

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université D^r. Tahar Moulay SAIDA

Faculté : Technologie

Département : Génie des Procédés

جامعة د الطاهر مولاي سعيدة

كلية التكنولوجيا

قسم هندسة الطرائق



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

*Pour l'obtention du diplôme Master
En Génie des Procédés*

Option : Génie pharmaceutique

Présenté par :

KHATER Mohamed Elamine

KAOUDJ Abdesselam

**Elaboration et caractérisation d'un matériau à base de
l'hydroxyapatite : Application sur l'activité antimicrobienne**

Soutenue Le 20/06/2023 Devant le jury composé de :

M^r Benhlime. A	MCA	Université Dr. MOULAY Taher Saida	Président
Mme Ramdani. A	Pr	Université Dr. MOULAY Taher Saida	Encadrante
Mme Belaarbi. O	MAA	Université Dr. MOULAY Taher Saida	Examinatrice

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciements

*En premier, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la santé,
le courage et la patience pour terminer ce travail.*

*Recevez ici nos sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous nous avez accordés tout
le long de ce travail. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse*

Pr RRAMDANI Amina

*Nous tenons à remercier également les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant
d'examiner et juger ce travail :*

Dr BENHELIMA Abdelkader et Mme BELARBI Ouassyla.

*Nous réservons un remerciement très chaleureux à Dr. TOUHAMI. M pour son
encouragement et son soutien durant l'année universitaire.*

À Dr. DAOUDI. S pour son aide précieuse et sa patience.

*À Dr. BENHELIMA.A et Dr AMMAM. A pour leurs conseils et leur participation
à la réalisation des tests antimicrobiens.*

*À Dr. KADDECH.A pour ses efforts considérables et pour nous avoir accompagnés
dans ce travail jusqu'à la dernière minute.*

*Nous remercions aussi l'équipe du laboratoire de recherche de deux départements de Génie des Procédés
et de Chimie (Mme DJELLOULI Zahra et Mr BENMHAMED).*

*Je remercie enfin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribués de près
ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.*

Dédicace

C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce modeste travail qui est le fruit de ma profonde reconnaissance

à

La lumière et le pilier de ma vie mes cher parents Fatima et Hakim, qu'Allah les garde et les protège.

à mes frères Amine, Redouane, Azzedine et Khaled

à les anges de la famille Zakaria , selsabil Ines , Hakim.

à mes chères sœurs amel et hajer.

à mes très cher amis Amine ,reda ,latif , bouthaina , manel , amina , sofien ,yocef , yocef , Fayek, Hamouda, Hicham et Farouk.

à toutes ma familles KACUDj et ARIF

Tous mes êtres chers dont je ressens la joie et l'amour.

Abdesselam

Dédicace

C'est avec toute l'ardeur de mes sentiments que je dédie ce modeste travail qui est le fruit de ma profonde reconnaissance

à

La lumière et le pilier de ma vie mes cher parents Houria et Abdelkader, qu'Allah les garde et les protège.

à mes sœurs Fatima, Imene, Fatma et Hadjer

*Aux anges de la famille Aya, Tarek, Ines, Farouk, Alaa
Et Rafik*

*à mes très cher amis Aïssa, Saidou, Kader, Zaki, Abdou,
Hichem, Haïthem, Yacine, Abdou, Hiba, Wiem, Mounia,
Mokhtaria, Hadjer, Dina, Wafaa, Setti et Manel.*

À toute ma famille KHAÏER

Tous mes êtres chers dont je ressens la joie et l'amour.

MOHAMMED

Liste des figures

N° de figure	Titre de figure	N° de Page
CHAPITRE I		
I.1	Structure de l'apatite	6
I.2	Exemples de substitutions dans la structure apatitique.	7
I.3	Surfaces d'un cristal d'Hydroxyapatite	8
I.4	Projection de la structure de HA sur les plans (001) et (010).	9
I.5	Quelque source d'hydroxyapatite naturelle.	14
I.6	Méthode par précipité.	16
I.7	Synthèse de l'hydroxyapatite par méthode Hydrothermale.	17
I.8	Méthode sol-gel.	18
I.9	Implants dentaires.	20
I.10	Joint artificiel.	20
I.11	Mise en place d'une cale en Hydroxyapatite, après Ostéome tibiale.	20
CHAPITRE II		
II.1	Forme des bactéries	28
II.2	Structure de la paroi des bactéries à gram positif et gram négatif.	30
II.3	Image MEB de Escherichia coli.	32
II.4	Image MEB de Staphylococcus aureus	33
II.5	Concentration minimale inhibitrice.	36
II.6	Méthode d'obtention des puits sur le milieu de culture solide	37

CHAPITRE III		
III.1	La filtration.	43
III.2	Séchage du produit obtenu.	43
III.3	Schéma représentant les étapes de préparation de l'hydroxyapatite synthétisé.	44
III.4	Synthèse de matériau HAP-N	46
III.5	Synthèse de matériau HAP-Zn	46
III. 6	Schéma représentant les étapes de préparation de HAP-zn	47
III.7	L'appareil est de mark SHIMADZU FTIR-8300S PC.	48
III.8	Appareil d'analyse DRX	50
III.9	Schéma d'un diffractomètre à compteur.	50
III.10	Matériel utilisé dans la partie biologique (l'activité antimicrobien)	51
CHAPITRE IV		
IV.1	Spectre IR de HAP naturel	55
IV.2	Spectre IR de HAP synthétisé par hydroxyde de calcium.	56
IV.3	Représentés le spectre IR des poudres d'hydroxyapatite commercialisé.	57
IV.4	Représentés le spectre IR des poudres d'hydroxyapatite synthétisé par zinc chloride.	57
IV.5	Diffractogrammes des poudres de coquillages crues.	59
IV.6	Diffractogrammes de l'hydroxyapatites élaborée naturelle HAp-N	60
IV.7	Diffractogrammes de l'hydroxyapatites élaborée HAp-S	60
IV.8	Diffractogrammes de l'hydroxyapatites commerciale HAp-S	60
IV.9	Diffractogrammes de l'hydroxyapatites dopée par le Zinc HAp-Zn.	61
IV.10	Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'E. Coli.	62
IV.11	Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'S. Aureus	62
IV.12	Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'C. Albicans.	63
IV.13	Influence de différents échantillons liquides sur la croissance d'E. Coli.	64
IV.14	Influence de différent échantillon liquide sur la croissance d'S. Aureus	64
IV.15	Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'C. Albicans.	64

Liste des tableaux

	CHAPITRE I	
I.1	Les différents phosphates de calcium Usuel.	5
I.2	Principaux phosphates de calcium classés par ordre de solubilité décroissante du haut vers le bas.	11
I.3	Les propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite	12
	CHAPITRE II	
II.1	Classification d'Escherichia coli.	31
II.2	Classification de Staphylococcus aureus.	32
	CHAPITRE III	
III.1	Les réactifs utilisés pendant la synthèse et l'application.	42
	CHAPITRE IV	
IV.1	La zone d'inhibition par rapport les poudres de HAP	63
IV.2	La zone d'inhibition par rapport les poudres de HAP	65

Liste d'abréviation

Abréviatiion	Signification
HAP	Hydroxyapatite Phosphocalcique
HAP-s	Hydroxyapatite synthétisé par Ca(OH)_2
HAP-n	Hydroxyapatite naturelle
HAP-Zn	Hydroxyapatite synthétique par ZnCl_2
IR	Infra-Rouge
IRTF	Spectres Infrarouges par Transformée de Fourier
DRX	Diffraction des Rayons X
MEB	Microscopie Électronique à Balayage

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....1

PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : L'HYDROXYAPATITE

I. Introduction5

I.1. Le phosphate de calcium5

I.2. Apatite..... 6

I.2.1. Composition et structure des apatites.....6

I.2.2. Substitution du réseau d'apatite.....7

I.3. L'hydroxyapatite.....7

I.3.1. Structure de l'Hydroxyapatite.....8

I.3.2. Propriétés de L'Hydroxyapatite.....9

I.3.2.1. Stabilité thermique10

I.3.2.2. Stabilité chimique.....10

I.3.2.3. Solubilité de l'hydroxyapatite10

I.3.2.4. Propriétés mécaniques.....11

I.4. Substitutions.....12

I.4.1. Substitution d'ions de même charge mais de tailles différentes12

I.4.2. Substitution d'ions de charge et/ou de taille différente12

I.4.3. Hydroxyapatite substituée au Zn (HAP-Zn)13

I.5. Origine des Hydroxyapatite.....13

I.5.1. Hydroxyapatite Synthétique.....14

I.5.2. Hydroxyapatite Naturelle14

I.6. Les méthodes de synthèse.....15

I.6.1. Synthèse par voie humide.....15

I.6.1.1. Synthèse par précipitation.....15

I.6.1.1.1. La méthode par double décomposition.....16

I.6.1.1.2. La méthode par neutralisation.....16

I.6.1.2. Synthèse par voie hydrothermale.....17

I.6.1.3. Synthèse par voie sol-gel.....17

I.6.2. Synthèse par voie sèche.....18

I.7. Utilisation des apatites.....19

I.7.1. Application biomédicale19

I.7.2. Applications en archéologie et climato-paléontologie.....21
I.7.3. Applications dans le domaine de traitement de l'eau.....21
I.7.4. Autres applications chimiques.....21
I.8. Conclusion.....22

REFERENCE BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE II : GENERALITE SUR LE MONDE MICROBIEN

II. Introduction27
II.1. Le monde microbien.....27
II.1.1. Morphologie.....27
II.1.2. Matériel génétique.....28
II.1.3. Paroi cellulaire28
II.2. Classification des bactéries.....29
II.2.1. Bactéries à Gram négatif29
II.2.1.1. Bacilles à Gram négatif29
II.2.1.2. Les Cocci à Gram négatif29
II.2.2. Les Bactéries à Gram Positif.....29
II.2.2.1. Les Bacilles à Gram positif.....30
II.2.2.2. Les Cocci à Gram positif30
II.3. Bactéries étudiées.....30
II.3.1. Escherichia coli.....30
II.3.2. Staphylococcus aureus31
II.4. Méthode de classement33
II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des matériaux..... 33
II.5.1. Standardisation des inocula des germes cibles 33
II.5.2. Détermination des zones d'inhibition (Antibiogramme)33
II.5.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé (par papier Buvard)34
II.5.4. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Antibiotique + matériau)35
II.5.5. Méthode de diffusion en milieu gélosé (diffusion en puits)35
II.5.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)35
II.5.7. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)36
II.5.8. Modes d'action des agents antimicrobiennes.....36

II.5.9. La technique des puits	36
II.5.10. Technique des disques	37
II.6. Activité antibactérienne de Cuivre.....	37
II.6.1. Résistance des bactéries aux cations métalliques Cu^{+2}	37
I.7. Conclusion	38
REFERENCE BIBLIOGRAPHIE	

PARTIE B : ETUDE EXPERIMENTAL

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODE

III. Introduction.....	42
III.1. Produits utilisés.....	42
III.2. Elaboration d'hydroxyapatite.....	42
III.2.1. Méthode expérimentale de synthèse.....	42
III.2.1.1. Hydroxyapatite synthétique par $\text{Ca}(\text{OH})_2$	42
III.2.1.2. Hydroxyapatite naturel.....	45
III.2.1.3. Hydroxyapatite dopée par ZnCl_2	46
III.3. Les techniques de caractérisation.....	48
III.3.1. Analyse spectroscopie IR.....	48
III.3.2. Analyse par diffraction des rayons X.....	49
III.4. Activité antibactérienne	50
III.4.1. La méthodes utilisées.....	50
III.4.1.1. Méthode de diffusion en milieu solide.....	50
III.5. Les souches microbienne.....	51
III.6. Conclusion	52
REFERENCE BIBLIOGRAPHIE	

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV. Introduction.....	55
IV.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)	55
IV.2. Analyse par diffraction par des rayons X.....	58
IV.3. Analyse le résultat de l'activité antimicrobienne	62
IV.3.1. Résultat de l'activité antimicrobienne.....	62
IV.3.1.1. Résultats des échantillons se forme solide	62
IV.3.1.2. Résultats des échantillons se forme dissous.....	64
IV.4. Conclusion	70
CONCLUSION GENERALE.....	70

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'hydroxyapatite (HAP) est un composé minéral de phosphate de calcium qui joue un rôle crucial dans plusieurs domaines traitement des eaux et l'application biomédicale [1].

Il s'agit de la forme cristalline de l'apatite, un minéral abondant dans le tissu osseux des êtres humains et des animaux et dans les dents, les coquilles d'œufs, Les coquillages et une autre obtenue à partir de dépôts minéraux comme les roches de phosphate tel que le phosphate noir [2].

En raison de sa similitude avec la structure minérale naturelle des os, l'hydroxyapatite est largement utilisée dans plusieurs domaines notamment la médecine régénérative, de l'orthopédie et de la dentisterie. Elle est utilisée pour la fabrication de biomatériaux, tels que des implants osseux, des revêtements de surface pour les prothèses et des substituts osseux. L'objectif est de favoriser la régénération et la réparation des tissus osseux endommagés ou perdus [3].

L'hydroxyapatite est appréciée pour sa biocompatibilité, c'est-à-dire sa capacité à interagir favorablement avec les tissus biologiques sans provoquer de réactions nocives. Elle peut être synthétisée en laboratoire selon différentes méthodes [4].

Le but de notre travail est de synthétiser des biomatériaux à base de l'hydroxyapatite et comparer leur comportement structural avec l'hydroxyapatite commerciale en appliquant les techniques de caractérisation (DRX et IRTF), et aussi à leur effet sur l'activité antimicrobienne comme inhibiteur microbien pour évaluer leur impact avec certaines bactéries et microbes.

Ce mémoire intitulé : « **Elaboration et caractérisation d'un matériau à base de l'hydroxyapatite : Application sur l'activité antimicrobienne** ».

Les plans de travail adopté sont comme suit :

Dans le 1er Chapitre, nous présentons une étude bibliographique sur généralités de l'hydroxyapatite, sa structure, ces propriétés et ces domaines d'application.

Le 2ème Chapitre consiste à une partie d'une étude détaillée des bactéries et de l'activité antimicrobienne et des méthodes pour leur évaluation.

Le 3ème chapitre présente la description de la méthode expérimentale de synthèse de différentes hydroxyapatites au laboratoire, et le principe des différentes techniques de caractérisation utilisées (IR ; DRX) ainsi que la méthode d'application antimicrobiennes.

Dans le quatrième chapitre sont exposés tous les résultats obtenus par voies expérimentales, suivi de leurs interprétations respectives.

Enfin, nous terminons ce travail par une conclusion générale dans laquelle nous regroupons l'essentiel des différents résultats obtenus.

Référence

- [1]. BALASSE, Marie, BRUGAL, Jean-Philippe, DAUPHIN, Yannick, *et al. Messages d'os : archéométrie du squelette animal et humain*. Archives contemporaines, 2015
- [2]. LAACHER LAMIA, LABIDI Chams Edoha. Détermination des paramètres qui influent sur la synthèse d'hydroxyapatite
- [3]. ADDA BOUCHRA, EZZIANI Maria. Élaboration et caractérisation des biomatériaux de substitution orthopédique et dentaire : Etude comparative. 2021.
- [4]. AMINA BEGHOURA, ABIR BEN ZATTA. Etude physico-chimique comparative entre l'hydroxyapatite élaboré à partir des précurseurs naturel et synthétique

PARTIE A
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
L'HYDROXYAPATITE

I. Introduction

Nous allons explorer en détail les caractéristique des hydroxyapatites, leurs applications cliniques et leur rôle dans la recherche biomédicale, en mettant en évidence leur importance croissante dans le domaine de la santé et de la médecine régénérative.

I.1. Le phosphate de calcium

Intérêt sur le phosphate de calcium, notamment en raison de sa biocompatibilité et de sa structure cristalline qui permet diverses substitutions de cations et/ou d'anions. En fait, le phosphate de calcium a souvent une forte capacité à immobiliser les ions lorsqu'il est en contact avec des solutions aqueuses. Ils forment des familles de composés aux structures et compositions différentes et peuvent se présenter sous différentes formes hydrates, hydroxydes ou anhydrides. [1,2].

Les propriétés de dissolution de ces phosphates de calcium dépendent de leurs propriétés physico-chimiques, notamment du rapport molaire Ca/P de la structure cristalline et de la surface spécifique. Ainsi, plusieurs familles d'ortho phosphates de calcium peuvent être définies selon le rapport molaire Ca/P [3,4].

Tableau I.1 : Les différents phosphates de calcium Usuel.

Abréviation	Phosphates de calcium	Formule	Ca/P
TTCP	Phosphate tétracalcique	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}_2$	2,00
HAP	Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
β TCP	Phosphate tricalcique anhydre	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50
OCP	Phosphate octocalcique	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6,5\text{H}_2\text{O}$	1,33
DCPD	Phosphate dicalcique d'hydraté	$\text{CaHPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
DCPA	Phosphate dicalcique anhydre	$\text{CaH}(\text{PO}_4)$	1,00
PPC	Pyrophosphate de calcium	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}$	1,00
MCPM	Phosphate monocalcique mono	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, \text{H}_2\text{O}$	0,50
PCP	Hydrate Phosphate monocalcique anhydre	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,50

I.2.Apatite

Le nom d'apatite est donné à tout composé minéral de formule générale (Me)(XO)(Y), où M est un cation divalent (Ca^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} ...) et XO_4 est un anion trivalent (PO_4^{3-} , VO , AsO_4^{3-} , ...) et Y sont des anions monovalents (OH^- , Cl^- , F^- , ...) [5].

I.2.1. Composition et structure des apatites

Les apatites sont des composés de formule générale : $\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$ avec :

- Me^{2+} est un cation divalent généralement Ca^{2+} ou encore Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ...
- XO_4^{3-} est un groupement anionique trivalent comme PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , MnO_4^{3-} ...
- Y^- est un anion monovalent, le plus souvent OH^- , Cl^- , F^- ...

L'apatite cristallise dans le système hexagonal du groupe spatial P /m 63 (P correspond à une maille primitive, 63 correspond à une rotation de $2\pi/3$ autour de l'axe c suivi d'une translation $\frac{1}{2}$ parallèlement à c, m pour miroir perpendiculaire à c à $z = \frac{1}{2}$). Caractérisé par un empilement quasi compact des groupements phosphates, qui forme 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 les atomes des autres ions calcium, notés Ca (II), et occupé par les ions OH^- . La taille de ce dernier tunnel (3 Å pour l'hydroxyapatite phosphocalcique, notée HAP) confère aux apatites des propriétés d'échangeurs d'ions [5].

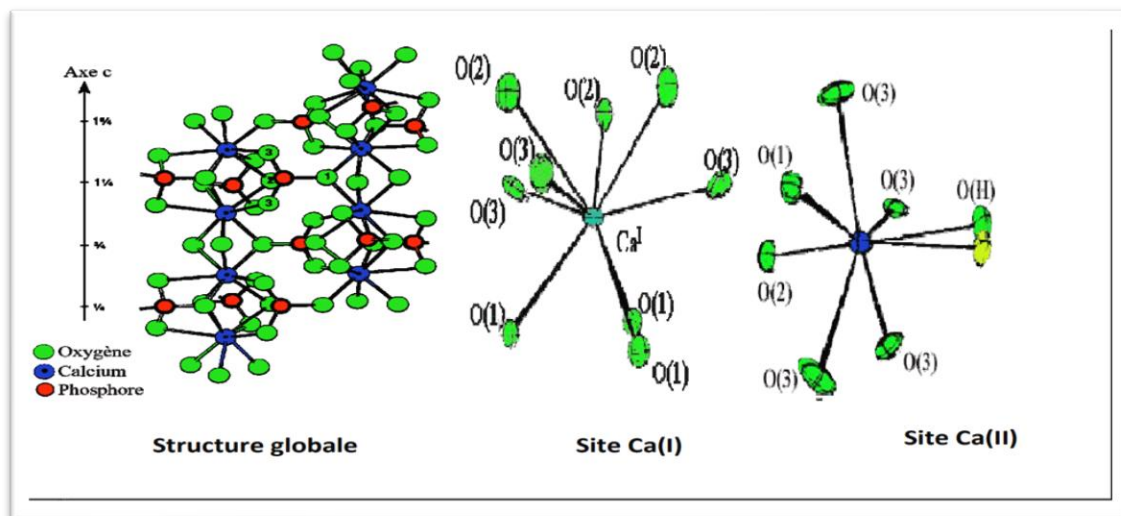


Figure I.1 : structure de l'apatite

I.2.2. Substitution du réseau d'apatite

La présence de tunnels joue un rôle très important dans les propriétés physicochimiques de l'apatite. Par conséquent, les apatites peuvent se comporter soit comme des échangeurs d'ions, soit comme des composés dans lesquels différents ions peuvent se substituer. Une capacité de substitution pour de nombreuses espèces anioniques ou cationiques a été décrite dans la littérature.

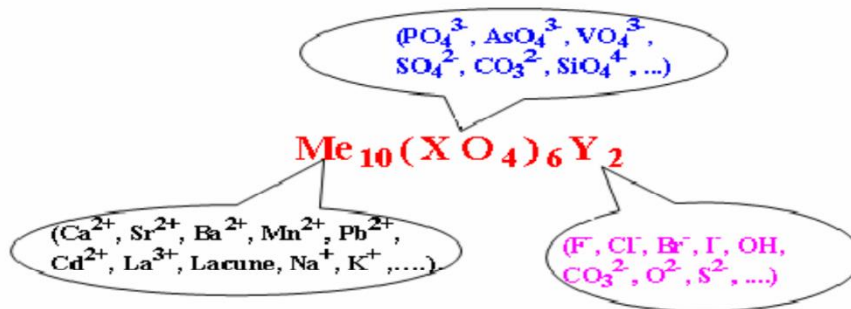


Figure I.2 : Exemples de substitutions dans la structure apatitique.

I.3.L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite (HAP), de formule chimique Ca₁₀(PO₄)₆OH₂, est l'apatite la plus courante. C'est une substance inorganique qui est naturellement obtenue à partir de sources d'apatite de calcium telles que les os, les coquillages et les coraux.

L'hydroxyapatite est un matériau biocompatible et bioactif qui peut être utilisé pour réparer les tissus humains calcifiés endommagés [6].

Une fois implanté, l'HAP peut être étroitement lié à l'os environnant. Tissu. Cependant, la réponse biologique des céramiques HAP dépend de leur composition chimique, de leur pureté de phase et de leurs propriétés microstructurales (c'est-à-dire ça : P, cristallinité, porosité, granulométrie et surface) [7].

Pour que l'hydroxyapatite soit considérée comme stœchiométrique, le rapport molaire Ca/P doit être de 1,67. Toutes les autres apatites avec un rapport molaire Ca/P < 1,67 à une carence en calcium [8].

I.3.1. Structure de l'Hydroxyapatite

La forme apatitique la plus connue est le fluor apatite de forme idéale $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$; Lorsque les ions fluor sont substitués par des ions OH^- dans le fluor apatite, on obtient l'Hydroxyapatite, dont la maille cristalline contient un motif $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [9]. L'Hydroxyapatite cristallise dans le système hexagonal, groupe spatial $\text{P6}_3/\text{m}$, qui résulte d'un empilement de groupements PO_4 , qui forment deux types de tunnels parallèles à l'axe (c) dans lesquels se localisent les ions Ca^{2+} [10], représenté dans la figure 3[11].

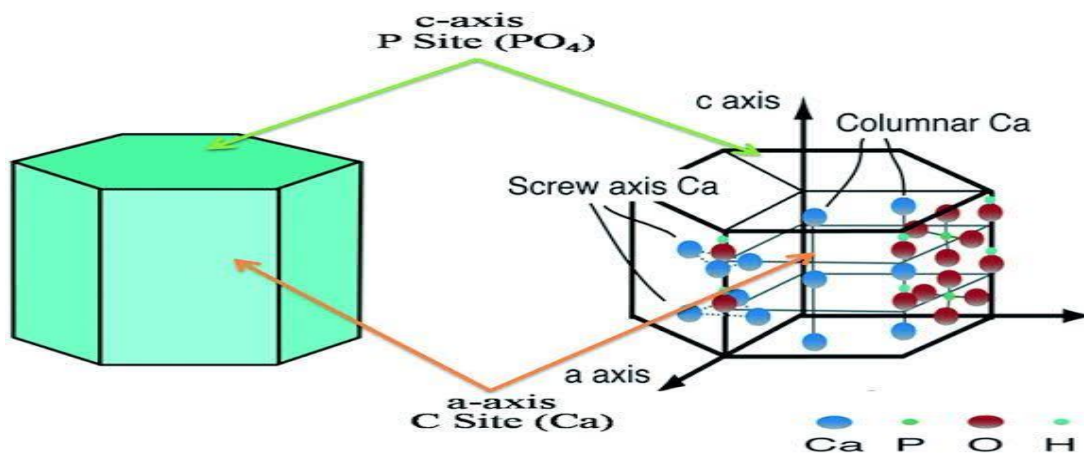


Figure I.3 : Surfaces d'un cristal d'Hydroxyapatite.

La dimension de la maille élémentaire de l'Hydroxyapatite est :

- ✓ $a = b = 9,432 \text{ \AA}$,
- ✓ $c = 6,881 \text{ \AA}$,
- ✓ $\beta = 120$.

L'hydroxyapatite phosphocalcique appartient à la famille cristallographique des composés isomorphes possédant tous la structure apatitique (hexagonale). Elle se cristallise dans le système hexagonal (groupe spatial= $\text{P6}_3/\text{m}$) avec les paramètres cristallographiques suivants : $a = 9.418 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, $\beta = 120^\circ$. Sa structure peut être décrite en considérant un empilement hexagonal de groupement PO_4^{3-} qui laisse apparaître deux types de tunnels, parallèles à l'axe c (figure I.4) [12].

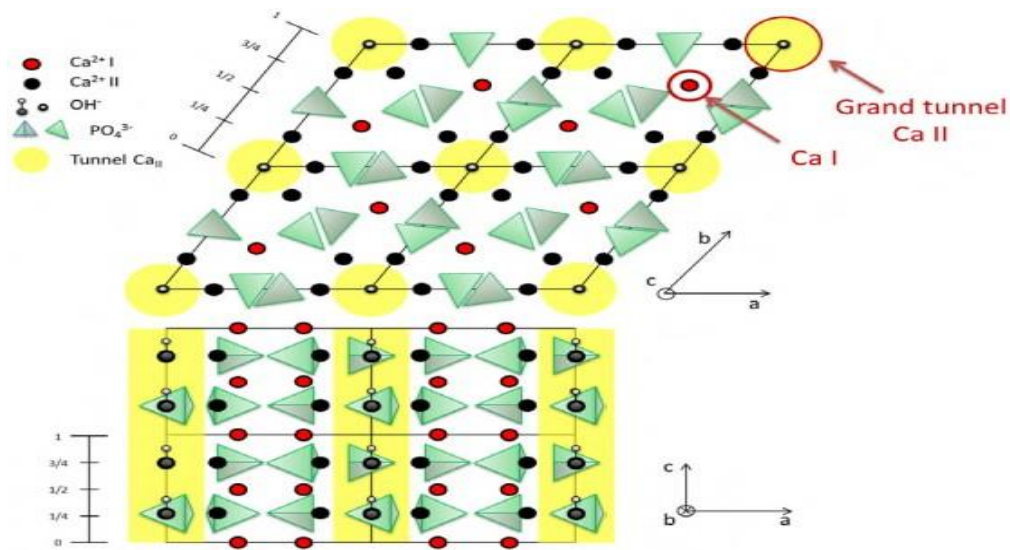


Figure I.4: Projection de la structure de HA sur les plans (001) et (010) [12].

I.3.2. Propriétés de L'Hydroxyapatite

Les propriétés physico-chimiques des matériaux dépendent essentiellement de leur procédé d'élaboration. Leurs caractéristiques physico-chimiques déterminantes sont en particulier leur surface spécifique et leur composition chimique. [13].

L'hydroxyapatite a une excellente affinité avec les tissus, son avantage principal est de créer de fortes liaisons chimiques avec l'os. Chimiquement, ce phosphate de calcium est le plus proche parent des cristaux d'apatites biologiques.

Cependant, le rapport atomique Ca/P d'une hydroxyapatite stœchiométrique est moins élevé que celui d'une poudre d'os, de dentine ou d'émail dentaire.

La densité théorique de HAP est de 3,156 g/cm³. F. N. Oktar a montré que la densité de HAP est plus grande pour des températures de frittage élevées (1200-1300°C). Sun et al. ont montré que la dissolution de la phase amorphe de l'hydroxyapatite est plus élevée par rapport à l'hydroxyapatite sous forme cristalline.

Parmi les facteurs qui influent sur la stabilité des apatites, nous citons en particulier la température, la pression et la composition chimique.

Dans cette partie, nous présentons également quelques propriétés physico-chimiques de l'hydroxyapatite phosphocalcique, à savoir la stabilité et la solubilité [14].

I.3.2.1. Stabilité thermique

L'hydroxyapatite présente une stabilité thermique importante qui dépend en particulier de la température, de la pression, de la composition chimique et la nature du milieu et également de la méthode de synthèse. Les hydroxyapatites possèdent une structure très stable, elles ne se décomposent qu'à des températures très élevées (au-delà de 1300°C) et en l'absence de vapeur d'eau. Les phosphates de calcium apatitiques se comportent différemment à haute température selon leur composition chimique de départ. Deux méthodes d'analyse sont utilisées pour déterminer le rapport atomique Ca/P d'un composé après un traitement à haute température : La diffraction des rayons X et la spectroscopie infrarouge. Ainsi, lors de la calcination à 900°C pour une longue durée (pendant 12h) d'un solide phosphocalcique, si le rapport atomique Ca/P est :

- a) Supérieur à 1,67 : formation d'une HAP de rapport Ca/P=1,67 avec formation de chaux(CaO).
- b) Egal à 1,67 : formation d'une HAP de rapport Ca/P=1,67 seulement. C'est-à-dire que l'HAP stœchiométrique n'est pas modifiée lors de la calcination.
- c) Compris entre 1,50 et 1,67 : l'apatite non stœchiométrique se décompose en phosphatetricalcique β de rapport Ca/P=1,50 et en HAP de rapport Ca/P=1,67.
- d) Inférieur à 1,50 : le solide se décompose en phosphate de calcium de rapport Ca/P=1 et phosphatetricalcique β de rapport Ca/P=1,50 [15].

I.3.2.2. Stabilité chimique

L'hydroxyapatite possède une stabilité chimique très importante, en milieux de pH neutres et basiques, qui est liée à sa faible solubilité rétrograde : elle diminue quand la température augmente et aux groupes fonctionnels de sa surface. Ces deux derniers sont considérés comme les principaux facteurs de rétention des métaux lourds. De plus, le réseau apatitique se restaure naturellement par accumulation d'énergie [16].

I.3.2.3. Solubilité de l'hydroxyapatite

La solubilité des HAP se généralise par l'équation suivante :



Cet équilibre est régi par une constante de dissolution-précipitation, appelée produit de solubilité, défini comme suit [17].

$$K_s = (\text{Ca}^{2+})_{10} (\text{PO}_4^{3-})_6 (\text{OH}^-)_2 = 6,62 \cdot 10^{-126}$$

La solubilité est contrôlée par l'équilibre thermodynamique de dissolution-précipitation mais également par les équilibres acide/basiques des ions phosphates et calcium, et par le processus interracial d'adsorption-désorption. En effet, l'hydroxyapatite placée au contact d'une solution aqueuse est capable de libérer ou de fixer des quantités non négligeables d'ions calcium et phosphates avant d'atteindre l'équilibre de dissolution – précipitation. Il a été montré que ces ions contrôlent en partie l'équilibre de dissolution, et sont à l'origine des dissolutions incongrues observées par certains auteurs. La solubilité de l'HAP dépend de la composition chimique initiale et de l'environnement des ions constitutifs (pH, température, ions en solutions, cristallinité ...) [18].

L'HAP a le produit de solubilité le plus faible des ortho phosphates de calcium de point de vue physicochimique, elle est le composé le plus insoluble et le plus basique de cette famille (tableau I.2).

Tableau I.2 : Principaux phosphates de calcium classés par ordre de solubilité décroissante du haut vers le bas.

Phosphate de calcium	Solubilité
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, \text{H}_2\text{O}$	115,0 g/L
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$	146,7 g/L
$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	82,0 g/L
$\text{Ca}(\text{HPO}_4)$	74,5 g/L
$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	49,6 g/L
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	22,6 g/L
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	5,7 g/L

I.3.2.4. Propriétés mécaniques

La connaissance des propriétés mécaniques d'hydroxyapatite est très nécessaire pour les différentes applications

Tableau I.3 : Les propriétés mécaniques de l'hydroxyapatite [19,20]

Propriété	Valeurs typiques
Densité (g cm ⁻³)	3,15
Le module de Young (GPa)	85-90
Dureté Knoop (MPa)	3450
Résistance à la traction (MPa m ⁻²)	120
Coefficient de Poisson	0,3
Dilatation thermique	11
Point de fusion (° C)	1660
Chaleur spécifique (cal g ⁻¹ K ⁻¹)	0,15
Conductivité thermique (W cm ⁻¹ K ⁻¹)	0,01
Résistance à la rupture (MPa m ^{1/2})	< 1

I.4.Substitutions

L'une des caractéristiques de la structure cristalline de l'hydroxyapatite est sa capacité à former des solutions solides et à accueillir de nombreux substituant sans altérer cette structure. Selon les règles de représentation, plusieurs types de représentation sont possibles :

I.4.1. Substitution d'ions de même charge mais de tailles différentes

Cet échange déforme légèrement le maillage. Le remplacement des ions Ca²⁺ ou PO₄³⁻ par des ions de même charge mais de taille différente modifie les paramètres cristallographiques a et c dans le même sens. Lorsque les ions OH⁻ sont remplacés, les paramètres ont et c changent dans des directions opposées [21].

I.4.2. Substitution d'ions de charge et/ou de taille différente

Il existe de multiples possibilités.

- Les cations divalents Ca²⁺ de l'hydroxyapatite peuvent être remplacés par d'autres cations.

- Le groupement anionique PO_4^{3-} peut également être remplacé par des groupements trivalents, divalents ou tétravalents.
- Les anions OH peuvent être remplacés par des groupes ioniques ou anioniques Divalent ou vacant (V ou \square).

Au niveau atomique, les substitutions d'ions modifient les paramètres de réseau des structures en créant des lacunes ou un encombrement stérique. À grande échelle, la substitution entraîne généralement une diminution de la cristallinité, une diminution de la stabilité thermique et une augmentation de la solubilité. Cependant, le remplacement des ions OH par des ions F ou le remplacement des ions Ca^{2+} par des ions Pb^{2+} s'écarte de cette règle. En effet, ces substitutions tendent à diminuer la solubilité de l'apatite [21].

I.4.3. Hydroxyapatites substitués au Zn (HAP-Zn)

Le zinc (Zn) qui se trouve en petite quantité dans les minéraux osseux est présent en abondance avec des proportions allant de 0.0126 à 0.0217 % en masse. Ce métal est essentiel pour plusieurs fonctions corporelles, comme la régulation des acides nucléiques, le métabolisme, le maintien de la structure membranaire et l'activité hormonale.

Ainsi donc, Il joue plusieurs rôles suivants :

- Un activateur enzymatique présent dans plus de 300 enzymes impliquées dans le métabolisme des os [22].
- Les cations Zn^{2+} encouragent simultanément la création de tissu osseux et la calcification en freinant la différenciation des cellules responsables de la résorption osseuse et l'activité des cellules formant l'os [23].
- Il entraîne une réduction des paramètres de réseau du cristal d'apatite à cause de son rayon ionique plus petit (0.075 nm) comparé à celui de Ca (0.099 nm) [24].
- Le zinc est bien connu pour son effet inhibiteur sur la croissance cristalline de l'hydroxyapatite, mais il a été démontré qu'il peut être substitué quantitativement dans le réseau de la matrice HAP à des concentrations allant jusqu'à 20 % de poids [25].

I.5.Origine des Hydroxyapatite

L'hydroxyapatite peut être d'origine naturelle ou synthétique. Elle est préparée par plusieurs méthodes.

I.5.1. Hydroxyapatite Synthétique

De nombreuses méthodes de préparation des apatites sont proposées dans la littérature. Toutefois, les différentes synthèses peuvent être classées en deux grandes catégories ; la voie fait intervenir des réactions en phase solide qui requiert des températures relativement élevées et des traitements thermiques assez longs. Ce mode de synthèse permet en revanche d'obtenir des poudres stœchiométriques bien cristallisées. Par contre la voie humide fait intervenir des réactions de précipitation en phase aqueuse. [26].

I.5.2. Hydroxyapatite Naturelle

Il existe deux types de source d'apatites : une biologique comme l'os, les dents, les coquilles d'œufs, Les coquillages et une autre obtenue à partir de dépôts minéraux comme les roches de phosphate tel que le phosphate noir [27].

- (a) extraction de minéraux issus de bio déchets ;
- (b) synthèse à partir de coquilles ;
- (c) synthèse à partir d'exosquelette d'organismes marins ;
- (d) synthèse avec l'aide de biomolécules d'origine naturelle ;
- (e) synthèse à l'aide de biomembranes [28].

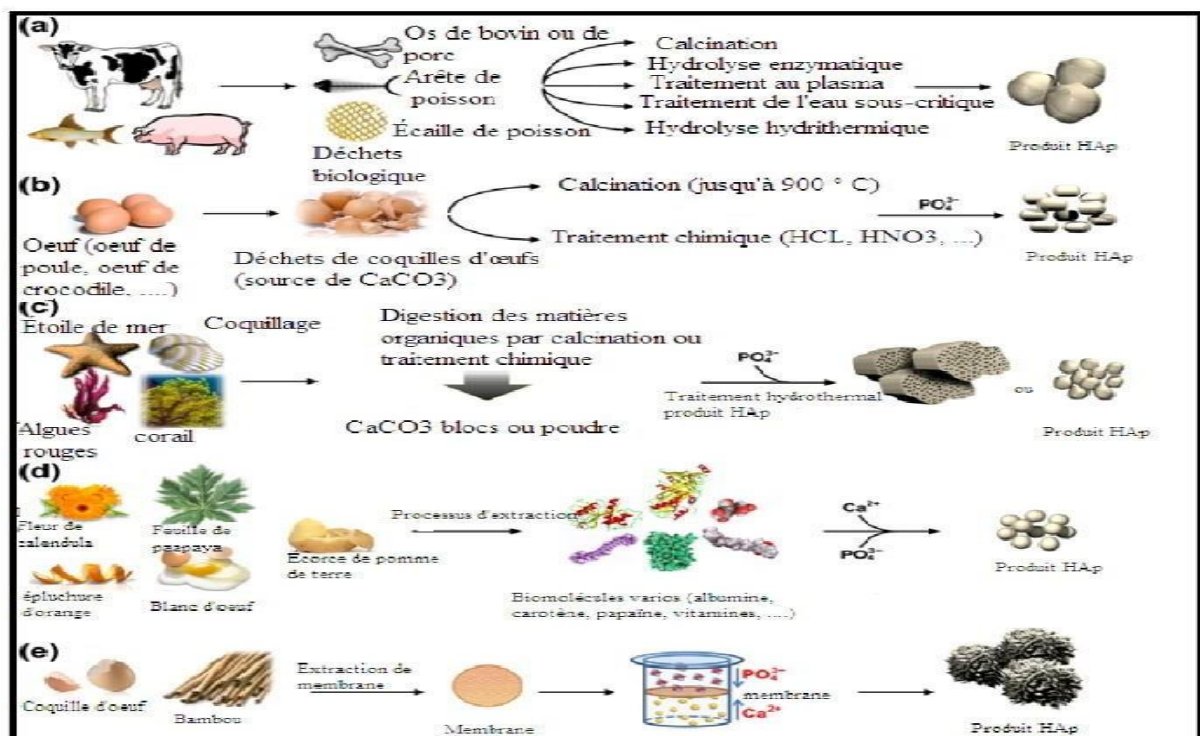


Figure I.5: quelque source d'hydroxyapatite naturelle

I.6. Les méthodes de synthèse

En raison de nombreuses applications de l'hydroxyapatite dans le domaine médical comme substitut osseux ou dans le domaine environnemental comme adsorbant de métaux toxiques et radioactifs, plusieurs méthodes de synthèse ont été mises en œuvre. On connaît deux voies principales d'élaboration des poudres d'HA, à savoir : les synthèses par voie humide et les réactions à l'état solide.

Parmi les techniques les plus couramment utilisées, on peut citer la synthèse hydrothermale, la méthode sol-gel, et la précipitation. [29].

I.6.1. Synthèse par voie humide

La synthèse par voie humide permet un contrôle précis des propriétés physiques et chimiques des poudres avec un avantage de production de matériaux homogènes avec une forme des particules uniforme [29].

Plusieurs méthodes ont été suivies pour la préparation de HAP par voie humide, telles que :

- Synthèse par précipitation.
- Synthèse par voie hydrothermale.
- Synthèse par voie sol-gel.

I.6.1.1. Synthèse par précipitation

Cette voie de synthèse est souvent utilisée en mélangeant des sels de calcium et des composés à base de phosphate dans l'eau. Parmi les sels utilisés, les nitrates de calcium, l'hydroxyde de calcium et l'acétate de calcium tandis que les solutions de phosphore utilisées sont l'hydrogénophosphate de d'ammonium et l'acide phosphorique.

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.

Cette méthode se fait selon deux procédés différents, la méthode par double décomposition et la méthode par neutralisation. Ces procédés sont actuellement utilisés pour la production industrielle d'apatite [29]

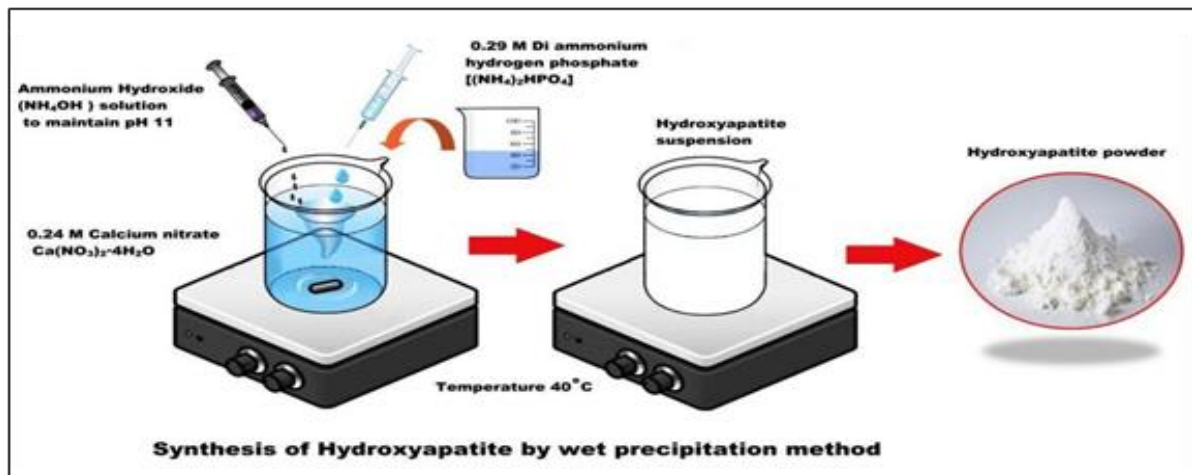


Figure I.6 : méthode par précipite.

I.6.1.1.1. La méthode par double décomposition

Consiste à ajouter de façon contrôlée une solution du sel de cation Me^{2+} dans une solution du sel de l'anion XO_4^{3-} . Le précipité est ensuite lavé et séché. Cette technique permet également d'obtenir des apatites mixtes (contenant deux cations différents) avec une maîtrise du rapport Me_1/Me_2 . Les sels des deux cations sont introduits simultanément dans le réacteur avec le rapport atomique Me_1/Me_2 désiré [30].

I.6.1.1.2. La méthode par neutralisation

Cette méthode consiste à neutraliser une solution de lait de chaux $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en y ajoutant une solution d'acide phosphorique. Cette réaction permet d'obtenir rapidement de grandes quantités d'hydroxyapatite phosphocalcique. L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans les risques de non-reproductibilité surtout en termes de stœchiométrie. En effet le nombre de paramètres 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...) [31].

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, de stœchiométrie ou d'activité catalytique et donc d'obtenir une grande variété d'échantillons. Avec cette méthode de synthèse les particules obtenues sont souvent plus fines et les surfaces spécifiques plus élevées que

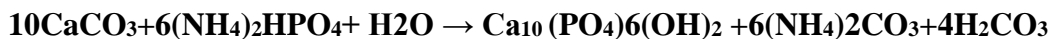
celles obtenues pour une synthèse par méthode sèche qui nécessite des températures élevées.

I.6.1.2. Synthèse par voie hydrothermale

Le principe de la méthode consiste à travailler sous des pressions et à des températures suffisamment élevées ($P > 1 \text{ atm}$ et $T > 100^\circ\text{C}$) tout en conservant l'eau à l'état liquide. On peut citer quelques exemples de réactions de synthèse de HAP par la méthode hydrothermale [32].



Au début, la méthode hydrothermale est utilisée pour préparer de l'hydroxyapatite directement à partir du corail qui est un matériau contenant de l'aragonite (CaCO_3) suivant la réaction :



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. Néanmoins, si certains reportent pouvoir contrôler le rapport Ca/P via cette méthode, la plupart des articles ne mentionnent pas ce paramètre [32].

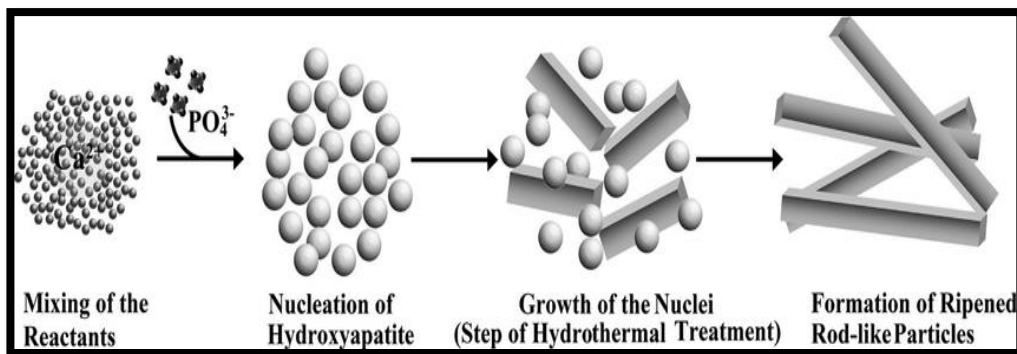


Figure I.7: synthèse de l'hydroxyapatite par méthode Hydrothermale [31].

I.6.1.3. Synthèse par voie sol-gel

La désignation sol-gel est une contraction des termes « solution-gélification ». C'est une méthode d'élaboration de matériaux, à partir de précurseurs en solution.

Ce procédé permet la synthèse et la mise en forme de différents matériaux : les céramiques les composés hybrides (organo-minéraux) les bioverres, les couches minces et revêtement d'épaisseur variant de l'ordre de nano- à micromètres [33].

Cette méthode permettant un mélange homogène de phosphate et de calcium grâce à un contrôle strict des paramètres. Cependant, l'application de la technique sol-gel est limitée par la possibilité d'hydrolyse des phosphates et le coût élevé des matières premières. L'avantage de cette méthode c'est qu'elle permet d'avoir un produit très pur à une température basse. En plus, elle permet une forte homogénéisation de la composition. Cette voie a été utilisée par plusieurs chercheurs. Seulement pour certains travaux, la synthèse de l'HAP a été toujours accompagnée de la formation de l'oxyde de calcium. Pour la synthèse de l'HAP, on peut utiliser l'alkoxyde phosphorique et les nitrates de calcium comme précurseurs de P et Ca [34].

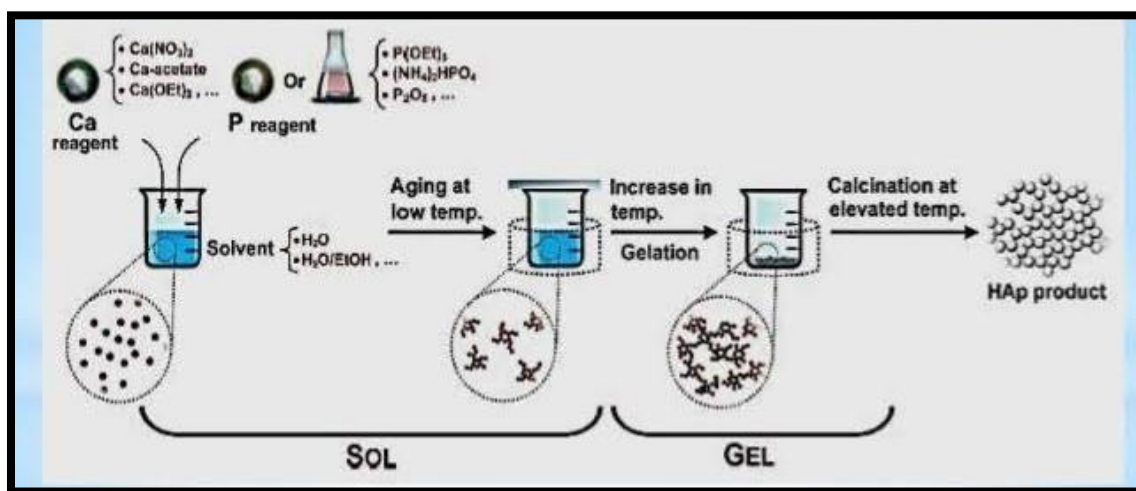
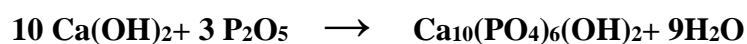


Figure I.8: méthode sol-gel [35].

I.6.2. Synthèse par voie sèche

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. [2]

On distingue aussi la synthèse mécano chimique dont le principe consiste en la perturbation par pression des espèces liées en surface pour accroître les réactions thermodynamiques et cinétiques entre les solides. Il existe différents protocoles employant par exemple les couples de réactifs Ca₃(PO₄)₂, xH₂O/Ca(OH)₂, ou CaHPO₄/Ca(OH)₂ ou encore Ca(OH)₂/P₂O₅. Dans le cas du dernier couple, la réaction s'écrit :



Cette voie de synthèse possède l'avantage de former des produits de composition stœchiométrique, elle permet ainsi d'obtenir des matériaux d'une grande pureté. Elle nécessite peu de matériel en la comparant aux méthodes réalisées par voie humide cependant, son coût énergétique reste élevé (synthèse à des températures élevées).

I.7. Utilisation des apatites

Les composés d'apatite jouent des rôles importants dans divers domaines. Dans l'industrie, les minéraux d'apatite sont la principale source d'engrais c'est un phosphate et est utilisé dans la fabrication d'acide phosphorique et de divers dérivés phosphate.

Les phosphates de calcium, grâce à une composition chimique proche de la phase minérale des tissus osseux, sont utilisés en chirurgie comme substituts osseux synthétiques. Outre leur importance biologique, les composés apatitiques sont étudiés pour leurs propriétés électroniques, utilisées dans les lampes à phosphore fluorescent ou les matériaux pour laser.

A moindre échelle ils sont également utilisés en pharmacie.

Les apatites sont aussi utilisées de façon marginale dans la chromatographie comme une phase stationnaire dans les colonnes pour séparation de diverses molécules telle que la vitamine D.

Depuis quelques années, de nouvelles applications dans le domaine de l'environnement sont utilisés :

- Application biomédicale
- Applications en archéologie et climato-paléontologie
- Applications dans le domaine de traitement de l'eau
- Autres applications chimiques

I.7.1. Application biomédicale

Les HAP en tant que constituant minéral principal des os et de l'email dentaire [28], possèdent de très bonnes propriétés de biocompatibilité et notamment des propriétés d'adsorption spécifique des cellules ou de protéines. Elles sont donc utilisées fréquemment dans le domaine de la médecine et de la pharmacie.

Les HAP servent par exemple de matériaux de substitution pour le remplacement ou la régénération de tissus malades ou endommagés. [35,36].



Figure I.9: Implants dentaires [35].

Les remplacements osseux sont indiqués si la prothèse est manquante, lorsqu'une perte osseuse sévère (ostéolyse) est observée autour de l'implant d'origine (alors il est utilisé Directement comme blocs de remplissage), ou si le tibia est coupé (alors ils sont utilisés pour restaurer l'inclinaison de l'articulation du genou). Enfin, il peut être indiqué dans une tumeur osseuse, ou une partie de l'os doit être enlevé, tels que le remplissage de joints artificiels avec une couche d'Hydroxyapatite à utiliser comme alternative artificiel. [37,38]

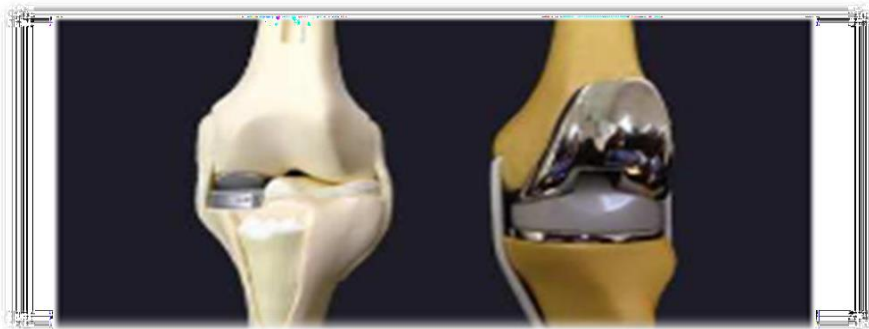


Figure I.10 : joint artificiel. [38].



Figure I.11: Mise en place d'une cale en Hydroxyapatite, après Ostéome tibiale [37].

I.7.2. Applications en archéologie et climato-paléontologie

Les HAP sont des matériaux qui sont également étudiés en archéologie et en paléontologie. L'analyse des HAP provenant de restes humains ou animaux (dents, os), il est possible de connaître la qualité de la nutrition pendant cette période. En effet il a été prouvé que le rapport strontium sur calcium (Sr/Ca) permet d'identifier le type d'alimentation de l'animal et permet même de faire le distinguo entre herbivores et omnivores. [1]. De la même façon, il permet aussi d'identifier la nature des plantes ingérées par les animaux, et là encore et donc d'en déduire des données climatologiques de l'époque à l'endroit où ils vivaient [1].

I.7.3. Applications dans le domaine de traitement de l'eau

L'eau est la plus importante ressource naturelle dont l'être humain a exploité. La quantité de l'eau utilisable est très limitée sur terre, bien que l'eau soit continuellement purifiée par évaporation et par précipitation, sa pollution est perçue comme l'un des plus grands problèmes environnementaux. Les polluants de l'eau sont à l'origine de plusieurs facteurs à savoir : les facteurs physiques et/ou chimiques [38]. Pour remédier à ce problème, il existe différents procédés d'élimination des polluants, Parmi les différentes techniques de traitement de l'eau l'utilisation de matériaux alternatifs comme L'Hydroxyapatite (HAP), synthétisée à partir de multiples sources biologiques (os d'animaux, les coquilles d'œufs ; ... etc., qui sont considérés comme étant des déchets très utiles pour l'élimination de certains polluants. La plupart des cas ont confirmé que l'utilisation de grandes quantités de tels types de déchets pour le traitement de l'eau polluée est une option attrayante et prometteuse avec un double avantage pour l'environnement. A attiré une attention particulière en raison de sa forte capacité d'absorption (certains anions et métaux lourds : Nitrates, Plombs, etc.), de sa faible solubilité dans l'eau, La production de HAP commerciale est encore coûteuse et une réflexion croissante a été donnée pour l'utilisation de méthodes plus économiques pour sa préparation [26,38].

I.7.4. Autres applications chimiques

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

Elles sont aussi employées très fréquemment en chromatographie pour séparer les protéines et autres biomolécules. Les HAP sont efficaces grâce aux effets combinés des groupes calcium et phosphates exposés à la surface du cristal qui donnent au matériau une sélectivité pointue permettant la séparation de mélanges complexes [1].

I.8. Conclusion

La caractérisation et la compréhension de la structure des hydroxyapatites sont essentielles pour leur utilisation efficace dans divers domaines, en particulier dans le domaine biomédical. Leur structure unique et leurs propriétés favorisent leur application dans les implants osseux, la régénération osseuse et d'autres domaines de la médecine régénérative, offrant ainsi de nouvelles solutions pour améliorer la santé et la qualité de vie des individus.

Référence

- [1] Benmouffok, H., L. Takorabet, et al. (2014). Elaboration d'un composite hydroxyapatite/Zéolithe pour la rétention du Cadmium en milieu aqueux, Université de Bejaia.
- [2] El Hammari, L. (2007). "Synthèse et études physico-chimiques des phosphates de calcium poreux greffes par des molécules organiques : Structure et processus d'adsorption."
- [3] Britel, O. (2007). "Modélisation et optimisation par la méthodologie des plans d'expériences de la synthèse : De l'hydroxyapatite phosphocalcique, du phosphate tricalcique apatitique, du phosphate de calcium apatitique carbonate."
- [4] Errassifi, F. (2011). Mécanismes d'adsorption du risédronate par des phosphates de calcium biologiques : applications aux biomatériaux, Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech.
- [5] Hadioui, M. (2007). Synthèse d'hydroxyapatite et de silices greffées pour l'élimination de métaux toxiques en solution aqueuse, Toulouse 3.
- [6] Garcia, S. D. (2012). Les Hydroxyapatites, un système basique atypique modulable par la synthèse : vers l'identification des sites actifs, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- [7] Eliaz, N. and N. Metoki (2017). "Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications." *Materials* **10**(4) : 334.
- [8] Bahlali, I. Extraction de l'hydroxyapatite à partir de l'os bovine.
- [9] Cherifa, A. B., A. Nounah, et al. (2001). "Synthèse et thermochimie de phosphates au cadmium : Partie II : Enthalpie standard de formation de fluor apatites calcocadmiées." *Thermochimica acta* **366**(1) : 7-13.
- [10] Marchat, D. (2005). Fixation du cadmium par une hydroxyapatite phosphocalcique : Étude cinétique et thermodynamique, Limoges.
- [11] AMINA BEGHOURA, A. B. Z. "Etude physico-chimique comparative entre l'hydroxyapatite élaboré à partir des précurseurs naturel et synthétique."
- [12] Boyer, A. (2014). Synthèse, caractérisation et évaluation biologique d'apatites phosphocalciques carbo silicatées, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- [13] Arioua, M. (2007). Elaboration et caractérisation d'un substitut osseux poreux à base de verre bioactif, Lyon, INSA.
- [14] El Hammari, L. (2007). "Synthèse et études physico-chimiques des phosphates de calcium poreux greffes par des molécules organiques : Structure et processus d'adsorption."
- [15] YOUNSI, S. and O. SEBBAH (2018). SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES BIOMATÉRIAUX NANOSTRUCTURÉS PHOSPHOCALCIQUES MODIFIÉS, université akli mohand-oulhadj bouira.
- [16] AMINA BEGHOURA, A. B. Z. "Etude physico-chimique comparative entre l'hydroxyapatite élaboré à partir des précurseurs naturel et synthétique."

- [17] Elliot, J. (1994). "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates." *Studies in inorganic chemistry* 18: 68.
- [18] Fatima, S. (2012). Immobilisation de l'uranium et des terres rares par l'hydroxyapatite et les sulfates de calcium: conditions, quantifications et mécanismes, Thèse de doctorat d'état, Université Mohammed V–Agdal Rabat.
- [19] Suchanek, W. and M. Yoshimura (1998). "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants." *Journal of materials research* 13(1): 94-117.
- [20] BERTOLUS, M. and M. DEFRANCESCHI (2004). "Les apatites: des phosphates naturels." *Techniques de l'ingénieur. Sciences fondamentales(AF6610): AF6610. 6611-AF6610. 6618.*
- [21] Khireddine, H. and N. Kadim (2014). Elaboration et caractérisation d'un nouveau biomatériau à structure apatitique extrait de la mine de Djebel Onk: Application environnementale, Université abderrahmane mira béjaia.
- [22] Bigi, A., E. Foresti, et al. (1995). "Inhibiting effect of zinc on hydroxylapatite crystallization." *Journal of Inorganic Biochemistry* 58(1): 49-58.
- [23] Moonga, B. S. and D. W. Dempster (1995). "Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro." *Journal of Bone and Mineral Research* 10(3): 453-457.
- [24] Webster, T. J., C. Ergun, et al. (2002). "Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion." *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 59(2): 312-317.
- [25] Boanini, E., M. Gazzano, et al. (2010). "Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature." *Acta biomaterialia* 6(6): 1882-1894.
- [26] Yataghene, F. and N. Ferguene (2009). "Préparation de l'hydroxyapatite a partir de différents précurseurs: application pour l'adsorption du plomb." Mémoire d'ingénieur, université de Bejaia.
- [27] Benmouffok, H., L. Takorabet, et al. (2014). Elaboration d'un composite hydroxyapatite/Zéolithe pour la rétention du Cadmium en milieu aqueux, Université de Bejaia.
- [28] Sadat-Shojai, M., M.-T. Khorasani, et al. (2013). "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures." *Acta biomaterialia* 9(8): 7591-7621.
- [29] Raynaud, S., E. Champion, et al. (2001). "Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry." *Journal of the American Ceramic Society* 84(2): 359-366.
- [30] Meriem, B. (2017). "Traitement de l'eau de mer par hydroxyapatite synthétisée à partir de coquilles d'œufs."
- [31] Meski, S. (2012). Etude de la rétention de métaux lourds sur les apatites: Modélisation du procédé de sorption et de l'élaboration des apatites par les plans d'expériences, Thèse de Doctorat, Université de Bejaia, Algérie.

- [32] Yala, S. and H. Khireddine (2010). Modification de la surface de l'hydroxyapatite par greffage de polymère (polypyrrole), Université de Bejaia.
- [33] Bezzi, G., G. Celotti, et al. (2003). "A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation." *Materials Chemistry and Physics* 78(3): 816-824.
- [34] Xu, Y. and F. W. Schwartz (1994). "Lead immobilization by hydroxyapatite in aqueous solutions." *Journal of Contaminant Hydrology* 15(3): 187-206.
- [35] Liu, H., T. Chin, et al. (1997). "Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method." *Ceramics International* 23(1): 19-25.
- [36] Mondal, S., A. Dey, et al. (2016). "Low temperature wet-chemical synthesis of spherical hydroxyapatite nanoparticles and their in situ cytotoxicity study." *Advances in nano research* 4(4): 295.
- [37] Viguier, E., P. Guigui, et al. (1996). "Étude biomécanique d'un modèle expérimental d'arthrodèses vertébrales. Mise au point chez le mouton." *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France* 149(2): 155-162.
- [38] AMINA BEGHOURA, A. B. Z. "Etude physico-chimique comparative entre l'hydroxyapatite élaboré à partir des précurseurs naturel et synthétique"

CHAPITRE II
GENERALITE SUR LE MONDE MICROBIEN

II. Introduction

Dans ce chapitre, nous explorerons les principales caractéristiques du monde bactérien, en mettant l'accent sur leur structure, leur diversité génétique et leurs classifications. De plus, nous aborderons les méthodes utilisées pour caractériser et identifier les bactéries, car ces approches sont essentielles pour comprendre leur diversité et leur fonctionnement. Nous explorerons des techniques de coloration, de culture en laboratoire, et nous avons également vu l'activité antimicrobienne qui nous permet d'expliquer notre travail dans ce chapitre.

II.1. Le monde microbien

Les micro-organismes, également appelés protistes, sont un groupe d'organismes microscopiques invisibles à l'œil nu. C'est le seul point commun, car ils diffèrent par la morphologie, la physiologie, les modes de reproduction et l'écologie. Les protistes sont constitués de bactéries, de protozoaires, de champignons microscopiques (champignons) et d'algues. On pense que le virus est un micro-organisme non vivant et acellulaire qui dépend complètement de la cellule hôte qu'il infecte.

Les bactéries sont des cellules procaryotes (pas de noyau cellulaire réel).

Il n'y a pas d'enveloppe nucléaire et généralement un seul chromosome. Les bactéries ont des parois dures qui : peptidoglycane ou murine.

Leur classification est fondée sur les caractères :

- ✓ Morphologiques.
- ✓ Tinctoriaux.
- ✓ Biochimiques.
- ✓ Antigéniques.
- ✓ Génétiques.

II.1.1. Morphologie

Les bactéries sont des micro-organismes (très petits organismes), des protozoaires (formes unicellulaires). En effet, les bactéries sont des entités complètes entourées d'une paroi cellulaire complexe, au sein de laquelle le cytoplasme contient toute la machinerie nécessaire à leur autonomie structurelle et fonctionnelle. Le matériel génétique n'est pas séparé du reste du cytoplasme. Ce dernier contient également des ribosomes qui, selon l'interprétation du message, sont nécessaires à la production de protéines. On le retrouve dans le code génétique et dans divers organites impliqués dans le maintien des fonctions métaboliques de base indispensables à la survie des cellules.

Les bactéries varient en taille, mais sont généralement de l'ordre du micron. Les bactéries se présentent sous de nombreuses formes. Bacillus (rectangulaire), coccus (rond), spirale.

La figure I.1 montre trois types de bactéries : les bacilles (orange) et les Cocci (vert) et spirille (bleu).

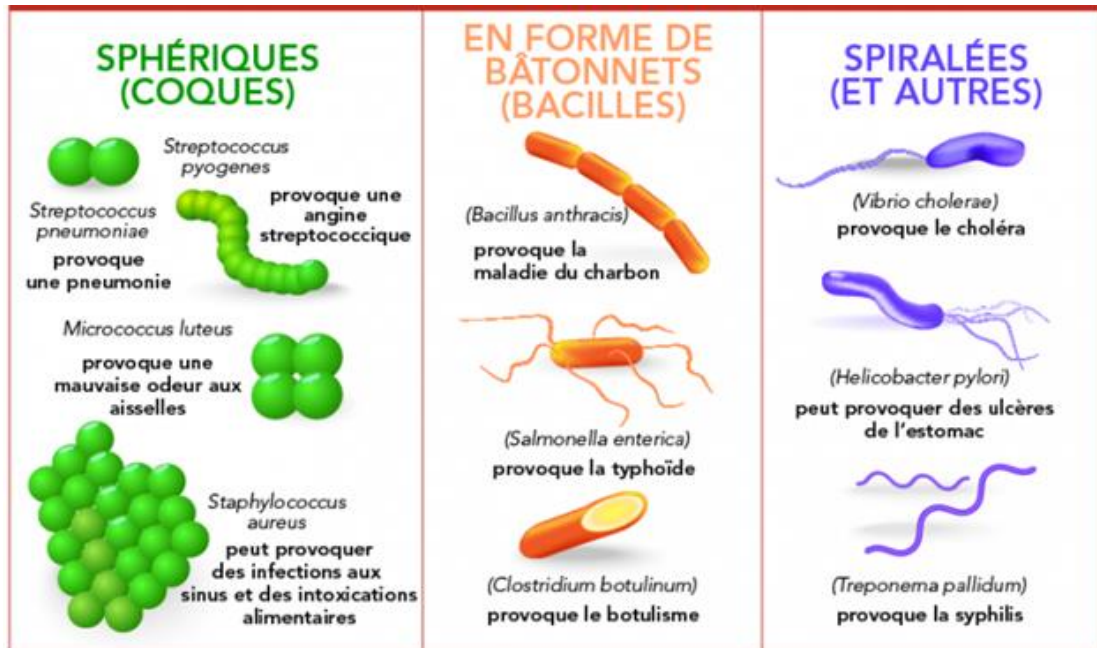


Figure II.1 : Forme des bactéries.

II.1.2. Matériel génétique

Les bactéries contiennent un seul chromosome sous la forme d'un long brin d'ADN enroulé autour de l'acide désoxyribonucléique, que nous appelons « l'alphabet génétique ». Le terme signifie que tout l'ADN contient les informations nécessaires à la structure et à la fonction des organismes vivants. C'est comme un alphabet qui peut former n'importe quel mot. La figure II est un exemple de cellule procaryote. Je ne peux pas voir le noyau. Mais notez que l'ADN est situé à : À l'intérieur de la membrane cytoplasmique, elle est entourée d'une paroi cellulaire plus rigide, qui assure l'intégrité structurelle de la bactérie

II.1.3. Paroi cellulaire

On peut distinguer deux grandes classes de bactéries caractérisées par la structure différente de la paroi cellulaire qui les entoure. Par exemple, chez les bactéries Gram (+), la paroi cellulaire est composée principalement de peptidoglycane, qui est la couche principale.

Cette couche est beaucoup plus épaisse que les bactéries Gram-négatives. Chez les bactéries Gram (-), la paroi cellulaire est constituée de trois couches. Les deux premières couches, la couche la plus externe, sont constituées de phospholipides et de protéines. Ils forment la membrane externe. Sous cette membrane se trouve une fine couche de peptidoglycane. Cependant, les modes de liaison des peptides ne sont pas les mêmes. Les parois peuvent être identifiées par coloration de Gram [1].

II.2. Classification des bactéries

II.2.1. Bactéries à Gram négatif

Celles-ci représentent plus de 66 bactéries répertoriées dans la classification de Burgey. Il y a des parois qui donnent sa forme à la cellule. Cette paroi est formée par une couche de peptidoglycane entre la membrane externe et la membrane cellulaire. Morphologiquement, cette classification distingue les groupes suivants :

II.2.1.1. Bacilles à Gram négatif

C'est une bactérie en forme de bâtonnet. La plus connue et la mieux étudiée est E. coli. La majorité des bâtonnets G- sont pathogènes. Par exemple, il existe des agents responsables de maladies infectieuses humaines. Peste : Yersinia Pestis ; Shigella : Dysenterie à Shigella ; Fièvre typhoïde. Les autres bacilles à Gram négatif sont des facteurs environnementaux très importants. Nous avons plusieurs genres : Rhizobium (fixateur d'azote) Nitrobacter et Thiobatyls. D'autres bactéries présentes dans le sol, l'eau douce ou l'eau de mer, dont certaines sont pathogènes, forment le genre Pseudomonas. Nous Distinguons Pseudomonas, Acetmonas et Xanthomonas.

II.2.1.2. Les Cocci à Gram négatif

Coques à Gram négatif. Sphère arrondie. Les principaux sont les agents responsables de deux maladies humaines graves. Gonorrhée, ou gonorrhée, qui provoque la gonorrhée, une maladie sexuellement transmissible

II.2.2. Les Bactéries à Gram Positif

Moins d'un gramme en moins, murs simples mais épais. Il a un aspect uniforme et a une structure dans laquelle d'autres composants tels que l'acide téichoïque sont dispersés dans le peptidoglycane. Ils sont très divers morphologiquement, physiologiquement et écologiquement.

II.2.2.1. Les Bacilles à Gram positif

Il existe deux groupes principaux.

Groupe qui forme des endospores. Comprend Clostridium et Bacillus. Les spores endogènes sont une forme de résistance aux conditions défavorables. Type de bactérie lactique qui ne forme pas de spores. Clostridium et Bacillus sont largement distribués dans le sol, les habitats aquatiques et autres.

II.2.2.2. Les Cocci à Gram positif

Les deux principaux genres sont les streptocoques et les staphylocoques. Il existe de nombreux types d'agents pathogènes. Staphylococcus aureus est présent sur la peau et les muqueuses des humains et des animaux. C'est la cause d'intoxications alimentaires et d'infections graves [2].

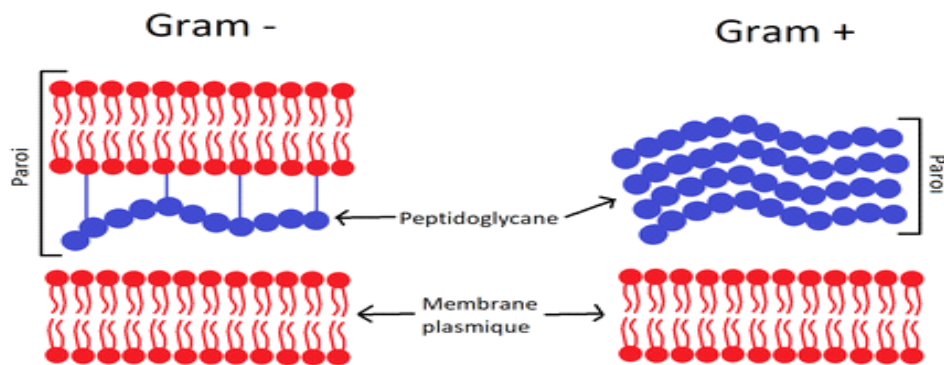


Figure II.2 : Structure de la paroi des bactéries à gram positif et gram négatif.

II.3. Bactéries étudiées

L'effet antibactérien de notre matériau a été prouvé contre les deux types de bactéries suivants dans le Laboratoire de Biologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences Naturelles.

II.3.1. Escherichia coli

En 1885, Theodore Escherich d'Allemagne a décrit pour la première fois Escherichia coli, une bactérie isolée des matières fécales des nourrissons. Cette bactérie s'appelait à l'origine Escherichia coli. Le nom d'E. Coli est T. Seulement 70 ans plus tard, il a été effectivement conservé pour commémorer les réalisations d'Escherichia [3].

II.3.1.1. Caractéristique

Le genre *Escherichia* appartient à la famille des Enterobacteriaceae et appartient à cette classe de Protéobactérie (tableau II.1). Les bactéries du genre *Escherichia* sont Gram-négatives, aérobies perméables, non halophiles, ont de la nitrate réductase et ne contiennent ni catalase ni oxydase. *Escherichia coli* est une bactérie mobile à structure Chiron-Péritriche (souches adhérentes rares) et ne forme pas de spores. La température de croissance optimale est de 37°C. C'est une bactérie très exigeante qui se développe dans des environnements normaux. *E. coli* fermente le lactose pour produire des indoles et possède diverses enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC) et l'ornithine décarboxylase (ODC). La plupart des variétés fermentent le sorbitol. Une étude d'*Escherichia* [3]. La plupart des propriétés biochimiques sont communes à tous les *E. coli*, à l'exception du stéréotype O157. H7 qui ne fermente pas le sorbitol [4]. *Escherichia coli* est une espèce sous-dominante de la flore anaérobie-aérobie dans l'intestin facultatif des humains et des animaux. Cette bactérie correspond à 80-90% de coliformes thermos tolérants et de coliformes fécaux (le lactose peut être fermenté à 44,5°C). Il existe une grande variété d'espèces d'*E. Coli*, y compris des bactéries commensales pour l'analyse gastro-intestinale, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement [5].

Tableau II.1: Classification d'*Escherichia coli* [5].

Règne	Procaryote
Domaine	Bactérie
Phylum	Protéobactérie
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Entérobactéries
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>



Figure II.3: Image MEB de Escherichia coli.

II.3.2. Staphylococcus aureus

II.3.2.1. Caractéristiques

Staphylococcus aureus est un agent pathogène humain important découvert par Alexander Ogston en 1881. Lors de l'analyse microscopique de l'infection pyogénique, Ogston a trouvé des bactéries rondes regroupées en grappes de raisins. Ainsi, le mot grec staphylum, signifiant grappe de raisin, est associé au Cocco de céréales. Il est maintenant établi que *S. aureus* est une bactérie anaérobie facultative à Gram positif qui produit de la catalase et de la coagulase et peut tolérer des activités hydriques très faibles ($A_w = 0,83$). Dans des conditions optimales, la division cellulaire se produit environ toutes les 20 minutes et les cellules ont un diamètre de 0,5 à 1,5 μm . *S. aureus* peut se développer de manière sélective ou non sélective dans une variété de milieux de croissance. Sur gélose au sang, *Staphylococcus aureus* est souvent hémolytique (α -hémolytique ou β -hémolytique). Les souches "typiques" de *Staphylococcus aureus* sont souvent dorées en raison des caroténoïdes (α -hémolysine (hémolysine) [6]) et forment des colonies lisses et convexes de 1 à 3 mm de diamètre.

Tableau II.2 : Classification de *Staphylococcus aureus* [7].

Règne	Bactérie
Phylum	Firmicutes
Classe	Bacille
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	Staphylococcus aureus

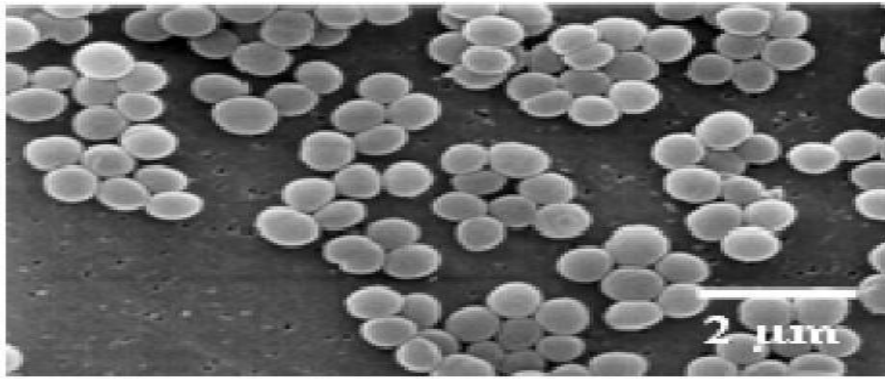


Figure I.4 : Image MEB de *Staphylococcus aureus*.

II.4. Méthode de classement

Selon Bergey's Manuel of Systématique Bactériologie, 9e édition, la maladie staphylococcique est classée comme une bactérie à Gram positif dont l'ADN est déficient en %GC, souches de Firmicutes, *Bacillus* spp. *Bacillus* spp. Et *Staphylococcus* spp. [7].

II.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des matériaux

Des moyens plus techniques sont prévus pour mettre en évidence l'activité antibactérienne et antibactérienne des souches étudiées.

II.5.1. Standardisation des inocula des germes cibles

Une fois la souche revivifiée, chaque souche est transférée dans un milieu spécifique. La méthode de normalisation des micro-organismes cibles utilisée est la méthode de normalisation de la suspension ou de la dilution, avec des mesures de densité optique à 625 nm jusqu'à ce que la DO de la solution mère soit comprise entre 0,08 et 0,1 [8], suivie d'un comptage dans la boîte. Mallasses (suspension de spores) pour bactéries et moisissures. La charge d'inoculum utilisée est de 10^6 UFC/ml de bactéries.

II.5.2. Détermination des zones d'inhibition (Antibiogramme)

Activité des matériaux métalliques

Principe

Les antibiotiques aident à déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Les antibiotiques utilisés dans chaque étude sont sélectionnés en fonction du spectre d'activité de l'espèce étudiée.

➤ Préparation de l'inoculum

Préparer une suspension bactérienne dans une solution saline stérile (0,9%) à partir d'une culture pure de 18 h dans un milieu d'isolement. Son opacité doit correspondre à une teneur en oxygène de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.

➤ L'ensemencement

La vaccination est réalisée par tamponnage selon la méthode Kir bey-Baur (dite méthode). (NCCLS) (Comité national sur les normes de laboratoire clinique) Trempez un coton-tige stérile dans la suspension bactérienne et laissez-le imbibé. Retirer du tube en le poussant doucement du mur. Ensemencer les boîtes Mueller-Hinton en grattant une gélose épaisse (4 mm). Tapotez doucement la surface du coton-tige et faites pivoter la boîte de 60 degrés trois fois pour assurer une bonne répartition de l'inoculum. Laissez sécher la boîte pendant 15 à 20 minutes.

➤ Application des disques

Les disques ont été appliqués à l'aide de distributeurs (6 antibiotiques par paquet) ou de pinces stériles (ne pas déplacer les disques après l'application).

➤ Incubation

Incuber la boîte dans une étuve à 37°C pendant 18-24 heures.

➤ Lecture

Pour chaque souche et chaque antibiotique :

Mesurer avec précision le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

II.5.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé (par papier Buvard)

Des disques de papier buvard sont découpés à 6 mm de diamètre, stérilisés dans des boîtes en verre, et imprégnés de différentes concentrations de molécules à tester. Des disques de papier buvard imprégnés de différentes concentrations de molécules à tester sont placés à la surface d'une plaque de gélose préalablement inoculée avec une culture pure de la souche à tester. Une fois le disque fixé, les molécules à l'étude diffuseront uniformément. Après incubation (24 h à 37 °C), les disques sont entourés d'une zone circulaire d'inhibition, correspondant à l'absence de culture [9].

II.5.4. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Antibiotique + matériau)

Appliquer 0,1 ml d'une solution mère (6000 µg/ml) de la molécule à tester sur chaque disque ATB. Après incubation (24 heures à 37°C), les disques sont entourés d'une zone circulaire d'inhibition correspondant à l'absence de culture.

II.5.5. Méthode de diffusion en milieu gélosé (diffusion en puits)

La méthode utilisée est la diffusion en puits sur gélose comme décrit par Berghe et Vlietinck (1991). Après ensemencement en versant de la gélose Mueller-Hinton dans des boîtes de Pétri de 8 mm d'épaisseur et en buvardant avec des dilutions des organismes à tester selon l'échelle de MC Ferland, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés de manière concentrique puis à chaque concentration Distribuer 0,1 ml de gélose dans chaque puits central. Après 45 min de pré-étalement à température ambiante, incuber les souches à 37 ° C pendant 24 h. Le diamètre de la zone d'inhibition est ensuite mesuré au pied à coulisse [10].

II.5.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration la plus faible d'une molécule testée qui inhibe la croissance visible d'une souche bactérienne après 18 heures d'incubation dans un milieu de croissance spécifique, et est le plus couramment utilisée pour évaluer l'activité bactériostatique de nouvelles molécules à activité antibactérienne C'est l'approche couramment utilisée. In vitro [10]

Grâce à la méthode de dilution, la valeur de la CMI peut être déterminée. Cette méthode peut également être utilisée pour la gélose et le bouillon.

Dans la méthode de dilution en bouillon, une série de tubes de bouillon (généralement du milieu Mueller-Hinton) contenant des concentrations variables des nanoparticules à tester sont préparées et inoculées avec une population standard de la souche à tester. La plus faible concentration de NPs inhibant la croissance après 18 à 24 heures d'incubation est la CMI [12]. Les bactéries sont comptées sur gélose nutritive pour chaque concentration (après 16, 18 et 24,72 h) en parallèle avec la CMI.

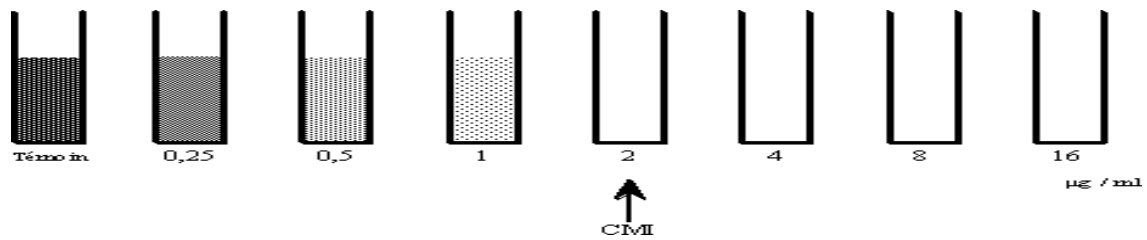


Figure II.5: Concentration minimale inhibitrice [11].

II.5.7. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Il s'agit de la concentration la plus faible de la molécule testée capable de tuer les bactéries après 24 heures d'incubation dans un milieu de croissance particulier. Le CMB est déterminé en transférant des échantillons ne montrant aucune croissance des tubes vers du milieu frais sans que la molécule soit testée [11] [12] technologie :

Dilution en milieu liquide Mueller-Hinton. Lire la CMI après 24 heures et la numération bactérienne de l'inoculum de départ. Tubes de sous-culture qui ne montrent aucune croissance visible. Numération bactérienne après 24 heures par rapport à l'inoculum initial.

III.5.8. Modes d'action des agents antimicrobiennes

Les précultures sont préparées en inoculant grossièrement l'ensemble du tube à essai avec 5 ml de M2 Truandria clair à DO 0,3 à 540 nm de chaque paire de souches femelles. Après 3 jours d'incubation à 30°C, 5 ml de pré culture (540 nm, 10 % de réflectance et ensemencement global) ont été utilisés pour étaler 50 ml de souche laide limpide sur des erlenmeyers de 250 ml. Incuber la culture à 30°C pendant 14 jours.

III.5.9. La technique des puits

L'activité antimicrobienne est évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose. Gélose molle pour bactéries (8 g de gélose). Ajouter 200 microlitres de surnageant de culture dans des puits de 6 mm de diamètre. Cette dernière est réalisée sur boîtes de Pétri pré-ensemencées. Utiliser des organismes de test à 10⁶ UFC/ml g

(Bactéries). Maintenir le plat à 4°C pendant 2 heures et dérouler. Une substance physiologiquement active qui inhibe temporairement la croissance des bactéries cibles. L'insert est ensuite incubé contre les bactéries pendant 24 heures à 37°C, après quoi le diamètre de la zone d'inhibition bactérienne est mesuré. Toutes les zones de suppression autour des trous de forage sont considérées, y compris les trous de forage de plus petit diamètre. Comme un bon résultat [12]

III.5.10. Technique des disques

Des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre n° 4 fractionnés avec 200 microlitres de surnageant de culture ont été retirés dans des conditions stériles et séchés sous flux d'air stérile. Le disque est ensuite placé sur un milieu gélosé nutritif mou pré-inoculé avec l'organisme à tester. Après pré-étalement à 4°C, la plaque est incubée à 37°C pendant 2 heures. Les diamètres d'inhibition sont mesurés 24 à 48 heures après l'incubation bactérienne et les résultats sont lus après 24 heures. Une zone d'inhibition de la croissance autour du disque est considérée comme un résultat positif, même si elle est de petit diamètre. [12]

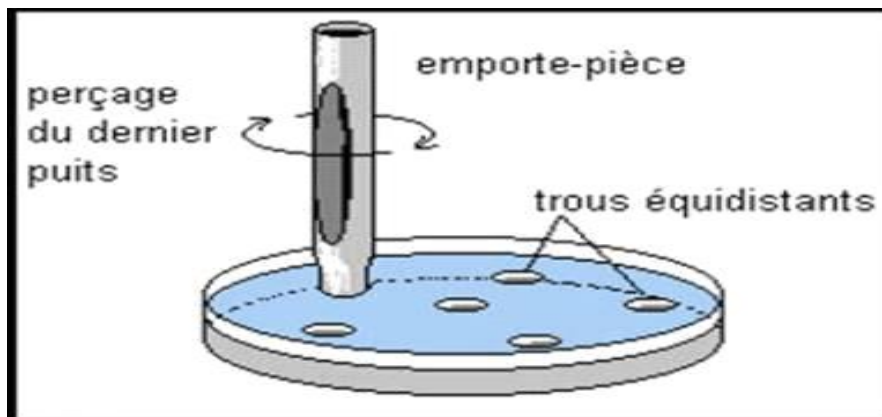


Figure II .6 : Méthode d'obtention des puits sur le milieu de culture solide.

II.6. Activité antibactérienne de Cuivre

Les humains ont toujours profité des propriétés antibactériennes naturelles du cuivre. De nombreuses études scientifiques menées au fil des décennies montrent clairement que le cuivre peut détruire les bactéries, les moisissures et les virus les plus résistants. Les ions cuivre (Cu^{+2}) pénètrent dans les bactéries par le même mécanisme que les ions argent, agissant sur l'ADN pour inhiber la respiration et la croissance bactériennes [13].

II.6.1. Résistance des bactéries aux cations métalliques Cu^{+2}

Le mécanisme de résistance bactérienne au cuivre repose sur des plasmides et des protéines. Selon le type de bactérie, différentes protéines provoquent cette résistance, et les ions Cu^{+2} pénètrent dans la bactérie et inhibent l'assemblage du plasmide. En dehors du cytoplasme. Ces études ont été réalisées sur des bactéries planctoniques, mais dans notre environnement les bactéries vivent sous forme de biofilms, auquel cas les mécanismes de résistance peuvent être différents. *Pseudomonas aeruginosa* est résistant au cuivre sous forme planctonique et biofilm [13].

I.7. Conclusion

L'étude du monde microbien et de l'activité antimicrobienne nous permet de mieux comprendre les interactions complexes entre les micro-organismes et leur environnement. Elle met en évidence l'importance de l'utilisation responsable des agents antimicrobiens et la nécessité de développer de nouvelles approches pour faire face aux défis posés par la résistance antimicrobienne. Cette compréhension et ces efforts continus sont essentiels pour préserver la santé humaine, animale et environnementale face aux menaces microbiennes.

Référence

- [1] Kahina Djeradi, L. B. "Conception des nouveaux dérivés de thiénoypyrimidine à l'activité antibactérienne par les méthodes de modélisation moléculaire."
- [2] Boumedjirek, A., N. Boukraa, et al. (2020). Inhibition de l'adhésion de *Staphylococcus aureus* par le surnageant de cultures bactériennes lactiques dans l'industrie agroalimentaire, Université de Jijel.
- [3] Hacker, J. and G. Blum-Oehler (2007). "In appreciation of Theodor Escherich." *Nature Reviews Microbiology* 5(12): 902-902.
- [4] Dougnon, V., E. Hounsa, et al. (2020). "A Literature Review—*Khaya senegalensis*, *Anacardium ouest* L., *Cassia sieberiana* DC., *Pterocarpus erinaceus*, *Diospyros mespiliformis*, *Ocimum gratissimum*, *Manihot esculenta*, *Vernonia amygdalina* Delile, *Pseudocedrela kotschy* and *Daniellia oliveri* possess properties for managing infectious diarrhea." *Advances in Bioscience and Biotechnology* 11(10): 457-473.
- [5] Gabriel, I., S. Mallet, et al. (2005). "La microflore digestive des volailles: facteurs de variation et conséquences pour l'animal." *INRAE Productions Animals* 18(5): 309-322.
- [6] ALIOUA, M. A. (2015). Les Staphylocoques: sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline, Université de Béjaia.
- [7] TORCHE, E. (2016). "SYSTEMATIQUE DES PROCARYOTES."
- [8] Kouider Moussaoui, M. and F. Sadi (2022). "Potentiel probiotique des Lactobacilles."
- [9] Djadi, A., H. Ait-Amar, et al. (2014). "Etude de la réactivité microbiologique et de l'effet toxique sur *Carassius auratus* du glutaraldehyde."
- [10] Belhaoues Farah, M. M. (2013). "Activité antibactérienne des nanoparticules métalliques (AgNO_3 , ZnO , CuO) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*."
- [11] LA PROPOLIS, C. I. G. S. "I. 7. Activités biologiques de la propolis." Dédicace : 10.
- [12] Belhaoues Farah, M. M. (2013). "Activité antibactérienne des nanoparticules métalliques (AgNO_3 , ZnO , CuO) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*."
- [13] Amniya, B. A. and O. I. Kemouguette Yousra (2021). "Pouvoir de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez *Proteus mirabilis*."

PARTIE B
ETUDE EXPERIMENTAL

CHAPITRE III
MATERIEL ET METHODE

III. Introduction

Dans ce chapitre ont fait la représentation des protocoles expérimentaux adoptés pour la synthèse des poudres d'apatites à partir de différents précurseurs naturel et synthétique. Les apatites préparées sont ensuite caractérisées par l'infrarouge (IR) et par la diffraction des rayons X (DRX). Enfin nous décrivons le protocole de valorisation de ces matériaux comme inhibiteur bactérien.

III.1. Produits utilisés

Tableau III.1: Les réactifs utilisés pendant la synthèse et l'application.

Réactifs	Formules brutes	Fournisseurs
Hydrogénophosphate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Panreac
Hydroxyde de calcium	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Riedel-de haen
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Biochem
Chlorure du Zinc	ZnCl_2	Sigma-Aldrich
Chlorure de calcium d'hydrate	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
L'ammoniac	NH_4OH	Biochem
Hydroxyapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Sigma-Aldrich

III.2. Elaboration d'hydroxyapatite

III.2.1. Méthode expérimentale de synthèse

III.2.1.1. Hydroxyapatite synthétique par $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Pour la synthèse de l'hydroxyapatite ; on a suivi les étapes suivantes :

III.2.1.1.1. Préparation des solutions

La méthode choisie pour synthétiser cette hydroxyapatite synthétique est la méthode de neutralisation. Cette dernière consiste à neutraliser une solution aqueuse de calcium par une solution aqueuse de phosphate.

➤ Solution A

La solution de Ca^{2+} est préparée par dissolution d'une quantité (0.1 mole) d'hydroxyde de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dans un mélange (eau- éthanol) de volume de 200 ml. La solution est ensuite agitée pendant 1h30 min à la température ambiante.

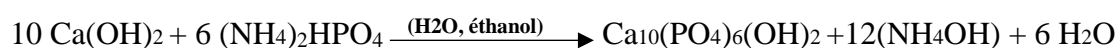
➤ Solution B

La solution de PO_4^{3-} est obtenue par dissolution d'une quantité (0.06 mole) de l'Hydrogénophosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dans 200 ml d'eau distillée.

➤ Titrage

Sous agitation continue, la solution de phosphate est ajoutée goûte à goûte à celle de calcium et il se forme un précipité blanc.

Une fois l'addition terminée, le mélange est maintenu sous agitation pendant 48 h à la température ambiante. La réaction entre les deux solutions se déroule selon l'équation suivante (eq. III.1) :



➤ Filtration

A l'issue de ces 48 heures, le mélange réactionnel est filtré afin de récupérer le précipité blanc.



Figure III.1: La filtration.

➤ Séchage

Le solide est ensuite lavé plusieurs fois avec un mélange (eau+ éthanol) et séché à 80°C pendant 24 heures. En fin le matériau est broyé et tamisé.

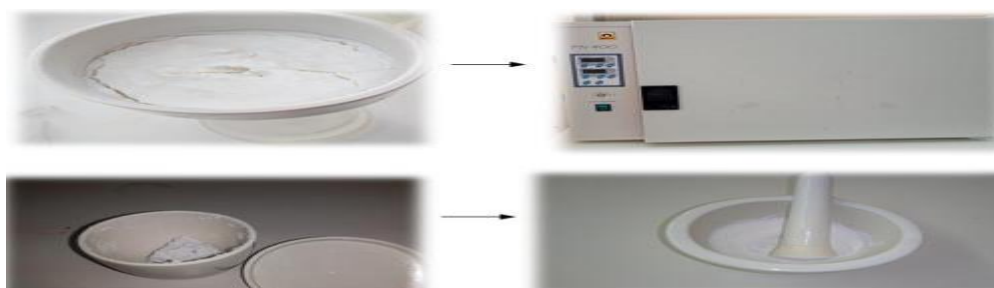


Figure III. 2 : Séchage du produit obtenu.

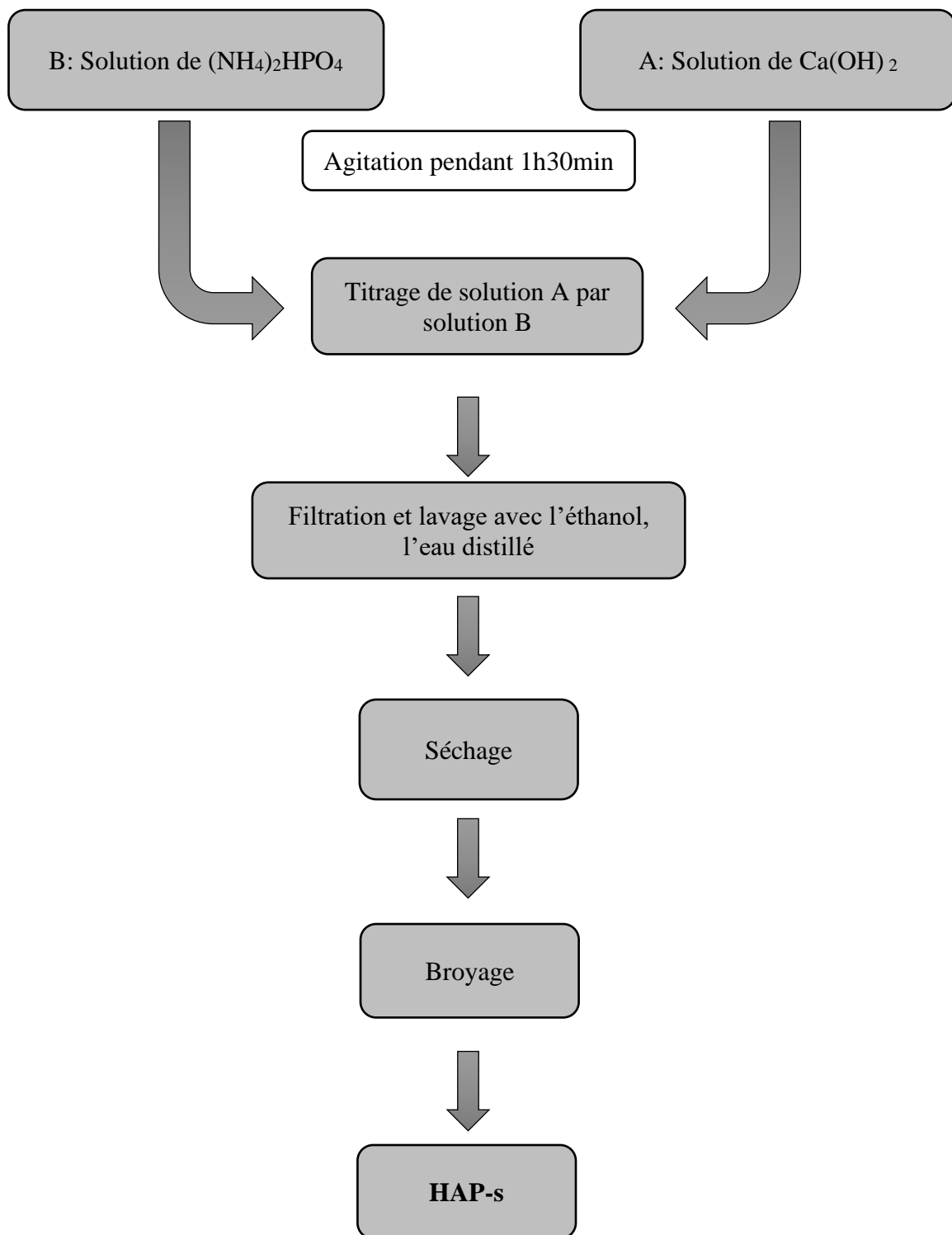
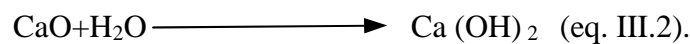
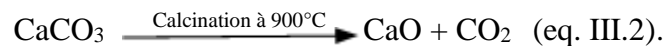


Figure III. 3 : schéma représentant les étapes de préparation de l'hydroxyapatite synthétisé.

III.2.1.2. Hydroxyapatite naturelle

Les apatites sont des minéraux secondaires qui existent à l'état naturel, mais leur concentration n'est pas suffisante pour une exploitation industrielle. Afin de répondre au besoin industriel, différents précurseurs ont été utilisés à savoir les nitrates de calcium, les carbonates de calcium, la chaux et les produits à base de phosphate. La cherté de ces produits a poussé les chercheurs à trouver des alternatives naturels tels que les coquilles d'œufs, les coquillages, le corail, la nacre et les os de bovins comme des sources de calcium. Dans ce présent travail, nous avons utilisé un produit naturel « **les coquillages** » (comme sources de calcium). Notons que la coquille des mollusques est constituée d'un assemblage intime et complexe de carbonate de calcium (CaCO_3) et de matière organique (protéines essentiellement) et que leur calcination à 900°C génère la transformation de CaCO_3 en CaO (eq. III.2). De plus, l'hydratation de ce dernier permet la formation calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (eq. III.3).



Les coquillages de mollusques ramassés sont lavés ébullition afin d'éliminer toutes les impuretés solubles dans l'eau. Ces dernières sont ensuite séchées dans une étuve à 40°C pendant 24 h, puis concassées, broyées tamisées et calcinées à 900°C pendant 30 min. Ces différentes étapes sont rassemblées dans la figure suivante.

La poudre obtenue est ensuite utilisée comme source de calcium $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pour la synthèse du HAP-N en adoptant le même mode opératoire décrit précédemment (celui élaborer pour la synthèse de l'HAP-S). Les différentes étapes de synthèse de la poudre d'apatite naturelle sont récapitulées dans l'organigramme suivant

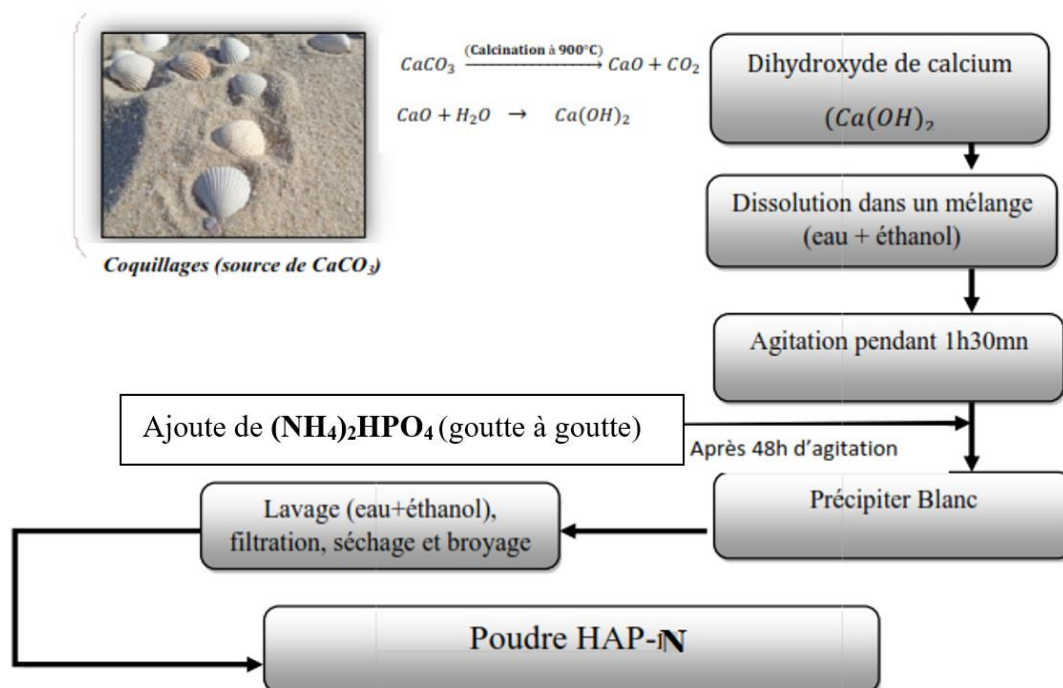


Figure III.4: Synthèse de matériau HAP-N

III.2.1.3. Hydroxyapatite dopée par ZnCl₂

Les poudres HAP-zn dopées et co-dopées au Zn ont été préparées selon le procédé de précipitation en utilisant les produits CaCl₂.2H₂O (99% de pureté ; Mm=111 g/mol) et (NH₄)₂HPO₄ (98% de pureté ; Mm=132.06 g/mol) comme sources de calcium et de phosphore respectivement.

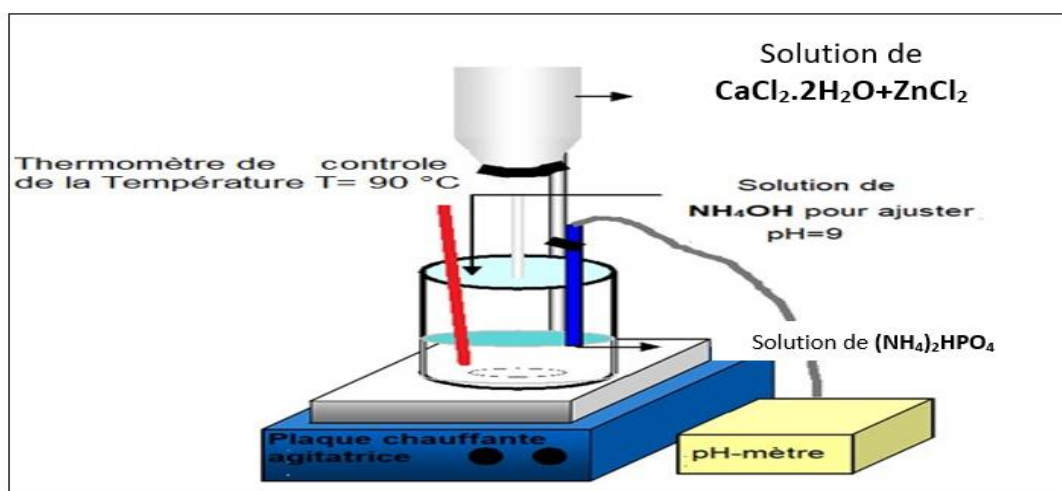


Figure III.5: Synthèse de matériau HAP-Zn

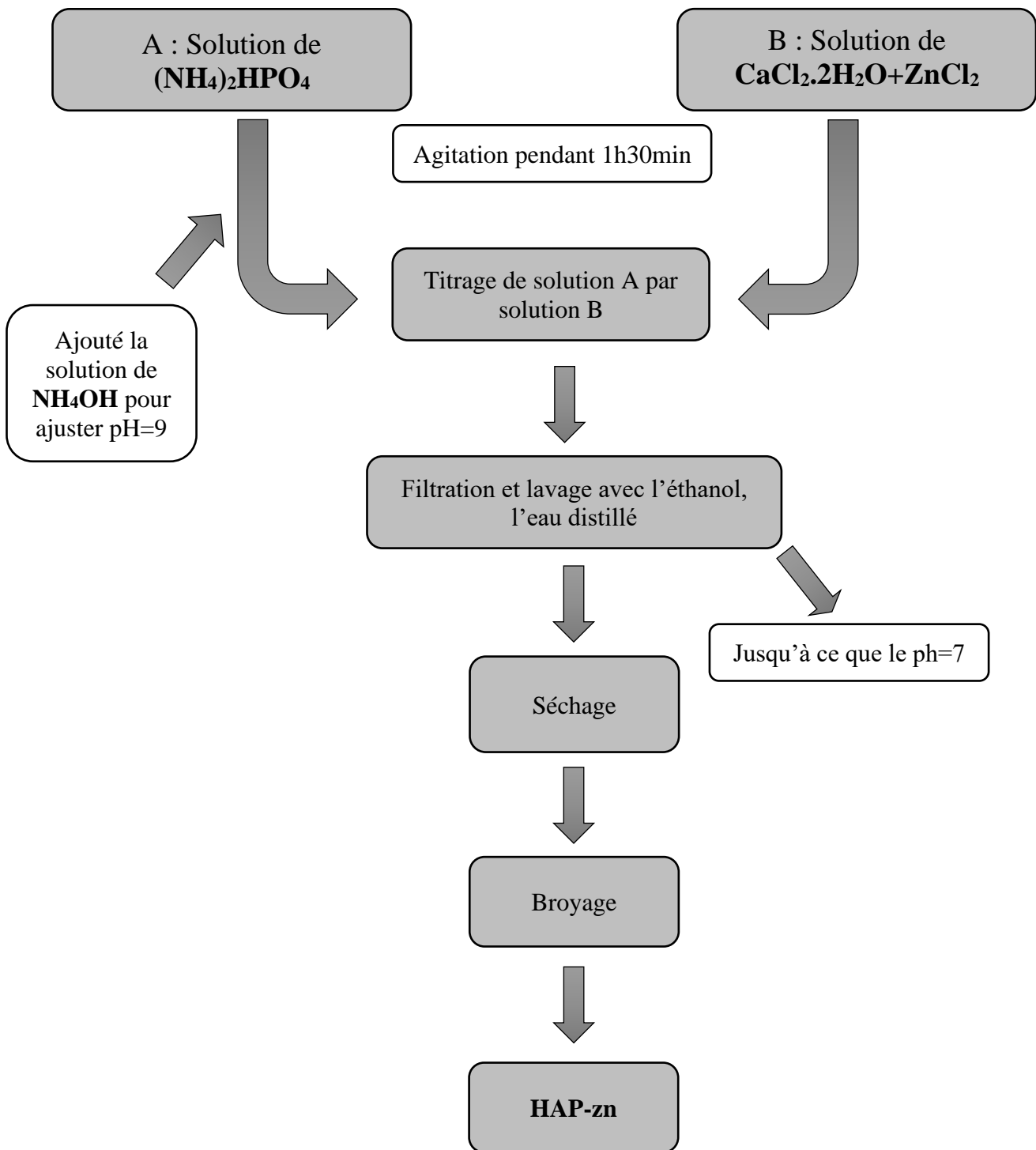


Figure III. 6 : schéma représentant les étapes de préparation de HAP-zn

III.3. Les techniques de caractérisation

Dans ce travail, nous avons exploité une certaine technique d'analyses physico-chimique telles que : spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier, diffraction des rayons X

III.3.1. Analyse spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge est une méthode couramment utilisée pour l'identification des molécules organiques et inorganiques en se basant sur leurs caractéristiques vibrationnelles. Elle est souvent utilisée en conjonction avec d'autres méthodes telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse. En effet, en irradiant un échantillon avec des rayonnements infrarouges, on peut exciter des modes de vibrations spécifiques des liaisons chimiques, tels que les modes de déformation et d'élongation. En comparant les rayonnements incidents et transmis à travers l'échantillon, il est possible de déterminer les principales fonctions chimiques présentes dans cet échantillon.

Par ailleurs, le proche infrarouge peut être utilisé pour évaluer la teneur en lipides des aliments ou des animaux vivants de manière non destructive. Par exemple, il peut être utilisé pour mesurer la teneur en lipides d'un saumon atlantique élevé en captivité sans causer de dommages à l'animal [1]. Les molécules présentent des transitions entre leurs états de vibration dans la gamme de l'infrarouge moyen. Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés en utilisant un spectromètre FTIR Impact 4000 de Nicolet. Les échantillons étudiés étaient des argiles sous forme de pastilles, préparées en comprimant les échantillons avec du bromure de potassium (KBr) dans un rapport de 2 mg de produit pour 300 mg de KBr. Les mesures ont été réalisées dans la plage de nombres d'onde allant de 4000 à 400 cm^{-1} . [2].

L'appareil spectrophotométrique IR utilisé dans ce travail pratique est de la référence Shimadzu série FTIR-8300. Le domaine de scanne est entre 400-4000 cm^{-1} .



Figure III .7 : L'appareil est de mark **SHIMADZU FTIR-8300S PC**.

IV.3.2. Analyse par diffraction des rayons X

La diffractométrie de rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique qui s'applique exclusivement aux matériaux cristallisés tels que les catalyseurs [3,4], les minéraux, les métaux, les céramiques [5], les polymères semi-cristallins, les produits organiques cristallisés et les semi-conducteurs [6]. En revanche, cette méthode n'est pas adaptée à l'analyse des matériaux amorphes tels que les liquides, les polymères amorphes et les verres. Cependant, il convient de noter que la matière amorphe peut diffuser les rayons X, ce qui permet une utilisation partielle de la technique dans ces cas-là, notamment lorsque la matière présente une cristallisation partielle.

L'un des avantages de la diffractométrie de rayons X est sa capacité à distinguer des produits ayant la même composition chimique brute, mais une structure cristalline différente. Par exemple, elle peut être utilisée pour différencier différentes formes de silice (telles que le quartz et la cristobalite) qui partagent la même formule brute SiO_2 . De même, elle permet de caractériser différents types d'aciers (comme l'acier ferritique et l'austénite) [7,9], des alliages [9] et différentes formes d'alumine (comme le corindon et l'alumine α , γ , δ , θ ...) qui partagent la même formule brute Al_2O_3 . Nous préparons l'échantillon soit sous forme de poudre aplatie dans une coupelle, soit sous forme d'une plaquette solide plate. Les rayons X sont dirigés vers l'échantillon, et un détecteur mesure l'intensité des rayons X dans différentes directions en faisant le tour de l'échantillon. Pour des raisons pratiques, l'échantillon peut être également tourné, ou éventuellement, le tube produisant les rayons X peut être tourné. Les rayons X, tout comme les autres ondes électromagnétiques, provoquent des oscillations du nuage électronique par rapport au noyau des atomes. Ces oscillations induites entraînent la réémission d'ondes électromagnétiques de même fréquence, un phénomène connu sous le nom de diffusion Rayleigh.

Les rayons X avec une longueur d'onde λ peuvent se réfléchir sur des plans réticulaires spécifiques, déterminés par la loi de Bragg, selon un angle θ . [10].

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (\text{eq.III.})$$

Avec :

n : nombre entier positif qui désigne l'ordre de l'intensité maximale diffractée ;

λ : longueur d'onde du rayon X ;

d : distance entre plans réticulaires ;

θ : angle entre le rayon X et le plan réflecteur.

Les diffractogramme des poudres étudiées sont enregistrés avec la radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5406\text{\AA}$) sur un diffractomètre de marque Expertpro-analytical type MPD/système vertical θ/θ et sur un intervalle angulaire compris entre 0 et 50° .



Figure III.8 : Appareil d'analyse DRX

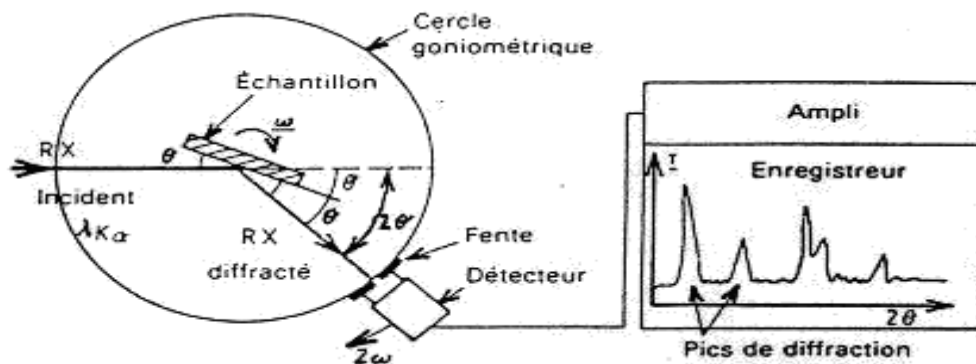


Figure III.9: Schéma d'un diffractomètre à compteur.

III.4. Activité antimicrobienne

III.4.1. La méthode utilisée

III.4.1.1. Méthode de diffusion en milieu solide :

Nous avons employé la méthode de diffusion en milieu solide (milieu Muller-Hinton) afin d'évaluer l'activité antibactérienne. Après avoir inoculé les suspensions bactériennes à la surface du milieu de culture, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques contenant les échantillons à tester.

Les cultures ont été diluées dans 20 ml de milieu GN à l'aide d'une pipette Pasteur [11]. Ensuite, des puits de 6 mm de diamètre ont été formés dans la gélose Muller Hinton, et la même quantité d'échantillon des différents matériaux (HAP-n, HAP-s, HAP-c, HAP-Zn) a été introduite dans les puits des boîtes de Pétri stériles de 90 mm. Les plaques de Pétri ont ensuite été placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La présence de zones d'inhibition autour des échantillons a été observée visuellement.



Figure III.10 : matériel utilisé dans la partie biologique (l'activité antimicrobien)

III.5. Les souches microbiennes

Dans notre étude, nous avons examiné trois souches bactériennes ainsi qu'une souche fongique. Les souches utilisées étaient des souches de référence. Pour l'essai antibactérien, nous avons utilisé des bactéries Gram-négatives telles qu'*Escherichia coli*, des bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus aureus*, ainsi qu'une souche de *Candida*, qui est un genre de levures.

➤ *Escherichia coli*

L'*Escherichia coli*, également connu sous le nom d'E. Coli, est une bactérie fréquemment présente dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux à sang chaud. Certaines souches d'E. Coli, appelées entérohémorragiques (ECEH), peuvent provoquer des diarrhées sanglantes et produire une toxine puissante responsable du syndrome hémolytique et urémique (SHU). De manière régulière, des souches d'E. Coli sont à l'origine d'intoxications alimentaires, souvent causées par la consommation de produits animaux insuffisamment cuits ou crus.

➤ **Staphylococcus aureus**

Staphylococcus aureus est l'espèce type du genre *Staphylococcus*, communément appelée staphylocoque doré, et elle produit de nombreuses toxines. Cette bactérie est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées, et dans certains cas extrêmes, elle peut provoquer des infections potentiellement mortelles. Communément appelée staphylocoque doré, et elle produit de nombreuses toxines. Cette bactérie est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées, et dans certains cas extrêmes, elle peut provoquer des infections potentiellement mortelles.

➤ **Candida albicans**

Candida est un genre de levures, et l'espèce la plus significative est *Candida Albican*. Elle est largement répandue chez les individus et se trouve normalement en tant que commensal bien toléré par les personnes en bonne santé dans la bouche, sur la peau, dans le système digestif et dans la flore vaginale. La présence et la prévalence de *Candida* peuvent varier en fonction des espèces et des conditions individuelles.

III.6. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons présenté les différents protocoles expérimentaux de la préparation de L'hydroxyapatite et les techniques d'analyse des matériaux (IR, DRX). Ainsi, nous avons discuté le protocole et les méthodes utilisées dans la partie anti bactérienne.

Référence

- [1] Solberg, C., E. Saugen, et al. (2003). "Determination of fat in live farmed Atlantic salmon using non-invasive NIR techniques." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(7): 692-696.
- [2] Ramdani Amina. (2012). Réduction de la salinité des eaux saumâtres sahariennes par rétention d'ions fluorures sur des matériaux naturels activés : comparaison avec les procédés membranaires. Thèse de Doctorat, Option : Chimie physique appliquée, Université UDL- Sidi-Bel-Abbès, Algérie.
- [3] Hävecker, M., S. Wrabetz, et al. (2012). "Surface chemistry of phase-pure M1 MoVTeNb oxide during operation in selective oxidation of propane to acrylic acid." *Journal of Catalysis* 285(1): 48-60.
- [4] d'Alnoncourt, R. N., L.-I. Csepei, et al. (2014). "The reaction network in propane oxidation over phase-pure MoVTeNb M1 oxide catalysts." *Journal of Catalysis* 311: 369-385.
- [5] Aissat, M., S. Hamouda, et al. (2019). "Characterization and application of ceramic membranes prepared from Algerian kaolin." *Cerâmica* 65: 554-561.
- [6] Fermin, J. R., C. D. Rincón, et al. (2019). "Microstructural Analysis of AgIn₅VI₈ (VI: S, Se, Te) Ternary Semiconductors by X-Ray Diffraction." *Materials Research* 22.
- [7] Fontes, M. A., V. H. B. Scheid, et al. (2019). "Morphology of the DIN 100Cr6 Case hardened steel after plasma nitro carburizing process." *Materials Research* 22.
- [8] Han-guang, F., Y. Yong-wei, et al. (2019). "Effect of quenching process on microstructure and performance of high-boron high-speed steel." *Matéria (Rio de Janeiro)* 24.
- [9] Iwamoto, G. Y., C. d. A. Rodrigues, et al. (2019). "New peritectoid reaction identified at the MnSb alloy." *Materials Research* 22.
- [10] Ushimaru, P. I., M. T. N. d. Silva, et al. (2007). "Antibacterial activity of medicinal plant extracts." *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 717-719.
- [11] Al, M. L., D. Daniel, et al. (2009). "Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania." *Food chemistry* 112(4): 863-867.
- [12] Leclerc, H., Izaerd, D., Huddon, M., Walter, P., and Jakube, E. (1993). Préparation des suspensions microbiennes. In "Microbiologie générale" (Dunod, ed.), pp. 12-23, Paris.

CHAPITRE IV
RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV. Introduction

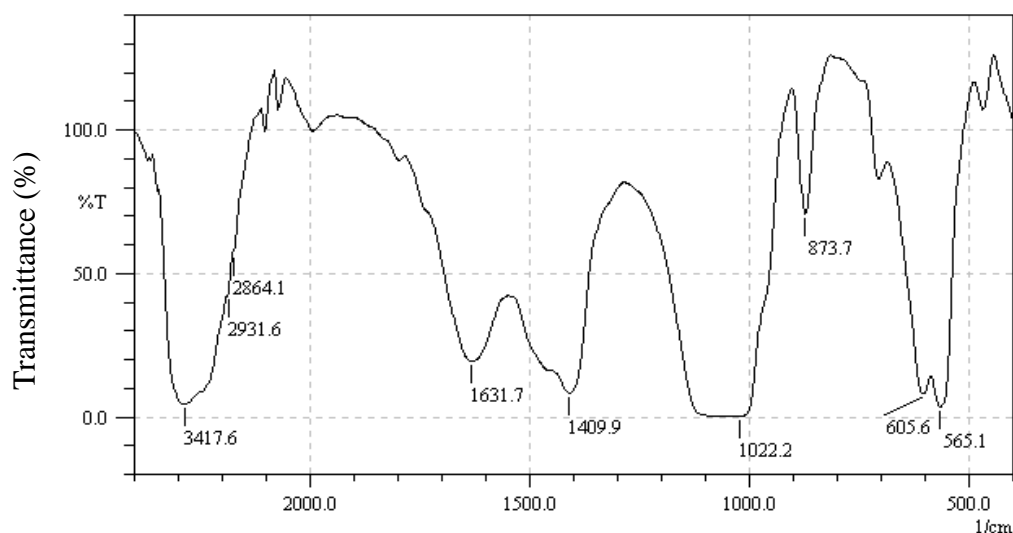
Ce dernier chapitre présente les résultats obtenus sur la caractérisation des matériaux synthétisés à base de l'hydroxyapatite caractérisation réalisée, La dernière partie regroupe les résultats issus de l'application de l'activité biologique antibactérienne en utilisant les différents germes de souche bactérienne vis-à-vis de différentes hydroxyapatites commerciale, naturelle et synthétisée par zinc.

IV.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

Les spectres IRTF des différents échantillons étudiés (HAp-S, HAp-N, HAp-C et HAp-Zn) sont illustrés dans les figures IV.1 à IV.4.

Les figures (IV.1- IV.4) représentent les spectres IR des poudres d'hydroxyapatite élaborées et commerciales.

Le spectre de l'HAP naturelle (figure IV.1) se caractérise par deux bandes : large intense à 3417.6 et fine intense à 1631.7 cm^{-1} dues à la présence des groupements OH^- de l'eau adsorbée dans le réseau solide [1,2]. Nous notons deux autres bandes à 3417.6 et 565.1 cm^{-1} correspondantes à la vibration d'élongation des liaisons O-H des HAP et à 1631.7 cm^{-1} des bandes de forte intensité de la liaison C-O, correspondent au groupement CO_3^{2-} et se situent à 1409, 1022, 873 et 708 cm^{-1} [3]. Nous relevons également les bandes suivantes : $\nu_1 = 873.7 \text{cm}^{-1}$, $\nu_2 = 605.6 \text{cm}^{-1}$, $\nu_3 = 1022.2 \text{cm}^{-1}$ et $\nu_4 = 565.1 \text{cm}^{-1}$ qui sont attribuées au groupement $(\text{PO}_4)^{3-}$ [4-6].



Nombre d'onde (cm^{-1})
Figure IV.1 : Spectre de l'IR de HAp-N

La figure (IV.2) représente le spectre IR des poudres d'hydroxyapatite élaborées par l'hydroxyde de calcium. Le spectre de l'HAP se caractérise par deux bandes : large intense à 3460.1 et fine intense à 1598.9 cm^{-1} dues à la présence d'eau dans le réseau solide. Nous notons deux autres bandes à 3460 et 603.7 cm^{-1} correspondantes à la vibration d'élongation des liaisons O-H des HAP et à 1463, 1020, 873 et 708 cm^{-1} des bandes fines de la liaison C-O, correspondent au groupement CO_3^{2-} [3]. Nous relevons également les bandes suivantes : $\nu_1 = 873.7 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_2 = 603.7 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_3 = 1118.6$ et 1020.3 cm^{-1} et $\nu_4 = 603.7 \text{ cm}^{-1}$ qui sont attribuées au groupement $(\text{PO}_4)^{3-}$ [4-6].

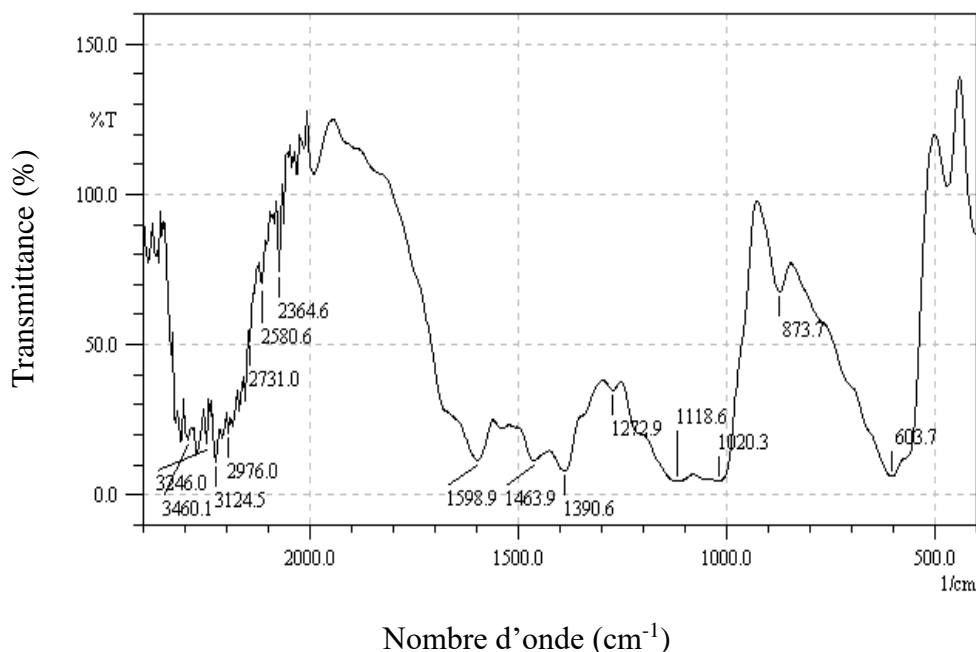


Figure IV.2 : spectre IR de HAp-S.

Les résultats de la figure IV.3 montrent que les bandes relatives à l'étirement (stretching) et déformation du groupe OH et de l'eau liée adsorbée peuvent être observées à 3569, 631, 1593 et 3159 cm^{-1} respectivement. Les bandes d'absorption situées à 1093 cm^{-1} et 1034 cm^{-1} sont les vibrations d'étirement de P=O [7]. En outre, $\nu_1 = 893 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_2 = 603.7 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_3 = 1348.1$ et 1037.6 cm^{-1} et $\nu_4 = 569 \text{ cm}^{-1}$ sont les vibrations de flexion de PO dans les groupes PO_4^{3-} . De plus, une autre bande faible apparaît à 2340 cm^{-1} appartenant au CO_2 physisorbé. Les bandes intenses situées à 1400–1458 cm^{-1} correspondent aux vibrations de valence du CO_3^{2-} .

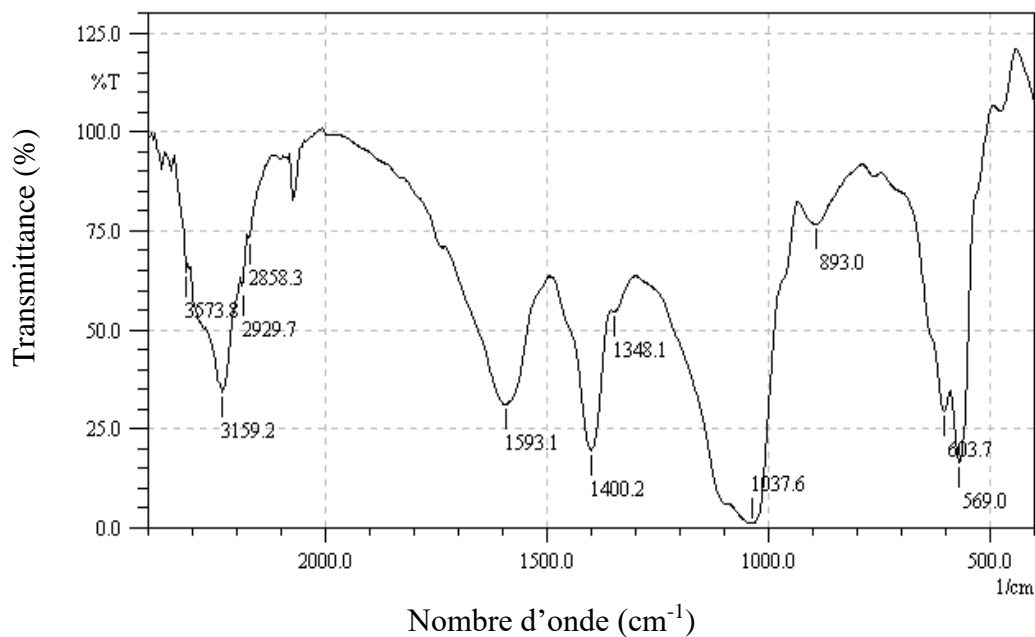


Figure IV.3 : Spectre IR des poudres d'hydroxyapatite commercialisé HAp-C.

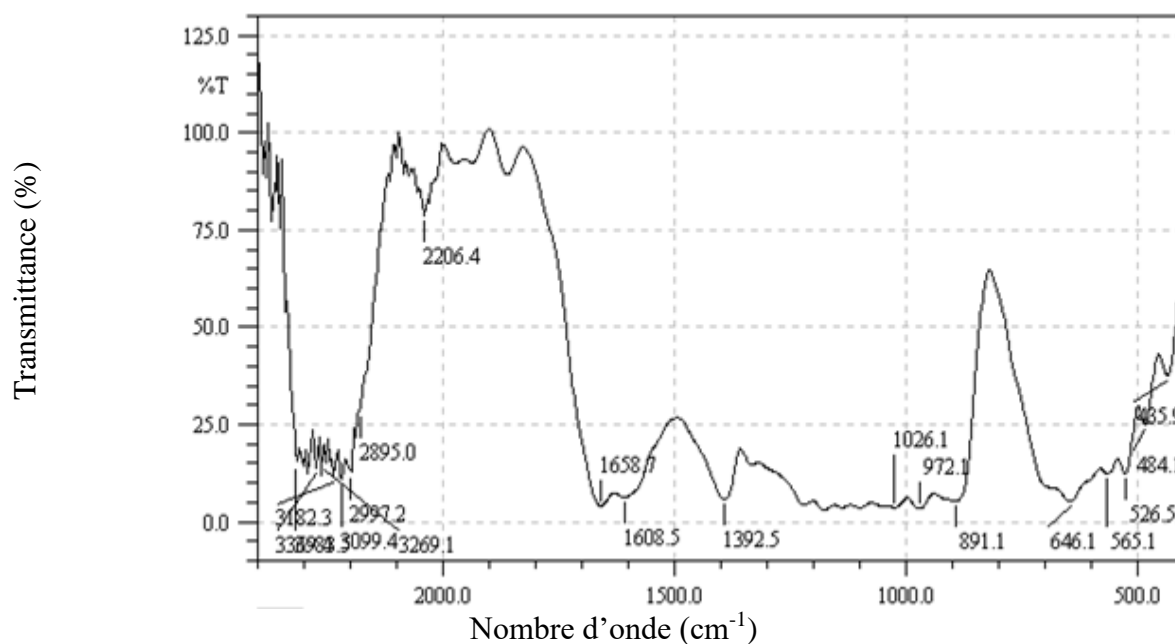


Figure IV.4 : Spectre IR des poudres HAp-Zn.

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

Les bandes relatives aux phosphates (PO_4^{3-}) correspondent à 598, 605, 977 et (1020-1120) cm^{-1} confirment donc la présence de la phase apatite. Les bandes attribuées au groupement PO_4^{3-} sont apparues à 1039 cm^{-1} et à 1089 cm^{-1} comme le montre la figure IV.4 [7]. La bande de vibration fondamentale de groupe HPO_4^{2-} qui est située dans la

région 972 cm^{-1} et dans la gamme $1190\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ apparaît moins intense. Les bandes situées à 630 et à 3470 cm^{-1} sont représentatives des groupements OH^- de la phase apatite et de l'eau adsorbée, qui apparaissent pratiquement dans tous les spectres IR-TF des différentes séries de HAps étudiées. Cependant, la réduction de la résolution aux environs de 645 cm^{-1} peut être attribuée au mode de libération des ions OH^- [8, 9]. Les bandes associées à OH^- apparaissant aux alentours de 3569 cm^{-1} sont plus larges et indiquent que l'incorporation des ions de Zn. Les bandes liées à l'eau d'hydratation (molécules adsorbées sur les cristaux) sont bien visibles dans les spectres IRTF dans les intervalles 3000 et 3500 cm^{-1} (HAps-Zn).

Une bande située à 3500 cm^{-1} est attribuée aux molécules d'eau adsorbées sur les cristaux HAps-Zn. La bande attribuée aux carbonates (CO_2^{3-}) est plus prononcée à environ 1658 cm^{-1} [10]. Les bandes apparaissant aux alentours de 400 à 500 cm^{-1} sont plus fines et indiquent que l'incorporation des ions de Zn par substitution dans la structure apatite a induit des changements significatifs.

IV.2. Analyse par diffraction par des rayons X

Afin d'étudier la structure de l'hydroxyapatite et les caractéristiques chimiques et physiques, un échantillon d'hydroxyapatite a été utilisé comme échantillon de référence tout au long de cette étude. Nous le notons par HAp.

La figure IV.5 montre que les valeurs de l'angle de Bragg 2θ (en degrés) attribuées à la phase hydroxyapatite donnent les principaux pics de l'hydroxyapatite stœchiométrique qui apparaissent à : 26 ; 29 ; 32 ; 34 ; 40 ; 47 ; 48 et 50 et correspondent aux différents plans (hkl) : (002) (210), (112), (202), (310), (222), (312) et (321), respectivement répertoriés par la base de données de fichiers de diffraction standards JCPDS (PDFN°70-0794) [11,3].

Les diffractogrammes des échantillons HAps commerciale et HAps synthétisée sont illustrés dans les figures (d'IV.6 à IV.9)

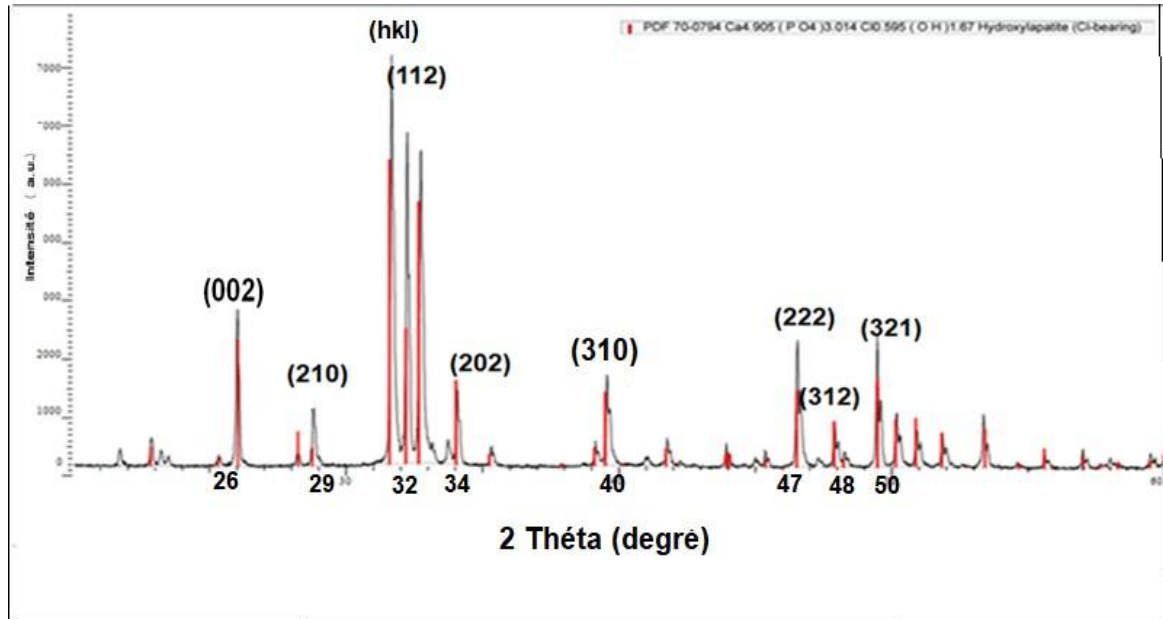


Figure IV.5 : Diffractogrammes des poudres HAp de référence.

L'examen de ces courbes DRX fait apparaître les principaux pics caractéristiques de l'hydroxyapatite HAp répertoriés par le comité mixte sur les normes de diffraction des poudres (JCPDS), PDF no°70-0794 pour HAp stœchiométrique [12].

Les résultats montrent que les pics cristallographiques à $2\theta = 26 ; 29 ; 32 ; 34 ; 40 ; 47 ; 48$ et 50 et correspondent aux différents plans (hkl) : (002), (210), (112), (202), (310), (222), (312) et (321), respectivement, sont attribués aux plans de différentes hydroxyapatites (HAp-N, HAp-S, HAp-C et HAp-Zn). Tous les pics peuvent être bien indexés sur la phase hexagonale de l'hydroxyapatite cristalline qui coïncidait avec les données standards de la JCPDS n°09-0432 [11,12]. Le diffractogramme présente les pics intenses des hydroxyapatites élaborées indiquant une bonne cristallinité. Elles sont composées essentiellement d'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ qui cristallise dans un système hexagonal compact.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus antérieurement par certains auteurs [12-13].

La comparaison des spectres de différentes apatites commerciales et synthétisées (HAp-C, HAp-N, HAp-S et HAp-Zn) montre l'apparition des pics secondaires à environ $29,3^\circ ; 36^\circ ; 43,1^\circ$ et $48,4^\circ$ qui sont attribués aux pics de diffraction des carbonates de calcium (calcite).

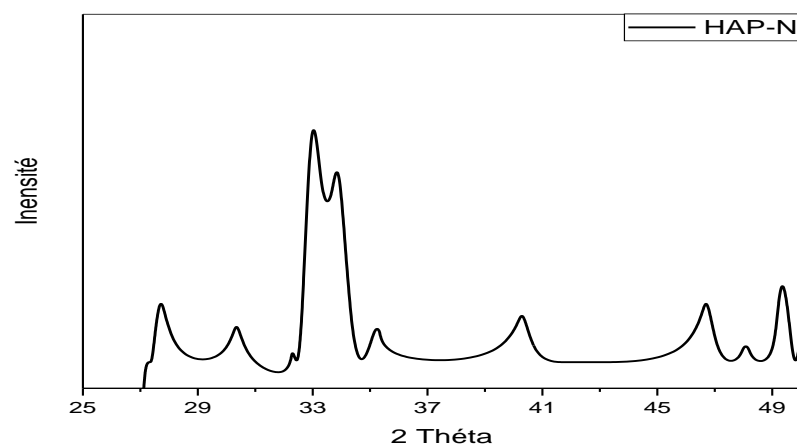


Figure IV.6: Diffractogrammes de l'hydroxyapatites élaborée naturelle HAp-N

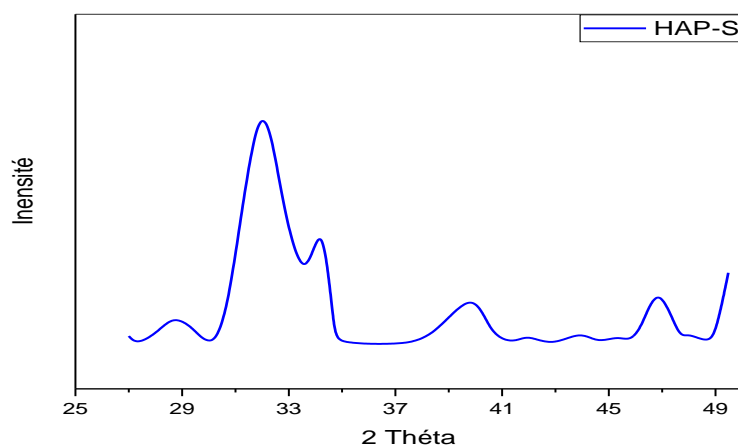


Figure IV.7: Diffractogrammes de l'hydroxyapatites élaborée HAp-S

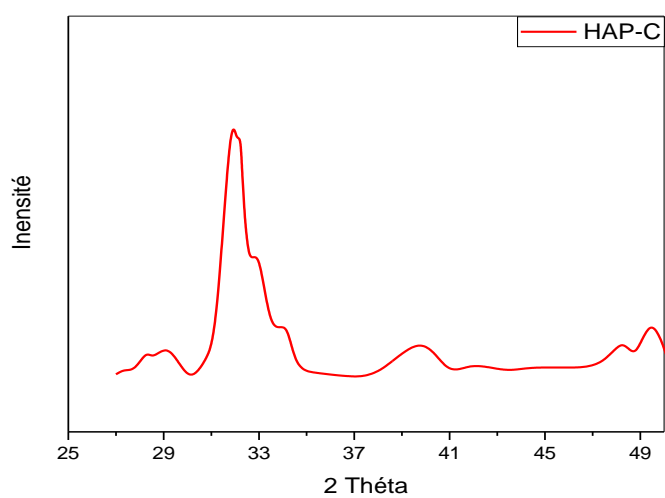


Figure IV.8: Diffractogrammes de l'hydroxyapatites commerciale HAp-

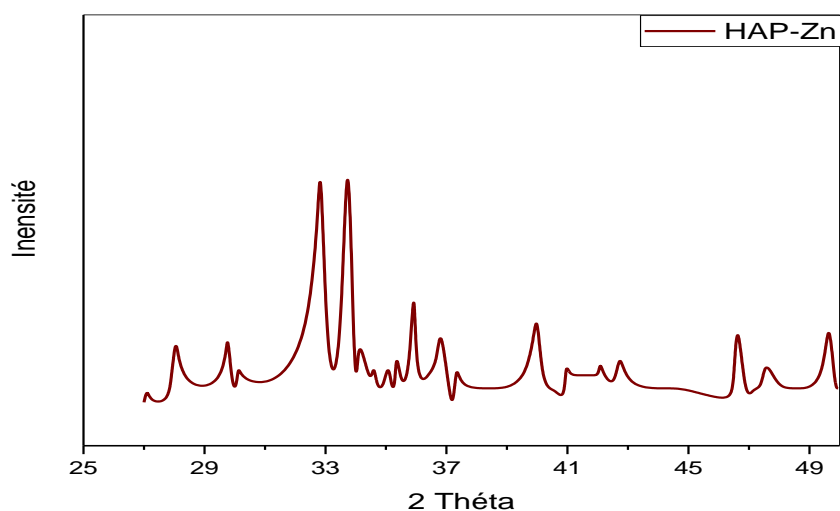


Figure IV.9: Diffractogrammes de l'hydroxyapatites dopée par le Zinc HAp-Zn

Les pics caractéristiques des supports HAp-Zn montrent par-là, la conservation de leurs structures apatitiques après les opérations de substitutions isomorphiques. Le diffractogrammes de l'hydroxyapatite dopée par le Zinc montre que toutes Les raies sont comparables à celles rapportées antérieurement par d'autres auteurs ayant travaillé sur les HAp substitués par le zinc [14]. Ces pics correspondent au modèle HAp standard (PDF # no° 70-0794 ; Figure IV.5). Ils révèlent clairement que l'incorporation des ions Zn ne modifie pas la cristallinité des nano cristaux de HAp

IV.3. Analyse le résultat de l'activité antimicrobien

L'activité antimicrobienne de différentes poudres de HAP synthétisé et commerciale dans la présente étude par la méthode de neutralisation, a été testé in vitro contre deux germes de bactérie "E. Coli ; S. Aureus ; et aussi sur une levure notée C. Albicans".

IV.3.1. Résultat de l'activité antimicrobien

IV.3.1.1. Résultats des échantillons se forme solide

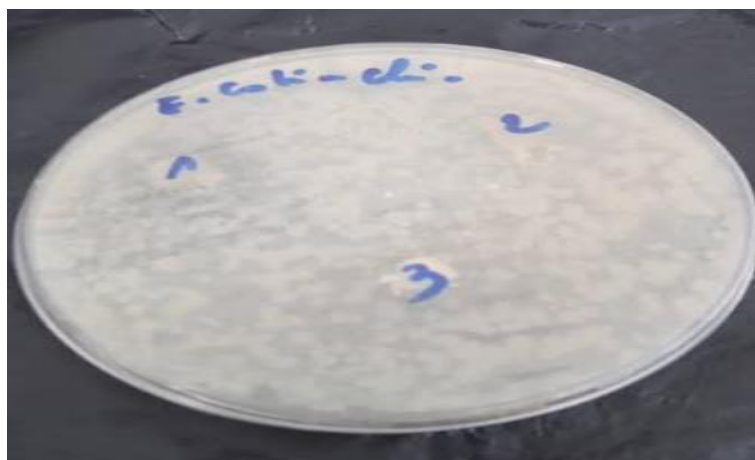


Figure IV.10 : Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'E. Coli.

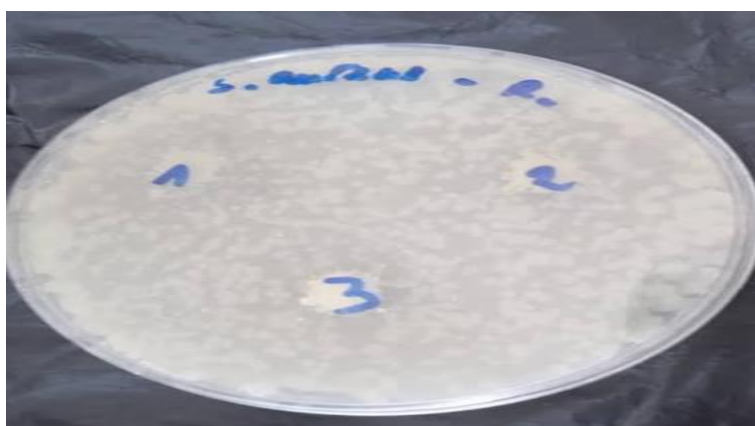


Figure IV.11 : Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'S. Aureus.

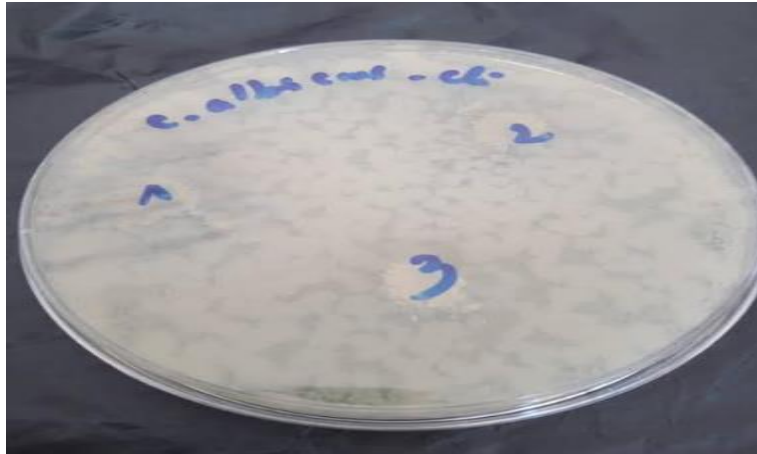


Figure IV.12: Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'*C. Albicans*.

Lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode solide, des résultats négatifs ont été observés dans les trois échantillons testés.

Malheureusement, aucune activité inhibitrice significative n'a été détectée contre les trois germes ciblés dans cette étude.

Les échantillons n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la croissance des bactéries, indiquant l'absence de composés antimicrobienne actifs dans ces échantillons.

Ces résultats indiquent la nécessité d'étudier d'autres sources potentielles d'agents antimicrobienne ou de revoir les méthodes d'extraction et de préparation des échantillons pour améliorer les chances de détection des composés actifs.

Tableau IV.1: la zone d'inhibition par rapport les poudres de HAP

	1	2	3
E. Coli	-	-	-
S. aureus	-	-	-
C.albicans	-	-	-

1 : Hydroxyapatite de source naturel (HAp-N)

2 : Hydroxyapatite synthétisée (HAp-S)

3 : Hydroxyapatite produite commerciale (HAp-C)

IV.3.1.2. Résultats des échantillons se forme dissous

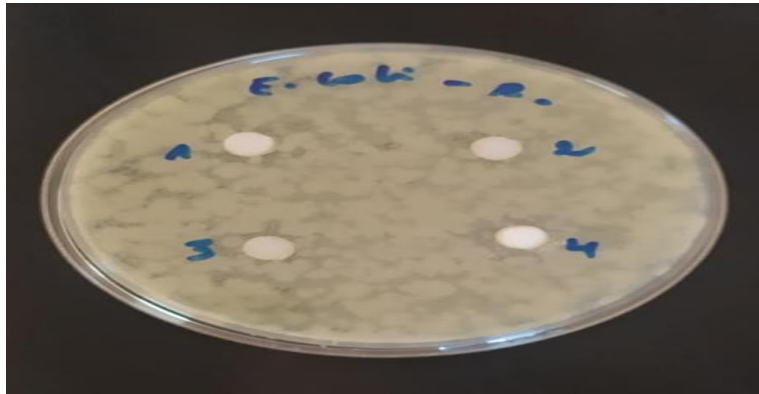


Figure IV.13 : Influence de différents échantillons liquides sur la croissance d'E. Coli.

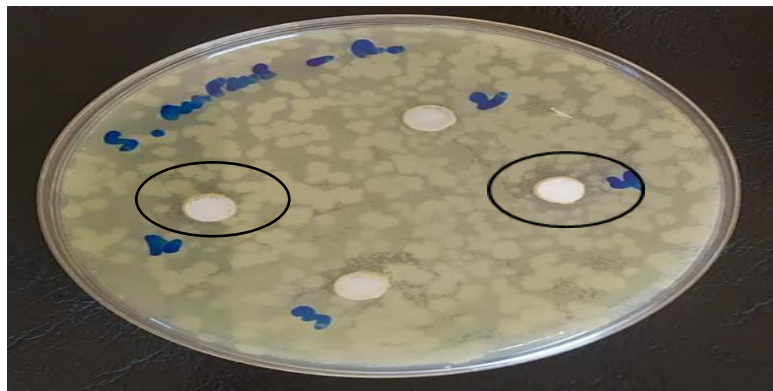


Figure IV.14: Influence de différent échantillon liquide sur la croissance d'S. Aureus

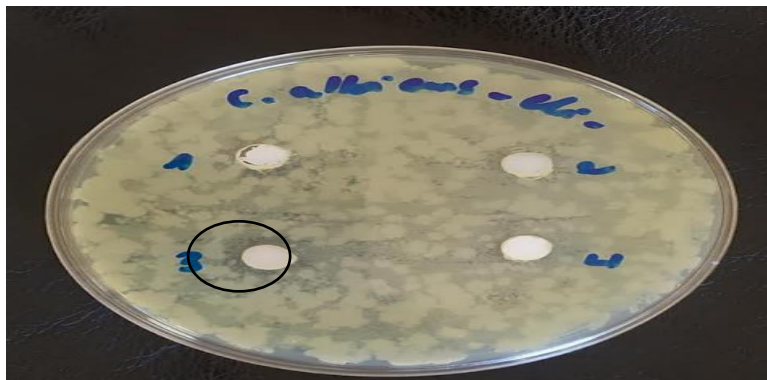


Figure IV.15: Influence de différent échantillon solide sur la croissance d'C. Albicans.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode solide aussi mais les échantillons préalablement lyophilisés ont été dissous dans une solution contenant du DMSO (diméthylsulfoxyde).

Les observations indiquent que l'échantillon d'hydroxyapatite synthétisé par le zinc et l'hydroxyapatite commerciale sont attaqués par la bactérie *S. Aureus* avec une zone d'inhibition de 13 mm et 10 mm respectivement, tandis que ces hydroxyapatites (HAp-C et HAp-Zn) ne montre aucun résultat positif sur les deux souches testées *E. Coli* et *C. albicans*.

De plus, l'échantillon de l'hydroxyapatite naturelle HAp-N n'a présenté aucun effet inhibiteur sur les trois germes testés.

Quant à l'échantillon d'hydroxyapatite synthétisé par hydroxyde de calcium (HAp-S) est attaquée par la levure *C. albicans* avec une zone d'inhibition de 11 mm, tandis que cette hydroxyapatite ne montre aucun n'ont montré aucune activité bactérienne contre les deux souches bactériennes testées *E. Coli* et *S. Aureus*.

L'activité antibactérien est influencée par l'effet de l'ion dopant et donc par des changements au niveau des propriétés cristallines de poudres d'hydroxyapatite.

Tableau IV.2: la zone d'inhibition par rapport les poudres de HAP

	1	2	3	4
E. Coli	-	-	-	-
S.aureus	13 mm	-	-	10mm
C.albicans	-	-	11mm	-

1 : Hydroxyapatite synthétisée par zinc (HAp-Zn)

2 : Hydroxyapatite de source naturelle "coquillage" (HAp-N)

3 : Hydroxyapatite synthétisée par hydroxyde de calcium (HAp-S)

4 : Hydroxyapatite produite commercialisé (HAp-C)

IV.4. Conclusion

Dans ce chapitre les biomatériaux à base d'hydroxyapatite ont été caractérisés utilisant deux méthodes IR et DRX. Il est utile d'utiliser de différents biomatériaux à base d'hydroxyapatite comme inhibiteur microbien. D'une manière générale, les résultats obtenus de l'application biologique s'avèrent être une solution prometteuse dans le domaine biologique et biomédical.

Référence

- [1] Amina Ramdani, Zoubida Taleb, Abdelkrim Guendouzi, Abdelkader Kadeche, Hayat Herbache, Asmaa Mostefai, Safia Taleb, and Andre Deratani, Mechanism study of metal ion adsorption on porous hydroxyapatite: experiments and modeling, *Can. J. Chem.* Vol. 98, 2020.
- [2] Amina Ramdani, Abdelkader Kadeche, Mehdi Adjdir, Zoubida Taleb, Djamila Ikhrou, Safia Taleb and André Deratani, Lead and cadmium removal by adsorption process using hydroxyapatite porous materials, *Water Practice & Technology* Vol 15 No 1, pp. 130-141
- [3] Tabrizi BN, Sheikh FA, Kahrizsangi RE (2013) A comparative study of hydroxyapatite nanostructures produced under different milling conditions and thermal treatment of bovine bone. *J Ind Eng Chem.* Volume 20, Issue 1, 25 January 2014, Pages 245-258. 33,34,37,50.
- [4] A.Niakan S. Ramesh Sangeetha Vasudevaraj Naveen Saktiswaren Mohan Tunku Kamaru, Osteogenic priming potential of bovine hydroxyapatite sintered at different temperatures for tissue engineering applications, *Materials Letters*, Volume 197, 15 June 2017, Pages 83-86
- [5] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res. A* 62 (2002) 600–612.
- [6] Marcelo F. Cipreste, Anderson M. Peres, Alexandre A.C. Cotta, Fermin H. Aragon, Alan de M. Antunes, Alexandre S. Leal, Waldemar A.A. Macedo, Edesia M.B. de Sousa, Synthesis and characterization of 159 Gd-doped hydroxyapatite nanorods for bioapplications as theranostic systems, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 181, 15 September 2016, Pages 301-311.
- [7] Burcu Cengiz, Yavuz Gokce Nuray, Yildiz Zeki Aktas, Ayla Calimli, Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* Volume 322, Issues 1–3, 5 June 2008, Pages 29-33
- [8] Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Gazzano, M., « Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Organical Chemical Acta*, V.60, n°3, (2007), 1009-1016.
- [9] Siddharthan, A., Seshadri, S., Sampath, Kumar, T., “Rapid synthesis of calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles by microwave irradiation. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*”, V.18, n°2, (2005), 110-113.
- [10] Raynaud, S., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Thomas, P., “Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio Synthesis, characterisation and thermal stability of powders”, *Biomaterials*, V. 23 n° 4, (2002), 1065-1072.
- [11] N. Jing, A.N. Zhou, Q.H. Xu, The Synthesis of Super-small Nano Hydroxyapatite and its High Adsorptions to Mixed Heavy Metallic Ions, *J. Hazard. Mater.* Vol. 353, pp. 89-98, Jul. 2018.

[12] Koutsopoulos, S., "Synthesis and Characterisation of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on the Analytical Methods", *Journal Biomedical Material Research*, V.62, n° 4, (2002), 600-612.

[13] Smiciklas, I., Onjia, A., Raicevic, S., "Experimental Design Approach in the Synthesis of Hydroxyapatite by Neutralization Method", *Separation and Purification Technology*, V.44 (2), (2005), 97-102.

[14] Matsunaga, K., "First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate", *Journal Chemistry Physical*, V.128, (2008).

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Le but de notre travail est de synthétiser des biomatériaux à base de l'hydroxyapatite et comparer leur comportement structural avec l'hydroxyapatite commerciale en appliquant les techniques de caractérisation (DRX et IRTF), et aussi à leur effet sur l'activité antimicrobienne comme inhibiteur microbien pour évaluer leur impact avec certaines bactéries et microbes.

En premier lieu, nous avons réussi à élaborer un bio-nanomatériau à base d'hydroxyapatite. Les résultats obtenus à partir la caractérisation de ce nanomatériau montrent que la présence des groupes fonctionnels OH^- et PO_4^{3-} sur la surface de différentes apatites a été confirmée par l'analyse infrarouge transformée de Fourier (IRTF). Tous les pics de DRX peuvent être bien indexés sur la phase hexagonale de l'hydroxyapatite cristalline avec le groupe d'espace P63/m qui coïncidait avec les données standards de la carte JCPDS n° 09-0432, ce qui indique la bonne cristallinité de ces biomatériaux.

Les résultats issus de l'effet de l'application biologique indiquent que l'échantillon de l'hydroxyapatite synthétisé par le zinc et l'hydroxyapatite commerciale sont attaqués par la bactérie *S. Aureus* avec une zone d'inhibition de 13 mm et 10 mm respectivement, tandis que ces hydroxyapatites (HAp-C et HAp-Zn) ne montre aucun résultat positif sur les deux souches testées *E. Coli* et *C. albicans*.

De plus, l'échantillon d'hydroxyapatite naturelle HAp-N n'a présenté aucun effet inhibiteur sur les trois germes testés.

Quant à l'échantillon d'hydroxyapatite synthétisé par hydroxyde de calcium (HAp-S) est attaquée par la levure *C. albicans* avec une zone d'inhibition de 11 mm, tandis que cette hydroxyapatite ne montre aucun n'ont montré aucune activité bactérienne contre les deux souches bactériennes testées *E. Coli* et *S. Aureus*. L'activité antibactérienne est influencée par l'effet de l'ion dopant et donc par des changements au niveau des propriétés cristallines de poudres d'hydroxyapatite.

L'étude comparative des résultats des différents tests d'activité antimicrobienne *in vitro* sur des bactéries pathogènes et fongiques suggère la possibilité de l'utilisation de ces nanoparticules dans le domaine biomédical.

Plusieurs remarques observées au cours de cette étude laissent la voie libre à une poursuite des travaux.

Nous proposons ici plusieurs perspectives.

1-Élaboration de nouvelles séries d'hydroxyapatites ou des céramiques phosphocalciques destinées essentiellement à l'ingénierie tissulaire osseuse.

2-Etude de l'influence des propriétés physicochimiques des biomatériaux sur le comportement biologique in vitro et in vivo.

3-Le nanomatériau à base de l'hydroxyapatite présente un potentiel en tant qu'un nouvel adsorbant biocompatible et son utilisation semble être une solution intéressante pour le traitement des eaux usées industrielles.

ملخص

هدف عملنا هو توليف مواد حيوية قائمة على هيدروكسيباتيت ومقارنة سلوكها الهيكلي مع هيدروكسيباتيت التجارية، وكذلك تأثيرها على النشاط المضاد للميكروبات ضد بعض البكتيريا والميكروبات. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها على سطح مختلف الأباتيت تم OH^- و PO_4^{3-} من خلال توصيف هذه المواد النانوية أن وجود المجموعات الوظيفية يمكن تحديد جميع ذروات الانكسار بشكل جيد على (IRTF) تأكيده بواسطة تحليل الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه JCPDS والتي تتطابق مع بيانات البطاقة القياسية P63/m المرحلة السداسية للهيدروكسيباتيت البلورية بمجموعة فضاء رقم 09-0432، مما يشير إلى جودة بلورية جيدة لهذه المواد الحيوية. يتأثر النشاط المضاد للبكتيريا بتأثير الأيونات بين نتائج المشوبة وبالتالي التغيرات على مستوى الخصائص البلورية لمساحيق هيدروكسيباتيت. تشير دراسة المقارنة اختبارات النشاط المضاد للميكروبات المختلفة في الأنبوب في المختبر على البكتيريا الممرضة و الفطريات إلى إمكانية استخدام هذه الجسيمات النانوية في مجال الطب الحيوي.

Résumé

Le but de notre travail est de synthétiser des biomatériaux à base de l'hydroxyapatite et comparer leur comportement structural avec l'hydroxyapatite commerciale ainsi que leur effet sur l'activité antimicrobienne sur certaines bactéries et microbes. Les résultats obtenus à partir la caractérisation de ces nanomatériaux montrent que la présence des groupes fonctionnels OH^- et PO_4^{3-} sur la surface de différentes apatites a été confirmée par l'analyse infrarouge transformé de Fourier (IRTF). Tous les pics de DRX peuvent être bien indexés sur la phase hexagonale de l'hydroxyapatite cristalline avec le groupe d'espace P63/m qui coïncidait avec les données standards de la carte JCPDS n ° 09-0432, ce qui indique la bonne cristallinité de ces biomatériaux. L'activité antibactérienne est influencée par l'effet de l'ion dopant et donc par des changements au niveau des propriétés cristallines de poudres d'hydroxyapatite. L'étude comparative des résultats des différents tests d'activité antimicrobienne in vitro sur des bactéries pathogènes et fongiques suggère la possibilité de l'utilisation de ces nanoparticules dans le domaine biomédical.

Abstract

The purpose of our work is to synthesize biomaterials based on hydroxyapatite and compare their structural behavior with commercial hydroxyapatite, as well as their effect on antimicrobial activity against certain bacteria and microbes. The results obtained from the characterization of these nanomaterials show that the presence of functional groups OH⁻ and PO₄³⁻ on the surface of different apatites has been confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). All the peaks in the X-ray diffraction (XRD) patterns can be well indexed to the hexagonal phase of crystalline hydroxyapatite with the space group P6₃/m, which coincided with the standard data from the JCPDS card number 09-0432, indicating the good crystallinity of these biomaterials. The antibacterial activity is influenced by the doping ion effect and thus changes in the crystalline properties of hydroxyapatite powders. The comparative study of the results from different in vitro antimicrobial activity tests against pathogenic bacteria and fungi suggests the possibility of using these nanoparticles in the biomedical field.