edition World Scientific.
- [13] K. Anselme. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials*, 21: 667-681.
- [14] L.L. Hench. (1991). Bioceramics: from concept to clinic, *Journal of the American Ceramic Society*, 74: 1487-1510.
- [15] C. Mauffrey, D. Seligson, P. Lichte, H.C. Pape and M. Al-Rayyan. (2011). Bone graft substitutes for articular support and metaphyseal comminution: what are the options? *Injury-international journal of the care of the injured*, 42: 35-39.
- [16] J.D. Santos. (2002). *Ceramics in medicine*, *Busines briefing: medical device manufacturing and technology*. 12p.
- [17] D. Mainard. Définitions données par GESTO (Association pour l'étude des Greffes et Substituts Tissulaires de l'Appareil Locomoteur). <http://www.maitrise-orthop.com/gesto/definition.shtml>
- [18] B.W. Cunningham, N. Hu, C.M. Zorn and P.C. McAfee. (2009). Bioactive titanium calcium phosphate coating for disc arthroplasty: analysis of 58 vertebral end plates after 6- to 12-month implantation, *The Spine journal*, 9: 836-845.
- [19] N. Vandecandelaere. (2012). *Élaboration et caractérisation de biomatériaux osseux innovants à base d'apatites phospho-calciques dopées*. Thèse de doctorat, université de Toulouse.

- [20] M. Pierre. (2009). Biocompatibilité - Biomatériaux - définitions- aspects fondamentaux. DESC de Chirurgie Pédiatrique, Paris. pp. 22-23.
- [21] L. Sedel and C. Janot. Biomatériaux. Faculté de Médecine Lariboisière, Paris et université Joseph Fourier - ILL, Grenoble. 27p.
- [22] L. Chetibi. (2014). Elaboration et étude des biomatériaux nanostructurés de type Hydroxyapatite/MWCNTs/TiO₂/Ti. Thèse de doctorat en sciences des matériaux. Faculté des Sciences, université Constantine 1.
- [23] G. Montel, G. Bonel, J.C. Trombe, J.C. Heughebaert et C. Rey. (1980). Progrès dans le domaine de la chimie des composés phosphores solides à structure d'apatite. Application à la biologie et au traitement des minerais, *Pure and Applied Chemistry*, 52: 973-987.
- [24] M.I. Kay, R.A. Young and A.S. Posner. (1964), Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature*, 204: 1050-1052.
- [25] S. Ciucă, I. Antoniac, C. Molagic and O. Trante. (2001). *Biomateriaux*, București, Editura Printech.
- [26] P. ducheyene, K.E. Healy, D. E.Grainger, D.W. Hutmacher and C.J. Kirkpatrick. (2011). *Metallic, ceramic and polymeric biomaterials*, *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, Oxford, 187.
- [27] T. Tsuchida, J. Kubo, T. Yoshioka, S. Sakuma, T. Takeguchi and W. Ueda, *J. Catal.* (2008). Reaction of ethanol over hydroxyapatite affected by Ca/P ratio of catalyst, *Journal of catalysis*, 259: 183-189.
- [28] Y.S. Wu, Y.H. Lee and H.C. Chang. (2009). Preparation and characteristics of nanosized carbonated apatite by urea addition with co-precipitation method, *Materials Science and Engineering: C*, 29: 237.
- [29] S.D. Garcia. (2013). *Les Hydroxyapatites, un système basique atypique modulable par la synthèse : vers l'identification des sites actifs*. Thèse de doctorat. Paris 6.
- [30] T. Tsuchida, J. Kubo, T. Yoshioka, S. Sakuma, T. Takeguchi and W. Ueda. (2009). Influence of preparation factors on Ca/P ratio and surface basicity of hydroxyapatite catalyst, *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 52: 51-59.
- [31] H.S. Liu, T.S. Chin, L.S. Lai, S.Y. Chiu, K.H. Chung, C.S. Chang and M.T. Lui. (1997). Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method, *Ceramics International*, 23: 19-59.
- [32] J.S. Earl, D.J. Wood and S.J. Milne. (2006). Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite, *Journal of Physics: Conference Series*, 26: 268.
- [33] M. Andrés-vergés, C. Fernández-González and M. Martínez-Gallego, (1998). A new route for the synthesis of calcium-deficient hydroxyapatites with low Ca/P ratio: both spectroscopic and electric characterization, *Journal of materials research*, 15: 2526-2533.
- [34] J. Liu, X. Ye, H. Wang, M. Zhu, B. Wang and H. Yan. (2003). The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method, *Ceramics International*, 29: 629-633.
- [35] Y. Zhang and J.J. Lu. (2008). A mild and efficient biomimetic synthesis of rodlike hydroxyapatite particles with a high aspect ratio using polyvinylpyrrolidone as capping agent, *Crystal Growth & Design*, 8: 2101-2107.

- [36] J.A. Rivera, G. Fetter and P. Bosch. (2011). Effet du pH sur la synthèse d'hydroxyapatite en présence de micro-ondes, *Revista Matéria*, 15: 506.
- [37] R.R. Rao, H.N. Roopa and T.S. Kannan, (1997). Solid-state synthesis and thermal stability of HAP and HAP - β TCP composite ceramic powders, *Journal of materials science: materials in medicine*, 8: 511-518.
- [38] D.M. Liu, T. Troczynski and W.J. Tseng. (2001). Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development, *Biomaterials*, 22: 1721-1730.
- [39] M. Santoro, A.M. Tataro and A.G. Mikos (2014). Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering, *Journal of controlled release*, 190: 210-218.
- [40] F. Portier. Biomateriaux collagène/gélatine: des phases cristal-liquides aux matériaux hybrides. (2016). Thèse de doctorat de physique et chimie des matériaux. Ecole doctorale ED 397 - Physique et chimie des matériaux, université Pierre et Marie Curie. France.
- [41] W. Babel, D. schulz, M. Giesen-Wiese, U. Seybold, H. Gareis, E. Dick, R. Schrieber, A. Schott and W. Stein. (2005). Gelatin. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH.
- [42] K. Rbii. (2010). Formation d'agrégats de haut poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse. Thèse de doctorat : pathologie, toxicologie, génétique et nutrition. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- [43] D.J.S. Hulmes (2008). Collagen diversity, synthesis and assembly. In: P. Fratzl (dir.) *Collagen-Structure and Mechanics*. New York: Springer US. pp: 15-47.
- [44] A. Yanovska, V. Kuznetsov, A. Stanislavov, E. Husak, M. Pogorielov, V. Starikov, S. Bolshanina and S. Danilchenko. (2016). Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatin composite materials for orthopaedic application, *Materials Chemistry and Physics*, 183: 93-100.
- [45] A.O. Elzoghby, W.M. Samy and N.A. Elgindy. (2012). Protein-based nano carriers as promising drug and gene delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 161: 38-49.
- [46] A. Borghi, M. Cojazzi, G. Fichera, A.M. Panzavolta and S. Roveri. (2000). Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 61: 451-459.
- [47] C.L. Popa, A. Deniaud, I. Michaud-Soret, R. Guégan, M. Motelica-Heino and D. Predoi. (2016). Structural and biological assessment of zinc doped hydroxyapatite nanoparticles, *Journal of Nanomaterials*, 1: 1-10.
- [48] E. Jallot, J.M. Nedelec, A.S. Grimault, E. Chassot, A. Grandjean-Laquerriere, P. Laquerriere and D. Laurent-Maquin. (2015). STEM and EDXS characterisation of physico-chemical reactions at the periphery of sol-gel derived Zn-substituted hydroxyapatites during interactions with biological fluids, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42: 205-210.
- [49] G. Daculsi, R.Z. Legeros, M. Heughebaert and I. Barbioux. (1990). Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics, *Calcified Tissue International*, 46: 20-27.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [50] I.R. Gibson, K.A. Hing, P.A. Revell, J.D. Santos, S.M. Best and W. Bonfield. (2002). Enhanced *in vivo* response to silicate-substituted hydroxyapatite, *Key Engineering Materials*, 203-206.
- [51] M. Okazaki. (1995). Crystallographic properties of heterogeneous Mg-containing fluoridated apatites synthesized with a two-step supply system, *Biomaterials*, 16: 703-707.
- [52] I.R. Gibson and W. Bonfield. (2002). Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite, *Journal of Biomedical Materials Research*, 59: 697-708.
- [53] E. Bertoni, A. Bigi, G. Cojazzi, M. Gandolfi, S. Panzavolta and N. Roveri. (1998). Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 72: 29-35.
- [54] A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichevan and R. Venketesan. (2010). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and Medicine*, 6: 103-109.
- [55] J.R. Morones-Ramirez, J.A. Winkler, C. S. Spina and J.J. Collins. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria, *Science Translational Medicine*, 5:190ra81
- [56] E. Fujii, and al. (2006). Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite, *Acta Biomaterialia*, 2: 69-74.
- [57] L.S. Hutley, J. Gowan and G. Milhaud. (1969). Calcium metabolism in manganese deficient and zinc-deficient rats, *Experimental Biology and Medicine* 130: 856-860.
- [58] G. Oner, B. Bhaumick and R.M. Bala. (1984). Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats. *Endocrinology* 114: 1860-1863.
- [59] C.O. Molokwu and Y.V. Li. (2006). Zinc homeostasis and bone mineral density. *Ohio Research and Clinical Review*. Ohio University, Athens.
- [60] Y.H. Koh, K.H. Choi and I.K. Park. (1998). Effects of niacin deficiency on the levels of soluble proteins and enzyme activities in various tissues of Japanese quail, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30: 943-953.
- [61] B.L. Vallee and K.H. Falchuk. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73: 79-118.
- [62] G.R. Sauer, D.M. Smith, M. Cahalane, L.N. Wu and R.E. Wuthier. (2003). Intracellular zinc fluxes associated with apoptosis in growth plate chondrocytes, *Journal of Cellular Biochemistry*, 88: 954-969.
- [63] C.S. Ciobanu, F. Massuyeau, L.V. Constantin and D. Predoi. (2011). Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C, *Nanoscale Research Letters*, 6: 613-620.
- [64] C.P. Doherty, and al.. (2002). Cutting. Malnutrition, zinc supplementation and catch-up growth: Changes in insulin-like growth factor I, its binding proteins, bone formation and collagen turnover, *Clinical Endocrinology*: 57, 391-399.

- [65] S. Chernousova and M. Epple. (2013). Silver as an antibacterial agent: ion nanoparticule, and metal. *Angewandte Chemie International Edition - Wiley Online Library*. pp. 1636-1653.
- [66] S. Eckhardt, P. S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese and K. M. Fromm. (2013). Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine, *Chemical Reviews*, 13: 4708-4754.
- [67] J.S. Clement, P.S. Jarrett. (1994). Antibacterial silver, *Metal Based Drugs*, 1: 467-482.
- [68] A. J. Tande and R. Patel. (2014). Prosthetic joint infection, *Clinical Microbial Review*, 27: 302-345.
- [69] R.J. Gordon and F.D. Lowy. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clinical Infectious Diseases*, 46: 350-359.
- [70] A. Burns, et al. (2014). A longitudinal study of *Staphylococcus aureus* colonization in pigs in Ireland, *Veterinary Microbiology*, 174: 504-513.
- [71] M.C. Porrero, et al. (2014). Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain, *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 4865-4870.
- [72] H.F.L. Wertheim, D.C. Melles, M.C Vos, W.V. Leeuwen, A.V. Belkum, H.A. Verbrugh, J.L. Nouwen. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*, 5: 751-762.
- [73] E. Sevin, O. Larmaraud-Sevin, and P. Legrand. (1999). Approche moléculaire de la résistance à la méticilline de *Staphylococcus aureus*, *Revue Française des Laboratoires*, 315: 25-31.
- [74] Z. Pei, L. Bian, H. Zhang, Y. Gao, H. Ma (2014). Cloning, expression, and purification of a new antibacterial substance gene from Larvae of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), *Journal of Insect Science*, 14: 253.
- [75] B. Couture. (1997). *Bactériologie médicale, troisième édition. Sciences appliqués à la médecine. Décarie Editeur Québec.*
- [76] L. Le Minor, M.Y. Popoff and J. Bockemühl (1990). Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, 141: 1173-1177.
- [77] J.S. Greatorex and G.M. Thorne. (1994). Humoral immune responses to Shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects, *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1172-1178.
- [78] H. Ghebru, (1988). Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise des sciences vétérinaires en microbiologie immunologie, Nantes.
- [79] M.A. Pfaller and D.J. Diekema, (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem, *Clinical Microbiology Reviews*, 20: 133-163.
- [80] S. Benedict and J. Colagreco (1994). Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS, *Cancer Nursing*, 17: 411-417.
- [81] M.A. Pfaller, R.N. Jones, G.V. Doern, H.S. Sader, S.A. Messer, A. Houston, S. Coffman and R. J. Hollis, (2000). Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998, *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 747-751.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [82] W.S. Chu, B.B. Magee and P.T. Magee. (1993). Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome, *Journal of Bacteriology*, 175: 6637-6651.
- [83] Y. Graser, M. Volovsek, J. Arrington, G. Schonian, W. Presber, T. G. Mitchell and R. Vilgalys. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 12473-12477.
- [84] J. Buffo, M.A. Herman and D. R. Soll. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*, *Mycopathologia*, 85: 21-30.
- [85] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro. (1990). Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *Journal of Biomedical Materials Research*, 24: 721-734.
- [86] Philippe Galez. (2011). Techniques spectroscopiques d'analyse / Absorption atomique & émission de flamme. Mesures Physiques Annecy.
- [87] T. Kokubo and H. Takadama. (2006). How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity, *Biomaterials*, 27: 2907-2915.
- [88] F.Z. Mezahi. (2009). Caractérisations physico-chimiques et cinétique de bioactivité des biomatériaux : hydroxyapatite & verre bioactif 52S4 élaboré par fusion et par voie sol-gel. Thèse de doctorat en sciences en physique, option métallurgie. Université de Constantine.
- [89] H. Kim, T. Himeno, T. Kokubo, T. Nakamura. Process and Kinetics of Bone-like Apatite Formation on Sintered Hydroxyapatite in a Simulated Body Fluid. *Biomaterials*; 2005; 26: 4366-4373
- [90] X. Fan, J. Chen, J.P. Zou, Q. Wan, Z.C. Zhou and J.M. Ruan. (2009). Bone-like apatite formation on HA/316L stainless steel composite surface in simulated body fluid. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 19: 347-352.
- [91] A.Z. Alshemary, M. Akram, Y.F. Goh, U. Tariq, F.K. Butt, A. Abdolahi, R. Hussain. (2015). Synthesis, characterization, *in vitro* bioactivity and antimicrobial activity of magnesium and nickel doped silicate hydroxyapatite, *Ceramics International*, 24 B: 11886-11898.
- [92] D.M. Liu, Q. Yang and T. Troczynski. (2002). Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrate, *Biomaterials*, 23: 691-698.
- [93] D.M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski and W.J. Tseng. (2002). Structural evolution of sol-gel -derived hydroxyapatite, *Biomaterials*, 23: 1679-1687.
- [94] A. Adeogun, M. Idowu and S. Kareem. (2019). Synthesis and characterization of Zn-doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies, *Heliyon* 5: e01716.
- [95] N. Rameshbabu, T.S. Sampath Kumar, T.G. Prabhakar, V.S. Sastry, K.V.G.K. Murty and K. Prasad Rao. (2007). Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80: 581-591.
- [96] P. Silva-Holguin and S. Reyes-Lopez. (2020). Synthesis of Hydroxyapatite-Ag composite as antimicrobial agent, *Dose-Response*, 1: 1-14.

ANNEXES

Tableau A1 : Composition de la Gélose de Mueller-Hinton⁸.

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17g
Extrait de viande	2g
Amidon	1.5g
Calcium	20 à 25mg
Magnésium	10 à 12.5mg
Agar	15g
pH	7.4 ± 0.2
Eau distillée	1 L

⁸ Source : <https://microbiologiemedicale.fr/gelose-mueller-hinton/>

Tableau A2 : Résultats des mesures des absorbances SAA

Echantillon	Absorbance (%)	Concentration (mg/L)
HAP/G-0%-J3	0.144	27.7376
HAP/G-0%-J7	0.389	57.9936
HAP/G-0%-J14	0.178	34.3560
HAP/G-0%-J21	0.071	13.3135
HAP/G-10%-J3	0.157	30.1935
HAP/G-10%-J7	0.170	32.8089
HAP/G-10%-J14	0.168	32.4974
HAP/G-10%-J21	0.187	36.0807
HAP/G-30%-J3	0.141	27.0226
HAP/G-30%-J7	0.139	26.7672
HAP/G-30%-J14	0.137	26.3096
HAP/G-30%-J21	0.141	27.1052
HAP/G-50%-J3	0.196	37.9357
HAP/G-50%-J7	0.238	46.2177
HAP/G-50%-J14	0.247	47.9350
HAP/G-50%-J21	0.286	55.5599
HAP-500-1h-J0	0.312	60.7774
HAP-500-1h-J7	0.319	62.1835
HAP-600-1h-J0	0.330	64.3667
HAP-600-1h-J7	0.317	61.6702
HAP-600-6h-J0	0.319	62.1724
HAP-600-6h-J7	0.311	60.5288
HAP-900-3h-J0	0.218	42.1972
HAP-900-3h-J7	0.177	34.1954

Résumé : Parmi les biomatériaux de substitution synthétiques, l'hydroxyapatite est la biocéramique la plus employée à cause de ses propriétés de bioactivité. Dans ce mémoire, la bioactivité de l'hydroxyapatite (HAP) élaborée par procédé sol-gel est étudiée après variation des paramètres de calcination (500°C-1h, 600°C-1h, 600°C-6h et 900°C-3h) et après l'avoir renforcée par la gélatine (10%, 30% et 50% en volume). L'activité antibactérienne de l'hydroxyapatite préparée est testée après l'avoir dopée avec des ions métalliques (Ag et Zn). Les résultats de la spectrométrie d'absorption atomique et de la spectrophotométrie-microscopie infrarouge ont montré que la nature de la couche de HAP carbonatée (*bone-like apatite*) susceptible de se former à la surface des biocomposites (HAP-gélatine) et de HAP pure calcinée à différents temps et températures dépend de la structure du matériau immergés dans la solution physiologique (SBF). Ces analyses ont également montré que quelle que soit la température (ou temps) de calcination de HAP, celle-ci peut induire la formation d'une couche apatitique à sa surface après un temps d'immersion dans le SBF de 7 jours. Une teneur de HAP en gélatine à 50% a pour effet de retarder le processus de dissolution des ions de Ca et la formation de la couche d'apatite carbonatée. Les résultats du test antibactérien ont révélé que les microorganismes testés : *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* et *candida albicans* ont montré une sensibilité à la poudre co-dopée « HAP-(Ag+Zn) » à une concentration de 10.000 ppm.

Mots clés : Biomatériau ; Hydroxyapatite ; Composite ; Gélatine ; Bioactivité ; Antibactérien.

Abstract: Among the substitute biomaterials synthesized, hydroxyapatite is the most widely used bioceramic due to its bioactivity properties. In this study, the bioactivity of hydroxyapatite (HAP) produced by sol-gel process is studied by varying the calcination parameters (500°C-1h, 600°C-1h, 600°C-6h and 900°C-3h) and after adding gelatin (volumes : 10%, 30% and 50%) . The antibacterial activity of the prepared hydroxyapatite was tested after doping with metal ions (Ag and Zn). The results of atomic absorption spectrometry and infrared spectrophotometry-microscopy showed that the nature of the carbonated HAP layer (*bone-like apatite*) formed on the surface of biocomposites (HAP-gelatin) and pure HAP (calcined at different times and temperatures) depends on the structure of the material in contact with the body fluid solution (SBF) medium. These analyzes also showed that whatever the temperature (or time) of calcination of HAP, this can induce the formation of an apatite layer on its surface after an immersion time in the SBF of 7 days. A gelatin content of 50% in HAP has the effect of delaying the process of dissolution of Ca ions and the formation of the carbonate apatite layer. The results of the antibacterial test revealed that the microorganism tested, *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* and *candida albicans*, showed sensitivity to the co-doped powder "HAP- (Ag + Zn)" at a concentration of 10,000 ppm.

Keywords: Biomaterial; Hydroxyapatite; Composite; Gelatin; Bioactivity; Antibacterial.

ملخص: من بين المواد الحيوية البديلة التي تم تصنيعها، تعتبر الهيدروكسيباتيت أكثر أنواع السيراميك الحيوي استخدامًا نظرًا لخصائصه الحيوية. في هذه الرسالة، تمت دراسة النشاط الحيوي للهيدروكسيباتيت الناتج عن عملية سول-جل بتغيير درجة حرارة ووقت التكلين (500 درجة مئوية ساعة واحدة، 600 درجة مئوية ساعة واحدة، 600 درجة مئوية 6 ساعات، 900 درجة مئوية 3 ساعات) وبعد إضافة الجيلاتين (10%، 30%، 50% من حيث الحجم). تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للهيدروكسيباتيت المحضر بعد إضافة الأيونات المعدنية Ag و Zn. أظهرت نتائج مطياف الامتصاص الذري والفحص المجهرى بالأشعة تحت الحمراء أن طبقة الهيدروكسيباتيت الكربونية (مشابهة للعظم) المحتمل أن تتشكل على سطح المركبات الحيوية-الهيدروكسيباتيت-الجيلاتين-والهيدروكسيباتيت النقية المحطرة في أوقات ودرجات حرارة مختلفة تعتمد على بنية المادة التي تلامس المحلول الفيزيولوجي (SBF). أظهرت هذه التحليلات أيضًا أنه بغض النظر عن درجة حرارة (أو وقت) التكلين يمكن أن يؤدي ذلك إلى تكوين طبقة أباتيتية على سطحها بعد وقت غمر في SBF لمدة 7 أيام. إن الهيدروكسيباتيت التي تحتوي على الجيلاتين بنسبة 50% لها تأثير في تأخير عملية انحلال أيونات الكالسيوم وتكوين طبقة الأباتيت الكربونية. أظهرت نتائج اختبار مضاد الجراثيم أن الكائنات الحية الدقيقة التي تم اختبارها :

candida albican و *escherichia coli* ، *staphylococcus aureus*

أظهرت حساسية تجاه المسحوق المشترك المنشط "(HAP- (Ag + Zn))" بتركيز 10000 جزء في المليون .

الكلمات الرئيسية: المواد الحيوية ؛ هيدروكسيباتيت ؛ مركب ؛ الجيلاتين ؛ النشاط الحيوي ؛ مضاد للجراثيم.